

# 염분 변화에 따른 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 삼투조절 유전자 발현변화

최영광<sup>1</sup> · 박흥기<sup>2</sup> · 김이경<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>강릉원주대학교 웰니스바이오산업학과, <sup>2</sup>강릉원주대학교 해양자원육성학과, <sup>3</sup>강릉원주대학교 해양생물공학과

## Gene Expression Profiles of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* after Salinity Challenge

Young Kwang Choi<sup>1</sup>, Heum Gi Park<sup>2</sup> and Yi Kyung Kim<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Wellness Bio Industry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

<sup>2</sup>Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

<sup>3</sup>Department of Marine Biotechnology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

Euryhaline teleost have extraordinary ability to deal with a wide range of salinity changes. To study the seawater adaptability of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (body weight 638±54 g, length 38.6±2 cm) to salinity increase fish were transferred from freshwater to 7, 14, 21, 28 and 32 psu and checked for mortality over 5 days. No mortality was observed in 0-32 psu. In fish transferred to 0-32 psu, blood osmolality was maintained within physiological range. The changes of serum enzyme activities (aspartate transaminase, AST and alanine transaminase, ALT) showed no significant level during experimental period. To explore the underlying molecular physiology of gill and kidney responsible for body fluid regulation, we measured mRNA expression of five genes, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter1 (NKCC1), aquaporin3 (AQP3), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), glucocorticoid receptor (GR) and growth hormone receptor (GHR) in response to salt stress. Based on our result, rainbow trout could tolerate gradual transfer up to 32 psu for 5 days without mortality under physiological stress. This study suggests to alleviate osmotic stress to fish, a gradually acclimation to increasing salinity is recommended.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, Salinity, Osmolality, Body fluid regulation, Salt responsive gene

### 서론

염분(salinity)은 모든 수생생물의 서식 범위를 결정짓는 중요한 요인이다(Kolar and Lodge, 2002). 경골어류가 정상적인 활동을 영위하기 위해서는 환경변화에 따라 체액 조절(body fluid regulation)을 유지하는 것이 필수적이다. 체액의 특성을 규정할 수 있는 중요한 요인으로 삼투압(osmotic pressure) 혹은 삼투질농도(osmolality)을 들 수 있는데 이는 주로 무기 전해질인 용질의 농도에 의해 결정된다(Kaneko and Hiroi, 2008). 체액의 주요 이온으로는 무기전해질의 90%를 차지하는 Na<sup>+</sup> 및 Cl<sup>-</sup>가 있으며, 삼투압조절 과정에서 두 이온의 농도를 조절하는 것이 매우 중요하다. 또 다른 중요한 요인으로 수분균형조절

(water balance)을 들 수 있다. 유동적인 수생환경에서 서식하는 경골어류는 아가미, 장 그리고 신장에서의 통합적인 물과 이온의 이동활동에 의해 체액의 균형이 유지되고 있다(Marshall and Grosell, 2005; Kaneko and Hiroi, 2008).

담수환경에서는 어류의 체표면을 통해 다량의 물이 유입되고 이온이 손실되므로 이를 대처하기 위해서 신장에서는 묽은 뇨(diluted urine)를 만들어 배출하고 아가미 상피조직을 통해 이온을 흡수한다. 한편, 고장성 환경에 접하게 되는 해산어류는 다량의 바닷물을 흡입하여 손실되는 수분을 최소화한다(Marshall and Grosell, 2005). 물 흡수는 주로 장의 후반부인 직장에서 장조직액과 체액사이에서 형성되는 근소한 삼투압차로 인해서 수동적인 물이동이 일어난다(Aoki et al., 2003; Kim et

\*Corresponding author: Tel: +82. 33. 640. 2409 Fax: +82. 33. 640. 2955

E-mail address: yikyung1118@gwnu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0676>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 676-684, October 2021

Received 1 September 2021; Revised 26 September 2021; Accepted 7 October 2021

저자 직위: 최영광(대학원생), 박흥기(교수), 김이경(교수)

al., 2008).

유동적인 삼투압조절 메커니즘을 가지고 있는 광염성어류는 수시로 변화하는 염분변화에 대처하기 위해 물과 이온 이동을 조절하므로써 환경변화에 적응한다. 이러한 역동적인 환경의 염분변화를 적응하는데 중추적인 역할을 하는 것이 호르몬이다(McCormick, 2001; Takei and McCormick, 2013; Takei et al., 2014). 염분농도가 증가될수록 혈장 내 성장호르몬(growth hormone), insulin-like growth factor 및 cortisol 발현양은 증가되고, 이러한 상승은 어류가 해수적응하는 과정에서 중요한 역할을 담당한다. 특히, cortisol은 지속성 호르몬(slow-acting hormone)으로 아가미조직에 존재하는 이온세포인 염류세포(chloride cell)의 형태를 담수형에서 해수형으로 분화를 촉진시키고,  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  (NAK) 및 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)과 같은 주요 이온수송체의 활성 및 전사를 높여 과다하게 유입된 이온의 배출을 증가시킨다(McCormick, 2001; Takei and McCormick, 2013; Takahashi and Sakamoto, 2013). 혈류를 통해 표적조직으로 들어간 cortisol은 glucocorticoid receptor (GR)와 결합하며 복합체를 형성하여 에너지 대사를 통해 어류의 해수적응 능력을 향상시킨다(Stocco et al., 2005).

경골어류는 체액 및 이온 항상성(internal osmotic and ionic homeostasis)을 유지하기 위해 복합적이고 체계적인 삼투조절 메커니즘을 가지고 있으며 이로 인해서 정상적으로 생리학적 기능을 할 수 있다(Evan et al., 2005; Hwang and Lee, 2007). 어류의 주요한 삼투조절기관인 아가미, 신장에서의 정상적 삼투과정은 다양한 이온채널단백질과 효소들의 활동에 의해서 이루어지며, 이러한 이온채널단백질의 합성과 활성화는 상당한 에너지가 소모된다(Singer and Ballantyne, 2002). 또한, 어류의 간 조직은 가장 기본적인 대사기관으로 삼투조직에 탄수화물 대사물(주로 glucose)을 제공하는 주요공급원이다(Tseng and Hwang, 2008; Zhang et al., 2017). 혈액이나 체액으로 분비되는 호르몬과 같은 조절인자를 통하여 이러한 기관들의 삼투조절이 이루어진다. 호르몬은 체액을 조절하는 중요한 systemic regulator로서 경골어류마다 다르게 작용한다. 본 연구에서는 물과 이온 이동조절에 관여하는 인자로서  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter 1 (NKCC1), aquaporin3 (AQP3) 및 CFTR gene을, 삼투조절에 관여하는 체액 인자로서는 glucocorticoid receptor (GR)과 growth hormone receptor (GHR) gene을 선정하였다.

무지개송어(rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*)는 담수환경에서 부화에서 산란까지 이루어지는 육봉형 연어과 어류로서 국내 담수어류 양식종이다. 삼투압조절능력을 활용한 어류 해수양식방법은 담수양식보다 빠른 성장개체를 얻을 수 있고, 지하해수를 이용할 수 있는 육상양식장의 경우 연중 양식이 가능하여 경제적인 측면에서도 가치가 높다. 우리나라 현장에서의 해수양식시 가장 문제시되는 대량폐사의 원인은 환경적 염분에 대한 적응력을 들 수 있다. 본 연구에서는 무지개송어가 단기간

(5일)의 점진적인 염분변화에 따른 영향을 혈액생상학적 분석과 삼투조절 메커니즘의 단백질과 호르몬의 변화를 통하여 알아보고자 하였다. 이러한 어류의 체액 조절 항상성과 호르몬과의 연관성을 확인하고, 향후 어류의 해수양식의 양성확립에 도움이 되고자 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 사육수의 염분 조절

실험어로 사용된 무지개송어는 강원도 정선에 위치한 양어장에서 구입하였으며, 실험은 강릉원주대학교 해양과학교육원(Gangneung, Korea)에서 실시하였다. 해수순치 실험에 사용된 무지개송어(체중 및 길이,  $638 \pm 54$  g,  $38.6 \pm 2$  cm)는 우수식 콘크리트 수조(7.5톤) 수조에서 사육하였다. 해수순치 전 실험수온과 동일한 온도에서 일주일간 적응시켰다. 예비실험을 통하여 안정적이고, 낮은 폐사율을 유도한 해수순치 조건을 검토하여 다음을 점진적 염분변화로 정의하였다: 담수조건에서 5일 동안 1일 간격으로 해수를 첨가하여 염분을 조절하였으며, 염도계(YSI 58; YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA)로 측정하며 해수와 담수의 비율을 조절하여 매일 7 psu씩 염분농도를 상승시켰다. 해수순치 24시간 전부터 먹이공급을 중단하였다. 수온은 냉각기를 이용하여  $13 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 용존산소량은 평균  $7\text{-}8 \text{ mg L}^{-1}$ 의 환경 조건으로 설정하였다.

### 혈액생리학적 분석

순치기간동안 사육수의 염분농도 7, 14, 21, 28, 32 psu에 도달되는 시점에서 24시간 경과 후 시점에서 0.1% 2-phenoloxylethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 무지개송어( $n=3$ )를 마취시킨 후 전장과 체중을 측정하였다. 헤파린 처리된 3 mL 주사기를 사용하여 무지개송어의 미부정맥으로부터 혈액을 채취하여 원심분리( $6,000 \text{ g for } 10 \text{ min at } 4^\circ\text{C}$ )한 후 혈장을 분리하여 분석 전까지 1.5 mL tube에 분주하여  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 혈액분석항목은 삼투압, AST (aspartate aminotransferase)/ALT (alanine aminotransferase), 중성지방을 측정하였고, 삼투압측정은 vapor-pressure osmometer (5520; Wescor Inc., Logan, UT, USA), 혈액분석은 자동생화학분석기(Fujidry-chem 4000i; Fujifilm Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

### 염분조절 유전자 발현 분석

염분변화에 따른 무지개송어의 이온채널단백질과 체액조절 메커니즘을 이해를 하기 위해서는 아가미, 간, 신장을 추출하여 total RNA분리를 실시하였다. RNAiso Reagent (Takara Bio, Shiga, Japan)을 이용하여 total RNA를 추출하였고, Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 분광광도계를 사용하여 RNA를 정량하였다. RNeasy Plus Mini Kit

(Qiagen, Hilden, Germany)와 RNase-free DNase set (Qiagen)을 이용하여 추가적인 정제작업을 진행하였다. cDNA합성은 PrimeScript RT reagent kit (Takara, Kyoto, Japan)을 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 RNA 역전사 반응을 유도하였다. 염분변화에 따른 유전자의 정량분석을 위해서 Thermal Cycler Dice™ real-time PCR system (Takara)과 SYBR premix ExTaq II Kit (Takara)을 사용하였다. PCR을 수행하기 위한 primer 정보는 Table 1에 나타내었다. 대조구로 사용한 house-keeping gene은 elongation factor 1 (EF1)이었으며, real-time PCR 조건은 초기 변성으로 95°C 30초간 1 cycle, 이어서 95°C에서 5초, 60°C에서 30초를 45 cycles로 수행하였다. 유전자의 실험결과는 Livak (2<sup>-ΔΔCT</sup>) 방법(Livak and Schmittgen, 2001)에 따라 나타내었다.

통계분석

실험결과는 mean ± standard error (SEM)로 나타냈으며 SPSS 25.0 software (SAS Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 및 Tukey tests를 실시하여 유의성(P<0.05)을 분석하였다.

결과 및 고찰

염분변화에 따른 삼투압 및 혈액생화학적 분석

염분변화(0, 7, 14, 21, 28, 32 psu)로 이동하는 5일동안 폐사하는 개체는 관찰되지 않았다. 5일동안 점진적 염분 변화로 인한 무지개송어의 삼투압 수치는 7 psu 구간에서 대조구보다 유의적인 차이를 보였으나, 염분도에 상승에 따른 유의적인 수치는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 염분변화에 따른 무지개송어의 혈액생화학적 성상의 변화는 Table 2에 나타내었다. 경골 어류의 체내 삼투압 유지는 담수 및 해수 환경에서 해수의 약

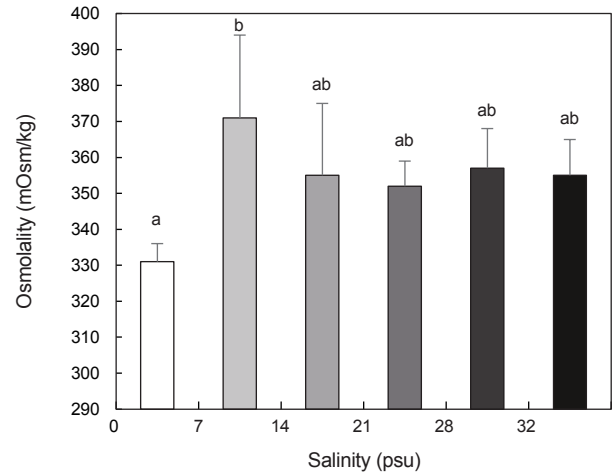


Fig. 1. Blood osmolality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* transferred from 0, 7, 14, 21 and 32 psu.

1/3 정도로 유지되며, 아가미, 신장, 장 조직에서의 통합적인 이온 및 물 분자 이동의 조절로 이루어진다. 협염성 어류인 *fugu Takifugu rubripes*를 3일동안 25, 50, 75, 100% 해수로 이동시켰을 때 폐사개체가 확인되지 않았으며, 혈액 삼투압의 변화는 평균 370 mOsm/kg·H<sub>2</sub>O이었으며, 염분환경 농도가 감소함에 따라 낮아지는 경향을 나타내었다(Lee et al., 2005). 본 연구에서도 5일동안 염분변화에 따른 혈장삼투압은 대조구에서 331 mOsm/kg·H<sub>2</sub>O, 7 psu에서 371 mOsm/kg·H<sub>2</sub>O, 32 psu에서는 355 mOsm/kg·H<sub>2</sub>O의 수치를 나타내었으며, 이는 *fugu*에서와 마찬가지로 생리학적 항상성 범주내에서 유지되었다. 혈액생화학적 분석결과, 간 독성 지표인 AST는 대조구(0 psu)에서 382.3 ± 120에서 7 psu조건에서 462.3 ± 70.7 U/L로 증가하는 경향을 보였으나, 100% 해수조건에서는 388.6 ± 57.5 U/

Table1. Oligonucleotide primers in this study

Genes	Primers	Sequences (5'-3')
AQP3	qOM_AQP3_FW1	TCCACCTTTGGGGTGATAGT
	qOM_AQP3_RV1	TCTCTTCCTTTAGGGCATCC
CFTR	qOM_CFTR_FW1	TAAGGAGGCCCGGATTAACT
	qOM_CFTR_RV1	TCCTTGCTCCTCAACCATA
EF1a	qOM_EF1a_1F	CTGCCGTTAAGGCTGGTAAA
	qOM_EF1a_1R	CTGCGTTGGGTTCTTTTCCT
GHR	qOM_GHR_FW1	CAAGATGTTGACTCCCAGCA
	qOM_GHR_RV1	GCCTCCTGGGATGTGTTTTT
SLC12A2	qOM_SLC12A2_FW1	GGTAGAAACCGTAGCCATTG
	qOM_SLC12A2_RV1	GATGCTTTCAAGCCAGAGGA
GR	qOM_GR_FW	AGAAGCCTGTTTTTGGCCTGTA
	qOM_GR_RV	AGATGAGCTCGACATCCCTGT

L으로 정상 수준으로 회복되었다. ALT의 경우도 이와 유사하게 대조구, 11.6±3.2에서 7 psu조건에서 14±1.7 U/L으로 증가하는 경향을 보였으나 100% 해수조건에서는 8.3±0.5 U/L로 감소하였다(Table 2). 에너지원으로 사용되는 중성지방(triglyceride)에서도 유의적인 경향을 나타나지 않았다. 염분변화에 따른 어류의 혈액생리학적 반응은 어종에 따라 달라진다. 은연어의 경우 AST 및 ALT는 10 psu 조건에서 일시적으로 활성이 증가되었다가 2일째(20 psu)부터 다시 정상수준으로 감소하며 안정화되는 경향을 나타냈다(Hong et al., 2004). 불락이나 굴의 경우에는 염분변화로 인해서 혈장 AST 수치가 유의적으로 증가되었다는 보고가 있다(Wickes and Morgan 1976; Oh et al., 2014).

염분변화시 어류는 체내 이온 평형에 혼란이 야기되어 상당한 스트레스를 받게 되고, 체내 항상성을 유지하기 위해 많은 에너지를 소모하게 된다(Singer and Ballantyne, 2002). 아미노산을 형성하는 효소 중 하나인 AST와 ALT는 대부분의 포유류의 간세포, 어류에서는 간과 비장 세포에 많이 분포하고 있다. 이 효소는 정상적인 상태에서 소량 유출되지만, 스트레스를 받게 되면 세포의 파괴가 일어나 혈액 내로 효소가 방출되어 혈액에서 수치가 높아진다고 알려져 있다. 따라서 간 기능 검사 지표로 진단하는데 많이 이용되고 있다(Smith and Romas, 1980). 본 실험에서는 5일동안의 단계적인 염분변화동안 폐사가 발생하지 않았으며, AST와 ALT를 비롯한 혈액생리학적 조사에서도 유의적인 변화를 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 비추어볼 때 담수에서 사육된 무지개송어(500-600 g)를 단기간이면서 점진적으로 5일동안 염분도를 상승시키는 것은 어류의 스트레스를 줄이면서도 효율적인 해수순치 방법이라고 판단된다.

유전자 정량 분석

염분 변화에 따른 아가미, 신장 및 간의 AQP3, NKCC1 및 CFTR mRNA의 변화

염분이 증가함에 따라 물과 이온 이동조절에 관여하는 인자인 AQP3, NKCC1 및 CFTR mRNA의 발현양상은 조직에 따라 다양하게 나타났다(Fig. 2). 아가미조직에서는 14, 28, 32 psu 염분조건에서 대조구 0 psu에 비해 약 3배 높은 수치를 나타내었으며, NKCC1 mRNA는 7 psu에서 상승하였으나, 14 psu이

상에서는 대조구와 비교하여 유의적인 변화를 나타내지 않았다. CFTR mRNA는 대조구보다 높은 염분조건인 14, 28, 32 psu 조건에서 유의적으로 증가하였다. 신장조직에서는 AQP3 mRNA 발현양은 대조구를 제외한 모든 염분농도 구간에서 담수조건보다 유의적으로 낮은 수치를 나타냈으며, NKCC1 mRNA 변화는 모든 염분농도 구간에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. CFTR mRNA는 32 psu에서 대조구보다 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 간조직에서는 대조구와 비교하여 유의적인 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2).

해수어류는 과다하게 유입된 이온을 배출하기 위해서 해수가 장조직을 통과하는 동안 1가이온 흡수는 NAK 및 V-H<sup>+</sup>-ATPase에 의해 일어나고(Loretz, 1995; Grosell, 2011), 흡수된 물의 삼투압은 장 말단부분인 직장에서 등장레벨까지 감소되어 수분이동통로인 AQP1 분자에 의해 수동적인 물이동이 일어난다(Kim et al., 2008). 한편 아가미 세포에서 일어나는 Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> 흡수 혹은 배출작용은 NAK, NKCC 및 Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter (NCC), 세 개의 이온단백질 간의 협력적인 관계에 의해서 이루어진다(Delpire and Mount, 2002; Grosell, 2011). 포유류에서는 분비형 NKCC1과 흡수형 NKCC2으로 나뉘고, NKCC1은 분비형 상피세포의 기저막에 분포하고, NKCC2는 굵은 상행각 세포(thick ascending limb cell)의 자유 막(apical membrane)에서 존재하여 능동적으로 Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> 및 K<sup>+</sup> 이온이동에 관여한다. 아가미조직 내 존재하는 염류세포는 담수환경에서 이루어지는 NaCl흡수작용(담수형)을 해수형, NaCl배출로 전환하여 이온평형(NaCl homeostasis)을 유지한다(Marshall, 2003). 아가미조직 염류세포(mitochondria-rich cell)에 의한 NaCl분비과정은 (1) NKCC1 cotransporter에 의해 기저막을 통한 Cl<sup>-</sup> 흡수가 증대되고, (2)해수로 이동시 NKCC1 cotransporter을 통해 유입된 Cl<sup>-</sup>은 세포의 apical 부위에 위치한 Cl<sup>-</sup> 채널인 CFTR을 통해 밖(해수)으로 배출된다. 염분농도가 증가함에 따라 이온조절을 담당하는 CFTR, NKCC1 및 NAK 유전자와 염류세포의 수적 증가에 따라 NaCl분비과정이 활발해진다(Marshall, 2003). 본 연구에서는 100% 해수에 도달한 무지개송어의 아가미 조직에서 CFTR mRNA 발현이 대조구에 비해서 약 4배정도 높은 것으로 확인되었으며 이에 반해 NKCC1발현양은 다른 두 유전자에 비해 전반적으로 낮은 편으로 7 psu 구간을 제

Table 2. The effect of salinity on hematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

Salinity (psu)	weight (g)	Length (cm)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GLU (mg/dL)	TG (mg/ dL)	TCHO (mg/dL)	TP (mg/dL)
0	652±51	40±3	382±120 <sup>a</sup>	11.6±3 <sup>ab</sup>	97±13 <sup>ab</sup>	5.4±0.1 <sup>b</sup>	285±17 <sup>ab</sup>	415.6±146 <sup>a</sup>
7	659±81	37±3	462±70 <sup>a</sup>	14±1 <sup>b</sup>	65±7 <sup>a</sup>	4±0.5 <sup>a</sup>	207±36 <sup>a</sup>	258±26 <sup>a</sup>
14	653±48	36±3	371±106 <sup>a</sup>	10.6±1 <sup>ab</sup>	101±26 <sup>ab</sup>	4.8±0.3 <sup>ab</sup>	286±31 <sup>ab</sup>	299±64 <sup>a</sup>
21	546±42	38±1	324±27 <sup>a</sup>	10.6±1 <sup>ab</sup>	86±15 <sup>ab</sup>	4.4±0 <sup>ab</sup>	283±58 <sup>ab</sup>	299±144 <sup>a</sup>
28	682±51	39±1	317±49 <sup>a</sup>	8.3±0 <sup>a</sup>	79±4 <sup>ab</sup>	4.3±0.2 <sup>ab</sup>	246±24 <sup>ab</sup>	287±39 <sup>a</sup>
32	619±51	40±1	388±57 <sup>a</sup>	8.3±0 <sup>a</sup>	107±10 <sup>b</sup>	5.1±0.5 <sup>ab</sup>	344±61 <sup>b</sup>	243±10 <sup>a</sup>

AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; GLU, glucose; TG, triglyceride; TCHO, total cholesterol; TP, total protein.

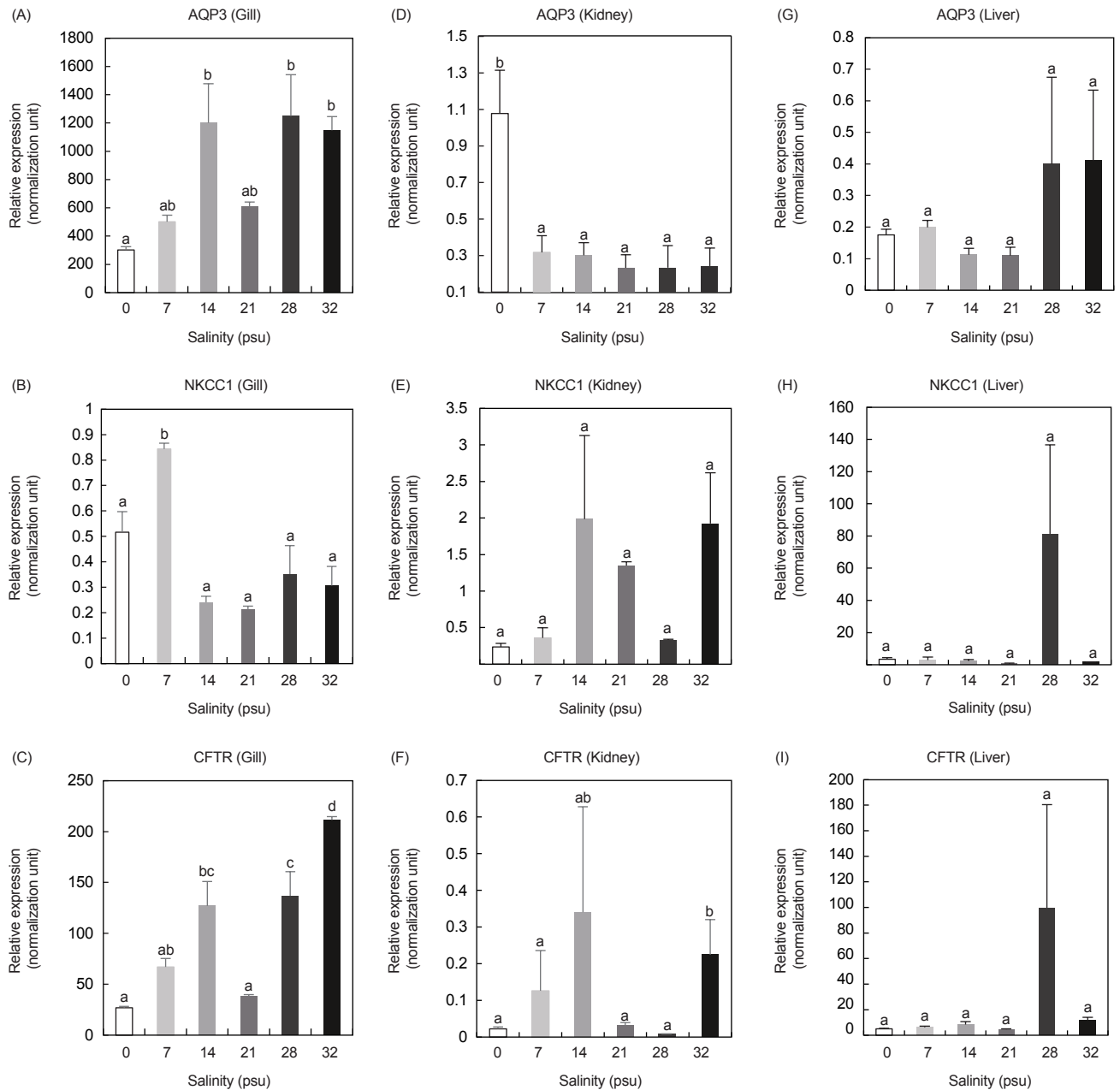


Fig. 2. The changes in the gene expressions profiles for  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter1 (NKCC1), aquaporin3 (AQP3) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in gill, kidney and liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* transferred from 0, 7, 14, 21 and 32 psu, as assessed by real-time PCR. Mean $\pm$ SDs with different letters are significantly different based on ANOVA followed by Turkey tests.

외하고는 대조구에 비해 유의적이 차이를 보이지 않았다. 이는 염분농도가 증가함에 따라 아가미의 세포에서  $\text{Cl}^-$  분비가 활발해지며,  $\text{NaCl}$  흡수형인 NKCC1발현이 감소된다는 사실은 기존 연구와 유사하였다(Kato and Kaneko, 2003). 아가미조직의 AQP3 mRNA는 NKCC1과 CFTR mRNA에 비해 월등하게 높은 발현양을 나타내었다. 대조구에 비해 14, 28, 32 psu

구간에서 약 4배정도 높은 수치를 나타냈으며, 염분이 상승하면서 염류세포의 기저막에 위치한 AQP3 분자의 수동적인 물 이동이 활발하게 이루어지는 것을 판단되었다. Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* AQP3단백질은 염류세포의 기저막(basolateral membrane)에 집중적으로 위치하고 있으며, AQP3 분자가 염류세포에 의한 osmoreception에 관여하고

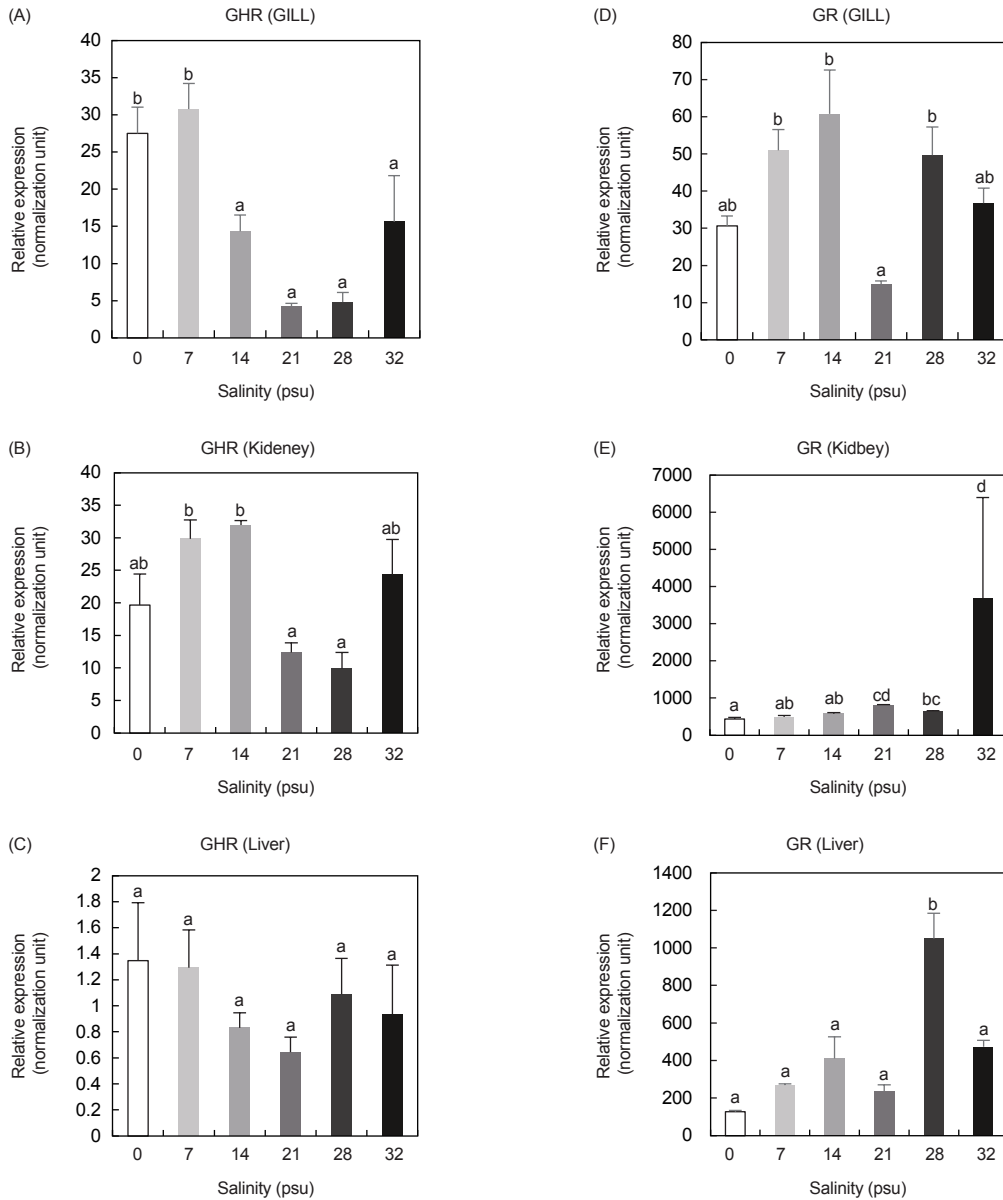


Fig. 3. Differential modulations of growth hormone receptor (GHR) and glucocorticoid receptor (GR) in gill, kidney and liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* transferred from 0, 7, 14, 21 and 32 psu, as assessed by real-time PCR. Mean±SDs with same letters are not significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range tests.

있다(Watanabe et al., 2005). 이는 염분변화에 따라 염류세포의 tubular system의 집적적인 접힘(infolding)에 의해 세포의 기저막 표면이 팽창되므로 표면 대비 세포 부피(cell volume)의 비율은 어떠한 세포보다 높은 관계로 염류세포의 osmosensitivity 활성의 가능성도 예측되었다(Watanabe et al., 2005). 아가미조직은 호흡과 이온교환기능이 월등한 반면에 해수에서 신장의 기능은 제한적으로, 물을 저장하고 2가 이온을 배출하는 역할을 한다(Evans et al., 1999, 2005; Nebel et al., 2005). 본 연구에

서는 신장의 유전자 발현은 아가미에 비해 전반적으로 발현량이 낮게 확인되었으며, 물이동에 관여하는 AQP3 유전자의 발현량은 대조구에 비해 염분도가 증가함에 따라 감소하였다. 신장의 사구체 여과율(glomerular rate, GFR)은 신장이 1분동안 깨끗하게 걸러주는 혈액의 양을 가리킨다. 사구체 여과율을 어종에 따라 다르며, 특히 해수어보다 담수어에서 7-10배 높은 것으로 알려져 있다(Engelund and Madsen, 2011). 무지개송어의 경우, 담수에서는 네프론의 50% 이하가 여과작용을 나타내고,

해수에서는 약 5% 정도로 감소한다. 이는 본 연구에서 AQP3 mRNA의 발현양이 담수(대조구)에서는 높은 수치를 보이다가 해수로 이동되면서 감소하는 경향에 부합된다고 볼 수 있다. 어류의 간조직에서는 모든 유전자에서 유의적인 발현차이를 나타내지 않았다.

어류 아가미 조직의 염류세포는 내분비와 신경계와 상관없이 담수형에서 해수형으로 기능적 분화가 가능한 *autonomous mechanisms*을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Shiraishi et al., 2001). 본 연구에서는 tilapia와 같이, 아가미조직 염류세포의 기저막에 의해 상승된 외부환경의 염분변화가 감지되어 염류세포가 담수형에서 해수형으로 전환되고, AQP3가 자발적으로 물흡수를 왕성하게 이루어지고 있다고 판단된다(Watanabe et al., 2005). Killifish *Fundulus heteroclitus*의 opercular epithelium 염류세포의 기저막에서 삼투압변화를 감지하여 Cl<sup>-</sup> 분비에도 영향을 미친다(Zadunaisky et al., 1995). 무지개송어에서 염분변화에 따라 상승되는 아가미 CFTR 발현량이 이러한 사실을 뒷받침하고 있다. 단기간 염분증가에 따른 재빠른 대응을 하기 위해서 아가미 조직에서 물과 이온조절이 자발적으로 이루어지고 있다는 사실을 확인하였다.

#### 염분 변화에 따른 GHR mRNA 및 GR mRNA의 변화

염분변화에 따른 아가미, 신장, 간에서의 GR receptor 및 GHR mRNA의 발현 변화를 조사하였다. 아가미조직에서는 GHR mRNA는 14 psu구간에서 약 2배 감소하였으며, GR mRNA 발현은 증가하는 경향은 관찰되나, 유의적인 변화는 확인되지 않았다. Coho salmon *Oncorhynchus isutch* (Shrimpton, 1996)과 atlantic salmon *Salmo salar* (Shrimpton and McCormick, 1998)의 경우, 해수순치 동안, GR mRNA 발현이 감소되었고, brown trout *Salvelinus fontinalis*은 해수에 노출시 GR수가 감소한다고 보고하였다(Weisbart et al., 1987). 본 연구에서 신장 GHR mRNA 발현은 대조구에 비해 14 psu구간에서 상승하였다가 21, 28 psu에서 유의적으로 감소하였으며, GR mRNA 발현은 21 및 32 psu에서 대조구에 비해 8.47배 유의적으로 증가하였다. 간조직에서는 GR mRNA 발현양이 월등히 높았으며 28 psu 구간에서 대조구보다 8.22배 높은 수치를 보였다. 스트레스 환경에 놓이게 되면 corticosteroid hormones인 cortisol은 GR를 통하여 발현이 매개되어 조직 호르몬 축진이 이루어진다. 스트레스로 인하여 증가한 혈장 cortisol은 GR유전자 발현을 조절하고, 이러한 GR 유전자는 두신, 비장, 아가미, 신장에서 주로 발현된다는 것으로 알려져 있다(Vazzana et al., 2010). Killifish의 경우, GR유전자와 혈장 cortisol activation로 인해서 아가미 조직의 CFTR mRNA 발현은 상승되어, Cl<sup>-</sup> 배출을 활발해진다(Shaw et al., 2007). 이는 본 연구의 결과와 유사한 경향을 나타내며, 이러한 체계적인 유전자의 발현으로 인해서 무지개송어가 5일동안의 점진적 염분변화에 폐사개체 없이 잘 적응하였다고 판단되었다. 혈액생화학적 분석 결과와 같이 고려해 볼 때 본 연구에서의 무지개송어의 점진적 염분변화는 생

리학적 항상성 유지 범주를 벗어나지 않는 염분스트레스이기는 하였으나, 스트레스와 관련된 유전자는 높게 발현하였다. 그러나, 점진적 염분증가가 진행되는 동안 폐사개체는 확인되지 않았다. 이는 본 연구에서 500-600 g 무지개송어에 적용된 해수순치 방법이 효율적이라고 사료된다. 이러한 점진적 순치방법을 100-150 g 개체에 적용하였을 때 폐사개체없이 순치가 완료되었으나, 해수 양성과정(해수순치 완료 후 2달)동안 빈번한 폐사가 발생하였다(unpublished data). 본 연구결과를 바탕으로 성공적인 무지개송어 해수 완전양성법을 확립하기 위해 다양한 크기, 온도 등의 사육양식조건을 검토하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 사 사

이 성과는 강원씨그랜트사업(2020년도) 및 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2020R1F1A1060772).

## References

- Aoki M, Kaneko T, Katoh F, Hasegawa S, Tsutsui N and Aida K. 2003. Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed in the apical membrane of mucosal epithelial cells in seawater-adapted Japanese eel. *J Exp Biol* 206, 3495-3505. <https://doi.org/10.1242/jeb.00579>.
- Delpire E and Mount DB. 2002. Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* 64, 803-843. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.155847>.
- Engelund MB and Madsen S. 2011. The role of aquaporins in the kidney of euryhaline teleosts. *Front Physiol* 2, 51. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00051>.
- Evans DH, Piermarini PM and Choe KP. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85, 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>.
- Evans DH, Piermarini PM and Potts WTW. 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J Exp Zool* 283, 641-652. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990601\)283:7<641::AID-JEZ3>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990601)283:7<641::AID-JEZ3>3.0.CO;2-W).
- Grosell M. 2011. Intestinal anion exchange in marine teleosts is involved in osmoregulation and contributes to the oceanic inorganic carbon cycle. *Acta Physiol* 202, 421-434. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02241.x>.
- Hwang PP and Lee TH. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148, 479-497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.416>.
- Hong GP, Kim BG, Jeon JK, Kim YH, Park YJ, Myoung JG

- and Kim JM. 2004. Serum stress responses during seawater acclimation in coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Ocean Polar Res* 26, 433-438. <https://doi.org/10.4217/OPR.2004.26.3.433>.
- Katoh F and Kaneko T. 2003. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established "time-differential double fluorescent staining" technique. *J Exp Biol* 206, 4113-4123. <https://doi.org/10.1242/jeb.00659>.
- Kaneko T and Hiroi J. 2008. Osmo- and ionoregulation. In: *Fish larval physiology* Finn RN and Kapoor BG, eds. Science Publishers, Enfield, 163-183.
- Kim YK, Ideuchi H, Watanabe S, Park SI, Huh MD and Kaneko T. 2008. Rectal water absorption in seawater-adapted Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp Biochem Physiol A* 151, 533-541. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.016>.
- Kolar CS and Lodge DM. 2002. Ecological predictions and risk assessment for alien fishes in North America. *Science* 298, 1233-1236. <https://doi.org/10.1126/science.1075753>.
- Lee KM, Kaneko T and Aida K. 2005. Low-salinity tolerance of juvenile fugu *Takifugu rubripes*. *Fish Sci* 71, 1324-1331. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.01098.x>.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Loretz CA. 1995. Electrophysiology of ion transport in teleost intestinal cells. *Fish Physiol* 14, 25-56. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60241-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60241-1)
- Marshall WS. 2003. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1618, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.015>.
- Marshall WS and Grosell M. 2005. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: *The physiology of fishes*, 3rd ed. Evans DH and Claiborne JB, eds. CRC Press, New York, NY, U.S.A., 177-230.
- McCormick SD. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am Zool* 41, 781-794. <https://doi.org/10.1093/icb/41.4.781>.
- Nebel C, Nègre-Sardargues G, Blasco C and Charmantier G. 2005. Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Anat Embryol* 209, 193-206. <https://doi.org/10.1007/s00429-004-0438-6>.
- Oh SY, Kim CK, Jang YS, Choi HJ and Myoung JG. 2014. Effect of salinity on survival, oxygen consumption and blood physiology of Korean rockfish *Sebastes schlegelii*. *Ocean Polar Res* 36, 135-143. <https://doi.org/10.4217/OPR.2014.36.2.135>.
- Shaw JR, Gabor K, Hand E, Lankowski A, Durant L, Thibodeau R, Stanton CR, Barnaby R, Coutermarsh B, Karlson KH, Sato JD, Hamilton JW and Stanton BA. 2007. Role of glucocorticoid receptor in acclimation of killifish *Fundulus heteroclitus* to seawater and effects of arsenic. *Am J Physiol* 292, R1052-R1060. <https://doi.org/10.1152/ajp-regu.00328.2006>.
- Shiraishi K, Hiroi J, Kaneko T, Matsuda M, Hirano T and Mori T. 2001. *In vitro* effects of environmental salinity and cortisol on chloride cell differentiation in embryos of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*, measured using a newly developed 'yolk-ball' incubation system. *J Exp Biol* 204, 1883-1888. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.11.1883>.
- Shrimpton JM and McCormick SD. 1998. Seasonal differences in plasma cortisol and gill corticosteroid receptors in upper and lower mode juvenile Atlantic salmon. *Aquac Fish* 168, 205-219. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00350-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00350-0).
- Shrimpton JM. 1996. Relationship between size, gill corticosteroid receptors, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity and smolting in juvenile coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in autumn and spring. *Aquac Fish* 147, 127-140. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01390-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01390-7).
- Singer TD and Ballantyne JS. 2002. Sturgeon and paddlefish metabolism. In: *Sturgeons and paddlefish of North America*. LeBreton GTO, Beamish FW H and McKinley RS, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 167-194.
- Smith AC and Romos F. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J Fish Biol* 17, 445-450. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02777.x>.
- Stocco DM, Wang XJ, Jo YA and Manna PR. 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: More complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19, 2647-2659. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0532>.
- Takahashi H and Sakamoto T. 2013. The role of 'mineralocorticoids' in teleost fish: relative importance of glucocorticoid signaling in the osmoregulation and "central" actions of mineralocorticoid receptor. *Gen Comp Endocrinol* 181, 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.016>.
- Takei Y and McCormick SD. 2013. Hormonal control of fish euryhalinity. In: *Euryhaline fishes. Fish physiology*. McCormick SD, Farrell AP and Brauner CJ, eds. Elsevier, New York, NY, U.S.A., 69-123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396951-4.00003-7>.
- Takei Y, Hiroi J, Takahashi H and Sakamoto T. 2014. Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes. *Am J Physiol* 307, 778-792. <https://doi.org/10.1152/ajp-regu.00104.2014>.
- Tseng YC and Hwang PP. 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comp Biochem Physiol* 148, 419-429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.009>.
- Vazzana M, Vizzini A, Sanfratello MA, Celi M, Salerno G and Parrinello N. 2010. Differential expression of two glucocor-



- ticoid receptors in seabass (teleost fish) head kidney after exogenous cortisol inoculation. *Comp Biochem Physiol* 157, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.05.003>.
- Watanabe S, Kaneko T and Aida K. 2005. Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater. *J Exp Biol* 208, 2673-2682. <https://doi.org/10.1242/jeb.01684>.
- Weisbart M, Chakrabort PK, Gallivan G and Eales JG. 1987. Dynamics of cortisol receptor activity in the gills of the brook trout *Salvelinus fontinalis*, during seawater adaptation. *Gen Comp Endocrinol* 68, 440-448. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90083-9](https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90083-9).
- Wickes MA and Morgan RP. 1976. Effects of salinity on three enzymes involved in amino acid metabolism from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol B* 5, 339-343. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(76\)90338-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90338-2).
- Zadunaisky JA, Cardona S, Au L, Roberts DM, Fisher E, Lowenstein B, Cragoe EJ and Spring KR. 1995. Chloride transport activity by plasma osmolarity during rapid adaptation to high salinity of *Fundulus heteroclitus*. *J Membr Biol* 143, 207-217. <https://doi.org/10.1007/BF00233449>.
- Zhang X, Wen H, Wang H, Ren Y, Zhao J and Li Y. 2017. RNA-Seq analysis of salinity stress-responsive transcriptome in the liver of spotted sea bass *Lateolabrax maculatus*. *PLoS One* 12, e0173238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173238>.