

해양생물다양성 보전을 위한 깃대종의 보호전략



[주요 해양생태계의 깃대종 및 연구 접근법]

2010. 03

남해특성연구부 엄승식

1. 추진 필요성 및 목적

1.1. 추진 필요성

추진필요성

환경의 변화 및 파괴는 다양한 생물들의 생존을 위협하고 있으며, 궁극적으로는 인류의 생존에도 큰 위협이 되고 있음

- 지구환경변화 및 해양유류유출 사고 등이 내셔널 아젠다로 제안되었음
- 인간에 의한 연안의 환경 변화로 인해 해양생물다양성 훼손이 진행되고 있음
- 이러한 국가적 현안을 해결하기 위해 생물 및 지식 기반의 생물다양성 보전 및 관리 방안의 도출이 필요함
- 적극적인 보전 및 관리 방안의 도출을 위해서는 전통적인 장기 생태계 모니터링의 수행, 그리고 대상 생물의 발생학 및 생리학적 연구를 통한 배양법의 개발이 수행되어야 함
- 아울러 집단유전학, 생태독성유전체 연구 기법을 도입한 첨단 생태계 건강 진단 기법의 도입 및 개발이 필요함

- 20세기 인류가 이룩한 산업화는 도시화를 통한 인류의 집중을 유발하였고, 의료 및 보건 서비스의 확대는 인류의 수명 연장에 의한 인구의 증가를 가속화함
- 인간 활동에 의한 자연 환경의 변화 및 파괴는 다양한 생물들의 생존을 위태롭게 하고 있으며, 궁극적으로는 인류의 생존에도 큰 위협이 되고 있음
- 이에 따라 최근 지구기후변화 및 해양유류유출사고 등이 내셔널 아젠다로 제안되었음
- 해조류와 해조숲, 그리고 산호와 산호초들은 그들의 다양성 측면 및 인간 활동에 따른 감소 때문에 최우선적으로 보존해야할 생물 가운데 하나임
- 즉, 다양한 해양생물이 알을 낳는 산란장, 먹이 공급장, 은신처 등의 서식 환경을 제공하고 있음
- 해조숲의 소실 속도는 산호초와 육지의 열대우림의 소실 속도와 비슷하며, 1990년 이후에는 매년 그 이전해의 7%씩 증가하고 있다고 함
- 전 세계적으로 지난 10년 동안 약 15% 정도의 해조숲이 지구 온난화, 인

위적 오염, 개발 및 건설 등의 원인으로 인해 소실되었으며, 가속화될 것으로 예측됨

- 우리나라의 경우에도 동해안, 제주 연안, 그리고 남해안 등에서 약 7000 ha에 갯녹음 현상이 발생했으며, 많은 지자체에서 해조숲 조성사업을 실행하고 있으나, 그 성공 여부에 대해서는 단언하기 어려움
- 해저나 표면에 서식하는 해조류와 식물플랑크톤은 광합성과정에서 산소를 방출하고 이산화탄소를 흡수하는 것과 같이 지구 환경 유지에 큰 역할을 하고 있음
- 또 최근에는 바이오에너지 개발의 원료가 되는 해양바이오메스로 인식되어 그 중요성이 한층 강조되고 있음
- 산호초는 열대 우림과 견줄 만한 정도로 단위 면적당 서식하는 생물종의 수가 많고 다양성이 풍부하여 경제적으로나 생물학적으로 매우 중요함
- 범지구적으로 진행되고 있는 기후변화, 즉, 해수온도의 상승 및 화학성분의 변화 그리고 연안의 난개발, 남획, 오염 등에 의해 산호초는 심각한 영향을 받고 있음
- 우리나라의 경우, 오스트레일리아, 오키나와 및 남아시아의 경우와 같이 대규모의 산호초가 형성되어 있지는 않지만, 제주해역의 서귀포 문섬, 숲섬 및 범섬 일대의 경우 다양한 해양 생물이 분포하는 독특한 해양생태계를 이루어 우리나라에서 종 다양성이 가장 높은 지역으로 알려져 있음
- 이들 역시 해조숲과 마찬가지로 해양생물다양성의 유지에 큰 공헌을 하고 있는 중요 생태계임
- 해조숲 및 산호초가 없어진다면, 해양 먹이사슬은 단절되고 전체 생태환경에 대해서는 큰 재앙이며, 해조숲을 이루는 대형 갈조류(감태, 모자반 등) 및 연산호균락을 이루는 연산호류(수지맨드라미류, 분홍바다맨드라미류 등)은 해당 생태계의 깃대종(keystone species)로서, 이들의 건강상태가 생태계 전체의 건전성 및 안전성을 반영할 것으로 예측되므로, 이들의 보전 및 관리가 무엇보다도 중요함
- 산호초 보호에 대한 국가 및 국제적 조치는 활발히 진행되고 있으나, 아직 해조숲에 대해서는 보호법은 물론, 보호구역의 지정 노력도 이루어지고 있지 않은 실정임

가. 기술적 측면

- 해양생태계의 변화 파악을 위해서 SCUBA 장비를 이용한 장기 생태 모니터링 방법이 적용되고 있음. 이 방법은 현황의 파악에는 매우 강력한 방

- 범이나, 변화의 원인 파악 및 변화의 예측에는 한계성을 가지고 있음
- 이를 보완할 수 있는 발생학, 유전학, 유전체학 등의 적용 및 ET, BT, IT의 융합에 의한 첨단 기술 개발과 체계의 확립이 필요함
 - 즉, 발생학적 지식을 토대로 대상 생물의 증식 기법, 종묘의 생산 기법의 개발이 수행되어야 함
 - 해당 생태계 깃대종의 보전/관리를 위해 유전학적 지식을 기반으로 한 대상 생물의 집단 간 유전적 유연관계의 파악이 필요함
 - 유전체학, 특히 생태독성유전체의 발굴과 이를 이용한 분석을 통해 환경의 변화와 이에 의한 생물의 대사 변화를 사전에 예측하는 기법의 개발이 필요함
 - 지구 온난화와 함께 연안의 생물다양성 훼손에 큰 악영향을 미치는 것이 환경오염임
 - 환경오염물질은 인류의 건강과 더불어 모든 생물의 생존에 커다란 영향을 미치고 있으므로, 이들에 대한 생물의 반응에 대한 정확한 평가와 동향 파악이 필요함
 - 현 수계 유해물질의 위해성 평가방법은 독성물질의 농도와 노출시간에 따라 급성 독성 평가와 만성독성평가로 구분되며, 시스템 구성원리에 따라 정적 비교체 (static non-renewal), 정적 교체 (static renewal) 및 연속 유출방법 (flow-through)으로 분류하여, 생물군집평가, 생물독성시험, 생물행태시험, 생물농축측정등을 수행하고 있음. 생물에 대한 오염물질의 독성을 파악하는 방법으로는 일반적으로 LC₅₀ (Lethal Concentration) 및 EC₅₀ (Effective Concentration)등, 시험생물체의 치사나 부동과 같이 판단이 쉬운 지표가 이용됨
 - 그러나 이와 같은 지표들은 오염물질에 의한 생물체 대사변화의 극단적인 최종 결과이므로 비교적 높은 농도에 노출하였을 경우에만 산출 가능하다는 점, 그리고 혼합물이 실험에 이용되었을 경우에는 생리적 변화의 원인이 되는 유해화합물의 특정화 및 이에 대한 생물의 반응을 조절하는 분자 기작의 규명에는 효과적이지 못한 점 등이 단점으로 작용함
 - 생물체내의 생화학적 반응(유전자, 단백질의 발현 변화 및 대사체의 변화)은 개체 또는 군집수준의 반응보다 훨씬 민감하고 짧은 시간에 일어나므로 외부환경의 변화에 대한 “조기경보자 (early warning system)”로서 생태계 안전성에 대한 유용한 정보를 제공할 것임 (그림 x)

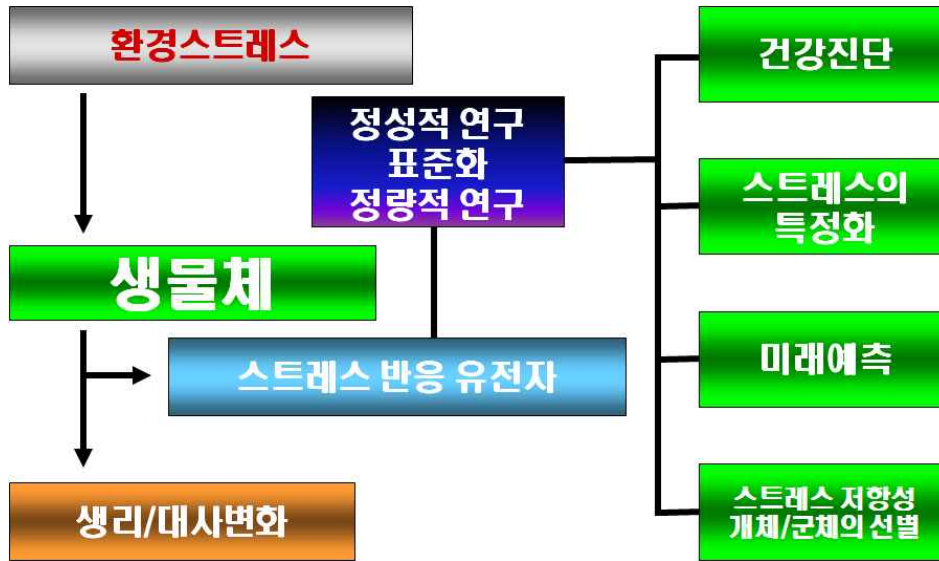


그림 1. 환경변화에 대한 세포내 수준에서의 생물 반응 및 분자생물지표의 활용

나. 경제, 산업적 측면

- 경제적 가치가 있는 어류 및 패류는 모두 해조숲에서 생산됨. 해조숲의 생물다양성은 해조숲이 발달되어 있지 않는 곳에 비해 2배 이상인 것으로 파악됨
- 제주지역의 경우 해조숲의 훼손과 함께 1990년 184톤이 채취되었으나, 2005년과 2006년에는 2 톤만이 채취된 것으로 파악됨. 오분자기 역시 채취량이 1994년의 200 톤에서 2004년 19 톤으로 격감하였음
- 이에 농림수산식품부에서는 바다숲 조성, 그린에너지화, 웰빙식품 개발, 의약품 및 화장품 개발 등에 2012년까지 750억 원을 투자할 계획이라고 함
- 산호초 자체가 내포하고 있는 경제적 이익은 세계적으로 매년 3000억 달러에 달하는 것으로 파악되고 있으며, 109개 국가에서 해안선 침식을 보호해주고, 어류의 약 25%가 산호초에 서식하는 것으로 알려져 있음
- 세계 식량 생산의 약 10%를 담당하고 있고, 나아가 산호는 미개발 의약 제재의 원료가 될 가능성이 높음
- 그러나 이미 인간의 직접적 활동으로 인해 10% 정도가 파괴되었으며 1997년에서 1998년의 엘니뇨에 의해 16%가 피해를 입은 것으로 파악되고 있음
- 최근 연구에 따르면 지구 온난화에 의한 온도 상승이 2도 이상이 되는 최악의 경우 오스트레일리아의 대보초 지역의 산호들이 2100년에는 사라

질 것이며 향후 200-500년 사이에는 복원될 수 없을 정도로 악화될 것이라 예측하고 있음

- 앞으로의 기후 변화 및 환경오염에 의한 해조숲 및 산호초의 파괴는 더욱 심해질 것으로 예측됨
- 분자생물학적 기법에 의한 생태계 및 환경오염 감시체계의 확립은 의료 비용 뿐 만 아니라, 산업현장에서 오염물질 제거 및 저감을 위해 투입되는 부가 비용 등을 절감해 줌으로써 경제적 이득을 성취할 수 있음

다. 사회, 문화적 측면

- 해양 생태계 건강 및 오염 상황을 조기에 경고할 수 있는 체계를 제시함으로써, 주요 단백질원인 해양 생물자원의 안전성을 확보할 수 있음
- 유해화학물질에 대한 생물의 반응을 분자수준에서 설명함으로써, 생물체에서의 질병 발생이나 기형개체 형성에 대한 인과관계의 파악을 용이하게 함
- 해조숲, 산호류 등의 중요성에 대한 사회적 인식 변화를 유도할 수 있음. 생물 보존에 대한 사회의 관심은 척추동물(예: 호랑이, 곰, 늑대, 황새)에 집중되어, 마치 이들이 가장 중요한 생물이고, 보호할 가치가 있다고 생각하고 있음
- 그러나 이러한 동물들은 생태계의 최상위에 위치함으로써 전체 생태계에 미치는 중요성은 생산자인 식물 및 생태계의 하위에 위치하는 다양한 무척추동물과 비교하면 그리 크지 않다고 생각됨
- 유엔환경계획(UNEP)은 유엔 기후변화협약 협상에서 "자연보전이 기후변화를 야기하는 온실가스를 다루는 데 가장 좋은 방법"이라고 밝힘
- 또 "발전소에서 배출되는 이산화탄소를 포집해 땅에 묻는 기술에 수백만 달러가 투자되고 있는데 이 돈을 생태계에 투자한다면 훨씬 싼 비용으로 상응하는 효과를 얻을 수 있다"고 주장함
- 생태계에 대한 투자는 첫째, 생물다양성을 보전하고; 둘째, 물 공급여건을 개선하며; 세째, 경기를 부양하는 등 부수적인 효과도 가져올 것임

1.2. 목적

목적

- 대한 증식, 이식, 복원 및 환경변화 대응 진단 기법의 도출
- 지식 기반의 통합적 해양생태계 보전/관리 방안 제시
- 해양생태계보호법 및 보호구역의 지정을 위한 과학적 근거 확보

갯대중에 대한 증식, 이식 복원 및 환경변화 대응 진단 기법의 도출

- 기후변화 및 연안의 오염으로부터 생태계를 보전하는 것이 지속가능한 발전을 위한 다른 어떤 시도를 하는 것보다 가치가 있고, 효율적인 방법이라 생각됨
- 해양생물다양성의 보전을 위해서는 해양생물다양성 유지에 큰 공헌을 하고 있는 생태계의 갯대중에 대한 기초 생물학적 지식을 축적하여야 함
- 즉, SCUBA 장비를 이용한 생태계 모니터링을 통해 현장 조사를 수행함
- 발생학적 연구를 통해 대상 갯대중의 생활환을 이해하고, 증식 방법 및 종묘 생산 방법을 개발하고, 필요에 따라 최적 현장 이식을 통한 복원 방법을 개발함
- 유전학적 연구를 통해 자연 집단 간의 유전적 연관 관계를 파악하고, 환경변화에 적응적인 집단을 선별하거나, 새로운 strain을 개발함
- 생태독성유전체 연구를 통해 연안오염을 포함한 환경변화를 사전에 감지하고, 이에 대한 생물의 반응을 이해할 수 있는 분자생물학적 생물지표를 발굴하고, 활용법을 제시함

지식 기반의 통합적 해양생태계 보전/관리 방안 제시

- 각 생물학 분야에서 얻어진 결과들을 통합할 수 있는 연구자 집단의 협의체 구성
- 군집 및 개체 수준, 세포내 수준에서 얻어진 결과들의 통합을 추구

보호법 및 보호구역의 지정을 위한 과학적 근거 확보

- 해당 생태계의 생산력, 잠재적 경제 가치 등의 산출 방법 등에 대한 고찰
- 보호법 또는 보호구역 지정의 타당성 제시

2. 국내외 연구개발 동향 · 분석

2.1. 국외 연구개발 동향

- 외국의 경우 1970년대부터 연안 환경의 보호와 생물자원의 보존을 위한 복원 연구, 그리고 생물들의 인공 양식 연구들이 이루어져 왔음
- 미국, 일본, 오스트레일리아 및 필리핀, 태국, 인도네시아 등 동남아시아 국가 등과 같이 산호초가 잘 형성된 나라에서는 오래전부터 산호초의 중요성을 인식하고, 종 분류에서부터 생태학적 모니터링까지 여러 각도에서 연구를 진행하고 있음
- 해양보호구역(Marine Protection Area)의 설정과 관련해서는, 오스트레일리아, 동남아시아 제국 등에서 이미 실행하고 있음
- 해조류를 대상으로 한 기초 생물학적 연구는 그리 많지 않음. 특히 기능 유전체 연구에서는 육상식물 분야에 비해 매우 뒤쳐져 있음
- 1990년대에 들어와서 형질전환 방법이 개발되었고, 탄수화물 합성과 관련된 유전자들의 기능 해석이 이루어졌음
- 최근 김류, 다시마류 등으로부터 유전자 대량 발굴을 위한 expressed sequence tags (ESTs) project가 도입되어, 새로운 기류가 형성되고 있으나, 아직 본 궤도에 올라서지는 못한 실정임
- 산호류의 경우, 종 보존 및 복원에 필요시 되는 중간 및 종내 유전적 다양성에 대한 연구가 이루어진 바 있으며, 산호초를 형성하는 산호종을 분자생물학적으로 이해하고, 산호 군락의 보전 및 보호에 분자적 기초 자료를 제공할 목적으로 NHGRI에서는 산호 제놈 프로젝트를 시작하였음
- 스트레스 관련 유전자와 관련해서는 heat shock protein을 동정하고 이에 대한 기초적인 조사를 보고한 바 있고, 이 유전자를 스트레스에 대한 마커로 이용할 것을 제안한 바 있음
- 그러나 보다 체계적이고, 발전된 방법으로 스트레스 반응 유전자를 찾고 이를 활용하려는 움직임은 아직 없는 것으로 파악됨

2.2. 국내 연구개발 동향

- 해조류를 대상으로 한 기초 생물학적 연구는 주로 미역, 다시마, 김 등과 같이 식품으로 이용되는 일부 양식 종에 국한되어 진행되고 있음
- 최근 국립수산물과학원 해조류바이오연구소에 의해 해조류 품종보호와 중요 산업 육성을 위한 중장기 전략이 제시된 바 있음. 유전자원과 품종에 대한 국가적 자원관리, 해조류 육종의 활성화를 통한 중요산업의 고도화

등을 통해 '해조산업의 선진국 진입'을 목표로 하고 있으나, 역시,대상 해조류는 미역, 다시마, 김과 같은 수산물에 집중되어 있음

- 위와 같은 전략을 생태적으로 중요한 해조류로 확대할 필요가 절실함
- 산호자원의 증식 및 복원에 대한 연구는, 관련 연구자의 부족으로 인해진 대학을 주축으로 겨우 명맥을 유지하고 있을 뿐임. 즉, 제주 서귀포해역의 보호종 현황의 파악, 일부 종에 대한 무성생식 방법의 증식 및 이식 기술 개발, 산호 개체군 변화 요인 분석과 모니터링 기법의 개발 등이 매우 작은 규모로 시도된 바 있음
- 어려운 상황 속에서도 비 파괴적 모니터링 기법은 해양환경생태 분야의 발전을 가져왔고, '제주도연안 연산호 군락지(천연기념물 421호)'의 설정이나 조사에 기술적인 표준을 제시하기도 함
- 오염등 환경변화에 대한 연구에 있어서, 국내의 경우 연안역에서의 유해화학물질이나 중금속 오염의 감지, 예측, 연구측면에서는 연구가 거의 전무한 실정으로, 대부분 갯벌의 굴·바지락·홍합 등 생물체내 오염물질 함량을 화학적으로 분석하는 정도에 머물러 있음
- 국내 일부 대학 및 연구소에서 담수 어류 또는 양서류를 이용한 바이오마커 선정 연구가 진행 중이나, 해양 생물에 미치는 종합적인 독성영향을 평가하지는 못하고 있는 실정임
- 우리나라에 서식하고 있는 산호류에 대해서는 소수의 연구자에 의해 주로 분류학적 연구를 진행되어 왔음
- 유전자 지표를 이용한 DNA chip과 같은 분석 도구는 기능유전체학 뿐 아니라 다양한 질병진단에 시도되고 있으며, 기본적으로 바이러스 감염, 당뇨병의 발병, 자궁경부암의 진단등과 같은 유전자 발현양상을 이용한 질병 진단 연구 및 인공지능, 기계학습기법과 같은 응용에 급속하게 활용되고 있음
- 그러나 국내 DNA chip의 제작기술이 세계적 수준으로 발전한 것에 비해 이를 이용한 환경변화에 조기 감지 및 생물의 반응 해석을 통한 유해화학물질의 위해성 평가는 아직 초보적인 수준이며, 환경관련 분야에 응용하고자 하는 연구인력 또한 적은 실정임

3. 목표

- 해양생태계 깃대종의 선정 및 생물다양성 유지 공헌도 판정
- 깃대종들에 대한 범 생물학적 지식망 체계 및 지식기반의 기술 융합 기반 구축
- 해양생태계의 통합적 보전/관리를 위한 표준 방안 제시

3.1. 최종목표

- 지식기반의 신 해양생물다양성 보전/관리 전략 개발

3.2. 연구 목표

제1단계(2011~2014년)

목표: 1. 깃대종 현황파악 및 해양생태계 공헌도 구체화

- 2. 깃대종의 생활환 규명을 통한 배양법, 증식법, 이식법 기준 마련
- 깃대종 후보의 선정하고, 이들에 대한 과거 연구 기록 및 결과 검색
- 장기 생태모니터링(2-3년)을 통해 해당 생태계의 생물다양성 유지에 미치는 영향을 파악함으로써 중요도 판정
- 깃대종을 대상으로 적절한 배양법을 개발하고, 종묘의 보존/관리 시설 설치 또는 관련 시설에 기증
- 지노믹스 기반의 첨단 연구 토대 구축 및 확보

제2단계(2015~2017년)

목표: 1. 깃대종 이식에 의한 생태계 복원 실현

- 2. 깃대종을 대상으로 한 Omics 연구 진흥
- 3. 환경변화에 대한 생물 반응 및 중요 유전자의 기능 해석
- 깃대종의 증식 및 이식법의 현장 적용성 검증 및 결론 도출
- Omics 연구를 통한 다양한 생물정보 발굴
- 생태계 환경 변화(지구환경변화, 연안 오염 등)의 감지 및 예측에 대한 생물정보의 활용 극대화
- BT, ET, IT 융합에 의한 생태계 변화 원인 파악 및 변동 예측 체계 구상

및 데모 버전 개발

□ 제3단계(2018~2020년)

목표: 1. 융합기술 기반 생태계 변화 조기 감지 체계 구축

2. 지식 기반의 해양보호구역 설정 및 해양보호법 제정을 위한 근거 자료 생산 및 확산

· BT, ET, IT 융합 기술 현장 적용

· 지속 가능한 성장을 위한 해양생태계의 중요성 구체화, 경제 지수로 환산 가능한 방법 개발

4. 연구개발 추진 체계

□ 산재되어 있는 연구 역량 및 기능을 통합하여 원-원 전략의 극대화

□ 통합형 연구 체계하에 연구 분야별로 그룹화하여 전문화와 협력화를 꾀함

□ 각 분야에서 얻어진 결과를 공유하고, 지식의 통합을 유도함

□ 경제 및 기획 전문가의 자문을 얻어 해당 생태계의 중요성을 경제지표로 환산하여 일반인과 정책추진 주체의 이해를 도모

5. 소요예산

(단위: 억원)

연구 분야	1단계				2단계			3단계			합 계
	'11	'12	'13	'14	'15	'16	'17	'18	'19	'20	
깃대종 현황 파악 및 생태 모니터링	5	5	5		1	1	1				18
깃대종 생활환 규명	4	4	4	4							16
연구 기반 구축	3	3	3	3							12
깃대종 이식을 통한 서식환경 복원				10	10	10	10				40
Omics 연구를 통한 생물정보 발굴 및 해석				5	5	5	5				25
생태계 변화 적용 융합기술 구상 및 설계					4	4	4				12
융합기술의 현장 적용 및 검증								4	4	4	12
해양생태계와 경제 함수 관계 정립								1	1	1	3
총 액											138

6. 개인창의과제(2009) 연구 결과보고

앞에서 제안한 기획보고서의 일부 내용이 개인창의과제 '지구환경변화 대응 연산호군락의 건강진단을 위한 분자생물지표 발굴 및 타당성 검증(PE98413)'을 통해 진행되었으며, 그 결과를 6장에서 기술하고자 한다.

6.1. 연구개발목표

- 지구 온난화 및 유기오염 대응 분자생물지표 후보 발굴 (50클론 이상)
- 연산호의 건강도 평가를 위한 기반 및 타당성 확보

6.2. 연구개발내용

- 실험조건에서 온도 스트레스 및 유기오염 스트레스에 연산호 노출
- 연산호 핵산 확보
- Differential display PCR법 또는 subtractive cDNA library 구축에 의해 분자생물지표 후보 클론 발굴
- 클론들의 염기서열 분석 및 기능 검색
- 후보 유전자들의 차등발현 분석에 의해 유용 유전자 선별
- 자연집단 또는 실험실 노출군에 적용하여 분자생물지표의 적용 타당성 검증

6.2. 연구방법

6.2.1. 분홍바다맨드라미의 배양

서귀포 연안에서 채취된 분홍바다맨드라미를 세 종류의 필터(100, 10 및 1 μ m)를 거친 자연해수에 배양하였다. 수중 히터를 이용하여 수온은 22°C로 고정하였으며, 1주 이상 순치시켰다. 광주기는 14:10으로 조절하였다.

6.2.2. 분홍바다맨드라미의 고온 노출

상기의 분홍바다맨드라미를 서귀포 지역의 여름 최고 수온인 26°C 보다 2°C 높은 28°C에 노출하여 24시간 동안 배양하였고, 대조군은 22°C에서 24시간 동안 배양하였다.

6.2.3. 분홍바다맨드라미의 다환방향족탄화수소 노출

상기의 분홍바다맨드라미를 100 ppb의 다환방향족탄화수소 표준시료(네디

채, USA)에 노출하여 24시간 동안 배양하였고, 다환방향족탄화수소를 처리하지 않은 대조군은 22°C에서 24시간 동안 배양하였다. 다환방향족탄화수소의 명칭은 PAH MIX 525로서, Acenaphthylene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Pyrene, Benzo(a)anthracene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene, Dibenzo(a,h)anthracene, Benzo(ghi)perylene 등의 대표적인 PAH 13종이 각각 500µg/mL의 농도로 혼합되어 있는 것이다.

6.2.4. RNA의 분리

위에서 기술한 대조군, 고온에 노출한 시험군 및 PAH에 노출한 시험군의 분홍맨드라미 조직을 막자사발에서 액체질소를 이용하여 분말로 만들고, 용해(lysis) 용액[35 mM EDTA, 0.7 M LiCl, 7% SDS, 200 mM Tris-Cl(pH 9.0)] 700 µl를 첨가하여 균질화하였다. 동량의 페놀 용액을 첨가하고 잘 섞은 후, 10분간 원심분리하여, 상층액을 취해 새 튜브로 옮기고 총 용량의 1/3의 8 M 염화리튬(LiCl)을 첨가하였다. 잘 섞은 후에 4°C에서 2시간 이상 방치하였다. 방치 후, 약 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하여 300 µl의 침전수에 녹였다. 1/10 용량의 3 M 아세트산나트륨(pH 5.2)과 동량의 아이소프로판올(isopropanol)을 첨가하고 약 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하였다. 침전물에 70% 에탄올 용액 50 µl를 넣어 5분간 원심분리한 뒤, 에탄올 용액을 제거하고 침전된 RNA를 건조시켰다. 건조 후, 적당량의 DEPC-처리수에 용해하였다.

6.2.5. First strand cDNA 합성

온도변화 및 PAH에 대응하는 특이적인 유전자의 분리에 GeneFishing™ DEG kits(Seegene, 한국)를 사용하였다. 추출된 전체 RNA(3.0 µg)를 주형으로 dT-ACP1을 프라이머로, MMLV RT-ase를 반응 효소로 사용하여 대조군과 실험군의 cDNA를 합성하였다.

6.2.6. 특이 유전자 단편의 분리 및 염기서열 분석

합성된 first strand cDNA를 주형으로 dT-ACP2 및 arbitrary ACPs(120종)를 프라이머로 이용하여 PCR을 실시하였다. 상기 PCR 조건은 94°C에서 1분; 50°C에서 3분; 72°C에서 1분을 실시하고, 94°C에서 40초; 65°C에서 40초; 72°C에서 40초를 40회 실시한 후, 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 산물은 2% 아가로스 겔을 이용하여 분리하였고, 이를 통해 확인된 특이적으로 증폭

된 PCR 산물은 정제 후, T-벡터 시스템을 이용하여 클로닝(cloning)하고, 프라스미드(plasmid)를 추출하여 염기서열분석을 실시하였다.

6.3. 연구결과

Differential display PCR법에 의해 환경변화 특이 유전자들을 증폭하여, 증폭 산물을 아가로스 젤을 이용한 전기영동법으로 분리한 결과를 그림 2에 나타내었다. 그림 2에서 보는 바와 같이, 대조군에 비해 온도상승(그림 2A)에 의해 발현이 증가 또는 감소하는 유전자 및 PAH 노출(그림 2B)에 의해 발현량이 변화되는 유전자 단편을 확인하였으며, 염기서열 분석을 통해 각각 24개 및 32개의 유전자가 확인되었다.

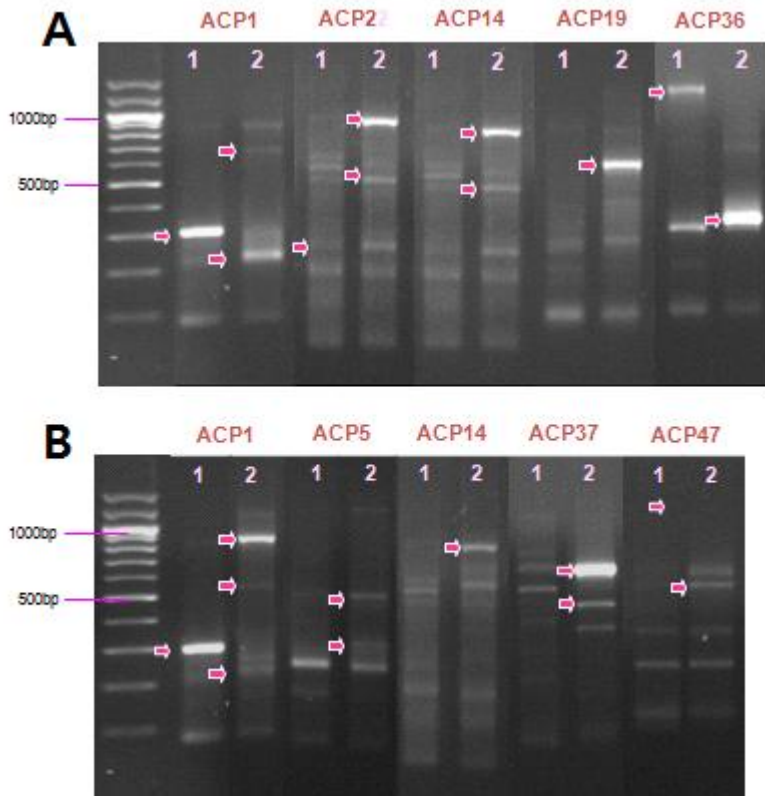


그림 2. Differential display PCR법에 의한 온도 변화 및 PAH에 의해 발현량이 변화되는 유전자의 분리. A, 온도변화; B, PAH 노출; 1, 대조군; 2, 실험군; ACPX, 적용한 프라이머의 종류. 특이적으로 나타나는 유전자 단편을 화살표로 표시함.

6.3.1. 고온 노출에 대한 특이 유전자 후보

온도변화에 반응하여 발현량이 변화된 유전자들의 염기서열을 아래에 나타내었다. 발현량이 증가된 유전자들은 1-18이며, 감소된 유전자들은 19-24이다.

1. Protein disulfide isomerase

CGTGACTTTGGCTCCGAAGTACGAAGAGGCTGCAAGGATGATTGCAAAAGGACACTTAAAAG
ATAAAGTTTCATTTAGTTAAGATCCAATGCGACAGCGAGAAAAGGAAGAGAAATATGTTCAACAA
ATAAAGTAGAAGGATTTCCGACTATCAATGTGTATCAAAAAGGAAAGAACTTGAACAATACGT
AGGCGCTAGAACCAGATGCTTTTCGTTAAGTACGTGGAGGAAGTTGTAAGACAGGAAAGC
CTCAATTTACTGGAAAACAAAGGAACGACCAACAAGTCTGCCTGGCCAAGGATTTAGAAAAT
ATGTTACCCAAAATCGTCATGAAGGAAATATAGTTAGACGTTAAATTTTGAACGATGTTACGT
ATTTACGTGTACATATCAAGAGTATAAATATTTTTGAAATGTAATTATTAATCAAAGGATTTTCG
TGAA

2. Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)

AAAAAATTTTTATTTATATCTACTTTACAACCTTAGTAAAATGGGTTTGGTCGTTTGGCAACAAAT
TTTGATTTGAACTGGGATTTTCATCACCCGATGTGGCCCCCATGAAGCGAATGCCTGGTAA
ACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAAAGCTCCCAACGCG
TTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG
CTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA
AAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACT
GCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG
GGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CG

3. Calmodulin

AATTACGTCATGTGATGACAAATCTTGGTGAAAAATTGACAGATGAAGAGGTTGATGAGATGA
TCAGAGAAGCTGATATTGATGGAGATGGACAAGTAACTATGAAGAATTTGTGAAAATGATGA
CTTCCAAGTAGATGTTTCAATTTTACGACAAGTTCTGGTTATGACATGGCCACGAATAATTTCT
GATGGCTGACTTAGCTCCTGCCTCCCATATTAATAACTTTTTATTTCACTTTTCATTTAATTGTA
TTTTTATTTAATGTAAGCACTAGGTTAGGAATAAGAATACTATTCAAGCAATCTATTAGTTGAAT
ATTTATACGTAAGTAGATATTGTTGCATGGTGATATAGATGTAATTATACTTAATGTAATTTCC
TGTCTTAGTTTCCAACCACAATGTAATTAATACCCATTTTATTA

4. Calreticulin

CTTTGTAATAAGTTGATGGTAAAAATGGGTCTTTTAAGGCTATTTGCTTGTGTTCTTTTTGTTTT
CTCAATTGTGGAATCAACAGTGTATTTAAGGAAACCTTTGGTGATGCGGACTGGGAGAAACG
GTGGGTTAGCTCGACCAAGAAGGGCAGTGATGCTGGAAAGTTTGTGTTTATCTGCTGGCAAGT
TTTATAATGACCCGGAGCTAGATAAAGGAATTCAGACGAGTCAAGATGCTAAATTTTACGGTC

TCTCAGCGAAATTTGATGAAGCATTCTCAAACAAGGACAAAGATCTTGTGATTCAATTCACAGT
TAAACATGAGCAAACGATTGACTGTGGGGGTGGATACGTCAAGGTATTTGGAAGTGACTIONAG
ACCAAGCTGGTATGCATGGAGACTCACCATAGAACATCATGTTTGGACCTGATATCTGTGGAC
CTGGAACAAAGAAAGTTCATGTAATCTTCAACTACAAGGGAAAGAACCTTTTGACCAAGAAAG
ATATTAGATGCAAGGATGATGAAATGACCCATCTTTATACATTGATTGTGAAACCAGACAATAC
TTATGAAGTAAGAATAGACAATGAAAAAGTTGAAAGTGGTGAAGTACTAGAGCAAGATTGGGAATT
TTTGCCTGAGAAGATAAAAGATCCTGAAGCTAAGAAGCCTGATGATTGGGTGGATGATG
CTAAAATCCCTGATCCCGAAGACAAGAAACCTGATGACTATGACAAACCACAACATATTCCTG
ACCCTGAT

5. Ferritin protein

ACGTTGCATTGGCTGGATTTCAAAATACTTCAAGAAAGCCTCAGATGAGGAACGAGAACAC
GCTGAAAACTGATGAAGTTTCAGAATCGTCGTGGTGGACGTATTGTTTTGAAGGACATAAAG
AAACCTGAGAAAGATGAATGGGGCAATGGACTGGATGCTATGAAGGTTGCACTGGCATTGGA
AAAGACCGTGAATGAAGCATTGTTCCAGTTACATGAAGTTGCTGTCACCAACAAGGATGATGA
GATGGCTGATTTTATTGAAGCCAACACTTGCATGAGCAAACCTGATGCCATCAAGGAATTGTC
AGATCATATTACCAACCTTGAACGTGTTGGTGAAGGCTTGGGTGAATACCAATTTGACAAGCT
CACATTGAATGGTGAAGTAACTTCTTACTTGTGATGAAGTGAATTCATGTAACCAGGATAA
TCAATTAGCTTAGTAACAATACTGTAATGATCAAGTAAAGGAAAAAGGGATTAATAATTATTAAG
CAAAAAA

6. Small GTPase

TGATTAGAAGGGCAAACCTGTGTACAATTGCGTAACTAGCGTTAAATTTATTCCTGGGTGGGC
TGTTGTGTATATAGACATATTATTGTGTACAAAGACAGTCTTATTAGACGAAATTGTAAATAA
AGTAATTAGAAACCGAATGGAATATTTAATGTGGATAGAACTTCTTTATCGAGTGATATTGTAA
AAAGGAAATATTTGAATATTAATTGTGCATATTAACATAA

7. 40S ribosomal protein S23

CATGCGAAGGGAATCGTACTCGAGAAAGTAGGTGTGAGGCCAAACAGCCTAACTCGGCCA
TCCGTAAGTGTGTGAGGGTCCAGCTCATCAAGAACGGAAAGAAAATCACCGCCTTCGTGCC
CGTGATGGTTGCCTCAACTACATTGAAGAGAACGACGAGGTGTTGGTAGCCGGGTTCCGTA
GGAAGGGTCACGCCGTGGGAGATATCCCCGGAGTACGATTCAAGATCGTCAAGGTCGCCAA
CGTCTCCCTACTCGCCCTGTACAAGGAGAAGAAGGAGAGGCCTCGATCATAAACATTCTCTA
CAGTTATATACAATA

8. Mannose-binding lectin 2

CGTTTGCACGTTCTAAAGGCTCGCGACAAACCTGGGTTGGCGTTTTTAGGCGATATGACAAA
CGTTTTATCAACGTTGAAGGGAGAGACCAAACCTACACCAACTGGAACCGAGGAGAACCAAA
CAACAGCGGCGGTAACGAGAAGTGTGTTGTCATGTATACCAACACTGCTAGATGGAATGACG
CAAGTTGTACTIONACTCGCCATGATTTCTGTCTGTGAAATCAAACCTTTGATTGTGTGCATAAATCAG
CTAAGTGAGCTTTTTGTGGCCTATACGTCTGGGCCTACAACGTATGTTAGCTATTTGCAGTAA

TAATAAAATCGTGATTTAATC

9. Eukaryotic translation initiation factor 4

TGTT CAGCGTTGCTTATGCAAATATGTGCCGATGTCTATTCACGATAAAAAGTTTCCGATGTGG
ATGGAAGAAGTGTCTTTCCGAAAGTTGCTGCTGAATAGATGTCAGAAAGAGTTTGAAAAAG
AAAAGGAGTGCAGAAATGCGTTATTAGAAAAGAATACTCAACTTGAAGGACTATCGGAGGAG
GAAATGA

10. Proteasome beta 3 subunit

TGCAGAAGATTTTGTGTTAGCGGCACCTGTA CTGAGCAGATGTATGGTATGTGCGAGTCGC
TATGGCAACCTGATTTGGCGCCGGACGATTTGTTGAGACCATCTCACAAGCACTCATGAAC
GCAGTCGACCGTGATGCTGTCAGTGGTTGGGGTGCTGTGGTTCATATTGTCGAAAAAGATAA
GATCAGACTCGCCATTTAAAGACAAGAATGGACTAGTACTAATATGCAAAAAAGTGATAAAC
AATGTTCTGAAGTACTTCTGTAAAATTCTATGAACACATAGTGA ACTCTTACTAATAAATGTAA
AAATCGTTTTCAATGTAAAAAAA

11. ATP synthase subunit 8

GGAGCCCTACCAACAATCTCAGCAATCCTATTAAGCCTTATATCATTAAATATATTAGGACTAT
TACCTTATACAATTTCAATAACATCCCACTTAATGACA ACTCTATCATTAGGGCTACCAATCTGA
GGCTCAATAATTCTCATCTCATTAGCAATTAGCAGGAAAACCACTAGGGCGCATTACTCCCC
CCAAACACCCCTTCATTTATTGCCAGGTTCTGTTACTTGTAGAAGCCCTAAGATCTTTAATTC
GCCCCCTGACCCTCTCTTTCCGTTTAGCAGCTAACATCAGAGCTGGACACGTAATCCTAGGA
ATAATATCATCTGGTGCCACTTATCTCATATATACACACCCAACAGCTGCTATTCTACCAATAA
TAGTAAGAAGCTTTTATTTTGTATTGAGATCGCAATTTGCGCAGTACAAGCATTGTATTGT
CTTCTTATTGCTATGTA CTCTAATGATTACATTAGATAACACAATAAGCTTAAATTTTAATAATTA
TTCCAAATTACATACTCCAATTATATAACCTTAT

12. Ribosomal protein S8

GGCCAGAGTGGTTCGATGTGATGGTTATATCTTGGAAGGCAAAGA ACTTGAGTTCTACGTCAA
GAAAATTAGGGCAAAGAAGAGCAAATAGATTGTA AAAATGCTGTTCAAACAAAATAACAATT
TGAAAACAA

13. Myosin heavy chain

GCGACGACGCTACCGCAAGATGTGCGACCAGAGAATTGGTATCGCTGTTATCCGGAGGAAT
GTGAGGAAGTATTTGTTCTTGAAGAACTGGGCTTGGTGGAACTTTATACCAAGGTGAAACCA
TTGTTGAACGTCGCGCAACTGAAGAAGAAATGAAACAGAAAAGAAGAGGAGTTGGCAAACT
TAAAGATGATTTAGCAAAGGAGAAAAGAACTGAGACAATCACTTGAGAATGAGAAGACGGAATT
GATTCA

14. Heletron 5 helitron-like transposon replicase/helicase/endonuclease

GACTGGTTTTATAGAGTTGAGTATCAACAAAGAGATTCGCCTCATATTCATATGTTAATATGGT

AGAAGATGCTCCAGTTTTTGGTGTTAATAATGACATACAAGTGACAGCATTATTGATAAAATA
ATTAGCTGTAAAAAACCATGGGATAATCCTCAGTTACTTAACTTGTTAACAGGCAAGTGCATC
GCCATTCCCTCACTTGCTA

15. Triacylglycerol lipase-like protein

GAAAGCACGGTCATTGCATATGACAGACAAACACCCCAAGAACAACCTTGTTTCTATACACCTTT
GGCCAGCCAAGAGTCGGTGATTACCAATACGCCTTACAACATGATAGACTGGTACCCATAAG
CTTTAGGGTTACCCACTATCGAGATCCCGTGGTTCACCTGCCACCTGCAAACTCTCTTGC
CTGGAACACCCTGTATCGCATAACCCGGGGACCCTACCACCATGGCAAGGAGATTTACTAT
GGCAACACCGTGATGACGAAAACATCGTCTTATAGAAAGTGTGAGGGATTGCCACACAACGA
AGACCTGAAATGCAGTAACAACCCTAAGGTATGGGTAAAGTGCTTCACCAACATAAAGAGCT
GTATCAATGATCATCGGCAGTATTTTGGAGTTCGTGTTGGAGTCTGGTGGCGAGGTTAGAGA
CACGAAGAAGCTAAGAACACCCAATATCCTTATATAAAGAGTGGAATTAGACATTTAATCTGCA
TGCTTTTTCTTGCAACGTTATAGAACTA

16. Bromodomain adjacent to zinc finger domain

ACAACCCATCAAAGAGGTGTCCTTACCGTAGTTCATTATACCCGACATAGCCGCTTGGATAA
TTTATGTGATGAAGTTTTCAACTATATACGAGATCGATACCAAGAAGGCGAAGAAGTTGATGTA
AAATATAAAGGAGAGAAGTTGGTTGGCTTTATCCACAATGTTATTGAACCTGAAATTCTAACAA
ATGGGTTTACTCCCCAAATCAAAGAATAAACTGAATTCACCATCTGGTAAATCTGGAAAATC
TCAAGAAGTTATTGTCTTGGGCAATGAGAAAAATGAAAGAACAGAAGTACAGAGCCCCAA

17. Ribosomal protein L6

GTGGTCATTCTCTTGGCTGGAAGACACCAGGGCAAAGAGTTATCTTCTTGAAACAATTGCCT
GGTGGTTTGTCTTGTCACTGGCCCGTACAAAATCAACGGTGTACCCCTCCGTCGTGTTCC
CCAGTCCTACGTGATTGCCACACAGACCAAGATTGACATCAGTGGTGTAGACCTTCCAGAAC
GTCTCGATGACGATTACTTCAAACGAGAGAAAACGGCAAAGAAAACGAACTGAGGAAAATGTTT
GAGGAAGAGAAAAGAGGAGGTCACTGTTAGTGATGAAAGGAAGGAAGATCAAAAAGCCGTGC
ATGAACAACCTTGCTCCTTTGATATCAAATGAAGCACATTTGAAGAATTACCTCAAGACTTTGTT
CAGTTTGAGAAAAGGACAATATCCTCATGAAATGATCTTCTAAATTTGTACAAGATTAAGCTAC
TAATAAAATCTTGCCAACCATAAA

18. ADAM metallopeptidase domain 19

TACTGATCTAAAGACGGTGAATGGTTTATCCTGCAAAAATGGACAGGGATATTGTTATAAAGG
GGAATGTACAACGTATAATGAGCAATGTAACATTTTGTGGTTTGGCGGTGGTTTTAAAGCGAA
TGATGTTTGTACCAAAGGTATAATCTACGTGGCGATATTCATGGTACTGCAAAAGATATTCA
GCAACAAGTTACAAGGCTTGTACACCAGAAAATGTTAAATGTGGCAAATTATGGTGTGTTGGT
AACGGCCACTTAGAAGCAAAAAATTTTGGCTTTGGTATTAATGGAGTCGTGGTACTATAAATG
GTCACACTTGTGCTCTGCTGTGATCAACATGAATCCAGGTAAACCGGCATTGGGCACTGTC
TTAGATGGGACAAAATGTGGGAGCGGCAAGGTTTGTCAAGACAATAAGTGTGTGCTACTTTCA
GCGGCTTATGGTGGGCAGCCAAAATGCACAAATAACTGTAACGGACATGGGGTCTGTAATGA

GAAGGGCAACTGCCATTGTAATCCAGGATGGAAATGTCCTGATTGTTCCAAATCG

19. Calcium dependent mitochondrial carrier protein

GAATTTGAGAAGTATGACACCAACGGCGATGGTAAAATCAGCGAAGAAGAGTTTAAGAAGAC
CCTGTCTCTGTCAGATAAGGATGCGGCCGACCTTTTCAAAGCTTAGATAAAGATGGTAATGG
CGTCGATTGCAATGAGTTGACAAAAAGCAACTTGGAGTTCAGATGTAAAACAAAGGCATGCC
TGATAACAAGAATGGAAAATCCCAAGATGAGTTTTTGGAAAGATGAGTGAAATGAACAGCCCTT
CCTTTGTTTCAACCGTACCTCATTGACATCTAACGATTAGTAATGCATGCAATTTAGGATTAA
CTTTTGTGATAATCATAATGAACTACAGTAGCTACTTTAATACTTTTCAATAAATCCTTCTTAAG
GCAA

20. Poly (ADP-ribose) polymerase 4

ATTCAGTTTTTCTGCTGGTATTGGCTCACACAAAATGATTTCTAACAATATATCCAGTCAAATA
TTGAACAAAGATAGTCTATCGCCCTCTGTGAAATCGCTTGTTTCATAGCATTGGTCCGACGCG
ATTGGCGAGCTAAGTTCGTTACTTAGCGAACCGGTTGAACGGCTGAAACTGGAAAACATTGC
TAAAGCTGAAGGAATATTACAAGCTATTCGCGAAATTTTGGACAAAAACGAGCCTTCTGATGA
AACTTGAGGAAATATTCCGAGGAATTTACTCTCTCGTTCCACACAACGAAA

21. Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase

GATGATGTCTGGAAAGACTGACGTGAAAACACTACATGCCTTTGTCCGTACATGGTCAAACCCC
ATTGATTGGGAAGACTTCTGCAAGGCTTCCGTCAATGTTCCCACTGTTGGAGCCCGACTTTGT
GGCAAAAAGAATTGGTGGACGGCATGCTACGGAACAAGAACATGGTCATCCTGCCAAAAATAA
TGACCTTGCATTTGGCGTTACCAATGTTTCATGCCAGAAAACGGATTGAGAATGCTATACCAGT
TTTATCGCATAACAGTTGAGGAGGAAACGGCAACAACCATGTTTCAACGGCGAGAACAAGCT
GCTGCAGTCGAGGAAAAGAAGTCGGAATAAGAATGCACAAAATTACGTGGCTTAAAGAAGGA
ATACAAGAATTGTCAAAGCGAACTTTGAAATGAATTAGTTGTTAATTGCTTAGGGAGAAATTG
AACTTTAGCATGTCAATATCTTTAGTGACCGTCCTTAGGAGGAACTTGAAACTTTATTCTTTTT
AATGTCAATATCTTTAGCTATCATGTATTGTGTGATTATTCTTTTATGGAATATATTTTTAAATT
TGAA

22. Collagen, type XXV

GCCGGGTCTACCTGGTATCCGTGGTATAAAAGGATTCCCCGGAATCCCTGGTTGTAAAGGTC
AACCGGGTGAGCCTGGTACAGCCAATGGCGCGGTTGGTTTAGATGGACCACCAGGGCCCCG
AAGGTGATCGAGGACCAAAAGGTCCAAAGGGTATCCCGTATCTGGTCCTACGCCGGATCA
AAAAGGTAGCAAGGGATCACTGGGTGATACAGGAGCCAAAGGAATAGAGGGACCAAGAGGC
AGAGCTGGTCCAAAAGGTGATGTGGGAAAAAAGGGTATCGATGGTGAGCAGGGTCTTGAAG
GTGAACAAGGTGATAGGGGTAAACCGGGAGATTACCCAAACAGGTAGATGAAGTTACAGAT
CATCTGAAAGGAATGCGGGGAGAGGAAGGTG

23. Peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase

CATGGGTCCCGAAATGCACCCGTTTTCGTTTCAGAGTTCATACTCACAAGTTAGGCTACGTTGT

GACTGGGTACAGAATACGTGATGGTAAATGGCATCTCATAGGAAAGGGCGACCCAAGACGA
CCTCAGGCATTTTATAAAGTTGACAATGAAGATTCCCTTCTTCTGAGATACACTGGCGGCT
AGATGTACTTACAATTCTATGAAGCGAGATCACACCACGTATATTGGGGCGACAGGTGCGGA
CGAGATGTGCAATTTCTACATGATGTAAGTGGTATGACCCGGCCGAAGGTCAGTCCACCGATG
CATGTTTTAATTCTGAAATACCCGATGATGACTACCCCAAGGATACTAACGTACCACTACCTG
CCCAGAAGAAAATGAAAATGAAACGGGATATGGATGATTCTGGTAAAACGTCTTCGATTCTG
AAGATGAAGAATCATGGCTTTAAATACAAAATATCAAGACTTCAAGATTAATTCTACCTATACTA
TATGTAAGTAACTTATTGCTAAATAGAAATTTAACCCTAATAATATATTGATAACTGATAATA
CGAGAACTTAGCTTAACTTAATCATCAAGTTCATTATAATTTTCTGTATGCAAATACACAGA
AGTCTATAAA

24. Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor

GTATTTAACGAAACGTTTTATCGGAGAATACCAGAGCAGTGTTGAAACGCACGCCTCGACTG
AGGTTGAAATTGACGAAGAAAAAGTTGTCGTGAAATATTTGATACAAGTGCTTCGGAAGAGA
AGATTTTGGAGCACATCAACTGGGCAGACGGATTCACTTCTGGTCTTTTCAATCACAGATTACT
GGAGCTTATATGAAGTAGCCAGACTATCGTCCATCATATCGCAGACGAAAAA

6.3.2. PAH 노출에 대한 특이 유전자 후보

PAH 노출에 반응하여 발현량이 변화된 유전자들의 염기서열을 아래에 나타내었다. 발현량이 증가된 유전자들은 1-18이며, 감소된 유전자들은 19-32이다.

1. Calmodulin

AATTACGTCATGTGATGACAAATCTTGGTGAAAAATTGACAGATGAAGAGGTTGATGAGATGA
TCAGAGAAGCTGATATTGATGGAGATGGACAAGTTAACTATGAAGAATTTGTGAAAATGATGA
CTTCCAAGTAGATGTTTCAATTTTACGACAAGTTCTGGTTATGACATGGCCACGAATAATTTCT
GATGGCTGACTTAGCTCCTGCCTCCCATATTAATAACTTTTTATTTCACTTTTCATTTAATTGTA
TTTTTATTTAATGTAAGCACTAGGTTAGGAATAAGAATACTATTCAAGCAATCTATTAGTTGAAT
ATTTATACGTAAGTAGATATTGTTGCATGGTATATAGATGTAAATTATACTTAATGTAATTTCC
TGTCTTAGTTTTCCAACCACAATGTAATTAATAACCCATTTTATTAATAA

2. Cytosolic malate dehydrogenase

GCACGAATTATAAACCTGTCAGGGAATTGGTTAACGATGACCACTGGCTGCACGGAGAGTTC
ATTACGACAGTCCAAAAGCGTGGCGCGGCAGTCATTGCCGCTCGTAACTCTCCAGCGCTAT
GTCTGCTGCAAACGCGATCTGTGATCACATGAGAACTGGTGGTTTGGAACATCTGAGGGTC
GTTGGGTATCCATGGGAGTATATTCTGATGGTTCGTTGTATGGCATAACCGGAGGGAATCATT
ATTCCATGCCCGTAACAATTGATGGCAATCGTGATTATAAAGTTGTTTCCGACTTGAGCATTGA
CGATTTCTCTCGCGAGAAAATGGATTTGACCGCTCAAGAACTCGTCAAGAGAAAGAAGCCG
CATTGCTTTTCTGTCTGCATGACTAGACGGTGAACATTGTAACCTGTAGAACAGCGGTTGAT
AGATTGTAATAGGGCTTAATAGAAGAATTGTATACAAGAGTTTCGATAATACATTCTGATTA

3. 40S ribosomal protein S23

CATGCGAAGGGAATCGTACTCGAGAAAGTAGGTGTGAGGCCAAACAGCCTAACTCGGCCA
TCCGTAAGTGTGTCAGGGTCCAGCTCATCAAGAACGGAAAGAAAATCACCGCCTTCGTGCC
CGTGATGGTTGCCTCAACTACATTGAAGAGAACGACGAGGTGTTGGTAGCCGGGTTCCGTA
GGAAGGGTACGCGCGTGGGAGATATCCCCGGAGTACGATTCAAGATCGTCAAGGTCGCCAA
CGTCTCCCTACTCGCCCTGTACAAGGAGAAGAAGGAGAGGCCTCGATCATAAACATTCTCTA
CAGTTATATAACAATA

4. Protein disulfide isomerase

GGCGGACATCGTAAACAATTAGCCCCAATCTGGGACAACTAGCTGAAAAATACAAAGATGAT
GAAAGTCTTGTTATTGCCAAGATGGACGCAACCAAAAATGAAATTGAAGAAGTTCGTGTTGAT
AGCTTCCCAACTCAAATGGTTCCCAAAAGACTCTGATGAGATTGTTGATTACACTGGTGGAA
CGAACACTGGACGATCTGGTAAAATTCATTGATTCTGGTGGTAAAGATATGCCTGCAGAAGAA
CCTGCTCCTGGAGAAGGCGAGGAGGATGCTGGGGCTGAGGCAGAGGAAGGAGAGGAGGA
GGCTGGTGAGGAAGCAGTCGAGGAAGAAGATGTTAAATCCAAGGACGAACTATAAAGGACAA
CACAATAATATGTGTACGGTTGCCCTCCACAATTTGGCGAACATGCAACATGGACGACTGTTT
TTGGTCGCATGAATATTATACGTATTTCCCTTTATAAATTATTTTAGATTTAATATTCTTTAGGTA
AGATATGTTTTGATGCAGTTGTTGTGTGCAATAAAGGACTTTTTTCAG

5. Dipeptidyl aminopeptidase IV

TGGGGAAATAGTCACAACAGTCTGGTTTTTCGTGTCAGGAAACGATGTATATTGGATAGAATCG
GTAGAACGACCCAACGCCATTCGTATTACGAAGACTGGGAAAAAAGAATCATGTTTAATGGC
ATTCCTGATTGGGTTTACGAAGAGGAAATCCTTGGTAAAAGACCTGCGCTTGTTGTTTCCCCA
GACGACAAATATTTGTGTTTTGCGAGTTTTAACGACACAGACGTGCGACTTTTCAAATAGCCT
ACTATGGTAAACCTATAACAGCGTACACCCGCATTCAAGATATCGCTTATCCAAAACCTGGAA
CGAAAAATCCTGATGTACATATTTATATTTACGATATCA

6. Proteasome beta 3 subunit

TGCAGAAGATTTTGTGTTAGCGGCACCTGACTGAGCAGATGTATGGTATGTGCGAGTCGC
TATGGCAACCTGATTTGGCGCCGGACGATTTGTTGAGACCATCTCACAAAGCACTCATGAAC
GCAGTCGACCGTGATGCTGTCAGTGGTTGGGGTGTGTTGTTTTCATATTGTCGAAAAAGATAA
GATCACGACTCGCCATTTAAAGACAAGAATGGACTAGTACTAATATGCAAAAAAGTGATAAAC
AATGTTCTGAAGTACTTCTGTAAAATTCTATGAACACATAGTGAACCTTACTAATAAATGTTAA
AAATCGTTTTCAATGTAAAAAAA

7. ATP synthase F0 subunit 6

GGAGCCCTACCAACAATCTCAGCAATCCTATTAAGCCTTATATCATTAAATATATTAGGACTAT
TACCTTATAACAATTTCAATAACATCCCACTTAATGACAACTCTATCATTAGGGCTACCAATCTGA
GGCTCAATAATTCTCATCTCATTAGCAATTAGCAGGAAAACCACTAGGGCGCATTACTCCCC
CCAAACACCCCTTCATTTATTGCCAGGTTCTGTTACTTGTAGAAGCCCTAAGATCTTTAATTC

GCCCCCTGACCCTCTCTTTCCGTTTAGCAGCTAACATCAGAGCTGGACACGTAATCCTAGGA
ATAATATCATCTGGTGCCACTTATCTCATATATACACACCCCAACAGCTGCTATTCTACCAATAA
TAGTAAGAAGCTTTTATTTTGTATTTCGAGATCGCAATTTGCGCAGTACAAGCATTGTATTGT
CTTCTTATTGCTATGTA CTCTAATGATTACATTAGATAACACAATAAGCTTAAATTTTAATAATTA
TTCCAAATTACATACTCCAATTATATAACCTTAT

8. Ribosomal protein S8

GGCCAGAGTGGTTCGATGTGATGGTTATATCTTGGAAGGCAAAGAAGCTTGAGTTCTACGTCAA
GAAAATTAGGGCAAAGAAGAGCAAATAGATTGTAAAATGCTGTTCAAACAAAATAACAATT
TGAAAACAA

9. Myosin heavy chain

GCGACGACGCTACCGCAAGATGTGCGACCAGAGAATTGGTATCGCTGTTATCCGGAGGAAT
GTGAGGAAGTATTTGTTCTTGAAGAACTGGGCTTGGTGGAACTTTATACCAAGGTGAAACCA
TTGTTGAACGTCGCGCAACTGAAGAAGAAATGAAACAGAAAGAAGAGGAGTTGGCAAACT
TAAAGATGATTTAGCAAAGGAGAAAGAACTGAGACAATCACTTGAGAATGAGAAGACGGAATT
GATTCA

10. MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit

CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
CGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACG
ACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACT
CATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
GGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACAC
TATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAG
GCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATT

11. Heletron 5 helitron-like transposon replicase/helicase/endonuclease

GACTGGTTTTATAGAGTTGAGTATCAACAAAGAGATTCGCCTCATATTCATATGTTAATATGGT
AGAAGATGCTCCAGTTTTTGGTGTTAATAATGACATACAAGTGACAGCATTATTGATAAAAATA
ATTAGCTGTAAAAAACCATGGGATAATCCTCAGTTACTTAACTTGTTAACAGGCAAGTGCATC
GCCATTCCCTCACTTGCTA

12. Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1

CGGGTTACAAAACGACGGATGTACTTGTAGAAGACACGCTCATCTTATCGGGCGTCCGTGCG
TACAACAGAGGTATCGGCGTTTCGATGGTGTCATACGGTTCGAGGAGTCGGTCTGGTACCATC
TTGAACTTGCATTATAGAGATCTATAATGCTGCGAGCCAAAATGGCAGATTTTGTAAACAGT
CTGACGTTACTATATAAACTTTAATTGAGTACGTACCACTTGTTTTGGTAATAACAATATATTA
TAATTATAGAATGCAATATTTTCCATAAAATTGTATCCAAAATAATTTCTAGATTTGATTGTATT
TTATTGATATCGTATTTTATTTTGGTGATGAGTTTAAAAACCATAACGTTTTGCTCAATATAGTA
ATCCTCAATGGCA

13. Allene oxide synthase/8R-lipoxygenase fusion protein

AGATTTGCATGACGTAATCGTGCAGGGAATTTCCGACCTAGATATTATTAACAAATGTTAAATC
ATACCTACACATTTGGATGCTAAATATAAAATTGTTATTTGATCGAAGCCCAATTCATTTCCATC
CAGTCAGATTTTCGCTATTCATCTAATGTGCGACATCACTGCAGATAATATTGGTTGGATTAGTAA
ACAGTTGATTATATTGTAAAGCACCTGTCAAGTTACAATTGCTTCCAAGTTTTCATAAA

14. Triacylglycerol lipase-like protein

GAAAGCACGGTCATTGCATATGACAGACAAACACCCCAAGAACAACCTTGTTTCTATACACCTTT
GGCCAGCCAAGAGTCGGTGATTACCAATACGCCTTACAACATGATAGACTGGTACCCATAAG
CTTTAGGGTTACCCACTATCGAGATCCCGTGGTTCACCTGCCACCTGCAAACTCTCTTGC
CTGGAACACCCTGTATCGCATAACCCGGGGGACCCTACCACCATGGCAAGGAGATTTACTAT
GGCAACACCGTGATGACGAAAACATCGTCTTATAGAAAGTGTGAGGGATTGCCACACAACGA
AGACCTGAAATGCAGTAACAACCCTAAGGTATGGGTAAAGTGCTTCACCAACATAAAGAGCT
GTATCAATGATCATCGGCAGTATTTTGGAGTTCGTGTTGGAGTCTGGTGGCGAGGTTAGAGA
CACGAAGAAGCTAAGAACACCCAATATCCTTATATAAAGAGTGGAATTAGACATTTAATCTGCA
TGCTTTTTCTTGTGCAACGTTATAGAACTA

15. bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A

ACAACCCATCAAAGAGGTGTCCTTACCGTAGTTCATTATACCCGACATAGCCGCTTGGATAA
TTTATGTGATGAAGTTTTCAACTATATACGAGATCGATACCAAGAAGGCCGAAGAAGTTGATGTA
AAATATAAAGGAGAGAAGTTGGTTGGCTTTATCCACAATGTTATTGAACCTGAAATTCTAACAA
ATGGGTTTGACTCCCCCAAATCAAAGAATAAACTGAATTCACCATCTGGTAAATCTGGAAAATC
TCAAGAAGTTATTGTCTTGGGCAATGAGAAAAATGAAAGAACAGAAGTACAGAGCCCCAA

16. Ribosomal protein L6

GTGGTCATTCTCTTGGCTGGAAGACACCAGGGCAAAGAGTTATCTTCTTGAAACAATTGCCT
GGTGGTTTGCTCCTTGTCACTGGCCCGTACAAAATCAACGGTGTACCCCTCCGTCGTGTTCC
CCAGTCCTACGTGATTGCCACACAGACCAAGATTGACATCAGTGGTGTAGACCTTCCAGAAC
GTCTCGATGACGATTACTTCAAACGAGAGAAAACGGCAAAGAAAACGAACTGAGGAAAATGTTT
GAGGAAGAGAAAAGAGGAGGTCACTGTTAGTGATGAAAGGAAGGAAGATCAAAAAGCCGTCG
ATGAACAACCTTGCTCCTTTGATATCAAATGAAGCACATTTGAAGAATTACCTCAAGACTTTGTT
CAGTTTGAGAAAGGGACAATATCCTCATGAAATGATCTTCTAAATTTGTACAAGATTAAGCTAC
TAATAAAATCTTGCCAACCATAAA

17. Short-chain dehydrogenase/reductase 9

GATGATGTCTGGAAAGACTGACGTGAAAACACTACATGCCTTTGTCCGTACATGGTCAAACCCC
ATTGATTGGGAAGACTTCTGCAAGGCTTCCGTCAATGTTCCCACTGTTGGAGCCCGACTTTGT
GGCAAAGAATTGGTGGACGGCATGCTACGGAACAAGAACATGGTCATCCTGCCAAAAATAA
TGACCTTGCAATTTGGCGTTACCAATGTTTCATGCCAGAAAACGGATTGAGAATGCTATACCAGT
TTTATCGCATAACAGTTGAGGAGGAAACGGCAACAACCATGTTTCAACGGCGAGAACAAGCT

GCTGCAGTCGAGGAAAAGAAGTCGGAATAAGAATGCACAAAATTACGTGGCTTAAAGAAGGA
ATACAAGAATTGTCAAAGCGAACTTTGAAATGAATTAGTTGTTAATTGCTTAGGGAGAAATTG
AACTTTAGCATGTCAATATCTTTAGTGACCGTCCTTAGGAGGAACTTGAAACTTTATTCTTTTT
AATGTCAATATCTTTAGCTATCATGTATTGTGTGATTTATTCTTTTATGGAATATATTTTTAAATT
TGAA

18. Cardiac troponin C

GTTGGCCGCAGTAGGTTTGGGGTCTGGGGCCTTATCTCGCTACAGAGTGTGTGGCACGAAG
ACGGTGTATTTGTATCCACAGTGTGCCCCACTAATCTGCATCAGGTAGGGGTACGGGTTTG
TTACAATACCTATCGAATCTGCGGCCGTAAACGATCGATTGGCAGCCAAAACGACATCGAAG
TTGGTTTTCCCTGCAATTTTACGATATATGACACCGACAAAGATGGATATATCACCCATAAAGA
GTTCAAGGCTGCCACAAGATTAGAGGAGAATGCGGAGGCCATTTTCAAGGGTGCAGACAAG
AACGACGACGGTCAATCGATTGTGACGAGTTCAAGAAAGCAAATGGGAGTTTGAATGCAA
ACCTATCGGTGGATGCAACGACGAAACCCAAGATGAGTCTTGAATTTGAGTAATTAACATT
CAGCATTTCTGATTATATTTTCATATCGACTAGGACTATACCACTCTTAAATGATAAGTAACGTAA
TTTACTTCTTTTTGTCATCGTTTGCACATTATCGAGCATTCTCTTGTGTAATAAGTAATGTTCTA
ATAAAAGATGCACAGACATAAA

19. Calcium dependent mitochondrial carrier protein

GAATTTGAGAAGTATGACACCAACGGCGATGGTAAAATCAGCGAAGAAGAGTTTAAAGAAGAC
CCTGTCTCTGTCAGATAAAGGATGCGGCCGACCTTTTCAAAGCTTAGATAAAGATGGTAATGG
CGTCGATTGCAATGAGTTGACAAAAAGCAACTTGGAGTTCAGATGTAAAACAAAGGCATGCCC
TGATAACAAGAATGGAAAATCCCAAGATGAGTTTTTGGAAAGATGAGTGAAATGAACAGCCCTT
CCTTTGTTTCAACCGTACCTCATTTGACATCTAACGATTAGTAATGCATGCAATTTAGGATTAA
CTTTTTGTCATAATCATAATGAACTACAGTAGCTACTTTAATACTTTTTCAATAAATCCTTCTTAAG
GCAA

20. Mannose-binding lectin 2

CGTTTGCACGTTCTAAAGGCTCGCGACAAACCTGGGTTGGCGTTTTTAGGCGATATGACAAA
CGTTTTATCAACGTTGAAGGGAGAGACCAAACCTACACCAACTGGAACCGAGGAGAACCAA
CAACAGCGGCGGTAACGAGAAGTGTGTTGTCATGTATACCAACACTGCTAGATGGAATGACG
CAAGTTGTAATACTCGCCATGATTTGTCGTGAAATCAAACCTTTGATTGTGTGCATAAATCAG
CTAAGTGAGCTTTTTGTGGCCTATACGTCTGGGCCTACAACGTATGTTAGCTATTTGCAGTAA
TAATAAAATCGTGATTTAATC

21. CXXC finger 1 (PHD domain), isoform

AAGAGGAAGAAGACGACACTGGAGATGAAGAAAAAGAATTGCAACCAGTAAAGCAGGATGAA
GAATCCAATGACGAGGAAAAGGAACCTGAGATTGACGCAAAAGACATATCCGAGGATGAAAG
TGACGAGTCTGATGAGAAAGATGAATTGCTGAAAGAAATGGACAAGGTTGGTGCAGAAACCG
AACCAAAAGCGGAGACCGAACCAAAAGCGGAGACTGCAGAAAATGACGAGGAGGAACGAGA
AGAGAATGTTCTGAGCCAATGGTAGAGAAAGATGAAGAGGAAACTGATCCTGATGTACAGG

ATCTTTTCGATGAAAAGTAAATTCAGAATTGGAGCTTTCTAAAGAACAGCACCCAATATTTACTT
CGCGTTAAAATATAGAATGTAGAAATCATGTAGAACGTTGTGTACTTTTTAGTTTACTTTGGTTA
TAATGTAATTGTGCTCACTTTTTGTA

22. Myosin light chain kinase isoform 3A

TTACCAGCCAGGGTAGTGTCCAGAGCCTCAACATAAAGAATATTCAAATTGATGACGAGGGAA
TATATGAATGTGTGGCTACTAATGTCGCAGGAACGGCTAAATGTGACTGCGAGGTTCTAGTTA
ATGATTGAAAAACCAGAGCTTGAAACAATGGCATGATCGTTAAGCTGTAAATACTTCTATTTA
ATGGGCATGGATAGAACAGTTAAGCTAAAGCCTGAGAATTAGGATATGACTATTGACAATTTT
CTTATAAATTTCTTAACCATAGCAAGTCACGCACAGATACAATTTAGCATCTGTATATCTAGGC
AATTAACACTCTCACACTTA

23. Transcriptional regulator, XRE family

GGTCCGCAAGATAGTAGAAGGTAAACAGAAGGATGCAAGAAGGTGAGCTGCAAGTCTCCC
GACTTCTGCCTAAACTGAAACCTTCAGCTGGAGATGCTGGACAATATGTAGCTGTCGTTGAA
TTGGAGGGCAAAGAGTAGTATCAGATCCAGTTACCCTTACAGTGGTATAAACAAAACACTGATG
ATGCCGTTTAAAGCATTCTGACTTAGTGCATTGTTTCATTTAA

24. Uboquitin-ptotein ligase

GGCGGCCGCGGGAATTCGATTGTCTACCAGGCATTGCTTTGGGGGTGCCCAAGCGATGGT
GTACATTGCCTTCTTGAATGCGTCAAGAAGCATGGCCCGGGAACCACCACGTTATAACAAA
GCCCGGTGGTGTGGCGACTATGAAGGAGAAATTGGTGGAGAGGAAATTGAAAAGTTCCCTA
AAAAGTTGATTTGTGAAAGCTTAGATCAACTCCCAAGCGGCAAGACGTGCATAAGAAGATTGT
GCGTCCCGCTGAACCCCTTAAACCAAAACGCATGACAAGAAAACACTGCTGTCCAAAATTAATTGT
TAGCTTTAGTTTGGTGAGGTTTCATGCAGTGATTTTATTATTTTATTATATAAAGTACATAAGT
AACACT

25. Astacin protease 4

AGTATTGACGTCATCGAATACGTCATCAGCTATGTCATCAGATACGTCATCAACTACGTCATC
AGATACGTCACCAACAACCTTTACAACCTGGAACAACGGAAGAAATCATGAAAAGGACATTGAA
GCCGAAATCTTCAACAACAACAACATCAAAAATTTCTCTGAATCCAATGTTTTACCAACGTTT
CAGCAAACAACATCAAATGAAAATCTACCGTTTAGACCAGATTGTTCTGACAAGAGCGACAGA
TGCCCTGAGTTTGCCTAAATAGACGGTTACTGTAATTATCAGCAAGAATTCATGGAAAGAAAC
TGTCCTAAATCATGTGGTTTCTGCTCGTTAGATGTTGCAGGAGGTCCAACCTTCAAAGCGATA
AAGCCAGACACACCAACATCTTTACCTACTACAA

26. Poly (ADP-ribose) polymerase 4

ATTCAGTTTTTCTGCTGGTATTGGCTCACACAAAATGATTTCTAACAATATATCCAGTCAAATA
TTGAACAAAGATAGTCTATCGCCCTCTGTGAAATCGCTTGTTTCATAGCATTGTTGGTCCGACGCG
ATTGGCGAGCTAAGTTCGTTACTTAGCGAACCGGTTGAACGGCTGAAACTGGAAAACATTGC
TAAAGCTGAAGGAATATTACAAGCTATTCGCGAAATTTTGGACAAAACGAGCCTTCTGATGA

AAACTTGAGGAAATATTCCGAGGAATTTTACTCTCTCGTTCCACACAACGAAA

27. ADAM metallopeptidase domain 28 (ADAM28)

TACTGATCTAAAGACGGTGAATGGTTTATCCTGCAAAAATGGACAGGGATATTGTTATAAAGG
GGAATGTACAACGTATAATGAGCAATGTA ACTATTTGTGGTTTGGCGGTGGTTTTAAAGCGAA
TGATGTTTGTACCAAAGGTATAATCTACGTGGCGATATTCATGGTACTGCAAAAAGATATTCA
GCAACAAGTTACAAGGCTTGACACCAGAAAATGTTAAATGTGGCAAATTATGGTGTGTTGGT
AACGGCCACTTAGAAGCAAAAAATTTGGCTTTGGTATTAATGGAGTCGTGGTACTATAAATG
GTCACACTTGTGCTCTGCTGTGATCAACATGAATCCAGGTAAACCGGCATTGGGCACTGTC
TTAGATGGGACAAAATGTGGGAGCGGCAAGGTTTGTCAAGACAATAAGTGTGTGCTACTTTCA
GCGGCTTATGGTGGGCAGCCAAAATGCACAAATAACTGTAACGGACATGGGGTCTGTAATGA
GAAGGGCAACTGCCATTGTAATCCAGGATGGAAATGTCCTGATTGTTCCAAATCG

28. Collagen, type XXV

GCCGGGTCTACCTGGTATCCGTGGTATAAAAGGATTCCCCGGAATCCCTGGTTGTAAAGGTC
AACCGGGTGAGCCTGGTACAGCCAATGGCGCGGTTGGTTTAGATGGACCACCAGGGCCCCG
AAGGTGATCGAGGACCAAAGGTCCAAAGGGTATCCCGTATCTGGTCCTACGCCGGATCA
AAAAGGTAGCAAGGGATCACTGGGTGATACAGGAGCCAAAGGAATAGAGGGACCAAGAGGC
AGAGCTGGTCCAAAAGGTGATGTGGGAAAAAAGGGTATCGATGGTGAGCAGGGTCTTGAAG
GTGAACAAGGTGATAGGGGTAAACCGGGAGATTCACCCAAACAGGTAGATGAAGTTACAGAT
CATCTGAAAGGAATGCGGGGAGAGGAAGGTG

29. Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3

TGAGGCGTTGTTTCGCCCTTCAGGAAATCTATTTGAAATATAATAAACCCAAAGCTATGCTGTC
GAAGTTTTTTGATACGCTGTATGATGAAGAAGTCATAACAGAGGAGGCGTTTATGAATTGGAA
ACAAGACGAGAACCCAGCAGACAAGAAGCCAAAGGTCTGCACTTCAGGCGACGTCTTCG
TTTTTTGATTGGCTCCAATCTGCTGTGCTGGACGGCGAGAAATAAACTAATGCGAAAAGTGAA
ATGGCTATAATTTGAATGCGAACGCGAAGAATGACTGTTGCACGAGGCATGAATTGTAATCCG
GAAGAGAAATTAGCAAACAAGCCTAGTTAGAGTAGAAATTTGTTTGCTCAAATCTGAGAACAT
GTTATACCTGTGCGCCTCCGAGGACAAACTTTTTCAAAGTCTTTATTTATAGAATTTATTTGGTC
AAGAATCTATCTTATTTCTTTTTGGGAAATGGAGATATAAAGTATACTGTGAAAATAATAAATA
ATTGATTATTGC

30. Peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase

CATGGGTCCCGAAATGCACCCGTTTGC GTTCAGAGTTCATACTCACAAGTTAGGCTACGTTGT
GACTGGGTACAGAATACGTGATGGTAAATGGCATCTCATAGGAAAGGGCGACCCAAGACGA
CCTCAGGCATTTTATAAAGTTGACAATGAAGATTCCCTTCTTCTGGAGATACACTGGCGGCT
AGATGTA CTTACAATTCTATGAAGCGAGATCACACCACGTATATTGGGGCGACAGGTGCGGA
CGAGATGTGCAATTTCTACATGATGTA CTGTTGATGACCCGGCCGAAGGTCAGTCCACCGATG
CATGTTTTAATTCTGAAATACCCGATGATGACTACCCCAAGGATACTAACGTACCACTACCTG
CCCAGAAGAAAATGAAATGAAACGGGATATGGATGATTCTGGTAAAACGTCTTCGATTCTG

AAGATGAAGAATCATGGCTTTAAATACAAAATATCAAGACTTCAAGATTAATTCTACCTATACTA
TATGTACTGTAACTTATTGCTAAATAGAAATTTAACCCTAATAATATATTGATAACTGATAATA
CGAGAACTTAGCTTAACTTAATCATCAAGTTCATTTCATAATTTTCCTGTATGCAAATACACAGA
AGTCTATAAA

31. Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor

GTATTTAACGAAACGTTTTATCGGAGAATACCAGAGCAGTGTTGAAACGCACGCCTCGACTG
AGGTTGAAATTGACGAAGAAAAAGTTGTCGTGGAATATTTGATACAAGTGCTTCGGAAGAGA
AGATTTTGGAGCACATCAACTGGGCAGACGGATTCTGCTTTTCAATCACAGATTACT
GGAGCTTATATGAAGTAGCCAGACTATCGTCCATCATATCGCAGACGAAAAA

32. Small acid-soluble spore protein Tlp

CTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTTCGATTGTCTACCAGGCATTTCGCTTCAGGGG
CTGCGGATCCACAAGACTATGGACGACATCAGAAGATTCTTAGAAACGTATGGTGAAGGACT
ACATTTTGGATAAAGGAATATTTACAAGAAATAATCAACAAACACCGTCAATCTACGGACGGA
ATTCGTGAAGAATTATAGATAGGTCATAGTTACAGTATGTCTATCTAAGCTAGTGAATCTAAT
TCCTATCTCATGCCATTTAAATGCTTAAGATTTGAATCAATTTCCAATCTCACGCAAAAA

6.4. 연구결과에 대한 고찰

분홍바다맨드라미를 대상으로 환경 스트레스에 반응하는 유전자들을 분리하기 위해 differential display PCR법을 적용하여, 고온 스트레스에 반응하는 24종의 유전자 및 PAH 오염에 대응하는 32종의 유전자를 분리하였다. 본 연구의 목적은 환경 스트레스에 반응하는 유전자들의 분리 뿐 아니라, 환경 변화의 평가에 활용할 수 있는 cDNA chip과 같은 간단하고 효율적인 시스템의 개발에 있다. 각 후보 유전자들은 연산호의 건강 상태를 진단할 수 있는 잠재적 생물지표이다. 또한 연산호의 건강 상태는 연산호 군락 전체의 건강 상태를 반영할 것이다. 아래에서는 분리된 유전자들의 기능을 고려하여 예측한 고온 스트레스에 대한 연산호의 반응에 대해 논해보고자 한다. PAH 노출에 대한 연산호의 반응에 대해서는 현재 분석 중에 있다.

6.4.1. 온도 상승에 의해 유도된 산화스트레스

Mitochondria는 세포의 에너지원인 ATP 합성뿐 만 아니라, 세포 사멸에도 실질적인 역할을 한다(Duchen, 2000). 본 연구의 분석에서 mitochondria에 의해 암호화되어 있는 ATP synthase(ATPase) subunit 8의 유전자 발현이 유도되었다. Mitochondria는 매우 민감한 세포내 기관으로 세포내 산화스트레스의 주 공격대상이 된다. 예를 들어, 40%의 에탄올에 노출된 쥐에서

ATPase subunit 8 mRNA가 증가되는 것이 확인된 바 있다(Pan et al., 2008).

산화스트레스는 mitochondria로부터 세포질로의 칼슘 방출을 유도하는데, 이에 의해 apoptosis를 일으키는 일련의 신호전달이 시작된다. 본 연구에서는 두 종류의 칼슘 관련 단백질 유전자가 분리되었다. 하나는 칼슘 결합 단백질인 calmodulin(CaM)인데, 세포질내의 칼슘 이온에 의해 영향을 받아, 근육 수축, 수정, 세포 증식 및 apoptosis와 같은 다양한 생물학적 반응을 조절한다(Chin et al., 2000; Hoeflich et al., 2002). 또 CaM은 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Moreto et al., 2009). 또 하나의 분리된 칼슘 관련 단백질은 칼슘 이온 buffering 단백질인 calreticulin이다. 이 단백질은 소포체의 공간에서 발견되며, 칼슘 이온 항상성을 조절함으로써 분자샤페론과 유전자 발현을 조절하는 역할을 한다(Gelebart et al., 2005). Calreticulin은 빈산소 환경에 대한 항산화 기능도 갖고 있으며(Jia et al., 2008), 전립선 암을 억제하는 역할도 하는 것으로 최근 확인된 바 있다(Alur et al., 2009).

세포질로부터 mitochondria로의 칼슘 수송은 칼슘 uniport에 의해 일어나거나(Carafoli, 2003), calcium-binding mitochondria carrier(CaMCs)에 의하는 것으로 알려져 있다(del Arco et al., 1998). 본 연구에서는 calcium-dependent mitochondria carrier protein의 유전자 발현 수준이 고온 노출에 의해 저해되는 것이 확인되었고, CaM과 calreticulin 유전자의 발현 수준은 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 해수온이 높아질 경우, 이는 연산호에게 산화스트레스로 작용하고, 이에 따라 mitochondria내의 칼슘이 세포질로 방출될 것이고, 과도한 세포질내의 칼슘 농도는 칼슘 이온 대사와 관련된 유전자들의 전사를 유도하게 될 것으로 생각된다.

6.4.2. 라이보솜 구조

본 연구에서는 다섯 종류의 라이보솜 단백질의 발현이 증가되는 것이 확인되었다. 라이보솜은 단백질 합성과 관련된 세포내 구조물로서, 라이보솜 단백질은 rRNA의 구성과 삼차구조의 안정화에 기여하는 단백질이다.

6.4.3. 신경계 장애

Polyglutamine binding protein 1(PQBP1)은 주로 신경세포에 존재한다. 생쥐에서는 이 유전자의 과발현에 의해 운동신경의 질환과 비슷한 표현형이 관찰되기도 하였다(Okuda et al., 2003). 본 연구에서는 고온에 노출된 연산

호에서 PQBP1 유전자의 발현이 유도되는 것이 확인되었다. 이는 연산호가 고온에 노출되면 신경계의 장애가 유도될 수도 있음을 암시한다.

6.4.4. 자기방어 기전

Ferritin은 세포내의 철 저장 단백질로서, 철이 이용할 수 있는 형태의 가용성, 비독성 상태가 될 수 있도록 유지하는 역할을 한다(Arosio et al., 2002). Ferritin mRNA의 발현은 tumor necrosis factor- α 의 발현 이후에 증가되는 것으로 확인되기도 하였다(Torti et al., 1988). Ferritin 발현은 cytokine, oxidant, oncogene 및 다른 성장인자를 조절하는 것으로 알려져 있다(Torti et al., 2002). 따라서 ferritin은 세포 스트레스 및 염증으로부터 세포 방어와 관련된 단백질군의 일원으로 인식되고 있다(Barbeito et al., 2009). 본 DD-PCR 분석에서 고온 노출에 대해 ferritin mRNA의 발현이 증가되었다. 이 결과는 수온 상승이 세포 방어 기전을 유도할 수 있음을 시사한다.

Mannose-binding lectin(MBL)은 패턴인식 분자로서 선천성 면역계의 중요한 구성요소이다(Turner, 2003). MBL은 collectin family에 속하며 lectin domain을 갖고 있다. 본 연구에서 MBL 유전자의 전사가 고온 처리에 의해 유도되는 것으로 확인되었는데, 이는 아마도 고온에 의해 병원체의 개체수가 증가되어 면역관련 유전자들이 발현이 증가된 것이 아닌가 생각된다.

6.4.5. 유전자 전사

Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 ADP-ribose의 동형중합체 합성을 촉매하는 효소로서, DNA 수리 및 산화된 핵 단백질의 분해와 같은 역할을 한다(Arnold et al., 2002). 반대로 ADP-ribosylation은 apoptosis의 개시에 필요한 것으로 알려졌다(Simbulian-Rosenthal et al., 1998). 본 연구에서는 고온 노출에 의한 PARP 발현의 억제가 관찰되었다.

6.4.6. 종양형성

Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor(RERG)는 small GTPase의 RAS superfamily의 일원이다(Finlin et al., 2001). Ras와는 반대로 RERG는 종양의 억제인자로 알려져 있다. 즉, 예를들어 RERG의 과발현은 유방암 세포에서 세포 증식 및 종양형성을 억제한다(Finlin et al., 2001; Key et al., 2006). 본 연구에서 RERG의 발현은 고온에 노출된 연산호에서 억제되었으며, 이는 발암과 연결될 것으로 생각된다.

6.4.7. 기타 생물학적 반응

ADAM(a disintegrin and metalloprotease) 또는 MDC 단백질은 세포막에 위치하는 glycoprotein으로 단백질 분해 활성을 막는 역할을 하는 pro-domain과 단백질 분해 활성을 보이는 metalloprotease domain, 접착 활성을 갖는 disintegrin domain과 cystein-rich region, 그리고 EGF repeat로 구성되어 있다(Bibel, 1997). 이 단백질군은 수정, 신경세포 형성, 근육세포 형성, 배아에서의 TGF- α 분비 및 염증 반응에 역할을 한다(Primakoff et al., 2000). 본 분석에서는 고온 스트레스 노출에 대해 연산호의 ADAM metallopeptidase domain 19의 발현이 증가되는 것이 확인되었다.

본 연구에서는 DD-PCR 기법에 의해 고온 스트레스 노출에 대해 차등 발현되는 연산호 유전자 후보들을 분리하였다. 얻어진 초기의 자료는 고온 조건에 대한 생물반응의 분자기전에 대한 향후의 연구가 가능하도록 할 것이며, 지구 온난화에 의해 발생하는 스트레스에 대한 시스템스 바이올로지의 발전에 역할을 할 것이다.

이상과 같이 개인창의과제를 통해 연산호를 대상으로 지구 온난화를 모사한 고온 스트레스 노출과 연안의 유기오염을 모사한 PAH 노출로써, 환경변화를 감지하고, 변화에 대한 생물의 반응을 예측할 수 있는 분자생물지표를 분리하였으며, 이들의 유의성을 검증하였다. 본 연구에서 분리된 유전자지표들은 앞으로 바이오칩의 개발로 연결되어 첨단 기법을 이용한 환경변화 감시 도구로 활용될 수 있을 것으로 확신한다.

6.5. 참고문헌

- Alur, M., Nguyen, M.M., Eggener, S.E., Jiang, F., Dadras, S.S., Stern, J., Kimm, S., Roehl, K., Kozlowski, J., Pins, M., Michalak, M., Dhir, R., Wang, Z., 2009. Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis. *Am J Pathol* 175, 882-890.
- Arnold, J., Grune, T., 2002. PARP-mediated proteasome activation: a co-ordination of DNA repair and protein degradation? *Bioessays* 24, 1060-1065.
- Arosio, P., Levi, S., 2002. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 33, 457-463.
- Barbeito, A.G., Garringer, H.J., Baraibar, M.A., Gao, X., Arredondo, M., Nunez, M.T., Smith, M.A., Ghetti, B., Vidal, R., 2009. Abnormal iron metabolism and oxidative stress in mice expressing a mutant form of

- the ferritin light polypeptide gene. *J Neurochem* 109, 1067-1078.
- Blobel, C.P., 1997. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* 90, 589-592.
- xCarafoli, E., 2003. Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci* 28, 175-181.
- Chin, D., Means, A.R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10, 322-328.
- del Arco, A., Satrustegui, J., 1998. Molecular cloning of Aralar, a new member of the mitochondrial carrier superfamily that binds calcium and is present in human muscle and brain. *J Biol Chem* 273, 23327-23334.
- Duchen, M.R., 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529 Pt 1, 57-68.
- Finlin, B.S., Gau, C.L., Murphy, G.A., Shao, H., Kimel, T., Seitz, R.S., Chiu, Y.F., Botstein, D., Brown, P.O., Der, C.J., Tamanoi, F., Andres, D.A., Perou, C.M., 2001. RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *J Biol Chem* 276, 42259-42267.
- Gelebart, P., Opas, M., Michalak, M., 2005. Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 260-266.
- Hoeflich, K.P., Ikura, M., 2002. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108, 739-742.
- Jia, L., Xu, M., Zhen, W., Shen, X., Zhu, Y., Wang, W., Wang, X., 2008. Novel anti-oxidative role of calreticulin in protecting A549 human type II alveolar epithelial cells against hypoxic injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C47-55.
- Key, M.D., Andres, D.A., Der, C.J., Repasky, G.A., 2006. Characterization of RERG: an estrogen-regulated tumor suppressor gene. *Methods Enzymol* 407, 513-527.
- Moreto, J., Vidal-Quadras, M., Pol, A., Santos, E., Grewal, T., Enrich, C., Tebar, F., 2009. Differential involvement of H- and K-Ras in Raf-1 activation determines the role of calmodulin in MAPK signaling. *Cell Signal* 21, 1827-1836.

- Okuda, T., Hattori, H., Takeuchi, S., Shimizu, J., Ueda, H., Palvimo, J.J., Kanazawa, I., Kawano, H., Nakagawa, M., Okazawa, H., 2003. PQBP-1 transgenic mice show a late-onset motor neuron disease-like phenotype. *Hum Mol Genet* 12, 711-725.
- Pan, J.S., He, S.Z., Xu, H.Z., Zhan, X.J., Yang, X.N., Xiao, H.M., Shi, H.X., Ren, J.L., 2008. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. *World J Gastroenterol* 14, 5857-5867.
- Primakoff, P., Myles, D.G., 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16, 83-87.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Iyer, S., Boulares, A.H., Smulson, M.E., 1998. Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J Biol Chem* 273, 13703-13712.
- Torti, F.M., Torti, S.V., 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99, 3505-3516.
- Torti, S.V., Kwak, E.L., Miller, S.C., Miller, L.L., Ringold, G.M., Myambo, K.B., Young, A.P., Torti, F.M., 1988. The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J Biol Chem* 263, 12638-12644.
- Turner, M.W., 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 40, 423-429.

6.6. 연구성과

6.6.1. 연구논문 (SCI)

1. Yum, S., Jeon, H.-y., Lee, J., Song, J.-I., Woo, S. Isolation of hyperthermal stress responsive genes in soft coral (*Scleronephthya gracillimum*). *Mol. Cell. Toxicol.* 투고 중

6.6.2. 지적재산권 (국내출원)

1. 해수온 변화에 대응하는 분홍바다맨드라미의 유전자 및 이를 이용한 해양 생태계 진단 방법. 출원번호 2009-0068438. 대한민국
2. 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미의 유전자 및 이를 이용한 연안 환경 오염 진단 방법. 출원번호 2010-0017165. 대한민국

6.6.3. 학술대회발표 (국제학술대회)

1. Jeon, H.-y., Kim, B., Won, H., Woo, S., Park, H., Yum, S. Transcription responses in a soft coral (*Scleronephthya gracillimum*) to thermal and organic pollutants stressors. International Workshop “The Evolution of Multicellularity: Insights from Hydra and other Basal Metazoans”. Tutzing, Germany, 2009. 9.16
2. Jeon, H.-y., Kim, B., Won, H., Woo, S., Park, H., Yum, S. Biological responses in a soft coral (*Scleronephthya gracillimum*) to hyperthermal and organic pollutants stressors. The Joint International Symposium of 5th International Conference on Toxicogenomics (ICT) and 2nd Toxicogenomics Integrated Environmental Science (TIES). Seoul, Korea, 2009. 9. 22
3. Kim, B., Jeon, H.-y., Won, H., Yum, S. The evidence of DNA methylation in Hydra, a Cnidarian model. The 2nd International Conference on Environmental Health Science, Seoul, Korea, 2009. 10. 29