

## 수온 및 염분 스트레스에 따른 참담치, *Mytilus coruscus*에서 Hsp70 및 GST 유전자 발현에 대한 연구

김 철 원 · 강 한 승<sup>1,\*</sup>

한국농수산대학교, <sup>1</sup>엠에스바이오랩

## The Expression of Hsp70 and GST Genes in *Mytilus coruscus* Exposed to Water Temperature and Salinity

Chul Won Kim and Han Seung Kang<sup>1,\*</sup>

Department of Aquaculture, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Kongjwipatjwi-ro 1515,  
Wansan-gu, Jeonju, Jeollabuk-do 54874, Korea

<sup>1</sup>MS BioLab, 49 Dongseo-daero 1730 beon-gil, Dong-gu, Daejeon 34574, Korea

**Abstract** - The heat shock proteins (Hsps), one of the most highly conserved groups of proteins, play crucial roles in protecting cells against environmental stressors, such as temperature, salinity, heavy metals and pathogenic bacteria. The glutathione S-transferases (GST) have important role in detoxification of oxidative damage, environmental chemicals and environmental stress. The purpose of this study is to investigate the gene expression of Hsp70 and GST on change of temperature and salinity in *Mytilus coruscus*. The *M. coruscus* was cultured in incubator of separate temperature and salinity (8, 20, 30°C × 20‰, 25‰, 30‰) for 28 days. Ten individuals in each group were selected after each 14 and 28 days exposure. Results that the expression of Hsp70 mRNA was no significant changed in *M. coruscus* exposed to temperature (8°C, 20°C, 30°C) and salinity (20‰, 25‰, 30‰) for 14 days. Whereas the expression of Hsp70 mRNA was increased in exposure to temperature 30°C and salinity (20‰, 25‰, 30‰) for 28 days. The expression of GST mRNA was increased in exposure to temperature 30°C, salinity (25‰, 30‰) for 14 days and temperature (8°C, 20°C, 30°C), salinity (20‰, 25‰, 30‰) for 28 days. These results suggest that Hsp70 and GST were played roles in biomarker gene on the thermal and salinity stress.

**Key words:** *Mytilus coruscus*, Hsp70, GST, temperature, salinity

### 서 론

이매패강(Bivalvia), 홍합목(Mytiloidea), 홍합과(Mytilidae)에 속하는 이매패류인 참담치(*Mytilus coruscus*, Gould)는

우리나라, 일본 북태평양 및 중국 황해 연안에만 서식하는 고유종으로 산업적 가치가 있는 중요한 패류이며, 생식은 자웅이체로서 체외수정을 한다(Yoo 1988). 형태적 특징은 껍질이 두껍고 칠흙색이며, 모양은 긴 계란형으로서, 접착성이 강한 단백질성 섬유 다발인 표류용 족사(drifting thread) 및 부착용 족사(attachment thread)를 가지고 있어서, 암초에 군집으로 부착해서 서식하는 특성이 있다(Lane *et al.* 1985). 참담치의 생산량은 2001년 기준으로 전국 패류 생산량의

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

3.1% 정도를 차지하였으나, 남획에 의한 자원 감소로 인하여 소량 채취만 가능한 정도로 생산량이 줄었다(Shin and Wi 2004).

참담치는 서식의 특성상 환경변화가 많은 조건에 노출되어 있다. 참담치 등을 비롯한 패류는 수온 및 염분 등의 외부 환경요인에 영향을 받으며 이들 환경요인이 불안정할 경우 생화학 및 생리적 변화의 유도에 따른 대사유지를 위한 에너지 불균형에 의해 생산력이 감소된다(Shin and Wi 2004). 이들 환경요인 중 온도는 직접적인 요인으로 대사 및 에너지 균형에 영향을 미친다(Newell and Kofoed 1977; Loomis *et al.* 1995; Chapple *et al.* 1998). 또 다른 중요한 환경요인 중의 하나인 염분의 변화는 세포 내 수분과 염분의 불균형을 일으키며, 이러한 염분의 불균형은 대사와 관계가 있기 때문에 참담치의 대사율을 감소시키는 원인이 된다(Bailey *et al.* 1996). 따라서 적절한 수온과 염분은 참담치의 생산에 있어서 매우 중요한 환경요인이다. 그러나 이러한 환경요인이 생물에 미치는 영향이 과도하게 되면 항상성에 문제를 일으키며 궁극에는 죽음을 초래한다.

최근의 연구경향을 살펴보면 환경요인의 변화에 따른 스트레스 반응의 정도를 세포수준의 분자생물학적인 연구방법을 통해 연구를 진행하는 경우가 많다. 수온의 변화에 따른 스트레스 연구는 열충격단백질(Heat Shock Protein, Hsp)의 분석을 통해 많이 이루어진다. Hsp는 온도, 염분, 중금속 등의 환경요인의 영향에 따라 발현에 차이를 보이는 단백질로서 면역상태의 지표를 나타낸다(Parsell and Lindquist 1993; Feder and Hofmann 1999; Kregel 2002; Fanguie *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). 이 중에서 Hsp70은 분자량이 70 kDa로 가장 활발히 연구되는 단백질로서 온도 및 염분의 영향에 따라 발현에 차이를 보이는 대표적인 유전자이다(Kim *et al.* 2006; Nam *et al.* 2013).

Glutathione-S-transferase (GST)는 다양한 기능을 가진 단백질로서 모든 생물체에서 발견이 되며 비생체물질(xenobiotic), 중금속, 병원체(pathogen), 온도, 염분 및 산화스트레스(oxidative stress) 등 외부에서 유입된 독성물질이나 대사과정에서 생성된 독소를 제거하는 해독작용에 관여하여 세포를 보호하는 기능을 가진다(Hayes *et al.* 2005). GST는 독성물질을 체외로 쉽게 배출되게 하거나 또는 반응성이 적은 물질로의 분해를 통해 해독작용을 한다(Hayes and Pulford 1995). 조개류인 *Chlamys farreri*, *Chlamys islandica*, *Perna viridis*와 *Ruditapes philippinarum*에서 온도, 산화스트레스 및 내분비계장애물질 등과 같은 환경요인에 노출되었을 때

GST의 고발현에 관한 연구가 진행되었다(Lau and Wong 2003; Luca-Abbott *et al.* 2005; Myrnes and Nilsen 2007; Liu *et al.* 2014a; Hu *et al.* 2015). GST에 대한 연구는 상대적으로 무척추동물에 비하여 척추동물에서 많이 이루어졌다. 포유류의 GST는 간세포에서 높은 농도로 존재 및 발현하기 때문에 독성 및 감염 정도를 측정하기 위한 바이오마커로 활용하고 있다(Hughes *et al.* 1997; Loguercio *et al.* 1998). 어류에서는 polychlorinated biphenyls (PCBs), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)와 같은 내분비계장애물질에 노출 시 GST의 발현이 증가한다는 연구결과가 있다(Hamed *et al.* 2003; Hansson *et al.* 2006).

본 연구에서는 온도 및 염분 등의 환경요인이 참담치에 미치는 영향에 관한 연구의 일환으로 스트레스 관련 유전자인 Hsp70과 GST 단백질의 mRNA 유전자 발현을 조사하고자 한다. 이들 환경요인이 Hsp70 및 GST 유전자의 발현에 미치는 영향에 대한 조사를 통해 체내 스트레스 정도를 파악하고, 적정 수온 및 염분의 범위를 밝히고자 한다. 본 연구를 통한 결과는 환경요인과 참담치 생산과의 기초자료로 활용하고자 하며 향후 환경요인에 대한 바이오마커로의 활용 가능성에 대해 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 연구에 사용된 참담치(*Mytilus coruscus*, Gould)는 각각 1.62~1.71 cm 정도의 미성숙 개체로서 국립한국농수산대학교 생물사육장에서 사육한 생물이며 사육을 위한 해수는 멸균해수를 사용하였다. 사육용기로는 2 L 유리소재 비이커를 사용하였으며 다연실배양기(multi room incubator)에서 사육하였다. 수온에 따른 사육 조건은 8°C, 20°C 및 30°C로 설정하였으며, 각각의 온도조건에 염분 20‰, 25‰ 및 30‰ 농도로 설정하여 28일간 사육하였다. 먹이는 *Isochrysis galbana*를 공급하였으며, 사육수는 염분농도 및 수온이 설정된 멸균해수를 이용하여 3일에 한번씩 전체 환수해 주었다. 대조군은 자연수온(18°C, 32‰)상태에서 실험개시 당일 수집한 10마리 개체를 사용하였다. 사육을 위한 참담치의 개체수는 각각의 실험군당 75마리를 입식 하였다. 실험을 위한 온도와 수온이 설정된 다연실배양기에는 실험군당 3반복 실험의 수행을 위하여 각각 3개의 사육용기를 배치하였다. 14일째와 28일째 각 조건별 실험군에 위치한 3개의 사육용기에서 각각 10개체씩 30마리를 수집하여 실험에 사용하였다.

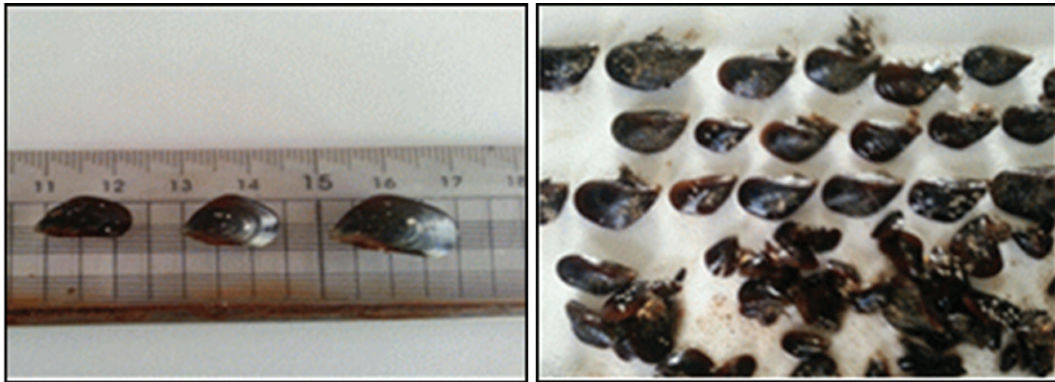


Fig. 1. Spat of *Mytilus coruscus*.

## 2. Total RNA 추출

Total RNA 추출을 위한 시료의 준비는 실험군당 3개의 사육용기별로 각각 10 개체씩 조직을 준비하였다. 각 사육용기에 따른 10개체의 조직은 함께 혼합하여 total RNA의 추출을 위해 사용하였다. Total RNA의 추출을 위한 조직은 폐각을 제외한 육질 부위 및 부속 조직 전체를 수집하여 사용하였다. 수집한 조직은 식염수로 깨끗하게 세척 및 식염수를 제거한 다음, 액체질소에 침지시켰다. 침지시킨 조직은 마이크로 튜브에 넣은 후에 실험에 사용하기 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  초저온냉동고에 보관하였다. Total RNA의 추출은 RNAiso Plus (TaKaRa Co. Shiga, Japan) 시약 용액을 이용하여 제조사가 준비하고 제시한 방법에 따라 시행하였다. 추출한 total RNA는 분광광도계 (NanoVue, GE Healthcare)를 이용하여 정량하였고, RNA quality는 260/280 ratio 1.8 이상을 확인하였으며, 역전사반응 (Reverse Transcription: RT) 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  초저온냉동고에 보관하였다.

## 3. 역전사-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)

추출한 total RNA에서  $1\ \mu\text{g}$ 을 취하여 oligo(dT)<sub>18</sub> ( $0.5\ \mu\text{g}$ ) primer와 AccuPower RT premix (Bioneer Co. Daejeon, Korea)를 이용하여 최종 반응용액  $20\ \mu\text{L}$ 로  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 시행하여 cDNA를 합성하였다. 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction: PCR)은 RT를 통해 얻은  $20\ \mu\text{L}$ 의 cDNA 중에서 cDNA  $1\ \mu\text{L}$ 와 각각의 유전자 primer인 Hsp70 (Accession No: KF322135) F(5'-TGGAATACCTCCAGCACCAA-3'), R(5'-AGCATCATTGACCATGCGTT-3'), GST (Accession No: KC525103) F(5'-GAAATTGTCTTAGTAGGTGGATC-3'), R(5'-CAGGCTGGTTGTCGGAGTAAGT-3'), 내재표준 유전자로 사용한  $\beta$ -actin (Liu *et al.* 2014b) primer F(5'-ATGAAACCACCTACAACAGT-3'), R(5'-TAGACCCACCAAT

CCAGACG-3') 및 AccuPower HotStart PCR premix (Bioneer Co. Daejeon, Korea)를 이용하여 최종 반응용액  $20\ \mu\text{L}$ 로 시행하였다. 각 유전자의 RT-PCR 조건은 Hsp70 및 GST의 경우 pre-denaturation  $95^{\circ}\text{C}$ , 5분; denaturation, annealing, extension 각각  $95^{\circ}\text{C}$  30초,  $50^{\circ}\text{C}$  30초,  $72^{\circ}\text{C}$  30초, 28회; extension  $72^{\circ}\text{C}$ , 10분 수행하였다. 내재표준유전자  $\beta$ -actin의 PCR 조건은 pre-denaturation  $95^{\circ}\text{C}$ , 5분; denaturation, annealing, extension 각각  $95^{\circ}\text{C}$  30초,  $55^{\circ}\text{C}$  30초,  $72^{\circ}\text{C}$  30초, 24회; extension  $72^{\circ}\text{C}$ , 10분 수행하였다. PCR 수행을 위한 annealing 온도의 설정은 gradient PCR을 수행하여 최적의 온도를 선택하였으며, PCR 수행의 반복 횟수는 각각 18회부터 32회 수행한 PCR 산물을 전기영동하여 PCR 산물의 포화상태가 이루어지기 전의 횟수를 선택하여 결정하였다. RT-PCR은 실험군당 3개의 total RNA를 이용하여 각각 3회 반복 수행하였다. 증폭된 PCR산물은 ethidiumbromide ( $100\ \text{ng mL}^{-1}$ )가 포함된 2% 아가로스겔 전기영동을 통해 확인하였으며 band intensity는 Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad, California, USA)을 이용하여 분석하였다.

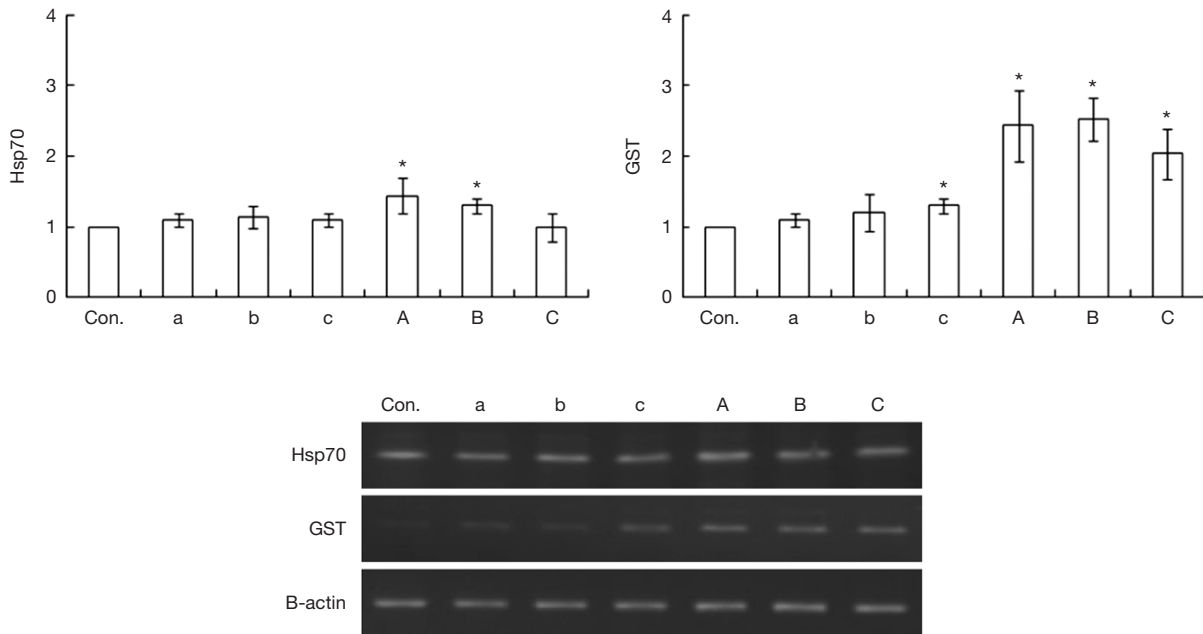
## 4. 통계학적 분석

대조군과 실험군 간의 유의성 검정을 위해 Student's *t*-test를 수행하였으며, *p*값이 0.05 이하인 경우에 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 사육시간의 경과에 따른 참담치의 성장 및 생존

본 실험에 사용한 치패는 각고  $1.62\sim 1.71\ \text{cm}$  정도의 미성숙 개체 (Fig. 1)로서 28일간의 사육에서 치패의 성장은 거



**Fig. 2.** Expression of Hsp70 and GST mRNA in cultured at 8°C and salinity (20‰, 25‰, 30‰) during 14 and 28 days. Con: control, a: 14 days-8°C-20‰, b: 14 days-8°C-25‰, c: 14 days-8°C-30‰, A: 28 days-8°C-20‰, B: 28 days-8°C-25‰, C: 28 days-8°C-30‰ (\**P* < 0.05).

의 변화가 없었다. 참담치를 수온(8°C, 20°C 및 30°C) 및 염분(20‰, 25‰ 및 30‰)농도로 설정하여 28일간 사육하였을 때 개체의 폐사는 관찰되지 않았다.

**2. 8°C 수온 및 염분 변화 상태에서 사육한 참담치 14일과 28일째 개체에서의 Hsp70 및 GST 유전자 발현**

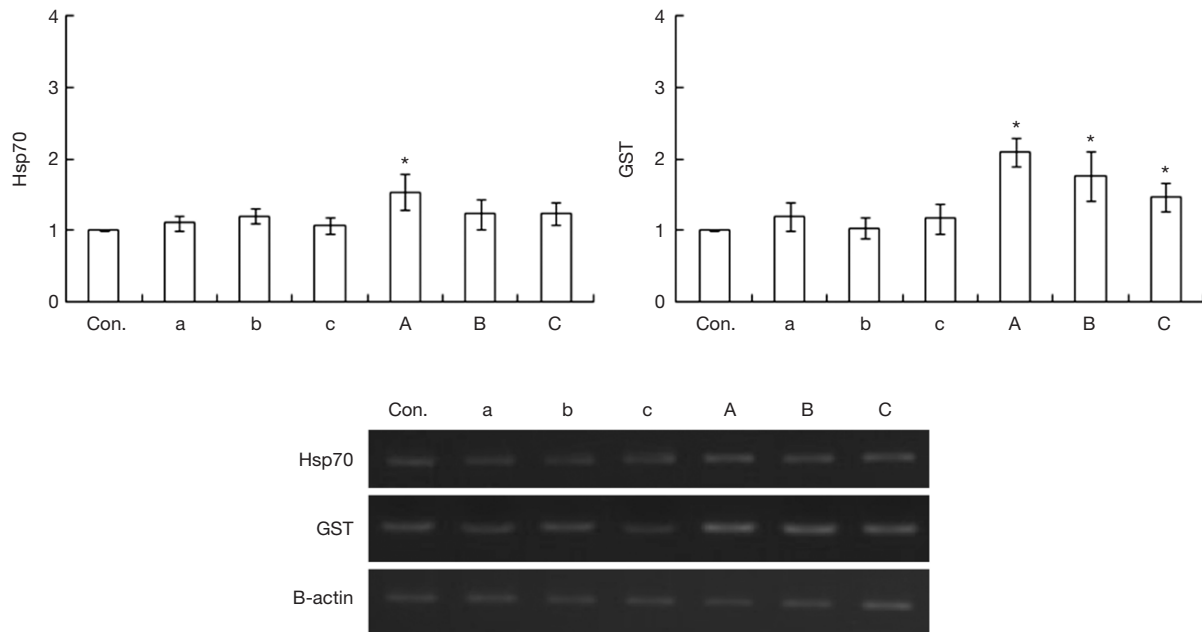
참담치의 저 수온 및 염분에 따른 개체의 생체 내 스트레스 수준을 알아보기 위하여 8°C 수온에 염분농도(20‰, 25‰, 30‰) 변화를 둔 멸균해수에 사육한 참담치를 14일과 24일간 노출시킨 후에 Hsp70 및 GST 유전자의 발현을 살펴보았다. 14일간 8°C 수온, 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에 사육한 개체를 대상으로 한 Hsp70 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 28일간 동일한 조건에서 사육한 개체를 대상으로 한 Hsp70 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 8°C 수온, 20‰ 및 25‰ 염분농도에서 유의적인 증가가 나타났다. GST 유전자의 발현은 14일간 동일한 조건에서 사육한 개체에서 대조군에 비하여 유전자 발현은 8°C 수온, 30‰ 염분농도에서 유의적인 증가가 나타났으며 나머지 실험군은 유의적인 차이가 없었다. 28일간의 동일 조건 사육에서는 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의적인 발현의 증가가 나타났다(Fig. 2)

**3. 20°C 수온 및 염분 변화 상태에서 사육한 참담치 14일과 28일째 개체에서의 Hsp70 및 GST 유전자 발현**

참담치의 사육수온 20°C 및 염분농도(20‰, 25‰, 30‰) 변화에 따른 개체의 생체 내 스트레스 수준을 파악하기 위하여 사육한 참담치를 14일과 24일간 노출시킨 후에 Hsp70 및 GST 유전자의 발현을 살펴보았다. Hsp70 유전자의 경우 14일간 20°C 수온, 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에 사육한 개체에서 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 28일간 동일한 조건에서 사육한 개체에서 Hsp70 유전자의 발현은 20°C 수온, 염분농도 20‰ 실험군이 대조군과 비교하여 유의적인 증가가 나타났으며 나머지 실험군에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. GST 유전자 발현은 14일간 동일한 조건에서 사육한 개체에서는 대조군에 비하여 유전자 발현의 유의적인 변화가 없었으나, 28일간의 동일 조건 사육에서의 개체는 대조군에 비하여 모든 실험군에서 유의적인 발현의 증가가 나타났다(Fig. 3).

**4. 30°C 수온 및 염분 변화 상태에서 사육한 참담치 14일과 28일째 개체에서의 Hsp70 및 GST 유전자 발현**

사육수온 30°C 및 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에 참담치를 사육한 후, 개체의 생체 내 스트레스 수준을 파악하기 위



**Fig. 3.** Expression of Hsp70 and GST mRNA in cultured at 20°C and salinity (20‰, 25‰, 30‰) during 14 and 28 days. Con: control, a: 14 days-20°C-20‰, b: 14 days-20°C-25‰, c: 14 days-20°C-30‰, A: 28 days-20°C-20‰, B: 28 days-20°C-25‰, C: 28 days-20°C-30‰ (\* $P < 0.05$ ).

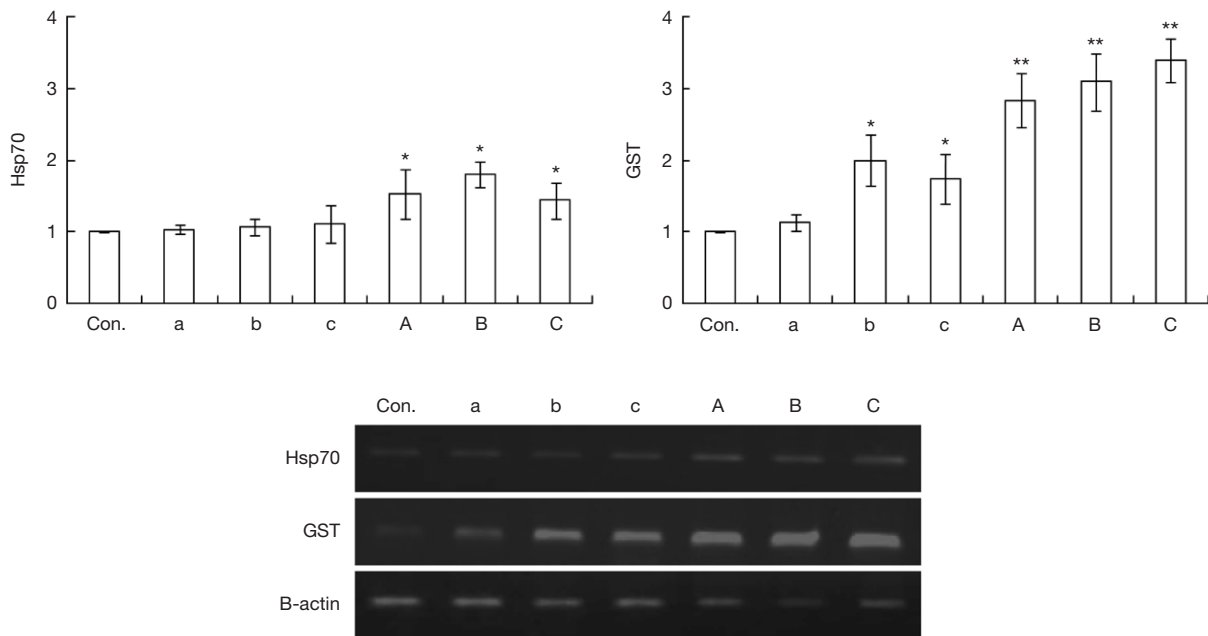
하여 14일과 24일째 개체를 대상으로 Hsp70 및 GST 유전자의 발현을 관찰하였다. Hsp70 유전자의 경우 14일간 30°C 수온, 염분농도 (20‰, 25‰, 30‰)에 사육한 개체에서 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 28일간 동일한 조건에서 사육한 개체에서 Hsp70 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 모든 실험군에서 유의적인 증가가 나타났다. GST 유전자 발현은 14일간 동일한 조건에서 사육한 개체에서는 대조군에 비하여 사육수온 30°C 및 염분농도 20‰에서는 발현의 유의적인 변화가 없었다. 그러나 사육수온 30°C 및 염분농도 (25‰, 30‰)에서 14일간 사육한 경우 대조군에 비하여 유의적인 발현의 증가가 나타났다. 28일간의 사육수온 30°C 및 염분농도 (20‰, 25‰, 30‰) 사육에서의 개체는 대조군에 비하여 모든 실험군에서 유의적인 발현의 증가가 나타났다 (Fig. 4).

## 고 찰

참담치 등의 패류는 환경적인 요인에 의해 생산력이 결정되는 경우가 발생할 수 있다. 수온 및 염분 등의 환경변화는 특히 중요한 환경요인으로 알려져 있다. 이러한 환경요인은 이동성이 제한적인 패류 개체에 스트레스로 작용하여 활성산소생성 등의 부작용을 유발한다 (Ferraris *et al.* 2002). 본

연구는 참담치를 이용하여 수온 및 염분 등의 환경요인 변화에 따른 스트레스 관련 유전자인 Hsp70 및 GST 유전자 발현양상을 통해 생체 내 스트레스의 상태를 알아보고자 함을 연구의 목적으로 두었다. 참담치는 우리나라 전 연안에 분포하나 특히 남해안에 많이 분포한다. 본 연구를 위한 실험조건의 설정은 Wi (2003) 등이 보고한 연구 논문을 참조하여 우리나라 남해안 연중 수온 및 염분의 자연조건을 참조하여 설정하였다. Wi (2003) 등의 보고에는 2000년 1월부터 12월까지 참담치가 자연서식 하는 경남 통영시 한산면 매물도 해역의 수온과 염분농도를 조사하여 제시하였는데 월별 평균수온은 1월에 10.9°C로 가장 낮았으며, 8월에 25.0°C로 가장 높았다. 염분농도는 1월에 34.4‰로 가장 낮았으며, 8월에 35.9‰로 가장 높았다. 평균수온은 계절에 따라 차이가 나타났으나 염분농도는 많은 차이가 나타나지 않았다. 본 연구에서 수온의 실험구 설정은 지역에 따른 차이를 감안하여 최저 수온 8°C, 평균 20°C 및 최고수온 30°C로 설정하였다. 염분농도의 설정은 자연해수에서 평균 염분농도보다 높은 고농도가 발생할 가능성이 낮을 것 이라는 판단에서 자연해수의 염분농도에 비교하여 낮은 염분농도를 설정하여 저염분이 참담치에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

본 연구 결과를 요약해 보면, Hsp70 유전자의 발현 양상을 관찰한 연구결과, 8°C, 20°C 및 30°C의 수온과 염분농도 (20‰, 25‰, 30‰)에서 14일간 사육한 개체에서는 대조군



**Fig. 4.** Expression of Hsp70 and GST mRNA in cultured at 30°C and salinity (20‰, 25‰, 30‰) during 14 and 28 days. Con: control, a: 14 days-30°C-20‰, b: 14 days-30°C-25‰, c: 14 days-30°C-30‰, A: 28 days-30°C-20‰, B: 28 days-30°C-25‰, C: 28 days-30°C-30‰ (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ).

에 비해 유의적인 발현 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다(Figs. 2, 3, 4). 그러나 동일 조건의 28일간 사육한 개체에서는 저수온 8°C, 염분농도(20‰, 25‰)에서 대조군에 비교하여 유의적인 발현의 증가가 나타났다(Fig. 2). 또한 고수온 30°C, 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에서도 대조군에 비교하여 유의적인 발현의 증가가 나타났다(Fig. 4). 8°C, 20°C 및 30°C의 수온과 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에서 14일간 사육한 개체에서 GST 유전자의 발현 양상은 8°C의 경우 30‰에서 대조군에 비해 유의적인 발현의 증가가 나타났다(Fig. 2). 20°C 수온과 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3). 30°C의 수온과 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에서는 25‰ 및 30‰에서 유의적인 발현의 증가를 보였다(Fig. 4). 동일 조건의 28일간 사육한 개체에서는 모든 실험구 수온 및 염분농도(20‰, 25‰, 30‰)에서 대조군에 비교하여 유의적인 발현의 증가가 나타났다(Figs. 2, 3, 4).

Shin and Wi (2004)의 연구보고에 의하면 각고 7 mm 정도의 참담치를 9일간 사육하고 수온에 따른 생존율의 연구결과 25°C 이하에서는 95% 이상의 생존율을 보였고, 30°C 이상에서는 7일째 개체가 모두 폐사하였다. 또한 수온의 증가와 염분농도의 상관관계에서 수온 10°C, 15°C 및 25°C에서 반수치사 염분은 17.01‰, 19.95‰ 및 21.79‰로 수온이 높을수록 염분의 영향이 큰 것으로 나타났다. 이와 같이 참담치는

온도 및 염분 등의 환경요인에 의해 성장 및 생존에 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 사육한 모든 실험구에서 폐사 개체는 없었다. 이는 연구에 이용한 참담치 개체가 평균 각고 1.62~1.71 cm로 Shin and Wi (2004)가 이용한 개체보다 더 성장한 개체이기에 수온 및 염분에 대한 내성이 강한 것으로 생각된다. 패류에서 상한치사수온을 살펴보면 전복류인 pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*)은 26.5°C 및 홍합류인 *Mytilus edulis*는 28.5°C로 알려져 있다(Chapple *et al.* 1998; Paul and Paul 1998). 홍합(*M. edulis*)에서 Hsp70의 경우 28°C 이상의 열 충격을 받게 되면 6시간 경과부터 유의적인 발현의 증가가 나타나기 시작하여 48시간 가장 높은 수준의 발현을 보이며 서서히 발현이 감소하기 시작한다(Chapple *et al.* 1997). 계화도조개(*Potamocorbula amurensis*)를 36.5~38°C 열 충격을 30분간 시행한 후에 7일간 사육하여 Hsp70의 발현양상을 살펴본 결과 3시간 경과째 약 3.5배 정도의 가장 높은 수준의 발현양상을 보이기 시작하여 140시간 경과째까지 약 2배 정도 높은 수준의 발현양상을 보였다(Werner 2004). 이러한 연구결과를 종합해보면 Hsp70은 열 충격을 받게 되면 고온일수록 반응이 일찍 일어나며, 패류 생물종에 따라 차이가 있을 수 있으나 열 충격에 적응이 되면 발현이 점차 감소하는 것을 알 수 있다. 본 연구에서 14일간 사육한 개체의 모든 실험군에서 Hsp70 유전자의 발현 양상은 대조군에 비교하여 유의적인 차이가 없었다. 이

러한 결과는 설정된 실험구에서 수온 및 염분 등이 스트레스로 작용하지 않았을 경우도 존재하지만 다른 한편으로는 스트레스에 적응하여 폐사에 이르지 않고 환경에 적응하였을 경우도 생각할 수 있다. 28일간의 사육에서는 저 수온인 8°C인 경우 20‰ 및 25‰, 20°C인 경우 20‰, 30°C인 경우 20‰, 25‰ 및 30‰에서 발현의 차이가 크지는 않지만 유의적인 증가가 나타났다. 앞선 Shin and Wi (2004)의 연구보고에 의하면 수온과 염분농도와와의 관계에서 수온 10°C 및 염분농도 17.01‰, 25°C 및 21.79‰일 때 참돔치 개체의 반수치사를 보여주었다. 28일간의 장시간 사육은 참돔치 개체에 수온 및 염분농도의 정도에 따라 스트레스가 유발된다고 생각된다. 또한 자연상태와 달리 적절한 환경요인으로의 복구가 없는 상태에 놓인 개체는 계속 스트레스를 받는 상황에 놓여지리라 생각된다. 수온(8°C, 20°C 및 30°C) 및 염분농도(20‰, 25‰ 및 30‰)에서 28일간 사육한 참돔치에서 GST 발현은 모든 실험구에서 유의적인 발현의 증가가 나타났다. 발현의 특징은 수온 20°C 및 염분농도(20‰, 25‰ 및 30‰)에서의 GST 발현의 증가가 각각 8°C 및 30°C 염분농도(20‰, 25‰ 및 30‰) 실험구에 비해서는 낮게 나타났다. 또한 GST의 발현은 Hsp70에 비교하여 발현의 증가가 높게 나타났다. 이런 결과를 통해서 GST는 Hsp70에 비하여 수온 및 염분 등의 스트레스 반응에 보다 더 민감하다는 것을 알 수 있다. 또한 참돔치 서식에 적절한 조건과 유사한 20°C 수온에 염분농도 30‰인 실험구에서 8°C 및 30°C 수온에 비하면 낮은 발현양상을 보이지만 대조군인 자연수온(18, 32‰)에 비교하여 유의적인 발현 증가가 나타났다는 것은 적절한 환경요인의 복구가 없는 장시간의 사육은 Hsp70 발현에서 나타난 것과 마찬가지로 개체에게 스트레스로 작용할 수 있다고 생각할 수 있다. 14일간 사육한 개체에서 GST의 발현은 8°C에서는 30‰, 30°C에서는 25‰ 및 30‰에서 유의적인 증가가 나타났으나 20°C 염분농도 실험구에서는 유의적인 발현의 차이가 나타나지 않았다. 따라서 참돔치 서식에 적절한 조건과 유사한 20°C 수온에 염분농도 30‰ 실험구에서 사육기간에 따라 GST의 유전자 발현 양상이 다른 것은 적절한 환경요인의 복구가 없는 장시간의 사육은 분명 사육중인 개체에게는 스트레스로 작용할 수 있다는 것을 알 수 있다.

Hsp70 및 GST는 온도, 염분 및 산화스트레스 등의 지표를 나타내는 유전자로 알려져 있다(Hayes *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006; Nam *et al.* 2013). 본 연구에서는 참돔치의 적정 서식 조건에서 온도 및 염분농도의 변화를 준 후, 참돔치의 스트레스 정도를 Hsp70 및 GST 유전자의 발현을 통해서 살펴보았다. 연구결과 온도 및 염분 등의 환경요인은 참돔치의 성장 및 생존에 영향을 미치는 스트레스와 관계한다는 것을

알 수 있었고 또한 유전자 발현변화 측면에서 GST 유전자는 Hsp70 유전자에 비해 민감한 것을 확인하였다. 생산량이 감소한 참돔치의 복원 및 인공종묘생산을 통한 양식산업을 수행할 시에는 장시간 적정하지 않은 환경요인에 노출된 개체에게 스트레스를 유발하여 생산량의 감소를 유발시킬 수 있는 것이 확인되었다. 본 연구에서는 스트레스 정도를 파악하기 위한 개체의 수집시기를 14일 및 28일 경과 후를 설정하였다. 참돔치 연구결과는 현재 부족한 상태이나 다른 생물에서 살펴보면 스트레스 반응에 따른 관련 유전자의 발현 시기는 일찍 발현하여 개체에의 적응을 유도하는 것으로 판단된다. 따라서 향후 참돔치를 이용한 온도 및 염분이 미치는 스트레스의 연구에 있어서 조기 발현시기의 확인과 온도 및 염분 등의 복합 영향이 아닌 단일 영향에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

## 사 사

본 논문은 한국해양과학기술진흥원 수산실용화기술개발사업(과제번호: 312017-4)의 일환으로 수행되었으며 연구비 지원에 대하여 깊은 감사를 드립니다.

## REFERENCES

- Bailey J, J Parsons and CA Couturier. 1996. Salinity tolerance in the blue mussel, *Mytilus edulis*. Bull. Aquacult. Assoc. Can. 96:74-76.
- Chapple JP, GR Smerdon and AJS Hawkins. 1997. Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*: Tissue-specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 217:225-235.
- Chapple JP, GR Smerdon, RJ Berry and AJS Hawkins. 1998. Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 229:53-68.
- 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.
- 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, mo-

- lecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243-282.
- Ferraris M, S Radice, P Catalani, M Francolini, L Marabini and E Chiesara. 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquat. Toxicol.* 50:283-296.
- Georgopoulos C and W Welch. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:601-634.
- Hamed RR, NM Farid, SE Elowa and AM Abdalla. 2003. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *Environmentalist* 23:313-322.
- Hansson T, D Schiedek, KK Lehtonen, PJ Vuorinen, Liewenborg, E Noaksson, U Tjarnlund, M Hansson and L Balk. 2006. Biochemical biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). *Marine Poll. Bull.* 53:451-468.
- Hayes JD and DJ Pulford. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445-600.
- Hayes JD, JU Flanagan and IR Jowsey. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:51-88.
- Hu F, L Pan, M Xiu, Q Jin G Wang and C Wang. 2015. Bioaccumulation and detoxification responses in the scallop *Chlamys farreri* exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39:997-1007.
- Hughes VF, AK Trull, A Gimson, PJ Friend, N Jamieson, A Duncan, DG Wight, AT Prevost and GJ Alexander. 1997. Randomized trial to evaluate the clinical benefits of serum alpha-glutathione S-transferase concentration monitoring after liver transplantation. *Transplantation* 64:1446-1452.
- Kim TH, KJ Kim, MK Choi and IK Yeo. 2006. Physiological changes of juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute water-temperature stress. *J. Aquacult.* 77-83.
- Kregel KC. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92:2177-2186.
- Lane DJW, AR Beaumont and JR Hunter. 1985. Byssus drifting and the drifting threads of the young post larval mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 84:301-308.
- Lau PS and HL Wong. 2003. Effect of size, tissue and location on six biochemical markers in the greenlipped mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 46:1563-1572.
- Liu D, L Pan, Z Li, Y Cai and J Miao. 2014a. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo(a)pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107:251-259.
- Liu H, J He, C Chi and J Shao. 2014b. Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. *Gene* 543:166-173.
- Loguercio C, N Caporaso, C Tuccillo, F Morisco, G Del Vecchio Blanco and C Del Vecchio Blanco. 1998. Alpha-glutathione transferases in HCV-related chronic hepatitis: a new predictive index of response to interferon therapy? *J. Hepatol.* 28:390-395.
- Loomis SH, AD Ansell, RN Gibson and M Barnes. 1995. Freezing tolerance of marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 33:337-350.
- Luca-Abbott SB, BJ Richardson, KE McClellan, GJ Zheng, M Martin and PKS Lam. 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51:694-707.
- Myrnes B and IW Nilsen. 2007. Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.* 144:403-407.
- Nam BH, EM Park, YO Kim, DG Kim, YJ Jee, SJ Lee and CM An. 2013. Analysis of heat, cold or salinity stress-inducible genes in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, by suppression subtractive hybridization. *Korean J. Malacol.* 29:181-187.
- Newell RC and LH Kofoed. 1977. Adjustment of the components of energy balance in the gastropod *Crepidula fornicata* in response to thermal acclimation. *Mar. Biol.* 44:275-286.
- 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.
- Paul AJ and JM Paul. 1998. Respiration rate and thermal tolerances of pinto abalone *Haliotis kamtschatkana*. *J. Shellfish Res.* 17:743-745.
- Shin YK and CH Wi. 2004. Effect of temperature and salinity on survival and metabolism of the hard shelled mussel *Mytilus coruscus*, Bivalve: Mytilidae. *J. Aquacult.* 17:103-108.
- Werner I. 2004. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Mar. Environ. Res.* 58:803-807.
- Wi CH, YJ Chang, SJ Lee, YB Hur and JS Lee. 2003. Sexual maturation and gametogenic cycle of the Hard Shelled Mussel, *Mytilus coruscus* (Bivalvia: Mytilidae). *J. Aquacult.* 16:245-251.
- 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 Chaper-*



one. 17:589-601.

Yoo SK, KH Kang and DY Lee. 1988. Occurrence and survival rate of the larvae of sea mussel, *Mytilus edulis*. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 21:35-41.

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.

Received: 25 November 2015

Revised: 15 December 2015

Revision accepted: 16 December 2015