

Molecular Cloning and Expression Analysis of Red-spotted Grouper, *Epinephelus akaara* Hsp70

Byung Hwa Min¹, Jun Wook Hur² and Hyung Jun Park^{3*}

¹Aquaculture Industry Research Division, East Sea Fisheries Research Institute, Gangneung 25435, Korea

²Bio-Monitoring Center, Sejong 30121, Korea

³Aquaculture Management Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Received January 17, 2018 / Revised February 19, 2018 / Accepted February 19, 2018

A new heat shock protein 70 was identified in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) based on an expression analysis. The cDNA of red-spotted grouper Hsp70 (designated RgHsp70) was cloned by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The full-length of RgHsp70 cDNA was 2,152 bp, consisting of a 5'-terminal untranslated region (UTR) of 105 bp, a 3'-terminal UTR of 274 bp, and an open reading frame (ORF) of 1,773 bp that encode a polypeptide of 590 amino acids with a theoretical molecular weight of 64.9 kDa and an estimated isoelectric point of 5.2. Multiple alignment and phylogenetic analyses revealed that the RgHsp70 gene shares a high similarity with other Hsp70 fish genes. RgHsp70 contained all three classical Hsp70 family signatures. The results indicated the RgHsp70 is a member of the heat shock protein 70 family. RgHsp70 mRNA was predominately expressed in the liver, with reduced expression noted in the head-kidney tissues. The expression analysis of different water temperatures (21, 18, 15 and 12°C) for sampled livers revealed that expression gradually increased at 12°C compared to 21°C. In this study, the effects of water temperature lowering on the physiological conditions were investigated, and the results revealed that novel RgHsp70 may be an important molecule involved in stress responses.

Key words : *Epinephelus akaara*, expression, Hsp70, RACE PCR, quantitative real-time PCR

서 론

Heat shock protein (Hsp)은 원핵생물과 진핵생물에 이르기까지 세포 내 어디에서나 다양하게 존재하고, 계통발생학적으로 매우 잘 보존되어진 단백질이다[15, 23]. 대부분의 Hsps는 다양한 생리학적 혼란이나 수온, 염분, 용존산소, 미생물의 감염 및 기타 요인으로 인해 발현의 변화를 보이며, 어류의 스트레스 biomarker로 잘 알려져 있다[23, 25]. 또한 Hsps는 단백질의 응집을 돕는 molecular chaperones로써의 기능을 가지며, 스트레스로 인해 손상된 세포를 회복시키는 역할과 더불어 병원체에 대한 면역반응을 증가시키는데 관여한다[2, 20, 27]. Hsps는 스트레스 반응과 분자생물학적인 진화에 관한 연구에 유용하게 이용되고 있고[7, 12, 17, 23], 분자량(molecular weight)에 기초하여 Hsp90 (85-95 kDa), Hsp70 (68-73 kDa), Hsp60과 Hsp47, 저분자량의 Hsps (16-24 kDa)의 등급으로 나눌 수 있다[19].

이 중, Hsp70은 온도에 의한 스트레스로 인해 유도되는 단백질로 잘 알려져 있으며, 분자 샤페론(molecular chaperone)의 기능적 측면에서 외부의 요인으로부터 세포 내 단백질간의 상호작용을 일으킴으로써, 세포 내 단백질을 보호한다[7, 19]. 세포 내 단백질의 손상이 발생하면 발현의 변화를 보이고, 발생된 heat shock factors (HSFs)를 의해 변성된 단백질을 시토솔(cytosol) 및 다른 Hsps family들간의 상호작용을 통해 HSFs를 분열시키면서 단백질을 활성화시킨다. 다양한 요인으로 인해 발생된 스트레스로부터 생체를 보호하기 위한 기작으로 Hsp70은 세포 내 단백질의 다양한 전사와 합성을 유발하며, 세포 내 단백질의 본래 기능 및 회복을 돕는다[24].

선행의 연구에서 어류로부터 알려진 Hsp70 gene에 관한 연구가 다수 보고되어진 바 있으며 이 중, Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala* [16], channel catfish, *Ictalurus punctatus* [22], zebrafish, *Danio rerio* [8], rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [18], humphead snapper, *Lutjanus sanguineus* [26] 등의 경골어류로부터 Hsp70에 대한 분자생물학적인 특성 및 발현에 관한 연구가 있다.

붉바리(*Epinephelus akaara*)는 한국, 일본 등 서태평양 해역의 암반에 주로 서식하고, 온대성 어종으로 알려져 있다. 또한, 붉바리는 한국과 일본에서 고급 어종으로 소비되며 그 수요가 증가하고 있는 추세이다. 특히, 한국에서는 이미 붉바리의 종묘생산 및 양성에 관한 기술을 확립한 바 있으며, 최근 NIFS

*Corresponding author

Tel : +82-51-720-2432, Fax : +82-51-720-2439

E-mail : phj3812@hanmail.net

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.

(National Institute of Fisheries Science)에서는 이 어종에 대한 해외수출 및 장거리 수송을 위한 기술을 개발하고 있다.

이에 본 연구에서는 아직까지 밝혀지지 않은 붉바리의 Hsp70 gene을 cloning 및 RACE technique를 이용하여 RgHsp70 full-length cDNA를 확보하고, 분자생물학적인 특성과 발현을 분석하였으며, 수온별로 노출시킨 붉바리 간 조직으로부터 Hsp70 mRNA 발현과의 관련성을 확인하고자 하였다. 이 후, 본 연구결과를 바탕으로 해외수출 및 장거리 수송에 따른 붉바리의 적정 수온을 구명하는데 있어 주요 스트레스 지표로 응용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어 및 실험조건

실험어는 국립수산물학원에서 사육하고 있는 평균 전장 11.2±1.5 cm, 평균 전중 75.0±10.5 g의 건강한 붉바리를 실험에 사용하였고, 1 ton 원형수조에서 aeration을 공급하며 25.0±0.5℃의 조건으로 사육하였다. 수온별 실험을 위해, 히터와 냉각기가 설치되어 있는 50 l 사각수조에 21, 18, 15 및 12℃ 구간으로 나누어 각각 20마리씩 수용하였고, 수온별 노출 48시간 후, 생존율 및 발현분석을 위한 조직을 적출하는데 이용하였다. 48시간의 노출조건은 중국 및 대만의 해외 장거리 수송 시 소요되는 시간으로써, 이 연구에 적용하였다.

RgHsp70 full-length cDNA의 Cloning 및 sequencing

붉바리 Hsp70 full-length cDNA의 확인을 위해 이전에 보고된 orange-spotted grouper Hsp70 (Accession No. FJ600726) sequence를 토대로 primer를 제작하여 분석하였다. 이 실험에 사용된 primer는 Table 1에 나타내었다.

Total RNA는 실험어로부터 적출한 간 조직으로부터 TRizol Reagent (Gibco/BRL, USA)를 이용하여 추출하였다. 분리된

1 µg의 RNA를 주형으로 하여 Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche, USA)를 통해 제작자의 지시에 따라 cDNA로 합성하였다. PCR은 TaKaRa Taq (TaKaRa, Japan)을 이용하여 수행하였고, 그 조건은 다음과 같다: 95℃에서 3분 동안 initial denaturation 과정을 거친 후에, 95℃에서 30초 동안 denaturation, 56℃에서 30초 동안 annealing, 72℃에서 1분 동안 extension 반응을 30 주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 agarose gel에 전기영동 하여 얻어진 DNA 밴드를 잘라내고 정제하였다. 준비된 DNA 산물을 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)와 ligation 시킨 후, ligation시킨 반응물은 DH5α competent cells (RBC Life Sciences, Korea)를 이용하여 형질 전환 하였다. Plasmid DNA는 LaboPass Plasmid DNA Purification Kit (Cosmo, Korea)를 이용하여 분리하였고, 추출된 plasmid DNA를 ABI DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

확인된 nucleotide 및 아미노산 sequence는 multiple sequence alignment 분석을 위해 Genetyx ver. 8.0을 사용하였다. Hsp70 cDNA의 sequence는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 비교, 분석하였다.

붉바리 Hsp70의 계통발생분석은 MEGA4 software package에서 neighbor-joining (NJ) 법을 이용하여 분석하였다. 이전에 보고된 Hsp70 family의 아미노산 분석을 위해, 다양한 경골어류들과 비교하였으며, 2,000번의 bootstrap 반복, 수행하여 확인하였다.

RgHsp70 full-length cDNA의 확인

RgHsp70 full-length cDNA sequence를 얻기 위해 oligo (dT) anchor primer (5'-CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA T(T)₁₈-3')와 CapFishing™ adaptor (Seegene, Korea)를 이용하여 합성하였다. 간의 RACE-Ready cDNA를 template로 하여

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sereal no.	Sequence (5'-3')	Location
Degenerate primers	F1	CASKCSGACATGAAGCACTGG	221-252
	R1	TGATGGTGATCTTGTCTCC	1,483-1,502
5' RACE	F2	GGAGGATGAGGGGCTTFGCTG	1,693-1,713
	R2	TTCATCGTTCTCGGCAGTCT	1,788-1,807
3' RACE	F3	TCTACACCTCCATCACCAGG	850-869
	R3	TGATGCTCTTGTCACCAGG	1,062-1,081
Real-time PCR RgHsp70	F4	TGTTGTCGCTGATGTCCTTC	1,602-1,621
	R4	TTCATCCTTCTCGGCAGTCT	1,679-1,698
RT-PCR RgHsp70	F5	TGAGGTC AAGTCCACAGCAG	576-595
	R5	TGGCAAGATCAGTGAAGACG	675-694
Rgβ-actin	F6	CTCTCCAGCCTCCTTCTT	781-799
	R6	GTGTTGGCGTACAGGTCCTT	871-890

target primer (TP)와 gene specific primer (GSP)를 이용한 일련의 RACE-PCR을 진행하였다.

3' RACE 및 5' RACE에 사용된 gene specific primer (GSP)와 target gene primer (TGP)는 Table 1에 각각 나타내었다. 5 µl의 cDNA는 GSP와 TGP를 SeeAmpTaq Plus Master Mix가 포함된 50-µl PCR시약을 이용하여 분리하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 과정을 거친 후에, 95°C에서 1분 동안의 denaturation, 62°C에서 30초 동안의 annealing, 72°C에서 2분 동안의 extension 반응을 40주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다.

증폭된 PCR산물은 1% agarose gel을 이용한 전기영동을 통해 분리하였으며, 그 다음 과정은 앞에서 서술한 cDNA의 합성방법과 동일하다.

RgHsp70 발현분석(RT-PCR 및 QPCR)

조직별 발현분석을 위하여 정상어로부터 간, 두신, 후신, 비장, 아가미, 장, 뇌와 근육을 적출했고, 수온별 간 조직의 발현 분석을 위해 수온별 50 l 사각수조에서 3마리씩 샘플링하여 48시간 후에 간 조직을 적출 한 뒤, total RNA와 cDNA를 확보하여 RT (reverse transcription)-PCR 및 real-time PCR 분석에 사용되었다. Total RNA와 cDNA의 분리는 위와 동일한 방법을 통해 확보하였다.

조직별 발현분석 및 수온별 간 조직에서 Hsp70 gene의 mRNA transcription을 조사하기 위해, real-time PCR 반응 조건은 다음과 같다. 95°C에서 20초 동안 denaturation, 56°C에서 20초 동안 annealing을 총 40회 실시하였다. 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다.

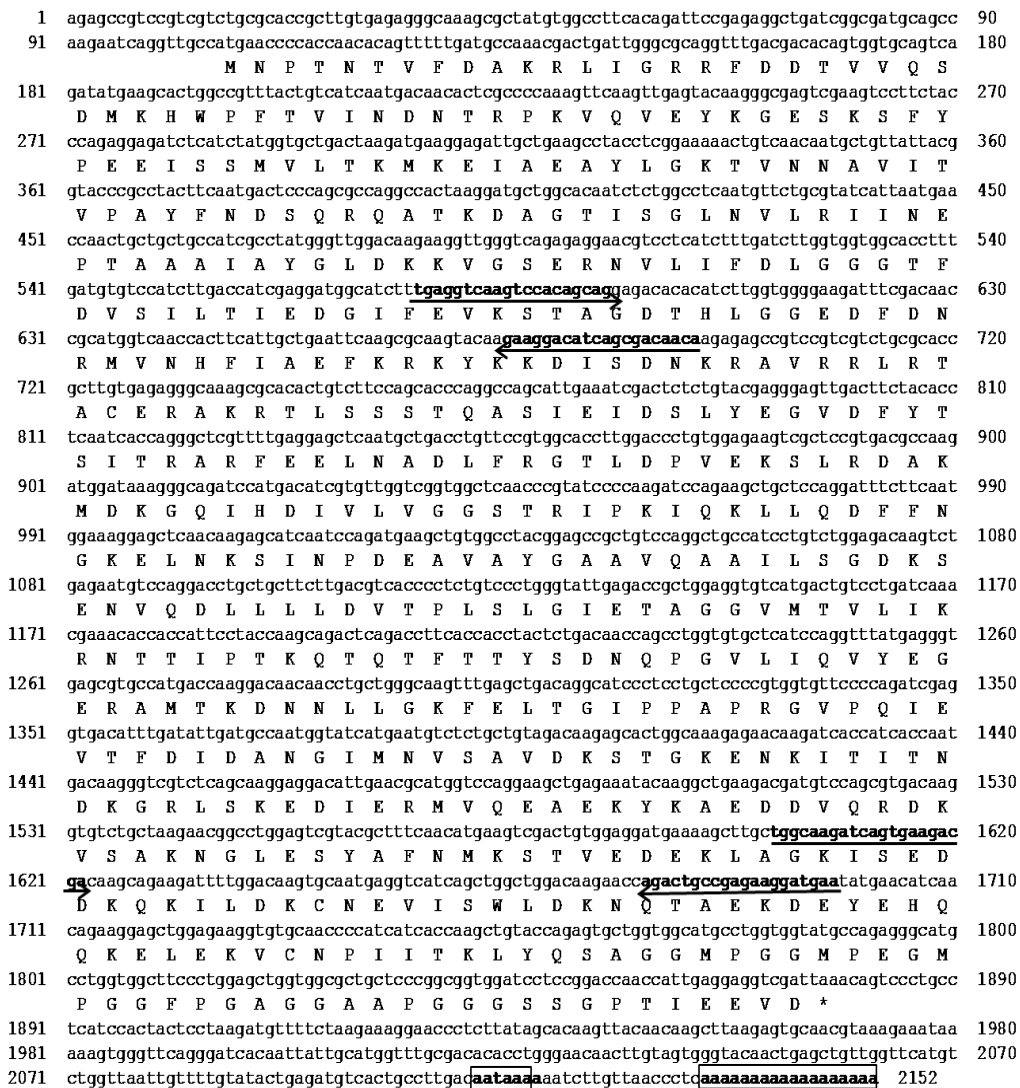


Fig. 1. The cDNA and deduced amino acid sequences of RgHsp70 from red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Amino acid residues in the mature protein are assigned a positive number, and those in the single peptide are assigned negative number. The RgHsp70 primers (forward and reverse) are arrow, its polyadenylation signal sequence AATAAA and poly (A) tail are in boxed.

Red-spotted grouper	1:-----MNPNTVTF	8
Amazon molly	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Annual killifish	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Asian swamp eel	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVFVLMETISIGAGFLKFKGSGFA	89
Black porgy	1:MAPAKVAIGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNHLALNPNNTV-----	70
Grass carp	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Guppy	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Humphead snapper	1:MSAAGVAIGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	70
Japanese flounder	1:MSAAGVIGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	70
Killifish	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Mummichog	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Nile tilapia	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Silver carp	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Southern patyfish	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Zebra mbuna	1:--MSKGPVAVGIDLGGTYSVGVVFGHQKVEIANDGGRNRTTSPVAFDTERLIGDAAKNVAMNPTNIVF-----	68
Hsp70 family signature 1		
Red-spotted grouper	99:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	98
Amazon molly	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Annual killifish	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Asian swamp eel	89:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	178
Black porgy	71:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	140
Grass carp	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Guppy	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Humphead snapper	71:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	140
Japanese flounder	71:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	140
Killifish	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Mummichog	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Nile tilapia	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Silver carp	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Southern patyfish	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
Zebra mbuna	69:DAKRLIGRRFDDTVQSDMKHWFVINDNRSRKFVQVEYKGEKSFVPEEISSMVLTKMKEIAEALGKTVNNNAVITVPAYFNDSORQAT	158
ATP/GTP binding site motif		
Red-spotted grouper	99:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Amazon molly	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Annual killifish	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Asian swamp eel	179:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Black porgy	141:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	250
Grass carp	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Guppy	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Humphead snapper	161:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	250
Japanese flounder	161:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	250
Killifish	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Mummichog	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Nile tilapia	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Silver carp	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Southern patyfish	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Zebra mbuna	159:KDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSRNVLFDLGGGTFDVSILLIEDGIEFVKSTAGDTHLGGDFDNRNMVHFFIAEAFKRR	248
Hsp70 family signature 2		
Red-spotted grouper	189:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	278
Amazon molly	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Annual killifish	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Asian swamp eel	269:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Black porgy	251:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	340
Grass carp	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Guppy	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Humphead snapper	251:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	340
Japanese flounder	251:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	340
Killifish	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Mummichog	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Nile tilapia	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Silver carp	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Southern patyfish	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Zebra mbuna	249:VKCISDNKRAVRLRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRAFEEINADLFRGTLDPVEKSLRDADKADKGGIHDVILVLM	338
Bipartite nuclear localization signal sequence		
Red-spotted grouper	279:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	368
Amazon molly	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Annual killifish	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Asian swamp eel	359:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	448
Black porgy	341:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	430
Grass carp	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Guppy	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Humphead snapper	341:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	430
Japanese flounder	341:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	430
Killifish	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Mummichog	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Nile tilapia	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Silver carp	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Southern patyfish	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Zebra mbuna	339:GSTRIPKIKQLLQDFNFKELNKSINPEAVAYGAQAALISGDKSENVDLILLDVTFLSLGIEAGGNTVTLKRNITIPKQTQTF	428
Hsp70 family signature 3		
Red-spotted grouper	469:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	548
Amazon molly	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Annual killifish	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Asian swamp eel	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Black porgy	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Grass carp	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Guppy	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Humphead snapper	431:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	520
Japanese flounder	431:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	520
Killifish	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Mummichog	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Nile tilapia	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Silver carp	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Southern patyfish	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Zebra mbuna	429:TVSDNQPGLVQVYGERAMTKNNLLGKFLGTGIFPAPRGVQIEVTFDIDANGIMNVAVDKSTGKKNKIIINDKGRSLKSDIERM	518
Red-spotted grouper	459:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	548
Amazon molly	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Annual killifish	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Asian swamp eel	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Black porgy	521:VQDADRYKAEDDLQREKIAANNSLESYAFNMKSTAQDDNLLKGLKSEEEQKLEK-DETSIENLNNLQADKEVEHQKLEKVCNPIIT	609
Grass carp	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Guppy	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Humphead snapper	521:VQDADRYKAEDDLQREKIAANNSLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	610
Japanese flounder	521:VQDADRYKAEDDLQREKIAANNSLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	610
Killifish	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Mummichog	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Nile tilapia	519:VOEAEKYKAEDDLQREKIAANNSLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Silver carp	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Southern patyfish	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Zebra mbuna	519:VOEAEKYKAEDDVQRDKYSAKNGLESYAFNMKSTVEDEKLAKGISDDDKQKILDKCNEVLSWLDKNTAKDEVEHQKLEKVCNPIIT	608
Red-spotted grouper	549:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	590
Amazon molly	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Annual killifish	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Asian swamp eel	629:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	666
Black porgy	610:RLVGGTAAQS-CGAGCAAGSQQGT	638
Grass carp	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Guppy	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Humphead snapper	611:KLYQGGMPAGG-CRGAGAGSQQGT	639
Japanese flounder	611:KLYQGGMPAGG-CRGAGAGSQQGT	640
Killifish	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Mummichog	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Nile tilapia	609:KLYQGGMPGATCGCQARAGSQQGT	638
Silver carp	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Southern patyfish	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	646
Zebra mbuna	609:KLYQSAGGMPGGMEPMGGFFGAGGAAPGGG-SSGFTI	650
EVD consensus sequence		

Fig. 2. Multiple-sequence alignment of the RgHsp70 with Hsp70 of 14 other fish Hsp70. They were aligned using ClustalX. The Hsp70 family signatures are shaded grey and the ATP/GTP binding site is boxed. The bipartite nuclear localization signal sequence is underlined and the EVD consensus sequence is shaded black. The Hsp70 family used in the alignment are as follows : *Poecilia formosa* XP_007541686, *Austrofundulus limnaeus* XP_013888455, *Monopterus albus* AGO01986, *Acanthopagrus schlegelii* AAX07834, *Ctenopharyngodon idella* ACI03596, *Poecilia reticulata* XP_008400612, *Lutjanus sanguineus* ADO32584, *Paralichthys olivaceus* AGZ01970, *Nothobranchius furzeri* XP_015816161, *Fundulus heteroclitus* XP_012712369, *Oreochromis niloticus* NP_001266600, *Hypophthalmichthys molitrix* ACJ03595, *Xiphophorus maculatus* XP_005813814, *Maylandia zebra* XP_004574972.

본 연구에서 이용된 primer들은 Hsp70 gene의 full-length cDNA sequence를 바탕으로 하여, forward primer와 reverse primer를 제작하였다. 사용된 Hsp70 specific primer (forward and reverse)와 대조구로 사용된 house keeping gene으로 알려진 β -actin primer는 Table 1에 나타내었다.

통계분석

분석결과와 자료값은 평균±표준오차로 나타내었으며, SPSS 통계프로그램(ver. 18.0)을 사용하여 one-way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

RgHsp70 full-length cDNA cloning 및 아미노산 비교

본 연구에서는 같은 바리과에 속하는 GeneBank에 등록된 orange-spotted grouper의 Hsp70 염기서열을 바탕으로 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)의 방법을 통해 붉바리의 간으로부터 full-length cDNA를 확보하였다. 확보된 RgHsp70 full-length cDNA는 NCBI의 BLASTX program을 통해 다른 어종에서 확인된 Hsp70 family들과의 유사성을 확인 및 분석에 이용하였다. 또한, 조직별 발현 및 붉바리의 간 조직으로부터 수온별 발현패턴에 관한 분석을 함으로써 수온

에 따른 스트레스로 어류의 생물학적 기능에 있어 Hsp70 gene의 유도에 어떤 영향을 미치는지에 대해 밝혀보고자 하였다.

RgHsp70 full-length cDNA의 염기서열과 추정되는 아미노산 서열간의 분석은 그림(Fig. 1 - Fig. 3)에 나타내었다. RgHsp70 cDNA의 전체 sequence의 길이는 2,152 bp이고, 590개의 아미노산을 암호화하는 1,773 bp의 open reading frame (ORF)로 이루어져 있었고, 3'UTR에는 polyadenylation signal (AATAAA), poly A(+) tail을 확인하였다(Fig. 1).

RgHsp70 cDNA의 아미노산 비교분석은 GenBank에 등록되어 있는 다양한 어종들의 Hsp70 family 아미노산과 Genetyx 7.0 program을 사용하여 상동성과 고전적으로 보존하고 있는 Hsp70 domain 및 motif를 비교, 분석하였다. 그 결과, RgHsp70과 *Maylandia zebra* Hsp70 (99.5%)과 *Poecilia reticulata* Hsp70 (98.5%)에서 가장 높은 상동성을 보였고(Table 2), multiple alignment 분석에서는 Hsp70 family signature, ATP/GTP binding site 및 EEVD consensus sequence를 다른 어종들의 Hsp70과 마찬가지로 잘 보존하고 있었다(Fig. 2).

RgHsp70 cDNA의 계통발생학적 분석은 Mega 4 software package와 neighbor joining (NJ)법을 사용하여 분석하였다. 다른 어종들과의 계통수 분석 결과, 다양한 경골어류들과 cluster를 형성했고, 특히, 농어목 어류인 *Dicentrarchus labrax* (AAR01102), *Epinephelus coioides* (ACN52063), *Lutjanus san-*

Table 2. The similarity of Hsp70 amino acid sequences between *Epinephelus akaara* and other fish species

		Percent Identity																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
Divergence	1		82.9	98.3	96.6	93.1	91.0	98.6	97.3	84.0	99.5	98.3	98.1	90.2	84.3	98.1	98.0	98.5	1	<i>Epinephelus akaara</i> Hsp70
	2	17.1		84.0	83.6	87.3	87.3	84.0	83.9	93.7	83.6	81.1	83.9	89.8	84.7	84.1	84.0	84.0	2	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> Hsp70
	3	1.7	16.0		95.7	92.9	90.4	99.4	96.1	84.5	98.8	95.9	99.8	88.9	83.9	99.1	98.9	99.2	3	<i>Austrofundulus limnaeus</i> Hsp70
	4	3.4	16.4	4.3		92.2	89.9	96.1	99.2	84.5	97.1	92.7	95.5	90.3	84.7	96.0	95.8	96.0	4	<i>Ctenopharyngodon idella</i> Hsp70
	5	6.9	12.7	7.1	7.8		94.3	92.8	92.5	88.7	93.4	89.7	92.8	87.4	85.1	92.6	92.5	92.8	5	<i>Dicentrarchus labrax</i> Hsp70
	6	9.0	12.7	9.6	10.1	5.7		90.4	90.1	88.9	91.1	87.3	90.3	87.2	85.4	90.3	90.1	90.4	6	<i>Epinephelus coioides</i> Hsp70
	7	1.4	16.0	0.6	3.9	7.2	9.6		96.6	84.7	98.9	95.8	99.2	88.9	84.0	99.2	99.1	99.5	7	<i>Fundulus heteroclitus</i> Hsp70
	8	2.7	16.1	3.9	0.8	7.5	9.9	3.4		84.8	97.5	93.0	96.0	90.5	84.8	96.1	96.0	96.1	8	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> Hsp70
	9	16.0	6.3	15.5	15.5	11.3	11.1	15.3	15.2		84.8	82.1	84.3	90.4	86.1	84.8	85.0	84.7	9	<i>Lutjanus sanguineus</i> Hsp70
	10	0.5	16.4	1.2	2.9	6.6	8.9	11.1	2.5	15.2		95.5	98.6	91.1	85.0	98.6	98.5	98.8	10	<i>Maylandia zebra</i> Hsp70
	11	1.7	18.9	4.1	7.3	10.3	12.7	14.2	7.0	17.9	4.5		95.8	85.9	81.4	95.8	95.6	96.1	11	<i>Monopterus albus</i> Hsp70
	12	1.9	16.1	0.2	4.5	7.2	9.7	0.8	4.0	15.7	1.4	4.2		88.7	83.7	98.9	98.8	99.1	12	<i>Nothobranchius furzeri</i> Hsp70
	13	9.8	10.2	11.1	9.7	12.6	12.8	11.1	9.5	9.6	8.9	14.1	11.3		85.4	89.2	89.2	89.0	13	<i>Xiphophorus maculatus</i> Hsp70
	14	15.7	15.3	16.1	15.3	14.9	14.6	16.0	15.2	13.9	15.0	18.6	16.3	14.6		84.2	84.0	84.2	14	<i>Oreochromis niloticus</i> Hsp70
	15	1.9	15.9	0.9	4.0	7.4	9.7	0.8	3.9	15.2	1.4	4.2	1.1	10.8	15.8		99.8	99.5	15	<i>Paralichthys olivaceus</i> Hsp70
	16	2.0	16.0	1.1	4.2	7.5	9.9	0.9	4.0	15.0	1.5	4.4	1.2	10.8	16.0	0.2		99.4	16	<i>Poecilia formosa</i> Hsp70
	17	1.5	16.0	0.8	4.0	7.2	9.6	0.5	3.9	15.3	1.2	3.9	0.9	11.0	15.8	0.5	0.6		17	<i>Poecilia reticulata</i> Hsp70
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			

guineus (ADO32584), *Acanthopagrus schlegelii* (AAX01834)와 cluster를 잘 형성하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

RgHsp70은 heat shock protein 그룹 중 하나로서, 다른 생물 중에서 많이 알려져 있다. 그리하여 Hsp70 family와의 아미노산 비교 결과, 다른 어류의 Hsp70과 마찬가지로, 다양한 수

온 및 환경 변화에 적응함에 있어 중추적인 기능을 할 것으로 추정되는 Hsp70 family signature, ATG/GTP binding site motif 및 EEVD consensus sequence를 확인할 수 있었다.

수온은 어류의 성장, 번식, 분포에 영향을 미치는 중요한 요인으로 작용하는데, 일교차나 계절적 온도 변화 등에 따른

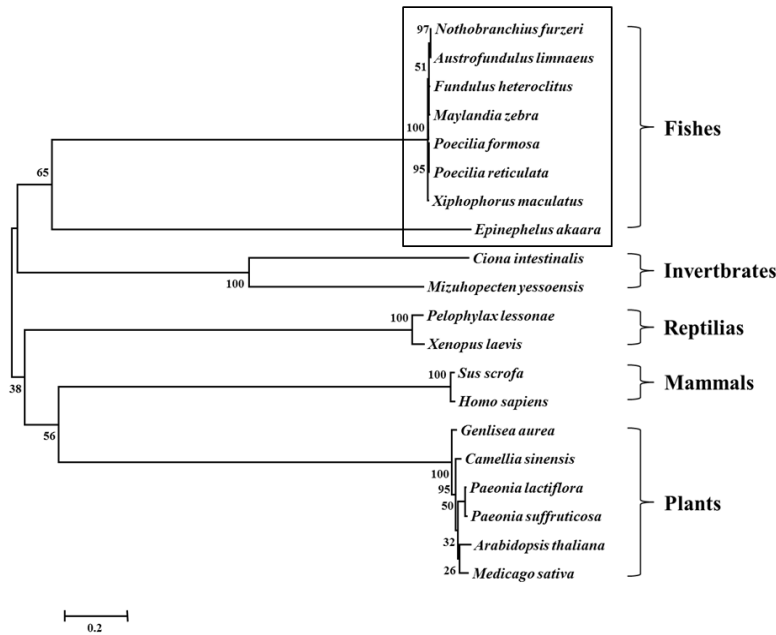


Fig. 3. Neighbour-joining tree of heat shock protein 70 and other Hsp70 members constructed with MEGA 4. The bootstrap confidence values shown at the nodes of the tree are based on 2,000 bootstrap replications. The Hsp70 family fishes of selected genes are indicate within brackets and its Percifomes group are boxed.

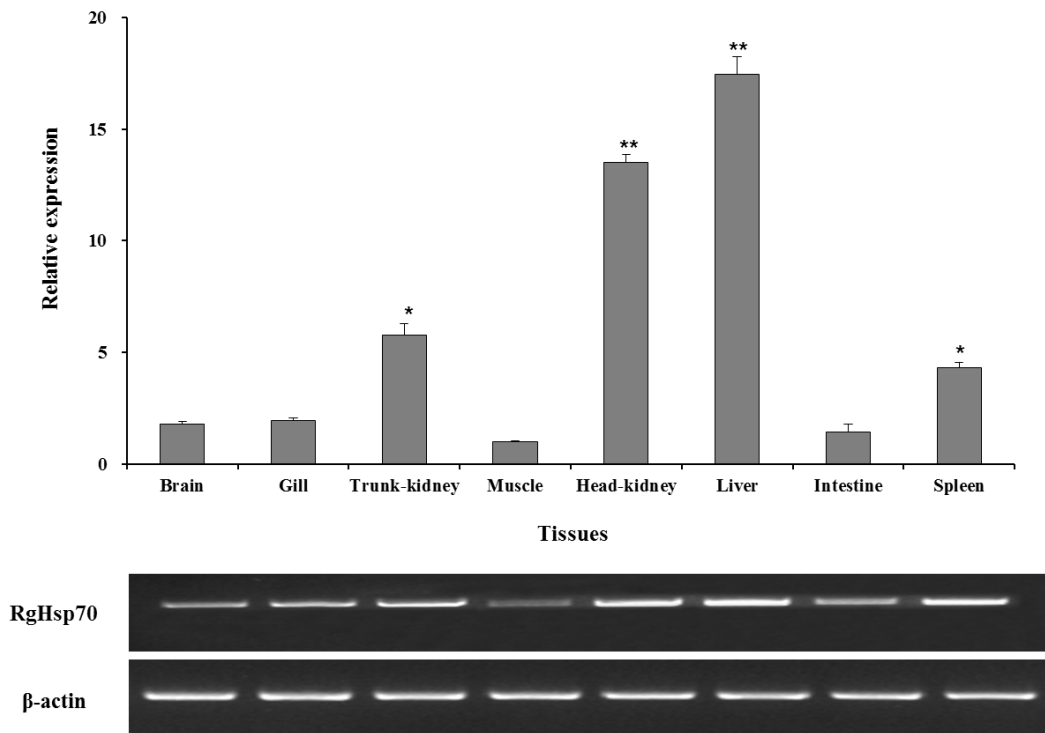


Fig. 4. Expression of RbHsp70 mRNA in various tissues of healthy red-spotted grouper, brain, gill, trunk-kidney, muscle, head-kidney, liver, intestine, and spleen were examined. The data are presented as the mean relative ratio RbHsp70/ β -actin mRNA levels. Errors bars represent SEM ($n=3$).

스트레스는 생물체의 생리 및 생태학적 상태에 영향을 미치고 있으며, 미세한 온도변화에도 생존에 위협을 받는 것으로 알려져 있다[14]. 이러한 Hsp70은 온도변화에 따른 유지와 적응 및 비자가 인식시스템에 있어 매우 중요한 단백질로써의 역할을 수행한다[11]. 이러한 결과로, 본 연구에서 확인된 RgHsp70에서도 특징적인 sequence를 나타낸 바, 다른 어종에서 알려진 정보와 마찬가지로 중요한 생물학적 기능을 수행할 것으로 여겨진다.

RgHsp70의 발현

붉바리 미성어로부터 분리한 조직들은 quantitative real-time PCR법을 통해 RgHsp70 유전자의 발현을 분석하였다. 그 결과, 간에서 높은 mRNA 발현량을 보였고(Fig. 4), 다른 조직에 비해 유의적으로 높은 결과값을 나타내었다($p < 0.05$). 간 조직에서 유의적으로 높은 발현량을 보인 결과를 바탕으로 수온별(12, 15, 18 및 21°C) 자극 48시간 후 각각 3마리씩 sampling한 실험어의 간을 적출하여 분석에 사용하였다. 낮은 수온으로 갈수록 높은 발현능을 보였고, 12°C와 15°C 그룹에서 21°C 그룹에 비해 유의적인 차이를 보였다(Fig. 5).

어류에 있어 연골어류의 간은 10-20%이며, 부레 대신 간의 지질로 부력조절에 관여한다고 보고되고 있으며, 경골어류의 경우는 4-10%를 차지하고 있다고 알려지고 있다[3]. 어류의 산란기 동안 암컷의 경우 간이 매우 커지게 되며, 어종에 따라

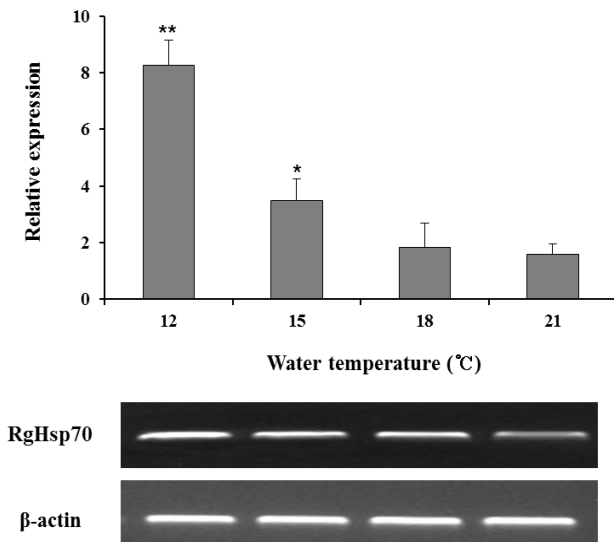


Fig. 5. Expression of heat shock protein 70 mRNA in livers of red-spotted grouper at differential temperatures (21, 18, 15 and 12°C). The levels of Hsp70 transcript were quantified by expressed relative to the β -actin transcript level. Data are presented as mean \pm SD from three independent cDNA samples with three replicates from each red-spotted grouper stimulated temperatures livers sampled at 48 h. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA.

수컷보다 2-3배나 되기도 한다. 자성 호르몬의 분비가 활발하게 되므로 간에서 난소의 난황 단백질의 합성 등이 활발해지기 때문이다[13]. 또한, 인간과는 달리 조절작용이 없지만, 다량의 간세포를 함유하고 있으며 탄수화물 대사, 단백질 대사, 지방대사, 간에서 장으로 배설되는 호르몬을 조절하는 기능을 가지는 담즙을 생성하는 등의 주요한 기능을 담당하는 조직이다[21]. 이와 유사한 결과로써, Hsp70 발현에 관한 연구는 silver seabream, *Sparus sarba* [5, 6]과 carp, *Cyprinus carpio* [1] 및 Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala* Yin [16]의 간 조직으로부터 높은 발현량을 나타내었다. 또한 수온변화에 있어 Hsp70 mRNA 발현은 Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala* Yin [16]과 Emerald rockcod, *Trematomus bernacchii* [9], gilt-head seabream, *Sparus aurata* [5] 등의 보고가 있다. Silver seabream, *Sparus sarba* [6]과 carp, *Cyprinus carpio* [1]에서도 이와 비슷한 결과가 나타났다. 하지만, 어류가 적정수온에서 낮은 수온으로 변화함에 따른 Hsp70 발현에 관한 보고는 아직 미흡한 실정이다. 이러한 결과는 수온변화에 따른 Hsp70 gene의 조절기작은 정상적인 생리적 기능을 유지하기 위해 주로 간 세포에서 Hsp70 mRNA가 주요하게 발현이 높아지는 것으로 판단된다. 또한 면역시스템에 있어 수온과 같은 다양한 환경적 요인에 의해 해양생물인 어류나 무척추동물은 환경 적응 및 자기방어수단을 위한 활성능력을 가진다[10]. 경골어류에 있어 Hsp70 gene의 생리 및 면역학적인 기능을 밝히는 것은 Hsp70 mRNA 조절기작에 있어 많은 기초적 지식을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

요약하자면, 본 연구의 결과는 붉바리로부터 분리된 Hsp70 gene이 급격한 저수온으로의 변화가 Hsp70 mRNA의 발현패턴을 보여주고 있고, 저수온에서 높은 발현을 보인 Hsp70 mRNA는 스트레스로 인해 손상된 세포를 보호하기 위한 기작으로 여겨진다. 따라서, RgHsp70 gene은 붉바리의 생체를 유지하는데 영향을 미침과 더불어, 수온 및 환경변화에 있어 면역체계를 강화시키고 생물학적 활성을 충분히 가지고 있는 단백질로써 붉바리의 장거리 및 해외수출을 위한 수송조건과 양식산업에 있어 기초적인 지식을 제공해 줄 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업 동해특성품종 양식기술개발(R2018012)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

1. Ali, K. S., Dorgai, L., Ábrahám, M. and Hermes, E. 2003. Tissue-and stressor-specific differential expression of two hsc70 genes in carp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**,

- 503-509.
2. Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M. and Iwama, G. K. 2002. Heat shock proteins genes and their functional significance in fish. *Gene* **295**, 173-183.
 3. Chen, J., Xiao, S. and Yu, Z. 2011. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*). *Fish Shellfish Immunol.* **30**, 750-754.
 4. Deane, E. E., Kelly, S. P., Lo, C. K. M. and Woo, N. Y. S. 1999. Effects of GH, prolactin and cortisol on hepatic heat shock protein 70 expression in a marine teleost *Sparus sarba*. *J. Endocrinol.* **161**, 413-421.
 5. Deane, E. E. and Woo, N. Y. S. 2005. Cloning and characterization of the hsp70 multi-gene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 776-783.
 6. Deane, E. E. and Woo, N. Y. S. 2005. Growth hormone increases hsc70/hsp70 expression and protects against apoptosis in whole blood preparations from silver sea bream. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1040**, 288-292.
 7. Feder, M. E. and Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 243-282.
 8. Graser, R. T., Malnar-Dragojevic, D. and Vincek, V. 1996. Cloning and characterization of a 70kDa heat shock cognate (hsc70) gene from the zebra fish (*Danio rerio*). *Genetica* **98**, 273-276.
 9. Hofmann, G., Buckley, B. A., Airaksinen, S., Keen, J. E. and Somero, G. N. 2000. Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Family nototheniidae). *Exp. Biol.* **203**, 2331-2339.
 10. Holmskov, U., Theil, S. and Jensenius, J. C. 2003. Collectins and ficolins: Humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 547-578.
 11. Konstantina, M. and Ioannis, K. Z. 2006. Molecular cloning and characterization of two homologues of mannose-binding lectin in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* **21**, 305-314.
 12. Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1151-1191.
 13. Listinsky, J. J., Siegal, G. P. and Listinsky, C. M. 1998. Alpha-L-fucose: a potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia. *Am. J. Chin. Pathol.* **110**, 425-440.
 14. Logue, J., Tiku, P. and Cossins, A. R. 1995. Heat injury and resistance adaptation in fish. *J. Ther. Biol.* **20**, 191-197.
 15. Milani, V., Noessner, E., Ghose, S., Kuppner, M., Ahrens, B. and Scharner, A. 2002. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int. J. Hyperthermia.* **18**, 563-575.
 16. Ming, J., Xie, J., Xu, P., Liu, W., Ge, X., Liu, B., He, Y., Cheng, Y., Zhou, Q. and Pan, L. 2010. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish Shellfish Immunol.* **28**, 407-418.
 17. Morimoto, R. I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Gene. Dev.* **12**, 3788-3796.
 18. Ojima, N., Yamashita, M. and Watabe, S. 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout. *Boichem. Biophys. Commun.* **329**, 51-57.
 19. Park, H., Ahn, I. Y. and Lee, H. E. 2007. Expression of heat shock protein 70 in the thermally stressed Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Cell Stress Chaperones* **12**, 275-282.
 20. Robert, J. 2004. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 449-464.
 21. Sharp, G. J. E. and Secombes, C. J. 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **3**, 119-129.
 22. Song, L., Li, C., Xie, Y., Liu, S., Zhang, J., Yao, J., Jiang, C., Li, Y. and Liu, Z. 2016. Genome-wide identification of Hsp70 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* **49**, 154-162.
 23. Srivastava, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 185-194.
 24. Wang, Z., Wu, Z., Jian, J. and Lu, Y. 2009. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **26**, 639-645.
 25. Yenari, M. A., Giffard, R. G., Sapolsky, R. M. and Steinberg, G. K. 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol. Med.* **5**, 525-531.
 26. Zhang, X., Huanying, P., Zaohe, W. and Jian, J. 2011. Molecular characterization of heat shock protein 70 gene transcripts during *Vibrio harvei* infection of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. *Fish. Physiol. Biochem.* **37**, 897-910.
 27. Zmijewski, M. A., Macario, A. J. and Lipinska, B. 2004. Functional similarities and differences of an archaeal HSP70 (DnaK) stress protein compared with its homologue from the bacterium *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **336**, 539-549.

초록 : 수온변화에 따른 붉바리(*Epinephelus akaara*)의 heat shock protein (Hsp) 70 mRNA 발현민병화¹ · 허준욱² · 박형준^{3*}(¹동해수산연구소 양식산업과, ²생물모니터링센터, ³국립수산과학원 양식관리과)

한국의 고급 양식대상 어종인 붉바리(*Epinephelus akaara*)로부터 새로운 heat shock protein (Hsp) 70을 동정하였다. 붉바리 Hsp70 (RgHsp70)의 cDNA는 RACE (rapid amplification of cDNA ends)법을 사용하였고, RgHsp70 cDNA의 전장은 2,152 bp이고, 5'-terminal untranslated region (UTR)은 105 bp, 3'-terminal UTR은 274 bp, 590개의 아미노산을 암호화하는 open reading frame (ORF)는 1,773 bp였으며, 분자무게(molecular weight)는 64.9 kDa 및 등전위값(isoelectric point, *pI*)은 5.2였다. 추정되는 아미노산 비교 및 계통발생학적 분석 결과, 다른 어종과 마찬가지로 Hsp70 고유의 signature를 포함하는 것을 비롯하여 높은 유사성을 나타내었으므로 RgHsp70이 Hsp70 family임을 확인할 수 있었다. RgHsp70 mRNA는 간과 두신 조직에서 높은 발현을 보였으며, 48시간 동안 수온별(21, 18, 15 및 12°C) 노출 후 간 조직에서 대조구인 21°C보다 12°C에서 발현이 증가함을 확인하였다. 본 연구에서는, 수온이 하강함에 따라 RgHsp70 mRNA 발현에 주요한 영향을 미치는 것으로 보아, 수온변화에 따른 스트레스로 인해 발현의 변화를 나타내는 주요 스트레스성 단백질을 확인할 수 있었다.