

북방전복(*Haliotis discus hannai*)의 급성 고수온 스트레스에 관한 전사체 분석

조유신* · Zahid Parverz Sukhan** · Shaharior Hossen* · 조두현* · 고강희†
*전남대학교(학생) · **전남대학교(연구원) · †전남대학교(교수)

Transcriptome Analysis of Acute Thermal Stress in the Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*

Yu-sin CHO* · Zahid Parvez Sukhan** · Shaharior Hossen* · Doo-Hyun CHO* · Kang-Hee KHO†
*Chonnam National University(student) · **Chonnam National University(researcher) ·
†Chonnam National University(professor)

Abstract

In this study, a comparative gene expression based on acute thermal stress (34 °C) exposure in Pacific abalone was conducted using transcriptome analysis. The hemocyte tissue were collected at 3 h (HS group) and 8 h (HT group) to conduct transcriptome analysis. In RNA sequencing, 132,199,030 transcriptome short reads were generated, and the average length was 125.59 bp. Among the expressed 9,721 genes, 8,302 were identified as functional. In DEG selection, 195 up-regulated genes and 512 down-regulated genes were selected, wherein, 168 up-regulated and 456 down-regulated genes were identified in the functional description. Within up-regulated DEGs, 11.2% were involved with biological process, 15% with cellular component, and 52.5 % with molecular function while within down-regulated DEGs, it was 20.2%, 21.8%, and 22.6%, respectively. The expression values were compared by measuring the average read count of heat shock proteins in each of the two experimental groups. HSP90 was expressed in 64,594 in the HS group and 22,649 in the HT group, following HSP60, 420 in the HS group and 94 in the HT group, HSP20, 87 in the HS group and 27 in the HT group. These results suggest that acute thermal stress alters the body mechanism of Pacific abalone.

Key words : Transcriptome analysis, Acute thermal stress, *Haliotis discus hannai*

I. 서론

북방전복(*Haliotis discus hannai*)은 원시복족목 (Order Archaeogastropoda) 전복과(Family Haliotidae)에 속하는 연체동물로 한국, 일본, 중국 연안에 분포하는 한류계 전복이다. 참전복으로 불리기도 하는 북방전복은 동아시아 국가에서 상업적으로

소비가 되며, 활발하게 양식산업이 이루어지고 있다 (Sukhan et al., 2022). 북방전복은 산업적으로 중요한 고부가가치 양식생물 중으로 지속적으로 생산량이 증가하고 있는 추세이며, 2021 기준 23,074톤 양식되었고 생산금액은 6,937억 원이었다(KOSIS, 2021). 북방전복의 최적 수온은 약 20 °C로 이 수온을 벗어나면 면역력 감소 및 질병

† Corresponding author : 061-659-7168, kkh@jnu.ac.kr

* 이 논문은 2023년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(20180375, 정자동결보존법을 활용한 전복 양식생산기술개발)

취약성이 증가되어 폐사율이 높아지는 것으로 보고되어있다(Yu et al., 2021). 전복과 같은 복족류는 이동이 제한적이므로 급격한 환경변화에 노출될 경우 어류보다 심각한 영향을 받는다. 수온 상승은 호흡과 대사를 억제하여 생체 내 에너지 불균형을 유발시키며, 수온 변화는 성장률 감소 및 폐사율 증가를 초래한다(Hoegh and Bruno, 2010; Zhang et al., 2022). 최근 기후변화에 따른 해양의 지속적인 수온 상승은 성장과 생존에 많은 영향을 미치고 있으며, 양식산업에 막대한 손실을 초래하는 환경요인 중 하나이다. 생산량의 현저한 증가에도 불구하고 최근 전복양식은 고수온에 따른 환경변화로 인해 전복의 집단 폐사와 같은 중요한 문제에 직면해 있어 이에 대한 대책 마련이 고수온에 대비하기 위해 내열성 유전자의 발현 기작을 연구하는 것이 중요하게 되었다.

차세대 염기서열 분석기(Next Generation Sequencer, NGS)를 통한 유전체 서열연구가 활발히 진행되어 기능 유전체학(functional genomics)을 통한 발현유전자 연구에 중요한 유전자원이 되고 있다(Werner, 2010). 일반적으로 전사체 분석 기술은 특정 스트레스 반응에 관여하는 전사체의 식별을 용이하게 하고 전사체의 풍부도를 기반으로 유전자 발현을 정량화 하는데 사용된다(Mortazavi et al., 2008). 북방전복에서 스트레스 관련 연구는 열 내성 관련 genome-wide association study (GWAS) 연구, 삼배체 전복 치패의 고수온 및 저산소 노출에 따른 전사체 분석, 수온 스트레스 노출에 따른 북방전복의 전사체 분석에 대한 연구가 진행되었다(Chen et al., 2019; Kim et al., 2021; Kyeong et al., 2020; Shin et al., 2021; Yu et al., 2021). 하지만 고수온 스트레스에 노출 시간에 따른 북방전복의 유전자 반응 비교 분석과 관련된 정보는 제한적인 실정이다.

따라서 본 연구에서는 NGS 방식으로 RNA sequencing을 진행하여 대량의 전사체를 분석하여 고수온 노출 시간에 따른 북방전복의 전사체 추정 및 관련 유전자 그룹의 발현 패턴을 확인하고

전복의 생리적 메커니즘 변화를 이해하여 고수온에 노출된 전복의 생리학적 지표설정의 기초자료로 활용하기 위하여 진행하였다.

II. 연구 방법

1. 시료 채집 및 고온 스트레스 처리

본 연구에서는 급성 고수온 스트레스에 의한 시간 별 유전자 발현을 비교하기 위하여 2년산으로 각장 9.8±1.2, 중량 98±5.6 북방전복 (*Haliotis discus hannai*)을 실험에 사용하였다. 북방전복은 실험에 사용하기 전 콘크리트 수조 20±0.5℃에서 1주간 순응 기간을 거친 후 바닥에 네트가 설치된 실험수조(145*90*70cm)에 옮겨 전복이 수조벽과 전복집에 부착한 것을 확인한 뒤 실험을 진행하였다. 열 스트레스를 처리하기 위해서 선행연구 방법에 따라 1시간에 1℃씩 수온을 상승시켰으며(Kyeong et al., 2019), 34℃를 유지하면서 후발이 탈락하는 시간을 기준으로 하여 실험구당 각각 3개체씩 선별하였다. 실험구는 노출 시간에 따라 각각 3시간, 8시간으로 구분하였으며 Heat sensitive (HS) 그리고 Heat tolerant (HT) 그룹으로 지정하였다. 전복에서 혈액을 주사기를 이용하여 샘플링 하였으며, 혈액 채취 후 원심분리기를 이용하여 4℃에서 14000 rpm으로 20분간 원심분리시킨 다음 가라앉은 혈구를 채취하였다. 샘플은 액체질소에 침지 시켜 급속 동결 시킨 후 -80℃에 total RNA 추출 전까지 보관하였다.

2. RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA 추출을 위하여 34℃에서 스트레스를 처리한 두 가지 처리구의 혈구 샘플을 사용하였다. total RNA는 ISOSPIN & Tissue RNA (Nippon Gene, Tokyo, Japan)를 사용하여 제조사에서 제공된 방법에 따라 수행하였다. 10 mg 조직에 200 µL PT Extraction Buffer를 첨가하여 Biomasher (Optima, Tokyo, Japan)와 Homogenizer를 이용하여

곱게 갈아준 후, 400 μ L PT Extraction Buffer을 넣고 30초간 vortexing 하였고, 4°C에서 13,000 xg으로 10분간 centrifugation 하였다. 분리된 층에서 상층액을 약 550 μ L을 1.5 mL tube에 옮긴 후 동량의 PT Binding Buffer를 첨가하고 inverting 하고 가볍게 spin down 하였다. Mixture을 Spin Column tube에 옮겨 담아 4°C에서 13,000 xg으로 1분간 centrifugation을 2반복하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 column에 400 μ L PT Wash 1 Buffer을 넣고 4°C에서 13,000 xg으로 1분간 centrifugation 하였다. 잔존해 있는 DNA를 제거하기 위하여 DNase I solution을 넣고 15분간 incubation 시킨 다음 300 μ L PT Wash 1 Buffer를 넣고 4°C에서 13,000 xg으로 1분간 centrifugation 하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 600 μ L PT Wash 2 Buffer를 넣고 4°C에서 13,000 xg으로 2분간 centrifugation 하였다. 그 후 column을 1.5 mL tube에 바꿔 끼운 후 50 μ L ddWater (RNase free water)을 넣고 3분간 실온에 incubation 시킨 다음 4°C에서 13,000 xg으로 1분간 centrifugation 하여 RNA를 확보하였다. 추출된 total RNA의 quality와 quantity의 측정을 위하여 Quant-IT RiboGreen (Invitrogen, #R11490, California, USA)을 사용하였고 tRNA의 무결성을 평가하기 위하여 TapeStation RNA screentape (Agilent, Waldbronn, Germany)를 실행하였다. RNI이 7.0 이상인 RNA만을 RNA 구성에 사용하였으며, Illumina TruSeq mRNA Sample Prep kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)을 각 샘플당 1 μ g의 tRNA 라이브러리를 준비하였다. 이후 poly-T oligo-attached magnetic beads를 사용하여 poly-A가 포함된 mRNA 분자를 정제한 후, 정제된 mRNA를 고온에서 2가 양이온을 사용하여 작은 조각으로 절단하였다. 절단된 RNA fragments는 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) 및 random primers를 사용하여 단일 가닥 cDNA로 복사한 후, DNA Polymerase I와 RNase H를 사용하여 이중 가닥 cDNA로 합성시켰다. cDNA

fragments는 end repair process를 진행하였으며, single 'A' base 추가 및 indexing adapters 연결을 실시하였다. 얻어진 산물은 정제 및 PCR 강화 과정을 거쳐 최종 cDNA 라이브러리를 생성하였다. 라이브러리는 qPCR Quantification Protocol Guide (KAPA Library Quantification kits for Illumina Sequencing platforms)에 따라 qPCR를 진행하여 정량화하였으며, TapeStation D1000 ScreenTape (Agilent)를 사용하여 검증하였다. 마지막으로 HiSeqX platform (Illumina)을 사용하여 Indexed libraries를 sequencing하였으며 paired-end sequencing을 수행하였다.

3. RNA-seq Library 구축 및 Illumina Sequencing 분석

RNA-Sequencing 분석은 Illumina HiSeq X을 이용하여 진행되었으며, sequencing 되어진 transcriptome short reads는 cutadapt (v1.18)를 사용하여 adaptor 서열을 제거하였다. 이후 SolexaQA package의 DynamicTrim (v1.13)을 이용하여 short read의 양쪽 끝의 bad quality의 base를 잘라내어 주고 LengthSort (v1.13)를 이용하여 25bp 이하의 read를 제거하여 전처리를 수행하였다. 전 처리 과정을 통과한 clean reads는 모든 샘플에서 평균 길이가 118.58bp로 생성되었다. 발현 값을 측정하기 위해서 전처리 과정을 통과한 clean reads를 HISAT2software를 사용하여 reference genomes (*Haliotis discus hannai*)를 이용하여 mapping 하였으며, 참조 genome은 Genome sequence of pacific abalone (*Haliotis discus hannai*): the first draft genome in family Haliotidae (doi: 10.1093/gigascience/gix014)에서 확보하였다. HTSeq (v.2.1.0)를 사용하여 각 유전자에 mapping된 read의 총수로 발현 값을 측정하였다. R의 DESeq library를 사용하여 normalization을 수행하여 차별적으로 발현된 유전자 발현 값을 분석하였다. 또한 유전자의 기능을 분석하기 위하여 NCBI NR Mollusca DB amino acid sequence와 BLASTP를 통해

annotation (filter 기준: e-value ≤ 1e-10, Best hits) 을 수행하였다.

category인 BP (Biological Process), CC (Cellular Component), MF (Molecular Function)로 분류하였다.

4. Differential expression genes (DEGs) 선발 및 Functional annotation

각 유전자에 mapping 된 발현 값이 상호 간에 비교되는 샘플에서 2배 이상 발현의 차이를 확인 하는 2 fold change 방법을 사용하여 차별적으로 발현된 유전자 (DEGs; Differentially Expressed Genes)를 선발하였다. 탐색한 DEG 후보군은 R의 amap과 gplot library를 이용하여 발현 패턴에 따라 군집화(Clustering)하여 그래프로 나타내었다. 이항식 테스트와 분석에서 p-value의 임계값 식별을 위해 FDR (false discovery rate)을 적용하여 선발된 DEGs를 통해 계산하였다. 모든 상관분석, hierarchical clusterin은 AMAP library 및 gplots을 사용하여 수행되었다. 각 DEG 목록에 대하여 유전자 기능의 주석 분석을 위해 reference에서 제공하는 GO 정보를 이용하였으며, in house scripts를 통해 Gene Ontology (GO) 분석을 수행하였다. 데이터의 분석은 KEGG DB의 amino acid sequence와 BLASTP를 통해 annotation (filter 기준: e-Value ≤ 1e-10, best hits)을 수행하였으며, significance level을 0.05로 지정하여 functional

Ⅲ. 연구 결과

1. RNA-sequencing 결과

고수온에 노출된 전복의 전사 변이를 비교하기 위해 고수온에 노출시킨 전복의 발 탈락여부로 두 가지 그룹 (Heat sensitive 그리고 Heat tolerant)으로 구분하였으며 혈구조직을 사용하여 RNA-sequencing 분석을 수행하였다. 각 처리구의 분석은 3 반복으로 진행되었으며, 결과를 <Table 1>에 나타내었다. RNA-seq 결과 132,199,030 transcriptome short reads (16,586,225,560 bp)가 생성되었으며, 평균 길이는 125.59 bp로 나타났다. Raw read에서 adaptor 서열 및 quality가 낮은 서열을 제거하는 trimming 과정을 통하여 clean reads를 생성하였다. Trimmed reads/total length of raw reads는 78.94 %로 나타났다. 결과적으로 reference genome 서열에 trimmed read를 mapping하여 발현값을 계산하였으며, 평균적인 mapping rate는 약 88. 9%로 나타났다(<Table 2>). Mapping은 HISAT 소프트웨어를 사용하여 진행하였다.

<Table 1> Raw and trimmed data exposed to acute thermal stress (34 °C) at 3 and 8 hours

Sample name ¹	Number of reads	Total length (bp)	Average length (bp)	Trimmed/Raw (%) ²
3h_Hm_1	11,569,150	1,439,871,696	124.46	77.62
	11,569,150	1,380,157,586	119.30	74.40
3h_Hm_2	13,172,411	1,659,611,858	125.99	78.49
	13,172,411	1,581,085,679	120.03	74.78
3h_Hm_3	9,412,676	1,176,70,975	125.01	77.55
	9,412,676	1,152,504,248	122.44	75.96
8h_Hm_1	11,309,093	1,502,220,882	132.83	85.05
	11,309,093	1,448,246,669	128.06	82.00
8h_Hm_2	9,908,947	1,313,951,709	132.60	84.82
	9,908,947	1,268,528,389	128.02	81.89
8h_Hm_3	10,727,238	1,395,055,800	130.05	81.07
	10,727,238	1,268,281,069	11.23	73.70
	132,199,030	16,596,225,560	125.59	78.94

<Table 2> Statistics of reads mapping to reference genome of *Haliotis discus hanna*

Sample ID	Total reads	Aligned 0 times		Aligned exactly 1 times		Aligned ≥ 1 times		Aligned(discordantly or Mappingrate single)			
		Reads(ea)	Percent(%)	Reads(ea)	Percent(%)	Reads(ea)	Percent(%)	Reads(ea)	Percent(%)	Reads(ea)	Percent(%)
HS_Hm_1	11,569,150	1,300,242	11.24	7,431,351	64.23	943,698	8.16	1,893,858	16.37	10,268,908	88.76
HS_Hm_2	13,172,411	1,482,941	11.26	8,593,467	65.24	1,048,157	7.96	2,047,845	15.55	11,698,470	88.74
HS_Hm_3	9,412,676	1,295,140	13.76	5,973,139	63.46	612,527	6.51	1,531,869	16.27	8,117,536	86.24
HS_Hm_4	11,309,093	943,843	8.35	7,985,445	70.61	1,046,298	9.25	1,333,507	11.79	10,365,250	91.65
HS_Hm_5	9,908,947	1,198,503	12.10	6,831,620	68.94	711,603	7.18	1,167,220	11.78	8,710,444	87.90
HS_Hm_6	10,727,238	1,059,160	9.87	7,153,848	66.69	1,060,854	9.89	1,453,375	13.55	9,668,078	90.13
	66,099,515	7,279,829	11.10	7,328,145	66.53	5,423,137	8.16	9,427,674	14.22	58,819,686	88.90

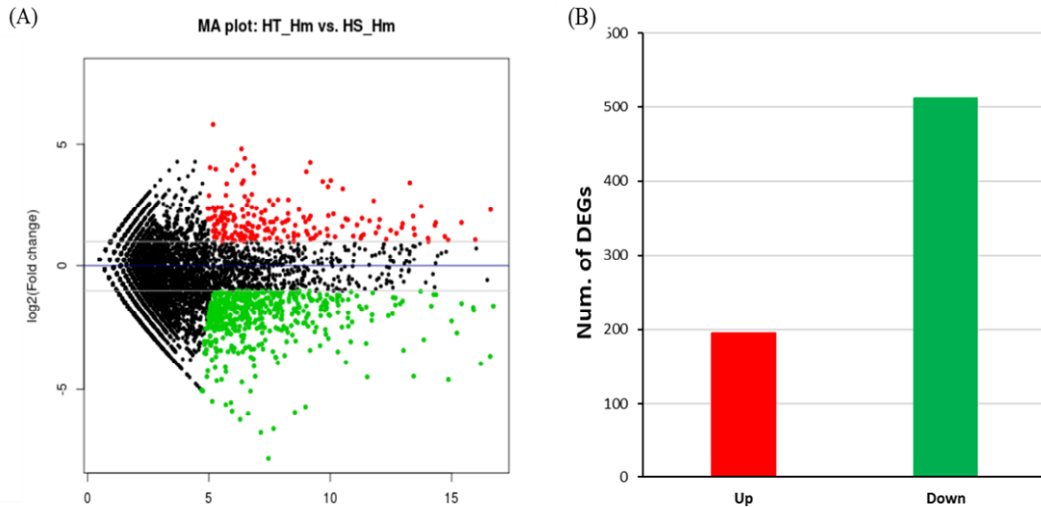
2. Differential expression genes (DEG) 선발

DEG 선발은 \log_2FC (fold change) > 1 and padj (adjusted p-value) < 0.05를 사용하여 수행하였으며, \log_2FC 값이 1보다 크면 상향 조절로, \log_2FC 값이 - 1 이하이면 하향 조절로 각각 구분하였다. 각 그룹 간 비교하여 선발된 DEG의 수는 [Fig. 1]에 나타냈으며, 상향 조절 유전자 195개, 하향 조절 유전자 512개가 선발되었다. 그 중 functional

description을 가진 유전자는 상향 조절에서 168개, 하향 조절에서 456개가 각각 확인되었다 (<Table 3>).

<Table 3> Total number of annotated DEGs

Sample name	Regulation pattern	Total genes	Functional description
8h_Hm vs	Up	195	168
3h_Hm	Down	512	456



[Fig. 1] (A) MA-plot to show genes in Pacific abalone (3 h vs. 8 h treatment). Horizontal lines highlight ± 2 log fold changes, and red plots represent up-regulated genes in the heat treated group; green plots represent down-regulated genes in the heat treated group (B) The number of significantly expressed up-regulated and down-regulated genes.

3. Functional annotation

DEG의 기능을 이해하기 위하여 GO(Gene Ontology) term enrichment 분석을 수행하였다. GO term은 Biological Process (BP), Cellular Component (CC), 그리고 Molecular Function (MF), 세 가지 독립적인 범주로 표시하였다. GO 분석 결과 상향 조절에 관여하는 DEG는 Biological Process (BP) 401개 유전자, Cellular Component (CC) 619개 유전자, Molecular Function (MF) 40개 유전자가 관여하는 것으로 나타났으며, 하향조절에 관여하는 DEG는 Biological Process (BP) 332개 유전자, Cellular Component (CC) 943개 유전자, Molecular Function (MF) 391개 유전자가 관여하는 것으로 나타났다([Fig. 2]). 그룹을 비교하여 상향/하향 조절 유전자의 항목을 백분율로 나타냈으며, 상향 조절에 관여하는 DEG는 Biological Process (BP)에서 cellular nitrogen compound metabolic process가 11.2%, Cellular Component

(CC)에서 intracellular anatomical structure가 15%, Molecular Function (MF)에서 structural molecule activity 52.5%를 차지하였으며, 하향조절에 관여하는 DEG는 Biological Process (BP)에서 regulation of cellular metabolic process가 20.2%, Cellular Component (CC)에서 intracellular anatomical structure가 21.8%, Molecular Function (MF)에서 protein binding이 22.6%를 차지하였다.

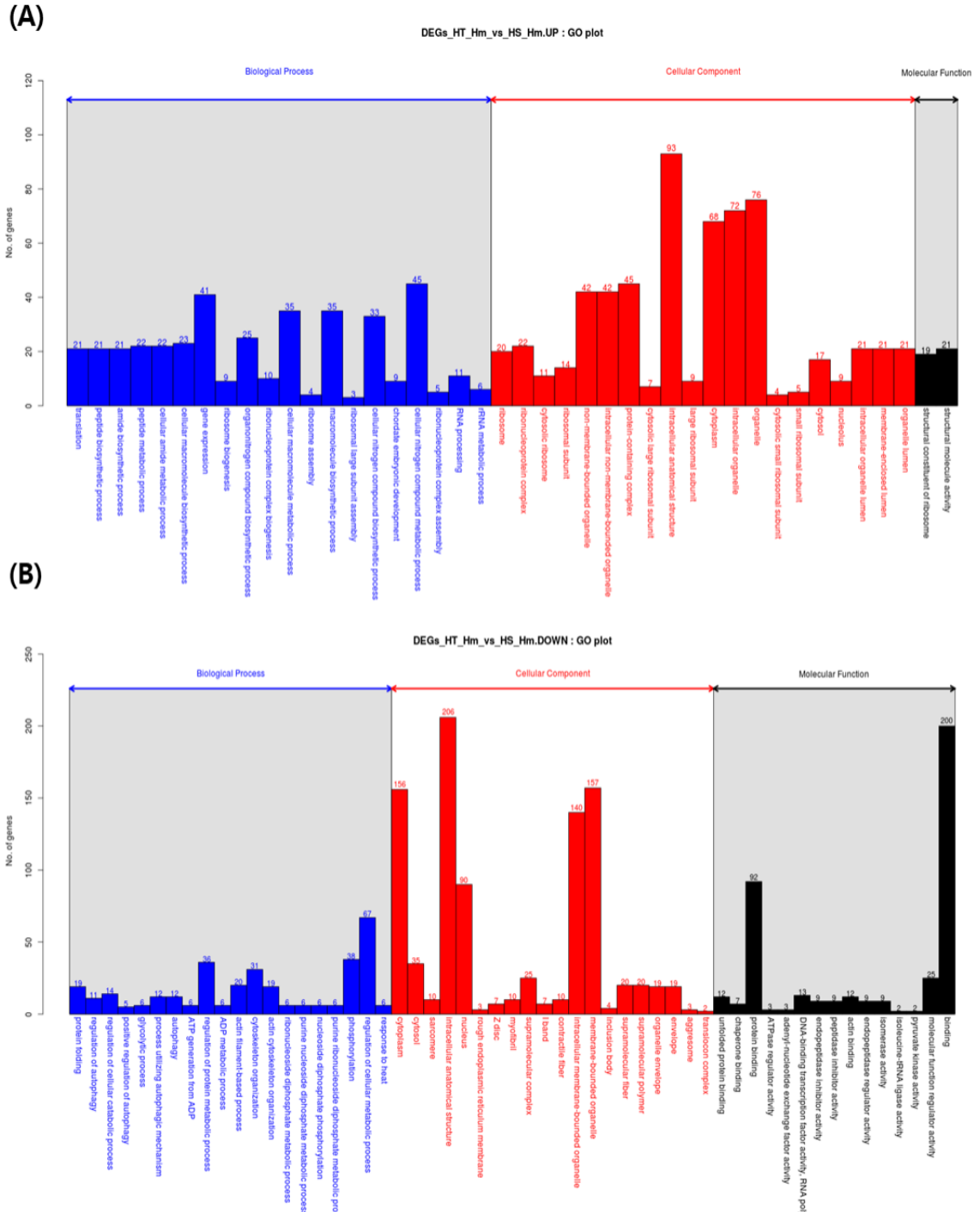
4. 유전자의 그룹간 발현 비교

두 가지 실험구에서 각각 평균 read count를 측정하여 HT그룹을 기준으로 하여 유전자의 차등 발현 값을 비교했을 때 상향조절 유전자의 경우 transcriptional regulator ATRX-like가 log2FC 값 5.78로 가장 높게 나타났으며, 하향 조절의 경우 PREDICTED: uncharacterized protein LOC109617406가 -7.83으로 가장 높게 나타났다(<Table 4>).

<Table 4> Gene expression value of genes in heat sensitive and heat tolerant groups

	Gene name	Heat sensitive	Heat tolerant	Log2FC value
up regulate	transcriptional regulator ATRX-like	6	157	4.81
	Ariadne-like RING finger protein	8	171	4.39
	CCAAT/enhancer-binding protein zeta-like isoform X1	8	134	4.12
	Ariadne-like RING finger protein R811	13	215	4.07
	sodium-dependent glucose transporter 1-like, partial	4	62	4.02
	protein sprouty homolog 2-like	67	965	3.85
	Mx	16	217	3.80
	myb-like protein I	170	1,908	3.49
	tubulin alpha-1 chain-like isoform X1	14	158	3.49
	hypothetical protein EGW08_023835	138	1,511	3.45
down regulate	uncharacterized protein LOC109617406	349	2	-7.83
	zinc finger protein 862-like isoform X3	403	4	-6.61
	matrix metalloproteinase	154	2	-6.24
	leucine-rich repeat-containing protein 74B-like	732	12	-5.93
	alpha-crystallin A chain-like	990	19	-5.71
	protein lifeguard 3-like	101	2	-5.62
	helix-loop-helix protein delilah	118	3	-5.54
	cell division cycle protein 23 homolog	203	6	-5.08
	arylacetamide deacetylase-like	52	2	-5.07
	uncharacterized protein LOC110445733	51	2	-5.05

북방전복 (*Haliotis discus hanna*)의 급성 고수온 스트레스에 관한 전사체 분석



[Fig. 2] Significantly ($p > 0.05$) differentially expressed genes in heat treatment were grouped in different sub-categories (A) up-regulated; (B) down-regulated

열 충격 단백질 발현 값을 비교하였을 때 HSP90의 경우 HS 그룹에서 64,594, HT 그룹에서 22,649 발현되었으며 log2FC 값은 - 1.51, HSP60의 경우 HS 그룹에서 420, HT 그룹에서 94로 log2FC 값이 - 2.16 발현되었다. 그리고 sHSP26의 경우 발현 값이 HS 그룹에서 92,906, HT 그룹에서 29,105으로 log2FC 값이 - 1.67로 나타났다 (<Table 5>).

<Table 5> Gene expression value of heat shock protein genes in heat sensitive and heat tolerant groups

Gene name	Heat sensitive	Heat tolerant	Log2FC value
HSP90	64,594	22,649	1.51
HSP60	420	94	- 2.16
sHSP26	92,906	29,105	1.67

IV. 결론

수온은 수중 생물, 특히 패류의 서식 환경에 영향을 미치는 중요한 환경 인자로 알려져 있다 (Khan et al., 2020; Nie et al., 2020; Xu et al., 2020; Zhang et al., 2022). 고수온은 여름철 전복 폐사의 주 원인 중 하나로 전복 양식의 가장 큰 문제점으로 손꼽히며 관련 연구가 활발히 수행되고 있다. 선행연구에서 수온별 33℃에 노출시켰을 때 전복의 발 탈락률이 급증한다는 연구 결과를 확인하였다(Yu et al., 2021). 본 연구에서는 스트레스 조건을 34℃를 선택하여 NGS를 이용한 고수온 노출 시간에 따른 북방전복의 전사체 분석을 실시하였다. 전복의 부착능력은 온도에 영향을 받는 것으로 보고되어 있다(Park et al., 2015). 전복의 부착능력은 중요한 요건이며 기질에 부착하여 있는 부착지속시간은 전복의 저산소 내성 연구에서 생존기간과 높은 상관관계를 보여 유용한 지표가 되는 것으로 밝혀졌다(Chen et al., 2020). 본 연구에서는 34℃에 전복을 노출시켰을 때 3시간 이후부터 발 탈락률이 증가하였으며,

이 그룹을 Heat sensitive 그룹, 8시간 노출 경과 후 발이 탈락한 그룹을 Heat Tolerant 그룹으로 구분 지었다. 이는 33℃에 노출 시킨 전복의 발 탈락률 연구와 유사한 결과를 보였다(Yu et al., 2021). 살아있는 샘플을 이용한 sequencing 조건을 충족시켜 고품질의 DNA를 얻기 위해 생존 시간이 아닌 부착 시간을 기준으로 사용하였다. 34℃에 노출된 전복의 발 탈락 시간대에 따라 각 두 그룹을 구분하여 샘플링을 진행하였다. 전사체 분석 결과 그룹 사이에 차등 발현을 가진 유전자는 상향 조절 유전자 195개, 그리고 하향 조절 유전자 512개가 확인되었으며, 그중 기능을 가진 유전자는 상향 조절 168개, 그리고 하향 조절에서 456개가 확인되었다. GO 분석 결과, 두 그룹 사이에서 상향 조절 유전자는 Biological Process (BP)에서 cellular nitrogen compound metabolic process가 11.2 %로 우위를 차지했으며, 이는 세포 내 다양한 유기 및 무기 질소 화합물과 관련된 화학 반응 및 경로에 관여하는 것으로 알려져 있다. cellular component에서 intracellular anatomical structure 관련 유전자가 93개로 가장 우위를 차지하고 있었으며, Molecular function 카테고리에서는 structural molecule activity가 52.5 %, 그리고 structural constituent of ribosome이 47.5 %로 나타났다. 하향 조절 유전자는 Biological Process (BP)에서 regulation of cellular metabolic process가 20.2%로 우위를 차지하였으며 이는 세포의 화학반응 및 경로의 빈도, 속도, 또는 범위의 조절 기능을 하는 것으로 알려져 있다. cellular component에서 상향 조절과 마찬가지로 intracellular anatomical structure 관련 유전자가 206개 (21.8 %)로 가장 우위를 차지하고 있었으며 이는 세포 내 핵과 세포질에 관여하는 것으로 알려져 있다. Molecular function 카테고리에서는 binding이 200개 (49.1 %)로 가장 우위를 차지하고 있었으며, 그다음으로 protein binding이 92 (22.6 %)개로 나타났고 이는 다른 분자와 상호작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 북방전복의

이배체와 삼배체 전복을 수온 스트레스에 노출 후 전사체 분석을 실시한 결과에서 Molecular function 카테고리에서 binding이 상위를 차지하는 것으로 나타나 본 연구 결과와 비슷한 패턴이 보고되었다 (Kim et al., 2021). 북방전복 육종전복에서는 protein folding과 protein refolding이 상위를 차지하는 것으로 나타났다 (Shin et al., 2021). 열 충격 단백질 유전자 그룹의 경우 HS 그룹에서 보다 HT 그룹에서 유전자의 발현 값이 하향 조절 된 것으로 나타나 유의미한 차이를 보였다. 선행 연구에서 북방전복이 다른 낮은 온도에서보다 30 °C에 노출되었을 때 발현이 높게 나타났으며, HSPs 발현이 높게 나타났으며, 특히 북방전복에서 sHSP26의 경우 30 °C에 노출 후 시간이 경과함에 따라 혈구 조직의 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (Shin et al., 2021). 또한 진주조개에서 HSP90 유전자의 발현이 29 °C에 노출 후 12시간 경과 후 최저 값을 보였다 (Zhang et al., 2022). 이 연구 결과는 인위적인 고수온 스트레스 노출 시간에 따른 유전자 발현 연구의 기초자료를 제공함으로써 북방 전복의 열내성 관련 분자 메커니즘에 대한 이해를 촉진할 것이다. 향후 고수온 노출 시간대별 관련 특이적인 발현 양상을 보인 유전자의 mRNA 발현 및 추가적인 기능을 분석하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

Barria A, MarinNahuelpi R, Caceres P, Lopez ME, Bassini LN, Lhorente JP and Yanez JM(2019). Single-step genome-wide association study for resistance to *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *G3 (Bethesda)* 9, 3833~3841.
<https://doi.org/10.1534/g3.119.400204>

Kim CH, Kim EJ, Seo CH, Park CJ, and Nam WK (2021). Transcriptome expression profiles between diploid and triploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) juveniles in response to acute heat-stress and hypoxia treatments. *Marine Genomics* 57,

100820.
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100820>

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>

Chen N, Shen Y, Yu F, Luo X, You W and Ke C(2020). A new indicator of hypoxia tolerance in abalone, developed based on heart rate fluctuations. *Aquaculture* 519. 734903.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734903>

Doan QK, Vandeputte M, Chatain B, Haffra P, Vergnet A, Breuil G and Allal F(2017). Genetic variation of resistance to viral nervous necrosis and genetic correlations with production traits in wild populations of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 478, 1~8.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.011>

Shin EH, Park EH, Noh ES, Kim YO and Nam BH(2021). Comparative transcriptome analysis of the response of Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) after adaptive or acute heat stress condition. *Korean J. Malacol* 37(2): 61~68.

Yu F, Peng WZ, Tang B, Zhang YF, Wang Y, Gan Y, Luo X, You WW, Gwo JC, Chen N and Ke CH(2021). A genome-wide association study of heat tolerance in Pacific abalone based on genome resequencing. *Aquaculture* 536, 736436.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736436>

Hoegh-Guldberg O and Bruno JF(2010). The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science* 328, 1523~1528.
<https://doi.org/10.1126/science.1189930>

Zhang H, Jia HX, Xiong PP, Yao GY and He MX(2022). Transcriptome and enzyme activity analyses of tolerance mechanisms in pearl oyster (*Pinctada fucata*) under high-temperature stress. *Aquaculture* 550, 737888.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737888>

Khan FU, Hu MH, Kong H, Shang YY, Wang T, Wang XH and Wang YJ(2020). Ocean acidification, hypoxia and warming impair digestive parameters of marine mussels. *Chemosphere* 256, 127096.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127096>
Statistics Korea(2021). Fishery production survey. Korean Statistical Information Service (KOSIS).
- Kyeong D, Kim J, Shin Y, Subramaniyam 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.
<https://doi.org/10.3390/genes11010022>
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L and Wold B(2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature Methods 5, 621~628
- Nie H, Jiang K, Li N, Li D and Yan X(2020). Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* under aerial exposure and reimmersion reveals genes involved in stress response and recovery capacity of the Manila clam. Aquaculture 524, 735271.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735271>
- Park K, Lee JS, Kang JC, Kim JW and Kwak IS(2015). Cascading effects from survival to physiological activities, and gene expression of heat shock protein 90 on the abalone *Haliotis discus hannai* responding to continuous thermal stress. Fish Shellfish Immunol 42, 233~240.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.036>
- Sukhan ZP, Hossen S, Cho YS, Lee WK and Kho KH(2022). Hdh-Tektin- 4 Regulates Motility of Fresh and Cryopreserved Sperm in Pacific Abalone, *Haliotis Discus Hannai*. Front. Cell Dev. Biol 10, 870743
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.870743>
- Werner T. 2010. Next generation sequencing in functional genomics. Brief Bioinform 11: 499~511.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbq018>
- Xu CX, Li Q and Chong JD(2020). Combined effect of temperature, salinity, and rearing density on the larval growth of the black shell strain and wild population of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquac. Int 28, 335~347.
<https://doi.org/10.1007/s10499-019-00465-4>
-
- Received : 07 July, 2023
 - Revised : 11 August, 2023
 - Accepted : 17 August, 2023