

# 이배체 및 삼배체 전복(*Haliotis discus hannai*) 치패에서 주요 열충격 단백질 유전자들(heat shock protein genes)의 발현 특징

박철지 · 김은정<sup>1</sup> · 남윤권<sup>1\*</sup>

국립수산과학원 육종연구센터, <sup>1</sup>부경대학교 해양바이오신소재학과

## Expression Pattern of Major Heat Shock Protein Genes in Diploid and Triploid Abalone *Haliotis discus hannai* Juveniles

Choul Ji Park, Eun Joeng Kim<sup>1</sup> and Yoon Kwon Nam<sup>1\*</sup>

Genetics and Breeding Research Center, National Institute of Fisheries Sciences, Geoje 46083, Korea

<sup>1</sup>Department of Marine Bio-Materials and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Basal and heat shock-induced mRNA expression patterns of major heat shock protein (HSP) genes, including those encoding heat shock protein (HSP) 90, HSP70, HSP70-12A, heat shock inducible protein 70 (HSIP70), heat shock binding protein 1 (HSPBP1), HSP60, and HSP40 were examined in the gill and hepatopancreas of 1-year-old diploid and triploid abalone *Haliotis discus hannai* juveniles. Under non-stimulated conditions at 19°C, triploid abalones displayed, in general, higher mRNA levels of various HSPs (HSP70, HSIP70, HSPBP1, HSP70-12A, and HSP60 in the gill and HSIP70, HSPBP1, and HSP60 in the hepatopancreas) than did communally cultured diploids. Conversely, only the hepatopancreatic expression of HSP70-12A was higher in diploids than in triploids. However, the fold changes in gene expression in response to an acute thermal challenge (elevation from 19 to 30°C) were generally greater in diploids than in triploids, such that the difference in basal expression was diminished, weakened, or even reversed after heat shock treatment. However, unlike other HSP genes, the basal expression of HSP60 (higher in 3N) was more pronounced after heat shock treatment. Collectively, the results of this study suggest that triploid abalones have different capacities for not only basal expression but also the heat-induced expression of HSPs in an HSP member-dependent manner.

Keywords: Abalone, *Haliotis discus hannai*, Heat shock protein genes, Thermal changes, Triploidy

### 서론

전복(*Haliotis discus hannai*)은 우리나라 주요 해산 양식 패류 종으로서 2000년대에 들어 인공종묘생산 기술의 발달과 해상 가두리 양식 방법의 이용을 통해 양식생산고의 많은 양적 성장이 이루어진 바 있다(Park and Kim, 2013). 그러나 최근 들어 여름철 고수온 환경의 심화에 따른 생존율 저하 및 빈번한 질병 유발 등 국내 전복 양식의 단위 노력 당 생산성은 점차 저하되고 있는 실정이며, 이에 전복의 양식 생산성 개선을 위해 선발 육종을 위시하여 여러 육종 연구들이 추진되고 있고, 그 일환으로서 염색체 공학을 이용한 삼배체(triploidy) 전복의 개발과 경제 형

질의 평가가 진행되고 있다(Park et al., 2018; Kim et al., 2019).

전복양식에서 문제를 야기시키는 여러 환경 요인들 중 지구 온난화와 관련한 수온의 증가와 여름철 고수온 환경의 장기간 유지가 최근 전복 양식의 생산성을 저하시키는 주요 환경 요인들로 주목 받고 있으며, 때문에 고수온 충격 또는 고수온 노출에 대한 전복의 생리 반응에 대한 분자 메커니즘을 이해하기 위한 여러 연구들이 이루어지고 있다(Chen et al., 2019; Kyeong et al., 2020). 특히, 고수온 노출 또는 적응 시 차등 발현 하는 분자발현마커들의 발굴과 이들에 대한 발현 특징을 해석하기 위한 연구들이 전복에서 최근 이루어진 바 있으며, 그 주요 대상 유전자 그룹으로서 열충격 단백질 유전자들(heat shock protein

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5918 Fax: +82. 51. 629. 5910

E-mail address: yoonknam@pknu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0515>

Korean J Fish Aquat Sci 53(4), 515-523, August 2020

Received 3 July 2020; Revised 30 July 2020; Accepted 5 August 2020

저자 직위: 박철지(연구관), 김은정(대학생), 남윤권(교수)

genes) 및 관련 유전자들에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다(Wan et al., 2012; Sun and Hu, 2016; Shin et al., 2017; Park et al., 2018; Kyeong et al., 2020).

Heat shock protein (HSP) gene family는 열 충격에 의한 세포 내 단백질의 보호를 주 기능으로 하는 molecular chaperone 들로서 다양한 분자량의 크기를 갖는 여러 종류의 HSP member 들(HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 및 그 외 저분자 HSPs)을 포함하며, 각 HSP member 내에서도 생물 종에 따라 서로 다른 다양한 isoform들이 존재하는 것으로 알려져 있다(Kregel, 2002; Kampinga et al., 2009). 아울러 일부 HSP member들의 경우 일반적인 스트레스 반응 인자(general stress response factor)로 작동함으로써 고수온 충격 외에 산화성 스트레스(oxidative stress) 및 감염(infection) 등에 대한 세포 방어 기능의 단백질로서도 그 역할을 수행함이 보고되고 있다(Brokordt et al., 2015; Dubey et al., 2015).

전복의 경우 역시 최근 whole genome assembly와 고수온 발현 transcripts들의 대량 발굴 실험을 통해서 다양한 HSP member들과 isoform들이 생물정보학 분석에 의해 동정된 바 있으나(Nam et al., 2017; Kyeong et al., 2020), 아직 전체 HSP member들의 isoform들에 대한 명명 및 분류체계(nomenclature)는 부분적으로 완성되어 있지는 못한 상태이다. 하지만, 전복류를 포함한 여러 수산생물종들을 대상으로 수행된 HSP 유전자 발현에 관한 여러 선행 연구들은 동일한 고수온 자극에 대해서 HSP member/isoform 특이적인 차등 발현을 나타내며, 그 차등 발현 패턴은 자극원에 대한 유도 발현의 민감도, 차등 발현의 양적인 절대량, 차등 발현 유발 주요 조직 등에서 생물 종 뿐만 아니라 계통 등에서도 그 차이가 관찰됨이 보고된 바 있다(Cheng et al., 2007; Wang et al., 2011; Shiel et al., 2014).

유도된 3배체(triploidy)는 일반적인 2배체(diploidy)에 비해서 1.5배 증가된 genome 크기를 갖도록 설계된 개체로서 2배체와 달리 3개의 상동염색체를(homologous chromosomes) 보유하게 되므로 제1감수분열(meiosis I)에서 상동염색체들간의 등 분할이 어렵기 때문에 감수분열의 지연 또는 억제에 따른 소위 불임 효과(sterility effect)의 유도된다(Piferrer et al., 2009; Dheilly et al., 2014). 때문에 3배체 유도 기술은 불임 효과를 통한 부가적인 경제 형질의 차등 발현을 유도하거나 인위적으로 형성한 육종 계통 또는 유전자변형 계통의 생식학적 제어(reproductive confinement) 전략으로써 그 가능성을 인정받고 있다. 하지만 인위적으로 유도된 3배체의 경우, 주 목적 형질인 불임성(sterility) 유도 외에도 세포 대사 및 생리 측면에서 다양한 비표적 형질(non-intended traits)들에서도 이배체와 차이를 나타낼 수 있는데, 이는 배수화 된 이론적으로 유전자좌위(locus) 별 조합 가능한 대립유전자(allele)의 수가 증가할 뿐만 아니라, genome 및 세포 크기의 증가로 인한 세포분열, 세포 수 및 세포 대사의 차이에 기인한다(Piferrer et al., 2009; Van de Pol et al., 2020).

이에 본 연구는 배수체 전복의 고수온 노출에 대한 생리 반응 특징을 평가하기 위한 연구의 일환으로 전복에서 발굴된 바 있는 주요 HSP 유전자들을 대상으로 일반 2배체 대조군 및 3배체 전복 치패에서 기초 발현 및 고수온 자극에 대한 유도 발현 특징을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 전복

실험에 사용한 전복은 제1극채 방출 억제를 통해 유도된 3배체 치패(1년산, 각장  $6.5 \pm 1.0$  cm)과 동일 모패로부터 생산된 동일 연령의 이배체 치패(각장  $6.2 \pm 1.2$  cm)들이다(Park et al., 2018; Kim et al., 2019). 이들 전복은 국립수산물품질관리원 육종연구센터(Geje, Korea)에서 동일 사육시스템에서 사육한 개체들로서, 기초 발현 수준 평가는 육종연구센터에서 사육 중인 개체들을 직접 샘플링하여 분석 조직을 확보하였다. 반면 고수온 처리 실험의 경우 육종연구센터에서 부경대학교 수산과학대학 수해양종합실험실습센터 부속어장으로 이송 후 수온  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 1주간 순치 후 수온 처리 실험에 사용하였다.

### HSP 유전자

분석을 위해 선발한 HSP 유전자들은 전복 genome draft로부터 선행 연구를 통해 보고된 바 있는 유전자들로서, heat shock protein 90 (HSP90) 1개 isoform, HSP70 member에서 3개 isoforms [HSP70 및 heat shock inducible protein 70 (HSIP70) 및 HSP70-12A], heat shock binding protein -1 (HSPBP1), 그리고 HSP60 및 HSP40 member에서 각 1개의 isoform씩 선발하여 총 7개의 HSP genes들을 유전자 발현 분석에 이용하였다(Kyeong et al., 2020). 각 유전자의 Gene ID 및 발현 유전자를 증폭하기 위한 RT-PCR용 primer pair는 Table 1에 나타내었다.

### 수온 자극 처리 및 실험 전복 샘플링

첫째, 2배체 대조군과 3배체 그룹의 HSP 유전자들의 기초 발현에 있어 차등 유무의 여부를 조사하기 위해서 동일 사육시스템 내에서 개체별 전자 표식 칩을 이용,  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 혼합사육(communal culture)중인 2배체와 3배체를 무작위로 선발하여(그룹 당 6개체) 아가미 및 간체장에서 발현하고 있는 각 HSP 유전자들의 발현 수준을 조사하였다. 총 3반복의 샘플링을 통해 2배체와 3배체에서의 기초 발현 수준을 비교하였다. 둘째, 고수온 자극 유도 시, 2배체 대조군과 3배체 그룹에서 고수온에 유도되는 HSP 유전자들의 종류 및 각 HSP 유전자의 발현 증가 민감도 등에 차등 발현이 관찰되는지 여부를 조사하기 위해 실험적인 고수온 자극 처리를 실시하였다. 상기 동일 사육시스템 내  $19 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 혼합사육하고 있는 개체들을 대상으로 개체식별 전자 칩을 이용하여 유사한 크기의 2배체 및 3배체 개체들을 선발하여 총 6개의 실험 수조(100 L;  $19 \pm 0.5^\circ\text{C}$ )를 선발하

여 수조 당 16 개체(2배체 및 3배체 각 8 개체)씩을 혼합 수용하였다. 실험 수조 환경에 적응하기 위해 48시간 동안 19±1°C에서 적응기간을 거친 후, 6개 실험 수조 중 3개의 수조를 대상으로 수온 증가를 유도하였다. 수온 증가는 자동 온도조절기가 연결된 300 W 석영 히터를 이용하여 시간 당 0.5°C씩 수온 상승을 유지하였고, 고수온으로 설정한 30°C에 도달 후 30±0.5°C에서 24시간 항온으로 유지하였다. 이때 수온 상승에 의한 용존산소 저감에 효과를 배제시키기 위해서 전기산소 발생기를 이용하여 19°C 유지 대조군과 30°C 고수온 처리 군의 용존산소를 6.0±0.5 ppm으로 조절하였다. 실험군 및 대조군의 수온과 용존산소는 실험 처리 전 기간동안 매 1시간 간격으로 측정하여 확인하였다. 고수온 자극 처리 직전 및 종료 시점에서 각 반복 처리 수조로부터 2배체 6미 및 3배체 6미를 샘플링하여 아가미와 간체장에서의 HSP 유전자 발현 수준을 분석하였다. 이때 각 개체 별 맨틀(mantle)의 일부 조직을 샘플링하여 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 배수성(ploidy level)을 재검증하였다(Park et al., 2018).

#### 핵산분리, 역전사 및 RT-qPCR assay

개체별 아가미 및 간체장 조직으로부터 total RNA를 분리하기 위해서 Tri-Reagent (Invitrogen)을 이용, 제조사의 권고 방법에 따라 total RNA를 추출하였고, 이어 추출한 total RNA 시료는 RNeasy plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 DNA 제거 과정을 포함한 순수분리 과정을 거쳐 최종 total RNA 시료를 확보하였다. 각 total RNA 시료를 대상으로 Nano Drop (ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA)을 이용하여 260 nm, 280 nm 및 230 nm에서 흡광도를 측정하여 1.9 이상의 260/280 nm 및 260/230 nm 흡광도 비율을 갖는 total RNA sample들만을 선발하여 역전사 반응에 이용하였다. 역전사 반응은 Qiagen사의 Omniscript RT kit를 이용하여 제조사의 권고방법대로 oligo-d(T)<sub>20</sub> 프라이머와 random nonamer 프라이머를 9:1 비율로 혼합하여 cDNA 합성을 수행하였다. 합성된 cDNA는 멸균 증류수를 이용하여 10배 희석 후 각 증폭반응 당 2 µL씩을 주형으로 이용하였다. 실시간 PCR 반응은 Light Cycler 480 시스템(Roche Applied Science, Penzberg, Germany) 및 2X SYBR mater mix (Roche)를 이용하여 유전자 증폭 산물의 변동을 45 cycles에 걸쳐 검출하였으며, 이후 melting curve 조사를 통해서 유전자별 단일 증폭 산물이 특이적으로 증폭되었음을 확인하였다. cDNA의 serial log-dilution 샘플을 이용한 표준 곡선(standard curve) 작성을 통해 각 유전자 증폭에 사용된 primer pair의 PCR efficiency가 90-105% 범위에 속함을 검증하였고, 각 유전자의 PCR efficiency 값과 threshold cycle (Ct)값을 이용하여 상대정량 분석(delta CT 및 delta-delta CT)을 실시하였다. 각 조직 내 HSP 유전자들간 상대 발현 수준의 비교 및 각 HSP 유전자의 온도 자극 처리에 따른 차등 발현 수준을 비교하기 위해서 상기 합성한 cDNA 주형들을 이용하여, reference-용 후보 housekeeping 유전자들을 대상으로 geNorm software package (Hallmans et al., 2007)에 의한 발현 안정성을 평가한 결과, normalization 효과가 가장 우수하다고 판정된 ribosomal protein L7 (RPL7) 유전자(Lee and Nam, 2016; Lee et al., 2019)를 reference 유전자로 선정하여 각 cDNA sample 별 HSP 유전자들의 발현 수준을

Table 1. Information on the HSP genes selected and PCR primers for RT-qPCR assay used in this study

Gene symbol	Gene ID/Scaffold	Primer sequence (5'-to-3')
HSP90	HDSC00143CG00040/ HDSC00143	FW: TTGACGAGTACTGTGTCCAG RV: ACCAGACGATTGAAACCAC
HSP70	HDSC00042CG00040/ HDSC00042	FW: GGATCGACCCGTATTCCTAA RV: TCCTGCTGTCTCAATGCCAA
HSIP70	HDSC00653CG00030/ HDSC00653	FW: AGAAAGCTCTGCGAGATGCT RV: CAGAACATCCTTGATGGCGT
HSPBP1	HDSC02831CG00020/ HDSC02831	FW: TTGGCATGATTGACCAGCTG RV: ACCTTCACAGACTCACCTGA
HSP70-12A	HDSC06051CG00020/ HDSC06051	FW: GAGTCAGCCACATTGCAGTA RV: AGCTTACTGGATGGATGACG
HSP60	HDSC04352CG00030/ HDSC04352	FW: AACCCCTTCTCATCATCGCT RV: GATGTCCTCCAGCTTGATACA
HSP40	HDSC01574CG00060/ HDSC01574	FW: TTTCCGGAGGTCCAAGTATGC RV: CAAGTGACACCTGTAGTCT

HSP, heat shock protein; PCR, polymerase chain reaction; FW, forward primer; RV, reverse primer. Gene IDs/Scaffolds annotated from the *Haliotis discus hannai* genome assembly are referred to Nam et al. (2017) and Kyeong et al. (2020). HSPBP1 gene is also referred to Park et al. (2018).

normalization 하였다(Schmittgen and Livak, 2008). cDNA 별 technical replication 으로서 3반복 증폭 실험을 통해 median Ct 값을 취하여 유전자 발현 분석에 이용하였다.

### 통계처리

HSP 유전자들의 조직 내 발현 수준 평가 및 2배체-3배체간 HSP 유전자들의 발현 수준 차이에 대한 평가는 Student t-test 분석 또는 One-way ANOVA 분석을 이용 P=0.05 수준에서 유의성 검정을 수행하였고, ANOVA 분석 결과의 경우 Duncan's multiple range test를 이용하여 평균 값의 분리를 실시하였다.

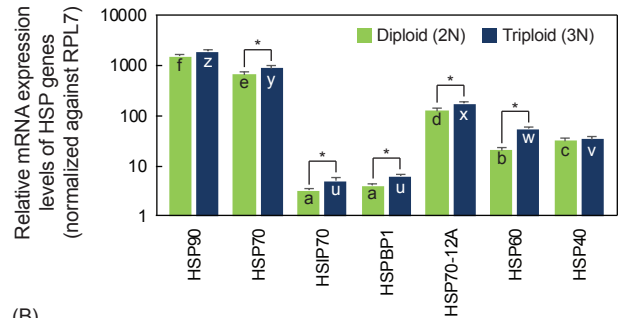
## 결 과

### 2배체와 3배체간 HSP 유전자들의 기초발현 수준

Normalization control로 사용한 내재 유전자 RPL7 유전자의 발현 수준은 2배체와 3배체간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(data not shown). 19°C 수온 조건에서 샘플링한 2배체의 아가미에서 HSP 유전자들의 기초 발현 수준을 평가한 결과, HSP90이 가장 높은 발현량을 그리고 이어서 HSP70이 두 번째로 높은 발현량을 나타내었다. 나머지 유전자들이 경우 HSP70-12A, HSP40 및 HSP60 순으로 발현 수준이 관찰되었고, HSPBP1 및 HSIP70 유전자들이 가장 낮은 발현량을 나타내었다(P<0.05). 3배체에서도 상기 2배체에서의 발현 패턴과 유사한 경향을 나타내어 3배체 아가미 조직 내 HSP 유전자들의 상대 발현량의 순위에는 차이가 없는 것으로 관찰됨으로써, 3배체에서도 역시 HSP90이 가장 높은 발현량을 그리고 HSPBP1 및 HSIP70이 가장 낮은 발현 수준을 보였다. 그러나 각 HSP 유전자별 2배체 및 3배체 그룹간 발현량을 비교 시 분석한 7개 HSP 유전자들 모두에서 3배체가 높은 발현 수준을 나타내는 경향을 보였으며, 이중 HSP90 및 HSP40을 제외한 5개 HSP 유전자들에서 통계적인 차이가 관찰되었다(P<0.05). 통계적 유의차가 인정되는 5개의 HSP 유전자들은 2배체의 평균 값과 비교 시 3배체에서의 1.3-2.6배 높게 나타났고, 이중 HSP60에서 2배체와 3배체간 가장 큰 차이를 보였다(Fig. 1A).

간체장에서의 HSP 유전자들의 발현 분석 결과, 이배체의 경우 역시 HSP90 및 HSP70이 상대적으로 다른 HSP 유전자들에 비해 월등히 높은 발현량을 나타낸다는 점, 그리고 이들 두 유전자에 이어서 HSP70-12A가 높은 발현 수준을 보인다는 점에서 아가미에서의 발현 결과와 유사하였다. 반면, 다른 HSP 유전자들의 경우, 아가미와 달리 간체장에서는 HSIP70 유전자가 HSP40, HSP60 및 HSPBP1보다 유의적으로 높은 발현을 나타내는 차이가 관찰되었다(P<0.05). 3배체 간체장 내 HSP 유전자들의 기초 발현 경향 역시 HSP90/HSP70이 매우 높은 발현을, 그리고 HSPBP1, HSP40, HSP60에서 상대적으로 낮은 발현을 보인다는 점에서 2배체에서의 결과와 유사하였으나, 2배체와 달리 3배체의 경우 HSIP70의 유전자 발현이 HSP70-12A보다

(A)



(B)

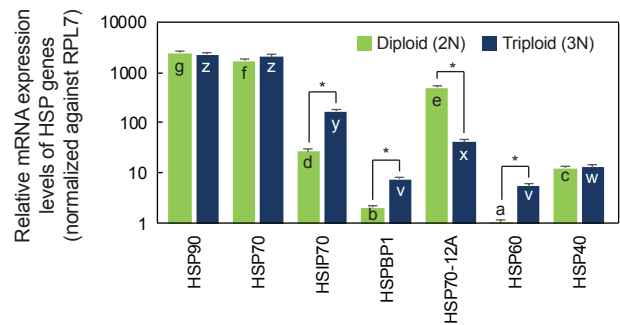


Fig. 1. Basal mRNA expression levels of selected heat shock response genes at 19°C in the gill (A) and hepatopancreas (B) of diploid and triploid abalone *Haliotis discus hannai* juveniles. Within a given ploidy group, means with different letters (a-g in 2N and u-z in 3N) are significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range tests at P<0.05. Also within a given HSP gene, statistical difference between diploid and triploid groups is indicated by asterisk based on student's t-test at P<0.05. HSP, heat shock protein.

더 높게 나타나 차이가 있었다. 한편, 각 HSP 유전자별 2배체와 3배체간 기초 발현 수준을 비교한 결과, 분석한 7개의 유전자 중 아가미에서와 마찬가지로 HSP90 및 HSP40에서는 유의적인 차이가 없었고(P>0.05), 그 외 추가적으로 HSP70 유전자 역시 간체장에서는 통계적인 유의차가 인정되지 않았다(P>0.05). 나머지 4개 유전자 중 HSIP70, HSPBP1 및 HSP60에서는 3배체가 2배체에 비해 3.6-6.3배 높은 기초발현 수준을 나타낸 반면, HSP70-12A의 경우 2배체가 3배체에 비해 10 이상의 높은 기초 발현 수준을 나타내었다(P<0.05) (Fig. 1B).

### 아가미에서 2배체와 3배체들간 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 차등 발현

2배체 및 3배체 모두에서 고수온 자극 처리에 의해 HSP 유전자들의 다양한 유도 발현 양상이 관찰되었으며, 각 HSP 유전자별로 유도발현의 민감도 및 fold change 값에 큰 차이를 나타내

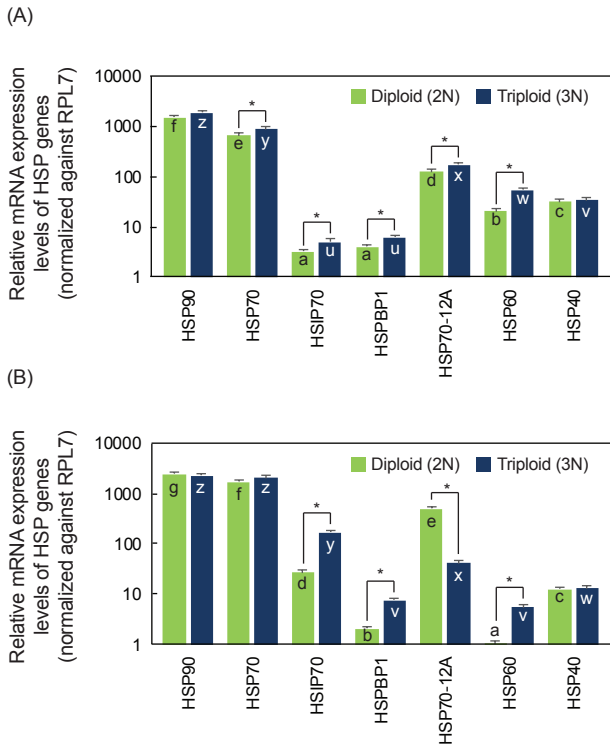


Fig. 2. Differential expression of HSP genes in response to acute thermal challenge (elevation of water temperature from 19°C to 30°C) in the gill of diploid and triploid abalone *Haliotis discus hannai* juveniles. (A) Fold changes of induced expression at the end of heat shock treatment relative to 19°C-control group. (B) Relative end-point expression levels normalized. In (A) and (B), asterisks indicate the statistical difference between diploid and triploid groups based on Student's t-test at  $P < 0.05$ . In (B), within a given ploidy group, means with different letters (a-e in 2N and v-z in 3N) are significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range tests at  $P < 0.05$ . HSP, heat shock protein.

었다. 2배체의 경우 RPL7 normalization을 토대로 19°C 유지군의 경우 앞서 시행한 기초 발현 수준 평가와 비교시 HSP 유전자 발현 수준의 순서 및 상대 발현 수준에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면 30°C로 수온 상승 그룹의 경우 19°C 항온 유지군에 비해서 HSP 유전자별로 다양한 폭의 유도발현 수준이 관찰되었는데 30°C/19°C fold change 값을 기준 시, HSIP70 (> 80-fold)에서 가장 많은 변화가 유발되었고, 이어서 HSP90 (22.5-fold) 및 HSP70 (17.8-fold)에서 많은 발현 수준의 변화가 관찰되었다( $P < 0.05$ ). 나머지 HSP40, HSP70-12A 및 HSPBP1 유전자의 경우 1.5-fold에서 4.0-fold의 비교적 소폭의 유전자 발현 증가를 나타내었으며( $P < 0.05$ ), 다른 HSP 유전자들과는 달리 HSP60의 경우 이배체 아가미에서 고수온 자극에 의한 유의적인 발현의 증감은 관찰되지 않았다( $P > 0.05$ ) (Fig. 2A).

3배체의 경우 고수온 자극에 의해 HSIP70, HSP90 및 HSP70 이 다른 HSP 유전자들에 비해 상대적으로 많은 폭의 fold change 변화가 관찰된다는 측면에서 2배체에서의 발현 패턴과 유사하였다( $P < 0.05$ ). 그러나 3배체의 경우 2배체에서 고수온에 발현의 증가를 나타낸 바 있는 HSP70-12A가 3배체에서는 오히려 발현이 감소되는 결과를 보인다는 점( $P < 0.05$ ), 그리고 2배체에서는 고수온 자극에 발현의 변화가 없는 HSP60 유전자가 3배체에서는 동일 고수온 자극에 대해서 4배에 가까운 발현 증가를 나타낸다는 점에서 2배체와 뚜렷한 차이를 보였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 2A).

각 HSP 유전자별 fold change 값에 관한 2배체와 3배체간 차이를 비교할 경우 HSP90, HSPBP1 그리고 HSP40에서는 유의적인 차이가 없었으나 HSP70 (2N vs 3N=18-fold vs. 10-fold) 및 HSIP70 (89-fold vs. 32-fold)에서 2배체가 3배체에 비해 유의적으로 높은 유도 발현 민감도를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 이에 기초 발현 수준을 반영한 고수온 자극 시 최종 발현 양(endpoint expression level)을 HSP 유전자별로 2배체와 3배체를 비교할 경우, 역시 HSP90, HSPBP1 그리고 HSP40에서는 고수온 자극 이후 2배체와 3배체가 유사한 발현 수준에 도달하는 것으로 나타났으며( $P > 0.05$ ), HSP70 (2N/3N ratio=1.4-fold), HSIP70 (1.8-fold) 및 HSP70-12A (4.6-fold)에서는 고수온 자극에 의해 2배체가 3배체에 비해 더 높은 발현량을 최종 나타내었다( $P < 0.05$ ). 반면 HSP60의 경우 3배체가 기초발현 수준이 2배체에 비해 더 높았음에도(2.6-fold) 불구하고 고수온 자극시 3배체 특이적인 유도발현을 나타냄으로써 고수온 처리 이후 2배체와 3배체간 발현 수준의 차이는 더 심화되었다(3N/2N ratio=9.5-fold) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B).

### 간체장에서 2배체와 3배체들간 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 차등 발현

아가미에서와 마찬가지로 고수온 자극에 의해 간체장에서도 HSP 유전자 별 다양한 fold change 값이 관찰되었고 HSP 유전자 종류에 따라 2배체와 3배체간 유도 발현의 민감도 및 고수온 자극 처리 후 최종 도달 유전자 발현량에 차이가 관찰되었다. 2배체 간체장의 경우 고수온 자극에 의해 가장 큰 폭의 fold change를 나타낸 유전자는 HSIP70 (30°C/19°C ratio=1,200-fold)로써 급격한 발현 증가가 유도되었고, HSIP70에 이어 HSPBP1 역시 고수온 처리에 의해 300배 이상의 발현 증가가 관찰되었다( $P < 0.05$ ). 이들 두 HSP 유전자외에 HSP90 및 HSP70에서 약 18-fold에서 20-fold의 발현 증가가 관찰되었으며 HSP40 및 HSP60의 경우 각각 1.4-fold 및 2.8-fold의 유전자 발현 증가를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 반면 HSP70-12A에서는 고수온 자극에 의해 오히려 발현이 감소하는 결과를 나타내어 아가미에서의 결과와 차이를 보였다( $P < 0.05$ ). 3배체의 경우 역시 HSIP70 및 HSPBP1에서 높은 유도발현을 나타내었으나 그 fold change 값의 증가 폭이 2배체에 비해서 상대적으로 낮았고

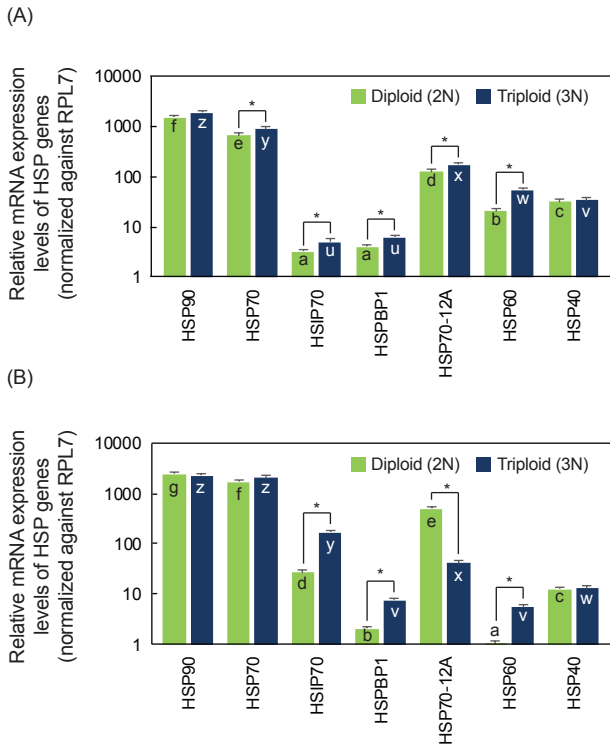


Fig. 3. Differential expression of HSP genes in response to acute thermal challenge (elevation of water temperature from 19°C to 30°C) in the hepatopancreas of diploid and triploid abalone *Haliotis discus hannai* juveniles. (A) Fold changes of induced expression at the end of heat shock treatment relative to 19°C-control group. (B) Relative end-point expression levels normalized. In (A) and (B), asterisks indicate the statistical difference between diploid and triploid groups based on Student's t-test at  $P < 0.05$ . In (B), within a given ploidy group, means with different letters (*a-e* in 2N and *v-z* in 3N) are significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range tests at  $P < 0.05$ . HSP, heat shock protein.

(HSIP70 119-fold 및 HSPBP1 127-fold), 2배체와 마찬가지로 HSP70-12A의 경우 3배체에서도 고수온 자극에 의해 발현이 감소하는 공통적인 결과를 나타내었다. 그 외 HSP90, HSP70 및 HSP40의 경우 2배체에서 관찰된 fold change 값들과 유사한 발현 변동을 보여 유의적인 차이가 없었다. 하지만 HSP60의 경우 2배체에서는 2.8배의 fold change 증가 보였으나 3배체의 경우 140배 이상의 유전자 발현 증가를 나타냄으로써 뚜렷한 차이가 관찰되었다( $P < 0.05$ ) (Fig. 3A).

아가미에서와 마찬가지로 간체장에서도 고수온 자극 시 최종 도달하는 HSP 유전자 발현 수준을 2배체와 3배체간 비교할 경우, HSP90 및 HSP40의 경우 고수온 자극 시 end-point 발현량에 배수체 수준에 따른 유의적인 차이는 없었다( $P > 0.05$ ). 반면, HSP70 및 HSPBP1의 경우 end-point 발현량에 있어서 3배체

가 2배체에 비해 1.3배의 높은 발현 수준을 나타내었으며, 반대로 HSIP70의 경우 2배체가 3배체에 비해 1.6배의 높은 발현량을 표현하였다( $P < 0.05$ ). 반면 HSP70-12A의 경우 고수온 자극에 의해 2배체 및 3배체에서 모두 유사한 발현 감소 폭(fold change)을 보였지만, 원 기초 발현 수준이 2배체가 3배체에 비해 매우 높았기 때문에 최종 고수온 자극 이후 발현량에서 2배체가 3배체보다 10배 이상의 높은 발현 수준을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 마지막으로 HSP60의 경우, 3배체가 2배체에 비해 5배 이상의 기초발현 수준을 보였으며 고수온 자극에 의해 3배체에서 훨씬 큰 폭의 fold change가 유도됨에 따라 최종 발현량 수준에서 2배체와의 차이가 더욱 심화되는 결과를 나타내었다 (3N/2N ratio=270-fold) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3B).

## 고찰

본 연구결과, 2배체 및 3배체 공통적으로 분석한 아가미 및 간체장 조직의 종류와 상관 없이 HSP90과 HSP70이 다른 HSP member들에 비해서 상대적으로 높은 기초 발현 수준을 나타내었는데, 이는 일반적으로 여러 HSP member들 중 HSP70과 HSP90이 고수온 자극 등 스트레스 반응에 대비한 molecular chaperone들로서 가장 주요한 역할을 하는 두 HSP member들임을 보고한 바 있는 여러 선행 연구결과들과 크게 다르지 않다 (Kregel, 2002; Cheng et al., 2007; Farcy et al., 2007; Shiel et al., 2014).

일반적인 전복의 사육 온도 범위에 있는 수온 조건에서 2배체와 3배체의 기초 발현 수준을 비교한 결과, 분석한 HSP 유전자들의 발현량에 대한 상대 순위의 경우 2배체 및 3배체가 유사한 경향을 나타내었다. 이는 유도된 3배체 전복 역시(특히, HSP의 발현 순위가 2배체와 3배체가 동일한 아가미에서) 기본적인 HSP 유전자들의 발현체계가 2배체와 다르지 않음을 시사하며, 본 연구의 관찰 결과는 척추동물인 어류(무지개송어)에서 3배체 유도가 고수온에 대한 생리적 반응 및 유전자 발현 반응체계에 큰 영향을 미치지 않는다는 종래의 연구보고와 일맥 상통한다(Benfey and Devlin, 2018; Bowden et al., 2018).

하지만 HSP 유전자별 발현량의 경우, 여러 HSP 유전자들에서 3배체 전복이 2배체에 비해 전반적으로 더 높은 기초 발현 수준을 고수온 자극 이전에도 이미 유지하는 것으로 나타났다. 아가미의 경우 모든 HSP 유전자들에서, 그리고 간체장의 경우 HSP70-12A를 제외한 HSP 유전자들에서 3배체가 2배체와 대등하거나 또는 더 높은 기초 발현 수준을 나타내었다. 본 연구의 해당 결과는 기존 어류 3배체에서(연어과 어류) 3배체가 2배체에 비해 상대적으로 낮은 HSP 기초발현 수준을 가지기 때문에 급격한 수온 변화나 고수온 충격에 생체 방어 기능이 있어 2배체에 비해 제한적일 수 있다는 기존의 보고와는 반대의 연구 결과이다(Saranyan et al., 2017; Sambraus et al., 2018). HSP의 기초 발현 수준이 높다는 점은 급격한 고수온 자극에 대한 항상성 유지가 보다 용이할 수 있다는(즉, 충격에 대한 완충효과

가 더 높고, 상대적으로 작은 폭의 HSP 유도 발현으로도 필요한 HSP 수준에 도달 가능) 기존의 추론을 고려할 때(Saranyan et al., 2017), 전복의 경우 3배체가 2배체에 비해 고수온 자극에 대하여 보다 높은 고수온 내성 형질을 보유할 잠재적인 가능성 평가에 대한 자세한 연구들이 필요할 것으로 판단된다. 그러나 그럼에도 불구하고 보다 정밀한 정량적 평가를 위해서는 본 연구에서 상용한 동일 total RNA 양내 HSP 유전자 mRNA의 양적 비교와 아울러 3배체 전복과 2배체 전복의 아가미 세포 당 유전자발현 능력 그리고 동일 아가미 조직 무게당 3배체와 2배체 간 구성 세포 수에 관한 정량평가법의 확립이 함께 이루어져야 할 것이다(Saranyan et al., 2017).

본 연구에서 기초 발현 수준 조사를 수행한 수온 조건은 통상의 전복 사육 조건 범위에 해당되며, 유도 발현 조사를 위해 실시한 고수온 조건은 국내 전복 양식장에서 여름철 고수온기 관찰되는 온도이다(Kyeong et al., 2020). 비록 3배체 전복이 2배체에 비해서 여러 HSP 유전자들에 있어 더 높은 기초 발현 수준을 가지지만, 고수온 자극(acute heat challenge)에 노출될 경우 많은 HSP 유전자들에서 2배체는 3배체에 비해서 대응하거나 또는 더 큰 폭의 발현 변화(고수온 자극 직전 대비 발현 증가의 fold change)를 보이는 것으로 나타났다. 고수온 자극 처리 시 아가미의 경우 HSP70, HSIP70, 및 HSP70-12A에서, 그리고 간체장의 경우 HSIP70 및 HSPBP1에서 3배체 대비 2배체의 발현 증가 폭이 유의적으로 크게 관찰되었는데, 본 결과는 상대적으로 낮은 HSP 유전자들의 기초발현을 갖는 2배체들이 고수온 자극 시 세포 방어 및 항상성 유지를 위해 요구되는 수준까지 HSP 유전자 발현산물을 신속히 생산하기 위한 대응 전략이라고 생각된다. 특히 기초발현 수준 차이를 고려 시, 2배체와 3배체간 유사한 기초 발현 수준을 보이는 HSP 유전자들은 대부분 고수온 자극 시 2배체와 3배체간 fold change 값 역시 유사한 반면 3배체에 비해 낮은 기초 발현 수준을 보이는 여러 HSP 유전자들의 경우 2배체에서 3배체보다 훨씬 큰 폭의 유전자 발현이 일어난다는 점 역시 해당 가설을 간접적으로 지지한다고 할 수 있다. 결과적으로 본 연구에서 2배체와 3배체간 기초발현에서의 발현양 차이는 고수온 자극 후 대부분 상쇄(2배체와 3배체간 유사한 발현 수준), 약화(3배체에서 더 높은 발현을 유지하지만 그 차이가 기초 발현에서의 차이에 비해 크게 줄어듦) 또는 역전(2배체가 3배체에 비해 오히려 더 높은 발현 수준에 도달)되는 현상으로 전환되는 경향을 나타내었으며, 비록 조직간 HSP 유전자별 차이는 있으나 아가미와 간체장 모두에서 전반적인 경향은 서로 크게 다르지 않았다.

그럼에도 불구하고, 낮은 기초 발현 수준을 극복하기 위해 더 큰 폭의 발현 증가를 유도한 다는 상기 가설로 설명되지 않는 HSP 유전자가 아가미와 간체장에서 공통적으로 관찰되는데, 바로 HSP60 유전자의 발현 패턴이 이에 해당된다. 아가미 및 간체장 모두에서 HSP60은 3배체에서 2배체에 비해 유의적으로 높은 기초 발현 수준을 보이지만, 고수온 자극 시 오히려 3

배체에서 더 큰 폭의 유도 발현이 유발됨으로써, 기초발현 수준에서의 2배체와 3배체간 차이가 고수온 자극 이후 더 심화되는 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구 결과는 다른 HSP 유전자들과 달리 전복에서 배수화가 되면서 고수온 자극과 기초발현 모두에서 3배체 전복에서 특이적으로 더 많은 HSP60 산물이 요구되며, 특히 3배체 전복의 간체장에서 고수온 스트레스에 대한 대응 인자로서 중요함을 시사하고 있다. 아직 본 연구결과만으로는 2배체에 비해 3배체에서 HSP60의 요구량이 상대적으로 유의적으로 더 큰 이유에 대해서 정확한 가설을 도출하기는 어렵다. 그럼에도 불구하고, HSP60이 전형적인 mitochondrial chaperonin의 일종으로서 주로 세포질내 발현한 단백질의 미토콘드리아로의 운반 및 re-folding/anti-folding을 담당하며(Koll et al., 1992) 고온 스트레스 조건에서 미토콘드리아 단백질들의 변성을 방지하는 기능(Martin et al., 1992), 세포사멸(apoptosis) 조절(Wiechmann et al., 2017) 및 미토콘드리아 생체막의 permeabilization (Gosh et al., 2010)에 관여한다는 점을 고려할 때, HSP60은 mitochondrial matrix에서 유발되는 고수온 스트레스를 포함한 다양한 스트레스 인자에 대한 방어 기작에 역할을 담당하며, 그 역할이 전복 2배체 비해 3배체화 되면서 그 역할이 더욱 중요시 되었을 가능성을 추론 해볼 수 있다. 그러나 유도된 3배체 전복이 2배체 전복과 비교 시 차등의 mitochondrial dosage를 갖는지 여부(즉 세포 당 mitochondrial copy number의 차등 여부)는 밝혀진 바 없어 이에 대한 추후 연구가 뒤따라야 할 것이다(Anderson, 2010).

이상의 본 연구 결과에서, 유도된 3배체 전복은 아가미와 간체장에서 일반적으로 여러 HSP 유전자들에서 2배체에 비해 더 높은 기초 발현 수준을 가짐으로써 동일 고수온 자극에 노출될 경우 2배체에 비해 상대적으로 작은 폭의 HSP 유전자 발현의 변동을 겪는다. 하지만, 미토콘드리아 단백질의 분자 chaperone인 HSP60의 경우 2배체에 비교 시 기초발현 및 고수온에 의한 유도 발현 모두에서 3배체에서 훨씬 높은 유전자 발현 수준을 나타내며, 때문에 본 연구 결과는 3배체 전복이 2배체와 비교 시 고수온 반응에 대해서 차등의 형질을 나타낼 수 있는 잠재성을 시사하고 있다. 이에 본 연구 자료는 앞으로 여러 발달 단계에 속한 다양한 전복 그룹을 대상으로 양식장 생산 환경을 반영한 다양한 고수온 자극 실험들의 설계 및 배수체 특이적인 고수온 발현 기작에 대한 가설 추론에 유용한 기초 정보를 제공할 수 있다고 기대된다.

## 사 사

이 연구는 Golden Seed Project 사업 GSP수산종자사업단의 지원에 의해서 수행되었습니다.

## References

Anderson JD. 2010. Mitochondrial DNA dosage effects in trip-

- loid grass carp. *N Am J Aquacult* 72, 177-183. <https://doi.org/10.1577/A09-052.1>.
- Benfey TJ and Devlin RH. 2018. Ploidy has minimal effect on hypoxia tolerance at high temperature in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Physiol Biochem Zool* 91, 1091-1101. <https://doi.org/10.1086/700218>.
- Bowden AJ, Andrewartha SJ, Elliott NG, Frappell PB and Clark TD. 2018. Negligible differences in metabolism and thermal tolerance between diploid and triploid Atlantic salmon *Salmo salar*. *J Exp Biol* 221, jeb166975. <http://doi.org/10.1242/jeb.166975>.
- Brokordt KB, González RC, Farías WJ and Winkler FM. 2015. Potential response to selection of HSP70 as a component of innate immunity in the abalone *Haliotis rufescens*. *PLoS One* 10, e0141959. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0141959>.
- Chen N, Huang Z, Lu C, Shen Y, Luo X, Ke C and You W. 2019. Different transcriptomic responses to thermal stress in heat-tolerant and heat-sensitive Pacific abalones indicated by cardiac performance. *Front Physiol* 9, 1895. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01895>.
- Cheng P, Liu X, Zhang G and He J. 2007. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Fish Shellfish Immun* 22, 77e87. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.014>.
- Dheilly NM, Jouaux A, Boudry P, Favrel P and Lelong C. 2014. Transcriptomic profiling of gametogenesis in triploid pacific oysters *Crassostrea gigas*: Towards an understanding of partial sterility associated with triploidy. *PLoS One* 9, e112094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112094>.
- Dubey A, Prajapati KS, Swamy M and Pachauri V. 2015. Heat shock proteins: a therapeutic target worth to consider. *Vet World* 8, 46-51. <http://doi.org/10.14202/vet-world.2015.46-51>.
- Farcy E, Serpentine A, Fiévet B and Lebel J. 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comp Biochem Phys B* 146, 540-550. <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.12.006>.
- Ghosh JC, Siegelin MD, Dohi T and Altieri DC. 2010. Heat shock protein 60 regulation of the mitochondrial permeability transition pore in tumor cells. *Cancer Res* 70, 8988-8993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2225>.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F and Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>.
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B and Hightower LE. 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14, 105-111. <http://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7>.
- Kim EJ, Kim SJ, Park CJ and Nam YK. 2019. Characterization of testis-specific serine/threonine kinase 1-like (TSSK1-like) gene and expression patterns in diploid and triploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*; Gastropoda; Mollusca) males. *PLoS One* 14, e0226022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226022>.
- Koll H, Guiard B, Rassow J, Ostermann J, Horwich AL, Neupert W and Hartl F. 1992. Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell* 68, 1163-1175. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90086-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90086-R).
- Kregel KC. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92, 2177-2186. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.01267.2001>.
- Kyeong D, Kim J, Shin Y, Subramaniam S, Kang BC, Shin EH, Park EH, Noh ES, Kim YO, Park JY and Nam BH. 2020. expression of heat shock proteins in thermally challenged Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Genes* 11, 22. <http://doi.org/10.3390/genes11010022>.
- Lee SY and Nam YK. 2016. Evaluation of reference genes for RT-qPCR study in abalone *Haliotis discus hannai* during heavy metal overload stress. *Fish Aquatic Sci* 19, 21. <http://doi.org/10.1186/s41240-016-0022-z>.
- Lee SY, Park C and Nam YK. 2019. assessment of suitable reference genes for rt-qpcr normalization with developmental samples in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *J Anim Reprod Biotechnol* 34, 280-291. <https://doi.org/10.12750/JARB.34.4.280>.
- Martin J, Horwich AL and Hartl FU. 1992. Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science* 258, 995-998. <https://doi.org/10.1126/science.1359644>.
- Nam BH, Kwak W, Kim YO, Kim DG, Kong HJ, Kim WJ, Kang JH, Park JY, An CM, Moon JY, Park CJ, Yu JW, Yoon J, Seo M, Kim K, Kim DK, Lee S, Sung S, Lee C, Shin Y, Jung M, Kang BC, Shin GH, Ka S, Caetano-Anolles K, Cho S and Kim H. 2017. Genome sequence of pacific abalone *Haliotis discus hannai*: the first draft genome in family Haliotidae. *Gigascience* 6, gix014. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix014>.
- Park CJ and Kim SY. 2013. Abalone aquaculture in Korea. *J Shellfish Res* 32, 17-19. <https://doi.org/10.2983/035.032.0104>.
- Park CJ, Kwon MS, Kim EJ and Nam YK. 2018. Improvement of cold-shock treatment conditions for triploidy induction in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Korean J Malacol* 34, 191-200. <https://doi.org/10.9710/kjm.2018.34.4.191>.
- Piferrer F, Beaumont A, Falguiere JC, Flajshans M, Haffray P and Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance



- improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293, 125-156. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.036>.
- Samraus F, Remen M, Olsen RE, Hansen TJ, Waagbø R, Torgersen T, Lock EJ, Imsland A, Fraser TWK and Fjellidal PG. 2018. Changes in water temperature and oxygen: the effect of triploidy on performance and metabolism in large farmed Atlantic salmon. *Aquacult Env Interac* 10, 157-172. <https://doi.org/10.3354/aei00260>.
- Saranyan PV, Ross NW and Benfey TJ. 2017. Erythrocyte heat shock protein responses to chronic (*in vivo*) and acute (*in vitro*) temperature challenge in diploid and triploid salmonids. *Comp Biochem Physiol Part A* 206, 95-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.007>.
- Schmittgen TD and Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Shiel BP, Hall NE, Cooke IR, Robinson NA and Strugnell JM. 2014. De novo characterisation of the greenlip abalone transcriptome *Haliotis laevigata* with a focus on the heat shock protein 70 (HSP70) family. *Mar Biotechnol* 17, 23-32. <http://doi.org/10.1007/s10126-014-9591-y>.
- Shin EH, Park EH, Kim YO, Kim DG, Kong HJ, Kim WJ, Park JY and Nam BH. 2017. Molecular characterization and expression profiles of heat shock transcription factor HSF1 under heat stress in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Korean J Malacol* 33, 243-251. <https://doi.org/10.9710/kjm.2017.33.4.243>.
- Sun BG and Hu YH. 2016. A novel small heat shock protein of *Haliotis discus hannai*: characterization, structure modeling, and expression profiles under environmental stresses. *Cell Stress Chaperones* 21, 583-591. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0683-7>.
- Van de Pol ILE, Flik G and Verberk WCEP. 2020. Triploidy in zebrafish larvae: Effects on gene expression, cell size and cell number, growth, development and swimming performance. *PLoS One* 15, e0229468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229468>.
- Wan Q, Whang I and Lee J. 2012. Molecular and functional characterization of HdHSP20: A biomarker of environmental stresses in disk abalone *Haliotis discus*. *Fish Shellfish Immun* 33, 48e59. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.03.034>.
- Wang N, Whang I, Lee J and Lee J. 2011. Molecular characterization and expression analysis of a heat shock protein 90 gene from disk abalone *Haliotis discus*. *Mol Biol Rep* 38, 3055-3060. <http://doi.org/10.1007/s11033-010-9972-x>.
- Wiechmann K, Müller H, König S, Wielsch N, Svatoš A, Jauch J, Werz O. 2017. Mitochondrial chaperonin HSP60 is the apoptosis-related target for myrtocommulone. *Cell Chem Biol* 24, 614-623. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.04.008>.