Journal of Environmental Science International
29(6); 633~641; June 2020

pISSN: 1225-4517 eISSN: 2287-3503
https://doi.org/10.5322/JESI.2020.29.6.633

ORIGINAL ARTICLE

명태(*Gadus chalcogrammus*)의 일차 간세포 배양에서 온도 스트레스에 따른 HSP70 mRNA와 단백질 발현

김소선 · 이창주 · 박장수*
부산대학교 화학과

Expression of HSP70 mRNA and Protein based on the Thermal Stress in the Primary Hepatocyte Culture of Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus*)

So-Sun Kim, Chang-Ju Lee, Jang-Su Park*
Department of Chemistry and Chemistry Institute of Functional Materials, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Abstract

Water temperature is one of the most important factors of fish survival, affecting the habitat, migration route, development, and reproduction. This experiment studied the induction level of heat shock protein (HSP70) mRNA and protein in a walleye pollock (*Gadus chalcogrammus*) primary hepatocyte culture based on different temperatures. Hepatocytes were attached at 7.5°C for 24 hours. Hsp70 induction levels were then measured for 48 hours at 5, 8, 11, 14, and 17°C. The induction level was lowest at 5°C and generally increased with temperature until 14°C. The induction level was reduced at 17°C, indicating that 14°C is the highest tolerable temperature for hepatocytes. These data indicate that primary hepatocyte cell culture is under no stress at 5 and 8°C. Temperatures greater than 11°C induce stress, showing similar induction patterns in both mRNA and protein in hepatocytes. The results suggest that 14°C is the maximum internal defense temperature of walleye pollock survival.

Key words : HSP70, Walleye pollock, Water temperature, Primary hepatocyte culture

1. 서 론

열충격단백질(Heat Shock Proteins; HSPs)은 원핵생물에서부터 진핵생물까지 잘 보존되어 있고, 정상 상태에서도 존재하지만, 열, 활성산소, pH, 중금속, 박테리아 감염과 같은 외부 환경에 노출이 되면 생체 내에서 급격하게 발현이 되는 스트레스 단백질이다(Guerriero et al., 2002; Dong et al., 2008; Reddy et al., 2013; Scalici et al., 2017; Piscopo et al., 2018). HSP는 유기체의 발달 동안 형태학적 변화 및 세포 방어 그리고 분자 chaperones으로써 잘못 접힌 펩티드의 재 접힘에 관여함으로써 생체 내에서 스트레스로부터 방어 역할을 한다(Tomanek, 2010). HSP들은 분자량을 기초로 하여 HSP90 (85-90kDa), HSP70 (68-73 kDa) 및 저분자

Received 30 March, 2020; **Revised** 3 May, 2020;
Accepted 7 May, 2020
***Corresponding author**: Jang-Su Park, Department of Chemistry and Chemistry Institute of Functional Materials, Pusan National University, Busan 46241, Korea.
Phone: +82-51-510-2294
E-mail : jaspark@pusan.ac.kr

ⓒ The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
ⓒⓒ 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.

Fig. 1. Walleye pollock used in the experiment.

HSP (16-47 kDa) 등의 그룹으로 나누어지며, HSP들 중에서도 HSP70은 박테리아에서부터 포유류까지 넓게 분포하고 있으며 환경적 스트레스에 크게 반응을 한다 (Podrabsky and Somero 2004; Somero, 2010). 명태 (*Gadus chalcogrammus*)는 캄차카 반도와 베링해에서부터 한국의 동해안 연안과 북아메리카 중앙 캘리포니아 연안에 이르기까지 널리 서식 한다(Carr and Marshall, 2008; Page et al., 2013). 특히 명태(*G. chalcogrammus*)는 한국과 일본에서 경제성 있는 어종이다. 상업적으로 경제성이 있음에도 불구하고 2000년대 들어서 동해안의 명태(*G. chalcogrammus*) 어획량은 급감했다(FAO, 2018). 이러한 명태(*G. chalcogrammus*)의 어획량 급감에는 기후 변화에 따른 수온 상승이 원인으로 지목되고 있다(Lee and Kim, 2010.). 일반적으로 명태(*G. chalcogrammus*)의 초기 부화 자어의 적정 수온은 2~7℃ 사이라고 알려져 있다(Nakatani and Maeda, 1984). 그러나 Yoo et al., (2015) 연구에 의하면, 최근 100년간 명태(*G. chalcogrammus*)의 산란 시기인 겨울철의 중부 동해안 평균 해수면 온도는 2.33±0.52℃ 상승하였으며, 수온변화는 생활사 초기 과정을 표층에서 부유 생활하며 보내는 부화 자어의 생존에도 영향을 미칠 것이라고 보고했다. 수온은 명태(*G. chalcogrammus*)의 서식지 결정과 회유 경로 변화 및 성장, 생식, 대사 등의 생리적 활성에 영향을 미치는 어류의 생존에서 가장 중요한 요인이다(Parsell & Lindquist, 1993; Guerriero et al., 2002; Perry et al., 2005; Brierley & Kingsford, 2009; Doney et al., 2012).

어류를 포함하는 변온동물들은 서식범위의 온도변화에서는 항상성(homeostasis)을 유지할 수 있는 적응 능력을 가지지만, 기후변화에 의해 발생할 수 있는 수온의 상승은 산소 용해도의 감소 및 산소를 운반하는 헤모글로빈의 결합력 약화를 통한 저산소증(hypoxia)을 유발하여 수산생물에게 영향을 줄 수 있으며(Quinn et al. 2011a), 서식 온도의 한계를 넘어서는 급격한 온도변화는 어류의 여러 조직에서 활성 산소와 같은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 생성시켜 생화학적 및 생리학적 문제를 발생시키게 된다(Parihar et al., 1996; Lushchak and Bagnyukova, 2006). 그러므로 본 연구에서 수온 변화에 따른 명태(*G. chalcogrammus*) 간세포에서 HSP70의 발현 연구는 수온 변화와 산화적 스트레스 발생과의 관계를 전사 수준 및 면역 상태를 이해하는데 중요한 정보를 제공할 것이라 여겨진다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험어

실험어는 국립수산과학원 동해수산연구소에서 10 ton(지름 4 m, 높이 1 m) 수조에서 수온 7±0.5℃ 사육하고 있는 명태(*G. chalcogrammus*; 전장 20 cm, 전중 210 g)를 제공받아, 50 ppm의 MS-222를 사용하여 마취 후 해부하여 간 조직만을 분리하였다(Fig.1).

2.2. 재조합 단백질 발현 및 폴리클로날 항체(polyclonal antibody) 제작

RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 의해 얻어진 HSP70 product는 pET21b+ 벡터에 삽입되었으며(PCR 조건 94℃ 3min; 94℃ 30 sec, 52℃ 40 sec, 72℃ 2 min, 30 cycles; 72℃ 5 min) BL21(DE3) 균주에서 37℃, 180 rpm으로 LB-media에서 배양하였고, OD600에서 0.6이 될 때 1mM IPTG (Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside; Bioneer,

Table 1. Primer lists

primer name	sequence(5'→3')	Size
patail HSP70F	AGCCACCAAGGATGCTGGTACC	1051bp
patail HSP70R	CTTTGCCAGTGGCTCTTGTC	
qRT-PCR HSP70F	CATCGCAGAGTTCAAGCGCA	111bp
qRT-PCR HSP70R	GGTGCTGGAGGAGAGCGTGC	
beta-actinF	AGGCTCAGAGCAAGAGAG	150bp
beta-actinR	CGGTGAGCGGACGGGTGC	

Korea)를 첨가하여 4시간 동안 30℃에서 발현하였고, Ni+ affinity column에서 정제 후 12% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)에서 확인하였다. 정제된 100 ug의 HSP70 재조합 단백질은 BABL/c 마우스에서 Freund's adjuvant (promega, USA)와 함께 1주일 간격으로 4회 주사하여 폴리클로날 항체를 생산하였다. 생산된 항체는 면역학적 분석에 이용되었다. 실험에 사용된 primer 정보는 Table 1에서 나타내었다.

2.3. 일차 간세포 배양(primary hepatocyte culture)

일차 간세포 배양은 다른 연구자들의 방법을 참고하였다(Chang et al., 2014). 명태(*G. chalcogrammus*)의 간 조직은 8℃에서 10분 동안 Hepatocyte Buffer (HB, 136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.81 mM $MgSO_4$, 0.44 mM KH_2PO_4, 0.33 mM Na_2HPO_4, 5.0 mM $NaHCO_3$, pH 7.6)에서 처리하여 혈액 등의 불순물을 제거하였다. 그 후에 collagenase가 담긴 Ca^{2+}-free Ringer HB buffer (0.3 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO)를 사용해 균질화하였으며, 부드러워진 조직들은 나일론 필터(70 μm)를 사용해서 간세포만을 분리했다. 분리해 낸 간세포는 1.5 mM $CaCl_2$를 포함한 HB를 사용해서 효소 활성을 억제했다. 세포 현탁액은 1000 g에서 두 번 원심분리 후 각 60 mm Dish 당 1×10^6 cell/100μl 농도로 Leibovitz-15 배지에서(L-15, Sigma, St. Louis, MO) 24시간 동안 7.5℃에서 부착 후 5, 8, 11, 14 및 17℃의 온도에서 48시간 배양하였다. 배양 온도는 명태(*G. chalcogrammus*)의 10℃ 이하 서식 수온과 겨울철 동해 표층 수온을 고려하여 설정하였으며 일정한 온도 유지를 위해 2019년 1월 중 실험하였다. 48시간 배양 후 세포 생존율 측정을 위해 trypsin-EDTA (Life technologies, Inc.)를 이용하여 세포를 떼어낸 다음 세포 부유액을 trypan blue 염색액과 동량으로 희석하여 hemocytometer를 이용하여 세포 수를 계측하였다. 염색이 되지 않은 세포를 살아있는 세포라 가정하고 계측하였으며 세포 생존율(%)은 전체 세포 중 살아있는 세포를 전체 세포수로 나눈 값에 100을 곱하여 계산하였다. 모든 배양은 세 번 이상 반복하여 평균 값과 표준편차를 나타내었다.

2.4. 온도에 따른 간세포로부터 HSP70 mRNA 발현 (qRT-PCR)

48시간 동안 5, 8, 11, 14 및 17℃의 배양 온도에 노출시킨 명태(*G. chalcogrammus*) 간세포에서 HSP70 mRNA 발현을 분석하기 위해 각 배양 Dish에서 세포들을 회수한 후 Total RNA를 추출했다. Total RNA는 TRizol Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 추출하였으며, 1 μg의 total RNA는 Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (promega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 명태(*G. chalcogrammus*) HSP70 nucleotide sequence (accession number; MF 770310)는 본 실험실에서 RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends-PCR)법에 의해 밝혀낸 정보를 참고하여 primer를 제작하였다(Table 1). HSP70 mRNA 발현은 Chrome4 Real-time System (Bio-Rad, USA)를 이용하여 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)으로 분석하였다. 대조구로서 house-keeping gene은 대구(*Gadus morhua*)의 β-actin (Genebank accession number; U48856)을 사용하였으며, 모든 분석 값은 β-actin에 대한 cycle (Ct) level 과의 차이로 계산하였다. Ct값은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 식으로 결정지었다(Livak and Schmittgen, 2001).

2.5. Western blot 및 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

배양된 간세포들은 NP40 buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 단백질을 추출하였으며, 추출된 단백질들은 10% SDS-PAGE gel에서 loading 한 후 전기영동 하였다. 전기영동 한 단백질들은 45 mm Immobilon-NC transfer membranes (Millipore, USA)에 옮긴 후 3% BSA로 2시간 동안 blocking하고 본 연구실에서 제작한 1차 항체, anti-HSP70을 처리하고 4℃에서 overnight 후 Alkaline Phosphatase (AP)가 붙어 있는 goat anti-mouse IgG (Sigma, USA, 2차 항체)로 반응시켜 AP가 붙어 있는 1-StepTM NBT/BCIP substrate solution (34042, Thermo Fisher Scientific, USA) 사용하여 발색하였다.

ELISA 분석을 위해 간세포에서 추출된 단백질들은 ELISA plate (Nunc, Denmark)에 50 μL (250 ng/well) 씩 분주한 후, 4℃에서 overnight하여 항원을 coating하였다. Tween-20이 0.05% 포함된 PBS (T-PBS)로 3번 세척 하였고 1% gelatin을 함유한 PBSTG로 blocking하고 세척하였다. 1차 항체로는 본 연구실에서 제작한 anti-HSP70을 처리하고 37℃에서 2시간 동안 반응시켰으며, PBST로 3번 세척 후 2차 항체로서 alkaline phosphatase conjugated 된 goat anti-mouse IgG (sigma, USA)를 5000:1로 희석하여 처리한 후 37℃에서 2시간 동안 반응 시킨 후 3번 세척하였다. 마지막으로 phosphatase substrate solutions (KPL, Korea)을 처리하고 10분 후에 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 통계학적 분석

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

3. 결 과

3.1. 재조합 단백질 HSP70 발현

명태(*G. chalcogrammus*) HSP70의 폴리클로날 항체 생산을 위해 Genebank에 등록된 명태(*G. chalcogrammus*) HSP70 (accession number; MF 770310) 서열을 이용해 약 35kDa 정도의 재조합 단백질을 *E.coil*에서 IPTG (Bioneer, Korea)를 처리하여 합성하였다(Fig 2. 3lane). pET21b+ 벡터의 c-terminal 말단에 붙은 His-tag과의 친화력을 이용하여 Ni^{2+} affinity column에서 HSP70을 정제하였으며(Fig 2. 4 lane), 정제된 재조합 HSP70 단백질은 BALB/c 마우스에서 HSP70 폴리클로날 항체를 만드는데 이용되었다.

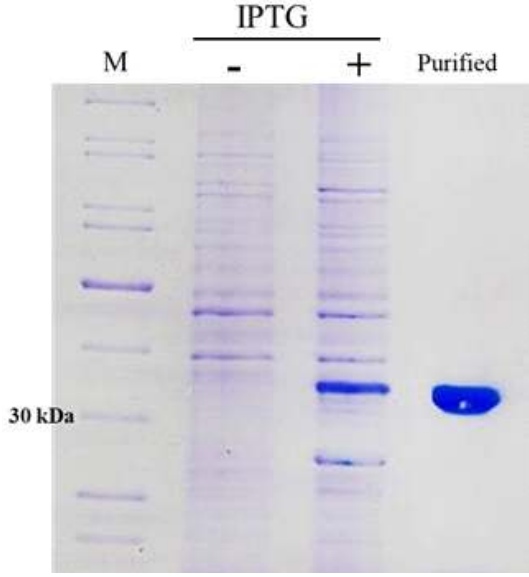

Fig. 2. 35 kDa fragment recombinant HSP70 protein expression in *E. coli*. 1 lane; Marker, 2 lane; before IPTG 3 lane; 4 hours after IPTG injection 5 lane; purification via Ni2+ affinity column. kDa fragment recombinant HSP70 was synthesized in *E. coli* BL21(DE3) strain for the production of polyclonal antibody.

3.2. 세포 생존율(%)

7.5℃에서 24시간 동안 부착 후에 각 배양 온도에서 48시간 동안 배양한 세포들은 5℃에서 11℃ 사이의 온도 범위에서는 90% 이상 세포 생존율을 보였다(Fig. 3). 8℃에서 98.23%로 가장 높은 세포 생존율이 나타났으며, 5℃와 11℃에서 각각 95.37%, 90.08%의 세포 생존율이 나타났다. 11℃ 이상의 온도에서 순차적으로 세포 생존율이 감소하는 양상을 보이며 14℃의 배양온도에서는 71.96%의 세포 생존율이 나타났다. 17℃의 배양 온도에서는 많은 간세포가 부유하며 죽어 있었으며 세포 생존율은 24.8%로 가장 낮았다. 이러한 결과로 보아 14℃ 이상의 배양 온도는 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포가 생존하기에 어려운 환경으로 보인다.

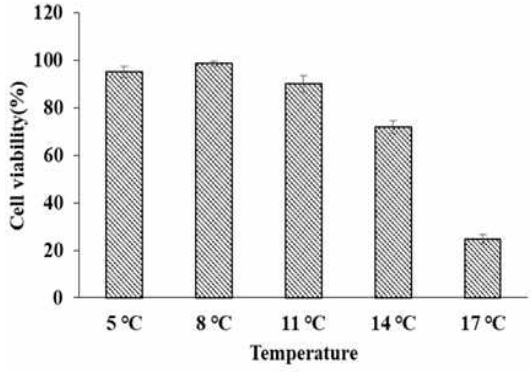

Fig. 3. Cell viability (%) of hepatocytes of walleye pollocks. The hepatocytes were attached at 7.5℃ for 24 hours and then cultured for 48 hours in each temperatures (5, 8, 11, 14 and 17℃). The hepatocytes cultured in temperatures between 5~11℃ showed viability of 90% and higher, at 14℃ and higher the cell viability decreased and at 17℃ culture temperature, many hepatocytes were suspended and dead. ($P<0.05$).

3.3. 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포에서 HSP70 mRNA 발현

Fig. 4은 5, 8, 11, 14 및 17℃의 온도에서 유도 된 HSP70의 발현량을 나타냈다(Fig. 4A). 5℃에서 HSP70의 발현량은 가장 낮게 나타났으며, 14℃에서 가장 높은 발현량을 나타났다. 반면에 17℃에서는 HSP70의 발현량은 다시 감소하였다(Fig. 4B). Fig. 4C에서 가장 낮은 발현량의 5℃와 다른 온도와의 HSP70의 상대적인 발현량을 비교해보면 11℃와 14℃에서는 2.5배 이상의 발현량의 차이가 나타나지만 17℃에서는 1배 정도로 상대적 발현량이 감소한다. 이러한 결과들은 11℃ 이상의 온도에서는 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포가 온도 스트레스에 노출이 된다는 것을 의미한다. 그러나 14℃ 보다 높은 온도에서는 세포가 생존하기 어려운 환경이 되어 HSP70의 발현량이 감소하는 것으로 보인다.

3.4. 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포에서 HSP70 단백질 발현

Fig. 5A는 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포에서 HSP70의 단백질 발현을 western blot으로 나타내었다. 재조합 단백질에 의해 만들어진 명태(*G. chalcogrammus*)의 HSP70 폴리클로날 항체는 ELISA 표준검량 곡선의 결과 2.75 ng/mL에서 1670 ng/mL의 검출 한계를 나타

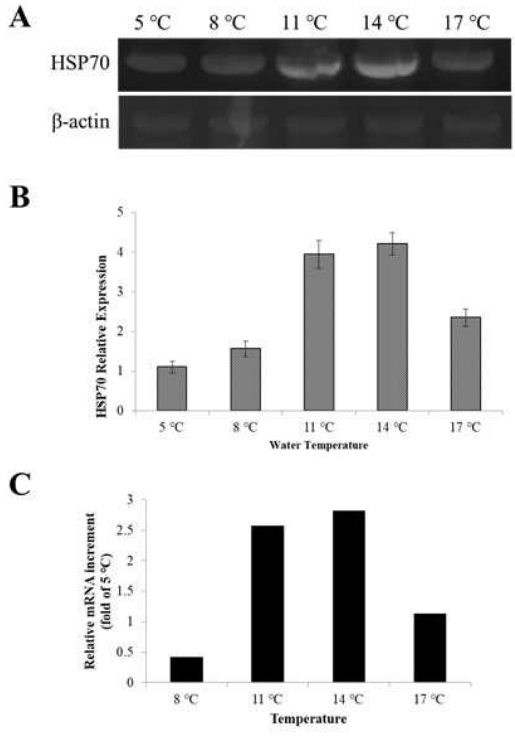

Fig. 4. The comparative induction of mRNA of HSP70. (A) HSP70 mRNA induction pattern by 1.2% agarose gel electrophoresis (B) HSP70 comparative induction level (qRT-PCR) (C) Comparison of induction of HSP70 to 5℃. Data were showed as mean ± SD ($P<0.05$).

냈으며 3차 다항식 $y=0.0088X^3-0.087X^2+0.2795X-0.1858$로 검출식이 나타났다(Fig. 5B). HSP70의 단백질 발현량은 Table 2에 나타냈다. 배양 온도에 따른 명태(*G. chalcogrammus*) 간세포의 HSP70 발현량은 5℃에서 43.2±3.25 ng/mL로 가장 낮은 값이 나타났으며, 14℃에서 321.87±15.57 ng/mL로 가장 높은 값을 나타냈다. 그러나 17℃의 배양 온도에서는 204.79±7.54 ng/mL로 발현량이 감소하여 11℃에서 발현량보다 낮게 나타났다(Fig. 5C, Table 2). 이러한 결과들로 보아 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포의 최적의 배양 온도는 5~8℃로 보이며 11~14℃ 배양 온도에서는 스트레스 환경에 노출이 되는 것으로 나타났으며, 그 이상의 온도가 되면 간세포의 생존이 어려운 환경으로 여겨진다.

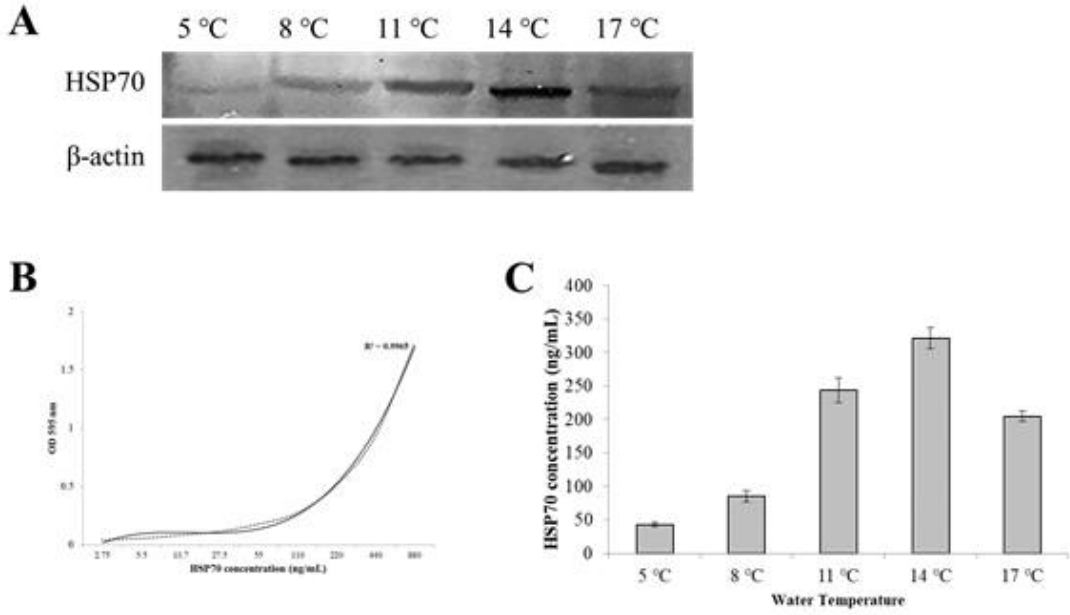

Fig. 5. Comparisons of protein induction levels of HSP70 based on temperature. (A) Induction pattern of HSP70 proteins based on temperature were cultured in (by western blot) (B) ELISA standard curve dotted line, curved line is trend line. (C) Induction level of HSP70 proteins by ELISA. Data were showed as mean ± SD ($P<0.05$).

Table 2. Induction level of HSP70 protein by ELISA

Temperature	HSP70 Concentration (ng/mL)
5 ℃	43.2±3.25
8 ℃	85.35±8.44
11 ℃	243.81±15.46
14 ℃	321.87±15.57
17 ℃	204.79±7.54

Data were showed as mean ± SD ($P<0.05$).

4. 고 찰

수온은 해양 생물의 성장 및 생존에 필수적인 기본 요소 중 하나이다. 특히 간 조직은 여러 가지 대사반응에 관여하는 중요한 장기 중 하나로써, 본 연구에서는 배양 온도에 따라 간세포에서 유도되는 HSP70의 발현을 연구함으로써 명태(*G. chalcogrammus*)의 온도 스트레스 대한 영향을 연구하는데 목적이 있다. 해양 생물에 대한 이전의 연구들에서 온도 스트레스에 대한 HSP의 조직 특이적 발현 연구는 입증되었다(Dyer et al., 1991; Koban et al., 1991; Dietz and Somero, 1993; Dietz, 1994; Mazur, 1996; Wood, 1996; Airaksinen et al., 1998). 그러나 명태(*G. chalcogrammus*)의 HSP70과 수온에 대한 연구는 아직까지 보고되어지지 않았다. 지구 온난화의 결과로 꾸준히 수온이 상승하고 있기 때문에 특히 명태(*G. chalcogrammus*)와 같이 냉수성 어류의 수온에 대한 스트레스 반응 연구는 향후 어류의 생존 및 종 보호를 위해 필요하지만 여전히 연구는 부족한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포에서 배양 온도에 따라 유도 되는 HSP70 mRNA와 단백질의 발현 패턴 및 발현 레벨에 대한 연구를 하였다.

수온의 상승은 물고기의 부화, 성장 및 서식지 결정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Perry et al., 2005; Brierley and Kingsford, 2009; Doney et al., 2012). 어류의 초기 단계에서 성장과 발달은 어류의 가입을 결정하는 가장 큰 요인 중 하나이다. 이것은 명태(*G. chalcogrammus*)와 같은 냉수 어류에서 특히 중요하다 (Nakatani et al., 2003). 일반적으로 서식 수온 범위에서는 수온이 높을수록 에너지 대사가 증가하여 성장이 빨라

지지만 고수온에서는 큰 개체일수록 산소 요구량이 높아져 성장은 둔화된다. 명태(*G. chalcogrammus*)의 수온에 대한 연구는 명태(*G. chalcogrammus*)의 치어에 대한 연구에서는 2~7℃ (Nakatani and Maeda, 1984), 명태(*G. chalcogrammus*)의 서식 온도 연구에서는 1~10℃ 등의 연구들이 보고되었다(Bakkala, 1993). 최근 겨울철 동해안의 평균 수온은 10℃ 이상이 나타나고 있다. 우리의 연구 결과에서 HSP70의 mRNA 발현량으로 비교해보면 5~8℃ 사이에는 환경적 스트레스에 작용 받지 않는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 11~14℃ 사이에서는 5℃에 비해 2.5배 이상의 상대적 발현량을 나타내며 HSP70이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. HSP70의 급격한 증가는 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포가 스트레스를 환경에 노출이 된 것을 의미한다. 17℃에서 배양된 간세포는 48시간 후 부착된 세포들이 부유하고 있었다. 17℃ 이상의 온도에서 명태(*G. chalcogrammus*)의 간세포는 생존하기 어려운 온도로 생각되며, 세포 내에서 누적되어 있던 HSP70이 발현이 된 것으로 여겨진다. HSP70의 단백질 발현량 또한 mRNA와 유사하게 14℃에서 321.87±15.57 ng/mL로써 가장 높은 발현량을 나타냈으며 온도가 높아질수록 HSP70의 발현량도 높아지는 유의미한 값을 나타냈다.

생체 내에서 HSP70은 온도, 중금속, 박테리아 감염 등에 노출 되었을 때 높은 발현을 나타내는 특징으로 인해 생체지표로서 많은 연구가 보고되었다(Feder and Hofmann, 1999; Sørensen et al., 2003; Karl et al., 2009; Shatilina et al., 2011). Somero(2002)에 의하면 HSP70은 스트레스 환경에 노출이 되면 발현량이 크게 증가되었으며 생리작용과 항상성 유지에 에너지를 소모함으로 성장과 번식에 영향을 주는 것을 보고하였다.

본 연구에서 HSP70은 생체지표 유전자로서 스트레스 및 대사에 관련되어 있으며 수온 변화 등의 외부 환경에 민감하게 반응하여 발현하였다. 해양 생물에서 수온과 같은 환경 요인은 해양생물에게는 항상성에 영향을 미쳐 대량 폐사로 이어지기도 하기 때문에 HSP70의 주기적인 발현 분석을 통하여 생태환경을 예측 및 관리 할 수 있다. 명태(*G. chalcogrammus*)와 같이 어획량이 급감하여 자원 보호를 위한 지속적인 방류와 양식 연구를 하고 있는 어종에서는 최적의 생태환경 관리를 위해 수온 변화에 따른 HSP70의 연구가 필요하다.

5. 결 론

명태(*G. chalcogrammus*) 간세포 배양에서 5~ 8℃ 사이에서는 온도 스트레스를 받지 않으며, 11℃ 이상의 온도에서는 온도 스트레스에 노출이 되는 것으로 여겨진다. 또한 HSP70의 mRNA 발현과 HSP70의 단백질은 유사한 패턴을 나타냈으며 온도 증가에 따라 HSP70의 발현 또한 유의미한 증가를 나타냈다. 그러므로 간세포 배양과 HSP70 발현은 수온과 같은 환경 스트레스 영향을 분석하는데 유용한 지표로 활용 가능하며, 본 연구 결과는 다른 냉수 어종에서도 HSP70의 발현과 온도와의 영향을 연구하는데 매우 중요한 기초 자료를 제공 한다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업(2019-2020)으로 진행되었습니다.

REFERENCES

Airaksinen, S., Rabergh, C. M. I., Sistonen, L., Nikinmaa, M., 1998, Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells, Journal of Experimental Biology, 201, 2543-2551.

Bakkala, R. G., 1993, Structure and historical changes in the ground fish complex of the Eastern Bering Sea, U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Report, 114, 91.

Brierley, A. S., Kingsford, M. J., 2009, Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems, Current biology, 19, 602-614.

Carr, S. M., Marshall, H. D., 2008, Phylogeographic analysis of complete mtDNA genomes from Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus* Pallas, 1811) shows an ancient origin of genetic biodiversity, Mitochondrial DNA, 19, 490-496.

Chang, Z., Lu, M., Kim, S. S., Park, J. S., 2014, Potential role of HSP90 in mediating the interactions between estrogen receptor (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways, Toxicology Letters, 226, 6-13.

Dietz, T. J., 1994, Acclimation of the threshold induction temperatures for 70-kDa and 90-kDa heat shock proteins in the fish *Gillichthys mirabilis*, Journal of Experimental

Biology, 188, 333-338.

Dietz, T. J., Somero, G. N., 1993, Species- and tissue -specific synthesis patterns for heat-shock proteins HSP70 and HSP90 in several marine teleost fishes, Physiological Zoology, 66, 863-880.

Doney, S. C., Ruckelshaus, M., Emmett, J., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N. N., Sydeman, W. J., Talley, L. D., 2012, Climate change impacts on marine ecosystems, Annual Review of Marine Science, 4, 11-37.

Dong, Y., Dong, S., Ji, T., 2008, Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* selenka. Aquaculture, 275(1-4), 329-334.

Dyer, S. D., Dickson, K. L., Zimmerman, E. G., 1991, Tissue-specific patterns of synthesis of heat-shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow (*Pimephales promelas*), Canadian Journal of Zoology, 69, 2021-2027.

FAO, 2018, Fish Stat. *Theragra chalcogramma*.

Feder, M. E., Hofmann, G. E., 1999, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, Annual Review of Physiology, 61, 243-282.

Gribanov, D. V., Timofeyev, M. A., 2011, The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) in the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats, Journal of Thermal Biology, 36, 142-149.

Guerriero, G., Finizio, D., Ciarcia, A. G., 2002, Stress -induced changes in plasma antioxidants of aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, Comparative Biochemistry and Physiology, 132, 205-11.

Karl, I., Sorensen, J. G., Loeschcke, V., Fischer, K., 2009, HSP70 expression in the copper butterfly *Lycaena tityrus* across altitudes and temperatures. Journal of Evolutionary Biology, 22, 172-178.

Koban, M., Yup, A. A., Agellon, L. B., Powers, D. A., 1991, Molecular adaptation to environmental temperature: heat shock response of the eurythermal teleost *Fundulus heteroclitus*, Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1, 1-17.

Lee, Y., Kim, D., 2010, Measuring surface water temperature effects on the walleye Pollock fishery production using a Translog cost function approach. Environmental and Resource Economics, 19 (4), 897-916.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta C(T)}$ Method, Methods, 25(4): 402-408.

Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., 2006, Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes, Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 143 : 36-41.

Mazur, C. F., 1996, The heat shock protein response and physiological stress in aquatic organisms, Doctoral thesis, University of British Columbia.

Nakatani, T., Maeda, T, 1984, Thermal effect on the development of walleye pollock eggs and their upward speed to the surface, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 50, 937-942.

Nakatani, T., Sugimoto, K., Takatsu, T., Takahashi, T., 2003, Environmental factors in Funka Bay, Hokkaido, affecting the year class strength of walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography, 67, 23-28.

Page, L. M., Espinosa-Perez, H., Findley, L. T., Gilbert, C. R., Lea, R. N., Mandrak, N. E., Mayden, R. L., Nelson, J. S., 2013, Common and Scientific names of Fishes from the United States, 7th edition. 34 American Fisheries Society, Canada, Mexico Special Publication, 243.

Parihar, M. S., Dubey, A. K., Faveri, T., Prakash, P., 1996, Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipids content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature, Journal of Thermal Biology, 21, 323-330.

Parsell, D. A., Lindquist, S., 1993, The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins, Annual Review of Genetics, 27, 437-496.

Perry, A. L., Low, P. J., Ellis, J. R., Reynolds, J. D., 2005, Climate change and distribution shifts in marine fishes, Science, 308, 1912-1915.

Piscopo, M., Notariale, R., Rabbito, D., Ausió, J., Olanrewaju, O. S., Guerriero, G., 2018, Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) spermatozoa: hsp70 expression and protamine-like protein property studies, Environmental Science and Pollution Research, 25(13), 12957-12966.

Podrabsky, J. E., Somero, G. N., 2004, Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*, Journal of Experimental Biology, 207, 2237-2254.

Quinn, N. L., McGowan, C. R., Cooper, G. A., Koop, B. F., Davidson, W. S., 2011, Identification of genes associated with heat tolerance in Arctic charr exposed to acute thermal stress, Physiological Genomics, 43, 685-696.

Reddy, D. V., Nagbhushanam, P., Ramesh, G., 2013, Turnover time of Tural and Rajvadi hot spring waters, Maharashtra, India, Current Science, 104(10), 1419-1424.

Scalici, M., Traversetti, L., Spani, F., Malafoglia, V., Colamartino, M., Persichini, T., Cappello, S., Mancini, G., Guerriero, G., Colasanti, M., 2017, Shell fluctuating asymmetry in the seadwelling benthic bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) as morphological markers to detect environmental chemical contamination, Ecotoxicology, 26, 396.

Shatilina, Z. M., Riss, H. W., Protopopova, M. V., Trippe, M., Meyer, E. I., Pavlichenko, V. V., Bedulina, D. S., Axenov-Gribanov, D. V., Timofeyev, M. A., 2011, The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) in the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats, Journal of Thermal Biology, 36, 142-149.

Somero, G. N., 2002, Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and costs of living, Integrative and Comparative Biology, 42(4): 780-789.

Somero, G. N., 2010, The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers', Journal of Experimental Biology, 213, 912-920.

Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., Loeschcke, V., 2003, The evolutionary and ecological role of heat shock proteins, Ecology Letters, 6, 1025-1037.

Tomanek, L., 2002, The heat-shock response: its variation, regulation and ecological importance in intertidal gastropods (genus Tegula), Integrative and Comparative Biology, 42, 797-807.

Wood, L. A., Brown, I. A., Youson, J. H., 1999, Tissue and developmental variations in the heat shock response of sea lampreys (*Petromyzon marinus*): effects of an increase in acclimation temperature, Comparative Biochemistry and Physiology A, 123, 35-42.

Yoo, H. K., Byun, S. G., Yamamoto, J., Sakurai, Y., 2015, The Effect of Warmer Water Temperature of Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus*) Larvae, Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety, 21(4), 339-346.

• Ph.D. So-Sun Kim
Department of Chemistry and Chemistry Institute of Functional Materials, Pusan National University
ssokim81@naver.com
• Graduate Student. Chang-Ju Lee
Department of Chemistry and Chemistry Institute of Functional Materials, Pusan National University
gd0090s@naver.com
• Professor. Jang-Su Park
Department of Chemistry and Chemistry Institute of Functional Materials, Pusan National University
jaspark@pusan.ac.kr