

장기 고온 스트레스에 대한 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*) 간 조직 내 유전자 발현 반응의 cDNA microarray 분석

조영선 · 이상윤 · 노충환¹ · 남윤권^{2,*} · 김동수²

부경대학교 양식학과, ¹한국해양연구원 생물자원본부,

²부경대학교 해양수산형질전환생물연구소

Survey of Genes Responsive to Long-Term Heat Stress Using a cDNA Microarray Analysis in Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*) Liver

Young Sun Cho, Sang Yoon Lee, Choong Hwan Noh¹,
Yoon Kwon Nam^{2,*} and Dong Soo Kim²

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

¹Marine Resources and Research Department, Korea Ocean Research and
Development Institute Ansan 426-744, Korea

²Institute of Marine Living Modified Organisms (iMLMO) Pukyong National University
Busan 608-737, Korea

Gene transcripts potentially responsive to the heat stress were surveyed by cDNA microarray analysis in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Transcriptional profiles of hepatic tissue in the fish exposed to either 23°C or 32°C for 4 weeks were compared each other by 3 replicated hybridization assays using 1,124 unigene clones selected from mud loach liver expressed sequence tags (ESTs). A total of 93 clones showed the substantially increased mRNA levels (> 2-fold) in 32°C-exposed group when compared in 23°C-control group. It includes various enzymes and proteins involved in energy pathway, protease/protein metabolisms, immune/antioxidant functions, cytoskeleton/cell structure, transport and/or signal transduction. Maximum level of increase was up to 15-fold relative to 23°C treatment. Heat exposure also resulted in the significant decrease (less than 50% relative to 23°C-exposed fish) of the transcriptional activities in 85 genes. Besides the above categories, yolk protein (vitellogenin) and ribosomal proteins were notably down regulated in the fish exposed to heat stress. A number of novel gene transcripts were also detected in both up-regulated and down-regulated groups.

Key words : mud loach, heat stress, gene expression, cDNA microarray

*Corresponding author: yoonknam@pknu.ac.kr

서 론

어류는 외부 온도의 변화에 대하여 자신의 체온을 적응시키는 변온동물(poikilotherms)이다. 따라서 이러한 온도의 변화는 어류 세포 내 유전자 발현에 직접적인 영향을 끼치게 되고 이로 기인한 유전자 발현 양상(transcriptional profile)의 변화는 종종 어류의 생리학적 형질로 표현된다(Johnston and Dunn, 1987; Gerlach *et al.*, 1990; Larsson *et al.*, 2002). 어류와 같이 변온동물들은 일정 범위의 온도 변화에 대해서 자신의 항상성(homeostasis)을 유지할 수 있는 적응 능력을 보유하고 있지만, 조절 범위를 넘어선 온도 폭의 변화(hypo- and hyperthermal conditions) 또는 급격한 온도변화는 어류의 여러 조직에서 산화성 스트레스(oxidative stress)를 유발함과 동시에 많은 생화학적 및 생리학적 기능 장애를 야기시키게 된다(Parihar *et al.*, 1996; Lushchak and Bagnyukova, 2006). 때문에 수온의 변화에 따른 어류 조직 내 유전자 발현 양상에 관한 정보 수집은 온도 변화에 따른 어류 조직 내 스트레스 반응을 전사(transcription) 수준에서 이해하는데 중요한 바탕정보를 제공할 수 있다.

이러한 온도 스트레스에 반응하는 관련 유전자군의 이해는 경제적으로 중요한 신규 품종의 양식 기술을 개발하거나, 멸종위기 어종의 장외 복원 기술을 위한 인공산란 유도 및 사육기술 개발에 유용 정보를 제공할 수 있다. 뿐만 아니라 특정 임계 온도를 보이는 발현 유전자를 발굴할 경우 프로그램화된 외부 온도 조절을 통해 목적 유전자 발현의 인위 조절을 가능케 할 핵심 소재로 이용될 수 있다. 그러나 온도 적응에 대한 어류 유전자 조절의 분자기전에 관한 연구는 아직 일천한 단계로서, 최근 들어 chaperone 단백질 유전자들을 중심으로 일부 유전자들에 대해서 연구되고 있으나(Rabergh *et al.*, 2000; Deane and Woo, 2005; Ojima *et al.*, 2005) 아직 온도특이적 발현 유전자들의 대량 탐색 또는 신규 유전자의 발굴은 미비한 실정이다(Vornanen *et al.*, 2005).

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)는 우리나라 대부분 하천에 서식하는 주요 담수 어종으로서 본 어종은 빠른 배(embryo) 발생, 연중 다산란 기술(induced multiple spawning)의 정착, 높은 산란력, 다양한 염색체 공학(chromosome engineering) 및 유전자 조작 기술의 확립 등 어류 유전자(체) 연구를 위한 실험재료로서 많은 장점을 갖고 있다(Nam and Kim, 2002). 특히 미꾸라지는 겨울철 영하에 가까운 온도서부터 여름철 30°C를 웃도는 광범위한 온도 영역에 서식할 수 있는 광온성 어류

로서 다양한 외부 온도 구배에 대한 유전자 발현 변화를 추적하는 데 유용한 실험 모델이다. 이에 본 연구는 미꾸라지를 어류 유전자 분석용 모델 시스템으로 개발하기 위한 연구의 일환으로 cDNA microarray 기법을 이용하여 고온에 장기간 노출된 미꾸라지에서 관찰되는 온도 반응 유전자들을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 고온 처리 조건

실험에 사용한 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)는 부경대학교 양식학과 연구실에서 사육하고 있는 4년산 친어로부터 인공산란 기법을 통해 생산된 부화 6개월 된 개체들이었다. 평균 어체중은 9~11 g 내외였으며, 온도 적응 실험에 사용하기 전 상품 잉어 사료(우성사료, 대한민국)를 이용하여 순환 여과식 사육수조에서 20~22°C로 사육하고 있던 개체들이었다.

고수온에 노출된 미꾸라지들의 간 조직에서 나타나는 전사 발현 양상(transcriptional response)을 조사하기 위해 32°C에 장기간 노출된 실험군과 대조군으로 설정된 23°C 유지군간의 유전자 발현을 cDNA microarray를 이용하여 분석하였다. 무작위로 선발한 9마리의 실험어를 50 L 수조에 수용하였으며 총 6개의 실험수조를 설정하였다. 실험어들을 실험 수조에 적응 시키기 위해서 23°C에서 1주일간의 예비 사육기간을 거쳤다. 예비 사육기간 후 3개 수조는 23°C의 온도를 계속 유지하였고 나머지 3개 수조는 시간당 3°C씩 온도를 상승시켜 32°C에 도달토록 한 후 총 4주간 온도 처리를 실시하였다. 항온 수조 시스템을 이용하여 각 설정 온도를 $\pm 1.0^\circ\text{C}$ 오차 범위 내에서 유지하였으며 각각의 독립된 순환여과식 시스템을 이용하였다. 상기 잉어 상품 사료를 이용, 1일 3회 반복 공급을 하였으며 잔여 사료가 수질에 영향을 끼치지 않도록 사료 공급 20분 후에 모두 제거하였다. 매일 전체 수량의 20%씩 1회 환수하였다. 온도 자극 실험이 완료되는 4주째 각 반복구 수조(n=3)에서 5마리 개체를 무작위로 선발하여 간 조직을 해부학적 기법을 이용하여 적출하였고 분석 전까지 -80°C에 보관하였다.

2. RNA 분리

적출된 간 조직으로부터 total RNA를 분리하였다. Total RNA 분리는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA)를 이용, 제조사의 사용 안내법에 의거하여 수행하였다. 각 개

체로부터 적출된 조직 30~40 mg씩을 대상으로 RNA를 분리하였고, 분리된 RNA는 1.0% formaldehyde/MOPS agarose 전기영동을 통해 28S 및 18S rRNA band 비율을 분석하여 28S:18S 비가 2.0에 근접한 RNA 시료만을 실험에 이용하였다. 분리된 RNA 시료에 오염되어 있는 DNA를 제거하기 위해서 DNase I (Roche, Germany) 10 U/ μ g total RNA의 농도로 37°C에서 30분간 처리하였고, DNase를 불활성화시키기 위해서 다시 75°C에서 20분간 반응시켰다. 최종 준비된 RNA 시료의 농도는 자외선 분광광도계 (Gene Quant Spectrophotometer; Pharmacia, USA)를 이용하여 측정하였고 최종 농도를 1 mg/mL로 조정하였다.

3. EST library 및 cDNA microarray 제작

cDNA microarray 제작을 위해 미꾸라지 간 cDNA library로부터 확보한 EST 클론을 이용하였다. cDNA library는 미꾸라지 암컷 2마리 및 수컷 2마리의 간 조직을 합쳐서 UniZap XR Lambda vector (Stratagene, USA)를 이용하여 단일방향성 (unidirectional) cDNA 클로닝을 통해 제작하였으며 제조사의 사용법에 의거하여 파아지 포장 (packaging), 증폭 (amplification) 및 *in vivo* excision을 수행하였다. Excised library를 이용 대장균 SOLR 계통에 감염시켜 pBluescript SK phagemid 벡터 형태로 EST 클론들을 확보하였다. 확보된 재조합 균주를 대상으로 phagemid를 분리하고 벡터 내 multi-cloning site의 5' 위치에 있는 염기서열 분석용 primer (SK primer; Stratagene)를 이용하여 단일 염기서열 분석 (single pass sequencing)를 수행하였다. 염기서열 분석은 자동염기서열 분석기 ABI 377 또는 3700 (Applied Biosystems, USA)을 이용하였으며 1차 확보한 염기서열 자료는 분석 프로그램 Sequencher (Gene Codes, USA)를 이용하여 교정을 수행하였다. NCBI GenBank의 BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하여 상동성 검색을 실시하였다 (Nam and Kim, 2002).

미꾸라지 간 조직 cDNA library로부터 구축된 EST 데이터베이스를 대상으로 다양한 assembly option들을 이용하여 contig 및 clustering 분석을 통해 unigene을 1차로 확보하였다. 1차 확보된 unigene들을 대상으로 염기서열을 재확인하였으며 contig내 속하지 않는 클론들을 대상으로 alternative splicing form의 존재 여부와 아울러 긴 transcript의 서로 다른 영역을 나타내는 클론들을 추가 확보하였다. 총 확보된 1,124 클론들을 대상으로 gene ontology (www.geneontology.org) 분석을 실시하였다. 데이터베이스로부터 선발된 박테리아 클론들로

부터 다음의 방법을 통해 PCR용 주형을 확보하였다. 선택배지를 이용하여 각 클론들을 14시간 동안 진탕 배양을 수행하였다. 배양액으로부터 1 mL를 회수하여 상등액을 제거한 후 박테리아 회수 침전물을 50 μ g/mL의 proteinase K 용액으로 현탁시키고 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 배양 반응이 완료되면 반응물을 50°C에서 30분간 다시 방치한 후 proteinase K를 불활성화시키고 플라스미드 DNA를 변성시키기 위해 95°C에서 15분간 반응하였다. 원심분리를 통해 세포 찌꺼기를 제거하고 상등액을 취하여 cDNA microarray 제작용 PCR 주형으로 사용하였다. 클론 내 삽입 DNA (insert DNA)를 증폭하기 위해 클로닝 벡터의 multi-cloning site 양 말단에 있는 벡터 primer를 이용하였으며, 열순환 반응을 위해 Bio-Rad사의 PCR 자동 장비 (iCycler™)를 이용하였다. 상용화되고 있는 PCR premix (AccuPower PCR premix; Bioneer, Korea)를 이용하였으며 반응 용액은 50 μ L로 하였다. PCR 조건은 94°C 2분의 최초 변성 반응 후, 94°C 45초, 57°C 45초 및 72°C 1분간 30 cycle을 수행하였다. 정확한 증폭 여부를 확인하기 위해 PCR 산물 1 μ L를 agarose 전기영동을 통해 확인하였으며 전기영동상 확인된 PCR 산물들을 대상으로 PCR clean up kit (Qiagen, USA)를 이용하여, 잉여 primer와 dNTP를 제거하였다. 순수 분리된 PCR 산물은 384 array format으로 spotting 위치를 설정하고 4개 block으로 나누어 spotting을 수행하였다. 미꾸라지 클론들과 함께 외부 대조군 (external control)으로 사용하기 위한 효모 DNA 클론 8개를 함께 spotting하였으며 아울러 내부 대조군 (internal control)으로 사용 가능하다고 판단되는 클론들로서 beta-actin 및 elongation factor alpha 등을 역시 선정하여 spotting을 실시하였다. 대조군 클론을 포함하여 각 클론 별 2반복 spotting을 실시하였다. 최종 제작된 microarray를 대상으로 spotting의 효율을 분석하기 위해 단일 염색 (single dye)을 통한 Q/C를 수행하였다.

4. Microarray hybridization 분석

cDNA microarray hybridization용 탐침 (probe) 제작을 위해 total RNA 50 μ g과 random primer (Invitrogen, CA, USA)를 이용, 역전사 (reverse transcription) 반응을 통해 aminoallyl-dUTP를 labeling 하였다 (6 μ g random primer; 37°C 3 hrs). 표지된 RNA 시료는 Microcon YM-30 column (Millipore, MA, USA)을 이용하여 정제과정을 수행한 후 Cy3 또는 Cy5 염색시약 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)과의 결합반응을 유도한 후 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA)

를 이용하여 다시 정제를 수행하였다. 동결 건조된 Cy3-또는 Cy5-표지 cDNA를 hybridization 용액 (30% formamide, 5X SSC, 0.1% SDS, 0.1 mg/mL salmon sperm DNA)에 현탁한 후, 표준시약 및 분석 시료간의 형광강도를 동일하게 조정하여 혼합하였다. 혼합된 시료를 이용하여 microarray 슬라이드와의 hybridization 반응을 유도하였으며 hybridization은 42°C에서 16시간 동안 수행하였다. Hybridization 반응이 종료되면 세척 용액 (washing solution) I (2X SSC, 0.1% SDS)을 이용하여 42°C에서 5분간 2회 세척을 수행한 후 세척 용액 II (0.1X SSC, 0.1% SDS)를 이용하여 실온에서 10분간 1회 세척을 수행하였다. 최종적으로 SDS를 제거하기 위해 0.1X SSC를 이용하여 실온에서 1분간 4회 다시 세척을 수행하였다. 세척과정이 완료된 후 650 rpm에서 5분간의 원심분리를 통해 슬라이드를 건조하였으며 건조된 microarray 슬라이드를 scanning하여 (Packard Bioscience, MA, USA) hybridization 이미지를 확보하였다. Hybridization 이미지는 GenePix Pro 3.0 software (Axon Instrument, CA, USA)를 이용하여 유전자 발현 비를 분석하였으며 역시 동일 프로그램을 이용하여 전체 표준화 (global normalization) 또는 내부 대조군 (internal control)을 이용한 표준화를 수행하였다. 동일 RNA 시료들에 대해서 3회의 독립된 반복 hybridization 반응을 실시한 후 모두에서 유사한 결과를 보이는 클론들만을 선별, 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 고온자극에 대한 발현증가 (up-regulation) 유전자들의 동정

cDNA microarray hybridization 3반복 분석 모두에서 2배 이상의 전사 발현 증가가 관찰된 유전자는 총 93 종류로 나타났다. 이들 유전자들을 Gene Ontology (www.geneontology.org) 분석을 통해 기능별 clustering을 수행하였으며 각 그룹에 속하는 유전자들의 잠재 기능 유추 (putative annotation) 결과는 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보듯이 에너지 대사 (energy pathway or energy metabolism)에 속하는 효소를 암호화하는 유전자가 총 21종, 단백질 대사 (protein metabolism)군에 속하는 유전자가 13종, 면역관련 유전자가 11종, 세포 골격 (cytoskeleton)관련 구조 단백질 유전자가 5종, 항산화 효소 유전자가 4종, 물질수송 단백질 유전자가 5종, 수용체 및 세포 신호전달 (cell signaling)에 관여하는 유전자가 6종, 그리고 정확한 분류가 어려운 유전자들이 4종으

로 나타났다. 또한 상기 기능이 알려진 유전자 (known gene)외에 GenBank DB에 일치되지 않거나 또는 염기서열 배열 (alignment)를 형성하더라도 그 기능이 아직 불투명한 유전자 (unknown gene)들이 총 24종 동정되었다 (Table 1). 그러나 일반적으로 온도 자극에 의해 유도 발현을 보이는 것으로 알려져 있는 heat shock protein (Hsp)들은 본 microarray 분석 시 유의적인 발현증가를 나타내지 않아 흥미로웠다. 이는 Hsp 유전자들의 경우 단기 고온 자극에 의해 주로 유발되며 변온동물인 어류의 경우 고온 조건이 지속될 경우 적응 과정에 의해 초기 증가된 Hsp의 발현 수준이 다시 감소할 수 있음을 시사하고 있다. 따라서 향후 자극 기간별 유전자 발현의 변화 양상에 관한 연구가 뒤따라야 할 것이다.

1) 전사 발현의 증가 수준

이들 유전자들은 모두 표준화 (normalization) 후 23°C에 유지된 실험어 보다 32°C에 장기 (4주) 노출된 실험어에서 최소 2배 이상의 mRNA 수준이 증가된 유전자들로서 그 증가 폭은 최대 15배까지 관찰되었다 (unknown gene). 가장 높은 전사 발현 증가를 보인 유전자들은 (>10배) 아직 기능이 알려져 있지 않은 유전자들 (unknown genes), 보체 (complement)관련 유전자 2종 (보체 조절 혈장 단백질; complement regulatory plasma protein 및 보체 구성 단백질 C7; complement protein component C7), transketolase, keratin (세포막 구성 구조 단백질) 및 전사조절 단백질 (CBP/p300 interacting transactivator) 등을 암호화하는 유전자들이었고 2배 이상 발현이 증가된 전체 유전자 수의 약 9%에 해당되었다. 그 다음 높은 발현 증가를 나타낸 유전자들은 (>5배) 기능 미확인 유전자 산물 (unknown gene transcripts), lactate dehydrogenase를 위시한 energy 생합성 경로에 속하는 효소들, 항산화 효소 1종 (glutathione peroxidase), fibrinogen 등의 응집인자들 (coagulation factors), 그리고 물질 수송 기능 (transport activity)을 갖는 일부 단백질들이 본 group에 속하였으며 전체 증가군의 25%를 차지하였다. 나머지 대부분의 유전자들은 2~5배 증가를 보인 유전자들로서 이들은 단백질 분해 등 대사에 관련하는 단백질들, 항산화 효소들, 물질수송 및 세포신호전달 등을 암호화하고 있는 유전자들이 주를 이루었다. 그러나 발현 증가 폭과 유전자 기능군 (clustering group)간의 특이적인 상관관계는 관찰되지 않았다.

2) 에너지 경로 (energy pathway) 관련 효소군 및 단백질 대사관련 유전자

에너지 경로에 관여하는 효소군은 탈수소효소 (dehydrogenase), 가수분해효소 (hydrolase), 산화환원효소

Table 1. Functional clustering of highly up-regulated genes (>2-fold) in mud loach liver during chronic exposure to elevated water temperature (32°C)

Functional clustering	Putative annotation	Fold increase
<i>Enzyme (energy pathway)</i>		
Dehydrogenase/oxidoreductase	Lactate dehydrogenase	8.1
	Pyruvate dehydrogenase	6.5
	Aldehyde dehydrogenase 7 family	6.1
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4.3
	NADH dehydrogenase subunit 5	6.7
	NADH dehydrogenase subunit 4	6.2
	Probable oxidoreductase	7.1
	NADH ubiquinone oxidoreductase	7.8
Hydrolase	Chitinase, acidic	6.6
	Phytanoyl-CoA hydroxylase	3.5
	Prolyl-4-hydroxylase	4.4
Others	Fructose-bisphosphate aldolase	7.1
	Flavocytochrome b-558 alpha polypeptide	3.3
	Arachidonate 12-lipase	2.2
	Prostaglandin D synthase	2.1
	Creatine kinase	6.5
	Dimethylaniline monooxygenase	4.5
	Enolase 1, (alpha)	9.1
	Galactosyltransferase	3.6
	Formiminotransferase cyclodeaminase	3.3
	Cytochrome P450 3A40	8.4
	Transketolase	11.2
<i>Protein metabolism</i>		
Protease activity	Plasma hyaluronan-binding protein	2.1
	Chymotrypsinogen 2	3.0
	Trypsinogen 2	3.2
	Prolyl endopeptidase	2.7
	Cullin	3.3
	Ubiquitin conjugating enzyme E	4.0
Coagulation factor	Fibrinogen alpha chain A	6.3
	Fibrinogen alpha chain E	6.2
	Coagulation factor IX	7.4
	Coagulation factor II	6.9
	Coagulation factor XI	4.1
Others	Protein disulfide isomerase	3.3
	Crystallin J1A	3.0
<i>Immune response or related</i>		
Complement	Complement regulatory plasma protein	12.4
	Complement protein component C7	11.5
	Complement component C3	4.2
	Complement associated protein	4.1
Lectin	C-type lectin	3.3
	Anti-freeze protein like protein	2.2
Others	Chemotaxin	2.1
	VHSV-induced protein	3.0
	Toxin-1	3.0
	Tumor rejection antigen	2.4
	Interferon inducible protein 2	3.1
<i>Antioxidant function</i>		
	Omega class glutathione-S-transferase	3.2
	Glutathione peroxidase isoform 1	6.1
	Glutathione peroxidase isoform 2	3.2
	Superoxide dismutase (Cu/Zn)	2.1
<i>Structural or cytoskeletal protein related</i>		
	T-plastin	4.0
	Vitronectin	3.6

Table 1. To be Continued.

	Keratin 18	13.2
	Thymosin beta-12	4.4
	Actin related protein	2.1
<i>Transport activity</i>	Ferritin H-2	6.6
	Aquaporin	6.4
	Exocyst complex 84-kDa subunit	6.2
	Perforin	7.1
	Serum vitamin D-binding protein	3.1
<i>Receptor, signal transduction or cell communication</i>	Cytotoxic cell receptor	3.0
	Chemokine (C-X-C motif), receptor	2.1
	Dopamine-beta-hydroxylase	2.4
	Calmodulin	3.0
	Stress-induced-phosphoprotein	3.2
	Insulin like growth factor binding protein	3.1
<i>Unclassified or miscellaneous</i>	CBP/p300 interacting transactivator	11.5
	Fetuin long form	3.2
	poly (C) binding protein	2.8
	inter-alpha globulin inhibitor	2.4
<i>Unknown</i>		
	Hypothetical ^a	9 genes
	Weak homology ^b	12 genes
	No match ^c	3 genes

^aSignificantly matched but protein function has not been clarified yet

^bWeak similarity with e-value higher than 10^{-10}

^cNo hit from BLASTx search against GenBank

(oxidoreductase) 및 다양한 대사 관련 효소들로 구분할 수 있었으며 이들 energy 관련 효소들의 전사발현 증가는 어류가 고온에 적응하면서 체내 전체적인 대사활성의 증가를 반영하고 있는 것으로 판단된다(Vornanen *et al.*, 2005). 탈수소효소 (dehydrogenase)들은 lactate dehydrogenase를 위시하여 여타 생물학적 스트레스에 반응하는 효소들로 알려져 있고(Schulte *et al.*, 2000) 본 연구의 pyruvate dehydrogenase 및 NADPH dehydrogenase 역시 생체의 에너지 생성(ATP pathway)에 주기능을 담당하는 효소들이다. 가수분해효소 중 phytanoly-CoA hydrolase와 기타군에 분류된 arachidonate 12-lipase는 지질대사에 관여하는 효소들로서 본 효소 유전자들의 유의적인 전사발현의 변화는 온도 상승에 의해 지질 분자들의 conformational change 및 cholesterol content 변화 등이 야기될 수 있음을 시사하고 있다(Buda *et al.*, 1994; Robertson and Hazel, 1995). 이미 온도 변화에 의해 지질 조성의 homoviscous adaptation의 일환으로 어류 세포막 주요 구성 요소인 인지질(phospholipids) 등의 구조 변화가 유발됨이 알려져 있다(Hazel, 1984; Zehmer and Hazel, 2005). 또한 가수분해 효소의 일종인 prolyl-4-hydrolase의 경우 저산소(hypoxia) 반응에 의해 발현이 영향을 받는 것으로 알려져 있으며(Siddiq *et al.*, 2005) 본 연구에서 prolyl-4-hydrolase

효소의 전사 발현 증가는 고수온 상태에서 용존산소의 감소와 체내 산소 소비 증가로 인한 유도 발현 가능성을 시사하고 있다.

단백질 대사에 속하는 유전자군의 경우 단백질 분해 활성(protease activity)을 갖는 단백질들과 응집인자(coagulation factor)들을 암호화하는 유전자들이 가장 많은 전사활성의 증가를 나타내었다. 이는 온도 상승으로 인한 단백질 대사율의 증가에 기인하는 것으로 판단되며, 특히 cullin 및 ubiquitin conjugating enzyme E의 경우 ubiquitin 특이적인 단백질 분해활성을 보유하는 단백질들로서 proteasome의 구성과 작용에 관여하며, 이들 유전자발현의 증가는 온도 상승 시간 조직 내 산화성 스트레스(oxidative stress) 및 단백질 합성/분해율(protein turnover rate)의 증가를 잘 반영하고 있다(Farout and Friguet, 2006). 최근 어류 응집인자 유전자들의 구조가 밝혀진 바 있어 이들 인자들의 생화학 기작에 관한 정보가 빠른 속도로 축적되고 있으나(Hanumanthaiah *et al.*, 2002) 아직 변온동물의 응집반응 경로의 분자기작과 온도와의 상관관계에 대한 연구는 미비한 실정이다.

3) 면역관련 및 항산화 효소 유전자

면역관련 단백질들 중 보체 조절 단백질들 및 보체

구성성분들의 전사 발현이 유의적으로 상승하였고 또한 면역조절인자 (immune modulator)로 작용하는 것으로 알려져 있는 C-type lectin 계열의 유전자들, 그리고 일부 항원/항체 반응에 관여하는 단백질들의 mRNA 수준이 함께 증가하였다. 보체는 생명체가 획득한 가장 초기 방어 시스템으로서 척추동물의 선천적인 면역 기능에 핵심적인 역할을 담당하며 최근 들어 획득 면역 (acquired immunity)에도 관여한다는 연구결과가 보고되어 선천적 면역 기능과 획득성 면역기능을 연결 시켜주는 생체 방어 단백질로서 새로이 조명되고 있다 (Boshra *et al.*, 2006). 뿐만 아니라 특정 보체들은 직접적인 박테리아 용해 (bacteriolytic) 활성을 갖고 있음이 무지개 송어에서 보고되어 큰 관심을 받은 바 있다 (Nikoskelainen *et al.*, 2002). 또한 보체 시스템은 자가 면역 (autoimmunity)에도 관여함이 보고되어 있어 (Rus *et al.*, 2005; Seelen *et al.*, 2005; Ogden and Elkon, 2006) 고수온 스트레스에 노출된 어류 세포들의 세포사멸 (apoptosis) 가속화 가능성을 간접적으로 시사하고 있다. C-type lectin은 세포의 자가성 (self) 및 비자가성 (non-self) 인식에 중요한 역할을 담당하며 면역반응의 조절에 관여하고 일부 lectin (manose-binding lectin)들은 'anti-microbial' 활성 역시 갖는 것으로 보고된 바 있다 (Jack and Turner, 2003). 특히 상기 보체 시스템을 촉발시키는데 핵심적인 기능을 담당하는 것으로 알려져 있어 lectin 및 보체 유전자 발현 증가가 함께 수반되는 본 연구 결과를 잘 뒷받침하고 있다 (Fujita, 2002; Fujita *et al.*, 2004).

이들 면역 관련 단백질들 외에 또 다른 생체 방어 단백질군인 항산화 효소 (antioxidant enzyme; AOE) 시스템의 유의적인 전사 발현 역시 증가하였다. 고온 스트레스는 어류의 다양한 조직에 있어 활성산소 (reactive oxygen species; ROS)를 유발시키며, 특히 간 조직 내 지방의 산화 (lipid peroxidation)를 야기시킴으로써 적절한 항산화 작용이 이루어지지 못할 경우 많은 생리적 장애가 야기된다 (Heise *et al.*, 2006; Lushchak and Bagnyukova, 2006). 본 연구에서는 여러 AOE 중 특히 superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) 및 glutathione peroxidase (GPX)의 전사 발현이 가장 유의적으로 증가하였다. SOD의 경우 ROS 제거의 제1선에 작용하는 scavenger enzyme으로서 활성산소를 H₂O₂로 전환시키는 촉매 반응을 담당하며 (Zelko *et al.*, 2002), GPX는 2개의 glutathione 분자를 이용하여 SOD의 촉매에 의해 야기된 H₂O₂를 물 분자로 전환시킴으로써 생체에 유발된 산화성 스트레스를 제거한다 (Imai and Nakagawa, 2003). 또한 GST의 경우 역시 glutathione을 이용하여 다양한 활성산소 기원의 유독물질들

을 무독화시키는 생체 방어 유전자의 일종으로 알려져 있다 (Oakley, 2005). 따라서 이들 항산화 효소 유전자의 전사활성 증가는 고온에 노출된 실험어의 조직 내 산화성 스트레스가 유의적으로 증가되었음을 직접적으로 잘 나타내고 있으며 (Cho *et al.*, 2006), 향후 이들 항산화 기능 효소들의 자세한 분자기전의 연구를 통해 고온 스트레스 노출 시 어류 조직 내 활성산소 생성에 관한 보다 자세한 정보를 수집할 수 있을 것이다.

4) 세포 골격 및 물질 수송 관련 유전자

고온에의 장기 노출은 어체 내 대사활성 뿐만 아니라 세포의 미세 구조에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 변온동물의 경우 큰 폭의 온도 변화가 장기간 지속될 경우 세포, 특히 세포막의 구성 성분 및 구조 변화가 유발 됨이 보고된 바 있으며 (Dey *et al.*, 1993), 본 연구에서도 actin 관련 단백질을 위시하여 keratin 및 thymosin beta와 같은 세포 골격 형성과 유지를 담당하는 구조 단백질들 그리고 vitronectin과 같은 세포 기질 단백질 (cellular matrix protein) 및 세포의 성장 및 유지에 관여하는 T-plastin 등 구조 단백질의 발현을 변화가 관찰되었다. 이러한 세포막 관련 단백질들의 변화는 종종 세포막 인지질의 변화와 함께 수반되며 세포의 유동성 (fluidity)에도 영향을 끼칠 수 있다 (Zehmer and Hazel, 2005). 본 연구 결과 역시 상기 구조 단백질들의 변화와 함께 세포 물질 수송에 관여하는 단백질들 (transport activity protein)인 aquaporin (water channel) (Borgnia *et al.*, 1999; King *et al.*, 2004) 및 exocyst complex 84 kDa protein들의 전사 발현의 유의적인 증가가 나타났고 아울러 물질 수송과 저장 기능을 동시에 갖는 ferritin의 mRNA 역시 함께 증가되었다. 또한 exocytosis와 함께 cytolysis 기능을 보유함으로써 세포 사멸 경로 (cell death pathway)에 중요한 역할을 담당하는 perforin이 유의적으로 증가 되었다 (Catalfamo and Henkart, 2003; Hwang *et al.*, 2004).

5) 세포 신호전달 및 기타 유전자

세포 막 단백질들 및 물질 수송 관련 단백질들의 발현 증가와 함께 세포 수용체/세포 신호전달 관련 단백질들의 전사활성 증가가 관찰되었다. 세포독성 수용체 (cytotoxic cell receptor) 분자들, Ca²⁺을 이용하는 세포 신호전달 관련 단백질인 calmodulin, 스트레스 신호전달에 관여하는 stress-induced phosphoprotein 및 dopamine hydroxylase, 그리고 세포 분화 및 성장에 관여하는 IGF-binding protein들의 mRNA 증가가 고온 노출에 의해 유도되는 것으로 나타났으나 아직 이들 단백질들이 외부 온도 변화에 대해 어떠한 작용 변화를 유발하

는 지는 불분명한 상태이다 (Johnston and Dunn, 1987; Gerlach *et al.*, 1990; Gordon and Leon, 2005). 또한 아직 정확한 기능이 분석되지 못한 hypothetical polypeptide 들 그리고 NCBI GenBank 상에 등록되어 있는 유전자/단백질들과 전혀 상동성을 갖지 않는 신규 유전자들이 탐색되어 향후 이들의 구조와 기능에 대한 연구를 통해 고온 스트레스에 반응하는 새로운 유전자 표지 발굴이 가능할 것으로 기대된다.

2. 고온자극에 대한 발현 감소 (down-regulation) 유전자들의 동정

1) 전사 발현 감소 유전자의 종류

고온 스트레스에 노출된 실험어 간 조직에서 유의적으로 전사 발현이 감소하는 유전자 역시 탐색되었으며 23°C 대조군에 비해 50% 이상 발현이 감소하는 유전자는 총 85종으로 나타났다 (Table 2). 감소한 유전자들은 환원효소 (reductase) 들을 포함한 에너지 회로에 속하는 효소 12종, 운송/저장 단백질 4종, vitellogenin 전구체 3종, 세포 신호전달에 관여하는 단백질 3종, 전사 조절 단백질 2종, 면역관련 단백질 4종, 리보솜 단백질 5종 및 미확인 기능 유전자 전사체들 37종으로 나타났다. 고온에 노출되었을 시 유전자 발현의 감소가 가장 많이 (0~10%) 감소하는 단백질들은 vitellogenin 이형 전사체 2종, sterol C4-methyltransferase, ornithin decarboxylase 및 미확인 기능 단백질 등을 포함하여 총 6개 (6/8=7%) 였다. 전사 발현이 23°C에 비해 20~30%로 감소한 유전자들은 landosterol synthase를 포함한 효소류, vitellogenin 전구체 1종 및 전사조절 단백질인 bromodomain-containing protein 1종을 포함한 9개 (10.5%)로 나타났다. 또한 30~50% 수준으로의 감소를 보인 유전자들은 서로 다른 기능 분류군에 속하는 다양한 단백질들을 암호화하고 있었으며, 특히 리보솜 단백질들이 대부분 본 그룹에 속하였다. 그러나 고온 노출시 유의적으로 발현이 감소하는 유전자군의 경우 증가군에 비해 미확인 기능 유전자들의 비율이 높게 나타났으며 각각의 유전자들의 전사 발현 감소와 온도군 간의 명확한 상관관계의 규명은 아직 불투명하다.

2) 에너지 대사 및 회로관련 효소 유전자

고온 스트레스에 노출 시 유의적인 전사발현의 감소를 보이는 에너지 관련 효소들은 환원효소 (reductase), 탈탄산효소 (decarboxylase) 및 이전효소 (transferase) 들이 주를 이루었다. 발현 감소를 나타낸 환원효소들은 이들 단백질의 주 작용위치가 peroxisome 또는 소포체

(endoplasmic reticulum; ER)인 공통적인 특징을 나타내었다 (available at <http://www.hprd.org>). Ornithine decarboxylase (ODC)는 polyamine의 생합성을 개시하는 효소로서 성장인자, 암유전자 발현 및 polyamine의 체내 수준 등 다양한 생물학적 자극들에 의해 민감한 유전자 발현 반응이 포유류에서 보고되어 있다 (Schipper and Verhofstad, 2002; Pegg, 2006). 어류에서도 zebrafish (*Danio rerio*) 모델을 이용하여 ODC 발현의 *in vivo* 분석이 수행되어 포유류에서 관찰되는 기본 발현 기작이 어류에서도 잘 보존되어 있음이 밝혀진 바 있다 (Hascilowicz *et al.*, 2002). 또한 고온 조건의 스트레스가 polyamine의 산화를 유발함이 보고되어 있으나 (Harari *et al.*, 1989) 산화된 polyamine의 축적이 어류 세포내 ODC anti-zyne 유도에 미치는 영향에 대해서는 추후 연구가 필요한 실정이다. 또한 phenyltransferase의 일종인 farnesyl diphosphate synthase의 경우 본 효소에 의해 생성되는 farnesyl diphosphate (FPP)가 동물세포의 cholesterol의 생합성에 이용되는 물질인 점을 고려할 때 고온에 장기간 노출된 어류 세포 내 cholesterol 대사의 변화 가능성을 시사하고 있다. 아울러 ligase의 일종인 glycogen synthase 2는 glycogen 생합성 중 UDP-glucose의 glycosyl residue를 alpha-1, 4-glucan에 전달하는 반응을 담당하는 효소로서 (Weinstein *et al.*, 2006; see also <http://www.hprd.org>), 본 효소의 전사활성 감소는 어류가 고온에 적응한 상태에서 대사활성이 증가하고, 따라서 고온에서 glycogen의 축적보다는 섭취한 영양소를 에너지 생성에 빠르게 이용하기 때문인 것으로 판단된다.

3) 운반/수송 단백질 유전자 및 vitellogenin 유전자

운반/수송 단백질군의 경우 운반 기능과 세포 부착 활성 (cell adhesion activity)을 동시에 갖고 있는 cadherin 17의 전사 발현이 급격히 감소되는 것으로 나타나 고온 상태에서 미꾸라지 세포의 표면 구조 변화 가능성을 시사하고 있으며 또한 cholesterol 대사에 관여하는 두 종류의 apolipoprotein들에서 유의적인 발현의 변화가 관찰되었다 (Malik, 2003).

고온 노출시 난 성숙에 필수적인 주요 난황 단백질인 vitellogenin의 급격한 전사 활성 감소가 관찰되었다. 어류에 있어 최소 2개 이상의 vitellogenin 유전자가 존재함이 연어과 어종과 해산어종인 참돔 (*Pargus major*)에서 밝혀진 바 있으며 (Sawaguchi *et al.*, 2006), 본 연구에서도 서로 다른 vitellogenin 전사체가 3종 관찰됨으로써 특정 외부 환경 조건에 대한 각 전사체 종류의 특이적인 발현 기작 규명의 필요성이 대두되었다. 그럼에도 불구하고 3종류의 vitellogenin 전사체들은 모두 고온상태

Table 2. Functional clustering of highly down-regulated genes ($\leq 50\%$) in mud loach liver during chronic exposure to elevated water temperature (32°C)

Functional clustering	Putative annotation	Relative mRNA level (%)
<i>Enzyme (energy pathway)</i>		
Reductase	HMG-CoA reductase	35
	7-dehydrocholesterol reductase	30
Decarboxylase	Ornithine decarboxylase	9
	Phosphatidylserine decarboxylase	25
Acyltransferase	Dihydroliipoamide S-acetyltransferase	29
Methyltransferase	Arsenic methyltransferase	34
Phosphotransferase	Phosphofructokinase	28
Phenyltransferase	Farnesyl diphosphate synthase	42
Mutase	Lanosterol synthase	21
Synthase	N-acetylneuraminic acid phosphate synthase	35
Ligase	Glycogen synthase 2	35
<i>Transport and/or cargo protein</i>		
	Cadherin 17	33
	Sterol-C4-methyl oxidase	6
	28 kDa-1e apolipoprotein	41
	Apolipoprotein C II	50
<i>Yolk protein</i>		
	Vitellogenin isoform precursor 1	9
	Vitellogenin isoform precursor 2	5
	Vitellogenin isoform precursor 3	25
<i>Signal transduction or cell communication</i>		
	RAB1A, member RAS oncogene family	35
	Protein tyrosine kinase	31
	Tyrosine kinase 2	33
<i>Transcription regulation protein</i>		
	CCAAT/enhancer-binding protein	49
	Bromodomain-containing protein	27
<i>Immune response</i>		
	MHC class II alpha chain	32
	MHC class I antigen	35
	Macrophage maturation-associated protein	30
	Dendritic cell nuclear protein	29
<i>Protein metabolism</i>		
	Coagulation factor V	35
<i>Ribosomal protein related</i>		
	Surf4	41
	Ribosomal associated membrane protein	33
	Laminin receptor 1	39
	Ribosomal protein L3	36
	60S Ribosomal protein L10A	51
<i>Others</i>		
	Sorting nexin	35
	DNA topoisomerase I	45
	Tubulin alpha 6	41
	Cold inducible RNA binding protein	39
	Collin	36
<i>Unknown</i>		
Hypothetical ^a	12 genes	3~27
Weak homology ^b	21 genes	11~50
No match ^c	4 genes	35~50

^aSignificantly matched but protein function has not been clarified yet

^bWeak similarity with e-value higher than 10^{-10}

^cNo hit from BLASTx search against GenBank

에서 유의적인 발현 감소를 나타내었는데 이는 미꾸라지의 인공성숙 유도가 25~26°C 이상의 고수온에서는

효과적이지 못한 *in vivo* 실험 결과와 일치하고 있다 (unpublished data). 뿐만 아니라 틸라피아 (*Oreochromis*

mossambicus) 간세포 배양 (hepatocyte primary culture) 에서 특정 온도 이상의 고온 조건에서 vitellogenin의 합성이 감소되고 eelpout (*Zoarces viviparous*) 수컷에서는 50 kDa vitellogenin의 발현이 수온과 완전히 반비례 함이 보고 되어 본 연구결과와 유사하였다 (Larsson *et al.*, 2002; Kim and Takemura, 2003).

4) 세포 신호전달, 면역관련 및 응집인자 V 유전자
세포 신호전달, 전사 발현 조절 단백질 및 면역관련 단백질 등에서 총 9개 유전자들의 mRNA 수준이 고온에서 유의적으로 감소하였으나, 이들 각 유전자의 기능과 온도와의 정확한 상관관계는 아직 알 수 없는 상태이다. Rab은 RAS oncogene family에 속하는 단백질로서 골지체와 소포체에서 주로 작용하는 GTPase의 일종이며 motor protein-mediated transport 기능을 담당한다 (Deneka *et al.*, 2003; Jordens *et al.*, 2005). 그러나 아직 어류 Rab 유전자들의 자세한 기능에 대해서는 많은 연구가 되어있지 못한 실정이다. 한편 면역관련 유전자군의 경우 항원표현 (antigen presentation)에 중요한 역할을 하는 major histocompatibility (MHC) class I 및 II 모두에서, 그리고 수지상세포 핵 단백질 (dendritic cell nuclear protein)에서 유의적으로 전사발현이 감소하는 것으로 나타나 앞서 고온 노출 시 보체 (complement)들의 급격한 전사활성의 증가와 대조를 나타내었다 (Groothuis and Neefjes, 2005). 또한 고온 노출 시 대부분의 응집인자들 (factors II, IX, XI 및 fibrinogens)이 증가하는 반면 응집인자 V는 유의적으로 낮은 전사발현을 보임으로써, 특정 생리적 조건에서 인자별 서로 다른 반응 양상의 가능성을 나타내었다.

5) 리보솜 단백질관련 및 기타 유전자

고온에 적응한 변온동물의 경우 일반적으로 단백질 대사의 증가로 인한 번역 기구 (translational machinery), 즉 리보솜 복합체 성분들의 전사 활성화도 증가될 것으로 예상하였으나, 예상과는 달리 32°C에 노출된 어류의 경우, 분석된 모든 리보솜 단백질들의 발현이 23°C에 비해 같거나 대부분 감소 경향을 나타내었다. 그러나 아직 리보솜 단백질들의 온도별 발현을 조사는 거의 이루어지지 못한 실정으로서 향후 23°C부터 자세한 온도 구배의 설정을 이용하여 리보솜 단백질들의 발현에 있어 특정 임계 온도의 존재 여부를 분석할 필요가 있다. 한편 저온에 노출된 무지개 송어의 심장 조직에서 리보솜 단백질 등 번역 기구의 단백질들이 유의적으로 증가함이 보고된 바 있어 본 연구 결과를 간접적으로 뒷받침하고 있다. 이러한 현상은 변온동물인 어류가 저온 상태에서 노출되었을 경우 대사율의 감소에 대한 보상작

용 기작 (compensatory mechanism)의 일환인 것으로 여겨지고 있다 (Vornanen *et al.*, 2005).

그 외 기타 전사발현 감소가 관찰된 유전자들은 아직 그 기능이 정확하지 않은 sorting nexin, DNA 복제에 필수적인 topoisomerase I 및 세포골격기능의 tubulin을 암호화하고 있었다. 아울러 두 종류의 RNA 결합단백질인 cold inducible RNA binding protein 및 collin 전사체들이 고온 조건에서 유의적으로 감소하였으며 이 중 특히 cold inducible RNA binding protein (CIRBP)은 저온 (hypothermic) 상태에서 RNA의 안정성 보호와 적절한 번역 (translation) 유도 기능을 담당하는 RNA chaperone 단백질로 알려져 있으며, 일부 다른 생물학적 스트레스에도 반응하는 것으로 알려져 있다 (Pan *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2006).

본 연구를 통해 확보된 유전자 탐색 자료는 1) 본 어종의 유전자 발현 조절을 위한 외부 온도 조절 프로그램의 개발 뿐만 아니라 2) 여타 담수 온수성 어종 (양식 품종 또는 멸종위기종)의 인공 종묘생산 기술 개발시 친어의 성숙유도 및 종묘 사육을 위한 최적 사육온도 프로그램 개발, 그리고 3) 특정 생태환경에서의 계절별 온도 변화가 어류에 미치는 영향 평가 등에 유용한 기초자료로 사용될 수 있으리라 기대된다. 그러나 아직 본 연구를 통해 확보된 각 유전자들을 정밀한 스트레스 분자표지로 이용하기 위해서는 보다 심화된 생물정보 수집 및 유전자들간의 networking 정보 분석 연구가 뒤따라야만 한다. 아울러 다양한 온도구간별 전사 수준에서의 transcriptome 분석과 함께 proteome 및 어류의 생리학 적 표현형 (성장, 성숙도 및 생존율 등) 분석이 병행되어야 할 것이다.

적 요

우리나라 주요 담수 어종인 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)를 실험 모델로 이용하여 실험적으로 설정한 고온 노출 (32°C)에 특이적으로 반응하는 유전자들을 cDNA microarray 분석을 통해 탐색하였다. 미꾸라지 간 조직 expressed sequence tag (EST) 데이터베이스 분석을 통해 1,124개의 unigene들을 선별하여 제작한 cDNA microarray를 이용하여 23°C 및 32°C에 4주간 노출된 실험어의 간 (liver)조직의 전사 발현 양상을 3반복 분석하였다. 다양한 유전자군이 32°C 고온 노출에 전사 발현의 증감 또는 감소 양상을 보였으며 23°C에 비해 32°C군에서 2배 이상의 발현 증가를 보인 클론들은 총 93종류로서 에너지 대사, 단백질 대사, 면역/항산화 기능, 세

포골격 및 구조, 물질수송 및 세포 신호전달 등에 관여하는 단백질들을 암호화하는 유전자들이었고 최대 15배 이상의 전사발현이 관찰되었다. 반면 고온 노출군에서 유의적인 발현 감소(50% 이하)를 보인 유전자들(n=85) 역시 탐색되어 상기 단백질 분류군외에 vitellogenin 전구체들 및 리보솜 단백질류에서 특이적인 전사활성의 저하가 관찰되었고, vitellogenin 유전자에서 가장 많은 mRNA 수준의 감소가 관찰되었다.

사 사

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-041-F00047).

인 용 문 헌

- Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel and P. Agre. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 68 : 425~458.
- Boshra, H., J. Li and J.O. Sunyer. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20 : 239~262.
- Buda, C., I. Dey, N. Balogh, L.I. Horvath, K. Maderspach, M. Juhasz, Y.K. Yeo and T. Farkas. 1994. Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91 : 8234~8238.
- Catalfamo, M and P.A. Henkart. 2003. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.*, 15 : 522~527.
- Cho, Y.S., B.N. Choi, K.-H. Kim, S.K. Kim, D.S. Kim, I.C. Bang and Y.K. Nam. 2006. Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA during exposures to heavy metals in rockbream (*Oplegnatus fasciatus*). *Aquaculture*, 253 : 667~679.
- Deane, E.E. and N.Y. 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.
- Deneka, M., M. Neeft and P. van der Sluijs. 2003. Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 38 : 121~142.
- Dey, I., C. Buda, T. Wiik, J.E. Halver and T. Farkas. 1993. Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90 : 7498~7502.
- Farout, L. and B. Friguier. 2006. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxid. Redox Signal.*, 8 : 205~216.
- Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2 : 346~353.
- Fujita, T., M. Matsushita and Y. Endo. 2004. The lectin-complement pathway-its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.*, 198 : 185~202.
- Gerlach, G.F., L. Turay, K.T. Malik, J. Lida, A. Scutt and G. Goldspink. 1990. Mechanisms of temperature acclimation in the carp: a molecular biology approach. *Am. J. Physiol.*, 259 : 237~244.
- Gordon, C.J. and L.R. Leon. 2005. Thermal stress and the physiological response to environmental toxicants. *Rev. Environ. Health*, 20 : 235~263.
- Groothuis, T. and J. Neefjes. 2005. The ins and outs of intracellular peptides and antigen presentation by MHC class I molecules. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 300 : 127~148.
- Hanumanthaiah, R., K. Day and P. Jagadeeswaran. 2002. Comprehensive analysis of blood coagulation pathways in teleostei: evolution of coagulation factor genes and identification of zebrafish factor VIIi. *Blood Cells Mol. Dis.*, 29 : 57~68.
- Harari, P.M., D.J. Fuller and E.W. Gerner. 1989. Heat shock stimulates polyamine oxidation by two distinct mechanisms in mammalian cell cultures. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 16 : 451~457.
- Hasilowicz, T., N. Murai, S. Matsufuji and Y. Murakami. 2002. Regulation of ornithine decarboxylase by anti-zymes and antizyme inhibitor in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1578 : 21~28.
- Hazel, J.R. 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am. J. Physiol.*, 246 : 460~470.
- Heise, K., S. Puntarulo, M. Nikinmaa, D. Abele and H.O. Portner. 2006. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. *J. Exp. Biol.*, 209 : 353~363.
- Hwang, J.Y., T. Ohira, I. Hirono and T. Aoki. 2004. A pore-forming protein, perforin, from a non-mammalian organism, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, 56 : 360~367.
- Imai, H. and Y. Nakagawa. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol.*

- Med., 34 : 145~169.
- Jack, D.L. and M.W. Turner. 2003. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem. Soc. Trans.*, 31 : 753~757.
- Johnston, I.A. and J. Dunn. 1987. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 41 : 67~93.
- Jordens, I., M. Marsman, C. Kuijl and J. Neefjes. 2005. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic*, 6 : 1070~1077.
- Kim, B.H. and A. Takemura. 2003. Culture conditions affect induction of vitellogenin synthesis by estradiol-17 beta in primary cultures of tilapia hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 135 : 231~239.
- King, L.S., D. Kozono and P. Agre. 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5 : 687~698.
- Larsson, D.G., I. Mayer, S.J. Hyllner and L. Forlin. 2002. Seasonal variations of vitelline envelope proteins, vitellogenin, and sex steroids in male and female eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125 : 184~196.
- Lushchak, V.I. and T.V. Bagnyukova. 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, C 143 : 36~41.
- Malik, S. 2003. Transcriptional regulation of the apolipoprotein AI gene. *Front. Biosci.*, 8 : 360~368.
- Nam, Y.K. and D.S. Kim. 2002. Screening of potential stress-responsive and immune-related genes by expressed sequence tags in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *J. Fish Pathol.*, 15 : 83~92.
- Nikoskelainen, S., J. Lehtinen and E.M. Lilius. 2002. Bacteriolytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) complement. *Dev. Comp. Immunol.*, 26 : 797~804.
- Oakley, A.J. 2005. Glutathione transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15 : 716~723.
- Ogden, C.A. and K.B. Elkon. 2006. Role of complement and other innate immune mechanisms in the removal of apoptotic cells. *Curr. Dir. Autoimmun.*, 9 : 120~142.
- Ojima, N., M. Yamashita and S. Watabe. 2005. Comparative expression analysis of two paralogous Hsp70s in rainbow trout cells exposed to heat stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 1681 : 99~106.
- Pan, F., J. Zarate, A. Choudhury, R. Rupprecht and T.M. Bradley. 2004. Osmotic stress of salmon stimulates upregulation of a cold inducible RNA binding protein (CIRP) similar to that of mammals and amphibians. *Biochimie*, 86 : 451~461.
- Parihar, M.S., A.K. Dubey, T. Faveri and P. Prakash. 1996. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipids content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *J. Therm. Biol.*, 21 : 323~330.
- Pegg, A.E. 2006. Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* (in press)
- Peng, Y., P.H. Yang, J.A. Tanner, J.D. Huang, M. Li, H.F. Lee, R.H. Xu, H.F. Kung and M.C. Lin. 2006. Cold-inducible RNA binding protein is required for the expression of adhesion molecules and embryonic cell movement in *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press).
- Rabergh, C.M., S. Airaksinen, A. Soitamo, H.V. Bjorklund, T. Johansson, M. Nikinmaa and L. Sistonen. 2000. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.*, 203 : 1817~1824.
- Robertson, J.C. and J.R. Hazel. 1995. Cholesterol content of trout plasma membranes varies with acclimation temperature. *Am. J. Physiol.*, 269 : 1113~1119.
- Rus, H., C. Cudrici and F. Niculescu. 2005. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol. Res.*, 33 : 103~112.
- Sawaguchi, S., H. Kagawa, N. Ohkubo, N. Hiramatsu, C.V. Sullivan and T. Matsubara T. 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, 73 : 719~736.
- Schipper, R.G. and A.A. Verhofstad. 2002. Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates. *J. Histochem. Cytochem.*, 50 : 1143~1160.
- Schulte, P.M., H.C. Glémet, A.A. Fiebig and D.A. Powers. 2000. Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: Role of a stress-responsive regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 : 6597~6602.
- Seelen, M.A., A. Roos and M.R. Daha. 2005. Role of complement in innate and autoimmunity. *J. Nephrol.*, 18 : 642~653.
- Siddiq, A., I.A. Ayoub, J.C. Chavez, L. Aminova, S. Shah, J.C. LaManna, S.M. Patton, J.R. Connor, R.A. Cherny, I. Volitakis, A.I. Bush, I. Langsetmo, T. Seeley, V. Gunzler and R.R. Ratan. 2005. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition-A target for neuroprotection in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 280 : 41732~41743.

- Vornanen, M., M. Hassinen, H. Koskinen and A. Krasnov. 2005. Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289 : 1177~1184.
- Weinstein, D.A., C.E. Correia, A.C. Saunders and J.I. Wolfsdorf. 2006. Hepatic glycogen synthase deficiency: an infrequently recognized cause of ketotic hypoglycemia. *Mol. Genet. Metab.*, 87 : 284~288.
- Zehmer, J.K. and J.R. Hazel. 2005. Thermally induced changes in lipid composition of raft and non-raft regions of hepatocyte plasma membranes of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 208 : 4283~4290.
- Zelko, I.N., T.J. Mariani and R.J. Folz. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 33 : 337~349.

Received : March 25, 2006

Accepted : May 15, 2006