

참돔(*Pagrus major*) Interferon regulatory factor 3 (IRF3) 유전자의 분자적 특성 및 발현 분석

김경호 · 조동희 · 주민수 · 최광민* · 박찬일** · 김무찬†
경상대학교(학생) · *경상대학교(연구원) · **†경상대학교(교수)

Molecular Characterization and Expression Analysis of the Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) Gene from Red sea Bream *Pagrus major*

Kyung Ho KIM · Dong-Hee CHO · Min-Soo JOO · Kwang-Min CHOI* · Chan-Il PARK** · Mu-Chan KIM†
Gyeongsang National University(student) · *Gyeongsang National University(researcher) ·
**†Gyeongsang National University(professor)

Abstract

Interferon regulatory factor 3 (IRF3) plays an important role in inducing the transcription of type I interferon (IFN) and IFN-stimulated genes (ISGs) following infection. We analysed the open reading frame (ORF) cDNA, genomic structure, and temporal variations in the mRNA transcription of IRF3 after challenge with *Streptococcus iniae* (*S. iniae*), *Edwardsiella piscicida* (*E. piscicida*), and red sea bream iridovirus (RSIV) in red sea bream *Pagrus major* (Pm). *P. major* IRF3 (PmIRF3) consisted an ORF of 1398 bp, encoding a polypeptide of 465 amino acids with an isoelectric point of 4.7 and theoretical molecular weight of 51.6 kDa. The strongest expression of PmIRF3 mRNA in healthy red sea bream was observed in the whole blood. The expression pattern of PmIRF3 mRNA after infection with pathogens was analysed in the gills, liver, kidney, and spleen. The quantitative real-time PCR (RT-qPCR) results showed that PmIRF3 mRNA expression was significantly elevated in the liver 1 h post-*E. piscicida* injection ($P < 0.001$). PmIRF3 expression increased significantly in most tissues 1 h post-*S. iniae* injection. PmIRF3 expression was also upregulated in the liver 12 h post-RSIV injection. These results indicate that IRF3 may play an important role in the immune response of *P. major* following pathogenic infections.

Key words : Interferon regulatory factor 3, Red sea bream, *Edwardsiella piscicida*, *Streptococcus iniae*, Red sea bream iridovirus (RSIV)

I. 서론

Interferons (IFN)는 면역세포를 활성화하고 바이러스 복제를 직접 억제할 수 있는 사이토카인의 한 종류로 구조와 기능에 따라 type I IFN과 type II IFN의 두 가지 유형으로 분류된다(Inkpen

et al., 2015). 병원체에 감염된 세포는 type I IFN을 생성하는 반면, type II IFN은 활성화된 T-세포와 NK세포에 의해 생성된다(Lengyel, 1982; Pestka et al., 1987). Interferon regulatory factors (IRF) family는 숙주 면역반응에 관여하는 IFN 유전자의 활성화에 중요한 역할을 한다고 알려져

† Corresponding author: 055-772-9135, kmc81@gnu.ac.kr

※ 이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원 '관상어 전자도감 개발(No. 20200470)'의 지원을 받아 수행된 연구임.

있다(Yeow et al., 2000). IRF family는 type I IFNs (IFN- α , β)와 IFN stimulated genes (ISGs)의 전사를 조절하는 핵심인자로 작용하여 항바이러스 반응, 면역 반응, 세포의 성장 조절 및 세포자살에 중요한 역할을 하는 선천성 면역 및 적응 면역의 중요한 구성 요소이다(Mamane et al., 1999; Barnes et al., 2002; Tamura et al., 2008; Battistini, 2009). 경골어류에서는 넙치(*olive flounder Paralichthys olivaceus*)에서 처음으로 IRF1이 확인되었으며(Yabu et al., 1998), 이후 IRF family가 다양한 어종에서 보고되었다. 현재까지 척추동물에서 11개의 IRF family (IRF1 - 11)가 확인되었으며(Huang et al., 2010), 인간과 생쥐에서 9개의 IRF family, 경골어류에서 11개의 IRF family가 보고되었다(Ordas et al., 2006; Stein et al., 2007; Sun et al., 2007; Jia and Guo, 2008; Shi et al., 2008; Nehyba et al., 2009; Bergan et al., 2010; Shi et al., 2010; Huang et al., 2010; Gan et al., 2012; Ruan et al., 2017). IRF는 N-terminal ~ 120 amino acid (aa)에서 DNA-binding domain (DBD)을 포함하고 5개의 tryptophan (W) 잔기가 보존되어 있다(Nehyba et al., 2002). IRF family의 C-terminal 부분에는 IRF-association domain (IAD)가 있으며, 그 중 IRF3 - 10은 IAD1을 가지고 IRF1, 2, 11에는 IAD2가 존재한다(Tamura et al., 2008; Nehyba et al., 2009; Bathige et al., 2012). IRF family의 DBD와 IAD 영역에서 중간 아미노산 서열의 보존은 상대적으로 DBD 보다 IAD에서 덜 보존되어 있다고 알려져 있으며(Nehyba et al., 2002). 이는 C-terminal에서 IAD의 서열과 구조적 특징에 따라 기능이 달라져 IRF family를 IFN 유전자 전사를 활성화시키는 그룹(IRF1, 3, 7, 9, 10), 억제하는 그룹(IRF 2, 8) 및 활성화와 억제를 모두 하는 다기능 인자로 다양한 기능을 하는 그룹(IRF2, 4, 5, 8)으로 분류된다고 알려져 있다(Nehyba et al., 2002; Huang et al., 2010; Hu et al., 2013). IRF family 중 IRF3와 7은 N-terminal DBD 영역에서 아미노산 서열의 상동성이 높다고 알려져 있다

(Bergan et al., 2010). 그 중 IRF3는 주로 세포질에 존재하며 다양한 조직에서 편재적으로 발현된다(Au et al., 1995). 바이러스 감염 후, IRF3는 I κ B kinase (IKK) 또는 TANK-binding kinase 1 (TBK1)에 의해 C-terminal serine (S) 및 threonine (T) 잔기에서 인산화되어 IRF3 homo/hetero-dimers를 형성하여 핵의 표적 DNA sequence에 결합하기 위한 전사 복합체를 형성한다(Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003; McWhirter et al., 2004). 이후, IRF3 dimers는 핵으로 이동하여 IFN- β 를 유도하고, 생성된 IFN- β 는 표적 세포에서 IRF7의 발현을 유도한다. 이는 IFN- α 와 IFN- β 의 발현을 촉진하여 바이러스 감염에 대응한다(Sato et al., 1998).

참돔(red sea bream *Pagrus major*)은 양식기술 발달로 1980년대 중반부터 대량 종묘생산 기술의 확립과 남해안 해상가두리를 중심으로 양식 산업화가 시작되어 고밀도 어류 양식이 이루어지고 있으며, 그에 따른 양식에 의한 수산물 생산량 비율은 매년 증가하고 있다. 그러나 양식 생산량 증가를 위해 고밀도 사육 및 과다한 사료투여 등으로 양식장 환경을 악화시켜 어류에 스트레스로 작용하여 이리도바이러스에 의한 바이러스성 질병, 연쇄구균에 의한 세균성 질병 및 백점충에 의한 기생충성 질병 등과 같은 다양한 전염성 질병이 매년 발병하여 대량 폐사로 인한 생산량 감소 등의 경제적인 영향을 미치게 되었다(Bae, 2004; Jung et al., 2012). 다양한 질병으로 인한 폐사를 줄이기 위해 무분별한 수산용 및 축산용 항생제와 화학요법제를 사용하여 생산량 증가에 이점이 있지만, 의약품의 오남용으로 인해 다제내성균 출현과 약물 잔류에 의한 양식생물과 수산식품의 공중 위생학적 안정성에 대한 심각한 문제를 일으킬 수 있으며 수생환경에 악영향을 끼칠 수 있다(Woodward, 1996; Kwon et al., 2014). 따라서 질병으로부터 참돔을 체계적으로 관리하기 위해서는 다양한 면역학적 연구가 필요하다.

본 연구에서는 참돔으로부터 IRF3 (PmIRF3)의 염기서열을 획득하여 분자유전학적 특성을 확인하였으며, 병원체 인위감염 후 PmIRF3의 유전자 발현 패턴을 분석하였다. 이러한 결과는 PmIRF3가 숙주내로 침입하는 병원체에 대한 면역반응에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 병원체

실험어는 경상남도 통영에 위치한 경상남도 수산자원연구소에서 분양받은 참돔으로 수산동물 병성감정 지침서와 OIE (World Organisation for Animal Health) 지침서를 참고하여 임상학적으로 건강한 참돔을 실험에 사용하였다. 참돔(체장: 22.4 ± 0.9 cm, 체중: 173.2 ± 31.1 g)은 경상대학교 해양생물교육연구센터 사육실내 원형 수조 (500 L)에서 수온 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 2주간 순치하였으며, 모든 동물실험은 경상대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 준수하여 수행하였다. 인위감염에 사용된 병원체, *Edwardsiella piscicida* (*E. piscicida*), *Streptococcus iniae* (*S. iniae*) 및 Red sea bream iridovirus (RSIV)는 국립수산과학원에서 분양받았으며, 실험에 사용될 때까지 -80°C 에 보존하였다.

2. PmIRF3의 sequence 및 phylogenetic 분석

PmIRF3의 open reading frame (ORF)은 lipopolysaccharide (LPS)에 자극된 참돔의 간으로부터 next generation sequencing (NGS) 분석을 통해 확보하였으며, PmIRF3의 cDNA 염기서열 검증에 위해 sanger sequencing을 수행하였다. 단백질의 분자량(molecular weight, MW)과 등전점(isoelectric point, pI)은 Expert Protein Analysis System ProtParam tool (ExPASy) (<http://web.expasy.org/protparam/>)을 이용하여 예측하였다. PmIRF3 서열과 다른 종의 IRF family members 서열과의 비교분석은 National Centre for Biotechnology

Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) algorithm을 이용하여 분석하였다. PmIRF3에서 보존되는 domain과 motif를 확인하기 위해 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)와 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)를 이용하여 분석하였으며, PmIRF3와 다른 종의 IRF3 아미노산과의 상동성을 확인하기 위해 GENETYX program version 8.0 (Genetyx Corporation, Japan)을 이용하여 multiple sequence alignment를 수행하였다. 계통발생학적 분석은 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 6.0 software (Tamura et al., 2013)를 이용하여 ClustalW algorithm과 neighbour-joining (NJ) 방법으로 작성하였으며, 2,000번의 bootstrap을 반복하여 분석하였다.

3. PmIRF3의 유전자 발현 분석

가. 정상어와 감염어의 조직별 발현 분석

(1) 조직 적출

정상 어체의 다양한 조직에서 PmIRF3 mRNA의 발현 분포를 확인하기 위해, 순치시킨 건강한 참돔 3마리를 무작위로 선별하였고 benzocaine (Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 마취시킨 후 두신, 체신, 비장, 아가미, 장, 심장, 근육, 피부, 간, 위, 뇌, 눈 및 혈액 총 13개의 조직을 무균적으로 적출하였다. 적출한 조직은 액체질소에 급속 냉각한 뒤 total RNA 추출에 사용하기 전까지 -80°C 에 보관하였다.

(2) 병원체 인위감염을 통한 면역반응 및 조직 적출

그람양성 및 음성세균과 바이러스 감염 이후 PmIRF3의 면역반응을 확인하기 위해, $100 \mu\text{L}$ 의 $1 \times$ phosphate-buffered saline (PBS)에 현탁한 *E. piscicida* (1.5×10^5 CFU/fish), *S. iniae* (1.5×10^5 CFU/fish) 및 RSIV (1×10^5 copies/fish)를 참돔에

복강 내 주사 주사하였고, 대조군으로는 100 μ L의 PBS를 복강 내 주사하였다. 접종 후 1, 12시간, 1, 3, 5, 7일마다 그룹별로 3마리의 참돔을 무작위로 선별하여 아가미, 간, 신장 및 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 조직들은 total RNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다.

(3) Total RNA 추출과 cDNA 합성

건강한 참돔 3마리에서 적출한 조직과 감염실험에서 적출한 조직들은 TRIzol-based (RNAiso Plus) reagent (Takara, Japan)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. Total RNA의 purity와 concentration는 NanoVue (GE Healthcare, UK)를 이용하여 측정하여 확인하였다. 추출한 total RNA는 PrimeScript™ first-strand cDNA synthesis kit (Takara)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 cDNA를 합성하였다. 이후, quantitative real-time PCR (RT-qPCR) assay를 수행하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

(4) RT-qPCR

참돔의 다양한 조직에서 IRF3의 mRNA 발현 분포를 확인하기 위해 PmIRF3 cDNA의 ORF sequence를 기반으로 Primer3 (ver. 0.4.0.) freeware (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)를 이용하여 specific primer를 제작하였다(<Table 1>). RT-qPCR은 Real-Time System TP950 Thermal Cycler Dice (Takara)와 TB Green premix Ex Taq™ (Takara)를 이용하여 RT-qPCR을 수행하였다. RT-qPCR를 수행하기 위한 조성과 반응은 TB Green premix 12.5 μ L, cDNA template 1 μ L, forward와 reverse primer 각각 1 μ L (10 pM), DEPC treated water 9.5 μ L으로 총 25 μ L를 이용하여, 95°C에서 10분 동안 initial denaturation 과정을 거친 후, 95°C에서 20초 동안 denaturation, 60°C에서 1분 동안 annealing을 총 45 cycles 실시하였다. Final dissociation 과정은 95°C에서 15초, 60°C에서 30초, 마지막으로 95°C에서 15초 동안 실시하였다. PmIRF3 mRNA의 상대적인 발현 수준은 참돔

housekeeping gene으로 알려진 elongation factor 1 alpha (EF-1 α)를 사용하였고(<Table 1>), 모든 PmIRF3 mRNA의 threshold cycle (Ct)은 EF-1 α mRNA의 Ct값과 비교하여 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method, [$\Delta\Delta$ Ct=2^{- $(\Delta$ Ct_{sample}- Δ Ct_{internal control})}] (Livak and Schmittgen, 2001)를 이용하여 정량화하였다.

4. 통계학적 분석

각 실험은 3회 반복 수행하였으며, 실험의 유의성을 확인하기 위해 통계분석은 SPSS software version 19 (IBM, USA)의 One-way ANOVA와 Duncan's multiple range test를 실시하였고, 모든 mRNA 상대 발현량은 평균(Mean) \pm 표준편차 (Standard deviation)로 나타내어 PmIRF3의 mRNA 상대 발현 수준을 통계분석 하였다. 모든 실험은 대조군과 비교하여 통계적인 유의성을 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 수준에서 검정하였다.

<Table 1> Primers used for qPCR amplification

Primer	DNA sequence (5'-3')
PmIRF3 forward	AGTTTGCGGAGCAGTTCCTA
PmIRF3 reverse	TTTGATCCAGCATCATTCCA
EF-1 α forward	CCTCAAGTACGCCTGGGTG
EF-1 α reverse	CTGTGTCCAGGGGCATCAAT

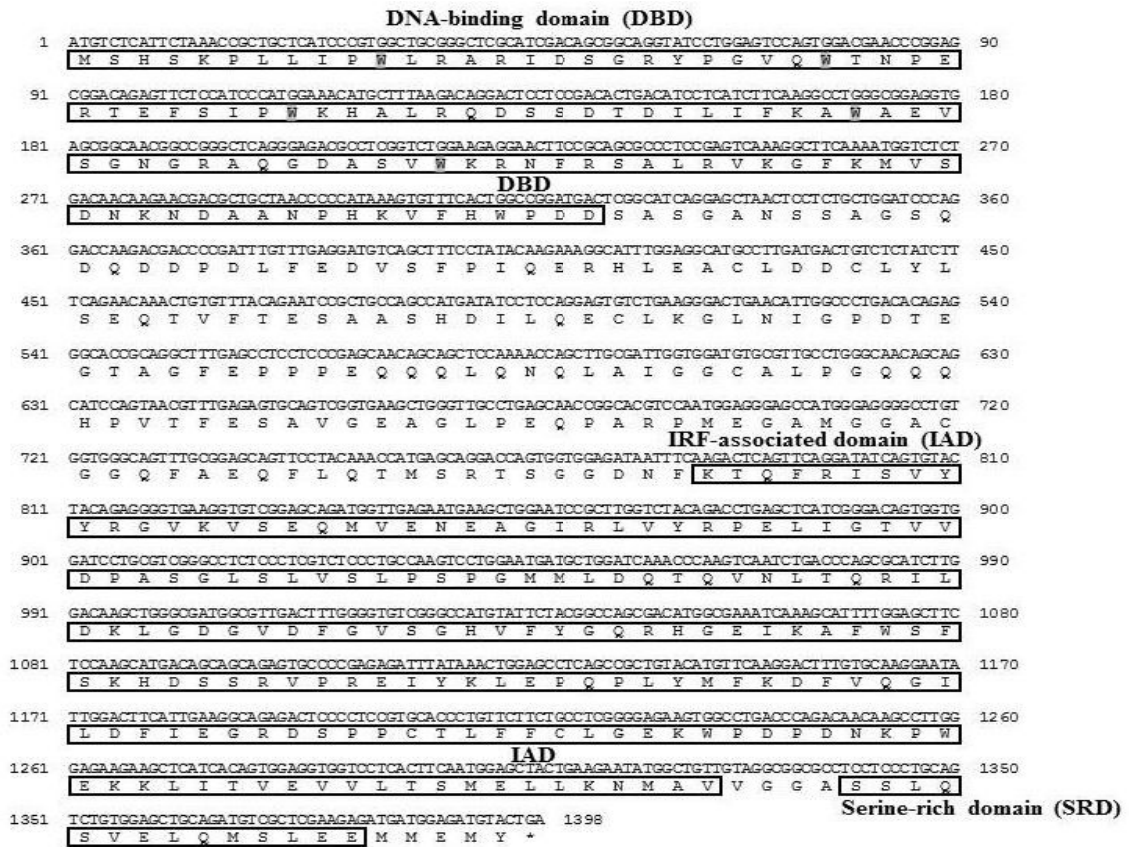
III. 결과 및 고찰

어류와 같은 하등 척추동물은 수생환경에 상존하는 병원체의 침입을 방어하기 위해 상대적으로 선천적 면역시스템이 더 발달되어 있다. 그 중 경골어류에서 알려진 몇 가지 주요 전사인자 중 IRF3는 바이러스 감염을 방어하기 위해 type I IFN 발현을 조절하는 필수 전사인자로 알려져 있다(Holland et al., 2008; Sun et al., 2010; Zhu et al., 2013). 본 연구에서는 참돔으로부터 IRF3의 cDNA ORF sequence를 동정하여 분자유전학적 특징을 확인하였으며, 다양한 병원체에 감염되었을 때 PmIRF3의 면역학적인 반응을 확인하기 위

하여 mRNA의 발현 분석을 수행하였다. PmIRF3 cDNA의 ORF sequence는 총 1,398 bp로 이루어져 있었으며, 465개의 아미노산을 암호화하는 것으로 예측하였다([Fig. 1]). 예측된 아미노산을 이용하여 PmIRF3의 단백질 분자량과 등전점을 확인하였을 때, 51.6 kDa과 4.7로 나타났다.

PmIRF3의 아미노산 서열을 이용하여 domain과 motif를 분석하였을 때, IRF family에서 보존되는 DBD, IAD 및 serine-rich domain (SRD)을 확인하였다([Fig. 1]). PmIRF3의 DBD (1 - 108 aa)는 N-terminal에 있었으며, 5개의 tryptophan 잔기가 Trp11, Trp26, Trp38, Trp57, Trp73 위치에 보존되어 있는 것을 확인하였다([Fig. 1]). DBD는 모든

IRF family가 갖는 특징적인 영역이며, 5개의 tryptophan 잔기가 보존되어 있는 것이 특징이다 (Nehyba et al., 2002). 이 영역은 표적 프로모터에서 ISRE/IRF-E consensus의 sequence에 결합하는 helix-turn-helix motif를 형성하며, 5개의 tryptophan 잔기 중 3개(Trp11, Trp38 및 Trp58)는 GAAA sequence를 인식하여 수소결합을 통해 DNA와 결합한다(Au et al., 1995, Escalante et al., 1998, Escalante et al., 2007). PmIRF3의 IAD (262 - 442 aa)와 SRD (447 - 460 aa)는 C-terminal에 있는 것을 확인하였다([Fig. 1]). IAD1은 IRF1과 2를 제외하고 IRF family (IRF3 - 10)에 존재하고 있으며, 전사 조절을 하기 위해 다른 전사인자들과 함께



[Fig. 1] cDNA and the deduced amino acid sequence of PmIRF3. The boxes indicates DNA-binding domain (DBD), IRF-associated domain (IAD) and serine-rich domain (SRD), respectively. The five typical tryptophans (W) are indicated by grey boxes.



[Fig. 2] Multiple alignments of amino acid sequences of *Pagrus major* IRF3 and IRF3 from other teleosts. Amino acids that are identical to the PmIRF3 sequence are indicated by asterisks (*), similar amino acid residues are indicated by dots (.), and the DNA-binding domain (DBD), IRF-associated domain (IAD) and serine-rich domain (SRD) are indicated by the box. The five typical tryptophans (W) are indicated by grey boxes. GenBank accession numbers: *Oplegnathus fasciatus* (AHX37215); *Larimichthys crocea* (NP_001290316); *Paralichthys olivaceus* (XP_019962614); *Oreochromis niloticus* (XP_005448377); *Salmo salar* (NP_001165753); *Danio rerio* (NP_001137376).

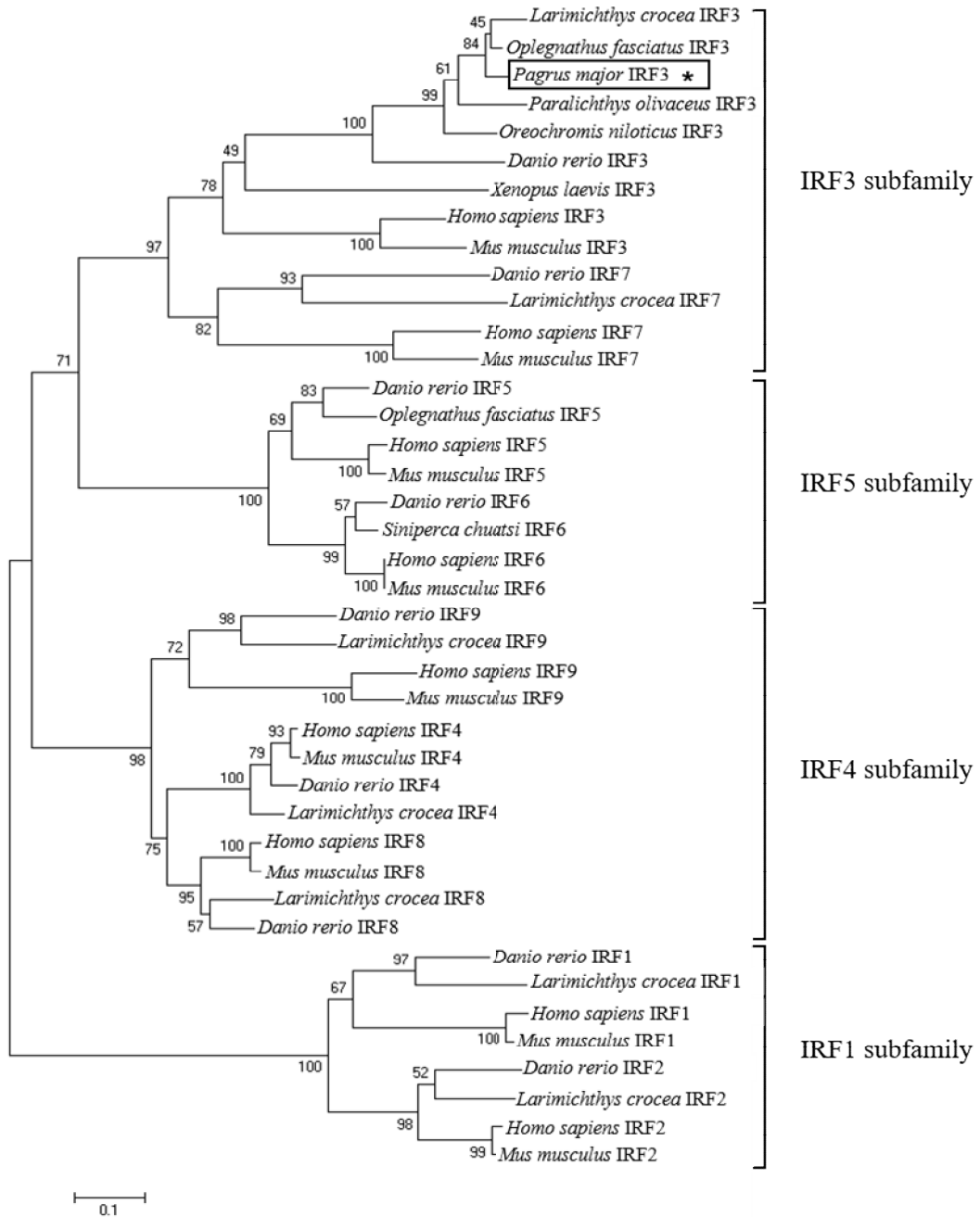
IRF homo/hetero-dimers의 형성을 매개한다 (Eroshkin and Mushegian, 1999). SRD는 DBD 및 IAD와 달리 IRF3, 5 및 7에 보존되어있는 것으로 알려져 있다(Holland et al., 2008, Xu et al., 2010). 포유류의 IRF3는 바이러스에 감염되지 않았을 때, 세포질에서 비활성 monomer 상태로 존재한다. 이후 바이러스 감염 시 pattern-recognition receptors (PRRs)는 IKK 및 TBK1와 같은 cellular kinase를 활성화시키며(Haller et al., 2006), 활성화된 kinases는 IRF3를 활성화시키기 위해 IRF3의 SRD에서 serine 및 threonine 잔기를 인산화하여 IRF3를 활성화한다고 알려져 있다(Panne et al., 2007). 활성화된 IRF3는 dimers를 형성하여 세포질에서 핵으로 전위되며, 여기서 IRF3 dimers는 전사조절 도움인자(transcriptional coactivator)인 CREB-binding protein (CBP)에 결합하고(Lin et al., 2000), 이어서 DNA promoter에 결합하여 항바이러스 상태를 유지하는 IFN- β 와 ISGs의 발현을 유도한다(Kawai and Akira, 2006). PmIRF3의 SRD에는 포유류 IRF3에서 phospho-acceptor 부위로 알려진 SSL motif가 보존되어 있는 것을 확인하였으며([Fig. 1]), 그 중 Ser447과 Ser448은 포유류와 다른 경골어류에서 보존된 SRD와 유사하였다(Marie et al., 1998; Zhang et al., 2003; Holland et al., 2008; Bergan et al., 2010). 이러한 PmIRF3의 보존된 SRD는 포유류의 IRF3 SRD와 마찬가지로 serine과 threonine의 인산화를 통해 IRF3가 활성화하는데 있어 중요한 역할을 할 것이라 여겨지며(Lin et al., 1998, Yoneyama et al., 1998, Hiscott, 2007), PmIRF3의 활성화는 참돔의 항바이러스 반응에 있어 필수적인 요인이라 사료된다(Iwasaki and Medzhitov, 2010).

예측한 PmIRF3의 아미노산 서열과 다른 종에서 기원한 IRF3의 아미노산 서열과의 multiple alignment를 수행한 결과, DBD 영역은 높은 homology와 모든 종에서 5개의 tryptophan 잔기가 보존되어 있는 것을 확인하였으며, IAD와 SRD 영역에는 종간에 비교적 낮은 homology를 확인하

였다([Fig. 2]). 또한, PmIRF3는 *Oplegnathus fasciatus* IRF3와 83.2%로 가장 높은 상동성을 나타내었으며, *Danio rerio* IRF3와 46.7%로 가장 낮은 상동성을 확인하였다([Fig. 2]).

PmIRF3의 계통발생학적 위치를 확인하기 위해 다양한 척추동물의 IRF family (IRF1 - 9) 아미노산 서열을 이용하여 계통수를 확인하였다([Fig. 3]), (<Table 2>). 척추동물의 IRF family는 C-terminal에서 IAD의 구조적 특징에 따라 IRF1 subfamily (IRF1, 2), IRF3 subfamily (IRF3, 7), IRF4 subfamily (IRF4, 8, 9) 및 IRF5 subfamily (IRF5, 6)로 4개의 subfamily로 분류된다고 알려져 있다(Huang et al., 2010; Zhu et al., 2016). 본 연구에서도 마찬가지로 IRF family는 4개의 IRF subfamily로 나뉘었으며, PmIRF3는 IRF3, 7 members와 함께 IRF3 subfamily에 속하여 *O. fasciatus* IRF3 및 *Larimichthys crocea* IRF3와 가장 밀접한 유연관계를 나타내었다([Fig. 3]).

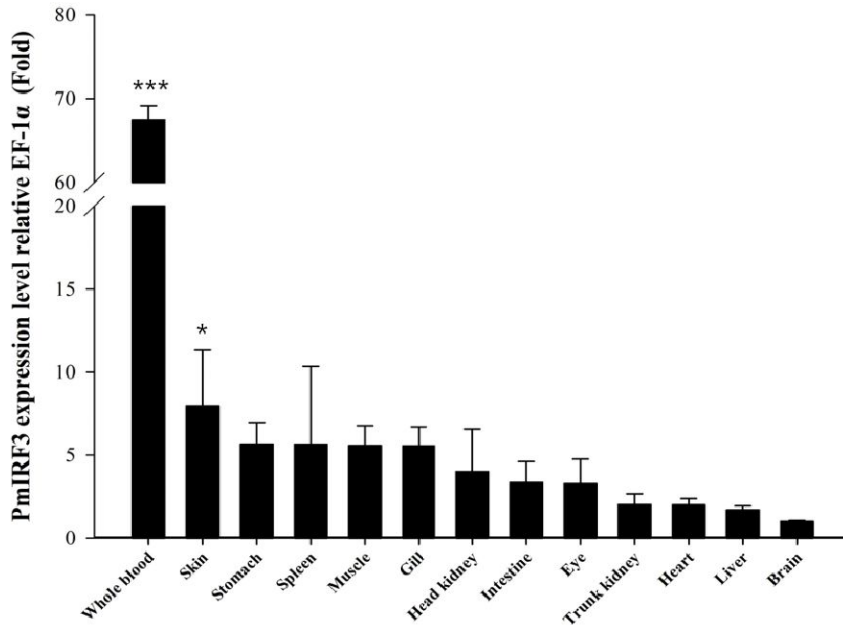
건강한 참돔의 조직별 IRF3 mRNA의 발현 양상은 가장 낮은 발현을 나타낸 brain을 기준으로 상대적인 비교를 하였다. qPCR 결과 다양한 조직에서 mRNA가 발현된 것을 확인하였으며, 특히 혈액에서 67.5배(***)로 가장 높게 발현하였고, 피부에서도 7.9배로(* $p < 0.05$) 높은 발현을 확인할 수 있었다([Fig. 4]). IRF3의 조직별 발현은 경골어류의 종마다 다양한 조직에서 발현한다고 알려져 있지만, 일반적으로 면역과 관련된 림프계, 점막기관/조직인 두신, 비장, 혈액, 아가미, 장 및 유문수에서 발현된다고 알려져 있으며(Hu et al., 2011; Yao et al., 2012; Zhang et al., 2015; Laghari et al., 2018), *Siniperca chuatsi*의 IRF3 mRNA도 마찬가지로 혈액에서 많은 발현량을 나타내었다(Laghari et al., 2018). 혈액에는 주로 NK세포, 수지상세포 및 대식세포가 존재하며 이러한 세포표면에 위치한 Toll-like receptors (TLRs)에 의해 IRF3가 활성화되어 IFN을 조절한다고 알려져 있다(Guillerey et al., 2015).



[Fig. 3] Phylogenetic analysis of deduced IRF3 amino acid sequences in other species. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method in MEGA 6.0 software. Bootstrap sampling was performed with 2,000 replicates. The scale bar is equal to 0.1 changes per amino acid position.

<Table 2> Protein sequences used for phylogenetic tree construction and multiple sequence alignment

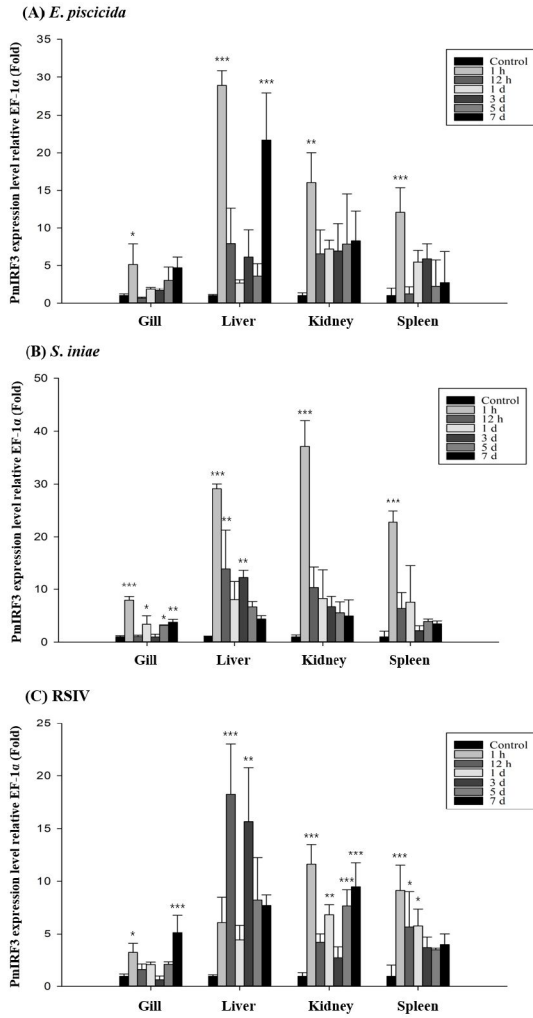
Protein	Scientific name	Common name	Accession No.	Identity (%)
IRF3 subfamily				
IRF3	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Rock bream	AHX37215	83.2
	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	NP_001290316	81.1
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Olive flounder	XP_019962614	74.4
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Nile tilapia	XP_005448377	73.7
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	NP_001137376	46.7
	<i>Mus musculus</i>	House mouse	NP_058545	41.6
	<i>Homo sapiens</i>	Human	AAH09395	41.4
	<i>Xenopus laevis</i>	African clawed frog	NP_001079588	32.1
IRF7	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	AAH58298	32.9
	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	NP_001290279	32.5
	<i>Homo sapiens</i>	Human	NM_001572	24.1
	<i>Mus musculus</i>	House mouse	AAB18626	23.5
Other subfamilies				
IRF1	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	NP_991310	38.1
	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	NP_001290310	33.9
	<i>Homo sapiens</i>	Human	AAA36043	31.8
	<i>Mus musculus</i>	House mouse	P15314	31.8
IRF2	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	AAH86813	32.6
	<i>Homo sapiens</i>	Human	NP_002190	31.8
	<i>Mus musculus</i>	House mouse	NP_032417	31.8
	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	XP_019113908	28.2
IRF4	<i>Mus musculus</i>	House mouse	AAI37714	35.8
	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	ATE88516	35.7
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	NP_001116182	23.1
	<i>Homo sapiens</i>	Human	AAH15752	22.6
IRF5	<i>Mus musculus</i>	House mouse	EDL13770	28.6
	<i>Homo sapiens</i>	Human	AAA96056	28.4
	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Rock bream	AFZ93894	26.6
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	NP_001314746	25.3
IRF6	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	NP_956892	24.7
	<i>Siniperca chuatsi</i>	Mandarin fish	AVC70703	24.5
	<i>Homo sapiens</i>	Human	AEL89176	23.8
	<i>Mus musculus</i>	House mouse	NP_058547	23.8
IRF8	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	ATE88517	37.3
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	NP_001002622	32.5
	<i>Mus musculus</i>	House mouse	NP_001288740	31.1
	<i>Homo sapiens</i>	Human	EAW95435	30.5
IRF9	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	ATE88518	42.1
	<i>Homo sapiens</i>	Human	NP_006075	40.1
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	NP_991273	39.2
	<i>Mus musculus</i>	House mouse	AAH12968	39.2



[Fig. 4] Detection of PmIRF3 mRNA expression in various tissues from healthy red sea bream by real-time PCR. EF-1 α was used to normalise the real-time PCR results. Data are presented as the mean \pm SD from three independent cDNA samples with three replicates from each sample. Asterisks indicate significant differences ANOVA (* p < 0.05 and *** p < 0.001) compared to the brain.

또한, 서로 다른 경골어류 종의 IRF family는 피부, 간, 유문수 및 근육에서도 발현이 된다고 알려져 있다(Collet et al., 2003, Holland et al., 2008, Holland et al., 2010, Hu et al., 2010, Hu et al., 2011, Hu et al., 2013, Hu et al., 2014, Bathige et al., 2012, Zhang et al., 2015). 병원체 인위감염을 통한 면역자극에 따른 IRF3 mRNA 발현량은 *E. piscicida*, *S. iniae*, 및 RSIV를 감염시킨 후 시간대별로 참돔의 아가미, 간, 신장 및 비장을 적출하여 qPCR을 수행하여 확인하였다. *E. piscicida*를 감염시킨 그룹에서는 control 그룹과 비교하였을 때, 1시간째에 아가미, 간, 신장 및 비장의 모든 조직에서 유의적으로 가장 많은 발현량이 관찰되었으며, 간에서는 12시간에서 감소하다가 7일 차에 증가하는 패턴을 확인하였다(* p < 0.05; *** p < 0.001), ([Fig. 5]). 마찬가지로, *S. iniae*를 감염시킨 그룹에서도 감염 초기인 1시간째에 모든 조직에서 유의적으로 가장 많은 발현이 관찰

되었으며, 아가미에서는 12시간, 5일, 7일 차에 유의적인 차이가 관찰되었고 간에서는 12시간과 3일째에 유의적 차이를 보였다(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001), ([Fig. 5]). RSIV를 감염시켰을 때에도 감염 초기인 1시간째에 아가미, 신장 및 비장에서 유의적인 차이를 확인하였으며, 아가미와 간에서는 각각 7일 차와 12시간째에 가장 높은 발현량을 확인하였다(* p < 0.05; *** p < 0.001), ([Fig. 5]). 포유류에서 IRF3는 바이러스 감염에 반응하여 type I IFN 유전자 발현의 주요 조절인자로 알려져 있으며, 항바이러스 반응 이외에도 *Yersinia pestis* (*Y. pestis*)의 성장을 억제시키는 대식세포와 호중구의 식균 작용을 촉진시켜 세균 감염 초기에 숙주 방어에도 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다(Stetson and Medzhitov, 2006; González-Navajas et al., 2012; Patel et al., 2012; Ivashkiv and Donlin, 2014).



[Fig. 5] PmIRF3 mRNA expression levels in gill, liver, kidney and spleen of red sea bream infected with three pathogens: (A) *Edwardsiella piscicida* (*E. piscicida*), (B) *Streptococcus iniae* (*S. iniae*) or (C) red sea bream iridovirus (RSIV). The levels of PmIRF3 transcripts were normalised to EF-1 α levels. The data are presented as the mean \pm SD from three independent cDNA samples with three replicates for each sample. The asterisks represent significant differences compared to the control (PBS) group by ANOVA (* p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001).

본 연구에서는 병원체 인위감염 후 PmIRF3의 발현 수준은 유의하게 증가하였으며, 이는 포유류에서의 연구와 경골어류에서의 연구와 일치하였다(Sato et al., 2000; Holland et al., 2008; Sun et al., 2010). 이전 연구에 따르면, Murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs)에 그람양성균 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)와 그람음성균인 *Escherichia coli* (*E. coli*)를 감염시켰을 때, 감염 초기인 4시간과 1시간째에 IRF3의 핵 전좌를 빠르게 유도하였으며(O'Connell et al., 2005), *Andrias davidianus*에 DNA 바이러스인 giant salamander iridovirus (GSIV)를 인위감염 하였을 때 감염 초기인 6시간째에 IRF3의 발현이 증가하였다(Xu et al., 2020). 또한, polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)를 주사하였을 때, *Anguilla anguilla* IRF3는 3시간과 6시간째에 다양한 조직에서 유의적으로 발현이 증가하였으며(Huang et al., 2014), *L. crocea*에서도 6시간째에 혈액과 비장에서 유의적으로 IRF3 발현이 증가하였다(Yao et al., 2012). 포유류를 대상으로 한 연구에 따르면, 바이러스 감염 시 신호 전달 체계가 시작되어 IRF3의 인산화 및 핵 전좌를 유도하여 IFN- α/β 의 발현을 촉진시켰으며, 이러한 type I IFN 생산 과정은 감염 후 초기인 6시간 이전에 이루어진다고 알려져 있다(Au et al., 1998; Sato et al., 2000). PmIRF3는 병원체 감염 초기에 높은 수준의 발현을 나타냈으며, 이는 다른 종의 IRF3와 유사하게 항균 기능과 항바이러스 과정에서 중요한 역할을 할 것이라 사료된다.

본 연구에서는 PmIRF3의 분자유전학적 특성을 확인하였고, 건강한 참돔과 병원체 인위감염 후 다양한 조직에서의 PmIRF3의 발현양상을 확인하였다. 이러한 결과는 참돔 면역체계의 기초 자료로 이용할 수 있을 것이며, 이후 참돔 IRF3의 명확한 기능을 알기 위해선 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

References

- Au WC, Moore PA, LaFleur DW, Tombal B and Pitha PM(1998). Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44): 29210~29217. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.29210>.
- Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT and Pitha PM(1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25): 11657~11661. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.25.11657>.
- Barnes B, Lubyova B and Pitha PM(2002). On the role of IRF in host defense. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22(1): 59~71. <http://dx.doi.org/10.1089/107999002753452665>.
- Battistini A(2009). Interferon regulatory factors in hematopoietic cell differentiation and immune regulation. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(12): 765~780. <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0030>.
- Chen W and Royer Jr WE(2010). Structural insights into interferon regulatory factor activation. *Cellular Signalling*, 22(6): 883~887. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.12.005>.
- Collet B, Hovens GC, Mazzoni D, Hirono I, Aoki T and Secombes CJ(2003). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2). *Developmental and Comparative Immunology*, 27(2): 111~126. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00072-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00072-1).
- Eroshkin A and Mushegian A(1999). Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *Journal of Molecular Medicine*, 77(5): 403~405. <http://dx.doi.org/10.1007/s001090050369>.
- Escalante CR, Nistal-Villán E, Shen L, García-Sastre A and Aggarwal AK(2007). Structure of IRF3 bound to the PRDIII-1 regulatory element of the human interferon-enhancer. *Molecular Cell*, 26(5): 703~716. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.022>.
- Escalante CR, Yie J, Thanos D and Aggarwal AK(1998). Structure of IRF1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature*, 391: 103~106. <http://dx.doi.org/10.1038/34224>.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM and Maniatis T(2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology*, 4(5): 491~496. <https://doi.org/10.1038/ni921>.
- González-Navajas JM, Lee J, David M and Raz E(2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology*, 12(2): 125~135. <https://doi.org/10.1038/nri3133>.
- Guillerey C, Chow MT, Miles K, Olver S, Sceneay J, Takeda K, Möller A and Smyth MJ(2015). Toll-like receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. *Oncoimmunology*, 4(9): e1027468. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1027468>.
- Haller O, Kochs G and Weber F(2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, 344(1): 119~130. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.024>.
- Hiscott J(2007). Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21): 15325~15329. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700002200>.
- Holland JW, Bird S, Williamson B, Woudstra C, Mustafa A, Wang T, Zou J, Blaney SC, Collet B and Secombes CJ(2008). Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: functional analysis and transcriptional modulation. *Molecular Immunology*, 46(2): 269~285. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.08.265>.
- Holland JW, Karim A, Wang TH, Alnabulsi A, Scott J, Collet B, Mughal MS, Secombes CJ and Bird S(2010). Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factors 4 and 8 (IRF-4 and IRF-8) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): 157~166. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.001>.
- Hu GB, Yin XY, Lou HM, Xia J, Dong XZ, Zhang

- JY and Liu Q(2011). Interferon regulatory factor 3 (IRF-3) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: sequencing, limited tissue distribution, inducible expression and induction of fish type I interferon promoter. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(2): 164~173.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.09.003>.
- Huang B, Qi ZT, Xu Z and Nie P(2010). Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: glimpse of the diversification in evolution. *BMC Immunology*, 11: 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-22>.
- Inkpen SM, Hori TS, Gamperl AK, Nash GW and Rise ML(2015). Characterization and expression analyses of five interferon regulatory factor transcripts (Irf4a, Irf4b, Irf7, Irf8, Irf10) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish and Shellfish Immunology*, 44(1): 365~381.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.032>.
- Ivashkiv LB and Donlin LT(2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1): 36~49.
<https://doi.org/10.1038/nri3581>.
- Iwasaki A and Medzhitov R(2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963): 291~295.
<https://doi.org/10.1126/science.1183021>.
- Jia W and Guo Q(2008). Gene structures and promoter characteristics of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2 and IRF-7 from snakehead *Channa argus*. *Molecular Immunology*, 45(8): 2419~2428.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.11.011>.
- Kawai T and Akira S(2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology*, 7(2): 131~137. <https://doi.org/10.1038/ni1303>.
- Kwon MG, Hwang JY and Jung SH(2014). The efficacy and safety on combination vaccines: *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and *S. parauberis*, in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *The Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, 26(6): 1193~1200.
<https://doi.org/10.13000/JFMSE.2014.26.6.1193>.
- Laghari ZA, Li L, Chen SN, Huo HJ, Huang B, Zhou Y and Nie P(2018). Composition and transcription of all interferon regulatory factors (IRFs), IRF1-11 in a perciform fish, the mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Developmental and Comparative Immunology*, 81: 127~140.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.11.015>.
- Lengyel P(1982). Biochemistry of interferons and their actions. *Annual Review of Biochemistry*, 51: 251~282.
<http://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.001343>.
- Lin R, Genin P, Mamane Y and Hiscott J(2000). Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17): 6342~6353.
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6342-6353.2000>.
- Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM and Hiscott J(1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(5): 2986~2996. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.5.2986>.
- Livak KJ and Schmittgen TD(2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4): 402~408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R and Hiscott J(1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*, 237(1): 1~14.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00262-0).
- Marie I, Durbin JE and Levy DE(1998). Differential viral induction of distinct interferon alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO Journal*, 17(22): 6660~6669.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6660>.
- McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT and Maniatis T(2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1): 233~238.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2237236100>.
- Nehyba J, Hrdlickova R and Bose HR(2009). Dynamic evolution of immune system regulators:

- the history of the interferon regulatory factor family. *Molecular Biology and Evolution*, 26(11): 2539~2550.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp167>.
- Nehyba J, Hrdliková R, Burnside J and Bose HR(2002). A Novel Interferon Regulatory Factor (IRF), IRF-10, Has a Unique Role in Immune Defense and Is Induced by the ν -Rel Oncoprotein. *Molecular and Cellular Biology*, 22(11): 3942~3957.
<http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.11.3942-3957.2002>.
- O'Connell RM, Vaidya SA, Perry AK, Saha SK, Dempsey PW and Cheng G(2005). Immune Activation of Type I IFNs by *Listeria monocytogenes* Occurs Independently of TLR4, TLR2, and Receptor Interacting Protein 2 but Involves TANK-Binding Kinase 1. *Journal of Immunology*, 174(3): 1602~1607.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1602>.
- Ordás MC, Abollo E, Costa MM, Figueras A and Novoa B(2006). Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) of turbot and sea bream. *Molecular Immunology*, 43(7): 882~890.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.06.034>.
- Panne D, McWhirter SM, Maniatis T and Harrison SC(2007). Harrison Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31): 22816~22822.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M703019200>.
- Patel A, Lee-Lewis H, Hughes-Hanks J, Lewis C and Anderson D(2012). Opposing Roles for Interferon Regulatory Factor-3 (IRF-3) and Type I Interferon Signaling during Plague. *PLOS Pathogens*, 8(7): e1002817.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002817>.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC and Samuel CE(1987). Interferons and their actions. *Annual Review of Biochemistry*, 56: 727~777.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003455>.
- Ruan BY, Chen SN, Hou J, Huang B, Laghari ZA, Li L and Nie P(2017). Two type II IFN members, IFN- γ and IFN- γ related (rel), regulate differentially IRF1 and IRF11 in zebrafish. *Fish and Shellfish Immunology*, 65: 103~110.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.054>.
- Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N and Taniguchi T(2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction. *Immunity*, 13(4): 539~548.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00053-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00053-4).
- Sato M, Tanaka N, Hata N, Oda E and Taniguchi T(1998). Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN- β gene. *FEBS Letters*, 425(1): 112~116.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00210-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00210-5).
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R and Hiscott J(2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, 300(5622): 1148~1151.
<https://doi.org/10.1126/science.1081315>.
- Shi Y, Zhang YB, Zhao Z, Jiang J, Zhang QY and Gui JF(2008). Molecular characterization and subcellular localization of *Carassius auratus* interferon regulatory factor-1. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(2): 134~146.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.05.004>.
- Shi Y, Zhu XP, Yin JK, Zhang QY and Gui JF(2010). Identification and characterization of interferon regulatory factor-1 from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Molecular Biology Reports*, 37(3): 1483~1493.
<https://doi.org/10.1007/s11033-009-9544-0>.
- Stein C, Caccamo M, Laird G and Leptin M(2007). Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biology*, 8(11): R251. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-11-r251>.
- Stetson DB and Medzhitov R(2006). Type I interferons in host defense. *Immunity*, 25(3): 373~381.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.007>.
- Sun BJ, Chang MX, Song Y, Yao WJ and Nie P(2007). Gene structure and transcription of IRF-1 and IRF-7 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116(1-2): 26~36.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.001>.
- Sun F, Zhang YB, Liu TK, Gan L, Yu FF, Liu Y and Gui JF(2010). Characterization of fish IRF3 as an IFN-inducible protein reveals evolving regulation

- of IFN response in vertebrates. *Journal of Immunology*, 185(12): 7573~7582.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002401>.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S(2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725~2729.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Tamura T, Yanai H, Savitsky D and Taniguchi T(2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual Review of Immunology*, 26: 535~584.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400>.
- Woodward KN(1996). The regulation of fish medicines - UK and European Union aspects. *Aquaculture Research*, 27(10): 725~734.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1996.00782.x>.
- Xiaoni G, Zhuo C, Xuzhen W, Dengqiang W and Xinwen C(2012). Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2 and IRF-5 in the chondrosteian paddlefish *Polyodon spathula* and their phylogenetic importance in the Osteichthyes. *Developmental and Comparative Immunology*, 36(1): 74~84.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.06.003>.
- Xu QQ, Chang MX, Xiao FS, Huang B and Nie P(2010). The gene and virus-induced expression of IRF-5 in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(3-4): 269~278.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.020>.
- Xu YP, Wang LZ, Zhou YL, Xiao Y, Gu WB, Li B, Zhao XF, Dong WR and Shu MA(2020). Identification and functional analysis of two interferon regulatory factor 3 genes and their involvement in antiviral immune responses in the Chinese giant salamander *Andrias davidianus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 110: 103710.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103710>.
- Yabu T, Hirose H, Hirano I, Katagiri T, Aoki T and Yamamoto E(1998). Molecular cloning of a novel interferon regulatory factor in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Molecular marine biology and biotechnology*, 7(2): 138~144.
- Yao CL, Huang XN, Fan ZJ, Kong P and Wang ZY(2012). Cloning and expression analysis of interferon regulatory factor (IRF) 3 and 7 in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(5): 869~878.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.015>.
- Yeow WS, Au WC, Juang YT, Fields CD, Dent CL, Gewert DR and Pitha PM(2000). Reconstitution of Virus-mediated Expression of Interferon α Genes in Human Fibroblast Cells by Ectopic Interferon Regulatory Factor-7. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9): 6313~6320.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.9.6313>.
- Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukada M, Nishida E and Fujita T(1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO Journal*, 17(4): 1087~1095.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1087>.
- Zhang J, Li YX and Hu YH(2015). Molecular characterization and expression analysis of eleven interferon regulatory factors in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(1): 272~282.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.033>.
- Zhu LY, Nie L, Zhu G, Xiang LX and Shao JZ(2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*, 39(1-2): 39~62.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.04.001>.
- Zhu Y, Qi C, Shan S, Zhang F, Li H, An L and Yang G(2016). Characterization of common carp (*Cyprinus carpio* L.) interferon regulatory factor 5 (IRF5) and its expression in response to viral and bacterial challenges. *BMC Veterinary Research*, 12(1): 127.
<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0750-4>.

-
- Received : 27 August, 2020
 - Revised : 24 September, 2020
 - Accepted : 07 October, 2020