

# 빅벨리해마(*Hippocampus abdominalis*) 글루코코르티코이드 수용체의 분자 유전학적 동정과 발현 분석

조은영 · 오민영 · 이숙경 · 완창 · 이제희\*

제주대학교 해양생명과학과

## Molecular Genetic Characterization and Analysis of Glucocorticoid Receptor Expression in the Big-belly Seahorse *Hippocampus abdominalis*

Eunyoung Jo, Minyoung Oh, Sukkung Lee, Wan Qiang and Jehee Lee\*

Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones regulated through responses to stress to maintain diverse metabolic and homeostatic functions. GCs act on the glucocorticoid receptor (GR), a member of the nuclear receptor family. This study identified and characterized the GR gene from the big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* designating it HaGR. The open reading frame of the HaGR cDNA was 2,346 bp in length, encoding a 782-amino-acid polypeptide with a theoretical isoelectric point of 6.26 and predicted molecular mass of 86.8 kDa. Nuclear receptors share a common structural organization, comprising an N-terminal transactivation domain, DNA-binding domain, and C-terminal ligand-binding domain. The tissue-specific mRNA expression profile of HaGR was analyzed in healthy seahorses using a qPCR technique. HaGR mRNA was expressed ubiquitously in all of the tissues examined, with the highest expression levels in kidney, intestine, stomach, and gill tissues. The mRNA expression in response to immune challenge with lipopolysaccharide (LPS), polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C), *Edwardsiella tarda*, and *Streptococcus iniae* revealed that it is inducible in response to pathogen infection. These results suggest that HaGR is involved in the immune response of the big-belly seahorse.

Key words: Big-belly seahorse, Glucocorticoid receptor, Immune stimulation, Molecular profile, Tissue specific mRNA expression

### 서 론

스트레스란 다양한 자극에 대하여 나타나는 체내의 비특이적 반응이다(Selye, 1973). 어류는 상처와 포식활동, 질병, 오염물질과 같은 다양한 스트레스 요인에 노출되어 있으며, 과거부터 스트레스가 어류에 미치는 영향에 대한 많은 연구가 보고되었다(Barton and Iwama, 1991; Gamperl et al., 1994; Reid et al., 1998; Tort, 2011). 스트레스가 중추신경계에 전달되면 부신 피질자극호르몬 방출호르몬(corticotrophin-releasing hormone, CRH)이 뇌하수체에서 부신 피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)을 분비시키고, ACTH는 간신편포에

서 글루코코르티코이드(glucocorticoid)의 방출을 촉진시킨다. 글루코코르티코이드는 지질성분으로 세포 막을 자유롭게 통과하다 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor)와 결합함으로써 음성 또는 양성 조절되며 스트레스에 대항하여 생체의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다(Mommsen et al., 1999). 에너지원인 혈당량을 증가시키고, 면역체계에서는 염증 관련 유전자의 전사를 억제하며 그 결과 염증부위의 백혈구 이동, 사이토카인 유전자 및 고착분자의 발현이 억제되어 항 염증 작용을 나타낸다(Cato and Wade, 1996; De Bosscher et al., 2000). 그뿐만 아니라 염류세포와 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 활성화에 관여해 이온과 삼투압을 조절하며, 성장과 번식을 억제하는

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0346>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 48(3) 346-353, June 2015

Received 16 March 2015; Revised 1 May 2015; Accepted 11 May 2015

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3472 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: jehee@jejunu.ac.kr

등 다양한 생리적 기능을 수행한다(Mommsen et al., 1999).

글루코코르티코이드 작용을 매개하는 글루코코르티코이드 수용체는 안드로겐 수용체, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체와 같은 핵 호르몬 수용체의 한 종류로 N-terminal trans-activation domain (NTD), DNA binding-domain (DBD), C-terminal ligand binding domain (LBD)의 공통적인 도메인들을 가지고 있으며, 다음 과정을 통해서 전사 조절을 한다. 글루코코르티코이드와 결합하지 않은 경우 heat shock protein 90 (hsp90), hsp70, hsp50과 같은 샤페론 단백질과 결합하여 세포질에 존재하다가, 글루코코르티코이드와 결합하면 GR/hsp 복합체가 분리되어 글루코코르티코이드 수용체가 핵 안으로 이동하고, 핵 안으로 들어간 글루코코르티코이드 수용체는 glucocorticoid-responsive elements (GREs)와 결합해서 목표 유전자의 전사를 조절한다(Lee and Park, 2008; Nicolaidis, 2010).

글루코코르티코이드 수용체는 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Colombe et al., 2000), tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Tagawa et al., 1997), gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Acerete et al., 2007), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Tokuda et al., 1999) 등의 어류에서 cDNA 분석을 통해 유전자의 구조와 특성이 밝혀졌다.

빅벨리해마(*Hippocampus abdominalis*)는 해마 중에서도 큰 어종으로 큰가시고기목(Syngnathiformes), 실고기과(Syngnathidae)에 속하며 온대와 열대해역에서 서식한다. 머리는 몸통과 직각을 이루고, 꼬리는 기질에 감아 부착할 수 있으며, 수컷이 알을 보호하는 습성이 있다. 아시아 등지에서는 한약재로 사용되며 독특한 모양 덕분에 인기가 많아 산업적 가치가 매우 큰 어종이다(Lourie et al., 2004). 하지만 무분별한 남획, 서식지 파괴로 인해 개체 수가 크게 감소하였고 해마의 수요를 충족시킬 수 있는 방안으로서 양식이 제시되었다(Koldewey and Martin-Smith, 2010). 이미 뉴질랜드, 호주, 중국에서는 해마양식이 시도되었고(Woods, 2007), 최근 제주에서도 해마의 완전 양식이 성공하였다(Shin et al., 2011).

해마의 양식에서 다양한 병원성 질병이 발생하나 아직까지 뚜렷한 대체방안이 마련되지 않았으며 해마의 스트레스 반응과 면역에 대한 연구가 부족하다. 따라서 본 연구에서는 다양한 스트레스 자극 중 면역 자극에 초점을 맞추어 빅벨리해마(*H. abdominalis*) 글루코코르티코이드 수용체(HaGR) 유전자의 특징과 발현을 분석함으로써 해마의 면역체계에 대한 이해를 높이고자 한다.

## 재료 및 방법

HaGR (*Hippocampus abdominalis* Glucocorticoid Receptor)의 특징분석

454 GS FLX sequencing technique (Roche 454 Life science, USA)을 사용하여 빅벨리해마 cDNA 시퀀스 데이터베이스

를 구축하였다. HaGR의 cDNA와 아미노산 서열은 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)와 Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org/>)를 이용하여 분석하였고, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 이용하여 Domain을 확인하였다. EMBOSS Needle ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/))로 pairwise sequence alignment를 수행하였으며, ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)로 multiple sequence alignment를 하였다. 계통발생학적 분석은 MEGA 5.5의 neighbour-joining (NJ) method으로 5,000번의 bootstrap 반복하여 계통수를 그렸다.

## 시험어 및 감염 실험

제주도 제주시 제주 관상어 종묘센터(CCOR, <http://www.ccora.com/>)에서 빅벨리해마를 구입하여 1주일간 32 ± 1 psu, 18 ± 2 °C에서 순치시킨 후 실험에 사용하였다.

어류에 면역 스트레스를 주기위해 대조구(phosphate buffered saline), LPS (1.25 µg/µL), Poly I:C (1.5 µg/µL), *Edwardsiella tarda* (5 × 10<sup>5</sup> CFU/µL), *Streptococcus iniae* (1 × 10<sup>5</sup> CFU/µL)를 각각 빅벨리해마 30마리에 100 µL씩 복강 내 주사하였다.

## 조직분리, RNA 추출 및 cDNA 합성

다양한 조직에서의 HaGR의 발현분포를 확인하고자 건강한 해마의 꼬리를 절단하여 채혈한 뒤 원심 분리(4 °C, 3,000 g, 10 분)하여 혈장으로부터 혈액세포를 얻어냈고, 나머지 조직(뇌, 아가미, 심장, 장, 간, 신장, 근육, 표피, 비장, 위, 난소, 정소, 알주머니)도 해부하여 분리하였다. 감염실험에 따른 HaGR의 발현 변화를 분석하기 위해서 PBS를 포함한 면역자극제 주사 후 3, 6, 12, 24, 48, 72 시간마다 각 그룹별로 5마리의 해마를 해부하여 신장 조직을 분리하였으며, 실험에 이용하기 까지 모든 조직은 액체질소로 동결한 후 -80 °C에 보관하였다. 빅벨리해마 각 조직의 total RNA는 RNAiso plus (Takara, Japan)를 사용하여 추출하였고, RNA의 추출 정도를 알아보기 위하여 1.5% 아가로스겔에 전기영동하였으며, 농도는 µDrop Plate (Thermo Scientific, USA)을 사용하여 260 nm에서 측정하였다. 그 다음 각 샘플의 2.5 µg의 RNA로 PrimeScript 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

## qPCR에 의한 발현분석

HaGR의 발현양상은 Real Time System TP800 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa)를 이용하여 quantitative real-time PCR (qPCR)로 분석하였다. 빅벨리해마의 ribosomal protein S7 (Accession no. KP780177)을 reference gene으로 활용하였고 forward (5'-GCGGGAAGCATGTGGTCTTCATT-3')와 reverse (5'-ACTCCTGGGTCGCTTCTGCTTATT-3')의 oligonucleotide primer로 증폭하였다. HaGR의 cDNA 단편을 증폭하기 위해 사용된 oligonucleotide primer는 HaGR-F

(5'-TATGGCGAGTCCACCACGATTCA-3')와 HaGR-R (5'-GCTTCGTCGGAACACACCAAACA-3')이다. 각 조직으로부터 합성된 cDNA는 qPCR을 수행하기 위한 주형으로 사용하였으며, qPCR은 SYBR Premix Ex Taq 2X (TaKaRa)을 사용하여 95°C에서 30초간 1 cycle, 95°C에서 5초, 58°C에서 10초, 72°C에서 20초를 45 cycle, 95°C에서 15초, 60°C에서 30초, 95°C에서 15초간 1 cycle 반응하였고, 각 반응은 3번 반복 수행하였다.

### 통계적 분석

각 실험구와 대조구 사이는 SPSS Version 18 program (IBM, America)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후 Duncan's multiple range test로  $P < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

어류는 스트레스에 저항하여 다양한 반응을 보이는데 그 중 하나가 글루코코르티코이드의 방출이며(Chrousos, 1998; Barton, 2002), 이것이 수용체와 결합하여 중간 대사, 이온과 삼투압 조절, 면역 기능에 작·간접적으로 영향을 준다(McCOR-MICK, 1995; Bonga, 1997).

본 연구에서는 HaGR cDNA (Accession no. KJ756323)를 동정하였고, 특징과 발현 분석을 수행하였다. HaGR은 782개의 아미노산을 암호화하는 2,346 bp의 open reading frame (ORF)로 구성되었으며, 아미노산의 분자량은 86.8 kDa, 등전점은 6.26으로 추정되었다. 글루코코르티코이드 수용체의 도메인구조에서 NTD는 transactivation domain인 activation function-1 (AF-1)을 가지고 있고 리간드와 독립적으로 활성화된다. DBD는 핵 호르몬 수용체에서 가장 보존된 부위로 4개의 cysteine

잔기에 둘러싸여 아연과 반응하는 2개의 zinc finger가 존재하며 GREs라 불리는 특정 DNA의 시퀀스에 부착한다. DBD와 LBD 사이에는 hinge 부위가 존재하는데 이는 구조적 유동성을 가지고 있어 하나의 수용체가 다양한 GREs와 결합하도록 하고, LBD는 가장 큰 도메인으로 AF-2를 포함하며 리간드 인식, 수용체의 이합체, 핵으로 전좌 등의 기능을 담당한다(Nicolaidis et al., 2010). HaGR cDNA와 아미노산 시퀀스 분석결과, DNA-binding 특이성을 나타내는 AGGTCA motif가 확인되었고, 416-496번 아미노산은 핵 호르몬 수용체에 존재하는 C4 zinc finger이며, 570-734번 아미노산은 LBD였다(Fig. 1).

HaGR 아미노산을 다른 어종의 GR과 비교 분석(pairwise alignment)하였을 때, 동일성과 유사성은 European flounder에서 가장 높았으며, red drum과는 77.3%, princess of burundi와는 76.9%, Nile tilapia와는 76.8%, European seabass와는 76.5%의 유사성을 보였다(Table 1).

Multiple sequence alignment 결과 HaGR에서 하나의 C4 zinc finger domain에서 보존된 4개의 cysteine 잔기 C<sup>419</sup>, C<sup>422</sup>, C<sup>436</sup>, C<sup>439</sup>를 확인하였고, 다른 하나의 C4 zinc finger domain에서도 4개의 cysteine 잔기 C<sup>464</sup>, C<sup>470</sup>, C<sup>480</sup>, C<sup>483</sup>을 확인할 수 있었다(Fig. 2). HaGR은 다양한 어류들과 계통발생학적으로 가까이 같은 cluster 안에 위치하고 양서류 및 포유류와는 계통발생학적으로 거리가 멀어 다른 cluster에 위치하였다(Fig. 3).

HaGR의 조직별 발현분석 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 다른 어류의 글루코코르티코이드 수용체는 아가미, 신장, 비장, 뇌, 간을 포함한 다양한 조직에서 발현된다고 보고되었는데(Sandor et al., 1984; Lee et al., 1992; Vazzana et al., 2008), HaGR 역시 조직 별로 차이는 있었지만 모든 조직에서 광범위하게 발현되었다. 경골어류의 면역기관인 신장에서 HaGR의 발현이

Table 1. Percent identities and similarities of HaGR gene with glucocorticoid receptor genes from other species

Common name	Scientific name	Accession number	Identity (%)	Similarity (%)
European flounder	<i>Platichthys flesus</i>	AEX56588.1	70.0	78.9
Red drum	<i>Sciaenops ocellatus</i>	ADI48099.1	68.3	77.3
European seabass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AAS48459.1	67.9	76.5
Princess of burundi	<i>Neolamprologus brichardi</i>	XP_006785026.1	67.4	76.9
Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003446987.1	67.3	76.8
Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	ACS91455.1	51.8	62.3
Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	NP_001018547.2	47.6	61.7
Asiatic ricefish	<i>Oryzias latipes</i>	NP_001156605.1	48.3	60.7
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	NP_001032915.1	44.8	57.1
Wild boar	<i>Sus scrofa</i>	NP_001008481.1	42.8	55.2
Human	<i>Homo sapiens</i>	CAJ65924.1	42.0	55.1
House mouse	<i>Mus musculus</i>	NP_032199.3	41.1	54.5
African clawed frog	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001081531.1	42.0	54.4
Brown rat	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_036708.2	40.6	52.7

1 ATGGACCAGGGCATCTTGAAGTGCAACAGTAATCAAGCAGACTCCCTGACATTCATAGAGTTGGGAACCAGAGAATGCAAGAGGCAGCT 30  
M D Q G I L K C N S N Q D D S L T F I E L G T R E C K E A A A  
91 GACACCATTGCTTCCCTGCTGCGCGCTCCACCCATTTCGCCAAATGGGGAGGAACCAAGACCAGCTGGAGCCCGAATCCTCCTC 60  
D T T A S L L C A L H P I S P N G G G T K D Q L E P G I L L  
181 GACTCCACCAGCAGCGTCAGGCCCTGTTCGAAGGGTCGAACACAAATGATCAGAAAATGGTCAGAATAGAGAAACGGCAGCAGGATGTC 90  
D S H Q Q R Q A L F E G S N T N D Q K M V R I E K R Q Q D V  
271 GCGGTGTTAATGAGGAGGATTGGCGCTGCTGAGCCAAAATATTGCCGATCTGGACAACGTGCTCCTGCTGTCATCAGCACCTCC 120  
G V F N I E E D L A L L S Q N I A D L D N V S S S V I S T S  
361 GTCCTGGAAACCTTCTCCTGACCTTTTCCCCAGCACATCAAACAGGAAGTAGACTTCTCCCTGGATAAAGAATTGGGATCTTAC 150  
V L G N L P L P D L F P Q H I K Q E V D F S L D K E L G S Y  
451 GGAGGACTTCCCTCCGAACTTCTGCGATTGACAGCGGCATCGCTGATTGAAGACAGTGAGCTTTGGAAAGACTGGACCTTCCG 180  
G G L P S A T S C D L T G G T R L I E D S E L W K D L D L P  
541 GGATCCCTGCCAGAGATCAGCGACTTTGAGCTGGATTCCGAAGTGGCTCACTGGATAACATCCTGACAGCAGCGCAGACTTCCCGGA 210  
G S L P E I S D F E L D S E V A H L D N I L H D D G R L A G  
631 GGCTGCCAAAAGCTATGCAAGTCTAACGGGCAATGGCGGAACTGTTATGCTAATGGCACCGGCCAGCAGCATCATAACGTGCTCCAC 240  
G L P K A M Q V L T G N G G N C Y A N G T G Q Q H H N V L H  
721 CCTCCTCACCAGCAGCATCACCTTCTCAGCACCAAGTTCACCCAGCATCAGCAGCCCGCATCCCTTCTCAAGCGTCATCATCAA 270  
P P H Q Q H H L L Q H Q V H P Q H Q Q P A S L L S S V I I K  
811 GAAGAGGACCCGACAACTCTTCGCCACATCCGTACTCCAGTATGGTCAAGCAGGAGAAGCAGGAGCTGTGTTCTGCCAGGCACAG 300  
E E D R D N P F A H I R T P S M V K Q E K Q E P V F C Q A Q  
901 TGCTCCAGGGAGGCATGGGTTGCGTTTATTAGAGCCCGATGCTCCTGCTGATGAGCGTGGACGCGGCTGGCTATGCTTGCAGAACC 330  
C L Q G G M G S V H L G A P M S S S M S V D A A G Y R C R T  
991 AACGCGCCCTCCATATGGTCAACAACCCGGAAGCCCTTGGCATGCACTCAAACCTGCTCCTATGGGAGAGAGCTGGATGCGAGGG 360  
N A P S T M G Q Q P R K P F A M H S N L S S L G E S W M R G  
1081 GACGGGTATGGCGATCCACCAGATTCAAAGGACTAACGATGGGCTCCCAACACGTCGATGTTGATGTCATACCCGCTCAGCTTCTCC 390  
D G Y G E S T T I Q R T N D G L P N T S M L M S Y P L S F S  
1171 AGCGCAACCCAGAGCAGGAGCAGACCCCAACAGTTCTGCTGCGGGTCAATCGAAACCAACGGGCAGACCCACAAAGTGTGTTG 420  
S A T P R A G A D P N S S V V P G Q S K P N G Q T H K V C L  
1261 GTGTGTTGGGAGGCTCCGGATGCCACTACGGGGTGGTAACGTGCGGACGTCGAAGTTTCTTCAAGAGGCGCGTGGAGGATGG 450  
V C S D E A S G C H Y G V V T C G S C K V F F K R A V E G W  
1351 AGAGCAGCAAAAAGCGATGGCCAGCACAACCTACCTGTCGCGAGGAAGGAACGACTGCATCATGATAAAGATCCGAGGAAAACTGT 480  
R A R Q K S D G Q H N Y L C A G R N D C I I D K I R R K N C  
1441 CCAGCTGCGGCTTCCGCAATGCCTTACGGCAGGAATGAATTTGGAAGCGAGGAACAAGAACTGAAGAGGAGAGAGCATCAGAGC 510  
P A C R F R K C L Q A G M N L E A R K N K K L K R R E H Q S  
1531 GTCCGAGCGCTGGAGCCCGCTCCCTCCATGCCCGTGGCGGTTCATCCCGCCTGATGCCCCAGTTGGTGCCCGCATGCTGTCGGTG 540  
V R A L E P A V P S M P V A V I P A C M P Q L V P A M L S V  
1621 CTCCAGGCATCGAGCCGAGATCATCTACTCGGGTACGACGGAACGCTGCCGACAGCTGCTGCGCCTGATGAGCAGCTCAACAAG 570  
L Q A I E P E I I Y S G Y D G T L P D T S S R L M S T L N K  
1711 CTCGGGGGAGCAGGTCATCTCGCCGCTCAAGTGGCCAAGTCCGTCAGGCTCCGTAACCTGCACCTGGACGACAGATGACATG 600  
L G G Q Q V I S A V K W A K S L P G F R N L H L D D Q M T L  
1801 TTGAGTGTCTGCTTCTCCTCATGCTTCTCAGTCTGGGCTGGAGGTCGTACAAGCAGTGAACGGGAGCATGCTGCTGCTCGCCCC 630  
L Q C S W L F L M S F S L G W R S Y K Q C N G S M L C F A P  
1891 GACCTGTCATCAACCAAGAACGGATGAAGCTTCCCTACATGACGGAGCAGTGGCAGCAGATGCTGAAGATCTGCACGGAGTTTGTGCGT 660  
D L V I N Q E R M K L P Y M T E Q C E Q M L K I C T E F V R  
1981 CTGGAGGTGCTACGACGAGTACCTGTGATGAAAGTACTGCTGCTTCTCAGCACAGTCCGAAAGACGGGCTAAAGATCAGGCGGTG 690  
L E V S Y D E Y L C M K V L L L L S T V P K D G L K S Q A V  
2071 TTCGACGAGATCCGATGACGTACATCAAAAGACTGGGAAAAGCCATCGTCAAGCGAGAGGAGAACCAGCCAGAAGTGGCAACGCTTC 720  
F D E I R M T Y I K E L G K A I V K R E E N T S Q N W Q R F  
2161 TACCAGCTGACTAAGCTACTGGACTCCATGACGGGATGGTAGAGGATCTCCTCCACATTTGCTTCTACATTCATGAACAAGCAGCTG 750  
Y Q L T K L L D S M Q G M V E D L L H I C F Y T F M N K T L  
2251 AGTGTGGAGTTCCCGAGATGCTGGCGGAGATCATCAACCAAGATACCAAAAGTCAAAGACGGCAGCTCAAGCAGCTCCTCTTTCAT 780  
S V E F P E M L A E I I T N Q I P K V K D G S V K Q L L F H  
2341 CAGAAGTGA  
Q K \*

Fig. 1. The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of HaGR from *Hippocampus abdominalis*. The nucleotides are numbered on the left margin and amino acids are on the right margin. The stop codon is indicated by asterisk (\*). C4 zinc finger is underlined and ligand binding domain is be noted by a grey background. A short motif responsible for DNA-binding in a box.



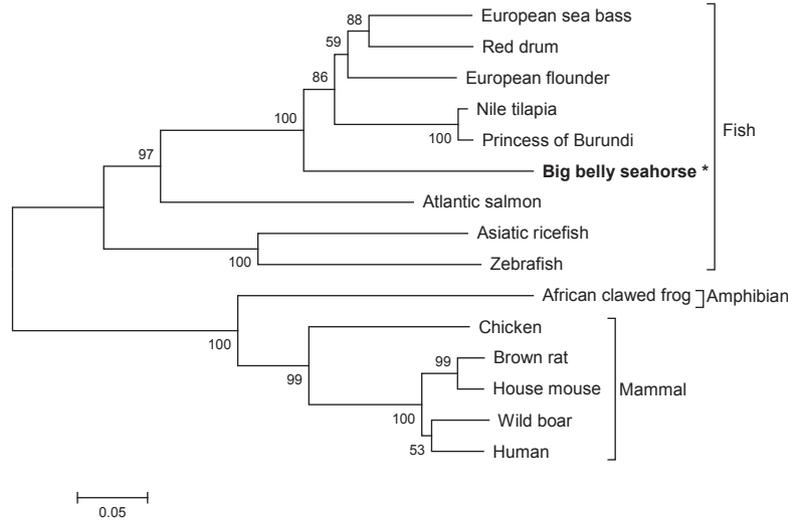


Fig. 3. Phylogenetic re-construction tree of glucocorticoid receptor constructed with MEGA 5.5. The bootstrap confidence values shown at the nodes of the tree are based on 5,000 bootstrap replications.

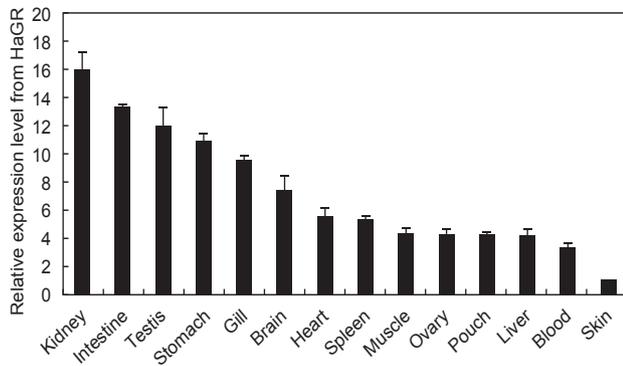


Fig. 4. Tissue-expression of HaGR mRNA determined by qPCR. Big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* ribosomal protein S7 was used as a reference gene. The relative mRNA level was compared with skin expression. Data are presented as mean values (n=3) with error bars representing SD.

가장 높았는데 이는 수용체와 결합한 글루코코르티코이드가 면역체계와 상호작용하여 다양한 면역을 조절하기 위함으로 생각된다(Weyts et al., 1998; Wang et al., 2005; Zapata et al., 2006; Castillo et al., 2009). 또한, 다른 조직에 비해 아가미와 장에서도 높은 발현을 보였다. 글루코코르티코이드는 아가미에서  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 활성을 높이고, 염류세포의 크기와 분화를 촉진하며 장에서는 이온 및 물의 흡수를 증가시키는 기능을 한다. 따라서, HaGR의 발현이 삼투압과 전해질 조절과 관련 있는 조직에서 높았음을 알 수 있다(Mommsen et al., 1999; Takahashi et al., 2006). 스트레스에 노출되었을 때 글루코코르티코이드는 정소의 테스토스테론의 방출을 억제하여 번식 대신 다른 대사

활동으로 우회시키는데, 이러한 기능을 수행하기 위해서 정소에서 글루코코르티코이드 수용체의 발현이 높은 것으로 보인다(Hu et al., 2008).

면역 자극에 따른 HaGR의 발현양상을 분석하고자 LPS, Poly I:C, *E. tarda*, *S. iniae*를 인위 감염시킨 빅벨리해마의 신장 조직을 사용하여 qPCR을 수행한 결과, HaGR의 발현양상은 Poly I:C 감염 후에는 점차적으로 감소하여 12시간째에서 가장 낮았으며, 그 후에 다시 점차적으로 증가함을 알 수 있었다. *E. tarda*와 *S. iniae* 감염 후에는 HaGR의 발현량이 48시간, 72시간에서 유의적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 5). 다양한 면역 자극에 따라 유도되는 HaGR의 발현 변화는 조금씩 다르지만 대체적으로 감소되는 경향을 보였는데 이러한 HaGR 발현 감소는 글루코코르티코이드 수용체의 항 염증 기능과 관련된 것으로 보인다. 글루코코르티코이드 수용체는 사이토카인, 사이토카인 수용체, 화학주성 인자와 같은 염증관련 유전자를 활성화시키는 전사인자 NF- $\kappa$ B의 활성을 감소시키거나 GR/NF- $\kappa$ B 복합체를 형성함으로써 NF- $\kappa$ B가 DNA에 결합하는 것을 방해하여 염증관련 유전자의 활성을 억제한다(Cato and Wade, 1996; Schottelius and Baldwin, 1999). 따라서 병원균 침입 시 HaGR이 감소되면서 염증관련 유전자가 활성화되어 감염으로부터 생체를 방어하는 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 HaGR을 분자학적 특성을 분석하였으며 건강한 빅벨리해마의 조직과 감염 후의 신장 조직에서의 HaGR의 발현양상을 확인함으로써 해마의 면역기전에 대한 이해를 도왔다. 추후 이 유전자의 면역, 삼투압과 전해질 조절과 같은 생리학적 기능을 이해하기 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

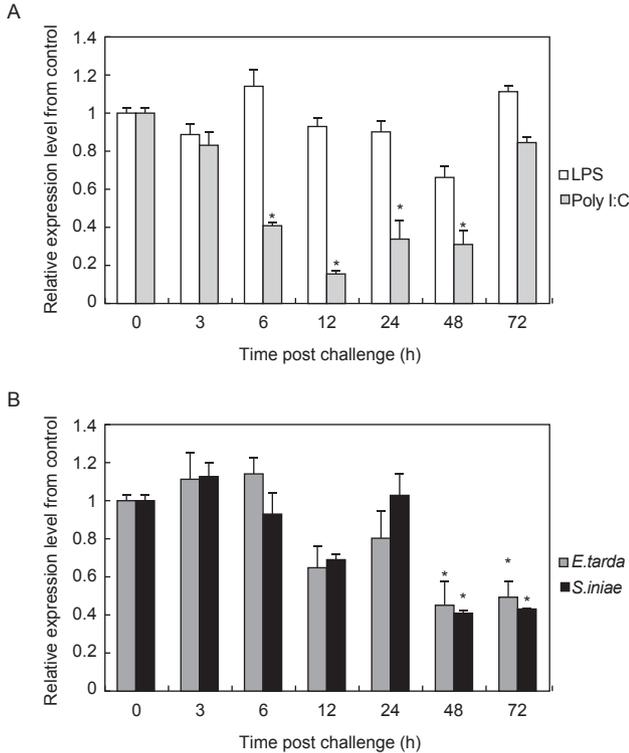


Fig. 5. Analysis of HaGR mRNA expression in kidney upon synthetic immunostimulants (LPS and Poly I:C) (A) and live bacterial pathogen (*Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae*) (B) challenges as determined by the SYBR Green qPCR assay. The relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method by using big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* ribosomal protein S7 as the reference gene with respect to corresponding PBS-injected controls at each time point. Vertical bars represent the mean SDs (n = 3); \*P < 0.05.

## 사 사

이 논문은 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (수산백신연구센터)

## References

- Acerete L, Balasch J, Castellana B, Redruello B, Roher N, Canario A, Planas J, MacKenzie S and Tort L. 2007. Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*): differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Molec Biol* 148, 32-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.04.015>.
- Barton BA. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *ICB* 42, 517-525. <http://dx.doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.
- Barton BA and Iwama GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann Rev Fish Dis* 1, 3-26. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G).
- Bonga SW. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* 77, 591-625.
- Castillo J, Teles M, Mackenzie S and Tort L. 2009. Stress-related hormones modulate cytokine expression in the head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol* 27, 493-499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.021>.
- Cato AC and Wade E. 1996. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* 18, 371-378. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.950180507>.
- Chrousos GP. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: the 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* 851, 311-335. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x>.
- Colombe L, Fostier A, Bury N, Pakdel F and Guiguen Y. 2000. A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: cloning and characterization of its steroid binding domain. *Steroids* 65, 319-328. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00090-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00090-8).
- De Bosscher K, Berghe WV and Haegeman G. 2000. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol* 109, 16-22. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00297-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00297-6).
- Gamperl A, Vijayan M and Boutilier R. 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev Fish Biol Fisher* 4, 215-255. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00044129>.
- Hu GX, Lian QQ, Lin H, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP and Ge RS. 2008. Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids* 73, 1018-1024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.020>.
- Koldewey HJ and Martin-Smith KM. 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.010>.
- Lee EK and Park YJ. 2008. Metabolic Regulation of Nuclear Receptors. *Endocrinol Metab Clin N Am* 23, 155-164. <http://dx.doi.org/10.3803/jkes.2008.23.3.155>.
- Lee P, Goodrich M, Struve M, Yoon H and Weber D. 1992. Liver and brain glucocorticoid receptor in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: down-regulation by dexamethasone. *Gen Comp Endocrinol* 87, 222-231. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(92\)90026-G](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(92)90026-G).
- Lourie SA, Foster SJ, Cooper EW and Vincent AC. 2004. A guide to the identification of seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America, Washington D.C., U.S.A.
- McCormick SD. 1995. 11 Hormonal Control of Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and Chloride Cell Function. *Fish Physiol* 14, 285-

315. [http://dx.doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60250-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60250-2).
- Mommsen TP, Vijayan MM and Moon TW. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 9, 211-268. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008924418720>.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP and Charmandari E. 2010. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2009.09.002>.
- Reid SG, Bernier NJ and Perry SF. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 120, 1-27. [http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00037-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00037-1).
- Sandor T, DiBattista JA and Mehdi AZ. 1984. Glucocorticoid receptors in the gill tissue of fish. *Gen Comp Endocrinol* 53, 353-364. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(84\)90262-4](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(84)90262-4).
- Schottelius A and Baldwin Jr A. 1999. A role for transcription factor NF- $\kappa$ B in intestinal inflammation. *nt J Colorectal Dis* 14, 18-28. <http://dx.doi.org/10.1007/s003840050178>.
- Selye H. 1973. The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *AmSci* 61, 692-699.
- Shin SP, Han JE, Gomez DK, Kim JH, Choresca Jr CH, Jun JW and Park SC. 2011. Identification of scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* from indo-pacific seahorses *Hippocampus kuda*. *Afr J Microbiol Res* 5, 738-741.
- Tagawa M, Hagiwara H, Takemura A, Hirose S and Hirano T. 1997. Partial cloning of the hormone-binding domain of the cortisol receptor in tilapia, *Oreochromis mossambicus*, and changes in the mRNA level during embryonic development. *Gen Comp Endocrinol* 108, 132-140. <http://dx.doi.org/10.1006/gcen.1997.6955>.
- Takahashi H, Sakamoto T, Hyodo S, Shepherd BS, Kaneko T and Grau EG. 2006. Expression of glucocorticoid receptor in the intestine of a euryhaline teleost, the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): effect of seawater exposure and cortisol treatment. *Life Sci* 78, 2329-2335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.050>.
- Tokuda Y, Touhata K, Kinoshita M, Toyohara H, Sakaguchi M, Yokoyama Y, Ichikawa T and Yamashita S. 1999. Sequence and expression of a cDNA encoding japanese flounder glucocorticoid receptor. *Fish Sci* 65, 466-471. <http://dx.doi.org/10.2331/fishsci.65.466>.
- Tort L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol* 35, 1366-1375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.
- Vazzana M, Vizzini A, Salerno G, Di Bella M, Celi M and Parinello N. 2008. Expression of a glucocorticoid receptor (DIGR1) in several tissues of the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Tissue Cell* 40, 89-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2007.09.008>.
- Wang W, Li A, Cai T and Wang J. 2005. Effects of intraperitoneal injection of cortisol on non-specific immune functions of *Ctenopharyngodon idella*. *J Fish Biol* 67, 779-793. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00779.x>.
- Weyts F, Flik G and Verburg-van Kemenade B. 1998. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Dev Comp Immunol* 22, 563-572. [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(98\)00027-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00027-5).
- Woods C. 2007. Aquaculture of the big-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis* Lesson 1827 (Teleostei: Syngnathidae). Ph.D. Thesis, Victoria University, Melbourne, Australia
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-de Frias C and Cortes A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol* 20, 126-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>.