

# 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 에서 분리한 Glutathione S-transferase 유전자의 분자생물학적 고찰 및 발현분석

문지영, 박은희, 공희정, 김동균, 김영옥, 김우진, 안철민, 남보혜

국립수산과학원 전략양식연구소 생명공학과

## Molecular Characterization and Expression Analysis of a Glutathione S-Transferase cDNA from Abalone (*Haliotis discus hannai*)

Ji Young Moon, Eun Hee Park, Hee Jeong Kong, Dong-Gyun Kim, Young-Ok Kim, Woo-Jin  
Kim, Cheul Min An and Bo-Hye Nam

Biotechnology Research Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

### ABSTRACT

Glutathione S-transferases (GSTs) are a superfamily of detoxification enzymes that primarily catalyze the nucleophilic addition of reduced glutathione to both endogenous and exogenous electrophiles. In this study, we isolated and characterized a full-length of alpha class GST cDNA from the abalone (*Haliotis discus hannai*). The abalone GST cDNA encodes a 223-amino acid polypeptide with a calculated molecular mass of 25.8 kDa and isoelectric point of 5.69. Multiple alignments and phylogenetic analysis with the deduced abalone GST protein revealed that it belongs to the alpha class GSTs and showed strong homology with disk abalone (*Haliotis discus discus*) putative alpha class GST. Abalone GST mRNA was ubiquitously detected in all tested tissues. GST mRNA expression was comparatively high in the mantle, gill, liver, and digestive duct, however, lowest in the hemocytes. Expression level of abalone GST mRNA in the mantle, gill, liver, and digestive duct was 182.7-fold, 114.8-fold, 4675.8-fold, 406.1-fold higher than in the hemocytes, respectively. Expression level of abalone GST mRNA in the liver was peaked at 6 h post-infection with *Vibrio parahaemolyticus* and decreased at 12 h post-infection. While the expression level of abalone GST mRNA in the hemocytes was drastically increased at 3 h post-infection with *Vibrio parahaemolyticus*. These results suggest that abalone GST is conserved through evolution and may play roles similar to its mammalian counterparts.

**Keywords:** Detoxification, *Haliotis discus hannai*, Glutathione S-transferase, *Vibrio parahaemolyticus*

### 서 론

해독작용은 외부에서 유입된 독성물질이나 대사과정에서 생성된 독소를 제거하여 유해환경으로부터 생명유지를 유지하기 위한 필수적인 과정중의 하나이다. 독소를 제거하기 위한 과정은 주로 간에서 이루어지며 glutathione S-transferase (GST), UDP glucuronosyl transferase, N-acetyl transferase, cytochrome P450과 같은 효소에 의해 매개된다 (Hayes *et al.*, 2005). GST는 간에서 일어나는 phase-II 해독과정에 관여하는 효소로 r-glutamyl-cysteinyl-glycine (GSH) 과 전자친화성 물질간에 티오에스테르결합을 촉매하는 효소를 말한다 (Oakley, 2011). GST에 의해 분해되는 전자친화적인 물질에는 알킬, 방향족할로젠 화합물, 에폭시화합물, 쿼

Received: December 1, 2014; Revised: December 20, 2014;  
Accepted: December 24, 2014

Corresponding author : Bo-Hye Nam

Tel: +82 (51) 720-2452 e-mail: nambohye@korea.kr  
1225-3480/24551

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

산화합물과 같은 환경성 발암물질, 살충제, 항생제, 산화손상에 의해 생성되는 물질들이 있는데, GST는 기질의 수용성을 증가시켜 독성물질을 체외로 쉽게 배출되게 하거나 반응성이 적은 물질로 분해되게 한다 (Hayes and Pulford, 1995).

GST는 미생물을 비롯한 식물, 동물에서 모두 보고되고 있으며 구조적 특징, 기질 저해제 특이성, 면역학적 교차반응성에 따라 alpha에서 zeta에 이르기까지 적어도 14 종류로 나눌 수 있다 (Ivarsson *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2005). GST superfamily는 단백질 서열과 구조를 바탕으로 크게 세포질 GST (cytosolic GSTs), 미토콘드리아 GST (mitochondrial GSTs), 막에 존재하는 마크로솜 GST (microsomal GSTs; MAPEG; membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) 의 3가지로 구분된다 (Hayes and Pulford, 1995). 현재 밝혀진 세포질 GST에는 alpha, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi, omega 가 있는데, 사람에는 alpha (GSTA), zeta (GSTZ), theta (GSTT), mu (GSTM), pi (GSTP), sigma (GSTS) 그리고 omega (GSTO) 가 보고 되어 있다 (Mannervik *et al.*, 2005). 사람에서 가장 많이 존재하는 세포질 GSTA와 GSTZ는 GSH에 의존적으로 이성질체화되며 GSTA는 testosterone과 progesterone과 같은 스테로이드 합성에 관여하고 (Johansson and Mannervik, 2002), GSTZ는 maleylacetoacetate isomerase 활성을 갖는다고 알려져 있다 (Polekhina *et al.*, 2001). GSTS는 GSH 의존적으로 prostaglandin D (PGD) 의 합성을 관여한다고 알려져 있다 (Kanaoka *et al.*, 1997). GSTT는 sulfatase 활성을 가지며 GSTO 는 glutaredoxin의 특징을 가지며 박테리아의 GSTB는 화학물질과 산화스트레스로부터 보호하고 생체이물의 이화작용에 관여한다고 알려져 있다 (Oakley, 2011). 미토콘드리아 GST는 세포질 GST와 진화적으로 유사하며 kappa 가 포함된다. 세포질 그리고 미토콘드리아 GST는 21-29 kDa 크기의 소단위체간에 동형 또는 이형이량체가 되면 활성화된다는 공통점이 있다 (Mannervik and Danielson, 1988). 마지막으로 마크로솜 GST는 4개 (1-4) 의 소그룹으로 구성되며 세포질 GST와 서열의 유사성은 낮은 편이다. 사람에서 1, 2, 4 소그룹에 포함되는 6개의 마크로솜 GST isozyme이 발견되었다. 그 중, 마크로솜 GST 1은 세포질과 미토콘드리아 GST와 유사하게 GSH와 친전하성 물질간의 결합을 촉매하고 다른 종류의 마크로솜 GST는 leukotriene과 prostaglandin의 생합성과정을 촉매한다 (Hayes *et al.*, 2005; Oakley, 2011).

GST 에 관한 대부분의 연구는 척추동물에서 주로 이루어졌으며 그에 반해 무척추동물에서는 연구결과가 부족한 실정이다. 포유류의 GST는 간 특이적인 발현과 세포 내에서 높은 농도로 존재하기 때문에 기관의 손상, 독성정도, 바이러스 감염

에 대한 모니터링을 위한 바이오마커로 활용하고 있다 (Hughes *et al.*, 1997; Beckett *et al.*, 1985; Loguercio *et al.*, 1998). 최근 조류 (*Fucus* spp), 연체동물 (greenlipped mussel; *Perna viridis*, clams; *Ruditapes philippinarum*), 갑각류 (crab; *Uca pugilator*, African river prawn; *Macrobrachium vollehovenii*) 및 어류 (perch; *Perca fluviatilis*, goldfish; *Carassius auratus*) 에서 GST에 관한 연구가 진행되었다 (Cairrao *et al.*, 2004; Lau and Wong, 2003; Luca-Abbott *et al.*, 2005; Hotard and Zou, 2008; Adewale and Afolayan, 2005; Hansson *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). 어류에서 polychlorinated biphenyls (PCBs), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 와 같은 환경 오염물질 처리시 GST의 발현이 증가가 보고된 바 있다 (Hansson *et al.*, 2006; Hamed *et al.*, 2003). 그러나 대부분의 연구가 GST의 존재와 환경오염물질이나 환경 호르몬과 같은 대사교란물질 처리시 GST의 발현에 관한 연구였고 GST와 병원균 감염에 따른 면역작용에 관한 연구는 부족한 실정이다 (Blanchette *et al.*, 2007). 특히 북방전복과 유사한 등근전복 (*Haliotis discus discus*) 에서 GSTM과 GSTS가 발견되었으나 (Wan *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2011), 북방전복에서 alpha class GST에 대한 연구와 특히 병원균의 감염과 GST의 발현변화에 대한 연구는 다루어지지 않았다.

본 연구에서는 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 GST 유전자의 단편을 대용량 염기서열 분석으로부터 확보한 후, 유전자의 전체 염기서열과 아미노산 서열을 규명하고 분석하였다. 정상 전복조직으로부터 GST mRNA의 발현 분포를 확인하고 비브리오균을 감염시킨 후 조직에서 시간에 따른 GST의 발현변화를 분석하였다. 본 연구를 통하여 외부 스트레스에 대한 북방전복의 면역작용에 대한 기초 자료로 활용하고자 하며 향후 병원균 감염에 대한 바이오마커로의 활용 가능성에 대해 알아보하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 연구에 사용된 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 은 국립수산물과학원 육종연구센터에서 공급받아, 40리터 수조 내에서 18-20°C 의 흐르는 해수에 일주일간 순치시킨 후 외관상 건강한 개체 (평균 중량; 50 g, 평균 각장; 62 mm, 평균 각폭; 45 mm, 평균 각고; 15 mm) 를 선별하여 사용하였다.

### 2. 미생물 배양 및 감염

*Vibrio parahemolyticus*는 25°C에서 brain-heart

infusion medium (BD Biosciences, USA) 배지로 배양하였다. 배양된 균은 phosphate buffered saline (PBS) 에 희석한 후 sub-lethal dose ( $1.2 \times 10^8$  cells) 의 농도로 근육 주사하였으며, 대조군은 동량의 PBS를 근육 주사하였다. 균을 주사한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12 시간마다 3마리씩 개체를 선별하여 외투막, 아가미, 근육, 패각근, 간체장, 족부, 소화관 조직을 적출하였다. 그 후 즉시 액체질소로 고정하였으며 RNA 분리를 위해  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 혈액은 주사기로 채취한 후 원심분리 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3000 rpm, 5분) 로 혈구 세포만을 분리하여 액체질소에 고정된 후 다른 조직과 마찬가지로 RNA 분리를 위해  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 3. 북방전복 GST 유전자의 전장 cDNA 클로닝

북방전복 조직별 (외투막, 아가미, 근육, 간체장, 혈구) RNAseq 분석을 수행하였다 (data not shown). De novo assembly를 진행한 후 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 을 이용한 대용량 시퀀스 분석을 통하여, 등근전복 alpha class GST 유전자 (accession no. EF103340) 와 아미노산 수준에서 상동성을 가지는 약 366 bp의 GST cDNA단편을 찾았다. 전장 GST cDNA 클로닝을 위해 366 bp의 GST cDNA단편의 염기서열을 기초로 한 GST 유전자 특이 프라이머를 디자인하였고 (HDH-GST ORF-F1: 5'-ATG GCG AGT G AA CCG CAT T-3', HDH-GST ORF-F2: 5'-ATG AAT GCC TTT GAC TTC TG-3', HDH-GST ORF-R: 5'-TTA GAG TTT GTA TTC CAT TG-3'), SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) 를 이용하여 5'-과 3'-말단의 염기서열을 확보하였다. 확보된 5'-과 3'-말단의 유전자 단편을 pGEM-T easy vector (Promega) 에 클로닝하여, *E. coli* strain XL1-blue로 형질전환하였다. Plasmid purification kit (Intron) 로 plasmid를 정제한 후에 자동염기 서열분석기 (AB-3730XL, Applied Biosystems) 로 염기서열을 결정하였다.

### 4. RNA 분리 및 RT-PCR 과 qPCR을 이용한 발현분석

$-80^{\circ}\text{C}$  에 보관한 각각의 샘플은 TRIzol reagent (Invitrogen) 를 사용하여 RNA를 분리하였다.  $1 \mu\text{g}$ 의 RNA로부터 transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche) 와 oligo (dT) primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 북방전복의 조직에서 GST 유전자의 발현은 cDNA 서열을 기초로 제작한 프라이머를 이용하여 RT-PCR 과 quantitative real time-PCR (qPCR) 로 확인하였다. 내재 표준 유전자로는 북방전복의 18S rRNA (accession no. AY319433; 18S rRNA F: 5'-CTC ACG GAA AGA GCG CGT TTA-3', 18S rRNA R: 5'-GAC TTG CCC TCC AAT

AGA TC-3') 를 사용하였다. RT-PCR 조건은 다음과 같다: Pre-denaturation  $95^{\circ}\text{C}$ , 5분; denaturation, annealing, extension 각각  $95^{\circ}\text{C}$  30초,  $55^{\circ}\text{C}$  30초,  $72^{\circ}\text{C}$  30초, 35회; extension  $72^{\circ}\text{C}$ , 10분. 증폭된 PCR산물은 ethidiumbromide ( $100 \text{ ng/ml}$ ) 이 섞인 1.5% 아가로즈젤에 전기영동하여 확인하였다. qPCR은 FastStart DNA Master SYBR Green I 을 이용하여 LightCycler system (Roche Diagnostics) 에서 수행하였다. qPCR 조건은 다음과 같다: Taq activation step,  $95^{\circ}\text{C}$ , 10분; denaturation, annealing, extension 각각  $95^{\circ}\text{C}$  10초,  $57^{\circ}\text{C}$  5초,  $72^{\circ}\text{C}$  30초; 40회 반복. PCR cycle이 끝난 후, 온도를 단계적으로 증가시켜 melting-curve를 분석하였다. GST 유전자의 상대적인 발현량은  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  방법으로 (Livak and Schmittgen, 2007) 결정하였고 전복 18S rRNA 유전자를 내재 표준 유전자로 이용하였다. 모든 실험은 3반복하였으며 데이터는  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 나타내었다.

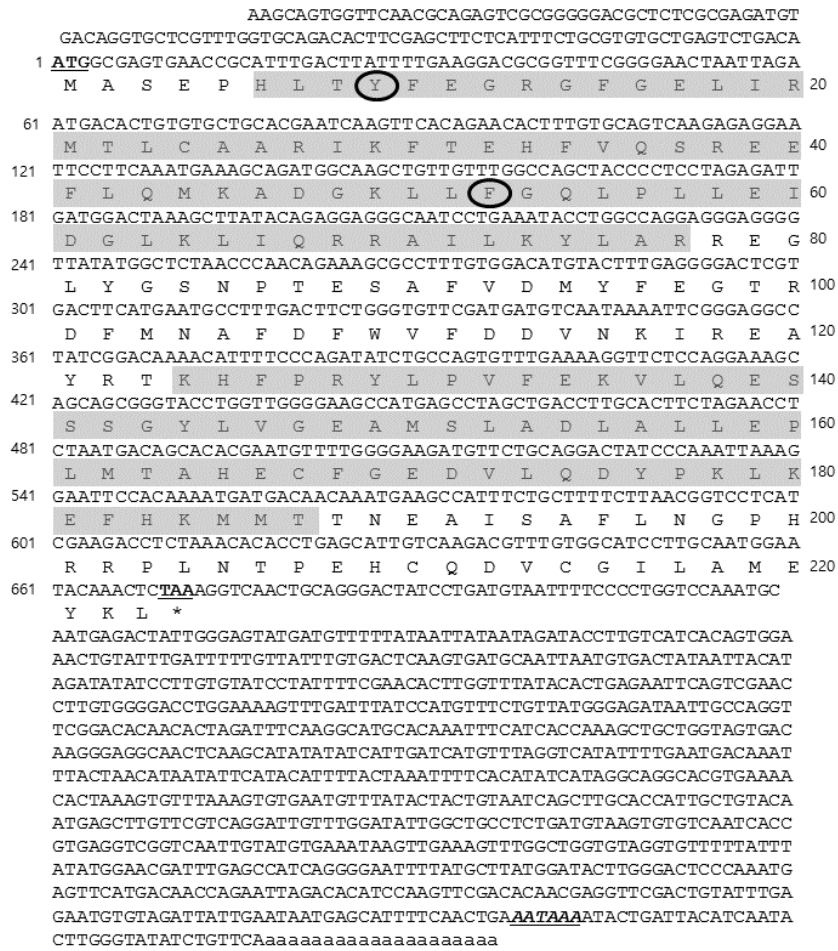
### 5. 바이오인포메틱스 분석

북방전복의 전장 GST cDNA염기서열을 완성하기 위하여 GST 단편과 5'- 및 3'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 로부터 확보된 염기서열을 조합하는 작업과 이로부터 아미노산 서열을 유추하는 작업은 GENETYX8.0 (SDS Software Development, Japan) 프로그램을 이용하였고, 등전점과 분자량 예측은 ExPASy 웹사이트 (<http://web.expasy.org>) 에서 분석하였다. 북방전복 GST의 아미노산 서열을 이용하여 domain 분석과 2차 구조분석은 Pfam 웹사이트 (<http://pfam.xfam.org>) 와 Jpred 웹사이트 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred>) 에서 분석하였다. GST의 염기서열과 아미노산서열의 비교를 위해 NCBI의 BLAST 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 과 데이터베이스를 이용하였다. 연체동물문에 속하는 생물 및 기타 생물들의 유사서열을 찾은 후, MEGA 4.0 프로그램의 CLUSTALW 모듈을 이용하여 multiple sequence alignment를 수행하였으며, phylogenetic tree 는 아미노산 서열에 기초한 Neighbor-Joining 알고리즘으로 분석하여 제작하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 북방전복 GST cDNA 염기서열 분석

북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 대용량 유전체 분석을 통하여 121개의 아미노산을 코딩하는 366 bp의 GST 유전자 염기서열 일부를 확보할 수 있었다 (data not shown). BLASTN search 결과, 확보된 염기서열은 등근전복



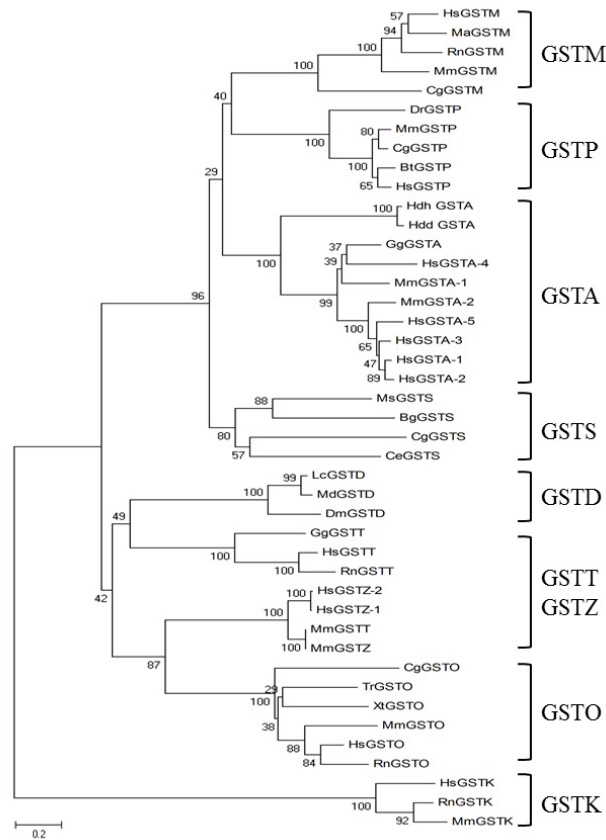
**Fig. 1.** The full-length cDNA and deduced amino acid sequences of GST from abalone *Haliotis discus hannai*. Start (ATG) and stop codons (TAA) are bold and underlined. The putative G-site (6-77) and H-site (124-187) are shaded. Conserved tyrosine and phenylalanine are circled. The polyadenylation signal sequence (AATAAA) is bold and underlined in italics.

(*Haliotis discus discus*) 의 putative alpha class GST 유전자 (accession no. EF103340) 와 99%의 높은 상동성을 보였다. 북방전복 GST의 아미노산 서열을 이용하여 NCBI Genbank의 BLASTX 검색결과, 북방전복 GST는 둥근전복의 putative alpha class GST (accession no. AB026598) 와 지중해 담치 GSTA (accession no. AFQ35982) 와 각각 99%, 46%의 상동성을 보였다. 북방전복 GST의 366 bp 염기 서열을 바탕으로 유전자 특이 프라이머를 제작한 후 이를 이용하여 5'- 및 3'-RACE 방법으로 총 1669 bp의 전장 cDNA를 완성하였다. 북방전복 GST 유전자는 110 bp의 5'-untranslated region (UTR), 907 bp의 3'-UTR과 669 bp의 open reading frame (ORF)에 223개의 아미노산을 코딩하고 있었으며 (Fig. 1) 분자량은 25.8 kDa 그리고 등전

점은 5.69로 예측되었다. 일반적으로 세포질 GST는 N-말단과 C-말단의 두 개의 domain 구조를 통해 효소활성을 갖는다고 알려져 있다 (Sun *et al.*, 1998). Pfam 웹사이트에서 북방전복 GST의 아미노산 서열을 분석해본 결과 N-말단 부분 (6-77) 과 C-말단 부분 (124-187) 에 GST의 특징적인 도메인이 존재하며 (Fig. 1) 이량체로 작용할 것이라 예측되었다 (data not shown).

**2. 북방전복 GST 다중서열비교 및 계통수 분석**

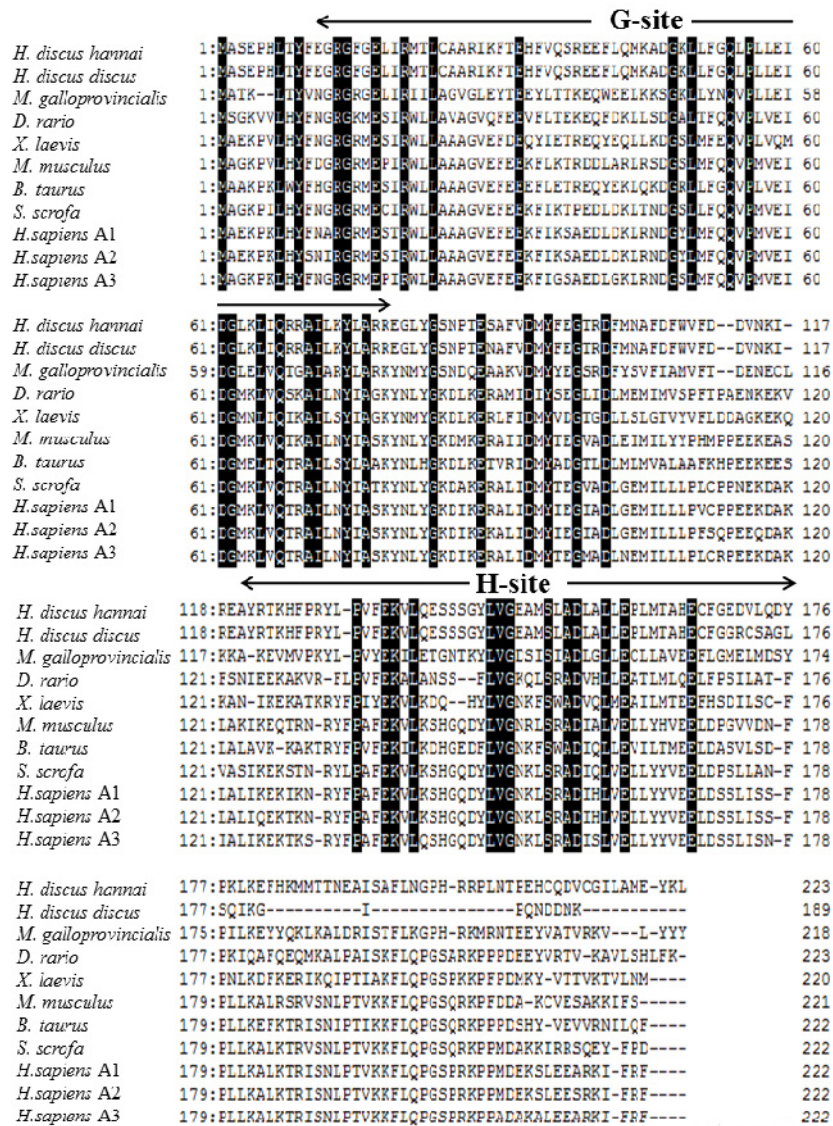
북방전복 GST가 어떤 종류의 GST인지 알아보기 위해 NCBI 데이터베이스에서 다양한 class에서 총 43개 GST 참고 서열을 선정하고 MEGA 4 프로그램을 이용하여 Neighbor-Joining 방법으로 계통수를 그려보았다. 그 결과



**Fig. 2.** Phylogenetic relationships of abalone GST proteins with those of other species, calculated using the neighbor-joining method. GenBank: HsGSTM (*Homo sapiens*, NP000839), MaGSTM (*Mesocricetus auratus*, CAA43368), CgGSTM (*Crassostrea gigas*, CAD90167), MmGSTM (*Mus musculus*, NP034490), RnGSTM (*Rattus norvegicus*, NP058710), DrGSTP (*Danio rerio*, AAG35785), MmGSTP (*Mus musculus*, NP038569), BtGSTP (*Bos taurus*, NP803482), HsGSTP (*Homo sapiens*, P09211), CgGSTP (*Cricetulus griseus*, S71959), MsGSTS (*Manduca sexta*, P46429), CgGSTS (*Crassostrea gigas*, CAE11863), BgGSTS (*Blattella germanica*, O18598), CeGSTS (*Caenorhabditis elegans*, Q21355), MmGSTA1 (*Mus musculus*, NP034487), GgGSTA (*Gallus gallus*, P26697), MmGSTA2 (*Mus musculus*, P30115), HsGSTA-1-5 (*Homo sapiens*; A-1, NP000837; A-2, NP000838; A-3, NP000839; A-4, NP001503; A-5, NP714543), LcGSTD (*Lucilia cuprina*, AAA29287), MdGSTD (*Musca domestica*, CAA43599), DmGSTD (*Drosophila melanogaster*, NP524912), HsGSTT (*Homo sapiens*, NP000845), MmGSTT (*Mus musculus*, NP032211), RnGSTT (*Rattus norvegicus*, NP036928), GgGSTT (*Gallus gallus*, P20135), HsGSTZ-1 (*Homo sapiens*, AAH01453), HsGSTZ-2 (*Homo sapiens*, AAC33591), MmGSTZ (*Mus musculus*, AAH31777), HsGSTO (*Homo sapiens*, NP004823), CgGSTO (*Crassostrea gigas*, CAD89618), MmGSTO (*Mus musculus*, NP080895), RnGSTO (*Rattus norvegicus*, AAH79363), TrGSTO (*Takifugu rubripes*, AAL08414), XlGSTO (*Xenopus tropicalis*, AAH87558), HsGSTK (*Homo sapiens*, NP057001), RnGSTK (*Rattus norvegicus*, P24473), MmGSTK (*Mus musculus*, Q9DCM2), HddGSTA (*Haliotis discus discus*, AB026598).

북방전복 GST 는 alpha class GST (GSTA) 와 하나의 그룹을 이루었다 (Fig. 2). 또한 북방전복 GST 아미노산 서열에는 GSTA 에서 GSH와의 결합 안정화와 효소활성에 중요한

Tyr9와 Phe52 잔기가 보존되어 있었다 (Fig. 1). 특히 Tyr9 잔기는 GSTA 의 G-site에 존재하면서 GSH와 안정적으로 결합하게 하며 이 잔기에 돌연변이가 생길 경우 90% 가량 효소



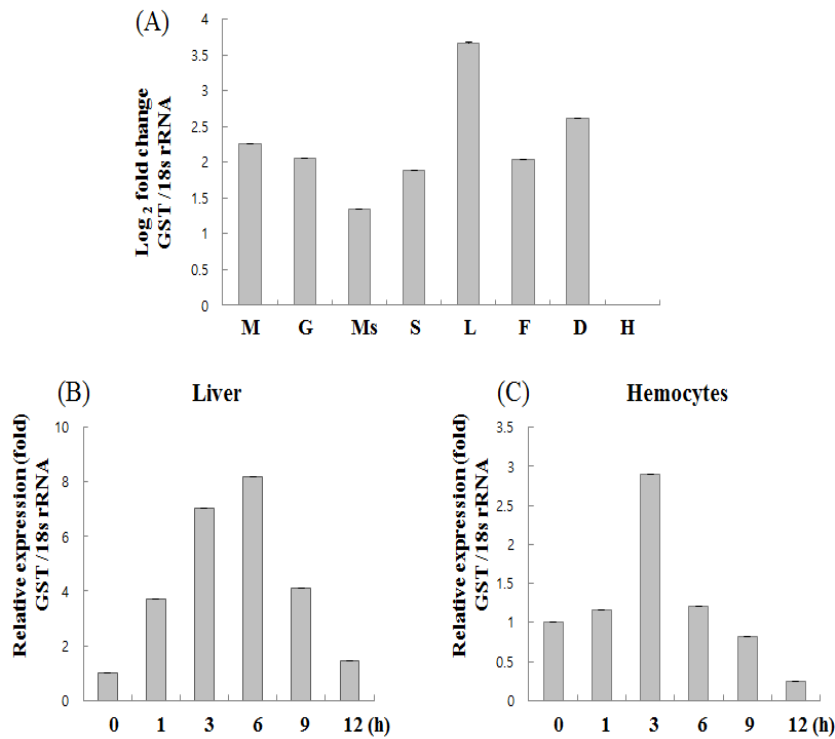
**Fig 3.** Multiple alignment of the amino acid sequences of abalone GST with those of other species using ClustalW. Sequences were obtained from GenBank: human (*Homo sapiens*; A1, NP665683; A2, NP000837; A3, NP000838), mouse (*Mus musculus*, AAI47274), pig (*Sus scrofa*, CAA93433), cow (*Bos Taurus*, AAI16162), frog (*Xenopus laevis*, NP001091163), zebrafish (*Danio rerio*, NP998559), and shellfishes (*Haliothis discus discus*, ABO26598; *Mytilus galloprovincialis*, AFQ35982).

활성이 감소한다고 알려져 있다 (Rushmore and Pickett, 1993). 일반적으로 GSTAs 는 세포질에서 약 50 kDa의 이량체를 형성하고 이 때 GST의 G-site 내에  $\alpha$  helix 2와  $\beta$  strand 3에 있는 Phe52 잔기는 볼의 역할을 하며 다른 subunit은 기질이 결합하는 H-site의  $\alpha$  helix 4와  $\alpha$  helix 5에서 소수성 포켓을 형성하여 두 subunit 사이에 볼과 소켓 형태의 안정적인 구조를 형성한다고 알려져 있다

(Armstrong, 1997; Sinning *et al.*, 1993).

추가적으로 북방전복 GST와 다른 종의 GSTA의 단백질 서열을 이용하여 다중서열 비교를 해보았다. 그 결과 북방전복 GST의 N-말단 domain 에서 다른 종의 GSTA와 높은 상동성을 보였고 C-말단 부위는 N-말단 부위에 비해 상동성이 낮았다. 또한 GSTA의 Tyr9, Phe52번 잔기는 종간에 매우 보존되어 있었다 (Fig. 3). 세포질 GST의 경우 N-말단 부위에서





**Fig. 4.** Normal tissue distribution (A) and expression level of abalone GST mRNA in the liver and hemocytes after *Vibrio hemolyticus* infection (B, C). Quantitative real-time PCR was performed on equal amounts of total RNA isolated from the internal organs of control abalone. 18S rRNA was used as an internal control. To determine tissue-specific expression levels, the expression level in each tissue was compared to that in the hemocytes, arbitrarily defined as 1. Values represent means  $\pm$  SD (n=3). (M, Mantle; G, Gill; Ms, Muscle; S, Shell muscle; L, Liver; F, Foot; D, Digestive duct; H, Hemocytes).

glutathione과 상호작용하는 잔기에 따라 Y-GST group과 S/C-GST group으로 구분된다 (Atkinson and Babbitt, 2009). Y-GST group은 tyrosine 잔기에서, S/C-GST는 serine 또는 cysteine 잔기에서 상호작용한다는 차이점이 있기 때문에 북방전복 GST의 경우, Y-GST로 예상된다. Fig 3의 결과를 보면, 북방전복 GST의 아미노산 길이는 포유류를 비롯한 다른 종과 비슷하였으나 등근전복 putative GSTA는 189개로 다른 종에 비해 C-말단 부위가 짧았다. 긴 C-말단 형태는 다른 종류의 GST와 달리 GSTA에서만 보여지는 특징으로, 긴 C-말단부위는  $\alpha$  helix 구조를 형성하여 이량체 구조를 안정화시키고, GSH와 반응효율을 증가시키며 Try9 번 잔기의 이온화 상태에 영향을 줌으로써 GST의 효소활성을 증가시킨다고 알려져 있다 (Sinning *et al.*, 1993). 그러므로 북방전복 GST는 GSTA의 특징적인 잔기들이 보존되어 있었고 구조적으로도 유사하기 때문에 alpha class GST로 생각되며 실제로 북방전복 GSTA가 효소활성을 갖는지 다른 종의 GSTAs와 어떠한 차이가 있는가에 대한 연구가 필요할 것이다.

### 3. 북방전복 조직에서 GST mRNA 발현 분석

북방전복 조직에서 GSTA 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위해 외투막, 아가미, 근육, 폐각근, 간체장, 족부, 소화관, 혈구에 대하여 qPCR을 수행하였다. 북방전복 GSTA의 mRNA는 실험에 사용된 모든 조직에서 관찰되었으며 특히 외투막, 아가미, 간체장, 소화관에서 발현이 높았고 혈구에서는 발현이 낮았다 (Fig. 4A). 북방전복 GSTA의 발현정도는 혈구에 비해 외투막, 아가미, 간체장, 소화관에서 각각 182.7배, 114.8배, 4675.8배, 406.1배 높았다. 간의 경우 대사과정에서 생성되는 물질과 산화물질의 해독작용을 담당하는 다양한 효소를 생성하는 주요기관으로 포유류를 비롯한 어류에서 GSTAs는 간에 특이적으로 발현되었기 때문에 북방전복 GST 역시 간체장에서 발현이 높은 것으로 생각된다 (Hayes *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2006; Aceto *et al.*, 1993). 이외에도 북방전복과 유사하게 Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) 의 아가미, 위와 장에서도 GST의 발현이 높은 것으로 보고된 바 있었다 (Ren *et al.*, 2009). 수생생물의 경우

외투막, 아가미를 통해 주변의 다양한 물질의 이동이 일어나기 때문에 이를 조절하기 위한 효소의 발현이 높아 질 수 있으며, 위, 장과 같은 소화관에서는 다양한 대사과정을 통한 해독작용의 하나로 GST의 발현이 높은 것으로 생각할 수 있다.

본 연구에서는 북방전복에 비브리오균을 감염시킨 후, GST mRNA의 발현을 확인해 봄으로써 병원균 감염에 대한 바이오마커로의 활용가능성에 대해 알아보았다. 그 결과, 병원균을 감염시킨 북방전복의 간체장과 혈구세포에서 GST의 mRNA 발현이 증가했다가 감소하였다. 특히 간체장에서 감염 후 1시간 쯤 발현이 3.7배로 급격히 증가했다가 6시간 뒤 8.16 배로 최고로 증가했다가 감소하였다. 혈구의 경우 병원균 감염 후 GST의 발현이 천천히 증가해서 3시간 후 약 2.89배로 증가한 후 점차적으로 감소하였다. 유사한 결과는 메기 (*Clarias gariepinus*) 와 새우 (*Exopalaenon carinicauda*, *Fenneropenaeus chinensis*) 에서 보고된 바 있다. *E. coli* 와 *V. fishceri* 균을 감염시킨 메기의 아가미, 간, 근육에서 GST의 발현이 증가하였고, 비브리오균을 감염시킨 새우 (*Exopalaenon carinicauda*, *Fenneropenaeus chinensis*) 의 간체장과 혈구에서 감염 후 GST의 발현이 증가하였다 (Adeyemi, 2014; Duan *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2009). 밀 새우 (*Exopalaenon carinicauda*) 역시 북방전복과 유사하게 간체장의 경우 병원균 감염 초기에 GST의 발현이 급격히 증가한 후 감소하였으나 혈구에서는 감염 후 6시간부터 증가해서 12시간 뒤 최고로 증가한 후 감소하였다 (Duan *et al.*, 2013). 간체장에서 병원균 감염 시 빠른 시간 안에 GST의 발현이 증가하는 것은 병원균 감염에 따른 효소의 생성이 증가하는 것으로 생각할 수 있다. 비브리오균 감염 시 혈구에서 GST의 발현이 증가하는 것은 북방전복의 혈구 역시 병원균 감염에 반응한다는 것을 의미한다. 최근 연체동물의 경우 개방혈관계를 순환하는 혈구세포가 척추 동물의 단핵구 혹은 대식세포와 유사한 구조와 기능을 하며 pathogen associated molecular patterns (PAMPs) 을 인식하고 chemotaxis와 phagocytosis에 관여한다는 연구결과가 있었다 (Jeong and Lee, 2013; Donaghy, *et al.*, 2009). 그러므로 북방전복의 혈구 역시 병원균 감염에 반응하며 면역세포로 작용할 수 있다는 가능성을 시사하며 실제로 북방전복 GST가 간체장과 혈구세포에서 효소 활성을 갖는지, 그리고 전복의 혈구세포가 병원균을 인지하여 면역반응을 하는데 관여하는지에 대한 후속연구가 필요할 것이다. 지금까지 연구결과를 정리해보면 북방전복 GST는 아미노산 서열상에 해독작용을 담당하는 GST의 특징을 잘 보존하고 있었으며, 병원균 인위감염 후 시간에 따른 발현양상의 변화를 관찰 한 결과, 병원균 감염에 대한 면역반응에도 관여함을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 무척추동물의 해독관련유전자를 동정하고 병원균 감염 시 발현변화를 알아봄

으로써 무척추동물에서 면역시스템을 이해하기 위한 기초자료로 활용하고 병원균감염에 따른 바이오마커 개발에 활용하고자 한다.

## 요 약

본 연구에서는 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 대용량 염기서열 분석을 통해 GST유전자의 전장 cDNA를 동정하였다. 북방전복 GST 유전자의 총 길이는 1669 bp로 672 bp의 ORF는 총 223개의 아미노산을 코딩하고 있으며 등전점은 5.69, 분자량은 25.8 kDa으로 예측되었다. 북방전복 GST 아미노산 서열은 등근전복과 지중해 담치와 같은 패류의 GSTA와 가장 유사성이 높았으며 계통수 분석을 통해 GSTA와 하나의 그룹을 이루었다. 북방전복 GST에는 GSTA의 특징을 갖는 두 site (N- 말단의 G-site, C-말단의 H-site)가 보존되어 있었고 효소활성과 구조 유지에 중요한 잔기가 중간에 매우 보존되어 있었다. 북방전복 GST 유전자의 mRNA는 관찰된 모든 조직에서 발현하고 있었으며, 특히 외투막, 아가미, 간체장, 소화관에서 높은 발현이 확인되었다. 북방전복의 GST는 비브리오균을 인위감염 시킨 전복의 간체장에서 감염 후 1시간 뒤 발현이 급격히 증가했다가 3시간까지 증가한 뒤 감소하였고, 혈구세포에서는 감염 3시간 경과 후 발현 정도가 최고로 증가했다가 감소하였다. 따라서 북방전복 GST는 alpha class GST의 특징을 가지며 병원체 감염에 따른 면역반응 조절에 관여할 것이라 생각되며 병원균 감염에 따른 바이오마커로 활용가능 할 것이라 예상된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 국립수산물과학원의 경상연구사업 (RP-2014-BT-060) 사업에 의해 이루어진 것입니다.

## REFERENCES

- Aceto, A., Dragani, B., Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Martini, F., Angelucci, S., Amicarelli, F., Miranda, M. and Di Ilio, C. (1993) Purification and characterization of the major glutathione transferase from adult toad (*Bufo bufo*) liver. *The Biochemical Journal*, **289**: 417-422.
- Adeyemi, I.O. and Afolayan, A. (2005) Organ distribution and kinetics of Glutathione transferase from African river prawn, *Macrobrachium vollenhovenii* (Herklots). *Aquatic Toxicology*, **71**: 193-202.
- Adeyemi, J.A. (2014) Oxidative stress and antioxidant enzymes activities in the African catfish, *Clarias gariepinus*, experimentally challenged with *Escherichia coli* and *Vibrio fisheri*. *Fish Physiology*



- and *Biochemistry*, **40**: 347-354.
- Armstrong, R.N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, **10**: 2-18
- Atkinson, H.J. and Babbitt, P.C. (2009) Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, **48**: 11108-11116.
- Beckett, G.J., Chapman, B.J., Dyson, E.H. and Hayes, J.D. (1985) Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut*, **26**: 26-31.
- Blanchette, B., Feng, X. and Singh, B.R. (2007) Marine glutathione S-transferases. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, **9**: 513-542.
- Cairrao, E., Couderchet, M., Soares, A.M.V.M. and Guilhermino, L. (2004) Glutathione-S-transferase activity of *Fucus* spp. as a biomarker of environmental contamination. *Aquatic Toxicology*, **70**: 277-286.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K. S. and Soudant, P. (2009) Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, **297**: 10-24.
- Duan, Y., Liu, P., Li, J., Li, J. and Chen, P. (2013) Expression profiles of selenium dependent glutathione peroxidase and glutathione S-transferase from *Exopalaemon carinicauda* in response to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, **35**: 661-670.
- Hamed, R.R., Farid, N.M., Elowa, Sh.,E. and Abdalla, A.M. (2003) Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *The Environmentalist*, **23**: 313-322.
- Hansson, T., Schiedek, D., Lehtonen, K.K., Vuorinen, P.J., Liewenborg, Noaksson, E., Tjarnlund, U., Hansson, M. and Balk L. (2006) Biochemical biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). *Marine Pollution Bulletin*, **53**: 451-468.
- Hayes, J.D. and Pulford, D.J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **30**: 445-600.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**: 51-88.
- Hotard, S. and Zou, E. (2008) Activity of Glutathione S-transferase in the hepatopancreas is not influenced by the molting cycle in the Fiddler crab *Uca pugilator*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **81**: 242-244.
- Hughes, V.F., Trull, A.K., Gimson, A., Friend, P.J., Jamieson, N., Duncan, A., Wight, D.G., Prevost, A.T. and Alexander, G.J. (1997) Randomized trial to evaluate the clinical benefits of serum alpha-glutathione S-transferase concentration monitoring after liver transplantation. *Transplantation*, **64**: 1446-1452.
- Ivarsson, Y., Mackey, A.J., Edalat, M., Pearson, W.R. and Mannervik, B. (2003) Identification of residues in glutathione transferase capable of driving functional diversification in evolution. A novel approach to protein redesign. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 8733-8738.
- Johansson, A.S. and Mannervik, B. (2002) Active-site residues governing high steroid isomerase activity in human glutathione transferase A3-3. *The Journal of biological chemistry*, **277**: 16648-16654.
- Jeong, J.E. and Lee, Y.S. (2013) Identification, sequence characterization and expression analysis of the arginine kinase gene in response to laminarin challenge from the Oriental land snail, *Nesiohelix samarangae*. *Korean Journal of Malacology*, **29**: 71-179.
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., Hayashi, O. (1997) Cloning and crystal structure of hematoopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*, **90**: 1085-1095.
- Lau, P.S. and Wong, H.L. (2003) Effect of size, tissue and location on six biochemical markers in the greenlipped mussel, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, **46**: 1563-1572.
- Liao, W.Q., Liang, X.F., Wang, L., Lei, L.M. and Han, B.P. (2006) Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase gene from the liver of silver carp, bighead carp, and other major Chinese freshwater fishes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **20**: 114-126.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2007) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Loguercio, C., Caporaso, N., Tuccillo, C., Morisco, F., Del Vecchio Blanco, G. and Del Vecchio Blanco, C. (1998) Alpha-glutathione transferases in HCV-related chronic hepatitis: a new predictive index of response to interferon therapy? *Journal of Hepatology*, **28**: 390-395.
- Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M. and Lam, P.K.S. (2005) Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **51**: 694-707.
- Mannervik, B. and Danielson, U.H. (1988) Glutathione transferases-transferase and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **23**: 283-337.
- Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I. and Pearson, W.R. (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, **401**: 1-8.
- Oakley, A. (2011) Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, **43**: 138-151.

- Polekhina, G., Board, P.G., Blackburn, A.C. and Parker, M.W. (2001) Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity. *Biochemistry*, **40**: 1567-1576.
- Ren, Q., Sun, R.R., Zhao, X.F. and Wang, J.X. (2009) A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology and Pharmacology*, **149**: 613-623.
- Rushmore, T.H. and Pickett, C.B. (1993) Glutathione S-transferase, structure, regulation and therapeutic implications. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**: 11475-11478.
- Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., Ji, X., Board, P.G., Olin, B., Mannervik, B. and Jones, T.A. (1993) Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes. *Journal of Molecular Biology*, **232**: 192-212.
- Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shen, H., Liu, H. and Wang, X. (2006) Bioaccumulation and antioxidant responses in goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No 1 exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **63**: 430-437.
- Sun, Y.J., Kuan, I.C., Tam, M.F. and Hsiao, C.D. (1998) The three-dimensional structure of an avian class-mu glutathione-S-transferase, cGSTM1-1 at 1.94 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **278**: 239-252.
- Wan, Q., Whang, I. and Lee, J. (2008) Molecular characterization of mu class glutathione-S-transferase from disk abalone (*Haliotis discus discus*), a potential biomarker of endocrine-disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, **150**: 187-99.
- Wan, Q., Whang, I. and Lee, J. (2008) Molecular cloning and characterization of three sigma glutathione S-transferases from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, **151**: 257-267.