

초어 tlr5a 및 tlr5b의 발현특성

지명환, 장성훈

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《양어과학과 기술에 대한 연구사업을 강화하고 선진적인 물고기기르기기술을 적극 받아들여 우리 나라의 양어사업을 최신과학기술에 기초하여 발전시켜나가도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》증보판 제20권 178~179페이지)

포유동물에서 tlr5는 세균편모를 인식하고 염증성세포인자들과 I형인터페론을 발현시켜 병원성세균에 대한 유기체의 면역을 조절한다.

우리는 초어를 연구대상으로 하여 병원성세균에 대한 물고기의 면역에서 중요한 역할을 하는 tlr5a와 tlr5b의 발현특성을 보았다.

재료와 방법

실험에 리용한 프라이머는 Primer premier 5.0으로 설계하였다.(표)

표. 유전자발현분석에 리용된 프라이머

프라이머 이름	배열(5'→3')	증폭대상
Q β -actin-F	AGCCATCCTTCTTGGGTATG	β -악틴 유전자
Q β -actin-R	GGTGGGGCGATGATCTTGAT	
MyQF	TGGAGGACTGTCGCCGAAATG	MyD88 유전자
MyQR	TGTGGCCTCTGGACGAGTTTC	
QTNF- α -F	CATCCATTTAACAGGTGCATAC	TNF- α 유전자
QTNF- α -R	GCAGCAGATGTGGAAGAGAC	
QIL-1 β -F	GATTTCGAAAGTTCGATTCAATCT	IL-1 β 유전자
QIL-1 β -R	TTCAGTGACCTCCTTCAAGAC	
QNK-IF	GGCAGATGTAAACGCAAAG	NF-kB 유전자
QNK-IR	GCCGAAGGTCAGGTGGTA	
QIKB-IF	GGCAGATGTAAACGCAAAG	I-kB 유전자
QIKB-IR	GCCGAAGGTCAGGTGGTA	
Qt5aF	TGACGCAGCAAATGTTCAAGC	tlr5a 유전자
Qt5aR	GAGAACCTGGGAGCAAAGCAA	
Qt5bF	CATTATCTCATGTTTCCTATG	tlr5b 유전자

반정량RT-PCR(sqRT-PCR)법[2]으로 매 감염 단계에서 여러가지 조직들에서의 초어 tlr5a 및 tlr5b mRNA량을 분석하였다. 조건이 달라져도 발현량이 변화되지 않는 β -악틴

유전자의 발현량을 측정하기 위하여 건강한 정상물고기와 비루스 및 세균에 의하여 감염된 물고기들에서 분리한 1 μ g의 총RNA속에서 β -악틴유전자의 mRNA량을 측정하였다. β -악틴유전자는 cDNA량을 표준화하기 위한 대조로 리용하였다. β -악틴유전자를 특이적으로 증폭하기 위하여 상류프라이머인 Qb-actinF와 하류프라이머인 Qb-actinR를 리용하였다.(표) 초어 tlr5a 및 tlr5b와 MyD88, NF-kB, IL-1 β , TNF- α 들의 발현상태를 검측하기 위한 프라이머들도 표에 제시하였다.

결과 및 론의

1) 초어 tlr5a, tlr5b mRNA의 조직별발현특성

반정량RT-PCR(sqRT-PCR)법으로 건강한 초어의 각이한 조직들에서 tlr5a의 mRNA량을 측정하는데 의하면 두신과 신장, 아가미, 뱀, 심장에서 발현량이 많았다.(그림 1) 마찬가지로 건강한 초어의 각이한 조직들에서 tlr5b의 mRNA량을 측정하는데 의하면 두신과 신장, 근육, 아가미에서 발현량이 많았다.(그림 2)

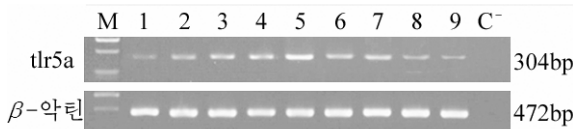


그림 1. 초어의 각이한 조직들에서 tlr5a mRNA의 발현특성

1-간장, 2-뇌수, 3-아가미, 4-심장, 5-두신, 6-뱀, 7-신장, 8-근육, 9-비장, C⁻-음성대조

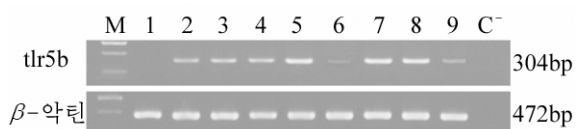


그림 2. 초어의 각이한 조직들에서 tlr5b mRNA의 발현특성

1-간장, 2-뇌수, 3-아가미, 4-심장, 5-두신, 6-뱀, 7-신장, 8-근육, 9-비장, C⁻-음성대조

tlr5a, tlr5b의 조직별발현특성이 유사한 경향성을 띠는것은 이 유전자들이 유사한 구조를 가지고있으면서 거의 유사한 기능을 수행한다[1]는것을 보여준다.

tlr5a와 tlr5b가 두신이나 비장과 같은 면역기관뿐만아니라 병원체와 직접적으로 접촉하는 아가미나 뱀, 근육에서도 발현된다는것은 이것들이 병원체에 대한 면역과 관련된 기능을 수행한다는것을 보여준다.

2) 병원체에 의하여 감염된 초어에서 tlr5a 및 tlr5b의 발현특성

아가미썩음병균에 의하여 감염된 초어에서 tlr5a 및 tlr5b의 발현 아가미썩음병균(*Flavobacterium columnare*)으로 초어를 감염시킨 후 0, 12, 24, 48h만에 아가미에서 총RNA를 분리하고 역전사를 진행하였다. 다음 tlr5a 및 tlr5b의 mRNA량을 반정량RT-PCR(sqRT-PCR)법으로 측정하였다. 아가미에서 tlr5a의 발현은 감염 후 12h때부터 높아지기 시작하여 36h만에 최대로 되었다가 점차 낮아졌다.(그림 3)

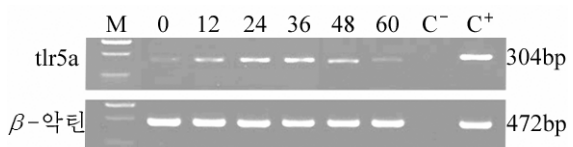


그림 3. 아가미썩음병균(*F. columnare*)으로 감염시킨 후 아가미에서 tlr5a의 발현특성

M-표식자, 수-감염후 시간(h), C⁻-음성대조, C⁺-양성대조

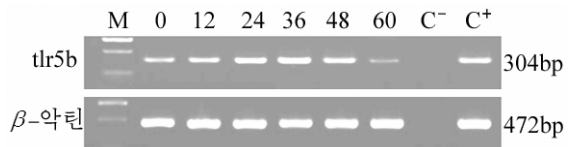


그림 4. 아가미썩음병균(*F. columnare*)으로 감염시킨 후 아가미에서 tlr5b의 발현특성

수와 문자들의 의미는 그림 3에서와 같음

tlr5b의 발현도 감염 후 12h부터 높아지기 시작하여 36h만에 최대로 되었다가 점차 낮아졌다.(그림 4)

tlr5a와 tlr5b의 발현이 그 신호통로에 미치는 영향을 보기 위하여 tlr5와 직접 결합되는 MyD88(골수분화인자88)과 톨류사접수체신호통로에서 결정적역할을 하는 NF-kB(핵인자-kB), 시토카인류들인 IL-1 β (인터로이킨-1 β)와 TNF- α (종양괴사인자- α)들의 시간별발현상태를 동시에 보았다.(그림 5)

그림 5에서 보는바와 같이 MyD88의 mRNA량은 감염 후 24h부터 많아지기 시작하여 36h만에 최대로 되었다가 48h만에는 감소되기 시작하였다. NF-kB의 mRNA량은 감염 후 12h부터 많아지기 시작하여 24~48h에는 높은 수준에서 유지되었다.

IL-1 β 의 mRNA량은 감염 후 12h부터 많아지기 시작하여 36h때 최대로 되었다가 48h부터는 감소되기 시작하였다. TNF- α 의 mRNA량은 감염 후 12h부터 많아지기 시작하여 24h만에 최대로 되었다가 36h부터는 감소되기 시작하였다.

톨류사접수체신호통로에서 접수체 tlr5a, tlr5b와 직접적으로 결합되는 MyD88의 mRNA량변화는 이 접수체들의 mRNA량변화와 유사한 경향성을 나타내었는데 이것은 접수체에 의하여 병원성세균이 특이적으로 인식된 후 신호통로를 따라 신호가 전달된다는 것을 보여준다.

톨류사접수체들의 신호통로에서 NF-kB는 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 신호통로가 활성화되지 않았을 때 NF-kB는 I-kB와 결합되어 불활성화상태로 있다가 신호통로가 활성화되면 두 단백질사이의 결합이 해제되면서 유리상태로 된다. 유리상태의 NF-kB는 핵막을 통과하여 핵속으로 들어가 게놈DNA의 특정한 위치에 결합되어 전사인자로 된다. 결과 시토카인의 합성량이 늘어나며 염증성반응이 일어난다.[3]

감염 후 24h때부터 NF-kB의 mRNA량이 높은 수준에서 유지된다는것은 tlr5a, tlr5b에 의하여 유도되는 신호통로가 활성화되었다는것을 보여준다. 또한 IL-1 β , TNF- α 와 같은 시토카인들의 mRNA량이 늘어났다는것은 초어유기체에서 염증성반응이 진행된다는것을 보여준다.

이상의 실험을 통하여 우리는 그람음성세균인 아가미씩음병균에 의하여 감염된 초어에서 tlr5a와 tlr5b의 발현이 시간에 따라 높아지며 신호통로관련유전자들과 시토카인유전자들의 발현도 높아져 전체 신호통로가 활성화된다는것을 확정하였다.

맺 는 말

1) 초어 tlr5a 및 tlr5b는 두신이나 비장을 비롯한 면역기관들에서 많이 발현되며 병원체에 대한 면역기능을 수행한다.

2) 아가미씩음병균에 의하여 감염된 초어에서 tlr신호통로가 활성화되며 결과 염증성 시토카인들의 발현이 높아진다.

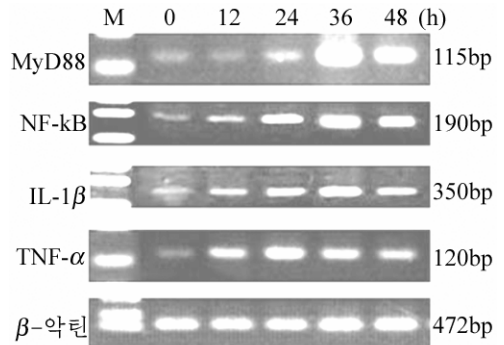


그림 5. tlr5a와 tlr5b의 발현이 그 신호통로에 미치는 영향

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), **62**, 4, 102, 주체105(2016).
- [2] A. H. Meijer et al.; Mol. Immunol., **40**, 773, 2004.
- [3] S. I. Yoon et al.; Science, **335**, 859, 2012.

주체106(2017)년 1월 5일 원고접수

Expression of tlr5a and tlr5b from Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*

Ji Myong Hwan, Jang Song Hun

The tlr5a and tlr5b of grass carp had their highest expressions in immune organs (i. e. head kidney and spleen), and involved the activation of the immune system in response to various pathogens. tlr signaling pathway was activated in the grass carp challenged by gill rot bacterias, finally upregulated proinflammatory cytokines.

Key words: grass carp, tlr5a, tlr5b, tlr signaling pathway