Check for updates

JFMSE, 35(1), pp. 10~21, 2023.
수산해양교육연구, 제35권 제1호, 통권121호, 2023.
www.ksfme.or.kr
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2023.2.35.1.10

수온 스트레스에 의한 명태의 Heat Shock Factor 1의 분자생물학적 특성과 Heat Shock Protein 70의 단백질 발현 패턴

이창주 · 최보희 · 박장수†
부산대학교(학생) · †부산대학교(교수)

Molecular Characterization of Heat Shock Factor 1 and Protein Expression Patterns of Heat Shock Protein 70 Under Thermal Stress in Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus*)

Chang-Joo LEE · Bo-Hee CHOI · Jang-Su PARK†
Pusan National University(student) · †Pusan National University(professor)

Abstract

This study evaluated the levels of mRNA expression of HSF1 and HSP70 expression patterns in walleye pollock, *Gasus chalcogrammus* according to water temperature. Walleye pollack HSF1, which has not been reported, was used as a Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR strategy. The HSF1 amino acid sequence of walleye pollack showed 93% identification with the Atlantic cod. On the other hand, it showed relatively low identification with 50% in zebrafish. However, in the phylogenetic analysis, fish HSF1 formed a single clade group. The relative mRNA expression of HSF1 in the liver, intestine, gill, kidney, and heart of juveniles and immatures was investigated. The tissues in juvenile and immature, HSF1 mRNA expression was the highest at 14℃, and HSF1 mRNA levels increased significantly from 11℃ compared to 5 and 8℃. The mRNA levels of HSF1 were particularly high in the gill both juveniles and immatures. The expression of HSP70 was also evident in 11℃ and 14℃. These results indicate that water temperature of 11°C or higher is exposed to stressed-condition in walleye pollock. Therefore, HSF1 and HSP70 can be considered as important indicator for water temperature stress in walleye pollock.

Key words : *Gasus chalcogrammus*, HSF1, Stress, Walleye pollock, Water temperature

Ⅰ. 서 론

수온은 어류 있어서 가장 중요한 환경 요인이며, 대사 조절, 행동 반응 조절 등을 통해 에너지 항상성을 유지하며 수온 스트레스에 적응한다(Neubauer and Andersen, 2019). 스트레스에 대한 유기체의 첫 번째 반응은 세포 단계에서 스트레스 단백질의 일반적인 증가이다. 수온 스트레스 및 산화 스트레스 또는 독성 물질과 같은 기타 손상에 노출이 되면 유기체는 heat shock proteins (HSPs)으로 알려진 단백질들을 합성한다(Wang et al., 2007). HSPs는 다양한 환경 스트레스 요인과 병리·생리학적 또는 성장 관련 신호에 반응하여 합성된다(Ribeiro et al., 1994; Polla and Cossarizza,

† Corresponding author : 051-510-2294, jaspark@pusan.ac.kr
※ 이 연구는 부산대학교 기본연구 지원사업 2년 과제로 수행되었습니다.

1996; Sapozhnikov et al., 1999). HSPs는 일반적으로 분자 chaperone으로 작용하여 스트레스에 노출된 세포에서 mis-folding 된 단백질의 re-folding을 위해 발현된다(Tomanek, 2010). HSPs 유전자의 전사 활성화는 다양한 heat shock factors (HSFs)에 의해 조절되며, HSFs가 heat shock elements (HSEs)에 결합하여 heat shock gene의 전사를 매개한다. HSFs는 발견된 순서대로 HSF1, HSF2, HSF3 및 HSF4로 명명되었으며, HSF1과 HSF2는 스트레스나 생리적 조건에서 협력하여 스트레스 반응을 조절한다(Mathew et al., 2001; He et al., 2003; Wang et al., 2003). HSF1은 정상상태에서는 monomer로 존재하지만 스트레스 환경에 노출이 되면 trimer를 형성하여 heat shock 반응에 참여한다(Kim et al., 2015). Helix-turn-helix motif와 확장된 hydrophobic heptad repeat, HR-A/B와 HR-C로 구성되어 보존되는 domain 구조를 특성으로 가진다(Tateishi et al., 2009). Helix-turn-helix DNA binding domain (DBD)은 head-to-head (nGAAnnTTCn) 및 tail-to-tail (nTTCnnGAAn)이 반복적으로 나타나는 HSEs에 결합하며(Perisic et al., 1989), HR-A/B domain은 분자 간 소수성, 비공유 상호작용에 따라 coil 형성을 통해 trimerization을 촉진한다(Lu et al., 2009; Sarge et al., 1993). 수생생물의 HSF1은 수온 스트레스, 산화제, 중금속 및 화학오염물질과 같은 다양한 유도 물질에 쉽게 노출이 되기 때문에 특히 중요하다. 외부 자극에 의한 HSF1 활성의 유도는 잘 알려져 있지만 냉수성 어류에 대한 연구는 부족한 실정이다.

냉수성 어류인 명태(*Gadus chalcogrammus*)는 한국의 동해안 연안과 오호츠크해, 베링해 및 북아메리카 연안에 이르기까지 널리 분포하고 있다(Hiatt et al., 2010). 한국과 일본에서는 상업적으로 경제성이 있음에도 불구하고 국내에서는 2000년 이후로는 통계적으로 어획량 기록이 어려울 정도로 급감하였다(FAO, 2021). 이러한 급감의 원인으로는 기후변화로 인한 수온 상승과 남획이 주요 원인으로 지목되고 있다(Lee and Kim, 2010). 이전 연구에서 명태의 서식 수온은 10℃ 이하이며, 초기 부화 자어의 적정 수온은 2~7℃라고 보고되었다(Nakatani and Maeda, 1984). 그러나 최근 100년간 동해안의 표층 수온은 2.33 ± 0.52℃ 상승하였으며, 이러한 수온변화는 생활사 초기 과정을 표층에서 부유 생활하며 보내는 명태 부화 자어의 생존에도 영향을 미칠 수 있다(Yoo et al., 2015). 따라서 본 연구는 명태의 수온에 따른 HSF1의 특성을 평가하기 위한 첫 번째 단계로 HSF1 유전자의 cloning과 mRNA 발현 및 HSP70 단백질 발현 패턴을 조사하였다.

Ⅱ. 연구 방법

1. 실험어

실험어는 국립수산과학원 동해수산연구소에서 사육하고 있는 명태를 제공받았으며, 수온 7 ± 0.2℃에서 사육하고 있는 명태 치어(8~12 cm) 및 미성어(20~25 cm)는 하루에 0.5℃씩 수온을 상승 또는 하강시켜 실험 수온 5, 8, 11 및 14℃로 변경하여 7일간 사육하였다. 그 후 수온에 따른 HSF1의 cloning과 mRNA 발현 및 HSP70 발현 패턴을 조사하였다. 수조 당 20마리의 명태를 수용하였으며, 모든 실험은 3반복으로 진행하였다.

2. HSF1 cDNA 합성

100 mg의 명태 간 조직을 균질화하여 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. RNA 순도는 흡광도 260/280 nm의 비율이 1.9~2.1 범위를 나타내는 것을 사용하였다. 5 μg의 total RNA와 oligo (dT) primer를 AMV reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성했다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 Taq DNA polymerase와 2.5 μM dNTP (Enzynomics, Korea)와 함께 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하여 HSF1 단편을 합성하였다. PCR 조건은 94°C에서 30 s, 52°C에서 50 s,

and 72°C에서 90 s로 30회 실시하였다. Primer는 제브라피쉬(Danio rerio) HSF1 (GenBank accession number NM_131600), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) HSF1 (GenBank accession number M21310), 대서양대구(*Gadus morhua*) HSF1 (GenBank accession number AB062548)의 염기서열을 이용하여 "Primer 3" 프로그램을 이용하여 디자인하였다. 실험에 사용한 primer의 정보는 <Table 1>에 나타내었다.

<Table 1> List of primers used for mRNA expression analysis in walleye pollock

Primer name	Sequence (5′ →3′)
Partial HSF1 F	CTGATCTGCTGGAGCCCAAG
Partial HSF1 R	AGCTTGTTGACGACCTTCTG
5′ -RACE HSF1	GGACGAGAGACACTAGAAACTGGATCA
Nested 5′ -RACE HSF1	ATGTTCTCCTGCTTTCCCTTCATCAG
3′ -RACE-1 HSF1	GTTCTGCCAAAGTTCTTCAAACACAAC
Nested 3′ -RACE HSF1	ATCTTGGAGTCGATGTTCTCCTGCTT
qRT-PCR HSF1 F	GACTCAAGCTCCACCCACTC
qRT-PCR HSF1 R	GCGTGACCAACTCTGTGATG
18S rRNA F	GCTCACCCGCTACTTGGATA
18S rRNA R	TCTGATAAATGCACGCATCC

3. Rapid amplification of cDNA Ends (RACE) -PCR

Full-length HSF1의 유전자는 SMART cDNA amplification kit (Clontech, USA)를 이용해 RACE-PCR법으로 수행하였다. 간략하게, 명태의 간 조직으로부터 증폭된 HSF1 단편을 sequencing 하고, 5′ -RACE 단편과 3′ -RACE 단편의 합성을 위한 gene-specific primers (GSPs)를 디자인했다. 5′ -RACE와 3′ -RACE의 단편은 GSP와 adapter primer를 이용해 증폭했다. 그 후 합성된 5′ -RACE와 3′ -RACE 단편은 TOPO PCR 2.1 vector (Invitrogen, USA)에서 각각 cloning 한 후 full-length HSF1 cDNA를 확보했다.

4. Phylogenetic analysis

Full-length HSF1의 아미노산 서열은 다양한 종의 HSF1 아미노산 서열과 alignment하여 계통발생분석을 하였다. 아미노산 서열의 alignment는 ClusterW를 이용하여 multiple alignment 하였다. Aligned HSF1 아미노산 서열은 MEGA-X 프로그램에서 maximum likelihood statistical method를 이용하여 분석을 하였다.

5. HSF1 mRNA 발현 (qRT-PCR)

실험 수온에 노출된 치어와 미성어는 50 ppm의 tricaine methan sulphonate (MS-222, Sigma, USA)로 마취한 후 50 mg의 신장, 심장, 장, 아가미, 및 간 조직을 분리하여 total RNA를 추출하였다. HSF1의 mRNA 발현은 Chrome4 Real-time System (Bio-Rad, USA)를 이용하여 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)으로 분석하였다. TOPreal™ One-step RT-qPCR Kit (Enzynomics, Korea)를 이용하여 10 pmol/μL의 primer와 50 ng/μL total RNA, 0.25 μM SYBR Green을 포함하는 20 μL의 반응물을 50°C에서 30 min 반응시킨 후 95°C에서 10 min, 95°C에서 5s, 60°C에서 30 s로 40회 실시하였다. 대조구로서 house-keeping gene은 18S rRNA gene (GenBank accession number: AB016661)을 사용하였으며, 모든 분석값은 18S rRNA에 대한 cycle (Ct) level과의 차이로 계산하였다.

6. Western blot

100 mg의 신장, 심장, 장, 아가미, 및 간 조직을 분리하여 Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER; Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 단백질을 추출하였으며, 추출된 단백질들은 10% SDS-PAGE gel에서 loading 한 후 전기영동하였다. 전기영동 한 단백질들은 45 mm Immobilon-NC transfer membranes (Millipore, USA)에 옮긴 후 3% BSA로 2시간 동안 blocking하고

```
  -257 gaggcgcgacgatacactacgcacttcatagtttgttctttcgctctcgtttcgtctcctaaagctttagtttggtc
-180 tttattggtcgcttcctctcctatccataacgtctactgagagaagacaatcatctccgtttagtttgggggtttcagttgctttgatcg
 -90 tcacgttaacgagttttattttcgtagttcaaacttaagccgcctaactctccgtagagtcgggggttttaagcttagtttagttggatctgt
   1 atgatggatctccatggaggaccaggaggaggaggaggcaggagtctcgaacccaaccccaacgtccctgccttcctcaccaaactctgg
     M  M  D  L  H  G  G  P  G  G  G  G  G  R  S  L  E  P  N  P  N  V  P  A  F  L  T  K  L  W
  91 atgctggtggaagaccccgacaccgacgacctgatctgctggagcccaagcgggagcagcttccatgtgttggaacacgcccgcttctcg
     M  L  V  E  D  P  D  T  D  D  L  I  C  W  S  P  S  G  S  S  F  H  V  L  E  H  A  R  F  S
 181 aaggacgttctgccaaagttcttcaaacacaacaacatggccagcttcatccgccagctcaacatgtacgggttcaggaaggtggtgcac
     K  D  V  L  P  K  F  F  K  H  N  N  M  A  S  F  I  R  Q  L  N  M  Y  G  F  R  K  V  V  H
 271 atggagcatggcgggctgctgaagccagagaaggaggacaccgaggtccagcatcccttcttcagccgaggacagcagcagctgctcgac
     M  E  H  G  G  L  L  K  P  E  K  E  D  T  E  V  Q  H  P  F  F  S  R  G  Q  Q  Q  L  L  D
 361 cacatcaagcgcaaggtcccgcctgtgtcctctgggaagcaggaggagggaaggtgtacccggaggaggtctccaagatcctcaacgac
     H  I  K  R  K  V  P  P  V  S  S  G  K  Q  E  E  G  K  V  Y  P  E  E  V  S  K  I  L  N  D
 451 atgcagctgatgaagggaaagcaggagaacatcgactccaagatcaccaccatgaagcatgagaacgaggcgttgtggagagaggtcgcc
     M  Q  L  M  K  G  K  Q  E  N  I  D  S  K  I  T  T  M  K  H  E  N  E  A  L  W  R  E  V  A
 541 actctgagacagaaacacgcccagcagcagaaggtcgtcaacaagctgatccagtttctagtgtctctcgtccagccgaacagagttatt
     T  L  R  Q  K  H  A  Q  Q  Q  K  V  V  N  K  L  I  Q  F  L  V  S  L  V  Q  P  N  R  V  I
 631 ggaatgaagaggaaacttcctctgatgctgagtgactcaagctccacccactccatacccaaatatagtcgacagtactccttagaaccc
     G  M  K  R  K  L  P  L  M  L  S  D  S  S  S  T  H  S  I  P  K  Y  S  R  Q  Y  S  L  E  P
 721 ctgcaggccacggccgctatatcggctccgggcggctcggtgacttccggccccatcatctctgacatcacagagttggtcacgcccacc
     L  Q  A  T  A  A  I  S  A  P  G  G  S  V  T  S  G  P  I  I  S  D  I  T  E  L  V  T  P  T
 811 tccacggagctcagcagtgattggatagatgcacccgacagcccagtcatcctagtgaaggaggagccgtccagcccagatctgaaggac
     S  T  E  L  S  S  D  W  I  D  A  P  D  S  P  V  I  L  V  K  E  E  P  S  S  P  D  L  K  D
 901 acgccccttcacccaccaccttctttaactccatcctattggacaacgaaggagccaatccctcagcagccaatcggctatcggccagt
     T  P  L  S  P  T  T  F  F  N  S  I  L  L  D  N  E  G  A  N  P  S  A  A  N  R  L  S  A  S
 991 cccagtatggaattaggctcctcctccacagctgtagacgccaacacacaatcacagcttcctgaccacgcccccagacatcctgaccac
     P  S  M  E  L  G  S  S  S  T  A  V  D  A  N  T  Q  S  Q  L  P  D  H  A  P  R  H  P  D  H
1081 gcccccagacttcctgaccacgcccccagaccttcccccccagaggagaggtgtctgagtgtggcgtgtctagacagtgctctgtattgc
     A  P  R  L  P  D  H  A  P  R  P  S  P  P  E  E  R  C  L  S  V  A  C  L  D  S  A  L  Y  C
1171 aggtcagagctctctgagcacctggaggacattgacagcagtctggagaatcttcatcacctcctcaacggccagaacatcaacatagac
     R  S  E  L  S  E  H  L  E  D  I  D  S  S  L  E  N  L  H  H  L  L  N  G  Q  N  I  N  I  D
1261 tcctcccccctgtttgagttcttcagctcccctggatcggcctgtgcagattttgacctcgacagtctggacactctgctgtcacctgag
     S  S  P  L  F  E  F  F  S  S  P  G  S  A  C  A  D  F  D  L  D  S  L  D  T  L  L  S  P  E
1351 actccaagagagacagacggacactcggcctctgaagggaagcagctggtgcagtacagcaccacgcccatcttgatgcctgagccaatg
     T  P  R  E  T  D  G  H  S  A  S  E  G  K  Q  L  V  Q  Y  S  T  T  P  I  L  M  P  E  P  M
1441 ggctgcttgggggcgtggccgacctgccctctctgctgcagctccaggaggattccttctacagcccgcccctcccagaggaccacccc
     G  C  L  G  G  V  A  D  L  P  S  L  L  Q  L  Q  E  D  S  F  Y  S  P  P  L  P  E  D  H  P
1531 tccgtctccacgacaaccacctcctccacccagcatcccaacttcctgtaa
     S  V  S  T  T  T  T  S  S  T  Q  H  P  N  F  L  *
1583 ccacgacaaccacctcctcctcctcctcccagcatcccaacttcatgtaaccacgacaaccacctcctccttctcccccaagcatcccaa
1673 cttcctgtaaccacgacaaccgcctcctcctccttcttgtaaccaccatctcaagtattattacagtctaaagtagattctacagtagtctat
1763 gacagtgtacagtagagtctatgacagtctacagtacagtatatgacagtctatagtgcagtctacagtagattctacagtagtcaatga
1853 cagtgtacagtagagtctatgacagtctacagtacagtctacagtagagtctacagtacagtctacgacagtctacagtagagtctacag
1943 tagagtacagaacagtctacaggacagtatacagtacagtctacagtagagtctacagtacagtctacgacagtctacagtacagtctac
2033 agtagagtctacagtagagtctacagtagagtacagaacagtctacaggacagtctacagtagagtctacagtacagtctacgacagtct
2123 acagtacagtctacagtacagtctacagtagagtctacagtagagtacagaacagtctacaggacagtcttcagtacagtatacagaaca
2213 gtctacgacagtctacagtacagtctacagtagagtacaggacagtctccagtacagtatacagaacagtctacgacagtctacagtaca
2303 gtctacagtacagtctacagtagagtctacagtagtctatgataatctacagtagtgtccctctactgacatcatgcagtggttgatctt
2393 tttctcagggttgattcctgggggtttggggtttcgttttgcgtggaactctggtaaattttta
```

[Fig. 1] Nucleotide and deduced amino acid sequences of *G. chalcogrammus* HSF1 cDNA. The sequences were deposited into GenBank with the accession number, MT350340.

본 연구실에서 제작한 1차 항체, anti-HSP70을 처리하고(Kim et al., 2022), 4℃에서 overnight 후 Alkaline Phosphatase (AP)가 붙어 있는 goat anti-mouse IgG (Sigma, USA, 2차 항체)로 반응시켜 AP가 붙어 있는 1-StepTM NBT/BCIP substrate solution (Thermo Fisher Scientific, USA) 사용하여 발색 후 HSP70 단백질 발현을 확인하였다.

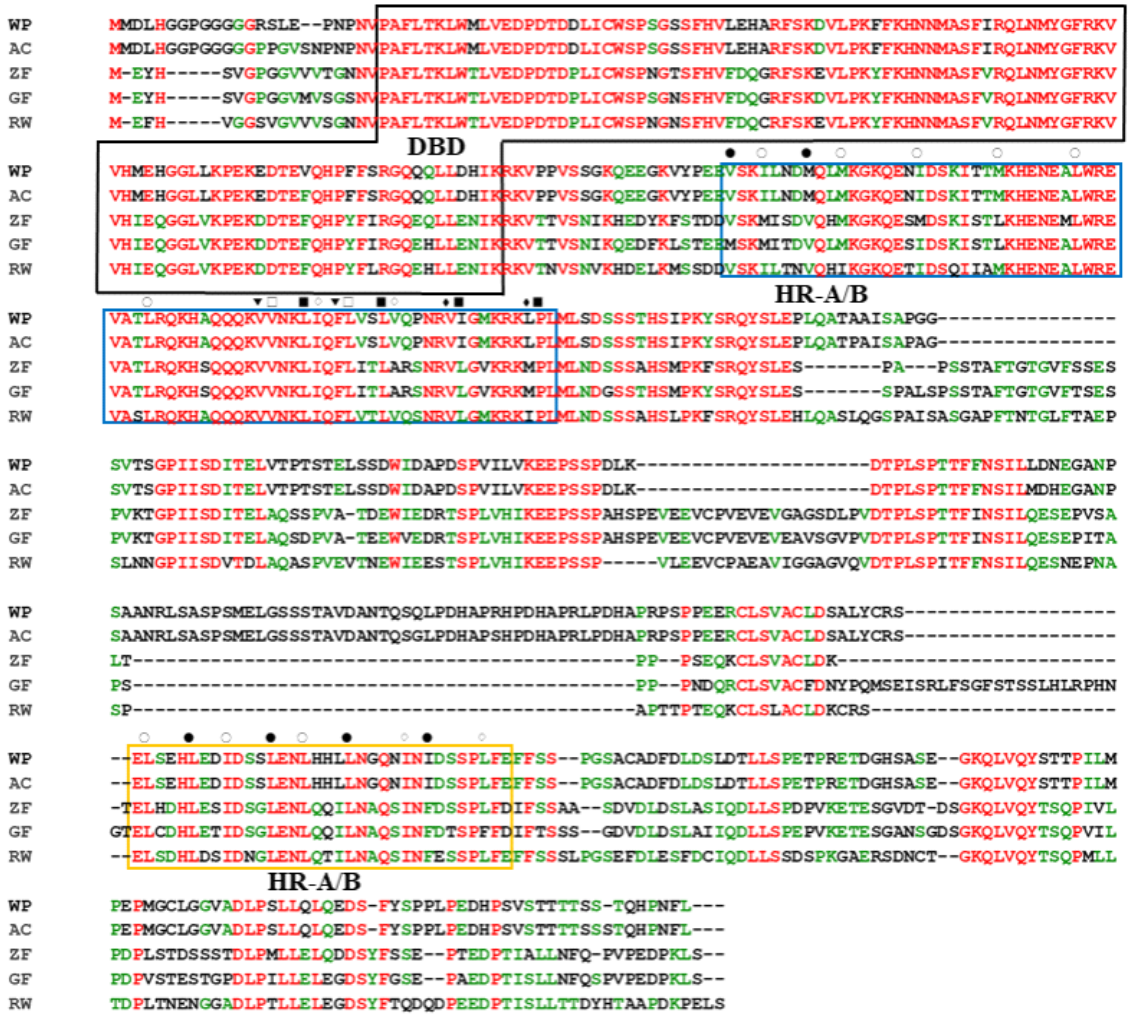
7. 통계분석

결과값은 평균과 표준편차(mean ± SD)로 나타내었으며, SPSS프로그램(version 10.0; SPSS Inc., USA)을 이용하여 실험구별 유의차는 Kruskal-Wallis test를 실시하였고 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성($p < 0.05$)을 검정하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 명태 HSF1 cloning과 sequence analysis

명태의 간에서 증폭된 HSF1 단편으로부터 full-length HSF1은 합성이 되었으며, 2713개의 nucleotide에서 1581개의 open reading frame (ORF)과 함께 526개의 암호화된 아미노산을 확인하였다([Fig 1]). 명태 HSF1과 경골어류인 대서양대구, 제브라피쉬, 붕어(*Carassius carassius*) 및 무지개송어 HSF1의 아미노산은 multiple alignment를 통



[Fig. 2] Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of HSF1 from *G. chalcogrammus* with those of HSF1 from *G. morhua* (GenBank accession number XM_030346607), *D. rerio* (GenBank accession number NM_131600), *O. mykiss* (GenBank accession number NM_001124748) and *C. carassius* (GenBank accession number KJ145025). The identical amino acids are shown in red and similar amino acids are presented as a green color. The three domain structures, DNA binding domain (DBD) and hydrophobic heptad (HR-A/B and HR-C), are boxed. Open and filled circles, quadrangles, diamonds and inverted triangles indicate the repeats of hydrophobic amino acids.

해 상동성을 확인하였다([Fig. 2]). 명태와 대서양대구의 HSF1 아미노산 서열은 515개, 97.35%가 일치하였고, 명태와 무지개송어의 HSF1 아미노산은 256개, 52.09%, 제브라피쉬와는 274개, 51.41%가 일치하였다. N-teminal DNA binding domain에서 대략 100개의 아미노산 잔기가 구성되어 있으며, 명태와 대서양대구의 아미노산 서열은 99.05%, 제브라피쉬와는 80%, 휴먼(*Homo sapiens*)과는 77.14%로 상동성이 매우 높게 나타났다. 반면에 C-teminal heat shock transcription factor domain은 아미노산의 변이가 뚜렷이 확인되었다.

계통발생분석에서 해산어와 담수어가 어류로 cluster를 형성하며, 제브라피쉬, 붕어, 무지개송어가 담수어로 한 가지를 형성하였다. 명태 HSF1은 대서양대구와 냉수성 해산어류로 같은 가지에 분류되었으며, 갈색둥근바리(*Epinephelus coioides*), 물총고기(*Toxotes jaculatrix*) 및 터봇(*Scophthalmus maximus*)은 광염성 어류가 같은 가지를 형성한다([Fig. 3]).

2. HSF1 mRNA 발현 (qRT-PCR)

수온에 따른 명태의 조직에서 HSF1 mRNA발현 수준을 평가하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. 치어와 미성어의 심장, 장, 아가미, 신장, 간 조직은 5℃와 8℃에서는 상대적으로 낮은 HSF1의 발현이 나타났지만, 11℃와 14℃에서는 급격한 증가를 보인다. 치어의 경우 각 조직들은 5℃에서 25.0~30.2, 8℃에서 20.9~26.8, 11℃에서 82.6~111.5, 14℃에서 137.5~205.1 범위의 발현 수준을 나타냈다([Fig. 4A]). 미성어의 경우 각 조직들은 5℃에서 8.1~19.2, 8℃에서 7.8~16.7, 11℃에서 41.3~81.4, 14℃에서 121.4~192.2 범위의 발현 수준을 나타냈다([Fig. 4B]). 11℃와 14℃에서 치어의 HSF1의 발현 수준이 미성어 보다 더 높았으며, 치어와 미성어 모두 아가미에서 가장 높은 발현 수준을 보였다([Fig. 4C와 D]).

3. HSP70 발현 패턴

수온에 따른 HSP70 단백질 발현은 western blotting으로 나타내었다. 치어와 미성어 모두 각 조직에서 HSP70의 발현이 나타났다([Fig. 5]).

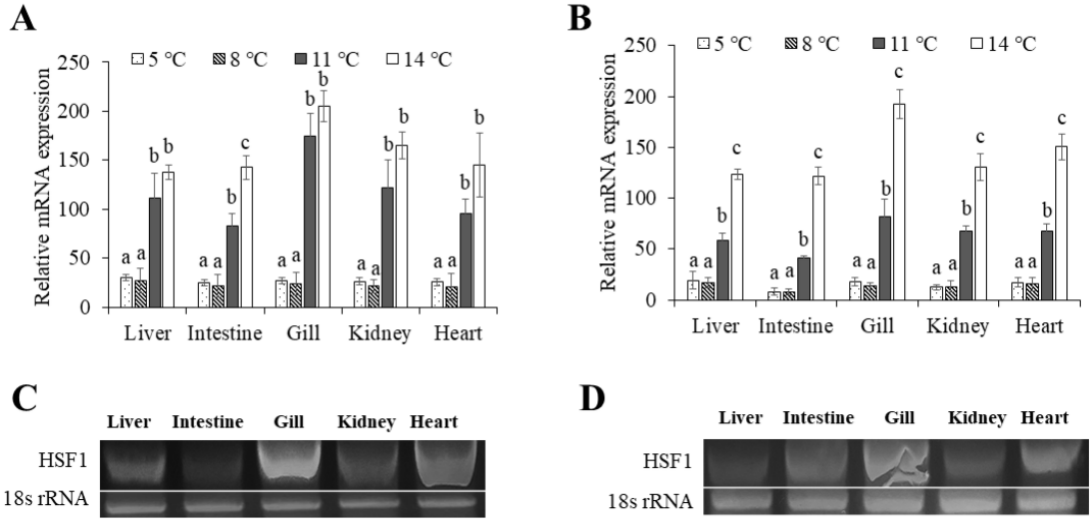
HSP70 발현 또한 HSF1 mRNA 발현과 유사한 경향으로 5℃와 8℃에서는 낮은 HSP70 검출 수준을 보였으나, 11℃와 14℃에서 HSP70은 뚜렷이 증가하는 발현 패턴이 나타났다.

Ⅳ. 고 찰

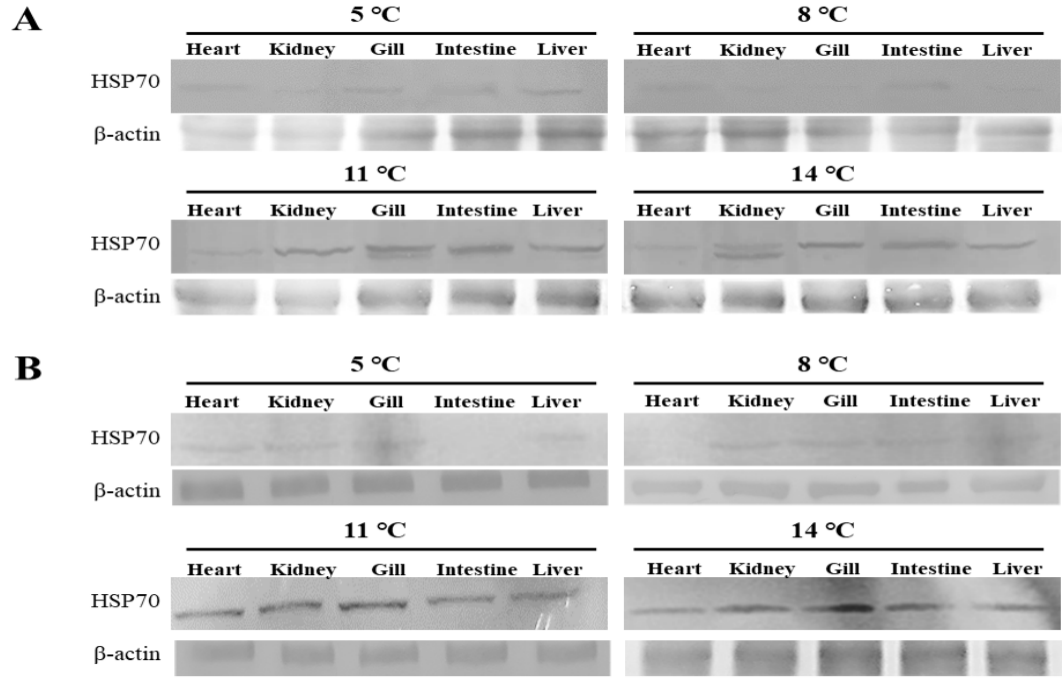
어류 세포와 조직에서 HSPs의 발현은 감염성 병원체, 수온 스트레스, 환경오염물질과 같은 다양한 외부 스트레스에 노출이 되었을 때 영향을 받는다(Iwama et al., 1998). 활성화된 HSFs는 heat shock gene 앞에 위치한 HSEs와 결합하여 HSPs를 유도한다(Baler et al., 1993; Kroes et al., 1991). 본 연구에서 RACE-PCR 전략을 이용하여 명태의 간 조직에서 HSF1을 암호화하는 full-length cDNA의 분리를 보고하였다. HSF1 DNA binding domain은 잘 보존되어진 높은 상동성을 특징으로 하며(Damberger et al., 1994; Harrison et al., 1994;Vuister et al., 1994), DNA binding domain에서 명태와 대서양대구의 아미노산 서열은 99.05%, 제브라피쉬와는 80%, 휴먼과는 77.14%의 상동성이 나타났다. 반면에 제브라피쉬는 휴먼과 상동성이 91.43%로 명태보다 높게 나타났다. 또한 full-length HSF1의 아미노산 서열에서 상동성은 냉수성 어류인 대서양대구와는 높은 유사도를 나타냈지만 온대성 어류인 제브라피쉬와는 51.41%로 상대적으로 낮은 상동성을 나타냈다.

제브라피쉬와 휴먼의 HSF1의 상동성은 60.30%로 같은 어류인 명태보다 높은 유사도를 나타냈다. 포유류 간의 HSF1 아미노산 서열은 높은 유사성을 가지지만 수온에 민감한 어류의 HSF1 아미노산 서열의 차이는 온대성 어류와 냉수성 어류에서 온도 특이성이 존재하는 것으로 보인다.

[Fig. 3] Phylogenetic analysis of *G. chalcogrammus* HSF1 with other organisms. The full-length HSF1 sequences were aligned using the ClustalW multiple alignment. The sequences and accession numbers are listed in the legend of Fig. 2, along with the sequences of the following: *E. coioides* (KR922440), *Toxotes jaculatrix* (XM_ 041053159), *Bos taurus* (BC123711), *Homo sapiens* (NM_005526), *Gallus gallus* (NM_001305256), *Rattus norvegicus* (NM_ 024393), *Penaeus monodon* (MH105755), *Litopenaeus vannamei* (KC782836), *Accipiter gentilis* (XM_049820243), *Panthera uncia* (XM_ 049632750), *Caretta caretta* (XM_048837099), *Pan troglodytes* (NM_001279921), *Anolis sagrei* (LC198691), *Capra hircus* (XM_018058067), *Scophthalmus maximus* (MN_820703), *Apostichopus japonicus* (KU206576), *Anser cygnoides* (XM_048052600), *Pseudonaja textilis* (XM_026723391), *Rana temporaria* (XM_040334352), *Apis cerana* (XM_028664447), *Trachymyrmex septentrionalis* (XM_018498240) and *Vanessa atalanta* (XM 047674421) .



[Fig. 4] HSF1 mRNA expression levels in *G. chalcogrammus* based on water temperatures. A: juveniles, B: immatures, C: juveniles at 14℃, and D: immatures at 14℃. For juveniles and immatures samples were collected from the liver, intestine, gill, kidney, and heart tissues. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$). Data are presented as the mean ± standard deviation (n = 3). Each experiment was performed in triplicate.



[Fig. 5] 9. Expression of HSP70 protein by western blotting using an anti-HSP70 antibody. A: juveniles, B: immatures. Expression of HSP70 protein increased at 11℃ and 14℃.

그러나 어류들 사이에 아미노산 상동성 차이에도 불구하고 계통발생분석에서는 어류들 간에 cluster가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 담수어인 제브라피쉬, 붕어 및 무지개송어가 한가지를 형성하며, 이들 중에서도 제브라피쉬와 붕어가 계통발생학적으로 더 가까운 것을 확인하였다. 또한 해산어인 명태, 대서양 대구, 갈색둥근바리, 물총고기 및 터봇이 한 가지에서 다시 명태와 대서양대구인 냉수성 어류가 분류되며, 광염성인 갈색둥근바리와 기수지역에 서식하는 물총고기 및 터봇이 더 세분화 된 가지를 형성한다.

이러한 HSF1의 계통발생학적 분류는 수온 뿐만 아니라 염분에 대한 영향까지 반영되는 것으로 보이며, 향후 이 부분에 대한 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

HSF1은 수온 스트레스 및 기타 스트레스에 반응하여 연구가 보고되었으며(Sarge et al., 1993; Koizumi et al., 2007; Prasad et al., 2007; Uenishi et al., 2005; Rabindran et al., 1993), HSF1의 생화학적 특성과 HSF1 전사 메커니즘은 비교적 잘 알려져 있다(Mathew et al., 2001; Åkerfelt et al., 2010). 그러나 명태와 같은 냉수성 어류에서 HSF1의 연구는 알려진 바가 없다. HSF1은 다양한 조직에서 분포하여 발현이 되며, 본 연구에서 명태는 수온 스트레스에 의해 아가미에서 발현이 높았다. 이러한 결과는 다른 수생 생물들에서 HSF1의 발현 결과와 유사하였다. 흰다리새우(Litopenaeus vannamei)는 열적 스트레스에 노출이 되면 심장, 장, 아가미에서 HSF1 mRNA의 발현이 높게 나타났으며(Yan et al., 2014), 붕어는 신장, 아가미, 간에서 mRNA의 발현이 높았다(Kim et al., 2015). 제브라피쉬는 37℃에 노출이 되면 생식소와 아가미에서 HSF1의 발현이 높았다(Rabergh et al., 2000). HSF1의 발현과 함께 western blot에 의한 HSP70의 발현 패턴은 11℃와 14℃에서 모든 조직의 발현이 증가한다. HSP70은 광범위한 환경 스트레스 요인에 반응하여 연구되었고 유도되는 단백질이다(Feder and Hofmann, 1999). 붉바리(Epinephelus akaara)는 cold shock에서 HSP70의 발현이 간에서 유의적으로 높았으며(Min et al., 2018), 잉어(Cyprinus carpio)와 대서양대구에서 열적 스트레스에 의해 HSP70의 발현이 증가됨을 보고하였다(Ali et al., 2003; Hori ey al., 2010). 또한 홍다리얼룩새우(Penaeus monodon)에서 HSF1이 HSPs의 발현을 조절함을 나타내었다(Sornchuera et al., 2018). 이전 연구결과들은 HSF1이 heat shock 반응을 중심으로 담당하여 trimerization을 형성하고 HSP70 발현에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Alastalo et al., 2003; Kim et al., 2015). 또한, 명태의 수온에 따른 생존율과 HSP70의 mRNA 발현을 보고되었는데 치어와 미성어 모두 14℃에서 7일차까지는 100% 생존하였고 반수치사 수온(lethal temperature 50; LT50)은 치어가 19.1℃이고 18.9℃로 나타났다. HSP70 mRNA 발현은 HSF1과 유사하게 아가미에서 다른 조직보다 높은 발현이 나타났다(Kim et al., 2022). 본 연구에서 HSF1의 mRNA 발현 수준과 HSP70의 발현 패턴을 비교해 보면 11℃와 14℃는 5℃와 8℃에 비해 높은 발현 수준을 보였다. 이전 연구들의 결과로 명태의 서식 수온은 10℃ 이하임을 고려해 볼 때(Kim et al., 2022), 11℃ 이상의 수온에서 명태는 열적 스트레스에 노출이 되며 HSF1이 HSP70의 발현을 조절함을 확인하였다.

결론적으로 명태 HSF1의 아미노산 서열은 대서양대구와는 매우 상동성이 높았다. 담수어이자, 온대성어류인 제브라피쉬와는 상동성이 비교적 낮았으나, 보존되는 DNA binding domain은 상동성이 높게 나타났다. 또한 11℃ 이상의 수온에서는 열적 스트레스에 의해 HSF1과 HSP70의 발현이 증가했다. 따라서 본 연구 결과는 수온에 민감한 어류에서 HSF1의 특성을 이해하는 첫 번째 단계이다. 향후 냉수성 어류와 온대성 어류 또는 해산어와 담수어에서 HSF1의 전사 조절 특성을 밝힐 수 있는 기초 자료로 활용될 수 있으리라 여겨진다.

References

Alastalo TP, Hellesuo M, Sandqvist A, Hietakangas V, Kallio M and Sistonen L(2003). Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. J Cell Sci 116(17), 3557~3570. https://doi.org/10.1242/jcs.00671

Ali, KS, Dorgai L, Ábrahám M and Hermesz E(2003). Tissue-and stressor-specific differential expression of two hsc70 genes in carp. Biochem Biophys Res Commun 307(3), 503~509. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01206-3

Åkerfelt M, Morimoto RI and Sistonen L(2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. Nat Rev Mol Cell Biol 11(8), 545~555. https://doi.org/10.1038/nrm2938

Baler R, Dahl G and Voellmy R(1993). Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. Mol Cell Biol 13(4), 2486~2496. https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2486-2496.1993

Damberger FF, Pelton JG, Harrison CJ, Nelson, HC and Wemmer DE(1994). Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. Protein Sci 3(10), 1806~1821. https://doi.org/10.1002/pro.5560031020

FAO. 2021. Global Fishery and Aquaculture Production. Available online at: http://www.fao.org/fishery/statistics/en

Feder ME and Hofmann GE(1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol 61(1), 243~282. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243

Harrison CJ, Bohm AA and Nelson HC(1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. Science 263(5144), 224~227. https://doi.org/10.1126/science.8284672

He H, Soncin F, Grammatikakis N, Li Y, Siganou A, Gong J, et al(2003). Elevated expression of heat shock factor HSF 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. J Biol Chem 278(37), 35465~35475. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.07.011

Hiatt T, Dalton M, Felthoven R, Fissel B, Garber-Yonts B, Haynie A, Kasperski S, Lew D, Package C, Sepez J, et al.(2010). Economic status of the ground fish fisheries off Alaska, 2009. Stock assessment and Fishery evaluation report for the groundfish fisheries of the Gulf of Alaska and Bering Sea/Aleutian Islands area; North Pacific Fishery Management Council: Anchorage, AK, USA, 254.

Hori TS, Gamperl AK, Afonso LOB, Johnson SC, Hubert S, Kimball J, Bowman S and Rise ML(2010). Heat-shock responsive genes identified and validated in Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver, head kidney and skeletal muscle using genomic techniques. BMC Genomics 11, 72. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-72

Iwama GK, Thomas PT, Forsyth RHB, and Vijayan MM(1998). Heat shock protein expression in fish. Rev Fish Biol Fish 8(1), 35~56.

Kim SS, Chang Z and Park JS(2015). Identification, tissue distribution and characterization of two heat shock factors (HSFs) in goldfish (*Carassius auratus*). Fish Shellfish Immunol 43(2), 375~386. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.07.011

Kim SS, Lee CJ, Yoo HK, Choi J, Byun SG, Kim WJ, Lim HJ and Park JS(2022). Effect of water temperature on walleye pollock (*Gadus chalcogrammus*) embryos, larvae and juveniles: Survival, HSP70 expression, and physiological responses. Aquaculture 554, 738136. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738136

Koizumi S, Gong P, Suzuki K and Murata M(2007). Cadmium-responsive element of the human heme oxygenase-1 gene mediates heat shock factor 1-dependent transcriptional activation. J Biol Chem 282(12), 8715~8723. https://doi.org/10.1074/jbc.m609427200

Kroes RA, Abravaya K, Seidenfeld J and Morimoto RI(1991). Selective activation of human heat-shock gene-transcription by nitrosourea antitumor drugs mediated by isocyanate-induced damage and

activation of heat-shock transcription factor. Proc Natl Acad Sci USA 88(11), 4825~4829. https://doi.org/10.1073%2Fpnas.88.11.4825

Lee Y and Kim D(2010). Measuring surface water temperature effects on the walleye pollock fishery production using a Translog cost function approach. Environ Resour Econ Rev 19(4), 897~916.

Lu M, Lee YJ, Park SM, Kang HS, Kang SW, Kim S, et al(2009). Aromatic-participant interactions are essential for disulfide -bond-based trimerization in human heat shock transcription factor 1. Biochemistry 48(18), 3795~3797. https://doi.org/10.1021/bi802255c

Mathew A, Mathur SK, Jolly C, Fox SG, Kim S and Morimoto RI(2001). Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. Mol Cell Biol 21(1), 7163~7171. https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7163-7171.2001

Nakatani T and Maeda T(1984). Thermal effect on the development of walleye pollock eggs and their upward speed to the surface. Bull Japan Soc Sci Fish 50, 937~942. https://doi.org/10.2331/suisan.50.937

Neubauer P, Andersen KH(2019). Thermal performance of fish is explained by an interplay between physiology, behaviour and ecology. Conserv Physiol 7(1), coz25.

Perisic O, Xiao H and Lis JT(1989). Stable binding of Drosophila heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. Cell 59(5), 797~806. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90603-X

Polla BS and Cossarizz A(1996). Stress proteins in inflammation. EXS 77, 375~391. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9088-5_25

Prasad KV, Taiyab A, Jyothi D, Srinivas UK and Sreedhar AS(2007). Heat shock transcription factors regulate heat induced cell death in a rat histiocytoma. J Biosc 32(3), 585~593. https://doi.org/10.1007/s12038-007-0058-4

Rabergh CM, Airaksinen S, Soitamo A, Bjorklund HV, Johansson T, Nikinmaa M, and Sistonen L(2000). Tissue-specific expression of zebrafish (Danio rerio) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. J Exp Biol 203(12), 1817~1824. https://doi.org/10.1242/jeb.203.12.1817

Rabindran SK, Haroun RI, Clos J, Wisniewski J and Wu C(1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. Science 259(5092), 230~234. https://doi.org/10.1126/science.8421783

Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD and Slutsky AS(1994). Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. Critical Care Medicine 22(6), 922~929. https://doi.org/10.1097/00003246-199406000-00008

Sapozhnikov AM, Ponomarev ED, Tarasenko TN and Telford WG(1999). Spontaneous apoptosis and expression of cell surface heat-shock proteins in cultured EL-4 lymphoma cells. Cell proliferation 32(6), 363~378. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1999.tb01354.x

Sarge KD, Murphy SP and Morimoto RI(1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress, Mol Cell Biol 13(3), 1392~1407. https://doi.org/10.1128/mcb.13.3.1392-1407.1993

Sornchuera P, Junprung W, Yingsunthonwattana W and Tassanakajon A(2018). Heat shock factor 1 regulates heat shock proteins and immune-related gene in Penaeus monodon under thermal stress. Dev Comp Immunol 88:19~27. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.06.013

Tateishi Y, Ariyoshi M, Igarashi R, Hara H, Mizuguchi K, Seto A, Nakai A, Kokubo T, Tochio H and Shirakawa M (2009). Molecular basis for SUMOylation-dependent regulation of DNA binding activity of heat shock factor 2. J Biol Chem 284(4), 2435~2447. https://doi.org/10.1074/jbc.M806392200

Tomanek L(2010). Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. J Exp Biol 213(6), 971~979. https://doi.org/10.1242/jeb.038034

Uenishi R, Suzuki K and Koizumi S(2005). Overexpression of heat shock factor 1 masks the

heavy metal response of the heat shock protein 70 (hsp70) gene promoter. J Health Sci 51(2), 242~247. https://doi.org/10.1248/jhs.51.242

Vuister GW, Kim SJ, Wu C and Bax A(1994). NMR evidence for similarities between the DNA-binding regions of Drosophila melanogaster heat shock factor and the helix-turn-helix and HNF-3/forkhead families of transcription factors. Biochemistry 33(1), 10~16. https://doi.org/10.1021/bi00167a002

Wang G, Zhang J, Moskophidis D and Mivechi NF(2003). Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects and reduced spermatogenesis, Genesis 36(1), 48~61. https://doi.org/10.1002/gene.10200

Wang J, Wei Y, Li X, Cao H, Xu M, and Dai J(2007). The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carassius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China. Com Biochem Psysiol Part C Toxicol Pharmacol 145(3), 350~362. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.01.018

Yan H, Zhang S, Li XY, Yuan FH, Qiu W, Chen YG, Weng SP, He JG and Chen YH(2014). Identification and functional characterization of heat shock transcription factor1 in *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 37(1), 184~192. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.020

Yoo HK, Byun SG, Yamamoto J and Sakurai Y(2015). The Effect of Warmer Water Temperature of Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus*) Larvae. J Korean Soc Mar Environ Saf 21(4), 339~346. https://doi.org/10.7837/kosomes.2015.21.4.339

• Received : 28 November, 2022
• Revised : 09 January, 2023
• Accepted : 25 January, 2023