





김 정 현



이학석사 학위논문

수온노출에 따른 각시붕어,

Rhodeus uyekii의 HSP70 family gene과

혈장 내 glucose 변화



부경대학교대학원

해 양 생 물 학 과

김 정 현







목 차

List of figuresiii
List of tablesv
Abstract
I. 서론1
Ⅱ. 재료 및 방법
1. 실험어
2. 세포배양(<i>in vitro</i> 실험) ···································
3. HSP70 mRNA 분리 및 cDNA 합성
4. 정량적 real-time PCR
5. 혈장 내 glucose 농도 분석(<i>in vivo</i> 실험)7
6. 조직 절편 제작
7. 계통수 및 통계분석
Ⅲ. 결과
- · 1. 각시붕어 HSP70 family cDNA의 분리 ·······9
2. 각시붕어 HSP70 family cDNA의 염기서열 분석
3. 각시붕어 HSP70 family mRNA의 조직별 발현
4. 각시붕어 HSP70 family mRNA의 발생단계별 발형
5. 수온변화에 따른 각시붕어 HSP70 family mRNA의 발형
6. 수온변화에 따른 각시붕어 혈장 내 glucose의 농도 변화31
7. 수온변화에 따른 각시붕어 아가미의 조직학적 관찰



V.	ይ.약	38
VI.	참고문헌	39





List of Figures

Fig. 1. Korean rose bitterling, Rhodeus uyekii1

 Fig. 5. Tissue distribution of the Korean rose bitterling RuHSP70

 family.

 25

Fig. 6. Developmental stage of the Korean rose bitterling RuHSP70 family. 28

Collection @ pknu





List of Tables

Table 1. Primers used for the real-time RT-PCR of the Korean rosebitterling RuHSP70 family and b-Actin.5

Table 2. Pairwise ClustalW analysis and comparison of the deduced amino acid sequence RUHSP70 4-like, RuHSP70, RuHSP70 12A-like, RuGRP78 with HSP70 4-like, HSP70, HSP70 12A-like, GRP78-related sequences from other species. 22





Effects of water temperature on HSP70 family gene and plasma glucose levels in the Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii*

Jung Hyun Kim

Department of Marine Biology, Graduate School, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract

NAT

Temperature is one of common variables in the aquatic environment that directly affect survival of aquatic organisms. Temperature also changes the physiological functions associated with the stress response of fish. Heat shock protein and glucose levels in plasma can be used as general stress indicators in fish. The objective of the present study was to investigate the expression of heat shock protein 70 family mRNAs as cellular stress responses and the levels of plasma glucose in Korean rose bitterling, Rhodeus uyekii exposed to water temperature. The experimental fish (TL; 4.0±0.5cm, BW; 0.75±0.3g) were divided into 4 groups that were exposed at 20, 24, 28 and 32°C, respectively. The expression of RuHSP70 family mRNA and the levels of plasma glucose were investigated. RuHSP70 family mRNA was expressed highly in the hepatopancreas, testis and ovary of normal R. uyekii. Quantitative real-time PCR analysis showed the expression of RuHSP70 family mRNA was elevated by higher water temperature (32 $^{\circ}$ C) in primary hepatopancreatic cells of *R. uvekii*. The plasma glucose level was the highest in R. uyekii exposed to higher water temperature (28 $^{\circ}$ C). In addition, histological observation of gill tissue in R. uvekii, gill lamella was damaged or curved at the higher temperature. These results showed that the expression of RuHSP70 family mRNA as well as the change of plasma glucose level in R. uvekii are influenced by the high water temperature.



I. 서 론

수서생물의 가장 일반적인 스트레스는 서식처 환경의 온도 변화이다. 개체의 적정 생체 온도 이하일 경우 저온 충격이 가해지며, 이상일 경우 열 충격이 가해져 스트레스의 원인으로 작용을 한다.

열충격단백질(Heat shock protein, HSP)은 고온에 노출되었을 때 발현되 는 단백질로, 대표적인 스트레스 단백질로 알려져 있으며(Roberts et al., 2010), 모든 생물에 공통적으로 존재하는 단백질이다. 생물이 자신의 서식 적정 온도를 벗어나면 세포내의 열충격단백질 합성 및 다양한 생리적인 변화가 일어나게 된다(Schlesinger et al., 1992). 살아있는 생물의 열충격 단백질 유전자 발현은 서식처의 온도(Currie and Tufts, 1997; Piano et al., 2005)뿐만 아니라 유기오염물질(Sanders et al., 1991), 미량금속 (Sanders et al., 1991; Schill et al., 2003), 중금속(Wagner et al., 1999), 삼투농도(Kultz, 1996), 산소 결핍(Myrmel et al., 1994), 그리고 비브리오 감염(Cellura et al., 2006) 등과 같은 다양한 스트레스 반응이 증가할 때 나타난다.

열충격단백질은 분자량을 기초로 하여 HSP90, HSP70, 그리고 저분자량 HSP(sHSP)등 3개의 주요한 family로 나누어진다(Basua et al., 2002; Georgopoulos and Welch, 1993). 그 중에서 HSP70은 가장 잘 알려진 스 트레스 단백질 중 하나로, 열 스트레스에 민감하게 반응한다. HSP70은 생체 내 조직과 세포에 열 충격의 정도 및 노출기간에 따라 발현량이 다 르게 나타난다(Iwama et al., 1998, 1999). 어류는 그들의 갑작스런 서식환 경 변화, 특히 수온 스트레스에 반응하여 HSP70 mRNA와 단백질 (HSP70)의 발현량이 증가한다고 보고하였다(Kong et al., 1996; Currie and Tufts, 1997; Currie et al., 2000; Hightower et al., 1999; Lund et al.,



2002; Ojima et al., 2005a,b). HSP70은 사람(Roux et al., 1994), 제브라피 쉬(Graser et al., 1996), 참돔(Deane and Woo, 2005) 그리고 무지개 송어 (Ojima et al., 2005a)등과 같은 여러 어류들과 그 상동성이 매우 높은 것 으로 알려져 있으며, 환경 조건의 변화시 글루코르티코이드 (glucocorticoid) 수용체의 합성을 위해 가장 잘 발현되는 스트레스 단백 질이다(Hutchison et al., 1994). 또한 생물체의 혈장 내 glucose는 스트레 스 지표(indicator)로 널리 사용되고 있으며, 어류가 스트레스를 받을 때에 그것에 저항하는 하나의 에너지 기질(energy substrates)로서 잘 알려져 있다(Afonso et al., 2008).

각시붕어(*Rhodeus uyekii*)는 잉어과(*Cyprinidae*), 납자루아과 (*Acheilognathinae*)에 속하는 우리나라 토종 담수어류이다. 각시붕어의 전 장은 4-5㎝이며, 유속이 완만하고 수초가 비교적 많이 있는 얕은 하천이 나 저수지에 살면서 미세한 부착조류와 동물성 플랑크톤을 먹고 산다. 산 란기는 4월 하순부터 6월 중순이며 서식처의 바닥에 사는 조개의 새강에 산란관을 이용하여 알을 낳는 어종으로, 최근에는 국내 관상용 어류로 관 심이 집중되고 있는 어종이다(Kang et al., 2005). 각시붕어에 대한 연구 는 산란관의 신장(Chae., 2001), 첨가 샤료에 의한 체색변화(Kim et al., 1999), 마취효과(Kang et al., 2005), 생식주가에 미치는 광주기 및 수온의 영향(An., 1995), 그리고 골격학적 연구(Kim., 1997)등이 있으나 서식환경 변화, 특히 얕은 하천의 수온변화에 따른 각시붕어의 생물학적 반응과 관 런된 연구는 여전히 부족한 실정이다.

본 연구에서는 우리나라 고유종인 각시붕어를 대상으로 수온변화에 따른 HSP70 family 유전자의 발현양상과 혈장 내의 glucose 농도변화를 조사 하였으며 온도변화에 반응하는 아가미의 조직학적 관찰도 병행하였다.



Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 경상남도 의령군 양천강에서 채집한 우리나라 고유종인 각시붕 어(Fig. 1)로 채집 즉시 국립수산과학원(NFRDI)으로 수송하여 사육하였 다. 사육하는 동안 먹이는 냉동장구벌레를 매일 2회 공급하였고 수온은 20±1℃, 광주기는 12L/12D로 유지하였다. 실험에 사용한 각시붕어의 평균 전장은 4.0±0.5cm, 그리고 체중은 0.75±0.3g이었다.



Fig. 1. Korean rose bitterling, Rhodeus uyekii



2. 세포배양 (in vitro 실험)

실험어 2마리로부터 간췌장(hepatopancreas) 조직을 절취한 뒤 Trypsin-EDTA용액으로 간췌장 세포를 각각 분리한 후 ACK lysing buffer(GIBCO BRL)로 3분간 유지 후 Phosphate buffer saline(PBS)로 세 척하였다. 이후 20°C의 배양기에서 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO BRL)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에, 1% (v/v) antibiotic - antimycotic(AA; GIBCO BRL) 항생제를 첨가하여 24-well plate에 배양하였다.

배양된 4개의 세포 실험구는 각각 20, 24, 28 그리고 32℃ 배양기에서 2 시간 노출시킨 뒤 실온에서 3시간 유지 후, -80℃의 초저온 냉동고에 보 관하였다.

3. HSP70 family mRNA 분리 및 cDNA 합성

작각의 실험구(20, 24, 28, 32℃) 시료로부터 TRIzol[®] reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. PCR을 수행 하기 위한 프라이머의 설계는 각시붕어 cDNA library의 EST 분석으로부 터 확보한 HSP70과 HSP70 family 유전자의 염기서열을 참고로 하여, Primer Express[®] software(Applied Biosystem)를 이용하여 프라이머를 설계하였다(Table 1). Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.



Gene	Primer	Sequence(5'-3')	Product size (bp)
RuHSP70	Ru-HSP70-RT-F Ru-HSP70-RT-R	GGA TGA CGT CCA AAG AGA AAA GG ATC TTC AAC GGT GGA CTT CAT GT	82
RuHSP70 12A-like	Ru-HSP12A-RT-F Ru-HSP12A-RT-R	AGC GTA TAA GGC TGG TCT GGT TT ATG CAG CTT CTG GTT CCA AAG	74
RuHSP70 4-like	Ru-HSP4-RT-F Ru-HSP4-RT-R	CCT GGC AGG GCG TTC A GGC ATC TGA GCA AGA TCA AAG A	74
RuGrp78	Ru-Grp78-RT-F Ru-Grp78-RT-R	CCA CCA GAG TGA AGG GAA AAA A CGT GAA GCC ACG AGG AAA GA	74
ß-actin	Ru-b-Actin-F Ru-b-Actin-R	GAT TCG CTG GAG ATG ATG CT ATA CCG TGC TCA ATG GGG TA	167

Table. 1. Primers used for the real-time RT-PCR of the Korean rose bitterling RuHSP70 family and b-Actin.





4. 정량적 real-time PCR

HSP70 mRNA의 온도별 발현양상을 조사하기 위해 Real-time PCR을 실시하였다.

Total RNA는 실험구의 세포 및 조직으로부터 추출하였으며, Real-time PCR을 수행하기 위한 각시붕어 HSP70와 3종류의 HSP70 family 유전자 에 대한 프라이머는 Table 1에 나타내었다.

Total RNA 2µg을 사용한 Real-time PCR은 Fast SYBR Green Master Mix(ABI)를 사용하여 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR시스템에 서 holding stage를 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, cycling stage에서는 95℃에서 15초, 60℃에서 30초를 40회 반복하였고, 그리고 melt curve stage를 95℃에서 15초, 60℃에서 1분, 95℃에서 30초, 60℃에서 15초로 실시하였다. HSP70 및 HSP70 family 유전자의 발현량은 Gelpro3.1(KBT, Korea) 컴퓨터 프로그램을 사용하여 2^{-ΔΔCT} 방법으로 내부표준 유전자인 β-actin의 발현량에 대한 비율로 환산하여 정량하였다.

W ZI CH QL II



5. 혈장 내 glucose 농도 분석 (in vivo 실험)

총 24마리의 각시붕어는 4개의 수조에 각각 6마리씩 수온 20, 24, 28 그 리고 32℃의 실험구에 3일간 노출시켰다. 수온 조절은 시간당 1℃씩 점차 적으로 증가시켰다. 혈장 내 glucose 분석을 위해 실험어는 2-phenoxyethanol(300ppm)으로 마취시킨 뒤, 헤파린 처리한 모세관을 사 용하여 혈액을 채취하였다. 수온별로 6마리의 혈액을 혼합한 후 원심분리 (4℃, 13000 rpm, 15분)한 뒤 분리된 혈장은 분석 전까지 - 80℃의 초저 온 냉동고에 보관하였다.

수온 실험구별로 추출된 혈장 내 glucose 농도는 Biochemistry Autoanalyzer(DRI-CHEM NX500i, FUJIFILM Co., Japan)를 이용하여 분 석하였다. 혈장 내 glucose 농도는 FUJI DRI-CHEM NX500i 전용 분석 용 kit를 사용하였으며, 이때 사용된 분석용 kit는 측정범위 10-600mg/dL 의 GLU-P III(Co. FUJIFILM, Japan)를 사용하였다.



6. 조직 절편 제작

각 수온에 노출된 각시붕어의 아가미 조직은 Bouin's 용액에 고정 후 파라핀으로 포매한 뒤 5-6 μm 두께로 연속절편을 만들어 Mayer's hematoxylin과 eosin으로 비교 염색하였다. 제작된 아가미 조직은 광학현 미경(BX-50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

7. 계통수 및 통계분석

발현서열 꼬리표(expressed sequence tag, EST) 클론은 각시붕어의 total cDNA libraries에서 plasmid miniprep kit(Qiagen)를 사용하여 분리 하였다. 그리고 서열은 T3 reverse primers(Promega)를 사용해 ABI3730xl automatic sequencer(Applied Biosystems, Inc.)로 분리하였다. 서열은 ユ **c**DNA GenBank의 BLASTX (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 주석을 달았다. 다중서열배치(multiple sequence alignment)는 ClustalW 2.1을 사용하여 만들었다. 도출된 아미노산 서열(deduced amino acid sequence)에 기반을 둔 계통수(phylogenetic tree)는 neighbor-joining algorithm을 사용하여 구성하였다. 그리고 분지의 신뢰도(reliability of the branching)는 bootstrap resampling with 1000 pseudo-replicates을 사용하여 검정하였 다.

실험결과는 모두 평균±표준편차로 나타내었다.



Ⅲ. 결과

1. 각시붕어 HSP70 family cDNA의 분리

각시붕어의 cDNA library의 EST분석으로부터 HSP70 family cDNA를 분리한 결과는 Fig. 2와 같다.





а	1	TTTGATTTAGGCTTCCTGAGCTGTTATGTGGCGGTCGCACGCGCGGTGGGATCGACACC F D L G F L S C Y V A V A R A G G I D T	61
	61	TTGGCGAACGAGTACAGCGACCGATGCACACCGTTTTTGTCTCGTTCGGGCCTCGGAAC L A N E Y S D R C T P F F V S F G P R N	121
	121	CGTTCGATTGGGGCAGCCGCCAATAGCCAGGTGGTCACAAACTGCATGAACACCGTGCAG R S I G A A A N S Q V V T N C M N T V Q	181
	181	GGATTTAAGCGGTTCCTGGCAGGGCGTTCATTGACCCGTATGTCCAGACGGCAAAGTCC G F K R F P G R A F I D P Y V Q T A K S	241
	241	ATCCTGGTCTTTGATCTTGCTCAGATGCCTTACCGGAACCACCGGCATTAATGTCATGTA	301
	301	CATGGAGGAGGAGAAGGTGTTC 322	
b	1	GGCACGAGGCACCACCTACTCTGACAATCAGCCTGGTGTCCTCATTCAGGTGTACGAGGG T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G	61
	61	TGAGAGAGCCATGACTAAGGACAATAACTTGCTTGGGAAGTTCGAGCTGACCGGCATCCC E R A M T K D N N L L G K F E L T G I P	121
	121	TCCTGCTCCTCGTGGCGTCCCCCAGATTGAAGTAACCTTTGACATTGATGCCAACGGCAT P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I	121
	181	$ \begin{smallmatrix} CATGAATGTCTCCGCCGTAGACAAGAGCACCGGGAAGGAGAACAAAATCACCATCACAAA \\ \mathsf{M & N & V & S & A & V & D & K & S & T & G & K & E & N & K & I & T & I & T & N \\ \end{smallmatrix} $	241
	241	TGATAAAGGACGTCTCAGCAAGGAGGACATTGAGCGCATGGTGCAGGAAGCTGAGAAGTA D K G R L S K E D I E R M V Q E A E K Y	301
	301	CAAGTCTGAGGATGACGTCCAAAGAGAAAAGGTTTCTGCTAAGAACGGCCTTGAGTCCTA K S E D D V O R E K V S A K N G L E S Y	361
	361	$\begin{array}{c} CGCCTTTAACATGAAGTCCACCGTTGAAGA TGAGAAACTCAAAGGCAAGATTAGTGACGA \\ A \ F \ N \ M \ K \ S \ T \ V \ E \ D \ E \ K \ L \ K \ G \ K \ I \ S \ D \ E \end{array}$	421
	421	$\begin{array}{cccc} GGACAAGCAGAAGATCCTCGACAAGTGCAATGATGTCATAAGCTGGCTG$	481
	481	GACTGCTGAGAAGGATGAGTTTGAGCATCAGCAGAAGGAGCTAGAGAAAGTGTGCAACCC T A E K D E F E H Q Q K E L E K V C N P	541
	541	TATCATCACTAAGCTGTACCAGAGCGCTGGTGGGATGCCTGGTGGGATGCCAGAAGGCAT IITKLY	601
	601 661 721 781 841 901	GCCTGGAGGCTTCCCAGGAGCTGGAGGTGCCCCTGGTGGAGGTGGATCCTCTGGACCAAC CATTGAGGAAGTCGATTAAACCGTTTCGAGAATTATTTCACTGTTCAGAGCACCTTACTG TGTTTCGGAGCATATTTCAAGTCATATTTCCTTTCC	661 721 781 841 901

Fig. 2. Continued.



С	. 1	GGCACGAGGATCATCCCAGGTGAAGCCGGCACTAAAAGCAATGGCTACTCCATCTCCAGC M A T P S P A	61
	61	CAAGAGTATGGGCCCCTCAAGGATCACGCCACTTTCCCCCACACATGTACTGAAGGACAC K S M G P S R I T P L S P T H V L K D T	121
	121	AGAAGAAATGAGCCTACGAGGCATCACTATGTGGTGGTGGTGGCTATCGACTTTGGCAC E E N E P T R H H Y V V V V A I D F G T	181
	181	CACCTCCAGTGGCTATGCATATGCCTTCATTAAAGAACCGGAGTGCATTCACAAATGAG T S S G Y A Y A F I K E P E C I H T M R	241
	241	GCGTTGGGAGGGTGGAGACCCAGGTGTGTCCAATCAGAAGACACCCACC	301
	301	GACTCCAGACAAGAAGTTCCACAGTTTTGGATATGCAGCCCGAGATTTTTACCATGACCT T P D K K F H S F G Y A A R D F Y H D L	361
	361	GGATCCCACTGAGTCTAAGCAATGGCTGTACCTAGAGAAGTTTAAAATGAAACTACACAC D P T E S K Q W L Y L E K F K M K L H T	421
	421	CACTGCAAATCTGTCCATTGACACAGATTTACATGCGGCCAATGGAAAAAGGGTGAAAGC T A N L S I D T D L H A A N G K R V K A	481
	481	TCTGGATATTTTTGCTTATGCACTGGCCTTTTTTAAGGAGCAGGCTCTTAAGGAGCTGAG L D I F A Y A L A F F K E O A L K E L S	541
	541	TGACCAAGCAGAGGCGGATTTTGATAATGCTGATGTCAGATGGGTCATCACTGTACCAGC D Q A E A D F D N A D V R W V I T V P A	601
	601	CATCTGGAAGATGCCAGCCAAGCAGTTTATGAGAGAGGCAGCGTATAAGGCTGGTCTGGT I W K M P A K Q F M R E A A Y K A G L V	661
	661	TTCTCGGGACAACCCTGACCAGCTGATCATCGCTTTGGAACCAGAAGCTGCATCCATTTA S R D N P D Q L I I A L E P E A A S I Y	721
	721	CTGCAGGAAGCTCCGCCTTCACCAAATGGTTGATTTGGGCTCCAAAACAGCCCTGAACGG C R K L R L H O M V D L G S K T A L N G	781
	781	TTACAGCCCAACGGAGAATGTTGGGGTGGGGAATGAACCAGGGTGACCGTTATGTGGTTGT Y S P T E N V G V G M N 0 G D R Y V V V	841
	841	GGATTGTGGGGGGAGGGGACAGTGGATCTCACTGTGCA 876	

Fig. 2. Continued

1	ATCACCATCACCAACGACCAGAACCGCCTGACGCCGGAGGACATCGAGCGCATGGTGAAC I T I T N D Q N R L T P E D I E R M V N	61
61	GAAGCCGAGCGCTTCGCCGACGAGGACAAGAAGCTGAAGGAGCGCATCGACGCCCGCAAC E A E R F A D E D K K L K E R I D A R N	121
121	GAGCTGGAGAGCTACGCCTACTCCCTGAAGAACCAGATCGGAGACAAGGAGAAGCTGGGC E L E S Y A Y S L K N Q I G D K E K L G	181
181	GGCAAGCTGTCGTCCGAGGACAAGGAGGCCATCGAGAAGGCGGTGGAGGAGAAGATCGAG G K L S S E D K E A I E K A V E E K I E	241
241	TGGCTGGAGGCTCATCAGGACGCCGACCTCGAGGACTTCCAGGCCAAGAAGAAGGAGCTG ₩ L E A H Q D A D L E D F Q A K K K E L	301
301	GAGGAGATCGTGCAGCCATCGTGAGCAAGCTGTACGGCAGCGCGGGGGGGG	361
361	GAGGACGGGGACGAGGAGGCGACAAGGACGAGCTATAGACGAGCGCGCGGCTGTACATA E D G D E Q A D K D E L	421
421 481 541 601 661 721	CTGAACACTTTATTTTGTACGAACCGGGCCGGACGTGAAGCCACGAGGAAAGACTTGTGG GATGCGTTGAGTTGCGTTTGTTTTTTTTTCCCTTCACTCTGGTGGAGAATTTAGTCGGC CTGGATTGAGGCTTGATTCTGCTGTTCTCAGGCAGTTCAGAGGTGGGTG	481 541 601 661 721

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Korean rose bitterling HSP70 family cDNA. a : RuHSP70 4-like, b : RuHSP70, c : RuHSP70 12A-like, d : RuGrp78



d

2. 각시붕어 HSP70 family cDNA의 염기서열 분석

PCR에 의하여 증폭된 각시붕어의 HSP70 family cDNA 단편의 아미노 산 배열을 이용하여, 타 어종과의 상동성을 ClustalW를 사용하여 비교, 분석하였다(Fig. 3).

각시붕어의 RuHSP70 4-like는 Bicolor damselfish(Stegastes partitus. XP 008296412) HSP70 4-like와 Amazon molly(Poecilia formosa, XP 007562090) HSP70 4-like와 87%, 박대(Cynoglossus semilaevis, XP_008331072) HSP105와 제브라피쉬(Danio rerio, NP_999881) HSP 4a 와 84%의 상동성을 나타내었다. RuHSP70은 Prussian carp(Carassius gibelio, AAO43731) HSP70과 99%, 백연어(Hypophthalmichthys molitrix, ACJ03595) HSP70과 피라미(Pimephales promelas, AAS46619) HSP70과 98%. 제브라피쉬(Danio rerio. NP 001103873) HSP71과 추어 (Ctenopharyngodon idella, ACJ03596) HSP70과 97%로 높은 상동성을 RuHSP70 12A-like는 나타내었다. 제브라피쉬(Danio rerio. NP_001038900) HSP12A와 92%, Mexican tetra(Astyanax mexicanus, XP_007244701) HSP70 12A와 91%, Zebra mbuna(Maylandia zebra, XP 004572562) HSP70 12A-like와 Bicolor damselfish(Stegastes partitus, XP_008305029) HSP70 12A-like와 85%의 상동성을 나타내었다. 그리고 Grp78은 초어(Ctenopharyngodon idella, ACJ65009) Grp78과 95%, 제브 라피쉬(Danio HSP5와 93%, rerio, AAH63946) Southern platyfish(Xiphophorus maculatus, XP_005803813) Grp78과 90%의 상동성 을 확인할 수 있었다(table. 2). 계통 발생의 분석에 의하면 각시붕어의 RuHSP70 4-like, RuHSP70, RuHSP70 12A-like, RuGrp78을 MEGA 3.1 을 사용하여 잘 알려진 다른 종들과의 계통수를 나타내었다(Fig. 4).





Fig. 3. Continued.

a

b

D.rerio H.molitrix C.gibelio R.uyekii P.promelas C.idella .punctatus B.taurus H.sapiens C.griseus M.musculus D.rerio H.molitrix Carassius R.uyekii P.promelas C.idella .punctatus B.taurus H.sapiens C.griseus M.musculus D.rerio H.molitrix C.gibelio R.uyekii P.promelas C.idella punctatus B.taurus H.sapiens C.griseus M.musculus D.rerio KLYO H.molitrix KL YQ C.gibelio KL YQ R.uyekii KI Y-P.promelas KL YO C.idella KLY0 I.punctatus KL-KLY0 B.taurus H.sapiens KL YO C.griseus KL YO M.musculus KL YO **

TTYSDN0PGVL10VYEGERAMTKDNNLLGKFELTG1PPAPRGVP01EVTFD1DANG1MNV TTYSDNOPGVL I QVYEGERAMTKDNNLLGKFEL TG I PPAPRGVPQ I EVTFD I DANG I MNV TTYSDN0PGVL I 0VYEGERAMTKDNNLLGKFEL TG I PPAPRGVPQ I EVTFD I DANG I MNV TTYSDN0PGVL I 0VYEGERAMTKDNNLLGKFELTG I PPAPRGVP0 I EVTFD I DANG I MNV TTYSDNOPGVL I QVYEGERAMTKDNNLLGKFEL TG I PPAPRGVPQ I EVTFD I DANG I MNV TTYSDN0PGVL I QVYEGERAMTKDNNLLGKFEL TG I PPAPRGVPQ I EVTFD I DANG I MNV TTYSDN0PGVL I 0VYEGERAMTKDNNLLGKFELTG I PPAPRGVP0 I EVTFD I DANG I LNV TTYSDN0PGVL10VYEGERAMTKDNNLLGKFELTG1PPAPRGVP01EVTFD1DANG1LNV TTYSDN0PGVL I QVYEGERAMTKDNNLLGKFELTG I PPAPRGVPQ I EVTFD I DANG I LNV TTYSDN0PGVL I 0VYEGERAMTKDNNLLGKFELTG I PPAPRGVP0 I EVTFD I DANG I LNV TTYSDN0PGVL10VYEGERAMTKDNNLLGKFELTG1PPAPRGVP01EVTFD1DANG1LNV SAYDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKAEDDVQRDKVSAKNGLESYAFN SAVDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKAEDDVQRDKVSAKNGLESYAFN SAVDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKSEDDVQREKVSAKNGLESYAFN SAVDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKSEDDVQREKVSAKNGLESYAFN SAYDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKSEDDVQREKVSAKNGLESYAFN SAVDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKAEDDVQRDKVSSKNGLESYAFN SAVDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKAEDDVQRDKVSAKNGLESYAFN SAYDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVQEAEKYKAEDEKQRDKVSSKNSLESYAFN SAVDKSTGKENK I T I TNDKGRLSKED I ERMVOEAEKYKAEDEKORDKVSSKNSLESYAFN SAVDKSTGKENKITITNDKGLLSKED I ERMVQEAEKYKAEDEKQRDKVSSKNSLESYAFN SAVDKSTGKENK I TI TNDKGRLSKED I ERMVOEAEKYKAEDEKORDKVSSKNSLESYAFN *** *** MKSTVEDEKLKGK I SDEDKOK I LDKONEV I GWLDKNOTAEREEFEHOOKEL EKVONP I I T MKSTYEDEKLKGK I SDEDKOK I LDKCNEVI SWLDKNOTAEKEEFEHOOKELEKYCNPI I T MKSTYEDEKLKGK I SDEDKOK I LDKCNEVI SWLDKNOTAEKEEFEHOOKELEKYCNPI I T MKSTYEDEKLKGK I SDEDKOK I LDKCNDV I SWLDKNQTAEKDEFEHOOKELEKYCNP I I T MKSTVEDEKLAGKISEEDKOKILDKCNEVISWLDKNOTAEKEEFEHOOKELEKVCNPIIT MKSTVEDEKLKGKISDEDKOKILDKCNEVISWLDKNOTAEKEEFEHOOKELEKVCNPIIT MKSTYEDEKLOGK I SDEDKOK I LEKONE I I SWLDKNOTAEKEEYEHOOOELEKYONPII T MKATVEDEKLOGK INDEDKOK I LOKONE I I NWLDKNOTAEKEEFEHOOKELEKVONP I I T MKATVEDEKLOGK INDEDKOK ILDKONE I INWLDKNOTAEKEEFEHOOKELEKVONPIIT MKAT I EDEKL OGR I NDEDKOK I L DKONE I I SWL GKNOTAEKEEFEHOOKEL EK VONP I I T MKATYEDEKLOGK INDEDKOK ILDKONE I I SWLDKNOTAEKEEFEHOOKELEKVONP I I T ****:** 01 11

Fig. 3. Continued.

С

D.rerio	MATPSPAKSMGDPG1TPLSPTH1LK-DSEENEPPRHHFVVVVA1DFGTTSSGYAYA
R.uyekii	MATPSPAKSMGPSRITPLSPTHVLK-DTEENEPTRHHYVVVVAIDFGTTSSGYAYA
A.mexicanus	AMAAPSPAKSIGDPGITPLSPTHILK-DSEENEPAGHSFIVVVAIDFGTTSSGYAYA
N.zebra P. nvererei	AMADPSPAKSMGDPGTTPLSPSHT00-NDTD0VPSGPSEVVVVATDPGTTSSGVAVA
S.partitus	AMANPSPAKSMGDPGTTPLSPSHT00-NDTD0VPSGPSFVVVVATDFGTTSSGYAYA
B.taurus	AYSSPARSLGDTG1TPLSPSH1VN-DADPNVSE00TFLVVVA1DFGTTSSGYAYS
0.aries	AYSSPARSLGDTGTTPLSPSHTVN-DADPNVSE00TFLVVVATDFGTTSSGYAYS
H.sapiens	AYSSPARSLGDTGTTPLSPSHTVN-DTDSNVSE00SFLVVVAVDFGTTSSGYAYS
P bivittatus	AVSTSATSSPAKSLGDPGTTPLSPSHTVSKDSDAEDAVEULFLYYVATDPGTTSSGTATS AVSTSAVASPARSLGDPGTTPLSPSHTAK-DSDANDAFFOTFLVVVATDFGTTASGVAVS
ribiviccacus	
D. secolar	ETDEDEC INTERDISCORDOUGNOWTOTT II I TROVVENCEOVA (DREVNO) ROTECVOS
R.uvekii	FIKEPECIHTNERWEGGDPGVSNOKTPTTILLTPDKKEHSEGVAARDEYHDLDPTESKOW
A.mexicanus	FTKEPECIHTMRRWEGGDPGVSNOKTPTTILLTPDKKFHSFGYAARDFYHDLDPTESKOW
M.zebra	FAKEPECIHTMRRWEGGDPGVSNOKTPTTILLTPDRKFHSFGYAARDFYHDLDPSESKHW
P.nyererei	FAKEPECIHTMRRWEGGDPGVSN0KTPTTILLTPDRKFHSFGYAARDFYHDLDPSESKHW
S.partitus	FIKEPECIHIMPR#EGGDPGVSNUKIPTITULTPEPKEPECVAAPDEVUDLDPSESKHW
0.aries	FTKEPEC1HVMRRWEGGDPGVSN0KTPTT1LLTPERKFHSFGYAARDFYHDLDPNEAK0W
H.sapiens	FTKEPECIHVMRRWEGGDPGVSN0KTPTTILLTPERKFHSFGYAARDFYHDLDPNEAK0W
F.perearinus	FTKEPEC1HVMRR#EGGDPGVSN0KTPTT1LLTPERKFHSFGYAARDFYHDLDPTESKH#
P.bivittatus	FTKEPECIHVMRRWEGGDPGVSN0KTPTTILLTPERKFHSFGYAARDFYHDLDPNESKHW
D.rerio	L YLEKFKMKL HTTANL SIDTDL HAANGKKVKALDIEAYAL AFFKEOAL KELSDOAGAEFD
R.uyekii	LYLEKFKMKLHTTANLS IDTDLHAANGKRVKALD I FAYAL AFFKEOAL KELSDOAEADFD
A.mexicanus	L YLEKPKMKLHTTANI, STUTULHAANGKHYKALDTPATACAPPKEUALKELSUUAGAEPU
P.nvererei	LYLEKEKIKL HTTANLS INTOL HAANGKRYKALD I FAYAL AFFKEOAL KELSDOTGGEFD
S.partitus	LYLEKFKMKLHTTANLSIDTDLHAANGRRVKALDIFAYALAFFKEDALKELSDOTGGEFD
B.taurus	LYLEKFKMKLHTTGDLTMDTDLTAANGKKVKALEIFAYALQYFKEQALKELSDQAGSEFE
0.aries	LYLEKEKMKLHETGDLTMDTELTAANGKKVKALETEAVALOVEKEDALKELSDOAGSEEE
F. percentious	L YEEKEKIKI HTTGNI TMETDI TAANGKKYKALE IFATADUTEKEDALKELSDOAGSDEE
P.bivittatus/	LYFEKFKMKLHTTANL TLETDLSAANGKKVKALE I FAYAL OYFKEOAL KEUSDOAGSEFE
	<pre>int; setsets the setset interest interest its;</pre>
Directio	NADVRWVI TVPA LIKKMPAKOEMREAAYKAAL VTRENPDOL LLAL EPEAAS LYCRKLRLHO
R.uyekii	NADVRWVITVPATHKMPAKOFMREAAYKAGLVSRDNPDOLTTALEPEAASTYCRKLRLHO
A.mexicanus	NADVRWY I TVPA I WKMPAKOFMREAAYKAGLASRENPEOL I I ALEPEAAS I YCRKLRLHO
Mizebra	NSDVRWVITVPATHKMPAKOFMREAAYKSGLVSRENPEOLIIALEPEAASIYCRKLRLHO
S partitus	NSUVERY I YPATRKPPAKUPREAATKSULVSRENPEULTTALEPEAASTTURKLEUM NNOVERV I TVPATRKPPAKUPREAAVKSULVSRENPEULTTALEPEAASTTURKLEUM
B.taurus	NSDVRWV I TVPA I WKOPAKOF MROAAYOAGLASPENSEOL I I ALEPEAAS I YCRKL RLHO
0.aties	NSDVRWVITVPATHKOPAKOFMROAAYOAGLASPENSEOLIIALEPEAAS/YCRKLRLHO
H.sapiens	NSDVRWVI TVPA I IKOPAKOF MROAAYOAGLASPENSEOL (I ALEPEAASI YCRKLRLHO
P bivittatue	NTEVRWYTTVPATWKUPAKUPMBUAATKAGMASPEDPEULTTALEPEAASTTCKKLRLHU NSDVDWYTTVPATWKOPAKOEMDOAAVYAGMASPETDEOLTTALEPEAASTYCKKLRLHU
P.Divillatus	
Durania V	NUCL CSV THE NOVSDTONACYONTO AVENUEDADD SOTEL VENULCEI HSEL AECODYUU
B.uvekii	MYDLGSK TALINGTSP TONAGYGNTOAKENTYRRANDSKTFLYENY TGELWSELAEGDRTYY
A.mexicanus	MIDLGSKTSINGYSPTENVGAGMTOAKEHVRPNROSRTFLVENVIGELWSELNEGDRYVV
M.zebra	HVDLGTOTTONGFSPSDNVGSGMS0GDRYVV
P.nyererei	MVDLGTQTTONGESPTDN/GSGMS0GKEHVRRNR0SRTFLVENVTGELWSELEEGDRYVV MLDLGTQTTOMGESPTDN/GSGMS0G
B. taurus	MTDLSSKAAVNGYSSSDTVGAGFA0AKEH I BRNR0SRTFL VENVIGE I WSEL FEGDKYVV
0.aries	MTDLSSKAAVNGYSSSDTVGAGFAOAKEHVRRNROSRTFLVENVIGE1WSELEEGDKYVV
H.sapiens	MIELSSKAAVNGYSGSDTVGAGFTOAKEHIRRNROSRTFLVENVIGEIWSELEEGDKYVV
P. peregrinus	MIDLSSRAPYNGYSPSDIIGTGETUAKEHYRRNROSRTENVENVIGETWSELEEGDRYTV MIDLSSRAPVNGYNDGETVGSGETDAVEH IDDNDOSDTELVENVIGETWSELEEGDDYTV
Fibryrecacus	
Deserie	VDCGGGTVDI TV
Buvekii	VDCGGGTVDLTV
A.mexicanus	VDCGGGTVDL TV
M.zebra	VDCGGGT1DLTV
P.nyererei S.partitus	VDCGGGTVDLTV
B.taurus	VDSGGGTVDL TV
0.aries	VDSGGGTVDLTV
H.sapiens	VDSGGGTVDLTV
P. bivittatus	VDGGGGTVDVTV
- OFFICER OFFICE	** ****:*:**

Fig. 3. Continued.



IT I TNDONRL TPED I ERMVNDAERFADEDRKLKER I DSRNEL ESYAYSLKN0 I GDKEKLG P.reticulata X.maculatus IT I TNDONRL TPED I ERMVNDAERFADEDKKLKER I DARNELESYAYSLKNO I GDKEKLG ITT INDURRE TPEDTERMYNDAERFADEDKKLKER I DARNELESYAYSLKNOTGDKEKLG ITT INDORRETPEDTERMYNDAERFADEDKKLKER I DARNELESYAYSLKNOTGDKEKLG ITT INDORRETPEDTERMYNEAERFADEDKKLKER I DARNELESYAYSLKNOTGDKEKLG ITT INDORRETPEDTERMYNEAERFADEDKKLKER I DARNELESYAYSLKNOTGDKEKLG ITT INDORRETPEDTERMYNEAERFADEDKKLKER I DARNELESYAYSLKNOTGDKEKLG ITT INDORRETPEETERMYNDAEKFAEEDKKLKER I DTRNELESYAYSLKNOTGDKEKLG N.brichardi C.idella R.uyekii D.rerio H.sapiens P.anubis M.musculus IT I TNDONRL TPEE I ERMVNDAEKFAEEDKKLKER I DTRNELESYAYSLKNQ I GDKEKLG L.africana C.livia IT I TNDONRL TPEE I ERMVNDAEKFAEEDKKLKER I DARNELESYAYSLKNO I GDKEKLG P.reticulata GKL SDEDKEA I EKAVEEK I EWMESHODADL EDFOAKKKEL EEVVOP I I SKL YGSAGGPPP GKL SDEDKEA I EKAVEEK I EWMESHODADLEDFOAKKKELEEVVOP I I SKL YGSAGGPPP GKL SDEDKEA I EKAVEEK I EWMESHODADLEDFOAKKKELEEVVOP I I SKL YGSAGGPPP GKL SDEDKEA I EKAVEEK I EWLESHODADLDDFOAKKKELEEVVOP I I SKL YGSAGGPPP GKL SSEDKEA I EKAVEEK I EWLESHODADLEDFOAKKKELEE I VOP I VSKL YGSAGGPPP X.maculatus N.brichardi C.idella R.uyekii GKL SSEDKEA I EKAVEEK I EWLEAHODADLEEFOAKKKELEEVVOP I VSKL YGSAGGPPP D.rerio GKLSSEDKETMEKAVEEK I EWLESHODAD I EDFKAKKKELEE I VOP I I SKLYGSAGPPPT H.sapiens P.anubis GKLSSEDKETMEKAVEEK I EWLESHODAD I EDFKAKKKELEE I VOP I I SKLYGSAGPPPT GKL SSDDKE TMEKAVEEK I EWLESHODAD I EDFKAKKKELEE I VOP I I SKL YGSGGPPPT GKL SSEDKE TMEKAVEEK I EWLESHODAD I EDFKAKKKELEE I VOP I I SKL YGSGGPPPT GKL SSDDKET I EKAVEEK I EWLESHODAD I EDFKAKKKELEE VVOP I VSKL YGSAGPPP-M.musculus L.africana C.livia *** :*** P.reticulata EDAEEQEKDEL -EGAEEQEKDEL -X.maculatus N.brichardi EGSEODEKDEL-C.idella EDGDEQGEKDEL R.uyekii EDGDEQADKDEL D.rerio EEAEEKDEL GEEDTAEKDEL-H.sapiens GEEDTAEKDEL-GEEDTSEKDEL-GEDETADKDEL-P.anubis M.musculus L.africana C.livia GEEEAAEKDEL . 11

Fig. 3. Continued.

Fig. 3. Multiple alignment of the amino acid sequences of the Korean rose bitterling heat shock protein 70 family(RUHSP70 family) and related sequences. A multiple alignment of amino acid sequences of HSP70 family was produced using ClustalW 1.81. GenBank accession numbers for the analyzed sequences are the following:

a. Haplochromis burtoni(XP_005921284), Oryzias latipes(XP_004073389), Cynoglossus semilaevis(XP_008331072)Stegastes partitus(XP_008296412), Poecilia formosa(XP_007562090), Danio rerio(NP_999881), Homo sapiens(AAH02526), Papio anubis(XP_003900145), Mus musculus(EDL33602), Vicugna pacos(XP_006212876).

b. anio rerio(NP_001103873), Hypophthalmichthys molitrix(ACJ03595), Carassius gibelio(AAO43731), Pimephales promelas(AAS46619), Ctenopharyngodon idella(ACJ03596), Ictalurus punctatus(ABD77547), Bos taurus(AAI54390), Homo sapiens(AAH08907), Cricetulus griseus (EGW02963), Mus musculus(BAE29904).

c. Danio rerio(NP_001038900), Astyanax mexicanus(XP_007244701), Maylandia zebra(XP_004572562), Pundamilia nyererei(XP_005747498), Stegastes partitus(XP_008305029), Bos taurus (XP_002698580), Ovis aries(XP_004020391), Homo sapiens(XP_005269729), Falco peregrinus(XP_005237627), Python bivittatus(XP_007433493).

d. Poecilia reticulata(XP_008422585), Xiphophorus maculatus(XP_005803813), Neolamprologus brichardi(XP_006789208), Ctenopharyngodon idella(ACJ65009), Danio rerio(AAH63946), Homo sapiens(EAW87621), Papio anubis(XP_003911999), Mus musculus(AAA37315), Loxodonta africana(XP_003407784), Columba livia(XP_005513063).
Identical residues are indicated by asterisks (*); conservative substitutions are

indicated by dots (.:).





0.005

Fig. 4. Continued





Fig. 4. Continued

Fig. 4. Phylogenetic relationships of the Korean rose bitterling heat shock protein 70 family with those of other species. A phylogenetic analysis based on the deduced amino acid sequences was performed using the NJ algorithm, and the reliability of the branching was tested using bootstrap re-sampling (1000 pseudo-replicates) using MEGA 3.1. Sequences were obtained from GenBank:

a. Haplochromis burtoni(XP_005921284), Oryzias latipes(XP_004073389), Cynoglossus semilaevis(XP_008331072)Stegastes partitus(XP_008296412), Poecilia formosa(XP_007562090), Danio rerio(NP_999881), Homo sapiens(AAH02526), Papio anubis(XP_003900145), Mus musculus(EDL33602), Vicugna pacos(XP_006212876).

b. anio rerio(NP_001103873), Hypophthalmichthys molitrix(ACJ03595), Carassius gibelio(AAO43731), Pimephales promelas(AAS46619), Ctenopharyngodon idella(ACJ03596), Ictalurus punctatus(ABD77547), Bos taurus(AAI54390), Homo sapiens(AAH08907), Cricetulus griseus (EGW02963), Mus musculus(BAE29904).

c. Danio rerio(NP_001038900), Astyanax mexicanus(XP_007244701), Maylandia zebra(XP_004572562), Pundamilia nyererei(XP_005747498), Stegastes partitus(XP_008305029), Bos taurus (XP_002698580), Ovis aries(XP_004020391), Homo sapiens(XP_005269729), Falco peregrinus(XP_005237627), Python bivittatus(XP_007433493).

d. Poecilia reticulata(XP_008422585), Xiphophorus maculatus(XP_005803813), Neolamprologus brichardi(XP_006789208), Ctenopharyngodon idella(ACJ65009), Danio rerio(AAH63946), Homo sapiens(EAW87621), Papio anubis(XP_003911999), Mus musculus(AAA37315), Loxodonta africana(XP_003407784), Columba livia(XP_005513063).



Table 2. Pairwise ClustalW analysis and comparison of the deduced amino acid sequence RUHSP70 4-like, RuHSP70, RuHSP70 12A-like, RuGRP78 with HSP70 4-like, HSP70, HSP70 12A-like, GRP78-related sequences from other species.

a: RuHSP70 4-like, b: RuHSP70, c: RuHSP70 12A-like, d: RuGRP78

-	4		
c.	л		

Species	Accession number	Identity(%)
Haplochromis burtoni Heat shock 70 kDa protein 4-like	XP_005921284	80
Oryzias latipes Heat shock 70 kDa protein 4-like	XP_004073389	81
Cynoglossus semilaevis Heat shock protein 105 kDa isoform X1	XP_008331072	84
Stegastes partitus Heat shock 70 kDa protein 4-like	XP_008296412	87
Poecilia formosa Heat shock 70 kDa protein 4-like	XP_007562090	87
Danio rerio Heat shock protein 4a	NP_999881	84
Homo sapiens Heat shock 70kDa protein 4	AAH02526	72
Papio anubis Heat shock 70 kDa protein 4	XP_003900145	73
Mus musculus Heat shock protein 4, isoform CRA_b	EDL33602	74
Vicugna pacos Heat shock 70 kDa protein 4 isoform X2	XP_006212876	74
b.	S	

b.

Species	Accession number	Identity(%)
Danio rerio Heat shock cognate 71 kDa protein	NP_001103873	97
Hypophthalmichthys molitrix Heat shock protein 70	AC J03595	98
Carassius gibelio Heat shock cognate 70 kDa protein	AAO43731	99
Pimephales promelas Heat shock cognate 70 kDa protein	AAS46619	98
Ctenopharyngodon idella Heat shock protein 70	AC J03596	97
Ictalurus punctatus Heat shock cognate 70 kDa protein	ABD77547	95
Bos taurus HSPA8 protein	AAI54390	92
Homo sapiens HSPA8 protein	AAH08907	92
Cricetulus griseus Heat shock cognate 71 kDa protein	EGW02963	91
Mus musculus Unnamed protein product	BAE29904	95

Table 2. Continued.

Collection @ pknu

с.

d.

Species	Accession number	Identity(%)
Danio rerio Heat shock protein 12A	NP_001038900	92
Astyanax mexicanus Heat shock 70 kDa protein 12A isoform X1	XP_007244701	91
Maylandia zebra Heat shock 70 kDa protein 12A-like isoform X4	XP_004572562	85
Pundamilia nyererei Heat shock 70 kDa protein 12A-like isoform X5	XP_005747498	84
Stegastes partitus Heat shock 70 kDa protein 12A isoform X3	XP_008305029	85
Bos taurus Heat shock 70 kDa protein 12A isoform X1	XP_002698580	76
Ovis aries Heat shock 70 kDa protein 12A	XP_004020391	75
Homo sapiens Heat shock 70 kDa protein 12A isoform X1	XP_005269729	75
Falco peregrinus Heat shock 70 kDa protein 12A	XP_005237627	74
Python bivittatus Heat shock 70 kDa protein 12A-like isoform X1	XP_007433493	74

NATIONAL U

Identity(%) Species Accession number Poecilia reticulata 78 kDa glucose-regulated protein XP_008422585 89 XP_005803813 Xiphophorus maculatus 78 kDa glucose-regulated protein-like 90 Neolamprologus brichardi 78 kDa glucose-regulated protein-like XP_006789208 88 Ctenopharyngodon idella GRP78 ACJ65009 95 AAH63946 93 Danio rerio Heat shock protein 5 EAW87621 Homo sapiens Heat shock 70kDa protein 5 84 Papio anubis 78 kDa glucose-regulated protein-like XP_003911999 84 Mus musculus Immunoglobulin heavy chain binding protein AAA37315 82 Loxodonta africana 78 kDa glucose-regulated protein XP_003407784 86 XP_005513063 86 Columba livia 78 kDa glucose-regulated protein ot



3. 각시붕어 HSP70 family mRNA의 조직별 발현

본 실험에 사용된 각시붕어의 HSP70 family mRNA 조직별 발현양상을 조사한 결과(Fig. 5), RuHSP70 4-like는 난소, 정소, 간췌장에서 높게 나 타났다. RuHSP70은 간췌장과 정소에서 높게 발현되었으며, RuHSP70 12A-like는 난소에서 높게 발현되었다. 그리고 RuGrp78의 mRNA 발현 량은 간췌장, 비장, 그리고 난소에서 높게 나타났다.

각시붕어의 RuHSP70 family는 간췌장(hepatopancreas)과 생식소(정소, 난소)에서 높게 발현되는 것을 관찰 할 수 있었다.





RuHSP70 4-like



Fig. 5. Continued.



С



Fig. 5. Tissue distribution of the Korean rose bitterling RuHSP70 family. Quantitative real-time RT-PCR was performed on equal amounts of total RNA isolated from tissues of normal conditioned fish. Korean rose bitterling b-Actin was used as an internal control. Expression levels of a(RuHSP70 4-like), b(RuHSP70), c(RuHSP70 12A-like), d(RuGrp78) transcript were quantified by expression relative to the β -Actin transcript level. B, brain; E, eye; G, gills; F, fin; Si, small intestine; H, hepatopancreas; St, stomach; Sp, spleen; I, intestine; M, muscle; T, testis; O, ovary. The values represent the mean±SD (n=3).



4. 각시붕어 HSP70 family mRNA의 발생단계별 발현

각시붕어의 부화 후 1일, 3일, 6일, 15일, 21일차의 발생단계별 RuHSP70 family mRNA 발현양상을 조사한 결과(Fig. 6), RuHSP70 4-like의 발현 은 부화 1일차에 비해 3, 6, 15, 21일차에 현저히 낮게 나타나는 것을 볼 수 있었다. RuHSP70의 발현은 부화 1일차에 비해 3, 6, 15, 21일차에 높 게 나타났으며 6일차에는 일시적으로 조금 낮아졌다가 부화 일수에 따라 조금씩 높게 발현이 나타나는 것을 관찰하였다. RuHSP70 12A-like의 발 현은 부화된 지 15일차에 부화 1일차보다 2배 이상 높게 나타났으며, 3, 6 일차에는 변화가 거의 없었다. 그리고 RuGrp78의 발현은 부화 된지 15일 차에 부화 1일차보다 4.5배 높게 나타났으며, 부화 6일차에는 거의 나타나 지 않았다.







Fig. 6. Developmental stage of the Korean rose bitterling RuHSP70 family. Quantitative real-time RT-PCR was performed on equal amounts of total RNA isolated from during developmental stage of whole body in fish. Korean rose bitterling b-Actin was used as an internal control. Expression levels of a(RuHSP70 4-like), b(RuHSP70), c(RuHSP70 12A-like), d(RuGrp78) transcript were quantified by expression relative to the β -Actin transcript level. The values represent the mean±SD (n=3).



5. 수온변화에 따른 각시붕어 HSP70 family mRNA의 발현

작시붕어의 간췌장(hepatopancreas) 세포 내에서의 수온변화에 따른 HSP70 family mRNA 발현양상을 조사한 결과(Fig. 7), RuHSP70 4-like 는 20, 24, 28℃에서는 변화가 거의 없었고, 32℃에서 대조구(control)인 20℃보다 9배 높게 발현되었으며, RuHSP70는 20℃에 비해 24℃에 조금 낮아졌다가 28℃부터는 수온이 상승할 때 높게 발현이 되었다. RuHSP70 12A-like는 20℃보다 24℃에 낮아지다가 28, 32℃로 수온이 상승함에 따 라 발현이 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 그리고 RuGrp78은 RuHSP70 4-like와 비슷하게 수온이 올라감에 따라 뚜렷한 변화가 없었 고, 32℃때에 5배정도 높게 나타났다.

본 실험 결과를 종합하여 보면, 각시붕어의 HSP70 family 유전자는 대 조구(control)인 20℃에 비해 24, 28℃에는 별다른 변화가 없었고, 32℃에 는 높게 발현되는 경향을 나타내었다.





Fig. 7. Heat shock treatment of the Korean rose bitterling RuHSP70 family. Quantitative real-time RT-PCR was performed on equal amounts of total RNA isolated from hepatopancreas cell of temperature difference conditioned fish. Fish were exposed to 20, 24, 28, 32°C by incubator. Korean rose bitterling b-Actin was used as an internal control. Expression levels of a(RuHSP70 4-like), b(RuHSP70), c(RuHSP70 12A-like), and d(RuGrp78) transcript were quantified by expression relative to the β -Actin transcript level. The values represent the mean±SD (n=3).

6. 수온변화에 따른 각시붕어 혈장 내 glucose 농도 분석

수온변화에 따른 각시붕어 혈장 내 glucose 농도를 조사한 결과 Fig. 8 과 같다.

대조구인 20℃에서는 89 mg/dl, 24℃에서는 84 mg/dl, 그리고 28℃에서 는 가장 높은 값, 149 mg/dl을 나타내었다. 그러나 32℃ 실험구에서는 가 장 낮은 값인 70 mg/dl로 관찰되었다.







Fig. 8. Changes of glucose levels in Korean rose bitterling exposed to water temperature. The values represent the mean±SD (n=3).

11

7. 수온변화에 따른 각시붕어 아가미의 조직학적 관찰

수온(20, 24, 28, 32℃)에 직접적으로 노출된 각시붕어 아가미의 조직학적 관찰 결과는 Fig. 9과 같다. 20℃에서는 아가미 조직의 1차 새변(gill filament), 2차 새변(gill lamella), 그리고 점액세포(mucus cell)에 경시적 인 변화는 나타나지 않았으며(Fig. 9-a, b), 24℃에는 20℃보다 2차 새변 이 불규칙적으로 굽어지고 손상이 되었으며, 상피세포의 괴사(necrosis)현 상 및 점액세포의 증식(proliferation)이 관찰되었다(Fig. 9-c, d). 28℃에서 아가미의 2차 새변이 더 굽어지고 손상이 심해졌으며, 상피세포의 손상도 관찰되었다(Fig. 9-e, f). 그리고 32℃에는 상피세포의 증생(hyperplasia)으 로 인한 2차 새변의 융합(fusion)부분이 증가하였고, 2차 새변의 굽어짐과 손상이 상대적으로 가장 심한 것을 확인하였다(Fig. 9-g, h).

본 실험 결과를 종합해보면, 각시붕어의 아가미조직의 2차 새변이 수온 이 상승함에 따라 굽어지거나 손상이 심해지고, 상피세포와 점액세포의 증식 및 아가미의 조직괴사와 변성이 나타나는 것을 알 수 있었다.

Ward II

Fig. 9. Histological observation in the gill tissue of Korean rose bitterling exposed to water temperature for 3 days. (a, b: 20 °C; c, d: 24 °C; e, f: 28 °C; g, h: 32 °C. gf: gill filament, gl: gill lamella, arrows hyperplasia, destruction of mucus cells and necrosis of epithelial cells)

Ⅳ. 고찰

수온은 어류의 성장과 생존에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Kang et al., 2013). 특히, 수온변화는 어체의 생리적 변화를 야기시키고 스트레스 요인으로 작용하여, 생체 내 대사와 혈액성상의 변화를 일으키는 것으로 보고되었다(Barton and Iwama, 1991).

HSP70 family는 어류에서 가장 광범위하게 연구가 되어져 있는 스트레 스 단백질로 무지개송어(Kothary et al., 1984), medaka, *Oryzias latipes*(Arai et al., 1995), zebrafish(Lele et al., 1997), 틸라피아, *Oreochromis mossambicus*(Molina et al., 2000), 그리고 자주복, *Fugu rubripes*(Lim and Brenner, 1999)등 여러 어종으로부터 분리되었다. 또한 HSP70은 수온과 관련된 환경적 스트레스 요인에 민감하게 반응하는 것 으로 보고되었다(Feder and Hofmann, 1999).

본 연구에서는 수온(20, 24, 28, 32℃)에 따른 각시붕어의 스트레스 반응 으로, 4종류의 HSP70 family 유전자(RuHSP70 4-like, RuHSP70, RuHSP70 12A-like, RuGrp78)의 발현양상을 조사하였다. 각시붕어 HSP70 family mRNA의 조직(뇌, 눈, 아가미, 지느러미, 소장, 간췌장, 위 장, 비장, 장, 근육, 정소, 난소)별 발현양상은 간췌장과 생식소(정소, 난 소)에서 높게 발현되었다. 금강모치(Im et al, 2013)와 *Paphia undulata*(Wu et al., 2014)에서도 HSP70은 간과 생식소에서 높게 발현되 는 결과를 볼 수 있었다. 포유류의 경우 HSP70은 스트레스로 인해 발생 하는 apoptosis(세포사멸)로부터 세포를 보호한다고 알려져 있다(Mosser et al., 1997; Mallouk et al., 1999). 비정상적인 HSP70의 발현은 생식세포 의 apoptosis를 초래하며(Dix et al., 1996), 또한 이 단백질은 정세포의 성

숙(Allen et al., 1988; Matsumoto and Fujimoto, 1990)과 황체 퇴화와 관 련이 있는 것으로 알려져 있다(Khanna et al., 1995). 본 연구에서는 수온 변화에 따른 HSP70 family 유전자의 발현양상은 생식소보다 간췌장에서 더 높게 관찰되었다.

따라서 각시붕어의 간췌장 세포를 온도(20, 24, 28, 32℃)에 노출시켜 HSP70 family 유전자의 발현양상을 조사한 결과, 32℃에서 HSP70 family mRNA 발현량이 가장 높게 나타났다. 이전까지 보고된 수온변화 에 따른 HSP70 유전자의 발현에 관한 연구로는 chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*(Kong et al., 1996), 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*(Currie and Tufts., 1997; Currie et al., 2000; Ojima et al., 2005a,b), *Poeciliopsis* 종의 사막어류들(Hightower et al., 1999), 그리고 Miramachi Atlantic salmon, *salmo salar*(Lund et al., 2002)등에서도 32℃ 와 같은 고온에서 HSP70 유전자의 발현량이 높게 나타났으며 본 연구결 과와 유사하였다.

일반적으로 혈장 내의 glucose는 스트레스에 의해 증가되며, Barton and Iwama(1991)는 cortisol의 농도가 높아짐에 따라 glucose의 농도도 함께 높아지는 현상은 스트레스에 의한 호르몬 상승 반응에 의한 2차반응의 결 과라고 보고하였다. 이러한 결과는 숭어, Mugilcephalus(Chang and Hur, 1999), 고등어, Odontesthes bonariensis(Tsuzuki et al., 2001), 넙치 (Paralichthys olivaceus: Chang et al., 2002), 감성돔, Acanthopagrus schlegeli(Chang et al., 2006), 조피볼락, Sebastes schlegeli(Baeck et al., 2014)등에서 보고되었다. 본 연구에서는 수온 20, 24, 28 그리고 32℃에서 각각 3일간 노출시킨 뒤 각시붕어의 혈장 내 glucose의 농도를 조사하였 다. 20℃에는 89 mg/dl, 24℃에는 84 mg/dl, 28℃에는 149 mg/dl, 32℃에 는 70 mg/dl 로, 20℃와 24℃에서는 큰 변화가 없었고, 28℃에서는 대조

구인 20℃에 비해 약 2배 정도 높게 나타났다. 이러한 결과는 적정 수온 이상이 되면 혈장 내의 glucose 농도가 높아지는 것을 알 수 있었다. 그 러나 혈장 내의 glucose 농도가 32℃에 이르면 대조구인 20℃보다 더 낮 은 값을 보였는데, 32℃에서의 각시붕어는 오히려 수온 스트레스에 적응 을 하였거나 스트레스에 의해 증가된 혈장 내 glucose의 농도에 비해 해 당과정의 소비량이 더 많은 결과로 인하여 혈장 내 glucose 농도가 낮아 졌을 것이라고 보고되어 있다(Chang et al., 1999).

일반적으로 어류가 수온, 염분, 독성 등의 환경적인 스트레스에 노출되면 아가미조직이 1차적으로 손상된다고 보고하였다(Schwaiger, 1997). 본 연 구에서도 3일 동안 수온노출(20, 24, 28, 32℃)에 따른 각시붕어의 아가미 를 조직학적으로 관찰한 결과, 20℃에서는 아가미 조직의 일부인 1차 새 변, 2차 새변 및 점액세포에 경시적인 변화는 나타나지 않았으나, 수온이 24, 28. 32℃로 높아질수록 아가미 조직의 세포 괴사, 2차 새변의 손상 및 융합이 심해지는 것을 알 수 있었다.

본 연구 결과들을 기초로 각시붕어에 대한 수온변화 영향뿐만이 아니라 여러 스트레스 요인들이 주는 영향을 확인하기 위해 *in vivo와 in vitro* 조건에서 실험을 다양하게 수반한 세부적인 연구가 요구된다.

V. 요약

생물의 가장 일반적인 스트레스는 환경에 의한 온도의 변화이다. 수 온변화는 어류의 성장과 생존에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있 다. 우리나라 고유종인 각시붕어는 수온과 관련된 환경적 스트레스에 쉽게 노출된 서식환경을 가진다. 열충격단백질(HSP)의 발현과 혈장 내 glucose 농도변화는 생물체의 스트레스 지표로 널리 사용되고 있으며, 어류가 스트레스를 받을 때에 그것에 저항하는 하나의 기질로서 잘 알 려져 있다.

본 연구에서는 각시붕어를 대상으로 수온변화(20, 24, 28, 32℃)에 따 른 *in vitro*상의 세포배양실험을 통한 4종류의 HSP70 family 유전자 (HSP70 4-like, HSP70, HSP70 12A-like, Grp78)의 발현양상과 *in vivo* 상의 혈장 내 glucose 농도 변화, 그리고 아가미의 조직학적 관찰 도 조사하였다.

각시붕어의 간췌장(hepatopancreas) 세포 내에서 수온변화에 따른 발 현양상을 조사한 결과, RuHSP70 family 유전자 발현은 대조구 (control)인 20℃에 비해 24, 28℃에는 거의 변화가 없었고, 32℃에는 높게 발현되는 것을 알 수 있었다.

각시붕어의 혈장 내에서 수온변화에 따른 glucose 농도 변화를 조사 한 결과, 20, 24℃에는 거의 변화가 없다가 28℃에서 높은 농도를 보였 고 32℃에는 다시 대조 구의 농도와 비슷하게 낮아지는 것을 알 수 있 었다.

수온에 직접적으로 노출된 각시붕어 아가미의 조직학적 관찰한 결과, 아가미 조직의 괴사현상이 고수온(28℃와 32℃)에서 관찰되었다.

VI. 참고문헌

- Ackerman PA, Forsyth RB, Mazur CF and Iwama GK, 2000. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. Fish Physiol. Biochem., 23, 327–336.
- Afonso LOB, Hosoya S, Osborne J, Gamerl AK and Johnson S, 2008. Lack of glucose and hsp70 responses in haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) subjected to handling and heat shock. J. Fish Biol. 72, 157–167.
- An CM, 1995. Effects of photoperiod and water temperature on the reproductive cycle of the spring-spawning bitterling, *Rhodeus uyekii*. Korean J. Ichthyol. 7(1), 43–55.
- Arai A, Naruse K, Mitani H, and Shima A, 1995. Cloning and characterization of cDNAs for 70-kDa heat-shock proteins(Hsp70) from two fish species of the genus Oryzias. Jpn. J. Genet., 70, 423-433.
- Barton BA. and Iwama GK, 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish Dis., 1, 3–26.
- Barton BA. and Iwama GK, 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish Dis., 1, 3–36.
- Basua N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. Gene 2002; 295:173-83.
- Blechinger SR, Evans TG, Tang PT, Kuwada JY, Warren Jr JT, Krone PH, 2002. The heat-inducible zebrafish hsp70gene is expressed during normal lens development under non-stress conditions. Mechanisms of Development 112, 213–215.

- Cellura C, Toubiana M, Parrenello N, Roch P, 2006. HSP70 gene expression in Mytilus galloprocincialis hemocytes is triggered by moderate heat shock and Vibrio anguillarum, but not by V. splendidus or Micrococcus lysodeikticus. Dev. Comp. Immunol. 30, 984–997.
- Chae BS, 2001. Elongation of the ovipositor in Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii.* Korean J. Ichthyol. 13(2), 111–116.
- Chang YJ. and Hur JW, 1999. Physiological responses of grey mullet(Mugil cephalus) and Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. J. Korea Fish. Soc., 32, 310–316.
- Chang YJ., Min BH, Chang HJ and Hur JW, 2002. Comparison of blood physiology in black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) cultured in converted freshwater from seawater and seawater from freshwater. J. Korean Fish. Soc., 35, 595–600.
- Choi CY, Min BH, Kim NN, Cho SH, Chang YJ, 2006. Expression of HSP90, HSP70 mRNA and change of plasma cortisol and glucose during water temperature rising in freshwater adapted black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. J. Aquacult. 19(4), 315–322.
- Currie S, Moyes CD, Tufts BL, 2000. The effects of heat shock and acclimation temperature on heat shock protein70 and heat shock protein30 mRNA expression in rainbow trout: *in vivo* and *in vitro* comparisons. J. Fish Biol. 56, 398-408.
- Currie S, Tufts BL, 1997. Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. J. Exp. Biol. 200, 607–614.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH and Ebby EM, 1996. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 3264–3268.

- Eddie ED and Norman YS Woo, 2005. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 330, 776–783.
- Feder ME and Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Phys., 61, 243-282.
- Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Reviews Physiology. 61, 243–282.
- Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. Annual Reviews Cell and Developmental Biology 1993;9:601–34.
- Graser RT, Malnar-Dragojevic D and Vincek V, 1996. Cloning and characterization of a 70 kd heat shock cognate (hsc70) gene from the zebrafish (Danio rerio). Genetica., 98, 273–276.
- Hartl FU, 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature. 381, 571–580.
- Hightower LE, Norris CE, Dilorio PJ, Fielding E, 1999. Heat shock response of closely related species of tropical and desert fish. Am. Zool. 39, 877-888.
- Hutchison KA, Dittmar KD, Czar MJ and Pratt WB, 1994. Proof that hsp70 is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a heterocomplex with hsp90. J. Bio. Chem., 269, 5043–5049.
- Im JS, Ghil SH, 2013. Cloning of heat shock protein 70 and its Expression profile under an increase of water temperature in *Rhynchocypris kumgangensis*. J. Korean Society on Water Environment, 29(2), 232–238.

Iwama GK, Thomas P, Vijayan MM, Forsyth TB, 1998. Stress proteins

expression in fish. Rev. Fish Biol. Fish. 8, 35-56.

- Iwama GK, Vijayan MM, Forsyth RB, Ackerman PA, 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. Am. Zool. 39, 901–909.
- Kang EJ, Kim EM, Kim YJ, Lim SG, Sim DS, Kim YH, Park IS., 2005. Effect of lidocaine hydrochloride and clove oil as an anaesthetic on Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii* and oily bitterling, *Acheilognathus Koreensis*. J. Aquacult. 18, 272–279.
- Kang HS, Park MY, Jang JH, 2013. Effect of climate change on fish habitat in the nakdong river watershed. JKWRA Vol. 46, No. 1, 1–12.
- Khanna A, Aten RF and Behrman HR, 1995. Physiological and pharmacological inhibitors of luteinizing hormone-dependent steroidogenesis induce heat shock protein-70 in rat luteal cells. Endocrinol., 136, 1775-1781.
- Kim HS, Kim YH, Cho SH, Jo JY, 1999. Effects of dietary carotenoids on the nuptial color of the bitterling (*Rhodeus uyekii*). J. Korean fish. Soc. 32(3), 276–279.
- Kim IJ, 1997. A Osteological Study of *Rhodeus uyekii*. Korean J. Ichthyol. 9(1), 130–140.
- Kong HJ, Kang HS, Kim HD, 1996. Expression of the heat shock proteins in HeLa and fish CHSE-214 cell exposed to heat shock. Korean J. Zool. 39, 123-131.
- Kothary PK, Burgess EA and Candido EPM, 1984. The heat-shock phenomenon in cultured cells of rainbow trout: hsp70 mRNA synthesis and turnover. Biochim. Biophys. Acta, 783, 137–143.
- Kultz D, 1996. Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat shock responses of *Gilichthys mirabilis* gill cells. Am. J. Physiol. 271, C1181–C1193.

- Lele Z, Engel S and Krone PH, 1997. Hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress-and tissue-specific manner in zebra-fish embryos. Dev. Genet., 21, 123-133.
- Lim EH and Brenner S, 1999. Short-range linkage relationships, genomic organization and sequence comparisons of a cluster of five hsp70 genes in *Fugu rubipes*. Cell. Mol. Life Sic., 55, 668–678.
- Lund SG, Caissie D, Cunjak RA, Vijayan MM, Tufts BL, 2002. The effects of environmental heat stress on heat shock mRNA and protein expression in Miramachi Atlantic Salmon (salmo salar) parr. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 1553;1562.
- Mallouk Y, Vayssier-Taussat M, Bonventre JB and Poll BS, 1999. Heat shock protein 70 and ATP as partner in cell homeostasis. Int. J. Mol. Med., 4, 463-474.
- Matsumoto M and Fujimoto H, 1990. Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. Biochem. Biophys. Res. Commun., 166, 43-49.
- Molina A, Biemar F, Muller F, Iyengar A, Prunet P, Maclean N, Martial JA and Muller M, 2000. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. FEBS Lett., 474, 5–10.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C and Massie B, 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol. Cell Biol., 17, 5317–5327.
- Myrmel T, McCully JD, Malkin L, Krukenkamp IB, Levitsky S, 1994. Heat shock protein 70 mRNA is induced by anaerobic metabolism in rat hearts. Circulation 90, 299–305.

Ojima N, Yamashita M, Watabe S, 2005a. Comparative expression anlysis of

two paralogous Hsp70s in rainbow trout cells exposed to heat stress. Biochim. Biophys. Acta 1681, 99–106.

- Ojima N, Yamashita M, Watabe S, 2005b. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 329, 51–57.
- Piano A, Franzellitti S, Tinti F, Fabbri E, 2005. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Gene 361, 119–126.
- Ritossan F, 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila. Experientia* 18, 571–573.
- Roberts RJ, Agius C, saliba C, Bossier P, Sung YY, 2010. Heat Shock Proteins(chaperones) in fish and shellfish and their prtential role in relation to fish health: a review. J. Fish Dis. 33, 789-801.
- Roux T, Saker A, Leroy C, Frantz C and Michel H, 1994. Low temperature nitriding mechanisms of austenitic stainless steels in N2, Nice-Acropolis, France, 291-299.
- Sanders BM, Martin LS, Nelson WG, Phelps DK, Welch W, 1991. Relationship between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope for growth in Mytilus edulis exposed to a range of copper concentrations. Mar. Environ. Res. 31, 81–97.
- Schill RO, Görlitz H, Köhler HR, 2003. Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum*(Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. Biometals 16, 391–401.
- Schlesinger MJ, Ashburner M and Tissieres A, 1992. Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor, New York, 131–137.

- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W and Triebskron R, 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J. Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6, 75–86.
- Tsuzuki MY, Ogawa K, Strussmann CA, Maita M and Takashima F, 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Aquaculture, 200, 349–362.
- Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. American Journal Physiology 1999;277:L1026-33.
- Wu X, Tan J, Cai M, Liu X, 2014. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a heat shock protein (HSP) 70 gene from Paphia undulata. Gene. 543, 275–285.

Ⅶ. 감사의 글

해양학과에서 학부생활을 마치고 대학원을 해양생물학과로 오게 되었지만 부족한 저를 많이 지도해주시고 공부시켜주신 백혜자 교수님께 제일 먼저 감 사드린다는 말을 하고 싶습니다. 그리고 저의 실험 및 논문심사를 도와주신 국립수산과학원 생명공학과 안철민 과장님, 유전자에 관해 많은 조언을 해주 신 김현우 교수님께도 깊은 감사를 전합니다. 처음 쓰는 논문이었지만 기초부 터 차근차근 실험설계 및 수정을 직접적으로 많이 도와주신 공희정 연구사님 께도 감사하다는 말을 하고 싶습니다. 발생생식내분비연구실에 인도를 해준 인준이형.. 고맙습니다. 형님 말대로 어디에서든 부끄럽지 않은 후배 되겠습니 다. 그밖에도 저의 이전 직장이자 실험을 많이 도와준 국립수산과학원 생명공 학과 연구원분들과 유전자분석을 가르쳐준 김주란 연구원도 너무 고맙고 자 원생물학과 실험실원들.. 먼저 동생이자 후배이자 친구인 실험실 방장 현철이 힘든 일 많은데도 함께 해준다고 정말 고맙고 함께 공부할 수 있어서 정말 행복했다. 앞으로도 더 좋은 친구로 남자. 그리고 지은아 선배에게 항상 모르 는 것 많이 가르쳐주고 도와주고 친구 없는 나를 많이 챙겨줘서 고맙다. 대근 이, 슬기도 항상 든든하게 있는 듯 없는 듯.. 함께 해줘서 고맙다. 파이팅이다. 그리고 우리 실험실 애기들.. 상은이, 종상이, 민주, 민경, 영진, 석연, 승찬아 너희들을 알게 돼서 선배는 정말 좋았고 파트타임으로 있다가 실험실 와서 어색했는데 항상 선배에게 잘해주고 많이 도와줘서 고맙네.. 앞으로도 많은 일들이 남아있지만 너희들은 잘해내리라 믿는다. 같이 밥먹어주고 친구가 되 어준 이인옥 수고했다고 말하고 싶네. 어방에 명세훈.. 너도 형 많이 도와줘서 고맙다. 그 밖에도 해양생물학과 선배님, 후배님들.. 마지막으로 하나뿐인 나 의 가족 아버지, 어머니, 동생 사랑합니다. 모두 진심으로 감사합니다.

