

바다송사리(*Oryzias dancena*)의 재조합활성화 유전자 RAG1/2의 분자 특성 및 개체발생학적 발현 패턴

김태수 · 박주환 · 남윤권 · 김찬희*

국립부경대학교 수산생명과학부 양식응용생명과학전공

Molecular Characterization and Ontogenetic Expression Patterns of Recombination Activating Genes (RAG1/2) in Marine Medaka *Oryzias dancena*

Tae-Su Kim, Juhwan Park, Yoon Kwon Nam and Chan-Hee Kim*

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

Recombination activating genes (RAGs) play a crucial role in initiating V(D)J recombination, which is essential for developing adaptive immunity in vertebrates. In this study, we cloned and characterized RAG1/2 cDNA from the marine medaka *Oryzias dancena* (OdRAG1/2) and investigated their mRNA expression patterns during ontogenetic developmental stages. The OdRAG1 and OdRAG2 cDNA contained open reading frames (ORFs) encoding proteins containing 1,078 and 531 amino acids, respectively. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that OdRAG1 and OdRAG2 are highly conserved with their corresponding orthologs, featuring distinct core and non-core regions. Notably, expression analysis showed that, in contrast to other fish RAGs studied, OdRAG1/2 expression peaked at 0 days post-hatching (DPH). Additionally, for the expression of T and B cell differentiation markers, CD3 γ and CD20, also peaked at 0 DPH. Collectively, adaptive immunity in *O. dancena* potentially begins during embryonic development, which is critical for V(D)J recombination and essential immune component development, suggesting the early ontogenetic stage interactions between innate and adaptive immunity.

Keywords: Recombination activating genes (RAGs), Gene expression, Ontogeny, *Oryzias dancena*, Immune system

서론

어류의 면역 체계(immune system)는 고등 척추동물과 비교하여 일부 차이는 있으나 생리적으로 유사한 내재면역(innate immunity) 및 적응면역(adaptive immunity) 요소들을 보유하고 있으며, 이들은 각각 독립적인 방법 또는 상호작용하는 방식으로 감염에 대한 효율적인 면역 반응을 수행한다. 하지만 어류의 적응 면역은 척추동물의 원시적인 진화적 지위와 변온동물(poikilotherm)의 특성으로 인하여 항체의 레퍼토리(repertoire) 다양성, 친화력 성숙(affinity maturation) 및 면역학적 기억(immunological memory)에 제한성을 가질 뿐만 아니라 림프구의 분화 및 증식이 고등 척추동물에 비해 지연됨이 알려

져 있다(Pasquier, 1982; Zapata et al., 2006; Buchmann et al., 2024). 따라서, 어류의 적응면역 반응은 온도에 독립적인 내재면역 반응에 비해 상대적으로 느리게 작동하고 비효율적으로 알려져 있다(Magnadóttir, 2006; Dixon et al., 2016; Smith et al., 2019). 어류는 다양한 병원성 인자가 존재하는 수생환경에서 초기 배아발달 및 개체발달 단계부터 서식하며, 이 시기는 주로 내재면역 반응에 의존적으로 생존하며, 개체 발생 초기에 적응면역 발달 지연으로 성어(adult fish)와 같은 완전한 면역 기능을 갖추기 전 병원성 인자로 인한 감염은 양식생물의 치어기 대량 폐사를 유발한다. 이로 인한 경제적 손실은 때때로 성공적인 상업적 양식 생산을 위한 위협으로 작용할 수 있다(Ransangan and Manin, 2010; Banerjee et al., 2014). 따라서 어류 초기 개

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5917 Fax: +82. 51. 629. 5910

E-mail address: chkim@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.2024.0239>

Korean J Fish Aquat Sci 57(3), 239-252, June 2024

Received 16 May 2024; Revised 14 June 2024; Accepted 18 June 2024

저자 직위: 김태수(대학원생), 박주환(학부생), 남윤권(교수), 김찬희(교수)

체 발생 단계의 면역체계 발달에 관한 연구는 어류 내재면역 및 적응면역의 역할을 확대할 수 있는 새로운 정보를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 자어 및 치어의 감염성 질병으로 인한 대량 폐사를 저감할 수 있는 새로운 전략을 수립하는데 도움을 줄 것이라 판단된다.

재조합 활성화 유전자(recombination activating genes, RAGs)인 RAG1과 RAG2 단백질은 척추동물의 B세포 수용체(B-cell receptor, BCR) 또는 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)과 T세포 수용체(T-cell receptor, TCR)를 암호화하는 가변(variable, V), 다양성(diversity, D), 이음(joining, J) 유전자 분절(gene segment)을 재배열하여 항원 수용체의 레퍼토리 다양성에 중요한 역할을 한다(Zhang et al., 2012; Braams et al., 2023; Chovatia et al., 2024). RAGs 단백질에 의한 항원 수용체 유전자 재배열 반응은 특정 재조합 신호 서열(recombination signal sequence, RSS)을 인식하고, RSS와 인접한 V(D)J 암호화 부분 사이의 DNA 이중가닥 절단(double-stranded breaks)으로 개시된다(Shlyakhtenko et al., 2009; Schatz and Swanson, 2011). RSS는 보존된 7 bp의 heptamer (CACAGTG) 서열과 9 bp의 AT-rich nonamer (ACAAAAACC), 그리고 그 사이에 V(D)J 재조합 과정에서 정확한 유전자 조각의 선택과 재배열을 보장하는 12/23 rule로 알려진 12 bp 또는 23 bp의 spacer 영역으로 구성된다(Tonegawa, 1983; Braams et al., 2023). DNA가 없는 상태에서 RAG1은 주로 homodimer 형태로 존재하며 RAG2는 monomer 형태 또는 다른 알려지지 않은 형태로 존재한다고 보고되었다(Bailin et al., 1999). 재조합 활성을 위해 DNA와 RAG1 및 RAG2 복합체는 2개의 heterodimer arm을 가진 “Y”자 형태의 heterotetrameric 구조를 형성한다(Bailin et al., 1999; Kim et al., 2015).

현재까지 어류를 포함한 다양한 척추동물부터 RAGs 유전자가 밝혀졌다(Carlson et al., 1991; Greenhalgh et al., 1993; Hansen, 1997; Willett et al., 1997; Peixoto et al., 2000; Zhang et al., 2012). RAG1과 RAG2는 T세포 및 B세포 초기발달 단계에서 높은 수준으로 발현되며, 다른 조직이나 세포유형에서는 발현되지 않아 어류를 포함한 척추동물의 적응면역 체계 발달 연구에 매우 유용한 지표로 밝혀졌다(Lam et al., 2004; Huttenhuis et al., 2005; Zhang et al., 2012; Lee et al., 2014; Braams et al., 2023; Chovatia et al., 2024). 그리고 적응면역 체계의 다른 분자들과 달리 RAGs는 어류부터 포유류에 이르기까지 잘 보존되어 있어 척추동물의 진화적 관계 분석을 위한 유용한 인자로 사용될 수 있다(Greenhalgh and Steiner, 1995; de Camargo and Nahum, 2005; Martin et al., 2023).

바다송사리는(*Oryzias dancena*)는 동갈치목(Beloniformes) 송사리과(Adrianichthyidae)에 속하는 경골어류로서, 인도, 미얀마 및 방글라데시 등지에 분포하고 기수 또는 담수에 서식하는 광염성 어류이다(Roberts, 1998; Song et al., 2009; Cho et al., 2010). *O. dancena*는 실내 사육 및 형태학적으로 암-수의 구

분이 용이하고, 세대 주기가 짧아 실험 모델동물로 많이 이용되고 있다(Lim et al., 2012; Park, 2021). 현재 *O. dancena*는 보고된 완전한 게놈 서열 정보가 없지만, 근연종인 *O. melastigma*의 게놈 서열 정보가 공개되어 있으며, 생식, 산란, 난발생 및 자치어의 형태 발달에 관한 생물학적·유전학적 정보가 축적되어 있어 초기 배아발생 및 개체 발생 연구를 위한 적합한 모델로 판단된다(Song et al., 2009; Cho et al., 2010; Lim et al., 2012; Park et al., 2016; Kim et al., 2018).

본 연구는 *O. dancena* 면역계의 초기 발달과정에 관한 이해와 정보를 제공하기 위해 RAG1 및 RAG2 유전자를 동정하고, 분자생물학적 특성을 규명하였으며, 초기 개체 발생과정에 따른 RAGs의 mRNA의 발현 특징을 조사하고자 하였다. 또한, B세포 발달과정에서 발현되는 B세포 마커인 CD20 및 T세포의 발달과정의 특이적인 마커 유전자인 CD3 복합체의 소단위인 CD3 γ 의 유전자 발현 양상을 비교하였다(Øvergård et al., 2009; Pavlasova and Mraz, 2020).

재료 및 방법

실험어

실험을 위한 바다송사리(*Oryzias dancena*) 친어는 부경대학교 수산과학대학 수해양종합실습센터 부속어장에서 관리하고 있는 계통이다. 사육수는 0.5% 염도(salinity)로 sea salt (Kent Marine, Acworth, GA, USA)를 사용하여 조제하였으며 일주일에 한번 70–80%씩 환수하였다. 자연산란 유도는 암컷 18마리(평균전장, 41.4 ± 1.4 mm)와 수컷 10마리(평균전장, 40.3 ± 4.0 mm)를 투명 유리수조(30 × 50 × 30 cm)에 수용하여 사육 온도 25 ± 1°C로 유지하면서 광주기(14L:10D)를 조절하며 수행되었다. 산란 직후 수정란은 부화망(망목, 180 × 180 μ m)이 설치된 원형 항온 수조(직경 × 깊이 = 10 × 10 cm)로 옮겨 초기발생, 부화, 자어 및 치어로 성장시켰다. 친어 사료는 초기미립자사료(Ewha Oil & Fat Ind Co., Ltd., Busan, Korea)와 배합사료(Love Larva No. 3, Hayashikane Sangyo Co., Ltd., Yamaguchi, Japan)를 동량 섞어 공급하였으며 자치어는 배합사료(Love Larva No. 1, Hayashikane Sangyo Co., Ltd.)를 1일 2회 공급하였다.

재조합활성화 유전자(recombination-activating genes, RAGs) 클로닝

바다송사리(*O. dancena*)로부터 RAG1/2 cDNA를 클로닝하기 위하여 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 데이터베이스의 *O. melastigma*의 RAG1 (GenBank 등록번호: XM_036212481) 과 RAG2 (GenBank 등록번호: XM_024282441)의 염기서열을 참조하여 5'-비번역 부위(5'-untranslated region, 5'-UTR)와 3'-비번역부위(3'-UTR)에서 해당하는 부분에 PCR (poly-

merase chain reaction) 프라이머(primers)들을 제작하였다. PCR을 위한 프라이머들의 염기서열은 Table 1에 나타내었다. Total RNA는 부화 후 45일령(45 days post hatching, DPH)의 치어 8마리로부터 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사의 권고방법에 따라서 추출하였다. 추출한 RNA의 정량 및 정성분석은 NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN, München, Germany)을 이용하여 흡광도비 260 nm/280 nm 및 260 nm/230 nm를 측정하였으며, 두 비율 모두가 1.8 이상인 것을 사용하였다. 역전사(reverse transcription) 반응은 total RNA 1 µg과 TOPscript™ RT DryMIX kit (Enzynomics, DaeJeon, Korea)를 사용하여 제조사의 권고방법에 따라 수행하였다. 역전사 산물인 first-strand cDNA는 멸균 증류수로 10배 희석 후 1µL를 PCR 증폭 반응의 주형으로 사용하였다. RAG1의 PCR 증폭 반응은 nTaq (Mg²⁺ Plus) kit (Enzynomics, DaeJeon, Korea)를 사용하여 최초 95°C에서 2분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초 동안 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 3분 30초 extension 반응을 30번 반복하였다. RAG2는 nTaq-HOT kit (Enzynomics, DaeJeon, Korea)를 사용하여 최초 95°C에서 10분 동안 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분 extension 반응을 30번 반복하여 PCR 증폭하였다. 증폭한 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동 뒤 해당 유전자들의 유무를 확인하고 정제하였다. 정제한 PCR 증폭산물은 제조사의 권고방법에 따라 TOPcloner™ TA vector (Enzynomics, DaeJeon, Korea)에 삽입한 후, 이를 대장균 DH5α에 형질 전환하여 colony를 배양하였다. 이후 무작위로 선별한 5개씩의 colony들에 대해 양방향으로 염기서열 분석하여 대표 cDNA 서열을 결정하였으며, *O. melastigma*의 RAG1과 RAG2의 염기서열과 비교 확인하였다.

O. dancena RAG1 (OdRAG1)과 OdRAG2의 *in silico* 분석

OdRAG1 및 OdRAG2 cDNA의 개방형 해독틀(open reading frame, ORF)의 아미노산 서열은 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 프로그램을 사용하여 분석하였으며, 분자량 및 이론적 등전점(theoretical pI)은 ExPasy ProtParam Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)을 사용하였다. 확인된 염기서열 및 아미노산서열의 유사성은 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 프로그램을 사용하여 분석하였고, 잠재적인 세포내 단백질의 위치는 CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)를 사용하여 예측하였다(Yu et al., 2006). 단백질내 도메인 위치는 InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)으로 분석하였다. OdRAG1 및 OdRAG2 아미노산 서열의 다중 서열 정렬(multiple sequence alignment, MSA)은 Clustal Omega 프로그램 (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>)을 사용하여

수행하였으며, 계통수(phylogenetic tree)는 MEGA-X 소프트웨어(web site 또는 reference)를 사용하여 neighbor-joining method로 사용하여 구축하였으며, 분지(node)의 신뢰도 평가를 위해 1,000 bootstrap replications를 사용하였다(Kumar et al., 2018).

발생 단계별 시료 및 실시간 정량적 PCR (RT-qPCR) 증폭

표적 유전자들의 mRNA 발현 패턴을 조사하기 위한 바다송사리(*O. dancena*) 배아발생(embryonic development)과 개체 발생(ontogenetic development) 단계는 이전의 선행 연구 결과를 참고하여 현미경으로 관찰하면서 시료를 선정하였다(Song et al., 2009). 각각의 발생 단계별 시료들은 세계의 부화 수조로부터 수정 직후(0 days post fertilization) 및 7 DPF에는 50개의 배아를, 대량 부화 직후(days post hatching, 0 DPH)부터 4, 10, 16, 22, 및 42 DPH에는 20마리씩 생물학적 3반복 수집하였다. DPF 및 DPH 시료는 각 발생단계에서 24시간 이내의 수집한 시료를 의미한다. Total RNA 추출 및 cDNA 합성은 앞서 기술한 유전자 클로닝과 동일한 방법으로 수행하였으며, 합성한 cDNA는 멸균 증류수로 10배 희석 후 1 µL를 RT-qPCR 증폭 반응의 주형으로 사용하였다. 표적유전자들의 RT-qPCR 수행을 위한 프라이머들은 OdRAG1 및 OdRAG2 cDNA 염기서열을 바탕으로 제작되었다. 부가적으로 전B세포(pro-B cell)부터 성숙한 B세포에서 발현되는 전형적인 B 세포 마커 유전자인 CD20 (GenBank 등록번호, XM_024258198)과 T세포의 특이적인 마커 유전자인 CD3 complex의 소단위체인 CD3γ (GenBank 등록번호, XM_036215050)는 NCBI GenBank DB의 염기서열을 참조하여 RT-qPCR 수행을 위한 프라이머들을 디자인하였다(Jacobs et al., 1994; Tedder and Engel, 1994). 표적 유전자들의 상대 발현 정량을 위해 사용한 참조 유전자(reference gene)는 *O. dancena* 18S rRNA (GenBank 등록번호, HM347347)로 사용하였다. RT-qPCR을 위해 사용한 프라이머들의 서열정보는 Table 1에 나타내었다. 사용한 프라이머들의 표적유전자에 대한 특이성은 각 시료의 3-log fold dilution에 따른 증폭산물의 임계값(cycle threshold)의 표준정량과 해리곡선 분석을 통하여 검증하였다. RT-qPCR 조건은 초기 95°C에서 10분간 pre-denaturation 후, 95°C에서 10초 denaturation, 61°C에서 15초 annealing, 72°C에서 10초간 extension 반응을 40반복 수행하였다. 각 시료당 3반복 RT-qPCR 증폭 반응의 결과인 표적유전자의 상대적 발현량은 2^{-ΔΔCT}의 방법으로 분석하였다(Schmittgen and Livak, 2008). 그룹간 평균값 차이의 통계적 유의성 검증은 Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA)를 사용하여 일원분산분석(one-way ANOVA) 후 Tukey's multiple comparison 사후분석(Post-hoc analysis)을 수행하였으며, P<0.05인 값이 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다. 표적유전자들의 상대적인 발현량은 평

균(mean)±표준 오차(standard error, SE)로 나타내었다.

결 과

바다송사리(*O. dancena*) RAG1 (OdRAG1) cDNA 서열 및 특성

클로닝된 OdRAG1 cDNA는 3,681 bp의 염기서열로 3,237 bp (종결코돈 TGA포함)의 ORF를 포함하고 있었으며, 분자량 및 theoretical pI가 각각 120.8 kDa 및 8.14인 1,078개의 아미노산(aa)으로 이루어진 단백질을 암호화하고 있었다(Fig. 1A). 세포 내 위치는 핵(reliability index 4.208)으로 CELLO v.2.5에 의해 예측되었다. NCBI GenBank DB의 BLAST 분석결과, OdRAG1의 단백질서열은 다양한 경골어류와 높은 상동성을 보였으며, 가장 높은 상동성은 *O. melastigma* RAG1 (OmRAG1)로 99.35% (E-value=0, query coverage=100%)의 상동성을 나타내었다. 또한, OdRAG1과 경골어류를 포함하는 척추동물 8종의 RAG1 단백질 MSA 결과, OdRAG1 전체단백질(full-length protein)의 서열은 인간(*Homo sapiens*), 마우스(*Mus musculus*), 닭(*Gallus gallus*) 각각 58.9, 58.8, 58.4%의 상동성을 보였으며, 제브라피쉬를 포함하는 경골어류들에 대해 76.3%에서 85.2% 범위의 상동성을 보였다(Fig. 1B). 흥미롭게도, RAG1 단백질의 N-terminal non-core region의 상동성은 34.0%에서 74.3%의 넓은 범위를 보였으며, 이는 core region의 74.4%에서 92.2%의 범위보다 상당히 낮은 수준의 상동성을 나타내었다.

InterProScan 도메인 예측 및 MSA 결과를 바탕으로 OdRAG1의 단백질 서열은 N-terminal non-core (Met¹-Gln⁴⁰⁶), core (Thr⁴⁰⁷-Ala^{1,038}) 및 short C-terminal non-core

(His^{1,039}-Leu^{1,078}) region의 3부분으로 구성되어 있었다(Fig. 1). 먼저 N-terminal non-core region은 RAG1 importin-binding domain (Pro¹²-Leu³⁰⁹), zinc finger RING (really interesting new gene)-type signature (³²⁶CGHLFCRSCI³³⁵)를 포함하는 zinc finger RING-type domain (Cys³¹¹-Asn³⁵⁰)과 zinc finger RAG1-type domain (Leu³⁷²-Asn⁴⁰¹)으로 예측되었다(Fig. 1A). Zinc finger RING-type 도메인은 아연결합 motif를 포함하고 있으며, RAG1의 homodimer 생성을 위해 요구되고, zinc finger RAG1-type domain은 autoubiquitylation 및 다른 단백질들의 변형을 위한 E3 ubiquitin ligase 역할을 하며, V(D)J 재조합 활성화에 요구된다고 알려져 있다(Rodgers et al., 1996; Jones and Gellert, 2003; Yurchenko et al., 2003). Core region은 nonamer RSS와 결합을 위한 RAG nonamer-binding domain (NBD, Gly⁴¹⁹-Gln⁴⁸⁶)과 재조합 활성화의 기능적 촉매 단위인 RAG1의 recombinase domain (Asp⁴¹¹-Ala^{1,059})을 포함하였다(Schatz and Swanson, 2011). 인간(*H. sapiens*) HsRAG1와의 MSA 결과를 바탕으로 예측한 OdRAG1은 NBD 외 추가적인 dimerization and DNA-binding domain (DDBD, Gly⁴⁸⁷-Phe⁵⁴⁴), central domain (Asn⁵⁵⁴-Ile⁷⁹²), C-terminal domain (CTD, Trp⁷⁹³-Ala^{1,009})이 발견되었다. 부가적으로 central domain과 CTD 상이에 공유되는 zinc binding domain (ZBD, Ala⁷⁵³-Ile⁹⁹⁵)은 RAG2와 상호 작용하는 두개의 아연 결합 영역을 포함하고 있었다(Fig. 1B) (Aidinis et al., 2000; Gwyn et al., 2009). DDBD는 DNA 결합의 역할을 수행하며, 또 다른 RAG1과 homodimerization을 위한 domain을 작용한다(Villa and Notarangelo, 2019; Christie et al., 2022). Central domain은 single strand DNA (ssDNA)를 절단하고 heptamer RSS를 인식하고 상호작용하는 motif들을 포함하고 있다(Arbuckle et

Table 1. List of oligonucleotide primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Usage
OdRAG1-FW	CGCCAGCTGACACTGAAAAA	cDNA cloning
OdRAG1-RV	GTCATGCCCTTGCAACACAA	
OdRAG2-FW	ATCCCACAACCTGCCTGTGAG	
OdRAG2-RV	CAGGCAAGAAATACACAGAAGA	
OdRAG1-qFW	GTGTTTGGCTATCCGGGTCA	RT-qPCR
OdRAG1-qRV	GAGAGTGTGVAAGGGCTGAAAG	
OdRAG2-qFW	CTTCTGTCTGGATCGCGGAG	
OdRAG2-qRV	CCTTCATGGGTGTGCGTTTC	
OmCD20-qFW	CCTTCTGACATGTTCTGCAAAAGC	
OmCD20-qRV	GGTTTCTGAAGCACTTGCGG	
OmCD3-qFW	CGACGCTTCATCAGCAGACTC	
OmCD3-qRV	TCAGAACCAGAGTCGCAGTGG	
Od18SRNA-qFW	GATCTCGGGATCGAGCTG	
Od18SRNA-qRV	CTCATTCCAATTACAGGGCCTC	



Fig. 1. Schematic representation depicting the predicted domain architecture of OdRAG1 protein in marine medaka *Oryzias dancena* (A). Multiple sequence alignment of OdRAG1 protein with RAG1 from other species (B).

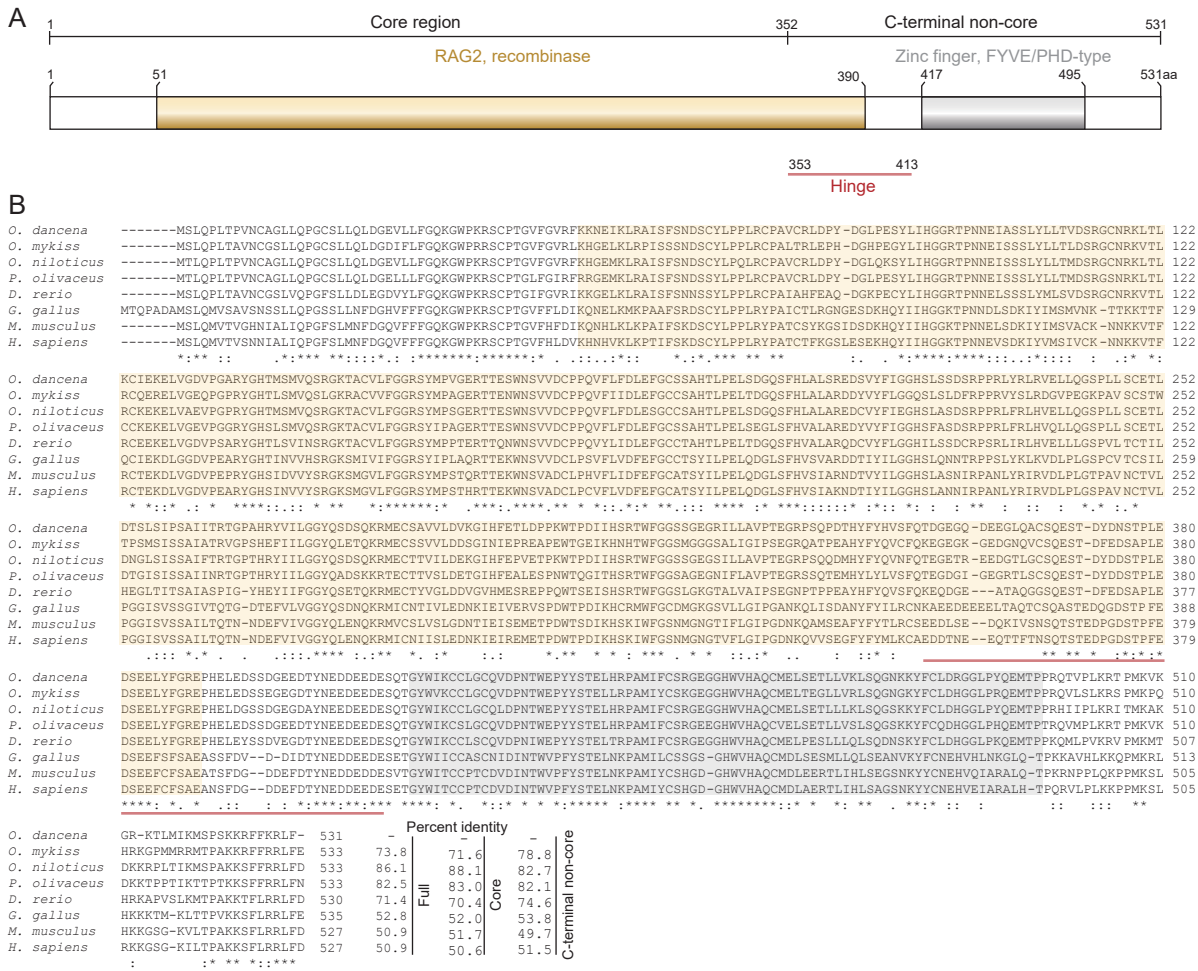


Fig. 2. Schematic representation depicting the predicted domain architecture of OdRAG2 protein in marine medaka *Oryzias dancena* (A). Multiple sequence alignment of OdRAG2 protein with RAG2 from other species (B).

al., 2001; Schatz and Swanson, 2011; Christie et al., 2022). CTD는 상대적으로 비 특이적인 double strand DNA (dsDNA) 결합을 수행한다(Mo et al., 2001; Schatz and Swanson, 2011). RAG1 recombinase domain내의 DNA 절단을 위한 주요활성 부위인 3개의 산성잔기(acidic residues)로 이루어진 DDE motif (OdRAG1에서 Asp⁶³¹, Asp⁷⁴¹, Glu⁹⁹⁵는 HsRAG1의 Asp⁶⁰⁰, Asp⁷⁰⁸, Glu⁹⁶²에 해당)가 보존되어 있었다(Swanson, 2001). C-terminal non-core region은 서열의 길이는 짧지만 V(D)J 재조합 과정에서의 hairpin 형성을 억제하고 RAG2의 C-terminal non-core region과 함께 결합 및 DNA 절단 활성을 조절하는 것으로 보고되었다(Grundy et al., 2010).

OdRAG2 cDNA 서열 및 특성

OdRAG2 cDNA는 총 길이 1,731 bp 염기서열로 클로닝 되었으며, 1,596 bp ORF (종결코돈 TAA포함)가 531개의 아미노산

을 암호화하고 있었다(Fig. 2A). 분자량은 59.5 kDa, theoretical pI는 5.62로 예측되었으며, OdRAG1과 마찬가지로 핵(reliability index 3.987)이 잠재적인 세포내 위치로 예측되었다. OdRAG2는 *O. melastigma* RAG2 (OmRAG2)와 99.25%로 가장 높은 상동성(E-value=0, query coverage=100%)을 보였다. MSA 결과, OdRAG2의 전체단백질 서열은 50.9%부터 86.1%의 상동성을 인간(*H. sapiens*)과 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에서 보였다. OdRAG2는 OdRAG1과 달리 core region과 C-terminal non-core region의 상동성 범위가 거의 차이나지 않으며, 전체 단백질 서열 상동성과 유사하게 나타났다(Fig. 2B). OdRAG2의 아미노산 서열은 galactose oxidase/kelch, beta-propeller(Ser⁶³-Ser³²²)를 포함하는 RAG2 domain (Lys⁵¹-Glu³⁹⁰)과 RAG2 plant homeodomain (PHD) (Gly⁴¹⁷-Pro⁴⁹⁵)이 InterProScan 프로그램으로 예측되었다. MSA 결과, OdRAG1과 유사하게 OdRAG2는 core region (Met¹-Gln³⁵²)

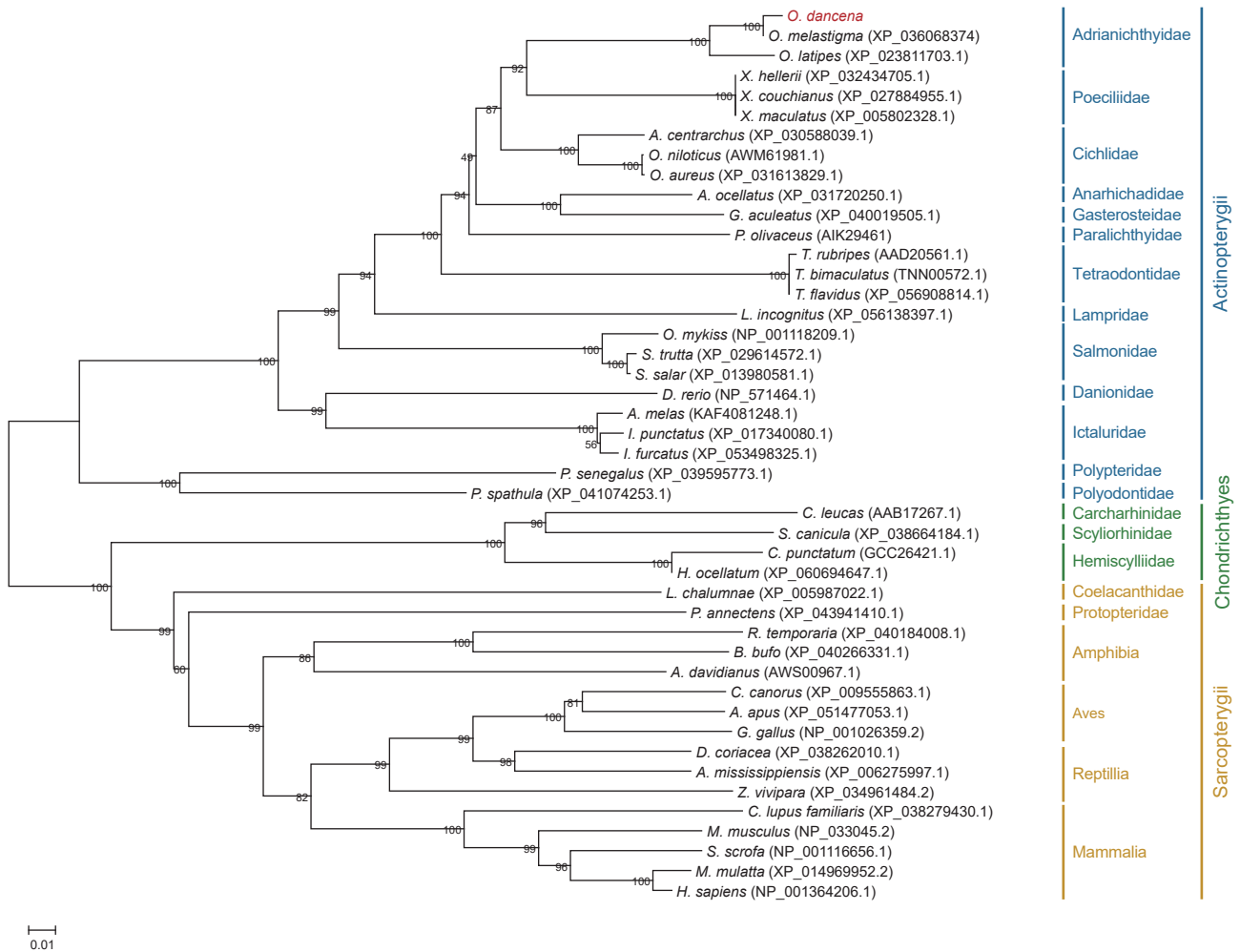


Fig. 3. Phylogenetic tree depicting the evolutionary relationship of OdRAG1 protein with its orthologs from other species in the jawed vertebrate lineage. The tree was constructed by neighbor-joining method. Numbers at each branch indicated the percentage bootstrap values on 1,000 replicates.

와 C-terminal non-core region (Thr³⁵³-Phe⁵³¹)의 두 지역으로 세분되었다. OdRAG2의 core region은 six-Kelch-like motif로 형성된 six-bladed β-propeller로 구성되어 있으며, 이는 효율적인 DNA 절단 및 RAG1과의 결합을 위한 기능이 보고되어 있다(Aidinis et al., 2000; Callebaut and Mornon, 1998). C-terminal non-core region은 두가지 주요 구성 요소인 acidic hinge (Thr³⁵³-Glu⁴¹³)와 예측된 PHD로 구성되어 있었다(Fig. 2). RAG2의 acidic hinge는 높은 비율의 acidic residue로 구성되며, core region과 PHD 사이의 연결 유연성을 제공하고 PHD는 메틸화된 히스톤(H3K4me3)에서 특히 염색질과 상호작용하며 두가지 구성 요소 모두 V(D)J 재조합 활성 조절에 관여함이 보고되고 있다(Matthews et al., 2007; Coussens et al., 2013; Teng et al., 2015).

계통수 분석

OdRAG1 및 OdRAG2와 다른 척추동물 ortholog들과의 분자 진화적 관계를 평가하기 위해 연골어류(Chondrichthyes), 육기어류(Sarcopterygii), 조기어류(Actinopterygii)로부터 43개의 RAG1 및 41개의 RAG2 ortholog들의 전체단백질 아미노산 서열을 NJ 방법으로 계통수 트리를 구축하였다. RAG1과 RAG2 단백질로부터 추론된 계통수의 위상 구조(topology)는 높은 통계적 신뢰도를 나타내며, 일반적으로 알려진 유악동물(jawed vertebrates)의 분류학적 평가와 일치하였다 (Fig. 3, Fig. 4). RAG1과 RAG2 단백질은 연골어류와 공통조상(common ancestor)을 가지는 유악동물의 단계통군(monophyletic clade)를 형성하고 있었으며, 조기어류와 육기어류는 자매군(sister clade)으로 명확히 구분되었다. 이에 따라 OdRAGs는 송

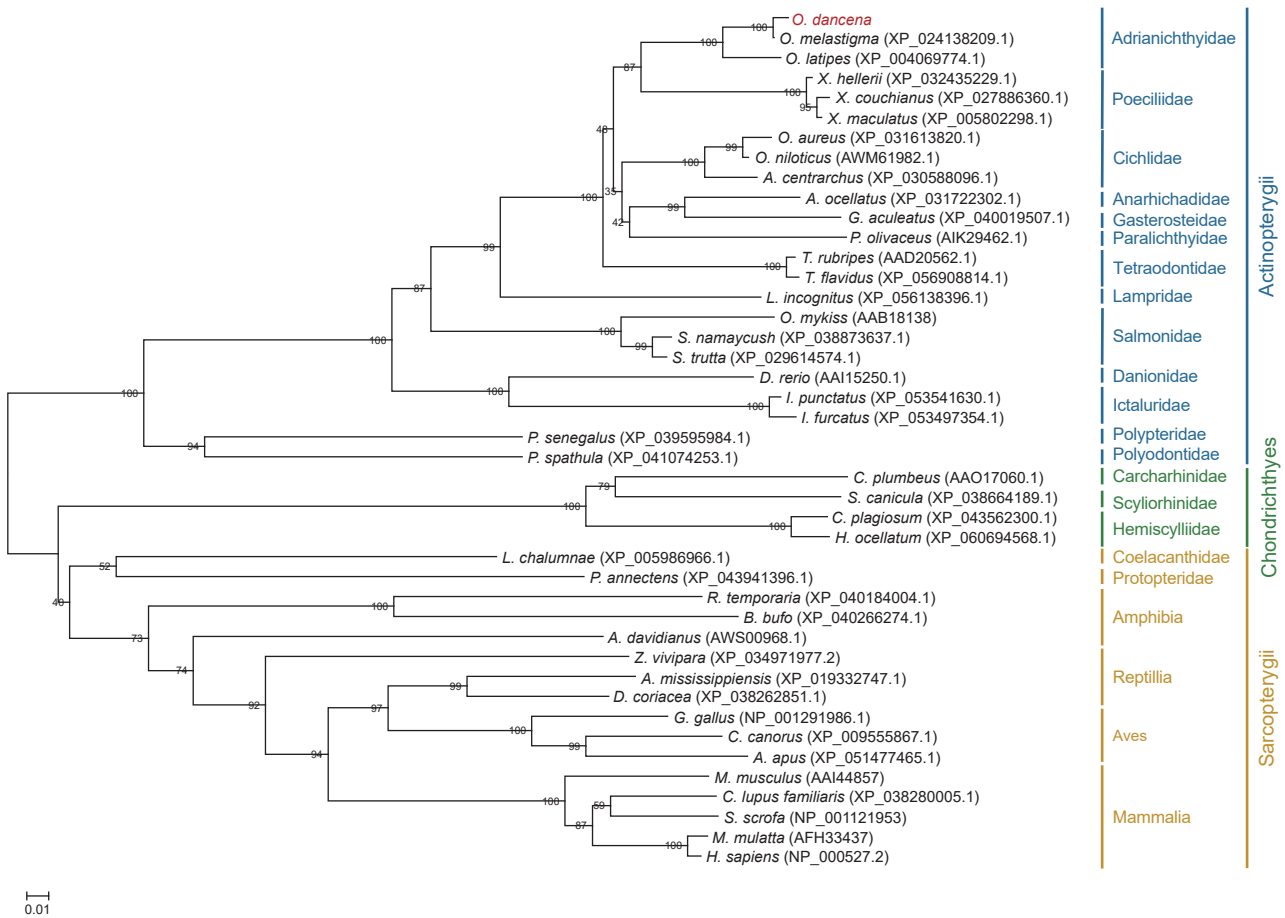


Fig. 4. Phylogenetic tree depicting the evolutionary relationship of OdRAG2 protein with its orthologs from other species in the jawed vertebrate lineage. The tree was constructed by neighbor-joining method. Numbers at each branch indicated the percentage bootstrap values on 1,000 replicates.

사리과(Adrianichthyidae) 어류의 RAGs와 밀접한 집단을 이루고 있었다. 또한 OdRAGs는 진화적으로 원시형태의 어류인 폴립테루스과(Polypteridae) 및 주걱철갑상어과(Polyodontidae)로 이루어진 집단(clade)과 조기어류의 기원을 공유하고 있었으며, OdRAGs는 다른 조기어류 RAGs들에 비해 상대적으로 최근에 분화하였음을 보여주었다. 하지만, RAG1와 RAG2의 계통수에 비교에서 clade의 위치와 bootstrap, 분지(node)의 순서와 길이가 약간 다른 형태를 보였으며, 이는 RAG1과 RAG2가 진화적 역사와 유전적 변이 특성에 차이가 있음을 제시한다.

개체 발달 단계에 따른 OdRAG1, OdRAG2, CD3 γ 및 CD20 유전자 발현 프로파일

DPH 3일째 대부분의 부화 자어는 난황을 거의 흡수하였으며 첫번째 먹이 급이를 시작하였다. 배아 및 개체 발달에 따른 적응면역의 발달 시기를 조사하기 위해 배아 발달 단계(embryonic development, 0, 7 DPF)와 자어 및 치어단계(ontogenetic de-

velopment, 0, 4, 10, 16, 22, 42 DPH)에 해당하는 총 8개 단계의 유전자 발현양상을 분석하였다.

모든 유전자들은 배아 발달(embryonic development) 단계에 가장 낮은 mRNA 발현을 나타냈으며, 부화 직후(11 DPF: 0 DPH)에 배아발생 단계보다 OdRAG1은 약 22배, OdRAG2는 약 58배, CD3 γ 는 약 23배, CD20은 약 40배 mRNA 발현량이 급격히 증가하였다(Fig. 5). 이 후 OdRAG1의 mRNA 발현량은 4 DPH에 0 DPH보다 약 2.5배정도 감소하였으며, 42 DPH에는 배아 발달 단계 수준까지 감소하였다(Fig. 5A). OdRAG2는 OdRAG1과는 다르게 22 DPH까지 그 발현량이 유사한 수준으로 유지하다가 42 DPH의 감소하는 패턴을 보였다(Fig. 5B). CD3 γ 의 발현패턴은 자어 및 치어 발달단계에 따른 변화가 거의 없었다(Fig. 5C). 반면 CD20은 0 DPH보다 4 DPH에서 mRNA 발현량이 2.9배 감소한 후 다시 증가하기 시작하여 16 DPH에는 0 DPH보다 약 1.3배 높은 발현량을 보였다. 이 발현량은 개체가 성장함에 따라 다시 감소하기 시작하여 42 DPH에

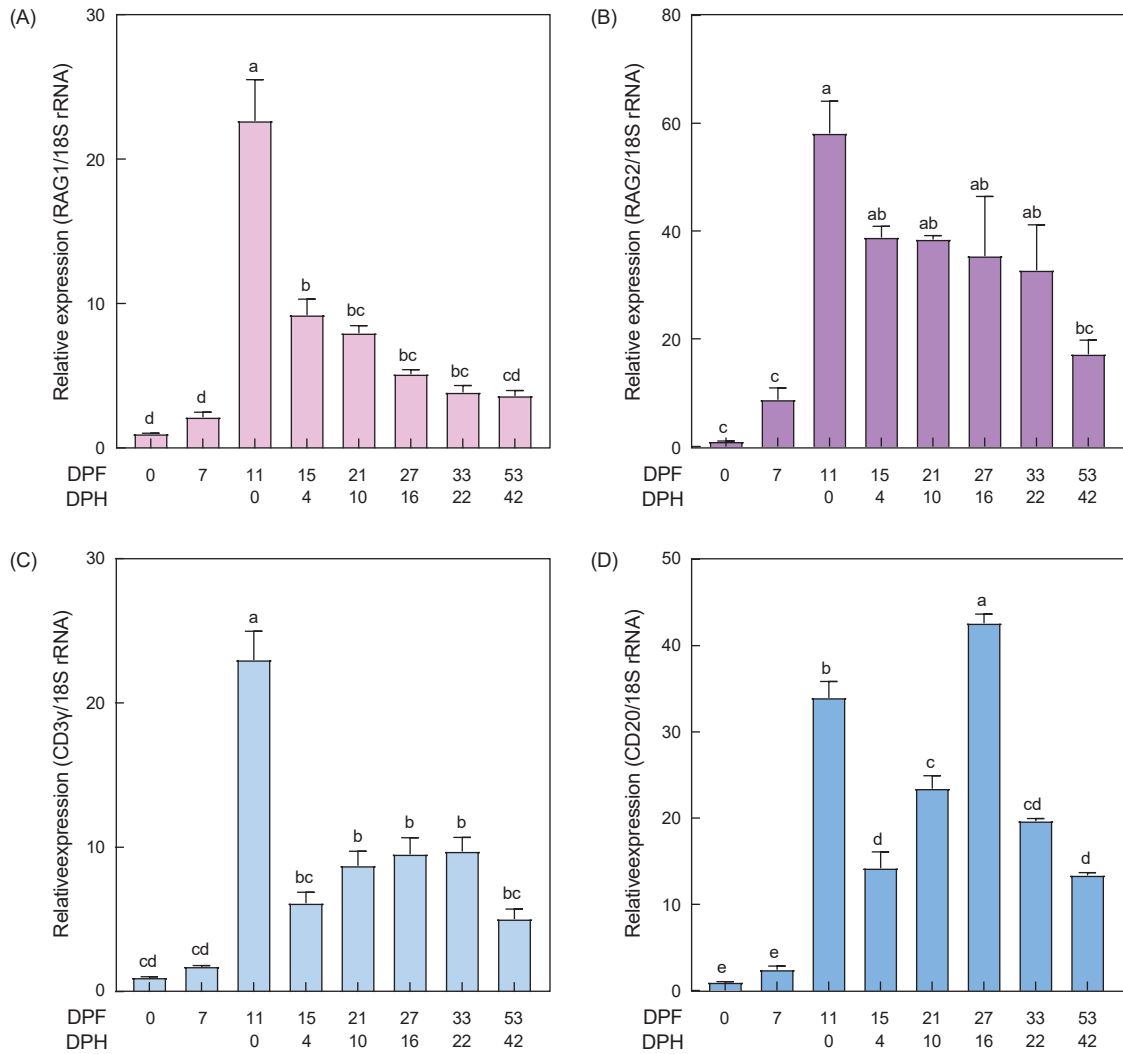


Fig. 5. Expression analysis of OdRAG1 (A), OdRAG2 (B), CD3γ (C), and CD20 (D) mRNA during embryonic and ontogenetic developments of marine medaka *Oryzias dancena*. Mean ± standard error (n=3) are shown. Means denoted by different letters (a, b, c, d) at the top of the bars indicate statistically significant differences (P<0.05) between development stages determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

4 DPH와 유사한 발현수준까지 감소하였다(Fig. 5D).

고찰

어류의 적응면역 반응은 다른 고등 척추동물과 마찬가지로 T 세포 및 B세포에 의해 매개된다. T세포 및 B세포의 항원 수용체(antigen receptor) 즉 TCR 및 BCR 또는 분비형 Ig은 이들을 암호화하는 독특한 형태의 서로 분리된 다른 유전자 분절의 V(D)J 재조합(recombination)이라는 과정으로 생성된다. 이러한 V(D)J 재조합은 궁극적으로 TCR 및 BCR (또는 Ig)의 다양

한 레퍼토리 생산으로 이어지며 RAG1/2 단백질에 의해 개시된다(Boehm and Swann, 2014). 따라서 RAG1/2 유전자는 적응면역 기능을 위한 필수적인 면역 연관 유전자(immune-related gene)이며, 많은 동물의 적응면역 발달 체계 연구를 위한 지표로 사용된다(Greenhalgh et al., 1993; Willett et al., 1997; Peixoto et al., 2000; Zhang et al., 2012; Braams et al., 2023; Chovatia et al., 2024). 본 연구는 바다송사리(*O. dancena*)의 적응면역 체계 발달 연구에 지표 유전자로 간주되는 OdRAG1 및 OdRAG2를 클로닝하고 분자적 특성을 규명하였으며, 클로닝된 OdRAG1과 OdRAG2 유전자와 부가적으로 CD20 및 CD3γ 유전자의 발현양상을 시간 경과에 따른 다양한 개체 발생 단계

(ontogenetic stage)에 따라 평가하였다.

OdRAG1 단백질 서열은 N-terminal non-core, core 및 short C-terminal non-core region의 구성되며, OdRAG2는 core 및 C-terminal non-core region으로 구성됨이 MSA 및 도메인 예측결과로 드러났다. 또한, MSA 및 계통수 분석결과 OdRAG1과 OdRAG2 단백질의 전체 아미노산 서열은 육기어류, 연골어류, 경골어류의 RAG ortholog들의 아미노산 서열과 진화적으로 잘 보존되어 있으며 높은 상동성을 보였다(Fig. 1-Fig. 4). 특히, MSA에서 RAG1의 core region과 RAG2의 core 및 C-terminal non-core region은 척추동물의 ortholog들 사이에 매우 높은 아미노산 서열 상동성을 보였다. 하지만, 흥미롭게도 RAG1의 N-terminal non-core region은 상대적으로 낮은 상동성을 보였다. RAG1/2의 core region은 recombinase domain를 포함하는 V(D)J 재조합 활성의 기능적 단위로 필수적 역할을 수행하며, non-core region은 RAG1/2의 완전한 활성(full activity)를 위한 활성 조절역할을 수행함이 보고되었다(Schatz and Swanson, 2011; Christie et al., 2022; Braams et al., 2023). RAG1의 기능적 연구에서 N-terminal non-core truncated 및 mutant RAG1가 off-target effect가 증가하고 재조합 효율성 및 항체 다양성이 감소하는 결과 보였으며, 이러한 결과는 N-terminal non-core region이 nucleolar localization, RSS인식, RAG 복합체 안정성, 유전자 재조합 과정에서 다른 단백질과의 상호작용에 중요한 역할을 수행함을 제시하였다(Talukder et al., 2004; Gigi et al., 2014; Kim et al., 2015). 종합적으로 이러한 결과는 항체 레퍼토리의 다양성, 친화력 성숙, 면역학적 기억 등과 같은 고등 척추동물에서 나타나는 적응면역의 특징이 어류에서 제한성을 가지는 원인들 중 한가지 요인이 RAG1의 N-terminal non-core region의 구조적 차이에서 기인할 수 있음을 제시한다.

적응면역의 면역학적 기억에 기반을 둔 어류 백신은 현재까지 감염병 예방을 위한 효과적인 방법으로 인식되고 있다(Adams, 2019; Du et al., 2022; Mondal and Thomas, 2022). 하지만, 어

류는 기초 면역학적 연구의 부족과 함께 넓고 다양한 종의 범위 때문에 백신 접종 최적시간, 접종 방식 및 횟수, 그리고 추가접종의 시기 결정을 위한 실험 데이터와 정보가 부족한 상태이다. 이전의 연구들은 일반적으로 어류에서의 RAG1/2발현 양상은 배아발생(embryonic development) 단계에는 아주 낮은 발현 패턴을 보이다가 점차 증가하여 정점발현(peak expression)을 나타낸 후, 종 특이적으로 발현 수준이 일정기간 동안 유지 또는 점차 감소되는 형태를 보였다. *O. dancena*의 배아발생 단계(0 및 7 DPF)에서 OdRAG1/2 mRNA는 매우 낮은 수준의 발현을 확인하였다. 이러한 결과는 엔젤피쉬(*Pterophyllum scalare*), 나일틸라피아(*O. niloticus*), 빨간통돔(*Lutjanus sanguineus*)의 미수정난 또는 배아발생단계에서 RAG1/2가 검출되는 결과와 일치하였으며, 이는 RAG1/2 전사체가 어류에서 모계전달(maternal transfer) 될 수 있음을 제시한다(Fig. 4A, Fig. 4B) (Lee et al., 2004; Zhang et al., 2012; Sushila et al., 2020; Chovatia et al., 2024). 하지만, 대부분의 어류 RAG1/2 mRNA의 정점발현이 완전한 난황흡수 후 첫 먹이활동을 하는 자어 혹은 때로는 치어 단계에서 보이는 것과 대조적으로 OdRAG1/2 mRNA는 부화직후(11 DPF, 0 DPH) 정점발현을 나타내었다(Fig. 4A, Fig. 4B, Table 2). 한편, 면역세포들은 분화집단(cluster of differentiation, CD)이라고 불리는 단백질 분자들을 발현하며, 이들은 특정 면역 세포유형의 발달 또는 활성화 단계에 따라 발현 양상이 달라 면역세포를 식별하고 분화과정에 따른 추적을 위한 지표로 사용한다(Suetake et al., 2006; Tian et al., 2022). 어류 CD3 복합체는 2개의 CD3ε, 1개의 각 CD3γ 및 CD3δ로 구성되어 있으며, 미성숙 T세포(immature T cell)부터 성숙 T세포(mature T cell)에서 이르기까지 넓은 발현 범위를 나타낸다(Park et al., 2001; Suetake et al., 2006; Liu et al., 2008; Qin et al., 2021). CD20에 대한 명확한 기능은 아직 밝혀져 있지 않지만, 전B세포(pro-B cell)와 성숙 B세포(mature B cell)에서 발현된다(Kozlova et al., 2020; Pavlasova and Mraz, 2020). *O. dancena*의 CD3γ의 발현은 부화직후에 정점발현을 나타낸 후

Table 2. Comparison of the expression patterns of RAG1 or RAG2 mRNA in marine medaka *Oryzias dancena* and other fish species with their hatching time, complete, the completely absorption of egg yolk, and the start of juvenile stage

Species	Peak expression (DPH ^a)	Hatching (DPF ^b)	Adsorption of yolk sac (DPH)	Family
<i>Oryzias dancena</i>	RAG1/2 (0)	11	4	Beloniformes
<i>Danio rerio</i>	RAG1 (15–16)	1.16–2.2	7	Cypriniformes
<i>catla catla</i>	RAG1 (54)	0.5	3	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	RAG1 (50)	2.08–2.5	5	Pleuronectiformes
<i>Oreochromis niloticus</i>	RAG1/2 (24)	5	5	Cichliformes
<i>Pterophyllum scalare</i>	RAG2 (27)	3	3	
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	RAG1 (22)	11	16	Gadiformes
<i>Epinephelus akaara</i>	RAG1 (80)	2	3.5	Perciformes
<i>Latris lineata</i>	RAG1 (80)	7–8	4	Centrarchiformes

^aDPH, Day post hatching. ^bDPF, Day post fertilization.

급격한 감소를 보이는 OdRAG1/2의 발현양상과 동일한 반면 CD20은 부화직후(0 DPH)와 16 DPH에 두곳에서 높은 발현이 나타났으며, 16 DPH에서 최대 정점발현을 보였다(Fig. 4C, Fig. 4D). 종합적으로 이러한 결과들은 *O. dancena*의 적응면역을 위한 TCR 및 BCR의 V(D)J 유전자 재조합은 물론 T세포와 B세포의 분화가 배발생단계에서 진행됨을 나타내며, 이는 아마도 다른 어류와는 달리 *O. dancena*의 상대적으로 오랜 기간의 배발생과 연관되어 있음을 제안하지만, 명확한 메커니즘 규명을 위해서는 배발생단계의 다양한 발생학적, 분자생물학적 연구가 필요하다.

바다송사리(*O. dancena*)는 동갈치목(Beloniformes) 송사리과(Adrianichthyidae)에 속하는 어류로 최초로 *Cyprinus dancena* 또는 *Haphochilus melastigma*로 명명되었다. 이후 기수에 서식하는 *Oryzias* 종들에 대해 *O. melastigma*로 명명되어 사용되다가(Iwamatsu et al., 1985; Naruse, 1996), 1998년에 형태 측정 분석을 바탕으로 *O. dancena*로 새롭게 명명되었다(Roberts, 1998). 하지만, 이전의 *O. melastigma*와 *O. dancena*의 지느러미 형태 연구에서 dorsal-fin rays, anal-fin rays, pelvic-fin rays 또는 지느러미 형태의 약간의 차이에 대해 보고하고 있다(Magtoon and Termvidchakorn, 2009). 이렇듯 현재까지 기수에 서식하는 *Oryzias* 종의 모호한 분류학적 위치로 인해 여러 학명을 혼용하여 사용하고 있으므로 과학적인 의사소통을 위한 적절한 명명법을 확립을 위해 분자 계통 발생학적 연구들이 필요하다. 적어도 현재까지 미토콘드리아 유전자처럼 RAG1과 RAG2는 “perfect orthologs”로 계통 발생학적 연구 및 재구성에 우수한 지표로 증명되었으며, 실제로 다양한 동물에 대한 연구가 광범위하게 활용되었다(Groth and Barrowclough, 1999; Murphy et al., 2001; Pereira et al., 2002). OdRAG1과 OdRAG2의 계통수에서 *O. dancena*와 *O. melastigma*는 *O. latipes*와 함께 100의 bootstrap 값으로 계통학적 관계가 높은 신뢰수준을 가지고 있다. 계통수에서 나타나듯이, *O. dancena*와 *O. melastigma*간의 유전적 거리는 비교적 작지만 각각이 독립적인 진화적 경로를 따르고 있다. 하지만 이러한 결과는 *O. dancena*와 *O. melastigma*의 진화적 차이점을 설명하는데 제한적일 수 있으므로 계통 비교 등 다양한 유전자 데이터의 종합적인 분석이 필요하리라 생각한다.

사 사

본 연구는 2021년도 부경대학교 신입교수 학술연구비(과제 번호: CD20211012)의 지원에 의해 수행되었음.

References

Adams A. 2019. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunol* 90, 210-214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>.

Aidinis V, Dias DC, Gomez CA, Bhattacharyya D, Spanopoulou E and Santagata S. 2000. Definition of minimal domains of interaction within the recombination-activating genes 1 and 2 recombinase complex. *J Immunol* 164, 5826-5832. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5826>.

Arbuckle JL, Fauss LJ, Simpson R, Ptaszek LM and Rodgers KK. 2001. Identification of two topologically independent domains in RAG1 and their role in macromolecular interactions relevant to V(D)J recombination. *J Biol Chem* 276, 37093-37101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105988200>.

Bailin T, Mo X and Sadofsky MJ. 1999. A RAG1 and RAG2 tetramer complex is active in cleavage in V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 19, 4664-4671. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.4664>.

Banerjee D, Hamod MA, Suresh T and Karunasagar I. 2014. Isolation and characterization of a nodavirus associated with mass mortality in Asian seabass (*Lates calcarifer*) from the west coast of India. *VirusDis* 25, 425-429. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0226-8>.

Boehm T and Swann JB. 2014. Origin and evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Anim Biosci* 2, 259-283. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114201>.

Braams M, Pike-Overzet K and Staal FJ. 2023. The recombinase activating genes: Architects of immune diversity during lymphocyte development. *Front Immunol* 14, 1210818. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1210818>.

Buchmann K, Karami AM and Duan Y. 2024. The early ontogenetic development of immune cells and organs in teleosts. *Fish Shellfish Immunol* 146, 109371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109371>.

Callebaut I and Mornon JP. 1998. The V(D)J recombination activating protein RAG2 consists of a six-bladed propeller and a PHD fingerlike domain, as revealed by sequence analysis. *Cell Mol Life Sci* 54, 880-891. <https://doi.org/10.1007/s000180050216>.

Carlson LM, Oettinger MA, Schatz DG, Masteller EL, Hurley EA, McCormack WT, Baltimore D and Thompson CB. 1991. Selective expression of RAG-2 in chicken B cells undergoing immunoglobulin gene conversion. *Cell* 64, 201-208. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90221-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90221-J).

Cho YS, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2010. Spawning performance, embryonic development and early viability under different salinity conditions in a euryhaline medaka species, *Oryzias dancena*. *Korean J Ichthyol* 22, 25-33.

Chovatia RM, Acharya A, Rasal KD, Bedekar MK, Jeena K, Rathinam RB, Dinakaran C and Tripathi G. 2024. Ontogeny and tissue specific expression profiles of recombination activating genes (RAGs) during development in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gene Expr Patterns* 52, 119358. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2024.119358>.

Christie SM, Fijen C and Rothenberg E. 2022. V(D)J Recombination: Recent insights in formation of the recombi-

- nase complex and recruitment of DNA repair machinery. *Front Cell Dev Biol* 10, 886718. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.886718>.
- Corripio-Miyar Y, Bird S, Treasurer J and Secombes C. 2007. RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L. *Fish Shellfish Immunol* 23, 71-85. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.006>.
- Coussens MA, Wendland RL, Deriano L, Lindsay CR, Arnal SM and Roth DB. 2013. RAG2's acidic hinge restricts repair-pathway choice and promotes genomic stability. *Cell Rep* 4, 870-878. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.041>.
- de Camargo MM and Nahum LA. 2005. Adapting to a changing world: RAG genomics and evolution. *Hum Genomics* 2, 132. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-2-2-132>.
- Dixon B, Heath G and Semple SL. 2016. The immune system of bony fish. *Encycl Immunol* 1, 481-485. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.12010-7>.
- Du Y, Hu X, Miao L and Chen J. 2022. Current status and development prospects of aquatic vaccines. *Front Immunol* 13, 1040336. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1040336>.
- Durand C, Charlemagne J and Fellah JS. 2000. RAG expression is restricted to the first year of life in the Mexican axolotl. *Immunogenetics* 51, 681-687. <https://doi.org/10.1007/s002510000191>.
- Gigi V, Lewis S, Shestova O, Mijušković M, Deriano L, Meng W, Luning Prak ET and Roth DB. 2014. RAG2 mutants alter DSB repair pathway choice *in vivo* and illuminate the nature of 'alternative NHEJ'. *Nucleic Acids Res* 42, 6352-6364. <https://doi.org/10.1093/nar/gku295>.
- Greenhalgh P, Olesen C and Steiner L. 1993. Characterization and expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in *Xenopus laevis*. *J Immunol* 151, 3100-3110.
- Greenhalgh P and Steiner LA. 1995. Recombination activating gene 1 (Rag1) in zebrafish and shark. *Immunogenetics* 41, 54-55. <https://doi.org/10.1007/BF00188438>.
- Groth JG and Barrowclough GF. 1999. Basal divergences in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene. *Mol Phylogenet Evol* 12, 115-123. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0603>.
- Grundy GJ, Yang W and Gellert M. 2010. Autoinhibition of DNA cleavage mediated by RAG1 and RAG2 is overcome by an epigenetic signal in V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22487-22492. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014958107>.
- Gwyn LM, Peak MM, De P, Rahman NS and Rodgers KK. 2009. A zinc site in the C-terminal domain of RAG1 is essential for DNA cleavage activity. *J Mol Biol* 390, 863-878. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.076>.
- Hansen JD. 1997. Inspection of the 3'UTR genomic region for RAG1 and RAG2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals potential regulatory motifs. *J Immunol Res* 5, 129-131. <https://doi.org/10.1155/1997/81279>.
- Huttenhuis HB, Huising MO, van der Meulen T, van Oosterhoud CN, Sánchez NA, Taverne-Thiele AJ, Stroband HW and Rombout JH. 2005. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev Comp Immunol* 29, 1033-1047. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.03.005>.
- Iwamatsu T, Uwa H and Saxena O. 1985. Sexual dimorphism in *Oryzias melastigma* (McClelland). *Curr Sci* 54, 754-755.
- Jacobs H, Vandeputte D, Tolcamp L, De Vries E, Borst J and Berns A. 1994. CD3 components at the surface of pro-T cells can mediate pre-T cell development *in vivo*. *Eur J Immunol* 24, 934-939. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240423>.
- Jones JM and Gellert M. 2003. Autoubiquitylation of the V(D)J recombinase protein RAG1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15446-15451. <https://doi.org/10.1073/pnas.2637012100>.
- Kim HS, Lee BY, Han JH, Jeong CB, Hwang DS, Lee MC, Kang HM, Kim DH, Lee DH, Kim JB, Choi IY and Lee JS. 2018. The genome of the marine medaka *Oryzias melastigma*. *Mol Ecol Resour* 18, 656-665. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12769>.
- Kim MS, Lapkouski M, Yang W and Gellert M. 2015. Crystal structure of the V(D)J recombinase Rag1-Rag2. *Nature* 518, 507-511. <https://doi.org/10.1038/nature14174>.
- Kozlova V, Ledererova A, Ladungova A, Peschelova H, Janovska P, Slusarczyk A, Domagala J, Kopcil P, Vakulova V, Oppelt J, Bryja V, Doubek M, Mayer J, Pospisilova S and Smida M. 2020. CD20 is dispensable for B-cell receptor signaling but is required for proper actin polymerization, adhesion and migration of malignant B cells. *PLoS One* 15, e0229170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229170>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ and Sin YM. 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: A gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol* 28, 9-28. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00103-4).
- Lee GS, Neiditch MB, Salus SS and Roth DB. 2004. RAG proteins shepherd double-strand breaks to a specific pathway, suppressing error-prone repair, but RAG nicking initiates homologous recombination. *Cell* 117, 171-184. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00301-0).
- Lee JW, Yang H, Noh JK, Kim HC, Park CJ, Park JW, Hwang IJ, Kim SY and Lee JH. 2014. RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev Reprod* 18, 99-106. <https://doi.org/10.12717/DR.2014.18.2.099>.
- Lim SG, Han HK, Kim KS, Kim BS, Baek HM, Park IS and Gil HW. 2012. Observations on the reproductive behavior

- of the marine medaka, *Oryzias dancena*. Korean J Ichthyol 24, 220-226.
- Liu Y, Moore L, Koppang EO and Hordvik I. 2008. Characterization of the CD3 ζ , CD3 $\gamma\delta$ and CD3 ϵ subunits of the T cell receptor complex in Atlantic salmon. Dev Comp Immunol 32, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.03.015>.
- Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol 20, 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>.
- Magtoon W and Termvidchakorn A. 2009. A revised taxonomic account of ricefish *Oryzias* (Beloniformes; Adrianichthyidae), in Thailand, Indonesia and Japan. Nat His J Chulalongkorn Univ 9, 35-68.
- Martin EC, Le Targa L, Tsakou-Ngouafo L, Fan TP, Lin CY, Xiao J, Huang Z, Yuan S, Xu A, Su YH, Petrescu AJ, Pontarotti P and Schatz DG. 2023. Insights into RAG evolution from the identification of “missing link” family A RAGL transposons. Mol Biol Evol 40, msad232. <https://doi.org/10.1093/molbev/msad232>.
- Matthews AG, Kuo AJ, Ramón-Maiques S, Han S, Champagne KS, Ivanov D, Gallardo M, Carney D, Cheung P, Ciccone DN, Walter KL, Utz PJ, Shi Y, Kutateladze TG, Yang W, Gozani O and Oettinger MA. 2007. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. Nature 450, 1106-1110. <https://doi.org/10.1038/nature06431>.
- Mo X, Bailin T and Sadofsky MJ. 2001. A C-terminal region of RAG1 contacts the coding DNA during V(D)J recombination. Mol Cell Biol 21, 2038-2047. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.6.2038-2047.2001>.
- Mondal H and Thomas J. 2022. A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. Aquac Int 30, 1971-2000. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00884-w>.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA and O'Brien SJ. 2001. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. Nature 409, 614-618. <https://doi.org/10.1038/35054550>.
- Naruse K. 1996. Classification and phylogeny of fishes of the genus *Oryzias* and its relatives. Fish Biol J Medaka 8, 1-9. <https://doi.org/10.18999/fishjm.8.1>.
- Øvergård AC, Hordvik I, Nerland AH, Eikeland G and Patel S. 2009. Cloning and expression analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) CD3 genes. Fish Shellfish Immunol 27, 707-713. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.011>.
- Park CI, Hirono I, Enomoto J, Nam BH and Aoki T. 2001. Cloning of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* CD3 cDNA and gene, and analysis of its expression. Immunogenetics 53, 130-135. <https://doi.org/10.1007/s002510100311>.
- Park IS. 2021. A review of studies on *Oryzias dancena*. Lab Anim Res 37, 4. <https://doi.org/10.1186/s42826-020-00081-x>.
- Park IS, Gil HW, Lee TH, Nam YK and Kim DS. 2016. Comparative study of growth and gonad maturation in diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev Reprod 20, 305-314. <https://doi.org/10.12717/DR.2016.20.4.305>.
- Pasquier LD. 1982. Antibody diversity in lower vertebrates—why is it so restricted?. Nature 296, 311-313. <https://doi.org/10.1038/296311a0>.
- Pavlasova G and Mraz M. 2020. The regulation and function of CD20: An “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. Haematologica 105, 1494-1506. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.243543>.
- Peixoto BR, Mikawa Y and Brenner S. 2000. Characterization of the recombinase activating gene-1 and 2 locus in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. Gene 246, 275-283. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00091-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00091-3).
- Pereira SL, Baker AJ and Wajntal A. 2002. Combined nuclear and mitochondrial DNA sequences resolve generic relationships within the Cracidae (*Galliformes*, *Aves*). Syst Biol 51, 946-958. <https://doi.org/10.1080/10635150290102519>.
- Qin Y, Sun Z, Wang W, Xu J, Wang B, Jia Z, Li X, Wang J, Gao Q, Chen X and Zou J. 2021. Characterization of CD3 γ/δ ⁺ cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Dev Comp Immunol 114, 103791. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103791>.
- Ransangan J and Manin BO. 2010. Mass mortality of hatchery-produced larvae of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), associated with viral nervous necrosis in Sabah, Malaysia. Vet Microbiol 145, 153-157. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.016>.
- Roberts TR. 1998. Systematic observations on tropical Asian medakas or ricefishes of the genus *Oryzias*, with descriptions of four new species. Ichthyol Res 45, 213-224. <https://doi.org/10.1007/BF02673919>.
- Rodgers KK, Bu Z, Fleming KG, Schatz DG, Engelman DM and Coleman JE. 1996. A zinc-binding domain involved in the dimerization of RAG1. J Mol Biol 260, 70-84. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0382>.
- Schatz DG and Swanson PC. 2011. V(D)J Recombination: Mechanisms of initiation. Annu Rev Genet 45, 167-202. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132552>.
- 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>.
- Shlyakhtenko LS, Gilmore J, Kriatchko AN, Kumar S, Swanson PC and Lyubchenko YL. 2009. Molecular mechanism underlying RAG1/RAG2 synaptic complex formation. J Biol Chem 284, 20956-20965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.028977>.
- Smith NC, Rise ML and Christian SL. 2019. A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. Front Immunol

- 10, 2292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>.
- Song HY, Nam YK, Bang IC and Kim DS. 2009. Embryogenesis and early ontogenesis of a marine medaka, *Oryzias danconena*. Korean J Ichthyol 21, 227-238.
- Suetake H, Saha NR, Araki K, Akatsu K, Kikuchi K and Suzuki Y. 2006. Lymphocyte surface marker genes in fugu. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics 1, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2005.08.002>.
- Sushila N, Das BK, Mir IN, Rout AK, Pani Prasad K and Tripathi G. 2020. Cloning, characterization and ontogenetic expression profile of RAG-2 and IgM in angelfish (*Pterophyllum scalare*). Gene 739, 144496. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144496>.
- Swanson PC. 2001. The DDE motif in RAG-1 is contributed in trans to a single active site that catalyzes the nicking and transesterification steps of V(D)J recombination. Mol Cell Biol 21, 449-458. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.2.449-458.2001>.
- Talukder SR, Dudley DD, Alt FW, Takahama Y and Akamatsu Y. 2004. Increased frequency of aberrant V(D)J recombination products in core RAG-expressing mice. Nucleic Acids Res 32, 4539-4549. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh778>.
- Tedder TF and Engel P. 1994. CD20: A regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunol Today 15, 450-454. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90276-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90276-3).
- Teng G, Maman Y, Resch W, Kim M, Yamane A, Qian J, Kiefer-Kwon KR, Mandal M, Ji YH, Meffre E, Clark MR, Cowell LG, Casellas R and Schatz DG. 2015. RAG represents a widespread threat to the lymphocyte genome. Cell 162, 751-765. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.009>.
- Tian HF, Xing J, Tang XQ, Chi H, Sheng XZ and Zhan WB. 2022. Cluster of differentiation antigens: Essential roles in the identification of teleost fish T lymphocytes. Mar Life Sci Technol 4, 303-316. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00136-z>.
- Tonegawa S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. Nature 302, 575-581. <https://doi.org/10.1038/302575a0>.
- Villa A and Notarangelo LD. 2019. RAG gene defects at the verge of immunodeficiency and immune dysregulation. Immunol Rev 287, 73-90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/imr.12713>.
- Willett CE, Cherry JJ and Steiner LA. 1997. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish. Immunogenetics 45, 394-404. <https://doi.org/10.1007/s002510050221>.
- Yu CS, Chen YC, Lu CH and Hwang JK. 2006. Prediction of protein subcellular localization. Proteins Struct Funct Bioinf 64, 643-651. <https://doi.org/10.1002/prot.21018>.
- Yurchenko V, Xue Z and Sadofsky M. 2003. The RAG1 N-terminal domain is an E3 ubiquitin ligase. Genes Dev 17, 581-585. <https://doi.org/10.1101/gad.1058103>.
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez-de FC and Cortés A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. Fish Shellfish Immunol 20, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>.
- Zhang XL, Lu YS, Jian JC and Wu ZH. 2012. Cloning and expression analysis of recombination activating genes (RAG1/2) in red snapper (*Lutjanus sanguineus*). Fish Shellfish Immunol 32, 534-543. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.001>.