

바이러스성 출혈성 패혈증에 감염된 넙치의 cDNA microarray 분석 : 수온에 따른 면역 유전자 발현의 차이

김진웅·정성주^{*†}

전라남도 해양수산과학원 여수센터, *전남대학교 수산해양대학 수산생명의학과

cDNA microarray analysis of viral hemorrhagic septicemia infected olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: immune gene expression at different water temperature

Jin-Ung Kim and Sung-Ju Jung^{*†}

Yeosu center, Ocean & Fishery Science Institute, JeollaNamdo, Yeosu 550-705, Korea

^{*}Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science,
Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

The olive flounder, *Paralichthys olivaceus* is susceptible to viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) at 15°C but no mortality at 20°C even though the virus can grow well *in vitro* at 20°C. Thus, we designed an experiment to know immune response of olive flounder against VHSV when the host reared at 15°C or 20°C. cDNA microarray analysis was performed to compare the gene expression patterns of the kidney cells between the host reared at 15°C or 20°C. The expression of MHC class I, IL-8, myeloperoxidase and endonuclease G-like having function for the antigen presentation and chemokine-factor were up-regulated both the 15°C and 20°C during VHSV infection. MHC class II gene existing on antigen-presenting cells and B cell lymphocytes, immunoglobulin (Ig) genes and phagocytosis related genes were down-regulated at 15°C but highly expressed at 20°C. It can be thought that innate immune related antigen presentation by MHC class I and phagocytosis reaction against VHSV are efficiently occur both the temperature but macrophage or B cell related antigen presentation via MHC class II fails to induce downstream immune reactions (adaptive immunity) to make antibody, and it can be one of the reason that causes high mortality only at 15°C.

Key words: VHSV, Temperature susceptibility, Microarray, Antigen presentation, Immunoglobulin

넙치는 국내 전체 해수 양식 어류 생산량의 40% 이상을 점유하며 그 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 넙치는 성장 속도가 매우 빠르고, 보통 육상 수조에서 양식되어지나 밀폐된 공간에서 집약적으로

양식되어지는 조건이 유지되면서 스트레스, 면역력 약화와 병원체 노출로 인한 대량 폐사가 발생해 오고 있다. 바이러스성 출혈성 패혈증(viral hemorrhagic septicemia: VHS)은 유럽 양식 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*를 비롯한 담수산 연어과 어류에 감수성이 높은 것으로 알려져 왔지만 최근에는 감염 대상의 범위가 확대되어 담수 및 해수 어류의

[†]Corresponding author: Sung-Ju Jung
Tel: +82-61-659-7175, Fax: +82-61-659-7179
E-mail: sungju@chonnam.ac.kr

약 50종에 질병을 유발하며(Mortensen *et al.*, 1999; Smail, 1999), 우리나라와 일본의 넙치에서 저수온기에 발생하여 양식 산업의 경제적 손실을 일으키고 있다 (Takano *et al.*, 2000; Issiki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003).

바이러스성 출혈성 패혈증의 발병은 일교차가 큰 봄의 저수온기(10-15°C)에 집중되는 경향이 있다. 변온 동물에 속하는 넙치는 생리적 적온의 범위를 가지며, 환경수온이 적온 범위보다 낮거나 높을 경우 신진 대사의 감소, 성장 저하, 면역성 감퇴의 현상을 보이고 심한 경우에는 폐사하게 된다. 이렇듯이 수온은 수서환경에서 어류와 병원체의 성장 및 어류의 스트레스 원인 요소 중 하나로 중요하며, 병원체에 의한 어류의 폐사율은 수온에 크게 의존된다고 알려져 있다. 바이러스성 출혈성 패혈증의 발병 기작에 대해서는 많이 알려져 있지 않으며 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV)에 의해 유도되는 면역반응에 대하여 몇몇 보고가 있다 (Avunje *et al.*, 2011, 2012, 2013). 바이러스성 출혈성 패혈증은 10-15°C 범위에서 대량폐사가 발생하지만 20°C 이상의 수온에서는 전혀 폐사가 일어나지 않는 질병으로 수온이 질병발생과 폐사율에 영향을 미치는 중요한 인자로 작용한다 (Sano *et al.*, 2009).

본 연구는 저수온기에 양식 넙치에 발생하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염과 질병의 진행경과에 수온이 끼치는 영향을 파악하고자 하였다. 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스를 15°C와 20°C에서 감염시키고 넙치의 면역 유전자 발현 profile을 cDNA microarray를 이용하여 분석하여 각 온도에서 바이러스에 대한 숙주 면역반응의 변화를 전체적으로 보고자 하였다.

재료 및 방법

감염실험

수온을 15, 20°C로 조절한 사육 수조에 넙치(평균 체중 7g)를 20마리씩 넣고 수온별로 시험어에 10^5 TCID₅₀/fish로 각각 근육 주사하였다. 대조구는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)만 근육 주사하여 수온에 따른 병원성의 변화

를 누적폐사율로 조사하였다.

바이러스 역가 측정 및 RT-PCR

15, 20°C에서 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 접종 후 3일과 10일째에 비장과 신장을 적출하였다. FHM (fathead minnow) 세포에서 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)방법으로 역가를 측정하였고, RNA는 상법에 따라 추출하여 Miller *et al.*(1998)이 glycoprotein에서 디자인한 PCR primer (VG1-VD3/VD3-VD5) set를 사용하여 nested-PCR을 실시하였다. PCR은 95°C 1분, 54°C 1분, 72°C 1분간 30 cycle을 반복하는 조건으로 증폭시켰다.

cDNA chip 제작

cDNA chip을 제작하기 위하여 1 kg의 건강한 넙치 2마리에 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스를 근육주사하고 20°C에서 2주간 사육한 후에 신장을 무균적으로 분리하였다. 신장에서 추출한 mRNA에서 약 1,000개의 EST 클론을 분리, sequencing하여 309개의 유전자를 선정하여 배양하였고, plasmid를 준비하여 PCR 과정을 거친 후 슬라이드에 유전자를 spotting하고 QC를 측정하였다.

cDNA microarray 분석

1) RNA 분리

접종 3, 10, 20일 경과 후 각 온도별 샘플의 신장에서 Trizol (Gibco, USA)를 사용하여 RNA를 분리하여 -80°C에 보관하였다. 각 실험구당 2마리씩 분석하였으며 데이터는 2마리의 평균값으로 나타내었다.

2) cDNA 분석

cDNA probe는 3시간 동안 6 µg의 random primer (Invitrogen, USA)와 amioally-dUTP가 결합한 RNA (50 µg)를 역전사시켜 준비하였다. cDNA probe는 YM-30 column (Millipore, USA)를 이용해 정제하여 상법에 따라 혼성화(hybridized)시켰다. 슬라이드의 혼성화 이미지 (hybridization image)는 Scanray lite (Packard Bioscience, USA)로 스캔하였다. 혼성화 이미지는 유전자 발현 비율 (각각의 실험온도에서 대조구에 대한 바이러스감염구의 비율)을 보

기 위해 GenePix Pro 3.0 software (Axon Instrument, USA)로 분석하였다.

3) 데이터 분석

유전자 발현 비율은 GenePix Pro 3.0 software에 의해 LOWESS (locally weighted regression and smoothing) 표준화(normalization) 하였다. 표준화한 값은 log2함수로 표현하였으며 대조구와 같은 발현을 보이는 것은 0, 대조구에 비하여 2배의 높은 발현량을 보이는 것은 1, 2배 낮은 발현량을 보이는 것은 -1로 나타내었다.

결 과

폐사율

수온 15°C에서는 공격실험 후 11일째부터 폐사가 발생하였고 실험 종료 시점인 20일째 까지 55%에 이르는 폐사율을 나타내었다. 수온 20°C에서는 20일 동안의 최종 누적 폐사율이 5%로 나타났고, 각 수온별 대조구들은 폐사가 전혀 일어나지 않았다 (Fig. 1).

바이러스 역가

사육 수온에 따른 넙치 체내 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 역가는 Table 1에 나타내었다. 15°C에서는 바이러스가 3일째에 5마리 중 3마리에서 분리되었고 ($10^{2.3}$ 과 $10^{3.3}$ TCID/g⁻¹), 10일째에는 5마리 중 4마리에서 분리되었으며 역가는 $10^{4.3}$ 과 $10^{5.3}$ TCID/g⁻¹ 가 각각 2마리씩이었다. 20°C에서는

Table 1. Titers of viral hemorrhagic septicemia virus from the kidney of experimentally infected olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at 15°C and 20°C.

		Virus titer (TCID/g ⁻¹ tissue)			
		15°C	20°C		
		3 day	10 day	3 day	10 day
-	-	-	-	-	-
-	-	-	$1.0 \times 10^{4.3}$	-	-
-	-	-	$1.0 \times 10^{4.3}$	-	-
$1.0 \times 10^{2.3}$	$1.0 \times 10^{3.3}$	$1.0 \times 10^{2.3}$	$1.0 \times 10^{5.3}$	-	-
$1.0 \times 10^{3.3}$	$1.0 \times 10^{3.3}$	$1.0 \times 10^{3.3}$	$1.0 \times 10^{5.3}$	-	-

-: under detection limit of $1.0 \times 10^{2.3}$

실험에 사용한 모든 넙치에서 바이러스가 분리되지 않았다.

RT-PCR

넙치 체내의 바이러스가 FHM 세포에서 배양되지 않은 샘플만을 감도가 더 좋은 nested-PCR로 바이러스의 유전자를 검출해 본 결과, 15°C의 3일째 3마리 중 2 마리에서 바이러스가 검출되었고, 15°C의 10일째에서 배양되지 않은 한 마리에서 바이러스가 검출되었다. 세포배양으로 바이러스가 검출되지 않았던 20°C 실험구에서는 3일째 5마리 중 2마리에서 PCR로 추가로 검출되었고 20°C 10일째 실험구에서는 5마리 모두에서 검출되지 않았다 (Fig. 2).

cDNA microarray 분석

309개의 면역 유전자가 부착된 cDNA chip을 활

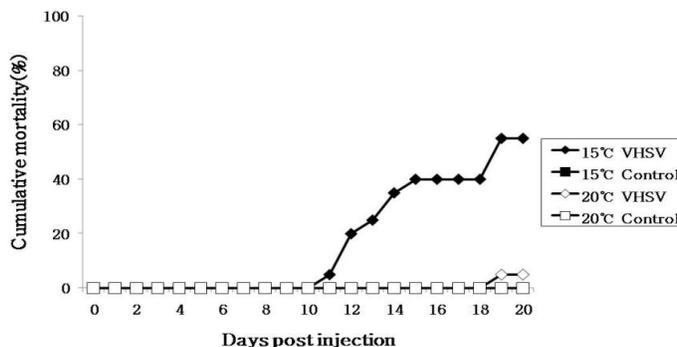


Fig. 1. Pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus to the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by intramuscularly injection with 10^5 TCID₅₀/fish at 15°C and 20°C.

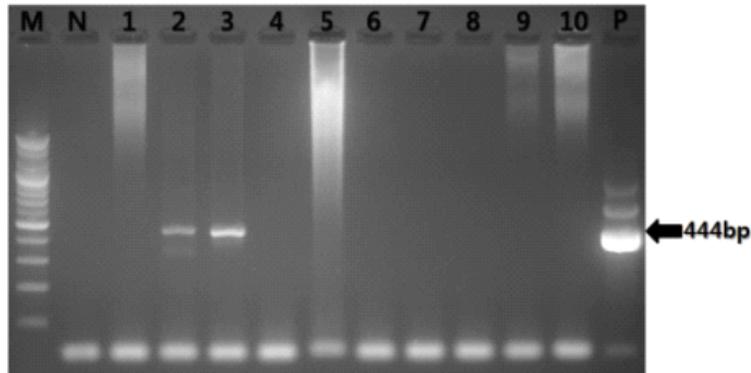


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products of viral hemorrhagic septicemia virus genome at 20°C. M, molecular weight marker; N, Negative; lane 1-5, 3 days of 20°C; lane 6-10, 10 days of 20°C; P, Positive.

용한 분석에서 15°C, 20°C의 감염 세포구에 공통으로 발현이 증가되는 유전자는 MHC class I, IL-8, myeloperoxidase 및 endonuclease G-like 유전자 등으로 모든 세포 표면에 존재하여 항원을 제시하거나 호중구 주화성을 자극하는 유전자들이었다 (Table 2). 항원 가공 및 제시에 관여하거나, 항체 생성 및 apoptosis의 기능을 가지는 MHC class II, immunoglobulin (Ig)과 retinoblastoma 등의 유전자가 15°C, 20°C 두 온도간에서 발현 차이가 났다. 15°C는 MHC class II 등의 유전자가 발현이 감소되었고 (Table 3), 세포 죽음을 유도하는 granzyme II 등의 유전자가 증가되었다 (Table 4). 이에 반해

20°C에서는 선천 면역에 관여하는 rhamnose-binding lectin STL2 등의 유전자가 발현 감소되었고, MHC class II, immunoglobulin 등 적응 면역에 관여하는 유전자들이 증가되었다 (Table. 5).

고 찰

바이러스성 출혈성 패혈증은 우리나라 양식장에서 해마다 수온이 15°C 이하인 저수온기에 나타나는 바이러스성 질병으로 낚치의 크기에 상관없이 발병하지만 치어기에 더 많은 폐사를 일으킨다 (Kim *et al.*, 2003). 본 연구는 저수온기에 대량 폐사

Table 2. Up-regulated gene (>1.0-fold) in the kidney of olive flounder infected by viral hemorrhagic septicemia virus at 15°C and 20°C.

Similar to	20°C			15°C		
	3d	10d	20d	3d	10d	20d
MHC class I a chain	0.9	1.1	0.1	0.8	0.2	1.5
MHC class I a chain	1.2	1.3	0.2	0.9	0.4	1.6
MHC class I a chain	1.2	1.1	0.2	0.8	0.4	1.4
Beta-2 microglobulin	1.4	0.8	0.0	1.1	0.4	1.2
Myeloperoxidase	2.6	1.6	0.1	2.1	1.6	1.8
Interleukine-8	0.2	1.9	-0.3	2.3	2.6	0.5
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor	1.7	0.5	0.0	1.6	0.7	0.5
Complement component C1q	0.2	1.0	-0.3	-0.3	-0.5	1.2
Spi-1/Pu.1 transcription factor	1.1	0.8	-0.1	0.3	0.3	1.1
Endonuclease G-like	2.1	0.8	0.1	1.4	1.1	1.3
Hemoglobin subunit beta-A	1.1	-0.7	0.5	0.0	-0.9	1.1
Proliferating cell nuclear antigen	1.8	0.7	-0.3	1.3	1.6	0.6
Putitive FK506-binding protein	1.9	1.3	-0.1	1.0	1.4	1.3

Table 3. Down-regulated gene (>1.0-fold) in the kidney of olive flounder infected by viral hemorrhagic septicemia virus at 15°C (shown with expressions in 20°C as reference)

Similar to	20°C			15°C		
	3d	10d	20d	3d	10d	20d
MHC class II α antigen	-0.8	1.0	0.3	-0.9	-0.9	0.6
MHC class II β antigen	-0.8	0.7	0.4	-1.1	-0.9	0.3
MHC class II invariant chain-like protein 2	-0.9	0.3	-0.1	-1.2	-1.5	0.3
Immunoglobulin light chain T2b constant region	-0.3	1.6	0.3	-1.5	-1.4	-0.1
Immunoglobulin light chain VJC region	-0.1	1.7	0.3	-1.8	-1.4	0.0
Immunoglobulin light chain	-0.1	0.2	0.4	-0.3	-1.3	0.5
Gelatinase	-0.6	0.1	-0.6	-2.4	-2.1	-1.6
Gelatinase	-0.5	-0.1	-0.6	-1.4	-1.4	-1.4
Collagenase	-0.4	0.5	-0.4	-2.1	-1.0	-1.4
Matrix metalloproteinase 9	-0.7	0.1	-0.6	-2.4	-2.3	-1.6
Serine protease	1.1	-0.1	-0.1	-1.0	-0.3	0.3
Nephrosin	1.2	0.0	0.4	-2.9	-0.7	0.3
Complement factor D	-0.3	0.6	-0.4	-1.1	-0.9	-0.3
Retinoblastoma	1.3	-0.1	0.5	-1.8	-0.7	0.2

Table 4. Up-regulated gene (>1.0-fold) in the kidney of olive flounder infected by viral hemorrhagic septicemia virus at 15°C (shown with expressions in 20°C as reference).

Similar to	20°C			15°C		
	3d	10d	20d	3d	10d	20d
Granzyme II	0.7	0.2	-0.1	1.5	1.4	0.7
Rab40c, member RAS oncogene family isoform 1	1.5	0.9	0.0	1.1	0.6	1.2
SAM-domain protein	0.3	0.4	-0.1	1.1	0.6	0.7
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa	0.8	0.7	0.2	1.3	0.9	1.0

Table 5. Up-regulated gene (>1.0-fold) in the kidney of olive flounder infected by VHS at 20°C (shown with expressions in 15 as reference)

Similar to	20°C			15°C		
	3d	10d	20d	3d	10d	20d
MHC class II α antigen	-0.8	1.0	0.3	-0.9	-0.9	0.6
Immunoglobulin D	0.5	1.4	0.7	-0.8	-0.8	0.5
Immunoglobulin M	0.4	1.3	0.7	-0.8	-0.8	0.6
Immunoglobulin M precursor	0.4	1.5	0.3	-0.7	-0.5	0.4
Immunoglobulin light chain T2b constant region	-0.3	1.6	0.3	-1.5	-1.4	-0.1
Immunoglobulin light chain VJC region	-0.1	1.7	0.3	-1.8	-1.4	0.0
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	0.6	1.0	0.0	-0.1	-0.2	0.8
Nephrosin	1.2	0.0	0.4	-2.9	-0.7	0.3
Serine protease	1.1	-0.1	-0.1	-1.0	-0.3	0.3
Retinoblastoma	1.3	-0.1	0.5	-1.8	-1.0	0.2
Progranulin	0.8	1.2	0.3	0.7	0.1	0.3
Thymosin beta-4	1.3	0.8	0.4	0.0	0.2	0.9

를 일으키는 바이러스성 출혈성 패혈증을 수온과 관련하여 넙치의 면역 유전자 발현 profile과 면역 반응 범위를 조사하였으며, 특히 저수온기에 폐사가 나타나는 원인을 면역 유전자 발현과 관련시켜 그 원인과 병리기전, 예방을 위한 가능성을 찾아보고자 하였다.

넙치에 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스를 마리당 10^5 TCID₅₀로 감염시켰을 때 15°C의 수온에서는 20일 동안의 누적 폐사율이 55%였으며, 20°C에서는 5%의 폐사율이 나타났다. 감염 후 3일과 10일에 바이러스 분리와 PCR에 의해 15°C에서는 VHSV의 증식이 어체내에서 잘 이루어지며 20°C의 온도에서는 감염 초기에 어체내에 VHSV가 존재하지만 시간이 경과함에 따라 체내에서 제거되는 것을 확인하였다. 그리고 20°C의 폐사어 1마리에서 바이러스 분리를 시도해 본 결과 VHSV가 분리되지 않아 20°C의 폐사는 VHS에 의한 폐사아아임을 확인하였다.

cDNA microarray는 Northern blotting이나 Southern blotting을 대규모로 병렬하는 방법으로, 다른 생리학적인 조건하에서 유전자 발현의 변화를 탐지하는데 유용한 도구이며 유전자 발현 형태 확인, 유전자 기능 예측, 돌연변이 또는 다형성 진단 및 질병 관련 유전자 발굴 등의 연구 목적에 사용되고 있고, 최근에는 어류 병원체 연구에도 적용되었다 (Byon *et al.*, 2005; Dang *et al.*, 2007). 본 연구에서는 넙치의 유전자가 올려진 cDNA chip을 이용하여 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 감염된 넙치에서의 면역관련 유전자들의 발현을 시간경과별로 분석함으로써 15°C에서는 높은 폐사율을 보지만 20°C에서는 전혀 폐사하지 않는 현상에 관여하는 넙치 면역관련 유전자군의 후보를 찾아내고자 하였다.

바이러스에 대한 자연 면역 반응은 감염된 세포로부터 interferon (IFN) α 와 β 를 생산하여 바이러스의 증식을 억제하거나 natural killer (NK) 세포에 의해 감염 세포를 제거한다. 또한 항원-항체 복합체의 phagocytosis에 의해 바이러스를 제거하며, 세포 매개 면역 반응으로 cytotoxic cell과 NK 세포가 감염 세포를 제거한다 (Hwang *et al.*, 2004). 감염 후 시간이 경과되어 항체가 생성되면 바이러스 감

염을 중화시키거나 바이러스의 숙주내 활성을 방해한다. 15°C와 20°C에서 공통으로 발현된 유전자들은 interleukine-8, myeloperoxidase, beta-2 microglobulin 및 spi-1/pu.1 transcription factor를 포함한 유전자들로 15°C와 20°C의 두 온도에서는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염에 대항하는 항원 제시나 호중구 자극 등 선천 면역에 의한 반응이 제대로 이루어진 것을 확인하였다. β -2 microglobulin은 세포 표면에 존재하는 MHC class I에 의해 항원 제시 및 면역 반응을 유도하는 것으로 알려져 있으며, IL-8은 탐식작용 기능을 갖는 호중구의 주화성을 자극하는 것으로 보고되어져 있다. IL-8의 발현 증가는 감염에 대한 방어 반응으로 호중구를 유도하며, 이어서 lysozyme의 발현이 증가되는 것으로 생각된다. Myeloperoxidase는 hypochlorous acid (HOCl)를 생산하며 산화제로 과산화수소를 사용하여 tyrosyl radical에 대해 tyrosine을 산화한다. Hypochlorous acid와 tyrosyl radical은 세포 독성물질로써 호중구에 의해 세균과 다른 병원체를 죽이는데 이용된다 (Heinecke *et al.*, 1993). 다른 관점으로 보면, 과도하게 활성화된 호중구는 superoxide를 방출하기 때문에 그 결과로 세포손상의 원인이 된다. 20°C에 반해 15°C에서 VHS의 감염된 넙치의 신장은 지나치게 유도된 IL-8와 myeloperoxidase에 의해 세포 손상이 초래될 수도 있을 것이다.

Spi-1/Pu.1 transcription factor는 조혈 작용의 조절에 중요하며, B세포와 macrophage에서 발현된다고 보고되었다. 또한 B세포와 T세포, macrophage 및 호중구의 성숙을 돕는다. 이 유전자는 두 온도에서 모두 발현이 증가되었으나, 20°C에서는 감염 초기에, 15°C에서는 감염 후기에 증가하였다. 본 결과를 통해 20°C에서는 VHS에 대해 macrophage와 B세포가 발현되어 항원 제시, 항체 생산 그리고 식작용이 이루어져 감염 초기에 선천 및 적응 면역 반응이 유도되지만, 15°C에서는 유전자의 발현이 감염 후기에 일어남으로써 VHS에 대한 면역 반응이 지연되거나 억제되는 것 같다.

15°C에서 감소된 유전자들은 MHC class II α , β antigen, immunoglobulin light chain 2TB 및 serine protease를 포함한 면역 시스템 관련 유전자들이다.

포유류에서, major histocompatibility complex (MHC) class II α , β antigen 등 MHC class II 분자는 면역 시스템 내에서 전문화된 세포, 특히 macrophage와 dendritic cell과 같은 항원 제시 세포의 표면에서만 존재한다 (Levine *et al.*, 1991). 15°C에서 VHS의 감염이 넙치 신장에 존재하는 MHC class II 유전자 발현을 억제시켜 면역 반응을 지연시켰거나, 혹은 저수온 조건에서 상대적으로 낮은 대사로 항원제시세포의 활성화도 낮아졌을 가능성이 생각되었다. 수온의 차이에 의한 항원제시세포의 활성화에 대한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

Serine protease는 면역 시스템에서 생물학적인 기능은 염증, 조직의 재형성, 혈소판과 chemokine의 활성화이다 (Scheriber *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2003). 세포 관련 살해는 바이러스성 질병의 통제에서 특히, 방어 기작에 중요하다고 알려져 있으며, serine protease는 어류에서 세포 면역에 관련된 분자로 알려져 있다 (Hwang *et al.*, 2004; Praveen *et al.*, 2004). Nephrosin은 astacin과의 endopeptidase로써 아가미, 신장, 두신 및 비장에 주로 존재한다. 어류에 있어서 nephrosin은 면역과 조혈 형성 그리고 extracellular matrix의 재형성 기능을 가지고 있다 (Hung *et al.*, 1997). 15°C에서 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스의 감염에 의한 유전자의 발현 감소는 세포성 면역을 포함한 면역 시스템의 기능 저하를 초래하는 것으로 사료된다. Retinoblastoma 유전자는 종양 억제 유전자의 특성을 가졌고 (Friend *et al.*, 1986), apoptosis를 조절하는 중요한 역할을 하며 (Hass-Kogan *et al.*, 1995), 15°C에서는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스의 감염에 의한 세포 자살 신호의 억제로 인해 apoptosis가 이루어지지 않아 세포간에 VHS의 전염이 형성되는 것으로 생각된다. Gellatinase, collagense와 matrix metalloproteinase등의 효소는 단백질분해효소들로 세포의 증식, 분화, 숙주방어와 apoptosis에 관여하는 것으로 알려져 있다. Apoptosis는 정상적인 발달과 조직 항상성을 위해 필요한 생리학적 과정이다. Apoptosis의 조절 곤란은 신경 변성, 자가 면역 및 암을 포함하여 질병에 걸리는 조건에서 발달과 결과에 영향을 미칠 수 있다 (Thompson, 1995). Granzyme은 특정 바이러스의 감염 또는 형질 표적

세포가 제거를 위해 표지되었을 때 exocytosis중 과립을 방출하는 cytotoxic T lymphocyte와 natural killer cell의 cytotoxic 과립을 저장한 세포 죽음 유도 효소이다. Granzyme은 선천 및 획득 면역 killer cell의 cytotoxic 과립을 포함한 serine proteases로, 바이러스와 종양 세포 제거를 위해 세포 죽음을 유도하는 기능을 가진다. 또한 granzyme은 활성화된 lymphocyte의 생존 통제에 의해 면역 조절과 세포의 기질의 작용에 의해 염증 조절을 하는 중요한 역할을 한다 (Dipanjan and Lieberman 2008). Apoptosis에 관여하는 인자 중 granzyme은 15°C에서 높은 발현을 보였으나 gellatinase, collagense와 matrix metalloproteinase등의 효소는 15°C 감염어에서 3일, 10일, 20일 모든 시간대에서 바이러스에 감염되지 않은 개체에 비하여 현저히 낮은 발현을 보여 15°C에서의 바이러스에 의한 폐사와 강한 연관성이 있다고 보여진다.

20°C에서는 15°C와 달리 MHC class II α , β antigen, retinoblastoma, nephrosin을 포함한 thymosin- β 4 및 progranulin 등의 유전자들이 발현되었다. Thymosin- β 4는 apoptosis 세포의 탐식작용 및 염증 조절의 중요한 역할을 하며 progranulin은 많은 종양의 진행에 있어서 발달과 상처 치유에 관련된 상피 조직 성장 인자로, macrophage의 증식과 분화에 관여한다 (Hanington *et al.*, 2006). 20°C에서 유도된 thymosin- β 4과 progranulin은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 의한 상처 치유, 탐식작용과 염증 조절을 하는 것으로 사료된다.

바이러스 감염에 따른 숙주 반응으로써 감염 3일 후에는 선천 면역반응이 유도되며, 10일에는 적응 면역 반응이, 그리고 20일에는 면역 반응이 정상으로 회복 되는 것으로 보고되었다 (Roitt *et al.*, 1998). 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스의 감염 경과일에 따른 유전자 발현 패턴을 분석해 본 결과 MHC class II α , β antigen은 15°C의 3일과 10일에서 감소되어 감염 후기인 20일에는 정상 범위로 회복되었다. 이러한 결과는 세포 표면에 MHC class II 분자가 존재하여 항원 가공 및 제시에 관여하는 macrophage가 감염 초기에 VHS에 감염되는 것을 의미하며 또한 macrophage의 항원 제시 실패로 항체 생산에 관여하는 Ig 분자들이 감염

초기와 중반에 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 이에 반해 20°C에서는 MHC class II가 초기에 감소되었지만, 시간이 지남에 따라 증가되어 항원 제시 등의 면역 반응이 이루어졌고, 또한 항체 생성이 제대로 형성되는 시점인 10일에는 Ig 관련 분자들이 증가되어 VHS를 중화시키거나 숙주내 활성을 방해하며, 항원-항체 복합체의 phagocytosis 반응으로 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스를 제거하는 것으로 사료된다.

본 연구는 cDNA microarray를 사용하여 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 감염된 넙치 신장의 Transcriptome 반응을 설명하였다. 15°C와 20°C에서 VHS에 의해 선천 면역 반응인 MHC class I에 의한 항원 제시와 염증 반응에 의한 호중구 활성이 모두 이루어졌다. 하지만, 15°C에서는 macrophage에 의한 항원 가공 및 제시 실패, 그리고 VHS에 대한 B세포의 항체 생산 등이 지연되었다. VHS가 면역을 피하는 기전으로 macrophage내에서 증식을 이루며 특히, macrophage는 VHS의 초기 증식을 지원한다고 보고된 바도 있고(Brudeseth *et al.*, 2002), 또한 macrophage의 성장과 활성 등 백혈구 발달에 관여하는 유전자인 *spi-1/pu.1* transcription factor의 발현이 감염 후기에 증가됨으로써 macrophage에 의한 적응 면역의 유도가 감염 초기에 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다. 20°C에서는 macrophage에 의한 항원 가공 및 제시, 그리고 항체 생산 등 정상적인 숙주 반응으로서 선천 및 적응 면역반응이 유도되었고, 상처 치유에 관여하는 몇몇 면역 유전자의 발현으로 인해 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 효과적으로 대응하여 폐사가 발생하지 않는 것으로 사료된다.

요 약

저수온기만 넙치에 대량 폐사를 일으키는 바이러스성 출혈성 패혈증을 폐사가 발생하는 15°C, 폐사가 발생하지 않는 20°C에서 인공감염시켜 넙치의 면역 유전자 발현 profile을 cDNA microarray 분석하였으며, 특히 저수온기에 폐사가 나타나는 원인을 면역 유전자 발현과 관련시켜 알아보려고 하였다. 15°C, 20°C의 감염 세포구에 공통으로 발현

되는 유전자는 MHC class I, IL-8, myeloperoxidase 및 endonuclease G-like 유전자로 모든 세포 표면에 존재하여 항원을 제시하거나 호중구 주화성을 자극하는 유전자들이었다. 항원 가공 및 제시, 항체 생성에 관여하는 MHC class II, immunoglobulin (Ig)과 retinoblastoma 등의 유전자는 20°C에서는 발현이 증가하였으나 15°C에서는 발현이 감소되었다. 이로부터 폐사가 발생하지 않는 20°C는 바이러스 감염초기의 항원 제시, MHC class I과 II에 의한 항원제시, apoptosis 및 이후의 항체 생산이 정상적으로 이루어져 폐사가 발생하지 않는 것으로 생각되었다. 그러나 폐사가 발생하는 15°C에서는 MHC class I 매개의 항원 제시와 탐식 작용 등의 선천 면역은 이루어지나 macrophage에 의한 MHC class II 매개의 항원 제시와 apoptosis저하, 항체 생산 관련 유전자의 발현저하가 관찰되어 초기 macrophage에 의한 항원제시의 실패로 적응 면역이 제대로 활성화되지 않아 폐사가 발생한 것으로 사료된다.

References

- Avunje, S., Kim, W.S., Park, C.S., Oh, M.J., and Jung, S.J.: Toll-like receptors and interferon associated immune factors in viral haemorrhagic septicaemia virus-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 31: 407-414, 2011.
- Avunje, S., Kim, W.S., Oh, M.J., Choi, I. and Jung, S.J.: Temperature-dependent viral replication and antiviral apoptotic response in viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 1162-1170, 2012.
- Avunje, S., Oh, M.J. and Jung, S.J.: Impaired TLR2 and TLR7 response in olive flounder infected with viral haemorrhagic septicaemia virus at host susceptible 15°C but high at non-susceptible 20°C. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 1236-1243, 2013.
- Brudeseth, B.E., Castric, J. and Evensen, Ø.: Studies on pathogenesis following single and double infection with viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Pathol* 39: 180-189, 2002.

- Byon, J.Y., Ohira, T., Hirono, I. and Aoki, T.: Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 18: 135-147, 2005.
- Dang, T.L., Yasuike, M., Hirono, I., Kondo, H. and Aoki, T.: Transcriptional profile of red seabream iridovirus in a fish model as revealed by viral DNA microarrays. *Virus Genes*, 35: 449-461, 2007.
- Dipanjan, C. and Lieberman J.: Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.*, 26: 389-420, 2008.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogeij, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Alberts, D. M. and Dryja R.P.: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323: 643-646, 1986.
- Hanington, P.C., Barreda, D.R. and Belosevic M.A.: novel hematopoietic granulins induces proliferation of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *J Biol Chem.*, 281: 9963-9970, 2006.
- Hass-Kogan, D.A., Kogan, S. C., Levi, D., Dazin, P., Ang, A.T., Fung, Y.K. and Israel, M.A.: Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *J EMBO.*, 14: 461-472, 1995.
- Heinecke, J.W., Li, W., Daenke H.L. 3rd and Goldstein J.A.: Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophage. *J Biol Chem.*, 268: 4069-4077, 1993.
- Hung, C.H., Huang, H.R., Huang, C.J., Huang, F.L. and Chang G.D.: Purification and cloning of carp nephrin, a secreted zinc endopeptidase of the astacin family. *J Biol Chem.*, 272: 13772-13778, 1997.
- Hwang, E.S., Park C.G. and Cha C.Y.: Immune responses to viral infection. *Immune Network*, 4: 73-80, 2004.
- Isshiki, I., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. and Miyazaki T.: An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Org.*, 47: 87-99, 2001.
- Kim, S.M., Lee, J.I., Hong, M.J., Park, H.S. and Park S.I.: Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J Fish Pathol.*, 16: 1-12, 2003.
- Levine, T.P. and Chain, B.M.: The cell biology of antigen processing. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 26: 439-473, 1991.
- Miller, T.A., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R.W. and Enzmann, P.J. Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis Aquat Org.*, 34: 13-20, 1998.
- Mortensen, H.F., Heuer, O.E., Lorenzen, N., Otte, L. and Olesen, N.J.: Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.*, 63: 95-106, 1999.
- Praveen, K., Evans, D.L. and Jaso-Friedmann L.: Evidence for the existence of granzyme-like serine proteinases in teleost cytotoxic cell. *J Mol Evol.*, 58: 449-459, 2004.
- Roitt, I.M, Brostoff, J. and Male D.K. *Immunology*. London, Mosby., 225. 1998
- Sano, M., Ito, T., Matsuyama, T., Nakayasu, C. and Kurita J.: Effect of water temperature shifting on mortality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* experimentally infected with viral hemorrhagic septicemia virus. *Aquaculture*, 286: 254-258, 2009.
- Schreiber, A., Luft, F.C. and Kettritz R.: Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int.*, 65: 2172-2183, 2004.
- Smail, D.A. Viral haemorrhagic septicaemia. In: *Fish disease and disorders*, vol. 3, Viral, bacterial and fungal infections. P.T.K. Woo, D.W. Bruno (ed), CABI Publishing, New York, 123-147, 1999.
- Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto M. and Muroga K. Isolation of viral haemorrhagic septicemia (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.*, 20: 186-193, 2000.
- Thompson, C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462, 1995.
- Uehara, A., Muramoto, K. Takada, H. and Sugawara, S.: Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol.*, 70: 5690-5696, 2003.

Manuscript Received : August 06, 2013

Revised : October 11, 2013

Accepted : April 07, 2014