

Characterization of novel serine protease from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

황지연* · I. Hirono · T. Aoki

국립수산과학원 병리연구팀*, 동경해양대학교 genome science 강좌

서론

Serine protease는 포유류에서 조혈 작용, 면역 반응 그리고 개체의 항상성 유지에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Borregaard *et al.*, Egesten *et al.*). 포유류에서는 이미 이러한 granulocyte serine protease에 대한 기능과 경로에 대해 많은 연구가 되어있지만, 어류 면역계에서는 이러한 역할을 하는 분자와 유전자에 대해서는 거의 알려져 있지 않은 실정이다. 이에 본 연구에서는 과립구의 serine protease의 유전자를 분리하여 그 유전자의 구조 및 발현pattern을 살펴보았다.

재료 및 방법

cDNA 및 gene 클로닝

degenerate primer를 사용하여 serine protease의 유전자 단편을 추출하고, 넙치 cDNA library 및 BAC gene screening (Katagiri *et al.*)을 통해 cDNA 및 gene의 full sequence를 DNA sequencer LC4200 (Li-Cor, USA)로 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 BLAST program을 사용하여 genebank에 등록된 유전자와 비교 분석하였다.

southern hybridization

넙치의 혈액에서 genome을 분리하여 *EcoRI*, *PstI*으로 enzyme reaction시켜 membrane 에 transfer 시킨 후 P^{32} labelling된 probe과 hybridization을 실시하였다.

Real-time PCR

건강한 넙치의 비장을 분리하여 HIRRV (10^3 TCID/well)을 감염시킨 후 1, 3, 6, 9일 후에 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 SYBR Green PCR master mix (PE Biosystems) kit를 사용하여 real-time PCR을 실시하였다.

In situ hybridization

넙치의 신장 절편에 T7 and Sp6 RNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 각각의 유전자를 labeling하여 형광현미경

으로 관찰하였다.

결과 및 요약

2가지 타입의 serine protease (1,096 bp와 1,572 bp)를 넙치에서 분리하여 genome을 분석한 결과, 같은 유전자의 alternative splicing임을 알 수 있었다. 또한 다른 neutrophil serine protease와 같이 5개의 exon의 구조를 형성하고 있었다. 244 amino acid로 serine protease의 특징적인 histidine, aspartic acid 그리고 serine을 포함하고 있었고, 포유류의 hematopoietic serine protease와는 39-22%의 상동성을 보였다.

계통수 분석 결과 neutrophil serine protease인 myeloblastin, N-elastase 그리고 azurocidin와 cluster를 형성하였다. 또한 Southern hybridization한 결과, single copy로 존재함을 알 수 있었다.

그 뿐만 아니라 각 조직의 발현량을 확인한 결과, 혈액, 신장, 장 등에서 발현되었고 LPS 및 IHNV에 의해 유도됨을 알 수 있었다.

In-situ hybridization 결과, serine protease은 CTL marker인 CD 8+cell에 발현하지 않음을 확인하였다.

참고문헌

- Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997 89: 3503-3521.
- Egesten A, Breton-Gorius J, Guichard J, Gullberg U, Olsson I. The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood* 1994 83: 2985-2994.
- McAleese S. M., Pemberton A. D., McGrath M. E., Huntley J. F., Miller H. R. P. S heep mast-cell proteinases-1 and -3: cDNA cloning, primary structure and molecular modelling of the enzymes and further studies on substrate specificity. *Biochem. J.* 1998., 333: 801-809.
- Katagiri T, Asakawa S, Hirono I, Aoki T, Shimizu N Genomic Bacterial Artificial Chromosome Library of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Marine Biotechnol (NY)*. 2000., 2(6): 571-576.
- Hideki T, Toshihiro N, Kunihiko Y, Caryn D Q, David J.S, Mark D.H, Jacquelin W, Turid K, Ronald G.C. Structure of the Human Neutrophil Elastase Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 1988; 263:14739-14747.
- Hirono I, Nam BH, Kurobe T, Aoki T Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Immunol.*, 2000; 165:4423 - 4427.
- Secombes CJ. The nonspecific Immune system: cellular defenses In: Iwama G, Nakanishi Teditors. *The fish immune system organism, pathogen, and environment*. Academic Press, 1996. p. 63-105.

Tohrs S., Anand S. S., Tadahide K., cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine protease from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Comparative Biochemistry and Physiology Part B 2002;131:63-70.