

참돔(*Pagrus major*)에서 동정된 CD74b의 분자유전학적 특성 및 발현분석

김민규 · 강경식 · 우원식 · 김경호 · 손민영 · 손하정 · 공희정* · 김주원* · 박찬일†
경상국립대학교(연구원) · *국립수산과학원(연구사) · †경상국립대학교(교수)

Molecular Characterization and Gene Expression Analysis of CD74b in Red Sea Bream (*Pagrus major*)

Min-Kyu KIM · Gyoung Sik KANG · Won-Sik WOO · Kyung Ho KIM · Min-Young SON ·
Ha-Jeong SON · Hee Jeong KONG* · Ju-Won KIM* · Chan-Il PARK†

Gyeongsang National University(researcher) · *National Institute of Fisheries Science(researcher) ·
†Gyeongsang National University(professor)

Abstract

The major histocompatibility complex class II-associated invariant chain is a molecule involved in antigen presentation, specifically in the context of T cells, which are effector cells of adaptive immunity. CD74 is a protein that reacts with MHC class II molecules and functions to transmit signals into cells by interacting with macrophage migration inhibitory factor. Red sea bream is one of the major marine aquaculture fish in Korea. Many studies on breeding but molecular studies are markedly lacking. In this study, CD74b was isolated from red sea bream (*Pagrus major*) and phylogenetic analysis, tissue expression and expression analysis through pathogen artificial infection were performed. As a result, it showed high expression in gills, brain and intestine. In addition, when analyzing *Edwardsiella piscicida*, *Streptococcus iniae*, and red sea bream iridovirus, it was confirmed that CD74b has an immune response function. This study characterizes CD74b may play an important role in the immune response of red sea bream following pathogenic infections.

Key words : Red sea bream, CD74b, MHC class II, Gene expression

I. 서론

참돔(*Pagrus major*)은 농어목(Perciformes) 도미과(Sparidae)에 속하는 온대성 어류로 한국의 주요 해산양식어류로서 고급어종으로 분류되어 있다(Fei Zhu et al., 2018). 양식어류로서 수요가 점점 증가되고 있을 뿐만 아니라, 활선어로서 수출

되어 외화획득에도 상당한 몫을 차지하고 있다(Noah, 2012). 그러나 수요를 맞추기 위해 밀집된 상태로 수행된 양식으로 질병에 취약해짐에 따라, *Streptococcus iniae* (*S. iniae*), red seabream iridovirus (RSIV) 등의 질병으로 인한 대량폐사로 인해 매년 양식장에서는 큰 피해를 입고 있다(Kader et al., 2012). 이러한 질병에 대한 대책으

† Corresponding author : 055-672-9253, vinus96@hanmail.net

* 이 논문은 2023년도 국립수산과학원 수산시험연구사업(R2023024)의 지원으로 수행된 연구입니다.

로 양식장에서는 항생제를 많이 이용해 왔지만, 항생제 오남용으로 인한 약제내성균의 증가 및 어체 내 약제잔류에 의한 안전성의 문제를 일으킬 수 있으며 수생환경에 악영향을 끼칠 수 있다 (Jung et al., 2008). 이러한 내성을 가지게 되거나 주변 수역에 영향을 주는 항생제를 대체하기 위해 현재 다양한 백신들이 연구되고 있다 (Song et al., 2021). 그러나 참돔은 현재까지 성장매개변수 및 계능 편집을 통한 육종 연구가 중점으로 수행되어지고 있다 (Kato et al., 2023). 분자적인 연구에 관해서는 발현분석과 관련하여 수행되어진 부분이 있지만 아직도 부족한 실정이다 (Woo et al., 2020). 따라서 참돔에 대한 양식장 질병을 체계적으로 관리하기 위해서는 면역 시스템에 대한 지속적인 연구가 필요하다 (Lieschke et al., 2009).

어류의 면역체계는 척추동물에서 가장 원시적인 형태의 특이면역 체계를 가지고 있다 (Secombes et al., 2012). 척추동물의 면역체계는 NK세포와 대식세포 등에 의한 선천성면역과 림프구에 의한 후천성면역으로 나뉘어진다 (Björge et al., 2022). 특히 어류는 상대적으로 선천성면역 체계가 발달되어 있어 생체방어에 있어서 많은 비중을 차지하고 있다 (Bergljót et al., 2006). 그러나 어류의 후천성 면역체계에 대한 연구는 부족한 실정이기 때문에, 양식기술 발달에 의한 대량 양식에 있어서 후천성면역에 대한 지속적인 관심이 필요하다 (Plouffe et al., 2005).

주조직 적합 복합체 (Major Histocompatibility Complex, MHC)는 대표적인 후천 면역 작용 세포인 T세포의 항원인자에 관여하는 분자로 대부분의 척추동물에서 면역계와 자가 면역에 중요한 역할을 한다. MHC는 합성된 단백질 조각을 CD8 및 CD4 T세포에 제시하는 역할을 수행한다. MHC가 세포의 표면에 위치하면, peptide는 peptide-binding grooves로써 돌출된 primary & secondary anchor 잔기를 통해 MHC 분자와 결합한다 (Kenneth et al., 2016). 확인된 단백질이 self peptide가 아닌 것으로 판명되면, 면역세포는 그

감염된 세포를 사멸시킨다 (Yamaguchi et al., 2019).

MHC는 크게 I형과 II형 두 종류로 나뉜다. MHC class I 분자는 척추동물 신체의 모든 유희 세포의 세포 표면에서 발견된다 (Grimholt et al., 2015). 혈소판에서도 발생하나 적혈구에서는 발생하지 않으며, 세포 내에서 세포독성 T세포까지 단백질의 peptide 단편을 표시한다 (Jurewicz et al., 1998). 포유동물의 경우 핵을 가진 세포에서는 거의 모든 MHC class I을 발현한다 (Jurewicz et al., 1998). MHC class II는 수지상세포, 단핵식세포, 일부 내피세포, 흉선상피세포 및 B세포와 같은 전문적인 항원제시세포에서만 발견되는 MHC class 분자이다 (Mair et al., 2021). 인간에서 MHC class II 단백질 복합체는 인간 백혈구 항원 유전자 복합체 (Human Leukocyte Antigen, HLA)에 의해 암호화된다. MHC 클래스 II에 해당하는 HLA는 HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR이다. MHC class II 분자의 작용은 식균작용에 의해 발생하며 면역 반응을 시작함에 있어서 중요한 역할을 한다 (Zhu et al., 2022). MHC class I 분자와 마찬가지로 MHC class II 분자도 이중이량체지만 두 개의 동종 펩티드인 α 및 β 사슬로 구성되며 두 펩티드 모두 MHC에서 암호화된다 (Peter, 1996).

CD74 (Cluster of differentiation 74)는 MHC class II 분자와 반응하는 type II transmembrane 단백질로 다양한 면역세포들과 상호작용하고, 면역반응과 염증반응에 관여하는 물질로 알려져 있다 (Potru et al., 2023). HLA class II 조직 적합성 항원감마 (HLA class II histocompatibility antigen gamma chain) 및 HLA-DR 항원 관련 불변 사슬 (HLA class II antigens-associated invariant chain)로 알려진 CD74는 인간에서 CD74 유전자에 의해 암호화되는 단백질이며, 백신 보조제의 개발 및 macrophage migration inhibitory factor (MIF)와 같은 분자들과 작용하는 등 임상학적으로도 중요한 역할을 한다 (Zhengshi et al., 2022). CD74는 MHC

CLASS II가 아닌 CD74 자체의 역할로써 인간의 장 염증 동안 장벽 보호 및 암이나 염증 같은 면역 질환에서 새로운 치료법으로 활용되는 연구도 수행되어져 왔다(Farr et al., 2020). 경골어류에서 CD74는 CD74a와 CD74b가 확인되어졌고(Dijkstra et al., 2003), 참돔에서 CD74a에 대한 유전자 발현 분석 연구가 수행되었지만(Woo et al., 2020), CD74b에 대한 연구는 수행되어진 바가 없다.

이번 연구에서는 참돔으로부터 CD74b를 분리 및 동정하여 분자적 특징에 대해 확인하였으며, 정상 어체에서 CD74b 유전자의 조직 특이적 발현 분석과 참돔 양식 산업에서 막대한 피해를 주는 *Edwardsiella piscicida* (*E.piscicida*) 또는 *Streptococcus iniae* (*S. iniae*), red seabream iridovirus (RSIV)를 인위 감염시킨 후 조직별 유전자 발현양상을 확인하였다.

II. 연구 방법

1. Next Generation Sequencing (NGS) 분석을 통한 full-length 확보

Lipopolysaccharide (LPS)로 자극시킨 참돔의 간으로부터 Next Generation Sequencing (NGS) 분석을 통해 CD74b의 Open reading frame (ORF) sequence를 확보하였다.

2. Molecular characteristic and phylogenetic analysis

동정된 CD74b ORF의 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. 분자중량 (Molecularweight, MW)과 등전점(theoretical isoelectric point, pI)은 ExPASy Proteomics Serve의 ProtParam tool

(<http://web.expasy.org/protparam/>)을 이용하여 예측되었다. 특정 도메인은 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)로 위치를 확인하였다. NCBI의 sequence database에 등록되어 있는 다른 종들의 CD74b 아미노산 서열과의 multiple sequence alignment는 ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)를 이용하여 분석하였다. 또한 CD74b의 계통발생학적 분석은 MEGA4 program의 neighbor-joining (NJ)법을 이용하여 제작하였으며, bootstrap sampling은 2,000번 반복 수행하였다.

3. 유전자 발현분석

가. 실험어

실험어는 경상남도 수산자원연구소로부터 체장 14.3 ± 1 cm, 체중 68.5 ± 10 g인 참돔을 제공받아 사용하였다. 실험에 사용 전 0.5 ton 수조에 20-23 °C에서 2주간 순치하였으며, 사료는 1일 1회 규칙적으로 포만감이 들 때까지 충분히 급여하였다.

나. 정상 어체에서의 조직별 발현분석

① 조직 분리

실험에 쓰일 조직 적출을 위해 건강한 참돔 세 마리를 Benzocaine (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 마취하여 체신, 두신, 비장, 간, 장, 아가미, 눈, 뇌, 근육, 심장, 피부, 위를 적출하였다. 이 때, 세 마리 각 장기는 같은 위치에 있는 조직을 무균상태로 sampling 후 사용하였다.

② Total RNA 분리와 cDNA 합성

참돔 세 마리로 부터 적출한 조직들은 TRIzol 기반의 RNAiso (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 먼저 각 샘플에 RNAiso 600 μ L를 첨가하고 homogenizer로 마쇄하여 균질화 하였다. 그리고 chloroform (Deajong, Republic of Korea)를 100 μ L 첨가하여 vortex한 후, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 분리된 상청액은 새로운 e-tube에 옮긴 후 PCI

(Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol = 25:24:1) (Biosesang, Republic of Korea)를 동량 첨가하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. Genomic DNA의 제거를 위해 상청액은 Recombinant DNase I (TaKaRa)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 DNase처리하였으며, 상청액을 새로운 e-tube에 옮긴 후, isopropanol (Sigma, St.Louis, MO, USA) 500 μ L, Dr.Gen (TaKaRa) 5 μ L, 3M sodium acetate (TaKaRa) 50 μ L를 첨가하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상청액은 모두 제거를 하고, 세척을 위해 75% DEPC ethyl alcohol 600 μ L를 첨가하여 14,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 남은 상청액 제거를 위해 상온에서 10-15분 자연 건조한 후, DEPC DDW 30-40 μ l를 첨가하여 완전히 용해하였다. cDNA를 합성하기 전, total RNA는 농도와 순도를 측정하기 위해 NanoVue (GEhealthcare, USA)를 이용해 측정하였고, PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)를 이용하여 제조사의 방법에 의거해 cDNA로 합성하였다. 그리고 DNase 처리한 total RNA 1 μ L과 Oligo dT primer 1 μ L, dNT Pmixture 1 μ L, RNase free water 7 μ L를 포함하는 총량 10 μ L를 혼합하여 65°C에서 5분간 반응 후, 얼음 상에서 5분간 반응시켰다. 그 후 위의 반응액에 5×Script Buffer 4 μ L와 RNase Inhibitor 0.5 μ L, Primer Script RTase 1 μ L, RNase free water 4.5 μ L를 혼합한 총량 20 μ L를 30°C에서 10분간 반응 후, 42°C에서 60분, 95°C에서 5분간 반응시켰다.

③ Primer 제작

<Table 1> Primer sequences and condition were used in this study

Target	Usage	Primer Sequence (5' - 3')	qRT-PCR condition
CD74b	qRT-PCR F	AGTCACTGGAGGAGCAGAGC	95°C for 10 min followed by 45 cycles at
	qRT-PCR R	AACTTTGAAGGGGCAGGTTT	
EF-1 α	qRT-PCR F	GACAGGTTTGTGCTTGTGTG	95°C for 20 s and 60°C for 1 min
	qRT-PCR R	GTCTCTGGAGATGATTTCAGC	

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)에 사용된 primer는 CD74b의 cDNA full-length sequece에 기초하여 Primer3 ver. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)을 이용하여 디자인하였다(<Table 1>).

④ Real-time PCR (RT-qPCR)

건강한 참돔에서 CD74b의 발현 정도를 확인하기 위해, TB Green Master Mix (TaKaRa)를 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 RT-qPCR을 수행하였다. 즉, cDNA template 1 μ L와 forward-reverse primers 각각 1 μ L, TB Green 12.5 μ L, DDW 9.5 μ L를 총 량 25 μ L이 되도록 혼합하였다. 증폭조건은 50°C에서 4분간 그리고 95°C에서 10분간 initial denaturation, 후에 95°C에서 20초, 60°C에서 1분을 1회로 하여 총 45회 반응시켰으며, 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 30초, 95°C에서 15초 final dissociation 하였다. 확인된 CD74b의 발현값은 EF-1 α mRNA의 발현값과 비교하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001)에 의해 계산하였다. 모든 실험은 세 반복씩 수행하였고, 모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였다. 조직들 간의 유의적 차이는 one-way analysis of variance(ANOVA) test에 의해 확인되었다(*p < 0.05).

다. 병원체 인위감염 후 시간별 발현분석

① 병원체 인위감염

병원체에 인위감염 후 CD74b의 발현특성을 확인하기 위해 준비된 그람양성세균인 *S. iniae*와 그람음성세균 *E. piscicida*, RSIV를 각각 1.5×10^5 cells/fish와 1.5×10^5 cells/fish, 1×10^5 copies/fish가

되도록 PBS에 현탁시킨 후, 참돔의 복강에 주사하였고, control (대조구)은 동량의 PBS를 복강주사하였다. 각 실험구와 control은 1.5 ton 수조에 90마리씩 수용하였으며, 수온은 23-26°C로 유지하였다. 병원체와 PBS를 주사한 후 1시간과 12시간, 1일, 3일, 5일, 7일 차에 각각의 실험구와 control로부터 무작위로 세 마리를 선정하여 아가미와 간, 신장, 비장 조직을 무균적으로 적출하였다. 적출한 조직은 실험에 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다. Total RNA 분리와 cDNA 합성은 위의 정상 어체에서 설명한 것과 같은 방법으로 수행되었다.

② Real-time PCR

다양한 병원체 인위감염에 의한 CD74b의 발현 분석을 위해, 위에 설명한 것과 같은 방법으로 RT-qPCR을 수행하였다. 그리고 각 유전자의 발현수준은 위의 기술사항과 동일하게 $2^{-\Delta\Delta CT}$

method에 의해 계산되었으며, 모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였다. 통계처리는 one-way ANOVA test로 수행되었다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Ⅲ. 연구 결과

1. CD74b의 유전학적 동정과 Amino Acid Sequence 특성화

가. Sequence 분석

CD74b cDNA의 ORF는 600 bp로 199개의 amino acid (aa)을 암호화하였고([Fig. 1]), CD74b의 아미노산은 104aa의 MHC2-interact (4 - 107 aa) 및 46aa의 Thyroglobulin type I repeats (138 - 183 aa)를 포함하고 있었다([Fig. 1]). CD74b의 등전점(pI)은 5.44, 분자중량은 21 kDa으로 측정되었다.

```

1  ATGTCGGACCCCGAGACCCAAACTCCTCTCATTGGAGGTCGGCCAGCCAACAATGTACCAGCAGCACAGG  70
   M S D P E T Q T P L I G G R P A N N V P A A Q
71  GTGGCAATTCCAGCCGGGCCTATAAGATTGCAGGGATAACCCTGTTGGCCTGCGTCTGATTGCCGGCCA  140
   G G N S S R A Y K I A G I T L L A C V L I A G Q
141 GGTGATGACTGCCTACTTCCTCCTCAGCCAGAGGAGCGACATCCAGTCACTGGAGGAGCAGAGCAACAAG  210
   V M T A Y F L L S Q R S D I Q S L E E Q S N K
211 ATGAACGCTGATATGACGAGGGGAAGATCTGTTGCTGTCCCGTTCAGATGCCTTGCCCATGAACTCCC  280
   M N A D M T R G R S V A V P V Q M H L P M N S
281 TGCCTGAGCTGATGGATGACTCTGTGGATGAGGAGGCCTCCACCGGAACCCCGAGAAAAACCTGCCCTTC  350
   L P E L M D D S V D E E A S T G T P E K P A P S
351 AAAGTTGACTGACTGCCAGCTGGAGGCAGCTGGTTTTGAAGGCCGTGCAGGTGCCAGGTTTCCGCCCCAGC  420
   K L T D C Q L E A A G L K A V Q V P G F R P S
421 TGTAACAAGCGTGGCCTCTACCAGGCGATGCAGTGCTTCGGGAGACACTGCTGGTGTGTGAACCCAGTCA  490
   C N K R G L Y Q A M Q C F G R H C W C V N P V
491 ACGGCGAAGTGACCCAGGATCCCTGCAGGAAGGACCGGTGAGGTGCACTGTTGCTCTCCTCCCTGGCCG  560
   N G E V T P G S L Q E G P V R C T V A L L P G R
561 CATGACCAAAGCGTTGACTCTGCCTGAAGTGGAGGAGTGA  600
   M T K A L T L P E V E E *
    
```

[Fig. 1] Red sea bream CD74b nucleotide and amino acid sequences. MHC2-interact are boxed with gray. Thyroglobulin type I repeats are boxed with black gray.

나. Multiple sequence alignment 분석

CD74b의 아미노산 서열과 다른 어류 및 포유류 CD74b의 아미노산 서열과의 multiple alignments 분석한 결과 CD74b는 *Sparus aurata*의 CD74b와 87%로 가장 높은 상동성을 보였으며, *Cyprinus carpio* CD74b와는 37%의 비교적 낮은 상동성을 보였다([Fig. 2]).

다. 계통발생학적 분석

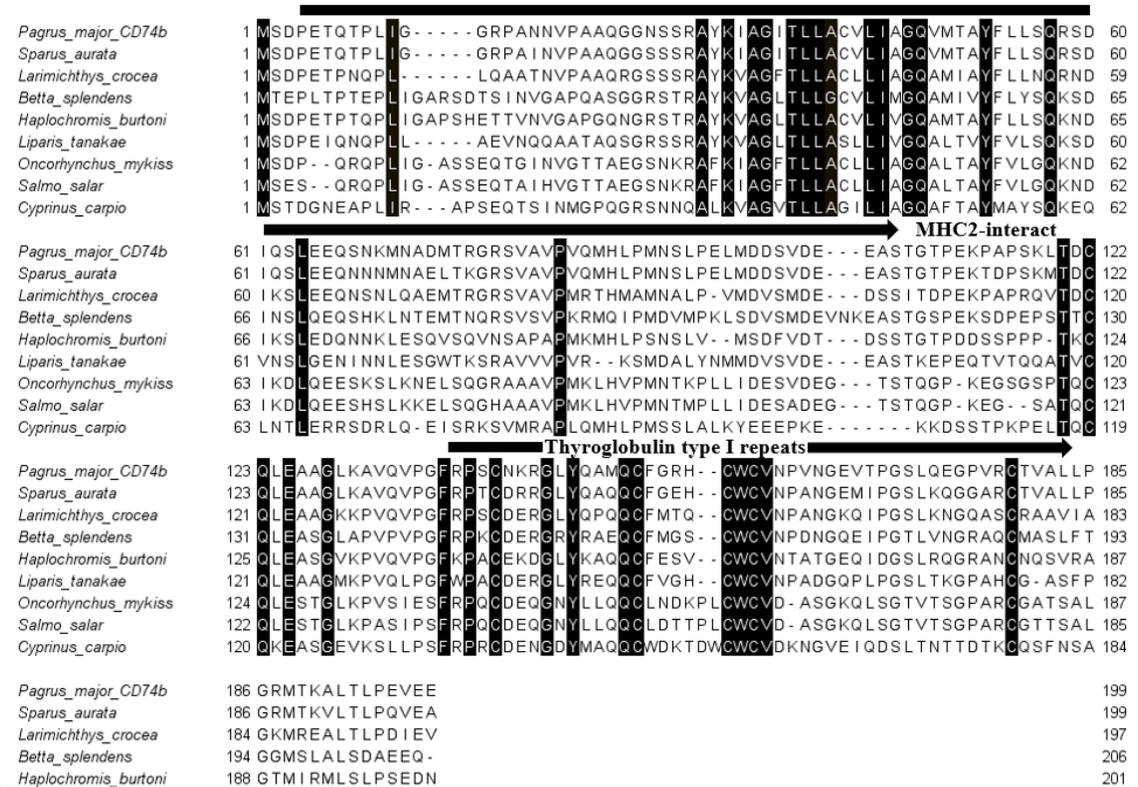
CD74b의 계통발생학적 분석결과 어류의 CD74b는 포유류와 차별된 별개의 cluster로 나뉘어 있었으며, CD74b는 어류 CD74b의 cluster에

포함되어 있었다. 또한 *Pagrus major* CD74b는 *Sparus aurata*와 가장 밀접한 유연관계를 보였다 ([Fig. 3]).

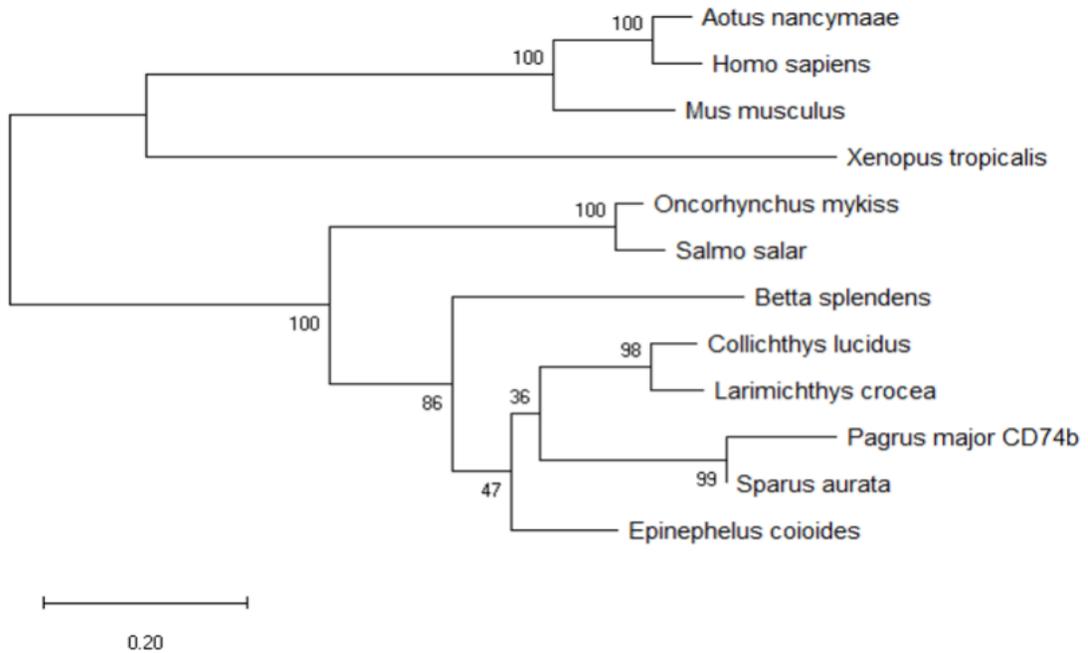
2. 유전자 발현분석

(1) 정상 어체에서의 조직별 발현분석

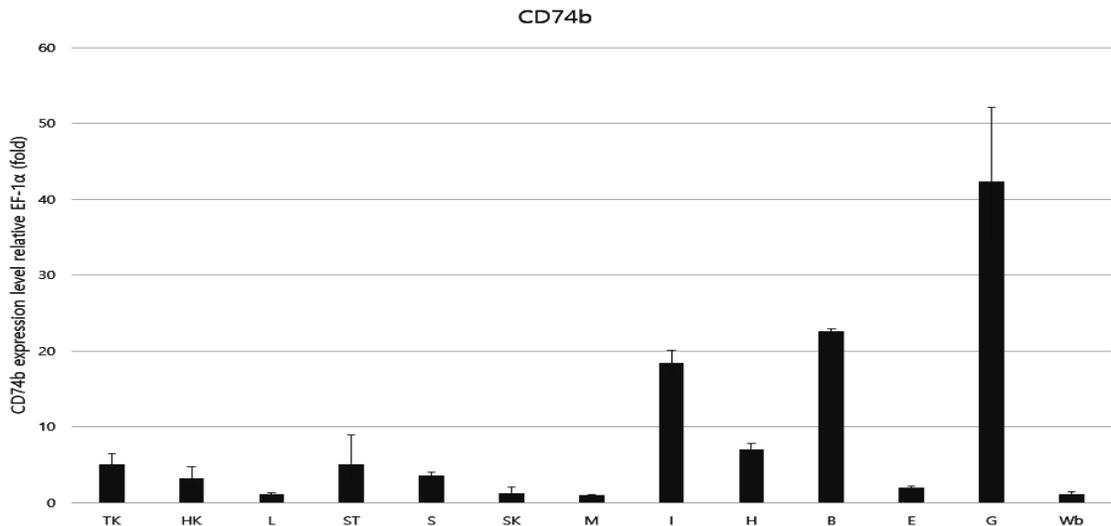
건강한 참돔에서의 조직 특이적 발현분석 결과 CD74b의 mRNA는 아가미에서 가장 높은 발현을 보였으며, 그 뒤를 이어 뇌와 장에서 유의적으로 높은 발현을 보였다([Fig. 4]). 하지만 근육, 간, 피부에서는 비교적 낮은 발현수준을 보였다.



[Fig. 2] Multiple sequence alignments of Red sea bream CD74b amino acids with other known homologs of other vertebrates. NCBI accession numbers of dicentracin are as follows: *Sparus aurata*, XP_030297717.1; *Larimichthys crocea* KAE8280808.1; *Betta splendens* XP_029031720.1; *Liparis tanakae* TNN45487.1; *Oncorhynchus mykiss* NP_001117913.1; *Salmo salar* AC169361.1; *Cyprinus carpio* XP_018974595.1.



[Fig. 3] Phylogenetic analysis of deduced CD74b amino acid sequences with CD74b other species. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method within MEGA 4 software. Bootstrap sampling was performed with 2,000 replicates. The scale bar is equal to 0.2 change per amino acid position.

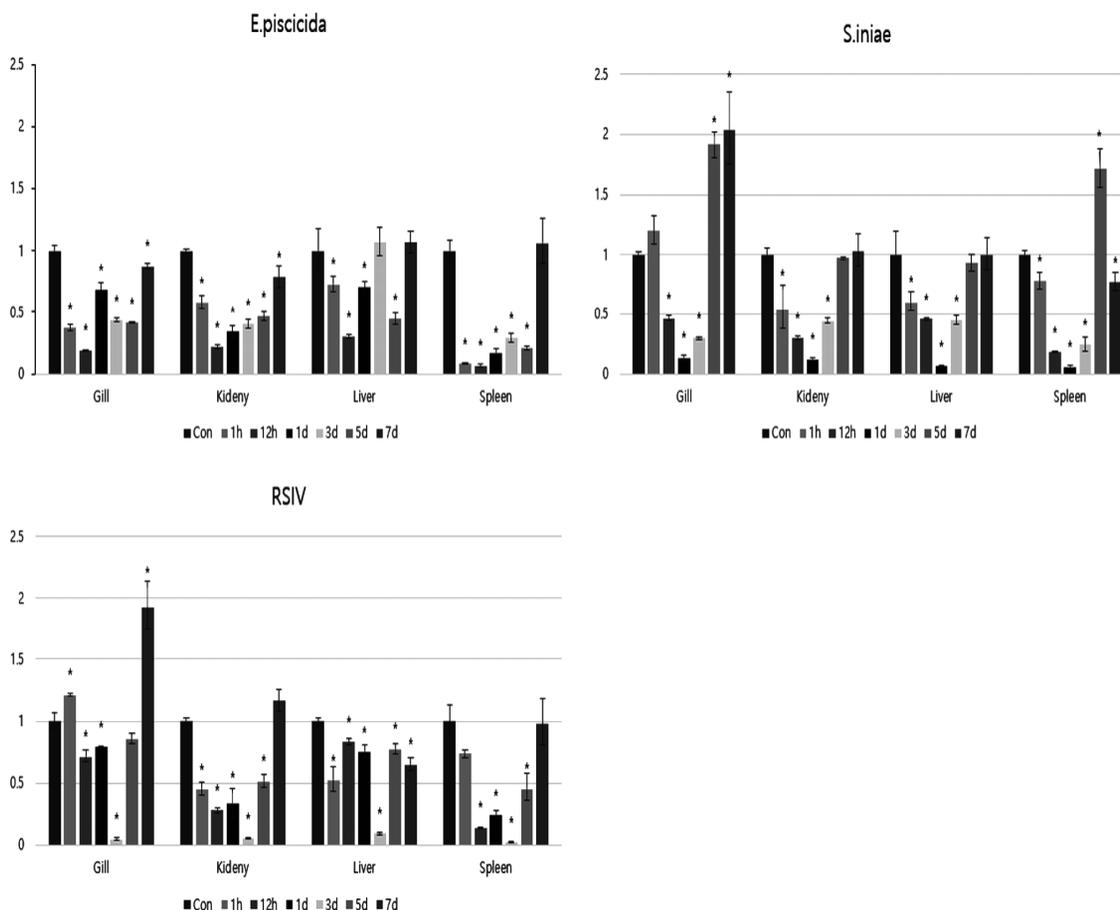


[Fig. 4] Expression analysis of CD74b genes in different tissues of healthy red sea bream by real-time PCR. EF-1 α was used for normalizing the real-time PCR results. Data are presented as the mean \pm SD from three independent cDNA samples with three replicates from each sample. Asterisks indicate significant differences compared to muscle.

(2) 병원체 인위감염 후 시간별 발현분석

세균과 바이러스를 참돔에 인위감염 시킨 후 아가미, 간, 신장, 비장에서 CD74b 유전자의 발현 패턴을 RT-qPCR을 이용하여 확인하였다. *S. iniae*를 감염시킨 그룹에서의 CD74b 발현결과 아가미에서는 5일째와 7일째에 유의적으로 높게 발현하였고, 특히 7일째에 가장 높은 발현이 나타났다. 신장과 간에서는 인위감염 직후 발현수준이 낮아졌지만, 3일째부터 점차 증가하는 양상이 확인되었다. 비장에서는 5일째에 유의적으로 높

은 발현율을 확인할 수 있었다. 한편 RSIV를 인위감염 시킨 후 아가미는 7일째에 발현이 유의적으로 증가하였고 신장에서는 1일째와 3일째에 유의적으로 발현이 감소하였고 아가미와 마찬가지로 7일째에 발현이 유의적으로 증가하였다. 간에서는 3일째에 가장 낮은 발현이 나타났다. 비장에서는 3일째에 가장 낮은 발현이 나타났다. *E. piscicida*를 인위감염 시킨 후, 모든 조직에서 발현수준이 낮아졌지만, 시간 경과에 따라 발현이 증가하는 양상이 확인되었다(Fig. 5).



[Fig. 5] Gene expression of CD74b in the gill, liver, kidney and spleen after infection with *Edwardsiella piscicida* (A), *Streptococcus iniae* (B) and Red sea bream iridovirus (C). Levels of CD74b transcripts were quantified relative to that of EF-1 α levels. Data are presented as the mean \pm SD from three independent cDNA samples with three replicates for each sample. Asterisks represent significant differences compared to the control (PBS) group by ANOVA (* $p < 0.05$).

IV. 결론

이번 연구에서는 비특이적 면역유전자인 CD74b를 NGS분석을 통해 참돔으로부터 분리 후 동정하여 분자적 특성에 대하여 조사하였다. Sequence 분석을 통하여 CD74b의 아미노산은 MHC2-interact 및 Thyroglobulin type I repeats를 포함하고 있는 것이 확인되었다. MHC2-interact는 같은 기원의 B세포와 T세포가 상호작용하는 동안 CD74의 매개로 B세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다 (Katikaneni et al., 2018). Thyroglobulin type I repeats는 진화적으로 보존된 단백질 도메인으로 시스테인 프로테아제에 대한 억제 활성이 보고되어져 있다 (Mihelic et al., 2007).

어류의 CD74에 대한 연구는 포유류에 비해 상대적으로 부족하였으며, 이번 연구를 통해서 CD74b의 도메인 내 서열이 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다 ([Fig. 1]). 이전 연구에서 MHC의 세포 내 이동 및 펩타이드 리간드를 적재하기 위한 MHC class II인 어류 및 포유류의 유사한 경로는 포유류에서 알려진 것과 유사하게 MHC class I의 경우 Proteasome subunit (PSMB), Transporter Associated with antigen Processing (TAP) 및 tapasin 분자, MHC class II의 경우 CD74와 같은 특정 분자 집합을 가진 어류에 의해 제시되어졌다 (Dijkstra and Ymaguchi., 2019). 이번 연구결과 참돔의 CD74b는 *Sparus aurata*와 가장 높은 상동성을 보이는 것이 확인되었으며 *Cyprinus carpio*와는 비교적 낮은 상동성이 확인되었다 ([Fig. 2]). 또한 어류의 CD74b는 포유류와 차별된 별개의 cluster로 나뉘져 있었으며, CD74b는 어류 CD74b의 cluster에 포함되어 있었다 ([Fig. 3]). 어류의 종에 따른 cluster의 분리도 확인되었기에, CD74b가 어류의 진화과정에서 잘 보존되어 온 것으로 생각된다.

이전 연구들에 따르면 인간의 CD74는 위장관

에서 높은 mRNA 발현을 확인할 수 있었고, 특히 암세포 내에서 주로 많이 발현되었다 (Gold et al., 2010).

이번 연구의 조직별 발현분석에서는 참돔의 여러 조직에서 CD74가 나타나는 모습을 확인할 수 있었는데, 그 중에서 아가미에서 가장 높은 발현이 나타났고 다음으로 뇌, 장에서 많은 발현이 나타나는 것을 확인할 수 있었다([Fig. 4]). 어류의 면역체계는 포유류의 것과 비교하면 조혈기관이 골수가 아닌 아가미, 간, 비장 및 신장이라는 면에서 차이가 있다 (Lieschke et al., 2009). 어류의 아가미는 병원체의 접촉에서 가장 밀접한 경로 중 하나이다. 병원체가 아가미를 통해 숙주 내에 들어가면 대식세포에 의해 처리되어 혈액에 의해 전신으로 운반된다고 보고되어져 왔다(Li et al., 2018). 이번 연구에서 아가미에서 참돔의 CD74가 많은 발현이 나타난 것을 보아서 아가미는 면역 반응에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 생각되어진다.

이번 연구에서는 참돔의 주요 병원체인 두 가지의 균과 하나의 바이러스 감염에 따른 참돔의 CD74b의 아가미와 신장, 간, 비장에서 조직별 발현분석 결과, 그람음성균인 *E. piscicida*의 감염 후 CD74b는 모든 조직에서 일시적으로 발현이 감소하고, 시간 경과에 따라 증가하는 것이 확인되었다.

*S. iniae*의 인위감염에서 5일째에 아가미에서 발현이 증가하였고 7일째에 가장 높은 발현량을 보였으며, 비장에서는 5일째에 가장 높은 발현량이 관찰되었다. 수생환경에 쉽게 노출되어 있는 아가미는 병원균의 침입경로라고 할 수 있다 (Chu et al., 2008). 병원균의 직접적인 침입경로인 아가미이기에 가장 높은 발현이 확인된 것으로 보이며, 어류의 조혈기관인 비장에서 다음으로 높은 발현이 나타난 것으로 생각되어진다 (Morita et al., 2011). 바이러스성 질병인 RISV에서는 아가미에서 7일째에 가장 높은 발현량을 나타내었다. 이는 *S. iniae*의 인위감염 후 나타나는 발현과

비슷하였기에, CD74b는 질병에 감염되었을 때 아가미에서 주로 면역과 관련된 기능을 한다고 생각된다.

이번 연구에서는 특이적으로 인위감염 직후 CD74b의 상향발현 후 일시적으로 발현이 감소하고 시간 경과에 따른 증가가 관찰되었다. 이는 이전 연구에서 항바이러스 및 세균에 대한 평형 유지를 위한 음성 조절자 역할이 수행되었을 것이라 추측할 수 있었다 (Li et al., 2014). 또한 이전 연구에서 CD74는 단편적이긴 하지만 포유류와 유사한 경골어류에서 Helper 및 조절 T세포의 기능에 대한 증거는 지속적으로 보고되었으며 (Fischer et al., 2005), 이번 연구결과를 통해 CD74 유전자가 MHC class II로써의 기능 수행 가능성을 제시할 수 있었다 ([Fig. 4]).

이번 연구에서는 참돔으로부터 CD74b를 분리 및 동정하였고, 분자적 특성 및 발현분석이 수행되었다. 또한 정상조직과 질병에 인위감염 후 CD74b의 면역관련 조직에서의 mRNA 발현양상을 확인하였다. 이번 연구 결과 경골어류에서 CD74b의 발현을 확인할 수 있었고, 이를 통해 CD74b는 어류의 병원체 감염에 대한 면역단백질로써의 기능을 수행할 것으로 추측할 수 있었다. 그러나 어류의 CD74에 대한 연구는 아직도 부족한 실정이다.

CD74의 면역반응은 발현분석을 통해 면역 기능을 수행할 수 있는 가능성을 제시하였다. 추후 명확한 기능적 특성 분석에 대한 기초자료로써 사용될 수 있을 것이다.

References

Bergljót M(2006). Innate immunity of fish (overview), *Fish and Shellfish Immunology*20(2), 137~151.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>.
 Bjørgen H, Koppang EO(2022). Anatomy of Teleost Fish Immune Structures and Organs. In: Buchmann, K., Secombes, C.J. (eds) *Principles of Fish Immunology*. Springer, Cham.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1_1
 Chu WH and Lu CP(2008). In vivo fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker, *Aquaculture*277(3-4), 152~155.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.009>
 Farr L, Ghosh S, Jiang N, Watanabe K, Parlak M, Bucala R and Moonah S(2020). CD74 Signaling Links Inflammation to Intestinal Epithelial Cell Regeneration and Promotes Mucosal Healing, *CMGH*10(1), 101~112.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.01.009>
 Fischer U, Dijkstra JM, Kollner B, Kiryu I, Koppang EO, Hordvik I, Sawamoto Y and Ototake M.(2005) The ontogeny of MHC class I expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish and Shellfish Immunol*18(1), 49~60.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.05.006>
 Gold DV, Stein R, Burton J and Goldenberg DM(2010). Enhanced expression of CD74 in gastrointestinal cancers and benign tissues, *Int J Clin Exp Pathol*4(1). 1~12.
 Grimholt U, Tsukamoto K, Azuma T, Leong J, Koop BF and Dijkstra JM(2015). A comprehensive analysis of teleost MHC class I sequences, *BMC Evol Biol*15, 32.
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0309-1>
 Jung WC, Chung HS, Shon HY and Lee HJ(2008). Application of a solid-phase fluorescence immunoassay to determine neomycin residues in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), rockfish (*Sebastes schlegeli*), and red sea bream (*Pagrus major*), (*Korean J Vet Res*), 48(2), 175~179.
 Jurewicz A, Biddison WE and Antel JP(1998). MHC Class I-Restricted Lysis of Human Oligodendrocytes by Myelin Basic Protein Peptide-Specific CD8 T Lymphocytes1, *J Immunol*160(6), 3056~3059.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.6.3056>
 Kader MA, Bulbul M, Koshio S, Ishijikawa 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>
 Katikaneni DS and Jin L(2018). B cell MHC class II

- signaling: A story of life and death, *Human Immunol*80(1), 37~43.
<http://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.013>
- Kato K(2023). Breeding studies on red sea bream *Pagrus major*: mass selection to genome editing. *Fish Sci* 89, 103~119.
<https://doi.org/10.1007/s12562-022-01668-0>
- Li S, Lu LF, Feng H, Wu N, Chen DD, Zhang YB, Gui JF, Nie P and Zhang YA(2014). IFN Regulatory Factor 10 Is a Negative Regulator of the IFN Responses in Fish, *J Immunol*193(3), 1100~1109.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400253>
- Li Z, Liu X, Cheng J, He Y, Wang X, Wang Z, Qi J, Yu H and Zhang Q(2018). Transcriptome profiling provides gene resources for understanding gill immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*, *Fish and Shellfish Immunology*72, 593~603.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.041>
- Lieschke GJ and Nikolaus ST(2009). Fish immunology, *Current Biology* 19.16, 678~682.
- Mair F and Liechti T(2021). Comprehensive Phenotyping of Human Dendritic Cells and Monocytes, *Cytometry*99, 231~242.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.24269>
- Mihelic M and Turk D(2007). Two decades of thyroglobulin type-1 domain research, *Biol Chem*388(11), 1123~1130.
<https://doi.org/10.1515/BC.2007.155>
- Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H and Ema H(2011). Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen, *Experimental Hematology*39(3), 351~359.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.12.008>
- Noah CH, Choi HJ, Choi MJ, Lee SG and Ryu JM(2012). Comparison of fertilized egg production and hatching between Korean and Japanese red sea bream (*Pagrus major*). *The Korea society of developmental biology*, 99
- Peter Cresswell(1996). Invariant Chain Structure and MHC Class II Function, *Cell*84(4), 505~507.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81025-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81025-9)
- Plouffe DA, Hanington, PC., Walsh JG., Wilson EC and Belosevic M(2005). Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*12, 266~277.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2005.00227.x>
- Potru PS, Spittau B(2023). Cd74: a prospective marker for reactive microglia?. *Regeneration Research*18(12), 2673~2674
<http://doi.org/10.4103/1673-5374.371350>
- Rock KL, Reits E and Neefjes J(2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules, *Trends in Immunology*37(11), 724~737.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.010>
- Secombes CJ and Ellis AE(2012). The Immunology of Teleosts. In *Fish Pathology: Fourth Edition*, WILEY-BLACKWELL, 144~166.
<https://doi.org/10.1002/9781118222942.ch4>
- Song L, Dong X and Hu G(2021). Transcriptome analysis of red sea bream (*Pagrus major*) head kidney and spleen infected by *Vibrio anguillarum*, *Aquaculture Reports*21, 100789.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100789>
- WOO WS, Choi GM, Cho DH, JOO MS, HU MJ, KANG GS and Park CI(2020). Analysis of Molecular Characteristics and Pathogen Expression of CD74a Isolated from Red sea bream (*Pagrus major*). *JFMSE*32(6), 1391~1400.
<https://doi.org/10.13000/JFMSE.2020.12.32.6.1391>
- Yamaguchi T and Dijkstra JM(2019). Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes and Disease Resistance in Fish. *Cells*8(4), 378.
<https://doi.org/10.3390/cells8040378>
- Yamaguchi T and Dijkstra JM(2019). Ancient features of the MHC class II presentation pathway, and a model for the possible origin of MHC molecules, *Immunogenetics*71, 233~249.
<https://doi.org/10.1007/s00251-018-1090-2>
- Zhengshi Z, Xiucong H, Qianying D, Panpan Z, Ying W, Zhenjie C, Yongcan Z, Chunsheng L, Yun S(2022). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) is involved in the antibacterial immune response. *Developmental & Comparative Immunology*133, 104445.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.013>
- Zhu F, Chen S, Jia C, Zhang Z, Xue L, Zhang Z, Meng Q, Gao B and Sun R(2019). Characterization of the complete mitochondrial genome in a backcross progenies between *Acanthopagrus schlegelii*

and *Pagrus major*. Mitochondrial DNA Part B3(2),
822~823.

<https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1501305>

Zhu W, Su J(2022). Immune functions of phagocytic
blood cells in teleost, Rev Aquac14, 630~646.

<https://doi.org/10.1111/raq.12616>

-
- Received : 11 July, 2023
 - Revised : 14 August, 2023
 - Accepted : 18 August, 2023