



## 염분 변화에 따른 감성돔 *Acanthopagrus schlegeli*의 Prolactin Receptor (PRLR) mRNA 발현 및 생리적 반응

안광욱, 민병화<sup>1</sup>, 박인석, 허윤성<sup>1</sup>, 최용기, 조필규, 장영진<sup>2</sup>, 최철영\*

한국해양대학교 해양환경생명과학부

<sup>1</sup>국립수산물과학원 수산생명과학본부 양식관리팀

<sup>2</sup>부경대학교 양식학과

## Expression of Prolactin Receptor mRNA and Blood Physiological Responses to Salinity Changes in the Black Porgy *Acanthopagrus schlegeli*

Kwang Wook An, Byung Hwa Min<sup>1</sup>, In-Seok Park, Youn Seong Heo<sup>1</sup>, Yong Ki Choi, Pil Gue Jo, Young Jin Chang<sup>2</sup> and Cheol Young Choi\*

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

<sup>1</sup>Aquaculture Research Team, NFRDI, Busan 619-902, Korea

<sup>2</sup>Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

We isolated complementary DNA (cDNA) encoding prolactin receptor (PRLR) from gill of black porgy *Acanthopagrus schlegeli*. Its PRLR cDNA consists of 1,611 base pairs and encodes the protein of 536 amino acids. To investigate the osmoregulatory abilities of black porgy in different salinities (35, 10 and 0 psu), we examined the expression of PRLR mRNA in osmoregulatory organs (gill, kidney and intestine) using reverse transcription (RT)-PCR. In gill and intestine, PRLR mRNA levels were high in 10 psu, and then decreased in 0 psu, but there is no changes in kidney. Also, plasma osmolality, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> levels decreased during the experimental period. These results suggest that PRLR plays an important role in hormonal regulation in osmoregulatory organs during freshwater acclimation, thereby improving the hyper-osmoregulatory ability of black porgy in hypoosmotic environments.

**Keywords:** Black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*, freshwater acclimation, osmolality, prolactin receptor

### 서론

어류 양식시 사육수의 염분 변화는 혈장 호르몬의 변화뿐만 아니라, 에너지 대사 및 전해질 변화 등 다양한 생리학적 변화를 야기한다. 지금까지 많은 어종에서 염분 변화에 의한 혈중 corticosteroids의 상승이 보고되었으며(Frisch and Anderson, 2005), 이러한 염분 변화에 따른 스트레스 반응은 혈중 글루코스의 상승(Carmichael et al., 1984) 및 혈액과 조직에서 전해질의 변화와 같은 이차적인 반응을 유도하게 된다. 또한, 어체 내에서는 삼투질 농도의 변화가 일어나게 되어, 어류는 체내 항상성을 유지하기 위해 삼투압을 조절하게 된다(Barton and Iwama, 1991). 해수에서는 어체 내의 삼투질 농도보다 체외 삼투질 농

도가 높기 때문에 어류는 다량의 해수를 마시게 되고, 삼투압에 의한 수분의 손실을 보충하기 위해 장에서 수분을 흡수하게 된다. 또한, 아가미에서는 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup> 등의 이온이 유출되고 신장에서는 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup> 이온을 흡수하여 외부로 배출한다. 반면, 담수어류에서는 아가미에서 이온의 배출을 억제하고, 신장에서는 다량의 묽은 소변을 생산하여 외부로 배출한다. 이러한 삼투압 조절에는 prolactin (PRL), cortisol, growth hormone (GH), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA), arginine vasotocin (AVT) 및 aquaporins (AQPs) 등과 같은 호르몬과 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다(Pickford and Phillips, 1959; Warne and Balment, 1995; Chang et al., 2007; Choi and An, 2007; An et al., 2008).

특히, PRL은 뇌하수체에서 분비되는 펩타이드 호르몬으로 담수에서 Na<sup>+</sup> 이온의 유지와 흡수를 조절하며, 혈장 이온 농도의 조절에 있어서도 중요한 역할을 한다(Hirano, 1986). PRL의 합

\*Corresponding author: choic@hhu.ac.kr

성과 분비는 담수나 기수에 적응시 증가한다고 보고되었다 (Ruijter and Wendelaar Bonga, 1988). 더욱이, 담수에 적응하는 동안 PRL은 아가미의 염류세포에서  $\text{Na}^+$ 의 유출을 억제하는 동시에  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 활성을 억제하고 수분의 흡수를 조절하여 이온 수송 능력을 활성화시킨다(McCormick, 1995). 즉, PRL의 활성은 해수보다 담수에서 높은 것으로 알려져 있다(Nishioka et al., 1988).

이러한 PRL은 세포 표면에 존재하는 PRL 수용체 (PRLR)와 결합하였을 때 비로소 그 활성이 개시된다. 지금까지 PRLR cDNA는 몇몇 경골어류에서 클로닝 되었으며, PRLR mRNA의 발현은 아가미, 신장 및 장과 같은 삼투압 조절 기관에서 주로 관찰되었다(Sandra et al., 1995; Santos et al., 1999, 2001; Higashimoto et al., 2001; Lee et al., 2006). 따라서, PRL과 PRLR은 삼투압 조절 기관에서 hydromineral의 균형을 조절하는 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다(Lee et al., 2006).

본 연구에 이용된 감성돔 *Acanthopagrus schlegelii*는 자어에서 치어단계로 성장하면서 근해에서 연해로 이동하며, 이후로는 육지와 근접한 강 하구역에서 서식하는 어종으로 삼투압 조절 능력이 뛰어난 광염성 해산어이다(Kitajima and Tsukashima, 1983).

본 연구의 목적은 광염성 어류인 감성돔을 사용하여 해수에서 담수 환경으로 적응시 삼투압 조절 기관에서의 PRLR 유전자 발현 변화, 혈장 삼투질 농도 및  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  등의 이온 농도의 변화를 분석하여, 저염분 환경에서 감성돔의 삼투압 조절에 관한 생리학 및 분자생물학적 기작을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 담수 순화

220 L 원형의 해수 사육 수조에서 사육중인 1년생 감성돔(평균 전장  $14.3 \pm 0.4$  cm, 평균 체중  $51.0 \pm 6.0$  g) 50마리를 실험에 사용하였다.

실험용 감성돔은 Min et al. (2003)의 방법에 의하여 사육 해수에 지하수를 첨가하여 10 psu의 염분 농도에서 24시간 동안 유지시킨 후, 다시 염분 농도를 낮추어 완전 담수(0 psu)에서 24시간 동안 적응시켰다. 실험기간 동안 수온은  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 자연 광주기 상태로 실험을 실시하였으며 먹이는 공급하지 않았다. 담수에 적응하는 동안 폐사한 개체는 발견되지 않았다.

### 혈액 및 조직 채취

완전 해수(35 psu), 10 psu 해수와 완전 담수(0 psu)에서 24시간 동안 적응시킨 각각의 실험구에서 실험어 5마리씩을 무작위로 꺼내어, 200 mg/L의 tricaine methan sulphonate (MS-222, Sigma, USA)로 마취한 후, heparin 처리된 주사기(3 mL)를 사용하여 미부혈관으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액소용괴를 방지하기 위해 채취한 혈액은 상온에서 10분간 방치한 후, 원심 분리( $4^\circ\text{C}$ , 10,000 rpm, 5분)하여 얻어진 혈장은 분석 전까지

$-80^\circ\text{C}$ 의 초저온 냉동고에 보관하였다. 혈액 채취 후, 실험어의 조직(아가미, 신장, 장)을 채취하였고, 채취한 조직은 total RNA 추출 시까지  $-80^\circ\text{C}$ 의 초저온 냉동고에 보관하였다.

### PRLR cDNA 분리

PRLR 유전자의 증폭을 위하여 유럽산 돔 *Sparus aurata* (AF253527), 잉어 *Cyprinus carpio* (AY661555) 및 무지개 송어 *Oncorhynchus mykiss* (AF229197) 등 이미 보고된 타종에서 잘 보존된 영역의 염기배열을 참고로 하여 PRLR forward primer (5'-GAG TGA CTG GAC CAA CAG TA-3')와 PRLR reverse primer (5'-AAT CTG AGC AGA AGC CAG CA-3')를 설계하였다.

Total RNA는 TRIzol kit (Gibco/BRL, USA)를 이용하여 감성돔 아가미에서 추출하였다. 역전사 반응은 Moloney Murine Leukemia virus에서 유래된 M-MLV Reverse Transcriptase (Bioneer, Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실시하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 반응은 BS Taq Master Mix (Biosesang, Korea)를 이용하여  $94^\circ\text{C}$ 에서 5분간 초기 열변성 1회,  $94^\circ\text{C}$ 에서 30초간 열변성,  $57^\circ\text{C}$ 에서 30초간 primer 결합,  $72^\circ\text{C}$ 에서 30초간 신장 반응을 40회 실시하였고,  $72^\circ\text{C}$ 에서 5분간 최종 신장 반응을 실시하였다. PCR 반응 후, 증폭된 cDNA를 1% agarose gel에 전기영동 한 후, DNA 단편을 잘라내어 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)에 삽입하였고, DH5 $\alpha$  (RBC, Korea)에 형질전환 하였다. Plasmid Purification Kit (Cosmo, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 분리시킨 뒤, EcoRI (Fermentas, USA)으로 DNA 단편을 잘라내어, ABI DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 PRLR의 염기배열을 결정하였다.

### PRLR cDNA의 3'과 5'의 rapid amplification (RACE)

3  $\mu\text{g}$ 의 total RNA를 이용한 RACE-PCR 방법에 의하여 전장의 PRLR cDNA 염기배열을 결정하였다. RACE-PCR 방법은 CapFishing™ Full-length cDNA Premix kit (Seegene, Korea)를 사용하였으며, first-strand cDNA 합성은 oligo (dT) anchor primer (5'-CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA T(T)<sub>18</sub>-3')와 CapFishing™ adaptor를 사용하였다.

3' RACE-PCR은 PRLR-specific primer (5'-CTC CTG TTC CTG GTC CAA AGA TCA GAG G-3')와 3' RACE primer (5'-CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA T-3')를 사용하였다. PCR은 SeeAmp™ Taq Plus Master Mix 25  $\mu\text{L}$ , first strand cDNA 5  $\mu\text{L}$ , 3' RACE primer (10  $\mu\text{M}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , PRLR-specific primer (10  $\mu\text{M}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 와 멸균 증류수 18  $\mu\text{L}$ 로 총 50  $\mu\text{L}$ 를 사용하였고,  $94^\circ\text{C}$ 에서 40초간 열변성,  $62^\circ\text{C}$ 에서 40초간 primer 결합,  $72^\circ\text{C}$ 에서 45초간 신장 반응을 40회 실시한 후, 최종 신장 반응을  $72^\circ\text{C}$ 에서 5분간 실시하였다.

5' RACE-PCR은 PRLR-specific primer (5'-GAA CAG GAG

GCA GAA CAC ACT GCT TCA C-3')와 5' RACE primer (5'-GTC TAC CAG GCA TTC GCT TCA T-3')를 사용하였다. PCR은 SeeAmp™ Taq Plus Master Mix 25  $\mu$ L, first strand cDNA 5  $\mu$ L, 5' RACE primer (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, PRLR-specific primer (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L와 멸균 증류수 18  $\mu$ L로 총 50  $\mu$ L를 사용하였고, 94°C에서 40초간 열변성, 62°C에서 40초간 primer 결합, 72°C에서 45초간 신장 반응을 40회 실시한 후, 최종 신장 반응을 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 반응 후, 형질 전환 및 염기배열 결정은 앞서 서술한 방법과 동일하게 시행하였다.

### 계통 분석

감성돔을 포함한 경골어류의 PRLR 아미노산 배열의 정렬은 BioEdit software (Hall, 1999)를 사용하여 수행하였다. PRLR 아미노산 상동성 비교를 위한 어종은 다음과 같다. 감성돔 *Acanthopagrus schlegelii* (the present study) (EF467927), 자주복 *Takifugu rubripes* (AB164302), 유럽산 돔 *Sparus aurata* (AF253527), 넙치 *Paralichthys olivaceus* (AB047922), 무지개 송어 *Oncorhynchus mykiss* (AF229197), 금붕어 *Carassius auratus* (AF144012), 잉어 *Cyprinus carpio* (AY661555)와 대서양산 연어 *Salmo salar* (DQ508436). 계통수는 MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004)의 neighbor-joining 방법을 이용하여 시행하였다.

### Semi-quantitative reverse transcription (RT)-PCR

감성돔 PRLR mRNA의 조직별(아가미, 신장 및 장) 발현을 알아보기 위하여 semi-quantitative RT-PCR을 실시하였다. 이들 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 이미 결정된 감성돔의 염기 배열을 바탕으로 PRLR forward primer (5'-GAG TGA CTG GAC CAA CAG TA-3'), PRLR reverse primer (5'-AAT CTG AGC AGA AGC CAG CA-3')와 내부표준 유전자로  $\beta$ -actin forward primer (5'-TCG AGC ACG GTA TTG TGA CC-3'),  $\beta$ -actin reverse primer (5'-ACG GAA CCT CTC ATT GCC GA-3')를 설계하여 RT-PCR을 실시하였다. PCR 반응은 BS Taq Master Mix (Biosesang, Korea)를 이용하여 94°C에서 30초간 열변성, 57°C에서 30초간 primer 결합, 72°C에서 30초간 신장반응, 72°C에서 최종 신장반응을 5분간 실시하였다. PCR 반응의 로그함수적 분석을 위하여 아가미, 신장, 장에서 PRLR과  $\beta$ -actin의 적정 cycle 수를 조사한 후, 각각 30 cycle과 25 cycle로 수행하였다. PCR 반응 후, 1% agarose gel에 전기영동 한 후, Gelpro 3.1 (KBT, Korea)을 이용하여 내부표준 유전자인  $\beta$ -actin에 대한 비율로 정량화하였다.

### 혈장 삼투질 농도 및 이온 농도 측정

혈장 삼투질 농도는 Vapor Pressure Osmometer (Vapro 5520, WESCOR Co., USA)로 측정하였고, 혈장  $\text{Na}^+$ 와  $\text{Cl}^-$  농도는 Biochemistry Autoanalyzer (Hitach 7180, Hitach Co., Japan)로 측정하였다.

### 통계 분석

각 실험 결과로부터 얻어진 자료 값 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지 프로그램(version 10.0)에 의한 One-way ANOVA 및 Duncan's multiple range test를 실시하여 평균간의 유의성 ( $P < 0.05$ )을 검정하였다.

## 결 과

### PRLR cDNA 분리

담수 사육환경에서 적응된 감성돔의 아가미에서 추출된 total RNA를 이용하여 RT-PCR에 의하여 증폭된 PRLR cDNA 단편은 398개의 염기로 구성되어 있었다.

PRLR cDNA 단편의 염기배열을 기초로 하여 3' RACE 및 5' RACE법에 의하여 536개의 아미노산을 포함하고 있는 총 1,611개 염기의 cDNA 전염기배열을 결정하였다. 감성돔 PRLR 아미노산 배열을 GenBank에서 그 상동성을 검색해 본 결과, 유럽산 돔 PRLR (AAG17629)과는 87%의 높은 상동성을 나타낸 반면, 잉어 PRLR (AAV71059)과는 51%, 금붕어 PRLR (AAF23268)과는 50%, 그리고 무지개 송어 PRLR (AAG44267)과는 50%의 비교적 낮은 상동성을 보였다. 감성돔 PRLR을 다른 어종의 PRLR과 비교한 결과, 두 쌍의 cystein ( $\text{C}^{33}$ ,  $\text{C}^{43}$  및  $\text{C}^{72}$ ,  $\text{C}^{83}$ )과 세 개의 putative N-linked glycosylation site ( $\text{N}^{108}$ ,  $\text{N}^{129}$ ,  $\text{N}^{166}$ )가 잘 보존되어 있었다. 또한, WS motif (WSDWT, 211-215 residues)와 소수성의 transmembrane domain (230-253 residues)이 잘 보존되어 있었다. Proline-rich region (PPVPGPKI, Box 1, 264-271 residues)과 소수성 영역(LIVT, Box 2, 311-314 residues)이 존재하였다(Fig. 1).

### 계통 분석

감성돔 PRLR 아미노산의 계통 분석을 위한 계통수를 조사한 결과, 경골어류의 PRLR은 크게 두 개의 하위그룹으로 구분되었으며, 본 연구에 사용된 감성돔은 유럽산 돔과 계통적으로 가장 유사함을 알 수 있었다(Fig. 2).

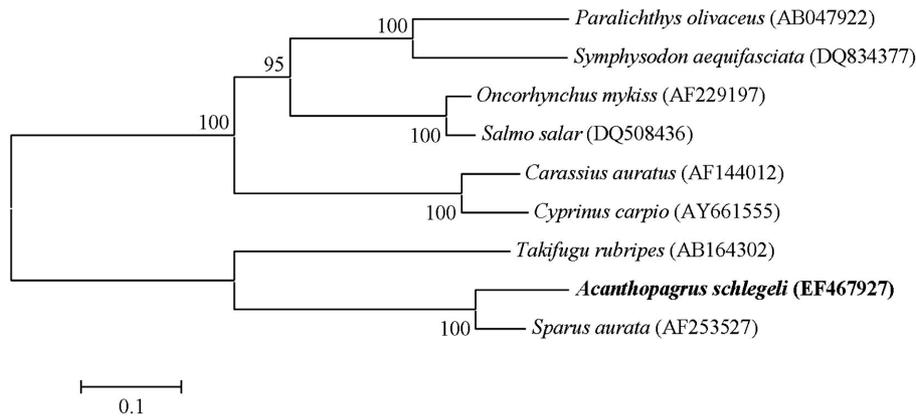
### PRLR mRNA의 조직별 발현

담수 적응에 따른 PRLR mRNA의 발현 정도를 아가미, 신장 및 장 조직을 이용하여 조사한 결과, 10 psu 해수 실험구의 아가미와 장에서는 PRLR mRNA 발현이 35 psu 해수 실험구에 비하여 유의하게 높은 발현을 보였으나, 신장에서는 담수 적응 동안 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

### 혈장 $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ 및 삼투질 농도

염분 변화시 삼투압조절 능력을 알아보기 위하여  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  및 삼투질 농도를 조사한 결과,  $\text{Na}^+$  농도는 35 psu에서  $179.5 \pm 2.5$  meq/L, 10 psu에서  $176.8 \pm 1.9$  meq/L로 유의한 차이가 없었으나, 0 psu 실험구에서는  $171.0 \pm 2.9$  meq/L로 유의하게





**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on an amino acid alignment for PRLR in some teleost fish. Bootstrap values (%) are indicated at each node (1,000 replicates). The score between two protein sequences, which is a measure of the relative phylogenetic relationship between the two protein, is represented by the horizontal distance in this tree, i.e. the shorter the distance, the more related they are.

**Table 1.** Plasma osmolality,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  levels during freshwater acclimation of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* reared in seawater

Salinity	Osmolality (mOsm/kg)	$\text{Na}^+$ (meq/L)	$\text{Cl}^-$ (meq/L)
35 psu	350.0±3.5 <sup>A</sup>	179.5±2.5 <sup>A</sup>	153.0±2.3 <sup>A</sup>
10 psu	341.0±5.8 <sup>B</sup>	176.8±1.9 <sup>A</sup>	145.5±1.0 <sup>B</sup>
0 psu	329.8±8.4 <sup>C</sup>	171.0±2.9 <sup>B</sup>	138.3±3.9 <sup>C</sup>

Values with dissimilar letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Values are means±SD (n=5)

조절 기관인 아가미, 신장 및 장 조직에서 PRLR mRNA의 발현 변화를 비교하였다. 또한, 혈장 이온 및 삼투질 농도를 조사함으로써, PRL-PRLR의 삼투압 조절 기능을 재검증 하였다.

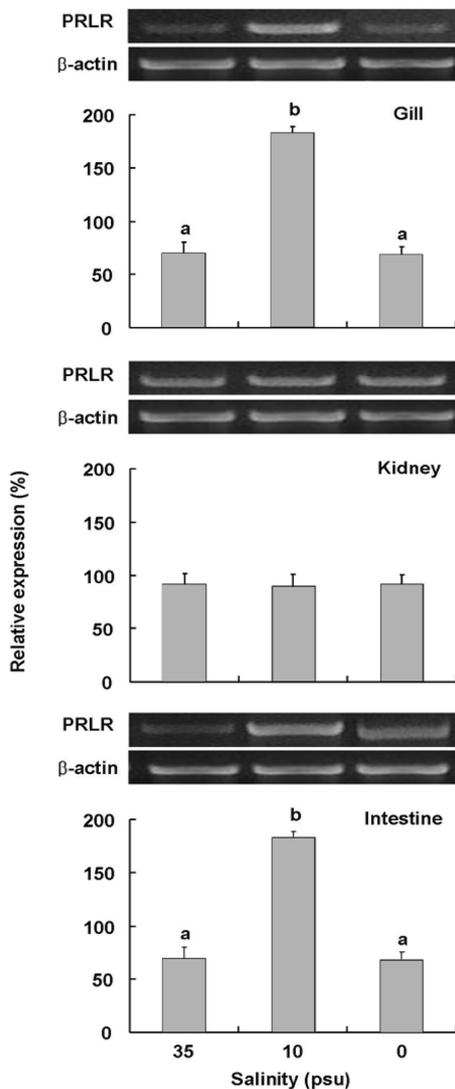
감성돔 아가미에서 분리한 전장의 PRLR cDNA는 536개의 아미노산을 포함하고 있는 총 1,611개 염기로 구성되어 있었다. 감성돔 PRLR의 아미노산 배열을 다른 경골어류의 PRLR과 비교한 결과, 해산어류인 유럽산 돔과는 87%의 높은 상동성을 보였으나, 잉어 및 금붕어 등의 담수어류와는 각각 51%와 50%의 낮은 상동성을 보였다(Fig. 1). 또한, 다른 어종과 아미노산 상동성을 비교해 본 결과 WS motif (WSDWT, 211-215 residues)는 잘 보존되어 있었으며, 특히 WS motif 중 두 번째 아미노산인 W와 네 번째 아미노산인 W는 PRLR이 보고된 모든 종에서 동일하게 보존되어 있었다(Fig. 1). WS motif는 ligand와의 결합과 단백질 분자의 정확한 folding을 하는데 있어 필수적이며, 이 영역의 변이는 수용체 친화력에 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Rozakis-Adcock et al., 1991; Goffin et al., 1998). 또한, 다른 어종의 PRLR 아미노산에서 잘 보존되어 있는 transmembrane domain (230-253 residues)은 이 수용체의 소수성 특성을 나타낸다고 보고되어져 있다(Santos et al., 2001).

계통수 상에서 PRLR은 크게 두개의 하위 그룹(1그룹; 감성돔, 유럽산 돔 및 자주복, 2그룹; 넙치, blue discus, 무지개 송어, 대서양산 연어, 금붕어 및 잉어)으로 분류되었다. 감성돔 PRLR 아미노산은 농어목 돔과의 유럽산 돔과 가장 높은 유사도를 보였으며, 잉어목 어류인 금붕어와 잉어, 연어목 어류인

무지개 송어와 대서양산 연어와도 높은 유사도를 보였다(Fig. 2).

RT-PCR을 이용하여 PRLR mRNA의 발현을 관찰해 본 결과, 아가미, 신장, 장 등 실험에 사용된 모든 조직에서 관찰되었으며, 담수에 적응하는 동안 아가미와 장에서는 발현량이 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 연구 결과는 자주복을 35 psu 해수에서 25 psu 해수로 옮겼을 때(Lee et al., 2006)와 넙치를 35 psu 해수에서 5 psu 해수로 단계적으로 옮겼을 때(Cho et al., 2006) PRLR mRNA 발현이 증가되었다는 기존의 연구와 일치하였다. 또한, 본 연구 결과는 해수 사육 감성돔을 담수로 순화시키는 동안 뇌하수체 PRL mRNA 발현이 증가하였다는 이전의 연구 결과와도 일치하였다(Chang et al., 2007). 이와 같은 사실은 PRL이 담수적응 호르몬으로써, 아가미, 신장 및 장과 같은 삼투압 조절 기관의 세포 표면에 존재하는 특이적 수용체인 PRLR과의 결합에 의해서  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  이온의 유출과 수분의 유입 억제 및  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 활성 등을 조절하여 삼투압 조절 작용을 촉진한 것이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 신장에서 PRLR mRNA 발현량의 증가를 관찰할 수 없었으나, 아가미에서 PRLR mRNA 발현량의 증가가 관찰되었다는 사실은 감성돔이 담수에 적응시 아가미에서  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 활성이 감소되었음을 의미하는 것이며, 장에서 PRLR mRNA의 발현량이 증가된 것은 수분의 재흡수를 억제하기 위하여 발현량이 증가한 것으로 판단된다(Manzon, 2002). 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 담수적응시 감성돔 체내에서는 삼투압의 불균형이 일어났을 것이며, 이때 감성돔은 체내의 항상성을 유지하기 위해 PRL의 합성과 분비를 증가시켜, 삼투압 조절기관인 아가미와 장에서 PRLR과 결합한 후, PRL-PRLR 시스템의 활성화에 의해 삼투압 조절 과정을 거쳐 담수에 적응하였을 것이라고 판단된다(Higashimoto et al., 2001; Santos et al., 2001).

해수 환경에서 어류는 이온을 배출하고 물을 흡수하는 반면, 담수 환경에서는 이온을 흡수하고 물을 배출하여 삼투압을 조절하게 된다. 담수에 적응하는 동안 감성돔의 혈장 삼투질 농도와  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  이온의 농도가 감소하는 경향을 보였는데, 이 결과



**Fig. 3.** Expression of PRLR mRNA in tissues of black porgy *Acanthopagrus schlegeli*. One microgram of total RNA prepared from gill, kidney and intestine was reverse transcribed and amplified using black porgy PRLR-specific primer. The tissue distributions of the PRLR were analyzed by RT-PCR. Values with dissimilar letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Values are means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

는 타종을 이용한 이전의 연구의 결과와도 일치하였다(Mancera et al., 1993; Min et al., 2005; Arjona et al., 2007). 본 연구에서는 염분 농도가 감소하면서 혈장 이온의 농도 또한 감소하였다. 그러나 아가미와 장에서는 PRLR mRNA 발현이 10 psu 실험구에서 가장 높게 관찰되었는데, 이것은 10 psu 실험구에서 감성돔은 삼투압 조절에 불균형이 생겨 PRLR mRNA가 급격히 증가된 것으로 판단되며, 0 psu에서는 삼투압을 어느 정도 조절할 수 있게 되어 PRLR mRNA 발현량이 초기 상태로 회복된 것이라고 판단된다. 즉, 담수에서는 외부 삼투압이 낮으므로 체내로 물이 들어오게 되며, 이온이 외부 환경으로 빠져나가 삼투압 조절에 불균형이 생긴 것임을 시사한다.

본 연구에서는 담수에 적응하는 동안 폐사한 감성돔이 없었던 점으로 볼 때, 체내의 삼투질 농도와  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  이온의 농도

는 감소하였으나 감성돔이 생존할 수 있는 정도까지의 농도는 유지되어졌을 것이며, 이러한 이온의 유출 억제 및 조절을 위한 삼투압 조절에 PRLR mRNA가 중요한 역할을 담당하였을 것이라고 추측된다.

## 요 약

본 연구에서는 담수적용 감성돔 *Acanthopagrus schlegeli*의 아가미로부터 전장의 PRLR cDNA를 분리하였다. 감성돔 PRLR은 1,611개의 염기로 구성되어 있었으며, 536개의 아미노산을 암호화하고 있었다. 염분 변화에 따른 감성돔의 삼투압 조절 능력을 알아보기 위하여 RT-PCR을 이용하여 삼투압 조절 기관인 아가미, 신장 및 장에서 PRLR mRNA의 발현량의 변화를 조사하였다. 아가미와 장에서 PRLR mRNA의 발현은 10 psu 해수에서 유의하게 높게 나타났으며, 완전한 담수 환경에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나, 신장에서는 PRLR mRNA의 발현량의 변화가 관찰되지 않았으며, 담수에 적응시 혈장 삼투질 농도 및  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  이온 농도 또한 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서, 본 연구의 결과를 통해 PRLR이 감성돔의 담수적용시 삼투압 조절 기관에서 호르몬의 조절과 관련한 중요한 역할을 담당하고 있을 가능성과 저염분 환경에서 감성돔의 고삼투압 조절 능력을 향상시키는 역할을 하고 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- An, K. W., N. N. Kim and C. Y. Choi, 2008. Cloning and expression of aquaporin 1 and arginine vasotocin receptor mRNA from the black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: effect of freshwater acclimation. *Fish Physiol. Biochem.*, 34, 185–194.
- Arjona, F. J., L. Vargas-Chacoff, I. Ruiz-Jarabo, M. P. Martin del Rio and M. Mancera, 2007. Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 148, 413–421.
- Barton, B. A. and G. K. Iwama, 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1, 3–26.
- Carmichael, G. J., J. R. Tomasso, B. A. Simco and K. B. Davis, 1984. Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113, 778–785.
- Chang, Y. J., B. H. Min and C. Y. Choi, 2007. Black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) prolactin cDNA sequence: mRNA expression and blood physiological response during freshwater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 147, 122–128.
- Cho, Y. M., J. Shin and Y. C. Sohn, 2006. Gene expression levels of growth hormone, prolactin and their receptors of olive flounder *Paralichthys olivaceus* by salinity changes. *J. Kor. Fish. Soc.*, 39, 326–332.
- Choi, C. Y. and K. W. An, 2007. Cloning and expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in

- black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* during osmotic stress. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 149, 91–100.
- Frisch, A. and T. Anderson, 2005. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 140, 317–327.
- Goffin, V., B. Bouchard, C. J. Ormandy, E. Wetmann, F. Ferrag, P. Touraine, C. Bole-Feysot, R. A. Maaskant, P. Clement-Lacroix, M. Edery, N. Binart and R. A. Kelly, 1998. Prolactin: A hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 840, 498–509.
- Higashimoto, Y., N. Nakao, T. Ohkubo, M. Tanaka and K. Nakashima, 2001. Structure and tissue distribution of prolactin receptor mRNA in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): conserved and preferential expression in osmoregulatory organs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 123, 170–179.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95–98.
- Hirano, T., 1986. The spectrum of prolactin action in teleosts. (in) C. L. Ralph (ed.), *Comparative endocrinology: developments and directions*. Alan R. Liss, New York, pp. 53–74.
- Kitajima, C. and Y. Tsukashima, 1983. Morphology, growth and low temperature and low salinity tolerance of sparid hybrids (*Sparus sarba*, *Acanthopagrus schlegeli*). *Jap. J. Ichthyol.*, 30, 275–283.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei, 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief. Bioinform.*, 5, 150–163.
- Lee, K. M., T. Kaneko and K. Aida, 2006. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 146, 318–328.
- Mancera, J. M., J. M. Perez-Figares and P. Fernandez-Llebrez, 1993. Osmoregulatory responses to abrupt salinity changes in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 106, 245–250.
- Manzon, L. A., 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125, 291–310.
- McCormick, S. D., 1995. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function. (in) W. S. Hoar, D. J. Randall, A. P. Farrell (eds.), *Fish Physiology*, vol. 14. Academic Press, San Diego, pp. 285–315.
- Min, B. H., B. K. Kim, J. W. Hur, I. C. Bang, S. K. Byun, C. Y. Choi and Y. J. Chang, 2003. Physiological responses during freshwater acclimation of seawater-cultured black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). *Kor. J. Ichthyol.*, 15, 224–231.
- Min, B. H., C. Y. Choi and Y. J. Chang, 2005. Comparison of physiological conditions on black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* acclimated and reared in freshwater and seawater. *J. Aquacult.*, 18, 37–44.
- Nishioka, R. S., K. M. Kelley and H. A. Bern, 1988. Control of prolactin and growth hormone secretion in teleost fishes. *Zool. Sci.*, 5, 267–280.
- Pickford, G. E. and J. G. Phillips, 1959. Prolactin, a factor in promoting survival of hypophysectomized killifish in fresh water. *Nature*, 228, 378–379.
- Rozakis-Adcock, M. and P. A. Kelly, 1991. Mutational analysis of the ligand-binding domain of the prolactin receptor. *J. Biol. Chem.*, 266, 16472–16477.
- Ruijter, J. M. and S. E. Wendelvaar Bonga, 1988. Allometric relation of total volumes of prolactin cells and corticotropic cells to body length in the annual cyprinodont *Cynolebias whiei*: effects of environmental salinity, stress and ageing. *Cell Tissue Res.*, 249, 477–483.
- Sandra, O., F. Sohm, A. De Luze, P. Prunet, M. Edery and P. A. Kelly, 1995. Expression cloning of a cDNA encoding a fish prolactin receptor. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 92, 6037–6041.
- Santos, C. R. A., L. Brinca, P. M. Ingleton and D. M. Power, 1999. Cloning expression, and tissue localization of prolactin in adult sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 114, 57–66.
- Santos, C. R. A., P. M. Ingleton, J. E. Cavaco, P. A. Kelly, M. Edery and D. M. Power, 2001. Cloning, characterization, and tissue distribution of prolactin receptor in the sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 121, 32–47.
- Warne, J. M. and R. J. Balment, 1995. Effect of acute manipulation of blood volume and osmolality on plasma [AVT] in seawater flounder. *Am. J. Physiol.*, 269, R1107–R1112.

---

원고접수 : 2008년 3월 18일

심사완료 : 2008년 3월 26일

수정본 수리 : 2008년 4월 4일