

Suppression Subtractive Hybridization을 이용한 삼투압 스트레스에 관여하는 Osmotic Stress Transcription Factors 조사

Diego F. Fiol, Ph.D. and Dietmar Kultz, Ph.D.
Physiological Genomics Group, Department of Animal Science, University of California,

광염성(생물이 외계(外界)의 넓은 범위에 걸친 염분의 농도변화에 견디어 생활할 수 있는 성질) 경골 어류의 아가미는 외부의 수질환경에 직접 접촉하고 삼투압 시 중요한 역할을 하는 조직이기 때문에 삼투압 스트레스에 대한 적응을 연구하는데 있어서 아주 훌륭한 모델이다. Tilapia(Tilapid, 민물 돔, *Oreochromis mossambicus*)를 담수(FW)에서 해수(SW)로 순화시킨 후, 아가미에서 추출한 mRNA를 이용하여 Suppression Subtractive Hybridization(SSH)을 실시하여 고삼투압 스트레스 하에서 일시적으로 급속히 유도되는 2개의 전사인자, 삼투압 스트레스 전사인자1(OSTF1, osmotic stress transcription factor 1) 및 전사인자 IIB(TFIIB, transcription factor IIB)의 tilapia homology를 동정하였다. 이 실험 결과 광염성 경골 어류에서 OSTF1 및 TFIIB가 전사 조절에 의해 삼투압에 적응하도록 하는 삼투압 감지 신호 전달의 중요한 요소라고 결론지었다.

서론

광염성 경골 어류는 주로 신장 외부의 NaCl 수송에 의해 혈장 삼투압의 항상성을 유지하는 삼투압 조절 생물이다. 광염성 경골 어류는 해수에서는 능동적으로 염(NaCl)을 배출하고 담수에서는 주로 아가미 상피를 통해 염(NaCl)을 능동적으로 흡수한다. 광염성 어류가 담수에서 해수로의 환경변화에 적응하는 동안 이온 수송 및 투과에 필요한 변화에 대처하기 위해 아가미 상피는 매우 큰 폭으로 변화한다. 이 변화에는 아가미 상피세포의 신진대사 변화, 아가미 상피세포의 분화 패턴 변화 및 삼투압 조절에 능동적으로 관여하는 수많은 이온 수송체의 발현과 활성 변화가 포함된다(1). 염분의 변화에 대한 여러 가지 적응 반응은 전사 조절을 토대로 한다(2-7). 그러나 경골 어류에 있어서 삼투압 스트레스에 특이적인 전사인자는 아직 확인되지 않았다. 본 연구에서는 광염성 tilapia(*Oreochromis mossambicus*)의 아가미 상피에서 추출한 mRNA에서 Suppression Subtractive Hybridization(SSH)을 실시하여, 두 가지 새로운 전사인자인 OSTF1과 TFIIB의 tilapia homology를 동정하였다.

물 삼투압 농도에 의해 제어되는 2개의 전사인자 cloning
담수에서 해수, 또는 담수에서 담수(handling controls)로 옮겨 4시간 경과한 물고기의 아가미에서 total RNA를 추출하였다. Total RNA에서 mRNA를 NucleoTrap mRNA Purification Kit로 정제하였다. 해수 조건의 농축한 cDNA로 Clontech의 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit(Clontech Code 637401)를 이용하여 SSH-PCR법으로 subtractive library를 만들었다. SSH clone의 full length clone은 degenerate primer(DPP) 및 Clontech의

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech Code 634914)를 이용하여 만들었다(그림 1 Panel A 및 B). 담수 및 해수에서 4시간 순화시킨 물고기에서 채취한 아가미 상피 유래의 mRNA 시료를 이용한 semi-quantitative PCR에 의해 OSTF1 및 TFIIB의 mRNA가 고삼투압 스트레스 하에서 발현이 증가된다는 사실을 확인하였다(그림 1 Panel C 및 D). (자세한 연구내용은 아래 참고문헌을 참조하기 바란다(8))

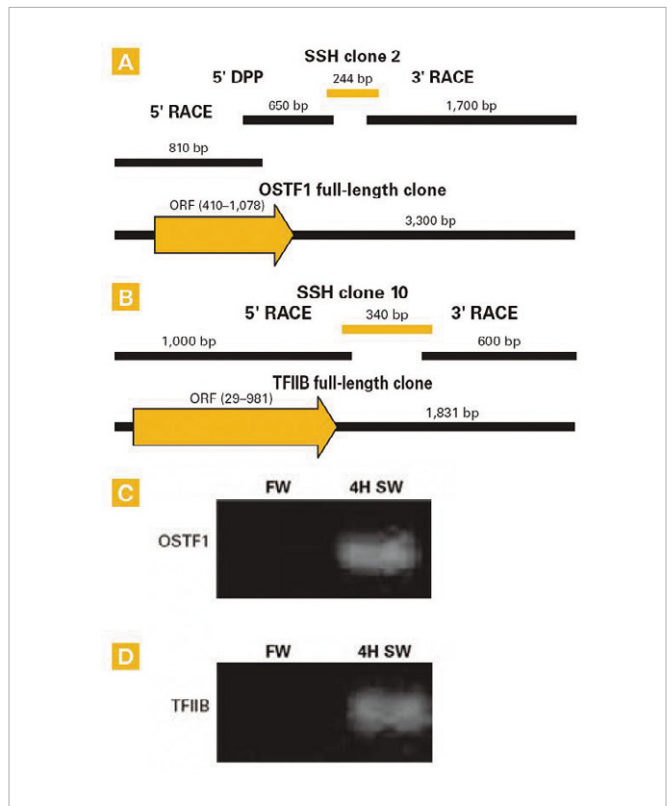


그림 1. Suppression Subtractive Hybridization(SSH)에 의한 OSTF1 및 TFIIB 동정
SSH clones2(Panels A) 및 SSH clone10(Panel B)을 RACE(SMART RACE cDNA Amplification Kit) 및 DPP(degenerate primer에 의한 PCR) 등의 PCR 방법을 이용해서 증폭시켰다. 담수(FW)에서의 물고기(대조) 및 해수(SW)에 4시간 순화시킨 물고기에서 시료의 semi-quantitative RT-PCR 결과를 Panel C 및 D에 나타내었다.

OSTF1 및 TFIIB는 고삼투압 스트레스 하의 초기 발현 유전자이다

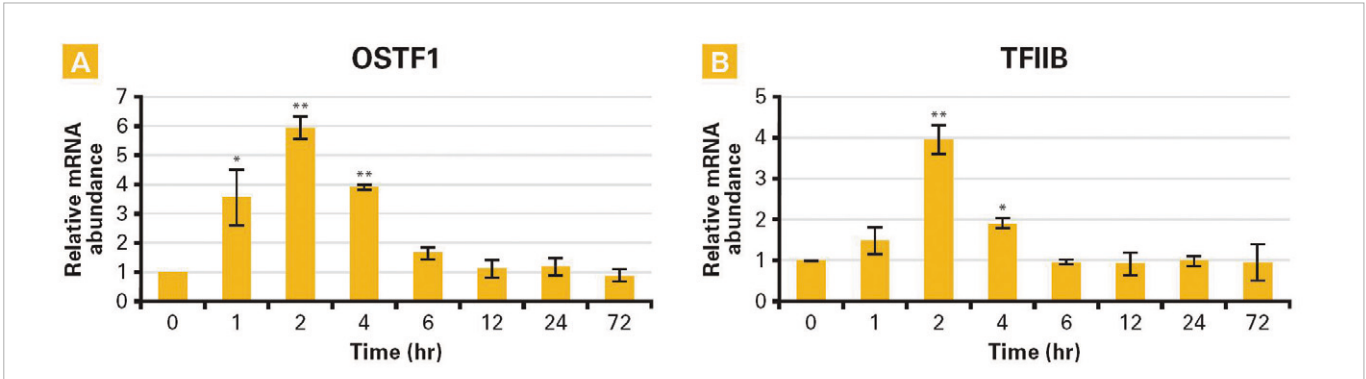


그림 2 OSTF1 및 TFIIIB의 mRNA의 고삼투압에 의한 유도
OSTF1(Panel A) 및 TFIIIB(Panel B)는 전사인자량을 정량적 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 실험은 4회 반복하여 실시하였다(n=4). 데이터는 평균치±SEM으로 나타냈으며 대조 시료(0hr=FW)와 비교하여 p<0.05(*) 및 p<0.01(**)이다.

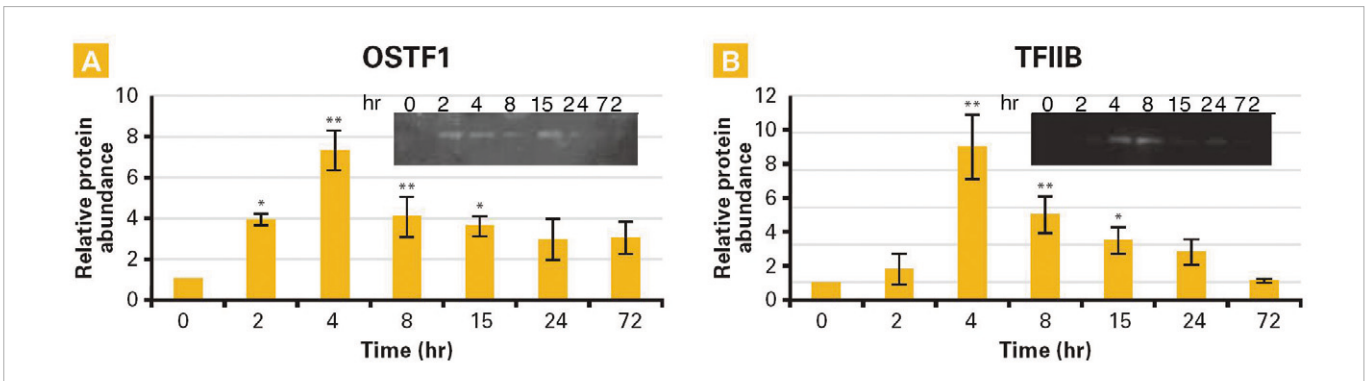


그림 3, 고삼투압에 의한 OSTF1 및 TFIIIB 단백질의 시간 경과 분석.
OSTF1(Panel A) 및 TFIIIB(Panel B)의 단백질 발현량을 Western blot법으로 분석하고, 또 Densitometry로 정량하였다. 전형적인 Western blot결과를 삽입 부분에 나타내었으며, 실험은 4회 반복하였다(n=4). 데이터는 평균치±SEM으로 나타냈으며 대조시료(0hr=FW)와 비교하여 p<0.05(*) 및 p<0.01(**)이다.

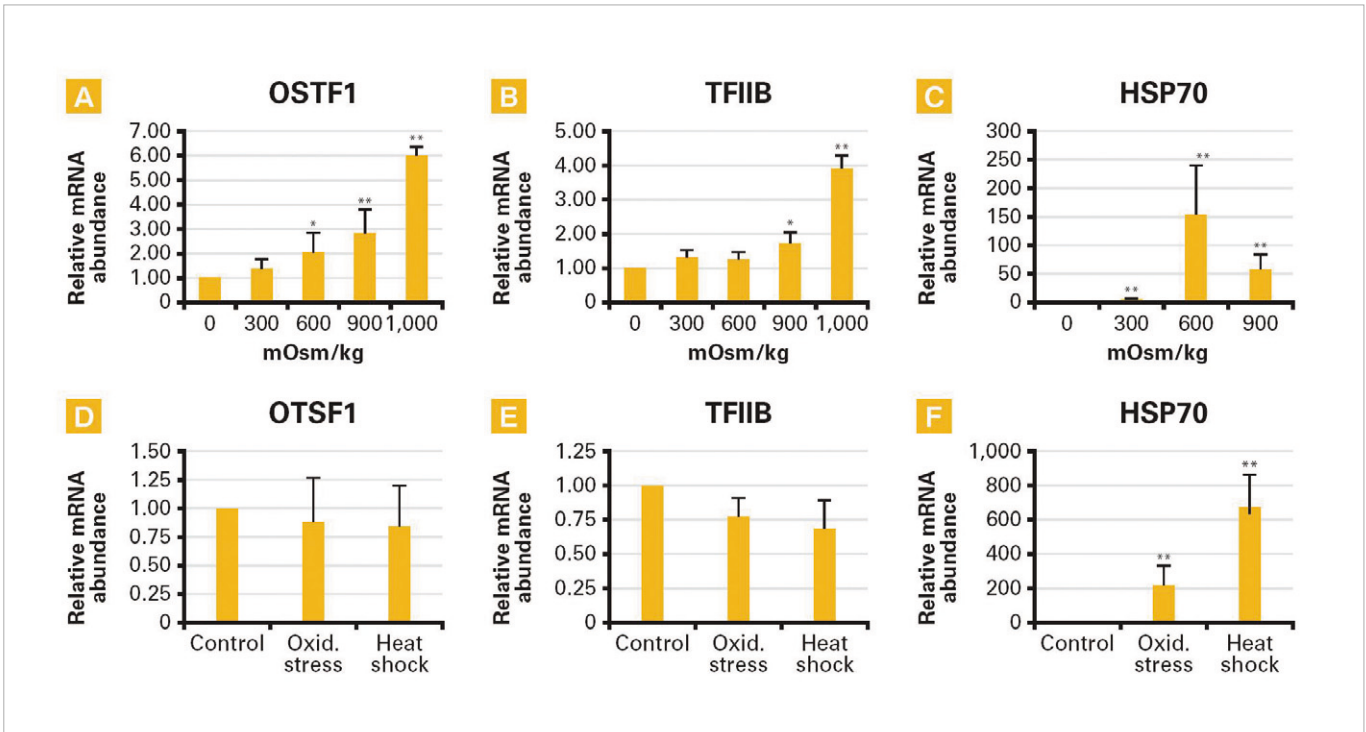


그림 4 고삼투압, 산화(1 mM H₂O₂) 및 열(+10℃) 스트레스 하에서 OSTF1, TFIIIB, 및 Hsp70의 mRNA 발현 분석.
각각 다른 염 농도(Panel A, B, C), 산화 스트레스 또는 heat shock(Panel D, E, F)에 2시간 노출시킨 물고기의 OSTF1(Panel A, D), TFIIIB(Panel B, E), Hsp70(Panel C, F)의 전사량을 quantitative RT-PCR로 측정하였다. 실험은 4회 반복으로 하였으며(n=4). 데이터는 평균치±SEM으로 나타냈고 대조시료(FW, 26℃)와 비교하여 p<0.05(*) 및 p<0.01(**)이다.

SSH에 의해 농축된 tilapia clone은 주로 3' UTR 안에 국소적으로 존재한다. SSH에 의해 확인된 서열이 짧고, 또 tilapia가 모델 실험 동물종이 아닌데도 Smart RACE 기술을 이용하여 OSTF1 및 TFIIIB에 대응하는 full sequence를 신속하게 얻을 수 있었다. Quantitative Real Time PCR(qPCR)에서 이들 2개의 전사인자의 삼투압에 의한 전사체 발현유도는 일시적이며, 유사한 발현 경과 패턴이 나타났다(그림 2). OSTF1 및 TFIIIB는 고삼투압 스트레스 하에서 동시에 유도되었고, 이는 초기 발현 유전자(IEGs)와 같은 유도 활동 성질을 갖고 있다. 특이적 항체를 이용한 immuno-blotting에 의해 검증된 고삼투압 스트레스 후의 OSTF1 및 TFIIIB 단백질량의 변화는 mRNA 유도의 경우와 비교하면 약간 늦으나 유사한 결과를 나타냈다(그림 3). 이들 OSTF1 및 TFIIIB의 고삼투압에 의한 단백질 level에서의 발현 유도는 이것이 기능적으로 중요하다는 것을 나타낸다.

2개의 전사인자 유도는 분명하게 주위 환경 내의 염분의 상승 정도에 의존한다(그림 4). 대조적으로 물고기의 산화 스트레스(1 mM H₂O₂) 또는 heat shock(36°C)에 의해 OSTF1 및 TFIIIB의 mRNA량은 증가하지 않는다(그림 4). 산화 스트레스 및 heat shock 이 물고기에게 있어서 스트레스가 있는 상태라는 것을 확인하기 위해 동일한 시료 중에 Hsp70의 발현변화를 정량했다. 이 결과에서 OSTF1 및 TFIIIB의 유도는 삼투압 스트레스에 아주 특이하다는 것을 나타내고 있다.

OSTF1은 Leucine zipper 구조를 가진 전사인자인 TSC-22/GILZ(Transforming Growth Factor beta(TGF-β)-Stimulated Clone-22/Glucocorticoid Induced Leucine Zipper) 단백질 family에 속한다. 이들 단백질은 다른 family 구성원과 homo 및 hetero dimer를 형성한다(포유류는 7종류, 경골류는 5~10종류 이상). TSC-22 / GILZ family 구성원의 기능에 비춰보면, OSTF1은 고삼투압 스트레스에 대한 빠른 반응에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

OSTF1과 달리 TFIIIB는 일반적인 전사인자며, 고삼투압에 의한 유도는 예측되지 않았다. 이는 고삼투압에 의한 TFIIIB 유도에 대해서는 현재로서는 해명되지 않았지만 고삼투압 스트레스 하에서 chromatin 응축 및 전사 효율의 저하를 보충하기 위해 필요할 것으로 생각된다(9).

결론

SSH법에 의해 tilapia의 삼투압 조절에 관여하는 2개의 신규 전사인자를 동정하는데 성공하였다. 스트레스 하에서 TFIIIB mRNA 유도는 고세균 및 효모에서 이미 확인되었다(10,11). Tilapia의 아가미에서 OSTF1과 TFIIIB이 동시에 유도되는 것은, OSTF1이 삼투압 방어 유전자로서 TFIIIB를 선택적으로 발현시켰기 때문이라고 생각한다. 이 가설과 일치하게, TFIIIB는 스트레스 하에서 NF-κB, c-jun, 및 p53 등의 다른 전사인자와 상호작용을 하고, 스트레스에 반응하는 유전자의 전사를 촉진하기 위해 TFIIIB가 이들 유전자를 표적으로 하고 있다는 것을 시사한다(12).

참고문헌

1. Evans, D. H. (2002) *J. Exp. Zool.* **293**(3):336-347.
2. Tipsmark, C. K., et al. (2002) *J. Exp. Zool.* **293**(2):106-118.
3. Mistry, A. C., et al. (2001) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol* **281**(5):R1594-R1604.
4. Takeuchi, K., et al. (2000) *Fish Physiol. Biochem.* **23**(2):173-182.
5. Cutler, C. P. & Cramb, G. (2002) *J. Exp. Biol.* **205**(Pt 17):2643-2651.
6. Kultz, D., et al. (2001) *J. Exp. Biol.* **204**(Pt 17):2975-2985.
7. Mistry, A. C., et al. (2001) *Biochem. J.* **360**(Pt 1):107-115.
8. Fiol, D. F. & Kultz, D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(3):927-932.
9. Kultz, D. (2000) *Environmental Stressors and Gene Responses*, eds. Storey, K. B. & Storey, J. Elsevier, pp. 157-179.
10. Thompson, D. K., et al. (1999) *Mol. Microbiol.* **33**(5):1081-1092.
11. Hoopes, B. C., et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**(22):4435-4443.
12. Espinosa, J. M., et al. (2003) *Mol. Cell* **12**(4):1015-1027.

관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
Clontech™ PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	7 rxns	637401
Clontech™ PCR-Select™ Differential Screening Blocking Solution	1 ml	637402
Clontech™ PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit	7 rxns	637404
Clontech™ PCR-Select™ Differential Screening Kit	each	637403
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	7 cDNA & 30 PCR rxns	634914