

## 고온 스트레스에 대한 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*) 항산화 효소 유전자들의 발현 특징

조영선, 이상윤, 방인철<sup>1</sup>, 김동수, 남윤권\*  
부경대학교 양식학과/해양수산형질전환생물연구소  
<sup>1</sup>순천향대학교 해양생명공학과

### Transcriptional Response of Major Antioxidant Enzyme Genes to Heat Stress in Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*)

Young Sun Cho, Sang Yoon Lee, In Chul Bang<sup>1</sup>, Dong Soo Kim and Yoon Kwon Nam\*  
Department of Aquaculture & Institute of Marine Living Modified Organisms (iMLMO),  
Pukyong National University (PKNU), Busan 608-737, Korea  
<sup>1</sup>Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan, 336-745, Korea

Expression of major antioxidant enzyme (AOE) including Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and 3 glutathione peroxidase isotypes (GPXs) at mRNA levels during heat stress was examined in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) liver. Based on the semi-quantitative RT-PCR, real-time RT-PCR and/or northern dot blot hybridization, the antioxidant enzyme genes were generally up-regulated during elevation of water temperature from 23°C up to 32°C. GPXs and SOD displayed the most significant elevation of mRNA levels (up to 3 and 2 folds, respectively) while CAT showed the steady-state expression irrespective of thermal conditions. GST represented the relatively moderate response (1.3-fold increase) in its transcription to thermal stress. The transcriptional activation of AOE genes was not significant at the treatment temperature lower than 29°C. Increased mRNA levels of GPX (extracellular form) and SOD genes in the fish exposed to 32°C was readily detectable 1 day after exposure to heat stress.

**Keywords:** Antioxidant enzyme genes, Gene expression, Heat stress, Mud loach

### 서 론

활성 산소(reactive oxygen)의 발생으로 인한 산화성 스트레스(oxidative stress)는 호흡을 통해 세포 에너지를 확보하는 모든 생체에서 필연적으로 야기되는 생물학적 스트레스이다. 그러나 외부 자극 등에 의해 유발되는 과도한 산화성 스트레스는 생체의 원활한 대사에 큰 장애요인으로 작용하며, 특히 조절 범위를 넘어선 활성 산소들은 세포내 주요 물질인 핵산 및 단백질의 구조 변성과 기능 손실 등을 야기시킴으로써 노화촉진, 질병저항성 감소, 생식능력 저하 등 많은 생리학적 장애를 유발시킨다(Johnson, 2002; Pandey et al., 2003). 따라서 생체는 이러한 산화성 스트레스로부터 자신을 방어하기 위해 다양한 항산화계(antioxidant system)를 구축하고 있으며 이중 활성산소를 직접적으로 제거하기 위한 항산화 효소(antioxidant enzymes)들

을 발현 시킴으로써 그 주된 생체방어 기능을 담당토록 하고 있다. 때문에 항산화 효소들은 생체가 처한 생물학적 스트레스 상황을 표현하는 지표(biological stress index or biomarker)로서 많은 관심을 받고 있으며 아울러 이러한 항산화 효소 지표를 이용하여 환경의 오염 등을 조기에 검출하고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다(Klumpp et al., 2002).

최근 어류는 수중 생활을 하는 서식 특성으로 인해 육상동물보다 훨씬 민감한 항산화 효소 시스템을 보유하고 있음이 알려지기 시작하면서 어류를 이용한 독성 모델 및 환경 위해성 평가 도구 개발을 위한 연구들이 시도되고 있다(Whitfield and Elliott, 2002; Cho et al., 2005). 또한 변온동물(poikilotherms)인 어류는 외부 온도변화에 자신의 생체 온도를 적응하는 기작을 갖고 있으며 어류의 서식 또는 사육 온도의 변화는 어류 세포 내 유전자 발현에 직접적인 영향을 미치게 되고 이러한 온도 변화에 의한 유전자 발현율의 변화는 종종 어류의 생물학적 기능으로 표현된다. 그러나 외부의 급격한 온도 변화 또는 일정

\*Corresponding author: yoonknam@pknu.ac.kr

범위 이상의 고-저온에의 장기간 노출은 어류 세포 내 다양한 세포막 단백질들의 구조 변성은 물론 호흡을 포함한 많은 생화학 대사에 관여하는 효소들의 정상적인 활성을 저해하고 나아가 어류 세포 또는 조직 내 lipid peroxidation을 위시한 여러 산화성 스트레스 유발 인자로 작용할 수 있다(Parihar et al., 1996; Hwang and Lin., 2002). 따라서 온도 스트레스에 노출 시 항산화 기능 유전자들의 발현 변화에 관한 정보 수집은 수온의 변화에 대한 양식 어류의 생리학적 스트레스 반응을 이해하는 데 중요한 자료를 제공할 수 있다(Chen et al., 2003; Heise et al., 2006).

본 연구는 우리나라 주요 담수 어종인 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)를 ecotoxicogenomic model 실험 모델 어류로 개발하기 위한 연구의 일환으로 실험적으로 설정된 수온 변화에 대한 항산화 유전자의 발현 특징을 분석함으로써 온도 변화에 의해 야기되는 세포내 산화성 스트레스의 정밀 검출 기술을 개발하고자 하였다. 본 연구의 실험동물인 미꾸라지는 비교적 소형의 성체 크기, 연중 다산란 기술(induced multiple spawning)의 확립 및 전 생활사(whole life cycle)의 용이한 실험실 관리 등 실험 모델어류로서 많은 장점을 갖고 있을 뿐만 아니라 염색체 공학, 유전자도입, dbEST에 관한 많은 분석/조작 기술들이 정착되어 있다(Nam, 2006). 이에 본 연구에서는 미꾸라지 간 조직으로부터 확립되어 있는 expressed sequence tag 데이터베이스(Nam and Kim, 2002) 분석을 통해 주요 항산화 기능 유전자들과 internal 대조군 유전자들을 선정, 이들의 transcript들을 정량화할 수 있는 조건을 개발하고, 다양한 온도 구간에 노출된 실험어에서 항산화 효소 유전자들의 mRNA 발현 증감을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

본 연구에 사용한 실험어 미꾸라지는 부경대학교 양식학과 유전자원공학 연구실 및 부경대학교 해양수산형질전환생물연구소(Institute of Marine Living Modified Organism; iMLMO)에서 유지하던 친어군으로부터 인공산란 유도를 통해 생산된 부화 5개월 된 개체들을 이용하였다. 온도 자극실험에 사용된 개체들은 어체중 평균 11 g 내외의 어류들을 이용하였다.

### 항산화 유전자 및 internal control 유전자

본 연구를 위해 사용된 항산화 유전자들은 superoxide dismutase (SOD; Cu/Zn type), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST; class mu), extracellular plasma glutathione peroxidase (GPX-ex), cytoplasmic glutathione peroxidase (GPX-cy; alpha class) 및 phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PH-GPX)로서 이들 염기서열들은 모두 미꾸라지 간 조직을 대상으로 구축된 expressed sequence tag database (ML dbEST)의 분석을 통해 확보된 유전자의 단편이었다(see also Nam and Kim, 2002).

Redundancy 및 contig 분석을 통해 각 항산화 유전자 단편들의 assembly를 수행하였으며 가장 긴 염기서열 길이를 갖는 contig를 대상으로 NCBI GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLASTx search를 통해 항산화 유전자 기능의 annotation을 재확인한 후 e-value < 10<sup>-50</sup> 이상인 contig만을 대상으로 재선발을 수행하였다. 선발된 염기서열을 대상으로 다양한 길이의 영역별로 RT-PCR 및 probe 제작용 oligonucleotide를 제작한 후 미꾸라지 간 조직 total RNA를 이용한 예비 RT-PCR 실험을 통해 1차 평가한 후 primer들을 최종 선발하였다(data not shown). 아울러 mRNA 정량 실험의 normalization을 위한 internal control 유전자를 확보하기 위해 역시 미꾸라지 EST 데이터베이스로부터 internal control로 사용 가능할 것으로 예상되는 beta-actin ( $\beta$ -ACT), elongation factor alpha (EF- $\alpha$ ) 및 glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자들을 상기와 유사한 방법으로 선발하였으며, 아울러 degeneracy primer를 이용하여 확보한 미꾸라지 18S rRNA 염기서열을 대상으로 예비 평가실험을 실시한 후 가장 안정적인 internal control을 선발, 정량화 실험에 이용하였다. 최종 유전자 발현 분석에 이용된 oligonucleotide primer들의 정보는 Table 1에 나타내었다.

### 고온 자극 실험-I

실험어들이 장기간 고온에 노출되었을 때 항산화 효소 유전자의 발현 양상을 1차 분석하였다. 사육온도 20~23°C에서 유지하던 미꾸라지 개체들을 대상으로 어체중 11 g 내외의 개체들을 선발하였으며 고온 자극에 노출시키기 전 실험 수조에 순응시키기 위해서 50 L 순환 여과식 수조 6개(온도구 당 3반복)를 설치한 후 각 수조에 12미씩을 수용하고 2주간의 순응 기간을 설정하였다. 순응 기간 동안 수온을 23°C로 유지하였으며 잉어 상품 사료(우성사료, 대한민국)를 6회/일 만복 공급하였고 매일 20%씩 환수하였다. 순응기간이 완료된 시점에 3개 수조는 계속 23°C를 유지하였으며 나머지 3개 수조는 시간당 3°C씩 상승시켜 32°C에 도달토록 하였다. 고온(32°C) 조건에 도달한 후 4주간 분 온도 조건을 유지하였고 이때 온도 편차는  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  이내로 유지하였다. 고온 자극을 수행하는 동안에도 역시 일일 6회 잉어 상품사료를 공급하였고 여타 사육조건은 상기와 동일하게 유지하였다. 4주간의 온도 처리가 완료되면 각 수조로부터 6미씩을 무작위로 선발한 후 해부학적 기법을 통해 간(liver)조직을 적출하였다. 적출된 조직은 제조사의 방법에 의거 RNAlater (Ambion, USA) 처리를 수행한 후 처리된 조직은 -85°C 초저온 냉동고에 분석 시까지 보관하였다.

### 고온 자극 실험-II

상기 1차 실험 결과를 바탕으로 32°C까지의 온도 범위를 몇 개의 구간으로 나누어 항산화 효소 유전자 발현의 반응 경향을 분석하였다. 앞서와 같이 23°C에 유지하고 있던 실험어들을 대상으로 역시 50 L 실험 수조를 설치하고 23, 26, 29 및 32°C 온

**Table 1.** A list of primers used in the present study for RT-PCR analysis

Target gene	Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	Length (bp)	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
sod	mSOD-4F	GTAACGTGAAAGCAGGTGCT	20	51.7	217
	mSOD-3R	TTTGGGCTTCACTGGGTGAT	20	56.4	
cat	mCAT-3F	CTGAAAGACGCTCAGCTGTT	20	51.9	377
	mCAT-1R	GGCCTCAAACAGGTTAGATG	20	51.0	
gst	mGST-2F	AACGGGTGAGGGTTGACATCT	21	56.8	283
	mGST-1R	AAGCGATCCATAAAGCACCG	20	56.4	
gpx isoform 01	mGPXcy-1F	GCGTCACTTTGAGGTACAAC	20	49.3	267
	mGPXcy-1R	GGGCAGCTTCTCTTTGAGGA	20	55.6	
gpx isoform 02	mPHGPX-1F	GCCCAAATCAAGGAATTCGC	20	58.0	295
	mPHGPX-1R	GCCAGAGTTGGGTCATTTGA	20	54.5	
gpx isoform 03	mGPXex-1F	ATGTTTCGTCCAGGCAATGGA	20	57.2	249
	mGPXex-1R	TTACTCTGGCAAACACCTC	20	51.4	
β-act	mACT-2F	CACAGATCATGTTTCGAGACC	20	49.6	313
	mACT-1R	TCGAAGTCCAGGGCAACATA	20	55.2	
gapdh	mGAPDH 2F	CTTACTGGTATGGCCTCCG	20	53.6	325
	mGAPDH 2R	ACTCCTTGGAGGCCATGTGT	20	55.4	
ef-α	mEF-α 2F	GCCACTTCAGGATGTCTACA	20	49.5	379
	mEF-α 1R	CTCAGCAAACCTGCAGGCAA	20	56.2	
18S rRNA	18S-1F	GGGGAGGTAGTGACGAAAAA	20	52.9	360
	18S-1R	CCTAGCTGAGATATTCAGGC	20	48.1	

Abbreviations for gene names can be referred to materials and methods.

도 조건을 설정하였으며 수조 당 10마씩을 수용하였다. 온도 증가 전 23°C 2주간의 예비 사육기간을 설정하였고 실험어의 관리는 상기와 동일하게 하였다. 목적 온도에 도달시키기 위해 시간당 3°C씩 사육 수온을 증가시켰으며 온도가 도달하면 7일간 해당 온도를 유지하였다. 각 온도구별 2반복 실험 수조를 설정하였으며 분석을 위해 각 반복구로부터 4마씩을 무작위로 선발하여 상기와 같이 조직을 적출하여 보관하였다.

### 고온 자극 실험-III

상기 실험 결과들을 바탕으로 가장 많은 유전자 발현 변화를 보이는 항산화 효소 유전자 2종을 선발하여 다시 32°C 온도자극을 자극 실험-I과 같이 실시하였다. 그러나 본 실험처리에서는 32°C 온도 조건에 도달 후 1, 3, 5 및 7일째 각 반복구로부터 3마씩을 무작위로 선발, 유전자 발현 분석을 실시함으로써 본 항산화 효소의 고온 자극에 대한 유전자 발현의 조기 검출 시점을 분석하고자 하였다. 그 외 실험 조건은 모두 상기와 동일하게 설정하여 실험을 수행하였다.

### RNA 분리

적출된 미꾸라지 간 조직을 대상으로 total RNA를 분리하였다. RNA분리를 위해 간 조직 30 mg을 이용하여 간단한 homogenization을 수행하고 균질화된 조직 시료로부터 TriPure Reagent (Roche Applied Science, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 모든 분리 과정은 제조사의 방법에 의거하여 실시하였으며 1차 분리된 total RNA 분획을 이용, MOPS agarose

전기영동을 통해 28S rRNA 및 18S rRNA bands의 intensity ratio를 분석하였다. 28S : 18S ratio가 최소 1.6 이상 되는 시료들만을 선발하였으며 선발된 시료들 내 오염되어 있는 DNA들을 제거하기 위해 RNase-free DNase I (Roche)을 10 U/mg RNA의 농도로 37°C에서 20분간 처리하였다. DNase처리가 완료되면 DNase를 불활성화시키기 위해 75°C에서 15분간 방치하였으며 본 DNase 처리 시료들을 대상으로 다시 RNA integrity를 전기영동을 통해 확인하였다.

### Northern dot blot 분석

Northern dot hybridization을 수행하기 위해 상기 DNase가 처리된 RNA들을 1 µg/µl의 농도로 조정된 후 1 µl씩 positively charged nylon membrane (Roche)에 3반복 spotting을 수행하였다. Membrane의 처리 후 fixation, prehybridization, hybridization, stringent washing 및 signal detection에 걸친 전 과정은 DIG Non-Radioactive DNA Labeling and Detection Kit (Roche)의 manual에 의거하여 수행하였다. 검출된 spot signal은 Gel Doc XR Image Analysis System (BioRad, USA)과 이미지 분석 프로그램 Quantity-One을 이용하여 분석을 실시하였다. 목적 유전자들의 분석과 아울러 normalization을 위해 internal control 유전자와의 hybridization을 동일 membrane을 대상으로 수행하였다(Cho et al., 2006).

### Semi-quantitative RT-PCR 및 real-time PCR 분석

Direct RT-PCR 방법을 이용한 정량 분석을 위해 조직으로부터

터 분리된 total RNA를 GeneQuant를 이용하여 농도측정을 하고 모든 sample의 농도가 100 ng/μl가 되도록 조정하였다. 동일 농도(100 ng/μl)로 맞춰진 total RNA 2 μl를 대상으로 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. AccuPower RT-PCR PreMix kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 제조사의 manual대로 시료를 혼합하고 42°C에서 60분간 역전사(reverse transcription) 반응 후 곧바로 PCR cycling을 수행하였다. PCR 반응은 Bio-Rad iCycler PCR machine을 이용하여 94°C에서 4분간 initial denaturation step을 1차례 수행한 후 94°C 45초, 58°C 45초 및 72°C 1분의 순환 반응을 반복하였다. 순환 반응의 반복 횟수는 예비실험 결과를 바탕으로 internal control로 사용한 유전자들의 경우 20회, target gene의 경우 22~30회로 수행하였다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 8 μl씩 전기영동하여 상기와 같이 Gel Doc XR Image Analysis System의 Quantity-One software (BioRad)를 이용하여 분석 하였다.

조직으로부터 분리된 total RNA 1 μg과 Oligo dT<sub>18</sub> (100 pmoles)을 섞어 70°C에서 5분간 방치한 후 AccuPower RT PreMix (Bioneer)를 이용하여 42°C에서 60분간 역전사 반응을 수행하였다. 사용한 역전사 효소를 불활성화 시키기 위해 반응물을 94°C에서 5분간 가열하였다. 합성된 cDNA 3 μl를 template로 사용하고 2×SYBR Green PCR Ready-Mix (Bio-Rad) 및 primer (3 pmoles each)를 혼합하여 PCR 반응(reaction volume = 50 μl)을 수행하였다. PCR 반응은 BioRad사의 real-time detection용 optic module이 장착되어 있는 iQ Real-Time PCR Detection System을 이용하여 수행하였고 이때 열순환 반응은 94°C에서 2분간 최초 변성 반응 후에 94°C 30초, 58°C 30초 및 72°C 45초의 순환반응을 40회 반복하였다. 각 cycle이 진행될때 마다 relative fluorescence unit의 변화 정보를 수집함으로써 각 반응구의 calculated threshold cycle (Ct) 값을 결정하여 상대 정량을 수행하였다. 각 유전자 별로 3반복 실험의 평균값을 이용하였다 (Cho et al., 2006).

## 결과 및 고찰

### 실험어의 생존율

대조군을 포함한 모든 고온 자극 실험군에서 폐사 개체는 관찰되지 않았고 단 32°C 4주간 노출군에서 1마리의 개체가 3주째 폐사하였다. 그러나 본 폐사 개체 역시 고온 노출이 폐사의 직접적인 원인은 아닌 것으로 판단되었으며 각 온도 설정구 모두에서 외관상 특이적인 어체의 변화는 관찰되지 않았다.

### Normalization을 위한 internal control 유전자의 평가 및 선발

PCR (semi-quantitative direct RT-PCR 및 in-direct real-time PCR) 정량화 실험의 normalization을 수행하기 위해 예비 선발한 유전자들 중 가장 개체간 편차가 적고 또한 온도 자극에 반응하지 않는 유전자를 선발하기 위해서 32°C 4주간 노출된 개

체들을 대상으로 internal control 유전자들의 평가를 실시하였다. 1차 선발된 β-actin, GAPDH, EF-α 및 18S rRNA를 대상으로 Table 1에 표시된 oligonucleotide primer를 이용하여 23°C 및 32°C에 노출된 실험어 각 6미씩을 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 역전사 반응 후 예비실험으로서 유전자 별로 14~26 cycles을 수행하였고 input total RNA의 양은 50~300 ng으로 조절하여 발현 안정성을 조사하였다(data not shown). 그 결과 GAPDH의 경우 개체간 편차는 비교적 적은 편이지만 본 실험 조건인 온도 인자에 반응하는 것으로 나타나 23°C 보다 32°C에 노출된 개체들에서 유전자 발현의 증가가 Et-Br stained gel signal 분석 결과를 기준으로 최대 50%까지 관찰되어 본 유전자는 미꾸라지에서 온도를 변수로 하는 유전자 발현 정량실험에는 사용할 수 없는 것으로 나타났다. 또한 β-actin의 경우 온도 증가에 따른 유전자 발현 증가가 GAPDH처럼 유의적이지는 않지만 일부 개체에서 유전자 유도 발현이 관찰되고 개체간 편차가 심한 것으로 나타나 역시 효과적인 normalization에는 사용할 수 없는 것으로 판단되었다. EF-α의 경우 고온에서 개체간 편차가 일부 관찰되었으나 그 정도가 앞서 다른 두 유전자들에 비해 훨씬 낮은 경향을 나타내었다. 반면 18S rRNA의 경우 가장 일정한 유전자 발현 양상을 나타내어 input RNA μg당 목적 유전자 mRNA의 정량적 검출에는 가장 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 1). 이에 본 예비 실험 결과 미꾸라지 18S rRNA primer를 이용시 100 ng의 total RNA를 이용 역전사 반응 후 94°C 30초, 58°C 30초 및 72°C 45초의 20 cycle의 순환반응이 가장 안정적인 조건인 것으로 나타났다.

본 연구 결과에서 보듯이 internal control 유전자의 선정은

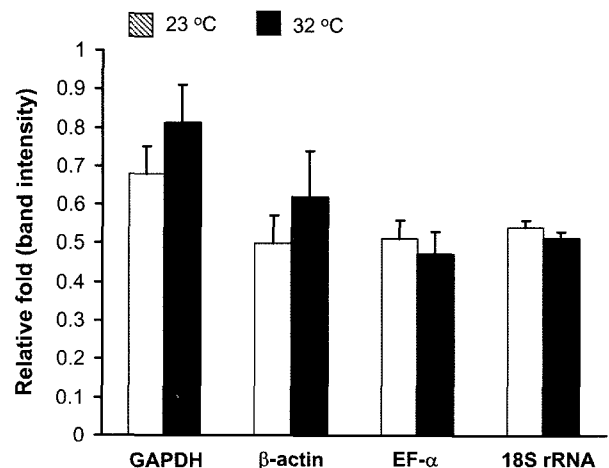


Fig. 1. Histograms showing differential expression of internal control genes in mud loach under two different water temperatures (23°C and 32°C). Intensity of RT-PCR bands relative to 18S rRNA bands were analyzed using Quantity-One image analysis software (BioRad, USA). Standard deviations were indicated by T bars. No statistical difference was detected in none of control gene transcripts based on student's t-test at P=0.05, however, it should be noted that relatively larger variations were observed in GAPDH and β-actin genes than in EF-α and 18S rRNA genes.

유전자 발현 정량화 실험에 가장 중요한 요인 중의 하나이며 각 internal control 유전자는 실험 자극 인자별로 신중한 사전 평가가 있어야만 함을 잘 나타내고 있다(Chen et al., 2006). GAPDH (E.C. 1.2.1.12)의 경우 D-glyceraldehyde 3-phosphate의 인산화를 통해 NADH를 생성하는 housekeeping 효소로서 다양한 어류 조직에서 발현하는 것으로 알려져 있다. 본 유전자는 서로 다른 생리적 조건에 노출된 생체 내 특정 유전자의 differential expression을 조사하기 위한 internal control 유전자로 널리 이용되고 있으나(Gilsbach et al., 2006) 본 실험에서는 온도의 증가와 함께 발현율의 증가를 나타냄으로써 어류를 대상으로 온도를 변수로 한 유전자 발현 실험에서는 효과적인 internal control로 사용될 수 없는 것으로 나타났다. Energy pathway에 관여하는 본 효소의 경우 온도에 따라 단백질 활성의 변화가 있을 수 있음이 이미 보고된 바 있고(Marcinkowska et al., 1990) 또한 사용하는 조직의 종류 및 실험인자에 따라 GAPDH 유전자의 유의적인 mRNA 발현의 편차가 관찰됨에 따라 universal internal control로서 GAPDH의 범용에 대한 문제점이 제기된 바 있다(Deindl et al., 2002; Barber et al., 2005). Beta-actin은 세포의 cytoskeleton 기능을 담당하는 대표적인 housekeeping 단백질로서 유전자 발현 정량 실험에서 가장 널리 이용되는 normalizing control 유전자이다. 그러나 이 역시 본 연구의 온도 자극 조건에서 steady-state expression을 나타내지 못하였는데 이는 어류와 같이 변온동물의 경우 외부 온도 증가로 인해 고온에 노출되었을 시 생체를 구성하고 있는 세포들의 미세 골격의 변화(세포막의 fluidity 또는 extracellular matrix의 변화)등이 야기되었기 때문으로 판단되며 이러한 세포 골격의 변화에 대처하기 위해서 구조 단백질의 정상 변화 뿐만 아니라 단백질 발현을 조절을 위한 전사활성 변화 역시 야기되었을 것으로 여겨진다(Dey et al., 1993; Buda et al., 1994). 본 유전자는 종래의 많은 연구에서 가장 흔히 사용되는 internal control 유전자였음에도 불구하고 최근 들어  $\beta$ -actin 유전자가 척추동물의 발생단계별로 많은 발현 차이가 관찰되며 또한 transplant 조직 등에서는 사용이 불가능함이 보고되고 있어 internal control로서  $\beta$ -actin 유전자의 이용에 있어 실험별 신중한 예비 조사의 필요성을 잘 시사하고 있다(Jeong et al., 2005; Rodriguez-Mulero and Montanya, 2005). EF- $\alpha$ 는 translation 조절 기작을 담당하는 단백질의 한 isotype으로서 그 기능의 특성상 무수히 많은 조절 단백질들 및 tRNA synthase와 상호작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 경우 온도 자극에 대해 비교적 일정한 유전자 발현을 보이기는 하였으나 일부 개체에서 발현 변화를 나타내었다. 그러나 변온동물 EF- $\alpha$ 의 온도 반응 기작에 대해서는 아직 많은 정보가 수집되어 있지는 못한 실정이다. 본 연구결과 중 18S rRNA의 증폭이 가장 안정적인 결과를 나타내어 Deindl et al. (2002) 및 Rodriguez-Mulero and Montanya (2005)의 결과와 일치하였다. 18S rRNA는 상기 유전자들과는 달리 단백질을 합성하는 유전자가 아니며 특히 18S

rRNA를 이용할 경우 RNA 전기영동 gel상에서 1차 정량 평가가 가능하다는 장점이 있어 많은 연구들에서 유용하게 이용되고 있다. 그러나 본 ribosomal RNA의 경우 in-direct RT-PCR 분석에서는 oligo-d(T) primer를 이용하여 polyA(+) mRNA만을 대상으로 하는 cDNA 합성에서 제외된다는 점, 또한 목적 유전자의 messenger RNA에 비해 워낙 많은 양으로 세포당 존재하기 때문에 multiplex RT-PCR이 불편하다는 점 등 일부 보완의 필요성이 있다. 따라서 보다 정확하고 정밀한 정량적 평가를 위해서는 향후 18S rRNA control과 병행 또는 중복 사용할 수 있는 신규 internal control의 개발이 이루어져야 할 것이다.

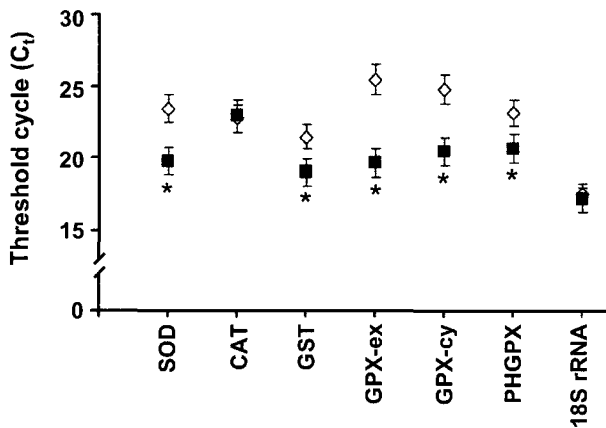
#### 고온에 노출된 실험어에서의 항산화 효소 유전자들의 전사 발현

고수온(32°C) 조건에 4주간 노출된 미꾸라지 실험개체들 간 조직에서의 항산화 기능 유전자의 발현은 semi-quantitative RT-PCR 분석을 기준으로 할 경우 대부분 up-regulation 형태를 나타냄으로써 고수온 조건이 광온성 어류인 미꾸라지에도 산화성 스트레스를 유발시킴을 알 수 있었다. 항산화 기능 pathway에 있어 서로 다른 역할을 담당하는 각 유전자들은 고온 스트레스에 서로 다른 수준의 발현을 증가를 나타내었는데 이중 GPX (isoform 3; extracellular plasma type)의 경우 가장 높은 증가 양상을 보여 3배 이상의 유도 발현 양상을 보인 반면 CAT의 경우 고수온 조건에 거의 반응하지 않는 일정한 mRNA 수준을 유지하였다. 그 외 다른 GPX isotype (isoform 1; cytoplasm type)가 2배의 발현량 증가를, 또 다른 GPX class로서 peroxidation-inhibiting protein인 phospholipid hydroxide glutathione peroxidase (PH-GPX; GPX isoform 2)의 경우 1.5배의 증가량을 나타내었다. 또한 활성산소 제거를 위한 항산화 scavenger enzyme인 SOD가 2배의 증가량을, 그리고 broad detoxification enzyme인 GST-mu의 경우 비교적 낮은 증가량인 1.3배의 증가를 나타내었다(Fig. 2). Direct semi-quantitative RT-PCR에서 관찰된 유전자 발현의 증가는 real-time PCR에서도 잘 반영되었으며 그 차이가 보다 크게 검출되어 'end-point' PCR에 비해 훨씬 우수한 정량 효과를 나타내었다. 그러나 본 real-time PCR 조건은 단순 threshold cycle 값을 기준으로 평가하였고 *in vitro* transcription에 의해 정량화된 표준 curve를 포함하지 않았으므로 직접적인 절대 정량치를 구할 수는 없었다(Fig. 3).

다양한 온도 구간별(23, 26, 29 및 32°C 7일간 노출) 항산화 효소 유전자 발현을 조사함으로써 온도 구간별 실험어에 야기된 산화성 스트레스를 조사한 결과 Fig. 3에서 보듯이 대부분 AOE 유전자들의 발현 증가는 RT-PCR과 northern blot hybridization 분석 모두에서 29°C 이상에서만 관찰되었고 CAT의 경우 모든 처리 온도 구간에서 유의적인 유전자 발현의 증감은 관찰되지 않았다(Fig. 4). 본 연구 결과 광온성 어류인 미꾸라지의 경우 29°C 이상에서 산화성 스트레스를 겪는 것으로 판단되었다. 아울러 상기의 두 실험 결과를 통해 고온 자극에 가장 많은 유전자 발현의 증가를 보이는 AOE 종류인 GPX

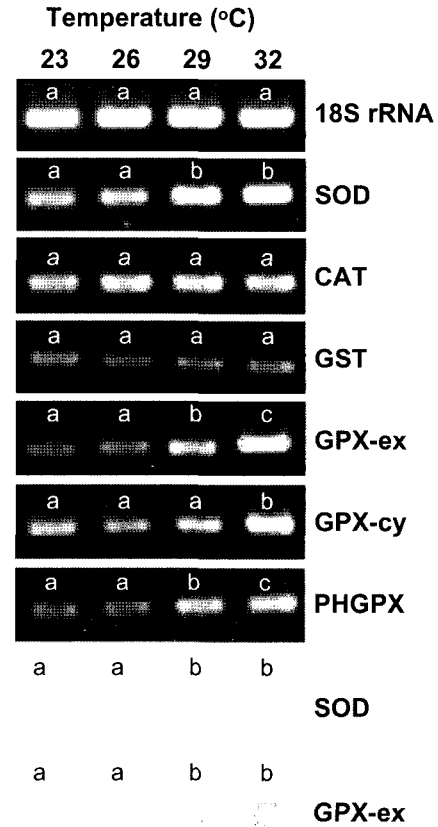


**Fig. 2.** Representative semi-quantitative RT-PCR gels showing up-regulated or steady-state expression of hepatic antioxidant enzyme genes in mud loach during exposure to heat stress. Relative folds of gene expression (mean±SD) in 32°C-treated group to 23°C-treated group were shown in parentheses. Asterisks indicate the significant elevation of mRNA levels in the fish exposed to 32°C as judged by student's t-test at P=0.05. Abbreviations for gene names can be referred to Materials and methods.



**Fig. 3.** Average threshold cycles in real-time PCR analysis of hepatic antioxidant enzyme gene transcripts in mud loach exposed to either 23°C (◇) or 32°C (■) for 4 weeks. Significant reduction of threshold cycles in 32-treated group was indicated by asterisks based on the student's t-test at P=0.05.

(extracellular form)와 SOD 유전자를 이용하여 32°C에 노출시킨 후 1일부터 7일까지 유전자 발현을 분석하였다. 그 결과 GPX 및 SOD 모두 자극 후 1일째부터 유전자 발현의 증가를 나타내었고 3일째 그 증가가 보다 심화되었으며 7일째는 3일째 관찰되었던 증가량이 유지되는 경향을 나타냄으로써 어류가 고온 스트레스에 노출되었을 때 산화성 스트레스의 축적이 급속도로 증가되며 아울러 항산화 효소의 유전자 발현율의 증가를 분석함으로써 본 스트레스를 조기에 검출할 수 있는 것으로 나



**Fig. 4.** Representative RT-PCR bands and northern blot hybridization dots showing the differential expression of antioxidant enzyme genes in mud loach liver during heat stress. Signals from amplified bands or hybridized dots were densitometrically imported into the image analysis software (Quantity-One; BioRad) to calculate the mean intensities from two replicate groups per temperature treatment. Signals of AOE genes were normalized against those of 18S rRNA internal control. Means showing no significant difference within each AOE gene were indicated with same letters on amplified bands or hybridized dots based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (P>0.05).

타났다(Fig. 5).

일반적인 서식온도의 범위를 넘어선 고온 조건에 어류가 장기적으로 노출되었을 때 외부 온도에 적응하기 위한 다양한 항상성 유지 반응이 나타나며 이러한 생리 반응은 종종 다양한 유전자들의 발현을 변화를 수반하게 된다(Buda et al., 1994). 고온에 노출된 어류의 세포 또는 조직 내에서는 효소활성, 일반 대사 및 호흡 등의 kinetics 변화뿐만 아니라 세포막 성분의 구조 및 기능 변화 등이 야기된다. 이러한 스트레스성 생리 변화는 생체내 활성산소(reactive oxygen; O<sup>2</sup>)의 효과적인 제어를 저해함으로써 어류의 다양한 조직내 산화성 스트레스(oxidative stress)를 유발시키게 된다(Heise et al., 2006). 본 연구에서 나타난 바와 같이 고온에 노출된 실험어로부터 다양한 항산화 효소의 유전자 발현이 유의적으로 증가함은 본 개체내 산화성 스트레스 유발을 직접적으로 시사하고 있으며 이미 여타 연구 결과에서 알려진 바와 같이 특정 스트레스 자극원(본 연구의 경

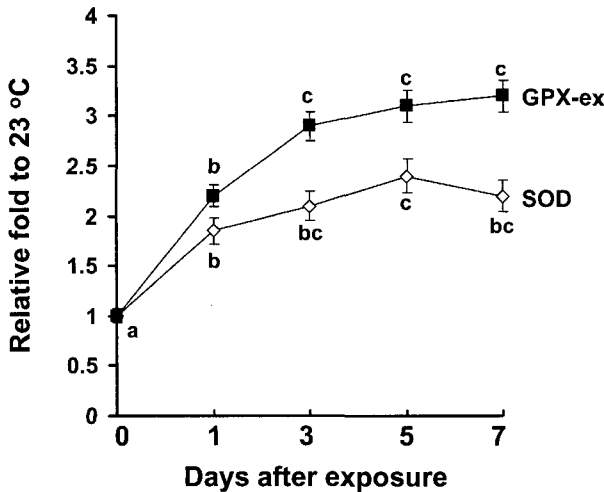


Fig. 5. Time course expression of superoxide dismutase ( $\diamond$ ) and extracellular glutathione peroxidase ( $\blacksquare$ ) genes in mud loach during exposure to high water temperature (32°C). Gene expression of 32°C-treated group relative to 23°C-treated group was estimated by semi-quantitative RT-PCR amplification followed by computer image analysis using Quantity-One software (BioRad). Means with same letters within a gene were not significantly different based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ( $P>0.05$ ).

우 고온 노출에 대해서 각 항산화 효소들은 서로 다른 발현 양상을 나타내었다(Lopes et al., 2001; Chen et al., 2006). 항산화 기능의 제 1단계를 담당하는 효소로 알려져 있는 SOD (E.C. 1.15.1.1)의 경우 활성산소와 결합하여 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 및  $O_2$ 를 형성하는 효소로서 본 연구의 2배에 달하는 SOD transcript의 증가는 23°C에 유지된 미꾸라지들 보다 고온(32°C)에 노출된 미꾸라지들에 대해서 많은 superoxide 분자들이 체내 생성되었음을 시사한다. 고온 스트레스에 의한 SOD 활성의 증가는 항온 동물인 포유류에서도 보고된 바 있어 본 연구결과와 일치하지만 또한 이러한 고온 스트레스에 대한 SOD의 발현이 개체의 age에 따라 다르게 나타날 수 있음 역시 보고된 바 있다(Bernabucci et al., 2002; Ozturk and Gumuslu, 2004). 그러나 SOD의 촉매에 의해 형성된  $H_2O_2$ 를 물 분자( $H_2O$ )로 전환하기 위한 CAT (E.C. 1.11.1.6;  $2 H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2 H_2O$ ) 유전자의 전사 발현은 거의 증가하지 않아 특정 스트레스 또는 자극원들(화합물 등)에 대해서 SOD-CAT이 유사한 활성 변화 양상을 보인다는 많은 선행 연구들과 차이를 나타내었다(see Pandey et al., 2003). 본 연구에서는 CAT 유전자 발현이 증가되지 않았지만 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )의 제거 기능을 담당하는 또 다른 항산화 효소인 GPX의 mRNA level이 유의적으로 증가함으로써 본 기능을 담당하였을 것으로 유추할 수 있다. Glutathione peroxidase는 크게 3종류로 구분될 수 있어 첫째  $2 glutathione + H_2O_2 \rightleftharpoons glutathione disulfide + 2 H_2O$ 의 기능을 세포질 내에서 담당하는 GPX 형태와 둘째 지질의 산화를 억제하는 phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase

( $2 glutathione + a lipid hydroperoxide \rightleftharpoons glutathione disulfide + lipid + 2 H_2O$ ), 그리고 셋째, 유사한 기능을 plasma내에서 수행하는 extracellular GPX isoform이 존재하는 것으로 알려져 있다(Imai and Nakagawa, 2003). 본 연구에서 3종류 GPX transcripts들 모두 유의적인 증가를 나타내었고 이는 SOD의 촉매에 의해 생성된 hydrogen peroxide 자체 그리고 생체막 지질 분자와 결합한 hydrogen peroxide를 물 분자로 전환시키기 위한 항산화 작용인 것으로 판단된다. 이에 미꾸라지의 경우 고온 스트레스로 인해 유발된 superoxide-hydrogen peroxide의 제거는 SOD-CAT system보다는 SOD-GPX system에 의해서 주로 담당하는 것으로 여겨진다.

본 연구 결과는 고수온 노출에 의한 산화성 스트레스의 유발은 실험어인 미꾸라지에서 노출 1일째부터 이미 급속도로 진행되며 이러한 산화성 스트레스 유발은 항산화 효소의 유전자 발현 증가를 측정함으로써 효과적으로 검출될 수 있음을 잘 보여주고 있다. 특히 nucleotide sequence 정보를 이용, mRNA 수준을 추적함으로써 각 AOE gene transcript들 뿐만 아니라 특정 AOE 내에서도 서로 다른 class 또는 isoform들(예컨대 GPX isoforms)을 각각 특이적으로 정량화할 수 있음을 잘 보여주고 있다. 따라서 종래 crude extract를 이용할 경우 다양한 isoforms들의 활성이 하나의 총 활성(total activity)으로 표현되는 'masking' 효과를 손쉽게 극복할 수 있었으며 이에 특정 자극원에 대한 서로 다른 AOE isoform들의 역할을 이해하는데 매우 유용할 것으로 판단된다(see Rhee et al., 2005; Cho et al., 2006). 그러나 mRNA 수준에서 나타난 발현률이 항상 단백질 수준으로 반영되는 것은 아니므로 후속 연구로서 AOE의 transcriptome과 proteome간 (또는 specific enzyme activity)의 상호 비교 연구가 뒤따라야 할 것이다. 또한 본 연구와 같이 chronic exposure 외에 급격한 온도 변화(acute exposure)에 대한 AOE 유전자 반응 자료 수집이 함께 이루어져야 할 것이다. 본 연구를 통해 얻어진 결과는 다양한 양식어류 또는 실험어류의 사육에 있어 온도 및 생체 스트레스에 관한 유전자 발현 연구뿐만 아니라 향후 본 실험모델 어종을 이용하여 항산화 유전자와 'non-enzymatic' 스트레스 지표 및 여타 생체 방어 유전자들간의 networking 연구에 유용한 기초자료를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

우리나라 주요 담수 어종인 미꾸라지를 ecotoxicogenomic 연구 모델 어류로 개발하기 위한 연구의 일환으로 본 어종이 고온 스트레스 자극에 노출되었을 때 야기되는 산화성 스트레스를 검출하고자 항산화 효소(antioxidant enzyme; AOE) 유전자의 발현 양상을 분석하였다. 주요 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) 및 glutathione peroxidases (GPXs)의 transcript들을 특이적으로 정량화할 수 있는 semi-quantitative RT-PCR, real-time PCR

또는 northern blot분석을 통해 23°C에서 32°C까지 설정된 실험어의 간 조직내 AOE 유전자들의 mRNA level을 분석하였다. 고온에 노출되었을 때 본 어종의 AOE들은 일반적으로 증가된 유전자 발현 양상을 나타내었고, 특히 SOD (2배)와 plasma GPX (3배) 유전자가 가장 유의적인 mRNA 증가를 나타내었다. GST의 경우 상대적으로 적은 증가량을 나타내었고 CAT의 경우 고온자극에 반응하지 않았다. 본 어종은 29°C 이상에서 AOE 유전자의 발현 증가를 나타내었고 32°C에 노출되었을 때 1일째부터 SOD와 plasma GPX mRNA의 증가가 관찰되었다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

- Barber, R. D., D. W. Harmer, R. A. Coleman and B. J. Clark, 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics*, 21, 389–395.
- Bernabucci, U., B. Ronchi, N. Lacetera and A. Nardone, 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J. Dairy Sci.*, 85, 2173–2179.
- 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.
- Chen, J., D. A. Rider and R. Ruan, 2006. Identification of valid housekeeping genes and antioxidant enzyme gene expression change in the aging rat liver. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 61, 20–27.
- Chen, R., R. Lochmann, A. Goodwin, K. Praveen, K. Dabrowski and K. J. Lee, 2003. Alternative complement activity and resistance to heat stress in golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*) are increased by dietary vitamin C levels in excess of requirements for prevention of deficiency signs. *J. Nutr.*, 133, 2281–2286.
- Cho, Y. S., B. N. Choi, E.-M. Ha, K. H. Kim, S. K. Kim, D. S. Kim and Y. K. Nam, 2005. Shark, *Scyliorhinus torazame* metallothionein: cDNA cloning, genomic sequence and expression analysis. *Mar. Biotechnol.*, 7, 350–362.
- 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.
- Deindl, E. K., Boengler, N. van Royen and W. Schaper, 2002. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Mol. Cell. Biochem.*, 236, 139–146.
- 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.
- Giltsbach, R., M. Kouta, H. Bonisch and M. Bruss, 2006. Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques*, 40, 173–177.
- 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 celpout *Zoarces viviparus* L. *J. Exp. Biol.*, 209, 353–363.
- Hwang, D.-F. and T.-K. Lin, 2002. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131, 1–7.
- 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.
- Jeong, Y. J., H. W. Choi, H.S. Shin, X. S. Cui, N. H. Kim, G. L. Gerton and J. H. Jun, 2005. Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 71, 284–289.
- Johnson, P., 2002. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C 133, 493–505.
- Klumpp, D.W., C. Humphrey, H. Huasheng and F. Tao, 2002. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish. *Mar. Poll. Bull.*, 44, 761–769.
- Lopes, P. A., T. Pinheiro, M. C. Santos, M da L. Mathias, M. J. Collares-Pereira and A. M. Viegas-Crespo, 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to in organic pollutants exposure. *Sci. Total Environ.*, 280, 153–163.
- Marcinkowska, A., R. Danielewicz R and M. Wolny, 1990. The effect of temperature on catalytic function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from muscle of pig and carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part B 97, 49–54.
- 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.
- Nam, Y.K., 2006. Tailoring of fish genome and transgenic manipulation as exemplified by mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Fish Genet. Breed. Sci.*, 35, 113–121.
- Ozturk, O. and S. Gumuslu, 2004. Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. *Life Sci.*, 75, 1551–1565.
- Pandey, S., S. Parvez, I. Sayeed, R. Haque, B. Bin-Hafeez and S. Raisuddin, 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.*, 309, 105–115.
- 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.
- Rhee, S. G., K. S. Yang, S. W. Kang, H. A. Woo and T. S. Chang, 2005. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid. Redox. Signal.*, 7, 619–626.
- Rodriguez-Mulero, S. and E. Montanya, 2005. Selection of a suitable internal control gene for expression studies in pancreatic islet grafts. *Transplantation*, 80, 650–652.
- Whitfield, A.K. and M. Elliott, 2002. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. *J. Fish Biol.*, 61, 229–250.
- 

원고접수 : 2006년 5월 4일

수정본 수리 : 2006년 7월 2일