

**미더덕 대량폐사 원인인자 규명을
위한 분자유전학적 분석**

(Molecular genetic analysis for characterization of
causing agents of Warty sea squirt mass mortality)

**미더덕 대량폐사 극복을 위한
양식 환경 생물학적 연구**

(Farming environment analysis for overcome of Warty
sea squirt mass mortality)

부산대학교

농림수산식품자료실



0006947

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미더덕 대량폐사 원인인자 규명을 위한 분자유전학적 분석에 관한 연구”
과제(세부과제 “미더덕 대량폐사 극복을 위한 양식 환경 생물학적 연구에 관한 연구”)의 보고
서로 제출합니다.

2010 년 9 월 24 일

주관연구기관명 : 부산대학교

주관연구책임자 : 정 재 훈

세부연구책임자 : 정 재 훈

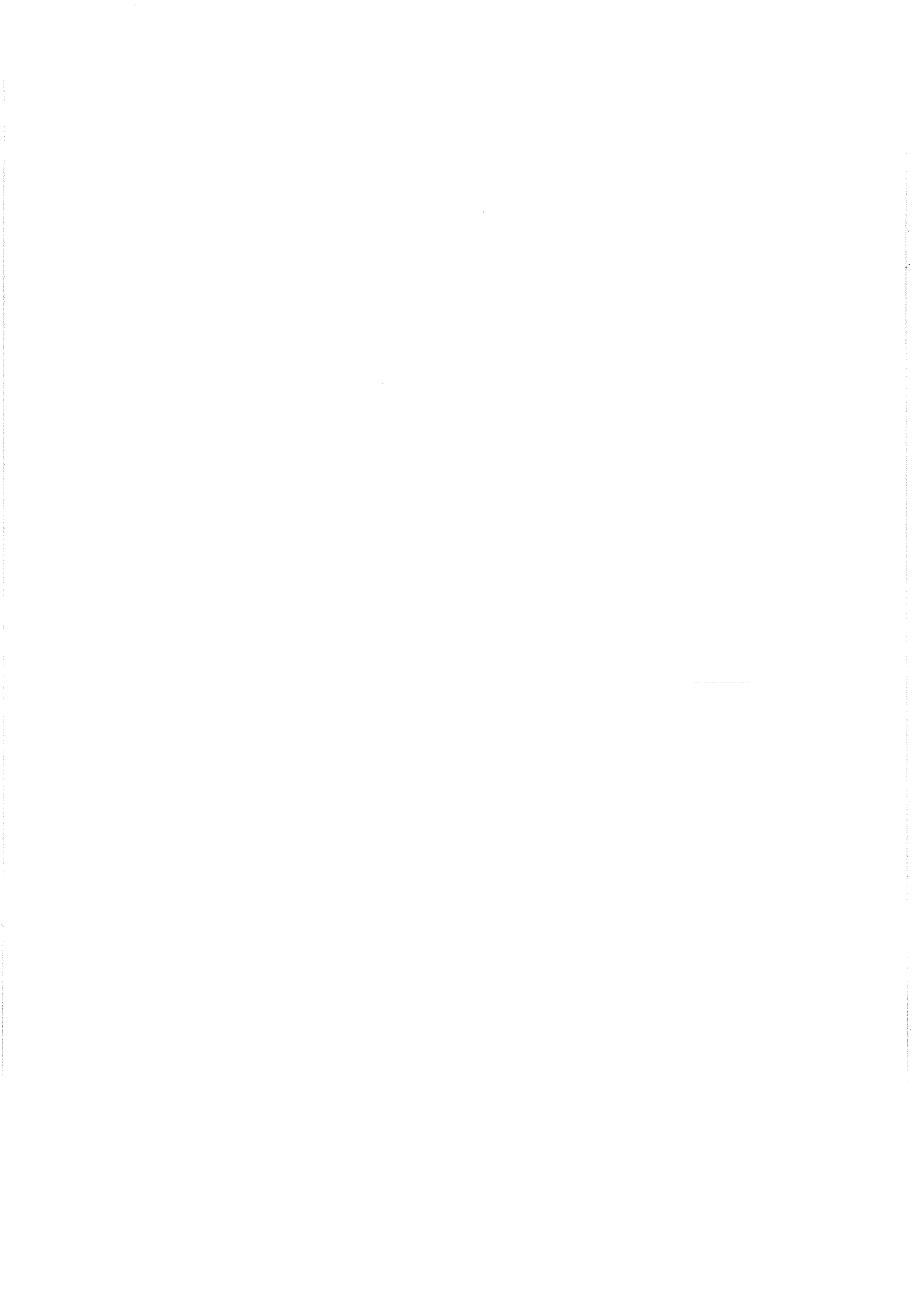
연 구 원 : 김 혜 영

연 구 원 : 최 정 인

연 구 원 : 정 병 선

협동연구기관명 : 국립수산과학원양식환경연구소

협동연구책임자 : 허 영 백



요 약 문

I. 미더덕 대량폐사 원인인자 규명을 위한 분자유전학적 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 미더덕의 대량폐사와 관련된 많은 조사가 있었으나, 가장 문제시 되는 물렁증 발생의 메커니즘을 설명하는 데는 한계가 있음. 양식생물의 대량폐사는 최근 전 세계적인 문제점으로 대두되고 있는바, 지속적이고 안정적인 양식 산업 유지를 위해서는 양식생물과 연안 생태계의 상호 연관성 등을 고려하여 체계적이고, 종합적인 연구수행이 요구되므로 본 연구를 수행하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 미더덕 대량폐사 원인인자 규명을 위한 분자유전학적 분석

가. 물렁증 유발 후보 유전자의 기능 규명을 통한 폐사 원인 분석

나. 물렁증 유발 유전자 정보를 이용한 내성 미더덕 선별법 확립 및 산업화

다. 우량종묘생산기술 및 대체품종 개발을 통한 미더덕 양식 현장에의 폐사저항성 우량품종의 보급

2. 미더덕 대량폐사 극복을 위한 양식 환경 생물학적 연구

가. 생물 생리 및 양식장 환경관련 인자변동에 따른 성장저해요인 조사규명

나. 성장저해요인 인자변동을 이용한 성장개선효과 및 대체양식 기술개발

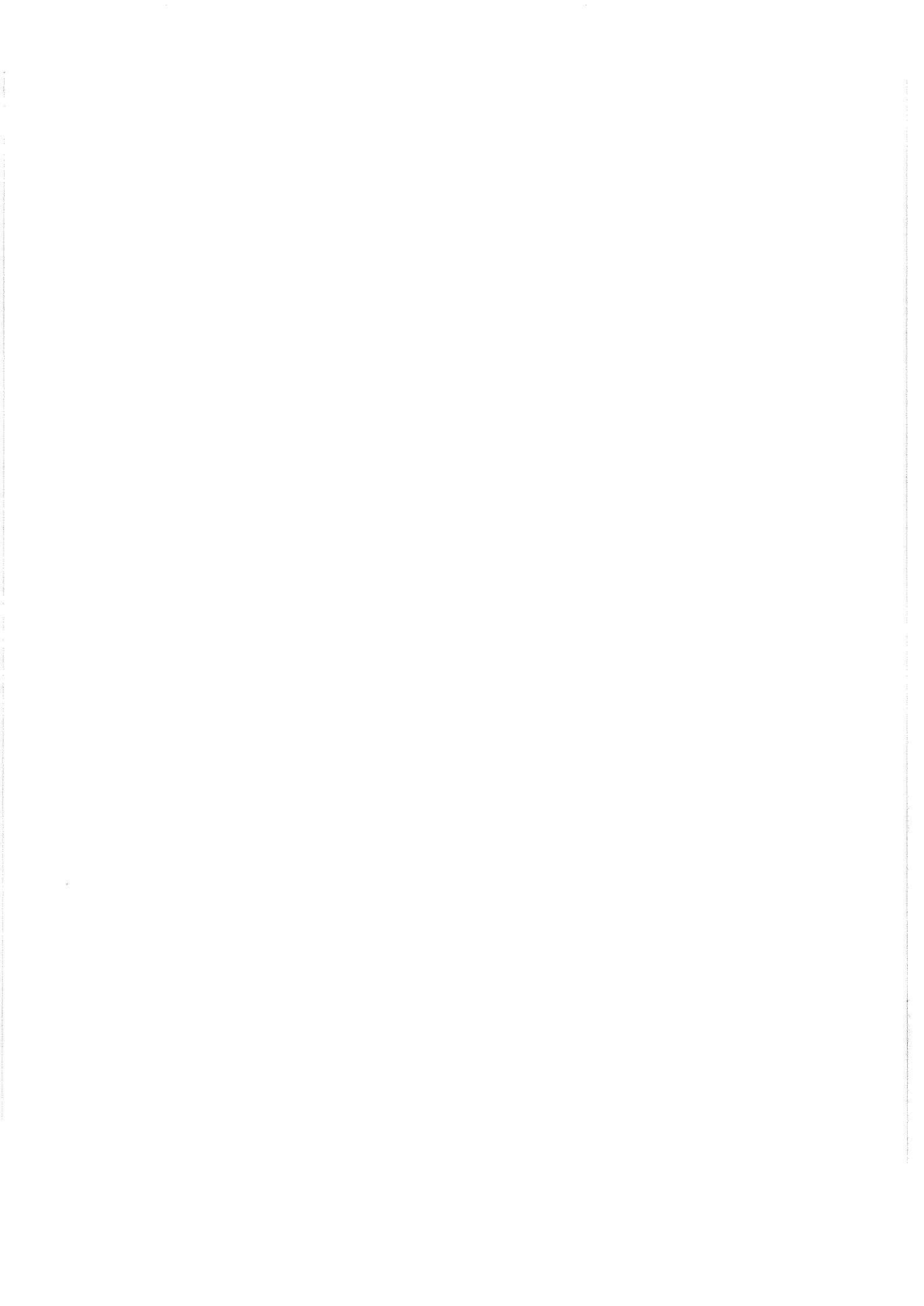
다. 미더덕 성장저해요인의 규명을 통한 양식어업인의 양식기술 지도

IV. 연구개발결과

본 과제를 수행함으로써 미더덕에 물렁증 발병과 관련된 후보인자인 serine protease와 GPx를 동정해 냈으며, 통계적인 분석 및 분자생물학적 분석 (RT-PCR, luciferase assay)등을 수행함으로써 후보인자의 프로모터 염기 다형성이 물렁증 발병과 밀접한 관련성이 있음을 확인하였음. 이러한 연구를 바탕으로 물렁증에 내성을 지닌 개체를 육종하기 위해 어미를 선별하여 교배하였음. 수정된 난을 부화시켜 성숙시킨 다음 양식 현장에 적용함으로써 물렁증에 대한 내성여부를 판단하고자 함. 또한 양식 환경의 생물학적 연구를 통해 미더덕의 양식 환경 적응에 대한 다양한 자료를 확보하였음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

분자 유전학적 연구를 통해 얻은 물렁증에 대한 저항성을 지닌 개체를 선별하여 각 양식장에 배포할 예정이며, 양식 환경의 생물학적 연구를 통해 얻은 자료를 바탕으로 배포된 미더덕이 양식 환경에 잘 적응할 수 있도록 활용할 예정임.



SUMMARY

I. Molecular genetic analysis for characterization of causing agents of Warty sea squirt mass mortality

II. Purpose and necessity of research and development

Although it was carried out many research related mass mortality, the studies have not yet discover the mechanism of softness disease development of Warty sea squirt. Mass mortality of farm-life is a growing the problem all over the world. The systematic and synthetic research is asked to consider reciprocal relation between farm-lives and marine ecosystems. So, we will perform this research to retain continuous and stable the farm industry.

III. Contents and ranges of research and development

1. Molecular genetic analysis for characterization of causing agents of Warty sea squirt mass mortality

a. to determine the cause of mass mortality through identification of the softness disease-inducing candidated genes

b. to establish the selection of the softness disease-resistive sea squirts

c. to supply the mass mortality-resistive a good breed through the technique of a good planting a seedling production and the improvement of breed

2. Farming environment analysis for overcome of Warty sea squirt mass mortality

a. to identify the growth-inhibition factors by change of the organism physiology and farm environment related factors

b. to develop the technique of growth improvement using the change of growth-inhibition factors

c. to guide the technique of farming through identification of growth-inhibition factors

IV. Results of research and development

We identified serine protease and GPx, softness disease inducing candidate genes through RT-PCR and luciferase assay and confirmed the correlation between promoter polymorphism and development of the disease. Base on the study, the selected mothers were crossed for selection of the disease-resistive organism.

V. Application plan of research development

We will distribute farming the disease-resistive organism.

CONTENTS
(영 문 목 차)

I. Summary of research and development project6

II. The present state of technique development at home and abroad9

III. Contents and results of research and development.....11

IV. Level of accomplishment of an aim and contribution of a related field65

V. Results of research development and an application plan69

VI. Science and technology information of abroad71

VII. References72



목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	6
제 2 장	국내외 기술개발 현황	9
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	11
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	65
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	69
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	71
제 7 장	참고문헌	72

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

대량폐사의 원인이 현재 정확하게 규명이 되지 않은 상태에서 가능성으로 환경적인 문제나 바이러스나 기생충 등의 감염을 생각할 수 있지만 바다에서 수하식으로 양식이 진행되는 상태에서 대량폐사 문제를 해결할 수 있는 방법은 2가지임. 첫째, 대량폐사와 관련된 특이유전자가 밝혀지면 이 유전자의 발현과 관련된 외부자극을 피할 수 있는 장소를 선택하여 양식을 진행시킬 수 있는 정보를 양식현장에 제공하는 것이며, 둘째, 정확한 원인이 규명되지 않더라도 대량폐사와 관련된 특이유전자의 발현을 분자마커로 이용하여 선발육종을 통하여 대량폐사에 대한 내성개체를 선별하여 양식장에 공급하는 것임. 이 해결방안을 제시하는 것이 본 연구의 최종목표임.

제 2 절 연구개발의 필요성

미더덕은 미더덕과(Styelledae) 척추동물문의 미색동물아문, 해초강, 측성해목초에 속하는 해양생물로 가늘고 긴 몸에 자루가 있고 그 끝이 바위에 부착해 서식하면 전체 길이는 5~10cm로서 황갈색을 띤다. 외피는 섬유질과 같은 물질로 되어 있으며 딱딱함. 바닷물이 들어오고 나가는 구멍이 몸에 있어 영어로는 멩게(우렁쉥이)와 같이 sea squirt로 불리움(Kim et al., 2005). Styelidae의 대표적인 생물로는 미더덕(*Styela clava*)이 잘 알려져 있으며, 단단한 외피를 제거하고 근막체를 생으로 먹거나 염지하여 즐겨 먹는 독특한 향과 맛으로 인해 식품에 널리 이용되고 있음(Lee, 1985). 최근 고도불포화지방산의 일종인 DHA, EPA 등이 풍부하고, 항산화물질인 셀레늄, 천연관절염치료제인 콘드로친 그리고 풍부한 식이섬유와 글리코젠 등의 함량이 높지만, 열량이 낮아 다이어트 식품으로도 주목받고 있는 우리나라 남해안의 주요 양식대상품종임. 미더덕 양식은 전 세계적으로 우리나라에서만 양식되고 있고, 국내에서도 경남 진해만내 국한되어 양식되고 있음. 양식장은 주로 마산시 관내에 3분 1 이상이 형성되어 있으며, 매년 4월이면 마산시 진동면에서 낙화불꽃 미더덕 축제가 열릴 정도로 마산시 진동의 특산물로 자리매김하고 있음.

우리나라에 분포하고 있는 미더덕 종류는 6종으로 미더덕(*Styela clava*), 두줄미더덕(*S. partita*), 긴자루미더덕(*S. longipedata*), 세줄미더덕, 상칭미더덕 그리고 오만둥이로 잘 알려져 있는 주름미더덕(*S. plicata*)이 있음. 산업적 양식은 주로 미더덕과 주름미더덕을 대상으로 하고 있음. 이러한 미더덕은 1990년대까지만 해도 각종 수산양식장의 시설물 또는 참굴 등의 수하 양식줄에 부착하여 서식경쟁 등을 유발해 양식피해를 주는 해적생물로 취급되었고, 생산도 주로 일부 양식 시설물에 자연부착된 것을 양식 부산물 형태로 채취하여 판매하였는데, 1990년 후반부터 지속적인 수요량 증대로 양식필요성이 부각되었음. 이때까지 미더덕류에 대한 양식기술을 개발하기 위한 연구는 전무한 실정이었으며, 주로 진해만을 중심으로 피조개 천연채묘양식장에 설치된 그물채묘망에 피조개 종패는 부착되지 않고, 주로 미더덕

이 다량으로 부착됨으로써 그대로 수하하여 두었다가 봄철에 생산을 하고 있는 실정이었음. 본격적으로 양식장이 개발된 2001년 이 후 미더덕 생산량은 그 해 15,084톤으로 최대생산량을 보인 이 후 점차 감소하여 2006년에는 1,519톤으로 급감하였고, 최근 2009년 다시 3,845톤으로 어느 정도 생산량이 늘어나고 있지만, 여전히 예년 수준의 생산량을 회복하지 못해 매년 추정치 300억원 이상의 어업피해를 유발하고 있음. 이에 따라 양식어업권과 양식면적도 점차 감소하여 2003년 556건에 8,034ha였던 것이 2007년 159건에 619ha로 감소하였음(표 1, 표 2).

표 1. 미더덕 양식현황(농림수산식품부 통계연보, 2010년)

연도	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
어업권(건)	556	165	171	161	159	-	-
양식면적(ha)	8,034	649	669	623	619	-	-

표 2. 연도별 미더덕 생산 및 어업피해현황(농림수산식품부 통계연보, 2010년)

연도	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
생산량 (위판량, 톤)	15,084	5,266	2,047	2,590	1,412	1,519	2,309	2,620	3,845	
생산금액 (백만원)	-	-	-	-	-	2,909	4,041	4,818	5,093	
폐사 정도	폐사량 (톤)	0	9,818	13,037	12,494	16,672	13,565	12,775	12,464	11,239
	비율 (%)	0	65.1	86.4	82.8	92.2	89.9	84.7	82.6	74.5
피해액(억원)	0	343	456	437	584	475	447	436	393	

(※ 폐사량 추정 : 2001년도 생산기준 피해액 추정 3,500원/kg)

미더덕 양식은 채묘와 양성과정이 동시에 실시되는데, 채묘가 완료되면 일정시기에 고수온 및 저염분 등에 의한 폐사를 방지하기 위하여 내만 양식장인 경우는 비교적 수심이 깊고, 조류소통이 좋은 외만 양식장으로 이동 양식하는 경우가 있지만, 대부분 그 자리에서 수확시기인 이듬해 3월에서 5월까지 양식을 하는 경우가 많음(그림 1).

미더덕에 대한 연구는 스테롤 함량(Jo, 1978), 유리아미노산 추출(Lee, 1975) 계절에 따른 영양성분의 조성의 변화(Lee, 1995) 등 주로 성분에 관한 보고가 있으며, 기능성 성분으로 껍질로부터 glycosaminoglycan을 추출(Ahn, 2003)한 예가 있음. 하지만, 대부분이 성분 추출에 대한 연구가 이행되어졌고, 양식 양식기술개발에 관한 연구는 1997년 국립수산물과학원에서 양식에 필요한 기초적인 양식생태 등을 조사 보고하였고(농림부, 1997), 이 조사 결과 등을 토대로 다른 양식생물의 피해를 감안하여 경남 진해만내에서만 국한하여 양식장개발이 2001

년부터 허용되었됨. 그러나 미더덕의 대량폐사에 관한 연구는 전무한 실정임.



그림 1. 미더덕 양식과정.

지금까지 밝혀진 미더덕 대량폐사 요인은 미더덕 주산지인 진동만을 중심으로 여름철 수중 산소 농도가 3ppm이하로 떨어지는 현상인 빈산소 수괴의 영향이 많고, 하절기 집중강우에 의한 저염분등이 일부 영향을 미친 것으로 밝혀졌음. 그리고 일부 양식 어업인들은 진해만 내 신항만 건설 등에 따른 조류 흐름의 변화와 조선기지 건설등과 같은 각종개발에 따른 어장환경변동이 미더덕 폐사에 간접적으로 영향을 미치고 있다고 주장하고 있음. 뿐만 아니라, 최근 자연채묘부진에 따른 안정적인 종묘확보의 어려움마저 과중되어 관련 양식어업인들이 이중의 고충을 겪고 있음. 따라서 어장환경 변동이 미더덕 대량폐사에 미치는 영향을 구명하고, 분자유전학적 연구를 통해서 어장환경을 변동에 저항성을 지닌 우량종묘생산을 위한 연구가 필요함.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 미더덕 대량폐사 원인인자 규명을 위한 분자유전학적 분석
 - 가. 물렁증 유발 후보 유전자의 기능 규명을 통한 폐사 원인 분석
 - 나. 물렁증 유발 유전자 정보를 이용한 내성 미더덕 선별법 확립 및 산업화
 - 다. 우량종묘생산기술 및 대체품종 개발을 통한 미더덕양식현장에의 폐사저항성 우량품종의 보급
2. 미더덕 대량폐사 극복을 위한 양식 환경 생물학적 연구
 - 가. 생물 생리 및 양식장 환경관련 인자변동에 따른 성장저해요인 조사규명
 - 나. 성장저해요인 인자변동을 이용한 성장개선효과 및 대체양식 기술개발
 - 다. 미더덕 성장저해요인의 규명을 통한 양식어업인의 양식기술 지도

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내기술동향

1. 미더덕은 우리나라의 삼면 연안에서 흔히 볼 수 있는 종이며 일본, 시베리아 연안에 주로 서식하고 있음. 미더덕은 우리나라에서 주로 양식되고 있기 때문에 대부분 우리나라에서 주로 양식기술에 관련된 연구가 추진되었음 (마산지방해양수산청, 2002; 농림부, 1997). 근래에는 미더덕의 추출물에 의한 항산화 및 항암작용에 관한 연구도 활발히 추진되고 있음 (Kim et al., 2005; Seo et al., 2006; Jung et al., 2008).
2. 우리나라 미더덕의 대량폐사와 관련된 조사로서는 동해안의 냉수대와 관련 및 남해안의 빈산소 및 고온 영향 그리고, 최근 환경변화 등에 따른 성장 및 체성분 변화, 그리고 다양한 환경변화에 대한 연구조사가 있지만 (국립수산과학원, 2007; 국립수산과학원, 2009), 가장 문제시 되는 물렁증 발생의 메카니즘을 설명하는 데는 한계가 있음.
3. 국제수역사무국에서 지정하고 있는 패류의 질병은 10종으로 아시아 지역에서는 4종 (*Marteilioides sydneyi*, *Bonamia* sp., *Mikrocytos roughleyi*, *Perkinsus olseni*)이 보고되고 있으며, 지정 질병과 밀접한 관련이 있는 6종의 질병(*Marteila lenghi*, *Marteilia* sp., *Marteilioides branchialis*, *Marteilioides chungmuensis*, *Haplosporidium* sp. and *Perkinsus* sp.)이 보고되어 있음.

제 2 절 국외기술동향

1. 난소기생충 *M. chungmuensis*는 호주 북부의 굴, *Saccostrea echinata* 와 한국, 일본 등의 참굴, *Crassostrea gigas*에 감염되어 심각한 피해를 입히고 있음이 보고되고 있지만 미더덕과 관련된 보고는 전무한 실정임.
2. 국외에서는 미더덕의 발생과정(Swalla and Jeffery, 1996; Jeffery and Capco, 1978; Jeffery et al., 1983; Jeffery, 2002; Wang et al., 2002) 과 항미생물 펩타이드(Lee et al., 1997; Zhao et al., 1997; Lehrer et al., 2001; Lee et al., 2001)에 관련된 연구가 최근 활발하게 진행되고 있으나 최근 문제시되고 있는 대량폐사관련 연구는 미미한 상태임.

제 3 절 향후전망

1. 미더덕 대량폐사의 원인으로 지목되고 있는 지구온난화에 따른 연안수온상승 등의 환경변

동으로 인한 연안생태계변동, 밀식 등의 어장수용력을 초과한 양식방법 및 어장관리 방법 개선 등에 대한 체계적인 모니터링 등에 대한 종합적인 연구를 시급히 수행하여야 함

2. 수산물의 중요성은 국민 단백질원 공급 차원을 넘어 식량자원으로서 중요성이 인정되고 있음. 미더덕은 향미와 씹는 느낌이 독특하여 음식 재료로 많이 쓰이고 있음. 최근에는 포함하고 있는 영양에 대한 연구가 진행되고 있는데, 열량과 콜레스테롤을 적게 포함하면서 비타민E, 비타민B의 일종인 엽산, 비타민C, 철분, 고도불포화 지방산인 EPA, DHA등이 들어 있음(국립수산과학원, 1995). 특히 4-5월이 수확기 인데, 이 때 미더덕은 그 이후에 수확된 것에 비해 맛 성분인 유리아미노산의 함량이 1.8-2.2배 높고 EPA, DHA도 많음. 입맛이 없을 때 입맛을 돋우어주는 국민의 기호식품으로 주요 수산 동물임. 또한, 최근 멧게류의 혈구 또는 혈장에서 항바이러스 및 항세균성 물질등이 발견됨으로 천연 항암제 또는 항생제개발에 많이 이용되는 있음이 보고되고 있는바 이에 기술 우위 및 해양 신물질 개발차원에서 관련연구가 시급함.

3. 양식생물의 대량폐사는 최근 전 세계적인 문제점으로 대두되고 있는바, 지속적이고 안정적인 양식산업 유지를 위해서는 양식생물과 연안생태계의 상호 연관성 등을 고려 체계적이고, 종합적인 연구수행이 요구되고, 특히 환경친화성이 배제된 양식은 지속적인 문제점을 야기할 수 있음을 상기하여 대량폐사에 대한 연구접근방법을 제시하여야 할 것임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1차년도

1. DEG 법을 이용한 물렁증 유발후보 유전자의 탐색

가. 정상 개체와 물렁증 개체의 발현 유전자 비교 물렁증 유발 유전자 탐색

(1) 재료 및 방법

(가) 정상 개체와 물렁증 개체의 근육 조직을 분리하여 액체질소에 동결시킨 뒤 Trizol을 이용하여 total RNA를 분리함(그림 2).

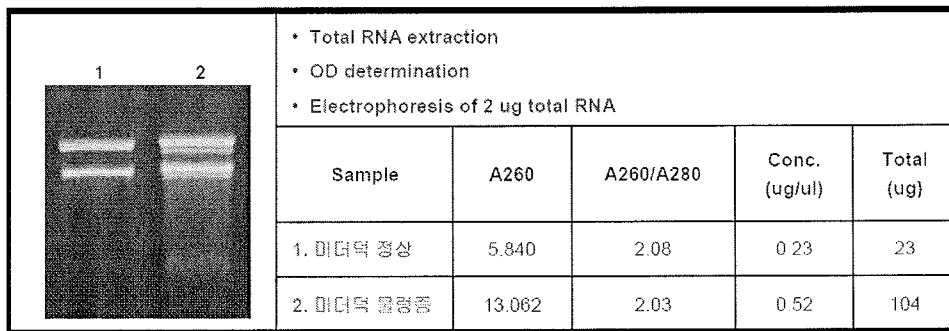


그림 2. 정상조직(1)과 물렁증조직(2)에서 분리된 RNA

(나) 분리된 RNA를 정량한 다음, 적정량의 RNA를 사용하여 oligo dT와 반응시킨 뒤 first 어댑터를 cDNA에 붙인 후, 어댑터 서열을 이용하여 cDNA 주형을 만듦(그림 3).

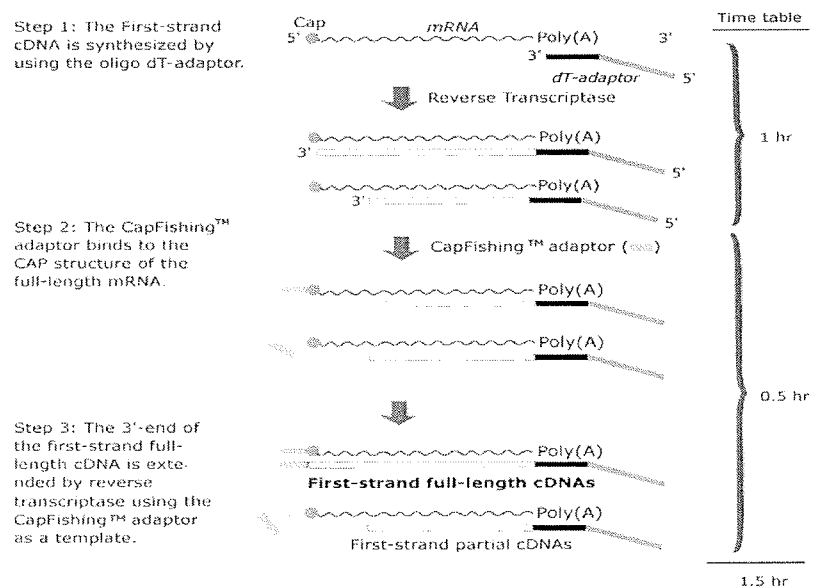


그림 3. DEG screening을 위한 cDNA 합성 모식도

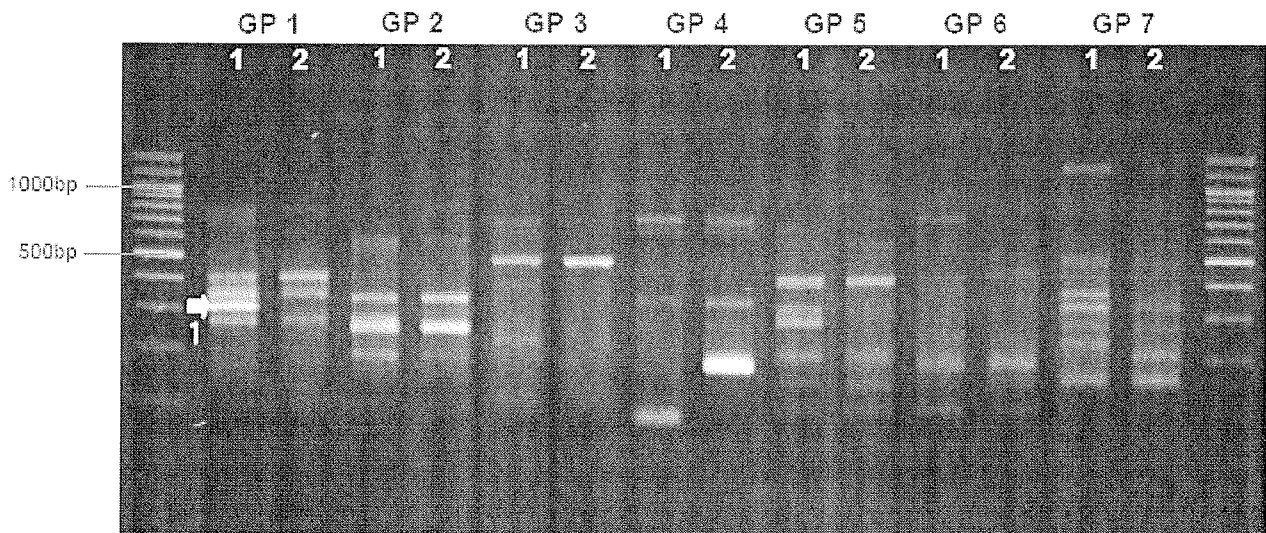
(다) cDNA와 GeneFishing™DEG arbitrary primer set를 이용하여 PCR 실시함.

(라) PCR 산물은 2% agarose ge에 전기영동하여 정상개체와 물렁증 개체간의 유전자 발현 차이 비교함(그림 4).

(2) 결과 및 분석

(가) 예비 screening 결과 발현에서 차이가 나타나는 많은 유전자를 확보할 수 있었음. 많은 유전자 중에서도 크기나 질적인 면에서 확연한 차이가 나타나는 유전자 9개를 우선 확보하였음. 물렁증 개체에서 발현이 감소한 유전자는 3개가 동정되었으며 (그림3. 1, 4, 9번 화살표), 발현이 증가한 유전자는 6개가 동정되었음 (그림 3. 2, 3, 5, 6, 7, 8번 화살표). 물렁증 개체에서 발현이 감소한 유전자들은 미더덕의 정상적인 생활사를 가능하게 하는 유전자로 이러한 유전자의 발현이 감소함으로써 물렁증의 발병에 영향을 줄 수 있다. 또한 물렁증 개체에서 발현이 증가한 유전자들은 미더덕의 정상적인 생활사에 필요 없는 유전자들로 이러한 유전자들이 많이 발현됨으로써 물렁증 발병에 영향을 줄 수 있다. 그러나 미더덕 물렁증 발병시기와 관련하여 실험 진행이 연기된 바로 인하여 아직 실험이 진행 중에 있으며, 전체 screening이 완료된다면 40여개의 유전자를 추가적으로 확보함으로써 물렁증 후보 유전자에 연구가 활발히 이루어 질 것으로 예상됨.

(나) DEG를 통해서 동정된 유전자들은 물렁증 발병에 대한 후보 유전자로써, 일차적으로 문헌 정보를 활용하여 후보 유전자로써 유의성을 있는 지 확인할 것이다. 또한 차후에 있을 RT-PCR과 real-time PCR을 통해 물렁증 후보 유전자로써 가능성이 있는지를 재검증한 다음 실험을 진행할 예정이다.



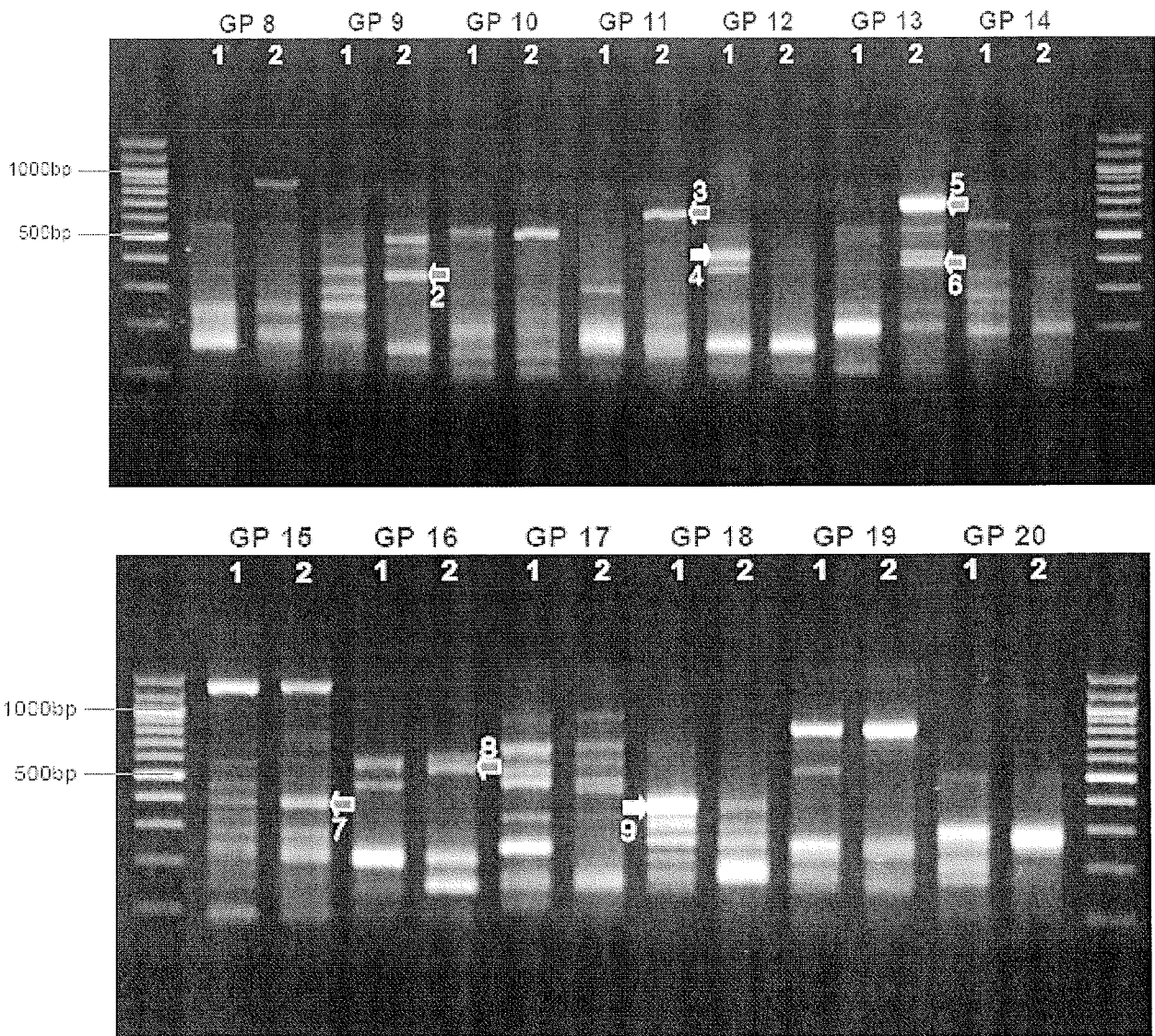


그림 4. 정상개체(1)와 물렁증개체(2)에서 DEG screening 결과

나. 미더덕 EST 분석을 통한 유전자의 대량확보

(1) 재료 및 방법

미더덕 정상개체로부터 근육조직을 분리한 다음 trizol을 이용하여 total RNA를 분리함. 분리된 total RNA에서 mRNA만 순수 분리하여 cDNA를 합성하고, cDNA의 양 끝에 이덴티를 부착한 다음 제한효소로 절단하였음. 절단된 cDNA와 vector를 ligatin시켜 cDNA library를 합성하였음. 합성된 cDNA library를 이용하여 클론을 만들고 각각의 클론에서 플라스미드를 분리하였음. 분리된 플라스미드를 이용하여 sequencing PCR을 실시하고 확보된 서열은 GeneMaster 프로그램을 이용하여 EST 분석을 실시하였음 (그림 5).

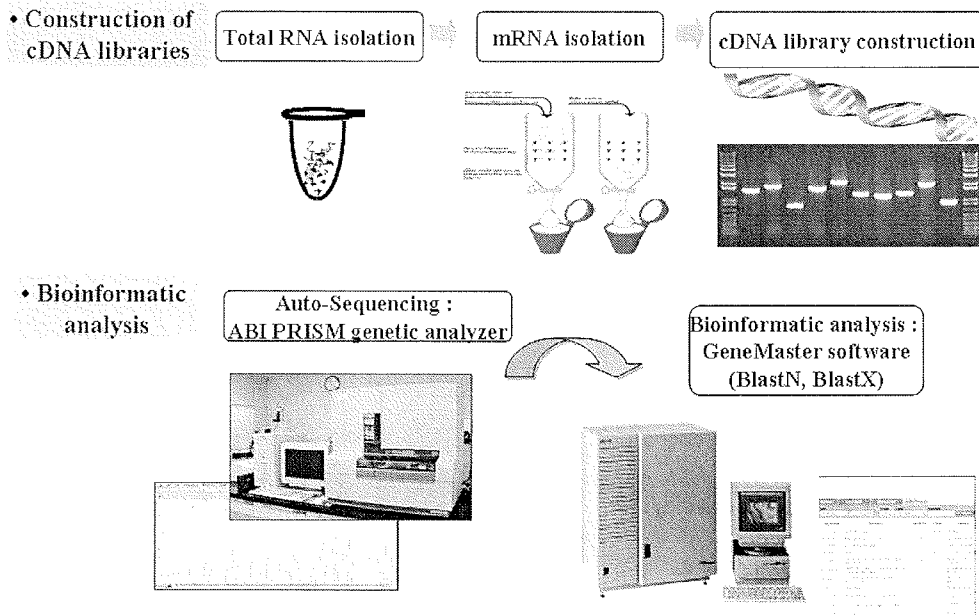


그림 5. 미더덕 EST 분석 모식도

(2) 결과 및 분석

(가) EST 분석에 사용된 클론의 개수는 1920개이며, 그 중에서 1428개의 EST를 확보하였음. Cluster의 개수는 1088로 나타났으며, 중복성 조사에서는 24%를 나타내었음(그림 6). 중복성 조사에서 가장 많이 나타난 유전자는 16번이며, actin의 경우에는 15번의 중복성을 나타내었음(그림 7). 분석된 EST 중에서 면역과 관련된 유전자는 34개가 동정이 되었으며(그림 8), 동정된 유전자로 분석을 하였을 때 미더덕은 innate immune에 비해 adaptive immune이 부족함. 이러한 결과는 하등동물일수록 innate immune이 발달되어 있다는 사실과 일치하는 결과임. 대표적인 면역관련 유전자인 transforming growth factor- β (TGF β) (Wahl, 1992)와 cyclooxygenase 2 (COX2) (Seibert and Masferrer, 1994)의 다른 종과의 matiple alignment 실시한 결과 높은 서열 유사성을 나타내는 것으로 나타났음(그림9).

Primary library size (pfu/ml)	5 x 10 ³
Average length of insert (kb)	2.5 ± 0.5kb
Base Calling Sequence	1920
Low Quality Sequence	492
Ambiguous Sequence (N > 5%)	0
<100bp	337
All Vector region	12
All Low Quality Region	143
All repeat Region	0
High Quality Sequence	1428
Clusters	1088
Consensus Sequence	188
Singleton Sequence	900
Redundancy (%)	24
BLAST Homology No Hit	137
Protein Domains/Functional Sites No hit	402
Gene Ontology No hit	528

그림 6. 미더덕 EST 분석 정보

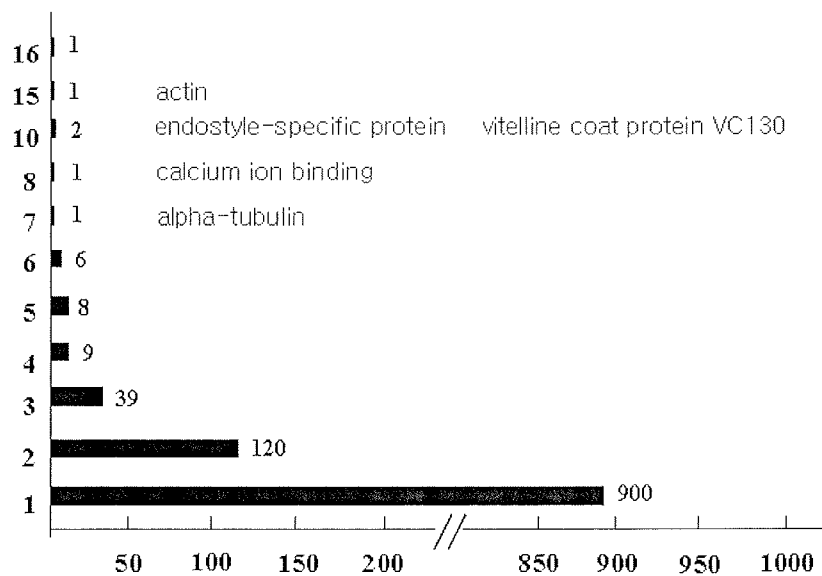


그림 7. 미더덕 EST 중복성 조사

Clone no.	Genes	Closest species	Identity (%)
15	Heat shock protein 70.2	Bos grunniens	65
16	Complement factor H-related 5	Homo sapiens	31
78	Cytochrome c oxidase subunit 1	Bodo saltans	31
117	Cytokine-like nuclear factor n-pac	Homo sapiens	50
138	Prostaglandin transporter	Bos taurus	30
140	Transforming growth factor beta receptor	Ciona intestinalis	65
164	Complement factor B	Halocynthia roretzi	36
203	Cytochrome c oxidase subunit III	Cucumaria miniata	41
212	Autophagy protein 5	Ciona intestinalis	42
442	Cyclooxygenase-2	Oncorhynchus mykiss	49

Clone no.	Genes	Closest species	Identity (%)
526	Transforming growth factor beta superfamily signaling ligand	Ciona intestinalis	52
647	similar to Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86) isoform 2	Danio rerio	91
706	Multidrug resistance transporter homolog	Fundulus heteroclitus	48
817	Ficolin B	Rattus norvegicus	39
879	Truncated methicillin resistance-related surface	Staphylococcus aureus RF122	23
905	Class mu glutathione S-transferase	Bos taurus	35
909	NADH-quinone oxidoreductase chain N	Ralstonia solanacearum UW551	26
1013	DNA mismatch repair protein PMS1	Entamoeba histolytica HM-1.1MSS	27
1106	Glutathione peroxidase	Malus x domestica	53
1158	Cytochrome c	Alligator mississippiensis	84
1166	similar to heat shock protein 1, alpha	Rattus norvegicus	80

Clone no.	Genes	Closest species	Identity (%)
1186	Ficolin 1	Halocynthia roretzi	37
1195	Complement component C3	Ciona intestinalis	28
1250	similar to multidrug resistance protein	Staphylococcus aureus subsp	26
1257	NADH-ubiquinone oxidoreductase	Ixodes ricinus	50
1259	Homologue of mammalian thyroid peroxidase	Halocynthia roretzi	59
1388	Heat shock protein 90	Chlamys farreri	83
1623	Glutathione-requiring prostaglandin D synthase	Herdmania curvata	37
1625	Interferon gamma-inducible protein 30	Branchiostoma belcheri tsingtaunese	47
1664	similar to P-selectin precursor	Strongylocentrotus purpuratus	32
1781	Heat shock protein 70	Wuchereria bancrofti	49
1786	Interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	Mus musculus	43
1907	Heat shock protein gp96	Strongylocentrotus purpuratus	72

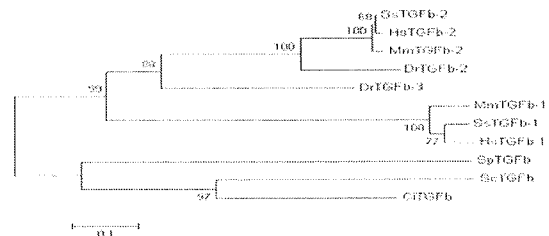
그림 8. EST 분석을 통해 동정된 미더덕 면역관련 유전자

```

ScTGFb  LIAVYVIVVAPPPTTHAGCCGVNFEKIKTRRTEAIRGQILSKLGLTFLR-FDDKFPQIIEVVCAMVPTDFVIEQARLRLEPE--EHDVBYAGQIVITY
CtTGFb  LFSISFMFLAPRTHAGCCGVNFEKIKTRRTEAIRGQILSKLGLTFLR-SAAATPEDVPEVEALYHPTDFVIEQARLRLEPE--DPETIYVYAGQIVITY
SpTGFb  LAVIISLTFDGLGAGGCKFDLQEVQDRRIAIRGQILSKLGLTFLR-TDDG-PEDVFKDILLDFNQTITLLEKVEHEREGKGLSGGSDDTFAQLPILY
DtTGFb-2  LLLDLAAVYHSLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-EIYPEPEVSRGIILVYHSTRDLLCEVSRFAATLERQSRDEEYVAKVWKID
DtTGFb-3  VLLNSVTHCLSLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-QLTG-PSQVYQVIALYHSTRDLLGFGKDRHQSQQDDITTEIYAKVWKID
SsTGFb-1  LVAITPGRPAAGLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-SQGVVPPGPLEAVIALYHSTRDRVAGESVE----PEPEPEADYVAKVWKID
SsTGFb-2  FLLHLVTVVSLSLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-EDYPEPEVPEVVISIYHSTRDLLCEVSRFAAALERERSDEEYVAKVWKID
MmTGFb-1  LVAITPGRPAAGLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-SQGVVPPGPLEAVIALYHSTRDRVAGESAD----PEPEPEADYVAKVWKID
MmTGFb-2  FLLHLVTVVSLSLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-EDYPEPEVPEVVISIYHSTRDLLCEVSRFAAALERERSDEEYVAKVWKID
HsTGFb-1  LVAITPGRPAAGLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-SQGVVPPGPLEAVIALYHSTRDRVAGESAE----PEPEPEADYVAKVWKID
HsTGFb-1  FLLHLVTVVSLSLSTGSLDNDQFKRRTEAIRGQILSKLGLTSPF-EDYPEPEVPEVVISIYHSTRDLLCEVSRFAAALERERSDEEYVAKVWKID

ScTGFb  S-NKEASGSPVDFFYKMKLSRQISEFFEDLEFFKLDL--EAITSATLFFYQIPNIVSESGITQVVL
CtTGFb  EKQVQIGSALQPDYKGYKLSRGLSEFYDLDLATQVVP--DSISATURLVQVPHGSR-CERNQVLL
SpTGFb  G---IVETDIEKDIG-NYATVTKRLSFFFDLTSFEDSQGDEVTEAPFLYQVPHGSR--TEGDDL
DtTGFb-2  VQPFYSEHV----ILSQHYPPFRALGDSMKNAS--NLKQALRIERLQHPKAR-VPEQRIEL
DtTGFb-3  KIQGSEKND----LPYCPKGITKAVFPDVSINENAS--NLKFAEFAIRMFHLSTK-RDQRIEL
SsTGFb-1  WVE--SNQI----YDKFKGTPEIYHFNISELPEAVP--EPVLSRAELRLR-LKL-KVQCHVEL
SsTGFb-2  WPPFFSENA----IPPTFYRPFYFRIVRDSAMENAS--NLKFAEFAVRLQHPKAR-VAPQRIEL
MmTGFb-1  WVD--KQVAI----VEKTKDISIYHFNISELPEAVP--EPVLSRAELRLR-LKS-SVQCHVEL
MmTGFb-2  WPSHLFSENA----IPPTFYRPFYFRIVRDSAMENAS--NLKFAEFAVRLQHPKAR-VAPQRIEL
HsTGFb-1  WVE--TNEI----YDKFKQSTPEIYHFNISELPEAVP--EPVLSRAELRLRRLKL-KVQCHVEL
HsTGFb-1  WPPFFSENA----IPPTFYRPFYFRIVRDSAMENAS--NLKFAEFAVRLQHPKAR-VAPQRIEL

```



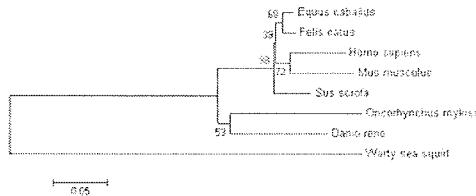
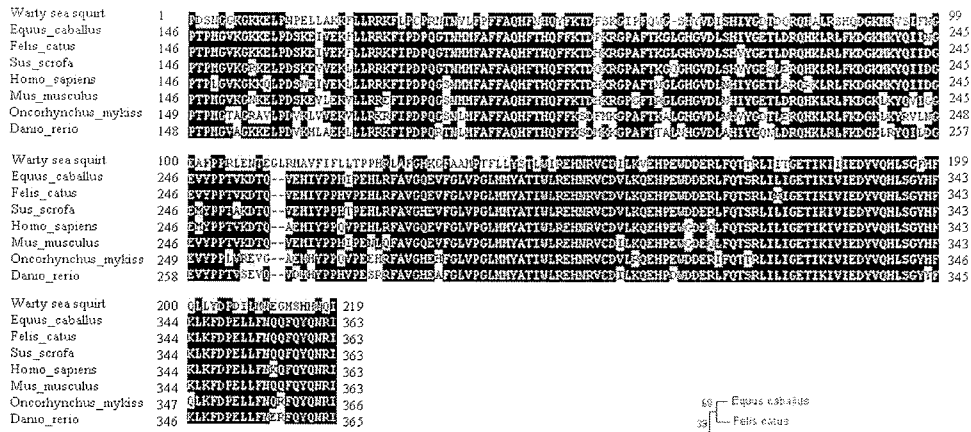


그림 9. 미더덕 면역관련 유전자인 TGFβ (위)와 COX2(아래)의 malitiple alignment와 계통도

(나) 면역관련 유전자 외에도 미더덕의 물렁증 발병과 관련하여 serine protease, Mmp1-prov protein, mannan-binding lectin serine protease 2, metalloprotease, chymotrypsin과 같은 단백질 분해효소들이 동정되었으며, caspase a, programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor), death-associated protein과 같은 세포사멸에 관련된 유전자들도 동정되었음(그림 10). 단백질 분해 효소같은 경우에는 세포와 세포의 결합을 가능하게 하는 단백질들을 분해함으로써 세포간의 결합력을 약하게 만들. 이러한 현상은 미더덕의 근육조직이 괴사되는 현상과 연관성이 있으며 물렁증 발병에 대한 후보 유전자로서의 가능성을 가지고 있음. 세포 사멸에 관련된 유전자들은 세포 내부나 외부의 여러 가지 자극에 의해 활성화되는 유전자들로 이러한 유전자들의 발현이 증가할 경우 세포가 사멸하게 됨. 이러한 현상 역시 미더덕의 물렁증 발병과정에서 나타나는 현상이므로 EST 분석을 통해서 얻어낸 이러한 결과들은 앞으로의 실험에 많은 도움을 줄 것으로 사료됨.

Clone no.	Genes	Closest species	Identity (%)
106	Serine protease	Botryllus schlosseri	75
1086	Mmp1-prov protein	Xenopus laevis	39
1170	Mannan-binding lectin serine protease 2	Gallus gallus	35
1275	Metalloprotease	Strongylocentrotus purpuratus	37
1733	Chymotrypsin	Burkholderia vietnamiensis G4	44
335	Caspase a	Danio rerio	35
75	Programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	Strongylocentrotus purpuratus	58
761	Death-associated protein	Strongylocentrotus purpuratus	48

그림 10. EST 분석을 통해 동정된 단백질 분해효소와 세포사멸관련 단백질

2. 생물 생리 및 양식장 환경관련 인자변동에 따른 성장저해요인 조사

가. 양식장 환경특성 조사

(1) 재료 및 방법

미더덕 양식어장의 양성실태를 조사하기 위하여 폐사다발 해역인 진동만 내 1개 정점과 비교적 폐사가 적은 가조도 앞 1개 정점을 선정하여 양식장의 수온, 염분, Do, 성장 변화, 생식소발달지수, 비만도 조사를 매월 1회 조사하였음.

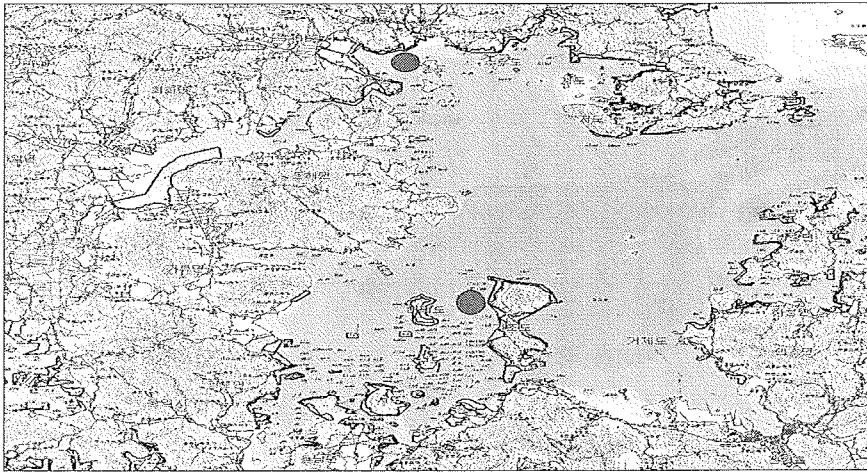


그림 11. 조사정점도.

수온, 염분, Do은 다기능수질측정기(YSI 600)이용 현장에서 직접 측정하였음. 어장별 성장특성, 비만도 및 생식소발달지수는 현장에서 직접 시료를 채취하여 실험실로 운반하여 각각의 요소를 측정하였음. 성장특성은 체장, 체폭, 전중, 육중, 피낭중을 건중량과 습중량으로 구분하여 측정하였고, 크기는 어장별로 버어니어캘리퍼스로 0.01mm까지 측정하였고, 전중, 육중, 피낭중은 직시전자저울로 전중을 측정하였고, 측정이 완료되면, 육질과 피낭을 분리하여 각각을 측정하였음. 건중량은 측정이 완료된 습시료를 먼저 -70℃로 냉동한 후 냉동진공건조기로 72시간 완전 건조 후 각각의 건중량을 측정하였음. 측정은 각각 어장별로 30개체를 측정하였음.

비만도는 다음의 식으로 계산하였음.

$$\text{비만도(Condition factor, wet, dry)} = \frac{\text{육중(건, 습중)}}{\text{체장} \times \text{체폭}^2} \times 1,000$$

생식소발달지수(Gonadosomatic index)은 생식소의 발달정도 휴지기(0), 분열증식기(1), 증식기(2), 성숙기(3), 산란기(4)로 구분하여 각각의 단계를 지수화하여 조사하였음. 부위별 크기는 다음과 같이 측정하였음.

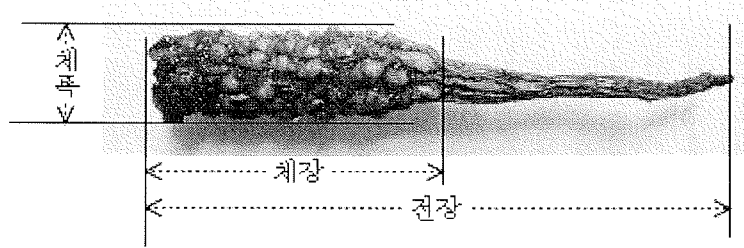


그림 12. 미더덕 측정 범위

(2) 결과 및 분석

(가) 정점별 수질환경조사

조사 정점별 월별 수온 및 염분 변화를 조사한 결과는 그림 13에서 보는 것과 같음.

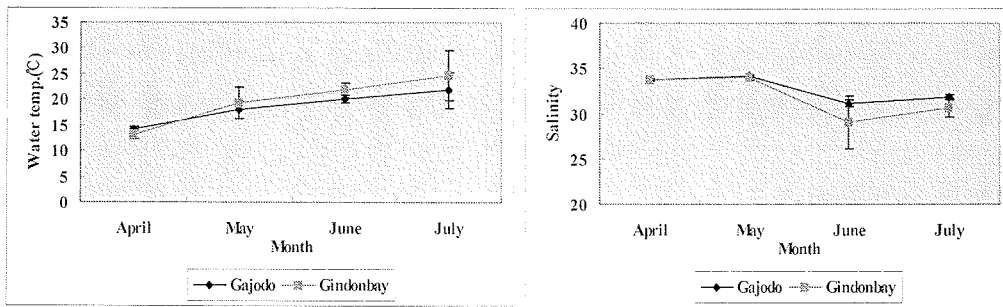


그림 13. 조사정점별 월별 수온 및 염분변화

조사기간 중 미더덕은 주로 2~7 m 층에 수하양성되고 있었음. 조사정점별 수심은 가조도가 최대 16m, 진동만이 최대 10m의 수심을 보였음. 수층별 온도변화는 가조도의 경우 표층은 14.6~26.2°C, 10 m 층은 14.2~20.2°C, 저층은 13.7~18.0°C의 변화를 보였고, 진동만의 경우는 표층은 13.9~29.5°C, 5 m 층은 12.8~28.5°C, 저층은 12.6~19.8°C의 변화를 보였음. 전체적으로 수심이 낮은 진동만 정점이 가조도 정점도보 수온변화가 높았음. 조사 기간 중 7월 진동만의 5 m 층에서 미더덕의 폐사를 유발할 수 있는 수온 28.5°C 높은 수온을 보인 것을 제외하고는 비교적 안정적인 수온분포를 보였음.

조사기간 중 염분의 변동폭은 가조도의 경우 30.7~34.3, 진동만의 경우 24.7~34.0으로 가조도에 비해 진동만이 높은 염분변동을 보였음. 이와 같은 결과는 진동만의 경우 주변에 하천이 잘 발달되어 있어 장마철 강우에 의한 담수유입으로 인한 것으로 판단됨. 일반적으로 미더덕은 저염분에 매우 취약한 것으로 조사되고 있는 점으로 미루어 본다면 진동만의 경우 6월 표층의 염분이 24.8까지 하강한다는 점은 미더덕의 폐사를 유발할 수 있는 환경요소로 작용할 가능성이 매우 높게 나타나고 있어 상대적으로 가조도 정점에 비해 진동만의 정점에서 많은 폐사가 유발하고 있는 요인으로 작용하고 있는 것으로 추정됨.

조사기간 중 용존산소의 변화는 그림 14에서 보는 것과 같음.

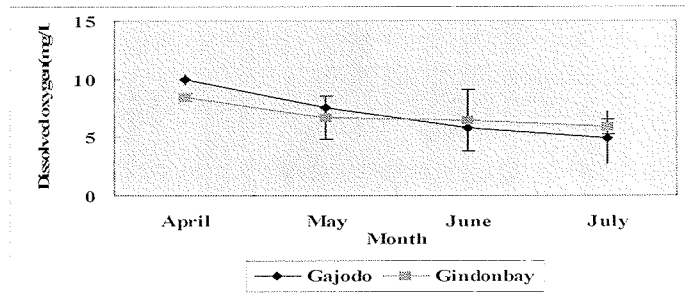


그림 14. 조사정점별 월별 용존산소 변화.

월별 용존산소의 변화는 매우 높게 나타났는데, 비교적 저수온기인 4월에는 조사정점과 수층에 관계없이 8.17 mg/L 이상으로 높은 용존산소를 보였지만, 7월에는 가조도 정점의 경우 10 m 이심에서 2.85 mg/L 이하의 빈산소현상을 보여 양식생물을 폐사시킬 수 있는 농도 이하였음. 그러나 진동만의 경우 6월 6 m 이심에서 비교적 낮은 4.85 mg/L 이하의 낮은 염분을 보였지만 비교적 양호한 용존산소 농도를 보였음.

(나) 정점별 성장특성조사

조사 정점별 미더덕의 성장특성을 조사한 결과는 그림 15에서 보는 것과 같음.

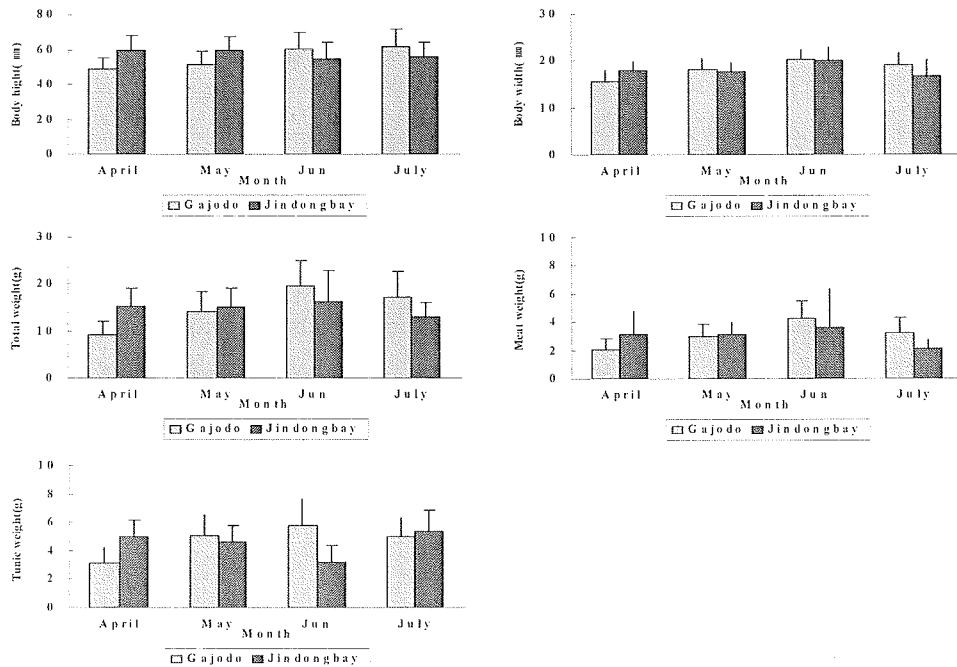


그림 15. 조사정점별 월별 체고, 체폭, 전중, 육중 및 피낭중변화

조사기간 중 조사정점별 체고, 체폭, 전중, 육중 및 피낭중은 전체적으로 7월 피낭중을 제외하고는 가조도가 진동만 정점에 비해 비교적 높은 값을 보여 외관상으로는 가조도 정점의 미더덕이 진동만 정점의 미더덕에 비해 성장도가 좋은 것으로 나타났지만, 유의적인 차이는 없었음. 성장 특성은 정점에 상관없이 6월까지의 지속적인 성장을 보이지만, 7월 고수온기로 접어들면서 낮아지는 경향을 보였음. 정점별 월별 건육중량, 건피낭

중량, 건육중량비 및 수분함량의 변화는 그림 16에서 보는 것과 같음.

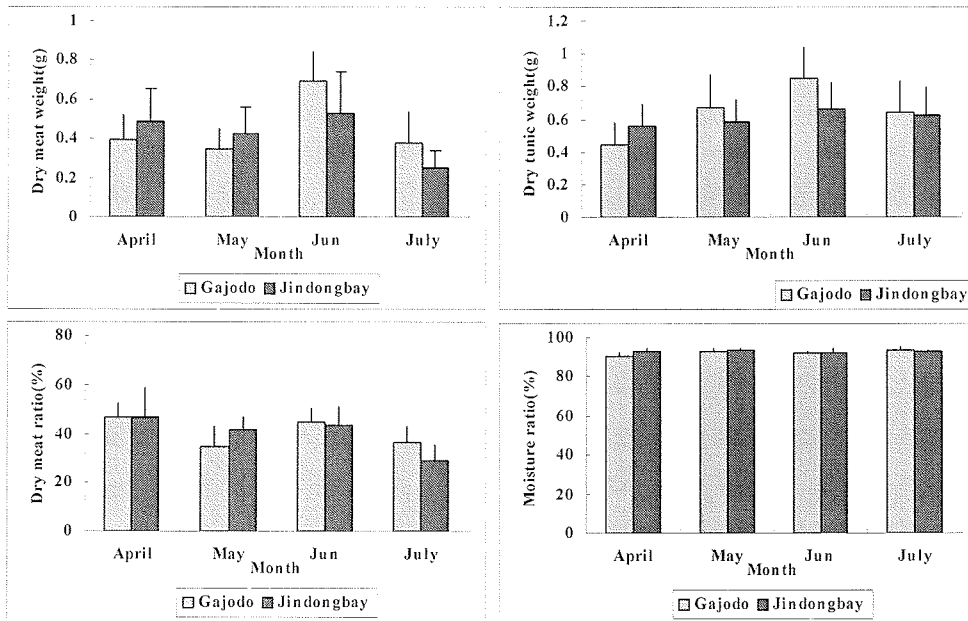


그림 16. 정점별 월별 건육중량, 건피낭중량, 건육중량비 및 수분함량의 변화

건중량의 경우 습중량의 변화에 비해 다른 경향을 보였지만, 전체적으로 6월까지의 증가 후 7월 감소하는 경향은 습중량을 기준으로 조사한 경우와 비슷한 경향을 보였음. 건육중량은 5월까지 가조도 정점에 비해 진동만 정점에서 비교적 높게 나타났고, 7월 이후 가조도 정점의 미더덕이 높아지는 경향을 보였음. 한편, 전 조사기간 중 수분함량은 조사정점과 월별에 관계없이 90.6~94.6% 높은 수분함량을 보였음.

조사정점별 월별 생식소발달지수 및 비만도의 변화는 그림 17에서 보는 것과 같음.

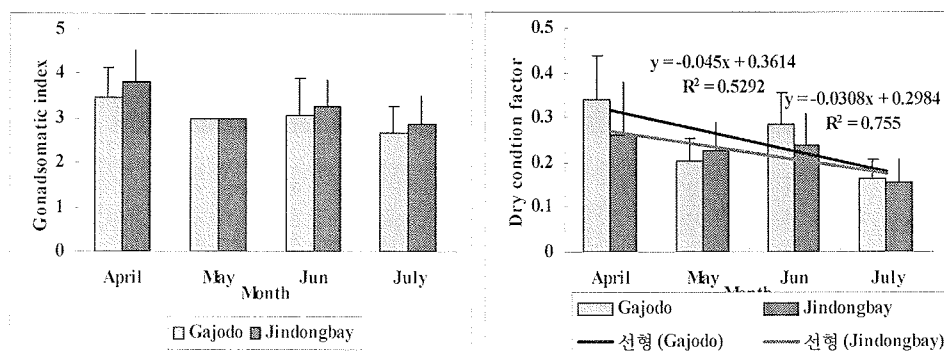


그림 17. 조사정점별 월별 생식소발달지수 및 비만도의 변화.

생식소발달지수는 조사기간중 정점에 관계없이 성숙단계로 나타났고, 5월 1차 산란이 일어나고, 다시 7월 2차 산란이 일어난 것으로 나타나 조사기간 중 2회의 산란이 일어난 것으로 추정됨. 한편, 조사기간 중 비만도는 4월 가조도 정점에서 0.34로 가장 높게 나타났고, 7월 진동만 정점에서 0.15로 가장 낮게 나타났음. 전체적으로 5월을 제외하고는 가조도 정점이 진동만 정점의 개체보다는 높은 비만도를 보였고, 생식소발달지수와

비슷한 경향으로 비만도의 변화는 산란과 밀접한 관련을 보였음.

나. 온도별 사육에 따른 생리변화 조사

(1) 재료 및 방법

실험에 사용된 미더덕은 만 1년생으로 가조도 앞 미더덕 양식장에서 양성중이던 것으로 실험에 이용된 미더덕은 평균전장(n=30) 84.8 ± 12.7 mm, 평균체장은 55.7 ± 8.2 mm, 평균 체폭은 19.5 ± 2.6 mm, 평균 전중은 15.6 ± 3.9 g 이었음.

사육온도는 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 ± 1 ℃로 해수냉각기와 티타늄 히터를 이용하여 조절하였고, 사육은 유수식으로 60L 사각 플라스틱 수조를 이용하였음. 유수량은 20회전/1일로 충분히 유수하였으며, 사육기간 동안 기아에 의한 생리적인 저하를 막기 위하여 연속적으로 먹이를 공급하였음. 먹이는 실내에서 인위배양한 *Tetraselmis tertiolecta*와 해삼 육성용 배합사료를 혼합한 것을 이용하였음.

실험온도는 최초 15℃에서 7일간 순치 후 매일 1℃씩 상승시켜 각각의 실험온도까지 서서히 상승시켜 갑작스런 온도변화에 의한 스트레스를 최소화하였음. 사육은 각 온도별 30마리를 2중 cage 형태로 부상수용하여 바닥에서 분리하여 2반복으로 실시하였음. 조사는 생존율, 효소활성도, 혈구활성도, DNA 손상도를 분석하였음.

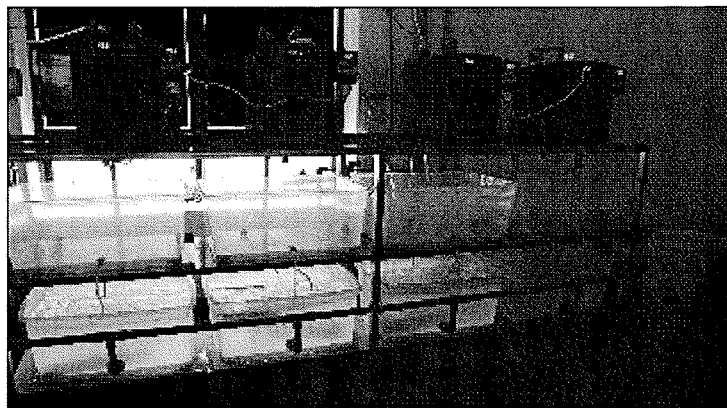


그림 18. 온도별 실험장치.

생존율은 매일 오전 10시를 기준으로 육안으로 관찰하여 완전히 폐사되어 만졌을 때 반응이 없는 것을 폐사체로 간주하였음. 온도별 효소활성도를 조사하기 위하여 실험 개시 시와 종료 시 각각의 온도별로 5마리의 시료를 채취한 후 간췌장을 분리 마쇄하여 원심분리 상등액을 API ZYM kit(API system france)로 20가지 효소를 발색법으로 측정하여 각각을 지수화(5단계)하여 측정하였음.

혈구활성도는 양식장에서 바로 채취한 개체를 실험실로 냉장 운반하여 혈액을 추출하여 온도별(10, 15, 20, 25, 30℃)로 30분간 노출한 후 자이모산 농도별 Phagocytosis 활성을 Flow cytometer로 분석하였음. DNA 손상도는 실험종료 시 각각 5마리의 시료의 혈구를 추출하여 Comet assay 5.5로 분석하였음.

(2) 결과 및 분석

(가) 수온별 생존율 조사

미더덕을 포함한 피낭류의 혈구세포의 주요기능은 영양공급, 중금속축적(V, Fe, Zn, Cu, Mn), 방어기작 및 피낭형성에 관여함(Goodbody, 1974; Burighel and Cloney, 1997). 혈구의 이상은 피낭형성에 많은 문제점을 발생시키고 궁극적으로 피낭형성과 방어기능이 떨어져 대량폐사를 유발할 수 있는 하나의 요소로 작용한다. 따라서 본 조사는 온도에 따른 미더덕의 혈구활성을 조사하기 위하여 실시하였음. 미더덕 대량폐사와 관련 수온의 영향을 조사하기 위하여 실내에서 수온별 사육시험을 실시한 결과 사육일수에 따른 생존율 변화는 그림 19에서보는 것과 같음.

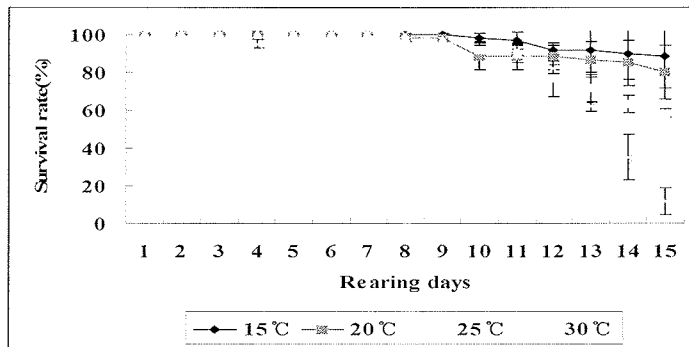


그림 19. 수온별 사육일수에 따른 생존율의 변화

온도별 생존율은 사육온도에 따라 유의적인($P < 0.05$) 차이를 보였는데, 실험종료시 15°C와 20°C 각각 88.3%와 80.0% 높은 생존율을 보였지만, 25°C와 30°C 각각 58.3%와 11.6%로 매우 낮은 생존율을 보였음. 이상의 결과 LT_{50} 은 정확한 분석을 실시하여야 하겠지만, 미더덕은 25°C가 넘어가면 생존에 치명적인 영향을 받는 것으로 추정됨.

(나) 온도별 혈구활성도 조사

수온별 혈구활성도를 조사한 결과는 그림 20과 21에서 보는 것과 같음.

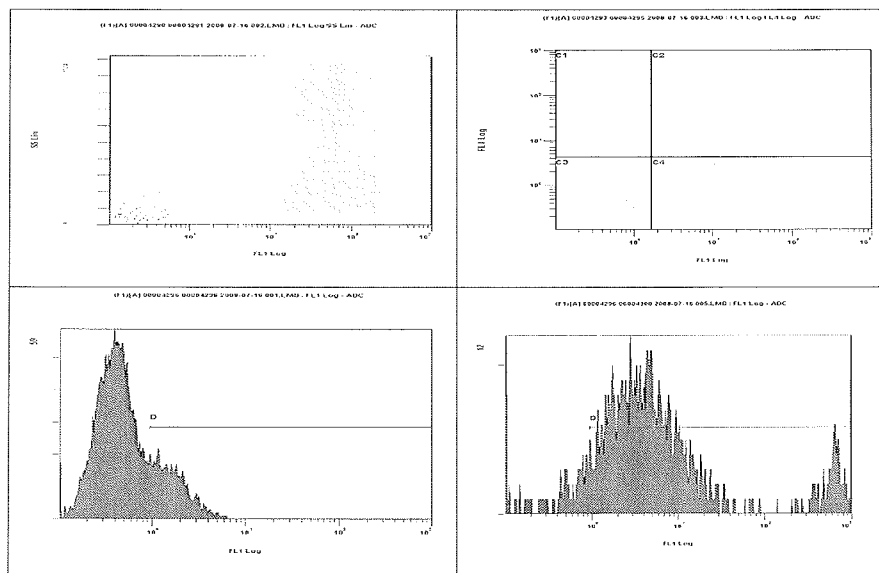


그림 20. 혈구활성도 조사를 위한 Flow cytometer 산물

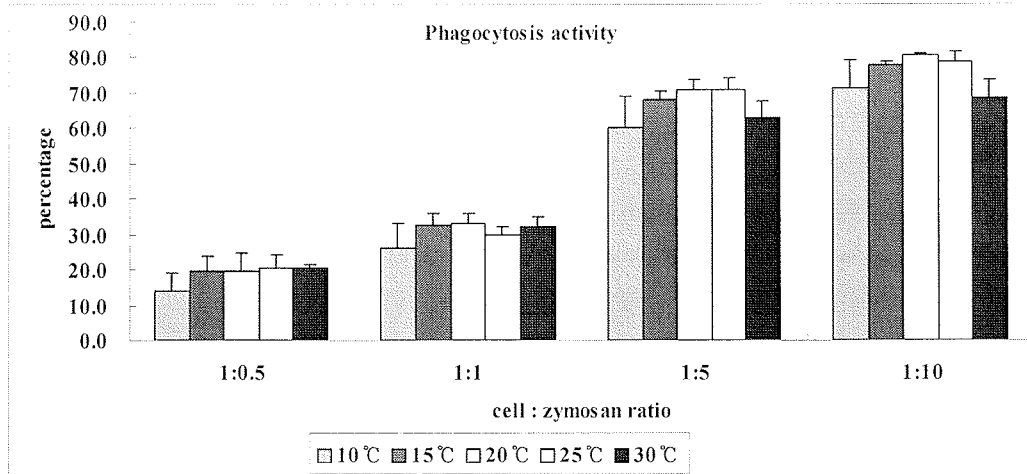


그림 21. 수온별 혈구활성도

수온별 미더덕 혈구의 phagocytosis activity를 zymosan 농도별로 조사한 결과 전체적으로 zymosan의 농도가 높을수록 활성도는 유의적($p < 0.05$)으로 높아지는 경향을 보였고, cell : zymosan 1:5 이상에서 30°C에서는 비교적 낮아지는 경향을 보여 어느 정도 활성도가 떨어지는 경향으로 나타났음. 이와 같은 경향은 25°C까지는 혈구가 외부인자의 공격에 대해서 어느 정도 방어력을 가지지만, 30°C에서는 과도한 병원생물체등의 공격에 대해서는 활성도가 낮아져 방어능력이 떨어지는 경향을 보였음.

다. 사육수의 금속이온농도에 따른 생리 및 효소활성 변화 조사(스트레스 저항성 발현 인자 변동 분석)

(1) 재료 및 방법

실험에 이용된 미더덕은 가조도 앞 미더덕 양식장에서 양성중이던 1년생 개체를 이용하였음. 노출실험은 1L 원형 아크릴 용기를 이용하여 각각 20마리의 미더덕을 수용하여 실험 금속이온을 투입하였음. 실험은 SOD 발현에 관여되는 금속이온(Zn, Fe, Cu, Mn, V, Se)과 EDTA를 각각 100uL 투입하여 각각의 물령증 발생율을 조사하였음. 조사항목 : 생존율, ROS 발생량, SOD관련유전자 발현량을 조사하였음.

(2) 결과 및 분석

(가) 미량금속(Zn, Se, Cu, Fe, Mn) 이온은 다양한 대사과정에서 발생한 각종 산화스트레스로부터 조직을 보호하기 위한 metalloenzymes(GPx)의 활성화에 매우 중요한 역할을 하며, 특히 superoxide dismutase(SOD)의 발현기로서 중요한 역할을 함. 이에 상기 미량금속이온의 결핍에 따른 분체점을 조사하기 위하여 본 연구를 수행하고자 함.

(나) 스트레스 관련 유전자의 분리 및 동정을 위하여 명게 ESTs DB를 참조하여 아래 스트레스 관련 유전자를 선정하였음. (<http://www.genome.ad.jp/magest/index.html>)

(다) Catalase, Cytochrome P450, Glutathione preoxidase, Glutathione reductase,

Glutathione S-transferase, Metallothionein, Superoxide dismutase, Thyroid peroxidase, biquitin, Xanthine oxidase

(라) PCR primer 제작 및 명계 스트레스관련 유전자 PCR 산물은 그림 22에서 보는 것과 같음

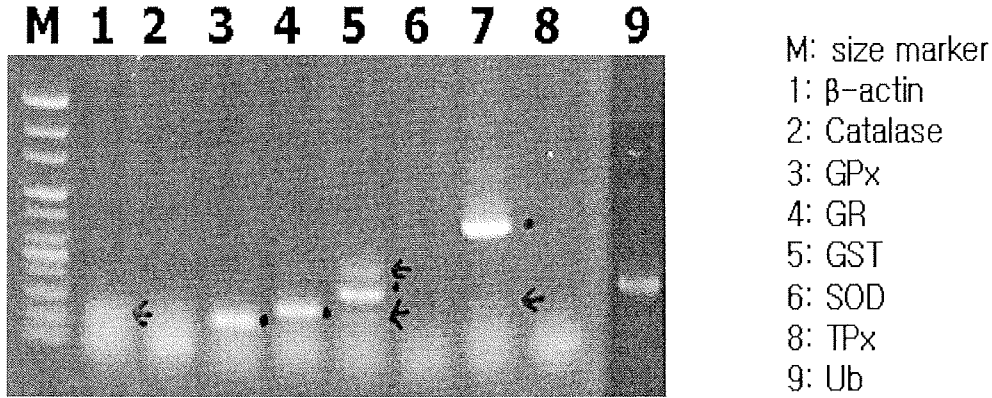


그림 22. 미더덕 스트레스 관련 유전자 PCR 결과

(마) Cloning 및 염기서열 확인

β -actin (internal control), Cytochrome P450, Glutathione peroxidase, Glutathione S-transferase, Metallothionein, Ubiquitin 등의 미더덕 homologue 확보

(바) 조직변화 및 ROS 발생량, 각종 스트레스 유전자 발현량 등은 하반기 조사분석 예정.

제 2 절 2차년도

1. 물렁증 유발 후보 유전자의 기능 규명을 통한 폐사 원인 분석

가. RT-PCR, Real-Time PCR로 각 시험구를 비교하여 물렁증 관련 후보유전자의 선별

(1) 재료 및 방법

정상개체와 물렁증 걸린 개체에서 조직을 분리한 다음 trizol을 이용하여 total RNA를 분리함. 2% agarose gel에서 전기영동을 하여 분리된 total RNA의 integrity를 확인한 다음 정량하여 5ug의 RNA를 cDNA 합성에 사용함. MMLV reverse transcriptase를 사용하여 mRNA에 대한 cDNA를 합성함. 합성조건은 37°C에서 60분, 95°C에서 5분간 방치함. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 serine protease와 GPx에 대한 RT-PCR을 수행함. PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 결과를 확인하였음. Real-time PCR은 로슈사의 Light cycler SYBR Green I-96 kit를 사용하여 mixture를 만들어서 실행하였음.

(2) 결과 및 분석

(가) DEG 분석을 통해서 물렁증 개체에서 발현량의 감소를 보인 유전자로는 PAPS reductase, WNK, GPx 였으며, 물렁증 개체에서 발현량의 증가를 보인 유전자는 serine protease 였음(그림 23). PAPS reductase와 GPx (glutathion peroxidase)는 생체내의 활성산소를 제거하는 역할을 수행하며, 활성산소는 세포내 소기관의 손상, 단백질 기능이상 및 DNA 손상을 유발함으로써 염증반응을 유발하는 주요인자임. 이러한 유전자의 발현감소로 인해 생체내 활성산소가 제거되지 못하여 물렁증 발병에 영향을 미칠 가능성이 존재함. 또한 물렁증 개체에서 발현이 증가한 serine protease는 단백질을 분해하는 기능을 수행하며, 이러한 유전자의 과다한 발현은 비이상적인 기능을 초래하여 주요 단백질의 분해 및 세포간의 결합력 저해 등 다양한 영향을 미침으로써 물렁증 발병에 영향을 미칠 수 있으므로 물렁증 유발 후보유전자로 선정하였음.

(나) DEG 분석을 통해 동정된 유전자들의 발현정도를 비교하기 위하여 정상개체와 물렁증개체에서의 mRNA를 분리한 다음 RT-PCR을 실시한 결과, GPx와 serine protease가 DEG 분석 결과와 동일한 결과를 나타내었음(그림 24(가)). 독립적인 두 개체 중 물렁증 발병한 개체에서 GPx의 발현량이 감소하였고, serine protease의 발현량은 증가한 것을 확인할 수 있었음. 그러나 DEG 분석을 통해 동정된 다른 유전자들은 유의할만한 결과를 나타내지 않았음(그림 24(나)). RT-PCR을 통해서 검증된 GPx와 serine protease의 발현량을 정량적으로 나타내기 위해서 real-time PCR을 실시한 결과 GPx는 물렁증 걸린 개체에서 약 5배 정도 감소한 것을 확인할 수 있었으며 (그림 24(다)), serine protease는 물렁증 걸린 개체에서 약 8배 정도 증가한 것을 확인할 수 있었음 (그림 24(라)).

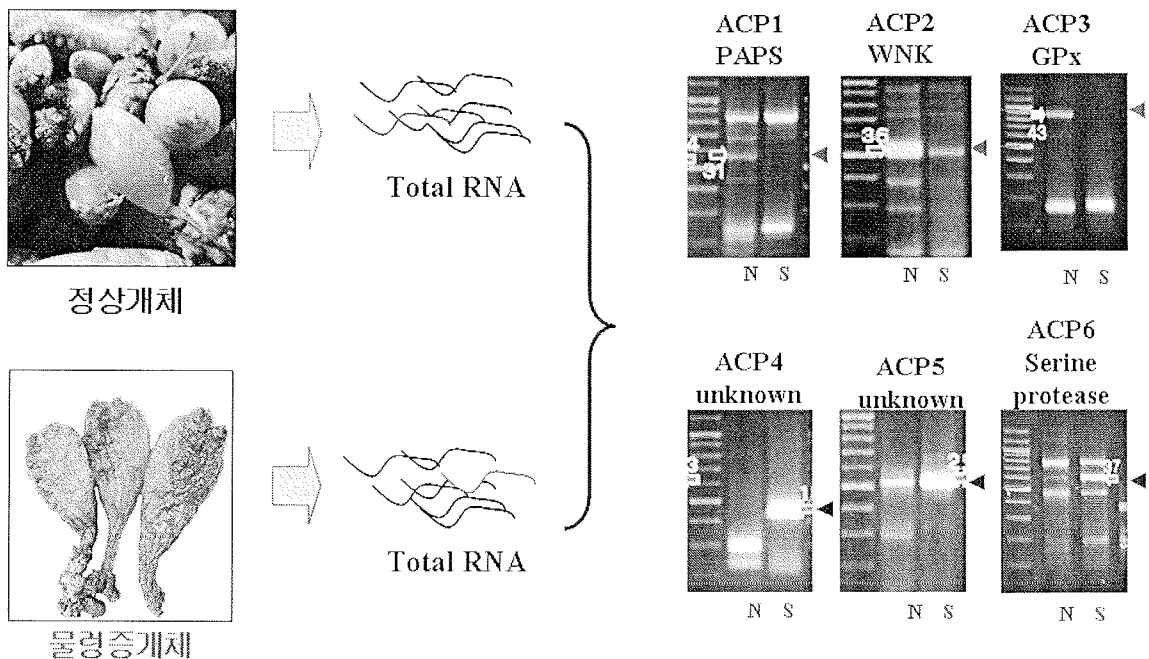


그림 23. DEG 분석의 전체적인 모식도와 분석을 통해 동정된 유전자들

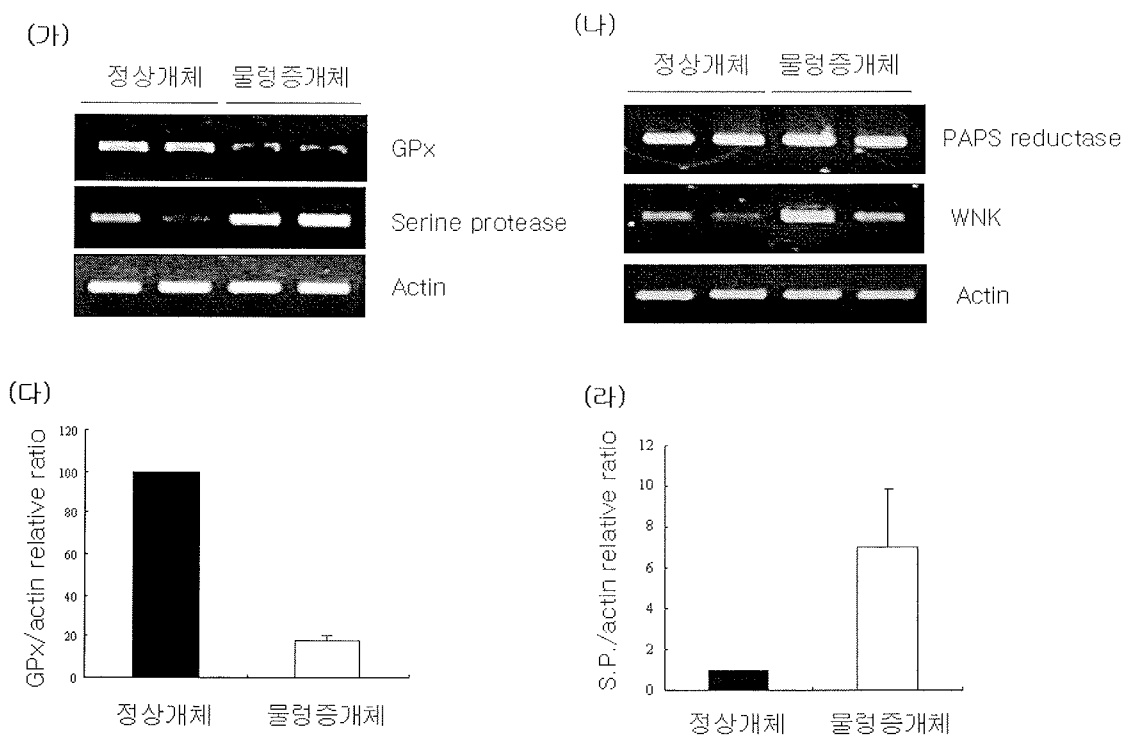


그림 24. 정상개체와 물렁증 개체에서의 serine protease와 GPx 발현량 비교

나. 물렁증 유발후보 유전자의 promoter 확보 및 발현분석 시스템 구축

(1) 재료 및 방법

(가) 물렁증 유발 후보 유전자인 serine protease와 GPx의 프로모터 서열을 확보하기 위하여 clontech사의 GenomeWalker™ Universal Kit를 사용하여 genomic walking을 실시함. 정상 개체에서 분리한 genomic DNA를 EcoR V, Dra I, Pvu II 및 Ssp I 제한 효소로 각각 절단 시킴. 절단된 genomic DNA에 GenomeWalker adaptor를 결합시킨 뒤, 이것을 주형으로 하여 AP1, AP2 primer와 gene specific primers (serine protease: 5'-act caa agc ccc gcc tcc tgc aca-3', 5'-gat ccc cag taa ttg gta cac tgg g-3', 5'-cag ttt ttg gca atg cgc agc tgt c-3', 5'-aat gcc agt atg cac cac cgc ttt g-3; GPx: 5' aag llg tlc caa ctg aat ata gtt ggc t-3', 5'-ttt gtc atg cct cat tta gag gca aca-3', 5' cat tga caa cca agc ata ctt tat ccc-3')를 사용하여 PCR을 수행함. PCR산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 확인한 뒤, T-vector에 삽입하여 클로닝 하였음. PCR산물의 서열을 확인하기 위해 T7과 SP6 프라이머로 sequencing PCR을 실시한 다음, automatic sequencer (ABI 3130, USA)를 사용하였음.

(나) Serine protease와 GPx의 프로모터 서열내 단일염기다형성을 분석하기 위하여 미더

덕 정상 개체와 물렁증 개체의 조직을 분리하여 e-tube에 넣고 lysis buffer 900 μ l 첨가하였음. 24시간 뒤 e-tube에 proteinase K(0.02 mg/ml) 5 μ l 넣고 37°C incubator에 24시간동안 방치하였음. 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액만 분리하여 MagExtractor (Toyobo, Japan)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였음. 위에서 분리한 genomic DNA를 template로 하여 serine protease와 GPx 프로모터 영역을 PCR 한 다음, PCR 산물을 AcroPrep™ 96 Filter Plate (Pall Life Sciences, USA)를 이용하여 clean-up 하였음. Clean-up한 PCR 산물을 사용하여 sequencing PCR을 실시하였고, 염기분석 반응산물을 clean-up 하기 위해 Montage™ SEQ₉₆ (Millipore, USA)을 사용하였음. Automatic sequencer (ABI 3130, USA)를 사용하여 염기 분석한 다음 SeqMan program으로 SNP를 분석하였음(그림 25).

(다) Serine protease와 GPx의 발현시스템을 구축하기 위하여 클로닝용 프라이머를 주문하였음 (serine protease: forward, 5'-aag gta ccc aac aac aat ctc tca ttt caa gt-3', reverse, 5'-cca agc ttc agt tgg tag acc tgt aat tta tc; GPx: forward, 5'-aag gta ccg atc aaa gtc ttt gat tct tgg c-3', reverse, 5'-cca agc ttt atg ctt atg ttg aag ata att gt-3'). 각각의 프라이머로 PCR을 수행한 다음, 제한효소 Kpn I과 Hind III를 처리하여 절단함. 절단된 PCR산물을 정제한 다음, pGL3B empty vector에 삽입함. 삽입된 유전자를 E.coli에 transformation 한 다음, colony PCR을 수행하여 insert가 들어간 클로니를 찾음. Mini-prep을 실시한 다음, 제한효소 Kpn I과 Hind III를 처리하여 cutting이 되는지 확인함. 마지막으로 염기분석을 실시하여 serine protease와 GPx의 프로모터가 맞는지 확인함.

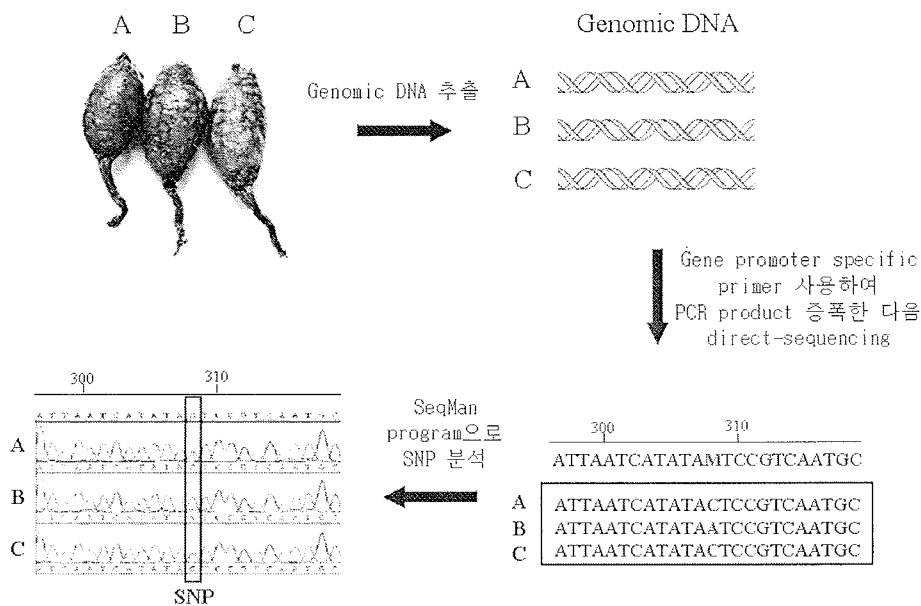


그림 25. 프로모터 단일염기 다형성을 분석하는 과정 모식도

(2)결과 및 분석

(가) GenomeWalker를 실시하여 serine protease의 genomic DNA 서열을 확보한 결과,

serine protease는 3개의 intron (그림 26, 빨간색 부분)과 4개의 exon (그림 26, 검은색 부분)으로 구성된 것을 확인할 수 있었음. 그림 4에서 파란색으로 표시된 서열은 아미노산 개시코돈과 종결코돈임. BioEdit program을 사용하여 염기서열에 따른 아미노산 서열을 분석한 결과, 256개의 아미노산으로 구성되어 있음을 확인하였음 (그림 27).

```

CTGAATCTGTAACCTACACATTATGCTTTTTGTATAAAAAACCAGAATTTTTAAAAACAACAACAATCTCTCATTCAAGTTCA
ATATTCATTAATAAAATAACAAGAAATTTGACGTTTATCTTTTGGGACTAAGTAATGATATTCAGTTTTGTAGAATGAATGTGTTT
ATATATAATATTCATGGGTATGGAAATCTTGAGCTGGCATTGAGATACAACATATCTTAATTGAACCATTAGCAACATGAGC
AATTTAATAACAATGCTTTAAAGAAGTACTGAATGTTATGATCAATGTC TACTCTAGACAAAATGAGTTTTAGGAAATTCATACATT
TTGTTGACCATACTATATTTATTGAGATAATTGAAATGACAAGGTAGTTATGGAATATATGTTGAATTCACAATGTCAATTTGTAC
TTGTATAATAGTCATATTACAAAATTTACTACTTTCAATTAATAAATACTATTTGCATGGTTTTTTGGATATATTACAGGTCTA
CCAACCTGGAGACCAGAAAAGTCATAAATGGAGATTTGCCGAATCGGGAGCATATCCGTGGCAGGTACGTACAAGAGACGGCAAATTC
GAACATTTAACACATGCTTTGATAAAAGCTGTGATGTTTTTAAATAGCCGAGAAAGTGATTTCAATGAAATGAAGATTGTGTACAG
GAGAGAAATCTGATTTTTATTATTTTTTCATCCAGGTATCTCTCAAACCAAAAGCGGTGGTGCATACTGGCAITTTTTGGGT
GGATCTGTCAATTTCCGAAAATATATCATGACAGCTGGCATTGCCAAAACCTGAGGTTCAAAATTTTATTCAATTTTGAAAAT
ATTTGACTTTTCGTCAATCATTCCTTCTATTACCACCTTTGTTTTTCTCTCTDATCTTTTTTATTATCATCTTTTCGTCACTC
TTCCATTTTTTTCACTTATTTTCCCTGCCGAACCTTTTTACATTTTACCGGCACTGCAATTTAGGCCGAGCCGGGTGACTGTATAT
GCTGGATCGGTTGACAAGTTC AATGGTGAGAACGATACACCGTGGAGACATTTTTGGCACATCCAGTTACGACTCCAAGTCTATA
TCTTGGGATTATGGCATTAATAACTAGCTGATCAACTCAATTCGGTAATACGAACGTAAGTATTTGTACAACCAAGTCCGTAAG
TCAATTCGGTAATTTATGACTAATAAAGCTTATTTAACATTTGTAGACTTTTGTATTAACAACAAAATTTATATAGAAGACAAGTTC
AAACGAACGAGTTTTGTGTGACATGAACTTGAATTTTGTATGGCGATCTTAAACATCAGCTTTTATCATCAATGTCAATTTAGTTT
GTGCAGTAAGACCAGTAGACCAAAACACTTCGTATATTTACTTTTTGTTTTGTGCAGATGGACCAATTCGCATCCCAAGTTTTGTGA
GTTCCGATGCGCAGTTCACTGGAGCCGGTCAACGTCGGGATGGGTTACATCTACTACGAGGCACAATCGGACCCGGACAACGAGT
TGCCGAACATGCTTCGATATGCAGACATTTCAATCTATCAGATACCCAGTGTACCAATTTACTGGGGATCTTTCTACCAAGCGAATC
CATGATCTGTGCAGGAGCCGGGCTTTGAGTAACCAAGGTGTTTGCATGGGTGATTCGGCGGACCGTTGGTACAAGAAATCAATGG
CGTGAACCTTGGTTGGAGCAACATCTTGGGCACTAGCTCATGCACAACCAAGCTTCCATGCGGATGGGCTAAACTTTCCACCGTT
CGTACCTGGATCATGAGTAACACCGATCTGCAATAACTGCAACTGGGAATGATGAATCACAACTAATTTAAAATAGTGCTTCATTTG
TAATTCATATAATGTATTAAACTGACAACCTTTCCAGATGTGCATGGCAATGTCAATCCAATGTGTTGCAATATAAGAACATGA
TAATTGAAAATAAAATTACATATTGATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

그림 26. Geomic walker를 통해 확보한 serine protease의 genomic sequences

```

ATGGTTTATTTGGATATATTACAGGCTACCAACTGGAGACCAGAAAGTCATAAATGGAGATTTGCCGAATCGGGAGCATATCCGTGG
M V Y F G Y I T G L P T G D Q K V I N G D F A E S G A Y P W

CAGGTATCTCTCAAACCAAAAGCGGTGGTGCATACTGGCATTTTTGGGTGGATCTGTCAATTCGAAAATATATCATGACAGCTGGC
Q V S L Q N Q S G G A Y W H F C G G S Y I S Q N Y I M T A A

CATTGCCAAAACCTGCCGAGCCGCGTGAAGTATATGCTGGATCGGTTGACAAGTTC AATGGTGAGAACGATACACCGTGGAGACATTT
H C Q K L P S R Y T Y Y A G S V D K F N G G E R Y T V E T F

TTGGCACATCCAGTTACGACTCCAGTTCTATATCTTGGGATTATGGCATCATAAATACTAGCTGATCAACTCAATTTCCGTAATACGAAC
L A H P S Y D S S S I S W D Y G I I K L A D Q L N F G N T N

GTAAGTATTTGTACAACCAAGTCCGTAAGTCAATTCGTTTTGTGAGTTCCGATGCGCAGTTCACTGGAGCCGGTCATACGTCGGGATG
V S I C T T S A V K S I A F C E F R C A Y H W S R S Y Y G M

GGGTTACATCTACTACGAGGCACAATCGGACCCGGACAACGAGTTGCCGAACATGCTTCGATATGCAGACATTTCAATCTTATCAGATAC
G L H L L R G T I G P G Q R V A E H A S I C R H F N L I R Y

CCAGTGTACCAATTTACTGGGATCTTCTACCAGGCAATCCATGATCTGTGCAGGAGCCGGGCTTTGAGTAACCAAGGTGTTTGCATG
P V Y Q L L G I F L P G E S M I C A G G G A L S N Q G V C M

GGTGATTCGGCCGACCGT TGGTACAAGAAATCAATGGCGTGAAAACCTTGGTTGGAGCAACATCTTGGGCACTAGCTCATGCACAACCA
G D S G G P L V D E I N G V K T L Y G A T S W A L A H A Q P

AGCTTCCATGCGGATGGGCTAAACTTTCCACCGTTCGTACCTGGATCATGA
S F H A D G L N F P P F V P G S *

```

그림 27. Serine protease의 mRNA 서열 및 amino acid 서열

(나) GenomeWalker를 실시하여 GPx의 genomic DNA 서열을 확보한 결과, GPx는 1개의

intron (그림 28, 빨간색 부분)과 2개의 exon (그림 28, 검은색 부분)으로 구성된 것을 확인할 수 있었음. 그림 6에서 파란색으로 표시된 서열은 아미노산 개시코돈과 종결코돈임. BioEdit program을 사용하여 염기서열에 따른 아미노산 서열을 분석한 결과, 200개의 아미노산으로 구성되어 있음을 확인하였음 (그림 29).

```
TGACAGAATGGATGACTGTAACCATTATAACGTGAATGCTATATTAAGATAACTATGGTGTAGCCAGATTATTTCTGGGTCA
TTAAGATCAAAGTCTTTGATTCTTGGCCTATCTTCTTCTGGAATCTTTTCTCTGTTGCCACCAATCCACATTGGTGAGTTTC
ATTTGAAATCAGTTTTGTATTATAAGTTTGTTCATTTGTGAAATGTTATTGTTTAAATAAACATAATAAGTATTCATGATCT
ATATATTGACTCAGCAGGGATAAATGTTCCA TCTATGGTGTATGAAAGTTCATTGAAGCAATACTCATAATCATCTGCAATACACTG
TTTATTATGTCACTAAATCAGTGCATGACAAATTAATAAATTTGAGCCTCAGTTGCAA TAACGTAAATGATGATAAACCAT
TCATGCATGTTTTATTATTTGTTTCATTTCCCTGGGTGGTGAACCATGTAATTCATTGCATGCGTTTGGGAAATTTCACTAT
TTTTGGGTAAACAAATTTATAGGTAATAAGAATGCCACAAACGTTGTTGTTGTTGTTACAAAGCCAATTCACCAAGCATTGCTGTCT
AACACCAATGAAATGTAGCATGACATAGACAAAACACTACTGTAGAAATGAGCATAAACAGTTGGACATCATTTGTGTTTTGAAA
AACTTTTCTTTAGAGACAATTATCTTCAACATAAGCATAAAAAATTGTTAATAGAATGAAATTAACATTAATAGTTTTATTATCAC
CTATTTTGTGATAAACAGTAAAATAAGCAAAAGCTGGGGGATAAGCAGCTACCAGATATAAATGACATGATCTGAATTTTGTGTA
CAATGATTGTGACGAATCCCTGCTCCATTCATCATCATAAATAATTATGGGTAATTAATAACATTTATAAATTTTCAGTCTGCTGAAA
GCAAAAAAGCAAAAGATTGGAAAAATGCAAAAACGATTTATGATTTCACAATGACGGATATTGATGGGAAAGAAGTTTCATTGAAA
AATAATAGTTAGATATAAATCTTTGAAACTTGGCTGAAAGGCCATTTGTTTATTAGTCATAGTGTAGTACTATAGACAGTGTAC
CTGAAATTTGATCATGTATATGTTGCAAGCTAAATTAATTCATCGTATGTATCTGTGAAAGGGGAAACGCCCTTTAATTTATGAT
AGTATATAATATATTTTTGTAATGTCATGAATATCGAAATGATGAATGAACCTTTCTTTCAATGTCGCATGTTTTGCAGGGATAAAG
TAGGGATAAAGTATGCTTGGTTGCAATGTTGCCCTCTAAATGTGGCATGACAAAAGCCAACATATTTCAAGTTGGAACAACCTTACGA
AAAGTACTCATCTCAAGGATTAAGCATAATGGCATTTCGGTGAATCAATTTGCAAGTCAGGAACCGGAACAAATGAAGAAATCAA
ACATTTTGGCCAGGTTAATCCCCACGCAAAAATGATCTATATGCCAAATTTGAGGTCAACGGTGACGGTGTCTCCTTTCTTCA
AGTGGCTGAAGAGCCGTAACAATGAAAAAGGAAAGATTGACAAAATCAATCAAAATGGAATTTTCAAAGTTTTGATGATAGACAAG
GAGAAGTTGCCGATCGGTTTGGCCCAAAACAC TGAACCTATGTCTAAAGACATCACTGGGAAAAATTGAGAAGCTGCTTTGAAAAAGGCC
TTGCTCGATCCAAAGTATTAATTTGTGCCAATCAATTTGTTGCATACCATAATCCACAACAGTGTGTTTCATATTTAGGATGCTGCC
TGATTTTATTCAGCTGATGGTGTCTGCTTTATTTCCCTTATTTCCGGTAAAATCTAAGATATAGCTCTTTTTCAAATTTATCACA
TGGTTTTCAAAAAAAAAAATTA
```

그림 28. Geomic walker를 통해 확보한 GPx의 genomic sequences

```
ATGATTGTGACCAATCCCTGCTCCATTCATCATCATAAATAATTATGGGTAATTAATACATTTATAATTTTCAGTCTGCTGAAAGCAAA
M I Y S N P C S I H H H N N Y G Y F N T F I I F Q S A E S K

AATGACAAAGATTGGAAAAATGCAAAAACGATTTATGATTTCACAATGACGGATATTGATGGGAAAGAAGTTTCATTTGAAAAATATAGG
N D K D W K N A K T I Y D F T M T D I D G K E Y S F E K Y R

GATAAAGTATGCTTGGTTGCAATGTTGCCCTCTAAATGTGGCATGACAAAAGCCAACATATTTCAAGTTGGAACAACCTTACGAAAAGTAC
D K Y C L V V N V A S K C G M T K A N Y I Q L E Q L Y E K Y

TCATCTCAAGGATTAAGCATAATGGCATTTCGGTGAATCAATTTGCAAGTCAGGAACCGGAACAAATGAAGAAATCAAACATTTGCC
S S Q G L S I M A F P C N Q F A S Q E P G T N E E I K H F A

CAGGTTAATCCCAACGCAAAATATGATCTATATGCCAAATTTGAGGTCAACGGTGACGGTGTCTCCTTTCTTCAAGTGGCTGAAGAGC
Q V N P H A K Y D L Y A K F E V N G D G A A P F F K W L K S

CGTAAACATGGAAAAGGAAGATTGACAAAATCAATCAAAATGGAATTTTCAAAGTTTTGATTGATAGACAAGGAGAAGTTGCCGATCGG
R K H G K G R L T N S I K W N F S K F L I D R Q G E V A D R

TTTGGCCCAAAACACTGAACCTATGTCTAAAGACATCACTGGGAAAAATGAGAAGCTGCTTTGA
F A P N T E P M S K D I T G K I E K L L *
```

그림 29. GPx의 mRNA 서열 및 amino acid 서열

(다) 프로모터는 전사를 조절할 대상이 되는 유전자의 유전정보를 지니고 있는 DNA염기 서열 앞부분에 위치하며, 전사조절인자들이 결합하는 모든 DNA 염기서열부위를 지칭

한다고도 할 수 있음. 프로모터는 전사가 일어나기 위해 필요한 최소한의 부분인 코어 프로모터, 전사시작지점으로부터 약 250 염기쌍 이내에 부분이며 전사를 조절하는데 있어서 직접적으로 영향을 미치는 주요한 부분인 프록시멀 프로모터, 전사 시작 지점으로부터 앞쪽으로 멀리 떨어져서 위치하며 전사를 조절하는데 있어서 프록시멀 프로모터보다 일반적으로 영향력이 약하고 부차적인 역할을 하는 디스털 프로모터의 세 가지로 나뉨. 프록시멀 프로모터에서 염기서열의 변화는 해당 유전자의 발현에 커다란 영향을 미칠 수 있기 때문에, 정상개체와 물렁증 걸린 개체에서의 serine protease와 GPx의 발현의 차이가 나타나는 메커니즘을 연구하기 위해 해당 유전자의 프로모터 단일염기다형성 분석은 매우 중요함. 그러므로 정상개체에서의 serine protease의 프로모터 부위에서 단일염기다형성이 존재하는지 확인하기 위하여 genotyping을 실시한 결과, PCR 산물의 150 bp (A>G)와 330 bp (A>G)에서 단일염기 다형성이 나타나는 것을 확인하였음. Genotype에 따른 빈도를 조사한 결과, 정상개체의 150 bp 부위에서는 AA homo-genotype이 전체의 59%, AG hetero-genotype이 전체의 22%, GG homo-genotype이 전체의 18%를 차지하였음. 이 부위에서의 물렁증 개체의 genotype 빈도와 정상개체의 genotype 빈도를 카이테스트를 통하여 통계적으로 비교하였을 때 유의미한 결과를 나타내지 못하였음(그림 30 왼쪽). 330 bp 부위에서는 AA homo-genotype이 전체의 64%, AG hetero-genotype이 전체의 30%를 차지하였고, GG homo-genotype 6%를 나타내었음. 이 부위에서의 물렁증 개체의 genotype 빈도와 정상개체의 genotype 빈도를 카이테스트를 통하여 통계적으로 비교하였을 때 유의미한 결과를 나타내었음 (그림 30 오른쪽). 이러한 결과는 미더덕의 물렁증 발병과 serine protease의 330 부위의 genotype과 상관관계가 있음을 의미하는 것임.

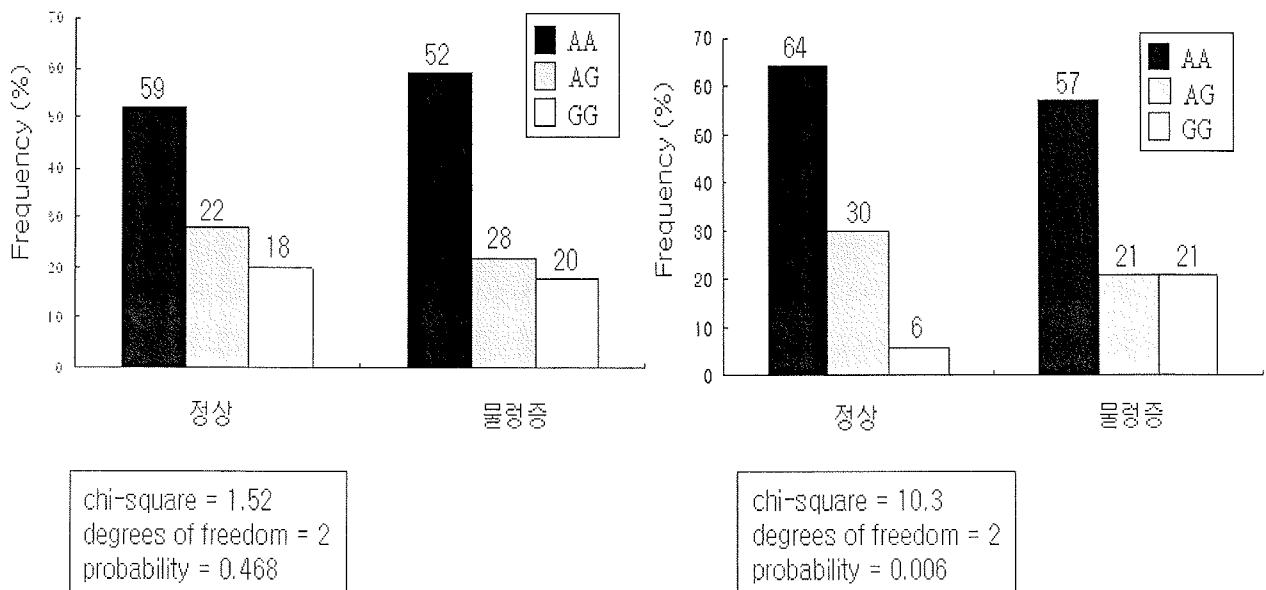


그림 30. 정상과 물렁증 개체에서의 serine protease의 단일염기다형성(SNP) 빈도 조사

(라) 프로모터상의 염기서열의 변화는 해당 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있으므로 TESS (Transcription Element Search System, <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>)에서 제공하는 프로그램으로 염기서열에 따라 결합 가능한 전사인자들을 조사하였음. 130

bp부위에서 genotype이 A인 경우 NKx2-5와 ANF가 결합할 수 있었으며, genotype이 G인 경우 opaque, CP2 및 SP1이 결합할 수 있었음 (그림 31(가)). 330 bp 부위에서는 genotype이 A인 경우 POU2F2와 c-Myb가 결합할 수 있었으며, genotype이 G인 경우 IRF-1,2, C/EBP alpha, YY1 및 NF1이 결합할 수 있었음 (그림 31(나)).

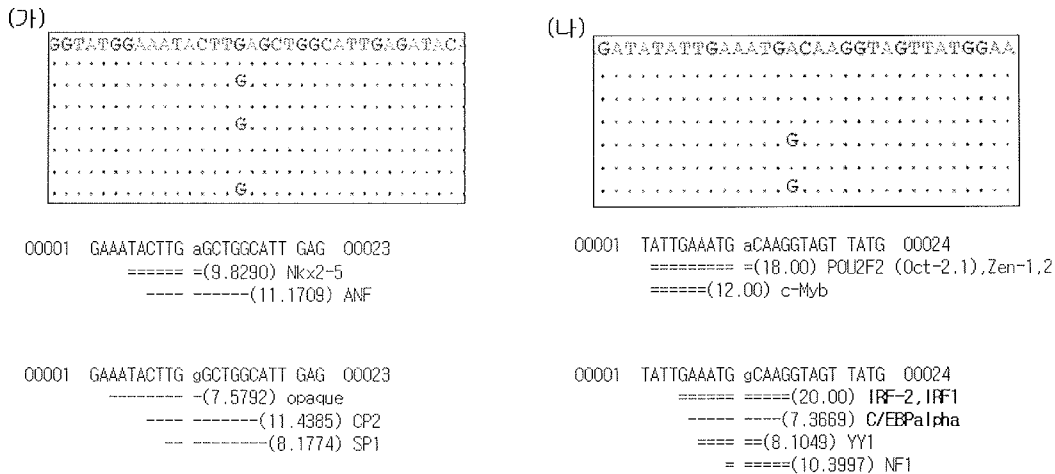


그림 31. Serine protease 프로모터 SNP에 따른 결합 가능한 전사인자

(마) 정상개체에서의 GPx의 프로모터 부위에서 단일염기다형성이 존재하는지 확인하기 위하여 genotyping을 실시한 결과, PCR 산물의 300 bp (C>T)와 530 bp (T>C)에서 단일염기 다형성이 나타나는 것을 확인하였음. Genotype에 따른 빈도를 조사한 결과, 300 bp 부위에서는 CC homo-genotype이 전체의 63%, CT hetero-genotype이 전체의 10%, TT homo-genotype이 전체의 27%를 차지하였음. 이 부위에서의 물렁증 개체의 genotype 빈도와 정상개체의 genotype 빈도를 카이테스트를 통하여 통계적으로 비교하였을 때 유의미한 결과를 나타내지 못하였음 (그림 32 왼쪽). 530 bp 부위에서는 CC homo-genotype이 전체의 36%, CT hetero-genotype이 전체의 16%를 차지하였고, TT homo-genotype이 48%를 나타내었음. 이 부위에서의 물렁증 개체의 genotype 빈도와 정상개체의 genotype 빈도를 카이테스트를 통하여 통계적으로 비교하였을 때 매우 의미있는 결과를 나타냈음(그림 32 오른쪽). 이러한 결과는 미더덕의 물렁증 발병과 GPx 프로모터 330 부위의 genotype과 상관관계가 있음을 의미하는 것임.

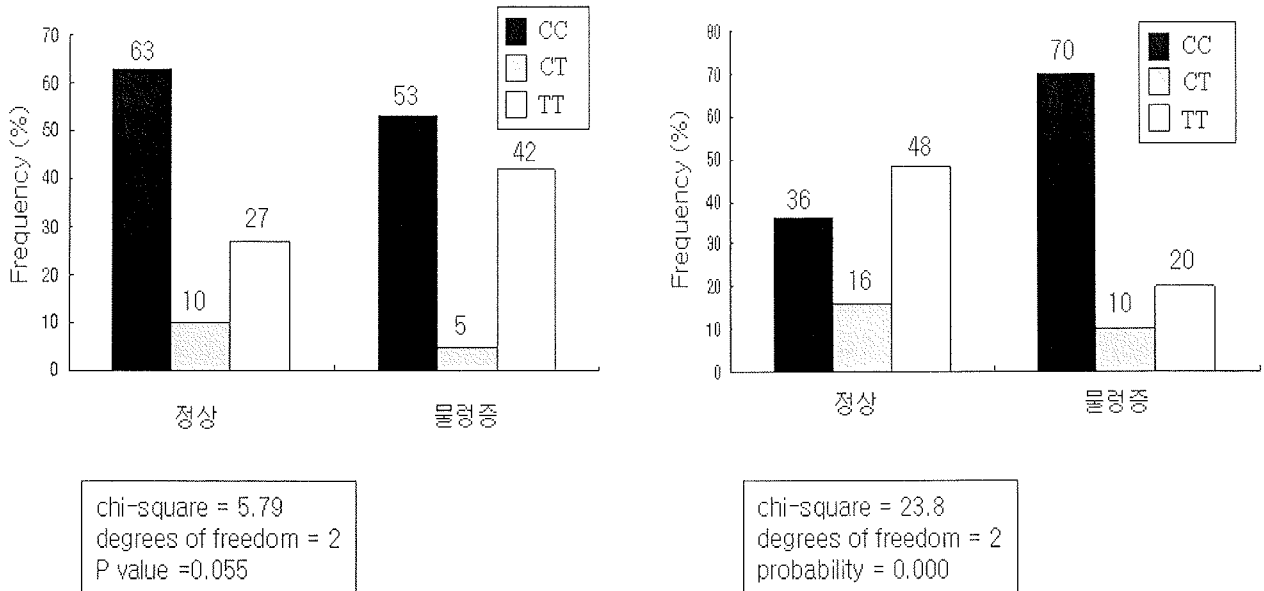


그림 32. 정상과 물렁증개체에서의 GPx의 단일염기다형성(SNP) 빈도 조사

(바) Serine protease와 마찬가지로 GPx 프로모터의 염기서열에 따른 결합 가능한 전사인자를 조사한 결과, 염기 300 bp 부위에서 genotype이 T인 경우 C/EBP family들이 강하게 결합하는 것을 확인할 수 있으며, genotype이 C인 경우에는 C/EBP family들이 약하게 결합하는 것을 확인할 수 있었음 (그림 33(가)). 염기 530 bp 부위에서 genotype이 C인 경우 C/EBPalpha와 AP-1이 강하게 결합하는 것을 확인할 수 있으며, genotype이 T인 경우 C/EBPalpha가 약하게 결합하는 것을 확인할 수 있었음(그림 33(나)).

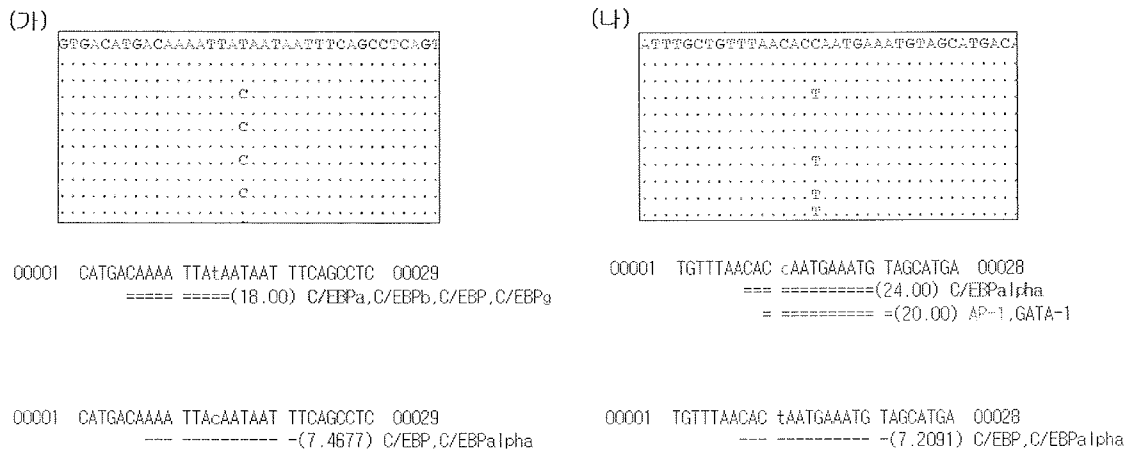


그림 33. GPx 프로모터 SNP에 따른 결합 가능한 전사인자

다. 실험실내 환경 조건 변화 (염분 및 금속이온농도)에 따른 물렁증 후보유전자의 발현 변화 조사

(1) 재료 및 방법

24 well에 human liver cell line Huh7을 seeding한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에 하루 동안 방치함. 다음 날 DPBS로 washing 한 다음, 새로운 배지로 교체함. Serine protease와 GPx의 프로모터가 클로닝된 벡터 (pGL3B-serine protease, pGL3B-GPx)를 e-tube에 400 ng 넣은 뒤, serum free media 100ul를 첨가함. Transfection reagent인 PolyFect를 4 ul 첨가한 다음, 10분간 실온에서 방치함. 배지를 300 ul 첨가한 다음, 각 well에 넣어줌. 37°C, 5% CO₂ incubator에 하루 동안 방치함. Transfection한지 24시간 후, DPBS로 washing 한 다음 농도별로 chemical을 처리함 (NaCl: 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mM; MgCl₂: 0.1, 0.5, 1, 2, 4 mM; MgSO₄: 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mM; CaCl₂: 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mM; H₂O₂: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM; CoCl₂: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM). Cold PBS로 washing 한 다음, lysis buffer 100 ul 첨가해서 deep freezer에 보관함. Luciferin과 luminometer를 사용하여 promoter assay를 실시함.

(2)결과 및 분석

(가) 실험실내 환경조건 변화에 따른 물렁증 후보 유전자의 발현정도를 luciferase assay를 통해 조사한 결과, serine protease는 염분의 다양한 농도에 대하여 별다른 변화를 나타내지 않았으며 (그림 34 (가)), 다양한 금속이온에 대해서는 금속이온의 농도에 따라 약간의 증가하는 경향을 나타내었으나 유의할 수준은 되지 못하였음 (그림 34(나)-(라)).

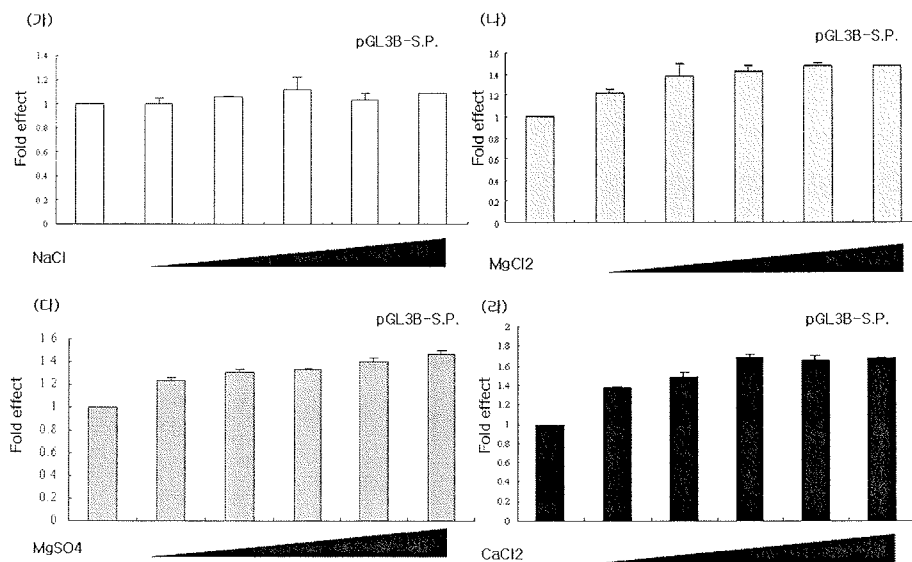


그림 34. 염분 및 금속이온 농도에 따른 serine protease의 발현량

(나) Serine protease는 활성산소의 농도에 따라 발현량이 점차 증가하는 경향을 나타내었으며, 저산소와 유사한 환경을 제공하는 CoCl₂의 처리에 의해서도 발현량이 점진적으로 증가하는 경향을 나타내었음(그림 35). 두 경우 모두 통계적으로 유의할 만한 결과를 나타내었음 (*p <0.01).

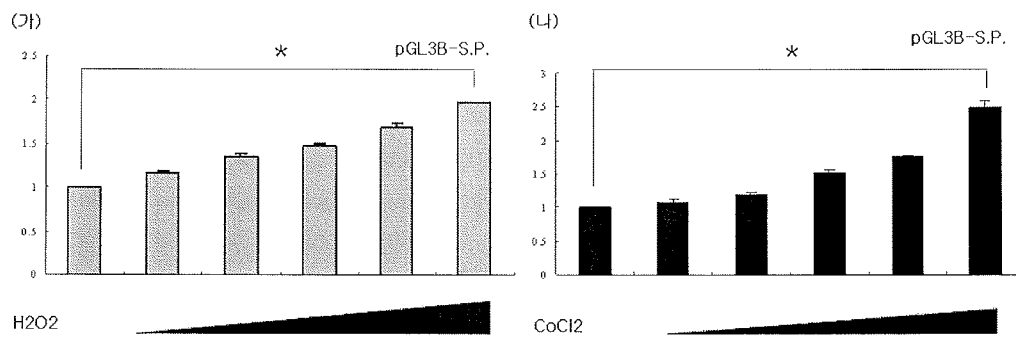


그림 35. 활성산소 농도 및 저산소 정도에 대한 serine protease 발현량

(다) 염분 및 다양한 금속이온의 농도별 처리에 의한 GPx의 발현량 변화는 serine protease와 마찬가지로 유의할만한 결과를 나타내지 못하였음 (그림 36). 그러나 활성산소에 의해서는 GPx의 발현정도가 절반수준까지 감소하는 경향을 나타내었으며, 저산소 상황에서는 30%까지 발현이 감소하는 경향을 나타내었음 (그림 37). 두 경우 모두 통계적으로 유의할 만한 결과를 나타내었음 (* $p < 0.01$).

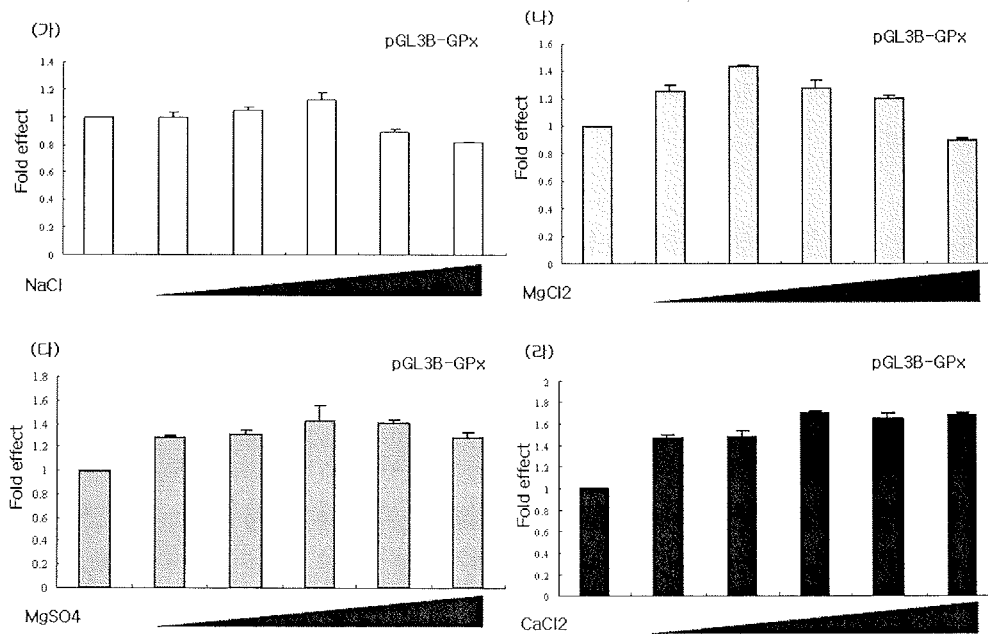


그림 36. 염분 및 금속이온 농도에 따른 GPx의 발현량

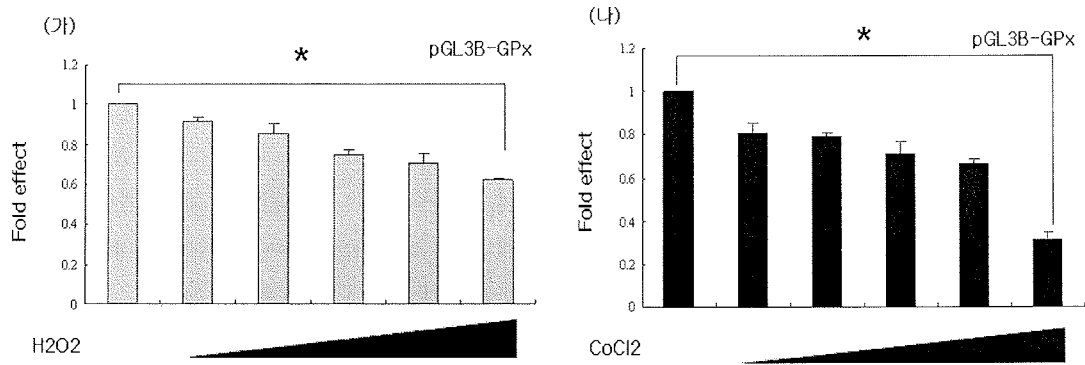


그림 37. 활성산소 농도 및 저산소 정도에 대한 GPx 발현량

(라) 환경변화에 따른 물렁증 유발 후보유전자의 발현량 분석 결과, 염분과 다양한 금속이온에 의한 영향은 거의 나타나지 않았으나, 활성산소와 저산소에 의해서는 발현에 영향을 받는 것으로 나타났음. Serine protease는 활성산소의 농도에 비례하여 발현량이 증가하는 경향을 나타내었으며 GPx는 반대로 감소하는 경향을 나타내었음. 저산소 상황에서도 serine protease의 발현량이 증가하는 경향을 나타내었으며, GPx는 현저하게 감소하는 경향을 나타내었음. 물렁증 개체에서 serine protease의 발현이 증가하고 GPx의 발현이 감소하는 DEG 분석과 비교할 때, 양식장내의 활성산소의 증가나 저산소상황이 유발되어 양식 미더덕의 물렁증 발병을 야기할 가능성이 존재함. 이러한 결과가 양식현장의 환경변화 (활성산소 증가, 저산소 상황)를 야기 시켰을 때 검증된다면, 물렁증에 내성을 지닌 개체의 선발육종 과정에서 환경적인 저해 요소를 제거하는 역할을 수행할 것이라 사료됨.

2. 성장저해요인 인자변동을 이용한 성장개선효과 및 대체양식 기술개발

가. 양식장 환경특성 조사

(1) 재료 및 방법

미더덕 양식어장의 양성실태를 조사하기 위하여 폐사다발 해역인 진동만 내 1개 정점과 비교적 외만인 가조도 앞 1개 정점을 선정하여 양식장의 수온, 염분, Do, 성장변화, 생식소발달지수, 비만도 조사를 매월 1회 조사하였음. 수온, 염분, Do은 다기능수질측정기(YSI 600)이용 현장에서 직접 측정하였음. 어장별 성장특성, 비만도 및 생식소발달지수는 현장에서 직접 시료를 채취하여 실험실로 운반하여 각각의 요소를 측정하였음.

(2) 결과 및 분석

(가) 2008년 10월에서 2009년 6월까지 진동만과 가조도해역 미더덕 양식어장의 환경변동을 조사한 결과는 그림 38에서 보는 것과 같음. 미더덕은 주로 표층에서 1m 이하의 수심에서부터 6m까지 비교적 표층에서 양성되고 있었음.

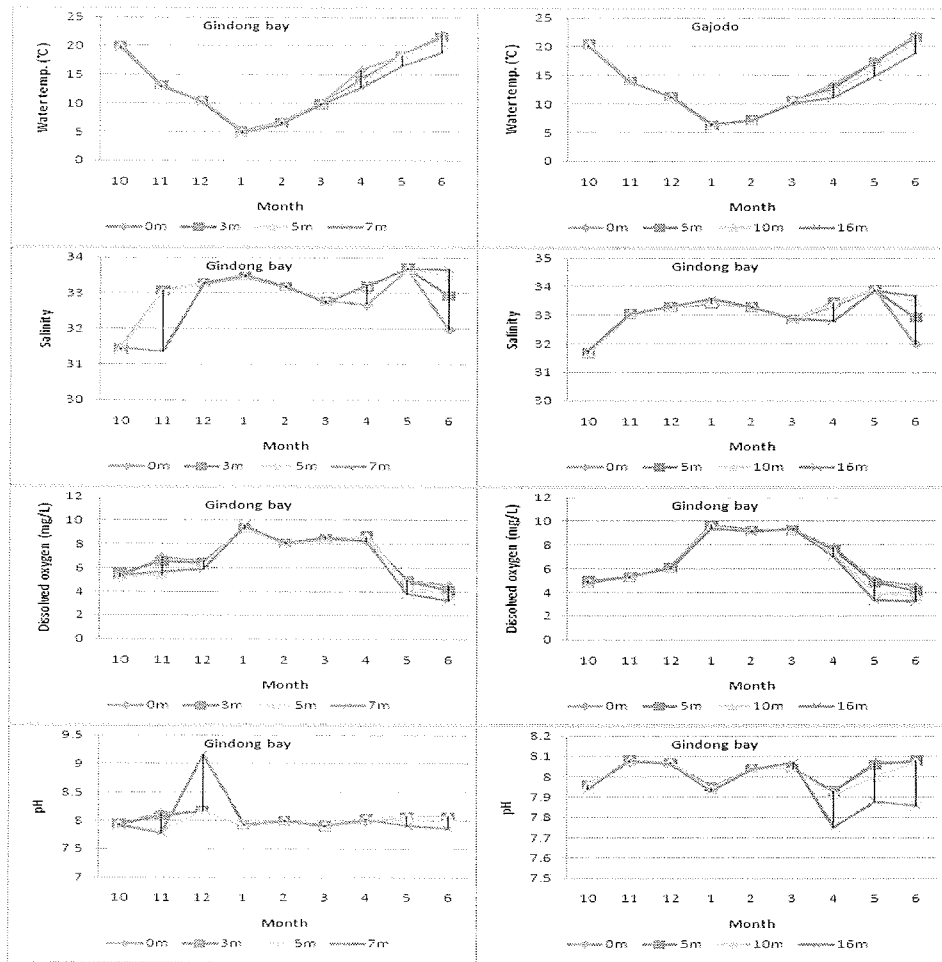


그림 38. 진동만과 가조도 주변해역 미더덕 양식어장의 월별 환경변동

(나) 수온은 각각 4.8~22.0℃, 6.2~22.0℃, 염분은 31.4~33.7, 31.7~33.9. pH는 7.7~8.1, 7.7~8.1, DO는 3.2~8.5 mg/L, 3.3~9.8 mg/L로 수온을 제외하고는 비슷한 환경변동을 보였다.

(다) 지역에 따른 성장요소를 조사한 결과는 그림 38에 서 보는 것과 같음. 성장요소로 지역별로 진동만의 경우 체장구성은 각각 40.0~75.6mm, 전중은 7.9~12.0g, 건육중은 0.1~0.5g, 습비만도는 0.39~0.67, 산란기는 6월로 나타났고, 가조도의 경우 체장구성은 42.4~105.0mm, 전중은 11.4~28.7g, 건육중은 0.1~0.6g, 습비만도는 0.18~0.71, 산란기는 6월로 나타났음.

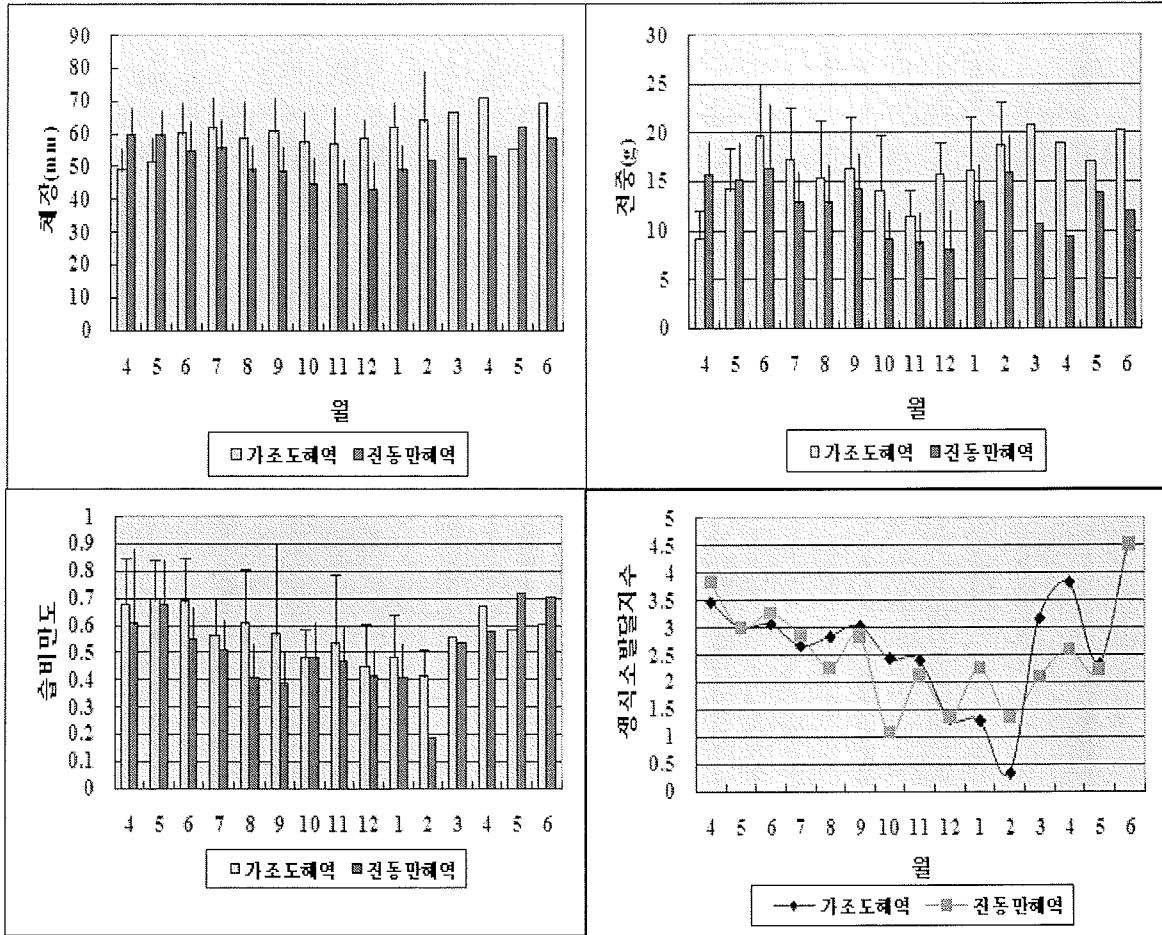


그림 39. 월별 성장요소 및 생식소발달지수 조사

(라) 생존율은 진동만의 경우 10월 조사개시시 평균 380마리/1연에서 198마리로 52.1%였고, 가조도는 개시시 33.2마리/1연에서 종료시 10마리로 30.1%를 보였음.

나. 사육수의 금속이온 농도에 따른 생리 및 효소변화 조사

(1) 재료 및 방법

금속이온으로 Fe, Zn, V, Se, EDTA를 각각 mole 농도별(1, 10, 100)으로 조절하여 1년생 미더덕을 대상(N=30, 2반복, 30일간 노출) 동안 50L 사각 플라스틱 용기를 사용하여 유수식으로 실시하였음. 실험기간 동안은 먹이는 자체 배양한 *T. tertiolecta*와 *P. triconutum* 및 치해삼사료를 혼합하여 연속공급하면서 성장요소, 폐사율, 효소활성 변화 및 금속이온 축적량을 조사하였다. 폐사는 육안 관찰하였고, 효소활성은 20가지 효소 키트(APZYME)를 이용하여 발색법으로 측정하여 각각을 지수화(5단계)하여 측정하였음.

(2) 결과 및 분석

금속이온별 농도에 따른 비만도, 육중량비 및 피낭중량비는 다양한 값을 보였지만, 금속이온에 따른 차이는 일정한 경향이 없었음. 금속이온 농도별 육 및 피낭 축적률 변화는

현재 분석중에 있음. 이온별 효소활성은 전체 19종의 효소 활성 중 Alkaline phosphatase, Leucicene arylamidase, Acid phosphatase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase 7종이 2이상의 활성을 보였지만, 온도별 유의성을 없었음.

다. 염분별 사육에 따른 생리변화 조사

(1) 재료 및 방법

실험수온은 22, 25, 28, 31, 및 34 $^{\circ}$ C, 실험 염분은 일반해수(33.0), 26.4, 19.8, 13.2 그리고 6.6 \pm 0.5 으로 감소시키며 미더덕의 생존율, 반수치사농도 및 생리적 반응을 조사하였음. 반수치사농도는 probit법에 의해 구하였으며, 산소소비율은 산소검량기(Orbis 3500, Switzzland)를 사용하였으며, 암모니아 질소배설률은 phenolphypochloride (Solorzano, 1969) 법을 이용하였음.

(2) 결과 및 분석

(가) 염분별(3.30,6.60,13.2,19.8,26.4,33.0 psu) 수온 25 $^{\circ}$ C에서 7일 동안 염분을 감소시키며 미더덕의 생존율조사 결과 생존율은 염분 19.8psu 이하에서 25%를 나타내었으며, 50%가 사망하는 반수치사 염분농도 (LS50)은 25.12 (LS₅₀: 22.59-28.15) psu였음(그림 40).

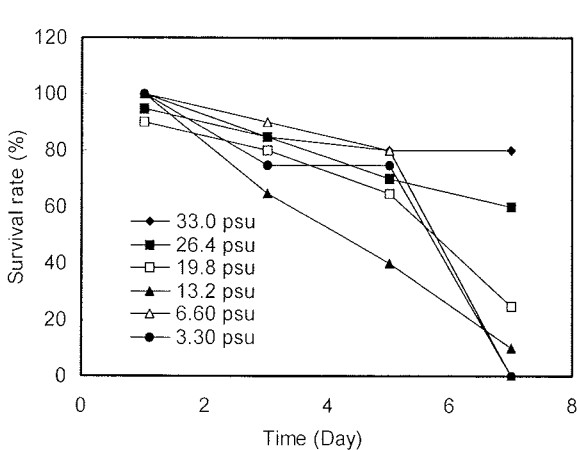


그림 40. 염분감소에 따른 미더덕생존율

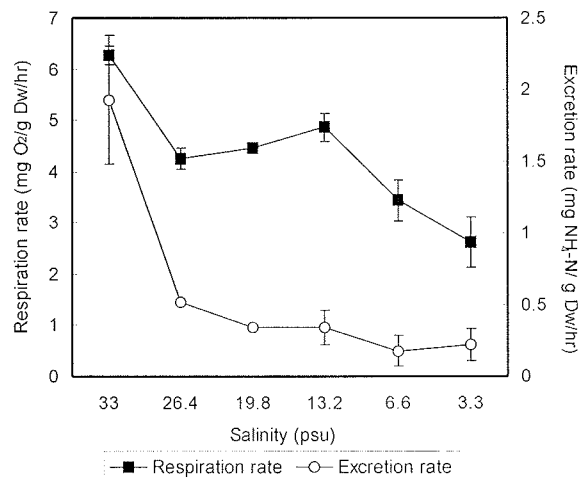


그림 41. 노출 3일째 염분감소에 따른 호흡률 및 배설률의 변화

(나) 염분감소에 따른 미더덕의 호흡률과 배설률의 반응은 자연염분의 경우 호흡률은 6.27 \pm 0.19 mgO₂/g dry wt/h를 나타내었으나, 실험염분 노출 3일째에는 대조구에 비해 모든 노출구에서 22.3%-58.3%로 감소하였음. 또한 암모니아질소 배설률은 대조구에서 1.93 \pm 0.45 mgNH₄-N/g dry wt/h를 보였으나 염분감소에 따라 현저히 감소하는 경향을 보여 염분의 감소에 의해 대사 저해를 받는 것으로 나타났음(그림 41).

(다) 수온에서 3일 동안 노출시킨 미더덕의 생존율을 나타낸 것으로 실험기간동안 22℃에 노출된 개체들은 95%이상 생존하였으나 수온 25℃이상에서는 생존율이 50%이하로 감소하였으며, 34℃에서는 모두 사망하였음. 노출 3일 동안 50%가 사망하는 수온은 24.91℃ (LT₅₀: 20.15-27.67℃)였음(그림 42).

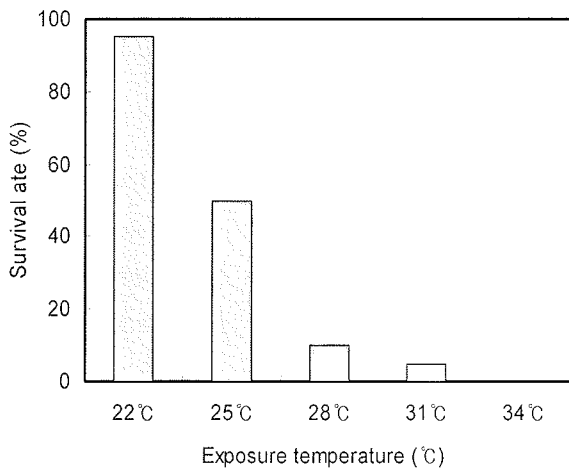


그림 42. 수온증가에 따른 미더덕 생존율

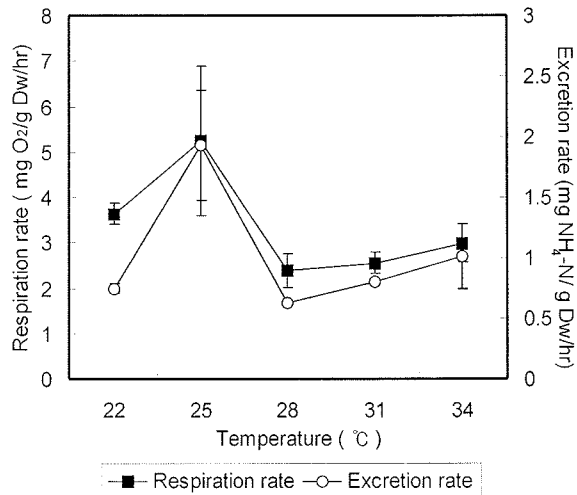


그림 43. 실험 수온 노출 1일째 수온증가에 따른 호흡률 및 배설률 변화

(라) 호흡률과 배설률은 25℃에서 높게 나타났으며, 이후 감소하였으며, 28℃ 이상 고수온간의 대사율에는 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 43).

(마) 우리나라 진해만의 미더덕 양식장이 대부분 연안에 치우쳐 있고, 양식장의 수심이 낮은 점을 고려하여 여름철 고수온, 집중강우에 의한 염분강하와 같은 환경변화에 따른 생리적 변화가 미더덕의 폐사와 관련될 가능성이 존재함. 사육수의 금속이온 농도에 따른 생리변화가 유의미하지 않았으며, 실험실내 환경변화에서도 금속이온의 농도변화에 따라 물렁증 유발 후보유전자의 발현에 변화가 없었음. 그러나 염분변화에서는 미더덕의 생존률이 영향을 받았으나, 실험실내 환경변화 실험중 염분의 변화에 대해서 유의미할만한 결과가 도출되지 않았음. 생리적인 변화는 저염분의 사육수에서 나타난 것이며, 실험실내 실험에서는 고염분을 처리하여 실험하였으므로 결과를 동일시 할 수 없을 것으로 사료됨. 그러나 여름철 고수온에 의한 미더덕 개체의 대사 불균형은 세포내 활성산소의 증가 및 저산소를 유발할 수 있는 환경을 제공함. 실험실내 환경변화에 관련된 실험중 저산소(CoCl₂, 세포내 저산소 유발물질)와 활성산소(H₂O₂)에 의해서 물렁증 유발 후보 유전자의 발현이 유의미할만한 결과를 나타내었음. 이러한 결과는 양식장내의 환경변화가 유전자의 발현에 이상을 야기함으로써 물렁증을 유발할 수 있다고 사료됨.

라. 내성종묘 개발을 위한 실내 인공채묘 시험

(1) 재료 및 방법

채묘시험에 이용된 미더덕 어미는 2008년 9월 채묘된 1년생 어미로 양성장에서 직접 채취하여 선박으로 운송하여 실내 수용된 3,000마리를 이용하였음. 어미는 실내 원형 300L FRP수조에 플라스틱 사각 용기에 수용하여 $18.0 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유수사육하였음. 채란자극은 수온상승 $18.0 \rightarrow 23.0$ + 빛자극을 병행하여 실시하였음. 포란량은 생식소를 절개하여 전체 포란된 양을 인위적으로 적출하여 1L 비이커에 수용한 후 환적법으로 계수하였음 (N=50). 난경은 micrometer로 측정하였음 (N=50), 부화율은 수정란에서 올챙이 유생으로 발생한 것으로 계수하여 계산하였음. 채묘 기질은 미더덕채묘망, 조개망, 팜사, 굴조가비를 이용하였고, 부화된 올챙이 유생을 수용하였음.

(2) 결과 및 분석

실험에 이용된 어미의 크기는 체장 $75.6 \pm 9.2\text{mm}$, 전중 $12.0 \pm 3.4\text{g}$ 이었음. 미더덕 체장 $63.7 \pm 9.8\text{mm}$ 의 1 개체당 포란량은 $340,758 \pm 173,021$ 개로 전중 1g당 10,633개 었음. 총 3,000 마리의 어미로부터 360만개의 수정란을 확보하였고, 올챙이 유생 부화율은 30%였음. 미더덕은 생리실험결과에서도 있듯이 온도에 매우 민감하여 온도상승자극 이후 대부분 폐사하는 경향으로 3차에 걸쳐서 채묘시험을 실시하였으나 많은 양의 수정란을 확보하는 데는 어려움이 있었음. 채묘된 미더덕은 현재 실내에서 사육 중에 있고, 계속 시험 중에 있음.

제 3 절 3차년도

1. 물렁증 유발 유전자 정보를 이용한 내성 미더덕 선별법 확립 및 산업화

가. Genotype에 따른 물렁증 유발 후보유전자의 발현량 조사

(1) 재료 및 방법

(가) Genotype에 따른 물렁증 유발 후보유전자의 발현량을 조사하기 위하여 정상 미더덕 개체 150마리에서 근육을 분리한 다음 e-tube에 넣고 lysis buffer $900 \mu\text{l}$ 첨가하였음. 24시간 뒤 e-tube에 proteinase K(0.02 mg/ml) $5 \mu\text{l}$ 넣고 37°C incubator에 24시간동안 방치하였음. 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액만 분리하여 MagExtractor (Toyobo, Japan)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였음. 위에서 분리한 genomic DNA를 template로 하여 serine protease와 GPx 프로모터 영역을 PCR 한 다음, PCR 산물을 AcroPrep™ 96 Filter Plate (Pall Life Sciences, USA)를 이용하여 clean-up 하였음. Clean-up한 PCR 산물을 사용하여 sequencing PCR을 실시하였고, 염기분석 반응 산물을 clean-up 하기 위해 Montage™ SEQ₉₆ (Millipore, USA)을 사용하였음. Automatic sequencer (ABI 3130, USA)를 사용하여 염기 분석한 다음 SeqMan program으로 SNP를 분석하였음 (표 3, 표4).

표 3. serine protease genotype 분석

Serine protease; 330 site (AA>GG)							
AA	2	3	5	6	7	10	11
	12	14	16	22	25	32	33
	36	37	42	43	44	46	47
	52	53	54	58	59	66	68
	69	71	73	74	75	81	83
	87	89	90	91	95	102	106
	109	111	112	114	119	124	129
	130	131	133	134	137	141	142
	150						
GG	21	26	27	63	104	115	135

표 4. GPx genotype 분석

GPx; 530 site (TT>CC)							
TT	10	14	15	17	19	21	23
	24	26	27	31	32	38	39
	46	47	53	56	70	78	83
	85	86	93	95	101	109	111
	113	114	122	128	130	131	135
	140	141	149	150			
CC	4	5	13	16	18	22	25
	36	40	42	43	48	61	63
	64	66	68	80	87	90	102
	103	110	115	116	118	125	139
	142	148					

(나) Serine protease와 GPx에 대한 프로모터 genotyping을 실시한 후 genotype에 따른 유전자의 발현을 조사하기 위해 genotype 별로 6마리를 선별하여 total RNA를 분리하였음. 2% agarose gel에서 전기영동을 하여 분리된 total RNA의 integrity를 확인한 다음 정량하여 5ug의 RNA를 cDNA 합성에 사용함. MMLV reverse transcriptase를 사용하여 mRNA에 대한 cDNA를 합성함. 합성조건은 37°C에서 60분, 95°C에서 5분간 방치함. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 serine protease와 GPx에 대한 RT-PCR을 수행함. PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 결과를 확인하였음.

(2) 결과 및 분석

2차년도 실험에서 동정된 단일염기다형성 부위와 물렁증 발병과의 상관관계를 통계적으로 분석을 실시하였음. 통계적 분석을 검증하기 위해서는 단일염기다형성 부위의 서열에 따른 동정된 단백질의 발현량을 조사할 필요가 있음. 우선 serine protease의 330 부위에서 AA genotype과 GG genotype을 가진 개체의 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시한 결과 GG genotype을 가진 개체에서 serine protease의 발현이 AA genotype을 가진 개체보다 훨씬 더 증가되어 있음을 확인하였음(그림 44 위). 이러한 결과는 2차년도에 실시한 통계결과와 일치하는 결과로써 AA genotype을 가진 개체에서 serine protease가 더 적게 발현됨으로써 물렁증에 대한 저항을 지닐 수 있음을 예상할 수 있음. 또한 GPx의 530 부위에서 TT genotype을 가진 개체가 CC genotype을 가진 개체에서의 GPx 발현량보다 훨씬 더 많음을 확인하였음(그림 44 아래). 이 결과 역시 통계결과와 일치하는 것으로써, TT genotype을 가진 개체가 더 많은 GPx 단백질을 발현함으로써 물렁증에 대한 저항을 지닐 수 있음을 시사함.

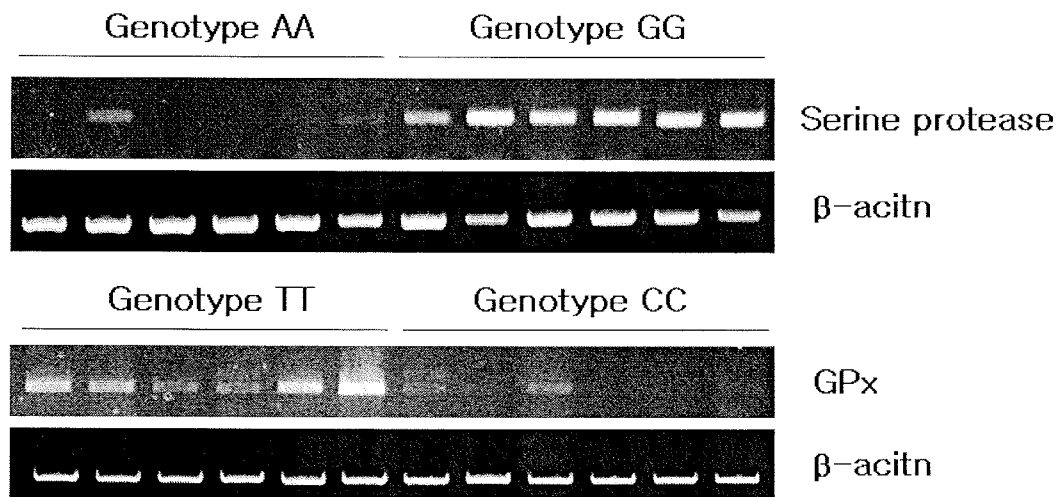


그림 44. genotype에 따른 serine protease와 GPx의 발현량 비교

나. 전사인자를 이용한 물렁증 유발 후보유전자의 발현 분석

(1) 재료 및 방법

24 well에 olive flounder embryonic cell line HINAE를 seeding한 다음, 18℃ incubator에 하루 동안 방치함. 다음 날 DPBS로 washing 한 다음, 새로운 배지로 교체함. Serine protease와 GPx의 프로모디가 클로닝된 벡티 (pGL3B-serine protease, pGL3B-GPx)와 전사인자인 C/EBPa (CCAAT/enhancer-binding protein alpha)와 IRF2 (Interferon regulatory factor 2)를 e-tube에 넣은 뒤, serum free media 100ul를 첨가함. Transfection reagent인 PolyFect를 4 ul 첨가한 다음, 10분간 실온에서 방치함. 배지를 300 ul 첨가한 다음, 각 well에 넣어줌. 18℃ incubator에 하루 동안 방치함. Transfection 24시간 후, cold PBS로 washing 한 다음, lysis buffer 100 ul 첨가해서

deep freezer에 보관함. Luciferin과 luminometer를 사용하여 promoter assay를 실시함.

(2) 결과 및 분석

Serine protease와 GPx의 발현정도가 프로모터 부위의 단일염기다형성으로 인한 것임을 일련의 실험을 통하여 규명하였음. 프로모터 부위의 염기서열은 해당서열에 결합하는 전사인자의 조합을 결정하기 때문에 염기서열의 변이는 결합할 수 있는 전사인자의 조합을 변화시키기 때문에 유전자의 발현이 달라질 수 있음. 2차 년도에 조사한 결과에 따르면 serine protease의 330 부위에 결합할 수 있는 전사인자는 C/EBP α 와 IRF2이며, GPx의 530 부위에 결합할 수 있는 유전자는 C/EBP α 였음. CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α)는 많이 알려진 전사인자이며 DNA에 결합하여 coactivator를 불러들인 다음 기본 전사인자들이 결합할 수 있게 크로마틴의 구조를 열어주는 역할을 수행함. Interferon regulatory factor 2 (IRF2)는 인터페론의 전사를 조절하는 전사인자이며, 면역반응에서 중요한 역할을 수행하는 단백질임. 이러한 전사인자들을 이용하여 미더덕의 물렁증 발병과 관련이 있는 유전자인 serine protease와 GPx의 발현이 영향을 받는지 luciferase assay를 실시하였음. 그 결과 serine protease의 330부위의 서열이 AA인 경우가 GG인 경우보다 발현량이 적었으며, C/EBP α 와 IRF2에 의해 그 발현이 감소하는 경향을 확인할 수 있었음(그림 45). GPx의 경우에는 530 부위의 서열이 TT인 경우가 CC인 경우보다 발현량이 상대적으로 많았으며, C/EBP α 에 의해 그 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음(그림 46). 이러한 결과들은 염기서열의 차이에 따라 그 발현량이 조절되며, 또한 C/EBP α 와 같은 전사인자에 의해 serine protease와 GPx의 발현이 조절될 수 있음을 시사함.

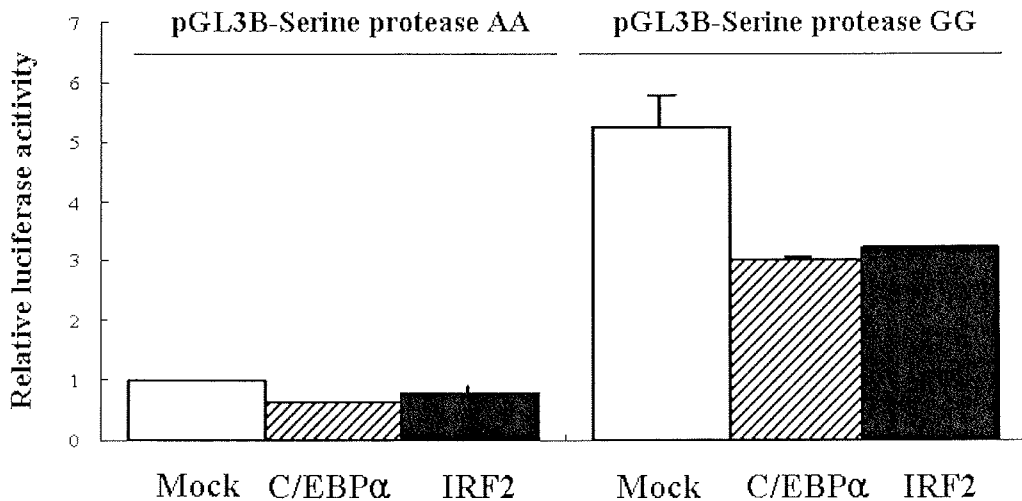


그림 45. C/EBP α 와 IRF2에 의한 serine protease 발현 분석

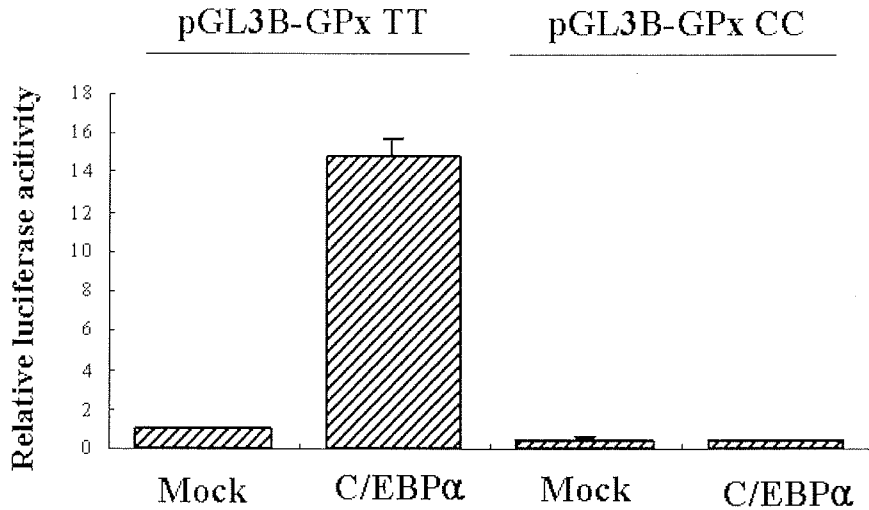


그림 46. C/EBPα에 의한 GPx 발현 분석

다. 물렁증 유발 유전자 정보를 이용한 내성 미더덕 선발 육종

(1) 재료 및 방법

물렁증에 대한 내성을 지닌 미더덕을 선발하기 위해서는 미더덕이 살아있는 상태에서 genotyping을 실시하여야 함. 미더덕 개체에 손상을 주지 않기 위해서 미더덕의 부착부 위의 조직을 일부 채취하여 e-tube에 넣고 lysis buffer 900 μ l 첨가하였음. 24시간 뒤 e-tube에 proteinase K(0.02 mg/ml) 5 μ l 넣고 37°C incubator에 24시간동안 방치하였음. 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액만 분리하여 MagExtractor (Toyobo, Japan)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였음. 위에서 분리한 genomic DNA를 template로 하여 serine protease와 GPx 프로모터 영역을 PCR 한 다음, PCR 산물을 AcroPrep™ 96 Filter Plate (Pall Life Sciences, USA)를 이용하여 clean-up 하였음. Clean-up한 PCR 산물을 사용하여 sequencing PCR을 실시하였고, 염기분석 반응산물을 clean-up 하기 위해 Montage™ SEQ₉₆ (Millipore, USA)을 사용하였음. Automatic sequencer (ABI 3130, USA)를 사용하여 염기 분석한 다음 SeqMan program으로 SNP를 분석하였음 (표 5, 표6).

표 5. 내성 미더덕 선발 육종을 위한 serine protease promoter genotyping

S.P.-1	AA	S.P.-31	—	S.P.-61	—	S.P.-91	—	S.P.-121	AA	S.P.-151	—	S.P.-181	—
S.P.-2	AA	S.P.-32	GG	S.P.-62	—	S.P.-92	AG	S.P.-122	—	S.P.-152	—	S.P.-182	AA
S.P.-3	—	S.P.-33	AA	S.P.-63	—	S.P.-93	AA	S.P.-123	AG	S.P.-153	AA	S.P.-183	AA
S.P.-4	—	S.P.-34	AG	S.P.-64	AA	S.P.-94	AA	S.P.-124	AA	S.P.-154	AA	S.P.-184	—
S.P.-5	AA	S.P.-35	GG	S.P.-65	—	S.P.-95	AA	S.P.-125	AA	S.P.-155	AA	S.P.-185	AA
S.P.-6	AA	S.P.-36	AA	S.P.-66	—	S.P.-96	—	S.P.-126	AA	S.P.-156	—	S.P.-186	GG
S.P.-7	GA	S.P.-37	AA	S.P.-67	—	S.P.-97	—	S.P.-127	AA	S.P.-157	GA	S.P.-187	—
S.P.-8	AA	S.P.-38	—	S.P.-68	GG	S.P.-98	GG	S.P.-128	AA	S.P.-158	AA	S.P.-188	AA
S.P.-9	AA	S.P.-39	AA	S.P.-69	AA	S.P.-99	—	S.P.-129	AG	S.P.-159	AA	S.P.-189	AA
S.P.-10	AA	S.P.-40	AA	S.P.-70	AA	S.P.-100	AA	S.P.-130	—	S.P.-160	—	S.P.-190	AA
S.P.-11	AA	S.P.-41	—	S.P.-71	—	S.P.-101	—	S.P.-131	—	S.P.-161	GA	S.P.-191	AA
S.P.-12	AA	S.P.-42	—	S.P.-72	AA	S.P.-102	—	S.P.-132	—	S.P.-162	—	S.P.-192	AA
S.P.-13	GA	S.P.-43	—	S.P.-73	—	S.P.-103	AG	S.P.-133	AA	S.P.-163	GG		
S.P.-14	—	S.P.-44	—	S.P.-74	GA	S.P.-104	AG	S.P.-134	—	S.P.-164	GG		
S.P.-15	GA	S.P.-45	AA	S.P.-75	AA	S.P.-105	GA	S.P.-135	AG	S.P.-165	GG		
S.P.-16	—	S.P.-46	AA	S.P.-76	AA	S.P.-106	AA	S.P.-136	—	S.P.-166	AA		
S.P.-17	—	S.P.-47	—	S.P.-77	AA	S.P.-107	AG	S.P.-137	AA	S.P.-167	GG		
S.P.-18	—	S.P.-48	—	S.P.-78	—	S.P.-108	AA	S.P.-138	AG	S.P.-168	GG		
S.P.-19	—	S.P.-49	GA	S.P.-79	GG	S.P.-109	—	S.P.-139	—	S.P.-169	—		
S.P.-20	AA	S.P.-50	AA	S.P.-80	GG	S.P.-110	—	S.P.-140	aa	S.P.-170	GA		
S.P.-21	—	S.P.-51	—	S.P.-81	AG	S.P.-111	AA	S.P.-141	—	S.P.-171	GA		
S.P.-22	—	S.P.-52	AA	S.P.-82	GG	S.P.-112	—	S.P.-142	—	S.P.-172	—		
S.P.-23	AA	S.P.-53	—	S.P.-83	GG	S.P.-113	GG	S.P.-143	—	S.P.-173	—		
S.P.-24	AA	S.P.-54	AG	S.P.-84	AG	S.P.-114	—	S.P.-144	AA	S.P.-174	AA		
S.P.-25	AG	S.P.-55	AG	S.P.-85	AA	S.P.-115	GG	S.P.-145	AA	S.P.-175	GA		
S.P.-26	GG	S.P.-56	AA	S.P.-86	AA	S.P.-116	GA	S.P.-146	—	S.P.-176	AA		
S.P.-27	—	S.P.-57	—	S.P.-87	AA	S.P.-117	GA	S.P.-147	AG	S.P.-177	AA		
S.P.-28	AA	S.P.-58	AA	S.P.-88	—	S.P.-118	AG	S.P.-148	AG	S.P.-178	—		
S.P.-29	—	S.P.-59	—	S.P.-89	—	S.P.-119	AA	S.P.-149	GA	S.P.-179	—		
S.P.-30	AA	S.P.-60	GG	S.P.-90	AA	S.P.-120	—	S.P.-150	—	S.P.-180	GA		

표 6. 내성 미더덕 선발 육종을 위한 GPx promoter genotyping

GPx-1	-	GPx-31	TT	GPx-61	CC	GPx-91	-	GPx-121	TT	GPx-151	-	GPx-181	CC
GPx-2	CC	GPx-32	-	GPx-62	-	GPx-92	CC	GPx-122	-	GPx-152	-	GPx-182	TT
GPx-3	TT	GPx-33	CC	GPx-63	CC	GPx-93	-	GPx-123	TC	GPx-153	CT	GPx-183	CT
GPx-4	-	GPx-34	CT	GPx-64	CC	GPx-94	-	GPx-124	TT	GPx-154	-	GPx-184	-
GPx-5	CC	GPx-35	TT	GPx-65	-	GPx-95	-	GPx-125	-	GPx-155	CC	GPx-185	-
GPx-6	-	GPx-36	TT	GPx-66	CC	GPx-96	-	GPx-126	-	GPx-156	-	GPx-186	-
GPx-7	-	GPx-37	-	GPx-67	-	GPx-97	-	GPx-127	-	GPx-157	-	GPx-187	CT
GPx-8	-	GPx-38	CC	GPx-68	CT	GPx-98	-	GPx-128	-	GPx-158	TT	GPx-188	TT
GPx-9	TT	GPx-39	-	GPx-69	CC	GPx-99	TT	GPx-129	-	GPx-159	-	GPx-189	CC
GPx-10	CC	GPx-40	CT	GPx-70	-	GPx-100	TT	GPx-130	TC	GPx-160	CC	GPx-190	CC
GPx-11	-	GPx-41	-	GPx-71	-	GPx-101	TT	GPx-131	TC	GPx-161	-	GPx-191	-
GPx-12	TT	GPx-42	CC	GPx-72	CC	GPx-102	-	GPx-132	CT	GPx-162	-	GPx-192	-
GPx-13	-	GPx-43	-	GPx-73	CC	GPx-103	-	GPx-133	CC	GPx-163	-		
GPx-14	TT	GPx-44	-	GPx-74	CC	GPx-104	-	GPx-134	-	GPx-164	CC		
GPx-15	CT	GPx-45	CC	GPx-75	CC	GPx-105	CC	GPx-135	CT	GPx-165	-		
GPx-16	CC	GPx-46	TT	GPx-76	-	GPx-106	-	GPx-136	-	GPx-166	CC		
GPx-17	TT	GPx-47	-	GPx-77	TT	GPx-107	-	GPx-137	TT	GPx-167	-		
GPx-18	-	GPx-48	TT	GPx-78	-	GPx-108	TT	GPx-138	CC	GPx-168	-		
GPx-19	-	GPx-49	CT	GPx-79	CC	GPx-109	-	GPx-139	TT	GPx-169	CC		
GPx-20	-	GPx-50	TT	GPx-80	CC	GPx-110	-	GPx-140	-	GPx-170	TT		
GPx-21	CT	GPx-51	TT	GPx-81	TT	GPx-111	-	GPx-141	-	GPx-171	-		
GPx-22	CC	GPx-52	-	GPx-82	TT	GPx-112	TT	GPx-142	-	GPx-172	CC		
GPx-23	TT	GPx-53	-	GPx-83	-	GPx-113	TT	GPx-143	-	GPx-173	-		
GPx-24	-	GPx-54	-	GPx-84	-	GPx-114	-	GPx-144	-	GPx-174	CC		
GPx-25	-	GPx-55	TT	GPx-85	-	GPx-115	TT	GPx-145	-	GPx-175	CC		
GPx-26	TT	GPx-56	CC	GPx-86	-	GPx-116	-	GPx-146	CC	GPx-176	TT		
GPx-27	CC	GPx-57	CC	GPx-87	CC	GPx-117	-	GPx-147	-	GPx-177	-		
GPx-28	-	GPx-58	TT	GPx-88	-	GPx-118	-	GPx-148	CC	GPx-178	-		
GPx-29	-	GPx-59	-	GPx-89	-	GPx-119	-	GPx-149	-	GPx-179	-		
GPx-30	TT	GPx-60	TT	GPx-90	CC	GPx-120	CC	GPx-150	-	GPx-180	-		

(2) 결과 및 분석

분자유전학적 방법을 이용하여 serine protease의 프로코더 330부위가 AA인 미더덕개체가 GG인 개체보다 물렁증에 저항성을 가지고 있음을 밝혔다. 또한 GPx의 530 부위가 TT인 개체가 CC인 개체보다 물렁증에 대한 저항성을 가지고 있음. 이러한 결과를 현장에서 검증하기 위해서는 선발육종이 필요함. 그러므로 정상미더덕의 조직일부를 채취하여 serine protease와 GPx에 대한 genotyping을 실시하였음. Serine protease에 대해서는 AA서열을 가진 개체를 선별하기 위해서 AA 서열을 가진 개체를 교배시키며, GG 서열을 가진 개체를 선별하기 위해서는 GG서열을 가진 개체끼리 교배시키면 됨. GPx는 TT 서열을 가진 개체를 선별하기 위해서 TT 서열을 가진 개체를 교배시키며, CC 서열을 가진 개체를 선별하기 위해서는 CC 서열을 가진 개체를 교배시킴으로써 수정된 난을 부화하여 육종한 다음 현장에 적용시켜 물렁증에 대한 저항성을 있는지 확인하고 함.

표 7. 내성 미더덕을 선발육종하기 위한 교배방법

S.P.																	
AA	1	6	8	11	20	24	28	37	39	40	52	70	76	85	86	93	94
	95	106	111	119	125	126	127	128	140	144	145	153	154	159	177	183	185
	191	192															
GG																	
	26	32	35	60	79	80	82	83	98	113	115	163	164	165	167	168	186
GPx																	
TT	9	12	14	17	23	30	31	36	46	48	50	51	55	58	77	81	99
	100	101	108	112	121	124	137	139	158	170	176	182	188				
CC																	
CC	2	5	10	16	22	27	33	38	42	45	56	57	61	63	64	66	69
	72	73	74	75	87	90	92	105	120	133	138	146	155	160	166	169	172
	174	175	181	189	190												

라. Morpholino를 이용한 knock-down system으로 물렁증 유발유전자 기능 확인

(1) 재료 및 방법

Serine protease와 GPx에 해당되는 morpholino를 미더덕 수정란 400여개에 microinjection 하여 삽입함. 각각의 morpholino는 엑손과 인트론 경계부분의 서열 (serine protease; ATA TCC GTG GCA GGT ACG TAC AAG A, GPx; TGA AAA ATA TAG GTT AGA TAT ATA A)에 대한 antisense를 사용하였음.

(2) 결과 및 분석

Morpholino는 관심 있는 유전자의 knock-down을 가능하게 하는 실험방법으로 관심 유전자의 어느 부위를 design 하느냐에 따라 결과분석이 달라짐. 관심유전자의 exon 부위의 서열에 대한 morpholino를 제작할 경우 관심 유전자의 단백질로의 번역을 억제하기 때문에 발현이 저해되었는지는 western blot으로 확인이 가능함. 그러나 현재 미더덕에 단백질에 대한 항체가 산업화되지 않았기 때문에 실제로는 확인이 불가능함. Exon과 intron 경계부위에 대한 morpholino를 설계할 경우 1차 전사체에 대한 splicing 과정이 저해되므로 해당 유전자에 대한 mRNA가 만들어지지 않기 때문에 PCR로써 발현저해 유무를 확인할 수 있음. 그러나 미더덕 게놈지도가 만들어지지 않은 상태에서 관심유전자의 intron 서열을 얻는 것이 힘들. 그러나 본 연구실에서는 serine protease와 GPx에 대한 mRNA를 얻는 과정에서 각각의 유전자에 대한 게놈서열을 동시에 얻었기 때문에 실험진행이 가능하게 되었음. 그러므로 exon과 intron 경계부위에서 serine protease와 GPx의 morpholino를 제작하여 미더덕 수정란에 주입하였음. 주입된 수정란을 부화시킨 후 성체가 되었을 때 개체일부를 채취하여 해당유전자에 대한 발현저해가 일어났는지 확인해야함. 성체가 되기까지 1년 정도의 기간이 필요하므로 그 이후에 RT-PCR을 이용하여 해당 유전자에 대한 발현저해 확인 및 해당 유전자와 물렁증에 대한 관련성 조사가 가능함.

2. 우량종묘생산기술 및 대체품종 개발

가. 양식장 환경특성 조사

(1) 재료 및 방법

(가) 양식장 환경실태 조사

미더덕 양식어장의 양성실태를 조사하기 위하여 폐사다발 해역인 경남 창원시 진동만 내 1개 정점과 비교적 폐사가 적은 경남 거제시 가조도 앞 1개 정점 미더덕 양식어장을 선정하여 양식장의 수온, 염분, Do, 성장변화, 생식소발달지수, 비만도 조사를 매월 1회 조사하였음. 수온, 염분, Do은 다기능수질측정기(YSI 600, USA)이용하여 국립수산과학원 탐구19호를 이용 조사정점별로 현장에서 직접 측정하였음.

(나) 성장특성조사

어장별 성장특성, 비만도 및 생식소발달지수는 현장에서 직접 시료를 채취하여 실험실로 운반하여 각각의 요소를 측정하였음. 성장특성 중 체장, 체폭은 각각의 길이를 버어니어캘리퍼스로 0.01mm까지 측정하였고, 전중, 육중, 피낭중은 먼저 채취된 미더덕 시료를 여과해수로 피낭에 부착되어 있는 이물질을 제거하고, 먼저 전중을 측정한 후 동일 시료를 육과 피낭으로 분리한 후 습포지로 물기를 제거한 후 각각의 육중과 피낭중을 측정하였음. 측정은 직시전자저울로 하였음. 측정 마리수는 어장별로 각각 30개체를 측정하였으며, 비만도는 다음의 식으로 계산하였음.

$$\text{비만도(Condition factor, wet)} = \frac{\text{육중(습중)}}{\text{체장} \times \text{체폭}^2} \times 1,000$$

생식소발달지수(Gonadosomatic factor)은 생식소의 발달정도에 따라 초기활성기 (Ea: early active stage), 후기 활성기 (La: late active stage), 완숙기 (R: ripe stage), 산출기 (S: spent stage) 그리고 회복 및 휴지기 (Re: recovery and resting stage)의 5단계로 나누어 각각의 단계를 지수화하여 조사하였음(그림 47).

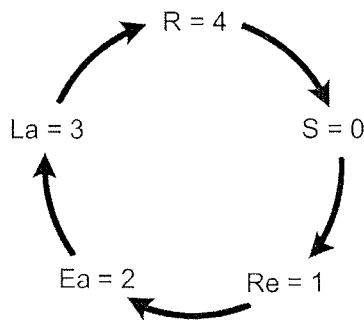


그림 47. 생식소발달 지수 조사를 위한 생식소 발달단계별 상수 계산 체제

(다) 생리변동에 따른 성장저해요인 조사

미더덕 생리변화 조사는 가조도 시험어장에서 채취된 만 1년생을 이용하였다. 수온별

은 22, 25, 28, 31, 및 34℃, 실험 염분은 일반해수(33.0), 26.4, 19.8, 13.2 그리고 6.6±0.5
 으로 감소시키며 미더덕의 생존율, 반수치사농도 및 생리적 반응을 조사하였음. 반수치
 사농도는 probit법에 의해 구하였으며, 산소 소비율은 산소검량기(Orbisphere 3500,
 Switzland)를 사용하였으며, 암모니아 질소 배설률은 phenolhypochloride (Solorzano,
 1969)법을 이용하였음.

(2) 결과 및 분석

(가) 양식장 환경실태 조사

미더덕 양식어장의 양식어장환경 변화를 조사하기 위하여 2008년 4월에서 2010년 3월
 까지 3년간 수온, 염분, 용존산소, 수소이온동도를 조사정정별 수심에 따라 조사한 결과
 는 그림 48, 그림 49에서 보는 것과 같음.

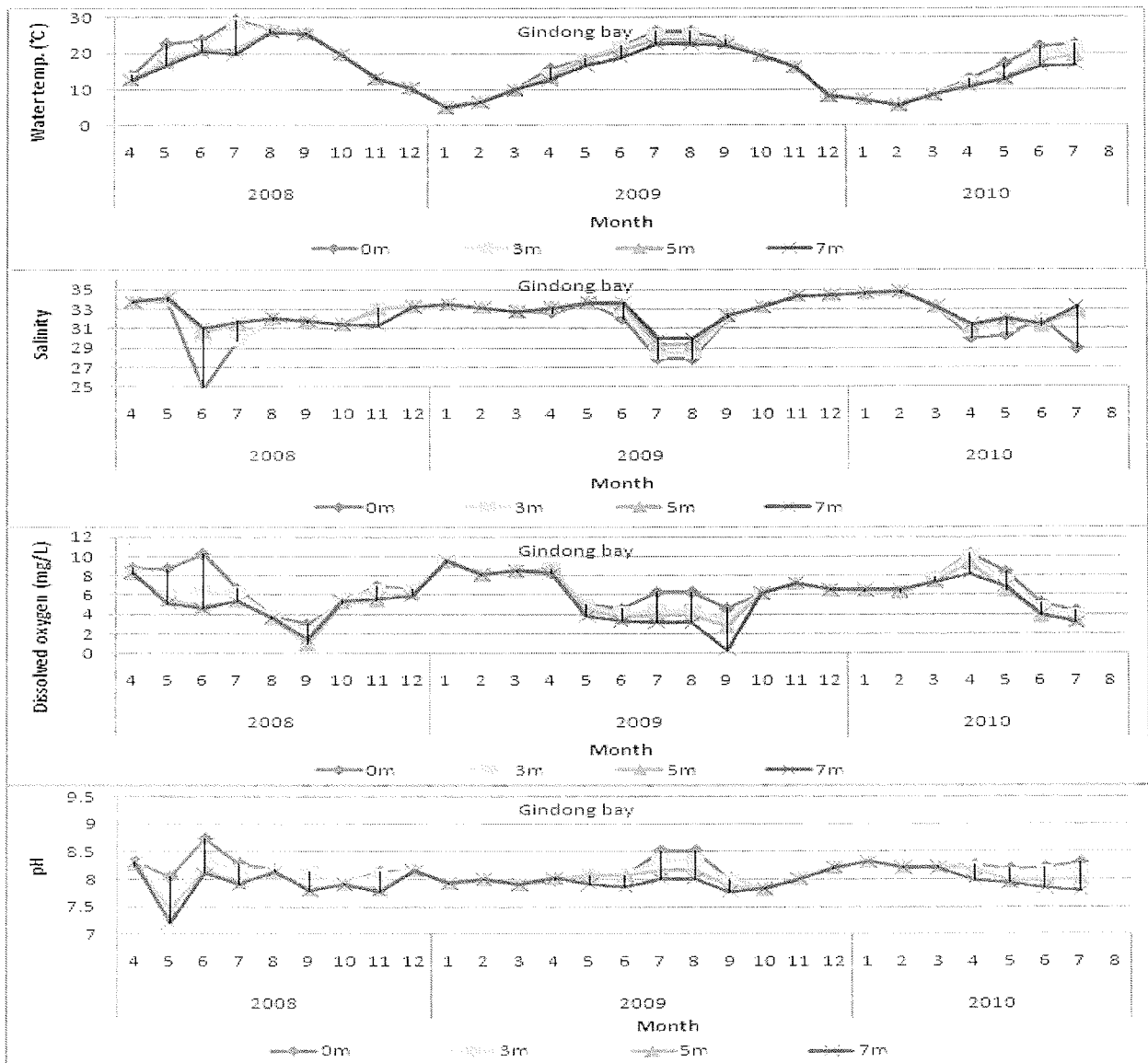


그림 48. 진동만 해역의 수심별 월별 수온, 염분, 용존산소, pH변화.

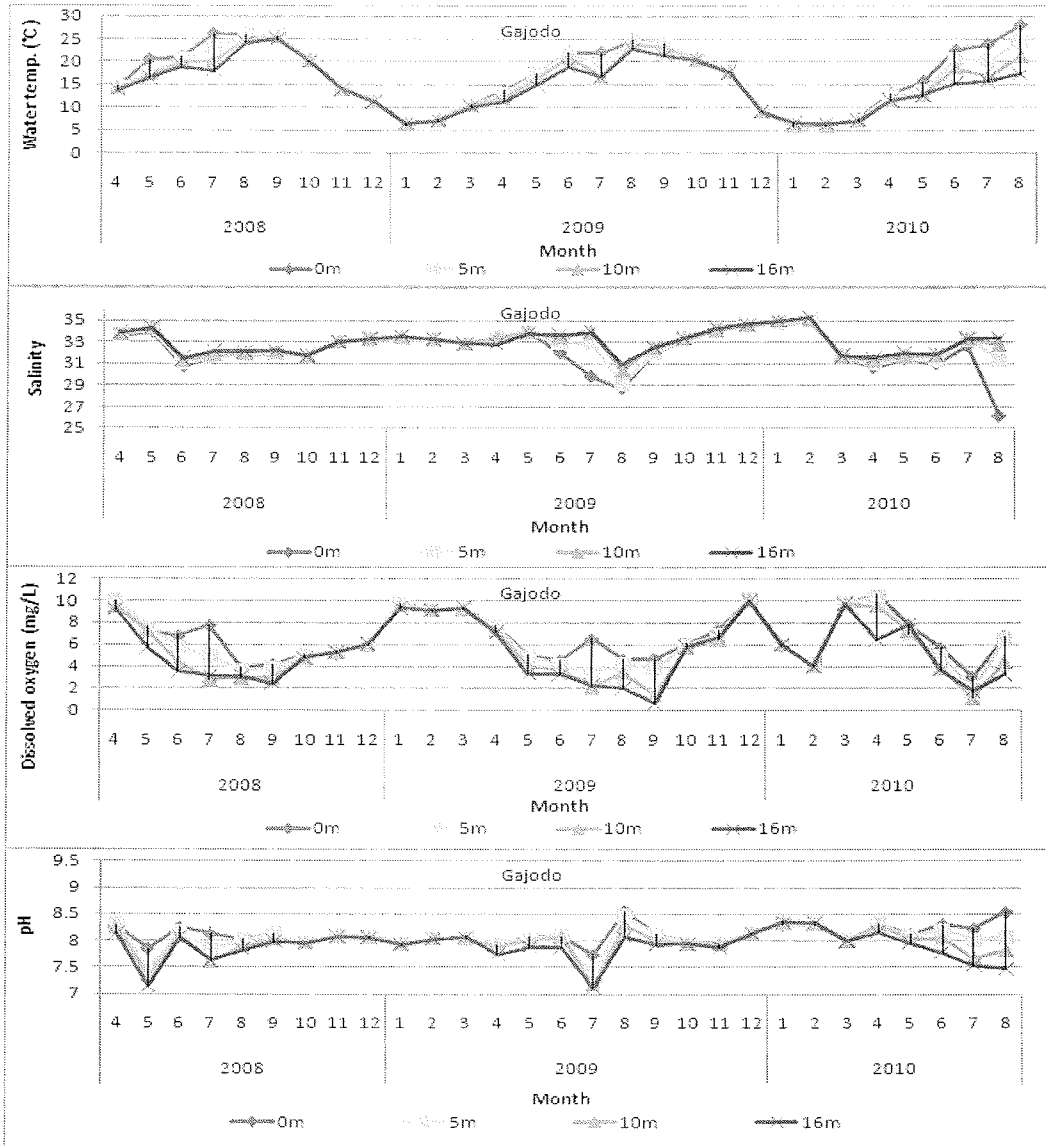


그림 49. 가조도해역의 수심별 월별 수온, 염분, 용존산소, pH변화.

조사기간 중 미더덕은 주로 2~7 m 층에 수하 양성되고 있었음. 조사정점별 수심은 가조도가 최대 16m, 진동만이 최대 10 m의 수심을 보였음. 수층별 온도변화는 가조도의 경우 표층(0 m)은 5.87~27.99°C, 5 m층은 5.73~25.67°C, 10 m 층은 5.96~25.26°C, 저층(16 m)은 6.48~24.97°C의 변화를 보였고, 진동만의 경우는 표층(0 m)은 5.21~26.93°C, 3 m층은 5.04~28.47°C, 5 m 층은 4.85~26.4°C, 저층(7 m)은 4.83~25.99°C의 변화를 보였음. 전 조사수심에 따른 평균 변동 범위는 가조도와 진동만이 각각 19.51 ± 0.80 , 22.61 ± 1.51 로 비교적 수심이 낮은 진동만 해역이 가조도 해역에 비해 비교적 높은 수온 변동을 보였음. 미더덕 성장의 최적수온은 6.8~11.3°C로 10°C 전후에서 가장 빠른 성장을 하고 25.0°C 이상에 장기간 노출 시 폐사를 유발하는 것으로 보고되고 있음(농림부, 1997), 본 조사에서 가조도 저층(24.97°C)을 제외하고는 대부분 조사점점 및 조사수심에 관계없이 하절기 25.0°C 이상을 보여 미더덕의 폐사를 유발할 수 있는 고온 한계수온 이상을 보였음.

전 조사기간 중 염분의 변동폭은 가조도의 경우 38.72~35.30(변동범위; 5.20 ± 0.87), 진

동만의 경우 24.76~34.83(6.59±2.23)으로 가조도에 비해 진동만이 비교적 높은 염분변동을 보였음. 이와 같은 결과는 진동만의 경우 주변에 하천이 잘 발달되어 있어 장마철 강우에 의한 담수유입으로 인한 것으로 판단됨. 일반적으로 미더덕은 저염분에 매우 취약한데, 염분 21.3이하에서는 6일이내에 전량폐사하고, 23.9에서도 6일 동안 노출시켰을 경우 20%의 폐사가 발생하는 것으로 보고되고 있음(농림부, 1997) 본 조사에서 진동만의 경우 6월 표층의 염분이 24.8까지 하강한다는 점은 미더덕의 폐사를 유발할 수 있는 환경요소로 작용할 가능성이 매우 높게 나타나고 있어 상대적으로 가조도 정점에 비해 진동만의 정점에서 많은 폐사가 유발하고 있는 요인으로 작용하고 있는 것으로 추정됨.

전 조사기간 중 월별 용존산소의 변화는 매우 높게 나타났는데, 진동만의 경우는 표층(0 m)은 3.01~10.24 mg/L, 3 m층은 2.224~9.99 mg/L, 5 m 층은 0.96~9.42 mg/L, 저층(m)은 0.32~9.58 mg/L의 변화를 보였고, 가조도 해역은 표층(0 m)은 3.08~10.57 mg/L, 5 m층은 1.98~10.39 mg/L, 10 m 층은 1.19~10.05 mg/L, 저층(16 m)은 0.66~9.97 mg/L로 조사점점에 관계없이 비교적 저수온기인 1월에서 6월까지 3.0 mg/L 이상으로 양식생물을 폐사시킬 수 있는 범위 이상이 없지만, 7월에서 9월까지 표층을 제외하고는 대부분 미더덕이 수하양성 관리되고 있는 수심에서 3.0 mg/L 이하로 빈산소현상을 보여 양식생물을 폐사시킬 수 있는 농도 이하였음. 수소이온농도(pH)는 전 조사기간 동안 진동만 해역은 7.21~8.74, 가조도 해역은 7.11~8.56으로 나타났음.

(나) 성장특성조사

양성기간 중 부착마리수와 생존율을 2008년 4월에서 2009년 2월까지 조사한 결과는 그림 50에서 보는 것과 같음. 전체적으로 양성기간이 경과함에 따라 조사정점에 관계없이 많은 폐사가 발생하여 2009년 2월 조사 시에는 전체 7.12% 이하의 생존율을 보였음. 주로 폐사는 하절기인 7월~9월 높은 폐사율을 보인 후 10월 이 후에는 어느 정도 안정되는 경향을 보였음.

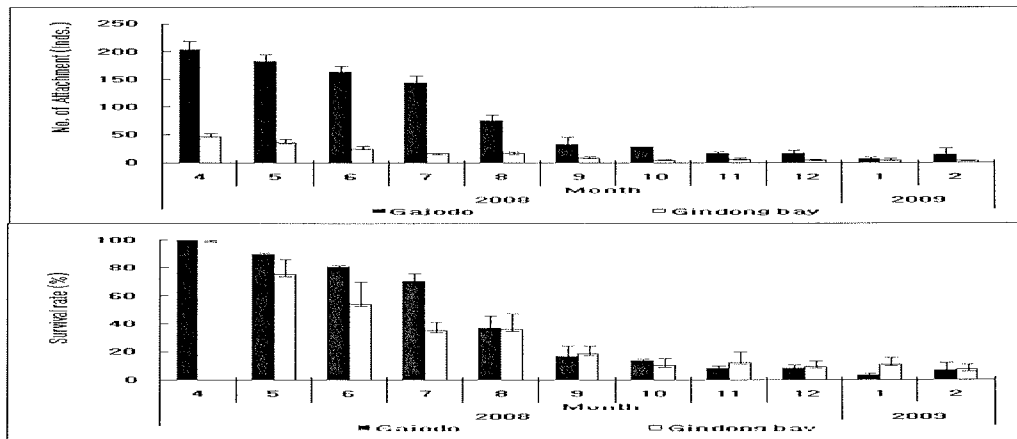


그림 50. 조사정점별 월별 미더덕, *Sytela clava* 부착마리수 및 생존율변화.

전 조사기간 중 조사 정점별 미더덕의 성장특성을 조사한 결과는 그림 51, 그림 52, 그림 53에서 보는 것과 같음.

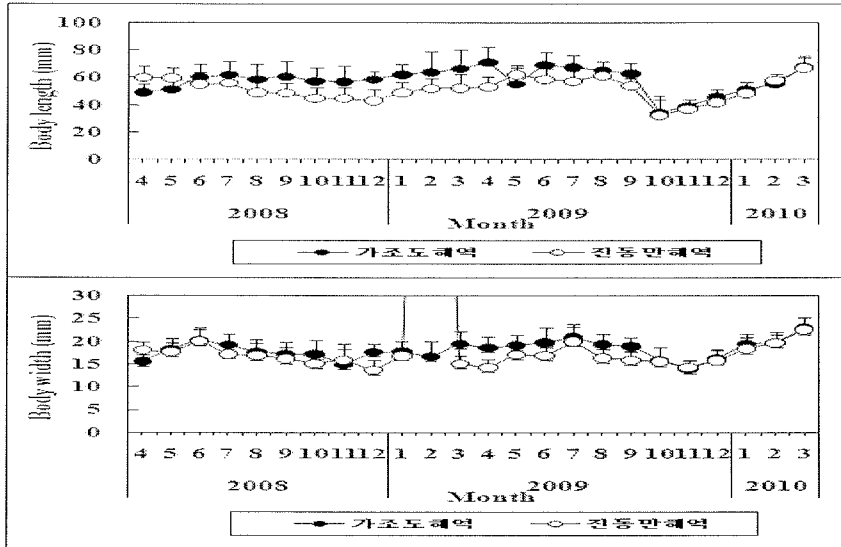


그림 51. 조사정점별 월별 미더덕, *Sytela clava* 체고 및 체폭 변화.

전체적으로 조사어장에 관계없이 1월 이 후 수온이 상승하면서 지속적으로 성장하다가 8월 이 후 10월까지 감소하다가 다시 증가하는 경향을 보였음. 전 조사기간 중 조사정점별 가조도해역과 진동만해역의 체고 및 체폭의 월별 평균 크기변화는 각각 34.4~71.2mm, 32.4~66.7mm로 가조도해역이 진동만 해역에 비해 비교적 크게 나타났고, 월별로는 10월이 작게 나타나고, 3, 4월 대체적으로 큰 개체가 많았음.

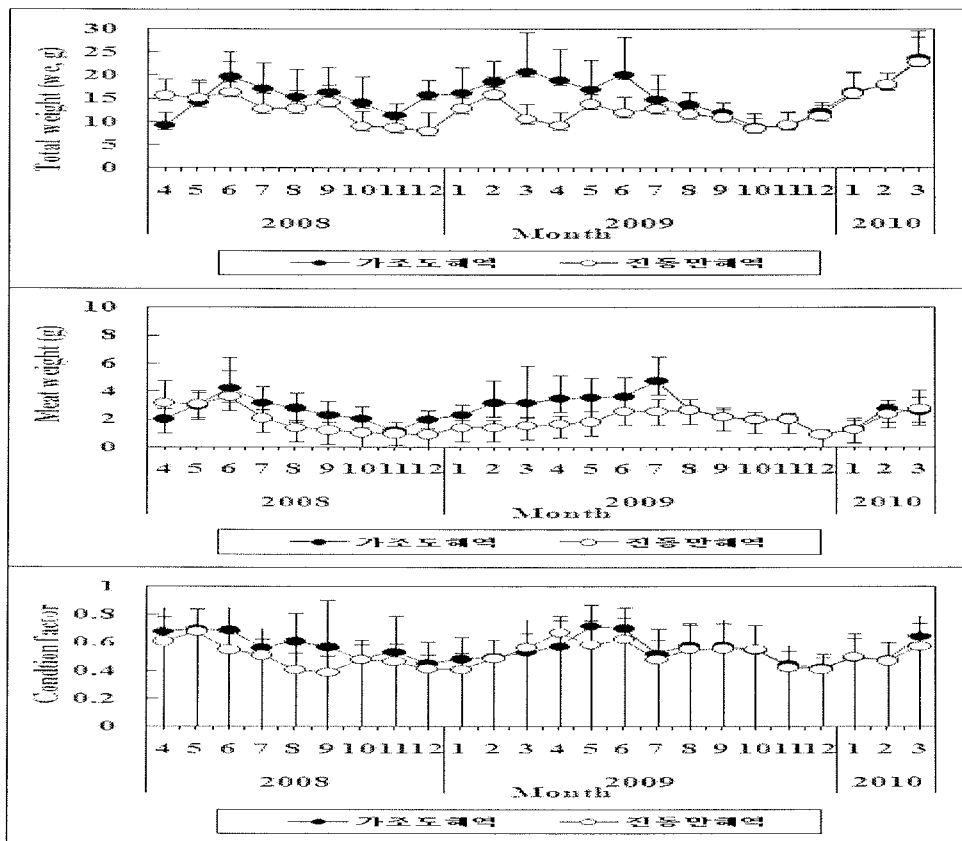


그림 52. 조사정점별 월별 미더덕, *Sytela clava* 전중, 육중 및 비만도변화

이와 같은 결과는 7월 이 후 하절기 동안 만 1년생의 큰 개체 위주로 많은 폐사가 관찰되고, 다시 6월 이 후 새로운 개체가 부착함으로써 크기 변화에 영향을 미치고 있는 것으로 나타났음. 본 조사 결과 미더덕은 주로 6월 이 후 산란하여 채묘된 후 이듬해 4월 경이면 체고 60.0mm 이상으로 성장하여 상품크기로 됨. 이와 같은 결과 진해만내의 대부분 미더덕 양식장에서 주 수확시기가 4월에서 6월로 본 조사결과와 일치하고 있음.

체고 및 체폭의 성장변화에 따라 전중, 육중 및 비만도의 변화도 비슷한 경향으로 변화였는데, 수온상승과 함께 1월 이후 6월까지 지속적으로 증가하다가 6~7월 산란기 이후 생식소가 줄어들면서 11월까지 감소 후 다시 증가하는 년 주기변화를 보였음. 조사 정점별로는 가조도 해역과 진동만 해역의 월별 평균 전중, 육중 및 비만도의 변화는 각각 전중은 8.91~23.69g, 8.03~22.84g, 육중은 0.95~4.76g, 0.91~3.63g이었고, 비만도는 0.418~0.716, 0.386~0.677 범위를 보여 비교적 가조도해역이 높은 무게변화와 좋은 비만상태를 보였음.

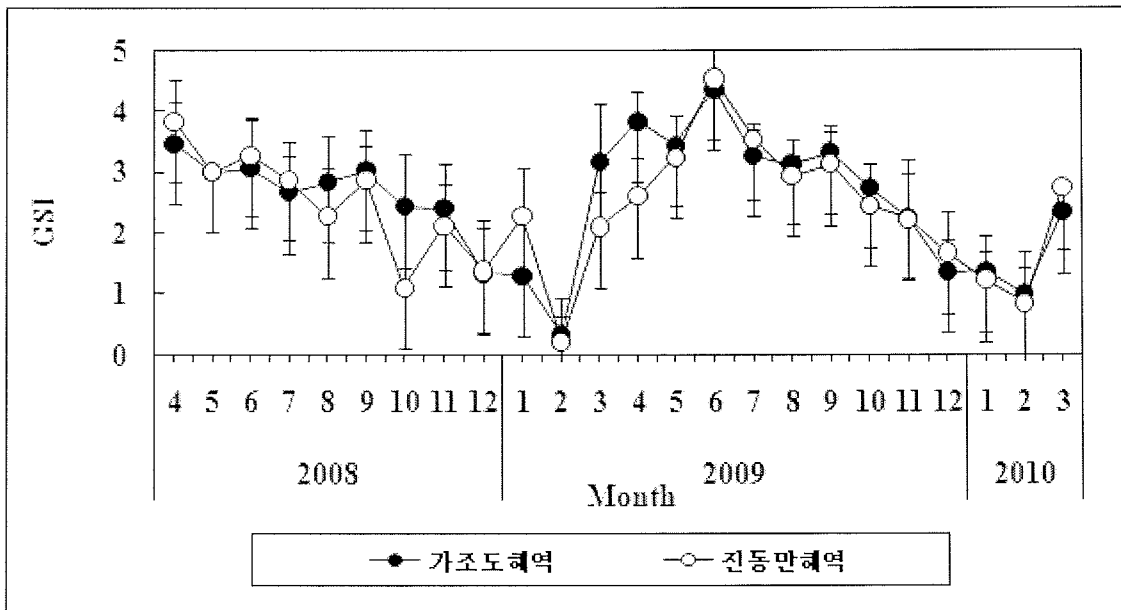


그림 53. 조사정점별 월별 미더덕, *Sytela clava* 생식소 발달지수 변화.

생식소발달지수는 조사기간 중 정점에 관계없이 5월 이 후 성숙단계로 나타났고, 6월 초 최초 산란이 일어나고, 9월까지 지속적으로 산란이 일어나는 것으로 추정되고 있음. Bourque 등(2007)은 캐나다 Herdman (46° 1' 42.168N, 62° 31' 57.901W) 내의 미더덕 산란 및 초기 생활사에 대하여 조사할 결과 미더덕의 성숙지수는 6월부터 발달하기 시작하여 7월에서 10월까지 높은 성숙지수를 보였는데, 가장 높은 성숙지수는 7월15일이었고, 7월 22일부터는 감소하였고, 다시 재성숙하여 8월 20일경 감소하였음. 산란기 동안 생식소의 발달단계가 다양하게 존재하고, 이와 같은 결과는 미더덕은 산란과 재성숙이 성숙산란기동안 계속해서 일어남. 미더덕의 성숙에 영향을 미치는 주요인은 수온으로 수온이 상승하는 6월 이후 난소의 발달이 시작되고, 수온 15°C이상에서 최초 산란이 시작됨. 유생의 부착마리수 변화는 6월 24일 최초 관찰되지 시작하여 8월 19일 0.68

마리/cm² 으로 부착 후 점점 감소하여 9월 2일 0.22마리/cm²까지 감소한 후 다시 증가하여 9월 23일 최대 0.95마리/cm²로 나타났고, 10월 22일 이후에는 부착이 관찰되지 않았다고 하였는데, 본 조사에서 비록 조사 어장 내 유생출현량과 부착마리수 변화는 조사하지 않았지만, 본 조사의 생식소의 발달지수와 국내 진해만내 미더덕 양식순기를 감안하면 비슷한 경향을 보일 것으로 추정됨.

(다) 온도별 사육에 따른 생리변화 조사

일반적으로 수산양식생물에 영향을 미치는 외부환경요인은 수온, 염분, 용존산소 및 먹이 등을 들 수 있으며, 이 가운데 온도는 대사율, 활성도 및 에너지균형 등에 영향을 미치는 직접적인 요인 (Newell and Kofoed, 1977)임. 염분의 변화는 세포 내 수분과 염류 출입간의 일정한 균형상태를 파괴시키며, 염분, 용존산소 등 수질환경이 급격하게 변하면 생물은 이에 따른 도피행동을 하게 되는데 특히 염분 또는 현탁부니와 같은 고형물의 혼입 등에 따른 수질의 변화가 발생하면 대사율의 감소를 줄이기 위하여 즉시 호흡공을 닫고, 대사를 감소시키는 반응을 보임(Lange, 1972), 뿐만 아니라, 수중의 용존산소 저하는 수산생물의 혐기성대사를 유발시켜 활동력을 감소시키는 것으로 보고되고 있음(Pamatmat, 1980). 또한, 생물체의대사지표로서 이용되는 산소소비율은 생리적으로 스트레스를 겪고 있는 생물에서 여러 가지 형태로 변화하는데(Sastry and Vargo, 1977), Almada-Villea (1984)는 염분 변화와 같은 다양한 환경변화로 산소소비율이 증가하거나 감소하는 것으로 보고하였음. 따라서 본 연구는 우리나라 진해만의 미더덕 양식장이 대부분 연안에 치우쳐 있고, 양식장의 수심이 낮은 점을 고려하여 여름철 고수온, 집중강우에 의한 염분강하와 같은 환경변화에 따른 미더덕의 폐사와 관련된 생리적 변화 및 이에 견디는 내성도를 판단하여 미더덕 대량폐사를 방지할 수 있는 적정 양식장관리의 기초자료를 도출하기 위하여 실시하였음.

비교적 고수온인 22℃ 이상에서 수온별로 3일 동안 노출시킨 미더덕의 생존율을 조사한 결과는 그림 54와 같음. 실험기간동안 22℃에 노출된 개체들은 95%이상 생존하였으나 수온 25℃ 이상에서는 생존율이 50%이하로 감소하였으며, 34℃에서는 모두 사망하였음. 노출 3일 동안 50%가 사망하는 수온은 24.91℃(LT₅₀: 20.15-27.67℃)였으며, 이때 각각의 호흡률과 배설률을 조사한 결과는 그림 55에서 보는 것과 같음.

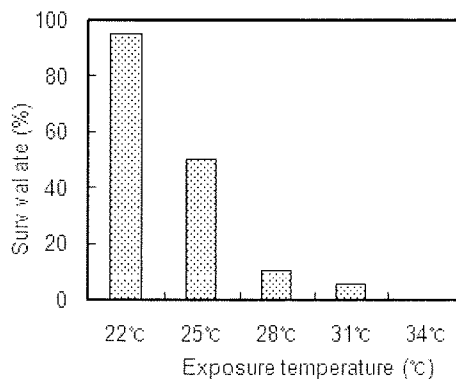


그림 54. 수온증가에 따른 미더덕 *Sytela clava* 생존율

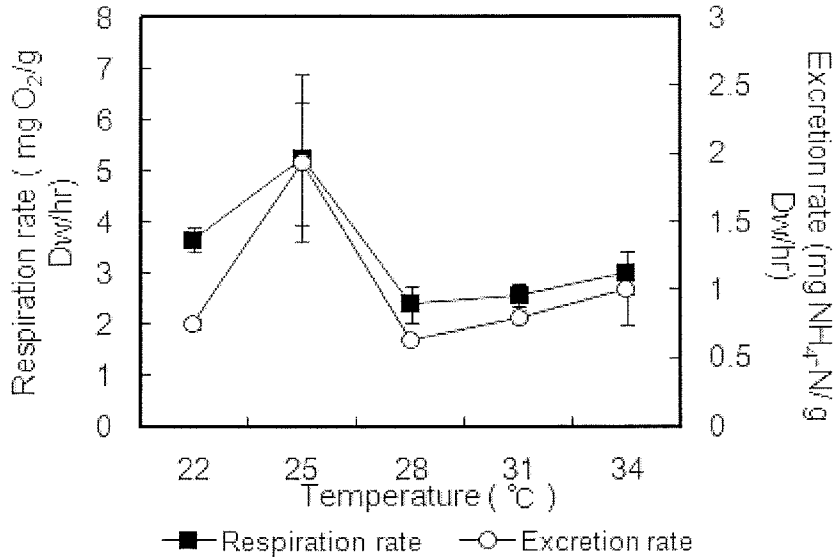


그림 55.수온증가에 따른 미더덕, *Sytela clava* 호흡률 및 배설률 변화

전체적으로 호흡률과 배설률은 25°C에서 가장 높게 나타났으며, 이후 감소하였고, 28°C 이상의 고수온 구간에서의 대사율에는 유의한 차이를 보이지 않았음. 이와 같은 결과로 보아 수온에 따른 LT₅₀은 정확한 분석을 실시하여야 하겠지만, 미더덕은 25°C가 넘어가면 생존에 치명적인 영향을 받는 것으로 추정됨.

한편, 염분별(3.30, 6.60, 13.2, 19.8, 26.4, 33.0 psu) 수온 25°C에서 7일 동안 염분을 감소시키며 미더덕의 생존율 변화를 조사한 결과는 그림 56에서 보는 것과 같음. 생존율은 염분 19.8 psu 이하에서 25%이하로 매우 낮은 생존율을 보였고, 26.4 psu 이상에서는 비교적 60%이상의 높은 생존율을 보였음. 이상의 결과를 이용하여 50%가 사망하는 반수치사 염분농도 (LS50)을 계산한 결과 25.12 (LS₅₀: 22.59-28.15) psu였음. 이와 같은 결과는 Miller (1971)가 미더덕과 비슷한 주름미더덕(*Sytela plicate*)의 경우 염분 20.0 psu이 한계라고 하여 멧게류의 종에 따라 저염분의 한계가 다양하다고 보고한 것처럼 동일한 종이 라도 서식조건에 따라 어느 정도 영향을 받은 것으로 간주되어 짐. 염분감소에 따른 미더덕의 호흡률과 배설률의 반응을 조사한 결과는 그림 57에서 보는 것과 같이 대조구인 자연염분의 경우 호흡률은 6.27±0.19 mgO₂/g dry wt/h를 나타내었으나, 실험염분 노출 3일째에는 대조구에 비해 모든 노출구에서 22.3%-58.3%로 감소하였음. 또한 암모니아질소 배설률은 대조구에서 1.93±0.45 mgNH₄-N/g dry wt/h를 보였으나 염분감소에 따라 현저히 감소하는 경향을 보여 염분의 감소에 의해 대사 저해를 받는 것으로 나타났음.

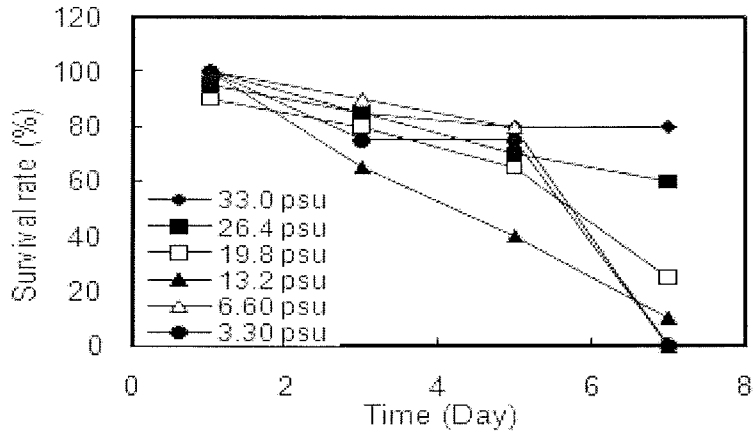


그림 56. 염분감소에 따른 미더덕, *Sytela clava* 생존율

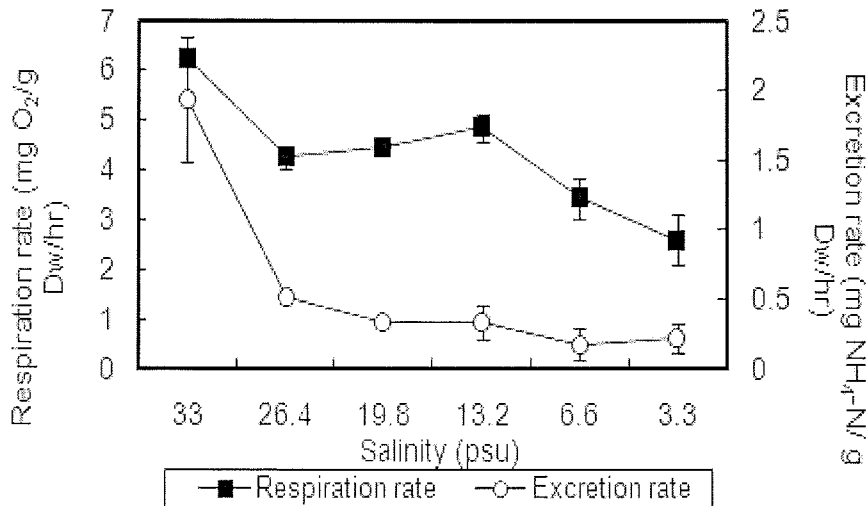


그림 57. 노출 3일째 염분감소에 따른 미더덕, *Sytela clava* 호흡률 및 배설률의 변화

나. 내성종묘 개발을 위한 실내 인공채묘 시험

(1) 재료 및 방법

(가) 채란 및 난 발생시험

채란 및 난 발생시험에 이용된 어미는 진동만에서 양성중이던 만 1년생 어미로 선박을 이용해 현장에서 직접 채취하여 해수가 채워진 500L 원형수조에 수용하여 남동해수산연구소 생물사육실로 운반 후 피낭표피에 붙은 따개비등 이물질을 제거하고, $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 저온 사육하면서 실내 인위배양된 *I. galbana*, *T. tertiolecta*를 혼합하여 공급하면서 유수관리하면서 실험에 이용하였음. 실험은 개체당 포란수, 자극방법별 산란반응율, 온도 및 염분별 올챙이 유생부화율 및 변태율을 조사하였음.

어미개체당 포란수 측정은 임의로 50개체의 어미를 선정하여 생식소를 인위로 적출하여 여과해수가 채워진 1L 비이커에 수하하여 환적법으로 계수하였고, 난경은 micrometer로 광학현미경을 이용하여 측정하였음(N=50). 자극방법별 산란반응율을 조사하기 위하여 사용된 방법은 간출자극, 간출+수온상승자극, 빛자극, 빛+먹이생물자극

법을 이용하였음. 간출자극은 공기중에 30분간 노출시킨 후 어미사육온도와 동일한 온도에 수용하는 방법으로 실시하였고, 간출 및 수온상승자극은 간출자극과 동일한 방법으로 간출시킨 후 어미사육온도와 동일한 수온에 수용 후 매 30분 간격을 1℃씩 상승시켜 최종 20℃를 유지하였고, 빛자극은 시험수조의 수표면 기준 100,000 Lux로 400watt 메탈하이라티트 등을 연속 조사하였음. 빛자극+먹이공급자극은 빛자극과 동시에 먹이생물로 *I. galbana*와 *T. tertiolecta*를 동일 비율로 혼합하여 최초 공급시 300,000 세포/ml기준으로 공급한 후 산란반응을 관찰하였음. 시험에 이용된 어미는 각 시험구당 30마리를 수용적 30L 투명 용기에 수용한 후 300L 원형 FRP 수조에 부상시켜 실시하였음. 온도상승자극을 제외한 나머지 시험은 수온 19±1℃로 해수냉각기와 티타늄 히터를 이용하여 조절하였고 염분은 자연염분으로 실시하였음. 모든 실험은 3반복 실시하였음. 각 시험구별 산란반응을 측정은 최초 방란·방정이 개시된 후 4시간 동안 유지하면서 전체 반응개체수를 계수하여 계산하였음.

온도 및 염분별 올챙이 유생부화율 및 변태율을 조사는 500L 사각 플라스틱 수조에 1,000의 어미를 수용한 후 산란 반응율이 가장 좋았던 빛조사 + 먹이생물 공급 방법으로 채란하여 수정란을 걸름망을 이용하여 수건한 후 여과해수로 세정을 수회 실시한 후 깨끗한 수정란을 여과해수가 채워진 1L 투명원형용기에 3수정란/ml 밀도로 수용한 후 각각 온도별(10, 15, 20, 25℃), 염분별(5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40)으로 시험구를 설정하여 실시하였음. 온도별 염분은 32.4였고, 염분별 온도는 20±1℃였음. 온도조절은 해수냉각기와 티타늄히터를 이용하여 각각의 온도를 유지하였고, 염분은 인공해수염과 증류수를 이용하여 조절하였음. 조사는 각각의 시험구별 올챙이 유생부화율과 올챙이유생 변태율을 각각 시험개시후 12시간과 24시간 후 조사하였음.

(나) 채묘 및 양성시험

채묘시험은 온도 및 염분별 올챙이 유생부화율 및 변태율에 이용된 대량의 확보된 수정란을 이용하였음. 채묘시험은 기질별로 미더덕채묘망(PP그물망), PP로프(51합사 3mm), 팜사, 굴조가비를 채묘기질로 각각 20cm² 크기로 채묘기를 제작하여 50L 사각 플라스틱 수조에 5장씩(굴조가비 20개)를 수용하였음. 올챙이 유생 수용밀도는 10마리/ml로 하였고, 채묘시 수온 및 염분은 각각 20±1℃, 32.4였음. 채묘율 조사는 각각 1cm²에 부착된 마리수를 10반복 계수하여 전체 채묘율로 환산하여 계산하였음. 양성시험은 미더덕채묘망(길이 5m x 4m) 한쪽을 2010년 6월 21일 실내 채묘 후 7일간 실내에서 관리한 후 선박을 이용하여 가조도 앞 남동해수산연구소 시험어장내에 2010년 6월 28일 이설하여 수하식으로 관리하면서 성장 및 생존을 매월 1회 조사하였음.

(2) 결과 및 분석

(가) 채란 및 난 발생시험

인공종묘생산 시 채란 가능한 포란량을 조사 한 결과는 그림 58과 같음. 평균 체장 63.7±9.8mm의 1 개체당 포란량은 340,758±173,021개로 전중 1g당 10,633개 었음. 체장에 따른 포란량은 체장이 커짐에 따라 증가하는 경향을 보였지만, 유의적인 상관관계는 보이지 않았음.

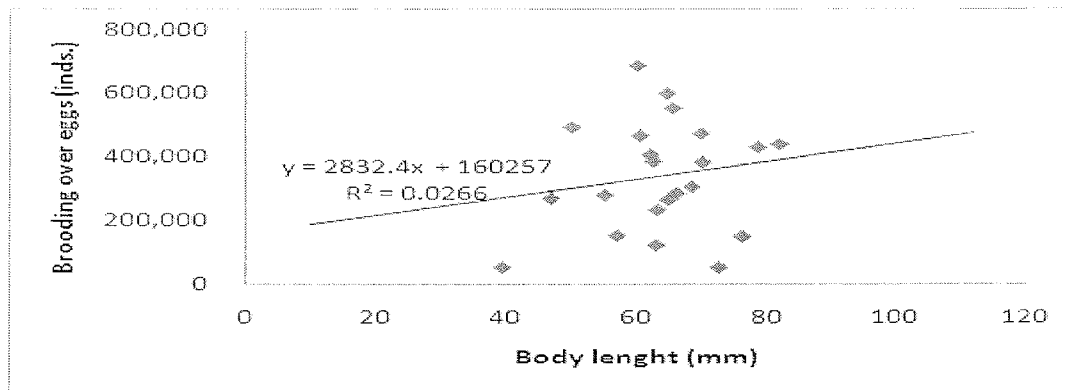


그림 58. 미더덕, *Sytela clava* 체장에 따른 포란량 변화

수온 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 염분 32.4 psu에서 수정 후 시간경과에 따른 난 발생시간을 조사한 결과는 그림59와 표 8에 나타낸 것과 같음. 완전히 성숙된 난은 난핵포의 형태가 완전히 갖추어져 난세포질과 뚜렷이 구별이 되어짐. 미더덕은 자웅동체로 난과 정자가 동시에 출구공을 통해 수중에 방출되고, 수중에서 수분내에 수정되어 제1극체가 방출됨. 평균 수정난의 크기는 $185.1 \pm 7.58 \mu\text{m}$ 임. 방출 후 1시간 20분이 경과 되면 난할을 개시하여 2세포기가 되고, 수정 후 약 8시간이 경과하면 난내에서 올챙이 형태로 완전히 발달하게 되고, 약 12시간이 경과하면 올챙이 유생으로 부화되어 약 18시간 이 후 변태가 개시되어 부착이 일어난다.

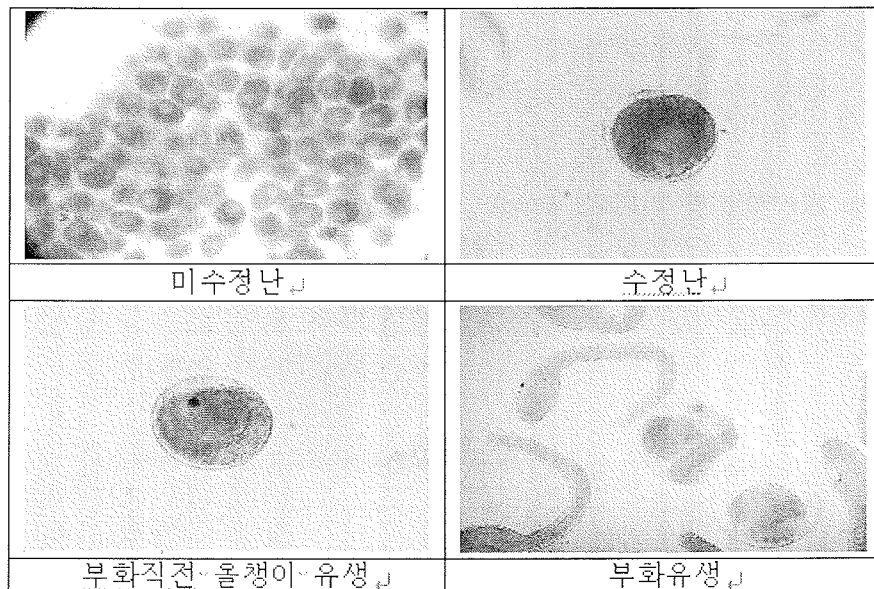


그림 59. 미더덕 난 발생과정

표 8. 미더덕, *Sytela clava* 난발생 시간

발달단계	시간(hours) (Mean ±S.D.)	수온(°C)	염분
2세포기	1.2 ± 0.6	20.0±1	32.4
포배기	3.5 ± 0.5		
꼬리형성 개시	6.0 ± 1.0		
꼬리 형성 완료	8.0 ± 0.7		
올챙이 유생부화	12.0 ± 1.5		
변태 및 부착	18.0 ± 1.4		

염분별, 온도별 난 발생을 및 변태율을 조사한 결과는 그림 60과 그림 61에서 보는 것과 같음. 수정란에서 올챙이 유생으로의 부화율은 염분 10.0 psu이하에서는 발생이 되지 않았고, 15.0 psu에서는 5.72±0.35로 매우 낮은 발생율을 보인 반면 25.0~35.0 psu에서는 평균 85.7%이상 높은 발생율을 보였지만, 그 이상에서는 감소되는 현상을 보였음.

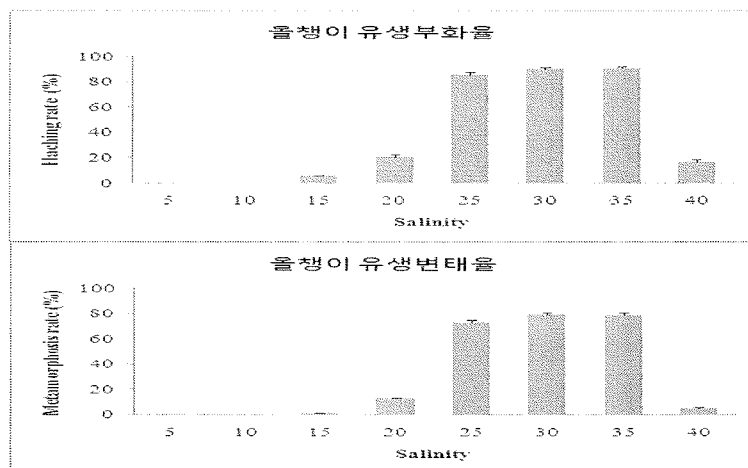


그림 60. 염분별 미더덕, *Sytela clava* 올챙이 유생부화율 및 변태율

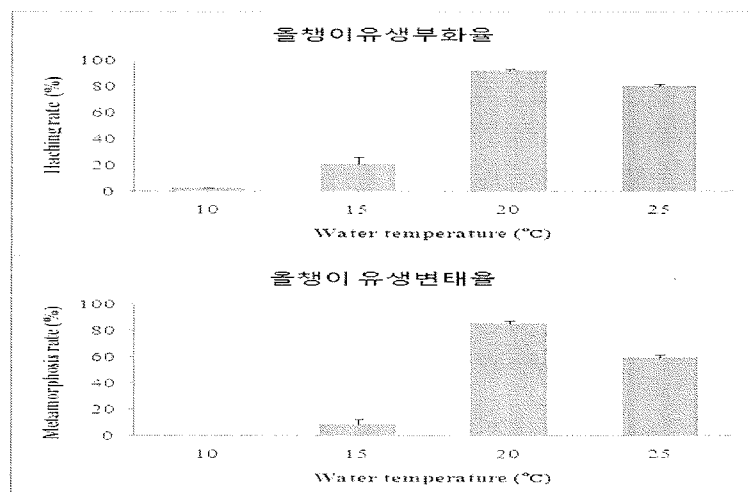


그림 61. 수온별 미더덕, *Sytela clava* 올챙이 유생부화율 및 변태율

울챙이 유생의 변태율도 비슷한 경향을 보였는데, 30.0 psu에서 79.5±1.19%로 가장 높은 변태율을 보인 반면, 15.0 psu 이하와 40.0 psu에서는 5.0%이하의 매우 낮은 변태율을 보였음. 온도에 따른 난 발생율은 15.0℃ 이하에서는 21.1±5.09%로 낮은 발생율을 보였고, 20.0℃ 이상에서는 80.2% 매우 높은 발생율을 보였음. 한편, 울챙이 유생변태율도 수정란의 울챙이 유생부화율과 비슷한 경향으로 10.0℃에서는 변태에 성공한 개체가 관찰되지 않았고, 15.0℃에서는 8.6%, 20.0℃에서는 85.6로 가장 높은 변태성공율을 보였고, 25.0℃에서는 60.0%로 20.0℃에 비해 다소 감소하는 경향을 보였음. 인공종묘 생산시 최적 채란방법을 구명하기 위하여 다양한 자극방법에 의한 채란시험을 실시한 결과는 그림 62에서 보는 것과 같음.

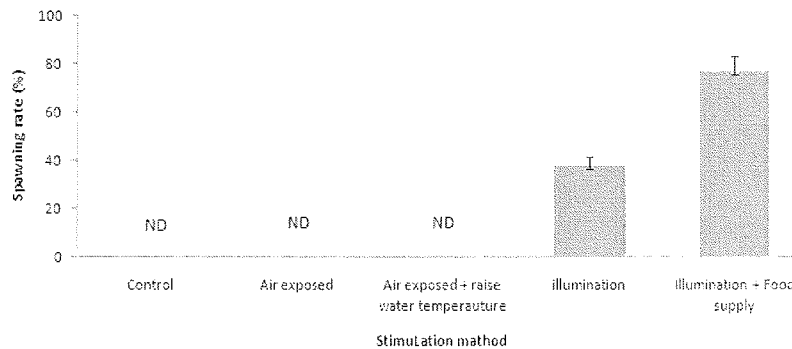


그림 62. 산란자극방법별 미더덕, *Sytela clava* 산란반응율

조사방법 중 가장효과적인 효과적 산란자극방법은 빛 조사 + 먹이생물 공급 시험구가 76.7%의 높은 산란자극 반응을 보였고, 다음으로는 빛 조사 자극이 37.8%로 나타났고, 간출, 간출+온도상승 및 자연상태의 대조구는 전혀 산란 반응을 보이지 않았음. 지금까지 조사된 미더덕의 산란 및 부착생리에 관한 연구를 보면 일반적으로 고착성인 미더덕류는 채외수정을 하면 보통 24시간 이내에 부유유생기간을 마치고 고착물등에 부착하게 된다(Svane, 1984)고 보고하고 있는데, 본 시험에서도 수온 22.0℃에서 약 18시간 이내에 변태하여 부착이 일어나는 것으로 나타났고, 산란반응도 주로 빛조사에 많은 영향을 받았는데, Bourque 등(2007)이 미더덕을 대상으로 실내 채란시험에서 빛을 조절하여 일정시간 동안 암기에 노출되지 않은 개체는 산란이 일어나지 않았고, 9시간에서 12시간 암처리 후 빛을 조사한 경우 가장 높은 산란반응이 일어난 결과와 비슷한 경향을 보였음. 이러한 이유로 많은 연구자들은 미더덕류는 주로 산란자극은 빛자극에 의해서 일어나는 것으로 보고하고 있음(Lambert et al., 1981; Svane and Young, 1989). 한편 낮 기간 동안의 산란시간은 미더덕류의 종과 지리적 여건에 따라 달라지는데, 주름미더덕, *Styela plicata* (lesueur)의 경우 일본에서는 주로 일몰 직전에 산란하고 (Yamaguchi, 1975), 미국 캘리포니아에서는 오후나절에 산란이 일어나는 것으로 보고되고 있음(West and Lambert, 1976)

한편, 실내 채묘시 적정 채묘기질을 선택하기 위하여 다양한 채묘기질을 이용하여 채

묘시험을 실시한 결과는 그림 63에서 보는 것과 같음. 채묘기질에 상관없이 대부분의 기질에서 64.0%이상의 높은 채묘율을 보였음. 시험기질 중 일반적으로 양식현장에서 미더덕 채묘 및 양성에 많이 이용되는 pp 그물망이 88.9%로 가장 높은 채묘율을 보였음. 그러나 일반적으로 멩게 인공종묘생산 시 채묘기질로 이용하는 팜사의 경우는 64.0%로 다른 채묘기질에 비해 비교적 낮은 채묘율을 보였음.

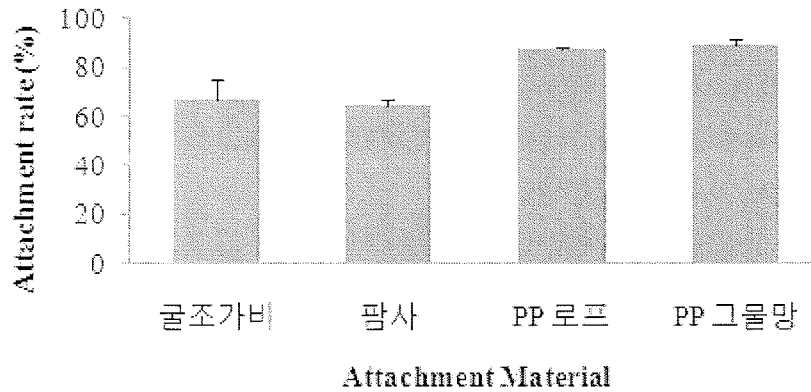


그림 63. 채묘기질별 미더덕, *Sytela clava* 채묘율

2010년 6월 21일 실내에서 대량채묘한 미더덕 인공종묘를 경남 거제시 가조도 해역에 위치한 남동해수산연구소 시험어장내에서 2010년 6월에서 8월까지 자연채묘된 종묘와 비교 양성시험을 실시한 결과는 그림 64에서 보는 것과 같음.

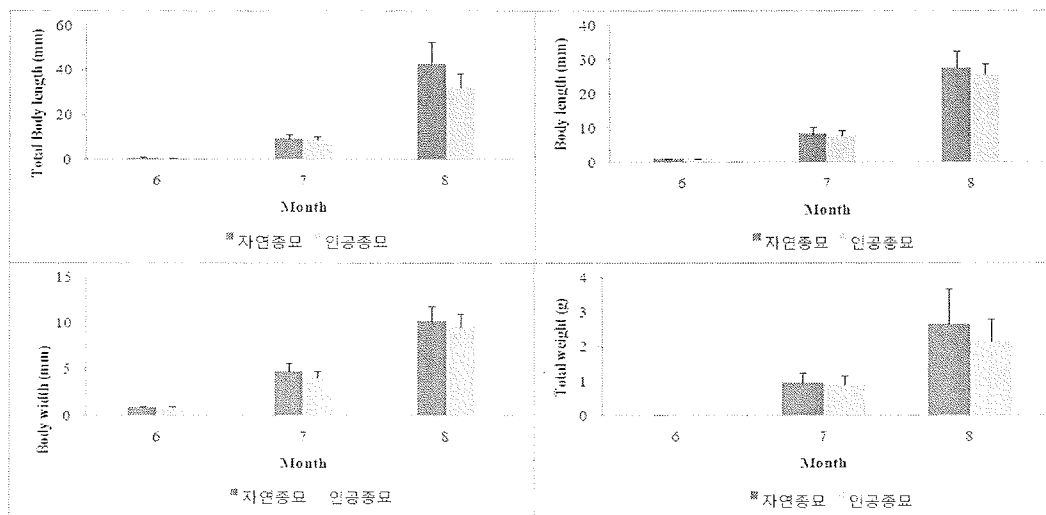


그림 64. 미더덕, *Sytela clava* 종묘생산 방법별 월별 전장, 체장, 체폭 및 전중의 변화

전체적으로 양성기간이 경과함에 따라 빠른 성장변화를 보였지만, 자연종묘에 비해서는 비교적 낮은 성장요소 변화를 보였음. 이와 같은 결과는 채묘시기에 따른 차이로 보여 지는데, 인공종묘에 비해 자연종묘가 약 15일 이상 빠른 시기에 채묘를 한 결과 양성기간에 따른 차이로 보여짐. 그러나 생존율은 매우 낮았는데, 낮은 생존율은 양성과정에서 대량

의 유령명게가 부착하여 서식경쟁을 유발하여 일시에 대량 폐사하였음. 따라서 향후 성공적인 인공종묘생산을 기대하기 위해서는 가능한 유령명게의 부착시기를 벗어나 양성을 시작할 수 있도록 조절하는 것이 매우 중요한 관건으로 사료됨.

다. 물렁증 내성종묘 현장적용 및 양성시험

(1) 재료 및 방법

미더덕 개체의 부착부위를 일부 채취하여 genotyping을 실시함으로써 표 5의 genotyping 결과를 얻었음. 이 자료를 바탕으로 serine protease 유전자에 대한 물렁증 저항성 개체(AA x AA)와 물렁증 민감성 개체 (GG x GG)를 집단 교배하고자 하였음 (표 7). 또한 표 6의 genotyping 결과를 바탕으로 GPx 유전자에 대한 물렁증 저항성 개체(TT x TT)와 물렁증 민감성 개체(CC x CC)를 집단 교배하고자 하였음 (표 7). 물렁증 저항성 개체와 민감성 개체로 선별된 각각의 미더덕 개체를 수용적 30L 투명 용기에 수용한 후 300L 원형 FRP 수조에 부상시켜 실시하였음. 산란 반응율이 가장 좋았던 빛조사 (100,000 Lux) + 먹이생물 공급 방법으로 채란한 다음 수정난을 걸름망을 이용하여 수건하였음. 여과해수로 세정을 수회 실시한 후 깨끗한 수정난을 여과해수가 채워진 1L 투명원형용기에 넣어 부화시켰으며, 양식현장에서 미더덕 채묘 및 양성에 많이 이용되는 pp 그물망을 이용하여 채묘하였음.

(2) 결과 및 분석

연구기간동안 미더덕의 물렁증에 대한 내성을 지닌 개체를 선별할 수 있는 기술을 확보 및 인위적으로 교배시키는 기술력을 확보하였음. 이러한 성과의 결과물로서 내성종묘에 대한 현장적용을 실시하는 과정에 있음. 내년이나 내후년에 내성종묘의 물렁증에 대한 저항성 여부를 확인할 수 있을 것으로 사료됨. 현장적용 결과 내성종묘 개체가 내성을 지니는 것이 확인된다면, 그 개체를 어미 개체로 하여 각 양식장에 분양하거나 인위적으로 수정하여 얻은 수정난을 각 양식장에 보급할 예정임.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 목표달성도

1. 1차년도

당해연도 연구목표	목표대비 결과	목표달성도 (%)	비고
정상 개체와 물렁증 개체의 발현 유전자 비교 물렁증 유발 유전자 탐색	미더덕의 물렁증 발병의 시기가 5월이기 때문에 5월부터 실험을 진행하였음. 현재 진행중에 있으며 9월중으로 실험 완료 될것으로 사료됨	70%	실험 완료
RT-PCR, Real-Time PCR로 각 시험구를 비교하여 물렁증 관련 후보 유전자의 선별	선행연구가 진행중에 있으므로 아직 진행하지 못하였음. 물렁증 발병의 시기의 문제로 인하여 진행하지 못하였으므로, 이 실험을 대신하여 2차년도 실험인 미더덕 EST 분석으로 대체하였음	100%	대체 실험에 대한 목표달성도임
양식장 환경특성 조사	당초에는 없었던 실험이었으나 실험진행과정에 있어서 필요한 실험이라 사료되어 추가하게 되었음. 그 결과 미더덕의 연중 생리 활성 변화를 관찰할 수 있었음		추가된 실험임
온도별 사육에 따른 생리변화 조사	온도에 따른 생존율 및 혈구 활성조사를 통해서 미더덕의 양식환경에 있어서 적절한 온도 범위를 확립하였음	100%	
사육수의 금속이온농도에 따른 생리 및 효소변화 조사	선행되어야 할 과제를 추가함으로써 본 실험의 진행이 늦추어졌음	70%	

2. 2차년도

당해연도 연구목표	목표대비 결과	목표달성도 (%)	비고
RT-PCR, Real-Time PCR로 각 시험구를 비교하여 물렁증 관련 후보유전자의 선별	DEG 분석법을 통해 동정된 유전자를 RT-PCR과 Real-Time PCR을 통해서 그 결과를 검증하였으며, 그 결과 동일한 결과를 확인함으로써 목표를 달성하였음.	100%	
물렁증 유발후보 유전자의 promoter 확보 및 발현분석 시스템 구축	동정된 유전자의 프로모터 서열 확보 및 단일염기 다형성 부위를 조사하였음. 또한 해당유전자의 프로모터를 벡터에 삽입함으로써 발현분석 시스템을 구축함으로써 목표를 달성하였음.	100%	
실험실내 환경 조건 변화 (염분 및 금속이온농도)에 따른 물렁증 후보유전자의 발현 변화 조사	동정된 유전자의 프로모터 벡터를 이용하여 염분변화 및 금속이온 농도뿐만 아니라 다양한 환경조건 변화에 대한 물렁증 후보 유전자의 발현 변화를 조사함으로써 목표를 초과하였음.	120%	
Morpholino를 이용한 knock down system으로 물렁증 유발 유전자 기능 확인			실험과정상 연구목표에서 제외하였음.
양식장 환경특성 조사	미더덕 대량폐사 관련 어장환경특성을 파악하고, 양식생물의 성장과 생존을 확인함으로써 목표를 달성하였음.	100%	
사육수의 금속이온농도에 따른 생리 및 효소변화 조사	금속이온이 미더덕 폐사와의 상관성을 구명하고자 하였으나, 명확한 상관관계를 도출하지 못했음.	70%	
염분별 사육에 따른 생리변화 조사	염분변화 특히 연안 강우에 따른 염분강하시 미더덕 대량폐사와 상관관계를 조사하고자 한 계획대비 수행하였음.	100%	
내성종묘 개발을 위한 실내 인공채묘 시험	미더덕 인공종묘생산 기법을 확립하고자 어미관리, 채란, 발생 및 채묘기법을 수립하고자 하였으나, 온도저항성이 매우 낮아 계획된 종묘생산 기법을 완전히 확보하지 못했음.	70%	계속 수행중

3. 3차년도

당해연도 연구목표	목표대비 결과	목표달성도 (%)	비고
Genotype에 따른 물렁증 유발 후보 유전자의 발현량 조사	여러 개체에서 동정된 유전자에 대한 genotyping을 실시한 후 RT-PCR을 통해서 유전자 발현을 조사함으로써 목표를 달성하였음.	100%	
전사인자를 이용한 물렁증 유발 후보 유전자의 발현 분석	동정된 유전자의 발현에 관여하는 전사인자들이 해당 유전자의 단일염기 다형성에 따라 그 발현량이 영향을 받는지 reporter assay를 실시하여 조사함으로써 목표를 달성하였음.	100%	
물렁증 유발 유전자 정보를 이용한 내성 미더덕 선발 육종	Genotype에 따른 물렁증에 대한 내성이 있는 개체와 내성이 없는 개체를 선별하였으므로 목표를 달성하였음.	100%	
Morpholino를 이용한 knock down system으로 물렁증 유발 유전자 기능 확인	미더덕 수정란에 serine protease와 GPx에 대한 morpholino를 삽입한 다음 부화시킨 뒤 양성하고 있음. 일정 기간이 지난 후에 해당유전자의 발현감소 및 물렁증과의 관련성을 연구할 것임.	70%	
양식장 환경특성 조사	양식장 환경실태 조사 및 성장특성조사, 온도별 사육에 따른 생리변화 조사를 실시함으로써 목표를 달성하였음.	100%	
내성종묘 개발을 위한 실내 인공채묘 시험	가장 효과적인 산란자극방법은 빛 조사 + 먹이생물 공급 시험구가 76.7%의 높은 산란자극 반응을 보였고, 채묘기질에 상관없이 대부분의 기질에서 64.0% 이상의 높은 채묘율을 보임을 확인함으로써 목표를 달성하였음.	100%	
물렁증 내성종묘 현장적용 및 양성시험	물렁증에 대한 저항성을 지닌 개체와 민감한 개체를 인위적으로 교배하여 얻은 다음 부화시킴으로써 현장적용 및 양성 시험중에 있음.	100%	

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

양식생물은 한정된 공간 안에서 밀집되어 육종되기 때문에 외부환경의 변화에 민감함. 그러므로 양식종의 대량폐사 원인을 규명하기 위해 가장 먼저 해야 되는 부분은 양식 환경의 조사라고 사료됨. 그러나 많은 양식종의 폐사와 관련하여 환경조사가 이루어져 원인은 밝혀냈으나 폐사를 막을 방법을 찾기가 어려운 실정임. 이에 본 관제에서는 미더덕의 대량폐사와 관련하여 미더덕 양식 환경 조사와 더불어 폐사와 관련된 근본적인 원인을 분자유전학적으로 밝혀내고자 노력하였음.

정상적인 개체와 물렁증에 걸린 개체에서 발현의 차이가 나타나는 유전자를 differential expressed genes (DEGs)를 통하여 밝혀냈으며, 동정된 유전자의 발현이 환경변화에 따라 발현의 차이가 나타나는 이유를 프로모터 단일염기 다형성 부위의 동정과 통계적인 조사 및 분자유전학적 실험기술을 이용하여 밝혀냈음. 그 결과 물렁증에 저항성을 지닌 개체를 선별하여 교배할 수 있었으며, 선별된 차세대 개체들이 양식 환경에서 저항성을 지니는지 실험을 할 수 있게 되었음.

미더덕 폐사의 원인과 해결책을 찾기 위해 접근한 일련의 방법들은 다른 다양한 양식종의 폐사원인을 밝혀내고 해결책을 찾기 위한 새로운 장을 열었다고 사료됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 산업지원 성과

산업지원 성과 (단위 : 건)			
기술지도	기술이전	기술평가	합계
20건			20

2. 논문 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2008	Identification of softness syndrome-associated candidate genes and DNA sequence variation in the sea squirt, <i>Halocynthia roretzi</i> .	조현국	정재훈		Marine Biotechnology (NY).	10(4) 447-456	국외	SCI
2010	Development of single nucleotide polymorphism markers for identification of mortality-resistant sea squirt in a selective breeding program.	조현국	정재훈		aquaculture revision		국외	SCI

제 2 절 성과 활용 계획

1. 미더덕 대량폐사 원인인자 규명을 위한 분자유전학적 분석

가. 양식 미더덕 대량폐사 원인 구명으로 미더덕 양식장 관리를 위한 합리적인 대책 수립을 위한 정보 제공

나. 미더덕 대량폐사 원인구명을 통한 안정적인 생산성 유지

다. 미더덕뿐만 아니라 양식 생물의 대량폐사의 원인을 규명할 수 있는 기반 기술을 제시
라. 건강종묘생산 기술개발로 양식 환경변화 적응 및 저항성 증대로 생산성 증대
마. 대체양식품종개발로 미더덕양식 품종다양화 도모 및 어업인 소득증대에 기여

2. 미더덕 대량폐사 극복을 위한 양식 환경 생물학적 연구

가. 미더덕 양식시설 개선의 기초자료 제공

나. 미더덕 양식어장 관리기법 제시를 위한 정책자료 제공

다. 미더덕 적정 양식 생산량의 기초자료 제공

라. 미더덕 양식어장의 수질 및 먹이환경요인의 정확한 계절변동 파악에 따른 적정 양식밀도
제시

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 폐사와 관련된 정보

멍게는 미더덕과 해초강 측성해초목에 속하며 우리나라에서 양식을 하고 있는 생물종임. 멍게 역시 대량폐사로 인해 매년 수백억원의 경제적 손실을 입고 있는 실정임. 이에 멍게의 대량폐사 원인을 밝히고자 연구를 수행해왔으나, 분자생물학적인 접근으로의 연구는 최근에 들어서 수행되고 있음. 그러한 연구들 중에서 본 실험실에서 발표한 단백질분해효소와 멍게의 물렁증 발병과의 상관관계를 규명한 논문(Cho et al., 2008) 외에도 최근 일본에서 멍게의 물렁증 발병과 관련하여 여러 편의 논문이 발표되었음. 대표적인 것으로 물렁증 발병에 대한 외형적인 관찰(Hirose et al., 2009) 및 flagellate-like cells과의 상관관계(Kumagai et al., 2010), 그리고 바이러스 감염과 멍게의 물렁증 발병과의 관련성(Kitamura et al., 2010)에 대한 연구가 있음을 확인할 수 있었음. 이러한 연구 결과들은 같은 목에 속하는 미더덕의 대량폐사 연구에 대한 분자생물적 접근을 더욱 용이하게 해줄 수 있을 것으로 사료됨.

제 2 절 미더덕과 관련된 정보

미더덕과 관련하여 미더덕 추출물의 항산화 및 항암 작용, 그리고 항미생물성 펩타이드에 대한 연구는 계속 진행되고 있는 실정임. 이러한 연구 외에도 미더덕으로부터 추출된 Chondroitin sulfate이라는 물질이 Akt/NF-kappaB 신호전달을 억제함으로써 염증반응과 관련된 인자인 VCAM-1 and iNOS의 발현을 억제함이 보고되었음(Xu et al., 2008). 또한 미더덕으로부터 분리된 헤파린을 혈액응고 및 혈전형성 저해에 적용할 수 있음이 보고되었음(Santos et al., 2007). 마지막으로 미더덕 섭취로 인해 우리나라 간암발병에 대한 고위험인자인 B형간염바이러스에 대한 항바이러스 효과가 있음이 보고된바 있음(Wang et al., 2006). 이러한 미더덕에 대한 지속적인 연구는 미더덕이 영양공급원으로써 뿐만 아니라 질병치료 및 다양한 분야에 활용될 수 있음을 시사하는 것임. 그러므로 미더덕에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 사료됨.

제 7 장 참고문헌

- Ahn SH. Extraction of glycosaminoglycans from styela clava tunic. *Biotechnol Bioproc Eng.* 18:180-185 (2003).
- Almada-villela PC. The effects of reduced salinity on the growth of small *Mytilus edulis*. *J Mar Biol Ass U.K.* 64:171-182 (1984)
- Bingham BL. Light cycles and gametogenesis in three temperate ascidian species. *Invertebr Biol.* 116:61-70 (1997)
- Bourque D, Davidson J, MacNair NG, Arsenault G, LeBlanc AR, Landry T, Miron G. Reproduction and early life history of an invasive ascidian *Styela clava* Herdman in Prince Edward Island, Canada. *J Exp Mar Biology and Ecology* 342:78-84 (2007)
- Burighel P, Cloney RA. Urochordata: Ascidiacea. In: F. W., Harrison and E. E., Ruppert (Eds): *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 15: 221-347 pp. (1997)
- Cho HK, Nam BH, Kong HJ, Han HS, Hur YB, Choi TJ, Choi YH, Kim WJ, Cheong J. Identification of softness syndrome-associated candidate genes and DNA sequence variation in the sea squirt, *Halocynthia roretzi*. *Mar Biotechnol (NY)*. 10:447-456 (2008)
- Goodbody I. The physiology of ascidians. *Advances in Marine Biology*. 12:1-149 (1974)
- Hirose E, Ohtake SI, Azumi K. Morphological characterization of the tunic in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), with remarks on 'soft tunic syndrome' in aquaculture. *J Fish Dis.* 32:433-445 (2009)
- Jeffery WR, Capco DG. Differential accumulation and localization of maternal poly(A)-containing RNA during early development of the ascidian, *Styela*. *Dev Biol.* 67:152-166 (1978)
- Jeffery WR, Tomlinson CR, Brodeur RD. Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Dev Biol.* 99:408-417 (1983)
- Jeffery WR. Role of PCNA and ependymal cells in ascidian neural development. *Gene.* 287:97-105 (2002)
- Jo YG. The sterol composition of *styela clava*. *Kor Fish Soc.* 11:94-101 (1978)

- Jung ES, Park E, Park HR, Lee SC. Antioxidant Activities of Extracts from Parts of *Styela clava*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 37:1674-1678 (2008)
- Kim JJ, Kim SJ, Park SH, Park HR, Lee SC. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 34:937-941 (2005)
- Kitamura SI, Ohtake SI, Song JY, Jung SJ, Oh MJ, Choi BD, Azumi K, Hirose E. Tunic morphology and viral surveillance in diseased Korean ascidians: Soft tunic syndrome in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), in aquaculture. *J Fish Dis.* 33(2):153-160 (2010)
- Kumagai A, Suto A, Ito H, Tanabe T, Takahashi K, Kamaishi T, Miwa S. Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. *Dis Aquat Organ.* 90:223-234 (2010)
- Lambert G, Lambert CC, Abbott DP. *Corella* species in the American Pacific Northwest: distinction of *C. inflata* Huntsman, 1912 from *C. willmeriana* Herdman, 1898 (Asciacea, Phlebobranchia). *Can J Zool.* 59:1493 - 1504 (1981)
- Lange R. Some recent work on osmotic, ionic and volume regulation in marine animals. *Occanogr. Mar Biol Ecol Annu Rev.* 10:97-136 (1972)
- Lee EH. Free amino acid content in the extract of mideuduck, *styela clava*. *Bull Korean Fish Soc.* 8:177-180 (1975)
- Lee EH. Lipid componets of sea squirt, *Halocynthia roretzi* and Mideduck, *styela clava*. *Korean. J Food Sci Tec.* 17:289-294 (1985)
- Lee IH, Zhao C, Cho Y, Harwig SS, Cooper EL, Lehrer RI. Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett.* 400:158-162 (1997)
- Lee IH, Zhao C, Nguyen T, Menzel L, Waring AJ, Sherman MA, Lehrer RI. Clavaspirin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *J Pept Res.* 58:445-456 (2001)
- Lee KH. Seasonal variations of nutrients in warty sea squirt, *Styela clava*. *Food Sci. Nutr.,* 24:268-273 (1995)
- Lehrer RI, Lee IH, Menzel L, Waring A, Zhao C. Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of *Styela clava*. *Adv Exp Med Biol.* 484:71-76

(2001)

Na GH, Lee TY. Early development and larval distribution of ascidians, *Styela clava* Herdman and *Ciona intestinalis* (Linne). *Publ Inst Mar Sci Natl Fish Univ Busan*. 10:41-56 (1977)

Newell RC, Kofoed LH. Adjustment of the components of energy balance in the gastropod *Crepidula fornicata* in response to thermal acclimation. *Mar Biol* 44:275-286 (1997)

Pamatmat MM. Facultative anaerobiosis of benthos. In, *marine benthic dynamics*, edited by K.R. Tenore and B.C. Coull, University of South Carolina, Columbia, pp. 69-90 (1980)

Santos JC, Mesquita JM, Belmiro CL, da Silveira CB, Viskov C, Mourier PA, Pavão MS. Isolation and characterization of a heparin with low antithrombin activity from the body of *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). Distinct effects on venous and arterial models of thrombosis. *Thromb Res*. 121:213-223 (2007)

Sastry AN, Vargo SL. Variations in the physiological response of crustacean larvae to temperature. (in) F. J. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg and W.B. Vernberg (Eds.), *Physiological Response of Marine Biota to Pollutants*. Academic Press, New York., pp. 410-424 (1977)

Seibert K, Masferrer JL. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*. 4:17-23 (1994).

Seo BY, Jung ES, Kim JY, Park HR, Lee SC, Park EJ. Effect of Aceton Extract from *Styela Clava* on Oxidative DNA Damage and Anticancer Activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 49:227-232 (2006)

Solorzano L. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol Oceanogr*. 14:799-801 (1969)

Svane I. Observations on the long-term population dynamics of the perennial ascidian, *Ascidia mentula* O. F. Mueller, on the Swedish west coast. *Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole*. 167, 630 - 646 (1984)

Svane I, Young CM. The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*. 27:45-90 (1989)

Swalla BJ, Jeffery WR. Localization of ribosomal protein L5 mRNA in myoplasm during

ascidian development. Dev Genet. 19:258-267 (1996)

Xu CX, Jin H, Chung YS, Shin JY, Woo MA, Lee KH, Palmos GN, Choi BD, Cho MH. Chondroitin sulfate extracted from the *Styela clava* tunic suppresses TNF-alpha-induced expression of inflammatory factors, VCAM-1 and iNOS by blocking Akt/NF-kappaB signal in JB6 cells. Cancer Lett. 264:93-100 (2008)

Yamaguchi M. Growth and reproductive cycles of the marine fouling ascidians *Ciona intestinalis*, *Styela plicata*, *Botrylloides violaceus*, and *Leptoclinum mitsukurii* at Aburatsubo-Moroiso Inlet (Central Japan). Mar Biol. 29:253-259 (1975)

Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. J Clin Immunol. 12:61-74 (1992)

Wang J, Karabinos A, Zimek A, Meyer M, Riemer D, Hudson C, Lemaire P, Weber K. Cytoplasmic intermediate filament protein expression in tunicate development: a specific marker for the test cells. Eur J Cell Biol. 81:302-311 (2002)

Wang R, Du ZL, Duan WJ, Zhang X, Zeng FL, Wan XX. Antiviral treatment of hepatitis B virus-transgenic mice by a marine organism, *Styela plicata*. World J Gastroenterol. 12:4038-4043 (2006)

West AB, Lambert CC. Control of spawning in the tunicate *Styela plicata* by variations in a natural light regime. J Exp Zool. 195:263-270 (1976)

Zhao C, Liaw L, Lee IH, Lehrer RI. cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava* cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. FEBS Lett. 412:144-148 (1997)

국립수산과학원. 1995. 한국수산물 성분표.

국립수산과학원 남해수산연구소 양식환경연구센터. 2007. 경남연안 양식생물 폐사원인 조사보고서, 2003-2006.

국립수산과학원 양식관리과. 2009. 양식산업 경쟁력 강화방안 정립 연구.

농림부. 1997. 미더덕 양식 기술개발에 관한 연구. pp, 1-195.

마산지방해양수산청. 2002. 연구.교습어장 사업보고서 미더덕 자연 채묘 및 양성