Check for updates

JFMSE, 33(3), pp. 713~722, 2021.
수산해양교육연구, 제33권 제3호, 통권111호, 2021.
www.ksfme.or.kr
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2021.6.33.3.713

참돔(*Pagrus major*)에서 동정된 Lumican의 분자적 특성과 유전자 발현분석

손하정 · 최광민* · 박찬일†
경상국립대학교(학생) · *경상국립대학교(연구원) · †경상국립대학교(교수)

Molecular Characterization and Gene Expression Analysis of Lumican from Red Sea Bream (*Pagrus major*)

Ha-Jeong SON · Kwang-Min CHOI* · Chan-Il PARK†
Gyeongsang National University(student) · *Gyeongsang National University(researcher) · †Gyeongsang National University(professor)

Abstract

Lumican is a member of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) proteoglycan Class II family. In particular, it plays the role of a regulator of extracellular matrix (ECM) tissue and biological function. It also has a function for tissue repair by regulating collagen fibrin formation in interstitial tissue. In this study, after analyzing the characteristics and expression of lumican in red sea bream, the highest expression was found in the skin, and expression was also confirmed after infection with *Edwardsiella piscicida* (*E. piscicida), Streptococcus iniae* (*S. iniae*), and red sea bream iridovirus (RSIV). As a result, it could be confirmed that lumican has a function of repairing tissue damage and immune response in red sea bream.

Key words : Red sea bream, Extracellular matrix (ECM), Small leucine-rich proteoglycan (SLRP), Lumican

Ⅰ. 서 론

Lumican은 세포 외 기질 (Extracellular matrix, ECM)의 중요한 부분을 구성하는 Small leucine-rich repeat proteoglycans (SLRPs)계열의 proteoglycan Class Ⅱ family에 속하며(Blochberger et al., 1992, Tingbø et al., 2012), 피부, 폐, 신장, 뼈 등 다양한 조직에 분포한다(Chakravarti et al., 1998; Dolhnikoff et al., 1998; Sztrolovics et al., 1999). 지금까지 Lumican의 기능에 대한 다양한 연구사례가 보고되어 있는데, Lumican을 knockout 시킨 mouse의 피부와 각막에서 비정상적인 조직의 연결이 관찰되어 콜라겐 섬유 생성 조절에 대한 기능을 확인할 수 있었고(Chakravarti et al., 1998; Chakravarti et al., 2000), 세포 증식 및 이동을 포함한 주요 생물학적 기능에도 관련되어 있는 것으로 보고되었다(Vuillermoz et al., 2004; Nikitovic et al., 2008). 그 외에도 Lumican은 대식세포와 다형 핵 호중구(polymorphonuclear neutrophils, PMN)를 자극시키고, tumor necrosis

† Corresponding author : 055-772-9153, vinus96@hanmail.net
※ 이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원 ‘스마트수산양식 연구센터(No. 20180386)’의 지원을 받아 수행된 연구임.

factor (TNF)와 interleukin-1 (IL-1)을 활성화하며 (Vij et al., 2005), 특정 세포 기능을 위해 세포표면단백질과 상호작용을 한다. 특히 mouse에 Lipopolysaccride (LPS) 자극한 후 Lumican은 CD14, Toll-like receptor 4 signaling pathway와 면역반응을 활성화하여 선천면역과 관련된 유전자일 뿐만 아니라 염증 및 패혈증 쇼크의 조절자로서 보고되었다(Wu et al., 2007). 또 다른 연구에서는 Lumican을 knockout 시킨 쥐의 피부에서 TGF-1, collagen Ⅰ, fibronectin의 발현 지연을 보였으며, 상처 난 토끼의 귀에서는 세포 증식이 유도됨을 확인 할 수 있었다 (Yeh et al., 2010; Zhao et al., 2016).

이러한 Lumican의 면역학적 기능에 대한 연구와 보고사례는 인간과 mouse에서 대부분 국한되어 있고, 어류에서는 대서양 대구(Tingbø et al., 2012)의 보고사례를 제외하면 극히 제한적이다.

농어목(Perciformes) 도미과(Sparidae)에 속하는 참돔(*Pagrus major*)은 우리나라 전 연안 해역에 분포하며 주로 남해안에서 양식되는 온대성 어류(Chyung, 1977)로 국내 양식어류 생산량의 6.6% (KOSIS, 2016)를 차지한다. 참돔은 성장률이 빠르고 다양한 환경변화에 내성이 높은 어류로 알려져 있지만, 성장단계에 맞는 영양소와 환경이 적절하지 못하면 성장률이 감소하고 질병이 자주 발생하게 된다(Tang et al., 2003). 특히 세균 및 바이러스의 감염을 통한 스트레스로 인해 심각한 폐사가 발생하여 양식어가에 많은 피해를 입히는데(Kader et al., 2012), 이를 해결하기 위한 과도한 항생제 사용으로 인해 다제내성균 출현과 체내 잔류 등의 문제가 발생하고 있다(Song and Lee., 2013; Kim et al., 2020). 그래서 이러한 근본적인 문제를 해결하기 위해 참돔의 면역학적 시스템에 대한 연구가 수행되고 있으며(Kim et al., 2020; Son et al., 2020) 앞으로도 많은 관련 연구가 필요한 실정이다.

따라서 이번 연구에서는 참돔으로부터 동정된 Lumican (PmLum) cDNA의 분자적 특성을 파악하였고, 건강한 어체 내에서 Lumican의 조직별 발현과 주요 병원체인 *Edwardsiella piscicida (E. piscicida)*와 *Streptococcus iniae* (*S. iniae*), red sea bream iridovirus (RSIV)를 인위 감염시킨 후 시간별 조직 내 발현수준을 확인하였다.

Ⅱ. 연구 방법

1. PmLum의 서열결정

Lipopolysaccharide (LPS)로 자극 시킨 참돔의 간으로부터 cDNA library를 제작하여 Next Generation Sequencing (NGS) 분석을 통해 PmLum의 coding sequence (CDS) 정보를 확보하였다. 확보한 서열을 기반으로 pGEM T-easy vector와 *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109를 이용하여 클로닝한 뒤 sangar sequencing을 이용하여 PmLum cDNA 서열을 최종적으로 결정하였다.

2. 분자적 특성

PmLum cDNA CDS의 염기서열과 예상 아미노산 서열은 GENETYX ver. 8.0 program (SDC Software Development, Tokyo, Japan)과 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLASTX program (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)을 이용하여 분석하였다. PmLum의 등전점 (Isoelectric point, *p*I)과 분자중량(Molecular weight, MW)은 ExPASy Proteomics Server의 ProtParam tool (http://web.expasy.org/protparam/)로 예측하였으며, 도메인의 위치와 서열은 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (http://smart.embl-heidelberg.de/)로 확인하였다. NCBI의 peptide sequence database에 등록되어있는 다른 종으로부터 보고된 Lumican 아미노산 서열들과의 multiple sequence alignment는 ClustalW (http://www.genome.jp/tools/clustalw/)를 이용하여 분석하였다. 또한 계통발생학적 분석은 Mega 4 program의 neighbor-joining (NJ)법을 이용하여 계

통수를 작성하였으며, bootstrap sampling은 1,000 번 반복 수행하였다.

3. 유전자 발현분석

가. 건강한 참돔의 조직별 발현분석

(1) 조직 채취

경상남도 수산자원연구소로부터 체장 14.3±1.2 cm와 체중 68.5±10.3 g인 참돔을 제공 받아 실험에 사용하였다. 실험에 사용 전 0.5 ton 수조에 20-23 ˚C에서 2주간 순치하였으며, 조직별 발현분석을 위해 건강한 참돔 3 마리를 Benzocain (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 마취하고 해부하여 체신, 두신, 간, 비장, 장, 위, 아가미, 뇌, 눈, 심장, 근육, 피부를 화염 멸균된 해부 도구에 알코올 솜으로 충분히 닦아낸 후 무균적으로 적출 하였다.

(2) Total RNA 분리와 cDNA 합성

건강한 참돔 3 마리로부터 적출한 조직들은 하나의 시료로 pooling 한 후 TRIzol 기반의 RNAiso (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 Son et al., (2020)의 방법으로 total RNA를 분리하였다. 먼저 샘플에 RNAiso 600 μL를 첨가한 뒤 homogenizer로 마쇄하고, chloroform (Deajong, Republic of Korea)를 100 μL 첨가하여 vortexing 한 뒤 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상청액은 새로운 e-tube에 옮긴 후 PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol) (Biosesang, Republic of Korea)를 동량 첨가하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였고, Genomic DNA의 제거를 위해 상청액은 Recombinant DNase I (TaKaRa)로 처리하였다. 상청액은 새로운 e-tube에 옮긴 후, isopropanol (Sigma, St. Louis, MO, USA) 500 μL, Dr.Gen (TaKaRa) 5 μL, 3M sodium acetate (TaKaRa) 50 μL을 첨가하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 분리한 상청액은 모두 제거한 후, 세척을 위해 75% DEPC ethyl alcohol 600 μL을 첨가하여 14,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였고, 남은 상청액을 완전하게 제거한 후 DEPC DW (Bioneer, Republic of Korea)를 첨가하여 완전히 용해시켰다. cDNA로 합성하기 전, NanoVue (GEhealthcare, USA)를 이용해 농도와 순도를 측정하였고, PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 cDNA로 합성하였다.

(3) Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR에 사용된 특이적인 primer sets는 PmLum의 cDNA CDS 서열에 기초하여 Primer3 ver. 0.4 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)를 이용하여 디자인하였다<Table 1>. 건강한 참돔에서 PmLum의 발현수준을 알아보기 위해 cDNA template 1 μL와 TB green master mix (TaKaRa) 12.5 μL, DW 9.5 μL, primer를 각각 1 μL씩 첨가하여 총량 25 μL이 되도록 혼합하여 RT-qPCR을 수행하였다.

최종적으로 확인된 PmLum의 Ct (Threshold cycle)값은 EF-1α mRNA의 Ct값과 비교하여 2-ΔΔCT method (Livak and Schmittgen, 2001)에 의해 계산하였다.

<Table 1> PCR primers used in this study

Target	Usage	Primer sequence (5'-3')
Lumican	RT-qPCR F	CAAGCCTGGACATTTGGAGT
	RT-qPCR R	ACACACTCCTCACCGATGAAC
EF-1α	RT-qPCR F	CCTTCAAGTACGCCTGGGTG
	RT-qPCR R	CTGTGTCCAGGGGCATCAAT

나. 병원체 인위감염 후 시간별 발현분석

(1) 병원체 인위감염

*E. piscicida*를 1.5 × 10^5 cells/fish, RSIV를 1 × 10^5 CFU/mL, S.iniae를 1.5 × 10^5 cells/fish 가 되도록 PBS에 현탁한 뒤, 참돔의 복강에 주사 하였고, 대조구는 동량의 PBS를 복강주사 하였다. 각 실험구와 대조구는 1.5 ton 수조에 90 마리씩 수용하였으며, 수온은 23-26 ℃로 유지하였다. 병원체와 PBS를 주사한 후 1시간과 12시간, 1일, 3일, 5일, 7일 차에 각각의 실험구와 대조구로부터 무작위로 3 마리를 선정하여 신장, 비장, 아가미, 간 조직을 적출하였다. 적출한 조직은 실험에 사용하기 전까지 -80 ℃에 보관하였다.

(2) Quantitative real-time PCR

다양한 병원체 인위감염에 의한 PmLum의 발현분석을 위해, 앞서 설명한 방법으로 RT-qPCR을 수행하였다.

4. 통계 분석

모든 실험은 정확성을 위해 3 반복씩 수행하였고, 모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였다. 조직 간의 유의적 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA) test에 의해 확인되었다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Ⅲ. 연구 결과

1. 분자적 특성

가. Sequences 분석

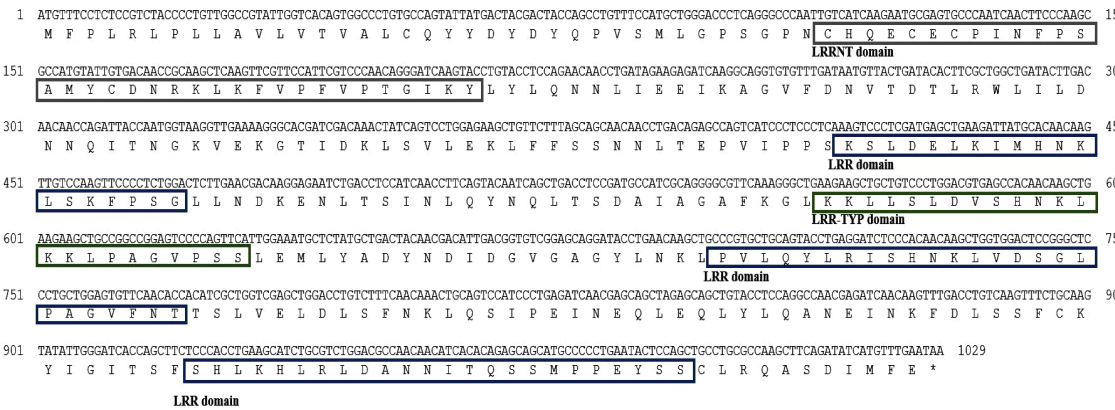
PmLum cDNA의 CDS는 1,029 bp로 이루어져 있으며, 이는 342개의 amino acid (aa)를 암호화하였다[Fig. 1]. PmLum의 예상 아미노산은 342 aa으로 LRRNT domain (37 - 71 aa), LRR-TYP domain (187 – 210 aa), LRR domain (138 – 157 aa, 232 – 257 aa, 307 – 332 aa)을 포함하고 있었고, 등전점(pI)은 5.73, 분자중량은 38.43 kDa으로 예측되었다[Fig. 1].

나. Multiple alignment 분석

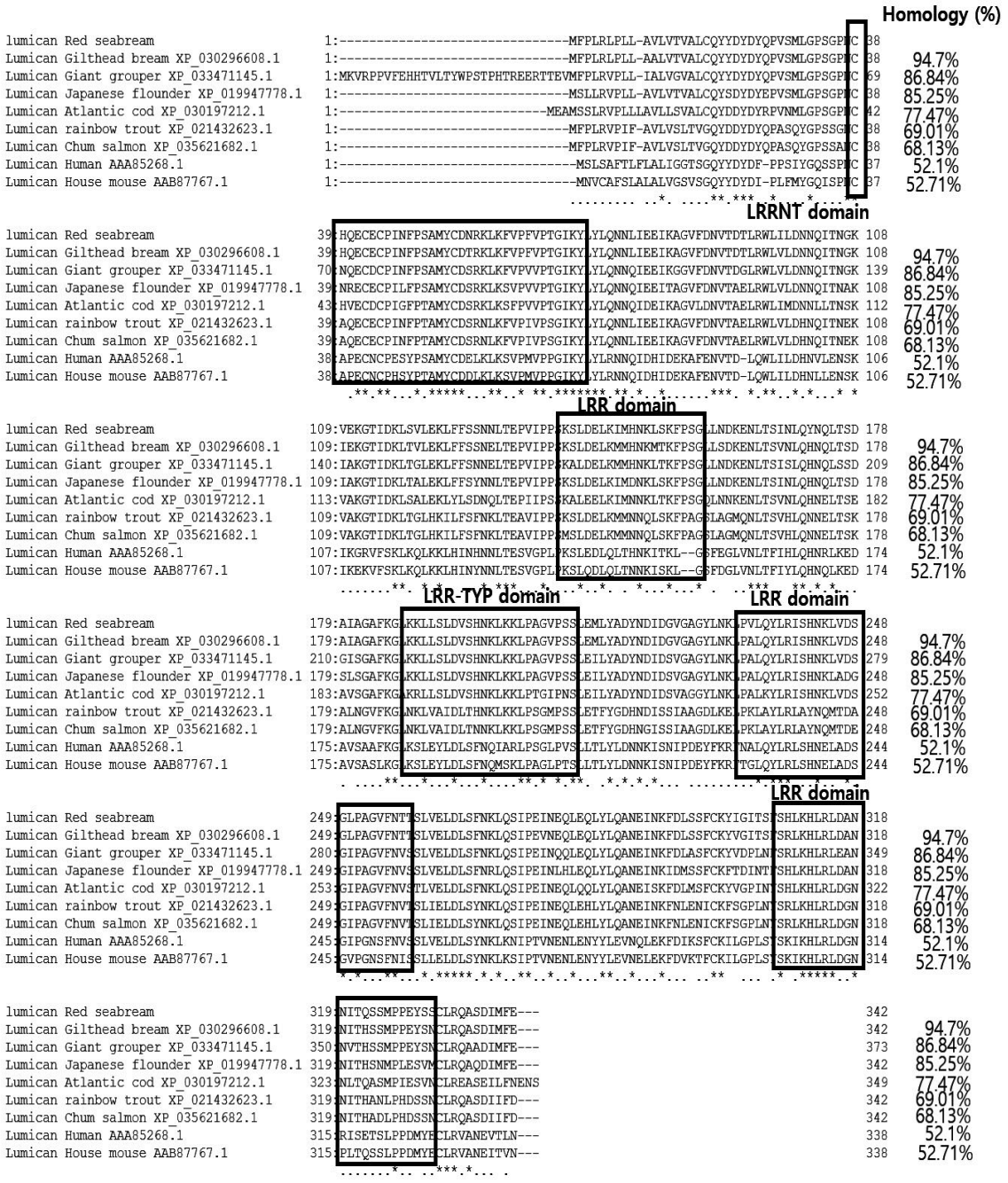
PmLum의 multiple alignments 분석결과 PmLum은 Gilthead bream의 Lumican과 94.74%로 상동성이 가장 높았다[Fig. 2]. 반면, 포유류 Lumican과 낮은 상동성을 보였는데 특히 human과 52.1%로 가장 낮은 상동성을 보였다[Fig. 2].

다. 계통발생학적 분석

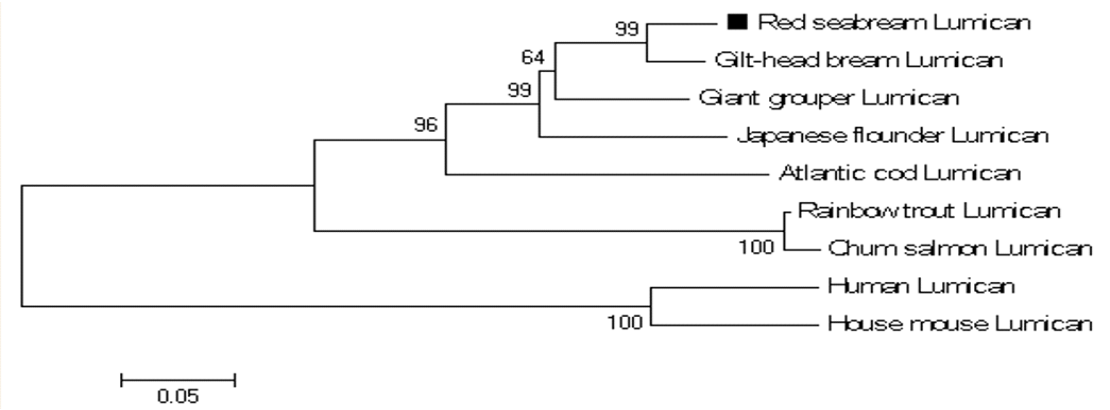
PmLum의 계통발생학적 위치를 확인하기 위해 Mega 4 program을 이용하여 계통수를 분석한 결과, PmLum은 어류의 cluster에 속해 있었으며, 포유류의 cluster와 구분되었다[Fig. 3]. 그리고 PmLum은 Gilt-head bream의 Lumican과 가장 밀접한 유연관계를 확인할 수 있었다[Fig. 3].



[Fig. 1] cDNA and deduced amino acid sequence of the Lumican.



[Fig. 2] Multiple alignments of PmLUM with other species LUM amino acid sequences. NCBI accession numbers of dicentracin are as follows: Gilthead bream, XP_030296608.1; Giant grouper, XP_033471145.1; Japanese flounder, XP_019947778.1; Atlantic cod, XP_030197212.1; Rainbow trout, XP_021432623.1; Chum salmon, XP_035621682.1; Human, AAA85268.1; House mouse, AAB87767.1.



[Fig. 3] Phylogenetic analysis of deduced LUM amino acid sequences in fish. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method within MEGA 4 software. Bootstrap sampling was performed with 1,000 replicates. The scale bar is equal to 0.05 change per amino acid position.

2. 유전자 발현분석

가. 정상 어체에서의 조직별 발현분석

건강한 참돔에서의 조직별 발현분석결과 PmLum의 mRNA는 가장 낮게 발현된 간을 기준으로 피부에서 유의적으로 가장 높은 발현량을 나타내었고 그 다음 비장과 눈에서 유의적으로 높았다[Fig. 4].

나. 병원체 인위감염 후 시간별 발현분석

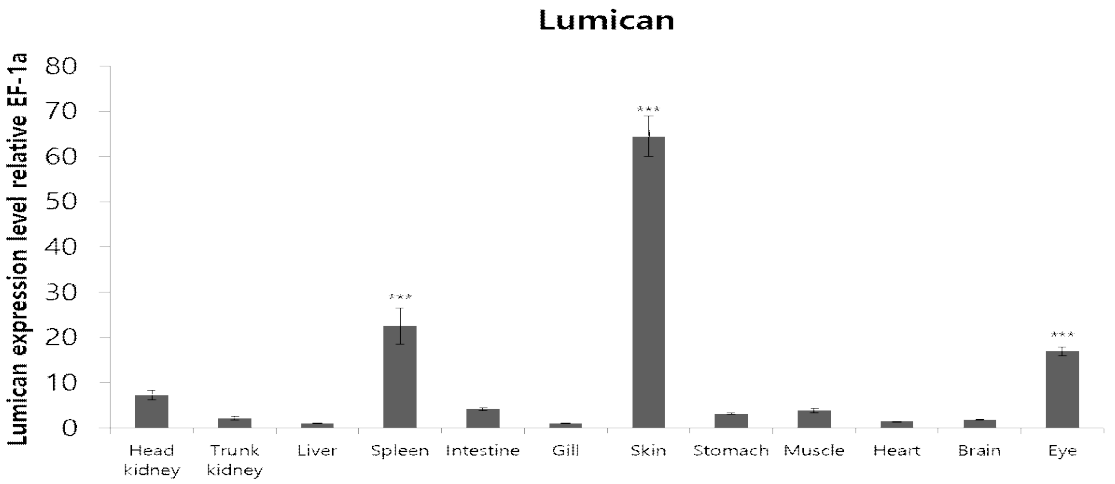
건강한 참돔에 세균과 바이러스를 인위감염 시킨 후 신장, 비장, 아가미 및 간에서의 PmLum mRNA의 발현을 quantitative real-time PCR을 이용해 확인하였다[Fig. 5]. 신장에서 *E. piscicida* 감염 12시간, 3일 후와 RSIV 감염 12시간 후에는 유의적으로 높게 발현되었지만 *S. iniae* 감염 후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 그리고 비장에서는 *E. piscicida, S. iniae*, RSIV 감염 후 모든 그룹에서 유의적으로 낮게 발현되었다. 아가미에서는 *S. iniae*와 RSIV 감염 12시간 후 유의적으로 높게 발현되었지만 *E. piscicida* 감염 후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 마지막으로 간에서는 *S. iniae* 감염 12시간, 3일 후 그리고 *E. piscicida* 감염 12시간 후, RSIV 감염 3일 후 유의적으로 가장 높게 발현되었다.

Ⅳ. 고 찰

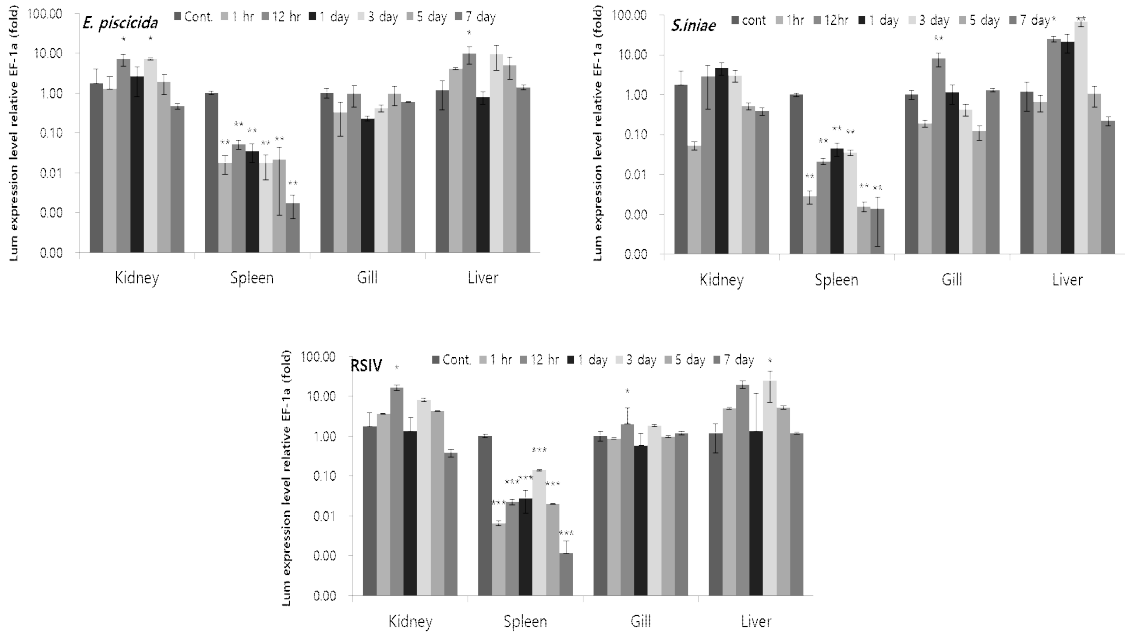
Extracellular matrix (ECM)은 세포 부착, 세포 간 상호작용, 그리고 세포 분화 등을 포함하여 살아있는 세포 생활사를 조절하는 중요한 요소이다. 이러한 ECM에는 SLRP가 분포되어 있는데

대부분의 SLRP는 간충직세포에 의해 생성되며 기질의 상처 치유를 조절한다(Karamanou et al., 2018). SLRP는 단백질 및 게놈 수준에서의 보존 및 상동성에 따라 5개의 그룹으로 분류된 18개로 구성되며, 이 중 Lumican은 글리코실화로 인해 조직에 따라 이종 고분자를 특징으로 하는 SLRP Class Ⅱ에 속해있다(Karamanou et al., 2020).

이번 연구에서 NGS로부터 얻은 PmLum의 서열로부터 Leucine-rich repeats (LRR) 도메인을 확인할 수 있었는데, 이는 인간에서 최초로 보고된 이후 현재까지 수천 개가 발견되었다(Matsushima et al., 2010). LRR 도메인은 식물, 무척추동물 및 척추동물에서 선천성 면역과 관련된 많은 단백질에서 보존되는 도메인이며(Ng et al., 2011), 2~45개의 류신이 풍부한 구성으로 약 20~30개의 잔기가 반복된다(Ng et al., 2011). 또한 LRR 도메인의



[Fig. 4] Detection of PmLUM genes in different tissues of healthy red sea bream by real-time PCR. EF-1 α was used for normalizing the real-time PCR results. Data are presented as the mean ± SD from three independent cDNA samples with three replicates from each sample. Asterisks indicate significant differences (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) compared to Liver.



[Fig. 5] Gene expression of PmLUM in the kidney, spleen, gill and liver after infection with *E. piscicida* (A), *S. iniae* (B) RSIV (C). Levels of PmLUM transcripts were quantified relative to that of EF-1 α levels. Data are presented as the mean ± SD from three independent cDNA samples with three replicates for each sample. Asterisks represent significant differences compared to the control (PBS) group by ANOVA (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

주요기능은 단백질-단백질 간의 상호 작용을 촉진하는 것으로 알려져 있는데(Kobe and Kajava, 2001) 대표적으로 신호전달, 세포 부착, DNA 복구, apoptosis 및 면역반응을 포함한 다양한 생물학적 과정에 관여한다. 이전 연구에서 인간으로부터 유래한 leucine-rich repeat-containing 8 (LRRC8)은 B세포 발달에 필수적이라는 보고가 있었으며(Sawada et al., 2003), 절지동물에서는 단백질 상호작용 및 신호전달에 관여하는 많은 LRR 단백질이 연구 되었다(Sriphaijit and Senapin, 2007). 홍다리얼룩새우에서도 LRR 도메인이 발견되었는데 이들은 96개의 류신 잔기를 가지고 있었으며 조직별 발현분석 결과 숙주 방어와 관련된 조직인 hemocytes, 내장 및 림프기관에서 높은 결과를 보였다(Sriphaijit and Senapin, 2007). 이번 연구에서는 LRR 도메인 뿐만 아니라 LRRNT, LRR-TYP 도메인 또한 확인 되었으며 모두 LRR 도메인으로부터 유래한 도메인이었다(Matsushima et al., 2007). 따라서 이번 연구에서도 대부분의 면역 수용체에 존재하여 면역반응에 관여하는 LRR 도메인이(Padmanabhan et al., 2009) 참돔에서의 면역반응 또한 도울 것으로 생각된다.

이번 연구에서 정상 PmLum이 피부, 비장, 눈에서 유의적으로 높은 발현을 보였는데, 이는 Lumican이 상피 세포 이동 및 증식 조절에 관여하며(Yeh et al., 2010a), 각막의 주요 keratan sulfate proteoglycan이자(Schaefer and Iozzo, 2008) 잉어의 피부 점액 상호 단백질로 보고된 이전 연구와 유사했다(Saleh et al., 2018). 또한 zebra fish의 Lumican 유전자를 knock down 시킨 이전 연구에서는 눈의 공막이 얇아져 눈 보호 기능이 저하됨을 확인 할 수 있었다(Yeh et al., 2010b). 결과적으로 이번 연구에서는 정상 PmLum의 조직별 발현으로 이전 연구들과 유사한 Lumican의 기능을 유추 할 수 있었으며, 특히 Lumican이 피부와 눈에서의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 예상된다.

E. piscicida, S. iniae, RSIV의 인위감염 후 PmLum은 모두 간에서 높은 발현을 보였는데, 이는 세균 및 바이러스에 노출 시 간이 손상되고(Verma V, 2008), 손상된 간세포는 Lumican 생산에 기여 한다는 결과(Krishnan et al., 2012)와 유사하여 PmLum이 인위감염 후 면역반응을 하기 위해 간세포가 Lumican을 생산 할 것이라 사료된다. 이에 반해 비장에서는 유의적으로 낮은 발현을 보였는데, 이는 내피세포에서 apoptosis를 유발하는 Lumican의 기능과 연관된다(Williams, et al., 2010). 따라서 이러한 apoptosis가 일어나면서 세포가 제거되어 기관 손상을 초래해 Lumican이 하향 조절된 것으로 생각된다. 하지만 단순히 apoptosis로 인한 결과로 단정 지을 수 없으며, 비장에서의 Lumican의 면역반응조절에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

결과적으로 이번 연구에서는 참돔으로부터 PmLum을 분리 및 동정하여 분자적 특성을 확인하였고, 조직별 발현분석과 세균·바이러스성 질병 감염 시 PmLum의 발현 변화를 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 참돔 내 조직 손상에 대한 복구와 면역기능을 하는 단백질로서의 가능성을 제안 할 수 있었으며, 참돔의 면역체계와 생리적인 특성을 이해하고 연구하는데 중요한 기초자료로써 제시될 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 아직까지 어류에서의 Lumican 유전자에 대한 다양한 연구가 부족하여 추후의 연구에서는 어류의 생리·생태적 특성을 고려한 단백질 수준에서의 조직복구와 면역 활동에 대한 추가적인 기능 연구가 수행되어야 할 것이다.

References

Blochberger TC, Cornuet PK and Hassell JR(1992). Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J. Biol Chem* 267, 20613~20619.

Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ,

LaMantia C and Carroll H(1998). Lumican Regulates Collagen Fibril Assembly: Skin Fragility and Corneal Opacity in the Absence of Lumican. *J Cell Biol* 141, 1277~1286. https://doi.org/10.1083/jcb.141.5.1277.

Chakravarti S, Petroll WM, Hassell JR, Jester JV, Lass JH, Paul J and Birk DE(2000). Corneal Opacity in Lumican-Null Mice: Defects in Collagen Fibril Structure and Packing in the Posterior Stroma. *J Invest Ophthalmo Vis Sci* 41, 3365~3373.

Chyung, MK(1977). The Fishes of Korea. Ilji-sa, Seoul, 361.

Dolhnikoff M, Morin J, Roughley PJ and Ludwig MS(1998). Expression of lumican in human lungs. *J Respir Cell Mol Biol* 19, 582~587. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.4.2979.

Kader MA, Bulbul M, Koshio S, Ishijkawa M, Yokoyama S, Nquyen BT and Komilus CF(2012). Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red seabream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 20, 109~116. https://doi.org/10.1016/j. aquaculture.2012.04.009.

Karamanou k, franchi m, vynios d and Brézillon S(2020). Epithelial-to-mesenchymal transition and invadopodia markers in breast cancer: Lumican a key regulator. *Semin Cancer Biol* 62, 125~133. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.003.

karamanou k, perrot g, maquart f.x and Brézillon S(2018). Lumican as a multivalent effector in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* 129, 344~351. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.011.

Kim KH, Cho DH, Joo MS, Choi KM, Park CI and Kim MC(2020). Molecular Characterization and Expression Analysis of the Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) Gene from Red sea Bream *Pagrus major*. *JFMSE* 32, 1153~1167. http://doi.org/10.13000/JFMSE.2020.10.32.5.1153.

Kobe B and Kajava A.V(2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725~732. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00266-4.

Korean statistical information service (KOSIS) 2016

Krishnan A, Li X, Yang Kao WW, Viker K, Butters K, Masuoka H, Knudsen B, Gores G and Charlton M(2012). Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis, *Lab Invest* 92, 1712~1725. https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.121.

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, 402~408.

Matsushima N, Miyashita H, Mikami T and Kuroki Y(2010). A nested leucine rich repeat (LRR) domain: The precursor of LRRs is a ten or eleven residue motif. *BMC Microbiol* (235), 1471~2180. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-235.

Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K and Kuroki Y(2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 8. http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-124.

Ng AC, Eisenberg JM, Heath RJ, Huett A, Robinson CM, Nau GJ and Xavier RJ(2011). Human leucine-rich repeat proteins: a genome-wide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 4631~4638. https://doi.org/10.1073/pnas.1000093107.

Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK and Tzanakakis GN(2008). Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *J IUBMB* Life 60, 818~823. https://doi.org/10.1002/iub.131.

Padmanabhan M, Cournoyer P and Dinesh-Kumar SP(2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. Cell Microbiol 11, 191~198. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01260.x.

Saleh M, Kumar G, Abdel-Baki AA, Dkhil MA, El-Matbouli M and AI-Quraishy S(2018). Quantitative shotgun proteomics distinguishes wound-healing biomarker signatures in common carp skin mucus in response to *Ichthyophthirius multifiliis*. Vet Res 49. http://doi.org/10.1186/s13567-018-0535-9.

Sawada A, Takihara Y, Kim JY, Matsuda-hashii Y, Tokimasa S, Fujisaki H, Kubota K, Endo H, Onodera T, Ohta H, Ozono K and Hara J(2003).

A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans. *J Clin Invest* 112, 1707~1713.

Schaefer L and Lozzo RV(2008). Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *J Biol Chem* 283, 21305~21309.

Son MY, Choi KM, Joo MS and Park CI(2020). Molecular Characterization and Expression Analysis of the Interleukin 7 Receptor Alpha Chain (IL-7R α) Gene from Red Sea Bream (*Pagrus major*). *JFMSE* 32, 560~569. https://doi.org/10.13000/JFMSE.2020.4.32.2.560.

Song JW and Lee KJ(2013). Effects of Dietary Nucleotide Supplementation on the Growth Performance, Feed Utilization, Hematological Parameters and Innate Immunity in Red Sea bream *Pagrus major*. *Kor J Fish sci* 46, 785~792. https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0785.

Sriphaijit T and Senapin S(2007). High expression of a novel leucine-rich repeat protein in hemocytes and the lymphoid organ of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 22, 264~271. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.001.

Sztrolovics R, Alini M, Mort JS and Roughley PJ(1999). Age-related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral discs. *J Spine* 24, 1765~1771. https://doi.org/10.1097/00007632-199909010-00003.

Tang QS, Sun Y and Zhang B(2003). Bioenergetics models for seven species of marine fish. *Journal of Fisheries of China* 27, 443~449.

Tingbø MG, Pedersena ME, Grøndahl F, Kolset SO, Veiseth-Kent E, Enersen G and Hannesson KO(2012). Type of carbohydrate in feed affects the expression of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), glycosaminoglycans (GAGs) and interleukins in skeletal muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*). *Fish Shellfish Immunol* 33, 582~589. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.025.

Verma V(2008). Fungus disease in fish, diagnosis and treatment. *Veterinary World* (1), 62.

Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'Onofrio MF, Ramont L, Venteo L, Perreau C, Antonicelli F, Maquart FX and Wegrowski Y(2004). The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression.J Exp Cell Res (296), 294~306. http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.02.005.

Vij N, Roberts L, Joyce S and Chakravarti S(2005). Lumican regulates corneal inflammatory responses by modulating Fas-Fas ligand signaling. J Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 88~95. https://doi.org/10.1167/iovs.04-0833.

Williams KE, Fulford LA and Albig AR(2010). Lumican reduces tumor growth via induction of fas-mediated endothelial cell apoptosis. Cancer Microenviron 18(4), 115~126. http://doi.org/10.1007/s12307-010-0056-1.

Wu F, Vij N, Roberts L, Lopez-Briones S, Joyce S and Charkravarti S(2007). A Novel Role of the Lumican Core Protein in Bacterial Lipopolysaccharide-induced Innate Immune Response. J Biol Chem (282), 26409~26417.

Yeh JT, Yeh LK, Jung SM, Chang TJ, Wu HH, Shiu TF, Liu CY, Kao WWY and Chu PH(2010a). Impaired skin wound healing in lumican-null mice. *BrJ Dermatol* 163, 1174~1180. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10008.x.

Yeh, LK, Liu, CY, Kao, WWY, Huang, C.., Hu, FR, Chien, CL, and Wang, IJ(2010b). Knockdown of Zebrafish Lumican Gene (zlum) Causes Scleral Thinning and Increased Size of Scleral Coats. *J Biol Chem* 285, 28141~28155.

Zhao Y, Li X, Xu X, He Z, Cui L and Lv X(2016). Lumican alleviates hypertrophic scarring by suppressing integrin-FAK signaling. J Biochem Biophys Res Commun 480, 153~159. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.159 .

• Received : 08 April, 2021
• Revised : 17 May, 2021
• Accepted : 27 May, 2021