

## 넙치, *Paralichthys olivaceus* 발생단계별 galectin-1 유전자의 발현 분석

장민석 · 이영미 · 양현 · 이정호 · 노재구 · 김현철 · 박철지 · 박종원 · 황인준 · 김성연<sup>†</sup>

국립수산과학원 육종연구센터

### Gene analysis of galectin-1, innate immune response gene, in olive flounder *Paralichthys olivaceus* at different developmental stage

Min Seok Jang, Young Mee Lee, Hyun Yang, Jeong-Ho Lee, Jae Koo Noh, Hyun Chul Kim,  
Choul-Ji Park, Jong-Won Park, In Joon Hwang, Sung Yeon Kim<sup>†</sup>

Genetics and Breeding Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, Geoje 656-842, Korea

The innate immune response is fundamental defense response of vertebrates and invertebrates. Especially, the innate immune response important for larvae that lack of resistance to infectious diseases in the early stages. Galectin is one of the kinds of lectin and presents in the fish mucous that involves innate immune response. Galectin have been studied from various fishing species, but expression analysis of galectin is still unclear during early developmental stage in olive flounder. In this study, we investigated gene expression of galectin-1 from various developmental stage and tissues. We excised several tissues including the muscle, fin, eye, gill, brain, stomach, intestine, kidney, spleen and liver from adult olive flounder and confirmed gene expression of galectin-1 using RT-PCR and quantitative real-time PCR. Expression of galectin-1 was significantly higher in muscle, stomach and intestinal tissue than other tissue in adult fish (5 and 29 months). Also, galectin-1 gene was detected from 0 DAH and gradually increased to 35 DAH and since then decreased after stomach development period. Induction of galectin-1 during the early developmental stage suggest that muscle, fin and eye tissue is formed and begins the secretion of galectin this period. In addition, increased expression levels at 35 DAH suggest that due to complete formation of stomach and intestine, increase of secretion and activation of enzyme. This study shows that expression of galectin-1 during early developmental stages and adult period in olive flounder and can be expect that galectin-1 play essential role in the innate immune system throughout the whole life time. Galectin-1 is primary barrier such as skin and digestive tissue against pathogen infection, also digestive tract developmental period is important for pathogen invasion can be expected that it will serve. Mass mortality due to the disease in seed production is continuing damage, therefore these result will be meaningful about infectious disease during early developmental stages as a basic data for the study.

*Key words* : Innate immune system, Olive flounder, Galectin-1

넙치는 1980년대 초 인공종묘 생산을 시작으로 1990년대부터 동해 및 남해안과 제주도 연안에서 양

식산업이 본격적으로 발달하기 시작하였다. 생활수준의 향상에 따른 소비 확대와 생산량 증대를 위한 기술 개발에 힘입어 양식넙치의 생산은 비약적으로 증가하였으며 우리나라 양식산업의 대표적인 어종

<sup>†</sup>Corresponding author: Sung Yeon Kim

Tel: 055-639-5801 Fax: 055-639-5809

E-mail: ssykim@korea.kr

으로 자리매김하였다.

그러나 최근에는 장기간의 집약적 양식에 의한 어장의 노후화, 양식품종의 열성화, 고밀도 사육 및 난치성 질병의 증가 등으로 질병의 발생 빈도가 증가하고 폐사가 빈번하게 일어나고 있다 (Oh *et al.*, 2006). 특히 초기 발생단계 과정의 자치어기에서 발생하는 유전적, 환경적, 그리고 영양적인 비감염성 질병과 더불어 바이러스 및 세균에 의한 감염성 질병 또한 지속적으로 증가하고 있다 (Noshioka *et al.*, 1997).

질병발생은 대량생산이 시작된 1990년대 초부터 증가하기 시작하였고, 과거에는 세균이나 기생성 질병이 주로 발생한 반면 최근에는 발병 시기 불분명 중 발생하며 병원체의 혼합감염이나 바이러스 감염에 의한 양식생물의 대량폐사가 빈발하고 있으며, 질병으로 인한 폐사가 총 사육량의 25~30%를 차지하고 있다. 넙치에 주로 발생하는 바이러스 질병의 원인체인 marine birnavirus (Oh *et al.*, 1999), flounder herpesvirus (Oh *et al.*, 2006), nervous necrosis virus (Munday and Nakai, 1997), 세균성 질병을 일으키는 *Vibrio ichthyenteri*, 기생충성 병원균인 scuticociliate에 감염될 경우 자치어는 대부분 짧은 시간 내에 손쓸 틈 없이 대량 폐사가 진행되어 양식 산업에 큰 피해를 주고 있다. 이처럼 감염성 질병에 의한 피해가 지속적으로 일어나고 있지만 피해를 막을 수 있는 뚜렷한 대책이 없는 실정이며, 특히 초기 발생단계 과정에서 발생하는 감염성 질병의 경우 넙치 자치어가 지니고 있는 선천성 면역력에 의존 할 수밖에 없는 상황이다.

선천성 면역반응은 모든 종류의 생물에서 갖추고 있는 일차적인 방어기작으로써 숙주가 병원체로부터 감염되지 않도록 즉각적으로 반응하는 면역 체계이며, 획득 면역과는 달리 면역력이 지속되지 않으며 포괄적인 방법으로 병원체를 제거한다 (Hemrich *et al.*, 2007). 숙주인 척추동물 또는 무척추동물의 체내에 병원체가 침입하면 병원성 미생물이 지니고 있는 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)

를 통하여 가장 먼저 인식하게 되며, 숙주는 병원체가 지니고 있는 PAMPs를 pattern recognition receptors (PRRs)로 감지하게 된다. Lectin은 잘 알려진 PRRs 중 하나로 병원체의 표면에 존재하는 carbohydrate를 인식하는 단백질이며 살아있는 모든 생물 내에 존재하고 있다 (Vasta, 2009). 또한 자기와 비자기를 구별하여 선천성 면역을 유도하고 (Vasta, 1994; Arason, 1996), PAMPs를 인지하여 오포소닌 (opsonization) 및 식균 작용 (phagocytosis) 그리고 보체 활성화 (complement activation)을 일으키는 등 다양한 생물학적 기능을 지니고 있다 (Ohta and Kawasaki, 1994; Swierzko *et al.*, 2009; Russell and Lumsden, 2005). 척추동물 또는 무척추동물에는 다양한 종류의 lectin이 존재하는데 특히 sequence motif와 structural fold에 의해서 C-type, F-, I-, P-, cytokine lectin 그리고 galectin으로 구분한다. 이 중 galectin은 어류의 피부 점액에 존재하며 선천적으로 외부 병원체로부터 숙주를 보호하는 기능을 한다 (Suzuki *et al.*, 2003). 현재까지 zebrafish, *Danio rerio* (Vasta *et al.*, 2004), conger eel, *Conger myriaster* (Kamiya *et al.*, 1988), rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Inagawa *et al.*, 2001)에서 galectin에 관한 연구가 수행되었으며, 최근에는 sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Poisa-Beiro *et al.*, 2009)에서 항염증 활성화와 olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Liu *et al.*, 2013)에서 항 바이러스 활성이 보고되었다.

그러나 질병에 민감한 초기발달단계를 거치는 자치어의 유일한 방어체계라 할 수 있는 선천성 면역반응에 관련된 유전자의 발현에 대한 연구가 부족하므로, 질병 원인체로부터 숙주를 보호하는 선천성 면역 관련 유전자인 넙치 galectin-1이 수정란을 포함한 자치어의 초기 발생단계에 따른 발현과 넙치 성어의 조직별 발현을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어 사육관리 및 샘플링

실험어의 사육은 경상남도 거제시에 위치한 국립 수산과학원 육종연구센터 (National Fisheries Research and Development Institute, NFRDI)에서 수행하였다. 넙치 galectin-1 유전자의 초기 발생단계별 발현량을 분석하기 위하여 넙치 수정란 및 자치어를 3톤 수조에서 유수식 (1~5회전/일)으로 사육하였다. 부화 후 55일까지의 사육기간 동안 수온을 18±0.5°C로 유지하였으며, 공기공급 장치를 이용하여 산소를 공급하였고, 조도 및 광주기는 각각 300 Lux, 12:12 (L:D)으로 관리하였다. 먹이생물 공급은 난황흡수가 완료되는 부화 후 3일째부터 동물성 플랑크톤인 rotifer를 1일 2회, 부화 후 13일째부터는 rotifer와 artemia를 동시에 1일 2회, 부화 후 18일째부터는 배합사료와 artemia를 동시에 1일 2회 공급하였다. 넙치 galectin-1 유전자의 발현량을 확인하기 위해 부화 전 수정기 (fertilization stage), 포배기 (blastula stage), 낭배기 (gastrula stage) 그리고 신경배기 (neurula stage)와 부화 후 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 그리고 55일째 넙치 시료를 300±10 µg으로 측정된 후 10개의 1.5ml tube에 각각 샘플링 하였으며, RNA를 분리하기 전까지 -80°C에서 동결 보존하였다.

넙치 galectin-1 유전자의 조직별 발현량을 확인하기 위하여 사육 중인 넙치 성어 (5개월령: 22±1 cm, 125±20 g, 29개월령: 62 cm, 2.5±0.2 kg)를 각각 5마리씩 실험어로 사용하였다. 넙치 성어로부터 근육 (피부 제외), 지느러미, 눈 (각막 포함), 아가미, 뇌, 위 (유문부), 장 (중장), 신장 (두신), 비장 그리고 간 조직을 채취하여 0.1 g씩 측정된 후 RNA를 분리하기 전까지 -80°C에서 동결 보존하였다.

### Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification

-80°C에 동결 보존되어 있는 넙치 초기 발생단계별 및 조직별 시료로부터 total RNA 분리를 진행하였다. TRIzol Reagent (Invitrogen, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 total RNA를 분리하였으며, 분리된 RNA는 cDNA 합성을 위해 Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, Swiss)를 사용하였다. 역전사 반응 시 Oligo (dT)<sub>18</sub> primer (Roche, Swiss)를 사용하여 55°C에서 30 분간, 85°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. PCR에 사용된 primer는 flounder의 galectin-1 (GenBank accession number: AF220550.1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 sequence를 이용하였다 (Table 1).

Table 1. Sequence of the primers used this study

Gene	Primer	Oligonucleotide Sequence (5' to 3')	Object
galectin-1	GL-1F (sense)	GAA CAT GTC CTT CAA GGT CGG	RT-PCR, qPCR primer
	GL-1R (anti)	CTC CTC ACA CCA CTG TCT TCC	
ACTB	beta-1F (sense)	GAG CGT GGC TAC TCC TTC AC	RT-PCR, qPCR primer
	beta-1R (anti)	AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG	

PCR은 AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, USA) polymerase와 Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA)기기를 사용하였다. Microtube에 10x buffer 1  $\mu$ l,  $MgCl_2$  1  $\mu$ l, dNTP 0.1  $\mu$ l, forward primer 0.5  $\mu$ l, reverse primer 0.5  $\mu$ l, AmpliTaq Gold 0.1  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l 그리고 DEPC-water 5.8  $\mu$ l를 첨가하여 최종액의 volume을 10  $\mu$ l로 맞추어 진행하였다. 반응조건은 95°C에서 10분간 initial denaturation, 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 반응을 25 cycle로 반복한 후 72°C에서 10분간 final extension을 수행하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 UV-transilluminator 상에서 확인하였다.

#### Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

qPCR 반응은 Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA)와 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)기기를 사용하였다. Microtube에 2 $\times$  Power SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ l (Applied Biosystems, USA), forward primer 0.3  $\mu$ l, reverse primer 0.3  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l 그리고 DEPC 7.4  $\mu$ l를 첨가하여 최종액의 volume을 20  $\mu$ l로 맞추어 진행하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 20초간 반응하였고, 95°C에서 3초간, 60°C에서 30초간의 과정을 40 cycle로 반복한 후 60~95°C에서 1°C/sec의 속도

로 Tm (melting point)을 측정하였다. Endogenous control은 ACTB (beta-actin)를 사용하여 분석하였으며, 실험결과 재현성을 위하여 3회 반복 실험하였다. Quantitative real-time PCR의 결과 분석을 위해 발현단계별 분석에서는 부화 전 수정기 (fertilization stage)를, 조직별 분석에서는 근육(29개월 연령)을 기준으로 분석하였다.

## 결 과

넙치 galectin-1 유전자의 초기 발생단계별 발현 분석 선천성 면역 반응에 관여한다고 알려진 galectin-1이 넙치의 초기 발달단계에서 발현 변화를 보이는지 분석하기 위해 수정기부터 부화 후 55일까지 넙치 시료를 샘플링 한 후 RNA를 추출하여 실험에 사용하였다. 넙치 galectin-1 유전자의 초기 발생단계별 발현량을 RT-PCR과 전기영동을 이용하여 조사한 결과 (Fig. 1) 넙치 galectin-1은 이전 단계에서는 전혀 발현되지 않다가 낭배기 이후부터 발현이 약하게 증가하기 시작하였으며 두 차례 큰 증가를 보였다. 첫 번째 증가는 신경배기에서 크게 증가했다가 부화 후 0일에서 25일까지 일정 수준을 유지하였으며, 부화 후 30일에서 다시 2배 이상 크게 증가한 후 부화 후 40일까지 높은 발현양을 보이다가 이후 점차 감소하였다.

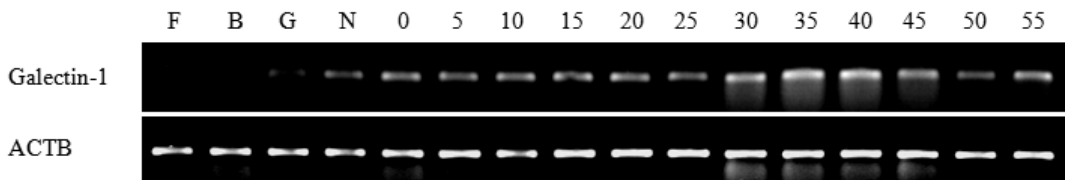


Fig. 1. RT-PCR analysis of galectin-1 during early developmental stage. F: fertilization stage, B: blastula stage, G: gastrula stage, N: neurula stage, day after hatching (DAH) 0~55.

넙치 galectin-1 유전자의 초기 발생단계별 발현량을 real-time PCR을 이용하여 정량적으로 분석한 결과 (Fig. 2) galectin-1 유전자의 발현은 부화 후 0일에서부터 증가되기 시작하였으며 일정 수준을 유지하다가 부화 후 5일에 일시적인 증가를 보였고 다시 일정수준으로 돌아오는 것을 확인하였다. 부화 후 25일까지 galectin-1 유전자의 발현량이 서서히 증가하였고 30일부터는 급격하게 발현량이 증가하여 35일째에 가장 많은 발현량을 보였으며, 부화 후 40일부터는 galectin-1 유전자의 발현량이 감소하는 패턴을 확인하였다. 넙치 galectin-1의 발현단계별 real-time PCR에 의한 정량적인 분석 결과는 앞서 시행한 RT-PCR의 결과와 유사한 경향을 보여주었다.

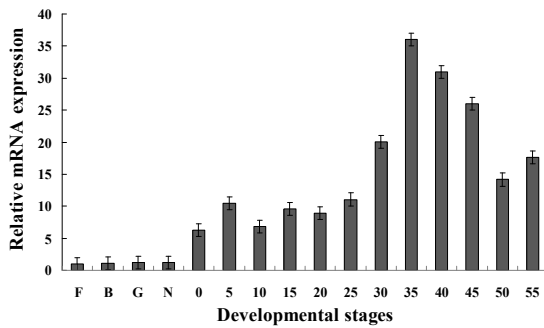


Fig. 2. Quantitative real-time PCR analysis of the expression patterns of olive flounder galectin-1 showing the relative levels of galectin-1 mRNA in eggs and developmental stages. F: fertilization, B: blastula, G: gastrula, N: neurula, day after hatching (DAH) 0~55.

넙치 galectin-1 유전자의 조직별 발현 분석

선천성 면역반응에 관여하는 galectin-1이 넙치의 어떤 조직에서 발현하여 기능을 가지는지 알아보기 위해, 다양한 발달과정의 넙치를 선택한 후 조직을 각각 샘플링하여 RT-PCR과 전기영동을 이용하여 조사하였다. 5개월령 넙치에서 galectin-1은 근육, 위, 장에서 강하게 발현되고, 비장에서는 약하게 발현되었다. 29개월령 넙치에서는 근육, 위, 장, 비장 뿐만

아니라 지느러미, 눈, 아가미에서도 galectin-1 유전자의 발현이 확인되었다 (Fig. 3).

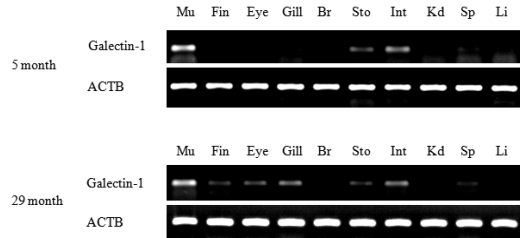


Fig. 3. RT-PCR analysis of galectin-1 mRNA expression in various tissues of different size of fish. Mu: muscle, Br: brain, Sto: stomach, Int: intestine, Kd: kidney, Sp: spleen, Li: Liver

넙치 galectin-1 유전자의 조직별 발현을 real-time PCR을 이용하여 정량적으로 분석한 결과 (Fig. 4) 근육 조직에서 월등히 높은 발현량을 나타냈으며 그 다음으로는 장, 지느러미, 위, 눈 조직 순서로 높은 발현량을 확인하였다. 그러나 아가미, 뇌, 신장, 비장 그리고 간 조직에서는 galectin-1 유전자의 발현이 나타나지 않았다.

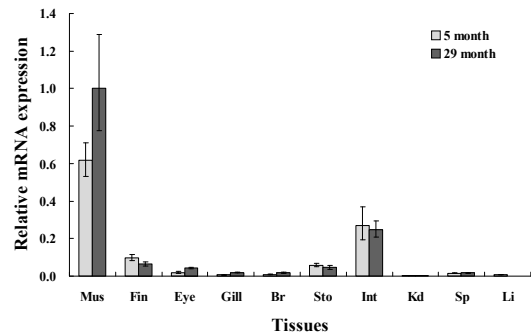


Fig. 4. Quantitative real-time PCR analysis of the expression patterns of olive flounder galectin-1 showing the relative levels of galectin-1 mRNA in different tissues. Mus: muscle, Br: brain, Sto: stomach, Int: intestine, Kd: kidney, Sp: spleen, Li: Liver.

## 고 찰

넙치의 초기 발생단계에 발병하여 대량폐사를 일으키는 질병의 방어기작을 이해하고 이와 관련된 선천성 면역반응에 대한 정보를 얻기 위해, 선천성 면역반응을 통한 방어기작에 관여할 것이라고 예상되는 넙치 galectin-1 유전자의 발현을 초기 발생단계에서 집중적으로 관찰하고, 다양한 발생단계의 조직에서 발현 변화를 보이는지 관찰하였다.

초기 발생단계에서 galectin-1 유전자의 발현을 분석한 결과, galectin-1은 수정 전 단계에는 전혀 발현하지 않는 것으로 확인되었다. 이는 galectin-1이 발현되는 근육, 지느러미, 눈, 장, 위 조직이 수정란 시기에 완전하게 형성되지 않았기 때문인 것으로 추정된다. Galectin-1 유전자의 발현은 부화 후 0일부터 나타나기 시작하여 점진적으로 약한 증가세를 보이지만 특이적으로 부화 후 5일에서 일시적인 증가세를 보였으며, 근육 다음으로 장에서 많이 발현되는 것으로 관찰되었다. 넙치의 소화기관 형성 및 소화효소 분비는 부화 후 3일을 전후로 집중적으로 나타나는데, 일부 소화기관은 부화 후 1일부터 관찰되며 소화효소의 활성을 유도하는 trypsinogen은 2일째부터 췌장에서 합성되어 장으로 분비되기 시작한다. 부화 후 3일에는 난황 흡수가 완료되고, 간, 장, 직장, 담낭이 형성되며, 턱이 형성되고 입과 항문이 개방되면서 비로소 먹이생물을 섭취하게 된다 (Kurokawa and Suzuki, 1996). 먹이 섭취와 소화와 관련된 기관의 형성이 완성되고 췌장에서 소화효소가 분비되어 각 소화기관에서 활성화가 시작되면서 부화 후 5일째 넙치에서의 발현이 일시적으로 증가되는 것으로 보인다.

본 연구 결과에서 넙치 성어의 위와 장 조직에서 galectin-1 유전자의 발현이 크게 나타나고 (Fig. 2, 4) 부화 후 20일부터 원시적인 위가 관찰되어 (Kurokawa and Suzuki, 1996) 30일 경에 기능적으로 완성된 위가 형성되는 이전 연구 (Miwa *et al.*, 1992)들을 감안할

때, 부화 후 30일째 galectin-1 유전자의 발현량이 급격하게 상승하는 것은 galectin-1이 넙치 자치어의 위와 장에서 존재하면서 병원체 침입시 소화기능 수행에 관여할 것이라고 판단된다.

발달단계가 다른 넙치 성어의 조직에서 galectin-1 유전자의 발현을 확인한 결과, 5개월령 넙치와 29개월령 넙치에서 공통적으로 근육, 장, 지느러미, 위, 눈 조직의 순서로 높은 발현량을 확인하였으며, 아가미, 뇌, 비장, 신장 그리고 간 조직에서는 발현이 나타나지 않았다 (Fig. 3). 특히 근육 조직에서 galectin-1 유전자의 발현량이 월등히 높게 나타났는데 이는 피부 점액 내에 존재하는 lectin 중에서 galectin이 포함되어 있다는 이전 보고 (Muramoto and Kamiya, 1992; Muramoto *et al.*, 1999)와 일치하는 결과이며, 본 연구에서 사용한 넙치의 피부조직에서 분비되는 점액 내에도 galectin이 포함되어 있음을 시사한다.

또한 어류의 피부에서 분비되는 점액은 다양한 생물학적인 활성 펩타이드, hemolysin, lysozyme 그리고 lectin 등을 포함한 단백질을 이용하여 병원성 세균과 기생충으로부터 숙주를 보호하기 때문에 (Ingram, 1980) 병원균 침입의 일차 관문인 지느러미와 눈에서 galectin-1 유전자가 발현되는 것은 galectin-1이 외부의 질병 원인체에 대한 숙주의 일차적인 방어기작에 관여할 것이라고 예측할 수 있다.

그리고 소화기관인 위와 장 조직에서 발현되는 galectin-1 유전자는 피부에서 분비되는 점액과 소화관 내에서 분비되는 점액이 외배엽의 발생 기원학적 유래가 같기 때문에 galectin-1 유전자가 발현되지 않은 아가미, 뇌, 비장, 신장, 그리고 간 조직 등에 비해 높은 발현량을 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구 결과들을 통해 넙치와 유사한 flatfish에서도 비슷한 galectin-1 유전자의 발현을 예측할 수 있으며, 경골어류의 피부나 소화관 점액에 galectin이 존재하는 점을 고려할 때 넙치의 소화기관이 완전히 형성된 이후에 질병의 원인체에 대한 선천성 면역반응과

방어기작이 활발하게 일어날 것으로 본다. Kim *et al.* (2004)는 넙치의 초기 발생단계 과정에 따른 소화관의 형성 및 위장 내에 분비되는 pepsinogen의 발현과 *Vibrio ichthyenteri*, *V. anguillarum*, 그리고 *Edwardsiella tarda*에 대한 감수성을 확인한 결과 pepsinogen 유전자가 발현하는 부화 후 30일 이후부터 세균에 대한 넙치의 감수성이 크게 감소하는 것을 확인하였고 쥐 (rat)의 경우 위와 장을 포함한 소화관 전역에서 galectin이 포함된 점액을 분비하며, 이 점액이 병원체에 대하여 면역력을 가진다는 보고에 따라 (Nio *et al.*, 2005) 소화기관이 완전히 형성되는 부화 후 30일째 넙치의 소화관에서 galectin이 분비되며 선천성 면역반응에 많은 기여를 할 것으로 추측된다.

본 연구에서는 질병 원인체로부터 숙주를 보호하는 선천성 면역관련 유전자인 galectin-1을 이용하여 넙치 초기발생단계 시기, 그리고 넙치 성어시기에서 발현하는 특성을 조사하였으며, 그 결과 galectin-1 유전자의 발현이 넙치 자치어에서 선천적 면역시스템의 역할을 수행할 것으로 추측할 수 있었다. 따라서 후천성 면역기능이 형성되지 않은 초기발생단계 과정에서 바이러스성, 세균성 그리고 기생충성 질병에 넙치 자치어가 감염되었을 경우 galectin-1 유전자의 선천성 면역반응과 방어기작에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 요약

선천성 면역반응은 감염성 질병에 대한 저항력이 부족한 초기 발달단계의 자치어에게 중요하다. 특히 lectin은 선천성 면역반응에 많은 기여를 하고 있으며 종류 또한 다양하다. Lectin의 종류 중 하나인 galectin은 어류 점액 내에 존재하며 선천적으로 외부 병원체로부터 숙주를 보호하는 기능을 지니고 있다. 하지만 어류 galectin과 초기발생단계 시기와 관련된 연구들은 부족한 실정이다. 본 연구는 넙치에서 발현되는

galectin-1을 통하여 자치어의 초기발생단계별 그리고 성어의 조직별 발현을 조사하였다. 초기발생단계별 galectin 발현을 조사한 결과, 부화 전 수정란의 낭배기부터 galectin-1 유전자의 발현이 시작되었으며, 부화 후 25일까지 서서히 증가하였다. 부화 후 30~35일에 galectin-1 유전자의 발현량이 급격하게 증가하였고, 그 이후의 galectin-1 유전자의 발현량은 서서히 감소하였다. 성어 (5개월령, 29개월령)의 조직별 galectin 발현을 조사한 결과, 근육, 장, 지느러미, 위, 눈 조직 순서로 높게 발현하였고, 이외의 조직에서는 발현이 나타나지 않았다. 초기발생단계에서 galectin-1의 발현이 증가되는 것은 낭배기부터 넙치의 근육, 지느러미 그리고 눈 조직이 형성되고 galectin의 분비가 시작되어 기능을 나타내기 때문인 것으로 추측된다. 부화 후 30일부터 galectin의 발현량이 많이 증가하는 것은 장과 위 조직이 활성화됨에 따라 점액의 분비량이 증가하여 galectin의 발현량 또한 증가하는 것으로 판단된다. 이로써 넙치 초기발생단계 시기의 galectin-1 유전자의 발현패턴과 galectin이 점액 내에 다량 포함되어 있는 것을 확인하였으며, galectin의 발현은 선천적 면역반응으로 넙치의 초기발생단계 시기와 성어기에 중요할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년 국립수산과학원의 지원(RP-2013-BT-088)을 받아 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Arason, G.J.: Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish Shellfish Immunol.*, 6:277-289, 1996.
- Hemrich, G., Miller, D.J. and Bosch, T.C.G.: The evolution of immunity: a low-life perspective.

- Trends Immunol., 28:449-454, 2007.
- Inagawa, H., Kuroda, A., Nishizawa, T., Honda, T., Ototake, M., Yokomizo, Y., Nakanishi, T. and Soma, G.I.: Cloning and characterisation of tandem-repeat type galectin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol., 11:217-231, 2001.
- Ingram G.A.: Substances involved in the natural resistance of fish to infection-a review. J. Fish Biol., 16:23-60, 1980.
- Kamiya, H., Muramoto, K. and Goto, R.: Purification and properties of agglutinins from conger eel, *Conger myriaster* (Brevoort), skin mucus. Dev. Comp. Immunol., 12:309-318, 1988.
- Kim, D.H., Han, H.J., Kim, S.M., Lee, D.C. and Park, S.I.: Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). J. Fish Dis., 27:497-505, 2004.
- Kurokawa, T. and Suzuki, T.: Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 141:267-276, 1996.
- Liu, S., Hu, G., Sun, C. and Zhang, S.: Anti-viral activity of galectin-1 from flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Shellfish Immunol., 34:1463-1469, 2013.
- Miwa, S., Yamano, K. and Inui, Y.: Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis. J. Exp. Zool. Part A, 261(4):424-430, 1992.
- Munday, B.L. and Nakai, T.: Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. World J. Microbiol. Biotechnol., 13(4):375-381, 1997.
- Muramoto, K. and Kamiya, H.: The amino-acid sequence of a lectin from conger eel, *Conger myriaster*, skin mucus. Biochimica. et. Biophysica. Acta. General Subjects, 1116:129-136, 1992.
- Muramoto, K., Kagawa, D., Sato, T., Ogawa, T., Nishida, Y. and Kamiya, H.: Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 123:33-45, 1999.
- Nio, J., Kon, Y. and Iwanaga, T.: Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract. J. Histochem. Cytochem., 53(11):1323-1334, 2005.
- Noshioka, T., Furusawa, T. and Mizuta, Y.: Diseases occurring in marine fish and shellfish hatcheries in Japan (1989-1994). Suisan Zoshoku., 45:285-290, 1997.
- Oh, M.J., Jung, S.J. and Kim, Y.J.: Detection of bimavirus from marine cultured fish using polymerase chain reaction (PCR). J. Fish Pathol., 12(1):49-55, 1999.
- Oh, M.J., Jung, S.J., Kitamura, S.I., Kim, H.J. and Kang, S.Y.: Viral diseases of olive flounder in Korean hatcheries. J. Ocean Univ. China, 5:45-48, 2006.
- Ohta, M. and Kawasaki, T.: Complement-dependent cytotoxic activity of serum mannan-binding protein towards mammalian cells with surface-exposed high-mannose type glycans. Glycoconj. J., 11:304-308, 1994.



- Poisa-Beiro, L., Dios, S., Ahmed, H., Vasta, G.R., Martinez-Lopez, A., Estepa, A., Alonso-Gutierrez, J., Figueras, A. and Novoa, B.: Nodavirus infection of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Induces up-regulation of Galectin-1 expression with potential anti-inflammatory activity. *J. Immunol.*, 183:6600-6611, 2009.
- Russell, S. and Lumsden, J.S.: Function and heterogeneity of fish lectins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108:111-120, 2005.
- Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M. and Suetake, H.: Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 136:723-730, 2003.
- Swierzko, A.S., Cedzynski, M., Domzalska-Popadiuk, I., MacDonald, S.L., Borkowska-Klos, M., Atkinson, A.P., Szala, A., Jopek, A., Jensenius, J.C., Kawakami, M., Szczapa, J., Matsushita, M., Szmraj, J., Turner, M.L. and Kilpatrick, D.C.: Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) in a large cohort of neonates and its clinical associations. *Mol. Immunol.*, 46:1696-1701, 2009.
- Vasta, G.R., Ahmed, H., Fink, N.E., Elola, M.T., Marsh, A.G., Snowden A. and Odom, E.W.: Animal lectins as self/non-self recognition molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 712:55-73. 1994.
- Vasta, G.R., Ahmed, H., Du, S.J. and Henrikson, D.: Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. *Glycoconj. J.*, 21:503-521, 2004.
- Vasta, G.R.: Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7:424-438, 2009.

---

Manuscript Received : October 16, 2013

Revised : November 14, 2013

Accepted : November 25, 2013