

〈Original article〉

수온이 대서양 연어 (*Salmo salar*) 치어의 체내 스트레스 관련 유전자 발현에 미치는 영향

강희웅 · 김광일¹ · 임현정² · 강한승^{3,*}

국립수산과학원 양식관리과, ¹국립수산과학원 병리연구과,
²동해수산연구소 양식산업과, ³엠에스바이오랩 유전체연구부

Effect of Water Temperature on the Expression of Stress Related Genes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fry

Hee Woong Kang, Kwang Il Kim¹, Hyun Jeong Lim²
and Han Seung Kang^{3,*}

Aquaculture Management Division, National Fisheries Research & Development Institute,
Busan 46083, Republic of Korea

¹Pathology Research Division, National Fisheries Research & Development Institute,
Busan 46083, Republic of Korea

²Aquaculture Industry Research Division, East Sea Fisheries Research Institute,
Gangneung 25435, Republic of Korea

³Department of Genome Research, MS BioLab, Daejeon 34576, Republic of Korea

Abstract - The warming of water as a result of climate change affects fish habitat. Variations in water temperature affect fish physiology almost totally. The rise in water temperature due to climate change leads to hypoxia following decreased oxygen solubility and decreased binding capacity of oxygen-carrying hemoglobin. This study was conducted to evaluate the health status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry at elevated water temperatures (20°C) compared with optimum water temperature (15°C). The method facilitated the detection of biomarker genes using NGS RNAseq analysis and evaluation of their expression pattern using RT-qPCR analysis. The biomarker genes included interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A transcript variant X3, protein L-Myc-1b-like, placenta growth factor-like transcript variant X1, fibroblast growth factor receptor-like 1 transcript variant X1, transferrin, intelectin, thioredoxin-like, c-type lectin lectoxin-Thr1-like, ladderlectin-like and calponin-1. The selected biomarker genes were sensitive to changes in water temperature based on NGS RNAseq analysis. The expression patterns of these genes based on RT-qPCR were similar to those of NGS RNAseq analysis.

Keywords : *Salmo salar*, water temperature, biomarker gene, NGS RNAseq, RT-qPCR

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

서론

해양에 서식하는 생물들은 수온, 산소 및 염분 등의 환경 요인에 많은 영향을 받으며 생활하고 있다. 특히 기후변화에 의한 수온의 변화는 생물의 서식처나 회유경로 변화 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고, 또한 생물의 항상성에 영향을 주어 스트레스를 유발한다고 알려져 있다(Caissie 2006; Crossin *et al.* 2008). 이러한 환경요인은 자연 생태계에 서식하는 생물뿐만 아니라 양식산업에도 영향을 미쳐 성장, 생식, 대사 및 삼투압조절 등 양식생물의 생리적 변화로 인해 질병 및 폐사 등이 발생하여 생산성 저하를 일으킨다고 보고되었다(Wedemyer and McLeay 1981; Chapple *et al.* 1998; Kang *et al.* 2007; Kang *et al.* 2008; Choi *et al.* 2009).

연어를 대상으로 한 연구에서 수온은 이동, 은화(smoltification), 개체의 성장 및 생존에 영향을 미친다고 알려져 있으며, 초기 발생과정에서 수온의 변화는 배아의 생존 및 형질 형성 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(McCormick *et al.* 1999; Swansburg *et al.* 2002; Crossin *et al.* 2008; Elliott and Elliott 2010; Somero 2010; Burt *et al.* 2012; Hevrøy *et al.* 2012; Morita and Nakashima 2015). 수온의 변동은 어류 생리의 거의 모든 부분에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Somero 2004). 기후변화에 의해 야기될 수 있는 수온의 상승 변화는 산소 용해도의 감소 및 산소를 운반하는 헤모글로빈(hemoglobin)의 결합 능력의 감소를 통한 저산소증(hypoxia)을 유발할 수 있다(Quinn *et al.* 2011a).

수온의 상승 및 저산소증과 관련하여 유전자 발현의 변화에 관련한 연구들이 연어(Somero 2004; Evans *et al.* 2011; Quinn *et al.* 2011a, b), 저온 적응 남극 서식 어류(Thorne *et al.* 2010; Windisch *et al.* 2011) 및 어류(Kassahn *et al.* 2007; Healy *et al.* 2010; Logan and Somero 2011; Liu *et al.* 2013)에서 보고되었다. 연구결과 수온의 상승에 따라 어류에서 많은 과정에 관여하는 유전자들의 차등 발현이 나타났다. 대표적으로 heat shock proteins(Healy *et al.* 2010; Evans *et al.* 2011; Logan and Somero 2011; Quinn *et al.* 2011a), cell growth(Kassahn *et al.* 2007), cell cycle arrest and apoptosis(Logan and

Somero 2011), inflammatory response(Thorne *et al.* 2010) 및 oxidative stress(Thorne *et al.* 2010) 등이다.

본 연구는 연어목(Salmoniformes), 연어과(Salmonidae) 어류인 대서양 연어(Atlantic salmon, *Salmo salar*) 치어를 대상으로 적정 사육수온보다 높은 고수온이 치어에게 미치는 스트레스로 인한 건강 상태를 평가하는 방법의 한가지로 생체지표유전자(biomarker gene)의 발현 양상을 이용한 평가에 목적을 두고 생체지표유전자의 발굴 및 평가를 수행하였다. 분자생물학적 연구방법을 통한 연구는 생물체의 유전정보를 분석하고 활용하는 데 있어 새로운 도구와 방법론을 제공하고 있다. 환경요인의 변화에 따른 유전자 발현의 변화는 생물체의 건강 상태를 평가하는 데 있어서 유용한 방법으로 이러한 생체지표유전자를 이용한 평가는 저비용으로 신속하게 개체의 상태를 평가할 수 있는 장점이 있다. 생체지표유전자의 발굴을 위하여 차세대유전체분석법(NGS; Next Generation Sequencing) RNA-seq을 이용하여 대서양 연어 치어 전사체 유전자 발현 확인 및 수온 변화에 차별적으로 발현하는 유전자를 확인 및 선별한 후, 수온변화에 따른 스트레스 정도를 RT-qPCR 방법을 이용하여 유전자 발현 양상을 확인하였다.

본 연구에 생체지표유전자로 평가에 선정된 interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A transcript variant X3, protein L-Myc-1b-like, placenta growth factor-like transcript variant X1, fibroblast growth factor receptor-like 1 transcript variant X1, transferrin, intelectin, thioredoxin-like, c-type lectin lectoxin-Thr1-like, ladderlectin-like, calponin-1 등의 유전자는 대서양 연어 치어 고수온 노출 개체를 대상으로 NGS RNAseq 연구 수행을 통해 발굴된 다수의 유전자 중에서, 생체지표유전자로 매우 유용한 역할을 기대하며 관심을 가진 유전자들이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

대서양 연어 치어(11.9~13.5 cm)는 2017년 강원도 영월



Fig. 1. Image of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry.

Table 1. Analysis of blood characteristics for the selection of experimental fishes

No.	Control group		Experimental group	
	Cortisol (ng mL ⁻¹)	Glucose (mg L ⁻¹)	Cortisol (ng mL ⁻¹)	Glucose (mg L ⁻¹)
1	37.22	190	67.29	237
2	42.67	227	66.87	263
3	37.48	202	69.53	259
4	44.20	248	59.04	288
5	36.09	175	71.58	218
6	42.16	171	69.59	202
7	44.82	231	56.02	267

군 김삿갓면에 소재한 옥동양어장에서 구입하여 유수식 사육장에서 사육하며 실험하였다(Fig. 1). 대서양 연어의 성장을 위한 적정 수온은 15°C로 알려져 있다(Nuez-Ortin *et al.* 2018). 본 연구의 목적은 수온의 상승이 대서양 연어 치어에게 미치는 스트레스를 알아보기 위한 연구로서 연어 치어의 수온에 따른 노출은 대조구(15°C) 및 실험구(20°C)에서 3시간 시행하였다. 각 실험구별로 10마리 치어를 노출시킨 후, 혈액성상 분석을 시행하여 스트레스 지표로 알려진 cortisol 및 glucose 농도를 측정하였다. 각각의 실험구에서 실험어의 선택은 대조구의 경우 cortisol 및 glucose 농도의 수치가 상대적으로 낮은 것을 선정하였으며, 고수온 실험구에서는 cortisol 및 glucose 농도의 수치가 상대적으로 높은 것을 선정하였다. 실험어는 각각 7마리로서 대조구 및 실험구에서 각각의 개체번호 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7번 개체를 선정하여 실험에 사용하였다(Table 1). 선정된 실험어에서 각각 간 조직을 수집한 후에 액체질소를 이용하여 동결 전처리 후 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

2. Total RNA 추출

Total RNA 추출은 GeneAll RiboEx kit(GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea)를 사용하였다. 저온 동결 보존된 조직시료를 grinder로 미세하게 갈았다. RiboEx 용액(1 mL/100 mg)을 조직에 넣고 잘 혼합한 후 실온에서 5분간 방치하였다. Chloroform 0.2 mL를 넣어주고 혼합 후 실온에서 2분간 방치하였다. 원심분리를 시행하여 상등액을 새로운 tube에 옮겨 담고 isopropyl alcohol 0.5 mL를 넣어 10분간 실온에서 방치하였다. 원심분리를 시행하여 상등액을 제거하고 75% EtOH로 세척한 후 DEPC-water로 녹여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다. RNA quality 확인은 Agilent사의 Bioanalyzer RiboPico 6000 chip을 이용하여 18S/28S 비율 및 RIN(RNA Integration Number)을 조사하였다. 대조구 및 실험구 각각의 개체에서 추출한 total RNA는 동량을 얻

은 후, 혼합하여 실험에 사용하였다.

3. NGS RNaseq 데이터를 이용한 생체지표유전자 발굴

대조구(15°C) 및 실험구(20°C)에서 채집한 간 조직에서 추출한 total RNA는 DNase 및 Ribo-zero rRNA remove kit (Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 mRNA 및 non-coding RNA를 포함한 total RNA를 정제하였다. 정제된 RNA는 short read로 sequencing하기 위해 random하게 fragmentation 시킨 후, 역전사 과정을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA fragment 양쪽 끝에 서로 다른 adapter를 붙인 후, ligation 시켰다. 다음으로 sequencing을 위하여 PCR 증폭을 통해 양을 증폭시킨 후, size selection과정을 통해 200~400 bp의 insert size를 확보한 다음, paired-end sequencing으로 cDNA fragment의 양쪽 말단으로부터 read의 length만큼 sequencing 시행하였다. Sequencing을 통해 얻어진 raw reads의 quality control 분석을 진행하여 전체적인 read의 quality와 total bases, total reads, GC(%) 등 기본 통계치를 생산하였다. 분석 결과의 bias를 줄이기 위해 low-quality를 가지거나 adaptor sequence, contaminant DNA, PCR duplicates와 같은 artifacts를 제거하는 전처리 과정을 수행하였다. 전처리 과정을 거친 reads들을 대상으로 splice를 고려한 HISAT2 프로그램을 이용하여 reference genome에 mapping한 후, aligned reads를 생성시켰다. Reference 기반 aligned reads의 paired 정보를 이용하여 StringTie 프로그램을 통한 transcript 어셈블리를 진행하였다. 대조구 및 실험구 각각의 간 조직 transcript quantification을 통해 얻은 발현량을 transcript length 및 depth of coverage를 고려한 normalization 값으로 계산하였다. FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)값으로 within normalization을 진행하여 expression profile을 추출하였다. 발현값을 통계적인 가설검증을 통하여 차별 발현하는 유전자 또는 transcripts를 선별하여 생체지표유전자로 선정하였다.

4. 역전사중합효소연쇄반응(RT-qPCR)

cDNA합성을 위한 역전사 반응(RT; Reverse Transcription)은 iScript cDNA synthesis kit(Biorad Co., Ltd., CA, USA)를 이용하였다. Total RNA 1 µg, iScript 5×Master mix 4 µL, iScript reverse transcriptase 1 µL 및 DEPC-water를 넣어 최종 반응용액 20 µL을 맞추어 42°C에서 1시간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 중합효소연쇄반응(realtime-qPCR)은 iQ SYBR Green Supermix kit(BioRad Co., Ltd., CA, USA)를 이용하여 수행하였다. cDNA 1 µL, primer 각각 1 µL, iQ SYBR Green Supermix (2×) 10 µL 및 DEPC-water를 넣어,

Table 2. PCR assays, including primers sequences and amplicon sizes

Gene	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)
transferrin	5-TGCTCCTGGATCTGAGGTGG-3	5-ACTGCTCTTCAGACCTGGCT-3	104 bp
intelectin	5-TTCTGCGACATGACCACTGC-3	5-CTGTTGGCCCAGTTCCCATC-3	155 bp
thioredoxin-like	5-AGAATCCCTCGTGGTGTCTG-3	5-ACAGCGTCAGTGCAGATGTG-3	132 bp
c-type lectin lectoxin-thr1-like	5-CTCTGGGCCGATGGGTCTAA-3	5-ACCGAGCCAGTTCATCTCCA-3	99 bp
ladderlectin-like	5-ACGCTGCAAGTGAGAAGCTC-3	5-GGTGAGCTGCAGTGAGTGAC-3	175 bp
calponin-1	5-GTCTCACTGCAGATGGGCAC-3	5-CTTGAGAGGAGGGGACTGGG-3	198 bp
interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A, transcript variant X3	5-GTAGCAGTGTTTCATGGCCCC-3	5-GCCACAGCTGCAGAAGACAT-3	107 bp
protein L-Myc-1b-like	5-CTTCGCTGGGGGACAAACTC-3	5-CCCCGACAACCTTCTCCAGC-3	180 bp
placenta growth factor-like, transcript variant X1	5-TGTTCAAGGAGGTGTGGGGT-3	5-TTCTCATCGCCACAGCAACC-3	148 bp
fibroblast growth factor receptor-like 1, transcript variant X1	5-ACACCAAGCCACCCATCACC-3	5-CTCTGGCAGAACCACAGCAG-3	127 bp
ACTB	5-CCAAGCCAACAGGGAGAA-3	5-AGGGACAACACTGCCTGGAT-3	102 bp

최종 반응용액이 20 μ L이 되도록 맞춘 후에 real-time PCR machine(CFX96, Biorad Co., Ltd., CA, USA)를 이용하여 증폭하고 형광량을 분석하였다. 유전자를 증폭시키기 위한 반응 조건은 95°C에서 3분간 유지, 이후 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 35 cycles를 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 유지하였다. Melting curve의 분석은 0.5°C 간격으로 60°C에서부터 95°C까지 상승시켰다가, 이후 30°C에서 5분간 유지하였다. 상대적인 유전자 발현량의 결정은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법 (comparative Ct method)을 이용하여 유전자의 발현량을 분석하였다. 내재표준유전자로는 house keeping 유전자인 β -actin(ACTB)을 사용하여 발현량을 normalization시켰다. 프라이머 염기서열은 다음과 같다 (Table 2). 실시간 증합효소연쇄반응은 5회 반복 실험하였다.

5. 통계학적 분석

대조군과 실험군과의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 비교하였으며, *p*가 0.05 및 0.01 이하인 것만 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

NGS RNAseq 분석을 통해 15°C 사육 대서양 연어 치어 간 조직에서 18,919,020개 reads가 생성되었으며, 총 길이의 합은 1.9G bp로 생산되었다. GC content (%)가 48.64%였으며, 염기 품질 점수 30 이상을 갖는 염기의 비율(Q30, %)은 94.66%이었다. 또한 20°C 사육 대서양 연어 치어 간 조직에

Table 3. Statistics of raw and mapped data

Sample	Total reads	GC ¹ (%)	Q30 ² (%)	Mapped reads (%)
15°C liver	18,919,020	48.64	94.66	96.91
20°C liver	17,603,894	49.39	94.89	96.70

¹GC (%): GC content ratio

²Q30 (%): Ratio with Phred quality score > 30

서 17,603,894개 reads가 생성되었으며, 총 길이의 합은 1.8G bp로 생산되었다. GC content (%)가 49.39%였으며, 염기 품질 점수 30 이상을 갖는 염기의 비율(Q30, %)은 94.89%이었다. 15°C 및 20°C 대서양 연어 치어 간 조직에서 생성된 전사체 mapping 효율은 각각 96.91% 및 96.7%를 보였다 (Table 3). 대서양 연어 치어를 대상으로 NGS RNAseq 분석 연구의 목적은 수온의 변화에 보다 효율적이며, 민감하게 반응하는 전사체 유전자를 다수 확보하고 그 중에서 생체지표유전자를 선정하고자 하는 것이었다. 따라서 NGS RNAseq 전사체 분석 데이터를 확보한 후, 정상(15°C) 및 고수온(20°C) 두 실험구간 차별 발현하는 유전자를 선별하기 위하여 $|fc| > = 2$ 조건을 만족하는 유전자 1,336개를 준비하고, 그 유전자 중에서 15°C 사육 대서양 연어 치어 대비 20°C 사육 대서양 연어 치어에서의 증가 발현된 유전자 880개, 감소 발현된 유전자 486개를 분석하였다. 이 중에서 ① interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A transcript variant X3, ② protein L-Myc-1b-like, ③ placenta growth factor-like transcript variant X1, ④ fibroblast growth factor receptor-like 1 transcript variant X1, ⑤ transferrin, ⑥ intelectin, ⑦ thioredoxin-like, ⑧ c-type lectin lectoxin-Thr1-like, ⑨ ladderlectin-like, ⑩

Table 4. Expression of biomarker genes via NGS RNAseq and RT-qPCR analysis

Gene name	Fold change (NGS RNAseq)	Fold change (RT-qPCR)
interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A, transcript variant X3	3.19	4.81
protein L-Myc-1b-like	3.73	2.12
placenta growth factor-like, transcript variant X1	10.20	5.12
fibroblast growth factor receptor-like 1, transcript variant X1	3.35	3.81
transferrin	2.80	3.78
intelectin	15.0	24.20
thioredoxin-like	26.50	15.10
c-type lectin lectoxin-Thr1-like	-9.0	-3.71
ladderlectin-like	-17.60	-3.75
calponin-1	-3.60	-3.42

calponin-1 유전자들을 생체지표유전자로 선정하였다(Table 4). 선정된 유전자들은 수온의 변화에 의해 민감하게 반응하는 유전자들로 수온 상승에 의해 발현이 유의적으로 증가한 유전자와 감소한 유전자가 있으며, 이들 유전자들은 주로 면역반응에 관여하는 유전자들이다. 본 연구의 목적은 환경요인 중에서 정상 수온보다 높은 수온의 변화에 따른 스트레스에 의해 발생 가능한 대서양 연어 치어의 생리상태를 생체지표유전자의 발현 양상을 이용하여 평가하는 데 있다. 유전자 발현을 통한 생체지표유전자의 선정 조건은 환경요인의 영향에 민감하게 반응하여 유전자의 발현 변화가 큰 유전자가 적합하다. 선정된 유전자들은 NGS RNAseq 분석을 통해서 수온의 변화에 민감하게 반응 발현한 유전자들이다. 이들 유전자들 RT-qPCR 반응을 통해 발현 양상을 살펴본 결과 NGS RNAseq 분석을 통한 발현 양상과 매우 유사하게 나타났다(Table 4, Fig. 2). 발현 fold change 값은 차이가 있었으나 유의적 증가 및 감소의 양상은 유사하게 나타났다.

본 연구에서 생체지표유전자로 선정하여 연구한 유전자들의 기능은 잘 알려진 것도 있으나, 대부분 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 특히 연어를 비롯한 어류에서는 연구가 미약한 현실이다. 따라서 포유류 및 유사 유전자들의 기능을 통해 유전자의 기능을 살펴보면 다음과 같다. Interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27)는 인터페론 알파 유도 단백질로 피부조직의 병변 부위의 상피 증식 및 암세포에서 발현이 증가하는 것으로 알려져 피부 암의 생체지표로 제시되고 있다(Suomela *et al.* 2004). Protein L-MYC은 MYCL 유전자명으로 통하며 전사인자로서 암에서 종양발생을 촉진하며, 배아 및 기관 발생에 관여한다고 알려져 있다(Soucek *et al.* 2008; Schick *et al.* 2017). Placenta growth factor (PIGF)는 혈관내피세포성장인자의 내피 성장 및 투과 촉진을 증진시키는 mitogen이며, 암 생성 시 혈관형성인자로 알려져 있으며, 저산소증이 PIGF 발현을 유도한다고 알려져 있다(Green *et al.* 2001). Fibroblast growth factor receptor-like 1은 FGRL1로

명명되며, 다양한 조직에서 세포의 증식 및 분화를 조절한다고 알려져 있고, 초어 grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)를 대상으로 연구한 결과 배아발생 기관의 형성 시, 기관 특이적인 발현 양상을 보여주어 기관형성에 관여한다고 알려져 있다(Lin *et al.* 2015). Transferrin은 TF로 명하여지며, 철분 결합 당단백질로 병원균의 성장 및 증식을 억제하고, 병원균으로부터 철분을 회수하며, 대식세포로 하여금 항균작용을 강화시키는 등의 작용으로 병원균 감염 저항 작용을 한다고 알려져 있다. 어류에서는 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)를 대상으로 세균 감염에 대한 숙주 방어 작용 및 간에서 발현이 높음을 확인하였다(Yin *et al.* 2018). Intelectin은 선천적 면역 반응(innate immune response), 철분대사 및 초기배아발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 포유동물과 양서류에는 구조 및 기능 등이 잘 알려져 있으나 어류에서는 잘 알려져 있지 않고 있다. Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)에서 intelectin은 간에서 발현이 높고, 발생단계에서 부화직후 발현이 가장 높다고 알려져 있다(Ding *et al.* 2017). Zebrafish (*Danio rerio*)를 대상으로 면역 연구를 시행한 결과 zebrafish 성체에서는 장에서 발현이 가장 높다는 연구 결과를 얻었다(Chen *et al.* 2016). 반응성 산소종(ROS; Reactive oxygen species)은 방사선, 금속산화 및 병원균 감염 등에 의해 생성되는데 ROS의 과다한 생성은 세포사멸로 이어진다고 알려져 있다. Thioredoxin은 원핵 및 진핵 생물 모두에서 발견되는 단백질로서 ROS의 활성조절 효소로 면역학적으로 매우 중요하다고 알려져 있다(Liyanage *et al.* 2018). C-type lectin은 세균에 대한 선천면역 및 적응면역의 기능을 가지며, c-type lectin의 결합은 발달 및 생리학적 이상 동반 및 질병 감수성을 낮춘다고 알려져 있다(Brown *et al.* 2018). Ladderlectin은 어류에서 intelectin과 유사하게 박테리아나 곰팡이 균의 수용체로 작용하며 면역 반응에 관여한다고 알려져 있다(Reid *et al.* 2011). Calponin-1은 수축성 단백질로서 고혈압에 의한 혈관재형성에

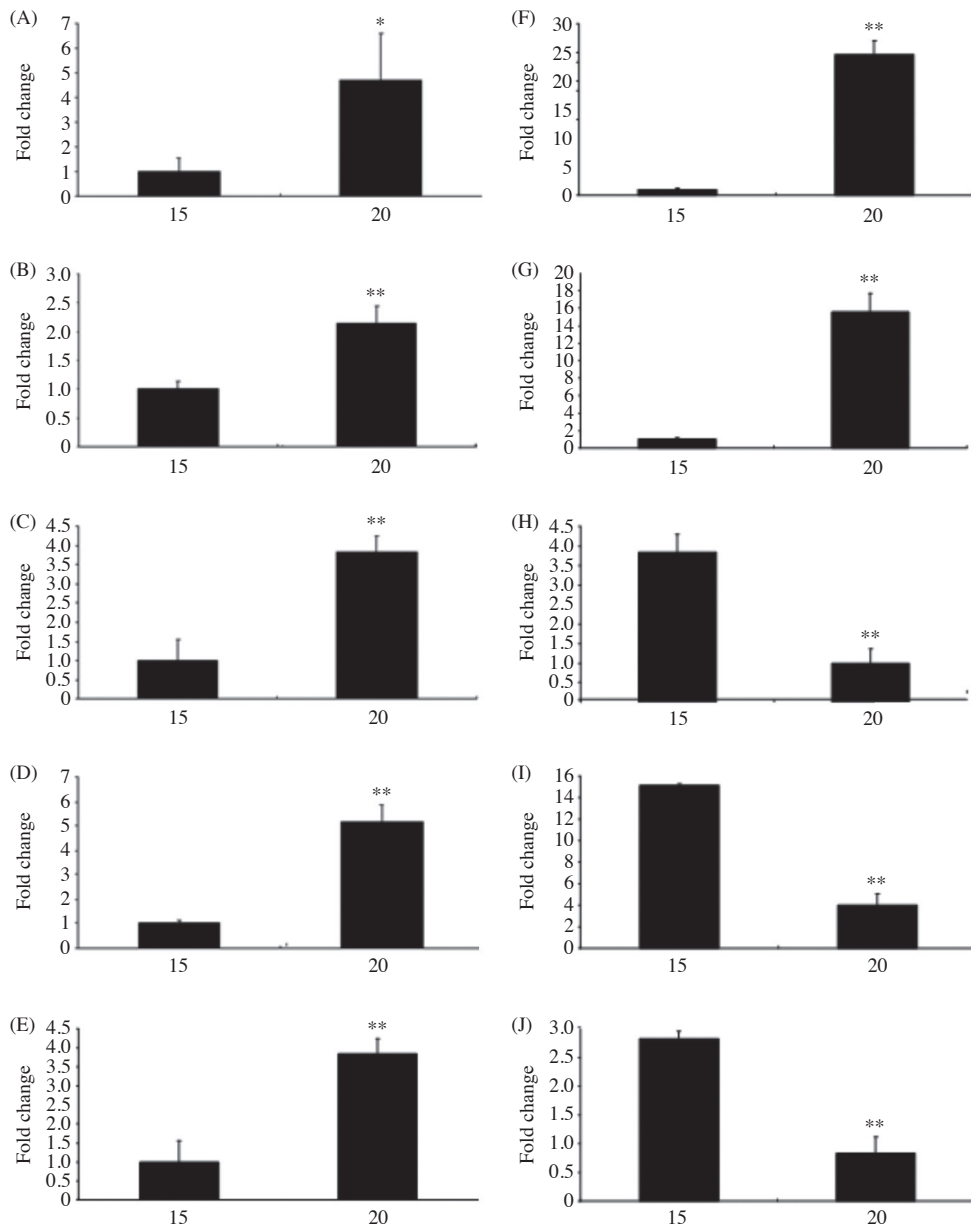


Fig. 2. Verification and evaluation of biomarker genes via RT-qPCR. A: interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A transcript variant X3; B: protein L-Myc-1b-like; C: fibroblast growth factor receptor-like 1 transcript variant X1; D: placenta growth factor-like transcript variant X1; E: transferrin; F: intelectin; G: thioredoxin-like; H: C-type lectin lectoxin-Thr1-like; I: ladderlectin-like; J: calponin-1. 15: 15°C, 20: 20°C. *Significant difference from control based on Student's *t*-test ($p < 0.05$, $**p < 0.01$).

MMP(matrix metalloproteinase)와 함께 관여한다고 알려져 있다(Belo *et al.* 2016).

본 연구에서 생체지표유전자로 선정된 유전자들의 기능은 병원균 및 체내 스트레스로 인한 체내 생리 및 면역에 대처하기 위한 단백질 유전자들로서, 수온 변화 등의 외부 환경요인에 의한 스트레스에 민감하게 반응하여 발현하였다. 환경요인이 야생 및 양식 생물의 항상성에 불균형을 초래하여

폐사에 이르게 하는 시간은 매우 짧게 나타날 수도 있다. 따라서 생물의 스트레스에 따른 건강상태의 주기적인 점검은 매우 중요하다. 이러한 주기적인 점검을 시행하는 데 있어서 저비용이며, 빠른 시간에 점검할 수 있는 최상의 방법은 유전자의 발현 분석을 통한 방법이다. 형태학적 혹은 사체 확인 후의 점검은 비효율적이며 대처가 늦은 단점이 있다. 최근 사람들을 대상으로 하는 진단 의학에 있어서도 생체지표

유전자를 이용하여 질병 및 향후 발생 가능한 질병을 예측하고 있다.

본 연구를 통해 대서양 연어 수온 변화에 따른 스트레스 상태 판단이 가능한 생체지표유전자를 확보하였다. 이러한 유전자들은 연어뿐만 아니라 다른 어종에도 적용 가능하기에 산업적으로 매우 유용하리라 판단된다. 생체지표유전자의 준비는 환경요인에 대비한 선제적 적응 대책의 수립, 지역별 서식환경과 양식생물 간의 관계에 대한 변화체계 모니터링 및 데이터베이스 구축을 통한 안정적인 양식생산성 예측을 위한 기반 확보로도 중요하다. 학문적으로도 상기 유전자들의 연어를 비롯한 어류에서의 기능에 대한 연구가 현재 미비하기에, 환경요인에 대한 어류 스트레스 감소 기작의 연구가 필요하며, 본 연구결과가 유용하게 적용되리라 생각된다.

적 요

기후 변화로 인한 수온의 상승은 어류 서식지에 영향을 미친다. 수온의 변화는 어류 생리 거의 모든 부분에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 기후 변화에 따른 수온의 상승은 산소 용해도의 감소 및 산소 운반 헤모글로빈의 결합 능력의 감소로 인해 저산소증을 초래할 수 있다. 본 연구는 대서양 연어(*Salmo salar*) 치어 성장의 최적수온(15°C)보다 고수온(20°C)에 사육 시, 대서양 연어 치어의 건강상태를 평가하기 위해 수행되었다. 평가 방법은 NGS RNAseq 분석방법을 이용하여 생체지표유전자를 개발하고, RT-qPCR 분석을 이용하여 생체지표유전자의 발현양상을 조사하는 것이다. 개발한 생체지표유전자는 interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2A transcript variant X3, protein L-Myc-1b-like, placenta growth factor-like transcript variant X1, fibroblast growth factor receptor-like 1 transcript variant X1, transferrin, intelectin, thioredoxin-like, c-type lectin lectoxin-Thr1-like, ladderlectin-like 및 calponin-1 등이다. 선택된 생체지표유전자는 NGS RNAseq 분석을 통해 수온변화에 민감하게 발현한 유전자들이며, RT-qPCR 분석을 통한 이들 유전자의 발현 양상은 NGS RNAseq 분석을 통한 발현 양상과 매우 유사하게 나타났다.

사 사

이 논문은 2018년 국립수산물과학원 수산과학연구소(2018005)의 지원으로 수행된 연구이며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Belo VA, JM Parente, JE Tanus-Santos and MM Castro. 2016. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension. *Biochem. Pharmacol.* 118:50-58.
- Brown GD, JA Willment and L Whitehead. 2018. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 1. doi: 10.1038/s41577-018-0004-8.
- Burt JM, SG Hinch and DA Patterson. 2012. Parental identity influences progeny responses to incubation thermal stress in sockeye salmon *Onchorhynchus nerka*. *J. Fish Biol.* 80: 444-462.
- Caissie D. 2006. The thermal regime of rivers: a review. *Freshw. Biol.* 51:1389-1406.
- 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.
- Chen L, J Yan, W Sun, Y Zhang, C Sui, J Qi, Y Du and L Feng. 2016. A zebrafish intelectin ortholog agglutinates both Gram-negative and Gram-positive bacteria with binding capacity to bacterial polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 55: 729-736.
- Choi HS, JI Myoung, MA Park and MY Cho. 2009. A study on the summer mortality of Korean rockfish *Sebastes schlegelii* in Korea. *J. Fish Pathol.* 22:155-162.
- Crossin GT, SG Hinch, SJ Cooke, DW Welsh, DA Patterson, SRM Jones, AG Lotto, RA Leggatt, MT Mathes, JM Shrimpton, G Van der Kraak and AP Farrell. 2008. Exposure to high temperature influences the behaviour, physiology, and survival of sockeye salmon during spawning migration. *Can. J. Zool.* 86:127-140.
- Ding Z, X Zhao, Q Zhan, L Cui, Q Sun, L Lin, W Wang and H Liu. 2017. Characterization and expression analysis of an intelectin gene from *Megalobrama amblycephala* with excellent bacterial binding and agglutination activity. *Fish Shellfish Immunol.* 61:100-110.
- Elliott JM and JA Elliott. 2010. Temperature requirements of Atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic char *Salvelinus alpinus*: predicting the effects of climate change. *J. Fish Biol.* 77:1793-1817.
- Evans TG, EDD Hammill, K Kaukinen, AD Schulze, DA Patterson, KK English, JMR Curtis and KM Miller. 2011. Transcriptomics of environmental acclimatization and survival in wild adult Pacific sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during spawning migration. *Mol. Ecol.* 20:4472-4489.
- Green CJ, P Lichtlen, NT Huynh, M Yanovsky, KR Laderoute,

- W Schaffner and BJ Murphy. 2001. Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer Res.* 61: 2696–2703.
- Healy TM, WE Tymchuk, EJ Osborne and PM Schulte. 2010. Heat shock response of killifish (*Fundulus heteroclitus*): candidate gene and heterologous microarray approaches. *Physiol. Genomics* 41:171–184.
- Hevrøy EM, R Waagbo, BE Torstensen, H Takle, I Stubhaug, SM Jorgensen, T Torgersen, L Tvenning, S Susort, O Breck and T Hansen. 2012. Ghrelin is involved in voluntary anorexia in Atlantic salmon raised at elevated sea temperatures. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175:118–134.
- Kang DY, HW Kang, GH Kim, KC Jo and HC Kim. 2007. Effect of cold shock on the physiological responses of the cultured mullet, *Mugil haematocheilus* in winter. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 40:226–233.
- Kang HW, EY Chung, DY Kang, YJ Park, KC Jo and GH Kim. 2008. Gonadal maturation and spawning of river puffer *Takifugu obscurus* indoor cultured in low salinity. *J. Aquaculture* 21:331–338.
- Kassahn KS, MJ Caley, AC Ward, AR Connolly, G Stone and RH Crozier. 2007. Heterologous microarray experiments used to identify the early gene response to heat stress in a coral reef fish. *Mol. Ecol.* 16:1749–1763.
- Liu SK, XL Wang, FY Sun, JR Zhang, JB Feng, H Liu, KV Rajendran, LY Sun, Y Zhang, YL Jiang, E Peatman, L Kaltenboeck, H Kucuktas and ZJ Liu. 2013. RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish. *Physiol. Genomics* 45:462–476.
- Lin ST, GD Zheng, YW Sun, J Chen, XY Jiang and SM Zou. 2015. Divergent functions of fibroblast growth factor receptor-like 1 genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 187:31–38.
- Liyanage DS, WKM Omeka, GI Godahewa and J Lee. 2018. Molecular characterization of thioredoxin-like protein 1 (TXNL1) from big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* in response to immune stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 75:181–189.
- Logan CA and GN Somero. 2011. Effects of thermal acclimation on transcriptional responses to acute heat stress in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300:R1373–R1383.
- McCormick SD, RA Cunjak, B Dempson, MF O’Dea and JB Carey. 1999. Temperature-related loss of smolt characteristics in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56:1649–1658.
- Morita K and A Nakashima. 2015. Temperature seasonality during fry out-migration influences the survival of hatchery-reared chum salmon *Oncorhynchus keta*. *J. Fish Biol.* 87:1111–1117.
- Nuez-Ortín WG, CG Carter, PD Nichols, IR Cooke and R Wilson. 2018. Liver proteome response of pre-harvest Atlantic salmon following exposure to elevated temperature. *BMC Genomics* 19:133.
- Quinn NL, CR McGowan, GA Cooper, BF Koop and WS Davidson. 2011a. Identification of genes associated with heat tolerance in Arctic charr exposed to acute thermal stress. *Physiol. Genomics* 43:685–696.
- Quinn NL, CR McGowan, GA Cooper, BF Koop and WS Davidson. 2011b. Ribosomal genes and heat shock proteins as putative markers for chronic, sublethal heat stress in Arctic charr: applications for aquaculture and wild fish. *Physiol. Genomics* 43:1056–1064.
- Reid A, KM Young and JS Lumsden. 2011. Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ladderlectin, but not intelectin, binds viral hemorrhagic septicemia virus IVb. *Dis. Aquat. Org.* 95: 137–143.
- Schick M, S Habringer, JA Nilsson and U Keller. 2017. Pathogenesis and therapeutic targeting of aberrant MYC expression in haematological cancers. *Br. J. Haematol.* 179:724–738.
- Somero GN. 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic “strategies”. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139:321–333.
- Somero GN. 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. *J. Exp. Biol.* 213:912–920.
- Soucek L, J Whitfield, CP Martins, AJ Finch, DJ Murphy, NM Sodik, AN Karnezis, LB Swigart, S Nasi and GI Evan. 2008. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* 455: 679–683.
- Suomela S, L Cao, A Bowcock and U Saarialho-Kere. 2004. Interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27) is upregulated in psoriatic skin and certain epithelial cancers. *J. Invest. Dermatol.* 122:717–721.
- Swansburg E, G Chaput, D Moore, D Caissie and N El-Jabi. 2002. Size variability of juvenile Atlantic salmon: links to environmental conditions. *J. Fish Biol.* 61:661–683.
- Thorne MAS, G Burns, KPP Fraser, G Hillyard and MS Clark. 2010. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. *Mar. Genom.* 3:35–44.
- Wedemeyer GA and DJ McLeay. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. pp. 247–276. In *Stress and Fish* (Pickering AD ed.). Academic

- Press, London, U.K.
- Windisch HS, R Kathover, HO Portner, S Frickenhau and M Lucassen. 2011. Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301:R1453–R1466.
- Yin X, L Mu, X Bian, L Wu, B Li, J Liu, Z Guo and J Ye. 2018. Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 74:530–539.
- Received: 3 April 2018
Revised: 26 April 2018
Revision accepted: 30 April 2018