

# 강도다리(*Platichthys stellatus*) zinc finger protein 703 (ZNF703) 유전자의 분자적 특성 및 발현 분석

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

## Molecular Characterization and Expression Analysis of the Zinc Finger Protein 703 (ZNF703) Gene from Starry Flounder, *Platichthys stellatus*

Se-Rin JANG · 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

Zinc finger protein (ZNF) is widely expressed in eukaryotes and is involved in a number of important biological processes such as cell differentiation, proliferation and apoptosis. ZNF703 is one of the transcription factors that regulates the expression of multiple genes involved in transcription modulation, cell proliferation, cell cycle regulation, and signaling pathway regulation. However, studies on the immune response of ZNF703 after pathogen infection in fish are lacking. We analysed the coding sequence (CDS), genomic structure, and temporal variations in the mRNA transcription of ZNF703 after challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and *Streptococcus parauberis* PH0710 in starry flounder (*Platichthys stellatus*) (Ps). *Ps*ZNF703 was confirmed to have a NLZ1 domain and ZNF C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> domain. The strongest expression of *Ps*ZNF703 mRNA in healthy starry flounder was observed in the gills. The expression pattern of *Ps*ZNF703 mRNA after infection with pathogens was significantly up-regulated in the spleen, liver, and intestine 12 h post-VHSV injection (\*\**p* < 0.001). After infection with *S. parauberis* PH0710, the *Ps*ZNF703 mRNA expression pattern was up-regulated in almost all major tissues, whereas it was significantly down-regulated in the gills and heart. Our results indicate that *Ps*ZNF703 may be involved in the host immune response to starry flounders.

**Key words :** Zinc finger protein 703, Starry flounder, *Streptococcus parauberis*, Viral hemorrhagic septicemia virus, Gene expression analysis

### I. 서론

강도다리(*Platichthys stellatus*)는 가자미목(Pleuronectiformes) 가자미과(Pleuronectidae)에 속하는 냉수성 저서 어류로 주로 연안 저층의 수심 150 m

내외에 서식하며, 종종 하천에서 발견되기도 한다(Chyung, 1977). 강도다리는 우리나라 동해에서 오후츠크해를 거쳐 베링해와 미국 남부 캘리포니아에서 관찰되며, 동계 산란 종으로 주로 낮은 수온 지역에 서식한다(Lim et al., 2007). 국내에서

† Corresponding author : 055-772-9153, [vinus96@hanmail.net](mailto:vinus96@hanmail.net)

※ 이 논문은 2024년도 국립수산과학원 연어류 예방양식연구사업(R2024062)의 지원으로 수행된 연구입니다.

는 2004년 강도다리의 대량 인공 종묘생산이 성공함으로써 양식이 가능해졌으며, 최근 높은 수요로 인해 양식 생산 규모가 증가하고 있는 추세이다(Kim et al., 2019). 그러나 강도다리 양식산업은 질병으로 인해 많은 경제적 피해를 입고 있다. 그 중 *Streptococcus parauberis*, *Aeromonas salmonicida*와 같은 세균성 질병이 강도다리에서 보고되고 있으며(Woo et al., 2023; Kim et al., 2022), megalocytivirus와 같은 바이러스성 질병도 보고되고 있는 추세이다(Won et al., 2013). 최근에는 점액포자 기생충인 *Enteromyxum leei*의 감염이 제주 소재 양식장에서 보고된 바 있다(Shin et al., 2023). 그럼에도 불구하고 강도다리의 질병과 면역 체계에 대한 기초적인 연구는 부족한 실정이다.

아연(Zinc, Zn)은 단백질과 핵산, 지질 등 다양한 생체 분자의 대사에 관여하는 여러 효소의 보조인자 역할을 하는 필수 영양소로 세포 및 체액 면역 모두에 관여하며 면역체계에서 핵심적인 역할을 수행한다(FAO, 2004; Rakhra and Rakhra, 2021). 또한, 300개 이상의 효소가 활성화되기 위해 아연을 필요로 하는 것으로 알려져 있으며, 신체 여러 대사 기능에 작용하고(Coleman, 1992), 유전자 발현을 조절하는 전사인자들의 구조를 유지하거나, 이들이 핵산에 결합하기 위해 아연을 필요로 한다(Prasad, 1995). Zinc finger protein (ZNF)은 1985년 African clawed frog (*Xenopus laevis*)의 transcription factor IIIA (TFIIIA)에서 처음 발견되었으며(Miller et al., 1985), 이는 시스테인(Cysteine, C)과 히스티딘(Histidine, H) 리간드(Ligand)를 포함하는 아연 결합 모티프로 금속단백질에서 킬레이트 화합물을 형성하고, 단백질 접힘 구조의 안정화에 아연 이온(Zn(II))의 배위결합이 필요하다고 보고된 바 있다(Chang et al., 2010). Zinc finger family는 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>CH 및 C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>와 같은 다양한 cysteine/histidine 조합을 가진 도메인 구조에 의해 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> type, RING type 및 PHD type 등으로 분류되며(Cassandri et al., 2017), 현재 HUGO Gene Nomenclature Committee에서 보고된

ZNF는 42개의 type으로 알려져 있다(HGNC, 2023). 이러한 ZNF는 DNA 또는 RNA에 결합해 유전자 발현을 조절하고, 단백질 간 상호작용에 관여하여 세포 분화, 증식 및 세포 사멸과 같은 여러 가지 중요한 세포 과정을 조절하는 역할을 한다(Leon et al., 2000; Cassandri et al., 2017). C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ZNF 중에는 DNA와의 직접적인 상호작용을 매개하는 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 모티프를 가지는 다양한 전사인자가 존재하며(Cassandri et al., 2017), C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 도메인은  $\alpha$ -helix의 N-말단을 통해 특정 DNA 서열(T/A)(G/A)CAGAA(T/G/C)에 결합하여 표적 유전자의 발현을 억제함으로써 세포 내 전사 과정 조절에 관여한다(Krishna et al., 2003; Nunez et al., 2011). 또한, 1k2f, 1fv5, 1fu9 등의 단백질 간 상호 작용을 매개하여 사이토카인 신호전달 체계를 조절함으로써 면역 반응에 관여할 수 있다(Polekhina et al., 2002; Santelli et al., 2005; Fox, 1999).

C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> type으로 알려진 ZNF703에 관한 연구는 주로 포유류에 국한되어있었으며(Cheah et al., 1994; Pereira-Castro et al., 2013), 경골어류에서는 zebrafish (*Danio rerio*)에서 보고된 바 있으나(Runko and Sagerström, 2003; Hoyle et al., 2004), 여전히 어류 면역 반응에서의 ZNF703에 대한 정보는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *PsZNF703*이 병원체에 대한 면역 반응에서 중요한 인자로서 역할을 수행하는지 여부를 확인하고자 강도다리로 부터 ZNF703 (*PsZNF703*) 유전자를 동정하여 분자적 특성을 확인하였으며, 병원체 인위감염 후 *PsZNF703*의 유전자 발현 패턴을 분석하였다.

## II. 연구 방법

### 1. *PsZNF703*의 염기서열 확보

*PsZNF703*의 coding sequence (CDS)는 이전 연구에서 확보한 서열을 기반으로 subcloning 및 sanger sequencing을 통해 검증되었다(Sohn et al.,

2023). 간략히 설명하면, *PsZNF703*의 CDS를 PCR로 증폭시킨 후 pGEM T-easy vector (Promega, USA)와 *Escherichia coli* JM109를 이용하여 cloning 하였다. Cloning 후 sanger sequencing을 통해 서열을 최종 확인 및 검증하였다.

모든 실험은 경상국립대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하여 수행하였다(승인번호: GNU-150907-M0050).

## 2. *PsZNF703*의 분자적 특성 분석

확보한 *PsZNF703*의 염기서열과 아미노산 서열의 분자적 특성 및 계통발생학적 분석을 수행하였다. 단백질의 분자량(Molecular Weight, MW) 및 등전점(Isoelectric point, pI)은 ExPASy Proteomics Serve의 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)로 예측하였다. 특정 도메인의 위치와 서열은 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 이용하여 확인하였고, NCBI의 sequence database에 등록된 다른 종들의 *ZNF703* 아미노산 서열과의 multiple sequence alignment는 ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)를 이용하여 분석하였다. 동정된 *PsZNF703*의 아미노산 서열과 다른 종에서 보고된 *ZNF703* 유전자의 아미노산 서열은 GENETYX ver 6.0 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 비교 분석하였으며, *PsZNF703*의 계통발생학적 분석은 molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) version 4.0 program의 neighbor-joining (NJ) 법을 통해 bootstrap을 1,000 반복하여 수행되었다.

## 3. *PsZNF703*의 유전자 발현 분석

가. 실험어 및 병원체

실험에 사용된 강도다리는 경상북도 포항시 소재의 양식장에서 구입하였으며, 평균 전장  $21.5 \pm$

1.3 cm와 평균 체중  $128.7 \pm 18.2$  g의 100마리를 실험실의 수조에서 14일 동안 순치시켰다. 병원체 인위감염 실험을 위해,  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 와  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 두 그룹으로 나누어 추가 순치시켰다. 실험 전 각 그룹에서 3개체씩 무작위 선발해 임상학적 검사를 통하여 건강도를 확인한 후 실험에 사용하였다. 인위감염 실험에 사용된 *S. parauberis* PH0710와 viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV, genotype IVa)는 국립수산과학원에서 제공받았다.

나. 정상 어체에서의 조직별 mRNA 발현 분석  
건강한 강도다리의 주요 조직 내 *PsZNF703* mRNA 발현 수준을 확인하기 위해 5마리의 강도다리에서 아가미, 눈, 뇌, 두신, 체신, 심장, 간, 위, 비장, 장, 근육, 피부 총 12개 조직 적출과 적혈구 및 말초혈액 백혈구를 분리하였고, total RNA 추출 전까지  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 혈액은 heparin sodium (Sigma-Aldrich, USA)이 처리된 주사기를 이용하여 미부 정맥에서 채혈하였고, 53% percoll 용액을 첨가하여 원심분리 후 적혈구와 백혈구로 분리하였다.

다. 병원체 인위감염 후 시간별 mRNA 발현분석  
병원체에 감염된 강도다리의 주요 조직 내 *PsZNF703* mRNA의 발현 수준을 조사하기 위해, 100  $\mu\text{L}$ 의 VHSV ( $10^3$  viral copies/fish)와 *S. parauberis* PH0710 ( $10^3$  CFU/fish)를 강도다리에 복강주사하였으며, 대조군에는 PBS를 동량 투여하였다. 사육 수온은 각각  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 와  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 실험 기간 동안 사료 급이는 중단하였다. 두 병원체의 감염 후 0, 1, 12시간과 1, 3, 5, 7일에 각 그룹에서 5마리씩 무작위로 선발해 뇌, 아가미, 심장, 체신, 간, 비장, 장을 분리하고, total RNA 추출 전까지  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

라. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

정상 및 감염한 강도다리에서 적출한 조직들로부터 total RNA 추출한 뒤 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)를 이용해

제조사에 따라 cDNA로 합성하였다. Total RNA의 추출은 각 적출 조직에 RNAiso Plus (Takara)를 1 mL 첨가해 homogenizer로 마쇄하고, chloroform을 100  $\mu$ L 첨가한 후 vortexing하여 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 e-tube에 옮겨 200  $\mu$ L의 PCI 용액(Phenol:chloroform:isoamyl alcohol, 25:24:1; Biosang, South Korea)을 첨가하고 vortexing 후 같은 조건으로 원심분리하였다. 상층액을 다시 새로운 e-tube에 옮겨 genomic DNA를 제거하기 위해 5 U/ $\mu$ L의 Recombinant DNase I (Takara) 3  $\mu$ L과 10 $\times$ DNase I Buffer 20  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액과 동량의 PCI 용액을 첨가하여 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하였고, 상층액은 새로운 tube에 옮긴 후 isopropanol 500  $\mu$ L, 3M sodium acetate (Takara) 50  $\mu$ L 및 Dr.Gen (Takara) 5  $\mu$ L을 첨가하여 위와 같은 조건에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 75% ethanol 600  $\mu$ L를 첨가하여 4°C에서 14,000 rpm, 5분간 원심분리하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 pellet을 건조시켰고, DEPC water를 20  $\mu$ L 첨가 후 pipetting 하여 풀어주었다. Total RNA의 purity와 concentration은 NanoVue (GE Healthcare, UK)를 이용하여 측정하여 확인하였다.

cDNA 합성을 위해 8  $\mu$ L의 total RNA 추출물에 dNTP mixture 1  $\mu$ L 및 random primer 1  $\mu$ L을 첨가하였고, 65°C에서 5분간 반응 후 얼음 상에서 5분간 반응시켰다. 반응물에 RNase free dH<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L와 5 $\times$ Primer script buffer 4  $\mu$ L, RNase inhibitor 0.5  $\mu$ L, Primer script RTase 1  $\mu$ L을 추가로 첨가하여 30°C에서 10분 반응시켰고, 42°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 마지막으로 95°C에서 5분간 반응시켰다.

#### 마. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

강도다리의 다양한 조직에서 *PsZNF703*의 mRNA 발현 분포를 확인하기 위해 *PsZNF703* cDNA

의 CDS를 기반으로 Primer3 (ver. 0.4.0.) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)를 이용하여 specific primer를 제작하였다(<Table 1>). Real-Time System TP950 Thermal Cycler Dice (Takara)와 TB Green premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Takara)를 이용하여 RT-qPCR을 수행하였다. RT-qPCR를 수행하기 위한 조성물과 반응은 cDNA template 1  $\mu$ L와 forward, reverse primers 각 1  $\mu$ L (10 pM), TB Green premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Takara) 12.5  $\mu$ L, DW 9.5  $\mu$ L를 총 25  $\mu$ L이 되도록 분주하였다. 증폭 조건은 50°C에서 4분, 95°C에서 10분간 initial denaturation 후, 95°C에서 20초, 60°C에서 1분을 1 cycle로 하여 총 45회 반응시켰고, final dissociation으로 95°C에서 15초, 60°C에서 30초, 95°C에서 15초 반응시켰다. *PsZNF703*의 상대적인 발현 수준의 비교는 *PsZNF703*의 housekeeping gene으로 알려진 elongation factor 1 alpha (EF-1  $\alpha$ )를 사용하였고<Table 1>, 모든 *PsZNF703* mRNA의 threshold cycle (Ct)값은 EF-1  $\alpha$  mRNA의 Ct값과 비교하여  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법 [ $\Delta\Delta Ct = 2^{-(\Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{internal control})}$ ]를 이용하여 정량화하였다(Livak and Schmittgen, 2001).

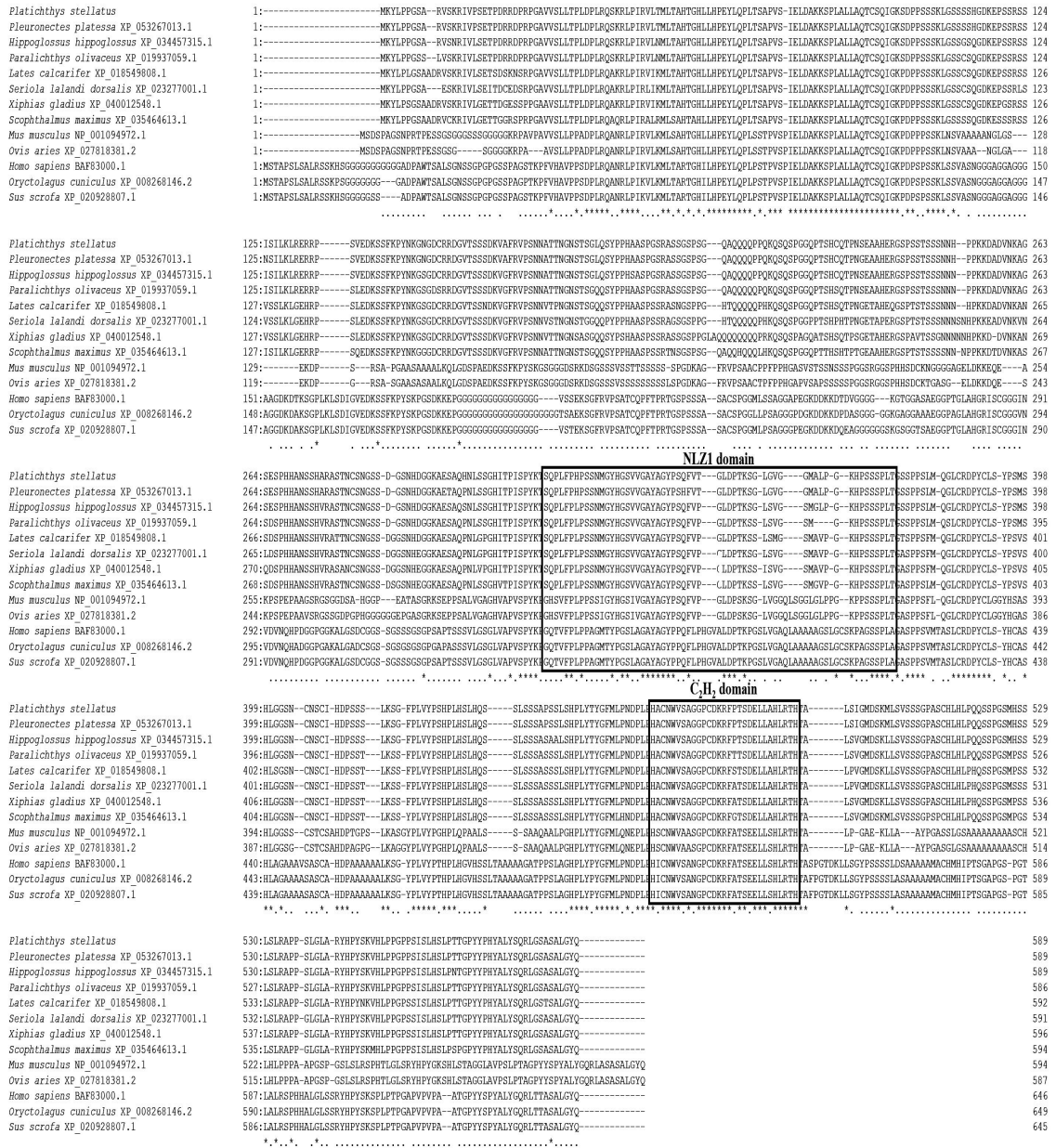
모든 실험은 3회 반복하였으며, 모든 mRNA 상대 발현량은 평균(mean)  $\pm$  표준편차(standard deviation)로 나타내어 *PsZNF703*의 mRNA 상대 발현 수준을 확인하였다. 실험의 유의성을 확인하기 위해, SPSS software version 19 (IBM, USA)의 one-way analysis of variance (ANOVA) test와 Tukey's honestly significant difference (HSD) test를 실시하였다(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

<Table 1> Primers used for RT-qPCR

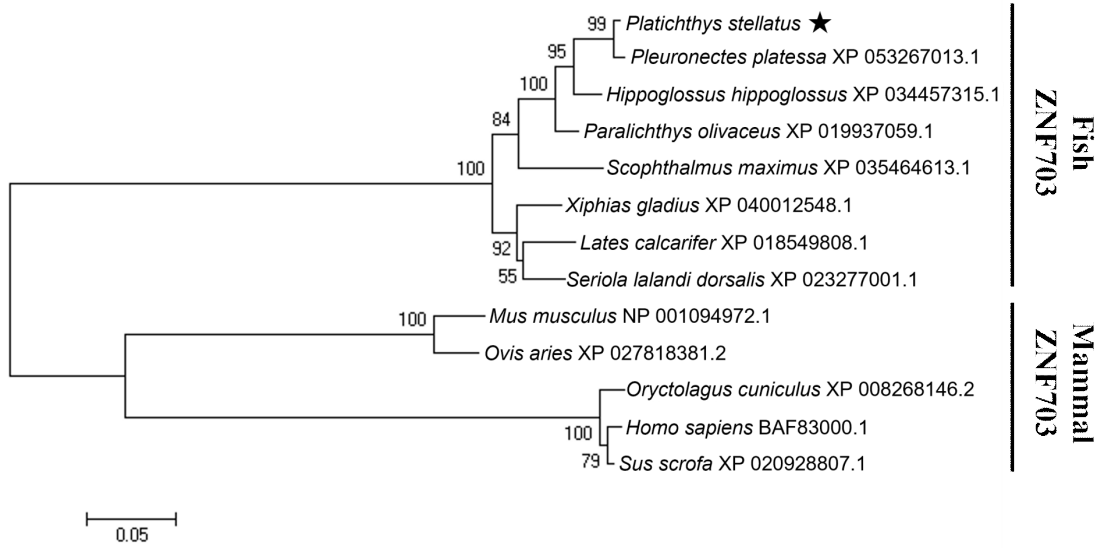
Primer	DNA sequence (5'–3')
<i>PsZNF703</i> forward	ACACTGGACACTTGCTGCAC
<i>PsZNF703</i> reverse	TCTTCTGGCATCCAGCTCT
EF-1 $\alpha$ forward	GTGGCAAGTCCACCACCA
EF-1 $\alpha$ reverse	GCTTGTCAGCACCCAGG



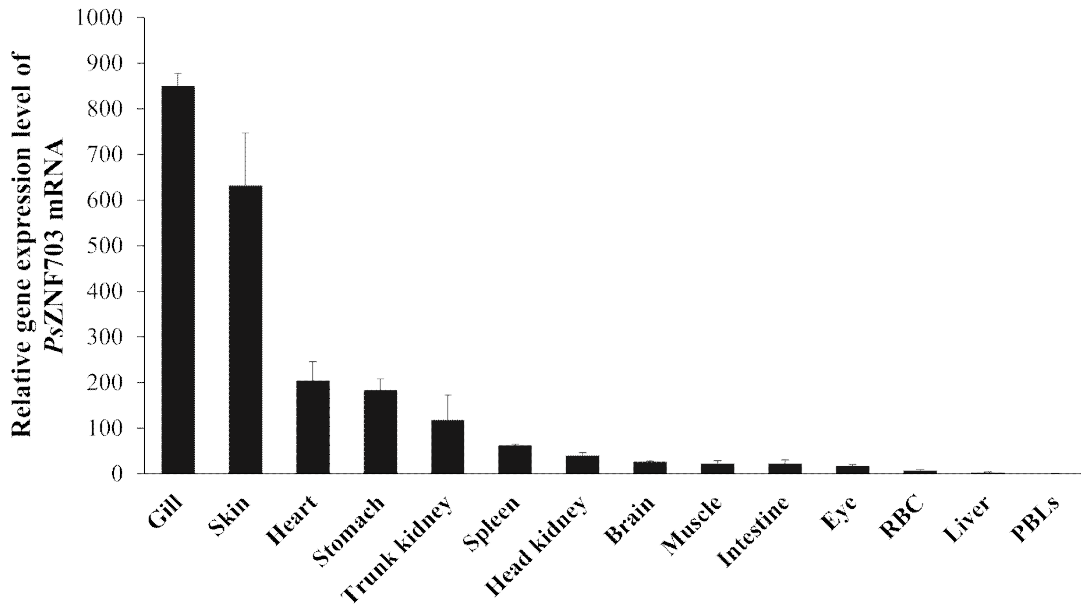
강도다리(*Platichthys stellatus*) zinc finger protein 703 (ZNF703) 유전자의 분자적 특성 및 발현 분석



[Fig. 2] Multiple alignments of *PsZNF703* with other species ZNF703 amino acid sequences. NCBI accession numbers of dicentracin are as follows: *Pleuronectes platessa* XP\_053267013.1; *Hippoglossus hippoglossus* XP\_034457315.1; *Paralichthys olivaceus* XP\_019937059.1; *Scophthalmus maximus* XP\_035464613.1; *Xiphias gladius* XP\_040012548.1; *Lates calcarifer* XP\_018549808.1; *Seriola lalandi dorsalis* XP\_023277001.1; *Mus musculus* NP\_001094972.1; *Ovis aries* XP\_027818381.2; *Oryctolagus cuniculus* XP\_008268146.2; *Homo sapiens* BAF83000.1; *Sus scrofa* XP\_020928807.1.



[Fig. 3] Phylogenetic analysis of deduced *PsZNF703* amino acid sequences with ZNF703 in 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 0.05 change per amino acid position.

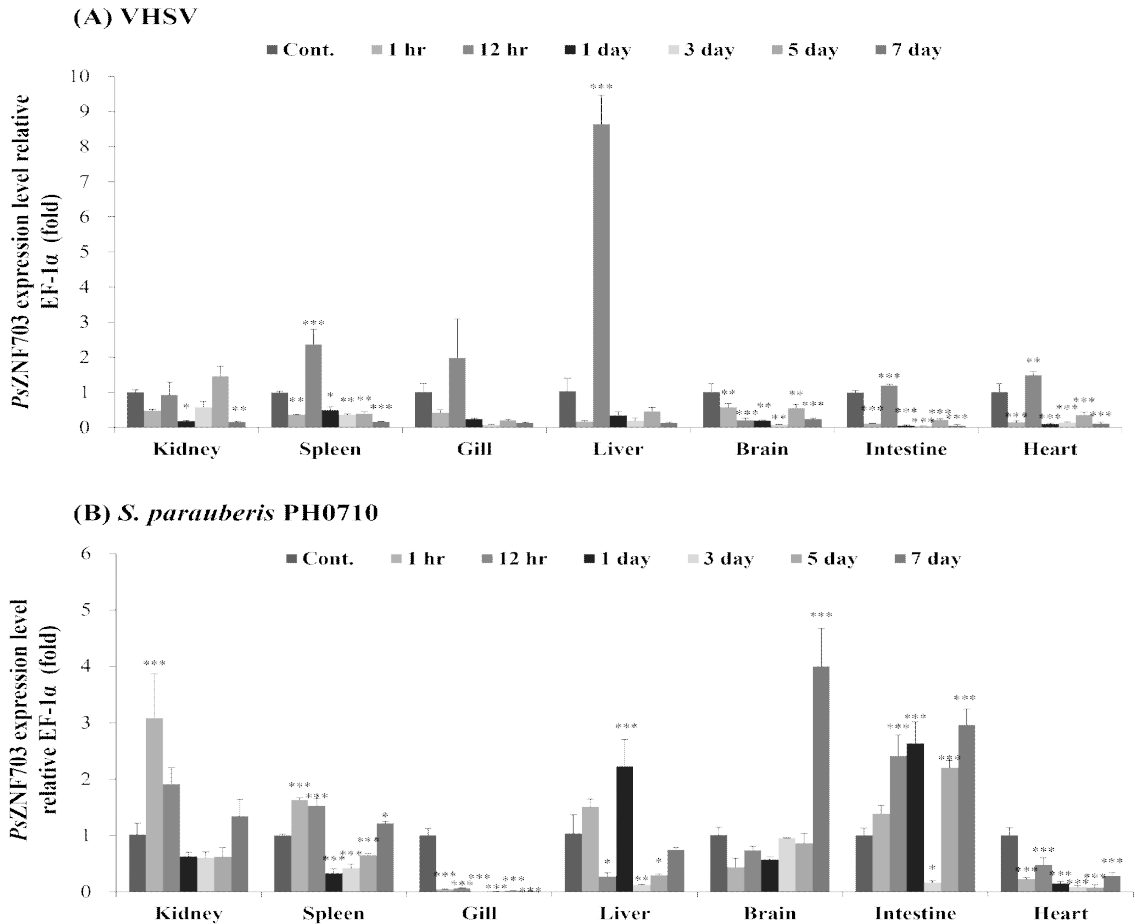


[Fig. 4] Expression analysis of *PsZNF703* genes in different tissues of healthy *Platicthys stellatus* by real-time PCR. *EF-1 $\alpha$*  was used for normalizing the real-time PCR results. The data are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent cDNA samples with three replicates from each sample.

나. 원체 인위감염 후 시간별 발현 분석

VHSV 감염 12시간 후 심장과 간, 비장, 장에서 *PsZNF703* mRNA 발현이 유의하게 상향 조절된 것으로 나타났으며, 뇌에서는 *PsZNF703* mRNA 발현 수준이 유의적으로 하향 조절되었다 (\*\**p* < 0.001). 감염 후 1일째에 간, 비장, 장을 포함한 대부분의 조직에서 유의적으로 하향 조절됨을 확인하였다([Fig. 5]).

*S. parauberis* PH0710 감염 후에는 거의 모든 주요 조직에서 *PsZNF703* mRNA 발현 패턴이 상향 조절된 반면, 아가미와 심장에서는 유의하게 하향 조절되었다. 감염 1시간 후에는 신장과 비장에서, 12시간 후에는 비장과 장에서, 1일 후에는 간과 장, 5일 후에는 장, 7일 후에는 뇌와 장에서 가장 높은 발현을 확인하였다([Fig. 5]).



[Fig. 5] Gene expression of *PsZNF703* in the kidney, spleen, gill, liver, brain, intestine, and heart after infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) (A), *Streptococcus parauberis* PH0710 (*S. parauberis* PH0710) (B). The levels of *PsZNF703* transcripts were quantified relative to that of *EF-1α* 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, \*\*\**p* < 0.001).



#### IV. 결론

ZNF 유전자는 진핵생물 계통에서 가장 풍부하게 발현되는 단백질 중 하나이며, DNA 인식, RNA 보호, 전사 활성화, 세포 사멸 조절, 단백질 접힘 및 조립, 지질 결합 등의 다양한 기능을 담당한다(Laity, 2001). 그 중 ZNF703 유전자는 척추동물에서 전사 조절, 세포 증식, 세포 주기 조절, 신호 전달 경로 조절 등에 관여하는 인자로 알려져 있다(Slorach et al., 2011; Wang et al., 2017; Yang et al., 2020). 이번 연구에서는 강도다리로부터 ZNF703의 분자 유전학적 특징을 분석하고, 병원체 인위감염 후 각 조직에서 *PsZNF703* mRNA 발현 경향을 확인하였다.

ZNF는 다양한 cysteine/histidine 조합의 도메인 구조에 의해 여러 type으로 분류된다(Cassandri et al., 2017). 그 중 두 개의 cysteine과 두 개의 histidine 리간드를 가지는 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 도메인은 아연 이온 주위로 hairpin 구조를 형성하는 두 개 또는 세 개의  $\beta$ -sheet과 한 개의  $\alpha$ -helix로 구성되는 단순한 모티프( $\beta\beta\alpha$  구조)를 가지며, 이러한 모티프로 인해 단백질의 구조를 안정화시킨다(Pabo et al., 2001). C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 도메인을 가지는 ZNF 단백질은  $\alpha$ -helix의 N-말단 영역의 특정 위치에 결합되어있는 4개의 아미노산 잔기가 DNA의 주요 홈을 따라 3-4 염기쌍에 노출된 수소이온 및 수용체와 상호작용하여 DNA 결합에 관여한다(Pabo et al., 2001; Razin et al., 2012). 다수의 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T) 영역을 가지는 NLZ1 도메인은 핵의 위치를 파악하고 C-말단을 통해 자가 결합되며, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 도메인의 DNA 결합능을 통해 보조억제인자와 상호작용하여 전사를 억제하는 기능을 수행한다(Runko and Sagerström, 2004; Nakamura et al., 2008). C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ZNF 계열의 하위 그룹인 NET (Noc, Nlz, Elbow and Tlp-1) family에 속하는 ZNF703은 NLZ1, ZPO1, ZEPO1로도 알려져있으며(Nakamura et al.,

2004; Nakamura et al., 2008; Slorach et al., 2011), zinc finger protein 503 (ZNF503)을 paralog로 갖는다(Pereira et al., 2016). ZNF의 분자적 특징과 NLZ1 도메인, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 도메인의 기능과 역할로 보아 두 도메인을 잘 유지하고 있는 *PsZNF703*이 어류 면역의 신호전달 체계에서 조절자 역할을 하며 면역 유전자의 발현에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

*PsZNF703* 아미노산 서열과 다른 종에서 보고된 ZNF703 아미노산 서열의 상동성을 확인하기 위해 multiple alignment를 수행하였을 때, 어류 중 유사한 어종인 European plaice (*P. platessa*)와 99.15%, Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)와 96.26%, olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)와 94.4%의 상당히 높은 상동성을 보였으며, 또한 계통발생학적 분석 결과 *PsZNF703*이 다른 어류의 ZNF703과 함께 clustering되며 European plaice (*P. platessa*)와 가장 가까운 유연관계를 보인 것은 *PsZNF703*가 어류의 진화과정에서 잘 보존되어진 것이라 생각된다.

이번 연구에서 강도다리의 조직 특이적 ZNF703 mRNA 발현을 분석한 결과 아가미와 피부에서 다른 조직보다 상당히 높은 *PsZNF703* mRNA의 발현이 확인되었다. 선행 연구에 따르면 아가미는 어류에서 호흡을 담당하며 외부 환경과 밀접하게 연결되는 선천면역 기관에 해당한다(Gomez et al., 2013; Koppang et al., 2015). 어류에서 선천면역은 병원체에 대해 매우 짧은 시간 내에 반응을 보이는 1차 방어선으로(Turvey and Broide, 2010; Mokhtar et al., 2023), 면역 신호전달 과정에서 다양한 ZNF가 상향조절되고, 발현된 ZNF 단백질은 MITA, IRF3 및 interferon-stimulated gene (ISG) 등의 여러 cytokines와 상호작용하여 어류의 선천면역에 관여한다(Liao et al., 2014; Yang et al., 2019; Blasi et al., 2022; Chen et al., 2023). 따라서 이번 연구에서 강도다리의 아가미와 피부에서 *PsZNF703* mRNA의 높은 발현이 관찰된 것은 *PsZNF703*이 1차 방어벽인 선천면역 반응에서 중요한

인자로 작용함을 의미하며, 이는 경골어류의 선천 면역에 대한 선행 연구 결과와 일치한다(Lazado and Caipang, 2014; Salinas, 2015; Wang et al., 2020; Sallam et al., 2020).

국내 넙치와 강도다리 양식에 많은 피해를 주는 병원체 중 VHSV와 *S. parauberis*는 주요 종에 속한다(Isshiki et al., 2001; Cho et al., 2008; Mork et al., 2004). 따라서 강도다리에 감수성이 높은 두 병원체를 선정하여 감염 후 신장, 비장, 아가미, 간, 뇌, 장, 심장에서의 *PsZNF703* mRNA 발현을 확인하였다.

VHSV는 국내 다양한 해산어류에 상존하여 높은 폐사율을 보이는 랍도바이러스로 알려져 있으며(Kim et al., 2003; Kim et al., 2009; Kim et al., 2016; Hwang et al., 2020; He et al., 2021; Mork et al., 2004), 모든 장기를 표적으로 하지만 특히 간, 신장, 심장, 비장에서 풍부하게 증식하는 것으로 보고된다(Smail and Snow, 2011, WOA, 2021). 이번 연구에서 VHSV 인위감염 12시간 후 간과 비장, 장을 포함한 거의 모든 조직에서 *PsZNF703* mRNA 발현이 유의하게 상향 조절되었다가 감염 1일 이후 대조군보다 낮은 수준으로 하향 조절된 것이 확인되었다(Fig. 5). IRF3 및 NF- $\kappa$ B는 RIG-I/MDA5 신호 전달 경로의 두 가지 주요 전사 인자이며 이들의 활성화는 면역 인자 I형 IFN의 RIG-I/MDA5 신호 전달 경로 매개 발현에 필요한 것으로 알려져 있다(Nakhaei et al., 2009). Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)의 실험에서는 polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)로 자극한 후 ZNF 유전자 mRNA 발현의 유의적인 상향 조절을 확인하였고, ZNF에 의한 IRF3, NF- $\kappa$ B 및 I형 IFN의 발현 촉진을 입증함으로써 RIG-I/MDA5 매개 면역 신호 전달 경로에서의 역할을 규명하였다(Liao et al., 2014). *D. rerio*의 연구에서는 ZNF703이 전사 억제자로 기능함이 보고되었으며(Nakamura et al., 2008), 뿐만 아니라 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호 전달을 조절함으로써 cytokine의 생성에 관여하고, 선천면역 반응의 조

절자로 기능할 수 있다고 보고되었다(Wang et al., 2020; Li et al., 2022). 또한 human의 zinc-finger antiviral protein (ZAP)에서 NLZ1 모티프를 함유하는 N-말단이 B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)의 RNA와 상호작용해 간 세포에서 항바이러스 기능을 수행함이 확인되었고(Mao et al., 2013), chicken의 ZAP연구에서는 ZAP가 항바이러스 반응에서 중요한 인자로 작용해 선천면역 반응에서의 중요성을 입증하였다(Zhu et al., 2019). RNA 바이러스 뿐 아니라 silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci*)의 연구에서는 C2H2 계열의 ZNF 전사인자가 DNA 바이러스인 Begomovirus의 capsid 단백질과 상호작용해 바이러스의 복제를 억제하는 것이 yeast two hybrid (Y2H) screening을 통해 검증되었다(Ghosh et al., 2023). C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ZNF는 DNA를 인식하여 유전자 발현 조절을 통해 세포 주기 및 신호전달 경로를 조절하고, 단백질 간의 상호작용에 관여해 여러 세포 과정에 중요한 역할을 한다(Wolfe et al., 2000; Laity et al., 2001; Gamsjaeger et al., 2007; Cassandri et al., 2017). T세포에 의한 항원인식 후 interleukin-2 (IL-2) 유전자의 일시적 발현은 후속 T세포 증식 및 분화에 중요한 요소이다. 그러나 발현 후 신속한 음성 조절 또한 면역 반응의 신호전달에 중요한 부분이며, ZNF의 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 모티프가 음성조절자로서 IL-2의 발현을 억제해 후천면역의 다중 면역 반응을 조절함이 확인되었다(Williams et al., 1991). 본 연구에서 감염 후 12시간에 일시적으로 *PsZNF703* mRNA의 유의적인 상향 조절이 일어난 것은 선행 연구와 유사하게 *PsZNF703*가 어류 체내에서 VHSV의 확산 제어를 위한 항바이러스 반응에 중요한 역할을 수행하였다고 생각된다.

선행 연구에 따르면 *S. parauberis*는 강도다리의 비장, 신장, 간을 표적으로 하여 비장과 신장 조직에 균체 침윤과 식세포 및 백혈구계 세포를 괴사시키며, 간의 충혈 및 울혈을 일으키는 것으로 보고되었다(Cho et al., 2008). 해당 연구에서

*S. parauberis* PH0710 감염 결과 거의 모든 주요 조직에서 *PsZNF703* mRNA 발현 패턴이 상향 조절되었으며 감염 1시간 후에는 신장과 비장에서, 12시간 후에는 비장과 장에서, 1일 후에는 간과 장, 7일 후에는 뇌와 장에서 가장 높은 발현이 확인되었다([Fig. 5]). 이전 연구에 따르면 ZNF 단백질 유래 펩타이드인 MF18이 *Staphylococcus aureus* 및 *E. coli*의 biofilm 형성을 억제하며 항균 활성을 보이는 것이 확인되었고(Nagaram et al., 2020), whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)의 연구에서는 ZNF 도메인을 포함하는 단백질이 *Vibrio parahaemolyticus* 감염의 항균 반응에 관여하여 ZNF의 발현이 갑각류 면역 반응에 중요한 요인임을 보고하였다(Zuo et al., 2018). 이번 연구에서 *PsZNF703* mRNA의 발현이 *S. parauberis* PH0710 감염 후 각 표적 조직에서 유의미하게 상향 조절된 것은 *PsZNF703*가 항균 면역 반응에서 중요한 인자로 작용한 것으로 생각된다. 최근 박테리아 RNA 중합효소에서 ZNF 결합 도메인이 박테리아의 다양한 전사인자의 결합을 위한 anchor 도메인으로 작용함이 밝혀져 경골어류의 ZNF와 상호작용에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다(Hu and Liu, 2022).

이번 연구에서 강도다리로부터 *PsZNF703*를 동정하여 분자적 특성을 분석하고, 정상어체 및 병원체 자극에 따른 mRNA 발현 양상을 확인하였다. 이를 통해 *PsZNF703*이 어류의 병원체 감염에 의한 면역 조절 인자로 작용할 수 있음을 예측하였고, 도출된 연구 결과는 추후 경골어류 및 강도다리의 면역기능 연구의 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다.

## References

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>  
 Blasi G, Bortoletto E, Gasparotto M, Filippini F, Bai

CM, Rosani U and Venier P(2022). A glimpse on metazoan ZNFX1 helicases, ancient players of antiviral innate immunity. *Fish & shellfish immunology*, 121, 456~466.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.019>  
 Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G and Raschella G(2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell death discovery*, 3, 17071.  
<https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>  
 Chang S, Jiao X, Hu JP, Chen Y and Tian XH(2010). Stability and folding behavior analysis of zinc-finger using simple models. *International journal of molecular sciences*, 11(10), 4014~4034.  
<https://doi.org/10.3390/ijms11104014>  
 Cheah PY, Meng YB, Yang X, Kimbrell D, Ashburner M and Chia W(1994). The Drosophila l(2)35Ba/nocA gene encodes a putative Zn finger protein involved in the development of the embryonic brain and the adult ocellar structures. *Molecular and cellular biology*, 14(2), 1487~1499.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1487-1499.1994>  
 Chen SN, Zhang S, Li L, Laghari ZA and Nie P(2022). Molecular and functional characterization of zinc finger aspartate-histidine-histidine-cysteine (DHHC)-type containing 1, ZDHHC1 in Chinese perch *Siniperca chuatsi*. *Fish & shellfish immunology*, 130, 215~222.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.023>  
 Cho MY, Lee JI, Kim MS, Choi HJ, Lee DC and Kim JW(2008). Isolation of *Streptococcus parauberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus Pallas*. *Journal of fish pathology*, 21(3), 209~217.  
 Chyung MK(1977). *The Fishes of Korea*, Iljisa, Seoul, Korea, 570.  
 Coleman JE(1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annual review of biochemistry*, 61, 897~946.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.004341>  
 FAO/WHO(2004). Expert consultation on human vitamin and mineral requirements, vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of joint FAO/WHO expert consultation, 2nd edition, Bangkok, Thailand, 341.

- Fox AH, Liew C, Holmes M, Kowalski K, Mackay J and Crossley M(1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. The EMBO journal, 18(10), 2812~2822.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2812>
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M and Mackay JP(2007). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. Trends in biochemical sciences, 32(2), 63~70.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.007>
- Ghosh S, Srinivasan R and Ghanim M(2023). A C2H2 zinc finger transcription factor of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the capsid proteins of begomoviruses and inhibits virus retention. Insect molecular biology, 32(3), 240~250.  
<https://doi.org/10.1111/imb.12827>
- Gomez D, Sunyer JO and Salinas I(2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. Fish & shellfish immunology, 35(6), 1729~1739.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.032>
- He M, Ding NZ and He CQ(2021). Novirhabdoviruses versus fish innate immunity: A review. Virus Research, 304, 198525.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198525>
- HGNC(2023). HUGO Gene Nomenclature Committee. <http://www.genenames.org> on 21 December 2023.
- Hoyle J, Tang YP, Wiellette EL, Wardle FC and Sive H(2004). Nlz gene family is required for hindbrain patterning in the zebrafish. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 229(4), 835~846.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20001>
- Hu Y and Liu B(2022). Roles of zinc-binding domain of bacterial RNA polymerase in transcription. Trends in biochemical sciences, 47(8), 710~724.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.03.007>
- Hwang JY, Ahn SJ, Kwon MG, Seo JS, Hwang SD and Jee BY(2020). Whole-genome next-generation sequencing and phylogenetic characterization of viral haemorrhagic septicaemia virus in Korea. Journal of fish diseases, 43(5), 599~607.  
<https://doi.org/10.1111/jfd.13150>
- Issshik T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T and Miyazaki T(2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. Diseases of aquatic organisms, 47(2), 87~99.  
<https://doi.org/10.3354/dao047087>
- Kim HS, Choi J, Lim HJ, Jeong MH, Lee CS and Byun SG(2019). Effect of Feeding Frequency on the Growth of Juvenile Starry Flounder *Platichthys stellatus*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52(1), 87~91.  
<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0087>
- Kim SJ, Kim JO, Kim WS and Oh MJ(2016). Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infectivity dynamics in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* with injection and immersion challenge routes. Aquaculture, 465, 7~12.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.025>
- Kim SM, Lee JI, Hong MJ, Park HS and Park SI(2003). Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. Journal of fish pathology, 16, 1~12.
- Kim WS, Kim SR, Kim DW, Kim JO, Park MA, Kitamura SI, Kim HY, Kim DH, Han HJ, Jung SJ and Oh MJ(2009). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Aquaculture, 296, 165~168.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.019>
- Koppang EO, Kvellestad A and Fischer U(2015). Fish mucosal immunity: gill. Mucosal Health in Aquaculture, 93~133.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00005-4>
- Krishna SS, Majumdar I and Grishin NV(2003). Structural classification of zinc fingers: survey and summary. Nucleic acids research, 31(2), 532~550.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg161>
- Laity JH, Lee BM and Wright, PE(2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. Current opinion in structural biology, 11(1), 39~46.  
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00167-6)
- Lazado CC and Caipang CM(2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. Fish & shellfish immunology, 39(1), 78~89.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.015>

- Lee MS, Gippert GP, Soman KV, Case DA and Wright PE(1989). Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4918), 635~637.  
<https://doi.org/10.1126/science.2503871>
- Leon O and Roth M(2000). Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. *Biological research*, 33(1), 21~30.  
<https://doi.org/10.4067/s0716-9760200000100009>
- Li X, Han M, Zhang H, Liu F, Pan Y, Zhu J, Liao Z, Chen X and Zhang B(2022). Structures and biological functions of zinc finger proteins and their roles in hepatocellular carcinoma. *Biomarker research*, 10(1), 2.  
<https://doi.org/10.1186/s40364-021-00345-1>
- Liao Z, Chen X, Nie D, Wang J and Wu M(2014). A RING finger protein 114 (RNF114) homolog from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) possesses immune-regulation properties via modulating RIG-I signaling pathway-mediated interferon expression. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 507~516.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.030>
- Lim HK, Byun SG, Lee JH, Park SU, Kim YC, Han HK, Min BH and Lee BY(2007). Sexual maturity and reproductive cycle of starry flounder *Platichthys stellatus* cultured in indoor tank. *Aquaculture*, 20(4), 212~218.
- 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 (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402~408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mao R, Nie H, Cai D, Zhang J, Liu H, Yan R, Cuconati A, Block TM, Guo JT and Guo H(2013). Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein. *PLoS pathogens*, 9(7), e1003494.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003494>
- Miller J, McLachlan AD and Klug A(1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO journal*, 4(6), 1609~1614.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03825.x>
- Mokhtar DM, Zacccone G, Alesci A, Kuciel M, Hussein MT and Sayed RKA(2023). Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System. *Fishes*, 8(2), 93.  
<https://doi.org/10.3390/fishes8020093>
- Mork C, Hershberger P, Kocan R, Batts W, Winton J(2004). Isolation and characterization of a rhabdovirus from starry flounder (*Platichthys stellatus*) collected from the northern portion of Puget Sound, Washington, USA. *The Journal of general virology*, 85(2), 495~505.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.19459-0>
- Nagaram P, Pasupuleti M and Arockiaraj J(2020). CxxC Zinc Finger Protein Derived Peptide, MF18 Functions Against Biofilm Formation. *The protein journal*, 39(4), 337~349.  
<https://doi.org/10.1007/s10930-020-09904-1>
- Nakamura M, Runko AP and Sagerström CG(2004). A novel subfamily of zinc finger genes involved in embryonic development. *Journal of cellular biochemistry*, 93(5), 887~895.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.20255>
- Nakamura M, Choe SK, Runko AP, Gardner PD and Sagerström CG(2008). Nlz1/Znf703 acts as a repressor of transcription. *BMC developmental biology*, 8, 108.  
<https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-108>
- Nunez N, Clifton MMK, Funnell APW, Artuz C, Hallal S, Quinlan KGR, Font J, Vandevenne M, Setiyaputra S, Pearson RCM, Mackay JP and Crossley M(2011). The multi-zinc finger protein ZNF217 contacts DNA through a two-finger domain. *The Journal of biological chemistry*, 286(44), 38190~38201.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301234>
- Pabo CO, Peisach E and Grant RA(2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biochemistry*, 70, 313~340.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.313>
- Pereira F, Duarte-Pereira S, Silva RM, da Costa LT and Pereira-Castro I(2016). Evolution of the NET (NocA, Nlz, Elbow, TLP-1) protein family in metazoans: insights from expression data and phylogenetic analysis. *Scientific reports*, 6, 38383.  
<https://doi.org/10.1038/srep38383>
- Pereira-Castro I, Costa AM, Oliveira MJ, Barbosa I,

- Rocha AS, Azevedo L and da Costa LT(2013). Characterization of human NLZ1/ZNF703 identifies conserved domains essential for proper subcellular localization and transcriptional repression. *Journal of cellular biochemistry*, 114(1), 120~133.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.24309>
- Polekhina G, House CM, Traficante N, Mackay JP, Relaix F, Sassoon DA, Parker MW and Bowtell DD(2002). Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nature structural biology*, 9(1), 68~75.  
<https://doi.org/10.1038/nsb743>
- Prasad AS(1995). Zinc: an overview. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 11, 93~99.
- Rakhra G and Rakhra G(2021). Zinc finger proteins: insights into the transcriptional and post transcriptional regulation of immune response. *Molecular biology reports*, 48(7), 5735~5743.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06556-x>
- Razin SV, Borunova VV, Maksimenko OG and Kantidze OL(2012). Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry. Biokhimiia*, 77(3), 217~226.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297912030017>
- Runko AP and Sagerström CG(2003). Nlz belongs to a family of zinc-finger-containing repressors and controls segmental gene expression in the zebrafish hindbrain. *Developmental biology*, 262(2), 254~267.  
[https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00388-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00388-9)
- Runko AP and Sagerström CG(2004). Isolation of nlz2 and characterization of essential domains in Nlz family proteins. *The Journal of biological chemistry*, 279(12), 11917~11925.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M310076200>
- Salinas I(2015). The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, 4(3), 525~539.  
<https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Sallam A, Mansour AT, Alsaqufi A, Salem MZ, El Feky MMM(2020). Growth performance, anti-oxidative status, innate immunity, and ammonia stress resistance of *Signanus rivulatus* fed diet supplemented with zinc and zinc nanoparticles. *Aquaculture Reports*, 18, 100410.  
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100410>
- Santelli E, Leone M, Li C, Fukushima T, Preece NE, Olson AJ, Ely KR, Reed JC, Pellecchia M, Liddington RC and Matsuzawa S(2005). Structural analysis of Siah1-Siah-interacting protein interactions and insights into the assembly of an E3 ligase multiprotein complex. *The Journal of biological chemistry*, 280(40), 34278~34287.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M506707200>
- Shin SP and Lee JH(2023). Infection of *Enteromyxum leei* in cultured starry flounder *Platichthys stellatus*. *Fish Aquat Sci*, 26(3), 234~240.  
<https://doi.org/10.47853/FAS.2023.e20>
- Slorach EM, Chou J and Werb Z(2011). Zeppol is a novel metastasis promoter that represses E-cadherin expression and regulates p120-catenin isoform expression and localization. *Genes & development*, 25(5), 471~484.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1998111>
- Smail DA and Snow M(2011). Viral Haemorrhagic Septicaemia. *Fish Diseases and Disorders*, 3, 110~142.  
<https://doi.org/10.1079/9781845935542.0110>
- Sohn MY, Kim JW, Kang G, Woo WS, Kim KH, Son HJ, Park JW, Kim DH and Park CI(2023). First report of L1 cell adhesion molecule (LICAM) in flat fish (Starry flounder): Molecular features and expression analysis. *Developmental and comparative immunology*, 149, 105054.  
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.105054>
- Turvey SE and Broide DH(2010). Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S24~S32.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Wang H, Deng X, Zhang J, Ou Z, Mai J, Ding S and Huo S(2017). Elevated Expression of Zinc Finger Protein 703 Promotes Cell Proliferation and Metastasis through PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  Signalling in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry*, 44(3), 920~934.  
<https://doi.org/10.1159/000485360>
- Wang Y, Zhao H, Liu Y, Nie X and Xing M(2020). Zinc exerts its renal protection effect on arsenic-exposed common carp: A signaling network comprising Nrf2, NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Fish & shellfish immunology*, 104, 383~390.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.031>
- Williams TM, Moolten D, Burlein J, Romano J, Bhaerman R, Godillot A, Mellon M, Rauscher FJ

- and Kant JA(1991). Identification of a Zinc Finger Protein That Inhibits IL-2 Gene Expression. *Science* (New York, N.Y.), 254(5039), 1791~1794. <https://doi.org/10.1126/science.1840704>
- WOAH(World Organisation for Animal Health)(2021). Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus. In *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, WOA (Paris, France). [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/2.3.10\\_VHS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.10_VHS.pdf) on 21 December 2023.
- Wolfe SA, Nekludova L and Pabo CO(2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29, 183~212. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.183>
- Won KM, Cho MY, Park M, Jee BY, Myeong JI and Kim JW(2013). The first report of a megalocytivirus infection in farmed starry flounder, *Platichthys stellatus*, in Korea. *Fisheries and aquatic sciences*, 16(2), 93~99. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0093>
- Woo SJ, Kim MS, Do MY, Kim NY and Joo MS(2023). Evaluation of MIC distribution and establishment of epidemiological cut-off values for *Streptococcus parauberis* isolated from aquatic animals. *Journal of Applied Microbiology*, 134(7), lxad126. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad126>
- Yang M, Han R, Ni LY, Luo XC, Li AX, Dan XM, Tsim KW and Li YW(2019). Molecular characteristics and function study of TNF receptor-associated factor 5 from grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & shellfish immunology*, 87, 730~736. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.018>
- Yang X, Liu G, Li W, Zang L, Li D, Wang Q, Yu F and Xiang X(2020). Silencing of zinc finger protein 703 inhibits medullary thyroid carcinoma cell proliferation in vitro and in vivo. *Oncology letters*, 19(1), 943~951. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11153>
- Zuo H, Yang L, Zheng J, Su Z, Weng S, He J and Xu X(2018). A single C4 Zinc finger-containing protein from *Litopenaeus vannamei* involved in antibacterial responses. *Fish & shellfish immunology*, 81, 493~501. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.053>
- Zhu M, Zhou J, Ma X, Li G, He S, Tang H, Yao Y and Cheng Z(2019). CCCH-type zinc finger antiviral protein is specifically overexpressed in spleen in response to subgroup J avian leukosis virus infection in chicken. *Research in veterinary science*, 123, 65~70. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.017>

- 
- Received : 17 January, 2024
  - Revised : 05 February, 2024
  - Accepted : 09 February, 2024