

시베리아 철갑상어(*Acipenser baerii*) 트랜스페린(Transferrin) 유전자의 발생 배 및 초기 자어에서의 발현 특징

김은정 · 남윤권*

국립부경대학교 수산생명과학부 양식응용생명과학전공

Expression Characteristics of Transferrin Gene During Embryo Development and Prolarval Ontogeny in Siberian Sturgeon *Acipenser baerii*

Eun Jeong Kim and Yoon Kwon Nam*

Major of Aquaculture and Applied Life Sciences, Faculty of Fisheries Life Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

Serotransferrin cDNA from the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* was isolated and its expression patterns during early life intervals were characterized. It contained an ORF encoding a 708-aa-long polypeptide, including a 19-aa signal peptide. Bioinformatic analysis and 3D modeling indicated a typical bi-lobal structure with conserved iron-coordinating residues. During embryonic development, the potential transition of maternally provisioned transcripts to zygotically *de novo* transcribed ones occurred around blastula stage. The transferrin mRNA levels peaked at stages responsible for pronephros, heart and erythropoietic component differentiation. After hatching, the transferrin mRNA expression gradually increased at early ontogenic phases (0 to 3 DPH) corresponding to the periods in which prolarvae exhibited increased blood circulation and liver differentiation. The expression decreased at subsequent stages in which prolarvae exhibited benthic movement. The tissue distribution assay indicated liver-predominant expression at fingerling stage. From the microinjection-based challenge with *Aeromonas hydrophila* at day-0 and day-7, the transcriptional response was modulated toward upregulation, in which the amounts induced at 6, 12 and 24 HPI were greater in prolarvae injected at day-7 than at day-0. Therefore, transferrin plays important roles in both early development and host protective responses to pathogens in the Siberian sturgeon.

Keywords: Transferrin, Development, Ontogeny, Gene expression, Siberian sturgeon *Acipenser baerii*

서 론

철(iron)은 산소 수송(oxygen transport), 전자 수송(electron transport), DNA 합성(deoxyribo nucleic acid synthesis)과 같은 기본적인 생명 활동은 물론 세포의 다양한 생리작용 및 대사 경로에 필수적인 미량 금속(essential trace element)이지만, 필요 이상으로 체내 과량 존재할 경우 유리기(free radicals) 생성에 의한 세포 독성 및 산화성 손상(oxidative damage)을 유발하거나 체내 감염 미생물의 증식을 촉진한다(Kawabata, 2019). 때문에 대부분 고등 생명체는 안전한 철의 수송, 이용 및 항상성 유지를 위한 조절 기작이 필요한데, 이와 관련하여 가장 중

추적인 역할을 담당하는 단백질이 트랜스페린(transferrin, serotransferrin)이다(Chen et al., 2014; Asmamaw, 2016). 트랜스페린은 2개의 구형 도메인(globular domains)으로 구성된 약 80 kDa의 분자량을 나타내는 당단백질(glycoprotein)로서 철 결합 단백질 상과(iron-binding protein superfamily)에 속하며, 그 기본 구조와 기능이 대부분의 척추동물에서 보존되어 있다고 알려져 있다(Kawabata, 2019). 혈청 트랜스페린은 체내 철 수송-저장으로 대변되는 기본 기능 이외에 염증반응, 호흡, 세포 분열·분화, 생식 및 면역 반응 등을 포함한 다양한 생리 기능에 관여한다고 보고된 바 있다(Asmamaw, 2016; Kamińska-Gibas et al., 2020). 특히, 어류에서 트랜스페린이 선천성 면역

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5918 Fax: +82. 51. 629. 5910

E-mail address: yoonknam@pknu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0041>

Korean J Fish Aquat Sci 57(1), 41-52, February 2024

Received 18 January 2024; Revised 4 February 2024; Accepted 20 February 2024

저자 직위: 김은정(대학원생), 남윤권(교수)

반응(innate immune response)과 밀접히 연관되어 있음을 가설하는 다양한 실험적 증거들이 제시된 바 있는데, 세균 감염 초기에 작용하는 ‘초기 신속대응 단백질(acute phase protein, APP)’로서 철과 신속한 결합을 통해서 세균의 증식에 필요한 혈청 내 철 가용성을 제한하는(iron sequestration) 방식이 대표적인 기작으로 알려져 있다(Asmamaw, 2016). 그 외에도 트랜스페린 절단산물(cleaved products)을 통한 대식세포(macrophage)의 활성화 촉진, 및 트랜스페린 자체의 세균 증식 저해 (bacteriostatic or bactericidal)에 관한 연구 결과들이 보고된 바 있으며 (Stafford et al., 2001; Stafford and Belosevic, 2003; Yin et al., 2019), 아울러 일부 어종에서 트랜스페린 유전자의 종내 다형성(polymorphism)에 따라 감염체에 대한 감수성 및 내성에 큰 차이가 있음이 보고(Kaminska-Gibas et al., 2020; Jurecka et al., 2021)되는 등 어류의 선천성 방어 체계에 있어 트랜스페린 역할에 관한 관심은 지속적으로 증가하고 있다.

트랜스페린의 생체 방어 기능에 대한 관심을 반영하듯 여러 양식 어종으로부터 트랜스페린 유전자의 발굴 및 다양한 발현 분석이 수행된 바 있는데, 유전자 및 단백질의 높은 구조적 상동성에도 불구하고 일부 발현 특징(또는 세부 기능)은 종 특이적인 여러 차이가 보고된 바 있다. 그 대표적인 예로서 트랜스페린은 어종에 따라 미생물 감염시 양성(positive) APP로 작용하거나(즉, 감염시 발현이 증가) 반대로 감염에 의해 발현이 감소하는 음성(negative) APP로 작용함이 알려져 있다(Asmamaw, 2016; Charlie-Silva et al., 2019). 또한, 대부분 사례에서 트랜스페린의 주 발현 장소는 간(liver)으로 알려져 있으나 일부 어종에서는 다른 조직에서 간보다 높은 발현을 보이며, 간의 조직(특히, blood barrier가 있는 조직에서의 발현 등)에서의 발현 패턴은 어종에 따라 서로 발현 분포 및 발현 수준 모두 큰 차이를 보인다(Neves et al., 2009; Cao, 2022; Luo et al., 2022). 뿐만 아니라, 종래의 트랜스페린 발현 기능에 관한 대부분의 연구 결과는 주로 종묘 단계 이후 육성어(또는 준성어) 어류 시료를 대상으로한 실험을 통해 얻어진 자료들로서, 상대적으로 면역체계가 온전히 갖추어지지 않은 배(embryo) 발생 및 초기 발달 단계(자·치어)에서의 트랜스페린의 발현 기능에 관한 정보는 소수의 단편적 결과를 제외하면 매우 미흡한 실정이다(Ding et al., 2015; Cordero et al., 2016).

시베리아 철갑상어(Siberian sturgeon *Acipenser baerii*)는 조기어강(Actinopterygii) 내 철갑상어목(Acipenseriformes)에 속하며 약 2억 5천만년전 출현 당시의 원형태를 상당 보전하고 있는 현존하는 원시어류(extant primitive fish)에 해당한다(Kim et al., 2019a). 이들의 계통학적 위치가 연골어류와 경골어류의 특징을 모두 보유하고 있는 연질어아강(Chondrostei)에 속한다는 측면에서 어류 유전자의 진화 연구를 위한 실험 생물로서 크게 각광받고 있을뿐만 아니라, 양식 산업 측면에서도 캐비아(caviar) 생산을 위한 원 자재로서 중요시 되고 있다. 우리나라 역시 1990년대 철갑상어의 시범 도입 후 캐비아, 어육,

어육 추출물 생산을 목적으로 양식이 이루어지고 있다(Park et al., 2013a). 철갑상어는 전세계적으로 양식 초창기 세균성 질병 감염 사례가 거의 알려져 있지 않았으나 인공종묘생산과 고밀도 양식 추진 등 양식 규모의 확대가 본격화되면서 감염성 질병에 의한 문제점들이 함께 증가하고 있는 추세이다(Kayış et al., 2017; Kim et al., 2019b).

철갑상어목에 속하는 어류들은 비교적 긴 배 발생(embryo development)과 난황자어기(prolarval period)를 거쳐 자어 단계(larval stage)에 도달하는데, 발생 과정 중 일반적으로 단황 부분할(meroblastic cleavages)을 보이는 대부분의 진골어류(teleosts)와 달리 비균일(비대칭) 전할(uneven holoblastic cleavages)을 나타내며(Park et al., 2013a), 부화 후 시베리아 철갑상어 난황자어는 다양한 내·외부 기관발달을 포함한 형태적 변태와 많은 행동학적 변화(주광성, 주류성, 유영특성, 군집성 등의 변화)를 거쳐 성체의 기본 형태를 닮은 자·치어로 발달한다(Park et al., 2013b). 하지만 철갑상어는 완전한 자어기 도달 후에도 비장(spleen), 흉선(thymus), 뇌막 골수양조직(meningeal myeloid tissue), 림프구(lymphocyte) 등 여러 면역 기관·세포가 아직 발달하지 않은 채로 치어기로 진입하는 등 전반적인 면역기능의 탑재가 여타 경골어류에 비해 늦게 완성된다고 알려져 있으며, 때문에 철갑상어의 양식 생산 과정 중 해당 초기 생활사가 병원체 감염에 가장 취약한 구간으로 여겨지고 있다(Gradil et al., 2014; Chesneau, 2018).

이에 본 연구는 시베리아 철갑상어 초기 발달 단계의 생체 방어 및 면역 기작 연구의 일환으로 트랜스페린의 발현 특징과 면역반응 여부에 관한 조사를 수행하고자 하였다. 이를 위해 트랜스페린 cDNA (complementary DNA)의 발굴과 이의 배 발생 및 난황자어기에서의 발현 패턴 그리고 난황자어를 대상으로 한 면역자극(세균의 미세현미주입을 통한 인위적 감염)시 트랜스페린 mRNA (messenger ribonucleic acid)의 차등발현 특징을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

시베리아 철갑상어 자·치어 실험어 생산

시베리아 철갑상어(*A. baerii*) 암수 친어(약 8–10년산, 암컷 3미, 수컷 3미)를 대상으로 luteinising hormone-releasing hormone analogue (LHRH-a; Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA)를 이용한 산란 및 방정을 유도하였다. 암컷은 체중 kg 당 150 µg, 그리고 수컷은 체중 kg 당 100 µg의 LHRH-a (leutenizing hormone releasing hormone analogue)를 근육주사(intramuscular injection)하였고, 이때 각 암컷의 경우 LHRH-a 최종 요구량의 10%와 90%를 12시간의 간격을 두고 주사를 통해 전달하였다(priming dose 10% 및 resolving dose 90%) (Park et al., 2013a). 이때 산란유도 과정 중 수온은 14–15°C 범위를 유지하였고, 전기 산소 발생기를 이용하여 용존 산소(dissolved

oxygen) 농도는 9.0 mg/L 이상이 되도록 조절하였다. 2차 주사 30–36시간 사이에 소량의 알이 배란 된 것을 확인하였고 채정 및 채란을 실시하였으며, 준비된 배우자는 건식법(wet method)에 의한 인공 수정을 수온 17–18°C 수행하였다. 수정란은 교질 제거제(Fuller's Earth; Sigma-Aldrich)를 이용, 천천히 혼합 및 세란을 반복한 후(5회) McDonald Jar 부화기에 수용하여 18–19°C에서 발생을 유도하였고, 부화 난황자어(약 수정 120시간 후 대량 부화 개시)는 2 m × 1 m × 0.3 m (D × L × H) 사각 순환 여과식수조 당 약 3,500–4,000개체를 수용하여 초기 발달을 유도하였다. 본 철갑상어 종의 자어 발달에 관한 선행 연구의 자료를 기준으로 자어의 성장, 형태 발달, 행동 변화(주광성, 주류성, 군집성, 휴지기 등) 특징이 정상적인 시점에 관찰되는지 확인하였다(Park et al., 2013b). 부화 후 9–10일째 yolk plug 배출이 일어나는 개체들을 대상으로 인공 미립자 사료(100 µm 크기의 넓 치어용 미립자 사료; Woosung Cor., Daejeon, Korea)와 알테미아(*Artemia nauplii*) 부화 유생을 번갈아 공급하였고, 부화 2주부터는 치어의 성장 정도에 따라 인공 사료(직경 200–1,500 µm)를 만복으로 일일 4–5회 공급하였다.

트랜스페린 cDNA 클로닝, 서열의 생물정보학 분석 및 3D 모델링

시베리아 철갑상어로부터 cDNA 서열을 확인하기 위해서 본 연구실이 보유하고 있는 시베리아 철갑상어 간 조직의 전사체(transcriptomes) 데이터베이스로부터 기존 어류의 트랜스페린 서열과 높은 상동성을 보이는 단편 서열들을 확보 다중 서열정렬(multiple sequence alignment)를 제작하였고(<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), 이로부터 5'-비번역 부위(5'-untranslated region, 5'-UTR)과 3'-비번역부위(3'-UTR)를 포함한 cDNA 서열을 PCR (polymerase chain reaction)로 분리(본 연구에 이용한 PCR primer 정보는 모두 Table 1에 나타내었음), 해당 PCR 산물의 염기서열을 양방향으로 읽어 대표 cDNA 서열(representative cDNA sequence)을 확정하였다. 해

당 cDNA 서열로부터 open reading frame finder 도구를 이용하여(ORF finder; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 추정 아미노산 서열을 확보하였고 이로부터 ExPasy ProtParam Tool을 이용하여(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 분자량 및 theoretical pI 값을 계산하였다. 트랜스페린 아미노산 서열 내 signal peptide의 존재 여부와 절단 위치(cleavage site)를 확인하기 위해서 SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 및 TargetP 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>) 도구를 이용하여 분석하였다. 아미노산 서열 내 N-glycosylation site의 예측은 NetNGlyc-1.0 도구(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>)를 이용하였고, 단백질의 도메인 예측은 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)와 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 사용하였으며, 도메인간 아미노산 서열의 상동성은 Sequence Manipulation Suite: Indent and Sim 도구(https://www.bioinformatics.org/sms2/indent_sim.html)를 이용하여 계산하였다. 아울러 시베리아 철갑상어 트랜스페린 단백질의 3차 구조 homology modeling과 철(iron) 결합 부위를 추정하기 위해서 ExPasy Swiss-Model Workspace (<https://www.expasy.org/resources/swiss-model-workspace>)를 이용하여 주형 탐색과 모델 구축을 수행하였고, 기존 어류 및 척추동물의 혈청 트랜스페린 단백질 관련 문헌 조사를 통해 철 결합 부위의 보존 특성 여부를 조사하였다.

발생 배(Embryo) 및 난황자어(Prolarvae) 발달 과정에서의 트랜스페린 발현 분석

발생 배(developing embryos)에서 트랜스페린 유전자 mRNA 발현 패턴을 조사하기 위해서 인공수정 직후부터 최초 부화까지의 발생 단계 중 철갑상어 배발생 특징을 나타내는 대표 발생 단계를 선정하여 분석을 수행하였다(Park et al., 2013a). 상기 선행 연구의 시베리아 철갑상어 발생의 구분 단계에 따라

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Usage
AbTF-5FW	CGAGGAGCAGTTTGTGATTC	Isolation and cloning of transferrin cDNA ORF
AbTF-3RV	GACAACATTTGGAAGACTCATG	
AbTF-qFW	CAGAGATGTGGTCGTCAGAT	RT-qPCR assay of transferrin transcripts
AbTF-qRV	TGCTGGCACTTGTGGAATGT	
Ab18S-qFW	ATACAGGACTCTTTCGAGGC	Normalization control for RT-qPCR assay (Developmental expression)
Ab18S-qRV	CTCAGTTAAGAGCATCGAGG	
AbRPL5-qFW	TCACAGCACCAAACGTTTCC	Normalization control for RT-qPCR assay (Tissue distribution and prolarval expression)
AbRPL5-qRV	TTCATGCACAGGATTCTCCC	
AbRPL7-qFW	GGCAAGAGTGGTATCATCTG	Normalization control for RT-qPCR assay (Tissue distribution)
AbRPL7-qRV	GTTCATCCTCCTGATGAGTC	

cDNA, Complementary deoxyribo nucleic acid; RT-qPCR, Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction.

ST1 (수정 직후), ST2 (제1난할), ST4 (8세포기), ST8 (초기 포배기, early blastula), ST10 (낭배기 개시; onset gastrulation), ST14 (낭배기 종료기; small yolk plug formation), ST16 (신경절기 개시; onset neurulation), ST19 (전신 형성; elongation of excretory rudiments), ST23 (심장 분화 및 전신 형성; heart rudiment and differentiated pronephros), ST25 (심장박동 개시; S-heart formation and heart beating), ST28 (꼬리 신장; tail elongation), ST29 (최초 부화; the first hatching)에 해당하는 총 12개 단계로부터 샘플을 확보하였으며, 각 발생 단계의 형태학적 특징 및 분화, 각 단계 도달을 위해 소요되는 발생 시간은 본 연구진의 선행연구를 참조할 수 있다(Park et al., 2013a; Gisbert and Nam, 2018). 수정 처리 및 교질 제거 직후 18–19°C 온도에서 발생 중인 배를 대상으로 각 발생 단계에 해당하는 배를 현미경으로 확인한 후 12개씩 3반복 샘플링하였다.

부화 이후 난황자어(prolarvae) 발달 기간에서 트랜스페린 유전자의 기초 발현 특징(mRNA 발현)을 조사하였다. 상기 인공 수정을 통해 생산한 부화 자어를 대상으로 대량 부화 직후(0 day post hatching; 0 DPH)부터 24시간 간격으로 10 DPH까지 각 샘플링 시점에서 24미를 무작위로 취한 후 각 개체의 길이/무게 측정 후 중간 값에 근접한 개체 9미를(3미씩 pooling하여 3개 반복구 형성) 분석에 이용하였다. 각 발달 시점에서 난황자어의 형태학적 및 행동학적 특징은 본 연구진의 선행 연구 자료를 참조할 수 있고(Park et al., 2013b) 난황자어의 마취 방법은 Kim and Nam (2018)의 조건을 이용하였다. 마취 후 드라이아이스 상에서 급속 냉동하였고 핵산 추출 직전까지 -85°C에서 보관하였다.

치어의 조직에서의 발현 분포 및 수준

시베리아 철갑상어 치어에서 트랜스페린 유전자 mRNA의 조직 분포와 발현 수준을 평가하기 위해서 건강하게 성장한 치어 그룹으로부터 9미(평균 전장, 8.5 ± 0.8 cm)를 무작위로 선별한 후 각 개체로부터 11 종류의 체세포 조직(뇌, 눈, 지느러미, 아가미, 심장, 소장, 신장, 간, 근육, 피부, 비장)을 샘플링하였다. 실험어는 MS222 (Sigma-Aldrich) 1,000 ppm을 이용하여 영구 마취 후 해부학적 기법을 통해 조직을 적출하였으며, 적출한 조직은 즉시 드라이아이스로 급속 냉동한 후 핵산 추출까지 -85°C에서 보관하였다. 조직 크기와 예상 RNA 추출량을 고려하여 각 조직 종류 당 3개체에서 얻은 시료를 혼합하여(pooling) 총 3반복의 반복구를 만들어 발현 분석에 이용하였다. 각 반복구 시료로부터 total RNA를 추출한 후 cDNA 합성 및 RT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction) 분석을 통해 트랜스페린 mRNA 발현을 상대 정량하였다.

세균 미세현미주입을 통한 난황자어 내 트랜스페린 mRNA의 차등 발현 분석

시베리아 철갑상어의 병원성 세균으로 알려진 *Aeromonas hydrophila* (Gram -; KCTC2358)를 이용하여 난황자어에 미

세현미주입(microinjection)에 의한 세균의 인위적 감염 노출 시 트랜스페린 mRNA의 차등 발현 여부를 조사하고자 하였다. 내부 장기의 발달이 거의 이루어지지 않은 초기 난황자어(day-0)와 내부 장기 형성을 일정 갖춘 후기 난황자어(day-7)가 *A. hydrophila* 인위적인 세균 감염에 대하여 트랜스페린 mRNA의 유도 능력에 관한 잠재적인 차등이 있는지를 분석하였다. 이를 위해 난황자어 두 발달 시기(day-0 및 day-7)에 선별한 난황자어 각 30개체씩을 대상으로 Kim and Nam (2018)에서 기술한 조건대로 마취 후 미세현미주입(microinjection)을 이용하여 1×10^4 CFU/g body weight (BW)의 세균 현탁액(멸균 생리식염수 이용한 현탁) 부화 자어에 주입하였으며(평균 주입 용량 30 nL), 미세현미주입에 이용한 난황자어 발달 단계의 형태학적, 행동학적 특징 그리고 미세현미주입에 세부 기술조건은 본 연구진의 선행 연구 자료를 참조할 수 있다(Park et al., 2013b; Kim and Nam, 2018). *A. hydrophila* 미세현미주입 그룹의 대조군 그룹을 제조하기 위해서 동일 용량의 멸균 생리식염수를 동일 마리 수의 자어에 주사하였다. 미세현미주입 후 각 자어 그룹은 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 수조(50 L)에 수용하였으며, 주입 6, 12, 24시간 후 *A. hydrophila* 주입 그룹 및 생리식염수 주입 대조군으로부터 각 6미씩을 무작위 선별하여 상기 언급한 방법대로 마취 및 급속 냉동 후 유전자발현 분석에 이용하였다.

핵산 추출, 역전사 반응, RT-qPCR 증폭 및 통계 처리

배, 난황자어, 자어 또는 치어 조직으로부터 TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 total RNA를 1차 추출한 후 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추가적인 정제를 수행하였으며, 1차 추출 및 정제 모두 제조사의 권고 방법을 준용하여 실시하였다. 통상의 MOPS/formaldehyde 한천 전기영동 및 ethidium bromide 염색을 통해서 28S rRNA/18S rRNA band intensity를 기준으로 RNA가 손상없이 적절히 추출되었음을 확인하였고, 아울러 Nanodrop ND 100 분광 광도계(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 260/280 nm 및 260/230 nm 흡광도 비가 모두 1.9 이상임을 확인하였다.

역전사(reverse transcription) 반응은 total RNA 2 µg과 Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen)을 이용하였고, 이때 역전사를 위한 프라이머는 Oligo-d(T)₂₀과 random nonamer 프라이머를 제조사의 권고 방법대로 혼합하여 반응시켰으며, 역전사 산물(RT product)은 멸균 증류수로 10배 희석 후 희석 산물 2 µL를 각 PCR 증폭 반응의 주형으로 이용하였다. PCR 증폭 및 산물 검출은 LightCycler 480 Real-Time PCR System 및 LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)를 이용하여 수행하였다. 트랜스페린 유전자 발현을 상대 정량하기 위한 적정 내재 대조군(internal control; reference control)을 선정하기 위해서 후보 내재 유전자들을 대상으로 한 예비 평가를 우선 실시하였고,

그 결과를 토대로 배 발생 단계에서 트랜스페린 mRNA의 상대 정량 분석은 18S rRNA를 참조 유전자(reference gene)로 이용하였고, 난황자어(prolarvae) 발달 단계별 상대 정량 분석은 ribosomal protein L5 (RPL5)를, 치어 조직의 발현 분포 조사를 위한 내재 유전자는 RPL5 및 ribosomal protein L7 (RPL7)을 병행하여 이용하였다. 한편, 세균 감염 후 난황자어에서의 차등 발현에 대한 상대 정량 분석은 RPL5를 내재 대조군 유전자로 이용하였다(Table 1).

RT-qPCR 증폭을 위해 4-log dilution cDNA 시료 세트를 이용하여 제작한 표준 곡선(standard curve)을 토대로 각 유전자의 qPCR efficiency가 92–105% 범위 내 속함을 확인하였고, 트랜스페린 유전자의 배, 자어 발달 및 치어 조직 발현 분포(기초 발현 분석)는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을, 그리고 세균 감염에 의한 차등 발현 분석은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 상대 정량하였다(Schmittgen and Livak, 2008). 각 cDNA 시료 당 3반복 RT-qPCR 증폭 반응을 통해 얻은 Ct (threshold cycle) 중앙값(median)을 결정하고, 각 실험구의 생물학적 반복구(3반복)를 통해 얻은 평균 Ct값을 이용하여 그룹 간 통계적 유의차 분석을 수행하였다. 유의성 검증을 위한 통계 분석은 One-way ANOVA (Duncan's multiple range test) 또는 Student's t-test를 통해서 P=0.05 수준에서 수행하였다.

결과 및 고찰

시베리아 철갑상어 혈청 트랜스페린 서열의 특징 및 3D 구조 모델링

시베리아 철갑상어 트랜스페린 cDNA는 708개의 아미노산(aa)을 암호화하고 있는 2,127 bp의 ORF (TAA stop codon 포함), 89 bp의 5'-UTR 및 182 bp (poly A+ tail 제외)의 3'-UTR 서열로 구성되어 있었으며 poly (A+) tail 22 bp 앞에 polyadenylation signal (aataaa)이 관찰되었다(GenBank No. PP145332). 총 708개 아미노산으로 구성된 시베리아 철갑상어 혈청 트랜스페린의 예측 분자량(77.2 kDa)과 등전점(pI=6.70)은 여타 척추동물에서 보고된 바 있는 수치와 크게 다르지 않았고, 잠재적 signal peptide (19개 아미노산; cleavage site: Ala¹⁹-Ala²⁰)의 길이 역시 유사하였다(Liu et al., 2010; Lambert, 2012; Mohd-Padil et al., 2013). 한편 시베리아 철갑상어 트랜스페린은 NetNGlyc-1.0 도구를 이용한 예측을 통해 Asp⁵⁰⁷에서 N-glycosylation이 예측되었으나 그 확률 값은 높지 않아 (potential score=0.5611), 실측에 의한 검증이 필요하다고 생각된다. 단백질 도메인(domain) 예측 분석에서 시베리아 철갑상어 혈청 트랜스페린은 여타 척추동물의 ortholog들과 마찬가지로 2개의 전형적인 트랜스페린 도메인[316-aa의 N-domain (26th-341st; e-value 1.77e-148)과 350-aa의 C-domain (345th-694th; e-value 3.76e-161)]을 나타내었다(Fig. 1) (Lambert, 2012; Mohd-Padil et al., 2013). 종래 척추동물 트랜스페린 유

전자의 분자 진화 연구를 통해서 해당 두 도메인은 공통 조상 유전자(common ancestral gene)로부터 유전자 복제(gene duplication)를 통해 형성된 결과물로 알려져 있다(Lambert, 2012; Cao, 2022). 두 도메인 사이에 유사 서열과 보존된 아미노산 잔기들의 존재를 확인할 수 있었고, 특히 InterPro 분석을 통해 각 도메인에서 예측된 2개의 철 결합 위치(106th-115th 및 204th-220th in N-domain; 444th-453rd 및 542nd-557th in C-domain)에서 높은 상동성을 보임으로써 척추동물내 트랜스페린 유전자 진화 가설과 잘 일치하였다. 철갑상어 트랜스페린의 두 도메인은 아미노산 서열 수준에서 39.3%의 상동성(% identity; alignment not shown)을 나타내었으며 해당 상동성 수치는 종래 어류에서 알려져있는 트랜스페린 N-/C-도메인간의 상동성 수준과 유사하였다(Cao, 2022; Luo et al., 2022). 그러나 N-domain과 C-domain은 theoretical pI 값에서 각각 6.54 및 7.75를 비교적 큰 차이를 나타내었는데 이는 어류를 위시한 척추동물 트랜스페린의 두 도메인 사이에 진화과정 중 기능적인 분화(functional differentiation)가 진행되고 있다는 연구가설과 일맥 상통하였다(Cao, 2022). 이와 관련하여 철 결합 능력, 항균 기능 정도, 기타 금속과의 결합 능력 등과 관련한 도메인별 평가를 통해 조기강어류(Actinopterygii)의 prototype일 가능성이 높은 철갑상어 트랜스페린을 대상으로 도메인 분화정도에 관한 후속 평가 연구가 뒤따라야 할 것이다.

시베리아 철갑상어 트랜스페린 708-aa 서열을 이용, Swiss-Model 데이터베이스 내 철 결합을 포함하는 혈청 타입의 트랜스페린 주형(di-ferric serotransferrin template)을 중심으로 모델을 구축하였다. 최종 모델 구축에 사용한 주형은 인간 혈청 트랜스페린(2×Fe; 3v83.6.A) 및 돼지 혈청 트랜스페린(2×Fe; 1h76.1.A)이었으며 이들 주형을 이용할 Global Model Quality Estimate (GMQE) 값은 각각 0.73 및 0.72 였고, QMEAN-DisCo global score는 0.72 및 0.71 (±0.05)였다. 주형과 모델 간 coverage는 인간 트랜스페린 주형을 이용할 경우 0.91 (25th-703rd; sequence identity=52.48%), 돼지 트랜스페린 주형을 이용할 경우 0.92 (23rd-703rd; sequence identity = 51.07%)에 해당하였으며, 본 분석에서 19개 signal peptide 서열을 모델링에 포함한 점을 고려할 때 구축된 모델은 트랜스페린 영역 대부분을 반영하는 모델임을 알 수 있었다. 구축한 두개 모델은 서로 큰 차이 없이 앞서 기존 척추동물 트랜스페린 3D 구조에서 제안된 bi-lobal 형태를 보였고, N-lobe 및 C-lobe는 β-sheet 및 α-helix 구조를 순차적으로 반복하는 서로 유사한 globular 구조를 각각 나타내었다(Wang et al., 2012; Luo et al., 2022). N-lobe와 C-lobe 사이에 짧은 interlobal bridge가 관찰되었는데, 3D 모델에서 예측된 연결부위(Ser³⁷⁷-Pro³⁴⁴)가 앞서 InterPro 분석과 SMART 분석에서의 예측길이(Thr³⁴²-Pro³⁴⁴)보다 다소 긴 길이로 차이가 있어 향후 실측 절단 실험을 통한 확인이 필요할 것으로 생각되었다. 구축한 모델을 통해서 철 이온과 상호작용이 예측되는 아미노산 잔기(iron-coordinating amino acid

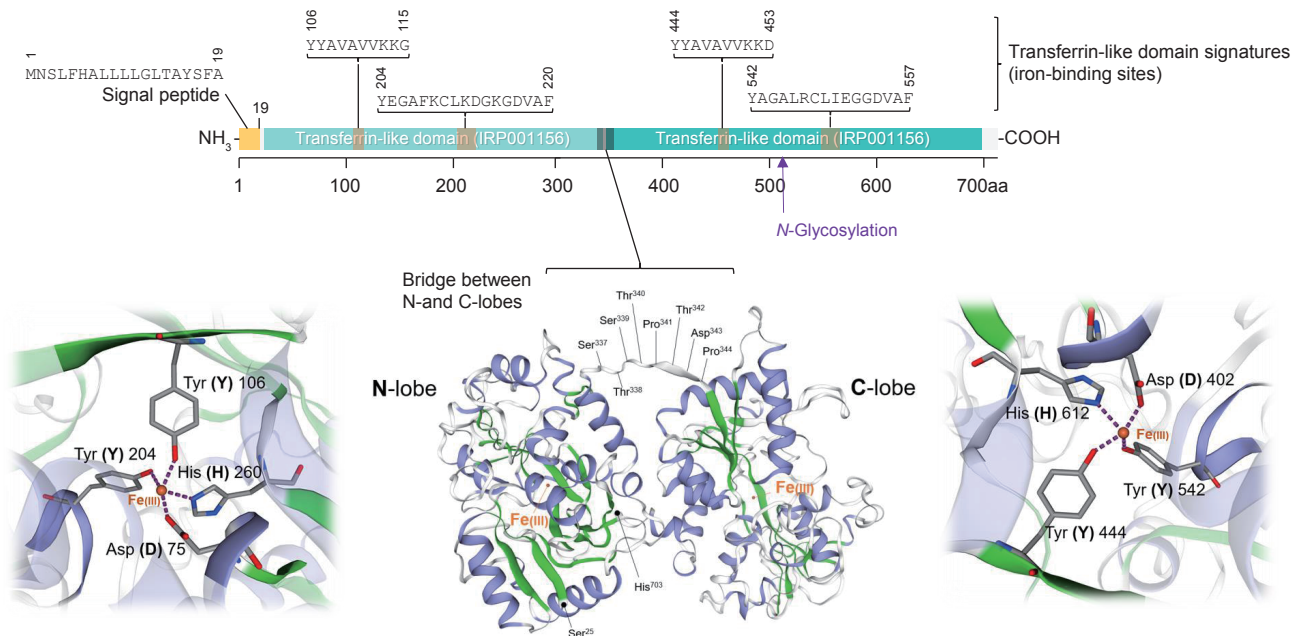


Fig. 1. Schematic representation showing the predicted domain architecture and 3D model for Siberian sturgeon *Acipenser baerii* serum transferrin (serotransferrin). Upper, Domains, motif signatures and signal peptide of *A. baerii* transferrin predicted with InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>); Lower, 3D structure homology model for bi-lobal *A. baerii* transferrin. Model was generated with human diferric serotransferrin template (3v83.6.A) by ExPasy Swiss-Model Workspace (<https://www.expasy.org/resources/swiss-model-workspace>). Two close-up views each for N-lobe and C-lobe show four conserved iron-coordinating residues (D⁷⁵/D⁴⁰², Y¹⁰⁶/Y⁴⁴⁴, Y²⁰⁴/Y⁵⁴², H²⁶⁰/H⁶¹²).

residues)를 예측한 결과(protein-ligand interaction pipeline 분석), N-lobe에서는 Asp⁷⁵, Tyr¹⁰⁶, Tyr²⁰⁴, His²⁶⁰으로 나타났으며, C-lobe에서 역시 N-lobe에서와 동일 아미노산 잔기 4개가 예측되어(Asp⁴⁰², Tyr⁴⁴⁴, Tyr⁵⁴², His⁶¹²) 철 이온 결합 부위에서 N-lobe와 C-lobe의 구조적 상동성을 잘 보여주었다(Fig. 1) (Teng et al., 2017; Charlie-Silva et al., 2019; Luo et al., 2022).

발생 배에서 트랜스페린 mRNA의 발현 패턴

트랜스페린 유전자 발현은 시베리아 철갑상어 배 발생 과정 중 큰 폭의 변화를 나타내어 발생단계에 따른 유의적인 발현 조절이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 2). 인공수정 직후(ST1)에서 관찰된 발현 수준은 제1난황이 일어나는 ST2에 소폭의 증가를 보였으나, 이후 난황 단계와 포배기를 거치는 동안에 점진적인 감소를 나타내었다(ST2-ST10) ($P < 0.05$). 그러나 낭배기 개시점(ST10)부터 전신형성이 명확해지는 ST19 단계까지 다시 점진적인 트랜스페린 mRNA의 수준이 증가하였고 전신(pro-nephros)와 심장(heart) 형성기인 ST23 단계에서 급격한 발현이 증가를 통해 전 발생 과정 중 최고점을 나타내었다($P < 0.05$). 반면 ST23에 뒤이어 ST25 (심장 박동 시작) 단계에서는 다시 발현의 감소를 보였으며($P < 0.05$), ST28 단계(꼬리 신장 등)까지 큰 발현 수준의 변화가 없었고($P > 0.05$), 이후 부화가 개시되는 ST29 시점에서 발현 수준의 재증가가 관찰되었다($P < 0.05$).

배 발생 단계는 지속적이고 반복적인 DNA 합성, 세포 분열 증식, 세포 분화가 일어난다는 점에서 적절한 철 이온의 세포 공급이 중요시되며, 따라서 철의 안전한 세포 수송을 담당하기 위한 트랜스페린의 역할이 중요시된다(Ding et al., 2015; Cordero et al., 2016). 철갑상어와 같이 체외 수정 및 체외 발생을 보이는 어류의 경우 배(embryo)는 발생 초기에 필요한 핵산, 단백질 및 영양성분 등을 어미로부터 제공받는 '모계 공급(maternal provision)' 기작이 성공적인 발생을 위해 매우 중요시되는데(Valipour et al., 2018; Kim et al., 2020), 본 연구 결과 인공 수정 처리 직후에 이미 일정량의 트랜스페린 mRNA가 수정란에서 검출된다는 점에서 시베리아 철갑상어 발생에서 수정란 내 모계 공급에 의한 트랜스페린 mRNA의 탑재가 중요함을 시사하고 있다. RT-qPCR 분석 결과, 트랜스페린 mRNA 수준이 난황(cleavages)과 포배기를 거치는 동안 계속 감소하였다가 이후 점진적인 발현 수준의 증가를 보였는데, 이는 발생 초기 모계 기원의 트랜스페린 transcripts의 사용에 따른 감소 후 배 자체의 신규 합성(*de novo synthesis*)으로 전환되는 전형적인 'maternal-zygotic transition' 패턴을 반영한다고 판단된다(Kim et al., 2020). 이후 ST20-ST24 구간에서 ST23 시점을 최고 정점으로하는 트랜스페린 발현 peak 구간을 보였는데 해당 구간은 본 철갑상어 어종에서 가장 많은 형태변화와 다양한 기관의 기본 원형(rudimentary forms)이 발달하는 구간으로서 이

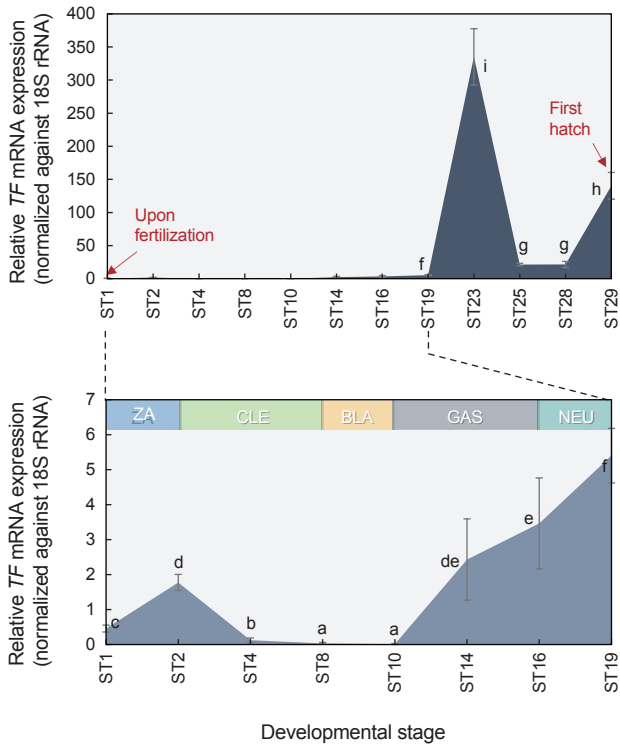


Fig. 2. Expression pattern of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* transferrin (*TF*) mRNA during embryo development from stage 1 (ST1; just fertilization) to stage 19 (ST19; the first hatching). Detailed embryological characteristics and time to reach each stage refer to Park et al. (2013a). Expression levels from ST1 to ST19 corresponding to stages of zygotic activation (ZA), cleavages (CLE), blastulation (BLA), gastrulation (GAS) and neurulation (NEU) are shown in magnified Y-axis scale for clarity. mRNA, Messenger ribonucleic acid. Different letters (a-i) indicate statistical difference at $P < 0.05$ based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

구간에 전신(pronephros), 심장(heart) 및 체절(somite) 등이 만들어지고 해당 구간 직후 심장 박동과 혈액순환이 바로 개시된다는 점에서 혈관 및 혈구세포생성(erythropoiesis) 역시 개시되는 발생 구간에 해당한다(Park et al., 2013a; Gisbert and Nam, 2018). 따라서 조혈기관인 두신의 원형인 전신의 분화 및 적혈구 생성에 있어 트랜스페린에 의한 철 항상성 조절의 중요성을 강조하는 선행 연구 결과들과 상통한다(Höhne et al., 2021). 반면, 부화 시점에 근접한 구간에서 다시 트랜스페린 발현 수준이 재증가하는 경향을 보였는데, 이는 부화를 통해 그간 배(embryo)를 보호하고 있던 난막이 제거되고 난황자어가 외부 환경의 감염 미생물에 직접 노출됨에 대한 대응 전략의 일환으로서 항균 단백질 등 생체 방어 단백질의 발현 증가가 일어난다는 선행 연구의 연구 가설과 일치하였다(Cordero et al., 2016;

Kim et al., 2019b).

난황자어(prolarva) 발달 단계에서 트랜스페린 유전자 mRNA의 발현 패턴

난황자어기 트랜스페린 발현 패턴은 본 종의 난황자어 발달(ontogenic development) 및 행동학적 유영 특성과 밀접한 상관 관계를 나타내었다(Fig. 3) (Park et al., 2013b). 부화 직후(0 DPH) 시베리아 철갑상어 난황자어로부터 3 DPH까지 관찰되는 점진적인 트랜스페린 mRNA 발현의 증가는(0 DPH에서 발현 수준의 약 2배까지 증가; $P < 0.05$) 부화자어에서 발달한 혈관망(blood vessel network) 확장과 혈액 순환(blood circulation) 요구의 증가에 따라 철 수송 및 조절 요구가 함께 증가하였기 때문으로 생각되며, 아울러 해당 구간에 철갑상어 난황자어에서 노출 아가미(external gills)의 발달이 개시되면서 모세혈관의 확장 역시 트랜스페린 요구의 증가와 관련이 있다고 판단된다(Park et al., 2013b). 행동학적 측면에서 0-3 DPH 구간은 난황자어가 수동적 표류 행동(passive drifting behavior)로부터 능동적인 장거리 표층 유영(active pelagic swimming)으로 전환하는 시점임을 고려할 때, 왕성한 호흡에 따른 산소 소비 증가와 비례하여 철 결합 적혈구의 필요성이 계속 증가하는 구간에 해당한다(Gisbert and Nam, 2018). 또한, 내부 장기의 조직학적 발달 측면에서, 시베리아 철갑상어를 포함한 여러 철갑상어 난황자어는 2-4 DPH에 트랜스페린 mRNA의 주 합성 기관인 초기 간이 발달하는 시기로 알려져 있는데(Gisbert et al., 1999), 제브라피시(*Danio rerio*) *in situ* hybridization 실험을 통해서 트랜스페린 mRNA 발현 위치가 초기 난황세포층(yolk syncytial layer, YSL)에서 간 발달 이후 자어에서 간으로 집중됨을 보고한 바 있다(Mudumana et al., 2004).

3 DPH에서 최고 정점을 기록한 이후 저서 움직임(bottom movement)으로 전환되기 시작하는 4 DPH에서 트랜스페린 발현양이 다시 감소하였으며, 이어 후속 난황자어 발달단계와 자어기 진입시까지 발현 감소가 지속되었다. 4 DPH 이후 주류성(rheotaxis)과 군집 행동(schooling behavior)이 본격화되는 5-7 DPH 구간에서 추가적인 발현 감소가 관찰되었고($P < 0.05$), 군집행동의 최고조를 지나 군집 후 휴지기(post-schooling rest; 7-9 DPH)로의 진입 및 외부 먹이전환(9-10 DPH) 단계에서는 더욱 낮은 발현 수준을 보였다($P < 0.05$) (Fig. 3). 이러한 지속 감소 패턴은 트랜스페린 발현이 간 조직으로 집중화된 후 다른 기관 및 난황자어 몸체 크기의 발달이 왕성해지는 시기에서 간이 전어체(난황자어 전체 biomass)에서 차지하는 비중이 상대적으로 점차 줄어들며 따라 전어체를 대상으로 한 RNA 분리 시 간 특이적 트랜스페린 mRNA의 비중이 total RNA pool에서 감소하였을 가능성을 시사하고 있으며 제브라피시 트랜스페린 mRNA의 Northern blot 분석서 유사한 결과가 보고된 바 있다(Mudumana et al., 2004). 또한 행동학적 측면에서, 4 DPH 이후 시베리아 철갑상어는 표층 유영에서 저층 움직임으로 전

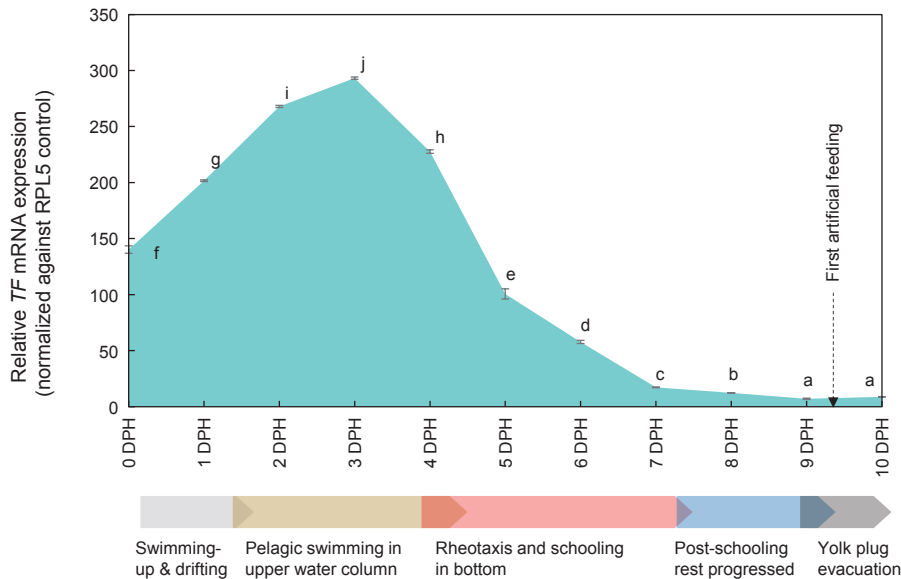


Fig. 3. Modulation pattern of transferrin (*TF*) mRNA during the ontogenic development (days post hatching, DPH) of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* prolarvae, as assessed by RT-qPCR assay. Brief summary on behavioral alterations during prolarval ontogeny is also provided at bottom. Detailed descriptions on morphological differentiations, swimming behaviors and prolarval growth during this period refer to our previous work (Park et al., 2013b). mRNA, Messenger ribonucleic acid; Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Different letters (*a-j*) indicate statistical difference at $P < 0.05$ based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

환 후 주류성과 군집성을 보이는 시기에는 장거리 유영 없이 에너지 소비가 적은 행동 양상을 나타내므로 산소 수송의 요구 정도가 이전 표층 장거리 유영 시기에 비해 상대적으로 낮아짐을 반영한다고 생각된다. 특히 군집 후 휴지기는 난황흡수 기반의 endogenous nutrition 방식에서 외부 먹이 섭취를 위한 exogenous nutrition 방식으로의 전환을 준비하기 위해 운동에 의한 에너지 소비를 최소화하고 소화기 시스템 발달을 준비하는 과정으로 알려져 있으며, 해당 구간에서 시베리아 철갑상어 난황자어는 바닥에서 유영이나 움직임이 거의 없는 독특한 행동을 표현한다(Gisbert and Nam, 2018). 이미 시베리아 철갑상어에서 일부 생체 방어 관련 유전자 발현이 본 휴지기에 급격히 줄어든다는 결과가 보고되어 있어 본 연구의 트랜스페린 유전자 발현 양상과 유사하였다(Kim et al., 2019b, 2021).

치어 조직에서 트랜스페린 유전자의 발현 분포 및 수준

RT-qPCR 분석 결과, 시베리아 철갑상어 트랜스페린 transcripts는 치어 시기에 조사한 11개 체세포 조직 모두에서 검출 가능한 광범위한 조직 분포 양상을 나타내었다. 그러나 발현 수준의 경우 조직 간 큰 차이가 있었으며 예상대로 트랜스페린 mRNA 발현은 간(liver)에서 고도로 집중되는 경향을 나타내었다($P < 0.05$). 상대 정량 분석 결과를 토대로, 간에서 발현하는 트랜스페린 mRNA의 양은 다른 모든 조직에서 발현하는 양의 총합보다 높았다. 간 다음으로 피부(skin) 및 근육(muscle)이 상대적으로 높은 발현 수준을 보였으며($P < 0.05$) 그 외 조직 중

류 중 소화관, 비장, 심장에서는 트랜스페린 mRNA 발현이 매우 미비하였다. RPL5 및 RPL7 두 내재 대조군 유전자를 이용한 normalization에서, 비록 절대 수치와 유전자 발현이 미비한 일부 조직간 순서가 완전히 일치하지는 않았지만, 상대 발현에 관한 전반적 경향은 서로 크게 다르지 않았다(Fig. 4).

RT-qPCR을 토대로 시베리아 철갑상어 트랜스페린 mRNA 발현이 간에서 우점 또는 집중되는 경향은(predominant expression) 기존 어류에서 보고된 대부분의 결과와 다르지 않아 차이가 없었으나, 그 외 조직에서의 상대 발현 수준은 종래의 연구 결과와 비교 시 작지 않은 차이를 나타내었다(Neves et al., 2009; Reyes-Becerril et al., 2016; Cao, 2022; Luo et al., 2022).

특히 연질어강(Chondrostei)에 속하는 시베리아 철갑상어의 경우 간을 제외한 조직 중 피부와 근육에서 상대적으로 가장 높은 발현을 나타내었는데, 근육에서의 높은 발현은 일반적으로 진골어류(teleosts)에서 잘 관찰되지 않는 결과에 해당한다(Yin et al., 2018; Cao, 2022). 또한 피부에서 높은 트랜스페린 유전자 발현은 본 어종에서 피부의 점막면역과 트랜스페린의 연관 가능성을 시사하고 있으며(Esteban, 2024), 추후 감염 자극 시 피부에서의 차등 발현 특성에 관한 연구가 필요할 것이다. 반면, 시베리아 철갑상어에서 가장 낮은 발현을 보이는 심장, 비장, 소화관의 경우 제브라피시(심장, 소화관) 및 *Megalobrama amblycephala* (비장)에서 상대적으로 간 이외에 상대적으로 높은 발현을 보이는 조직에 해당하여 큰 차이가 있었다(Mudumana

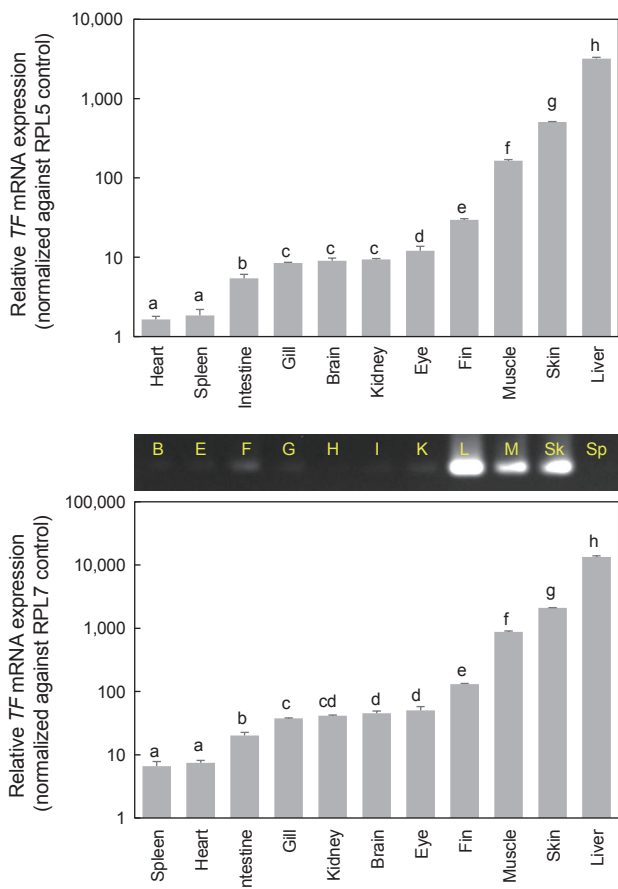


Fig. 4. Tissue distribution patterns and mRNA expression levels of transferrin (*TF*) in Siberian sturgeon *Acipenser baerii* fingerlings as assessed by RT-qPCR assay using two different reference genes (for normalization) *RPL5* and *RPL7*. Y-axis of each graph is shown in logarithmic scale intervals. A representative ethidium-bromide-stained gel showing end-point RT-PCR products of transferrin amplified from the same tissue sources [brain (B), eye (E), fin (F), gill (G), heart (H), intestine (I), kidney (K), liver (L), muscle (M), skin (Sk), and spleen (S)] is also provided between the two graphs for RT-qPCR assays. mRNA, Messenger ribonucleic acid; RT-qPCR, Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Different letters (*a-h*) indicate statistical difference at $P < 0.05$ based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

et al., 2004; Ding et al., 2015). 한편, 본 시베리아 철갑상어와 동일 속에 속하는 스틸렛 철갑상어 연구에서 트랜스페린 유전자 transcripts가 수컷 성체의 생식소에서 활발한 발현을 보이며 트랜스페린이 일부 다른 어종에서 알려진 것처럼 수컷 배우자의 최종 성숙 품질과 밀접한 관계가 있음이 보고된 바 있어(Xin et al., 2019), 추후 치어기가 아닌 성체 조직에서의 발현 양상에 관한 비교 조사가 추가적으로 수행될 필요성이 있다.

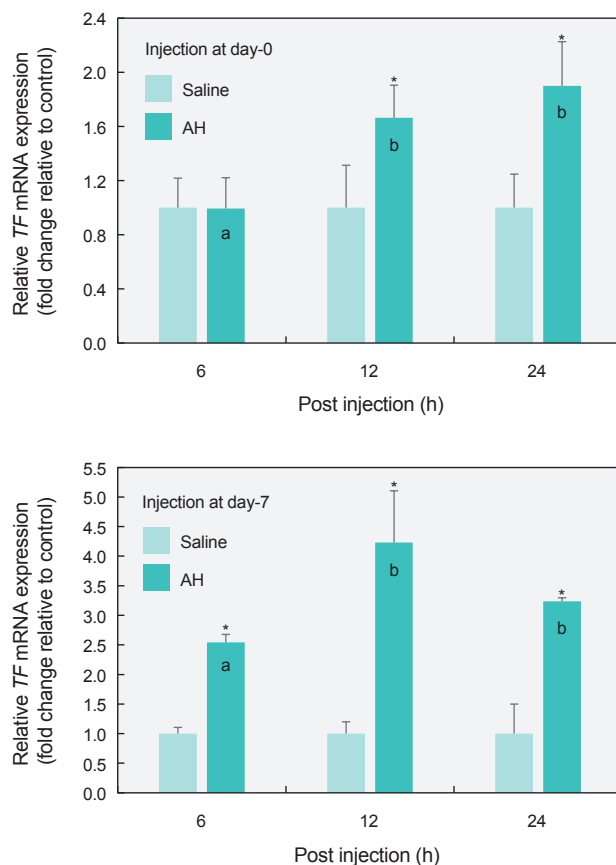


Fig. 5. Differential expression of transferrin (*TF*) mRNA in Siberian sturgeon *Acipenser baerii* prolarvae microinjected with *Aeromonas hydrophila* (AH; 1×10^4 CFU/g body weight) at ages Day-0 (upper) and day-7 (lower), respectively. Expression levels (induced folds) relative to those of control prolarvae microinjected with saline were assessed by RT-qPCR assay based on normalization against the *RPL5* internal control at 6, 12, and 24 h post-injection (HPI). mRNA, Messenger ribonucleic acid; RT-qPCR, Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Within a given age, different letters (*a, b*) indicate statistical difference at $P < 0.05$ based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test, while asterisks (*) mean the statistical difference at $P < 0.05$ between saline- and AH-injected groups with

A. hydrophila 미세현미주입 시 난황자어에서 트랜스페린의 차등 발현 패턴

갯 부화한 난황자어(day-0)에 *A. hydrophila* 미세현미주입한 결과, 주입 후 6시간째(6 h post injection, HPI)에는 생리식염수 주입구와 세균 주입구 사이의 트랜스페린 발현 차이가 관찰되지 않았으나($P > 0.05$), 12 HPI 및 24 HPI에서 대조군 대비 1.7-1.9배의 발현 증가를 나타내었다($P < 0.05$). 반면, day-7 난황자어를 이용한 실험의 경우 day-0 자어를 이용한 실험과 달

리 6 HPI에서 유의적인 트랜스페린 발현의 증가가 관찰되었고 ($P < 0.05$), 그 유도 발현 폭(대조군 대비 2.5배) 역시 day-0에서 보다 큰 폭의 발현 증가를 나타내었다. 이후 12 HPI에서 발현 증가가 더욱 선명하게 나타나 생리식염수 주입 대조군 대비 4 배 이상의 유도발현을 보였으며($P < 0.05$), 24 HPI에는 발현 수준이 소폭 다시 감소하였으나(대조군 대비 3.2배) 12 HPI와 24 HPI간 통계적인 유의차는 관찰되지 않았다($P > 0.05$) (Fig. 5).

Day-0 (< 1 DPH)에 해당하는 시베리아 철갑상어는 어류에서 일반적인 면역 기관에 해당하는 신장, 비장, 흉선, 아가미 등을 분화된 형태로 갖추고 있지 않다(Gisbert and Nam, 2018). 따라서 상기의 차등 발현 결과는 면역기관이 발달하지 않은 초기 발달 단계에서도 세균 감염에 대한 방어 기작의 일환으로 트랜스페린이 관여할 수 있음을 보여주고 있다. 비록 해당 유도발현의 부위 또는 세포 유형을 특정하기 위한 후속 조사가 뒤따라야 하지만, 어류 내배엽(endoderm)기원 기관들이 발달하기 전 혈장 단백질(plasma protein)의 주 발현 부위는 YSL임이 보고된 바 있다(Mudumana et al., 2004). 다만 세균 주입 시 트랜스페린 발현의 유도 발현 폭은 간의 분화와 발달이 진행된 후기 난황자어에서(day-7) 더욱 크게 유도되는 것으로 나타났는데, 이는 트랜스페린의 주 발현 장소가 간으로 집중된 후 면역 자극에 대한 간 특이적 발현 기능의 획득에 의한 결과라고 판단된다.

종래 어류 트랜스페린 연구에서 세균 감염 시 트랜스페린의 발현은 대부분 증가(upregulation) 경향을 보이지만, 일부 어종에서는 반대로 감소 반응(downregulation)을 나타내어 어종 별 조절 방향에 차이가 있음이 보고된 바 있다(Asmamaw, 2016; Reyes-Becerril et al., 2016). 본 연구 결과 시베리아 철갑상어 난황자어는 두 자극 시점(day-0 및 day-7) 모두에서 차등 발현 조절이 '발현 증가' 방향으로 나타나며, 감염 초기 신속한 유도(12 HPI 또는 6 HPI)가 이루어지지만 후속 시점(24 HPI)까지 지속적인 추가 증가는 관찰되지 않는다는 점을 고려할 때, 본 종의 초기 발달 시기에 트랜스페린은 '양성 APP'로서 방어에 작용하는 것으로 판단된다(Sun and Zhang, 2014; Charlie-Silva et al., 2019). 그러나 난황자어에서 나타난 차등발현 증가 폭이 매우 크게 유도되지 않았으므로(특히 day-0 자어에서) 양성 AAP의 역할을 보다 선명히 가설하기 위해서는 비장 등 여러 면역기관이 충분히 발달한 미성어 또는 준성어를 대상으로 추가 비교 검증이 뒤따라야 할 것이다(Gradil et al., 2014; Höhne et al., 2021).

사 사

본 연구는 부경대학교 자율창의연구사업(2021년)의 지원에 의해 수행되었음.

References

Asmamaw B. 2016. Transferrin in fishes: A review article. J

Coastal Life Med 4, 176-180. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016j5-255>.

- Cao J. 2022. Functional divergence of the N-lobe and C-lobe of transferrin gene in *Pungitius sinensis* (Amur Stickleback). *Animals* 12, 3458. <https://doi.org/10.3390/ani12243458>.
- Charlie-Silva I, Klein A, Gomes JMM, Prado EJR, Moraes AC, Eto SF, Fernandes DC, Fagliari JJ, Corrêa Junior JD, Lima C, Lopes-Ferreira M, Conceição K, Manrique WG and Belo MAA. 2019. Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. *Sci Rep* 9, 4776. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41312-z>.
- Chen JH, Wang CH, Li YL, Wang HM, Zhang XJ and Yan BL. 2014. cDNA cloning and expression characterization of serum transferrin gene from oriental weatherfish *Misgurnus anguillicaudatus*. *J Fish Biol* 84, 885-896. <https://doi.org/10.1111/jfb.12307>.
- Chesneau V. 2018. Immunology in sturgeons with a focus on the Siberian sturgeon mechanisms, responses to stress and stimulation. In: *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 - Farming*. Williot P, Nonnotte G and Chebanov M, eds. Springer, Cham, Switzerland, 373-402.
- Cordero H, Guzmán-Villanueva LT, Chaves-Pozo E, Arizcun M, Ascencio-Valle F, Cuesta A and Esteban MA. 2016. Comparative ontogenetic development of two marine teleosts, gilthead seabream and European sea bass. *Dev Comp Immunol* 65, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.011>.
- Ding Z, Zhao X, Su L, Zhou F, Chen N, Wu J, Fu X, Wu F, Wang W and Liu H. 2015. The *Megalobrama amblycephala* transferrin and transferrin receptor genes: Molecular cloning, characterization and expression during early development and after *Aeromonas hydrophila* infection. *Dev Comp Immunol* 49, 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.12.010>.
- Esteban MA. 2024. A review of soluble factors and receptors involved in fish skin immunity: The tip of the iceberg. *Fish Shellfish Immunol* 145, 109311. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109311>.
- Gisbert E and Nam YK. 2018. Early ontogeny in the Siberian sturgeon. In: *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1 - Biology*. Williot P, Nonnotte G, Vizziano-Cantonnet D and Chebanov M, eds. Springer, Cham, Switzerland, 131-158.
- Gisbert E, Sarasquete MC, Williot P and Castelló-Orvay F. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. *J Fish Biol* 55, 596-616. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00702.x>.
- Gradil AM, Wright GM, Wadowska DW and Fast MD. 2014. Ontogeny of the immune system in Acipenserid juveniles. *Dev Comp Immunol* 44, 303-314. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.01.006>.
- Höhne C, Prokopov D, Kuhl H, Du K, Klopp C, Wuertz S, Tri-

- fonov V and Stöck M. 2021. The immune system of sturgeons and paddlefish (Acipenseriformes): A review with new data from a chromosome-scale sturgeon genome. *Rev Aquac* 13, 1709-1729. <https://doi.org/10.1111/raq.12542>.
- Jurecka P, Wiegertjes GF, Dietrich M, Forlenza M, Kamińska-Gibas T, Pilarczyk A, Savelkoul HFJ, Ciereszko A and Irnazarow I. 2021. Differences in growth of *Trypanoplasma borreli* in carp serum is dependent on transferrin genotype. *Fish Shellfish Immunol* 114, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.011>.
- Kamińska-Gibas T, Szczygieł J, Jurecka P and Irnazarow I. 2020. The many faces of transferrin: Does genotype modulate immune response?. *Fish Shellfish Immunol* 102, 511-518. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.001>.
- Kawabata H. 2019. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Rad Biol Med* 133, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>.
- Kayış Ş, Er A, Kangel P and Kurtoğlu İZ. 2017. Bacterial pathogens and health problems of *Acipenser gueldenstaedtii* and *Acipenser baerii* sturgeons reared in the eastern Black Sea region of Turkey. *Iran J Vet Res* 18, 18-24.
- Kim CH, Kim EJ and Nam YK. 2019a. Chondrosteian sturgeon hepcidin: An evolutionary link between teleost and tetrapod hepcidins. *Fish Shellfish Immunol* 88, 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.045>.
- Kim CH, Kim EJ and Nam YK. 2019b. Subfunctionalization and evolution of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) isoform genes in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), a primitive chondrosteian fish species. *Fish Shellfish Immunol* 93, 161-173. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.040>.
- Kim CH, Kim EJ and Nam YK. 2021. Superoxide dismutase multigene family from a primitive chondrosteian sturgeon, *Acipenser baerii*: Molecular characterization, evolution, and antioxidant defense during development and pathogen infection. *Antioxidants* 10, 232. <https://doi.org/10.3390/antiox10020232>.
- Kim CH, Kim EJ, Seo CH and Nam YK. 2020. Transcriptome analysis of maternal gene transcripts in unfertilized eggs of *Misgurnus anguillicaudatus* and identification of immune-related maternal genes. *Int J Mol Sci* 21, 3872. <https://doi.org/10.3390/ijms21113872>.
- Kim EJ and Nam YK. 2018. Anesthetic protocol for microinjection-related handling of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*; Acipenseriformes) prolarvae. *PLoS One* 13, e0209928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209928>.
- Lambert LA. 2012. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1820, 244-255. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.002>.
- Liu H, Takano T, Abernathy J, Wang S, Sha Z, Jiang Y, Terhune J, Kucuktas H, Peatman E and Liu Z. 2010. Structure and expression of transferrin gene of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish Shellfish Immunol* 28, 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.014>.
- Luo L, Chang Y, Sun B, Su B, Zhang L, Nie L, Chen J and Liang L. 2022. Molecular characterization and expression analysis of the transferrin gene in amur ide (*Leuciscus waleckii*) in response to high alkaline stress. *J Appl Ani Res* 50, 1-12. <https://doi.org/10.1080/09712119.2021.2016419>.
- Mohd-Padil H, Mohd-Adnan A and Gabaldón T. 2013. Phylogenetic analyses uncover a novel clade of transferrin in non-mammalian vertebrates. *Mol Biol Evol* 30, 894-905. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss325>.
- Mudumana SP, Wan H, Singh M, Korzh V and Gong Z. 2004. Expression analyses of zebrafish transferrin, ifabp, and elastase B mRNAs as differentiation markers for the three major endodermal organs: Liver, intestine, and exocrine pancreas. *Dev Dyn* 230, 165-173. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20032>.
- Neves JV, Wilson JM and Rodrigues PNS. 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. *Dev Comp Immunol* 33, 848-857. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.02.001>.
- Park CH, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013a. Embryonic development of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* under hatchery conditions: An image guide with embryological descriptions. *J Fish Aquat Sci* 16, 15-23. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0015>.
- Park CH, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013b. Effects of incubation temperature on egg development, hatching and pigment plug evacuation in farmed Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Fish Aquat Sci* 16, 25-34. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0025>.
- Reyes-Becerril M, Angulo C, Angulo M and Ascencio-Valle F. 2016. Changes in transferrin gene expression after exposure to iron and *Aeromonas hydrophila* infection in yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*). *Agri Gene* 1, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2016.04.002>.
- Schmittgen TD and Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Stafford JL and Belosevic M. 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: Identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev Comp Immunol* 27, 539-554. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00138-6).
- Stafford JL, Neumann NF and Belosevic M. 2001. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Dev Comp Immunol* 25, 101-115. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(00\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(00)00048-3).
- Sun W, Li Z and Zhang S. 2014. Acute phase response in zebrafish embryo/larva with special emphasis on LPS-induced changes in expression pattern of acute phase protein genes. *J Mar Biol Assoc UK* 94, 1569-1580. <https://doi.org/10.1017/S0025315414000150>.

- Teng T, Xi B, Xie J, Chen K, Xu P and Pan L. 2017. Molecular cloning and expression analysis of *Megalobrama amblycephala* transferrin gene and effects of exposure to iron and infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Physiol Biochem* 43, 987-997. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0346-3>.
- Valipour A, Heidari B, Hadavi M and Yousefi A. 2018. Changes in immune parameters (lysozyme, IgM, C3) in early life stages and broodstock of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Fish Aquat Life* 26, 21-30. <https://doi.org/10.2478/aopf-2018-0003>.
- Wang ZS, Qi ZT, Zhang QH, Qiu M, Huang JT, Zhao WH and Guo XJ. 2012. The cDNA sequence of the transferrin gene in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and its transcriptional changes under acute hypoxic stress. *Ital J Anim Sci* 11, e74. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e74>.
- Xin M, Vechtova P, Shaliutina-Kolesova A, Fussy Z, Loginov D, Dzyuba B, Linhart O, Boryshpolets S, Rodina M, Li P, Loginova Y and Sterba J. 2019. Transferrin identification in sterlet (*Acipenser ruthenus*) reproductive system. *Animals* 9, 753. <https://doi.org/10.3390/ani9100753>.
- Yin X, Mu L, Bian X, Wu L, Li B, Liu J, Guo Z and Ye J. 2018. Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol* 74, 530-539. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.023>.
- Yin X, Yang Y, Han K, Wu L, Wu H, Bian X, Wei X, Guo Z, Mu L and Ye J. 2019. Purification and functional characterization of serum transferrin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol* 88, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.060>.