뱀장어(*Anguilla japonica*)에서 Cytochrome P450 1 gene 클로닝 및 benzo[a]pyrene 노출에 따른 발현 분석

조현호 · 김주안 · 이승현 · 정준기[†]

부경대학교 대연캠퍼스 수산생명의학과

Cytochrome P450 1 gene in Eel, *Anguilla japonica:* cloning and expression patterns after exposure to benzo[a]pyrene

Hyun Ho Jo, Ju An Kim, Seung Hyun Lee and Joon Ki Chung[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Cytochrome P450(CYP) gene is involved in the biotransformation of drugs and environmental pollutants. In this study, we analyzed the nucleotide sequence of the *Anguilla japonica* CYP1(AjCYP1) family gene and examined the relative expression of AjCYP1A, AjCYP1B and AjCYP1C1 in response to the exposure to environmental pollutants. After exposure to B[a]P 20mg/kg bw, the expression of AjCYP1 family gene increased over time. Among four tissues examined (liver, spleen, gill and kidney), AjCYP1 family gene was expressed significantly in the kidney. Compared with the control group, AjCYP1A was expressed about 5-fold at 48 hr, AjCYP1B about 6-fold at 24 hr, and AjCYP1C1 about 4-fold at 24 hr. However, after exposure to B[a]P 200mg/kg bw, AjCYP1A did not change in all tissues. On the other hand, AjCYP1B was expressed at about 4-fold at 24 hr in the spleen and 4-fold at 48 hr, respectively. Taken together, our results suggest that the expression of AjCYP1 gene in eel tissues might be used as a useful tool to assess the exposure to environmental pollutants in aquaculture system

Key words: Cytochrome P450, Anguilla japonica, Benzo[a]pyrene

Cytochrome P450(CYP) 효소는 내인성 화합물, 환경 오염 물질, 약물 등의 생체 내 변환에 관여하 며, 잠재적인 독소로부터 유기체를 보호하는 데 중 요한 역할을 한다(Kim *et al.*, 2013). CYP 효소는 halogenated hydrocarbons(HHs), polycyclic aromatic hydrocarbon(PAHs) 등 물질들의 생체 내 대사나 제 거 과정에 관여한다. 보통 CYP 효소에 의한 화학 물질의 분해는 해독과정으로서 대사물이 모(母) 화합물보다 생물학적으로 활성이 적게 된다. CYP 효소를 생성하는 CYP 유전자는 환경오염물질에 의해 발현 유도된다고 알려져 있다(Lee and Ahn, 2020).

어류에서 이 CYP 유전자는 18종이 밝혀져 있는 데 CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46 및 CYP51이 있다

[†]Corresponding author: Joon Ki Chung

Tel: +82-51-629-5940, Fax: +82-51-629-5938

E-mail: jkchung@pknu.ac.kr

(Nelson, 2003). 이 중 CYP1은 또다시 CYP1A, 1B, 1C 및 1D의 4개의 subfamily로 나누어진다. 대부분 어류는 single CYP1A와 CYP1B1 유전자와 두 개의 paralogous CYP1C gene인 CYP1C1과 CYP1C2를 가지고 있다(Godard *et al.*, 2005).

CYP1A, CYP1B 및 CYP1C1 mRNA 및 단백질 발 현이 여러 어종에서 arvl hydrocarbon receptor(AhR) 작용제에 의해 유도된다는 것이 밝혀졌다(Bugiak and Weber, 2009; Wang et al., 2010). 또한 CYP1A, 1B 및 1C는 어류에서 약물 대사 효소로서 AhR 작 용제에 노출된 동물에서 강하게 유도될 뿐만 아니 라 PAHs 계열의 환경오염물질들에 대해서도 매우 특이적으로 반응하여 유도된다(Williams et al., 1998; Hu et al., 2007; Jonsson et al., 2010). Benzo[a] pyrene(B[a]P)은 전형적인 PAHs 물질로서 수생생 물에서 유전독성 및 돌연변이 유발 물질로 알려져 있다(Scott et al., 2011). 또한 B[a]P는 0.1 μg/L의 낮은 환경 수준에서 초기 단계의 형태학적 발달에 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다(Hose et al., 1981). Channel catfish(Ictalurus pntatus)에서는, CYP1B는 B[a]P 노출 후 아가미, 간, 혈액 및 생식 샘에서 높은 수준의 발현을 보였다(Willett et al., 2006). 이와 비슷한 연구에서는 은연어 간, 아가미 및 신장에서 CYP1B의 강한 유도를 보였다(Jönsson et al., 2007). 그러므로, CYP 유전자 및 단백질 발현은 수서 환경 오염의 생체지표로서 중요성이 있다고 할 수 있다(Murk et al., 1996; Williams et al., 2000; Nebert and Karp, 2008).

뱀장어는 우리나라를 비롯하여 일본, 중국, 대만 에 주로 분포하는 강하성 어류로, 2019년 국내 생 산량은 10,942톤에 달하고 있다. 그중 10,885톤이 거의 양식에 의해 충당되는 이 어종은 양식어종 중에서 유일하게 인공 생산이 불가능하여 자연산 실뱀장어를 잡아 양식용 종자로 이용하고 있는데, 최근에는 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 자원 감소에 의한 실뱀장어의 어획량 급감으로 뱀장어 양식산업 자체의 위기감도 고조되고 있다. 원인으 로는 지구온난화, 환경 오염 및 서식지 감소 등에 의해 어획량이 감소하고 있다고 추측되고 있다. 특 히 양식장 환경의 오염이 주요한 원인으로 부각되 고 있는데, 오염지역에 노출된 유럽산 뱀장어(*An*- guilla Anguilla)에서 CYP 발현이 증가하였으며 (Agradi et al., 2000), 공장 폐수에 노출된 유럽산 뱀장어 (A. anguilla)와 잉어(Leuciscus alburnoides) 에서 glutathione S-transferase(GST) 활성이 증가한 것으로 보고된 바 있다(Lopes et al., 2001; Maria et al., 2003).

따라서 본 연구에서는 AjCYP1 gene을 뱀장어 양식환경에서 오염 물질 노출의 위험을 감지하는 생체지표로 활용 가능한지를 알아보고자 뱀장어 (*A. japonica*)에서 AjCYP gene을 확인하고, B[a]P의 농도 변화에 따른 AjCYP1 gene의 발현 경향을 분 석하였다.

재료 및 방법

실험어

본 연구에서 사용된 총 50마리의 건강한 뱀장어 (70±5g)를 고창의 한 양식장에서 구매하여 300L 수조(수온 15℃, pH 6.5-7.0)에 5마리씩 7일 동안 순치시켰다.

총 RNA 분리 및 cDNA 합성

무작위로 선택된 뱀장어 한 마리에서 간을 채취 하였다. 총 mRNA는 Trizol[™](Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 Nanodrop(Thermo Scientific[™], NanoDrop[™] Lite Spectrophotometer)를 사용하여 260/280 nm의 O.D.(optical density)를 기준으로 정량하였다. 모든 검체의 흡광도 비율은 1.8부터 2.1까지로 만족스러운 순도 를 나타내었다. cDNA는 cDNA Synthesis kit(Enzo-Life Science Inc., Farmingdale, NY, USA)를 사용하 여 합성하였고, 합성된 cDNA는 사용할 때까지 -80 ℃에서 저장하였다.

AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1의 클로닝

AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1 mRNA의 유 전자 발현분석을 위해 MG. Max II DNA Polymerase(MG med, Korea)를 이용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였다. 본 실험에서 사용된 primer는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응 용액 (Table 2)을 0.2 mL PCR 튜브에 넣은 후 LifeECO

	· · ·	
Primer name	5'-3' sequence	Product size (bp)
AjCYP1A-F AjCYP1A-R	ATGGCACTGATGATTCTACCCTTGG CTTAAACTGAATGTGCGCGCACAAC	1,603
AjCYP1B-F AjCYP1B-R	ATGGACATTCAGGAGGTGATGGA TTAGTTCTGTTCTGAGGATGTGCTTT	1,619
AjCYP1C1-F AjCYP1C1-R	ATGGCACTGTGGGACTCAGAGTTT TCATGCTGGTGAAACCAAGCCTAGA	1,580

Table 1. Primers sequence sets used to amplify CYP gene for PCR

ThermalCycler(Bioer Technology, Hangzhou, China) 을 이용하여 DNA를 증폭시켰다(Table 3). 증폭된 PCR product는 1.2% agarose gel을 사용하여 PCR 여부를 확인하였고, FaverPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (FAVORGEN, Seoul, South Korea)를 이용해 추출하고 pGEM®-T Easy Vector(Promega) 를 이용하여 ligation을 진행하였고, E. coli DH5a MCR competent cells을 이용하여 XALB(ampicillin 100µg/ml)배지에 beads로 도말하여 형질전환 하여 37℃에서 overnight하여 배양하였다. White colony 를 선별하여 colony PCR을 진행하였고 Gel Doc image analysis system(Bio Rad, USA)를 통해 확인 하였다. Target sample을 선별해 ALB 배지에 배양 액 100µ를 넣어 37℃에서 160 rpm으로 overnight

Table 2. Condition of working solution for PCR

Components of PCR	Volume
10X reaction buffer	5 µl
dNTP mixture	5 µQ
GC solution	2.5 µl
F (10 pmole/ $\mu \ell$)	1 µQ
R (10 pmole/ $\mu \ell$)	1 µQ
DNA Polymerase	0.5 µl
Template DNA	0.5 µl
DEPC water	34.5 µl

Table 3. Condition of CYP gene for PCR

Step	Temp (℃)	Time	Cycle
Initial denaturation	94	2 min	
Denaturation	95	30sec	
Annealing	55	30sec	30
Extension	72	30sec	
Final elongation	72	5 min	

하였다. 확인된 gel을 추출하여 DNA 염기서열은 T7 Promoter/ SP6 primer를 사용하여 MACROGEN Co, Ltd.,(DNA Sequencing Service, Seoul, Korea)에 서 분석하였다.

AjCYP1 isoform의 염기서열 분석

염기서열 비교는 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에 등록된 염기서열을 이용 하였다. 염기서열 정렬은 BioEdit Sequence Alignment Editor와 Basic Local Alignment Search Too l(BLAST)을 이용하였으며, ClustalW multiple alihnment(Bioedit)를 이용하여 확인하였다. ClustalW multiple alihnment를 사용하여 유전자 서열을 분석 하고(Hall, 1999), 이를 zebrafish의 CYP1 protein sequence와 비교하였다. 그리고 단백질의 분자량은 ExPASy(http://prosite.expasy.org)를 사용하여 측정 하였다.

B[a]P 노출

300L 수조(수온 15℃, pH 6.5-7.0)에 5마리씩 7일 간 순치가 끝난 뱀장어를 얼음 마취 후 20, 200 mg/kg bw의 용량으로 DMSO에 용해된 B[a]P(Sigma-Aldrich Co., MO, USA)을 복강 주사하였다. 대 조군 5마리에도 DMSO만 동등한 양을 주사하였 다. 주사 후 12시간, 24시간 그리고 48시간에서 뱀 장어를 MS-222(Sigma, USA)로 마취시켜 간, 아가 미, 신장 및 비장을 채취하였다.

AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1 발현의 정량 분석

AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1 total RNA isolation 및 first strand cDNA 합성은 위에서 언급

Primer name	5'-3' sequence	Product size (bp)
AjGAPDH-F AjGAPDH-R	CAATGGAGACACCCACTCCT TGCTGTAGCCGAACTCATTG	106
AjCYP1A-F AjCYP1A-R	GGAGGGTGAGTACCTGGTGA TCCTGGTCATCGTGGTTGTA	143
AjCYP1B-F AjCYP1B-R	CAGGGTTTAACAAGCTCTACGG CGGGAACCTTACAAGTACCAGA	137
AjCYP1C1-F AjCYP1C1-R	CCATAGGGAAGAGAAGATGTATTG GCTTATTTCCTGGGAAGGGTTG	115

Table 4. Oligonucleotide primers used for qPCR

한 RNA 추출 및 cDNA 합성 과정과 같이 진행하였 다. 이때 사용된 primer는 Table 4와 같다. Quantitative polymerase chain reaction(qPCR)은 quantitative thermal cycler(LightCycler®480 II; Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland)를 이용하여 실시하 였다. 그리고 반응 용액은 TOP real qPCR 2×Premix(SYBR Green, Enzynomics, Daejeon, Korea)이 제시하는 설명서에 따라 만들고(Table 5), PCR 조 건은 Table 6와 같이 설정하였다. 실험 결과는 내부 대조군으로 사용된 AjGAPDH의 표준화 이후 2^{-ΔΔCT} method에 의해 계산하였다.

통계

결과의 통계 처리는 SPSS Version 25 program

Table 5. Condition of working solution for qPCR

Components of PCR	Volume
TOP real qPCR 2 × preMIX	10.0 µl
DEPC water	7.0 µl
F (10 pmol/µl)	1.0 µl
R (10 pmol/µl)	1.0 µl
Template DNA	1.0 µl

Table 6. PCR condition of CYP gene for qPCR

Step	Temp (℃)	Time	Cycle
Initial denaturation	95	15 min	1
Denaturation	95	10 sec	
Annealing	variant	15 sec	40
Extension	72	20 sec	
Final elongation	72	5 min	1

(SPSS[®]Statistics)을 사용하여 one way ANOVA를 실시한 후, Duncan's test로 그룹 평균 간의 유의성 (P<0.01)을 사후검정하였다.

결 과

AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1의 클로닝

T7/SP6 Primer를 통하여 분석한 DNA 염기서열 이 AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1임을 확인하 였으며 그리고 AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1 의 Full-length cDNA을 얻었고, 535, 540, 532 크기 의 단백질을 인코딩하는 1,605 bp, 1,620 bp 및 1,597 bp ORF가 포함되어 있다. ExPASy에서 AjCYP1A의 theoretical pI/Mw는 7.07/57733.28이며 AjCYP1B의 theoretical pI/Mw는 8.27/59363.23 AjCYP1C1의 theoretical pI/Mw는 8.83/61024.05임을 확인하였다.

A. japonica CYP1 protein의 특징적인 구조의 특성

CYP450의 전체적인 구조는 종들 사이에서 일반 적으로 잘 보존되어있다. 특히 CYP 효소의 활성부 위에 있는 6개의 substrate recognition site(SRS)은 기질의 결합과 효소 변환에 중요한 역할을 한다. AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1의 유전자 서열 정렬과 *D. rerio* CYP1 protein에서 6개의 분리된 SRS를 볼 수 있다(Fig. 1 and 2). SRS의 위치와 아미 노산 서열은 Jönsson *et al.* (2007)에 따라 표시하였 다. 뱀장어의 CYP1 단백질에서 6개의 SRS 역할은 상대적 중요도에 따라 다를 수 있지만 다른 어종의 CYP1 효소와 유사하게 기질의 인식과 결합에 관 련 부분에 해당할 가능성이 있다.

A. Japonica 1A D. rerio 1A A. Japonica 1B D. rerio 1B 61 61 60 53 A. Japonica 1C1 68 65 D. rerio 1C1 A. Japonica 1A D. rerio 1A ANPHLSLTAMSERFGCVYCICIGMRPVVVLNGSETIRCALIKCGEE 128 KCY.P.F. S.N. YFSR.ACKY.E.F. KL.S.A. ---FYFSR.ACKY.D.F. KL.S.N. ---ITFSKL.KKY.N. .RL.CNDI. ---DA.T...K.AD 128 126 119 135 132 A. Japonica 1B D. rerio 1B A. Japonica 1C1 D. rerio 1C1 CM..ITFSKLAKKY.N....RL.CSDI.....DAA..K..VQHST. A. Japonica 1A D. rerio 1A A. Japonica 1B D. rerio 1B 196 WWRTRRKLAMNALRSFSTIKGSDLGYSCVLEEHVCKEGEYLVKCLSNVTEASGSFDPFRHIVV W.KAQ..I.Q ...VC.KSPK...A. ...GN---VHTKK.. ...AN---IQTKQTF ..SAN---SQTKKAF A....ISN..L...CR. ...N..LC..RE.LHLE TF.K.IVS.IGE.IRLE AF.C.IVG.ALD..CVE HS.MK.D 196 190 TTV.T FMKM.NERKY FL.KSRECOF HLEMKM 183 199 C.KMH.RI.CSTI.A..SAN-C.K.H..V.CST..A..MAN-A. Japonica 1C D. rerio 1C1 NISDEFC VAGSGNPADFIPFLRELP--SRUMKTEMDINDR M. T.KIV GRN.G.TKTV.A.SIV.VM.W.GYF.NPIKYIFGN.K.L.R GRN.G.TKTV.A.SIV.VM.WMCYF.NPIKYIFGN.K.L.RE SRV.K. ETV.A.SIV. 196 SVANVICGMCFGRRYNHDDCELLS 261 261 A. Japonica 1A D. rerio 1AINSAV...K..SYN.A.FQAV A. Japonica 1B D. rerio 1B 258 251 TMSAV. A. Japonica D. rerio 1C1 267 a 1C1 .A.SLV.VM.W.QSF.NPVRSVYQN 264 ..P.FRTI .KT. A. Japonica 1A D. rerio 1A A. Japonica 1B D. rerio 1B A. Japonica 1C1 D. rerio 1C1 330 FDKNNIRDITDSLIDHCEDRKLDENSNVQVSDEKIV 330 SK.MKRL.M. ..D......N...L. QSRTV..M..AF.LALDQG-.TSSTG.YLDK 326 319 RK A. ISQK.A. SPSHV...M. . AF. VALDKG SGG.G.SLDK KDK TO RE NPEVT. MS.AI.SVI.HG-K -LTK 331 328 .PDVT..MS.AI.GVI.HG-KEST----LTK A. Japonica 1A D. rerio 1A A. Japonica 1B D. rerio 1B 398 LSWAVVYLVAYPEIGEKLHGEMKDSVGLERTPLLSDKANLPLLEAFILELFR LSWAVVYLVATFEIGEKHAGEMKDSVGLERTPLLSDRANLFLEAFILEFR H. V. R.CR.LDEKI.KD....R. SI. G.IILV.RF.D.RC.RE.VDRV.DSS.L.SIE.OPR.YVM.LY.VM G.IILL R. K.R.CEUDRV.DRS.L.SIE.OPR.YVM.Y.VM G.ILLL R. H. A.CECIDRV.RDXLCME.SS.AY.D. VY.TM MG.MLLL R.S. S.CECIDRV.RDL.SIE.RC.AY.D. Y.TM 398 394 387 399 A. Japonica 1C1 D. rerio 1C1 396 TALNGYFIPKDTCVFINQWQVNHDPALWKDPSSFSPERFLNADG VNKMDAEKVMVFGMGKRHCIG 466 A. Japonica 1A A. Japonica 1A D. rerio 1A A. Japonica 1B D. rerio 1B A. Japonica 1C D. rerio 1C1 .S., V., E., I.D. T., TEL, LEG. L. L. R. .IC. R. V. S. S. K.VR.EV.D.N. DKS.A-LD.DCTSS.LI.SL. R. SI. P. VI.V. SL. TK.DC.EV.N.C. DE. S-L. DLTTN.LI.SL. R. 466 461 .TK.DC.EV.N DE. TN.LI.SL. 454 a 1C1 466 VTIE.VH..R..V.....S.....QK...HV.N.S...DEN..-LD.DLTSS..I.SI...R.. VTIE.LH....V....S....QK.S..HI.N.S...DEN.A-L..DLTNS..I.ST...R. 463 AIGRTEVFLFLAILVCKLRFHELPGHPIDLTPEYGLU S. A. ...L.R.K.TGM., EM., M. DISKMCL.,YTTL.IHCCL.KAN, AE. S.DYL. DVSKIGL...TSV.HCCS.KAESTP--NMDY... A. Japonica 1A D. rerio 1A MKHKRCQLRASLRVQE------519 519 L.P.AFSIAVEN.NSMALLDAYVQCHAKAEA L.P.AFSIAVEN.NSMALLDAYVQCHAKAEA A. Japonica 1B D. rerio 1B A. Japonica 1C1 529 MDY. DCS 520 .AKV.... .F...LHCCS.ESN.SCEI PLNHSTS K. G-- KELGLVSPA 526 D. rerio 1C1 A. Japonica 1A D. rerio 1A A. Japonica 1B D. rerio 1B DGESTSSEQN 539 KRQKCD.... 526 nica 1C1 A. Japonica D. rerio 1C1

Fig. 1. Sequence alignment of *A. japonica* and D. rerio CYP1 family proteins. Locations of the heme binding site and substrate recognition sites(SRS 1~6) of the putative enzymes are indicated by red shading, respectively. Residues identical to the AjCYP1A, AjCYP1B and AjCYP1C1 sequence are indicated by dots.

	SRS1	SRS2	SRS3	SRS4	SRS5	SRS6
A. Japonica IA D. rerio 1A A. Japonica 1B D. rerio 1B	SRPDLYSFCFINNGRSLAFS SDCA G.E. TR. 8D. T. V G. FT. VS. M.G -NYS G. FA.R.VS. M.G -NYS	VNLSDEFG	FNVFVCRIVTEHYRT .SK.MKRL.MD. .Y.ISQK.A.RK. .CA.IELK.S.RK.	RIVGIVNDLFGAGEDTIST YVPPT.S.ISCL. EVPPTIS.ISCL.	SSFLPFTIPHCTTK T.I.VS. T.T.L.S.T	DLTPEYGLT .M S.DYL NMDY
A. Japonica 1C1 D. rerio 1C1	GNFLM.3GMTNYS GNFVM.SG.R.ST.T-NYS	LSRV.K LGRVNK	.FAKDK.IC.BE. FNY.KDK.LC.RD.	EVE.T.TICV FVEST.TICV	T. V.V88 T. V.V88	S.DCS

Fig. 2. Sequence alignment of SRS(1~6) of A. japonica and D. rerio CYP1 enzymes.

AjCYP1 mRNA의 조직 발현

B[a]P 20, 200mg/kg bw 또는 대조군에서는 사망 률이 관찰되지 않았다. B[a]P는 4개 조직(간, 비장, 아가미 및 신장) 모두에서 AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1의 발현을 유도하였다. B[a]P 20mg/kg bw에서는 시간이 지남에 따라 발현이 증가하는 것 을 볼 수 있었다. 4개의 조직 중 특히 신장에서 크 게 발현이 되는 것을 볼 수 있는데, 대조군보다 AjCYP1A은48시간에서 5배 이상, AjCYP1B는24시 간에서 6배 이상, AjCYP1C1은24시간에서 4배 이 상 발현하였다. 그러나 AjCYP1A와 AjCYP1B에서 는 대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이는 나 타나지 않았으며, AjCYP1C1에서는 비장과 아가 미에서 48시간에서 대조군과 비교해 통계적 유의 한 차이를 보였다(Fig. 3).

B[a]P 200mg/kg bw에서도 20mg/kg bw 그래프와



Fig. 3. Relative expression of AjCYP1A, AjCYP1B and AjCYP1C1 in liver, spleen, gill, head kidney of *A. japonica* exposed to 20mg/kg B[a]P. GAPDH gene expression was determined by qPCR. Gene expression is presented as relative levels. Each value represents a mean value \pm SD of five replicates(n=5). Significant different from control by Duncan's test (p<0.01)



Fig. 4. Relative expression induction of AjCYP1A, AjCYP1B and AjCYP1C1 in liver, spleen, gill, head kidney of *A. japonica* exposed 200mg/kg B[a]P. GAPDH gene expression was determined by qPCR. Gene expression is presented as relative levels. Each value represents a mean value \pm SD of five replicates(n=5). Significant different from control by Duncan's test (p<0.01)

같이 비슷한 양상의 그래프를 볼 수 있다. 대조군 과 비교했을 때 AjCYP1A는 4개 조직(간, 비장, 아 가미 및 신장) 모두에서 큰 차이를 보이지 않았지 만, AjCYP1B은 비장에서 24시간에 약 4배 이상, 아가미에서는 48시간에 4배 발현이 되었으며, AjCYP1C1은 48시간에 비장과 신장에서 각각 3.7 배, 4.3배 이상 발현되었다. 그러나 AjCYP1A와 AjCYP1C1에서는 대조군과 비교해 통계적으로 유 의적 차이는 나타나지 않았으며, AjCYP1B에서는 비장에서만 24시간에 대조군보다 유의적인 차이 를 보였다 (Fig. 4).

고 찰

AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1을 DNA 염기 서열과 NCBI에 등록되어있는 BLAST DNA 서열 과 비교 분석하였다. CAP Contig assembly program (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)을 이용하여 AjCYP1A는 1,561bp, AjCYP1B는 1,680bp, AjCYP1C 는 1,581bp까지 염기서열을 비교하여 확인하였다. AjCYP1A는 152bp, 433bp, 803bp, 819bp 및 1,081bp 에서, AjCYP1B는 204bp, 407bp, 687bp, 1,359bp, 1,439bp 및 1,585bp에서, AjCYP1C는 609bp, 1,081 bp, 1,206bp, 1,233bp 및 1,290bp 부분의 염기서열이 일치하지 않았다. 그 이유로는 같은 뱀장어의 CYP 유전자지만 개체 간의 차이가 있을 것으로 사료된 다. 그러나 NCBI에 등록된 BLAST DNA 염기서열 과 본 실험의 DNA 염기서열이 번역되어 생성되는 단백질이 같은 것을 확인하였다. 따라서 위의 염기 서열의 차이가 결과에는 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

한편 다른 많은 연구에서 CYP1 gene은 PAHs 계 열의 환경오염물질들에 매우 특이적으로 반응하 여 유도된다고 알려져 있다. AhR의 작용제로써 CYP1A의 유도물질이며 환경 오염 물질인 b-naphthoflavone(b-NF)를 처리한guilthead seabream(*Sparus aurata*)와 grey mullet(*Liza aura*)에서 CYP1A의 발 현 정도를 확인 하였다(Cousinou *et al.*, 2000). 또한, dexamethasone에 노출한 rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)가 CYP1A를 더 많이 발현하는 것을 볼 수 있었다(Burkina *et al.*, 2015). TBT에 노출한 common carp(Cyprinus carpio) CYP의 연구에서도 CYP1A, CYP1B 및 CYP1C가 변화됨을 확인할 수 있었고(Li et al., 2016), 그뿐만 아니라 B[a]P에 노 출한 조피볼락(Sebastes schcledlii)에서는 대조군과 비교하여 CYP1A와 CYP1B의 mRNA 발현은 비장에 서 각각 450배와 17배로 상향 조정되었고, CYP1C1 은 아가미에서 45배 증가하였고, CYP1C2는 변하 지 않은 상태를 유지하여, 여러 조직에서 다환 방 향족 탄화수소에 의한 CYP1 발현의 차이를 나타 냈다(Woo and Chung, 2020). 또한, 오염 물질뿐 아 니라 절식, 염도 변화 및 oil이 함유된 먹이 급여와 같은 스트레스 상황을 주었을 때 javanese ricefish (Oryzias javanicus)에서는 CYP1B와 CYP1C 변화 를 볼 수 있었다(Tuan et al., 2014). 이러한 결과들 로부터 CYP1이 수서 환경 오염의 생체지표가 된 다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서도 B[a]P에 노출된 4개의 조직 (간, 비장, 아가미 및 신장)의 AiCYP1 발현이 조직마다 서로 다르게 나타나는 경향을 보였다. B[a]P 20 mg/kg bw 노출에서 AjCYP1A는 신장(대조군 대비 약 5배), 비장(대조군 대비 약 3배)에서 강하게 발 현이 유도되었고 AjCYP1B도 신장(대조군 대비 약 6배), 비장(대조군 대비 약 3배) 발현이 유도되었 다. AjCYP1C1 또한 신장, 비장(대조군 대비 약 4 배)에서 발현이 유도된 것을 볼 수 있다. 200 mg/kg bw 노출에서는 AjCYP1A는 대조군과 비교에서 큰 차이를 보이지 않았다. AiCYP1B 신장과 아가미 (대조군 대비 약 4배), AiCYP1C1 신장과 비장(대 조군 대비 약 4배) 강하게 발현된 것을 볼 수 있다. 20 mg/kg bw와 200 mg/kg bw에서 공통적으로 신장 과 비장에서 상대적으로 강하게 유도된 것을 볼 수 있는데 이는 신장과 비장에서 B[a]P를 빠르게 제거했다는 것을 설명할 수 있다. 이와 비슷한 실 험으로 zebrafish(Danio rerio)는 간, 아가미 및 신장 에서 AjCYP1B의 강한 유도를 보였다(Jönsson et al., 2007).

결론적으로, 본 연구를 통해 얻은 결과들을 종합 하여 보면, AjCYP1의 발현은 뱀장어 양식환경에 서 오염 물질을 감지하는 유용한 도구로 활용할 수 있으리라 사료된다.

사 사

이 논문은 부경대학교 자율 창의 학술연구비 (2019년)에 의하여 연구되었음.

References

- Agradi E., Baga R., Cillo F., Ceradini S. and Heltai D.: Environmental Contaminants and Biochemical Response in Eel Exposed to Po River Water. Chemosphere, 41:1555-1562, 2000.
- Bugiak B. and Weber LP.: Hepatic and Vascular Mrna Expression in Adult Zebrafish (Danio Rerio) Following Exposure to Benzo-a-Pyrene and 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. Aquatic Toxicology, 95:299-306, 2009.
- Burkina V., Sakalli S., Rasmussen MK., Zamaratskaia G., Koba O., Thai GP., Grabic R., Randak T. and Zlabek V.: Does Dexamethasone Affect Hepatic Cyp 450 System of Fish? Semi-Static in-Vivo Experiment on Juvenile Rainbow Trout. Chemosphere, 139:155-162, 2015.
- Cousinou M., Nilsen B., Lopez-Barea J. and Dorado G.: New Methods to Use Fish Cytochrome P4501a to Assess Marine Organic Pollutants. Science of the Total Environment, 247:213-225, 2000.
- Godard CA., Goldstone JV., Said MR., Dickerson RL., Woodin BR. and Stegeman JJ.: The New Vertebrate Cyp1c Family: Cloning of New Subfamily Members and Phylogenetic Analysis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 331:1016-1024, 2005.
- Goldstone JV., McArthur AG., Kubota A., Zanette J., Parente T., Jönsson ME., Nelson DR. and Stegeman JJ. Identification and Developmental Expression of the Full Complement of Cytochrome P450 Genes in Zebrafish. BMC Genomics, 11:643, 2010.
- Hall T.: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows Tm. Bioedit Version, 7, 1999.
- Hose JE., Hannah JB., Landolt ML., Miller BS., Felton SP. and Iwaoka WT.: Uptake of Benzo [A] Pyrene by Gonadal Tissue of Flatfish (Family Pleuronectidae) and Its Effects on Subsequent Egg Development. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues, 7:991-1000, 1981.
- Hu W., Sorrentino C., Denison MS., Kolaja K. and Fielden MR.: Induction of Cyp1a1 Is a Nonspecific Biomarker of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation:

Results of Large Scale Screening of Pharmaceuticals and Toxicants in Vivo and in Vitro. Molecular Pharmacology, 71:1475-1486, 2007.

- Jönsson ME., Orrego R., Woodin BR., Goldstone JV. and Stegeman JJ.: Basal and 3, 3', 4, 4', 5-Pentachlorobiphenyl-Induced Expression of Cytochrome P450 1a, 1b and 1c Genes in Zebrafish. Toxicology and Applied Pharmacology, 221:29-41, 2007.
- Kim B-H., Ryu CS., Jang HC., Lee SY., Lee J-Y., Chae J-W., Kwon K-I. and Kim SK.: In Vitro Assessment of Cytochrome P450 Inhibition by Ambroxol and Cetirizine. Yakhak Hoeji, 57:194-198, 2013.
- Lee J. and Ahn S-H.: Recent Trends in Drug Interaction Studies Based on Drug Metabolism. Yakhak Hoeji, 64:8-20, 2020.
- Li Z-H., Zhong L-Q., Mu W-N. and Wu Y-H.: Effects of Chronic Exposure to Tributyltin on Tissue-Specific Cytochrome P450 1 Regulation in Juvenile Common Carp. Xenobiotica, 46:511-515, 2016.
- Lopes PA., Pinheiro T., Santos MC., da Luz Mathias M., Collares-Pereira MJ. and Viegas-Crespo AM.: Response of Antioxidant Enzymes in Freshwater Fish Populations (Leuciscus Alburnoides Complex) to Inorganic Pollutants Exposure. Science of the Total Environment, 280:153-163, 2001.
- Maria V., Correia A. and Santos M.: Genotoxic and Hepatic Biotransformation Responses Induced by the Overflow of Pulp Mill and Secondary-Treated Effluents on Anguilla Anguilla L. Ecotoxicology and Environmental Safety, 55:126-137, 2003.
- Murk A., Legler J., Denison M., Giesy J., Van de Guchte C. and Brouwer A.: Chemical-Activated Luciferase Gene Expression (Calux): A Novelin Vitrobioassay for Ah Receptor Active Compounds in Sediments and Pore Water. Fundamental and Applied Toxicology, 33:149-160, 1996.
- Nebert DW. and Karp CL.: Endogenous Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (Ahr): Intersection of Cytochrome P450 1 (Cyp1)-Metabolized Eicosanoids and Ahr Biology. Journal of Biological Chemistry, 283:36061-36065, 2008.
- Nelson DR.: Comparison of P450s from Human and Fugu: 420 Million Years of Vertebrate P450 Evolution. Archives of Biochemistry and Biophysics, 409:18-24, 2003.
- Scott JA., Incardona JP., Pelkki K., Shepardson S. and Hodson PV.: Ahr2-Mediated, Cyp1a-Independent Cardiovascular Toxicity in Zebrafish (Danio Rerio) Embryos Exposed to Retene. Aquatic Toxicology, 101:165-174, 2011.

- Tuan T., Kaminishi Y., Funahashi A., Hassanin AA. and Itakura T.: Cloning and Tissue Expression of Cytochrome P450 1b1 and 1c1 Genes from Javanese Medaka, Oryzias Javanicus, under Environmental Stress Conditions. African Journal of Biotechnology, 13, 2014.
- Wang L., Camus AC., Dong W., Thornton C. and Willett KL.: Expression of Cyp1c1 and Cyp1a in Fundulus Heteroclitus During Pah-Induced Carcinogenesis. Aquatic Toxicology, 99:439-447, 2010.
- Willett KL., Ganesan S., Patel M., Metzger C., Quiniou S., Waldbieser G. and Scheffler B.: In Vivo and in Vitro Cyp1b Mrna Expression in Channel Catfish. Marine Environmental Research, 62:S332-S336, 2006.
- Williams DE., Lech JJ. and Buhler DR.: Xenobiotics and

Xenoestrogens in Fish: Modulation of Cytochrome P450 and Carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 399:179-192, 1998.

- Williams T., Lee J-S., Sheader D. and Chipman J.: The Cytochrome P450 1a Gene (Cyp1a) from European Flounder (Platichthys Flesus), Analysis of Regulatory Regions and Development of a Dual Luciferase Reporter Gene System. Marine Environmental Research, 50:1-6, 2000.
- Woo SJ. and Chung JK.: Cytochrome P450 1 Enzymes in Black Rockfish, Sebastes Schlegelii: Molecular Characterization and Expression Patterns after Exposure to Benzo [a] Pyrene. Aquatic Toxicology, 226: 105566, 2020.

Manuscript Received : Oct 21, 2020 Revised : Nov 30, 2020 Accepted : Dec 4, 2020