

담수 사육 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli*의 수온 상승에 따른 HSP90, HSP70 mRNA의 발현 및 혈장 cortisol과 glucose 변화

최철영*, 민병화¹, 김나나, 조성환, 장영진¹

한국해양대학교 해양환경·생명과학부, ¹부경대학교 수산과학대학 양식학과

Expression of HSP90, HSP70 mRNA and Change of Plasma Cortisol and Glucose During Water Temperature Rising in Freshwater Adapted Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*

Cheol Young Choi*, Byung Hwa Min¹, Na Na Kim, Sung Hwoan Cho and Young Jin Chang¹

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan, 606-791 Korea

¹Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan. 608-737 Korea

The objective of the present study was to investigate the expression of heat shock protein 90 (HSP90) and 70 (HSP70) mRNA as cellular stress responses, the levels of plasma cortisol with glucose as neuro-endocrine stress responses during water temperature rising in freshwater adapted black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. A cDNA fragment of 891 (HSP90) and 465 (HSP70) bp was cloned from black porgy testis by Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers designed from the conserved regions of other teleost. The PCR product of HSP90 showed very high homology to red seabream (99%), rainbow trout (95%), Atlantic salmon (94%), zebrafish (94%) HSP90, HSP70 of black porgy was also highly similar to those of rainbow trout (96%), silver seabream (95%), zebrafish (95%) HSP70. Water temperature rising (20~30°C) induced elevation of HSP90 mRNA in black porgy gonad, liver, brain, intestine and kidney, whereas it resulted in an induction of the HSP70 mRNA expression in gonad only. Plasma cortisol levels increased significantly at 30°C in the fish compared to those at 20°C. Glucose levels of the fish showed a tendency of co-increase with cortisol during water temperature rising. These results suggest that increased HSP90 mRNA in liver with plasma cortisol following heat shock may be related to increasing glucose for homeostasis in this species.

Keywords: Black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*, Water temperature, HSP90, HSP70, Cortisol, Glucose

서 론

온도는 생물체의 성장, 번식, 분포에 영향을 미치는 중요한 요인으로 작용하나, 일교차나 계절적 온도 변화 등에 따른 스트레스는 생물체의 생리학적·생태학적 상태에 영향을 미치고 있다. 특히, 수중생물은 미미한 수온변화에도 생존의 위협을 받는 것으로 알려져 있다(Logue et al., 1995). 생물체가 자신의 서식 적정 온도범위를 벗어나게 되면 세포내 heat shock proteins (HSPs)의 합성과 함께 다양한 생리적 변화가 일어나게 된다 (Schlesinger et al., 1992).

이러한 HSP는 온도뿐만 아니라 중금속, 폐수, 활성산소, 염분 등과 같은 환경오염을 비롯한 여러 스트레스 요인에 대하여

높게 발현되는 스트레스 단백질로 알려져 있다(Beckmann et al., 1990). HSP는 스트레스 요인에 의해 나타나는 충격으로부터 자신을 보호함으로써 항상성(homeostasis)을 유지하는 중요한 역할을 담당한다(Sanders, 1993; Forsyth et al., 1997; Iwama et al., 1998; Iwama et al., 1999; Ackerman and Iwama, 2001).

HSP는 분자량을 기초로 하여 HSP90 (85-90 kDa), HSP70 (68-73 kDa) 및 저분자 HSP (16-47 kDa) 등 3개의 그룹으로 나누어진다(Basu et al., 2002). 그 중 분자량이 가장 큰 HSP90은 세포 단백질의 1~2%를 차지함으로써 스트레스를 받지 않은 세포에서도 다량으로 존재하며(Pratt, 1997), 세포내 protein kinases, steroid receptor, actin, tubulin, calmodulin, proteasomes와 결합한 뒤, 세포간 신호전달을 조절하며(Csermely et al., 1998), 특히 glucocorticoid 수용체의 신호 전달 등 cortisol이 세포작용을 하는데 있어 이를 도와주는 역할을 한다(Pratt, 1997). 최근

*Corresponding author: choic@hhu.ac.kr

수온상승과 관련하여 HSP90의 발현이 chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Palmisano et al., 2000), 무지개 송어, *Oncorhynchus mykiss* (Sathiyaa et al., 2001) 및 zebrafish, *Danio rerio* (Murtha and Keller, 2003)에서 연구된 바 있다. HSP70은 가장 보존이 잘되어 있는 단백질 중 하나로, 사람(Roux et al., 1994) 뿐만 아니라 zebrafish (Graser et al., 1996), silver seabream, *Sparus sarba* (Deane and Woo, 2005), 무지개 송어(Ojima et al., 2005) 등 여러 경골어류에서 그 상동성이 매우 높은 것으로 알려져 있으며, 환경 조건의 변화시 glucocorticoid 수용체의 합성을 위해 가장 잘 발현되는 스트레스 단백질이다(Hutchison et al., 1994).

또한, 어류에서 혈장 cortisol의 수준은 스트레스에 대한 대표적인 지표로 이용되고 있다(Wedemeyer and McLeay, 1981). 어체는 스트레스를 받게 되면, 생리·생화학적 변화에 의해 cortisol 농도의 혈중 상승이 나타나며(Holloway and Leatherland, 1997), 이는 특히 간에 작용하여 당신생합성을 촉진함으로써, 항상성 유지에 필요한 에너지를 공급하게 한다(Ackerman et al., 2000).

본 연구에서는 담수사육 감성돔을 대상으로 수온을 상승시켰을 때, 스트레스 반응의 세포적 수준을 파악하기 위해 HSP90, HSP70의 mRNA 발현을 조직별로 조사하였으며, 또한 혈중 cortisol 및 glucose 수준 등을 파악함으로써, 이들 스트레스 단백질과 cortisol의 관계를 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

실험어 및 담수순화

해수 순환여과 시스템에서 사육중인 평균전장 14.4±0.2 cm, 체중 48.6±0.6 g의 감성돔 40마리를 사용하였다. 감성돔의 담수순화를 위하여, 사육수조 내에 담수를 첨가하여 10‰ 해수에서 3일간 유지시킨 후에 완전한 담수 사육수조로 이동시켜 35일간 사육하였다. 실험 전 수온은 20±1°C로, 광주기는 12L:12D로 유지하였으며, 상업용 사료를 매일 2회 공급하였다.

수온상승 조건

담수 순화된 감성돔을 자동 수온조절 시스템(JS-WBP-170RP,

Johnsam Co., Korea)이 부착된 40 L 순환여과 사각수조 2개에 각각 20마리씩 수용한 후 24시간 안정시켰다. 이후 사육수온을 20°C에서 30°C까지 매일 1°C 씩 상승시켰으며, 수온상승 기간 동안 사료는 공급하지 않았다.

혈액 및 조직 채취

수온이 20, 25 및 30°C에 이르렀을 때 각각 2개의 수조에서 3마리씩(총 6마리)으로부터 혈액 및 조직을 채취 하였다. 채혈 직전 실험어를 MS-222 (200 ppm)로 마취한 후, heparin sodium 처리 주사기(3 ml)를 사용하여 미부혈관으로부터 채취한 다음, 원심분리(4°C, 10000 rpm, 5분)하여 얻은 혈장은 호르몬 분석 전까지 -80°C의 초저온 냉동고에 보관하였다. 채혈 후, 실험어의 척추를 절단하여 폐사시킨 후, 뇌, 간, 신장, 생식소 및 장을 채취하여 액체질소에서 즉시 냉동하였다가 total RNA 추출시까지 -80°C에 보관하였다.

HSP90 및 HSP70 cDNA의 분리

-80°C에서 보관중인 뇌, 간, 신장, 생식소 및 장으로부터 Total RNA Extraction kit (Promega, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. PCR을 수행하기 위한 primer의 설계는 이미 알고 있는 타 종의 HSP90 및 HSP70 유전자의 염기서열을 참고로 하여, 종내·종간을 통해서 잘 보존되어 있는 영역에서 primer를 설계하였다(Table 1).

역전사 반응을 포함한 RT-PCR을 AccuPower RT/PCR PreMix (Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하여 실시한 결과, HSP90과 HSP70에서 각각 891 bp와 465 bp의 PCR 산물을 얻었다(Table 1). 증폭된 PCR 산물은 1.0% agarose gel로 전기영동한 후, 정제된 다음, pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)에 삽입하여 이를 대장균 DH 5α에 형질전환하여 plasmid purification kit (NucleoGen, Seoul, Korea)에 의하여 plasmid DNA를 정제하였다. 정제된 plasmid DNA의 염기배열은 ABI DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 결정하였다. 결정된 염기배열은 BLAST의 GenBank를 이용하여, 본 cDNA와의 상동성을 검색하였다.

Table 1. Primers used for the RT-PCR of the black porgy HSP90, HSP70 and β-actin

Gene	Primer	DNA sequence	Product size (bp)	Accession number
HSP90	HSP90-F	5'-AAYGACTGGGARGAHCACYTG-3'	891	AY190704
	HSP90-R	5'-CATGATBCKCTCCATGTTBGC-3'		AB196458
	RT-HSP90-F	5'-AACGACTGGGAGGATCACCTG-3'		AF135117
	RT-HSP90-R	5'-CATGATGCGCTCCATGTTCCG-3'		BC065359
HSP70	HSP70-F	5'-CCCTRCCTACTYCAACGATTYA-3	465	AB196461
	HSP70-R	5'-AAYGAGCCCTRGITGAHGGAG-3'		AY436786
	RT-HSP70-F	5'-CCCTGCCTACTTCAACGATTCA-3		BC045841
	RT-HSP70-R	5'-AACGAGCCCTGGTGATGGAG-3		
β-actin	Actin-F	5'-TCGAGCACGGTATTGTGACC-3'	557	AY491380
	Actin-R	5'-ACGGAACCTCTCATTGCCGA-3'		

HSP90 및 HSP70 mRNA의 조직분포

HSP90 및 HSP70 mRNA의 조직내 특이적인 발현을 조사하기 위하여, RT-PCR을 실시하였다. Total RNA는 뇌, 간, 신장, 생식소 및 장으로부터 추출하였으며, RT-PCR을 수행하기 위한 감성돔 HSP90 및 HSP70 primer는 Table 1에 나타내었다.

Total RNA 1 µg을 사용한 RT-PCR은 SuperScript™ reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 42 °C에서 50분간 역전사 반응 후, 열변성을 94 °C에서 2분간, 94 °C에서 1분간, 54 °C (HSP90) 및 60 °C (HSP70)에서 45초간, 72 °C에서 45초간 총 35회 실시하고, 최종 신장 반응을 72 °C에서 5분간 실시하였다. 이후 증폭된 PCR 산물은 1.0% agarose gel로 전기영동한 다음, HSP90 및 HSP70 mRNA의 발현량은 Gelpro 3.1(KBT, Korea) 컴퓨터 프로그램을 사용하여 내부표준 유전자인 β-actin의 발현량에 대한 비율로 환산하여 정량하였다.

혈장 cortisol 및 glucose 분석

혈장 cortisol 농도는 cortisol RIA kit (DPC, Los Angeles, U.S.A.)로 항원과 표지항원이 항체에 경쟁적으로 반응하도록 유도한 다음, Hewlett Packard Gamma Counter (Cobra 5010,

Packard Co., U.S.A.)로 측정하였다. Glucose는 Biochemistry Autoanalyzer (Hitach 7180, Hitach Co., Japan)로 분석하였다.

통계분석

각 실험결과로부터 얻어진 자료 값 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계패키지(version 10.0)에 의한 t-test와 one way ANOVA 및 Tukey's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정하였다(P=0.05).

결 과

HSP90 및 HSP70 cDNA의 상동성 검색

PCR에 의하여 증폭된 HSP90 cDNA 단편(891 bp)의 아미노산 배열을 이용하여, 타 어종과의 상동성을 비교, 분석하였다. 감성돔의 HSP90은 참돔(*Pagrus major*, AY190704) HSP90과 99%, 무지개송어(AB196458) HSP90과 95%, 대서양 연어(*Salmo salar*, AF135117) HSP90과 94%, zebrafish (BC065359) HSP90과 94%로 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 1).

HSP70 cDNA 단편(465 bp)의 아미노산 배열을 이용하여, 상

bpHSP90	1 : NDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFI PRAPFDLFENKKKKNNIKLYVRRVFI	MDNCEEL	60
rsHSP90	1 : NDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFI PRAPFDLFENKKKKNNIKLYVRRVFI	MDNCEEL	60
rtHSP90	1 : NDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFI PRAPFDLFENKKKKNNIKLYVRRVFI	IMDSCEEL	60
asHSP90	1 : NDWEEHLAVKHFSVEGQLEFRALLFI PRAPFDLFENKKKKNNIKLYVRRVFI	IMDSCEEL	60
zfHSP90	1 : NDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFI PRAPFDLFENKKKKNNIKLYVRRVFI	MDNCEEL	60
bpHSP90	61 : IPEYLNfVrGvVdSEdLPLNISREMLQqSkILKvIRkNIVKkCLELFAELAE	DkENyKkF	120
rsHSP90	61 : IPEYLNfVrGvVdSEdLPLNISREMLQqSkILKvIRkNIVKkCLELFAELAE	DkENyKkF	120
rtHSP90	61 : IPEYLNfVrGvVdSEdLPLNISREMLQqSkILKvIRkNIVKkCMELFGELAE	DkENyKkF	120
asHSP90	61 : IPEYLNfVrGvVdSEdLPLNISREMLQqSkILKvIRkNIVKkCMELFGELAE	DkENyKkF	120
zfHSP90	61 : IPEYLNfIRGvVdSEdLPLNISREMLQqSkILKvIRkNIVKkCLELFAELAE	DkDnYKkF	120
bpHSP90	121 : YEGfSKNIKLGIHEDSQNRKKLSELLRYHSSQSGGETTSLTEYLTRMKENQK	SIYYITGE	180
rsHSP90	121 : YEGfSKNIKLGIHEDSQNRKKLSELLRYHSSQSGDETTSLTEYLTRMKENQK	- IYYITGE	180
rtHSP90	121 : YDGFskNLKLGIHEDSQNRKKLSELLRYHSSQSGDELtSLTEYLTRMKDNQK	SIYYITGE	180
asHSP90	121 : YDGFskNLKLGIHEDSQNRKKLSELLRYHSSQSGDELtSLTEYLTRMKDNQK	SIYYITGE	180
zfHSP90	121 : YDAfSKNLKLGIHEDSQNRKKLSELLRYQSSQSGDEMTSLTEYVSRMKENQK	SIYYITGE	180
bpHSP90	181 : SKDQVANSaFvERvRKRgFEVLYMTEPIDeYCVQQLKEFDGKSLVSVTKEGLEL	PEDEEE	240
rsHSP90	181 : SKDQVANSaFvERvRKRgFEVLYMTEPIDeYCVQQLKEFDGKSLVSVTKEGLEL	PEDEEE	240
rtHSP90	181 : SKDQVANSaFvERvRKRgFEVLYMTEPIDeYCVQQLKEFDGKTLVSVTKEGLEL	PEDEEE	240
asHSP90	181 : SKDQVANSaFvERvRKRgFEVLYMTEPIDeYCVQQLKEFDGKTLVSVTKEGLEL	PEDEEE	240
zfHSP90	181 : SKDQVAHSAFvERvCKRgFEVLYMTEPIDeYCVQQLKDFDGKSLVSVTKEGLEL	PEDEDE	240
bpHSP90	241 : KKKMEEDKAKfESLCKLMKEILDkKvEKVTVSNrLVSSPCCIVTStyGWTANMERIM		297
rsHSP90	241 : KKKMEEDKAKfESLCKLMKEILDkKvEKVTVSNrLVSSPCCMVTStyGWTANMERIM		297
rtHSP90	241 : KKKMDEDKtKfENLCKLMKEILDkKvEKVTVSNrLVSSPCCIVTStyGWTANMERIM		297
asHSP90	241 : KKKMDEDKtKfENLCKLMKEILDkKvEKVTVSNrLVSSPCCIVTStyGWTANMERIM		297
zfHSP90	241 : KKKMEEDKAKfENLCKLMKEILDkKvEKVTVSNrLVSSPCCIVTStyGWTANMERIM		297

Fig. 1. Multiple alignment of black porgy (*Acanthopogon schlegelii*) HSP90 with several teleost. The HSP90 sequences used for alignment were black porgy HSP90 (bpHSP90, AY929159), red seabream HSP90 (rsHSP90, AY190704), rainbow trout HSP90 (rtHSP90, AB196458) Atlantic salmon HSP90 (asHSP90, AF135117) and zebrafish HSP90 (zfHSP90, BC065359). Identical amino acids are indicated by shaded box.

bpHSP70	1:	QRQATKDAGTISGLHVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLI	FDLGGGTFDVSILTIE	60
rtHSP70	1:	QRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLI	FDLGGGTFDVSILTIE	60
ssHSP70	1:	QRQATKDAGTISGLSVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSEARNVLI	FDLGGGTFDVSILTIE	60
zfHSP70	1:	QRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLI	FDLGGGTFDVSILTIE	60
bpHSP70	61:	DGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFI	SEFKRKYKKDISDKRAVRRRLRTACERAKRT	120
rtHSP70	61:	DGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFI	AEFKRKYKKDISDNKRAVRRRLRTACERAKRT	120
ssHSP70	61:	DGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFI	AEFKRKYKKDISDNKRAVRRRLRTACERAKRT	120
zfHSP70	61:	DGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFI	TEFKRKHKKDISDNKRAVRRRLRTACERAKRT	120
bpHSP70	121:	LSSSTQASIEIDSLHEGTFDYTSITRAR		148
rtHSP70	121:	LSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRAR		148
ssHSP70	121:	LSSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAR		148
zfHSP70	121:	LSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRAR		148

Fig. 2. Multiple alignment of black porgy (*Acanthopogrus schlegeli*) HSP70 with several teleost. The HSP70 sequences used for alignment were black porgy HSP70 (bpHSP70, AY929160), rainbow trout HSP70 (rtHSP70, AB196461) silver seabream HSP70 (ssHSP70, AY436786) and zebrafish HSP70 (zfHSP70, BC045841). Identical amino acids are indicated by shaded box.

동성을 비교한 결과, 무지개송어(AB196461) HSP70과 96%, silver seabream (*Sparus sarba*, AY436786) HSP70과 95%, zebrafish (BC045841) HSP70과 95%로 HSP90과 마찬가지로 높은 상동성을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

HSP90 및 HSP70 mRNA의 발현

수온상승에 따른 HSP90 및 HSP70 mRNA의 조직별 발현 정도를 조사한 결과, HSP90 mRNA는 수온 상승과 상관없이 모든 조직에서 발현하는 것으로 나타났다. 그러나 수온을 30 °C

로 상승시켰을 때의 HSP90 mRNA의 발현 정도는 20 °C 실험구에 비하여 7~9배 정도 높게 나타났다(P<0.05) (Fig. 3A).

20 °C 실험구에서 HSP70 mRNA의 발현은 어떠한 조직에서도 관찰되지 않았으나, 30 °C 실험구에서는 생식소에서만 발현한 것으로 나타났다(P<0.05) (Fig. 3B).

혈장 cortisol 및 glucose 수준

감성돔의 혈장 cortisol의 농도는 20 °C 실험구에서 6.5±0.7 ng/ml였던 것이 25 °C 실험구에서는 32.3±1.1 ng/ml로 유의하

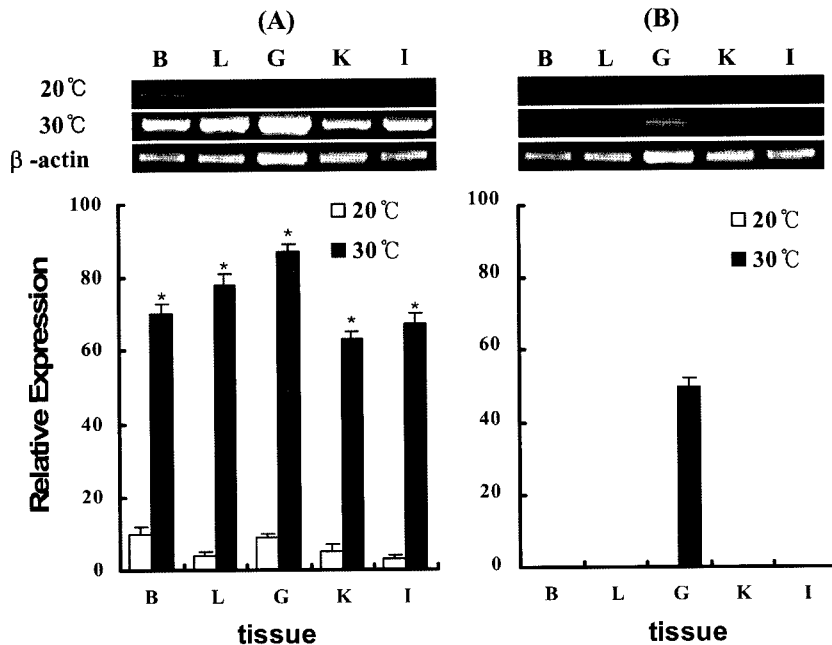


Fig. 3. Tissue-specific expression of HSP90 (A) and HSP70 (B) mRNAs in five different tissues from black porgy (*Acanthopogrus schlegeli*) by RT-PCR. Amplification of β-actin gene was used as an internal control at 20 °C. B: brain, L: liver, G: gonad, K: kidney, I: intestine. Value represents a mean±S.E. (n=3). Asterisks indicate difference between 20 °C and 30 °C (P<0.05).

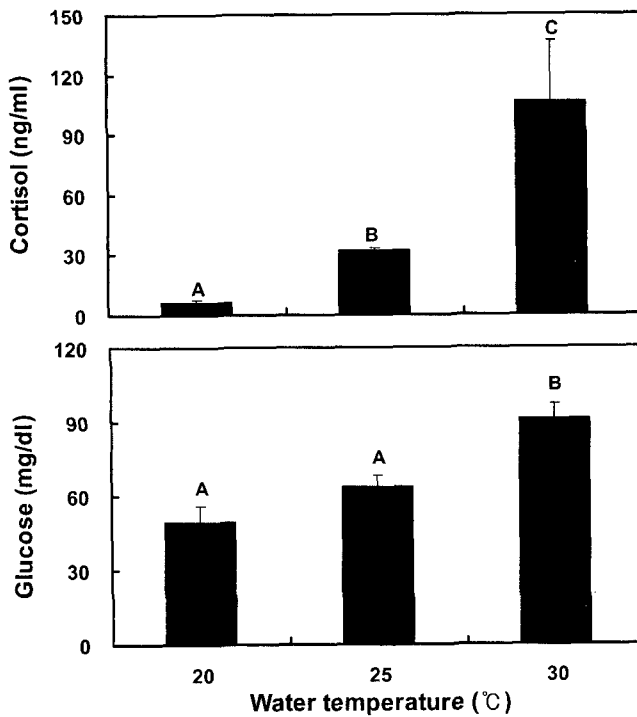


Fig. 4. Plasma cortisol and glucose in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) during water temperature rising. Value represents a mean \pm S.D. (n=6). Different letter indicate significantly different ($P < 0.05$).

게 증가하였으며 ($P < 0.05$), 30 °C 실험구에서는 106.6 ± 29.9 ng/ml로 20 °C 실험구에 비하여 16배 정도 높게 나타났다 ($P < 0.05$) (Fig. 4). Glucose는 20 °C 실험구에서 49.5 ± 6.5 mg/dl였으며, 25 °C 실험구까지는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 30 °C 실험구에서는 91.0 ± 6.2 mg/dl로 유의하게 증가함이 관찰되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 4).

고 찰

일반적으로 어류에 작용하는 다양한 스트레스 요인은 신경내분비계적 반응과 세포적 스트레스 반응을 일으키며, 이러한 반응은 삼투압 조절의 혼란, 질병 저항력의 감소, 번식억제 등을 초래한다 (Ackerman et al., 2000). 어류는 이러한 불안정한 생리상태를 극복하기 위하여 항상성 유지에 필요한 에너지원 (glucose)을 필요로 하는데, 이때 신경내분비계적 반응은 당신생합성을 촉진시키며 (Munck et al., 1984), 세포적 스트레스 반응은 당신생합성에 사용되는 에너지원인 단백질을 합성한다 (Gamperl et al., 1994). 본 연구에서는 수온상승에 따른 스트레스 반응으로 신경내분비적 및 세포적 반응을 조사하였으며, 그 상호 작용을 고찰하였다.

급격한 수온의 변화, 핸들링, 수송 및 포획 등은 어류를 포함한 수산생물에 스트레스를 유발시키는 요인으로 작용하는데, 1차적으로는 시상하부-뇌하수체-간신선축의 활성이 높아지며,

이로 인해 cortisol이 혈액으로 분비되며 (Perry and Reid, 1993; Wendelaar Bonga, 1997; Chang and Hur, 1999), 2차적 반응으로는 물-이온의 불균형, 심장 박동, 산소 소비의 증가 및 에너지 동원의 증가, 즉 혈중 glucose의 상승이 나타난다 (Tomasso et al., 1980; Eddy, 1981; Carmichael et al., 1984; McDonald and Milligan, 1997). 이러한 반응은 신경내분비적 반응의 전형적인 지표로 이용되고 있다.

본 연구에서는 수온을 상승시켰을 때, 혈장 cortisol 및 glucose 농도가 유의하게 증가하였는데, 이 결과는 넙치 (*Paralichthys olivaceus*; Chang et al., 2002), sunshine bass (*Morone chrysops* \times *Morone saxatilis*; Davis, 2004) 등 여러 경골어류에서도 보고된 바 있다.

다양한 스트레스 요인에 의한 어류의 세포적 스트레스 반응으로, 어체 내에서 HSP, WTA65 (warm temperature acclimation-associated 65-KDa protein), cytochrome P450 monooxygenases, etallothioneins 등과 같은 스트레스 단백질이 합성된다는 사실이 보고되었다 (Stegeman et al., 1992). 스트레스 단백질은 스트레스로 인한 2차적 충격으로부터 세포를 보호하는데, 만약 이런 생리적 작용이 일어나지 않으면 스트레스를 받은 개체는 치사에 이르게 된다 (Ciavarrá and Simeone, 1990; Hightower, 1991). 본 연구에서는 수온을 20 °C에서 30 °C로 상승시켰을 때, 열 충격 관련 스트레스 단백질인 HSPs mRNA의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 조직(뇌, 간, 생식소, 신장 및 장)별로 조사하였다. 감성돔의 적정사육 수온이 20~25 °C (Min et al., 2006)이며, 안정된 상태에서 감성돔의 혈장 cortisol 농도가 35 ng/ml 이하 (Chang et al., 2002; Min et al., 2003)인 점과 본 연구의 실험 개시수온인 20 °C 실험구에서 사육된 감성돔의 혈장 cortisol 농도가 평균 9 ng/ml 이라는 점으로 볼 때, 20 °C 실험구에서 사육된 감성돔은 스트레스를 받고 있지 않은 상태였음을 알 수 있다. 따라서 20 °C 실험구에서 사육된 감성돔의 모든 조직에서 HSP90 mRNA가 약하게 발현하였다는 사실로 볼 때, HSP90 mRNA는 스트레스와 관련 없는 다른 생리적 역할도 가지고 있는 것으로 해석된다. 또한, HSP90은 스트레스를 받지 않은 상태에서도 대부분의 조직 내의 세포 단백질 중의 1~2%를 차지하고 있다는 연구 보고 (Lai et al., 1984)는 본 연구결과를 잘 뒷받침 해주고 있다. 30 °C 실험구에서 HSP90 mRNA의 발현은 20 °C 실험구에 비하여 유의하게 증가하였으며, 혈장 cortisol 농도 또한 30 °C 실험구에서 증가하였음이 관찰되었다. 따라서 수온 스트레스에 의한 HSP90의 발현은 혈장 cortisol 농도의 상승과 관련하여 생각해 볼 수 있다. HSP90은 코르티코이드 수용체의 활성화에 관여한다고 알려져 있으며, 코르티코이드 수용체를 포함한 여러 스테로이드 호르몬 수용체의 폴딩 (아미노산 서열이 복잡한 3차 구조를 이루는 과정, 사프론적 기능)과 기능을 위해 필요하다고 알려져 있다 (Pratt et al., 1996; Pratt and Toft, 1997). 또한 코르티코이드의 생리적 효과는 세포막에 존재하는 코르티코이드 수용체에 의해 조절되므로 (Munck et al.,

1984; Adcock, 2000), 수온의 상승은 신경 내분비 반응 측면에서 cortisol 농도의 증가를, 세포적 반응 측면에서 HSP90 mRNA가 발현하게 된다고 볼 수 있다. 즉, HSP90 mRNA는 cortisol 수용체의 활성화와 친화력을 높여 cortisol의 세포학적 작용을 촉진하는 것으로 추측해볼 수 있다. 본 연구에서 수온 상승에 따른 HSP90 mRNA의 조직별 발현을 조사한 결과, 생식소, 간, 뇌에서 매우 높게 나타났다. 또한 돼지에 열 충격(43 °C, 30분)을 주었을 때, HSP90이 뇌, 신장, 뇌하수체, 정소 및 간에서 높게 발현되었는데(Huang et al., 1999), 이러한 결과들은 척추동물에서 스트레스 단백질이 스테로이드 호르몬에 민감한 조직에서 잘 발현된다는 Vamvakopoulos (1993)의 견해를 뒷받침해 주고 있다.

HSP70은 척추동물에서 진화를 통해 잘 보존된 스트레스 단백질로 알려져 있다. 어류에서는 HSP family 가운데서 가장 광범위하게 연구되어져 있으며, 무지개송어(Kothary et al., 1984), medaka, *Oryzias latipes* (Arai et al., 1995), zebrafish (Lele et al., 1997), 틸라피아, *Oreochromis mossambicus* (Molina et al., 2000), 자주복, *Fugu rubripes* (Lim and Brenner, 1999) 등 다양한 어종으로부터 클로닝 되었다. 또한, HSP70은 수온과 관련된 환경적 스트레스 요인에 민감하다고 보고되어져 있다(Feder and Hofmann, 1999).

포유류에서 연구된 바에 의하면 HSP70은 스트레스로 인해 발생하는 apoptosis (세포사멸)로부터 세포를 보호한다고 알려져 있다(Mosser et al., 1997; Mallouk et al., 1999). 비정상적인 HSP70의 발현은 생식세포 apoptosis를 초래하며(Dix et al., 1996), 또한 이 단백질은 정세포의 성숙(Allen et al., 1988; Matsumoto and Fujimoto, 1990)과 황체 퇴화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Khanna et al., 1995). 따라서 HSP70은 감성돔에 있어서도 생식과 관련하여 중요한 생리적 작용을 할 것으로 추측된다. 실제로 독성물질(aryl hydrocarbon receptor: AHR, 작용제가 포함)에 만성적으로 노출된 white sucker, *Ictalurus punctatus*에서 HSP70 mRNA 발현은 난소세포의 apoptosis 증가와 관련된다(Janz et al., 1997, 2001). 본 연구에서도 수온 상승 스트레스와 관련하여 HSP70 mRNA는 생식소에서만 발현되었는데, 이것은 수온 스트레스로 인해 감성돔의 정소 내 생식세포에서 apoptosis가 발생 혹은 증가되었을 가능성을 추측해 볼 수 있으며, 이와 같은 현상이 일어나는 것을 방지하기 위해 HSP70이 발현한 것으로 보여진다. HSP70은 생물체가 스트레스를 받았을 경우, glucocorticoid 수용체의 합성을 위해 HSP90과 더불어 가장 잘 발현되는 스트레스 단백질로 알려져 있으며(Hutchison et al., 1994), 앞서 기술한대로 스트레스를 받게 되면 생물체는 이를 극복하기 위해 당신생합성이 필요하게 되며, 이를 위해 cortisol의 상승이 나타나게 된다. 이때 간에서 cortisol 수용체의 합성을 위해 HSP70 mRNA가 관여하게 된다. 따라서 본 연구에서는 30 °C 실험구의 감성돔 간 조직에서 HSP70 mRNA가 발현될 것을 기대해 보았으나, 발현을 확인할 수 없

었다. 그러나 Wegele et al. (2005)의 보고에 의하면 HSP90 mRNA가 cortisol 수용체와 상호작용하지 않을 때 비로소 HSP70 mRNA가 발현되어 cortisol 수용체를 활성화 한다는 점으로 볼 때, 본 연구에서는 HSP90 mRNA가 HSP70 mRNA 보다 먼저 발현하여 당신생합성에 필요한 cortisol 수용체와 상호작용한 것으로 보여지며, 이로 인해 간에서 HSP70 mRNA의 발현은 나타나지 않은 것으로 추측된다.

따라서 앞으로는 스트레스에 관련하여 cortisol-cortisol 수용체-HSP70의 관계뿐만 아니라 HSP90-HSP70과의 상호작용에 관한 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 담수사육 감성돔을 대상으로 수온을 상승시켰을 때, 세포적 스트레스 측면에서 HSP90 및 HSP70 mRNA의 발현 정도를, 신경-내분비적 스트레스 측면에서 혈장 cortisol 및 glucose 농도를 조사하였다. RT-PCR법을 이용하여 생식소로부터 HSP90 (891 bp) 및 HSP70 (465 bp) cDNA 단편을 클로닝 하여, 타 종과 그 상동성을 비교해 본 결과, 감성돔 HSP90은 참돔 HSP90과 99%, 무지개송어 HSP90과 95%, 대서양 연어 HSP90과 94%, zebrafish HSP90과 94%로 나타났으며, 감성돔 HSP70은 무지개송어 HSP70과 96%, silver seabream HSP70과 95%, zebrafish HSP70과 95%의 상동성을 나타내었다. 감성돔의 사육수온을 30 °C로 상승시켰을 때, HSP90 mRNA는 모든 조직에서 그 발현 정도가 20 °C 실험구에 비하여 7~9배 정도 높았으나, HSP70 mRNA는 생식소에서만 발현하는 것으로 나타났다. 혈장 cortisol 및 glucose 농도는 20 °C 실험구에 비하여 30 °C 실험구에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구에서는 논문은 한국과학재단 국제협력연구지원사업(과제번호: F01-2006-000-10066-0) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ackerman, P. A. and G. K. Iwama, 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to Vibriosis. J. Aquat. Anim. Health, 13, 173-180.
- Ackerman, P. A., R. B. Forsyth, C. F. Mazur and G. K. Iwama, 2000. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. Fish Physiol. Biochem., 23, 327-336.
- Adcock, I. M., 2000. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. Pulm. Pharmacol. Ther., 13, 115-126.
- Allen, R. L., D. A. O'Brien, and E. M. Eddy, 1988. A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. Mol. Cell. Biol., 8, 828-832.

- Arai, A., K. Naruse, H. Mitani, and A. Shima, 1995. Cloning and characterization of cDNAs for 70-kDa heat-shock proteins (Hsp70) from two fish species of the genus *Oryzias*. *Jpn. J. Genet.*, 70, 423–433.
- Basu, N., A. E. Todgham, P. A. Ackerman, M. R. Bibeau, K. Nakano, P. M. Schulte and K. Iwama, 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295, 173–183.
- Beckmann, R. P., L. E. Mizzen and W. J. Welch, 1990. Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850–854.
- Carmichael, G. J., Tomasso, J. R., Simco, B. A., Davis, K. B., 1984. Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113, 778–785.
- Chang, Y. J. and J. W. Hur, 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. *J. Korean Fish. Soc.*, 32, 310–316.
- Chang, Y. J., B. H. Min, H. J. Chang and J. W. Hur, 2002. Comparison of blood physiology in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) cultured in converted freshwater from seawater and seawater from freshwater. *J. Korean Fish. Soc.*, 35, 595–600.
- Ciavarra, R., and A. Simeone, 1990. T lymphocyte stress response. *Cell. Immunol.*, 129, 363–367.
- Csermely, P., T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka and G. Nardai, 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 79, 129–168.
- Davis, K. B., 2004. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 139, 433–440.
- Deane, E. E. and N. Y. S. Woo, 2005. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 776–783.
- Dix D. J., J. W. Allen, B. W. Collins, C. Mori, N. Nakamura, P. Poorman-Allen, E. H. Goulding and E. M. Eddy, 1996. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 3264–3268.
- Eddy, F. B., 1981. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In *Stress and Fish* (ed. A.D. Pickering), pp. 77–102. London: Academic Press.
- Feder, M. E. and G. E. Hofmann, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Phys.*, 61, 243–282.
- Forsyth, R. B., E. P. M. Candido, S. L. Babich and G. K. Iwama, 1997. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. *J. Aquat. Anim. Health*, 9, 18–25.
- Gamperl, A. K., M. M. Vijayan and R. G. Boutilier, 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4, 215–255.
- Graser, R. T., D. Malnar-Dragojevic and V. Vincek, 1996. Cloning and characterization of a 70 kd heat shock cognate (hsc70) gene from the zebrafish (*Danio rerio*). *Genetica*, 98, 273–276.
- Hightower, L. E., 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell*, 66, 191–197.
- Holloway, A. C. and J. F. Leatherland, 1997. Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 105, 246–254.
- Huang, H. C., W. C. Lee, J. H. Lin, H. W. Huang, S. C. Jian, S. J. T. Mao, P. C. Yang, T. Y. Huang and Y. C. Liu, 1999. Molecular cloning and characterization of porcine cDNA encoding a 90-kDa heat shock protein and its expression following hyperthermia. *Gene*, 226, 307–315.
- Hutchison, K. A., K. D. Ditmar, M. J. Czar and W. B. Pratt, 1994. Proof that hsp70 is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a heterocomplex with hsp90. *J. Bio. Chem.*, 269, 5043–5049.
- Iwama, G. K., P. T. Thomas, R. B. Forsyth and M. M. Vijayan, 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 8, 35–56.
- Iwama, G. K., M. M. Vijayan, R. B. Forsyth and P. A. Ackerman, 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Am. Zool.*, 39, 901–909.
- Janz, D. M., M. E. McMaster, K. R. Munkittrick and G. Van Der Kraak, 1997. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 147, 391–398.
- Janz, D. M., M. E. McMaster, L. P. Weber, K. R. Munkittrick and G. Van Der Kraak, 2001. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 58, 620–625.
- Khanna, A., R. F. Aten and H. R. Behrman, 1995. Physiological and pharmacological inhibitors of luteinizing hormone-dependent steroidogenesis induce heat shock protein-70 in rat luteal cells. *Endocrinol.*, 136, 1775–1781.
- Kothary, R. K., E. A. Burgess and E. P. M. Candido, 1984. The heat-shock phenomenon in cultured cells of rainbow trout: hsp70 mRNA synthesis and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, 783, 137–143.
- Logue, J., P. Tiku and A. R. Cossins, 1995. Heat injury and resistance adaptation in fish. *J. Ther. Biol.*, 20, 191–197.
- Lai, B.T., N.W. Chin, A.E., Stranek, W. Keh and K.W. Lanks, 1984. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2802–2810.
- Lele, Z., S. Engel and P. H. Krone, 1997. Hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebra-fish embryos. *Dev. Genet.*, 21, 123–133.
- Lim, E. H. and S. Brenner, 1999. Short-range linkage relationships, genomic organization and sequence comparisons of a cluster of five hsp70 genes in *Fugu rubripes*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 668–678.
- Mallouk, Y., M. Vayssier-Taussat, J. V. Bonventre and B. S. Poll, 1999. Heat shock protein 70 and ATP as partner in cell homeostasis. *Int. J. Mol. Med.*, 4, 463–474.
- Matsumoto, M. and H. Fujimoto, 1990. Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun., 166, 43–49.
- McDonald, D. G. and C. L. Milligan, 1997. Ionic, osmotic and acid base regulation in stress. In *Fish stress and Health in Aquaculture* (eds. Iwama, G.W., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B.), pp. 119–144. Cambridge: University Press.
- Min B. H., B. K. Kim, J. W. Hur, I. C. Bang, S. K. Byun, C. Y. Choi and Y. J. Chang, 2003. Physiological responses during freshwater acclimation of seawater-cultured black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*). *Korean J. Ichthyol.*, 15, 224–231.
- Min, B. H., M. H. Joeng, G. A. Noh, H. K. Lim, C. Y. Choi and Y. J. Chang, 2006. Hyposmotic treatment for control of the parasitic copepod, *Alella macrotrachelus* on the gill of cultured black porgy. *J. Aquaculture*, 19, 19–24.
- Molina, A., F. Biemar, F. Muller, A. Iyengar, P. Prunet, N. Maclean, J.A. Martial and M. Muller, 2000. Cloning and expression analysis of an inducible hsp70 gene from tilapia fish. *FEBS Lett.*, 474, 5–10.
- Mosser, D. D., A. W. Caron, L. Bourget, C. Denis-Larose and B. Massie, 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 17, 5317–5327.
- Munck, A., P. M. Guyre and J. Holbrook, 1984. Physiological functions of glucocorticoid in stress and their relationship to pharmacological action. *Endocrine. Rev.*, 5, 25–34.
- Murtha, J.M. and E.T. Keller, 2003. Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Ger.*, 38, 683–691.
- Ojima, N., M. Yamashita and S. Watabe, 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 51–57.
- Palmisano, A. N., J. R. Winton and W. W. Dickhoff, 2000. Tissue-specific induction of hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Mar. Biotechnol.*, 2, 329–338.
- Perry, S. F. and S. D. Reid, 1993. β -adrenergic signal transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish. Physiol. Biochem.*, 11, 195–203.
- Pratt, W. B., 1997. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 297–326.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft, 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18, 306–360.
- Pratt, W. B., U. Gehring and D. O. Toft, 1996. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. In: *Stress-Inducible Cellular Responses*, U. Feige, R.I. Morimoto, I. Yahara, and B. Polla. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 79–95.
- Roux, T., A. Saker, C. Leroy, C. Frantz and H. Michel, 1994. Low temperature nitriding mechanisms of austenitic stainless steels in N₂, Nice-Acropolis, France, 291–299.
- Sanders, B. M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23, 49–75.
- Sathiyaa, R., T. Campbell and M. M. Vijayan, 2001. Cortisol modulates hsp90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 129, 679–685.
- Schlesinger, M. J., M. Ashburner and A. Tissieres, 1992. Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor, New York, 131–137.
- Stegeman, J. J., M. Brousuer, R. T. DiGuilio, L. Forlin, B. A. Fowler, B. M. Sanders and P.A. VanVeld, 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein system as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R. J., R. A. Kimerle, P. M. Mehrle and H. L. Bergman. *Biomarkers-biochemical, physiological and histological markers of anthropogenetic stress*. Boca Raton, FL: Lewis, 235–335.
- Tomasso, J. R., Davis, K. B., Parker, N. C., 1980. Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics of hybrid striped bass (white bass \times striped bass) during netting and hauling stress. *Proc. World Maricult. Soc.*, 11, 303–310.
- Vamvakopoulos, N. O., K. Fukuhar, V. Patchev and G. P. Chrousos, 1993. Effect of single and repeated immobilization stress on the heat shock protein 70/90 system of the rat: glucocorticoid-independent, reversible reduction of hsp90 in the liver and spleen. *Neuroendocrinol.*, 47, 1057–1065.
- Wedemeyer, G. A. and D. J. McLeay, 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressor. In: Pickering, A.D. (ed), *Stress and Fish*. Academic Press, London, pp. 247–275.
- Wegele, H., S. K. Wandinger, A. B. Schmid, J. Reinstein and J. B. Substrate, 2005. Transfer from the Chaperone Hsp70 to Hsp90. *J. Mol. Biol.*, 356, 802–811.
- Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591–625.

원고접수 : 2006년 10월 22일

수정본 수리 : 2006년 11월 8일