

참돔(*Pagrus major*)에서 온도 및 염분 스트레스가 FK506BP 발현에 미치는 영향

민병화¹ · 명정인² · 강한승^{3*}

¹국립수산물관리원 양식관리과

²국립수산물관리원 전략양식부

³엠에스바이오랩 유전체연구부

Effects of Thermal and Salinity Stress on Expression of FK506BP in the Red Seabream (*Pagrus major*)

Byung Hwa Min¹, Jeong-In Myeong², Han Seung Kang^{3*}

¹Aquaculture Management Division, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 46083, Korea

²Aquaculture Research Department, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 46083, Korea

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

Corresponding Author

Han Seung Kang

Genome Research Department, MS

BioLab, Daejeon 34576, Korea

E-mail : hanseungkang66@gmail.com

Received : April 24, 2017

Revised : April 25, 2017

Accepted : April 26, 2017

FK506BP는 일명 FK506 binding protein 12이라 불리는 작은 펩티드로서 single 도메인을 가진다. FK506BP는 면역반응 억제, 산화적 스트레스 및 염증과 관련이 있다. 본 연구의 목적은 참돔(*Pagrus major*)을 저수온(8°C, 33 psu) 및 저염분(20°C, 10 psu) 상태에 노출시킨 후, FK506BP 유전자의 발현을 관찰하는 것이다. 연구결과, FK506BP 유전자의 발현은 저수온(8°C, 33 psu) 및 저염분(20°C, 10 psu)상태에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이 연구결과로서 FK506BP 유전자는 수온 및 염분 등의 환경 스트레스에 대한 생체지표유전자로서 역할을 한다고 제의한다.

FK506BP (FK506 binding protein 12) is a small peptide with a single FK506BP domain. It is involved in suppression of immune response, oxidative stress and inflammation. The purpose of this study was to investigate the gene expression of FK506BP in red seabream (*Pagrus major*) exposure to low water temperature (8°C, 33 psu) and low salinity (20°C, 10 psu). Results showed that, the expression of FK506BP was significantly increased in the experiment groups, such as low water temperature (8°C, 33 psu), and low salinity (20°C, 10 psu). These results suggest that FK506BP was played roles in biomarker gene on the environmental stress such as water temperature and salinity.

Keywords: *Pagrus major*, FK506BP, Biomarker(생체지표), Temperature(온도), Salinity(염분)

서론

수온, 산소 및 염분 등 환경요인의 급격한 변화는 환경재해요인으로 작용하여 수산양식을 업으로 하는 어민들에게 피해를 주고 있다. 또한 정부는 이에 대한 피해 보상을 위해 막대한 재원을 지출하고 있는 실정이다. 양식생물에게 특히 피해를 많이 주는 환경재해요인은 저수온(Kang et al., 2007), 고수온(Choi et al., 2009) 적조(Lim et al., 2008), 저염분(Kang et al., 2008) 등이다.

환경재해요인이 양식생물의 항상성에 불균형을 초래하여 폐사에 이르게 하는 위해 수준의 정도에 대한 과학적인 자료는 양식생물 피해 발생 시에 피해산정 및 기준 제시 시 필요하다. 또한, 과학적인 자료의 준비는 자연환경재해요인에 대비한 선제적 적응대책의 수립, 지역별 서식환경과 양식생물 간의 관계에 대한 변화체계 모니터링 및 데이터베이스 구축을 통한 안정적인 양식생산성 예측을 위한 기반 확보로도 필요하다.

일본에서는 양식생물에 대한 기초 생물학적 연구가 체계적으로

A			B			C		
No.	Glucose (mg/L)	Cortisol (ng/mL)	No.	Glucose (mg/L)	Cortisol (ng/mL)	No.	Glucose (mg/L)	Cortisol (ng/mL)
1	46	ND	1	185	14.0	1	97	68.7
2	55	2.3	2	163	25.2	2	86	164.5
3	136	3.1	3	213	22.5	3	155	159.6
4	168	2.7	4	210	14.6	4	157	4.5
5	272	4.1	5	117	6.2	5	68	306.4
6	75	1.0	6	234	24.5	6	146	178.5
7	54	3.9	7	196	8.1	7	102	213.7
8	83	ND	8	143	20.5	8	129	98.8
9	152	ND	9	133	21.0	9	148	87.1
10	143	1.4	10	243	33.3	10	177	72.7

Fig. 1. Analysis of blood characteristics for selection of experimental fishes. A. control, B. low temperature, C. low salinity.

수행되어 각 생물종에 대한 적정수온, 한계수온, 적정염분 및 용존 산소 농도 범위 등과 같은 기초자료가 각 생물종별로 체계적으로 정리되어 있다(Kodama et al., 2012; Thanasaksiri et al., 2014). 미국 및 유럽에서도 수산생물의 기초 생물학적 연구가 수행되어 생물의 건강성 평가, 생리적 내성 범위 등 환경변화에 따른 생태, 생리 및 분자생물학적 연구에 관한 기초 자료가 풍부하다(Balbi et al., 2017; Múgica et al., 2015; Parisi et al., 2017).

분자생물학적 연구방법을 통한 유전체 연구는 생물체의 유전정보를 분석하고 활용하는데 있어 새로운 도구와 방법론을 제공함으로써 생물 산업의 기술 패러다임 자체를 변화시키고 있다. 환경요인의 변화에 따른 생물 개체의 건강상태를 평가하는데 있어서 생체지표유전자(biomarker gene)를 이용한 평가는 저비용으로 신속하게 개체의 상태를 평가할 수 있는 장점이 있다.

해양에 서식하는 생물은 저수온 및 저염분 등의 환경요인의 변화에 따라 개체에 많은 스트레스를 유발하고 이러한 스트레스는 생물 개체의 항상성에 불균형을 유도하여 성장 및 대사과정에 영향을 미쳐서 건강을 잃게 만든다.

따라서 본 연구의 목적은 환경요인 중에서 저수온 및 저염분에 의해 발생된 참돔(*Pagrus major*) 개체의 스트레스에 따른 건강상태를 평가하는데 있어서 생체지표유전자를 이용한 평가에 목적을 두며, 차세대유전체분석법(next generation sequencing, NGS)을 통하여 발굴된 유전자 중에서 FK506BP를 선정하여 평가하였다.

본 연구에 생체지표유전자로 평가에 선정된 FK506BP는 참돔 성어 저수온 및 저염분 노출 개체를 대상으로 NGS RNAseq 연구수행을 통해 발굴된 다수의 유전자 중에서, 생체지표유전자로 매우 유용한 역할을 기대하며 관심을 가진 유전자이다. 현재까지 FK506BP 유전자의 기능은 면역, 염증 등의 질병 관련 및 산화적 스트레스 등의 조절에 관여한다고 알려져 있다(Lima et al., 2006; Ingelsson et al., 2009; Kim et al., 2011; Kim et al., 2015).

재료 및 방법

1. 실험동물

참돔 성어를 대조군(20°C, 33 psu), 저수온(8°C, 33 psu) 및 저염분(20°C, 10 psu) 상태의 실험군을 준비한 후 5시간 노출시켰다. 각 실험군별 10마리의 개체를 선택한 후에 혈액성상 분석을 시행하여 스트레스 지표로 알려진 glucose 및 cortisol 농도를 분석하여 대조군 대비 저수온 및 저염분에 따른 스트레스를 받은 개체를 선정하여 실험어로 선정하였다(Fig. 1). 대조군의 경우 glucose 및 cortisol 농도의 수치가 낮은 것을 선정하였으며, 상대적으로 저수온 및 저염분 실험군에서는 glucose 및 cortisol 농도의 수치가 높은 것을 선정하였다.

실험어는 각각 5마리로서 대조군(No: 1, 2, 6, 7, 8), 저수온(No: 3, 6, 7, 9, 10) 및 저염분(No: 2, 3, 5, 6, 7) 선정하였다. 각 실험군별 실험어에서 조직시료(뇌, 뇌하수체, 간, 아가미, 비장, 신장)를 수집한 후에 액체질소를 이용하여 동결 전 처리 후 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

2. RNA 추출

Total RNA 추출은 GeneAll RiboEx kit를 사용하였다. 저온 동결 보존된 조직시료를 grinder로 곱게 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.

3. 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

cDNA 합성을 위한 역전사 반응(Reverse Transcription, RT)은 iScript cDNA synthesis kit (Biorad Co.)를 이용하였다. Total RNA 1 µg, iScript 5×Master mix 4 µl, iScript reverse transcriptase 1 µl 및 DEPC-water을 넣어 최종 반응용액 20 µl을 맞추어 42°C에서 1시간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 iQ SYBR Green Supermix kit (BioRad)를 이용하여 수행하였다. cDNA 1 µl, primer 각각 1 µl, iQ SYBR Green Supermix (2×) 10 µl 및 DEPC-water을 넣어 최종 반응용액 20 µl 되게 맞추어 real-time PCR machine (CFX96, Biorad)를 이용하여 증폭하고 형광량을 분석하였다. 유전자를 증폭시키기 위한 반응 조건은 95°C에서 3분간 유지, 이후 95°C에서 15초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 45 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. 내재표준 유전자로는 house keeping 유전자인 β -actin을 사용하여 발현량을 normalization시켰다. 프라이머 염기서열은 FK506BP (5'-TACCAGC-AGGTCCATAAGCG-3'), (5'-AGGGAAGTGGCTAAACGGGA-3'), β -actin (5'-GGCACTGCTGCCTCCTC-3'), (5'-GCCAGGATGGAGCCTCC-3') 및 AccuPower HotStart PCR premix kit (Bioneer Co.)이다.

4. 통계학적 분석

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

결과 및 고찰

FK506 binding protein 12는 FK506BP로 명칭되며, 단일 FK506BP 도메인을 갖는 작은 펩타이드(12 kDa)로서, 면역억제약물과의 결합 능력이 있는 immunophilin과에 속한다(Kim et al., 2015). 따라

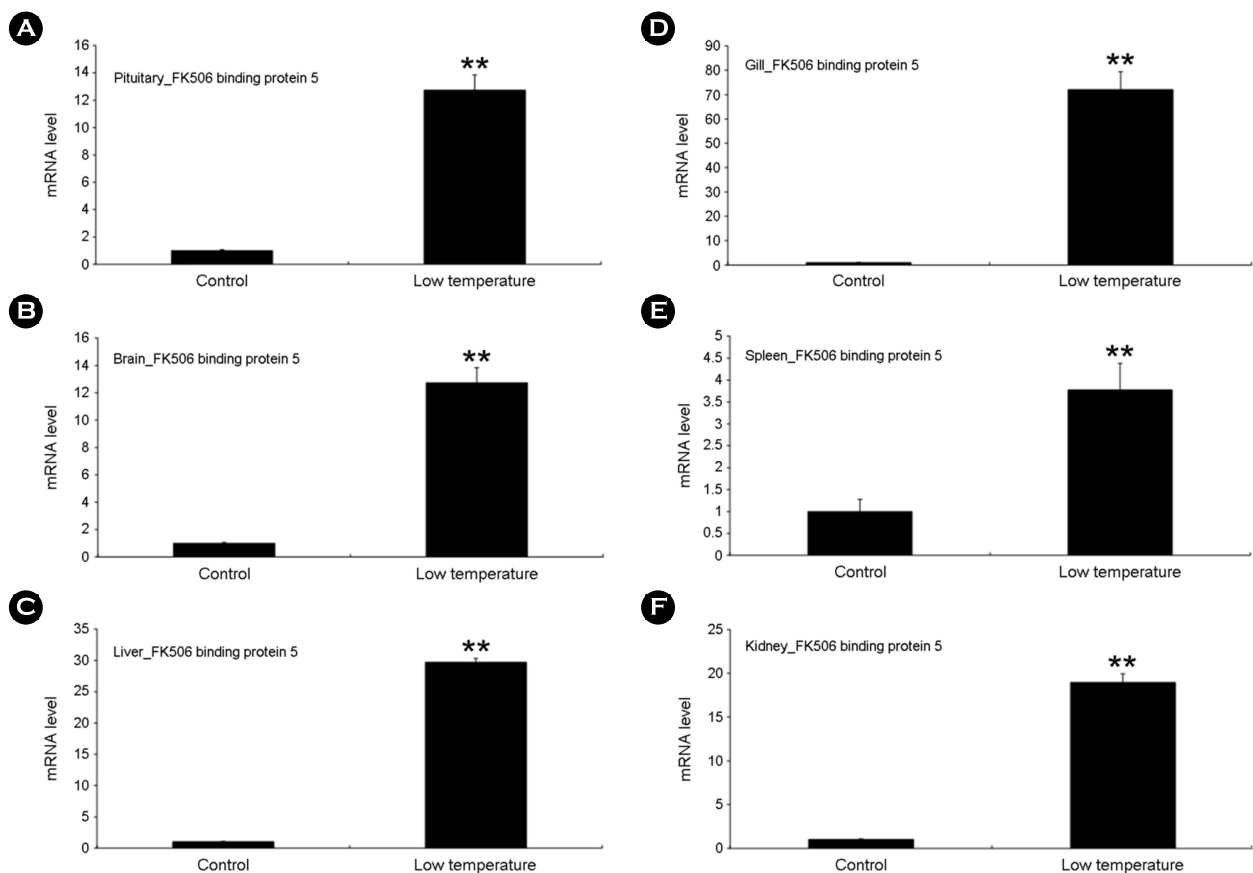


Fig. 2. mRNA fold changes of FK506BP by real-time PCR in *P. major* exposed to low temperature. A: pituitary, B: brain, C: liver, D: gill, E: spleen, F: kidney. *Significant different from control by Student's *t*-test (***p*<0.01).

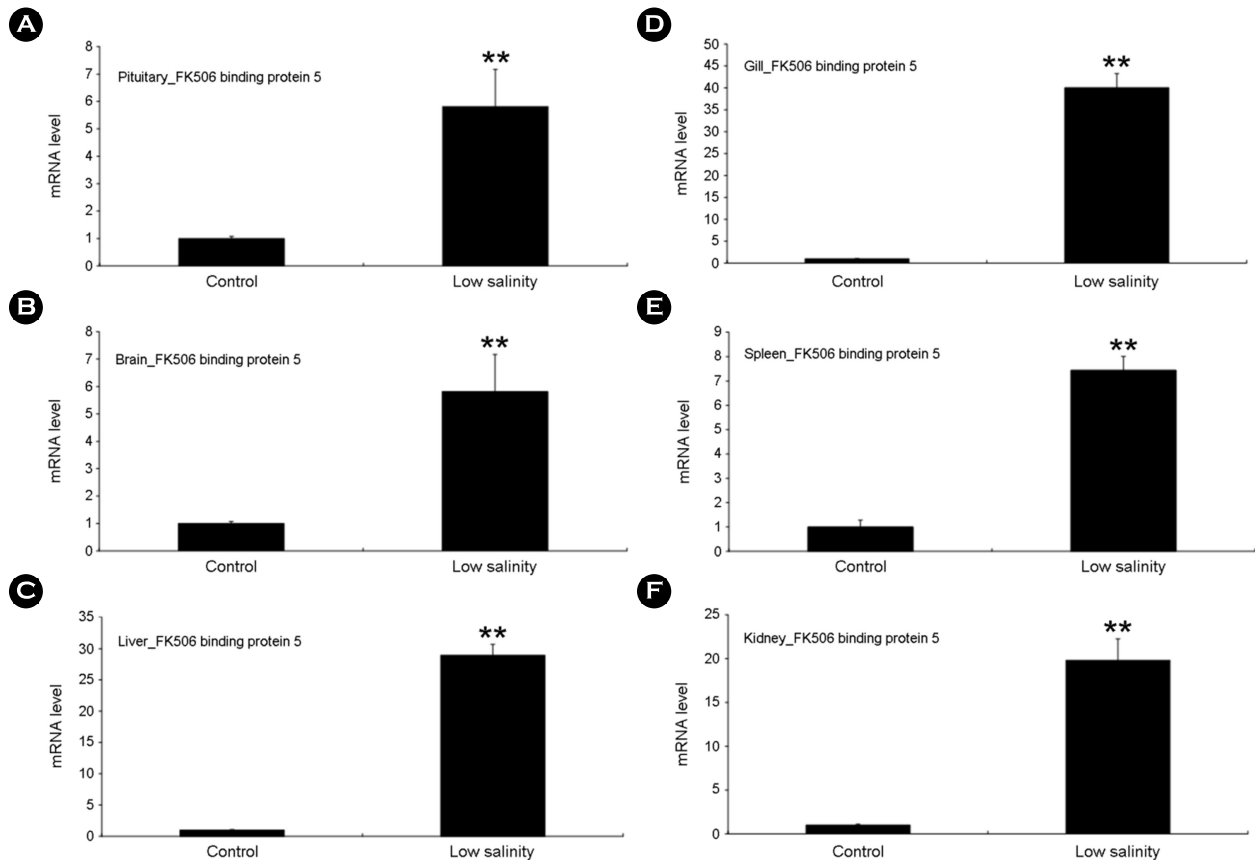


Fig. 3. mRNA fold changes of FK506BP by real-time PCR in *P. major* exposed to low salinity. A: pituitary, B: brain, C: liver, D: gill, E: spleen, F: kidney. *Significant different from control by Student's *t*-test (** $p < 0.01$).

서 면역억제 반응에 관여하며, 또한 활성산소종(reactive oxygen species)의 반응에도 관여한다고 알려져 있다(Kim et al., 2015). FK506BP에 관한 연구로는 사람, 쥐(rat) 및 생쥐(mouse)를 대상으로 암(Liu et al., 2017), 염증(Kim et al., 2011), 아토피성 피부염(Kim et al., 2011) 및 안구질환(Kim, 2013; Kim, 2015) 질병모델 연구 등이 보고되었다. 식물에 있어서 환경 스트레스에 대한 스트레스 조절 단백질로서 FK506BP는 중금속, 산화적 스트레스 및 병원균의 침입 등에 대한 반응을 하는 것으로 알려져 있다(Lima et al., 2006; Ingelsson et al., 2009). 척추동물에서 근소포체(sarcoplasmic reticulum, SR)는 Ca^{2+} 저장체이며 심장의 SR Ca^{2+} 채널은 FK506BP에 의해 조절된다고 알려져 있다(Korajoki and Vornanen, 2014). 또한 온도 변화에 따라 심장의 SR 기능은 변동이 생기는데 여기에 FK506BP 발현이 연관되어 있다고 알려져 있다(Korajoki and Vornanen, 2014).

본 연구결과 참돔 성어를 저수온 및 저염분 농도에 노출시켜 스트레스를 유발시킨 후, 각각의 뇌하수체, 뇌, 간, 아가미, 비장 및 신장 조직에서 FK506BP 유전자의 발현을 조사하면 대조군에

비해 현저한 발현의 증가를 나타냈다(Fig. 2, 3). 저수온에 노출된 개체의 조직별 발현양상을 가장 높은 발현을 보인 조직에서 상대적으로 낮은 발현을 보인 조직을 순서대로 나열하면 아가미, 간, 신장, 뇌, 뇌하수체 및 비장의 순서로 나타났다. 또한 저염분에 노출된 개체 조직을 대상으로 고발현에서 저발현으로의 순서를 나열하면 아가미, 간, 신장, 비장, 뇌 및 뇌하수체의 순서로 나타났다. 그리고 FK506BP는 저수온 및 저염분 모두 아가미에서 가장 높은 발현을 보였으며 다음으로 간, 신장이라는 공통점을 보였다. 저수온 및 저염분 노출에 따른 스트레스 및 건강상태를 평가하기 위한 생체지표유전자로서 FK506BP를 이용할 경우 고발현이 나타난 조직을 대상으로 평가가 이루어지는게 유용하다고 판단된다.

이러한 결과는 FK506BP 유전자의 발현이 대조군에 비해 현저히 높게 발현 시에는 개체가 스트레스를 받고 있다고 평가할 수 있다. 분자생물학적 유전체 분석을 통한 생체지표유전자의 선정 조건은 환경요인의 영향에 민감하게 반응하여 유전자의 발현 변화가 큰 유전자가 적합하다. 또한 환경요인의 영향에 따른 스트레스 및 건강상태를 판명하기 위한 실용성 있는 생체지표유전자

의 선택은 단일 환경요인 영향에 민감하게 반응하는 유전자보다는 다수의 환경요인 영향에 공통적으로 민감하게 반응하는 유전자가 실용성 있게 사용할 수 있다.

따라서 해수 양식어종인 참돔에게 있어 주요한 스트레스 및 폐사 유발 자연환경재해요인인 저수온 및 저염분의 영향에 대한 참돔 개체의 건강상태의 평가를 위한 생체지표유전자로서 FK506BP 유전자의 활용은 매우 유용하리라 판단된다.

참고문헌

- Balbi T, Fabbri R, Montagna M, Camisassi G, Canesi L. 2017. Seasonal variability of different biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) farmed at different sites of the Gulf of La Spezia, Ligurian sea, Italy. Mar Pollut Bull Epub ahead of print.
- Choi HS, Myoung JI, Park MA, Cho MY. 2009. A Study on the summer mortality of Korean rockfish *Sebastes schlegelii* in Korea. J Fish Pathol 22: 155-162.
- Ingelsson B, Shapiguzov A, Kieselbach T, Vener AV. 2009. Peptidyl-prolyl isomerase activity in chloroplast thylakoid lumen is a dispensable function of immunophilins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 50: 1801-1814.
- Kang DY, Kang HW, Kim GH, Jo KC, Kim HC. 2007. Effect of cold shock on the physiological responses of the cultured mullet, *Mugil haematocheilus* in winter. J Kor Fish Soc 40: 226-233.
- Kang HW, Chung EY, Kang DY, Park YJ, Jo KC, Kim GH. 2008. Gonadal maturation and spawning of river puffer *Takifugu obscurus* indoor cultured in low salinity. J Aquaculture 21: 331-338.
- Kim DW, Lee SH, Shin MJ, Kim K, Ku SK, Youn JK, Cho SB, Park JH, Lee CH, Son O, Sohn EJ, Cho SW, Park JH, Kim HA, Han KH, Park J, Eum WS, Choi SY. 2015. PEP-1-FK506BP inhibits alkali burn-induced corneal inflammation on the rat model of corneal alkali injury. BMB Rep 48: 618-623.
- Kim DW, Lee SH, Ku SK, Cho SH, Cho SW, Yoon GH, Hwang HS, Park J, Eum WS, Kwon OS, Choi SY. 2013. Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates corneal injury in Botulinum toxin A-induced dry eye mouse model. BMB Rep 46: 124-129.
- Kim DW, Lee SH, Ku SK, Lee JE, Cha HJ, Youn JK, Kwon HY, Park JH, Park EY, Cho SW, Han KH, Park J, Eum WS, Choi SY. 2015. The effects of PEP-1-FK506BP on dry eye disease in a rat model. BMB Rep 48: 153-158.
- Kim SY, Jeong HJ, Kim DW, Kim MJ, An JJ, Sohn EJ, Kang HW, Shin MJ, Ahn EH, Kwon SW, Kim DS, Cho SW, Park J, Eum WS, Choi SY. 2011. Transduced PEP-1-FK506BP inhibits the inflammatory response in the Raw 264.7 cell and mouse models. Immunobiology 216: 771-781.
- Kim SY, Sohn EJ, Kim DW, Jeong HJ, Kim MJ, Kang HW, Shin MJ, Ahn EH, Kwon SW, Kim YN, Kwon HJ, Kim TY, Lee KS, Park J, Eum WS, Choi SY. 2011. Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice. J Invest Dermatol 131: 1477-1485.
- Kodama K, Rahman MS, Horiguchi T, Thomas P. 2012. Assessment of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA expression in mantis shrimp as a biomarker of environmental hypoxia exposure. Biol Lett 23: 278-281.
- Korajoki H, Vornanen M. 2014. Species- and chamber-specific responses of 12 kDa FK506-binding protein to temperature in fish heart. Fish Physiol Biochem 40: 539-549.
- Lim WA, Lee YS, Lee SG. 2008. Characteristic of Environmental Factors Related to Outbreak and Decline of *Cochlodinium polykrikoides* Bloom in the southeast coastal waters of Korea, 2007. Journal of the Korean Society of Oceanography The Sea 13: 325-332.
- Lima A, Lima S, Wong JH, Phillips RS, Buchanan BB, Luan S. 2006. A redox-active FKBP-type immunophilin functions in accumulation of the photosystem II supercomplex in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 103: 12631-12636.
- Liu T, Xiong J, Yi S, Zhang H, Zhou S, Gu L, Zhou M. 2017. FKBP12 enhances sensitivity to chemotherapy-induced cancer cell apoptosis by inhibiting MDM2. Oncogene 36: 1678-1686.
- Múgica M, Sokolova IM, Izagirre U, Marigómez I. 2015. Season-dependent effects of elevated temperature on stress biomarkers, energy metabolism and gamete development in mussels. Mar Environ Res 103: 1-10.
- Parisi MG, Mauro M, Sarà G, Cammarata M. 2017. Temperature increases, hypoxia, and changes in food availability affect immunological biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. J Comp Physiol B Epub ahead of print.
- Thanasaksiri K, Sakai N, Yamashita H, Hirono I, Kondo H. 2014. Influence of temperature on Mx gene expression profiles and the protection of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, against red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection after poly (I:C) injection. Fish Shellfish Immunol 40: 441-445.