

강도다리(*Platichthys stellatus*) Nuclear factor interleukin 3 regulated protein (NFIL3) 유전자의 분자생물학적 특성 및 발현분석

정수빈 · 강경식 · 우원식 · 김경호 · 손민영 · 손하정 · 주민수* · 박찬일†
경상국립대학교(연구원) · *국립수산과학원(연구사) · †경상국립대학교(교수)

Molecular Biological Characterization and Expression Analysis of the *Platichthys Stellatus* Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated Protein (NFIL3) Gene

Su-Bhin JEONG · Gyoungsik KANG · Won-Sik WOO · Kyung-Ho KIM · Min-Young SOHN ·
Ha-Jeong SON · Min-Soo JOO* · Chan-Il PARK†

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

Abstract

Given the increasing importance of *Platichthys stellatus* in the aquaculture industry, basic research on the immune response is needed. Therefore, we analyzed the molecular biology and expression of the Nuclear factor interleukin 3 regulated protein (NFIL3) gene, which plays an important role in innate immunity. Tissue-specific expression analysis of healthy *P. stellatus* showed that NFIL3 mRNA had the highest expression in gill, followed by skin and trunk kidney. In the Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) infection group, the tissues that were significantly expressed after infection were the trunk kidney, spleen, gills, and heart, and the strongest expression was observed in the trunk kidney. In the *Streptococcus parauberis* PH0710 infection group, high expression was observed in the liver on day 1, and in the intestine and brain on day 7.

Key words : *P. stellatus*, NFIL3, VHSV, *S. parauberis*, Gene expression

I. 서론

강도다리(*Platichthys stellatus*)는 가자미목(Pleuronectiformes) 가자미과(Pleuronectidae)에 속하는 어류로서 일반적으로 몸길이가 30~40 cm 정도로 자라며, 수심 80~350 m 정도의 부드러운 모래질이 분포한 해역에서 많이 잡힌다. 염분 변화에 대한 적응이 빨라, 기수 지역에서도 관찰되며

주로 12월에서 1월 사이에 산란한다. 겨울철 저수온기에서도 먹이 섭취활동이 왕성하여 육성기부터 성어기까지 지속적인 소비가 가능하기 때문에 국내에서 각광받는 어종이다. 특히, 우리나라 연안 해수 수온이 15°C 이하의 저수온 기간이 길고 담수 유입이 잦은 환경임을 고려할 때 염분 내성과 질병 저항성이 강한 강도다리는 국내 양식 대상 품종이다(Orcutt,1950; Kramer et al.,

† Corresponding author : 055-772-9153, vinus96@hanmail.net

* 이 논문은 2023년도 국립수산과학원 연어류 예방양식연구사업(R2023061)의 지원으로 연구되었음.

1995; Shin et al., 2019). 양식 산업에서 강도다리의 중요성이 증대되고 있음에도 불구하고 각종 질병 및 감염에 대한 강도다리의 면역 반응에 대한 기초연구는 부족한 실정이다. 따라서 면역 관련 유전자의 발현 양상을 분석하는 것은 필수적이다(Sohn et al., 2022).

어류는 하등 척추동물로서 무척추동물과 고등 척추동물 사이에 위치하고(Bergliot et al., 2006), 이들의 면역체계는 대식세포와 과립구 등에 의한 비특이적 면역과 림프구에 의한 특이적 면역체계를 가지고 있다. 특히 어류는 비특이적 면역체계가 비교적 발달하고 많은 비중을 차지하고 있다. 비특이적 면역체계의 사이토카인은 세포가 세포를 활성화시키는 단백질이며 면역 반응과 조혈 기능, 조직 회복, 세포의 발달과 성장 등에 중요한 기능을 하며, 항원에 대한 항체 생산을 유도하고, 방어체계를 제어하는 역할을 수행한다(Sohn et al., 2020). 사이토카인에 포함된 interleukin (IL)은 백혈구 및 일부 다른 체세포에서 발현되고 분비되는 사이토카인 그룹이다. 면역계의 기능은 주로 interleukin에 의존하며, 일부 interleukin의 결핍은 모두 자가 면역 질환 또는 면역 결핍 질환을 특징으로 한다. 대부분의 interleukin은 단핵구와 대식세포, 내피세포를 통한 보조 T세포 합성으로 T세포, B세포, 조혈 세포의 발달과 분화를 촉진한다(Brocker et al., 2010). Interleukin 3 (IL-3)는 과립구와 대식세포의 생산과 분화, 기능을 조절함으로써 조혈을 조절하는 사이토카인이다(Dorssers et al., 1987).

Nuclear factor interleukin 3 regulated protein (NFIL3)은 B세포 조절과 적응 면역에 영향을 주는 T세포에서 IL-3 promoter의 전사 활성화제로(Zhang et al., 1995; Kashiwada et al., 2010), 선천성 림프구 세포의 분화를 조절함으로써 선천 면역에 중요한 역할을 한다(Yu et al., 2014). E4 binding protein 4 (E4BP4)라고도 하는 NFIL3는 세포 생존과 사멸, 항염증 반응, 생물학적 주기의 변동 메커니즘을 포함한 필수적인 조절 분자이다

(Cowell., 2002). 포유류의 pro-B 림프구에서 NFIL3는 anti-apoptotic effector로 기능하며, 유도된 NFIL3의 발현은 pro-B 세포의 생존을 도와 면역 반응에서 외부로부터 침입하는 항원에 대항하여 항체를 만들어 낸다(Ikushima et al., 1997).

Scylla paramamosain (Mud crab)과 *Ctenopharyngodon idella* (Grass carp)를 대상으로한 이전 연구에서도 *Vibrio alginolyticus*와 *Aeromonas hydrophila* 인위 감염 후 NFIL3가 상향 조절되었음을 통해 NFIL3가 병원체 침입에 대한 면역 반응에 영향을 주는 것을 확인하였다(Gu et al., 2019; Yu et al., 2014a). 무척추동물과 경골어류에서 병원체 감염 후 NFIL3의 유전자 발현 분석 연구가 수행되었지만, 국내 양식 대상 품종인 강도다리에서는 연구가 수행되어진 바가 없다. 따라서 강도다리에서 NFIL3의 면역 기능과 분자적 특징에 대한 추가 연구가 필요하다.

이번 연구에서는 염분 내성과 질병 저항성이 강한 강도다리로부터 NFIL3 유전자를 분리 및 동정하여 분자적 특징에 대해 확인하였으며, 정상 어체에서 *PsNFIL3* (*Platichthys stellatus*) 유전자의 조직 특이적 발현 분석과 강도다리 양식 산업에서 막대한 피해를 주는 Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)와 *Streptococcus parauberis* (*S. parauberis*) PH0710를 인위감염시킨 후 조직별 유전자 발현양상을 확인하였다.

II. 연구 방법

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

이전 연구에서 next-generation sequencing (NGS) 분석을 통해 강도다리의 전체 게놈 염기서열 데이터를 획득하였다(Sohn et al., 2023). 요약하면, *S. parauberis* PH0710으로 자극 시킨 강도다리의 주요 조직(백혈구, 적혈구, 간, 신장, 비장)으로부터 total RNA를 분리하고, complementary DNA

(cDNA)로 합성되었으며, assembled 된 데이터에서 *PsNFIL3*의 cDNA 서열을 얻었다. 서열을 확인하기 위해 conventional PCR과 pGEM T-easy vector (Promega, USA)와 *E. coli* (*Escherichia coli*) JM109를 이용하여 cloning을 수행하였다. *PsNFIL3* cDNA 서열은 sanger sequencing에 의해 확인되었다.

2. 분자적 특성

검증된 *PsNFIL3*의 서열은 기존에 보고된 유전자들과의 서열 유사성 확인을 통해 서열의 특성을 확인하고 기능을 예측하기 위해 multiple sequence alignment 분석과 계통발생학적 분석을 수행하였다. 아미노산 서열은 GENETYX ver 8.0 program (SDC Software Development, Japan)과 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLASTX program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 이용하여 다른 종에서 보고된 관련 아미노산 서열들을 검색하였다. 분자량(Molecular weight, MW)과 등전점(Isoelectric point, pI)은 ExPASy Proteomics Serve의 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)을 이용하여 예측하였으며, 특정 도메인은 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)로 확인하였다. NCBI의 sequence database에 등록되어 있는 다른 종들의 NFIL3 아미노산 서열과의 multiple sequence alignment는 ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)를 이용하여 분석하였다. 또한 *PsNFIL3*의 계통발생학적 분석은 Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) version 4.0 program의 neighbor-joining (NJ)법을 이용하여 제작하였으며, bootstrap을 1,000번 반복 수행하였다.

3. 유전자 발현분석

건강한 상태의 강도다리와 병원체별 인위감염 시킨 후 강도다리의 주요 조직 내 *PsNFIL3*의 발현 수준을 확인하기 위해 적출한 조직으로부터

total RNA를 분리하고 cDNA로 합성한 후 Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)을 이용하여 mRNA의 발현 수준을 측정하였다.

가. 정상 어체에서의 조직별 발현분석

① 실험어 및 감염 병원체

실험에 사용한 실험어인 강도다리는 평균전장 21.5 ± 1.3 cm와 평균체중 128.7 ± 18.2 g으로 경상북도 포항시 소재의 양식장에서 100마리를 구입하여 실험실의 수조에서 2주간 순치시켰고, 인위감염을 위해 $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 와 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 각각 나누어 추가 순치시켰다. 인위감염 실험에 사용 전 무작위로 3개체씩 선발하여 임상학적 검사를 수행하여 건강성을 확인한 후 실험에 사용하였다.

인위감염 실험에 사용한 모든 세균과 VHSV 균주는 국립수산물과학원에서 제공받았고, 세균은 증균을 위해 Brain heart infusion (BHI, BD Biosciences) 액상배지를 이용하여 배양 조건에 따라 배양하였다.

② 건강한 강도다리 Total RNA 분리와 cDNA 합성

건강한 강도다리의 조직 내 *PsNFIL3*의 mRNA 발현수준을 확인하기 위해 5개체로부터 14가지의 주요 조직(뇌, 눈, 아가미, 두신, 체신, 심장, 간, 위, 비장, 근육, 피부, 장, 말초혈액 백혈구, 적혈구)을 무균적으로 적출하여 total RNA 추출 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 혈액은 heparin sodium (Sigma-Aldrich, USA)을 처리한 주사기를 이용하여 미부정맥으로부터 채혈하였고, 53% percoll 용액과 원심분리를 이용하여 PBLs와 RBC로 분리하였다.

적출된 조직들과 분리된 혈구 샘플들은 total RNA 추출한 뒤 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)를 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA로 합성하였다. Total RNA의 분리는 적출한 조직에 RNAiso Plus 용액을 1 mL 첨가한 뒤 homogenizer를 이용해 완전히 마쇄시

켰고, 100 μL 의 chloroform (Daejung, South Korea) 을 첨가한 후 vortexing하여 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액은 새로운 tube에 옮긴 후 200 μL 의 PCI 용액 (Phenol:chloroform:isoamyl alcohol, 25:24:1; Biosesang, South Korea)을 첨가하여 vortexing 후 같은 조건으로 원심분리 하였다. 상층액은 다시 새로운 tube에 옮겼고, genomic DNA를 제거하기 위해 5 U/ μL 의 Recombinant DNase I (Takara) 3 μL 과 10 \times DNase I Buffer 20 μL 를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액에 동량의 PCI용액을 첨가하여 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였고, 상층액은 새로운 tube에 옮긴 후 isopropanol (Daejung) 500 μL 과 3M sodium acetate (Takara) 50 μL , Dr.Gen (Takara) 5 μL 을 첨가하여 위와 같은 조건으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 제거하고 diethylpyrocarbonate (DEPC) water (Bioneer)로 희석시킨 75% ethanol을 600 μL 첨가하여 4°C에서 14,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 완전히 제거하고 pellet을 건조 시킨 후 DEPC water를 20 μL 첨가하였다.

cDNA 합성은 total RNA 추출물 8 μL 에 random primer 1 μL 과 dNTP mixture 1 μL 을 첨가하여 65°C에서 5분간 반응시킨 뒤 얼음 상에서 5분간 반응시켰다. 반응물에 5 \times Primer script buffer 4 μL 과 RNase inhibitor 0.5 μL , Primer script RTase 1 μL , RNase free dH₂O 4.5 μL 을 추가적으로 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시켰고, 42°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 마지막으로 95°C에서 5분간 반응시켰다.

③ Primer 제작

RT-qPCR에 사용된 primer는 *PsNFIL3*의 cDNA full-length sequence에 기초하여 Primer3 ver 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)을 이용하여 디자인하였다(<Table 1>).

④ Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

건강한 강도다리에서 *PsNFIL3*의 발현수준을 알아보기 위해, TB Green Master Mix (Takara)를

이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 RT-qPCR을 수행하였다. 즉, cDNA template 1 μL 와 forward-reverse primers 각각 1 μL , TB Green 12.5 μL , DDW 9.5 μL 를 총 량 25 μL 이 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. 최종적으로 확인된 *PsNFIL3*의 cycle threshold (Ct)값은 강도다리 elongation factor 1-alpha (EF-1 α)의 Ct값과 비교하여 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 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(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

나. 병원체 인위감염 후 시간별 발현분석

① 병원체 인위감염

병원체 인위감염 후 주요 조직 내에서 시간대별 mRNA의 발현수준을 확인하기 위해 VHSV와 *S. parauberis* PH0710 균주를 각각 PBS buffer에 1×10^3 CFU/fish와 1×10^6 copies/fish로 희석하여 건강한 강도다리에 피하주사 및 복강주사 하였고, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 와 $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 각각 사육 수온을 유지하였으며, 감염 실험 동안 사료 공급을 중단하였다. 인위감염 후 0, 1, 12시간과 1, 3, 5, 7일 마다 5개체씩 무작위로 선발한 뒤 뇌와 아가미, 심장, 체신, 간, 장 비장을 적출하여 total RNA 추출 전까지 -80°C 에서 보관하였다. Total RNA 추출에서 cDNA 합성까지의 모든 프로토콜은 II-3-(2)와 동일하게 수행하였다.

② Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

다양한 병원체 인위감염에 의한 *PsNFIL3*의 발현분석을 위해, 위에 설명한 것과 같은 방법으로 RT-qPCR을 수행하였다. 그리고 각 유전자의 발현수준은 위의 기술사항과 동일하게 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

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

III. 연구 결과

1. *Ps*NFIL3의 분자적 특성

강도다리의 주요 조직(백혈구, 적혈구, 간, 신장, 비장)의 NGS분석으로 확보한 *Ps*NFIL3 cDNA의 분자적 특성을 확인하기 위해 특이적인 domain 등을 검색하였다. 또한 보고된 NFIL3의 서열들을 이용하여 multiple sequence alignment 분석과 계통발생학적 분석을 통해 *Ps*NFIL3를 동정하였다.

가. *Ps*NFIL3의 분자적 특성

*Ps*NFIL3 유전자의 전체 서열은 총 1332 bp로 443개의 amino acid (aa)로 암호화되어 있었고, *Ps*NFIL3 유전자는 특이적인 basic leucine zipper (bZIP) domain (57-122 aa)을 포함하고 있었다([Fig. 1]). *Ps*NFIL3의 등전점(pI)은 4.98, 분자중량은 109.6 kDa으로 예측되었다. 이러한 서열정보는 NCBI의 database에 등록하여 OR699025 등록번호를 부여받았다.

나. Multiple sequence alignment 분석

*Ps*NFIL3 유전자와 다른 종에서 보고된 NFIL3 서열간의 비교분석을 위해 아미노산 서열을 이용해 multiple alignment를 수행한 결과 모든 중간서열이 높은 수준으로 보존되어 있었다. *Ps*NFIL3는 어류에서 *Pleuronectes platessa*의 NFIL3와

95.54%의 가장 높은 상동성을 보였으며, *Lates calcarifer*의 NFIL3와 80.65%으로 비교적 낮은 상동성을 보였다. 포유류에서는 *Mus musculus*의 NFIL3와 45.51%로 낮은 상동성을 확인할 수 있었다([Fig. 2]). 계통발생학적 분석결과 *Ps*NFIL3는 *Pleuronectes platessa* NFIL3과 가장 가까운 근연관계임을 확인할 수 있었다([Fig. 3]).

2. *Ps*NFIL3의 mRNA 발현 특성

가. 정상어체에서의 조직별 발현분석

건강한 상태의 강도다리에서 *Ps*NFIL3 mRNA의 발현은 장에서 가장 낮게 나타났으며, 발현수준은 장의 값에 비해 배수 증가로 표현하였다. 아가미(약 260배)에서 가장 풍부하게 발현하였다. 피부와 체신에서도 각각 약 111배와 66배로 풍부하게 발현하였으며, 심장과 위에서는 25배, 23배 발현하였다([Fig. 4]).

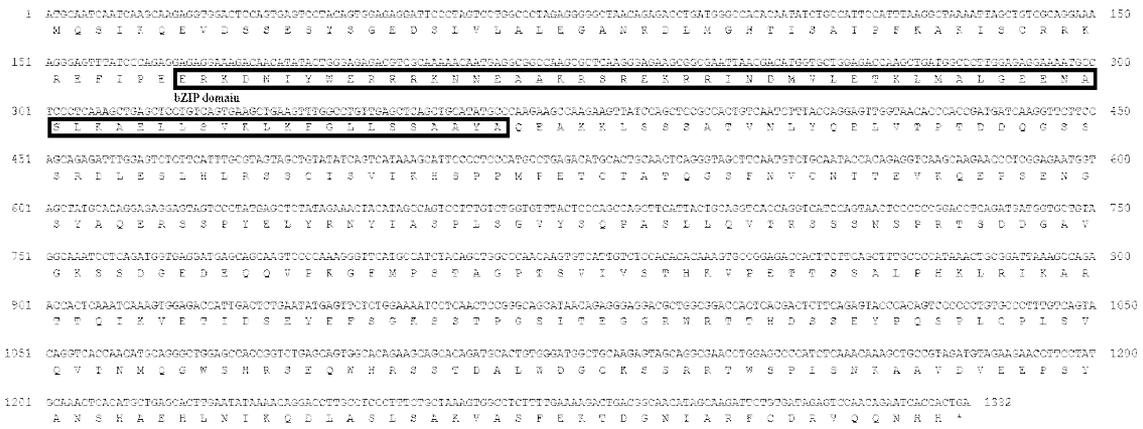
나. 병원체 인위감염 후 시간별 발현분석

VHSV를 인위감염 시킨 후 12시간째에 강도다리의 체신, 비장, 아가미, 간, 뇌, 장, 심장에서 *Ps*NFIL3 mRNA의 발현수준은 유의적으로 up-regulation 되었다. 장에서는 감염 후 12시간째에 up-regulation 되다가 다시 down-regulation 되었다([Fig. 5]).

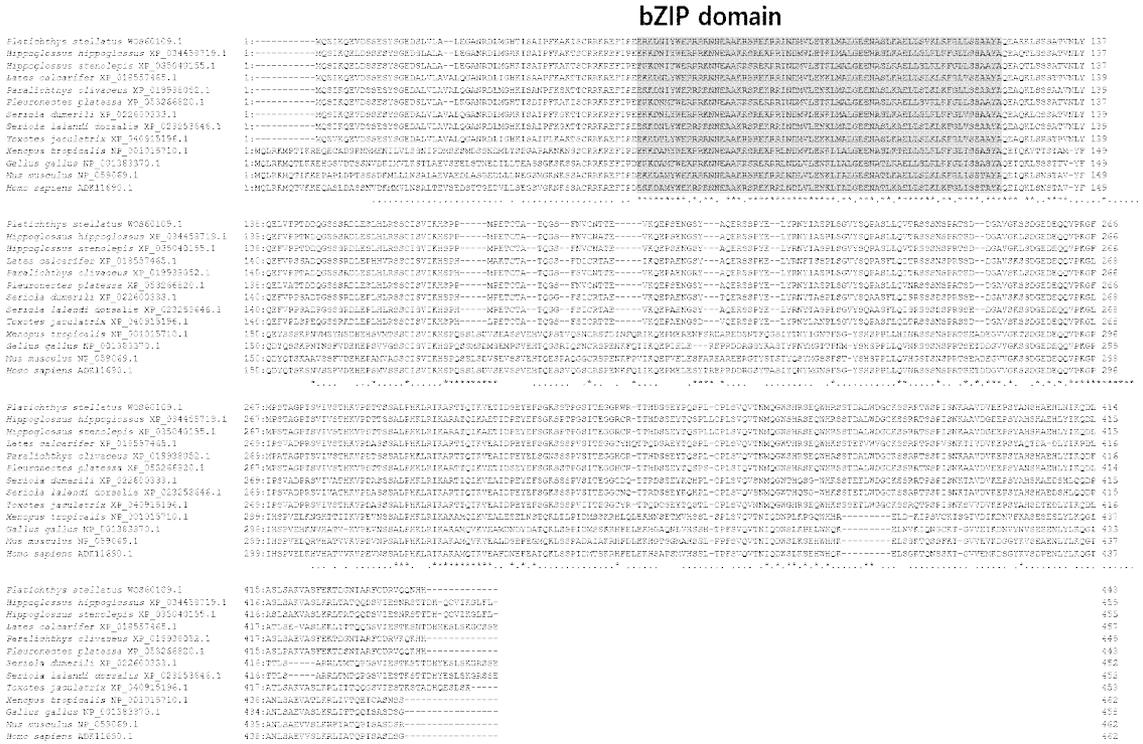
S. parauberis PH0710를 인위감염 시킨 후 *Ps*NFIL3 mRNA의 발현수준은 간에서 1일째에 up-regulation 되었으며, 장과 뇌에서는 7일째에 유의적으로 up-regulation 되는 것을 확인하였다([Fig. 5]).

<Table 1> List of primer sets used for RT-qPCR

Usage	Primer	Primer sequence (5'-3')
Housekeeping gene	EF-1 α (F)	GTGGCAAGTCCACCACCA
	EF-1 α (R)	GCTTGTCCAGCACCCAGG
Target gene	NFIL3 (F)	GCTATGCACAGGAGAGGAGT
	NFIL3 (R)	TGAAGCTGGCTGGGAGTAAA

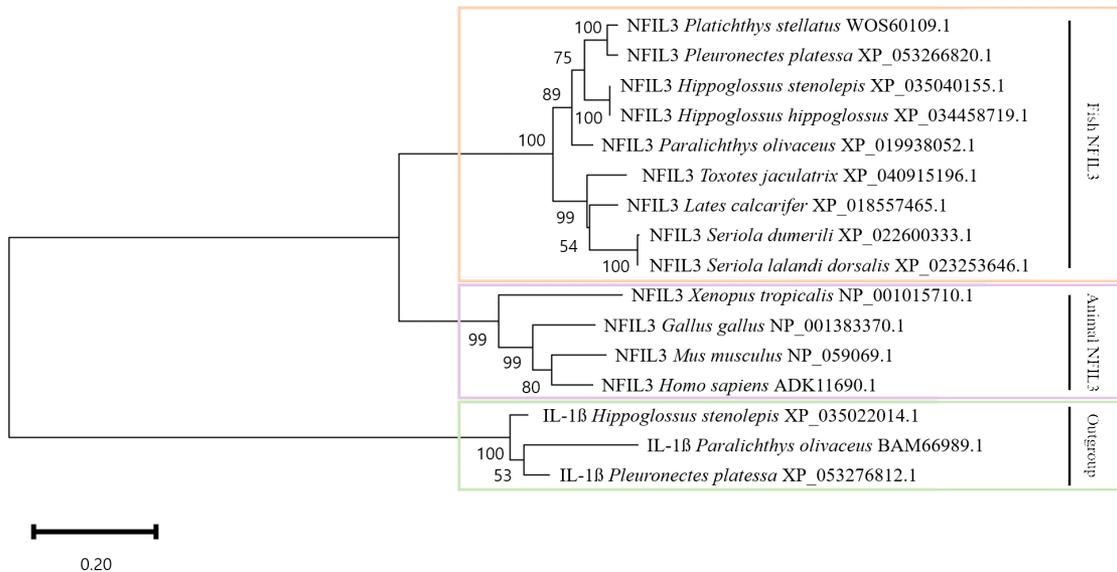


[Fig. 1] *Platicthys stellatus* NFIL3 nucleotide and amino acid sequences. bZIP domain are boxed.

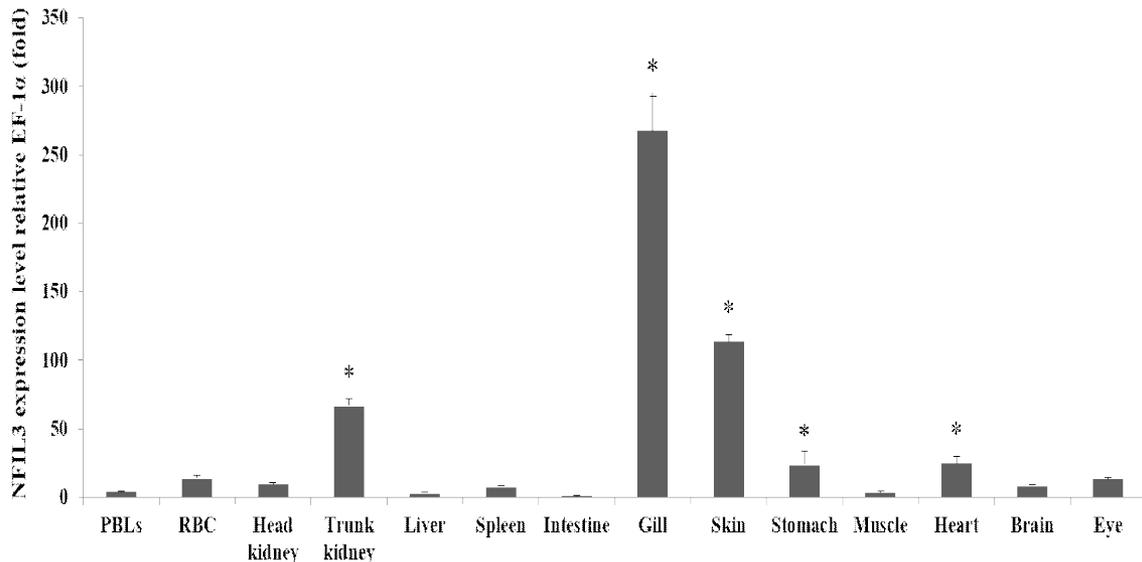


[Fig. 2] Multiple alignments of *PsNFIL3* with other species NFIL3 amino acid sequences. NCBI accession numbers of dicentracinare as follows: *Platicthys stellatus* WOS60109.1; *Hippoglossus hippoglossus* XP_034458719.1; *Hippoglossus stenolepis* XP_035040155.1; *Lates calcarifer* XP_018557465.1; *Paralichthys olivaceus* XP_019938052.1; *Pleuronectes platessa* XP_053266820.1; *Seriola dumerili* XP_022600333.1; *Seriola lalandi dorsalis* XP_023253646.1; *Toxotes jaculatrix* XP_040915196.1; *Xenopus tropicalis* NP_001015710.1; *Gallus gallus* NP_001383370.1; *Mus musculus* NP_059069.1; *Homo sapiens* ADK11690.1.

강도다리(*Platichthys stellatus*) Nuclear factor interleukin 3 regulated protein (NFIL3) 유전자의 분자생물학적 특성 및 발현분석

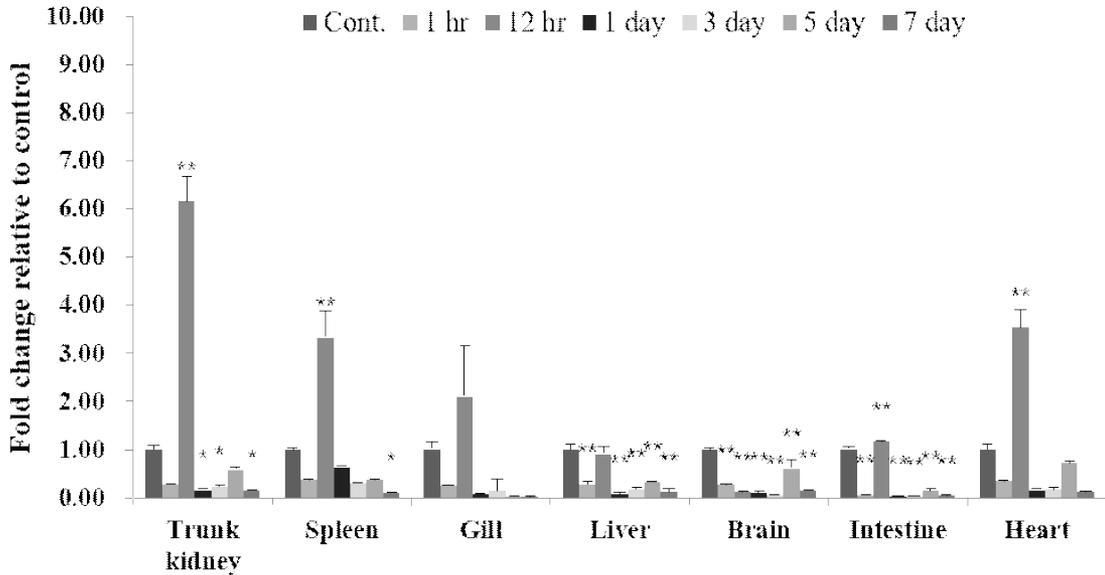


[Fig. 3] Phylogenetic analysis of deduced *Ps*NFIL3 amino acid sequences with NFIL3 other species. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method within MEGA 4 software. Bootstrap sampling was performed with 1,000 replicates. The scale bar is equal to 0.2 change per amino acid position.

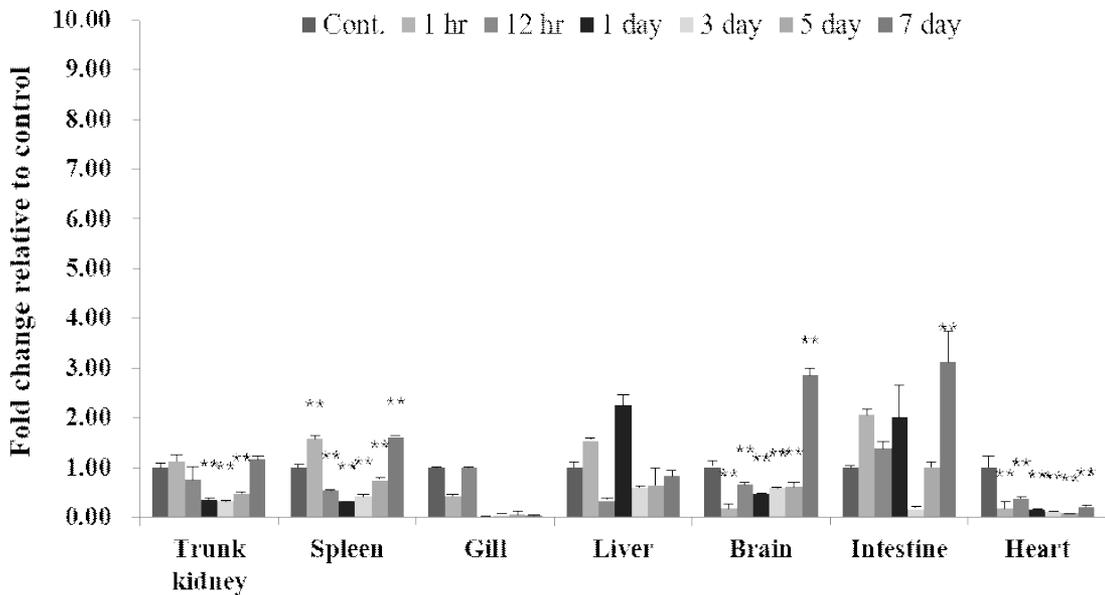


[Fig. 4] Expression analysis of *Ps*NFIL3 genes in different tissues of healthy *Platichthys stellatus* by real-time PCR. EF-1 α was used for normalizing the real-time PCR results. Data are presented as the mean \pm SD from three independent cDNA samples with three replicates from each sample. Asterisks indicate significant differences (* p < 0.05, ** p < 0.01) versus the intestine.

(A) VHSV



(B) *S. parauberis* PH0710



[Fig. 5] Gene expression of *PsNFIL3* in the trunk kidney, spleen, gill, liver, brain, intestine and heart after infection with VHSV (A), *Streptococcus parauberis* PH0710 (B). Levels of *PsNFIL3* 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, ** p < 0.01).

IV. 결론

NFIL3는 세포 생존과 세포 사멸, 항염증 반응, 생물학적 주기의 변동 메커니즘을 포함한 과정의 필수적인 조절 분자이다(Cowell, 2002). 이전 연구에서 NFIL3는 포유류의 pro-B 림프구에서 anti-apoptotic effector로서 기능하며, NFIL3의 발현은 pro-B 세포의 생존에 긍정적인 영향이 있음을 확인할 수 있었다(Ikushima et al., 1997).

이번 연구에서는 비특이적 면역 유전자인 NFIL3를 NGS분석을 이용해 강도다리로부터 분리 및 동정하여 분자생물학적 특성과 발현 분석적 특징에 대해 확인하였다. NFIL3는 포유류의 basic leucine zipper (bZIP) 전사 인자 superfamily에 속하는 인자이다. 전사 인자 superfamily에는 cAMP response element binding protein (CREB), activating transcription factor, activator protein 1, CCAAT enhancer binding protein (C/EBP), nuclear factor (erythroid-derived 2), proline and acidic residue rich (PAR) 계열이 포함되어 있다. bZIP 인자는 양친매성 α -helical dimerization 도메인을 포함하며, leucine 잔기의 헵타드 반복으로 구성된 leucine zipper 영역을 특징으로 한다(Hurst, 1994; Cowell, 2002; Vinson et al., 2002; Acharya et al., 2006; Li et al., 2011). 이전 연구에서 포유류 NFIL3의 서열은 bZIP 도메인의 N-말단 부분(amino acids 79-95)에는 DNA에 직접 결합하는 basic motif가 포함되어 있고, C-말단 부분(amino acids 99-106)에는 amphipathic leucine zipper 영역을 포함한다고 보고되어 있다(Keniry et al., 2014). bZIP는 특정 DNA 서열에 결합하여 유전자 전사를 조절하는 homodimers와 heterodimers를 형성하며, 신체 전반의 다양한 과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어, 기능적으로 중요한 역할을 수행할 것으로 생각된다(Acharya et al., 2006). 또한 계통발생학적 분석 결과 *PsNFIL3*는 다른 어류의 NFIL3와 한 cluster를 이루며 높은 유연관계를

를 확인할 수 있었다. 이는 *PsNFIL3*가 어류의 진화과정에서 잘 보존되어 온 것으로 생각된다.

이전 연구에 따르면 인간의 NFIL3는 신장에서 높은 mRNA 발현이 확인되었다(Fagerberg et al., 2014). 이번 연구의 조직별 발현분석에서는 강도다리의 여러 조직에서 *PsNFIL3*의 mRNA 발현이 나타나는 것을 확인하였으며, 이 중 특히 아가미에서 풍부하게 발현하였으며, 피부와 체신에서도 풍부한 발현을 확인할 수 있었다([Fig 4.]). 어류의 아가미와 피부는 처음 병원체가 침입하는 경로로 병원체의 접촉에서 가장 민감하고 박테리아에 직접적으로 노출되는 숙주 방어 메커니즘의 중요한 부위로 알려져 있다. 아가미와 피부를 통해 병원체가 숙주 내에 들어가면 대식 세포에 의해 처리되어 혈액으로 전신 운반된다고 보고되어 왔다(Li et al., 2012; Li et al., 2018). 체신에서의 풍부한 발현 결과는 어류의 면역체계 중 조혈 기관인 신장에서 높은 발현이 나타나는 것으로 보아 *PsNFIL3*가 면역 반응에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다(Lieschke et al., 2009).

강도다리 양식 산업에서 중요한 병원체인 세균과 바이러스 감염에 따른 강도다리의 *PsNFIL3*의 체신, 비장, 아가미, 간, 뇌, 장, 심장에서의 조직별 발현분석 결과 VHSV 감염 후 12시간째에 체신, 비장, 아가미, 심장에서 up-regulation 되었고, 장에서는 감염 후 12시간째에 up-regulation 되다가 다시 down-regulation 되었다. *S. parauberis* PH0710의 인위감염 후에는 간에서 1시간째에 up-regulation 되었고, 장과 뇌에서는 7일째에 유의적으로 up-regulation 되었다.

VHSV는 국내 양식 어류인 *P. stellatus*와 *Paralichthys olivaceus*에 높은 폐사를 일으키는 바이러스로 알려져 있다(Kim et al., 2009). 이전 연구에 따르면 VHSV 바이러스가 가장 풍부한 부위는 신장, 심장, 비장으로 알려져 있다(Smail, 1999). 이번 연구에서 VHSV 감염 후 12시간째에 체신, 비장, 아가미, 심장에서 *PsNFIL3*의 up-regulation이 나타났다. 인위감염 후 12시간

에 조직별 *PsNFIL3*의 발현량이 급격히 높아진 것은 *PsNFIL3*가 어류 체내에서 VHSV의 확산을 억제하기 위해 잠재적으로 관여한 것으로 보여지며, 이는 *PsNFIL3*가 바이러스 감염의 진행을 완화하는데 중요한 역할을 하는 것을 나타낸다. 본 연구에서 VHSV 인위감염 후 체신, 심장, 아가미에서의 up-regulation이 *PsNFIL3*와 관련이 있는 것으로 추측했다. 이는 건강한 *P. stellatus*의 *PsNFIL3* 조직별 발현분석에서 아가미, 심장, 체신이 높은 수준으로 발현된 것과 연관될 수 있으며, 아가미의 경우 이전 연구에 따르면 *P. olivaceus*에서 VHSV 감염 후 아가미가 초기 VHSV 흡수에 중요한 역할을 하며, VHSV가 주로 12시간 이후에 아가미 lamella의 상피와 혈관에서 복제되는 결과와 유사하다(Qadiri et al., 2020). VHSV 인위감염 후 비장에서의 *PsNFIL3* up-regulation은 VHSV 표적 장기에 대한 이전 연구에 따라 VHSV 감염 후 비장에서 면역 반응을 보인 것으로 생각된다(Smail, 1999).

또한 VHSV 감염 후 장에서 *PsNFIL3*가 12시간째에 up-regulation 되었다가 다시 down-regulation된 것은 이전의 NFIL3 결핍 mouse에서 NFIL3가 장 면역 보호에 필수적인 innate lymphoid cell (ILC) 발달에 핵심적인 조절자 역할을 하고, 적응 면역 세포의 발달과 기능의 여러 측면을 조절하며, 광범위한 발현과 연관되어 선천성 면역 체계의 발달에도 영향을 미칠 가능성이 높다는 연구 결과에 따라 이번 연구에서도 *PsNFIL3*가 VHSV 감염 후 장에서 면역 보호의 핵심 조절자로 역할하고 선천 면역 반응을 보인 것으로 생각된다(Ikushima et al., 1997; Kashiwada et al., 2010; Kobayashi et al., 2011; Motomura et al., 2011; Seillet et al., 2013; Seillet et al., 2014).

S. parauberis PH0710 인위감염 시킨 후 *PsNFIL3*의 발현 수준은 간에서 1일째에 up-regulation되었고, 장과 뇌에서는 7일째에 유의적으로 up-regulation 되는 것을 확인하였다. 간에서의 *PsNFIL3*의 높은 발현은 건강한 *S.*

*paramosain*와 *C. idella*의 NFIL3 조직별 발현분석에서 간체장과 간 조직이 다른 조직의 발현과 비교하여 유의미한 발현을 보인 이전 연구의 결과와 유사하다(Gu et al., 2019; Yu et al., 2014a). 갑각류의 간체장은 섭취 물질의 흡수와 저장을 담당하는 주요 기관이자 중요한 면역 기관으로 작용한다는 이전 연구 결과와 본 연구 결과를 토대로 간에서 *PsNFIL3*가 높은 발현을 보인 것은 병원성 미생물의 자극에 대항하는 중요한 기능을 가진 것이라고 보여진다(Xu et al., 2014). 장과 뇌에서 7일째에 *PsNFIL3*의 높은 발현을 보인 것은 인위감염 후 시간의 흐름에 따라 장과 뇌와 같은 말초조직에서 면역 반응을 보인 것이라고 생각되며, 장에서의 7일째의 *PsNFIL3*의 up-regulation은 VHSV 인위감염 실험 결과와 마찬가지로 *PsNFIL3*가 장 면역 보호에 조절자로서 역할한 것으로 보인다. 추가적으로 뇌에서의 *PsNFIL3*의 up-regulation은 *Schizopygopsis pylzovi*, *Oreochromis niloticus*에서 *Streptococcus*를 인위감염 시킨 후 뇌수막의 울혈과 뉴런의 괴사, 부종, 액포의 변성과 염증 세포의 침윤을 확인할 수 있었다(Deng et al., 2017; Yang et al., 2018). NFIL3가 상향조절되어 신경의 보호를 보이는 구체적인 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, NFIL3는 세포 내 Ca^{2+} 농도의 상승과 cAMP 반응 요소 결합 단백질의 활성화에 의해 Trans-activating된다(Nishimura Y and Tanaka T, 2001; MacGillavry et al., 2009). 다양한 신경 관련 질환에서 Ca^{2+} 항상성의 파괴는 발병 과정에서 일어나며, $A\beta$, 산화 스트레스, 외인성 독소 등 다양한 신경 손상 자극이 신경 세포의 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가를 유도한다. 고농도의 글루타메이트, 과산화수소, 칼슘 이온 운반체에 노출된 뉴런에서 NFIL3가 상향 조절될 것을 고려할 때, Ca^{2+} 의 과도한 유입이 뉴런에서 NFIL3의 상향 조절을 유발한다고 보고되었다(Bossy-Wetzler et al., 2004; Tamai et al., 2014). 이전의 연구 결과를 바탕으로 이번 연구에서 *S. parauberis* PH0710 감염 후 7일째에 뇌에서 *PsNFIL3*이

up-regulation된 것은 *S. parauberis* PH0710 인위감염 후 뇌 신경 세포의 손상으로 인해 뉴런에서 *PsNFIL3*의 상향 조절이 유발된 것으로 보이지만, *Streptococcus* 감염에 따른 뇌에서의 *PsNFIL3* 조절에 관련된 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구에서는 강도다리로부터 *PsNFIL3*를 분리 및 동정하였고, 분자적 특성과 발현분석을 수행하였다. 또한 정상어체의 조직과 세균·바이러스성 질병에 인위감염된 강도다리의 조직에서 *PsNFIL3* 발현 조절을 확인하였으며, 이를 통해 *PsNFIL3*가 어류의 병원체 감염에 대해 면역반응 조절로써 기능을 수행할 수 있음을 시사한다. 이후 *PsNFIL3* 면역반응의 정확한 기능 분석이 필요할 것으로 생각된다.

References

- Acharya A, Rishi V, Moll J and Vinson C(2006). Experimental identification of homodimerizing B-ZIP families in *Homo sapiens*. *Journal of Structural Biology*, 155(2), 130~139.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.02.018>
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R and Lipton SA(2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature medicine*, 10, S2~S9.
<https://doi.org/10.1038/nm1067>
- Bergliot M(2006). Innate immunity of fish (overview), *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137~151.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW and Vasiliou V(2010). Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human genomics*, 5(1), 30~55.
<https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-1-30>
- Cowell IG(2002). E4BP4/NFIL3, a PAR-related bZIP factor with many roles. *Bioessays*, 24, 1023~1029.
<https://doi.org/10.1002/bies.10176>
- Dorssers L, Burger H, Bot F, Delwel R, Kessel AH, Lowenberg B and Wagemaker G(1987). Characterization of a human multilineage-colony-stimulating factor cDNA clone identified by a conserved noncoding sequence in mouse interleukin-3. *Gene*, 55(1), 115~124.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90254-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90254-X)
- Deng ZB, Zhang YW, Geng Y, Wang KY, CHEN DF, Ouyang P, Huang XL, He CL, Zhong ZJ, Yang ZX and Tang L(2017). A new sequence type (ZST-1) of infectious *Streptococcus agalactiae* from Chinese cyprinid fish, *Schizopygopsis pylzovi*. *Aquaculture*, 468(1), 496~500.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.010>
- Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold F, Kampf A, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjostedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Linfckog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, Feilitzten KV, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson IM, Navani S, Huss M, Nielsen J, Poten F and Uhlen M(2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 397~406.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, Licence DR, Charnock-Jones DS, Smith SK and Print CG(2002). *VavCre* transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *Genesis*, 34(4), 251~256.
<https://doi.org/10.1002/gene.10161>
- Gu WB, Liu ZP, Zhou YL, Li B, Wang LZ, Dong WR, Chen YY and Shu MA(2019). The nuclear factor interleukin 3-regulated (NFIL3) transcription factor involved in innate immunity by activating NF- κ B pathway in mud crab *Scylla paramamosain*. *Developmental & Comparative Immunology*, 101, 103452.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103452>
- Hurst HC(1994). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, 1, 123~168.
- Ikushima S, Inukai T, Inaba T, Nimer SD, Cleveland JL and Look AT(1997). Pivotal role for the NFIL3/E4BP4 transcription factor in interleukin 3-mediated survival of pro-B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- 94(6), 2609~2614.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2609>
- Kamer DE, Brass WH, Paust BC and Bracken BE(1995). Guide to northeast pacific flatfishes: families Bothidae, Cynoglossidae, and Pleuronectidae. Marine Advisory Bulletin, 47, 1~104.
- Kim WS, Kim SR, Kim DW, Kim JO, Park MA, Kitamura SI, Kim HY, Kim DH, Han HJ, Tung AJ and Oh MJ(2009). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Aquaculture, 296(1-2), 165~168.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.019>
- Kashiwada M., Levy DM, McKeag L, Murray K, Schröder AJ, Canfield SM, Traver G and Rothman PB(2010). IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 821~826.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0909235107>
- Kashiwada M, Cassel SL, Colgan JD and Rothman PB(2011). NFIL3/E4BP4 controls type 2 T helper cell cytokine expression. The EMBO journal, 30, 2071~2082.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.111>
- Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, Hisamatsu T, Hansen JJ, Doty KR, Pope SD and Smale ST(2011). NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. The journal of immunology, 186, 4649~4655.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003888>
- Keniry M, Dearth R, Persans M and Parsons R(2014). New frontiers for the NFIL3 bZIP transcription factor in cancer, Metabolism and beyond. Discoveries (Craiova), 2(2), e15.
<https://doi.org/10.15190/d.2014.7>
- Lieschke GJ and Nikolaus ST(2009). Fish immunology. Current Biology, 19(16), 678~682.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.068>
- Li F, Liu J, Jo M and Curry TE(2011). A Role for Nuclear Factor Interleukin-3 (NFIL3), a Critical Transcriptional Repressor, in Down-Regulation of Periovulatory Gene Expression. Molecular endocrinology, 25(3), 445~459.
<https://doi.org/10.1210/me.2010-0250>
- Li C, Zhang Y, Lu J, Nandi S, Mohanty S, Terhune J, Liu Z and Peatman E(2012). RNA-seq analysis of mucosal immune responses reveals signatures of intestinal barrier disruption and pathogen entry following *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Fish & Shellfish Immunology, 32(5), 216~827.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.004>
- 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. The journal of immunology, 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 & Shellfish Immunology, 72, 593~603.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.041>
- Macgillavry HD, Stam FJ, Sassen MM, Kegel L, Hendriks WT, Verhaagen J, Smit AB and Kesteren RE(2009). NFIL3 and cAMP response element-binding protein form a transcriptional feedforward loop that controls neuronal regeneration-associated gene expression. The journal of neuroscience, 29(49), 15542~15550.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3938-09.2009>
- Motomura Y, Kitamura H, Hijikata A, Matsunaga Y, Matsumoto K., Inoue H, Atarashi K., Hori S, Watarai H, Zhu J, Taniguchi M and Kubo M(2011). The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells. Nature Immunology, 12, 450~459.
<https://doi.org/10.1038/ni.2020>
- Nishimura Y and Tanaka T(2001). Calcium-dependent activation of nuclear factor regulated by interleukin 3/adenovirus E4 promoter-binding protein gene expression by calcineurin/nuclear factor of activated T cells and calcium/calmodulin-dependent protein kinase signaling. Journal of biological chemistry, 276(23), 19921~19928.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M010332200>

- Orcutt HG(1950). The life history of the starry flounder.: *Platichthys stellatus* (Pallas). University of California eScholarship, 78, 25~32.
- Qadiri SSN, Kim SJ, Krishnan R, Kole S and Oh MJ(2020). Early detection and localization of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) genomic mRNAs in external tissues of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) following an immersion challenge. *Aquaculture*, 518, 734859.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734859>
- Smail DA(1999). Viral haemorrhagic septicaemia. *Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 3, 110~142.
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1573105975048406144>
- Seillet C, Jackson JT, Markey KA, Brady HJ, Hill GR, Macdonald KP, Nutt SL and Belz GT(2013). CD8 α ⁺ DCs can be induced in the absence of transcription factors Id2, Nfil3, and Batf3. *Blood*, 121(9), 1574~1583.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445650>
- Seillet C, Rankin LC, Groom JR, Mielke LA, Tellier J, Chopin M, Huntington ND, Belz GT and Carotta S(2014). Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. *Journal of experimental medicine*, 211(9), 1733~1740.
<https://doi.org/10.1084/jem.20140145>
- Shin SJ, Lee TK, Lee DH, Lim SR, Yang IC, Kim SS, Choi JW, Kim JS and Kim JD(2019). Effect of dietary fish meal replacement by a blend of plant and animal ingredients on the growth and blood chemistry of starry flounder *Platichthys stellatus*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(2), 134~140.
<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0134>
- Sohn 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*). *Korean Society for Fisheries and Marine Sciences Education*, 32(2), 560~569.
<https://doi.org/10.13000/JFMSE.2020.4.32.2.560>
- Sohn MY, Choi KM, Joo MS, Kang GS, Woo WS, Kim KH, Son HJ, Kim DH and Park CI(2022). Molecular characterization and expression analysis of septin gene family and phagocytic function of recombinant septin 2, 3 and 8 of starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 126, 251~262.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.018>
- Sohn MY, Kim JW, Kang GS, Woo WS, Kim KH, Son HJ, Park JW, Kim DH and Park CI(2023). First report of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in flat fish (Starry flounder): Molecular features and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 149, 105054.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.105054>
- Tamai SI, Imaizumi K, Kurabayashi N, Nguyen MD, Abe T, Inoue M, Fukada Y and Sanada K(2014). Neuroprotective role of the basic leucine zipper transcription factor NFIL3 in models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of biological chemistry*, 289(3), 1629~1638.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.524389>
- Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR and Bonovich M(2002). Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 6321~6335.
<https://doi.org/10.1128/MCB.22.18.6321-6335.2002>
- Xu WN, Liu WB, Yang WW, Zhang DD and Jiang GZ(2014). Identification and differential expression of hepatopancreas microRNAs in red swamp crayfish fed with emodin diet. *Fish & shellfish immunology*, 39(1), 1~7.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.005>
- Yu HY, Shen YB, Sun JL, Xu X, Wang RQ, Xuan YF, Lu LQ and Li JA(2014a). Molecular cloning and functional characterization of the NFIL3/E4BP4 transcription factor of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Developmental & Comparative Immunology*, 47(2), 215~222.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.019>
- Yu X, Wang Y, Deng M, Li Y, Ruhn KA, Zhang CC and Hooper LV(2014). The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. *eLife*, 3, e04406.
<https://doi.org/10.7554/eLife.04406>
- Yang H, Huang JL, Wang KY, Chen DF, Geng Y, Huang XL, Yang PO, Zhou Y, Wang J, Min J, and Lai WM(2018). Pathogenicity of streptococcus agalactiae in *oreochromis niloticus*. *Oncotarget*, 9(1), s401~s413.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23551>

Zhang W, Zhang J, Kornuc M, Kwan K, Frank R and Nimer SD(1995). Molecular cloning and characterization of NF-IL3A, a transcriptional activator of the human interleukin-3 promoter. *Molecular and cellular biology*, 15(11), 6055~6063.
<https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.6055>

Zu HB and Liu JY(2022). Nuclear factor interleukin 3 (NFIL3) participates in regulation of the NF-κ

B-mediated inflammation and antioxidant system in *Litopenaeus vannamei* under ammonia-N stress. *Fish & shellfish immunology*, 131, 1192~1205.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.11.028>

-
- Received : 20 October, 2023
 - Revised : 16 November, 2023
 - Accepted : 24 November, 2023