

돌돔, *Oplegnathus fasciatus*의 Cyclooxygenase-2 유전자의 cloning 및 발현분석

진지웅 · 김도형* · 김영철 · 정현도[†]

부경대학교 수산생명의학과, 전남대학교 수산생명의학과*

Cloning and Expression of the Cyclooxygenase-2 gene in the Rock bream, *Oplegnathus fasciatus*

Ji Woong Jin, Do Hyung Kim*, Young Chul Kim and Hyun Do Jeong[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, South Korea

*Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, South Korea

Megalocytivirus is a major fish pathogen in marine aquaculture of Asian countries including Korea. Despite of many species affected by this pathogen, little is known interaction between megalocytivirus and the fish immune system. One of the cyclooxygenase isoforms, named COX-2, is playing an important role in immune regulation, and distinct from COX-1 isoform of constitutive activity. COX-2 enzyme is induced by various inflammatory signals, including injection of lipopolysaccharide or infection by pathogenic agents. We cloned COX-2 gene in rock bream using degenerated primers designed from reported sequences of other fish species in PCR followed with 5'- and 3'-end RACE-PCR. The full length of cDNA of rbCOX2 (rock bream COX-2) gene are 2655 bp and that translates into 609 amino acids. The rbCOX-2 genomic organization are found to span 10 exons separated by 9 introns. We also studied if the experimental infection of rock bream with megalocytivirus could affect the expression of COX-2 gene. When injected with LPS, expression of the COX-2 gene was reached peak level at 1 day post injection and showed 13.10 fold increased level compared with that of control. While, when injected with megalocytivirus, we were not able to find significantly increased COX-2 gene expression different from that of control. Cloned and analyzed COX-2 gene in rock bream will help to understand defence mechanisms in fish after viral infection and will also support the development of the measures for treatment and prevention of viral infection.

Key words : COX-2, Rock bream, LPS, Megalocytivirus

Prostanoid는 다양한 생리적 과정에 작용하는 지방산으로, 포유류에서는 온도조절, 수분조절, 배란과 출산에 중요한 역할을 하며, 통증, 열, 염증, 신경과사

성 질병과 암의 발병 시 높은 발현을 한다. 이러한 prostanoid는 arachidonic acid을 prostaglandin H2로 변환시키는 촉매작용을 하는 cyclooxygenases (COX)에 의해 형성된다.

COX enzyme에는 COX-1, COX-2 그리고 COX-3 3가지의 isoform이 알려져 있으며, COX-3는 COX-1의

[†]Corresponding author: Hyun-Do Jeong

Tel : +82-51-629-5941

Fax : +82-51-629-5936

Email : jeonghd@pknu.ac.kr

splice variant로 frame shift mutation으로 인해 생겨 COX-1b 또는 COX-1 variant (COX-1v)라고 불리기도 한다 (Chandrasekharan *et al.*, 2002). 기본적으로 사람의 경우 COX-1과 COX-2는 아미노산이 서로 약 60-65% 일치하며 효소의 활성은 비슷한 것으로 알려져 있다. 그러나 대식세포나 다른 염증부위에서 growth factor, cytokines 그리고 endotoxine등과 같은 염증유발물질에 의해서 합성이 유도되는 inducible enzyme인 COX-2 유전자는 위장관, 신장, 혈소판, 혈관내피세포 등 모든 조직에 항상 내재적으로 존재하는 constitutive enzyme인 COX-1 enzyme과는 구별되고 있다 (Francesco *et al.*, 2005). 어류에서는 최근 rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* 와 brook trout, *Salvelinus fontinalis*, Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*, mummichog, *Fundulus heteroclitus*, zebrafish, *Danio rerio*, longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecemspinosus* 등 몇몇 어류에서 COX-1과 COX-2 유전자가 밝혀졌고, COX-2 유전자의 경우 사람과 같이 염증반응을 매개하는 유전자라고 보고되고 있다 (Ishikawa and Herschman, 2007; Roberts *et al.*, 2000; Havird *et al.*, 2008; Choe *et al.*, 2006).

Megalocytivirus는 전 세계적으로 많은 양식어종에 큰 피해를 주고 있으며, 우리나라에서는 돔류 및 넙치과 어류에 감염되어 경제적으로 큰 손실을 야기시키고 있다. 하지만 현재 megalocytivirus 감염에 대한 치료법이나 대책은 전무한 실정이다. Megalocytivirus 감염의 예방법이나 치료대책을 세우기 위해서는 바이러스 자체에 대한 연구뿐만 아니라 감염에 의한 어류의 방어 체계분석도 함께 연구되어야 한다. 현재 우리나라에서 매우 중요한 양식어류의 한 종인 돌돔의 면역유전자에 관한 연구는 Mx 유전자 (Zenke and Kim, 2009), TNF- α 유전자 (Kim *et al.*, 2009)에 관한 연구 등이 보고되어 있으나, 아직까지 면역유전자에

대한 정보는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 우리나라 주요 양식어종인 돌돔 COX-2 유전자의 전체 염기서열과 분자생물학적인 특징에 대해 분석 하였으며, megalocytivirus 감염 시 COX-2 유전자의 초기면역 반응에 조사 하였다.

재료 및 방법

실험 어

외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 5-6 g 되는 양식산 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*을 거제의 한 양식장에서 구입하여 250 L 수조에서 1일 2회 사료 투여 및 사육수 환수를 하며 $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 2주간 순치시킨 뒤 실험에 사용하였다.

COX-2 유전자의 cloning

LPS (*Escherichia coli* O127:B8 lipopolysaccharide, Sigma-Aldrich, USA)를 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 맞춘 후 한 마리당 100 μL 씩 복강주사하여 24시간 동안 자극시킨 돌돔의 간 조직을 사용하여 TRIzol Reagent (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 total RNA를 분리하였다. 분리된 1 μg 의 total RNA를 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase와 oligo-dT primer를 이용하여 42°C 에서 45 분간 반응시켜 cDNA로 합성하였다.

Oncorhynchus mykiss (AJ238307), *Salvelinus fontinalis* (AF158373) 그리고 *Micropogonias undulatus* (AB292357)의 COX-2 유전자의 염기서열을 비교하여 유사한 부위에 primer (dgpCOX2 F, dgpCOX2 R)를 제작하였고 (Table 1), 준비된 cDNA를 template로 하여 PCR하였다. PCR 생성물은 TOPO-TA vector (Invitrogen)에 삽입하고, competent cell (*E. coli*, DH-5 α)에 transformation 시켰다. 배양 후 plasmid DNA를

Table 1. Primer used in this study

Gene	Name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	Object
COX-2	dgpCOX2 F	acccaccagttcttcaaatac	For partial cDNA cloning
	dgpCOX2 R	ctgtaggcgttgagggactg	
COX-2	5' rbCOX2 1st	gaagtgatatccgctcagggtgctgcacgtag	For full length of gene
	5' rbCOX2 2nd	gaagcggtagagagtcaggaacatgaggagg	
	3' rbCOX2 1st	ggctcttccagacctcacggctcattctg	
	3' rbCOX2 2nd	gtcccaggacctaatacatgtacgtggccatc	
COX-2	rbCOX2 UTR F	aacagcgaagcgacacaaact	For genomic walking
	rbCOX2 UTR R	caagccaatacacagcctca	
β -actin	rbB-actin F	caggagagaagatgaccaga	For quantitative PCR
	rbB-actin R	catagatgggcactgtgtgg	
COX-2	rbCOX2 F	accttgtggagtcgttcacc	
	rbCOX2 R	catggagaatcgcttcctgt	

분리하고 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

5'와 3'-ends의 염기서열은 GeneRacer™ Kit (Invitrogen)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 RACE-PCR을 수행하고, 그 생성물을 cloning하여 전체 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열과 아미노산은 BioEdit program (Ver. 7.0.6, USA)을 이용하여 비교하였다.

Clustal W program (European Molecular Biology Laboratory)을 이용하여 정리한 염기서열은 MEGA4 program (Ver. 4.1, USA)을 이용하여 Phylogenetic tree를 만들어 비교하였다.

Genomic COX-2 유전자의 cloning

Genomic DNA 분리를 위해 돌돔 간 조직 약 10 mg을 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit

(Bioneer, Korea)를 제조사의 방법에 따라 사용하여 분리하였다.

RACE PCR을 통해 밝힌 돌돔 COX-2 cDNA의 5'와 3'-ends untranslated region (UTR)에 각각 specific primer (rbCOX2 UTR F, rbCOX2 UTR R)를 제작하였다 (Table 1). 분리한 돌돔의 genomic total DNA를 template로 하여 PCR을 수행한 뒤 그 생성물을 cloning하고 염기서열을 분석하여, 돌돔 COX-2 유전자의 genomic DNA 염기서열을 결정하였다.

돌돔COX-2 유전자의 발현분석

돌돔 두신에서의 leukocyte분리는 Graham *et al.* (1988)의 방법에 따라 percoll을 이용하여 분리하였다. 분리한 leukocyte는 24 well plate에 10^6 cells/mL 농도로 분주한 뒤 25℃에서 3시간 배양하였다. 그 후 LPS (50 μ g/mL) 및 돌돔에서 분리된 megalocytivirus 인 IVS-1 (1 mg/mL) (Jeong *et al.*, 2003)를 접종하였고, 대조구에는 세포배양 배지인 L-15를 접종하였다. 접

종 6시간 후 leukocyte에서 RNA를 분리하였고 cDNA를 합성하였다.

In vivo 실험의 경우 돌돔에 LPS (500 µg/mL), megalocytivirus IVS-1 (10 mg/mL) 그리고 대조구로 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)를 각 그룹별로 돌돔 한 마리당 100 µL 씩 주사하였다. 채집은 1일, 3일 그리고 7일째에 각 그룹 당 3마리씩 취하여 간에서 total RNA를 분리하고, oligo-dT primer를 이용하여 total cDNA를 합성하였다. COX-2 유전자의 발현을 분석하기 위한 qPCR은 Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, AUS)을 이용하였다. 0.2 mL microtube에 SensiMixPlus SYBR (Quantace, USA) 10 µL, 1 µM의 각각의 primer, template DNA로서 cDNA를 첨가한 후, 증류수로 PCR 혼합물 최종 volume이 20 µL가 되게 하였다. qPCR의 조건은 95°C에서 10분간 반응한 후, 95°C 10초, 55°C 15초, 72°C 20초의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycles를 반응시켰다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72°C부터 95°C까지의 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. 분석방법은 상대정량으로 하여 β-actin과 돌돔COX-2 유전자의 비교에 따른 상대정량으로 비교한 후 정상어와 감염어에 대한 상대적 발현량을 계산하는 -ΔΔCt methods로 분석하였다 (Livak and Schmittgen, 2001). 발현분석의 계산은 다음과 같다.

$$\Delta Ct = COX-2 \text{ gene } Ct - \beta\text{-actin } Ct$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{IVS-1 \text{ or } LPS} - \Delta Ct_{PBS}$$

$$\text{Gene expression} = E^{-\Delta\Delta Ct}$$

여기에서 Ct는 threshold cycle을 의미하며, E는 PCR의 efficacy이며 1.98 이하의 efficacy를 나타낸 sample은 사용하지 않았다.

통 계

결과의 통계처리는 Statistical Package for the Social Science (SPSS, Ver. 12.0)을 사용하여 정상어와 감염어 간의 유의차를 One-way ANOVA test를 실시하여 유의성을 검정하였고 P-value가 0.05 이하의 경우 유의한 값으로 나타내었다.

결 과

돌돔 COX-2 cDNA의 cloning과 유전적 특성 분석

LPS로 자극시킨 돌돔의 간 조직에서 분리한 RNA와 이전에 보고된 COX-2 유전자에 conserved 하게 제작한 primer (dgpCOX-2 F, dgpCOX-2 R)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 785 bp의 product를 얻을 수 있었으며, 염기서열 분석을 통하여 다른 어종의 COX-2 유전자와 높은 유사도를 보임을 확인할 수 있었다. 따라서 785 bp의 fragment 를 COX-2 유전자의 부분 염기배열로 하여, 전체 염기서열을 결정하기 위해 5' 및 3' RACE-PCR을 수행한 결과 총 2655 bp의 COX-2 유전자 전체 염기서열을 결정할 수 있었다.

돌돔COX-2 유전자는 형태적으로 125 bp의 5' UTR과 703 bp의 3' UTR 그리고 1827 bp Open reading frame (ORF)으로 구성되어 있었다 (Fig. 1). 또한 COX 유전자에서 특이적으로 나타나는 2개의 hem-binding sites (Val-Ala-Lys-Gly-His; Thr-Ile-Trp-Leu-Arg-Glu-His-Asn-Arg-Ala)와 기능적으로 중요한 아미노산인 N-glycosylation site (Asn-56, 133, 399), cyclooxygenase active site (Tyr-374, His-377, Ser-519), 그리고 peroxidase activity site (Gln-192, His-196)를 확인할 수 있었다. 또한 COX-1과 COX-2 유전자를 구분하는 아미노산인 Arg-502과 Val-512을 통하여 본 연구에서 밝힌 유전자가 COX-2임을 확인할 수 있어, 이를 rock bream COX-2 (rbCOX-2) 유전자라 명명하였으며,

GGACACTGACATGGAAGGAGTAGAAATTCAAACTCCGAGCCTCAGAGCGACGAGCTGCGGAGGAAAAGGAGAGAGAGAGAGAG 90
 GAAAGAACAGAAGATCTGACAAAGTCTTTGGAGTATGAACAGACTCACACTTGGCGTTTCCCTCTTGGCACTGGGTTTTCTTGCTGCG 180
 M N R L T L A V S L L A L G F L V C

AGCTGGTAAAGTAGAGAAAACAGAAGATTATTCTGACAGCTCAACCAGAAGTCTTACAAGTTCGGTTTTGGGTGTCTAAAGTTTTATTT 270
 E A

TCGTTTTGTATTTTTATTATTTTGCAGGCTGTCTTATATCTTATGGCTTAGAGATTTATATATTATAAGGAATATTGTAGTGTCT 360
 GGGGTGATATTTTCAATGATATTTTGAAGATTCTTAACAGATTGTGTTGGTATCTGAAGTGATTCCTCAGTAACCGCCCAACATTGTC 450
 TGTCACAGCTAACCCATGTTGCTCAGACCCGTGCCAGAACAGGGCGTTTGCACAGCACTTGAACAGATAAATATGAGTGGGATTGCAC 540
 G N P C C S D P C Q N K G V C T A L G T D N Y E C D C T

ACGCACAGGATATATGGACAAAACGCACACAGCTAAGTATGAATGGCACACGTGAGGTGAAGATAAAATCAGGATAGTATGTGTTGT 630
 R T G Y Y G Q W C T T

GGTGATTTGTCAGTAATTAAATCCCTCTTGGACTTTACAGCTGAATTCCTACCTGGGTCAAAATCTCCCTGAAGCCATCGCCCAAC 720
 P E F L T W V K I S L K P S P N

ACGGTCCACTACCTTCTCACCACCTTCAAGGGCTTCTGGAACATCATCAACAACATCTATTCTCAGGATGCCATCATGAGATATGTG 810
 T V H Y L L T H F K G F W N I I N N I S F L R D A I M R Y V

CTGACATGTAAAGTGTCTAGCTGAAGGCAAGTGAGAAGATGGGTGGAACCTGCCTATAACACATCAATAATTTGTACAGCAGGTT 900
 L T

GTAGAGAAGTGGTGTGGCATTCTACTAATAATGAAATGCTTTTTTCTCTCCAGCCGATCCCACTTGATTGATAGTCTCCAACCT 990
 S R S H L I D S P P T

TCAATGCGGATTATGGTTACAAAAGCTGGGAAGCCTATTCCAACCTTTCTACTATACGCGCACCTCCCCCTGTGGCAGAGGATTGCC 1080
 F N A D Y G Y K S W E A Y S W L S Y Y T R T L P P V A E D C

CAACCCCTATGGGAGTAGTAGTGTGAGTACT 1170
 P T P M G V V

CCATGGCTCGGCTCATTACATCACGGGAAGTGACACATTGAAATGATCCCTTCTGCTGGATTGACAGGGAATGTGCTGAAGGAACGC 1260
 CGCAAAACCTGCCTCAGCAAGCCAAAACCTAAAGAACATGAAACCTTTTTTTTCCCAATTTGTGTCTCAGGAATTTACAATGAAAGTTAAC 1350
 CTCAGTCATAGCCTTTCTCTACAAGTAAATCAATCAGTTAATGTGTTGTATCCAAATTAACCTGGCTGTCTCTGTATGCTCACTGTAAT 1440
 GTTCTTAATTTGTTTCTCTAGGTAAAAAGGAGCTACCTGACGCTAAGATACTGGCCGAGAAGCTTCTGATGAGAAGACAGTTATCCCGGA 1530
 G K K E L P D A K I L A E K L L M R R Q F I P D

CCCCCAGGGAACAGTCTGATGTTTGGCTTCTCGCACAGCATTTCACCCACCAGTTCTTCAAATCTGATATGAAGAAAGGACCTGCTTT 1620
 P Q G T S L M F A F F A Q H F T H Q F F K S D M K K G P A F

TACCGTTGCTAAAGGTCACGGGTAAAGCACAGCAGATTCAAGCCCATCAGATTTTGGTCGGGAAAGTGAGACAAAGAAATCGTTTGTTA 1710
 T V A K G H G

AAAATACAGCATGTGCTCATGGTGTGTTTCTGCTTCCAGTGGACCTCAACCACATTTATGGAGACAGCCTGGAGAGGCAGCACAGCT 1800
 V D L N H I Y G D S L E R Q H K L

CAGACTCTTAAAGGACGGCAAGCTTAAATATCAGTTATGAGAAGAGCAGATGTTACGAGTTTAAACAGCCAAATGCTTCAGACCACAC 1890
 R L L K D G K L K Y Q

AAGTGTCTAACGGTTGCTTTCTCTCTTGCATAAATCTGCAAGTCTGGATGGAGAGGTGACCCCCAACAGTAAAGGAAGTGGCGTT 1980
 I L D G E V Y P P T V K E V G V

GACATGCACTACCTCTCTCATGTTCTGACTCTCACCGCTTCGCTGTGGGCCACGAGGCTTCGGCTGGTCCCCGGCTGATGATGTAC 2070
 D M H Y P P H V P D S H R F A V G H E A F G L V P G L M M Y

GCCACCATCTGGCTACGGGAACACACCGGGCGTGTGACGTGCTGAAGGAGGTCCACCTGACTGGGACGACGAAAGGCTCTTCCAGACC 2160
 A T I W L R E H N R A C D V L K E V H P D W D D E R L F Q T

TCACGGCTCATTCTGATTGGTGAGTTTACAAGATTCTGACAACTGCACAAACTTTTGAAAACATTTGCTCTATTGTATTGTCTGGGAAA 2250
 S R L I L I

ATAAAGTAAAAATGACAAGAGAGCCAAATAGTTACCATGGGAGTTATGAAAGAGGAAGTTGACTTTTTATTTCTGTAATCAGCTAC 2340
 TAGCAACCGTATTTGCACACTGCAGATCATTTGAGCTCTACTGTGAGAAACAGGATTTACTGACTGATGTGAGAAAGAGGAAATGTTTGAC 2430
 TTCCTGCTGACGTCAAACCTACTACAGCCAAACAACTTAAAGATCCCCCACCACATGTTTAAAGACATATGAAATACACTGCTTGAA 2520
 TAATAATTTGCGTCTGATATTGATTTCCACAAAAAGCAAACCTACTTAAATTTTAAACTAAATGTACTTCTCTCACTGCTTGAA 2610
 AAATACAGAATCTTATTCAAAGTTTAAATGCTGGACACAGAAGTCTCTAATTCATAACAGTTTATTCTCAATGTATGTGAACCT 2700

Fig. 1. Continued.

TAAACATCTATAATATCTGCATTACATAAAATATTTGATCATTTGTCTGCAAGAGAGACCATCAAGATCGTGATCGAGGACTACGTGCA 2790
 G E T I K I V I E D Y V Q
 GCACCTGAGCGGATATCATCTCAAGCTCAAGTTGACCCGAGCTGCTCTTCAACCAGCGCTTCCAGTACCAGAACCGATTGCGTCCGA 2880
 H L S G Y H F K L K F D P E L L F N Q R F Q Y Q N R I A S E
 GTTCAACACCCGTGTACCCTGGCACCCTGATGCGCTGATTTTCCACGTTGAGGAGCAGGATTACAGCTATAAACAGTTTGTCTTCAA 2970
 F N T L Y H W H P L M P D S F H V E E Q D Y S Y K Q F V F N
 CACCTCTGTGGTGACCGAGCAGCGCATCAGCAACCTTGTGGAGTCGTTACCAACCAGATCGCTGGACGGTAAGAGCTGTTGAGCTGT 3060
 T S V V T E H G I S N L V E S F T N Q I A G R
 CGTAGCAGCACTTAGATTAGATTGTGACACCAGTGTGCTTTAAGGCTGATTACTGACTTCCCATTATTCTTTTTAGTTGCAGGT 3150
 V A G
 GGCGAAATGTCCAGGACCTATCATGTACGTGGCCATCAAGTCTATTGAAAACAGCCGACAGATGCGCTACCAGTCTCTGAACGCTAC 3240
 G R N V P G P I M Y V A I K S I E N S R Q M R Y Q S L N A Y
 AGGAAGCGATTCTCCATGAAGCCCTACAGTTCTTTGAAGACATGACAGTGAGACGAAGTCAAGATCATTCACAAGCCCTAATAC TTGC 3330
 R K R F S M K P Y S S F E D M T
 AGGTGGAAGGATGACGGCAGGAGATTAGTGAAGATGTTATTATCAACATGAAATGAAAGGAAATGTTGCCTCAGGCCAAATTATAGTTG 3420
 CATTATTGATAGCATTGTTATGAGCTGATTGCAGGAATTA AAAACACACCCAGCTGCCACAGATCAAGCTTGTGTCATAGATTACTTA 3510
 T TACTAAGGAAATGGTTTGGACTCAGCTCTAGTCCCCAGCAGCTTTGGAGGTTAGGAATTTATTTCCGTGACTCTTAAGACCAAGGTGT 3600
 TCACCTTCGTCTTGAGACAGTGTAAAGCAGATTGTCATCAGAGAGCAAGACATAAACAGACAAGAGAGGCCTCTGCTTCAGAGGAGAAG 3690
 ATTTAAATTTTCGCAAGATAAGAGGATTTAATATCAAAACTAACGTGATGTATGTATGAGGAGAGGAAATATCAGTGTGTGTGTGTGT 3780
 GTGCTTGAAGAGAGCATGAATGAGAAGGAAGTGAAGACAGAAAGAGATCATTTTTATCTACCATTGCTGGATTGTAATCAGTCAAA 3870
 ACACAGAGCTCATATTTAGACTAGCAGCAAGCTTTGACAGCTGCTGAGCCAGCAAGAGAAGCCAGATTGAGGCGCTAACCAAAACTATTTT 3960
 CTCTCTGTGTTACTCAGAGAGAAAGAAATGGCCGAGTACTCAGGAGATGTACGGACATCGACGCTGTGGAGCTCTACCCGGGTC 4050
 G E K E M A A V L E E M Y G H I D A V E L Y P G
 TGCTGGTGAGAAACCCAGGCTAACGCCATCTTTGGGAGACCATGGTGAGATGGGGGCCCTTTCTCCCTCAAGGCTTAATGGGAA 4140
 L L V E K P R P N A I F G E T M V E M G A P F S L K G L M G
 ACCCATCTGCTCCCGGAGTACTGGAAGCCAGCACAATCGGAGGCAGCGTGGGCTTCGACATCGTCAACACCGCTCCCTGCAGAGGC 4230
 N P I C S P E Y W K P S T F G G S V G F D I V N T A S L Q R
 TCGTCTGCAATAACGTCCCGGGCCCCGTCCCGTGGCATCCTTTTATGTGCCCCGACGTTAAAGACACGGGCTCCATGATCATCAACTCAA 4320
 L V C N N V R G P C P V A S F H V P D V K D T G S M I I N S
 GCACGTCCCACTCGCGCAGCAGTGATATCAACCCACAGTCATTTTGAAGAAAGGACTACTGAGCTTTAAATTTTGTGTTTATTTCTTAG 4410
 S T S H S R S S D I N P T V I L K E R T T E L *
 GTTCTTTTTTAATATATGATATTTATTTATTTATTTATTTTGTATTTATTTGCCCCATATTTATAACATAACATGAGAAAGTGCAACACAG 4500
 AGTTTTTTTTATATGTAATTTTGTATGTTTTGCCGTATTATCGAACAAAAGCTGTGGTTGTGTTTATTTATTTGAAAGATTGTTATTAT 4590
 AAGTTATTTGTCAGTAATGACCTCAGTCACTGCAACTTGATCTTGAAGGTTGGTTTATAGTTTCACTGCATAGTAGCGTACATTACA 4680
 CTTCATATGTAATAATTATGTTTCATTCAATTGTGCGGCTGCCCGAGTGACCCACAGAGATCTGTTTTCAGACAGCGATTACGTAGCAT 4770
 CAGTAGTAATGTTACAGTGAACCTAACGACTGATCTCTTGATCTAATGTAAACACACAGCAAAAGTGCAATTCCTGTTTCAGTATTGTTCTA 4860
 CTGATGTTTTTTCTTCTGAGGCTGTGATTGGCTTGGGTAATTTGAAATGACATGAATAACCCGTGAGTTTAAGCTGCACTGTGTTTAA 4950
 AACTGTACTGTTGTTCTGTAGAAATGTATCATTCAGTTATATAGGCTTAACAAAGCCATGCAGTTTCTTAGTTTGTGTTCAATGCCTA 5040
 TTGACTTGAAGGTTGACACTAATAAATGCTACCAGAAATGGAACGCTTTCT 5094

Fig. 1. Compiled full-length of rock bream COX-2 gene sequence. Exon regions underlined are derived from the cDNA sequence. Start/stop codons and the splicing motifs (GT/AG) are gray boxes. The two domains that the hem-binding sites are empty boxes. Functionally important amino acids are indicated italic; cyclooxygenase active site (Tyr-374, His-377, Ser-519), the N-glycosylation site (Asn-56, 133 and 399) and peroxidase activity (Gln-192 and His-196).

GenBank에 등록하였다 (Accession number, FJ952157).

다른 유사 어류에서의 COX-2 아미노산 서열 비교에서 rbCOX-2는 Atlantic croaker COX-2와 94.4%의 유사도를 보여 가장 유사하였다 (Fig. 2). 또한

phylogenetic tree를 통해 다른 어종들과의 유전적 거리를 확인할 수 있었으며, COX-1과 COX-2의 명확한 구분이 가능하였다 (Fig. 3).

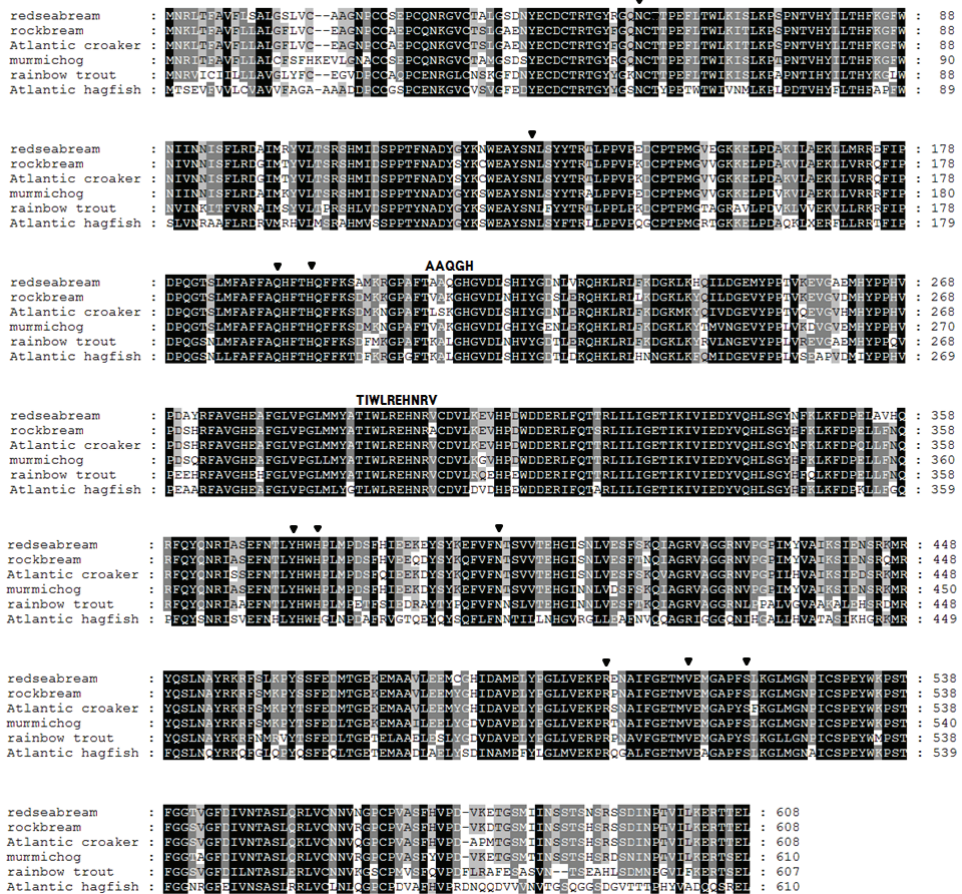


Fig. 2. Multiple amino acid sequence alignment of different COX-2 genes. Shading was performed using the conserved mode (black, dark grey, light grey shading set to 100%, 80% and 60% amino acid conservation, respectively). Gaps are shown as dashes. The GenBank accession numbers of the COX-2 genes are as follows : red sea bream, HM453866; Atlantic croaker COX-2, AB292358; mummichog COX-2, AY532639; rainbow trout COX-2, NM 001124348; Atlantic hagfish COX-2, EU703785.

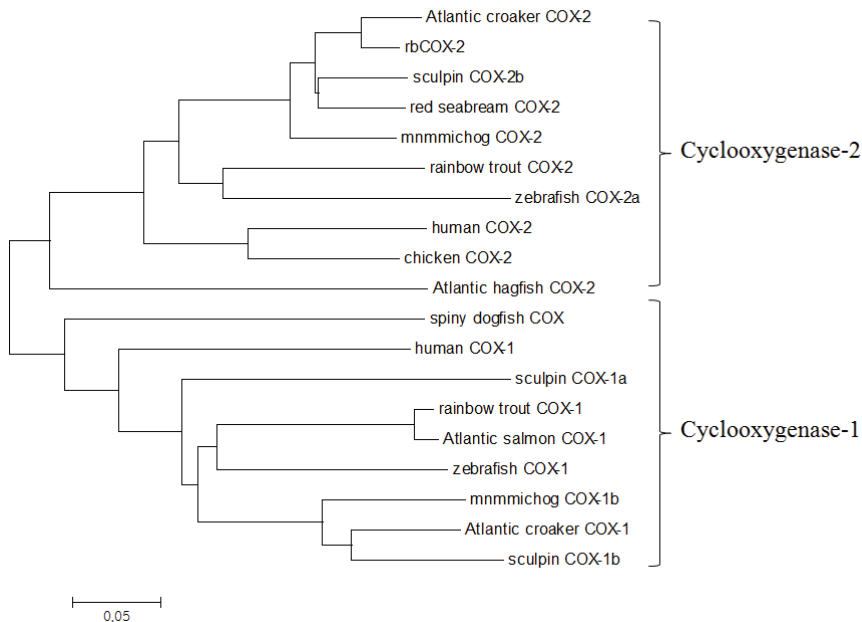


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationship between different COX-2 amino acid sequences. The GenBank accession numbers of the COX-1 and COX-2 genes are as follows : Atlantic croaker COX-2, AB292358; red sea bream COX-2, HM453866; longhorn sculpin COX-2b, EU703783; mummichog COX-2, AY532639; rainbow trout COX-2, NM_001124348; zebrafish COX-2a, NM_153657; human COX-2, NM_000963; chicken COX-2, NM_001167719; Atlantic hagfish COX-2, EU703785; spiny dogfish, AF420317; human COX-2, NM_000962; longhorn sculpin COX-1a, EU703784; rainbow trout COX-1, NM_001124361; Atlantic salmon COX-1, BT045745; zebrafish COX-1, NM_153656; mummichog COX-1b, EU703781; Atlantic croaker COX-1, AB292358; longhorn sculpin COX-1b, EU703789

Genomic rbCOX-2 유전자의 염기서열 분석

rbCOX-2 유전자의 cDNA 염기서열을 바탕으로 5'와 3'-ends의 UTR 부위에 제작한 primer (rbCOX2 UTR F, rbCOX2 UTR R)를 사용하여 genomic DNA를 분석한 결과 4609 bp의 전체 genomic DNA 염기서열을 알 수 있었다. cDNA의 염기서열과 비교해본 결과 모든 exon과 intron 사이에 splicing motif (GT/AG)를 확인할 수 있었으며, 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성되어 있어 유전적 구조에서 다른 포유류나 어류의 COX-2와 유사함을 확인할 수 있었다.

rbCOX-2 유전자의 발현분석

LPS 접종 시 COX-2 유전자는 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 각각 대조구에 비해 최고 13.1배와 7.4배의 발현을 보여 통계적으로 유의적으로 높은 발현을 보였다 (Fig. 4, 5). 변화를 살펴보면 *in vivo*의 경우 LPS 접종 1일째 가장 높은 발현을 보이며, 이후 급격히 감소하여 7일째에는 PBS를 주사한 대조구 수준의 발현을 나타내었다 (Fig. 5). 반면, IVS-1 접종 시에는 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 감염이 진행되는 동안 LPS를 접종한 그룹에 비해 높은 발현을 확인할 수 없었으며, 대조구와의 통계적 비교에서도 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4, 5).

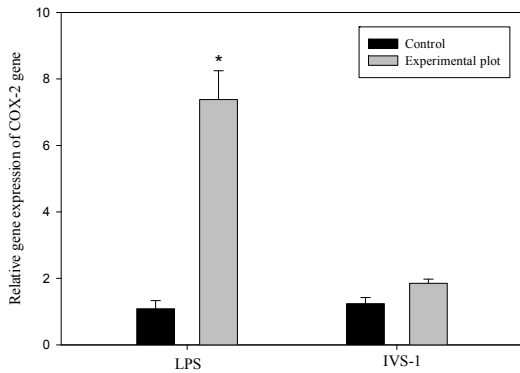


Fig. 4. Expression level of the COX-2 gene in rock bream leukocyte relative to controls after LPS or IVS-1 exposure *in vitro*. Rock bream leukocytes were isolated from head kidney using percoll, cultured at 25°C for 3hrs and stimulated with LPS (50 µg/mL) or IVS-1 (1 mg/mL) for 6hrs at 25°C. The data are normalized relative to the expression of β -actin and analysed using the $-\Delta\Delta C_t$ method. *Depicts statistical significance between challenged fish versus control fish ($P < 0.05$).

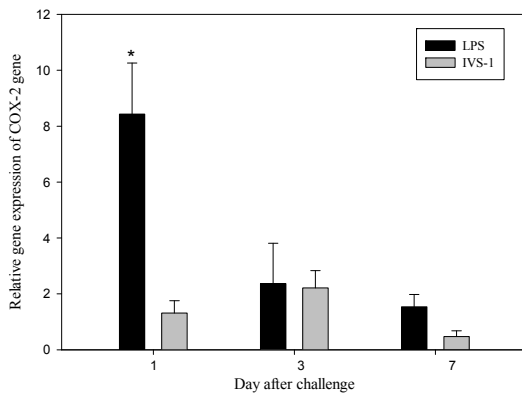


Fig. 5. Expression level of the COX-2 gene in rock bream relative to controls. after LPS or IVS-1 injection *in vivo*. Nine fish in a group were injected with 500 µg of LPS or 1 mg of IVS-1 in 100 µL of PBS and control group was injected with PBS only. After 1, 3, and 7 days 3 fish from each group was sacrificed and liver was aseptically collected for RT-qPCR. The data are normalized relative to the expression of β -actin and analysed using the $-\Delta\Delta C_t$ method. *Depicts statistical significance between challenged fish versus control fish ($P < 0.05$).

고 찰

본 연구는 돌돔의 초기 면역반응에 중요한 역할을 하는 COX-2 유전자의 cDNA와 genomic DNA의 전체 염기서열을 결정하고, 바이러스 감염에 따른 그 발현 양상을 *in vivo*와 *in vitro*상에서 분석 하였다.

COX 유전자는 특징적으로 cyclooxygenase active site, N-glycosylation site, peroxidase activity 그리고 hem-binding site가 공통적으로 존재하며, COX-2 유전자는 COX-1 유전자와 달리 substrate binding channels로 arginine과 valine을 가지며, 염증반응에 따라 inducible enzyme이라는 차이를 보인다. 본 연구에서 밝힌 rbCOX-2 유전자 역시 COX 유전자에서 나타나는 두 개의 hem-binding site를 비롯한 특징적 motif를 확인할 수 있었으며, COX-2 유전자에서만 특징적으로 나타나는 substrate binding channels 역시 확인할 수 있었다 (Fig. 1). rbCOX-2 유전자 아미노산을 다른 어류와 비교해 보았을 때 Atlantic croaker (94.4%), 참돔 (90.6%), longhorn sculpin (90.3%)의 COX-2 유전자와 유사하였다. 또한 아미노산의 배열을 이용한 phylogenetic tree를 통해 COX-1과 COX-2 유전자의 명확한 구분 및 다른 어류와의 유전적 유사성을 확인하였다 (Fig. 3).

Genomic DNA 분석을 통해서도 rbCOX-2 유전자는 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성되어있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 반면 human COX-2, zebrafish COX-2b 그리고 rainbow trout COX-2a 유전자와 일치하여 어류뿐만 아니라 포유류와도 일치하는 결과를 보여 일정한 exon의 수가 진화론적으로 잘 보존 되고 있음을 추정케 하였다 (Herschman *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2007; Ishikawa and Herschman, 2007).

본 연구에서 qPCR을 이용한 *in vivo* 및 *in vitro*에서의 발현분석에서는 LPS를 주사 시 *rbCOX-2* 발현량은 대조구와의 비교에서 통계적으로 유의적인 차이를 보이며 증가하였으나, *megalocytivirus*의 감염 시에는 대조구와 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 *megalocytivirus* 감염이 어류에 있어 염증반응을 유도하지 않거나 매우 낮은 정도의 염증반응을 유도를 하고 있음을 추정케 하였는데, 실제로 *megalocytivirus* 감염어의 경우 체색흑화 및 이상유영을 제외한 외부 증상이 뚜렷하지 않으며, 다만 조혈기관에 비대세포만 관찰되어 해부학적 및 외관상 염증증상이 관찰되지 않아 본 연구결과와 외부증상 간의 연관관계에 대한 새로운 접근이 필요하다고 할 수 있다.

또한 Siwicki *et al.* (2001)은 carp, rainbow trout 그리고 sheatfish의 pronephric leukocytes를 이용한 *in vitro* 실험에서 iridovirus감염에 따라 염증관련 단백질인 IL-1와 IL-6의 생성이 감소됨을 ELISA 분석을 통해 밝혀, iridovirus가 interleukin의 생성을 억제시키는 면역억제를 한다고 보고하였다.

바이러스 감염에 대한 COX-2 유전자의 발현에 대한 연구는 사람의 경우 hepatitis C virus (HCV)의 core protein은 I κ B kinase (IKK)의 활성을 감소시켜 사람의 대식세포에서 COX-2 유전자의 발현을 저해하며 (Joo *et al.*, 2005), Epstein-Barr Virus (EBV)는 PEG2의 발현을 억압하여 사람의 단구에서 COX-2 유전자의 발현을 억제한다고 보고된바 있다 (Savard *et al.*, 2000). 하지만 위의 기술 한 바와 반대로 hepatitis B virus (HBV), HCV 그리고 Kapos's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)와 같은 바이러스의 감염은 *in vitro*에서 COX-2 유전자의 발현을 유도한다고 보고하였다 (Cheng *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2008). HCV의 경우 같은 바이러스 임에도 불구하고 저자에 따라 바이러스 감염에 따라 COX-2 유전자 발현에 대해 이견을

보이고 있다. 본 연구에서 사용한 *megalocytivirus* 역시 감염에 대한 면역억제 및 유도에 관한 더 명백한 증거 및 확인이 필요할 것이다.

본 연구는 돌돔 COX-2 유전자의 cDNA와 genomic DNA의 전체 염기서열을 밝히고 다른 어종과 비교 및 분자적 특징에 대해 분석하였으며, LPS 또는 *megalocytivirus* 감염 시 COX-2 유전자의 발현을 분석함으로써 돌돔의 초기 면역반응을 이해하고자 하였다.

요 약

*Megalocytivirus*는 우리나라를 포함한 아시아 각국의 양식현장에서 고위험성 병원체이다. 그럼에도 불구하고 어류의 면역체계와 *megalocytivirus*의 상호관계에 관한 연구는 아직 부족한 실정이다. 다양한 연구에서 cyclooxygenase isoform중 COX-1 유전자는 constitutive 하게 발현되며, COX-2 enzyme은 면역반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 COX-2 유전자는 LPS (lipopolysaccharide) 또는 병원체의 감염과 같은 염증반응 시 그 발현이 증가한다고 알려져있다. 본 연구는 다른 어종의 COX-2 유전자를 바탕으로 제작된 degenerated primer와 5'- 그리고 3'-end RACE-PCR을 이용하여 돌돔에서 COX-2 유전자의 전체 염기서열을 밝혔으며, 그 결과 *rbCOX-2* (rock bream COX-2)유전자 cDNA의 전체 길이는 2655 bp였으며, 609개의 아미노산으로 구성되어있었다. *rbCOX-2* 유전자의 genomic organization은 9개의 intron과 10개의 exon으로 구성되어 있었다. 또한 본 연구에서는 돌돔에 *megalocytivirus*의 인위감염 시 COX-2 유전자의 발현을 조사하였다. LPS 접종 시 *rbCOX-2* 유전자는 접종 1일 후 대조구와 비교하여 13.10배 증가하여 최고 발현을 보였으나, *megalocytivirus* 접종 시 대조구와의 비교

에서 유의적인 발현을 확인할 수 없었다. 돌돔에서 COX-2 유전자의 염기서열의 분석과 발현 분석은 바이러스 감염 시 어류의 방어기작을 이해하는데 도움이 될 것이며, 바이러스 백신개발 및 치료제 개발의 기초 자료로 활용될 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 수산실용화기술개발사업 (Fishery Commercialization Technology Development Program)에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S. and Simmons, D. L.: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:13926-13931, 2002.
- Cheng, S. L., Chan, L. Y., Leung, K., To, F., Go, Y. Y., Chan, Y. H., Liew, T. and Sung, J. Y.: Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Modern Pathology*, 17:1169-1179, 2004.
- Choe, K. P., Havird, J., Rose, R., Hyndman, K., Piermarini, P. and Evans, D. H.: COX2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: primary sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation. *J. Exp. Biol.*, 209:1696-1708, 2006.
- Graham, S., Jeffries, A. H. and Secombes, C.: A novel assay to detect macrophages bactericidal activity in fish. Factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish. Dis.*, 11:389-396, 1988.
- Havird, J. C., Miyamoto, M. M., Choe, K. P. and Evans, D. H.: Gene duplications and losses within the cyclooxygenase family of teleosts and other chordates. *Mol. Biol. Evol.*, 25:2349-2359, 2008.
- Herschman, H. R.: COX-2 blockade in cancer prevention and therapy. *Humana Press*, 13-32, 2003.
- Ishikawa, T. O. and Herschman, H. R.: Two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes are present in the rainbow trout genome. *J. Cell Biochem.*, 102:1486-1492, 2007.
- Ishikawa, T. O., Griffin, K. J. P., Banerjee, U., Herschman, H. R.: The zebrafish genome contains two inducible functional cyclooxygenase-2 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 352:181-187, 2007.
- Jeong, J. B., Kim, H. Y., Kim, K. H., Chung, J. K., Komisar, J. L. and Jeong, H. D.: Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*, 255: 105-116, 2006.
- Joo, M., Hahn, Y. S., Kwon, M., Sadikot, R. T., Blackwell, T. S. and Christman, J. W.: Hepatitis C Virus Core Protein Suppresses NF- κ B Activation and Cyclooxygenase-2 Expression by Direct Interaction with I κ B Kinase. *J. Virol.*, 79:7648-7657, 2005.
- Kim, M. S., Hwang, Y. J., Yoon, K. J., Zenke, K., Nam, Y. K., Kim, S. K. and Kim, K. H.: Molecular cloning of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) tumor necrosis factor- α and its effect on the respiratory burst activity of phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 27:618-624, 2009.

- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 25:402-408, 2001.
- Lu, L., Wei, L., Peng, G., Mu, Y., Wu, K., Kang, L., Yan, X., Zhu, Y. and Wu, J.: NS3 protein of hepatitis C virus regulates cyclooxygenase-2 expression through multiple signaling pathways. *Virology*, 371:61-70, 2008.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S. and Pickup, D. J.: Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 69:597-604, 1992.
- Roberts, S. B., Langenau, D. M. and Goetz, F. W.: Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary. *Mol. Cell Endocrinol.*, 160:89-97. 2000.
- Savard, M., Belanger, C., Tremblay, M. J., Dumais, N., Flamand, L., Borgeat, P. and Gosselin, J.: Infection of Primary Human Monocytes by Epstein-Barr Virus. *J. Immunol.*, 164:6467-6473. 2000.
- Siwicki, A., Pozet, F., Morand, M., Terech-Majewska, E. and Bernard, D.: Pathogenesis of iridovirus: *in vitro* influence on macrophage activity and cytokine-like protein production in fish. *Acta. Vet. Brno.*, 70:451-456. 2001.
- Zenke, K. and Kim, K. H.: Molecular cloning and expression analysis of three Mx isoforms of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 26:599-605, 2009.

Manuscript Received : November 9, 2012

Revised : April 1, 2013

Accepted : April 2, 2013