

북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 에서 분리한 Toll-like receptor 2/6 유전자의 분자생물학적 특성 및 발현분석

문지영, 박은희, 공희정, 김영옥, 김동균, 안철민, 남보혜

국립수산과학원 전략양식연구소 생명공학과

Molecular Characterization and Expression Analysis of a Toll-like receptor 2/6 gene from Abalone (*Haliotis discus hannai*)

Ji Young Moon, Eun Hee Park, Hee Jeong Kong, Young-Ok Kim, Dong-Gyun Kim, Cheul Min An and Bo-Hye Nam

Biotechnology Research Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) are a major pattern recognition receptor that recognize the structure of invading pathogen and play key roles by triggering immune response. In this study, we identified a sequence of TLR homolog and characterized at molecular level from the abalone (*Haliotis discus hannai*). Multiple alignments and phylogenetic analysis of abalone TLR protein belongs to the TLR 2/6. Expression level of abalone TLR 2/6 in the tissue was comparatively high in the mantle, gill, digestive duct, and hemocytes, but lowest in the muscle. Expression level of abalone TLR 2/6 mRNA in the mantle, gill, digestive duct, and hemocytes was 20-fold, 60-fold, 115-fold, 112-fold higher than in the muscle, respectively. Expression level of abalone TLR 2/6 mRNA in the mantle was steadily increased until 12 h and decreased post-infection with *Vibrio parahemolyticus*. While the expression level of abalone TLR 2/6 mRNA in the gill and hemocytes was drastically increased at 6 and 9 h post-infection with *Vibrio parahemolyticus*, respectively. These results suggest that abalone TLR 2/6 is conserved through evolution and may play roles similar to its mammalian counterparts.

Keywords: *Haliotis discus hannai*, pattern recognition receptor, Toll-like receptor, *Vibrio parahemolyticus*

서 론

무척추동물을 비롯한 생명체는 박테리아, 곰팡이, 기생충과 바이러스와 같은 병원균의 감염으로부터 자기 보호를 위해 면역 시스템을 발달시켰다. 일반적으로 면역시스템은 선천면역과 획득면역이 존재하며 상호 보완하여 감염으로부터 숙주를 보호하는 것으로 알려져 있으나 전복과 같은 무척추동물은 획득면역보

다 선천면역에 의존적인 것으로 알려져 있다 (Iwanaga and Lee, 2005). 선천면역에 있어 가장 중요한 것은 침입한 병원균을 인지하는 과정이며 이는 병원균의 특정 패턴 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) 을 인지하는 수용체 (pattern recognition receptors; PRRs) 에 의해서 이루어진다. 이러한 수용체들은 진화적으로 보존되어 있으며 숙주에는 없으나 병원균에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan과 같은 세포막의 구성물질이나 핵산 등을 인지하고 결합하는 것으로 알려져 있다 (Medzhitov R, 2001).

Toll-like receptor (TLRs) 는 패턴인지 수용체 중 가장 잘 알려진 수용체로 초파리의 발생단계에서 발견된 후 면역반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. TLR은 척추동물을 비롯한 식물, 미생물에서 보고되고 있으며 종간에 매우 보존적이다 (Uematsu and Akira, 2008). TLR은 미생물의 구조적 특징을 인지하고 결합하는 PAMP의 종류에 따라 적어도 사람

Received: September 11, 2015; Revised: September 22, 2015; Accepted: September 30, 2015
Corresponding author : Bo-Hye Nam
Tel: +82 (51) 720-2452 e-mail: nambohye@korea.kr
1225-3480/24588

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

의 경우 지금까지 11종이 보고되고 있다 (Casanova *et al.*, 2011). 일반적으로 TLR은 주로 면역, 상피 또는 내피세포의 막에 존재하며 TLR은 단백질 서열과 세포 내 위치에 따라 면역세포의 세포막에 존재하는 형태 (TLR 1, 2, 4, 5, 6) 와 세포내막성 소기관 (TLR 3, 7, 8, 9) 에 존재하는 형태로 구분할 수 있다. 또한 TLR은 인지하는 PAMP 종류에 따라 박테리아의 세포벽 구성성분과 바이러스의 지질을 인지하는 TLR 1, 2, 4, 5, 6와 박테리아와 바이러스의 DNA, RNA와 같은 핵산을 인지하는 TLR 3, 7, 8, 9로 구분될 수 있다. TLR 2의 경우 TLR 1, TLR 6와 heterodimer을 형성하여 박테리아나 곰팡이 균의 세포벽 성분이나 그람 양성 세균의 lipoteichoic acid (LTA)를 인지하는 것으로 알려져 있다 (Medzhitov R, 2001). TLR 4의 경우는 그람 음성세균의 LPS를 TLR 5의 경우는 박테리아의 섬모를 구성하는 flagellin 단백질을 인지하여 면역반응을 유도한다 (Medzhitov R, 2001, Moon *et al.*, 2011). TLR 3는 바이러스의 dsRNA를 인지하여 type I interferon을 생성하며, TLR 7과 8의 경우 바이러스의 ssRNA를 인지하고 TLR 9의 경우 박테리아의 unmethylated CpG motif를 인지하여 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Uematsu and Akira, 2008). TLR은 주로 면역, 상피 또는 내피세포의 막에 존재하며 공통적으로 3 가지 구조로 구성된다. 이는 세포 밖으로 노출되어 박테리아나 바이러스의 분자패턴을 인식하는 Leucine Rich Repeat (LRR) 영역, 막에 걸쳐진 transmembrane domain (TM) 영역, 세포질로 노출되어 신호전달을 하는 Toll /Interleukin 1 receptor (TIR) 영역으로 구성된다 (Bell *et al.*, 2003).

사람을 비롯한 척추동물의 패턴인지 수용체의 돌연변이 또는 비정상적인 신호전달은 염증성질환과 연관되어 있다. TLR의 돌연변이는 패혈증, 면역결핍질환, 류마티스질환, 자가면역질환과 연관되어 있으며 특히 사람의 TLR 4의 돌연변이는 그람음성세균 감염 시 패혈증 쇼크를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Cook *et al.*, 2004; Sabroe *et al.*, 2003). TLR은 면역계에서 중요성이 인식된 이후 antagonist와 수용성 TLR을 활용해 패혈증에 대한 치료제로 개발되고 있다 (Kaczanowska *et al.*, 2013; Shanmugam *et al.*, 2012). 최근에는 포유류 뿐만 아니라 경골어류와 같은 수생생물에서도 다양한 종류의 TLR이 존재하고 있는 것이 밝혀졌고 분자생물학적 특징과 구조에 대한 연구가 이뤄지고 있다 (Oshiumi *et al.*, 2003; Bilodeau *et al.*, 2005). 등근전복 (Elvitigala *et al.*, 2013) 과 굴 (Zhang *et al.*, 2011) 을 비롯한 무척추동물에서도 패턴인지수용체가 존재하고 있다는 보고가 있으나 척추동물에 비해 연구결과가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 복방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 전사체 분석을 통해 TLR 유전자의 단편 서열을 확보한 후 아미노산 서열을 예측하고 분

석하였다. 정상 전복조직으로부터 TLR 2/6 mRNA의 발현 분포를 확인하고 비브리오균을 감염시킨 후 각 조직에서 시간에 따른 TLR의 발현변화를 분석하였다. 본 연구를 통하여 미생물 감염에 대한 복방전복의 면역작용에 대한 기초 자료로 활용하고자 하며 향후 병원균 감염에 대한 바이오마커로의 활용 가능성에 대해 알아보하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에 사용된 복방전복 (*Haliotis discus hannai*) 은 국립수산물학원 육종연구센터에서 공급받아, 40리터 수조 내에서 18-20°C 의 흐르는 해수에 일주일간 순치시킨 후 외관상 건강한 개체 (평균 중량; 50 g, 평균 각장; 62 mm, 평균 각폭; 45 mm, 평균 각고; 15 mm) 를 선별하여 사용하였다.

2. 미생물 배양 및 감염

*Vibrio parahemolyticus*는 25°C에서 brain-heart infusion medium (BD Biosciences, USA) 배지로 배양하였다. 배양된 균은 1.2×10^8 cells/ml로 phosphate buffered saline (PBS) 에 희석한 후 100 μ l를 근육 주사하였으며, 대조군은 동량의 PBS를 근육 주사하였다. 균을 주사한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 시간마다 3마리씩 개체를 선별하여 외투막, 아가미, 근육, 패각근, 간체장, 족부, 소화관 조직을 적출하였다. 그 후 즉시 액체질소로 고정하였으며 RNA 분리를 위해 -80°C에 보관하였다. 혈액은 주사기로 채취한 후 원심분리 (4°C, 3000 rpm, 5분) 로 혈구 세포만을 분리하여 액체질소에 고정한 후 다른 조직과 마찬가지로 RNA 분리를 위해 -80°C에 보관하였다.

3. 복방전복 TLR 유전자의 cDNA 클로닝

복방전복 조직별 (외투막, 아가미, 근육, 간체장, 혈구) RNAseq 분석을 수행하였다 (data not shown). De novo assembly를 진행한 후 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 을 이용한 대용량 시퀀스 분석을 통하여, 모시조개 (*Cyclina sinensis*) TLR 2 (accession no. AIZ97750) 와 굴 (*Crassostrea gigas*) TLR 6 유전자 (accession no. EKC38225) 와 아미노산 수준에서 상동성을 가지는 약 1044 bp의 TLR 유전자의 cDNA단편을 찾았다. 전장 TLR cDNA 클로닝을 위해 1044 bp의 TLR cDNA단편의 염기서열을 기초로 한 유전자 특이 프라이머를 디자인하였고 (HDH-TLR ORF-F: 5'-ATG CTG TAC TTT AAC GAT-3', HDH-TLR ORF-R: 5'-CTA TCT TCC TCC TCG TCT-3', HDH-TLR RT-F: 5'-GAT GCT ACG AAT GCC AAG GT-3',

```

1  ATGCTGTACTTTAACGATAGCTTTTTTCGAAACAATCTTATCTGGTCTTGACAAAATAGAG 61
   M L Y F N D S F F E T I L S G L D K I E
61  ATGCTACGAATGCCAAGGTGTCTAGTTATCCTTTTTTCCAAATGTAATATCGAACTTCCGG 121
   M L R M P R C Q L S F F P N V I S N F R
121  GAACTTAAAGAACTTGATCTTCATGGAAACCGAATTACGTCTGTAGATCCAGGAGTGTTC 181
   E L K E L D L H G N R I T S V D P G V F
181  ACCAACTTGACAAAACCTCAGACGTATAAGACTCTCACAAAATGCCATCCAGGTCATAAGT 241
   T N L T K L R R I R L S Q N A I Q V I S
241  GAAGCTGTATTTCTGTACCAATCAGAAATCAACTCACAAAACGTGAATTTAGCAAAGAT 301
   E A V F P V P I R N Q L T N V N L A K N
301  GATTATCTGTGCACCTGTGTACACCTTTGGTTTATTACATGGGTAAAGACAGATAAACAC 361
   D Y L C T C A N L W F I T W V K T D K H
361  ATATTCACGGACTTCCCAATTTATACCAATGTGAATACCCTCCGAACCTCAAATCAACG 421
   I F T D F P N L Y Q C E Y P P N L K S T
421  CTTTGATTGATGCCAATGTCTCCGAAGAGACGTGTGGATCTCACCTTATGTGTTCCC 481
   L L I D A N V S E E T C R I S P Y V F P
481  GTAGTCTATGGTATTTC AATAGTTTCAATAGTGTGATAGTCGTTATCTCGATTGCTTAT 541
   V V Y G I S I V S I V L I V V I S I A Y
541  AGATTACGTTGGCGCATTCGCATTTATATCCACATGTTGAGATACAAAAGAGGGAGGAA 601
   R L R Y R I R Y I H M L R Y K K R E E
601  GTTGATGAAGAGAGATACATCTATGATGCTTTTGTGGTTTATTGTGAGGATGATTCCAGA 661
   V D E E R Y I Y D A F V V Y C E D D S R
661  TGGGTAAGAAATAATATCATACCAAGGATTGAAGAGGAAACCAACTTTAAGCTGTGTATC 721
   W V R N N I I P R I E E E A N F K L C I
721  CACGAGAGAGACTTTGTTCTGGGAAATATATAGTTGATAACATTGTACCAATTTGGAT 781
   H E R D F V P G K Y I V D N I V T N L D
781  AATAGCAGAAACGTCATCATGGTGTCTAATTCCTTTCATTCTGAGTTCATGGTGTGAG 841
   N S R N V I M V L S N S F I L S S W C Q
841  TTTGAACACTAGCTCTGATCCAGAAACGAGCTCTGGAGAGGACGAGGGCTACGTGGTGGT 901
   F E L A L I Q K R A L E K D E G Y V V V
901  GTGCTGCTTGAAAACATTGAGGACAGGAACATGACGTCGTCACTGTATGCCCTCTTTGAG 961
   V L L E N I E D R N M T S S L Y A L F Q
961  ACTACTACCTATATCACGTGGCCAGACGAGGAGGAAGATAGACATGTATCTGGATCCGA 1021
   T T T Y I T W P D E E E D R H V F W I R
1021 CTTAAACAATGTTTGCAGAGATAGgttttttaaaaaacccccccccccccccccccccca 1044
   L K Q C L Q R *
   aaaaagtactctgcgttgataccactgctt

```

Fig. 1. The cDNA and deduced amino acid sequences of TLR from abalone *Haliotis discus hannai*. Leucine rich repeat (LRR) regions are indicated by arrows. Transmembrane domain is indicated by box and the TIR domain is indicated by a discontinuous-border arrow, and the domain's conserved consensus amino acid sequences are indicated in red.

HDH-TLR RT-R: 5'-TGG ATG GCA TTT TGT GAG AG-3', HDH-TLR 3'RACE: 5'-CAT TGA GGA CAG GAA CAT G-3'), SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) 를 이용하여 5'-과 3'-말단의 염기서열을 확보하였다. 확보된 5'-과 3'-말단의 유전자 단편을 pGEM-T easy vector (Promega) 에 클로닝하여, *E. coli* strain XL1-blue 로 형질전환 하였다. Plasmid purification kit (Intron) 로 plasmid를 정제한 후에 자동염기 서열분석기 (AB-3730XL, Applied Biosystems) 로 염기서열을 결정하였다.

4. RNA 분리 및 RT-PCR 과 qPCR을 이용한 발현분석

- 80°C 에 보관한 각각의 샘플은 TRIzol reagent (Invitrogen) 를 사용하여 RNA를 분리하였다. 1 μg의 RNA 로부터 transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche) 와 oligo (dT) primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 북방전복의 조직에서 TLR 2/6 유전자의 발현은 cDNA 서열을 기초로 제작한 프라이머 (HDH-TLR RT-F: 5'-GAT GCT ACG AAT GCC AAG GT-3', HDH- TLR RT-R: 5'-TGG ATG GCA TTT TGT GAG AG-3') 를 이용하여 RT-PCR 과 quantitative real time-PCR (qPCR) 로 확인 하였다. 내재 표준 유전자로는 북방전복의 18S rRNA (accession no. AY319433; 18S rRNA F: 5'-CTC ACG

GAA AGA GCG CGT TTA-3', 18S rRNA R: 5'-GAC TTG CCC TCC AAT AGA TC-3') 를 사용하였다. RT-PCR 조건은 다음과 같다: Pre-denaturation 95°C, 5분; denaturation, annealing, extension 각각 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초, 35회; extension 72°C, 10분. 증폭된 PCR산물은 ethidiumbromide (100 ng/ml) 이 섞인 1.5% 아가로스젤에 전기영동하여 확인하였다. qPCR은 FastStart DNA Master SYBR Green I 을 이용하여 LightCycler system (Roche Diagnostics) 에서 수행하였다. qPCR 조건은 다음과 같다: Taq activation step, 95°C, 10분; denaturation, annealing, extension 각각 95°C 10초, 57°C 5초, 72°C 30초; 40회 반복. PCR cycle이 끝난 후, 온도를 단계적으로 증가시켜 melting-curve를 분석하였다. TLR 2/6유전자 발현양은 내재표준유전자인 18S rRNA의 상대적인 발현량을 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법으로 결정하였다 (Livak and Schmittgen, 2001). 모든 실험은 3반복하였으며 데이터는 mean \pm SD로 나타내었다.

5. 바이오인포메틱스 분석

북방전복 TLR의 cDNA염기서열로부터 아미노산 서열을 유추하는 작업은 GENETYX8.0 (SDS Software Development, Japan) 프로그램을 이용하였다. 북방전복 TLR의 아미노산 서열을 이용하여 domain 분석은 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 에서 분석하였다. TLR의 염기서열과 아미노산서열 비교는 NCBI의 BLAST 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 과 데이터베이스를 이용하였다. 연체동물문에 속하는 생물 및 기타 생물들의 유사 서열을 찾은 후, MEGA 4.0 프로그램의 CLUSTALW 모듈을 이용하여 multiple sequence alignment를 수행하였으며, phylogenetic tree 는 아미노산 서열에 기초한 Neighbor-Joining 알고리즘으로 분석하여 제작하였다.

결과 및 고찰

1. 북방전복 TLR cDNA 다중서열비교 및 계통수 분석

북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 대용량 전사체 분석을 통하여 347개의 아미노산을 코딩하는 1044 bp의 TLR 유전자 염기서열 일부를 확보할 수 있었다 (Fig. 1). BLASTP search 결과, 확보된 염기서열은 모시조개 (*Cyclina sinensis*) TLR 2 유전자 (accession no. AIZ97750) 와 굴 (*Crassostrea gigas*) 의 TLR 6 유전자 (accession no. EKC38225) 와 각각 97, 95%의 상동성을 보였다. 확보한 북방전복 TLR의 단백질 서열을 SMART 프로그램으로 domain을 분석해본 결과, N-말단 부분 (Phe39-Asp62, Leu63-

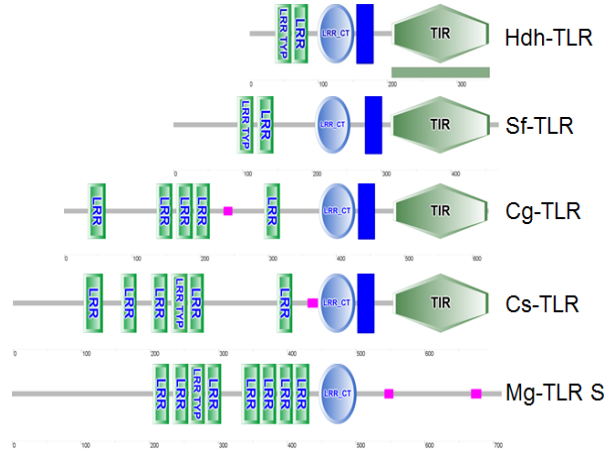


Fig. 2. Schematic structure of TLR from invertebrate homologs from *Haliotis discus hannai* (HdhTLR 2/6), *Crassostrea gigas* (CgTLR 6; EKC38225), *Cyclina sinensis* (CsTLR 2; AIZ97750), *Mytilus galloprovincialis* (MgTLR; AGI05195), *Scleropages formosus* (SfTLR; KXX00545).

Val86, Asp100-Arg153) 은 leucine rich repeat (LRR) 영역이 있었고, Val157-Ala179 영역에 막을 통과하는 구조인 transmembrane domain과 C-말단의 (Ile207-Arg347) 은 Toll /Interleukin 1 receptor (TIR) 으로 TLR의 특징적인 도메인이 존재하였다 (Fig. 2). 일반적으로 TLR은 막에 존재하는 수용체 형태로, 세포 밖으로 노출되어 PAMP와 결합하는 부분인 N-말단의 LRR 영역, 막을 통과하는 구조와 그리고 세포질 내로 노출되어 adaptor와 결합하여 신호전달이 일어나는 C-말단의 TIR domain으로 구성된다 (Bell *et al.*, 2003). 북방전복과 다른 종의 TLR의 단백질 서열을 비교한 결과, N-말단의 LRR 영역보다 C-말단의 TIR 도메인 영역의 상동성이 높았으며, 특히 C-말단의 TIR domain에는 YDA (Tyr208-Ala210), RD (Arg243-Asp244), FW (Phe337-Trp338) 와 같이 수용체가 막에 구성하기 위해 필요한 잔기들이 중간에 보존되어 있었다 (Fig. 3). 일반적인 TLR의 N-말단에 LRR이 약 7-10개 이상 반복적으로 존재하는 것으로 보고되어 있으나 본 연구에서 밝혀진 북방전복의 TLR의 경우, Asian arowana (*Scleropages formosus*) TLR과 마찬가지로 단일의 LRR로 구성되어 있었다. 북방전복 TLR이 어떤 종류의 TLR인지 알아보기 위해 NCBI 데이터베이스에서 다양한 종에서 TLR 참고 서열을 선정하고 MEGA 4 프로그램을 이용하여 Neighbor-Joining 방법으로 계통수를 그려보았다. 그 결과 무척추동물, 어류와 포유류로 분류되었고 특히 북방전복 TLR은 모시조개 그리고 굴과 같은 패류의 TLR 2 또는 TLR 6와 하나의 그룹을 이루었다 (Fig. 4).

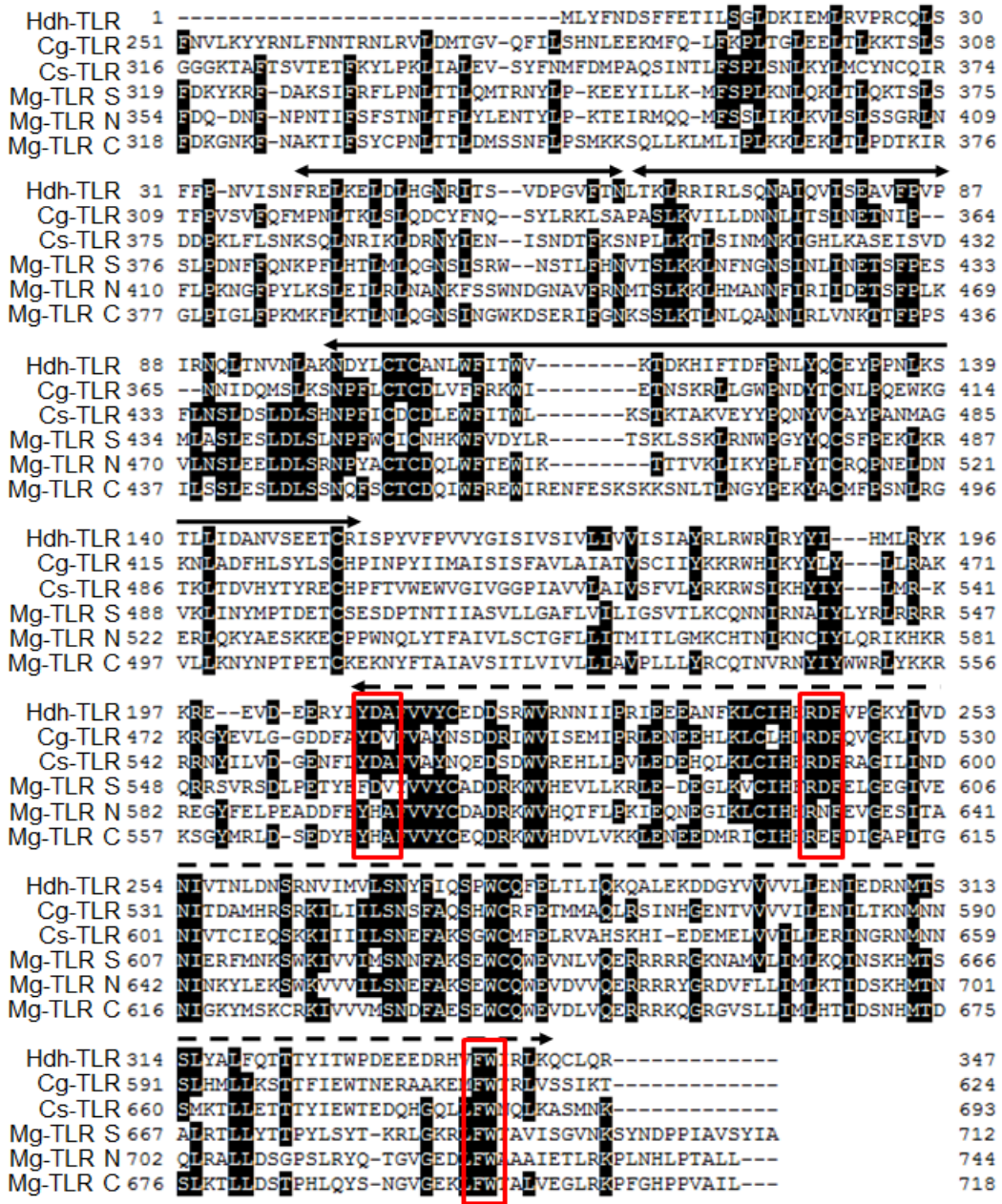


Fig 3. Multiple alignment of the amino acid sequences of abalone TLR with those of other species using ClustalW. Sequences were obtained from GenBank: *Cyclina sinensis* (CsTLR 2; AIZ97750), *Crassostrea gigas* (CgTLR 6; EKC38225), *Mytilus galloprovincialis* (MgTLR S; AGI05195, MgTLR C; AFU48615, MgTLR N precursor; AGI05190). Leucine rich repeat (LRR) regions are indicated by arrows. The TIR domain is indicated by a discontinuous-border arrow, and the domain's conserved consensus amino acid sequences are boxed.

2. 북방전복 조직에서 TLR 2/6 mRNA 발현 분석

북방전복의 9조직 (외투막, 아가미, 근육, 패각근, 간체장, 생식소, 족부, 소화관, 혈구) 에서 TLR 2/6 유전자의 mRNA 발현을 qPCR로 확인하였다. 북방전복 TLR 2/6의 mRNA는

실험에 사용된 모든 조직에서 관찰되었으며 특히 외투막, 아가미, 소화관, 혈구에서 발현이 높았고 근육에서 발현이 가장 낮았다 (Fig. 5A). 북방전복 TLR 2/6 mRNA 발현은 외투막, 아가미, 소화관 그리고 혈구에서 근육에 비해 20배, 60배, 115

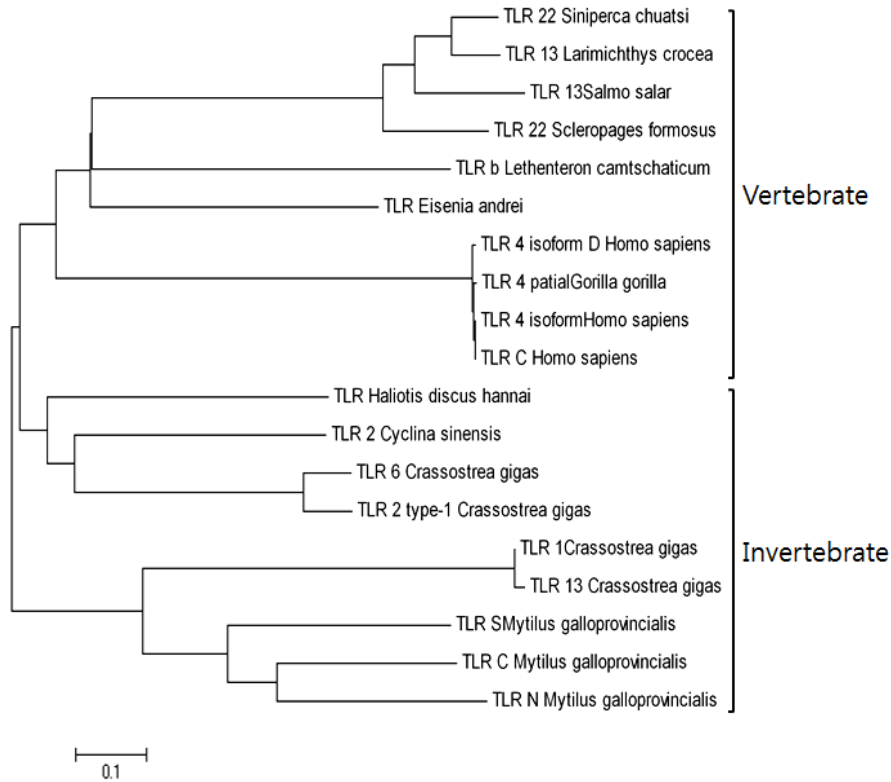


Fig. 4. Phylogenetic relationships of abalone TLR proteins with those of other species, calculated using the neighbor-joining method. Sequences were obtained from 18 GenBank: CsTLR 2 (*Cyclina sinensis*, AIZ97750), CgTLRs (*Crassostrea gigas*, CgTLR 1; NP001295783, CgTLR 2; EKC38226, CgTLR 6; EKC38225, CgTLR 13; EKC34370), MgTLRs (*Mytilus galloprovincialis*, MgTLR S; AGI05195, MgTLR C; AFU48615, MgTLR N; AGI05190), SfTLR 22 (*Scleropages formosus*, KKX00545), EaTLR (*Eisenia Andrei*, AGS14315), ScTLR 22 (*Siniperca chuatsi*, AFC95889), LcTLR 13 (*Larimichthys crocea*, KKF22743), LcTLR b (*Lethenteron camtschaticum*, BAE47506), SsTLR 13 (*Salmo salar*, NP001133860), GgTLRs (*Gorilla gorilla*, AGR83152), HsTLRs (*Homo sapiens*, HsTLR4 isoform D; NP612567, HsTLR 4 isoform C; NP003257)

배 그리고 112배 더 높았다. 이와 유사한 결과는 동근전복, 굴 그리고 비단 가리비에서도 보고된 바 있다 (Elvitigala *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013, Qiu *et al.*, 2007). 동근전복의 경우 혈구와 아가미에서 TLR의 발현이 높았으나 근육과 소화관에서는 발현량이 낮았으며 (Elvitigala *et al.*, 2013), 굴과 비단가리비의 경우 혈구에서 TLR의 발현이 높았으나 아가미, 소화관에서는 발현량이 상대적으로 낮았다 (Zhang *et al.*, 2013, Qiu *et al.*, 2007). 연체동물의 경우 혈구세포는 척추 동물의 단핵구 혹은 대식세포와 유사하게 면역세포로 작용하며 미생물의 분자패턴을 인식하고 chemotaxis와 phagocytosis에 관여한다 (Jeong and Lee, 2013; Donaghy *et al.*, 2009). 또한 체액성 면역인자인 lysozyme, lectin과 같은 항균물질을 분비한다 (Wootton *et*

al., 2003). 수생생물의 아가미는 출수·입수 시 외부로부터 유입되는 이물질과 미생물을 걸러주는 기관이므로 TLR의 발현이 높은 것으로 생각된다.

3. 병원균 감염 시 북방전복 TLR 2/6 mRNA 발현 분석

북방전복에 비브리오균을 감염시킨 후, TLR 2/6 mRNA의 발현을 확인해 봄으로써 병원균 감염에 대한 바이오마커로의 활용가능성에 대해 알아보았다. 그 결과, 병원균을 감염시킨 북방전복의 외투막, 아가미와 혈구세포에서 병원균에 의한 초기 감염 후 시간경과에 따라 TLR 2/6의 mRNA 발현이 증감하는 것을 확인하였다. 외투막에서는 비브리오균 감염 후 12시간까지 점차적으로 증가했다가 감소하였다 (Fig. 5B). 아가미와 혈구에서는 감염 후 각각 6, 9시간 쯤 발현이 급격히 증가

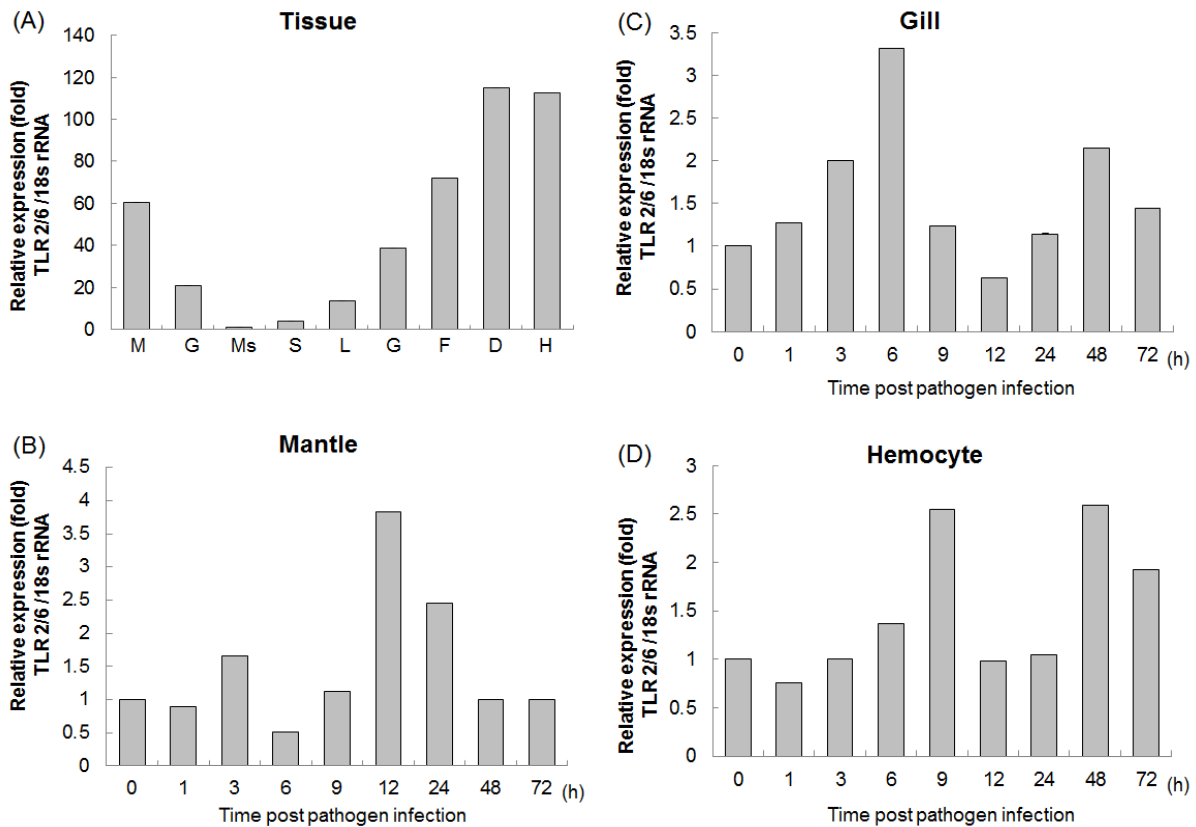


Fig. 5. Normal tissue distribution (A) and expression level of abalone TLR 2/6 mRNA in the mantle, gill and hemocytes after *Vibrio hemolyticus* infection (B, C, D). Quantitative real-time PCR was performed on equal amounts of total RNA isolated from the internal organs of control abalone. 18S rRNA was used as an internal control. To determine tissue-specific expression levels, the expression level in each tissue was compared to that in the muscle, arbitrarily defined as 1. Values represent means \pm SD (n = 3). (M, Mantle; G, Gill; Ms, Muscle; S, Shell muscle; L, Liver; F, Foot; D, Digestive duct; H, Hemocytes).

했다가 감소한 후, 48 시간 뒤 다시 증가하였다 (Fig. 5C, D). 북방전복 결과와 유사하게 등근전복 (*H. discus discus*) 에서도 비브리오균에 감염된 혈구에서 6시간째, 아가미에서는 24 시간 뒤 발현이 증가한다는 보고가 있다 (Elvitigala *et al.*, 2013). 또한 비단가리비 (*Chlamys farreri*) 의 경우 LPS를 주사 후 6시간 뒤 혈구에서 TLR의 발현이 증가하였으며 (Qiu *et al.*, 2007), 비브리오 균을 감염시킨 굴 (*C. gigas*) 의 혈구에서도 감염 후 3시간 뒤부터 12 시간까지 TLR의 발현이 증가한다는 보고가 있다 (Zhang *et al.*, 2013). *Mytilus* (*Mytilus galloprovincialis*) 에서도 그람음성, 양성 세균 감염 후 3시간 뒤부터 TLR의 발현이 증가하여 24시간까지 관찰된 바 있다 (Toubiana *et al.*, 2013; Toubiana *et al.*, 2014). 세균감염 시 외투막, 아가미를 비롯한 혈구에서 TLR의 발현이 증가하는 것을 볼 때 전복 TLR 2/6 역시 병원균 감염에 따른 면역 반응에 관여하는 것을 예상할 수 있다. 또한 북방전복의 혈구에서 병원균 감염 시 패턴인지수용체의 발현이

증가하는 것은 북방전복의 혈구 또한 중요한 면역세포임을 시사한다. 북방전복 TLR 2/6가 실제로 혈구세포의 표면에서 발현되는지, 어떠한 종류의 병원균을 인지하는지, 인지 후 어떠한 메커니즘으로 면역반응을 조절하는지에 대한 후속연구가 필요할 것이다. 지금까지 연구결과를 정리해보면 북방전복 TLR 2/6는 아미노산 서열상에 병원균을 인지하는 TLR의 특징을 잘 보존하고 있었으며, 발현패턴을 분석한 결과 병원균 감염에 대한 면역반응에도 관여함을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 무척추동물의 면역유전자를 동정하고 병원균 감염에 의한 발현변화를 알아봄으로써 무척추동물의 면역시스템을 이해하기 위한 기초자료와 병원균감염에 따른 바이오마커 개발에 활용되리라 기대한다.

결론

본 연구에서는 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 데

용량 전자체 분석을 통해 TLR 2/6 유전자의 일부 cDNA 염기 서열을 확보하였다. 북방전복 TLR 2/6 유전자는 1044 bp의 ORF 부위는 347개의 아미노산을 코딩하는 것으로 예측되었다. 북방전복 TLR 2/6의 아미노산 서열은 모시조개와 굴과 같은 패류의 TLR 2/6와 유사성이 가장 높았으며 계통수 분석을 통해 무척추동물의 TLR과 하나의 그룹을 이루었다. 북방전복 TLR 2/6에는 TLR의 특징을 갖는 Leucine rich repeat (LRR) 영역, 막을 통과하는 transmembrane domain (TM), 세포질내의 Toll /Interleukin 1 receptor (TIR) 영역이 잘 보존되어 있었고, 구조 유지에 중요한 잔기가 중간에 잘 보존되어 있었다. 북방전복 TLR 2/6 유전자의 mRNA는 관찰된 모든 조직에서 발현하고 있었으며, 특히 외투막, 아가미, 소화관 그리고 혈구에서 높게 발현되었다. 북방전복의 TLR 2/6의 발현은 비브리오균을 인위감염 시킨 전복의 외투막에서 감염 후 12시간 까지 점차적으로 증가했다가 감소하였고, 아가미와 혈구세포에서는 감염 후 6시간, 9시간째 발현정도가 최고로 증가했으며 48시간 뒤 다시 증가하였다. 따라서 북방전복 TLR 2/6는 TLR의 구조적 특징을 보존하면서 병원체 감염에 따른 면역반응 조절에 중요한 기능을 담당하고 있으므로 병원균 감염에 따른 바이오마커로도 활용 가능할 것으로 예상된다.

감사의 말씀

이 논문은 2015년도 국립수산물과학원 수산과학연구소사업 (R2015039) 의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R. and Segal, D.M. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunology*, **24**(10): 528-533.

Bilodeau, A.L. and Waldbieser, G.C. (2005) Activation of TLR3 and TLR5 in channel catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**: 713-721.

Casanova, J.L., Abel, L. and Quintana-Murci, L. (2011) Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual Reviews of Immunology*, **29**: 447-491.

Cook, D.N., Pisetsky, D.S. and Schwartz, D.A. (2004) Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*, **5**(10): 975-979.

Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K. S. and Soudant, P. (2009) Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), current knowledge and future

prospects. *Aquaculture*, **297**: 10-24.

Elvitigala, D.A., Premachandra, H.K., Whang, I., Nam, B.H. and Lee, J. (2013) Molecular insights of the first gastropod TLR counterpart from disk abalone (*Haliotis discus discus*), revealing its transcriptional modulation under pathogenic stress. *Fish and Shellfish Immunology*, **35**: 334-342.

Iwanaga, S. and Lee, B.L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**(2): 128-150

Jeong, J.E. and Lee, Y.S. (2013) Identification, sequence characterization and expression analysis of the arginine kinase gene in response to laminarin challenge from the Oriental land snail, *Nesiohelix samarangae*. *Korean Journal of Malacology*, **29**: 71-179.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**: 402-408.

Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, **1**(2): 135-45.

Moon, J.Y., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, Y.O., Kim, W.J., Kim, B.S., Kim, K.K. and Lee, S.J. (2011) Maximal transcriptional activation of piscine soluble Toll-like receptor 5 by the NF- κ B subunit p65 and flagellin. *Fish and Shellfish Immunology*, **31**(6): 881-886.

Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K. and Seya, T. (2003) Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics*, **54**: 791-800.

Qiu, L., Song, L., Xu, W., Ni, D. and Yu, Y. (2007) Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**: 451-466.

Kaczanowska, S., Joseph, A.M., and Davila, E. (2013) TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, **93**(6): 847-863.

Sabroe, I., Read, R.C., Whyte, M.K., Dockrell, D.H., Vogel, S.N. and Dower, S.K. (2003) Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. *Journal of Immunology*, **171**(4): 1630-1635.

Shanmugam, A., Rajoria, S., George, A.L., Mittelman, A., Suriano, R. and Tiwari, R.K. (2012) Synthetic Toll like receptor-4 (TLR-4) agonist peptides as a novel class of adjuvants. *PLoS One*, **7**(2): e30839.

Toubiana, M., Gerdol, M., Rosani, U., Pallavicini, A., Venier, P., and Roch, P. (2013) Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: complete cds and gene expression levels. *Developmental and Comparative Immunology*, **40**: 158-166.

Toubiana, M., Rosani, U., Giambelluca, S., Cammarata, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P. and Roch, P. (2014) Toll signal transduction pathway in bivalves: complete cds of intermediate elements and

- related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **45**: 300-312.
- Uematsu, S. and Akira, S. (2008) Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handbook Experimental Pharmacology*, **183**: 1-20.
- Wootton, E.C., Dyrzynda, E.A. and Ratcliffe, N.A. (2003) Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish and Shellfish Immunology*, **15**: 195-210.
- Zhang, L., Li, L. and Zhang, G. (2011) A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, **30**: 653-660.
- Zhang, Y., He, X., Yu, F., Xiang, Z., Li, J., Thorpe, K.L. and Yu, Z. (2013) Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. *PLoS One*, **8**: e76464.