

## 조피볼락(*Sebastes schlegelii*) Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8)의 분자유전학적 특성 및 발현 분석

양혜림 · 권혁재 · 이성도 · S.D.N.K Bathige · 김명진\* · 이제희\*

제주대학교 해양생명과학과

### Molecular Characterization and Expression Analysis of Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) in the Black Rockfish *Sebastes schlegelii*

Hyerim Yang, Hyukjae Kwon, Seongdo Lee, S.D.N.K Bathige, Myoung-Jin Kim\*, and Jehhee Lee\*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Interferon regulatory factor 8 (IRF8) is essential for the development of B and T cells, as well as for the activity of dendritic cells and macrophages. We performed molecular characterization of *IRF8* from rock fish, *Sebastes schlegelii* (*Ss*), and investigated the spatial and temporal profile of mRNA expression after challenge with lipopolysaccharide (LPS), polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C), or *Streptococcus iniae*. The full-length cDNA sequence of *SsIRF8* was 1,657 bp, containing an ORF of 1,266 bp. The gene had a predicted molecular mass of 47.7 kDa and an isoelectric point of 5.99. The amino acid sequence coded by this gene showed the highest degree of identity (90.8%) and similarity (96.2%) with IRF8 from *Oplegnathus fasciatus*. The *SsIRF8* mRNA was expressed ubiquitously, at varying levels, with the highest level of expression observed in the spleen. To confirm the role of *SsIRF8* in mediating the immune response, we measured *SsIRF8* mRNA expression in the splenic tissue at different time points after injection with LPS, poly I:C, or *S. iniae*. The qRT-PCR results showed that *SsIRF8* mRNA expression in the poly I:C-injected group was highly upregulated 6 hr after exposure ( $P < 0.05$ ). Expression of *SsIRF8* mRNA in the *S. iniae*-injected group peaked at 24 hr. These results suggest that *SsIRF8* might be important in regulating the strength of the rockfish immune response to immunostimulatory agents.

Key words: Black rockfish, IRF8, Immune regulator, mRNA expression

## 서론

Interferon regulatory factor (IRF) family는 바이러스에 대한 방어, 병원체에 대한 초기 면역반응, 세포의 성장과 세포자멸, 림프구의 발달 등 의 역할을 하며(Barnes et al., 2002), 현재 까지 척추동물에서는 11개의 IRF family가 보고되어 있다(Huang et al., 2010). IRF에 의해 인터페론(interferon, IFN)과 interferon stimulated genes (ISGs)의 전사가 조절된다고 알려져 있으며(Nguyen et al., 1997), 인터페론은 사이토카인 중 하나로 척추동물의 생체 내에서 항 바이러스 반응, 면역조절 기능, 세포의 성장과 분화, 세포자살 등과 같은 중요한 기능을 하고 있다(Pfeffer et al., 1998). 그리고 구조와 기능에 따라 Type I 과 Type II IFN으로 나뉘며(Inkpen et al., 2015), 바이러스에

감염되었을 때 Type I IFNs (IFN $\alpha$  와 IFN $\beta$ )이 생성되어 Type I IFNs이 세포의 특이적 수용체와 결합하여 하위 유전자의 전사를 유도한다(Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2001; Taylor et al., 2007). IRF family는 특징적으로 N-말단 ~120 amino acid에서 5개의 tryptophan (Trp) 잔기가 포함된 helix-turn-helix motif구조의 DNA binding domain (DBD)을 가지고 있다(Nguyen et al., 1997). IRF의 DBD은 consensus DNA sequence인 IFN-stimulated response element (ISRE)의 GAAA, AANNNGAA서열을 특이적으로 인식하여 ISRE를 프로모터에 갖는 면역관련 유전자의 전사를 조절하게 된다(Honda and Taniguchi, 2006; Paun and Pitha, 2007). IRF-associated domain (IAD)는 IRF family에서 C-말단에 존재하며 IRF3-10는 IAD1를 가지며, IRF1과 IRF2는 IAD2가 존재한다(Mamane

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0302>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(3) 302-310, June 2017

Received 1 June 2017; Revised 22 June 2017; Accepted 23 June 2017

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3473 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: jehee@jejunu.ac.kr (J. Lee), mj.kim.lucky@gmail.com (M-J. Kim)

et al., 1999). IAD는 정확한 프로모터 타겟팅과 전사 조절을 하기 위해 다른 IRFs와 다른 전사인자 함께 homodimer 또는 heterodimer의 형태를 매개한다(Eroshkin and Mushegian, 1999; Ozato et al., 2007). 또한 IRF family안에서 N-말단 DBD서열과 C-말단 IAD서열의 보존을 비교 하였을 때 DBD보다 IAD가 상대적으로 낮게 나타난다(Nehyba et al., 2002). 이는 IAD서열에 따라 IRF family의 기능이 특이적으로 나타나게 되는데, 이를 통하여 유전자 전사를 활성화시키는 그룹(IRF1, IRF3, IRF7, IRF9), 억제하는 그룹(IRF2, IRF8), 표적 유전자에 따라 유전자의 전사가 활성화되거나 억제되는 그룹(IRF2, IRF4, IRF5, IRF8)으로 나뉜다(Stellacci et al., 2004).

IRF1, IRF2은 거의 대부분의 세포에서 발현하는 반면, 이전 연구에 따르면 IRF8의 경우에는 myeloid 또는 lymphoid cell와 같은 면역시스템과 관련한 세포에서 발현한다고 알려져 있다(Wang and Morse, 2009; Marecki et al., 2015). 포유류의 경우, IRF8은 IRF4과 같이 hematopoietic cell의 성장을 결정하는데 중요한 역할을 하며, 이는 myeloid progenitor cell에서 분화뿐만 아니라 B세포와 T세포의 발달의 필수적이며(Lu, 2008), dendritic cells (DCs)와 plasmacytoid dendritic cells (pDCs)에서 대식세포의 발달과 type I IFNs의 생산을 위해 필요하다고 알려져 있다(Alter-Koltunoff et al., 2008). IRF8은 표적 유전자에 존재하는 Ets-IRFE motif와 같은 복합적 자리에 결합할 때는 전사를 촉진하는 역할을 하지만 ISRE motif에 결합할 때 전사 과정을 억제하는 중요한 역할을 한다(Lee et al., 2006). 특히 포유류에서의 IRF8는 LPS-TLR4와 polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)-TLR3의 결합에 대하여 Toll-like receptor와 IFN- $\gamma$  signaling pathways의 상호작용을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있으며(Zhao et al., 2006), 또한 poly I:C-activated signaling pathways에 있어서 plasmacytoid DCs (pDCs)에서 IFN 생산을 증대하거나 DCs subtype으로 발달시킬 때 IRF8은 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Gabriele and Ozato, 2007; Taylor et al., 2007).

현재까지 어류의 IRF8은 rainbow trout (Holland et al., 2010), turbot (Chen et al., 2012), rock bream (Bathige et al., 2012), Japanese flounder (Hu et al., 2013), tongue sole (Zhang et al., 2015), atlantic cod (Inkpen et al., 2015) 등에서 유전자의 특징이 보고되었다. 본 연구에서는 *in silico* 분석을 통하여 조피볼락, IRF8의 분자적 특성을 확인하였으며, 면역반응에서의 역할을 규명하기 위하여 LPS, poly I:C, *Streptococcus iniae* 등의 면역자극을 준 후 유전자의 발현양상을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### Rockfish의 IRF8 cDNA sequence 분석

454 GS FLX sequencing (Roche 454 Life science, USA)을 이용하여 조피볼락 cDNA sequence database를 구축하였다.

DNAassist 2.2 software를 이용하여 아미노산으로 번역되는 부분인 open reading frame (ORF)을 예측하였다. 또한 아미노산 서열을 이용하여 단백질이 가지는 물리화학적 특징을 알아보기 위해 Expert Protein Analysis System ProtParam tool (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Swiss) (<http://web.expasy.org/protparam>)을 이용하여 각 분자량과 등전점을 추정하였다. 이후, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm을 이용하여 *SsIRF8*의 전체 서열과 이미 밝혀진 IRF family member와 서열을 비교 분석하였다. IRF family에서 보존되는 domain과 motif를 알아보기 위해 proteins, motif scan Pfam hidden Markov models (Local models) (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Swiss) (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>)를 이용하여 아미노산 서열을 분석하였으며 다른 종에서 기원한 IRF8과 조피볼락에서 기원한 IRF8의 homolog를 비교하기 위해 Matgat software와 ClustalW2 server (EMBL-EBI, UK) (<http://www.Ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>)를 이용하여 pairwise sequence alignment와 multiple sequence alignment strategies를 수행하였다. 계통 분류 분석은 Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 7.0을 이용하여 neighbor-joining (NJ) 방법을 통해 1,000 bootstrap으로 분석하였다.

### 시험어 준비 및 조직 분리

조피볼락(200 ± 20g)은 수온 22 ± 1°C로 설정한 400 L 수조에서 일주일 동안 순치한 뒤 실험을 진행하였다. 여러 조직에서의 *SsIRF8*의 발현분포를 확인하기 위해 다섯 마리의 건강한 조피볼락을 무작위로 선별하여 샘플링을 진행하였다. 건강한 어체로부터 gill, heart, head kidney, spleen, liver, intestine, kidney, testis, ovary 총 9개의 조직을 분리하였으며 분리한 조직은 액체질소에 급속 냉각한 뒤 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다. 혈액샘플의 경우, 꼬리부분의 정맥으로부터 혈액을 채취하였으며 0.2% heparin sodium salt (USB, USA)으로 코팅한 주사기를 사용하였다(-1 mL/fish). 혈액 샘플은 즉시 원심분리(4°C, 3,000 g, 10 분) 후 혈장으로 부터 peripheral blood cells (PBCs)를 분리하여 -80°C에 보관하였다.

### 공격실험을 통한 면역자극 비교 및 조직 분리

바이러스, 박테리아의 병원체 자극에 대한 *SsIRF8*의 면역반응을 확인하기 위해 200  $\mu$ L의 1 × phosphate buffered saline (PBS)에 녹인 lipopolysaccharide (LPS; 1.25  $\mu$ g/ $\mu$ L)와 200  $\mu$ L의 1 × PBS에 녹인 polyinosinic: polycytidylic acid (poly I:C; 1.5  $\mu$ g/ $\mu$ L, Sigma, USA), 200  $\mu$ L 1 × PBS에 녹인 *Streptococcus iniae* (1 × 10<sup>5</sup> colony-forming units/ $\mu$ L)를 세 개의 그룹으로 분리하여 각각 복강 주사하였다. 대조군으로는 200  $\mu$ L의 1 × PBS를 복강 주사하였고 접종 후 3, 6, 12, 24, 48, 72시간마다 각 그룹별로 5마리의 조피볼락에서 비장을 분리하여 RNA 추출 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

건강한 다섯 마리 조피볼락에서 얻은 조직과 공격실험에서 얻은 조직을 각 그룹마다 모아 제조사의 방법에 따라 QIAzol® (Qiagen)을 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA purity는 1.5% agarose gel에 전기영동으로 확인하였으며, 260 nm에서 µDrop™ Plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 측정하여 확인하였다. cDNA는 분리한 RNA 2.5 µg과 reaction mixture을 총 볼륨 20 µL로 맞추어 PrimeScript™ first-strand cDNA synthesis kit (TaKaRa, Shiga, Japan)이용하여 합성하였다. 이후, 합성한 cDNA는 nuclease-free water에 40배로 희석하여 qPCR assay를 수행하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

qPCR에 의한 발현분석

채취한 조직으로부터 quantitative real-time PCR (qPCR)을 수행하여 조피볼락 *IRF8*의 mRNA 발현량을 비교하고자 하였다. Reference gene으로는 elongation factor 1-α (EF1α)를 사용하였고 forward (5'-AACCTGACCACTGAGGTGAAGTCTG-3'), Reverse (5'-TCCTTGACGGACACGTTCTTGATGTT-3')의 oligonucleotide primer를 사용하였다. 그리고 *SsIRF8*의 oligonucleotide primer는 forward (5'-CATCAATGCTTTCCCTCCGCATCAAG-3'), reverse (5'-TGTGCATCAGCTTTCCCTCCGTAGT-3')로 사용하였다. qPCR는 Real Time System TP800 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa)를 이용하여 진행하였다.

<p><b>5'-UTR(67)</b> AAGAGCTCAACCGCTTATCACACTGCACAAGGAAACAATCCCCAAAACGCCCTTCTCTTCAATTAAG</p>	
<p>ATG TCA AAC ACT GGA GGT CGG AGA CTG AAG CAG TGG CTG GTG GAG CAG ATC CAG AGT GGC CAG TAC TCT GGA M S N T G G R R L K Q <b>W</b> L V E Q I Q S G Q Y S G</p>	<p>CTG CAG TGG GAG GAT GAC AGC CGC ACT ATG TTC AGA ATC CCA TGG AAA CAC GCA GGC AAA CAA GAC TAC AAC L Q <b>W</b> E D D S R T M F R I P <b>W</b> K H A G K Q D Y N</p>
<p>CAA GAA GTA GAC GCA TCC ATT TTC AAG GCC TGG GCT GTG TTT AAA GGC AAG TTT AAG GAG GGG GAG AAG GCT Q E V D A S I F K A <b>W</b> A V F K G K F K E G E K A</p>	<p>GAG CCT GCC ACC TGG AAG ACC AGA CTC CGC TGT GCC CTG AAT AAA AGC CCT GAC TTT GAG GAG GTG ACT GAA E P A T <b>W</b> K T R L R C A L N K S P D F E E V T E</p>
<p>AGG TCG CAG CTG GAC ATC TCT GAG CCC TAT AAA GTC TAC CGC ATT GTA CCT GAG GAA GAG CAG AAA AAC GGC R S Q L D I S E P Y K V Y R I V P E E E Q K N G</p>	<p>AAA GGC GCA TTG ATG GCC ATG GCA GCC ACC ACC AGC TCC GGT GAT ATC AAT GAC ATG GAC TGC AGC CCT GCA K G A L M A M A A T T S S G D I N D M D C S P A</p>
<p>GAG ATA GAG GAG CTC ATC AAA GAG GAG GAA GGC TGT AGT ATC CAG ACC AGT CCA GAG TAT TGG TCC CAT GGC E I E E L I K E E E G C S I Q T S P E Y W S H G</p>	<p>AGC ATC AAT GCT TTC CCT CCG CAT CAA GAC CCT TTG CCA TCA GGC AAT CTC AGC ACA GCT TTC TCC CAG ATG S I N A F P H Q D P L P S G N L S T A <b>F S Q M</b></p>
<p><b>ATG ATC AGT TTC TAC TAC GGA GGA AAG CTG ATG CAC AAC ACA CAT GTT GTT CAT CCT GAA GGC TGC CGA ATC M I S F Y Y G G K I M H N T H V V H P E G C R I</b></p>	<p>GCC CCA CAA CAG CAC CTG GGC CGT GGC GCC CTA TAC AAT TCA GAC AGC ATG CAG AGT GTT CAC TTT CCT CCC <b>A P Q Q H L G R G A L Y N S D S M Q S V H F P P</b></p>
<p>GCT GAG CAC ATC GAG TAC GAC CGC CAG CGC CAT GTC ACA CGC AAG CTC CTG GGA CAC CTG GAG AGA GGT GTA <b>A E H I E Y D R Q R H V T R K L L G H L E R G V</b></p>	<p>CTG GTC CGT GCC AAC CAA GAG GGC ATC TTC ATC AAA AGG CTG TGC CAG AGC CGT GTC TTC TGG AGC GGG TTG <b>L V R A N Q E G I F I K R L C Q S R V F W S G L</b></p>
<p>GGA GAA GTG GGC TCA CAA TAT GGC TCC ATG CCT TGT AAA CTT GAG AGG GAT GCT GTA GTC AAG ATT TTT GAC <b>G E V G S Q Y G S M P C K L E R D A V V K I F D</b></p>	<p>ACA GGA AAG TTT CTT CAA GCT CTC CAG CTG TAC CAG GAG GGT CAG TTT CCA GCT CCT GAT CCG ACA GTG ACT <b>T G K F L Q A L Q L Y Q E G Q F P A P D P T V T</b></p>
<p>CTG TGT TTC GGA GAG GAG CTC CAT GAC CTC AGC AAT GCC AAG AGC AAG CTG ATC ATT GTG CAG ATC ACT GTG <b>L C F G E E L H D L S N A K S K L I I V Q I T V</b></p>	<p>GTG AAC TGC CAG CAG CTG CTG GAG GCA GTG AAC ATG CGT CGC TCC CAG CCT TAC TCC AAC AGC TCA AAC CTG <b>V N C Q Q L L E A V N</b> M R R S Q P Y S N S S N L</p>
<p>GAG ATG TCT GAT AAT GTG GCC ATT GAC CAG ATG GCC CGC ATC TAC CAG GAC TTG TGC AGC TAT AGC GGC CCC E M S D N V A I D Q M A R I Y Q D L C S Y S G P</p>	<p>TAC CAG GAC TTG TGC AGC TAT AGC GGC CCC CAG AGG CCA GCC TGC TAC AGG GAC AAC ATG CCC ATC ACT GCC Y Q D L C S Y S G P Q R P A C Y R D N M P I T A</p>
<p><b>3'-UTR(324)</b> TGAGCCGTGAGCAGCAGCAAAACACCTGCCAGGAGCTCTTCAGCGAGTACCAGACTGACTGTACAACATATTAGGGACAGTCTTATTTT CCTGACATACACTGACAAGGTGAATTCAGGTAAAAACAGTATCACAATTAGTTTGGACTTTTTAAATGGAGCAAAATATCTTACAGTAAGACT TTTACGCTGGAGCTCAGTATTAGGATTTTGTATACCAGTAATGTTTATGTGCTTATATGTACAATGCTAACACAAACTCTGTGTCTAACTTC TGCTTTTTTACAATAAGAGAGTGTATCATCCAGCTCGAGAGAAAAAG</p>	

Fig. 1. The cDNA and amino acid sequences of the black rockfish *Sebastes schlegelii* *IRF8*. The open reading frame from ATG to TGA is shown in the middle box. The amino acid sequence of the DNA binding domain (DBD) is shaded in gray and the IRF-association domain 1 (IAD1) is in bold, shaded in gray, and boxed. The five conserved tryptophan (W) residues in the DNA binding domain are boxed.

qPCR은 3  $\mu$ L의 cDNA, 5  $\mu$ L의 2 $\times$  TaKaRa Ex Taq™ SYBR premix, 0.4  $\mu$ L의 10  $\mu$ M forward, reverse primer, 1.2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 를 넣어 총 볼륨을 10  $\mu$ L로 맞췄다. qPCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10 초에서 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 5초, 58 $^{\circ}$ C 10초, 72 $^{\circ}$ C 20초를 35 cycle, 95 $^{\circ}$ C 에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 95 $^{\circ}$ C에서 15초를 1 cycle로

반응하였으며 각 반응은 3반복으로 진행하였다.

통계학적 분석

실험의 유의성을 살펴보기 위한 통계분석은 SPSS version 18 program (IBM, USA)의 one-way ANOVA 방법을 사용하였

Table 1. The percentages of identity and similarity of *SsIRF8* amino acid sequence with that of other species. *Oplegnathus fasciatus IRF8* protein sequence showed the highest values

Scientific Name	Accession Number		<i>Sebastes schlegelii</i>	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	<i>Miichthys miiuy</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Larimichthys crocea</i>	<i>Gadus morhua</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>Gymnocypris przewalskii</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Scleropages formosus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Cathartes aura</i>
<i>Sebastes schlegelii</i>				90.8	90.5	90	90.5	90	89.1	85.8	87	73.4	73.3	67.3	64.8	64.5	64.5	51.9	51.8
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	AFU81290.1	96.2		91.5	91	92.9	92.7	90.3	87	89.3	71.1	72.4	67.7	65.7	65.9	64.4	52.6	52.3	
<i>Epinephelus coioides</i>	AND67453.1	95.5	96.9		99.1	91.2	91	89.3	86.5	87.7	72	71.5	66.4	64.3	65.2	63.7	51.9	52.3	
<i>Epinephelus coioides</i>	AND67452.1	95	96.4	99.5		90.8	90.5	88.9	86	87.2	71.8	71.3	66.1	64.5	64.8	63.4	51.9	52.3	
<i>Miichthys miiuy</i>	AHB59740.1	95.3	96.4	96	95.5		94.1	88.6	85.3	95	72.7	72.4	67.5	65.7	65.5	64.6	52	52.5	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	AKC57349.1	95.7	97.6	96.9	96.4	97.9		88.9	85.8	90.5	73.1	73.1	67.7	66.1	64.8	64.4	52.1	52.1	
<i>Scophthalmus maximus</i>	AFE88896.1	94.3	95.7	95	94.5	95	96.4		88.8	85.8	71.3	71	66.2	64.8	64.6	62.2	52.5	51.6	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	AFE18694.2	93.6	94.3	94.8	94.3	93.6	94.1	95		82.5	69.4	70.2	64.4	63.5	61.9	63	52.2	50.7	
<i>Larimichthys crocea</i>	KKF19617.1	91.5	92.9	92.7	92.2	95.7	94.3	92.4	91		74.2	70.6	66.6	64.8	63.5	64.3	51.1	51.6	
<i>Gadus morhua</i>	AJR33029.1	86.5	86.7	86.7	86.3	87.7	87.7	86.5	85.5	87.4		71.6	65.5	64.7	64.5	60.6	51.3	52.8	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ALS92677.1	81.8	82	81.8	81.3	82.7	83.8	81.3	80.9	80.6	81.5		71.5	69.9	66	64.6	54.7	55.6	
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	AMT92197.1	80.4	81.5	82.2	81.8	81.8	81.5	79.4	79.4	79	79.9	81.8		92.5	85.1	66	56.5	57.7	
<i>Gymnocypris przewalskii</i>	AMB19593.1	79.4	80.8	80.8	80.6	80.4	80.4	79.7	78.5	78	79.7	81.8	94.9		82.7	63.2	56.5	57.8	
<i>Danio rerio</i>	NP_001002622.1	80.4	80.9	80.9	80.4	81.8	82	80.9	79.2	78.7	80.1	78.4	91.1	90		61.6	55.2	56.1	
<i>Scleropages formosus</i>	KPP68827.1	78.4	77.7	77.7	77.7	78.6	79.1	77.2	77.9	77	77.2	79.1	78.2	77.2	74.7		51.4	52.9	
<i>Gallus gallus</i>	NP_990747.1	68.9	70.4	70.1	69.9	68.9	69.4	70.1	69.4	68.5	68.9	68.7	72.9	72.2	73.2	68.5		91.1	
<i>Cathartes aura</i>	KFP53072.1	68	68.9	69.2	68.9	68.7	68.5	67.8	67.8	68.2	68.2	69.6	72.4	72.4	72.2	69.7	96		



고, 모든 mRNA 상대 발현량은 평균(Mean)±표준편차(Standard deviation)로 나타내어 면역 자극에 따른 조피볼락 *IRF8*의 mRNA 상대 발현 정도를 통계분석 하였다. 모든 실험결과는 대조군 대비 통계적인 유의성을 나타내는  $P<0.05$ 에서 판단하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 조피볼락에서 유래한 *IRF8*의 full-length cDNA sequence를 확인하고 분자 유전학적 특징과 mRNA 상대 발현량을 비교분석을 통하여 면역반응을 확인하였다. *SsIRF8*의 full-length cDNA sequence는 총 1,658 bp로 이루어져 있으며, 5'-untranslated region (UTR)는 67 bp, 3'-untranslated region (UTR)은 324 bp로 나타났다. Open reading frame (ORF)은 1,266 bp로 구성되어 있으며 이 부분은 422개의 아미노산으로 번역되는 것으로 예측되었다(Fig. 1). 예상한 아미노산 서열을 이용하여 단백질 특성을 예측하였을 때 47.77 kDa의 분자량으로 추정되며 등전점은 5.99로 나타났다.

*SsIRF8*의 아미노산 서열은 bioinformatics tool을 이용한 *in silico* 분석을 통해 척추동물 IRF family에서 보존되는 DBD,

다섯개의 tryptophan 잔기, IAD을 확인하였다. DBD는 IRF family에서 관찰되며 표적 프로모터의 ISRE/IRF-E consensus sequence을 인식하여 전사를 조절하는 기능을 한다. 5개의 tryptophan는 DBD에서 확인되며 척추동물의 IRF 서열에 보존되어 있는 motif이다(Eroshkin and Mushegian, 1999; Nehyba et al., 2002). *SsIRF8*의 DNA-binding domain은 N-말단 6-113 aa에 있었으며 IRF3-10에 있는 IRF-association domain (IAD)도 C-말단 189-371 aa에서 확인되었다. 그리고 5개의 tryptophan 잔기는 12W, 27W, 39W, 59W, 77W의 위치에서 보존되어 있는 것으로 확인 되었다(Fig. 1).

예측한 아미노산 서열을 이용하여 다른 종에서 기원한 *IRF8*과 조피볼락에서 기원한 *IRF8*를 비교하였을 때, *Oplegnathus fasciatus IRF8*과 동일성과 유사성이 각각 96.2%, 90.8%로 가장 높았으며 *Epinephelus coioides*, *Miichthys miiuy*, *Dicentrarchus labrax* 종에서도 각각 95.5%, 95.3%, 95.7%의 높은 동일성을 보였다(Table 1). Phylogenetic tree를 통해 *SsIRF8*의 계통발생학적 분류를 비교하였다. 계통발생학적 분류를 비교하기 위해서 민어(*Miichthys miiuy*), 부세(*Larimichthys crocea*), 유럽바다농어(*Dicentrarchus labrax*), 돌돔(*Oplegna-*

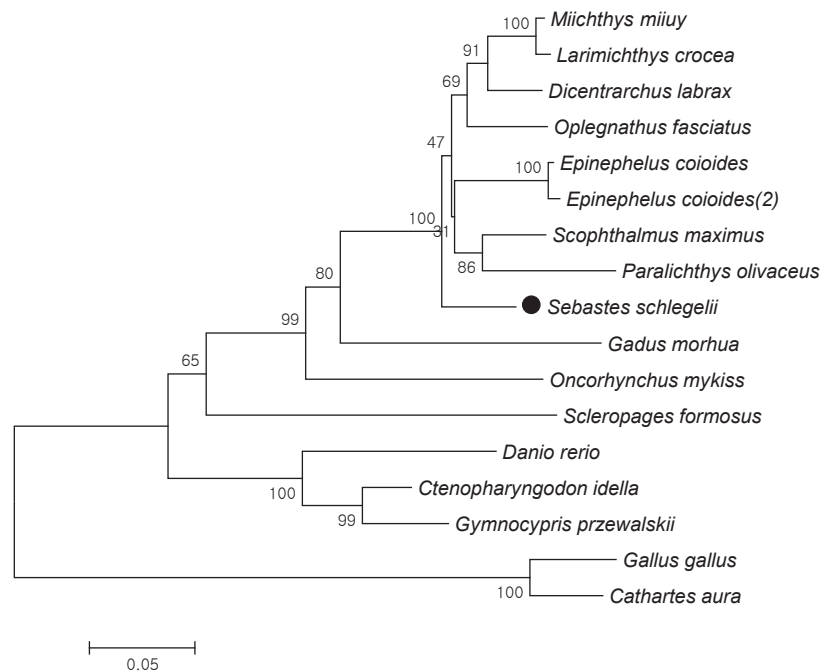


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of IRF8 constructed with Mega7. The bootstrap confidence values shown at the nodes of the tree are based on 1000 bootstrap replications. Black rock fish *Sebastes schlegelii* IRF8 is indicated with a black dot (●) and the scientific name of the fish is in bold. GenBank accession numbers are as follows: *Miichthys miiuy*, AHB59740.1; *Larimichthys crocea*, KKF19617.1; *Dicentrarchus labrax*, AKC57349.1; *Oplegnathus fasciatus*, AFU81290.1; *Epinephelus coioides*, AND67453.1, AND67452.1; *Scophthalmus maximus*, AFE88896.1, *Paralichthys olivaceus* AFE18694.2; *Gadus morhua*, AJR33029.1; *Oncorhynchus mykiss*, ALS92677.1; *Scleropages formosus*, KPP68827.1; *Danio rerio*, NP\_001002622.1; *Ctenopharyngodon idella*, AMT92197.1; *Gymnocypris przewalskii*, AMB19593.1; *Gallus gallus*, NP\_990747.1; *Cathartes aura*, KFP53072.1.

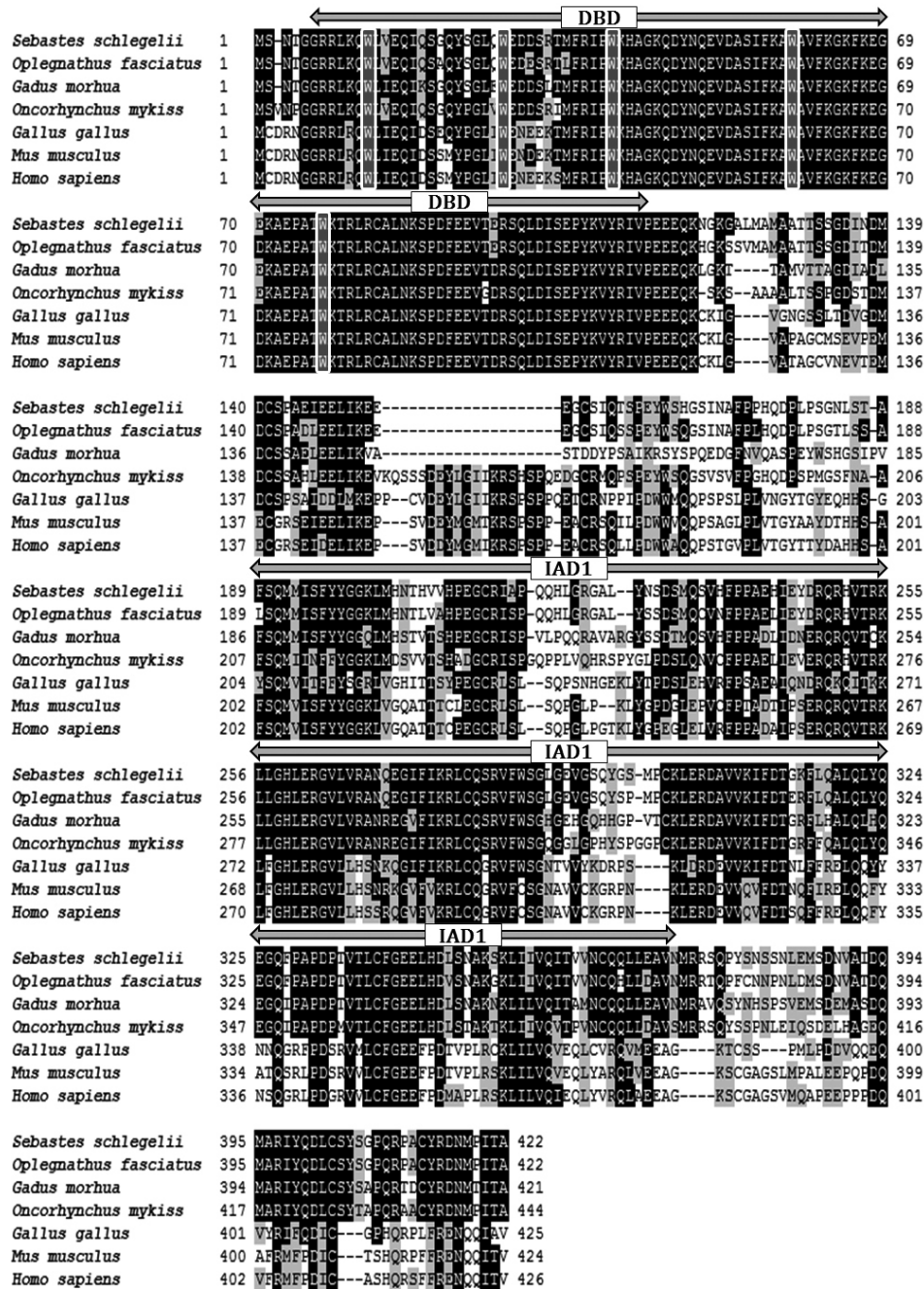


Fig. 3. Multiple sequence alignment of *SsIRF8* amino acid sequence with other known orthologs from GenBank. The alignment was conducted using ClustalW. The DNA binding domain (DBD) and IRF-association domain1 (IAD1) are shown with arrows. The conserved tryptophan (W) residues in the DBD are boxed and shaded in white.

*thus fasciatus*), 갈색등근바리(*Epinephelus coioides*), 대문짝넙치(*Scophthalmus maximus*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 대서양참대구(*Gadus morhua*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 아시아아로와나(*Scleropages formosus*), 제브라피쉬(*Danio rerio*), 초어(*Ctenopharyngodon idella*), *Gymnocypris*

*przewalskii*, 적색야계(*Gallus gallus*), 터키콘도르(*Cathartes aura*)의 *IRF8* 서열을 이용하였으며, *SsIRF8*은 다양한 어류들과 가까운 cluster 인 것으로 확인하였다(Fig. 2).

Multiple alignment 결과 어류부터 포유류의 *IRF8*를 비교하였을 때 DBD와 IAD1 모두 서열 간의 높은 homology를 보

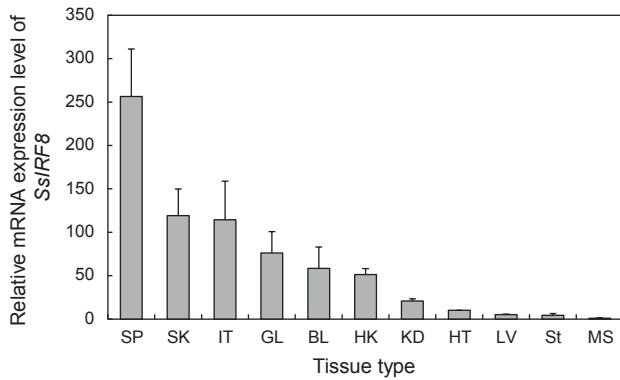


Fig. 4. *SsIRF8* mRNA expression in different tissues (SP- spleen, SK-skin, IT-intestine, GL-gill, BL-blood, HK-head kidney, LV-liver, St-stomach, MS-muscle) of the healthy black rockfish *Sebastes schlegelii* as measured using real time qPCR. The relative expressions of the *IRF8* are shown as a ratio to *IRF8* expression in the MS. *Sebastes schlegelii* EF1 $\alpha$  was used as a reference gene. Data are shown as the mean (n=3) and the error bars represent the standard deviation.

였다. *SsIRF8*의 DBD서열은 *Oplegnathus fasciatus*, *Gadus morhua*, *Oncorhynchus mykiss*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*에서 거의 차이가 없는 것으로 확인되었으며 이에 비해 IAD1에서는 종간의 차이가 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 3).

*IRF8*의 조직 발현은 보통 lymphomyeloid-rich 조직이나 면역과 관련된 조직에서 높은 것으로 알려져 있다(Lehtonen et al., 2003; Wang and Morse, 2009). 이전 연구에서 lymphomyeloid-rich 조직인 비장, 신장, 두신에서 *IRF8*가 높게 발현되는 것이 확인되었으며, 특히 비장에서 가장 높은 발현을 나타냈다. 또한 종마다 특이적으로 근육, 뇌, 정소 등의 기관에서 높은 발현이 확인되었다(Holland et al., 2010; Bathige et al., 2012; Chen et al., 2012; Hu et al., 2013). *SsIRF8*의 조직별 발현양상을 확인하기 위해 건강한 조피볼락으로부터 분리한 9개 조직 (gill, heart, head kidney, spleen, liver, intestine, kidney, testis, ovary)과 분리한 PBCs의 cDNA를 사용하여 qPCR을 수행하였다. Elongation factor 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ )를 reference gene으로 하였으며 근육 조직을 기준으로 상대적인 비교를 하였다. qPCR 결과 다양한 조직에서 mRNA 발현량이 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다. 특히 근육 조직에 비해 비장에서 256배로 가장 높게 발현하였고 표피, 장, 아가미, 혈액세포, 두신, 신장에서도 높은 발현을 보이며, 간 조직에서는 상대적으로 낮게 발현하였다(Fig. 4). 이러한 발현 양상은 myeloid progenitor cell의 분화와 B세포, T세포의 발달에 관여하는 것으로 알려진 *IRF8*의 기능(Lu, 2008)과 관련하여 *SsIRF8*가 비장에서 가장 높게 발현하는 것으로 보여지며, 다른 lymphomyeloid-rich 조직인 장, 아가

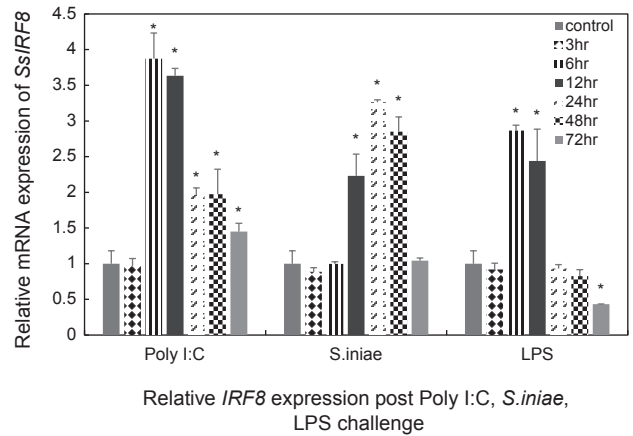


Fig. 5 Gene expression of *SsIRF8* in the spleen after challenge with either poly I:C or *S. iniae* or LPS. All data were normalized to that of *Sebastes schlegelii* EF1 $\alpha$ . The time course of *IRF8* mRNA expression in the spleen at 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 hr post injection is shown. Data are presented as the mean (n=3) and the error bars represent the standard deviation. Asterisks (\*) represent significant differences ( $P<0.05$ ).

미, 혈액세포, 두신, 신장 조직에서도 많이 분포하는 것으로 사료된다(Hu et al., 2013).

면역 자극에 따른 mRNA의 상대 발현량을 비교분석하기 위해 PBS, *S. iniae*, poly I:C, LPS를 주사한 뒤 시간대 별로 조피볼락의 비장을 샘플링하여 qRT-PCR을 진행하였다. Poly I:C를 주사한 뒤 6시간 이후부터 0시간과 비교하였을 때 유의적으로 상대 발현량이 증가하는 패턴을 보이고 6시간에서 가장 높은 발현량이 관찰되었다( $P<0.05$ ). 또한 *S. iniae*를 주사한 뒤 12시간부터 상승하는 패턴을 보이며 12시간, 24시간, 48시간에서 유의적인 차이가 관찰되었으며 24시간에서 가장 많은 발현을 나타냈다( $P<0.05$ ). LPS를 처리했을 때도 6시간과 12시간에서 유의적 차이를 보였다( $P<0.05$ ). 이와 같이 본 연구에서는 다양한 면역 자극에 의해 *SsIRF8*의 발현이 높아짐을 확인하였다(Fig. 5). 면역자극 후, *SsIRF8*의 발현이 높아지는 것은 LPS-TLR4와 polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)-TLR3의 결합에 대하여 Toll-like receptor와 IFN- $\gamma$  signaling pathways의 중요 조절 인자로서 *IRF8*이 관여하기 때문인 것으로 예상된다(Zhao et al., 2006). 특히 poly I:C를 주사한 실험군의 경우, 다른 실험군에 비해 컨트롤 대비 발현량이 급격하게 증가하는 패턴을 보였다. 이는 poly I:C 복강 주사 후 pathogen associated molecular pattern (PAMP)이 인식하고(Perdiguer and Esteban, 2009; Hu et al., 2013), poly I:C-activated signaling pathways에 관여하여 *SsIRF8*의 발현량이 급격한 양상을 보인 것으로 사료된다(Gabriele and Ozato, 2007; Taylor et al., 2007).

본 연구에서는 *SsIRF8*의 분자유전학적 특성을 비교 분석하여



건강한 조피볼락의 조직에서의 *SsIRF8*의 발현양상과 여러 병원성 스트레스를 가했을 때 비장조직으로부터의 *SsIRF8*의 발현의 차이를 비교 분석함으로써 조피볼락의 내재면역 기초 자료로 이용할 수 있을 것이며 이후 조피볼락의 IRF8이 myeloid와 lymphoid cell에 어떠한 영향을 주는지 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 사 사

이 논문은 2016년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행한 연구임(수산백신연구센터).

## References

- Alter-Koltunoff M, Goren S, Nussbeck J, Feng CG, Sher A, Ozato K, Azriel A and Levi BZ. 2008. Innate immunity to intraphagosomal pathogens is mediated by Interferon Regulatory Factor 8 (IRF-8) that stimulates the expression of macrophage-specific Nramp1 through antagonizing repression by c-Myc. *J Biol Chem* 283, 2724-2733. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M707704200>.
- Barnes B, Lubyova B and Pitha PM. 2002. On the role of IRF in host defense. *J Interf cytokine Res* 22, 59-71. <http://dx.doi.org/10.1089/107999002753452665>.
- Bathige SDNK, Whang I, Umasuthan N, Lim BS, Park MA, Kim E, Park HC and Lee J. 2012. Interferon regulatory factors 4 and 8 in rock bream, *Oplegnathus fasciatus*: Structural and expressional evidence for their antimicrobial role in teleosts. *Fish Shellfish Immunol* 33, 857-871. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.07.017>.
- Chen X, Hu G, Dong X, Liu Q and Zhang S. 2012. Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor 8 (IRF8) in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Vet Immunol Immunopathol* 149, 143-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.008>.
- Eroshkin A and Mushegian A. 1999. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *J Mol Med* 77, 403-405. <http://dx.doi.org/10.1007/s001090050369>.
- Gabriele L and Ozato K. 2007. The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 503-510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.008>.
- Holland JW, Karim A, Wang T, Alnabulsi A, Scott J, Collet B, Mughal MS, Secombes CJ and Bird S. 2010. Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factors 4 and 8 (IRF-4 and IRF-8) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol* 29, 157-166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.001>.
- Honda K and Taniguchi T. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6, 644-658. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1900>.
- Hu G, Chen X, Gong Q, Liu Q, Zhang S and Dong X. 2013. Structural and expression studies of interferon regulatory factor 8 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol* 35, 1016-1024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.016>.
- Huang B, Qi ZT, Xu Z and Nie P. 2010. Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: glimpse of the diversification in evolution. *BMC Immunol* 11, 22. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-11-22>.
- Inkpen SM, Hori TS, Gamperl AK, Nash GW and Rise ML. 2015. Characterization and expression analyses of five interferon regulatory factor transcripts (Irf4a, Irf4b, Irf7, Irf8, Irf10) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Shellfish Immunol* 44, 365-381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.032>.
- Lee CH, Melchers M, Wang H, Torrey TA, Slota R, Qi CF, Kim JY, Lugar P, Kong HJ, Farrington L, van der Zouwen B, Zhou JX, Lougaris V, Lipsky PE, Grammer AC and Morse HC. 2006. Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *J Exp Med* 203, 63-72. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051450>.
- Lehtonen A, Lund R, Lahesmaa R, Julkunen I, Sareneva T and Matikainen S. 2003. IFN- $\alpha$  and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells. *Cytokine* 24, 81-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2003.07.001>.
- Lu R. 2008. Interferon regulatory factor 4 and 8 in B-cell development. *Trends Immunol* 29, 487-492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2008.07.006>.
- Mamane Y, Heylbroeck C, Génin P, Algarté M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R and Hiscott J. 1999. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237, 1-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00262-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00262-0).
- Marecki S, Atchison ML and Fenton MJ. 2015. Differential Expression and Distinct Functions of IFN Regulatory Factor 4 and IFN Consensus Sequence Binding Protein in Macrophages. *J Immunol* 163, 2713-2722.
- Nehyba J, Hrdliková R, Burnside J and Bose HR. 2002. A Novel Interferon Regulatory Factor (IRF), IRF-10, Has a Unique Role in Immune Defense and Is Induced by the v-Rel Oncoprotein. *Mol Cell Biol* 22, 3942-3957. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.11.3942-3957.2002>.
- Nguyen H, Hiscott J and Pitha PM. 1997. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 293-312. [http://dx.doi.org/10.1016/S13596101\(97\)00019-1](http://dx.doi.org/10.1016/S13596101(97)00019-1).
- Ozato K, Tailor P and Kubota T. 2007. The interferon regulatory factor family in host defense: Mechanism of action. *J Biol Chem* 282, 20065-20069. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R700003200>.
- Paun A and Pitha PM. 2007. The IRF family, revisited. *Biochimie*



- 89, 744-753. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.014>.
- Perdiguero B and Esteban M. 2009. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* 29, 581-98. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2009.0073>.
- Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BRG, Borden EC, Bordens EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP and Pestka S. 1998. Biological properties of recombinant  $\alpha$ -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res* 58, 2489-2499.
- Stellacci E, Testa U, Petrucci E, Benedetti E, Orsatti R, Feccia T, Stafnes M, Coccia EM, Marziali G and Battistini A. 2004. Interferon regulatory factor-2 drives megakaryocytic differentiation. *Biochem J* 377, 367-78. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20031166>.
- Taylor P, Tamura T, Kong HJ, Kubota T, Kubota M, Borghi P, Gabriele L and Ozato K. 2007. The Feedback Phase of Type I Interferon Induction in Dendritic Cells Requires Interferon Regulatory Factor 8. *Immunity* 27, 228-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.009>.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A and Tanaka N. 2001. IRF Family of transcription factors as regulatory of host defense. *Annual Review Immunol* 19, 623-655. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>.
- Wang H and Morse HC. 2009. IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol Res* 43, 109-117. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-008-8055-8>.
- Zhang J, Li Y and Hu Y. 2015. Molecular characterization and expression analysis of eleven interferon regulatory factors in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish Shellfish Immunol* 44, 272-282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.033>.
- Zhao J, Hee JK, Li H, Huang B, Yang M, Zhu C, Bogunovic M, Zheng F, Mayer L, Ozato K, Unkeless J and Xiong H. 2006. IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN- $\gamma$  signaling pathways. *J Biol Chem* 281, 10073-10080. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M507788200>.