

Apostichopus japonicas (Echinodermata; Holothuroidea)에서 온도 스트레스에 의한 Hsp90 및 Ferritin 유전자의 발현

김철원 · 진영국¹ · 김태익¹ · 정달상 · 강한승^{2,*}

한국농수산대학교, ¹국립수산과학원, ²엠에스바이오랩

The Expression of Hsp90 and Ferritin Genes under Thermal Stress in the Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

Chul Won Kim, Young Guk Jin¹, Tae Ik Kim¹, Dal Sang Jeong and Han Seung Kang^{2,*}

Department of Aquaculture, Korea National College of Agriculture and Fisheries,

Kongjwipatjwi-ro 1515, Wansan-gu, Jeonju, Jeollabuk-do 54874, Korea

¹Southwest Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Yeosu 59780, Korea

²MS BioLab, 49 Dongseo-daero 1730 beon-gil, Dong-gu, Daejeon 34574, Korea

Abstract - The *Apostichopus japonicus* is an important species in some Asia countries including Korea, China and Japan. The purpose of the present study was to investigate the differential gene expression of heat shock protein90 (Hsp90) and ferritin as a biomarker for the thermal stress during water temperature rising in the sea cucumber, *A. japonicus*. The *A. japonicus* (1.4 g) was cultured in incubator of separate temperature (15°C, 20°C, 25°C and 30°C) for each 0, 3, 6, 12, 24, 48 hours. The mRNA expression levels of Hsp90 and ferritin were examined using RT-PCR assay. Results showed that, the expression of Hsp90 mRNA was not significantly changed at 15°C. The expression of Hsp90 mRNA was significantly increased at high temperature such as 20°C and 25°C. Furthermore, Hsp90 mRNA was early increased at 25°C than 20°C. The ferritin mRNA was similar expression pattern with Hsp90. But, Hsp90 mRNA was more sensitive than ferritin mRNA at high thermal stress. These results indicate that Hsp90 and ferritin mRNAs were involved in the temperature changes response and may be play an important role in mediating the thermal stress in *A. japonicus*.

Key words : *Apostichopus japonicus*, Hsp90, ferritin, temperature, RT-PCR

서 론

우리나라 연안에서 포획되는 해삼(sea cucumber)은 참해삼이라 일컫는 돌기해삼(*Apostichopus japonicus*)으로 한국,

중국, 일본 및 러시아에 서식한다(Liao 1997). 우리나라에서 해삼의 생산은 잠수기 어업으로 자연산 해삼을 채취하여 생산하는데 연안어장의 환경변화에 의한 산란 및 서식장의 축소에 기인하여 생산량이 감소하는 추세이다. 이에 대한 대책으로 해삼자원의 증강을 위해 인공종묘생산기술의 개발을 통해 생산된 종묘의 방류 및 해삼 양식을 통한 생산량의 확대를 추진하고 있다. 그러나 해삼 양식은 기술력 부재와 기

* Corresponding author: Han Seung Kang, Tel. 042-632-9753,
Fax. 042-637-6844, E-mail. hanseungkang66@gmail.com

초생물학적 특성에 대한 연구 부족 등으로 많은 어려움을 겪고 있다.

해삼은 저온성 변온동물로서 다른 해양생물과 달리 여름 잠을 자는 독특한 생태생리적 습성을 지니고 있으며 수온에 의해 성장, 성숙 및 분포 등이 결정되고 있다. 해삼의 성장에 적합한 수온은 8~15°C이나 적응범위는 매우 넓어 견딜 수 있는 수온은 -2~30°C까지이며, 수온이 20°C 이상 상승하면 성숙한 개체들은 먹이섭취를 중단하고, 산소소비를 감소하며 하면기(aestivation stage)에 들어간다(Li *et al.* 1996; Liu *et al.* 1996; Yang *et al.* 2006).

수온은 생물의 생식 및 성장에 영향을 미치는 중요한 요인으로서 특히 해양생물은 수온변화에 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Logue *et al.* 1995). 해삼에서 수온 변화는 생리 및 생화학적 기작에 영향을 주어 성장 및 에너지대사에 영향을 미친다는 보고가 있다(Li *et al.* 2002; Yang *et al.* 2006; Dong *et al.* 2008). 또한 해삼에서 수온의 상승은 superoxide dismutase 및 catalase 등의 항산화효소의 증가를 유도한다는 보고가 있다(Wang *et al.* 2008). 열충격단백질인 heat shock protein (Hsp)은 스트레스 반응 단백질로서 온도, 염분 및 중금속 등의 환경요인에 의해 발현에 차이를 보이는 대표적인 유전자이며, 면역상태의 지표를 나타내는 유전자이다(Parsell and Lindquist 1993; Feder and Hofmann 1999; Kregel 2002; Fangue *et al.* 2006; Colinet *et al.* 2010; Xu and Qin 2012; You *et al.* 2013). Hsp는 분자량을 기준으로 Hsp110, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 및 저분자량 Hsp 등이 있다(Georgopoulos and Welch 1993; Parsell and Lindquist 1993; Feder and Hofmann 1999). 환경요인 스트레스에 의한 생리적 변화에 따른 유전자의 발현에 있어서 수온의 상승은 해삼에서 Hsp70 유전자의 발현을 증가한다는 보고가 있다(Dong *et al.* 2008). Hsp90은 세포분화 및 발생에 관여하며, 다양한 생물에서 스트레스 반응 시 단백질조절, 세포사(apoptosis)의 조절 및 신호전달에 관여한다(Jacob *et al.* 1995; Galea-Lauri *et al.* 1996; Imai and Yahara 2000; Richter and Buchner 2001; Soetaert *et al.* 2006; Wu and Chu 2008; Li *et al.* 2009).

Ferritin은 동물, 식물, 미생물 등의 대부분의 세포에 존재하는 단백질로서, 주요 기능은 세포 내 철분의 과잉에 따른 손상에 대비하며, 또한 철분 부족 시 capturing을 통한 철분의 보충 등 세포 내 철분의 항상성 조절을 한다(Theil 1987; Picard *et al.* 1996; Picard *et al.* 1998; Konijn *et al.* 1999; Kakhlon *et al.* 2001). 또한, 세포 내 중금속의 농도 수준이 높으면 중금속을 해독하여 항상성을 유지하는 기능이 있다(Harrison and Arosio 1996). 환경적요인중에 온도 변화에 기인한 세포 스트레스가 해삼 및 굴(*Crassostrea gigas*) 등의 무척

추동물에서 선천성 면역 반응을 변화시킬 수 있다는 보고가 있다(Gagnaire *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008). 온도 스트레스는 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하여 산화적 스트레스를 유도 함으로서 면역 및 대사에 영향을 미치는데 ferritin은 산화적 스트레스를 조절하는 기능이 있다는 보고가 있다(Tsuji *et al.* 2000). 이외에도 수생태생물인 갈따구(*Chironomus riparius*)를 이용하여 내분비계장애물질로 알려진 제초제 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)를 노출시켰을 때 ferritin 유전자의 발현이 증가함이 보고되어 ferritin이 내분비계장애물질 모니터링을 위한 생체지표유전자(biomarker gene)로서의 가능성을 제시한 보고도 있다(Park *et al.* 2010). 따라서 온도, 산화적 스트레스, 내분비계장애물질 및 중금속 등의 환경의 변화에 의한 ferritin의 발현 관찰은 세포 내 스트레스 정도를 평가하는 데 있어서 중요한 생체지표유전자로 판단된다.

본 연구는 수온의 변화가 해삼의 성장시기에 미치는 체내 스트레스 정도에 관한 연구의 일환으로 온도 스트레스 지표 유전자로 알려진 Hsp90과 ferritin 유전자의 발현 양상의 관찰을 통해 체내에 미치는 스트레스 정도를 조사하고자 한다. 본 연구를 통해 생성된 결과는 해삼양식에 있어서 적정 수온의 범위를 설정하는 데 중요한 기초자료가 되리라 생각된다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 해삼은 중량 약 1.4g 정도의 치삼으로 국립한국농수산대학교 생물사육장에서 사육한 생물이다. 수온에 따른 사육 조건은 15°C, 20°C, 25°C 및 30°C로 설정하였으며 한국농수산대학교 사육실에서 48시간 사육하였다. 사육을 위한 해수로는 멸균해수를 사용하였으며 사육용기로는 2L 유리소재 비이커를 사용하였다. 사육조건에 따라 온도가 설정된 다연실배양기(multi incubator)에 온도조건에 따라 사육용기를 3회 반복 실험수행과 동일시 시키기 위해서 각각 3개씩 설치하여 멸균해수의 수온을 맞춘 후 각각의 실험군 사육용기에 20마리의 치삼을 수용하여 사육하였다. 단기간인 2일간 즉 48시간 사육의 실험조건을 두었기에 사육용기에 해삼의 서식처를 위한 별도의 기질은 마련하지 않았다. 실험 기간 중 해수의 교환 및 먹이의 공급은 없었다. 사육중인 치삼은 0, 3, 6, 12, 24, 48시간 간격으로 각각의 실험군에 위치한 3개의 사육용기에서 각각 3개체씩을 수집하여 실험에 사용하였다. 대조군인 0시간의 실험개체는 각각의 실험군 온도에 노출시킨 후 즉시 사육용기에서 각각 2개체씩 총

6개체를 수집한 것을 대조군으로 사용하였다.

2. Total RNA 추출

Total RNA의 추출은 RNAiso Plus (TaKaRa Co.)시약 용액을 이용하여 추출하였다. Total RNA의 추출을 위해 사용한 조직은 치삼의 중앙부 몸통조직으로 내장 부분을 제거시킨 0.5 g 정도의 몸통 조직을 수집하여 사용하였다. 몸통조직은 식염수로 깨끗하게 세척 및 식염수를 제거한 다음, 액체질소에 침지시켰다. 침지시킨 조직은 마이크로 튜브에 넣은 후에 실험에 사용하기 전까지 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다. Total RNA의 추출은 제조사가 준비하고 제시한 방법에 따라 시행하였다. 추출한 total RNA는 역전사반응 (Reverse Transcription: RT)전까지 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다.

3. 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

Total RNA는 분광광도계 (NanoVue, GE Healthcare)를 이용하여 정량였다. cDNA합성을 위한 RT는 1 μg 의 total RNA, oligo(dT)₁₈(0.5 μg)와 AccuPower RT premix (Bioneer Co.)를 이용하여 최종 반응용액 20 μL 로 42°C 에서 1시간 수행하였다. 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction: PCR)은 RT를 통해 얻은 20 μL 의 cDNA 중에서 cDNA 1 μL 와 각각의 유전자 primer인 Hsp90 (Accession No: HQ689677.1, product size: 84 bp) forward (5'-TGGTGTGGCTTTTACTCTGCTT-3'), reverse (5'-CACCTGTAGCATTCGTCATCGT-3'), Ferritin (Accession No: JF796141.1, product size: 135 bp) forward (5'-CGATGATGTCGCCCTTCC-3'), reverse (5'-AGCCGTGATGTCCTTGAGC-3'), 내재표준유전자로 사용한 β -actin (Accession No: EU668024.1, product size: 157 bp) primer forward (5'-ACAGAGGCTCCATTCAACCC-3'), reverse (5'-CGTCTCCTGAGTCCATGACG-3') 및 AccuPower HotStart PCR premix (Bioneer Co.)를 이용하여 최종 반응용액 20 μL 로 시행하였다. 각 유전자의 RT-PCR 조건은 Hsp90 및 ferritin의 경우 pre-denaturation 95°C , 5분; denaturation, annealing, extension 각각 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초에서 28회; extension 72°C , 10분 수행하였다. 내재표준유전자 β -actin의 PCR 조건은 pre-denaturation 95°C , 5분; denaturation, annealing, extension 각각 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초, 25회; extension 72°C , 10분 수행하였다. RT-PCR은 3회 반복 수행하였다. PCR 산물은 ethidiumbromide (100 ng mL^{-1})가 포함된 2% NuSieve 3:1 (Lonza Co.) 아가로즈겔 전기영동을 통해 확인하였으며 band intensity는 Gel DocTM XR + System

(Bio-Rad)을 이용하여 분석하였다.

4. 통계학적 분석

대조군과 실험군과의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 비교하였으며, *p*가 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 수온 및 시간의 경과에 따른 치삼의 생존

치삼을 사육온도 15°C , 20°C 및 25°C 에서 48시간 사육하였을 때 개체는 100% 생존하였다. 그러나 30°C 에서 사육하였을 경우 사육중인 전 개체는 3시간 경과 시 20%, 6시간 경과 시 65% 및 12시간 경과 시 100% 폐사하였다. 따라서 Hsp90 및 ferritin 유전자 발현의 관찰은 수온 30°C 에서 사육한 개체에서의 연구결과는 생성시키지 못했다.

2. 수온 및 시간의 경과에 따른 Hsp90 유전자의 발현

치삼을 수온 15°C 에서 48시간 사육한 후에 시간의 경과에 따른 Hsp90 유전자 발현 양상을 살펴보았다. 연구결과 15°C 사육수온에 노출한 치삼들에서의 Hsp90 유전자 발현은 유의적 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 1). 15°C 에서 48시간 사

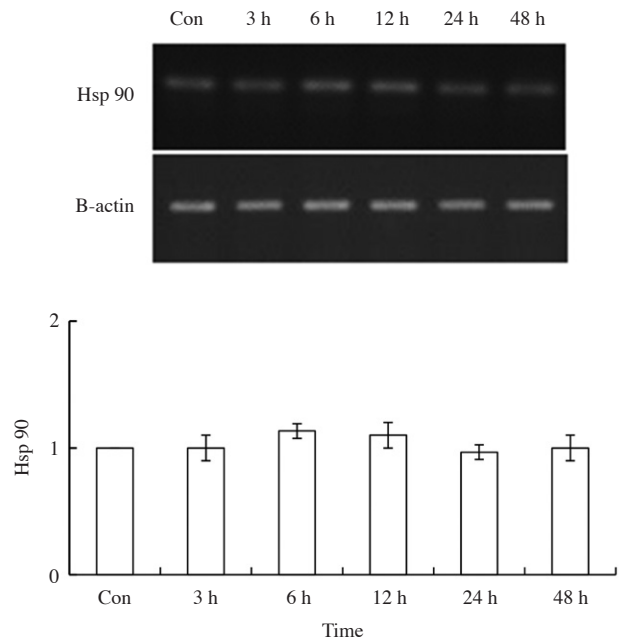


Fig. 1. The expression of Hsp90 in cultured *A. japonicas* at 15°C .

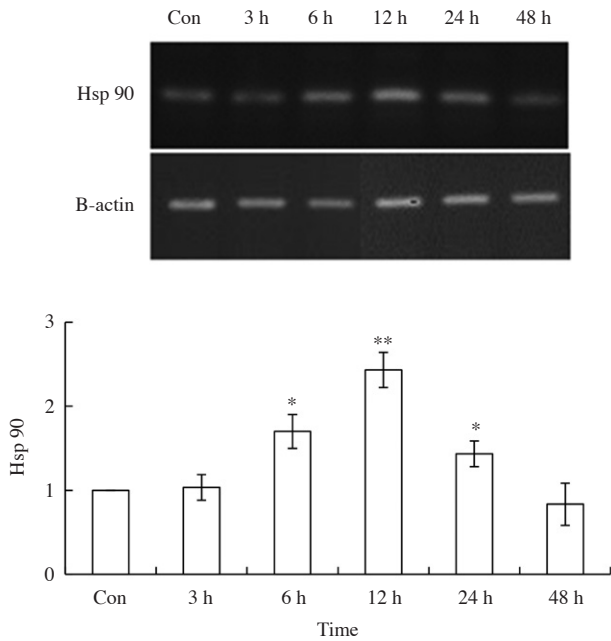


Fig. 2. The expression of Hsp90 in cultured *A. japonicas* at 20°C. *Significant different from vehicle control by Student-t test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

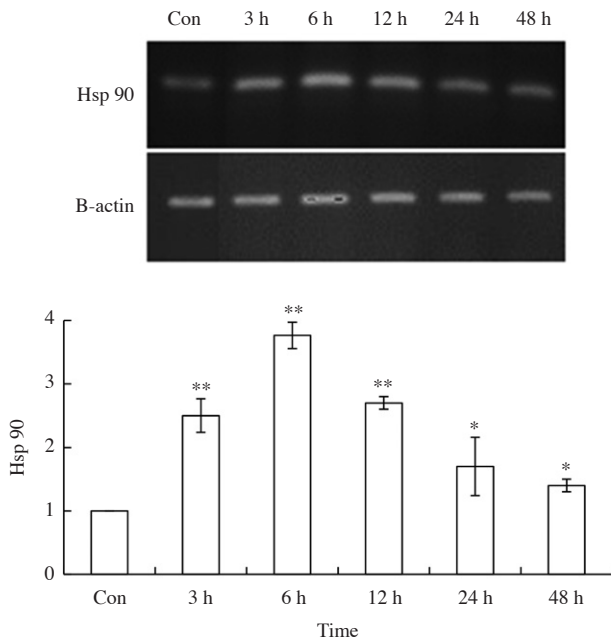


Fig. 3. The expression of Hsp90 in cultured *A. japonicas* at 25°C. *Significant different from vehicle control by Student-t test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

육한 치삼은 수온에 따른 스트레스는 받지 않는 것으로 판단된다.

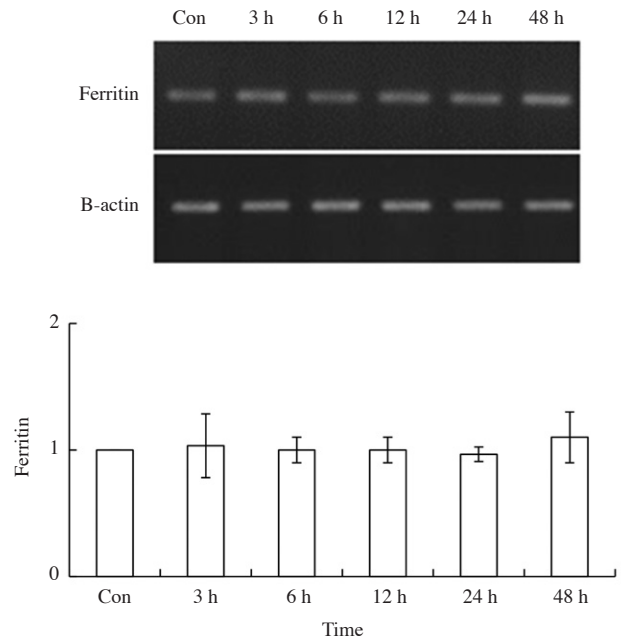


Fig. 4. The expression of ferritin in cultured *A. japonicas* at 15°C.

수온 20°C에서 48시간 사육한 치삼에서 Hsp90 유전자 발현은 대조군에 비하여 6시간 경과째부터 발현이 유의적으로 증가하기 시작하여, 12시간 경과째 가장 높은 발현 양상을 나타냈다. 그리고 24시간째부터 48시간째까지 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 2).

25°C 수온에서 사육한 치삼들에서 Hsp90 유전자 발현은 대조군 비교 3시간 경과째부터 유의적으로 증가하기 시작하여 6시간 경과째 가장 높은 발현 양상을 나타내다가 12시간 경과째부터 48시간째까지 유의적으로 감소하였다(Fig. 3).

3. 수온 및 시간의 경과에 따른 ferritin 유전자의 발현

치삼을 15°C 수온에서 48시간 사육한 후에 시간의 경과에 따라 ferritin 유전자 발현 양상을 살펴본 결과, 15°C 사육 수온에서 사육한 치삼에서 ferritin 유전자 발현은 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4). 사육수온 15°C는 치삼에게 환경적 온도 스트레스로 작용하지 않는 것으로 생각된다.

사육수온 20°C에서 48시간 사육한 치삼들을 대상으로 ferritin 유전자 발현 양상을 살펴본 결과 ferritin의 발현은 대조군에 비하여 48시간 경과째부터 유의적인 증가가 나타나기 시작하였다(Fig. 5).

25°C 수온에서 사육한 경우, ferritin 유전자의 발현은 대조군에 비하여 12시간 및 24시간 경과째부터 유의적인 증가가 나타나기 시작하여 48시간 경과째 가장 높은 발현 양상이 나타났다(Fig. 6).

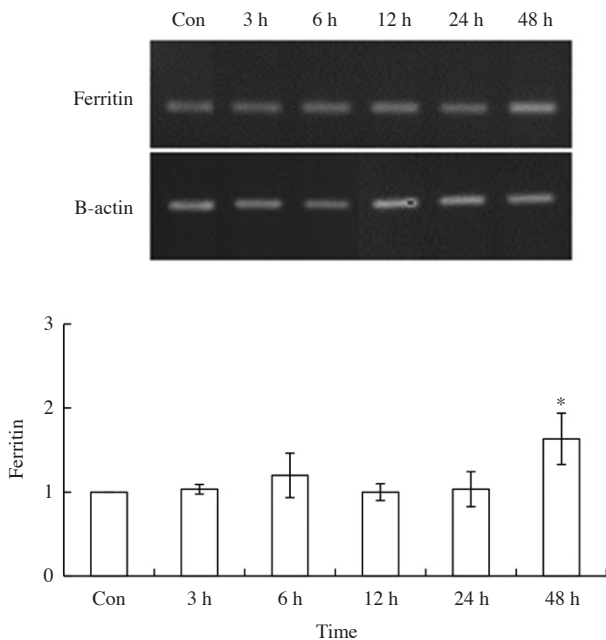


Fig. 5. The expression of ferritin in cultured *A. japonicas* at 20°C. *Significant different from vehicle control by Student-*t* test (**P*<0.05).

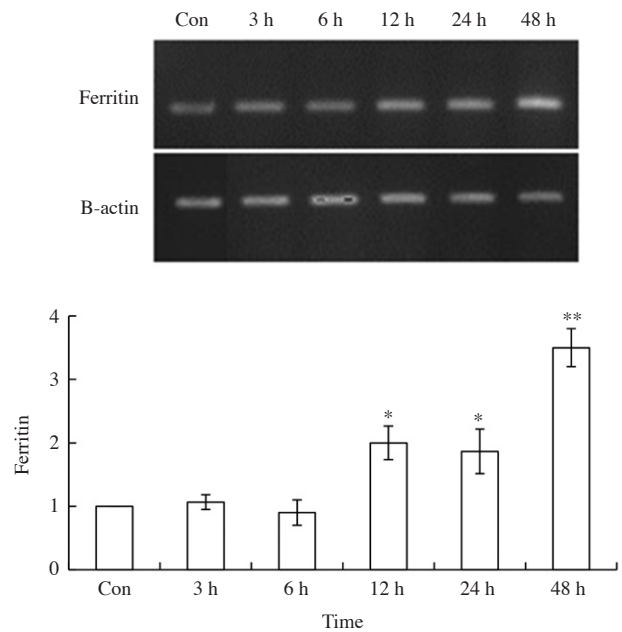


Fig. 6. The expression of ferritin in cultured *A. japonicas* at 25°C. *Significant different from vehicle control by Student-*t* test (**P*<0.05, ***P*<0.01).

고 찰

해삼의 생활주기는 보통 활동기, 하면전기, 하면기, 회복기로 나누어진다. 활동기에는 성장 및산란을 하고, 하면기에는 단식 및 활동을 멈춘 수면상태를 유지한다. 이렇게 생활주기가 구분되는 주요한 요인은 해수의 수온이다. 수온이 6~12°C인 시기는 활동기로서 수온이 올라가는 3월과 4월은 최고의 활동성기이다. 수온이 17.5~19°C인 시기는 하면전기, 24.5°C 이상이면 하면기, 수온이 상승하였다가 하강하는 시기를 회복기, 19°C 이하로 내려가면 다시 활동기로 돌입한다.

하면이라는 독특한 생활주기를 가지고 있는 해삼에서 수온이 해삼에게 미치는 스트레스 정도를 스트레스관련 단백질인 Hsp90 및 ferritin mRNA 유전자 발현을 통해 살펴보았다.

치삼을 15°C, 20°C 및 25°C의 수온에서 사육 후 시간의 경과에 따른 Hsp90 유전자 발현은 15°C 사육수온에서는 발현의 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 15°C의 수온은 치삼의 성장과 관련하여 환경적 스트레스로 작용하지 않는 것으로 생각할 수 있다 (Fig. 1). 치삼을 20°C 및 25°C의 수온에서 사육한 경우 Hsp90 유전자의 발현은 사육온도가 높으면 짧은 사육기간에도 유전자 발현이 증가하였다. 본 연구에서 20°C의 경우 Hsp90 유전자 발현은 6시간 경과째부

터 유의적으로 증가하여 12시간째 최고의 발현을 나타낸 후 감소하기 시작하였으며 (Fig. 2), 사육수온 25°C의 경우는 3시간 경과째부터 유의적으로 증가하여 6시간 경과째 최고의 발현을 나타낸 후 감소하기 시작하였다 (Fig. 3). 따라서 치삼에서 Hsp90 유전자는 생태적 환경수온이 높을수록 빠르게 반응하여 발현이 나타나는 것으로 생각된다. 해양생물에서 온도와 관련한 Hsp90의 연구는 해삼과 같은 무척추동물에 비해서 척추동물인 어류에서 많이 보고되었다 (Palmissano *et al.* 2000; Sathiyaa *et al.* 2001; Murtha and Keller 2003). 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 간세포를 이용한 온도 스트레스와 Hsp90의 연관을 살펴보면 배양온도가 높을 경우 Hsp90 유전자 발현은 온도에 비례하여 발현이 높아졌으며 일정시간 경과 후 발현이 낮아지는 양상을 보였다 (Sathiyaa *et al.* 2001). 연어 (*Oncorhynchus tshawytscha*)의 경우도 사육수온이 높을 경우 Hsp90의 발현은 높게 나타났으며, 특히 심장조직에서 발현이 높게 나타났었다 (Palmissano *et al.* 2000). 송사리 (*Danio rerio*)의 경우 온도 스트레스를 주었을 경우 Hsp70의 발현은 초기에 높게 나타나며 시간의 경과에 따라 감소하는 경향을 나타냈으나, Hsp90의 발현은 차이가 나타나지 않았다 (Murtha and Keller 2003). 송사리를 시험대상어로 조사한 경우 Hsp90 유전자는 온도에 민감하게 반응하지 않았고, Hsp70 유전자는 온도 스트레스에 민감하게 반응하는 것으로 보아 Hsp90과 Hsp70 유전자는 생물 종에 따

라서 환경적 온도 스트레스에 노출 되었을 경우, 서로 다른 기능을 수행하는 것으로 생각된다. 해삼(*A. japonicas*)에서 Hsp90의 연구 보고에 의하면 26°C 온도 스트레스를 받을 경우 4시간째에서 가장 높은 발현을 보이며 6시간째까지 유지하고 그 이후 시간째부터 감소하는 경향을 나타냈다(Zhao *et al.* 2011). Zhao *et al.*(2011)의 연구결과는 25°C에서 사육한 본 연구의 결과와 매우 유사하다. 수온 25°C에서 사육한 치삼 개체들에서의 Hsp90 유전자 발현이 3시간 경과째부터 유의적으로 증가하기 시작하여 6시간 경과째 가장 높은 발현을 보이다가 이후 감소하는 경향과 유사하다. 또한 Xu *et al.*(2014)이 해삼(*A. japonicas*)을 대상으로 수온이 생존과의 연관관계를 살펴본 결과 16°C 및 32°C에서 5일간 사육한 결과 16°C에서 사육한 개체에서는 개체의 죽음이 관찰되지 않았으나 32°C에서 사육한 개체에서는 6시간 경과부터 죽은 개체들이 발생하기 시작하여 24시간 경과 시 가장 많은 개체가 죽었으며 그 후, 96시간 경과까지 개체의 죽음이 관찰되었다. 이 연구 결과에서 보듯이 30°C 이상의 수온은 해삼의 사육에 적합하지 않으며, 적합 수온은 15~16°C 정도임을 알 수 있다. 본 연구에서 30°C에서 사육 결과 3시간을 견디지 못하고 전 개체가 죽었다. Xu *et al.*(2014)의 연구와 비교하여 살펴보면, 본 실험에 사용한 개체의 중량은 1.4 g 정도였고 Xu 등의 연구에 사용한 개체는 10 g 정도로 개체의 크기에 따른 수온에 대응한 면역력의 정도 차이로 생각된다.

해삼 및 무척추동물에서 Hsp90과 온도 스트레스와 관련한 연구는 많지 않다. 본 연구결과를 척추동물인 어류의 연구결과 및 일부 해삼에서의 연구결과를 통해 고찰해 보면 Hsp90은 온도 스트레스에 반응하는 단백질이며, Hsp90을 이용한 연구결과를 통해 살펴보면 해삼이 온도 스트레스를 받지 않고 생활할 수 있는 최적의 수온은 15°C 정도로 생각된다. 이 연구결과는 해삼의 성장 및 산란을 위한 생태계내의 활동기의 온도와 근접한 것으로 스트레스 관련 유전자인 Hsp90 유전자 발현 양상을 통해 증명한 것으로 판단된다.

Ferritin 유전자의 경우 치삼을 15°C, 20°C 및 25°C의 수온에서 사육한 후 시간의 경과에 따른 발현양상은 15°C 온도에서는 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4). 그러나 대조군과 비교하여 20°C 사육수온에서는 48시간 경과째부터 유의적으로 증가하였으며(Fig. 5), 25°C 사육수온에서는 12시간 경과째부터 유의적으로 증가하여 48시간째 최고의 발현을 나타내었다(Fig. 6). Ferritin 유전자는 Hsp90과 마찬가지로 사육온도가 높을수록 빠른 시간의 경과에 유의적인 발현의 증가가 나타났다(Figs. 5, 6). Zhang *et al.*(2013)의 보고에 의하면 해삼(*A. japonicas*) 사육수의 온도 조건을 16°C와 25°C에서 7일간 사육시킨 후, ferritin mRNA 유전자 발현 양상을 보면 16°C에 비해 25°C에서 1.2배 정도 발현이 높게 나타났

다. 온도 스트레스 노출기간의 차이는 있지만 ferritin 유전자의 경우 온도 스트레스에 반응하여 발현은 나타나지만 민감도는 약한 것으로 판단된다. Ferritin의 주요 기능은 스트레스에 의해 생성된 체내 활성산소종을 제거하는 항산화기능이 있다(Tsujii *et al.* 2000). Hsp90은 수온의 변화에 즉시 반응하여 열 충격에 따른 스트레스에 즉시 대응하며, ferritin의 경우는 온도 스트레스에 의해 체내에서 활성산소종이 생성된 후 이를 제거하는 항산화기작에 관여하기에 스트레스에 따른 민감도는 Hsp90에 비해 낮은 것으로 생각된다.

본 연구결과 및 이전 연구결과를 바탕으로 Hsp90과 ferritin mRNA 유전자 발현을 비교한 결과 동일 사육수온에서 Hsp90이 ferritin에 비해 온도 스트레스에 대한 반응이 보다 민감한 것으로 나타났다. 이는 ferritin에 비해 Hsp90이 동일 사육수온에서 보다 빠른 시간의 경과에 유의적인 발현의 증가가 나타나는 것으로 보아 알 수 있다. Hsp90 및 ferritin mRNA 유전자들의 발현 양상을 통해본 해삼의 최적 사육수온은 15°C 정도가 스트레스 없이 적절한 것으로 생각되며 Hsp90 및 ferritin 유전자는 해삼의 적정 사육조건을 판단할 수 있는 생체지표유전자(biomarker gene)로 활용이 가능하다고 생각된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원 10대 전략품종(해삼) 육상양식 기술개발의 일환으로 수행되었다. 과제 추진에 많은 도움을 준 생물모니터링센터의 허준욱 박사님께 이 지면을 통해 감사 말씀을 드립니다.

REFERENCES

- Basu N, A Todgham, P Ackerman, M Bibeau, K Nakano, P Schulte and GK Iwama. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295:173-183.
- Colinet H, SF Lee and A Hoffmann. 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.* 277:174-185.
- Dong YW, SL Dong and TT Ji. 2008. Effects of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Aquaculture* 275:329-334.
- Fangue NA, M Hofmeister and PM Schulte. 2006. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene

- expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Biol. 209:2859-2872.
- Feder ME and GE Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61:243-282.
- Gagnaire B, H Frouin, K Moreau, H Thomas-Guyon and T Renault. 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish Shellfish Immunol. 20:536-547.
- Galea-Lauri J, AJ Richardson, DS Latchman and DR Katz. 1996. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. J. Immunol. 157:4109-4118.
- Georgopoulos C and W Welch. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. Annu. Rev. Cell Biol. 9:601-634.
- Harrison PM and P Arosio. 1996. Ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim. Biophys. Acta 1275:161-203.
- Heckathorn SA, CA Downs, TD Sharkey and JS Coleman. 1998. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. Plant Physiol. 116:439-444.
- Imai J and I Yahara. 2000. Role of HSP90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin. Mol. Cell. Biol. 20:9262-9270.
- Jakob U, H Lilie, I Meyer and J Buchner. 1995. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. J. Biol. Chem. 270:7288-7294.
- Kakhlon O, Y Gruenbaum and ZI Cabantchik. 2001. Repression of the heavy ferritin chain increases the labile iron pool of human K562 cells. Biochem. J. 356:311-316.
- Konijn AM, H Glickstein, B Vaisman, EG Meyron-Holtz, IN Slotki and ZI Cabantchik. 1999. The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. Blood 94:2128-2134.
- Kregel KC. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J. Appl. Physiol. 92:2177-2186.
- Li BQ, HS Yang, T Zhang and Y Zhou. 2002. Effects of temperature on respiration and excretion of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Oceanol. Limnol. Sin. 33:182-187.
- Li FX, YH Liu, BX Song, HL Sun, XL Zhang and BX Gu. 1996. Study on aestivating habit of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. II. Ecological characteristic of aestivation. J. Fish. Sci. China. 3:49-57.
- Li P, J Zha and KY Zhou. 2009. Molecular cloning, mRNA expression, and characterization of HSP90 gene from Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis*. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 153:229-235.
- Liao Y. 1997. FAUNA SINICA: phylum echinodermata, class holothuroidea Science Press, Beijing.
- Liu YH, FX Li, BX Song, HL Sun, XL Zhang and BX Gu. 1996. Study on aestivating habit of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. I. Ecological characteristic of aestivation. J. Fish. Sci. China. 3:41-48.
- Logue J, P Tiku and AR Cossins. 1995. Heat injury and resistance adaptation in fish. J. Therm. Biol. 20:191-197.
- Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional responses: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev. 12:3788-3796.
- Murtha JM and ET Keller. 2003. Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). Exp. Gerontol. 38:683-691.
- Palmisano AN, JR Winton and WW 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.
- Park K, J Park, J Kim and IS Kwak. 2010. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol. 151:439-446.
- Parsell D and S Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu. Rev. Genet. 27:437-496.
- Picard V, F Renaudie, C Porcher, MW Hentze, B Grandchamp and C Beaumont. 1996. Overexpression of the ferritin H subunit in cultured erythroid cells changes the intracellular iron distribution. Blood 87:2057-2064.
- Picard V, S Epsztejn, P Santambrogio, ZI Cabantchik and C Beaumont. 1998. Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. J. Biol. Chem. 273:15382-15386.
- Queitsch C, SW Hong, E Vierling and S Lindquist. 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. Plant Cell 12:479-492.
- Richter K and J Buchner. 2001. Hsp90: chaperoning signal transduction. J. Cell. Physiol. 188:281-290.
- Sathiyaa R, T Campbell and MM Vijayan. 2001. Cortisol modulates hsp90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol.

- Biol. 129:679-685.
- Soetaert A, LN Moens, K Van der Ven, K Van Leemput, B Naudts, R Blust and WM De Coen. 2006. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.* 142:66-76.
- Song L, L Wu, D Ni, Y Chang, W Xu and K Xing. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol.* 21:335-345.
- Theil EC. 1987. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56:289-315.
- Tsuji Y, H Ayaki, SP Whitman, CS Morrow, SV Torti and FM Torti. 2000. Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 20:5818-5827.
- Wang FY, HS Yang, F Gao and GB Liu. 2008. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* 151:491-498.
- Wu LT and KH Chu. 2008. Characterization of heat shock protein 90 in the shrimp *Metapenaeus ensis*: evidence for its role in the regulation of vitellogenin synthesis. *Mol. Reprod. Dev.* 75:952-959.
- Xu D, L Sun, S Liu, L Zhang and H Yang. 2014. Polymorphisms of heat shock protein 90 (Hsp 90) in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* and their association with heat-resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 41:428-436.
- Xu Q and Y Qin. 2012. Molecular cloning of heat shock protein 60 (PtHSP60) from *Portunus trituberculatus* and its expression response to salinity stress. *Cell Stress Chaperone.* 17:589-601.
- Yang HS, Y Zhou, T Zhang, XT Yuan, XX Li, Y Liu and FS Zhang. 2006. Metabolic characteristics of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 330:505-510.
- You L, X Ning, F Liu, J Zhao, Q Wang and H Wu. 2013. The response profiles of HSPA12A and TCTP from *Mytilus galloprovincialis* to pathogen and cadmium challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 35:343-350.
- Zhang P, Y Lu, C Li, X Su, Z Wang, C Jin, Y Li and T Li. 2013. Identification of differential expressed proteins and characterization their mRNA expression in thermally stressed *Apostichopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 8:194-200.
- Zhao H, H Yang, H Zhao, M Chen and T Wang. 2011. The molecular characterization and expression of heat shock protein 90 (Hsp90) and 26 (Hsp26) cDNAs in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Cell Stress Chaperone.* 16:481-493.

Received: 23 July 2015

Revised: 8 December 2015

Revision accepted: 9 December 2015