

빅벨리해마(*Hippocampus abdominalis*)에서의 Mitochondrial Heat Shock Protein 75 유전자의 특징과 발현 분석

고지연 · Wan Qiang · 이숙경 · S.D.N.K. Bathige · 오민영 · 이제희*

제주대학교 해양생명과학과

Characterization of Mitochondrial Heat Shock Protein 75 (mtHSP75) of the Big-belly Seahorse *Hippocampus abdominalis*

Jiyeon Ko, Wan Qiang, Sukkyoung Lee, S.D.N.K. Bathige, Minyoung Oh and Jehee Lee*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Mitochondrial heat shock protein 75 (mtHSP75) is a member of the HSP90 family and plays essential roles in re-folding proteins of the mitochondrial matrix. Mitochondria provide energy in the form of ATP and generate reactive oxygen species (ROS). Heat shock proteins (HSPs) are activated in response to stress, and protect cells. In this study, we characterized the *mtHSP75* of the big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis*. The protein (BsmHSP75) is encoded by an open reading frame (ORF) of 2,157 nucleotides, has 719 amino acids (aa), and is of molecular mass 82 kDa. BsmHSP75 has two functional domains, a histidine kinase-like ATPase (HATPase_c) domain (123–276 aa) and an HSP90 family domain (302–718 aa). *BsmHSP75* was expressed in all tested tissues of healthy seahorses. The ovary contained the highest transcription level, followed (in order) by the blood, brain, and muscle. Pouch tissue showed the lowest expression level. The expression of *BsmHSP75* was significantly ($P<0.05$) up-regulated on viral or bacterial challenge, suggesting that BsmHSP75 plays a role in the immune defense against bacterial and viral pathogens.

Key words: Big-belly seahorse, Mitochondrial heat shock protein 75, HSP90, Stress, Real-time PCR

서론

Heat shock proteins (HSPs)는 세포 내 chaperones 또는 스트레스 단백질로 잘 알려져 있으며, 세포내에서 수송과정과 단백질 접힘, 단백질 기능 저하에 대하여 중요한 역할에 관여한다(Lindquist and Craig, 1988; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Mayer and Bukau, 2005; Wang et al., 2009). 분자량에 따라 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP10 등으로 분류되며 모든 생물에서 공통적으로 보존되어 있다(Padmini and Geetha, 2009). 대부분의 HSPs는 생리학적 환경에서 낮은 농도로 존재하나, heat shock와 oxidative stress, hydroperoxidase stress, radioadaptive response, glucose deprivation 등에 의해 발현이 증가된다(Hadari et al., 1997; Lee, 2001; Mitsumoto et al., 2002; Jönsson and Schill, 2007).

미토콘드리아에 존재하는 HSP75 (mtHSP75)는 TNF receptor-associated protein 1 (TRAP1)로서 HSP90 계열에 속하는 단백질이며 다른 HSP90 계열 단백질과는 달리 N-말단에 미토콘드리아를 target하는 signal peptide을 가지고 있다(Matassa et al., 2012). mtHSP75는 미토콘드리아에 필요한 단백질의 수송과 단백질 가수분해를 통해 단백질 재조립하는 역할을 한다(Haynes and Ron, 2010). Heat shock이나 다른 형태의 스트레스에 노출되었을 경우, 미토콘드리아에서는 reactive oxygen species (ROS)가 과도하게 생성되는데 이렇게 생성된 ROS는 단백질 변성을 촉진시키고(Sakurai and Cederbaum, 1998; Gutterman, 2005) 세포자살(apoptosis)을 유발시킨다(Hua et al., 2007). 이때 mtHSP75는 ROS와 같은 산화적 스트레스로 인해 변성된 단백질을 회복시켜 세포자살을 방지한다(Im et al., 2007).

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0354>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 48(3) 354-361, June 2015

Received 16 March 2015; Revised 1 May 2015; Accepted 11 May 2015

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3472 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: jehee@jejunu.ac.kr

HSPs는 오랫동안 지속적으로 연구를 해왔으나, 어류에서의 미토콘드리아 단백질에 속하는 HSPs에 관한 많은 연구가 되지 않았다. 최근 경골어류인 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*), 빅토리아 시클리드(*Pundamilia nyererei*), 시클리드 하플로크로미스 부르토니(*Haplochromis burtoni*) 등의 mitochondrial heat shock protein 75 유전자가 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)에 등록되어있으나 이 유전자의 분자적 특징이나 발현분석은 이루어지지 않았다.

해마는 세계적으로 천식, 심장병, 골절 등에 치료하는 약제로 쓰이며, 특히 빅벨리해마(*Hippocampus abdominalis*)는 해마류 중에서 크기가 가장 크고 아름다운 체색과 체형을 지니고 있어觀賞 가치가 높아 국제 해수觀賞생물 시장에서도 인기가 많다. 그러나 약용 가치로 인해 일부 국가에서 남획하고 있으며 더욱이 지구온난화와 연안의 환경오염 등으로 서식할 수 있는 환경이 축소되면서 자연개체의 수는 점차 감소하고 있다(Hilton-Taylor and Mittermeier, 2000). 호주와 그 주변국, 중국과 한국에서 인공수정을 통한 양식이 되고 있으나, 그 수가 수요에 비해 현저히 부족하다(Forteath, 1997; Woods, 2000a, b). 북해마(*Hippocampus kuda* Bleeker), 갈귀해마(*Hippocampus guttulatus*), Short-snouted seahorse (*Hippocampus hippocampus*) 등에서 면역반응과 생리적 연구가 진행되고 있으나 빅벨리해마의 면역·생리학적 연구가 아직 미비하다.

이에 본 연구에서는 빅벨리해마로부터 mitochondrial heat shock protein 75 (BsmHSP75) 유전자의 분자유전학적 특징과 조직별 발현 양상을 분석하고 동정하였으며 해마에 병원체 및 면역자극제를 사용하여 유전자의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 공격실험

제주에 위치한 한국해수관상어종묘센터(CCORA, <http://www.ccora.com/>)에서 약 20 cm 크기의 빅벨리해마를 구입하여 수온 $18 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 염분 32 ± 1 psu의 순환수조에서 일주일동안 순치시켰으며, 각 수조당 35마리씩 사육하였다. 대조군을 제외한 각 실험군에 lipopolysaccharide ($1.25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), Poly I:C ($1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), *Streptococcus iniae* (1×10^5 CFU/ μL), *Edwardsiella tarda* (5×10^3 CFU/ μL)를 100 μL 씩 접종하였고 샘플 채집은 시간별(0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h)로 각각 5마리의 해마에서 blood와 kidney를 채취하여 -80°C 에 보관하였다.

BsmHSP75 유전자 클로닝과 분자적 특징 분석

건강한 해마의 blood와 liver, kidney, gill, spleen에서 추출한 RNA를 이용하여 합성된 cDNA 염기서열은 454 GS-FLX™ system (Roche 454 Life Sciences, USA)로 분석하여 cDNA library database를 구축하였다. BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 이용하여 빅벨리해마 mtHSP75 유

전자의 cDNA 전체 서열을 확인하였으며, BLAST Search program을 사용하여 BsmHSP75의 상동유전자를 비교하였다. ClustalW2 program을 이용하여 Multiple sequence alignment를 수행하였으며, 비교 분석한 다른 종은 *Maylandia zebra* (XP_004559424.1), *Haplochromis burtoni* (XP_005944046.1), *Oreochromis niloticus* (XP_003450104.1), *Oryzias latipes* (XP_004071480.1), *Takifugu rubripes* (XP_003964711.1), *Xenopus (Silurana) tropicalis* (XP_002932506.1), *Gallus gallus* (NP_001006175.1), *Microtus ochrogaster* (XP_005349296.1), *Homo sapiens* (NP_057376.2) 이다. Pairwise sequence alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)를 이용하여 다른 종 mtHSP75와의 동일성(identity)과 유사성(similarity)을 비교분석하였고, BsmHSP75의 단백질 도메인은 SMART program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 통해 분석하였다. 계통발생학적 분석은 다른 종의 mitochondrial HSP75와 아미노산 서열을 비교분석하였으며, MEGA 5.5 program을 이용하여 the neighbor-joining (NJ) 방법으로 계통수를 나타내었다.

Total RNA 추출과 cDNA 합성

Total RNA 추출을 위해 건강한 빅벨리해마의 14개 조직(Blood, brain, gill, heart, intestine, liver, kidney, muscle, ovary, pouch, skin, spleen, stomach, testis)과 공격실험한 빅벨리해마의 조직(blood와 kidney)을 분리하여 액체질소로 냉동시킨 후 -80°C 에 보관하였다. 각 조직의 total RNA는 RNAiso plus (TaKaRa, Japan)을 사용하여 추출하였으며, PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 first-strand cDNA를 합성하였다.

Quantitative real-time PCR을 이용한 BsmHSP75의 발현분석

BsmHSP75의 cDNA 단편을 증폭하기 위해 사용된 oligonucleotide primer는 각각 mtHSP75-F (5'-TCTGGACATTGTTGCCAGGTCTCT-3')와 mtHSP75-R (5'-CGTGTCCCTGTATGGTGAAGGTGTTCT-3')이다. 각 조직별 cDNA는 real-time PCR을 수행하기 위한 주형으로 사용되었다. Quantitative real-time PCR 분석은 2X SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)을 이용하여 95°C 에서 30초간 1 cycle, 그리고 95°C 에서 5초, 58°C 에서 10초, 72°C 에서 20초를 45 cycles, 그리고 95°C 에서 15초, 60°C 에서 30초, 95°C 에서 15초간 1 cycle로 반응하였고, Thermal cycler DICE Real Time System (TP800; TaKaRa, Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다. BsmHSP75의 발현 결과는 Livak ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) 방법(Livak and Schmittgen, 2001)을 통해 나타내었으며 빅벨리해마의 40S ribosomal protein S7 (F: 5'-GCGGGAAGCATGTGGTCTTCATT-3', R: 5'-ACTCCTGGGTCGCTTCTGCTTATT-3')을 reference gene으로 사용하였고, 모든 데이터는 40S ribosomal protein

-62 CGACAGTAGTACCAGTTAGTGGGTTGACAGCTGCATCCCAGTGTCTCCTTTTCACTGTCACC
 1 **ATG**CCCCGCTTCCTCACTTTGTCGCCGATTGCGTATCACGCTTTTGTGCCCCAGGACCACTCAGAGGGTTCGCCATGCGTACGAGGATAT
M S R F L T L S R F G I T S L S A R T T Q R V P P C V R G Y 30
 91 AGCGCTTGTCTCGCGCTCCTTGACACAGGACACACAGGTTGAACCCAGCAGAGTTGGAGCAGCCGGCTGGCTTGGCGTCTCAG
 S A C V S R S L T Q D T Q V E P Q Q S W S S R P G L W R P Q 60
 181 CAGGCTTCCTTGGATCAAGCAGCAGTCTTCTACAGCACAGGAGGCTGAGAAGGAGCCCAGGATGAGCCCTTGACACCATCATC
 Q A F P W I K Q Q S F Y S T Q E A E K E P E D E P L H T I I 90
 271 AGCGATTAGAGACTGTGAAGGCACCTTCTCAAACATGAATTTACAGCCGAGACTAAGAAGCTTCTGGACATTGTTGCCAGGCTCTCTG
 S D S E T V Q G T F S K H E F Q A E T K K L L D I V A R S L 120
 361 TATTAGAGAAAGGAGTCTTATCAGGAGCTCATCTCAAACGGCAGGACGCTCTGGAGAACTGCGCCACAACTGATCACCAGGAG
 Y S **E K E V F I R E L I S N G S D A L E K L R H K L I T A G** 150
 451 GGCCAGCAGGCTCCCATGGAGATCCACCTGCAGCAGGACGCTGCCAAGAACACCTTACCATAACAGGACAGGGAGTGGGGATGAACCAA
G Q T A P M E I H L Q T D A A K N T F T I Q D T G V G M N Q 180
 541 GAGGAGTGGTTGCAAACCTGGTACCATCGCCGCTCAGGTTCCAAGGCTTCTGGATCGCTTCAAGCAGCAGGAGGAGCCGCGCAGC
E E L V A N L G T I A R S G S K A F L D A L Q N Q T E A G S 210
 631 ACAATCATCGGCAGTTTGGCGTGGCTTCTACTCAGCCTTCATGGTGGCCGACCGGCTGGACGCTACTCGCGGCCCGGAGTCCGGC
T I I G Q F G V G F Y S A F M V A D R V D V Y S R A A E S G 240
 721 TCACCTGGGTTCAAGTGGTCTCCGAGCGCTCGGGCCCTTTGAGATCGCCGAAGCCAGCGGCTCCAGCAGGGAACAAGATTGTGTTG
S P G F K W S S D G S G A F E I A E A S G V Q Q G T K I V L 270
 811 CACCTCAAAGCAGACTGCAAGGAGTTGCTCCGAGGACAGAGTCAAAGCCTTGTGACCAAGTACAGCAACTTTGTCAGCTTCCCCATT
H L K D D C K E F A S E D R V K D V V T K Y S N F V S F P I 300
 901 TTCTCAAAGCTCGCCGCTCAATACTCTGCAGCGTGTGGATGATGGAGCCAAAGAGATCAGGACTGGCAGCAGGAGTCTAC
F L N G R R L N T L Q A L W M M E P K E I S D W Q H E E F Y 330
 991 CGCTTTGTGGCGCAGGCTATGACAAGCCGCTACACGCTGCCTACCGCCGACGCCCCGCTCAACATCCGAGCATTTCTACGTC
R F V A Q A Y D K P R Y T L H Y R A D A P L N I R S I F Y V 360
 1081 CCTGAAACGAAGCCGCTCATGTTGACCTGAGCAGGAGATGGCTCCAGCGTGGCGCTCTACAGCAGGAAGTTCTCATCCAGACAAA
P E T K P S M F D V S R E M G S S V A L Y S R K V L I Q T K 390
 1171 GCCCGCAGATCTCGCCAAAGTGGTGGCTTCTCCGAGGTGGTGGACAGGAAAGACATCCCGCTCAATCTGAGCAGAGAGCTGCTG
A A D I L P K W L R F L R G V V D S E D I P L N L S R E L L 420
 1261 CAGGAGAGCCCTCATCAGGAAGTCCGTGACGCTCTGCAGCAGAGAGTATCCGCTTCTCTGGACCAGAGCAGGAAGGAGCCGAG
Q E S A L I R K L R D V L Q Q R V I R F L L D Q S R K E P E 450
 1351 AAGTACAGCAAATTTTCGAGGACTACGGCTTCTCATGCGGAGGCGATCGTACCACCCATGAGCAGGACGCTCAAGGAGATATGCC
K Y S K F F E D Y G L F M R E G I V T T H E Q D V K E D I A 480
 1441 AAGCTGCTCCGCTACGAGTCTCGGCGTGGCGGCGCCAGCACACCAATCTGACCGAGTACGCTCCCGCATGAAGCGGGAACCCGC
K L L R Y E S S A L P A G Q H T N L T E Y A S R M K A G T R 510
 1531 AACATCTACTACTGTGCGCCCCAACCGCATCTCGCGGAGCAGTCCGCTACTTTGAGGCAATGAAGCAGAAAGACATGGAGGTGCTG
N I Y Y L C A P N R H L A E H S P Y F E A M K Q K D M E V L 540
 1621 TTCTGCTACGAGAGTTGACGAGTGCCTTGTCTACCTGAGGAGTTTGACAAGAAGAAGCTCATCTCGGTGAGACGGACATTGTC
F C Y E Q F D E L T L L H L R E F D K K K L I S V E T D I V 570
 1711 GTGGACCATAAAGGAGAGAAGTTGAGGACAGAAACCGGCATCGGAGCGCCTGACTCAGGAGCAGGCCGACACTGATGGCGTGG
V D H Y K E E K F E D S K P A S E R L T Q E Q A D D L M A W 600
 1801 ATGAAGAATGCCCTGGTCTCGGCTCACTAACGTTCAAGCTTACTCTCGCCTGGACACGACCCCGCATGATCAGGTAAGTGAAGT
M K N A L G P R V T N V K L T P R L D T H P A M I T V L E M 630
 1891 GCGCGCAGCCATTTCTCGGTACGAGCAGTGGCTCGCAGTGGCAGGAGAGGCCAGATACTGCAGCCCACTCTGGAGATCAAC
G A A R H F L R T Q Q L A R S A E E R A Q I L Q P T L E I N 660
 1981 ACAGGACATGATGATCAAGAAGTTACACGCGTTAAGGACTCCAACAATGAAGTGGCCGACTGCTACTTGAACAGATTACGACAAC
T G H D L I K K L H A L K D S N N E L A A L L L E Q I Y D N 690
 2071 GCCATGATCAGCGGGGCTTGAACGAGATCCCGCGGATGATTCCCGCTCAACGACCTGCTGACAAAAGCGTTGGAGAAGCAG**TGA**
A M I T A G L N D D P R P M I S R L N D L L T K A L E K H * 720

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* mitochondrial HSP75. The start codon (ATG) and the stop codon (TGA) are shown by underlining with bold letters. The signal peptide is indicated in box. The HATPase_c domain is shaded in gray. The HSP90 domain is underlined.

S7 (Accession No. KP780177)에 대해 상대적으로 나타내었다.

통계학적 분석

실험결과는 mean ± 표준편차(S.D.)로 나타냈으며 PASW Statistics 18 (SPSS Inc.) program을 이용하여 일원배치 분산 분석을 실시하였다. 유의수준은 Duncan's Multiple Range test를 통해 P<0.05에서 판단하였다.

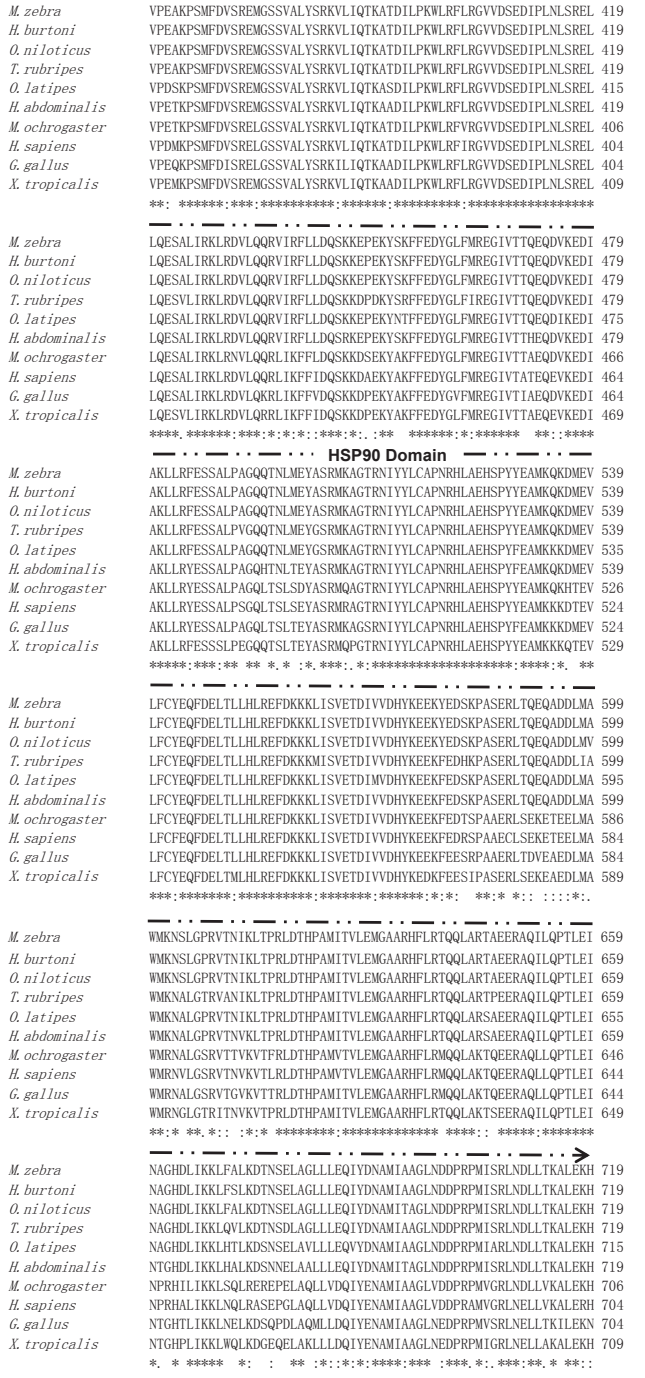
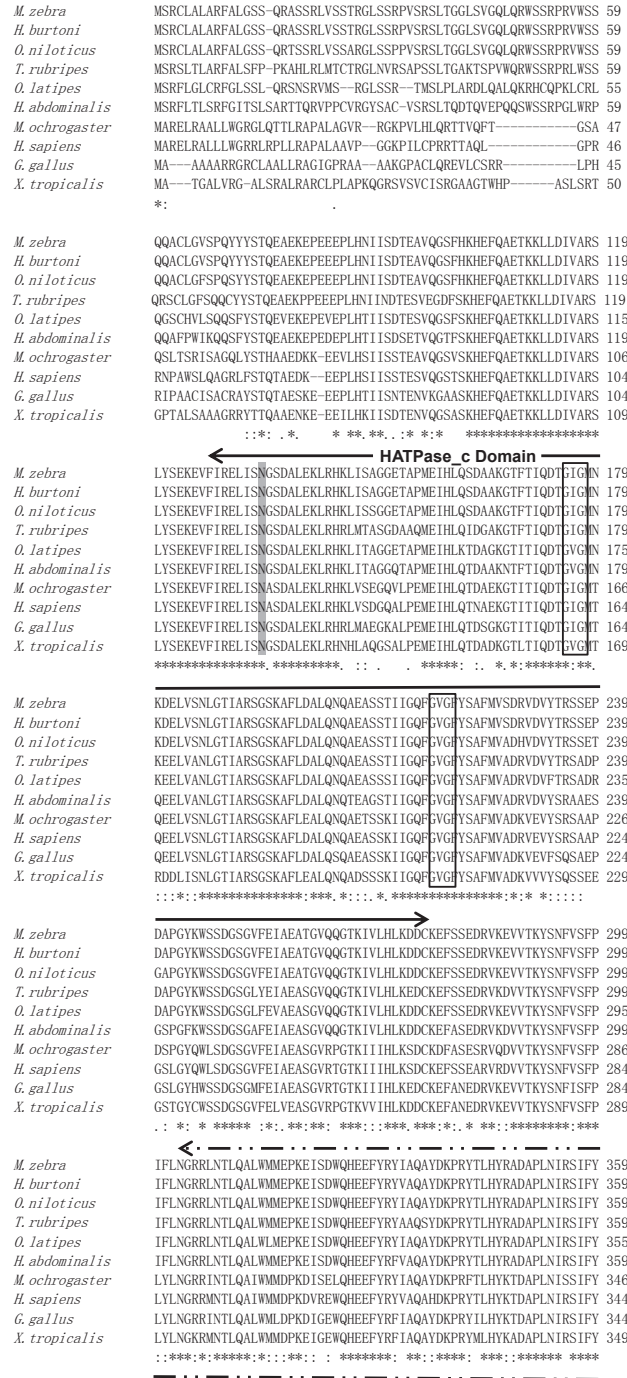


Fig. 2. Multiple sequence alignment of vertebrate mitochondrial heat shock protein 75. Sequence alignments were obtained by the ClustalW method. Conserved residues are indicated *. Two GXG motifs are indicated by boxes. M2+ ion binding site is shaded in gray.

결과 및 고찰

본 연구에서는 빅벨리해마의 mitochondrial heat shock protein 75 (BsmthHSP75)를 추출하여 cDNA를 확인하고 분자유전학적 특징과 발현 양상을 분석하였다. BsmthHSP75 cDNA (KJ756322)의 open reading frame (ORF)는 2,157 bp로 719 개의 아미노산을 암호화하며 분자량은 82 kDa로 추정되었다(Fig. 1).

mtHSP75은 다른 HSP90 계열의 단백질과는 달리 N-말단에는 미토콘드리아를 인식하는 mitochondrial signal peptide와 ATPase domain을 가지며, C-말단에는 HSP90 dimer 형성도

메인을 포함하는 HSP90 domain으로 구성되어 있다(Buchner, 1999; Sreedhar et al., 2004; Wegele et al., 2004). 이와 마찬가지로 *in silico* analysis을 통해 BsmthHSP75의 N-말단에는 17 개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide (1-17 aa)가 존재하였으며, ATP binding site (또는 chemical binding site)를 가지는 histidine kinase-like ATPase (HATPase_c) domain (123-276 aa)이 확인되었고, C-말단 부분에는 HSP90 domain (302-718 aa)이 위치하였다(Fig. 1). HATPase_c domain에는 1개의 Mg²⁺ ion binding site (N¹³⁴)와 ATP binding pocket에서 top과 bottom에 위치하는 2개의 GXG motif (G¹⁷⁵VG¹⁷⁷, G²¹⁷VG²¹⁹)를 포함하고 있었다(Fig. 2) (Obermann et al., 1998). Pairwise

Table 1. Percent identities and similarities of BsmthHSP75 with other mtHSP75 counterparts

Scientific name	Protein	Accession number	Identity (%)	Similarity (%)
<i>Oreochromis niloticus</i>	mtHSP75	XP_003450104.1	88.1	93.3
<i>Pundamilia nyererei</i>	mtHSP75	XP_005744430.1	87.9	93.1
<i>Maylandia zebra</i>	mtHSP75	XP_004559424.1	87.8	93.1
<i>Haplochromis burtoni</i>	mtHSP75	XP_005944046.1	87.8	93.1
<i>Oryzias latipes</i>	mtHSP75	XP_004071480.1	87.1	92.8
<i>Xiphophorus maculatus</i>	mtHSP75	XP_005809349.1	87.1	92.8
<i>Takifugu rubripes</i>	mtHSP75	XP_003964711.1	84.4	90.4
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	mtHSP75	XP_002932506.1	74.0	83.5
<i>Homo sapiens</i>	mtHSP75	NP_057376.2	72.7	83.9
<i>Gallus gallus</i>	mtHSP75	NP_001006175.1	72.4	81.9
<i>Mus musculus</i>	mtHSP75	NP_080784.1	71.3	80.5

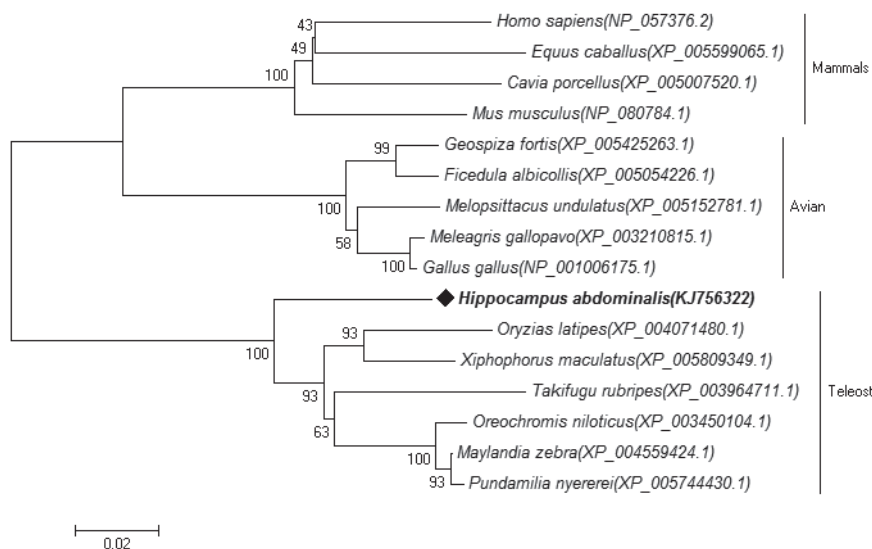


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on ClustalW alignment of deduced amino acid sequences of various mitochondrial heat shock protein 75. Big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* mtHSP75(KJ756322) indicated by ◆ and bold. The tree was constructed by MEGA software version 5.05 using neighbor-joining methods.

sequence alignment 결과, BsmHSP75는 *O. niloticus* mtHSP75와 *P. nyererei* mtHSP75에서 각각 88.1%, 87.9%의 동일성과 93.3%, 93.1%의 유사성을 확인하였다(Table 1). Multiple sequence analysis를 통해 다른 종과의 유사성과 공통적으로 보존된 도메인을 확인하였으며(Fig. 2), 계통발생학적 분석에서 BsmHSP75는 다른 경골어류 mtHSP75와 같은 cluster안에 속하고 있음을 확인하였다(Fig. 3).

mtHSP75는 모든 세포에 기본적으로 존재하고 있으며 이는 BsmHSP75 유전자의 조직별 발현 분석에서도 잘 나타나고 있다. BsmHSP75 유전자는 모든 조직에서 발현하고 있으며 다른 조직에 비해 ovary, blood, brain 순으로 높은 발현을 보이고 있었다. 척추동물인 돼지와 토끼의 HSP90 유전자는 생식기관에서 가장 높게 발현하였으며, 무척추동물인 새우에서도 생식기관에서 가장 높게 발현되었다(Quraishi and Brown, 1995; Huang et al., 1999; Li et al., 2012). 이는 HSP90이 생식기관의 발달과 성숙에 관여하기 때문으로 보이며(Wu and Chu, 2008), 따라서 ovary에서 HSP90 계열인 BsmHSP75가 생식기관의 발달과 성숙에 관여하는 것으로 생각된다. 이 뿐만 아니라, 포유류의 mtHSP75는 혈액에서 보편적으로 존재하고 있는 단백질로 보고되어 있다(Stamova et al., 2009). 포유류의 뇌에서도 mtHSP75가 발현되는데 그것은 열충격과는 관계없이 평상시에도 mtHSP75가 발현되어 있어 뇌의 뉴런 기능에 관여하는 것으로 보인다(Quraishi and Brown, 1995). 이는 빅벨리 해마의 혈액과 뇌에서 mtHSP75 유전자가 보편적으로 발현하고 있으며 뇌에서는 뉴런 기능에 관여하는 것으로 사료된다.

병원체 감염 시 일어나는 면역반응을 조사하기 위해 조직별 분석 결과를 토대로 하여 대표적인 면역기관인 blood와 kidney에서 LPS, Poly I:C, 병원균을 접종한 실험동물의 mtHSP75 mRNA 발현을 분석하였다. 그 결과, blood에서는 Poly I:C 접종 후 12, 72 h에서, *E. tarda* 접종 후 24, 48 h에서 발현이 유의

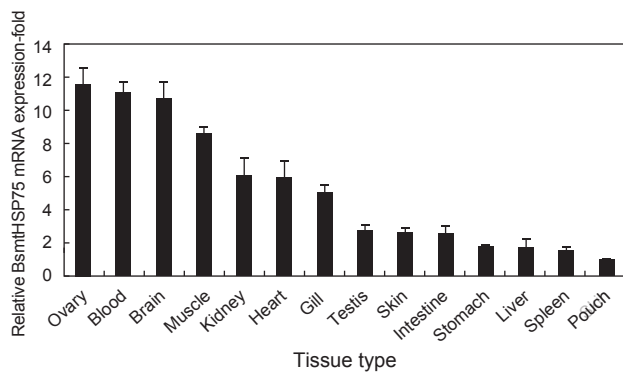


Fig. 4. Tissue specific expression analysis of BsmHSP75 mRNA determined by qPCR. Error bars represent the SD (n=3). The data are indicated as the mean relative ratio of BsmHSP75/40S ribosome mRNA levels.

적으로 증가하는 양상이 보이며(Fig. 5A), kidney에서는 LPS는 3, 6, 12, 24, 48 h에서, Poly I:C는 12, 48, 72 h에서 유의적으로 발현이 증가하였다(Fig. 5B).

바이러스와 세균 감염에 의한 ROS 발생은 단백질을 변성시키고 세포자살을 야기한다(Feuer et al., 2003; Saraste et al., 2003; Donati et al., 1991). 이러한 ROS의 발생은 mtHSP75를 발현을 유도한다고 보고되어 있으며(Jönsson and Schill, 2007), mtHSP75는 손상된 단백질을 결합하여 원래의 구조로 회복시킨다(Gao et al., 2008). 결국 mtHSP75는 바이러스와 세균의 감염에 의해 유발된 세포자살을 억제함으로써 바이러스와 세균로부터 세포를 보호한다(Wang et al., 2009). 이 연구에서는 바이러스 유사물질인 Poly I:C를 사용하여 접종하였고 blood와 kidney 두 조직에서 BsmHSP75의 발현이 유의적인 경향을 보였다. 또한 *E. tarda*에 대해 blood에서 BsmHSP75가

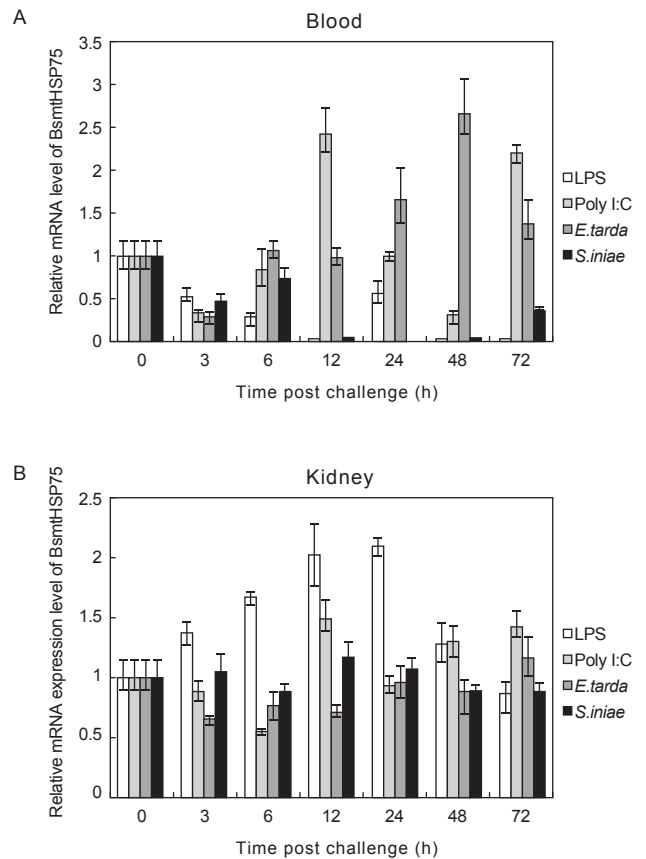


Fig. 5. The expression level of BsmHSP75 mRNA in blood (A) and kidney (B) after viral and bacterial challenges. Seahorse *Hippocampus abdominalis* were challenged with LPS, Poly (I:C), *Edwardsiella tarda*, and *Streptococcus iniae*. BsmHSP75 mRNA expression were determined by quantitative real time PCR at various times post challenges. Vertical bars represent the mean±S.D. (n=3) and significant differences are indicated with * letters at P<0.05.

유의적으로 증가하는 양상을 나타내었으며, 이는 ROS 발생으로 인한 세포자살 메커니즘에 의한 것으로 보인다.

LPS는 그람 음성균의 외막에 존재하는 내독소로서 어류에 LPS자극 시 면역 반응을 일으킨다(Magnadóttir, 2006). Kidney에서 LPS자극 시 BsmHSP75가 3 h부터 유의적으로 증가하다가 48 h에서 감소하는 경향을 나타내고 있으며, 이는 kidney에서 LPS자극에 의한 면역 반응에 mtHSP75가 관여하는 것으로 사료된다. 그러나 송어에서 LPS자극 시 단핵구/대식세포에서 발현이 억제된다고 보고되어 있으며(MacKenzie et al., 2006), 빅벨리해마의 blood에서 LPS자극에 의해 BsmHSP75의 발현이 억제된 것으로 생각되어진다.

LPS처럼 직접적으로 세포의 면역 반응에 영향을 끼치는 것과는 달리 세균의 경우, 면역 반응을 회피하기 위한 여러 메커니즘을 가지고 있으며(Finlay and McFadden, 2006), blood와 kidney에서 세균 감염시 유의적인 경향을 보이지 않았던 것은 세균의 면역회피 가능성으로 보여진다.

결론적으로, 빅벨리해마(*H. abdominalis*)의 mtHSP75 유전자는 외부로부터 침입한 바이러스와 세균 등의 병원체에 대해 항바이러스성 및 항균성을 가지고 있는 것으로 생각되어진다. 이러한 해마의 면역자극물질과 병원체 감염에 의한 mtHSP75 유전자 분석을 어류의 면역학적 연구나 해마의 또 다른 유전자 분석연구에 있어서 기초적인 연구자료로 사용될 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (수산백신연구센터)

References

- Buchner J. 1999. Hsp90 & Co.—a holding for folding. Trends Biochem Sci 24, 136-141. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01373-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01373-0).
- Donati Y, Kantengwa S and Polla B. 1991. Phagocytosis and heat shock response in human monocytes-macrophages. Pathobiology 59, 156-161. <http://dx.doi.org/10.1159/000163635>.
- Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Harkins S, Hassett DE and Whitton JL. 2003. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. Am J Pathol 163, 1379-1393. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63496-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63496-7).
- Finlay BB and McFadden G. 2006. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. Cell 124, 767-782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.034>.
- Forteach G. 1997. The large bellied seahorse, *Hippocampus abdominalis*. Austasia Aquaculture 11, 52-53.
- Gao Q, Zhao J, Song L, Qiu L, Yu Y, Zhang H and Ni D. 2008. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*. Fish Shellfish Immunol 24, 379-385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.08.008>.
- Gutterman DD. 2005. Mitochondria and reactive oxygen species an evolution in function. Circ Res 97, 302-304. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000179773.18195.12>.
- Hadari YR, Haring HU and Zick Y. 1997. p75, a member of the heat shock protein family, undergoes tyrosine phosphorylation in response to oxidative stress. J Biol Chem 272, 657-662. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.1.657>.
- Hartl FU and Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 295, 1852-1858. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068408>.
- Haynes CM and Ron D. 2010. The mitochondrial UPR—protecting organelle protein homeostasis. J Cell Sci 123, 3849-3855. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.075119>.
- Hilton-Taylor C and Mittermeier RA. 2000. 2000 IUCN red list of threatened species. IUCN Gland, Gland, Switzerland.
- Hua G, Zhang Q and Fan Z. 2007. Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. J Biol Chem 282, 20553-20560. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M703196200>.
- Huang HC, Lee WC, Lin JH, Huang HW, Jian SC, Mao SJ, Yang PC, Huang TY and Liu YC. 1999. Molecular cloning and characterization of porcine cDNA encoding a 90-kDa heat shock protein and its expression following hyperthermia. Gene 226, 307-315. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00569-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00569-1).
- Im CN, Lee JS, Zheng Y and Seo JS. 2007. Iron chelation study in a normal human hepatocyte cell line suggests that tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates production of reactive oxygen species. J Cell Biochem 100, 474-486. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21064>.
- Jönsson KI and Schill RO. 2007. Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol 146, 456-460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.10.111>.
- Lee AS. 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. Trends Biochem Sci 26, 504-510. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01908-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01908-9).
- Li J, Han J, Chen P, Chang Z, He Y, Liu P, Wang Q and Li J. 2012. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. Fish Shellfish Immunol 32, 1191-1197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.03.008>.
- Lindquist S and Craig E. 1988. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 22, 631-677. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>.

- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- MacKenzie S, Iliev D, Liarte C, Koskinen H, Planas JV, Goetz FW and Tort L. 2006. Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol. *Mol Immunol* 43, 1340-1348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2005.09.005>.
- Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 20, 137-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>.
- Matassa DS, Amoroso MR, Maddalena F, Landriscina M and Esposito F. 2012. New insights into TRAP1 pathway. *Am J Cancer Res* 2, 235-248.
- Mayer M and Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *CMLS Cell Mol Life Sci* 62, 670-684. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>.
- Mitsumoto A, Takeuchi A, Okawa K and Nakagawa Y. 2002. A subset of newly synthesized polypeptides in mitochondria from human endothelial cells exposed to hydroperoxide stress. *Free Radic Biol Med* 32, 22-37. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00755-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00755-9).
- Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP and Hartl FU. 1998. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 143, 901-910. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.143.4.901>.
- Padmini E and Geetha BV. 2009. Modulation of ASK1 expression during overexpression of Trx and HSP70 in stressed fish liver mitochondria. *Cell Stress Chaperones* 14, 459-467. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-009-0099-8>.
- Quraishi H and Brown IR. 1995. Expression of heat shock protein 90 (hsp90) in neural and nonneural tissues of the control and hyperthermic rabbit. *Exp Cell Res* 219, 358-363. <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1995.1239>.
- Sakurai K and Cederbaum AI. 1998. Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitrosyltriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Mol Pharmacol* 54, 1024-1035. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.54.6.1024>.
- Saraste A, Arola A, Vuorinen T, Kytö V, Kallajoki M, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM and Hyypiä T. 2003. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 12, 255-262. [http://dx.doi.org/10.1016/S1054-8807\(03\)00077-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1054-8807(03)00077-2).
- Sreedhar AS, Kalmár É, Csermely P and Shen Y-F. 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters* 562, 11-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00229-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00229-7).
- Stamova BS, Apperson M, Walker WL, Tian Y, Xu H, Adamczyk P, and Sharp FR. 2009. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BMC Med Genomics* 2, 49. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-2-49>.
- Wang Z, Wu Z, Jian J and Lu Y. 2009. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* 26, 639-645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.011>.
- Wegele H, Müller L and Buchner J. 2004. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer, Berlin Heidelberg Germany, 1-44. <http://dx.doi.org/10.1007/s10254-003-0021-1>.
- Woods CM. 2000a. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture* 190, 377-388. <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.2000.9516950>.
- Woods CM. 2000b. Preliminary observations on breeding and rearing the seahorse *Hippocampus abdominalis* (Teleostei: Syngnathidae) in captivity. *N Z J Mar Freshw Res* 34, 475-485. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00408-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00408-7).
- Wu LT and Chu KH. 2008. Characterization of heat shock protein 90 in the shrimp *Metapenaeus ensis*: evidence for its role in the regulation of vitellogenin synthesis. *Mol Reprod Dev* 75, 952-959. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20817>.