

꼼치, *Liparis tanakae*에서 특이하게 발현되는 새로운 유전인자의 검색

송인선 · 이석근^{1†} · 손진기

강릉대학교 해양생명공학부 · ¹강릉대학교 치과대학 구강병리학교실

Molecular Cloning of Novel Genes Specifically Expressed in Snailfish, *Liparis tanakae*

In-Sun Song, Suk-Keun Lee^{1†} and Jin-Ki Son

Department of Faculty of Marine Bioscience and Technology,;

¹Department of Dentistry, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

요 약: 심해에서 서식하며 특이한 조직형태를 갖고 있는 꼼치조직에서 cDNA를 제작하여 클로닝을 통해서, 꼼치에서 특이하게 발현하는 유전인자를 검색하였다. 그 결과 62개의 클론이 알려진 유전자에 동질성이 있었는데 이들은 thioesterase가 9개, myosin이 8개, creatine kinase가 7개, skeletal alpha-actin이 6개, parvalbumin b와 ribosomal protein이 각각 5개, type I collagen과 muscle troponin이 각각 3개, dopamine receptor, histatin, 그리고 heat shock protein이 각각 2개, cystatin, lectin, statherin, secretory carrier membrane protein, keratin type I, desmin, chloroplast, muscle tropomyosin, reticulum calcium ATPase, ribonucleoprotein이 각각 1개로 나타났다. 나머지 클론은 동질성이 낮거나 비반복성으로 나타났으며, 이 중 in situ hybridization으로 조직에서 특이하게 발현되는 5종류의 클론을 선택하여 분석하였으며, C 말단 단백질 구조와 특색(motif)을 분석하였다. 5종류의 클론에서 C90-77은 약 5000bp 크기로 상피조직, 점액조직, 섬유조직 그리고 교원질 조직에서 강한 양성반응을 보이는 세포의 기질 단백질로 예상되었다. C90-116은 약 1500bp 크기로 섬유조직, 상피조직 그리고 점액조직에서 약한 양성반응을 보였고, 근육 다발 주변 부위 세포에서 매우 강한 양성반응을 보이는 막투과성 단백질로 예상되었다. C90-130은 약 1200bp 크기로 상피조직, 근육조직 그리고 점액조직에서 양성반응을 나타냈으며, 특히 상피조직에서 강한 양성반응을 나타내는 세포내 단백질로 예상되었다. C90-161은 약 2000bp 크기로 상피조직과 근육조직 그리고 점액성 섬유조직에서 약한 양성반응을 보였고, 상피세포에서 강한 양성반응을 보였으며, 근육다발을 둘러싸는 섬유성 세포에서도 강한 양성반응을 보이는 세포의 기질 단백질로 추측되었다. C90-171은 약 1000bp 크기로 상피조직, 근육조직 그리고 섬유기질 조직에 널리 강한 양성반응을 나타냈으며 교원띠조직에서도 양성반응을 보이는 전사인자로 추측되었다.

ABSTRACT: Snailfish usually lives at the bottom of the sea and showed typical retrogressive change with specialized tissue structures of skin and skeletons. In order to obtain the specific genes of snailfish, highly expressed in the body, we made subtracted cDNA library and analyzed 200 clones. Totally 200 clones were obtained and sequenced, and among them 62 clones were turned out to be homologous to the known gene, i.e., thioesterase (9), myosin (8), creatine kinase (7), skeletal alpha-actin (6), parvalbumin b (5), ribosomal protein (5), type I collagen (3), muscle troponin (3), dopamine receptor (2), histatin (2), and heat shock protein (2), cystatin (1), lectin (1), statherin (1), secretory carrier membrane protein (1), keratin type I (1), desmin (1), chloroplast (1), muscle tropomyosin (1), reticulum calcium ATPase (1), ribonucleoprotein (1). The remaining 138 clones were low homologous or non-redundant genes through Genbank search. Especially 5 clones were novel and specifically expressed in the body tissues of Snailfish by in situ hybridization. Therefore, we analysed these 5 clones to identify the C-terminal protein structures and motifs, and partly defined the roles of these proteins in comparison with the expression patterns by in situ hybridization. C90-77, about 5000 bp, was supposed to be a matrix protein expressed strongly positive in epithelium, myxoid tissue, fibrous tissue and collagenous tissue. C90-116, about 1500 bp, was supposed to be a transmembrane protein which was weakly expressed in the fibrous tissue, epithelium tissue, and myxoid tissue, but strong in muscle tissue. C90-130, about 1200 bp, was supposed to be an intracytoplasmic molecule usually in the epithelial cells. C90-161, about 2000 bp, was weakly expressed in epithelium, muscle tissue and myxoid tissue, but specially strong in epithelium. C90-171, about 1000 bp,

본 연구는 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안 해양생물자원 연구 센터의 연구비(99-2-1-0)에서 일부 지원 받았음.

†교신저자: 강원도 강릉시 지변동 산 123, 강릉대학교 치과대학 병리학교실 (우) 210-702 (전) 033-630-2228 (팩) 033-642-6410 e-mail: sklee@knusun.kangnung.ac.kr

was supposed to be a transcription factor containing zinc finger like domain, which was intensely expressed in the epithelium, muscle tissue, fibrous tissue, and in collagenous tissue.

Key words: Snailfish, *Liparis tanakae*, Novel gene, *In situ* hybridization.

서 론

꼼치는 수심 50~80m 되는 바다 밑 펄질에서 주로 서식하며, 겨울철에 연안으로 이동하는 어종으로서 수컷이 암컷보다 비교적 크며, 체장이 30~40cm이며, 몸은 전방으로 두툼하고 꼬리부위는 빈약하게 약간 긴 형태이다 (해양수산부·국립수산진흥원, 1999). 아가미 형태, 지느러미 구조, 머리와 몸통의 뼈대구조는 퇴행성 변형이 깊은 바다 속 환경에 알맞게 새로운 형태의 어류로 진화하였다는 점에 착안하여 꼼치 살코기 내에 풍부하게 존재하는 물질이 생물학적으로 중요한 역할을 할 것으로 추측되어서 꼼치에서 발현되는 유전인자를 검색하고자 하였다. 특이한 성질의 꼼치 몸통 조직을 생화학 및 조직화학적으로 조사한 결과 당단백질 성분이 많이 존재하는 것을 관찰하였는데, 이렇게 꼼치의 살코기에 풍부하게 들어 있는 당단백질은 꼼치가 매우 열악한 자연환경에서 견디어 낼 수 있고, 한정된 먹이사슬 관계에서 생물학적인 번식을 유지하기 위하여 특수하게 사용될 것으로 생각된다. 이러한 당단백질은 신체구조를 유지하고 외부의 자극에 대하여 신체를 보호하면서, 원활한 근육, 신경, 뼈대계통의 기능을 유지하기 위한 역할을 할 것으로 추측된다. 이에 본 연구에서는 분자생물학적인 클로닝 방법으로 꼼치에서 특이하게 발현되는 유전인자의 생물학적인 기능을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 단백질의 생화학적 및 조직학적 검색

신선한 꼼치의 몸통에서 얻은 약 1g의 조직을 2ml의 단백질 추출 완충액 (Protein SDS lysis buffer; SDS; 0.3%, β -mercaptoethanol; 1%, 0.05M Tris-HCl pH 8.0)에 phenylmethylsulfonyl fluoride(1mM), aprotinin(10 μ g/ml) 그리고 leupeptin(10 μ g/ml) 등의 antiprotease를 넣어 혼합한 후 교반기로 분해시켰으며 다시 원심분리하여 상청액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 SDS-PAGE를 통하여 분리하였으며, Coomassie blue 염색과 toluidin blue 및 aniline blue 염색들을 통하여 단백질의 특성을 관찰하였다. 한편, 꼼치의 피부와 근육조직을 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후, 4 μ m 두께의 파라핀 절

편을 만들어서 헤마톡실린과 에오진 중염색을 하였으며 단백질의 특성을 관찰하기 위하여 PAS (periodic acid-Schiff), toluidin blue 및 Masson trichrome 염색을 한 후, 현미경 관찰하였다(Hibiya, 1982).

2. 추출된 cDNA library 제작

신선한 꼼치조직을 GTC (4.0 M guanidinium thiocyanate, 0.1 M Tris-Cl (pH 7.5), 1% β -mercaptoethanol) 용액에 넣고 교반시킨 후 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) 추출 방법으로 total RNA를 일차적으로 분리하였으며, cesium chloride-EDTA 용액 (96.0g CsCl₂ in 100 ml DEPC water, 0.01 M EDTA, pH 7.5)을 이용한 ultra centrifuge 방법으로 순수한 total RNA를 얻었다. 이렇게 얻은 total RNA를 Oligotex (Qiagen, CA, USA)를 이용해서 mRNA를 순수 분리하였으며, 순수 분리된 mRNA를 이용하여, Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (Stratagene, CA, USA)로 single strand cDNA를 만들었으며 RNase H (1.5 U/ μ l)와 DNA polymerase I (9.0 U/ μ l)을 이용해서 second strand cDNA를 제작하였다. 그리고 NIH 3T3 세포주를 충분히 배양하여 같은 방법으로 mRNA를 추출하고 double strand cDNA를 제작하였으며, NIH 3T3 세포주에서 얻은 cDNA에 streptavidin magnetic particle (Boehringer Mannheim, 1093274, Germany)을 붙인 probe를 사용해서 추출된 cDNA를 제작하였다. 이렇게 얻은 double strand cDNA의 양끝을 *pfu* DNA polymerase (2.5 U/ μ l)를 이용해 blunting 시켰으며 *Eco*R1 adaptor를 붙였다. *Eco*R1 adaptor 부위는 T4 polynucleotide kinase로 인산화작용을 시키고, 다시 cDNA를 *Xho*I로 소화시켰다 (Stratagene, CA, USA). 이 cDNA는 T4 DNA ligase(4 U/ μ l)를 이용해서 Uni-ZAP XR vector에 ligation시켰으며 이 vector를 packaging extract (Stratagen, CA, USA)을 사용하여 packaging시킨 후, Lambda phage의 증식을 XL1-Blue MRF 세포를 사용해서 증폭시킴으로써 추출된 cDNA library를 제작하였다.

3. Cloning and Sequencing

꼼치의 추출된 cDNA library에서 클론을 얻기 위하여, SOLR strain의 세포와 Exassist helper phage의 도움으로 *in vivo* mass excision을 수행하였는데 이때 X-Gal (Sigma, SL, USA) 반응에 의해서 파란색 콜로니는 버리고 백색 콜로니를

취해서 ampicillin-LB broth (10g tryptone, 5g yeast extract, 5g NaCl, 1ml 1N NaOH, in 1L H₂O₂, 100 µg/ml ampicillin)에 배양하였다. 모두 200례 cDNA 클론을 얻었으며 충분히 배양된 세균을 resin bead (Promega, WI, USA)를 이용해서 cDNA를 포함하는 플라스미드를 분리하였고, 분리된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)으로 삽입된 cDNA 크기를 확인한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 ALF-express (Pharmacia Biotech, CA, USA)의 auto sequencer를 사용해서 부분적 염기서열 배열을 시행하였는데 여기서 얻은 sequencing 결과는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 blast search program을 통하여 유사성 검색을 하였으며, 유사성 검색에서 비반복성 유전인자로 확인된 클론은 *in situ* hybridization을 시행하기 위하여 보관하였다.

4. *In situ* Hybridization

폼치조직에 대한 조직화학적 검색은 신선한 폼치 조직을 4% 중성 paraformaldehyde에 고정시킨 후 RNase protection된 방법으로 paraffin block을 제작하였으며, 4 µm 두께의 현미경 절편을 silanized 유리 슬라이드에 부착하여 보관하였다. *In situ* hybridization에 사용되는 RNA probe를 제작하기 위하여, RNA in vitro transcription 반응을 시켰는데, DNA template (6 µl), 10 × buffer (2 µl), RNAase inhibitor (1 µl), NTP (DIG-UTP) mixture (1 µl), T3 또는 T7 RNA polymerase (2 µl)를 DEPC H₂O 10 µl의 용량을 만들어 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 formamide 용액 10 µl를 첨가하여 -20°C에 보관하였다. RNA probe의 생산을 확인하기 위하여 보관된 반응물 중에서 2 µl를 1% agarose gel에 전기영동하여 band를 조사하였다. 파라핀 절편 슬라이드를 xylene에 20분간 넣어 파라핀을 제거하였고 100% ethanol에서부터 90, 80, 70% ethanol까지 2분씩 수화시킨 후 DEPC H₂O로 혼합한 PBS용액으로 5분간 처리했다. 단백질 완충액 (1M tris-HCl 20 µl, 0.5M EDTA 4 µl)에서 Proteinase K용액 (0.01 µg/µl)을 넣어 실온에서 20분간 반응시킨 후, 4% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 10분간 재고정을 시킨 후 0.2N HCl용액으로 실온에서 10분 동안 반응시켜 내재성 alkaline phosphatase를 불활성화 시켰다. DEPC H₂O로 처리한 PBS용액으로 5분씩 2회 수세한 후 0.1M triethanolamine (TEA) 용액으로 10분간 반응시키고, 0.25% acetic acid가 포함된 0.1M TEA 용액으로 실온에서 10분간 반응시켰으며, DEPC H₂O로 혼합한 PBS로 5분씩 2회 수세했다. 50°C로 예열된 150 µl의 hybridization용액 (50% formamide, 10mM tris-HCl pH 7.6, 200 µg/ml tRNA, 1X Denhardt's solution, 10% Dextran sulfate, 600mM NaCl, 0.25%

SDS, 1mM EDTA, DEPC H₂O)에 4 µl의 RNA probe를 첨가한 후 조직위에 기포가 생기지 않도록 hybrislip으로 봉입시켜 55°C chamber에서 16시간 동안 hybridization 시켰다. 50°C로 예열된 2 × SSC(sodium chloride sodium citrate)-50% formamide 용액에서 30분간 반응시킨 후 hybrislip을 제거하고 다시 50°C로 예열된 2 × SSC-50% formamide용액에서 30분간 반응시켰다. DIG 1 (0.1M Tris, 0.15M NaCl)용액으로 37°C에서 30분간 반응시킨 후 blocking reagent가 들어 있는 DIG 2 (0.1M Tris, 0.15M NaCl, 2% blocking)용액으로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 여분의 용액을 제거하고 anti-DIG antibody(Boehringer manheim GmbH, Germany)를 DIG 1 용액으로 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. DIG 1용액으로 30분씩 4회 수세하고 BCIP-NBT (Kirkegaard & Perry Lab, SF17, MA, USA)로 실온에서 20분간 발색시켰다. 발색이 끝난 후 DIG4 (10mM Tris, 1mM EDTA)용액으로 10분간 수세하였고, glycerol gel (DAKO, 106-1, CA, USA)로 봉입하였다. *In situ* hybridization에서 발현된 양성반응의 결과는 Image Pro-4.0 (Media Cybernetics, MA, USA)의 Image analyger 영상처리를 통하여 양성 반응의 정도를 분석하였다.

5. Northern Blot

폼치의 몸통조직에서 분리한 total RNA를 이용하여 Northern blot을 실행하였는데, 위의 방법으로 순수 분리한 total RNA를 이용하여 RNA loading buffer (5 µl 10X MOPS running buffer, 9 µl 37% formaldehyde, 25 µl formamide, 11 µl RNA sample)에 55°C에 15분간 incubation시킨 후 1% agarose/formaldehyde gel을 통하여 전기영동 시켰다. 전기영동 후 젤을 0.05M NaOH, 1.5M NaCl에 20분 동안, 0.5M Tris-HCl, 1.5M NaCl에 30분 동안, 10 × SSC에 45분 동안 각각 충분히 잠기게 담가서 세척시킨 후, nitrocellulose membrane에 blotting시켰다(Frederick, 1999). 각각의 membrane은 클로닝에서 얻은 cDNA를 사용해서 RNA probe를 제작하였는데 이 probe의 제작은 *in situ* hybridization에 사용된 RNA probe의 방법과 동일하다. digoxigenin-dUTP를 labeling 시켰으며, 55°C 배양기에서 16시간 정도 hybridization을 시켰다. Hybridization 후 anti-DIG antibody(Boehringer manheim GmbH, Germany)를 실온에서 1시간 반응시키고 나서, DIG 1용액으로 30분씩 4회 수세하고 BCIP-NBT (Kirkegaard & Perry Lab, SF17, MA, USA)로 실온에서 20분간 발색시켜 관찰하였다.

6. 단백질 특색 검색 및 가상 단백질 구조

전체 cDNA의 염기서열을 완성하고 이 cDNA 염기서열을

ExPASy site (<http://www.expasy.ch/tools/>)에서 아미노산 배열을 번역한 후, NCBI의 Genbank를 통하여 검색하였다. 검색된 클론의 아미노산 배열이 현재까지 Genbank에 수록된 단백질 구조와 유사성을 검색하기 위하여 ExPASy site뿐만 아니라 PDB(protein data bank) site를 이용하여 Sybyl 6.6 프로그램으로 단백질 특색을 검색하였다. 이렇게 얻은 단백질 배열을 Unix computer system의 Sybyl 6.6 프로그램을 이용하여 단백질 구조를 관찰하였다. 이때 결합에너지를 최소화하기 위한 컴퓨터 환경설정은 다음과 같다: Method는 Powel로 하고, Termination Gradient는 0.01 kcal/(mol*A)로 하였으며, Max Iteration은 1,000,000으로 하였다. Energy Setup에서 Force Field는 Kollman United로 하였고, Charges는 Kollman으로 하여 얻은 가상의 단백질 구조를 입체적으로 영상 처리하여 관찰하였다.

결 과

1. 조직화학적 관찰

꼼치의 몸통조직에서 추출한 단백질을 전기영동을 통하여 분리한 후, aniline blue와 toluidin blue 등의 화학적 염색을 한 결과 양성반응을 보이는 밴드가 150 kDa 부위에서 집중되어 관찰되었으며 (Fig. 4), 여러 부위의 몸통조직을 통하여 얻은 조직표본을 조직화화적인 방법으로 현미경 관찰한 결과 PAS 염색과 von Gieson 염색, toluidin blue, 그리고 Masson trichrome 염색에서 상피세포, 간질세포 등에 모두 강한 양성 반응을 보였다. 특히 상피와 간질 사이에 존재하는 기저막은 대략 150~200 μ m로 매우 비대되어 있었는데 이 기저막 부위에서 PAS, toluidin blue, 그리고 Masson trichrome 등에 강하게 염색되므로 매우 풍부한 당단백질이 존재함을 관찰하였다. 그리고 일반적으로 근육조직은 굵은 다발을 형성하지 않고, 작은 소근육질이 산재되어 나타났는데 근육사이의 간질과 근육을 둘러싸는 피막조직에서도 PAS, toluidin blue, 그리고 Masson trichrome 등에 미만성의 양성반응이 보이므로 충분한 당단백질이 분포함을 알 수 있었다 (Fig. 1).

2. cDNA Library 분석

꼼치의 몸통에서 제작한 추출된 cDNA library를 통하여 얻은 200레 cDNA 클론의 염기서열분석을 시행한 후 Genbank 검색을 하였고 그 결과, thioesterase 9레, myosin 8레, creatine kinase 7레, skeletal alpha-actin 6레로 가장 많이 나타났고, 그 다음으로 parvalbumin b와 ribosomal protein이 각각 5레씩 나타났다. 그리고 type I collagen과 muscle troponin이 각각 3레,

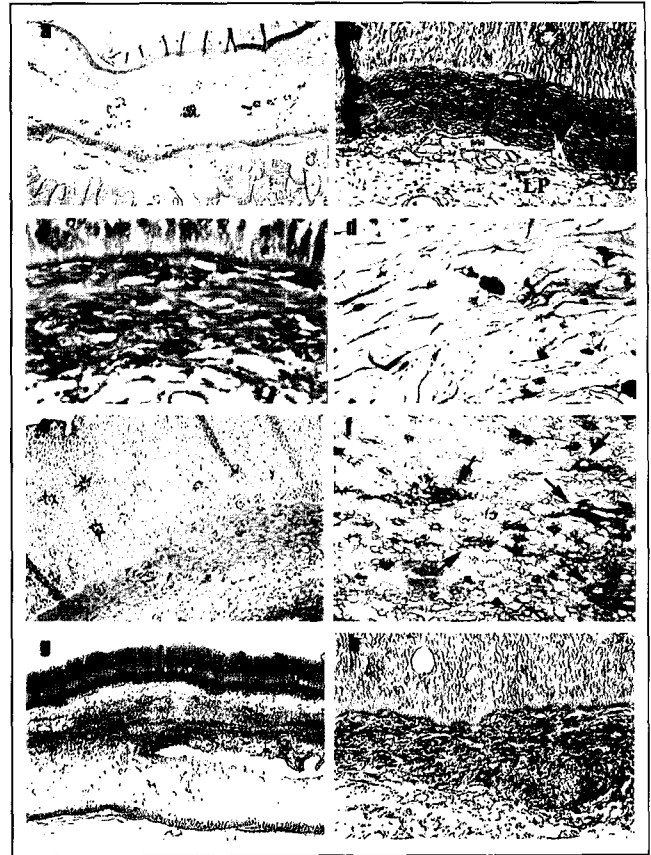


Fig. 1. a-d: Hematoxylin and eosin staining. a; Skin and muscle tissues, noted thick layer of submucosal connective tissue. b; Juxtaepithelial hyalinoid(JEH) tissue appears between epithelium(E) and abundant lamina propria(LP). c; High magnification of juxtaepithelial hyalinoid tissue of panel b, noted spindle mesenchymal cells in the thick eosinophilic fibrinoid materials. d; Myxoid mesenchymal tissue of lamina propria. e-f: PAS staining. e; PAS is slightly positive in the juxtaepithelial hyalinoid tissue. f; stellate cells(arrows) in the myxoid stroma are strongly positive for PAS reaction. g-h: Masson trichrome staining. g; The lamina propria is diffusely stained in blue color, demonstrating the collagen tissue. h; The juxtaepithelial hyalinoid tissue is mainly stained in red color.

dopamine receptor, histatin, heat shock protein은 각각 2레씩 나타났으며, cystatin, lectin, statherin, secretory carrier membrane protein, keratin type I, desmin, chloroplast, muscle tropomyosin, reticulum calcium ATPase, ribonucleoprotein이 각각 1레씩으로 총 62레에서 homology가 비교적 높게 나타났으며, 나머지 138레는 Genbank 검색에서 유사성이 낮거나 비반복성 유전 인자으로 확인되었다 (Table 1). 이 138레의 cDNA 클론 중에서 in situ hybridization를 통하여 꼼치의 조직 세포 내에서 뚜렷한 양성반응을 보이는 5레의 cDNA 클론을 선택하여 C 말단 펩타이드로 추정되는 단백질 서열을 얻었으며 이들은 다

음 그림과 같다.

1) C90-077 :

① DNA sequence

```

1 CTCAACAGAAGTTTCACAATTCCTTTTGGGGCCCTACATCCCCCACACACCATCTTCA 60
1 L N R S F T I P F A A P T S P H T P S S 20
61 GTGCGCTCGATACGTTTGAATCCCTTTTAAAGCGCCGGTGGACCTCAGCCGGGGGCG 120
21 V A S D T F E S L F K R P G R P Q P G G 40
121 GCGAGCCTGTGTCATGCACAACGGGTCCTCTGAAAGTGTACGAGCAGATGCATGTG 180
41 G E P R A S T T G S L L K C T S R C I V 60
181 GGTTCGACGGAGGTTGGGAATAAAGGAACGTAAAGAGAGTGAATCTCAOGTTGTGTAA 240
61 G S A G G W E - 67
241 TGGATTAAGAGCTTCAGCTGTAGTTTTTTTGGTTTTTCTCTTTGACTCCGTTAATTC 300
301 ATTGAGACGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGAGAAGCTGGAGGAGTCTGTCTT 360
361 ACATCTGTTAATAACCGTGTATGGGTTGGCTTTTGAACCTTTTAAATGAGGTATGTGACC 420
421 CAGAGAAAACTAAACGGGAAGAACAGGAGTGTAGTTTCTCGTGAAGAGTGAAGA 480
481 AACCCAGACCCCGAAGACACTGCCATGTGTGCACACGATGTGCAGCCGAGACATTGCA 540
541 GCTACTGAAGCACAGTGTGTTTTCCACTCTTGTGATTGTGAGACGATTTACACATGTG 600
601 AGTATATCACCTGGATGCGGAATATATGCTTTTTTTAGAGTTAAATAAAGTCTTGCTG 660
661 CGTTTGGAAAAAATAAATAA
    
```

② DNA Motif : AP-2, IBP-1b, IBP-1b, GHF-1

③ Peptide homology motif : SR protein, ASF/SF2, CK2 phosphorylation site (2), PKC phosphorylation site (5), ASN glycosylation (2), Myristyl (1), cAMP phosphorylation site (3), Try phosphorylation site (1)

④ PI 값은 10.06이었고, C 말단 펩타이드가 주로 소수성이었다.

2) C90-116 :

① DNA sequence

```

1 TTCTGTCGCGAATTCCGACAGGCTTTTTTGTGTGTTCATATTTCCCCCTTACACAT 60
1 F S C R I R H E L F L L C S Y F P L T H 20
61 GTGTGTCTGCCAGTAGATCTGGTGTGTATGGATGGTAACTCCAAAAGAACATTGATG 120
21 V C L P S R S G V Y G W L T S K R T L M 40
121 ATTGTAAGTGTGCTGTGCTATAACGCATCACACTGGTGAATAAACGCTAGTAGAGAT 180
41 I V L I A G A I T H H T G C A I N A S R D 60
181 GCACATAAACCTGCAGAACATCTTTTCGGTATTTCOCAGCATATCGCATCGTATTACATC 240
61 A H K P A E H L F G I S Q H I A S Y Y I 80
241 CTCATGCTTCTCAGGATOCATGACGATATGTGCTACTGAACTTCGATGCTGTGAAAG 300
81 L H A S H G S M T I C A T E L R S S E T 100
301 CAATCATATCTCATGATGACCAAGGCATCACTGGTGGCCACTGTGCCCTGACATCAGACA 360
101 Q S Y L M M T K A S L V A T V P - 116
361 CAACTAGTCAATAGCTAGCCGTGAAAGGCCCATGCAGATGTGTGCCCTCACAG 420
421 GTGGTCAGTACCTAGCCGTGTACTATGCCACTGAACTGTCCGACGACCAAGCCGTTAGA 480
481 GAGATATACCGGGGGTCCGCGCACATATATTTAAAAAGGCTTCTCACAACAGC 540
541 CCTGTACTACTGTTGTAGACTGTCACTATAAAGACTGAGCCAGGAAAATAAAGTTGGTTTTA 600
601 ACTACAAAAAATAAATAA
    
```

② DNA Motif : IBP-1b, TGGCA, LBP-1, OTF-2B, LBP-1

③ Peptide homology motif : CK2 phosphorylation site (2), PKC phosphorylation site (3), ASN glycosylation (3), cAMP phosphorylation site (1), Myristyl (1)

④ PI 값은 8.98이었고, N 말단 펩타이드가 주로 친수성이었다.

Table 1. Partial sequence analysis

cDNA	No.	cDNA	No.
thioesterase	9	cystatin	1
myosin	8	lectin	1
creatine kinase	7	statherin	1
skeletal alpha-actin	6	secretory carrier membrane protein	1
parvalbumin beta	5	keratin type I	1
ribosomal protein	5	desmin	1
type I collagen	3	chloroplast	1
muscle troponin	3	muscle tropomyosin	1
dopamine receptor	2	reticulum calcium ATPase	1
histatin	2	ribonucleoprotein	1
heat shock protein	2	Total	62

3) C90-130 :

① DNA sequence

```

1 AGAACGTTGTATGTTATTCGTGCTGGTGGAGCTGTATGTCAGGATATATTACAATGTGTC 62
1 K R C M L F V L V S C M S G Y I Y N V F 20
63 TGTCGCTGCTGCTGGATGTTGTTACAATGATTAGGCTCTGTGGACATGAGCTGGCA 122
21 C L P V S G C L L Q C I R L C G H E L A 40
123 TTGGCTGTATGGATGATTAATAACAATGTTATTACGTACAGAAGTGGTGGATTTGCACAC 182
41 L A V W M I N N K C I T Y R S G R F A H 60
183 ACAGTCTAAACAATGTTACACGGATTATAGGATATATTACATTTAGGTCAGGTTTAG 242
61 T V L N N V T R I Y R I Y I L G Q V - 79
243 ATGCAAGTTTTCTCATTGAATACAAAGTAGCTCTGCGTGTCCAGCTTACACGAGATGG 302
303 CAAGATGTCATGTGATTTGTCCAAATTTGATTTAGCCGGGCTGATGGTTTTGGATTTCAT 362
363 CTGCTAAATTTTTATATCTATCTGGAAGTGGAAATTTTTGTTTGTCTCAAAATCATT 422
423 GACATAACAAGCAAATTAATAACATTCATGATTAATAAATCTTAAATATAATATGCCCTGC 482
483 TATTTTATTCATGTTATGATATTTGTAAACATGTTTTCTGCTGTTTACAAGGTGTC 542
543 CCCTTGGATGAATAAAGTCTATCAAACTAAATTTAAAAAATAAATAA
    
```

② DNA Motif : AP2, LBP-1, T-antigen, TGGCA

③ Peptide homology motif : hydrophobic, Leucine rich protein, Myristyl (1), ASN glycosylation (1), PKC phosphorylation site (2)

④ PI 값은 9.11이었고, N 말단 펩타이드가 주로 친수성이었다.

4) C90-161 :

① DNA sequence

```

1 ATTTGTTTTCATCGGTTTGTATTAAGAGTGCCTTTACATTCCTAGAGACCAGAGGGCC 61
1 L V S H R F D L R S A F T F P R D Q R A 20
62 CTGTCTCTCAGGGCCGTTTACAGATGAGACCAACCTGTACGCATTACAGACCTTGTGAT 121
21 L S L Q G R S Q M R P T C T H S D V L M 40
122 CTGCAATGTTTGCATTAACATCCAAAGTGCAGCACTTAAGAGACCAAGATCATATGAAT 181
41 L A L F A L T S K M Q H L R D T N H M N 60
182 ATTATATGATGTCATGCGAAAGTATTCTGAGGTGACACAAAGAGAAAGGCTGAAGTTA 241
61 I I - 62
242 AACACGTCAGAAATGTACACGAAAGCGGGGGGGGGGTTATTTTCAAAATCTATT 301
302 TGAAAAATCCAACAATTTCTCAAAACCAACCGCTGTCTGTCTCTCTCAAAACATTTG 361
362 AATTAATTTTACTGAAACTAAGAACTACCAACTGAAGAGCCAGTGAAGCCAGCGGG 421
422 TGGAAAGAAGCTGCACATCGACGATTTATGATGGTATGTTTTTAAOCAGAGTGCATCGG 482
482 GCTCATTGATGGATGAATCCGGGTTCCGGGCAACTCTGTTGGTTTCACTGAATAAA 541
542 GCCAAAGTGTACTAAAAAATAAATAA
    
```

- ② DNA Motif : AP-2, OBP
- ③ Peptide homology motif : PKC phosphorylation site (3), Mrystyl (2), CK2 phosphorylation site (1), cAMP phosphorylation site (1)
- ④ PI 값은 11.75이었고, N 말단 펩타이드가 주로 소수성이었다.

5) C90-171 :

① DNA sequence

```

1  AGGAAGTTCCTCTTGGCTTGGAGTTTGTAGAAACCGGATTAACGACCGATGACTGGATTTT 61
1  G S C S S L R V L E T G L T T D D W I F 20
62  GGAGGAAAGACGTACCGCACAGGCTGGAGTGTGACTGTGCACCTCAGACTGAATATC 121
21  G G K T Y R T A L G C L T C A L R L N I 40
122  TCAAGTATTTCTAGTCAGGGGCTAGCAGCACCCTGACAGGAGGATTATGTTTATTTGG 181
41  S R I S S Q G L A A I R D T R I M F I W 60
182  CCTGCTGGACATGTAATTATGCACTGAACAACTGTCATGCTGTGGTGGTTTCTGAA 241
61  P A R T C N Y C T E Q T V M L W W F S E 80
242  ATGTTGGGCTTTGACAGCAACTGGGTGTGCTTGCATGTTGTTTACTTCGCTTAGTGATT 301
81  M L G F D S N W V C L H V V L L R L V I 100
302  GAAGCCGTGATGTTGGCATGTGACAGTCTGTAGGTCAAATCGGGCAGTAGCGTGAAAA 361
101  E A V M L A C D S P V G Q I G A V A - 118
362  TATATGATGTTAATCTGTGGAACTGAACTAATACATGGTGTATACGATGTTAGCCTGA 421
422  CAAAGAGAACCCCTCTGTGATCCGACCCAGTGGCAATAAGTTGCAATCAGTCCGATTT 481
482  GTAAAATGTTTGGCTATGCCACACTAAAGGATGTGCTGGTAGCAAGCCCTTTACTCTT 541
542  TATGATTGAACAAAACACTCTAATAGATATATACCAACAAAAAATAAAAAAAAAA
    
```

- ② DNA Motif : AP-2, TGGCA
- ③ Peptide homology motif : SR protein, ASF/SF2, Amidation (1), PKC phosphorylation site (4), Myristyl (8), CK2 phosphorylation site (2), ASN glycosylation (2), cAMP phosphorylation site (1)
- ④ PI 값은 7.58이었고, C 말단 펩타이드가 주로 친수성이었다.

AP	Apurinic or Apyrimidinic
IBP	heat shock protein
LBP	lipopolysaccharide binding protein
GHF	Growth hormone factor
VP	Viral protein
TGGCA	binding consensus sites
OTF	Octamer transcription factors
OBP	Odorant binding protein
CK2	casein kinase II
PKC	protein kinase C
ASF/SF2	activities of splicing factor

3. *In situ* Hybridization 관찰

추출된 cDNA library에서 얻은 비반복성 유전인자의 클론들을 썬치의 몸통 조직에 *in situ* hybridization을 한 결과 5례

의 클론이 특이한 세포군에 매우 강한 양성 반응을 보였다 (Fig. 2).

- 1) C90-77; 상피조직과 점액조직에서 강한 양성반응을 나타내고 있으며, 섬유조직뿐만 아니라 교원질 조직에서도 강한 양성반응을 나타냈다. 특히, 기저막을 이루고 있는 섬유성 세포에서 매우 강한 양성반응을 보였으며, 이러한 양성반응은 상피층에서도 계속되었다.
- 2) C90-116; 섬유조직과 상피조직 그리고 점액조직에서 약한 양성반응을 보인 반면, 근육조직에서 특이하게 근육 다발 주변 부위 세포에서 매우 강한 양성반응을 나타냈다.
- 3) C90-130; 상피조직, 근육조직 그리고 점액조직에서 양성반응을 나타내고 있는데, 특히 상피조직에서 강한 양성반응을 나타냈다. 상피세포에서도 전 세포층에 고르게 강한 양성반응을 보였으며 점액조직 내에 일부의 섬유성 세포에서도 강한 양성반응을 보였다.
- 4) C90-161; 상피조직과 근육조직 그리고 점액성 섬유조직에서 약한 양성반응을 보였으며, 상피세포에서 특이하게 강한 양성반응을 보이고, 근육다발을 둘러싸는 섬유성 세포에서도 강한 양성반응을 보였다.
- 5) C90-171; 상피조직, 근육조직 그리고 섬유기질 조직에 널리 강한 양성반응을 나타냈으며 교원띠조직에서도 양성반응을 나타냈다. 특히, 상피세포에서 매우 강한 양성반응이 관찰되었는데 기저막 부위에 있는 섬유성 세포에서는 뚜렷한 양성반응이 관찰되었다. 한편, 근육 다발 내부에서도 흔하게 강한 양성반응이 관찰되었다.

4. Northern Blot

위에서 얻은 5례의 클론들을 썬치의 몸통에서 얻은 total RNA를 이용해서 Northern blot을 시행한 결과, C90-77 클론의 mRNA는 약 5000bp 크기의 mRNA가 발견되었고 C90-116, 130, 161 클론들의 mRNA 크기는 각각 1500bp, 1200bp, 2000bp로 나타났으며 C90-171 클론은 약 1000 bp 크기의 mRNA가 예상되었는데 비교적 그 발현 양이 많았다 (Fig. 5).

5. 가상의 단백질구조 관찰

위에서 얻은 5례의 클론의 정확한 염기서열을 확인한 후 예상되는 아미노산 배열을 관찰하였는데 이들 5개의 클론은 비록 N 말단 펩타이드 일부가 없고 C 말단에 존재하는 62~118개의 아미노산을 포함하므로 단백질의 특성을 이루는 구조를 연구하기에는 충분하였다. 이들의 단백질 구조는 다음과 같았다 (Fig. 3).

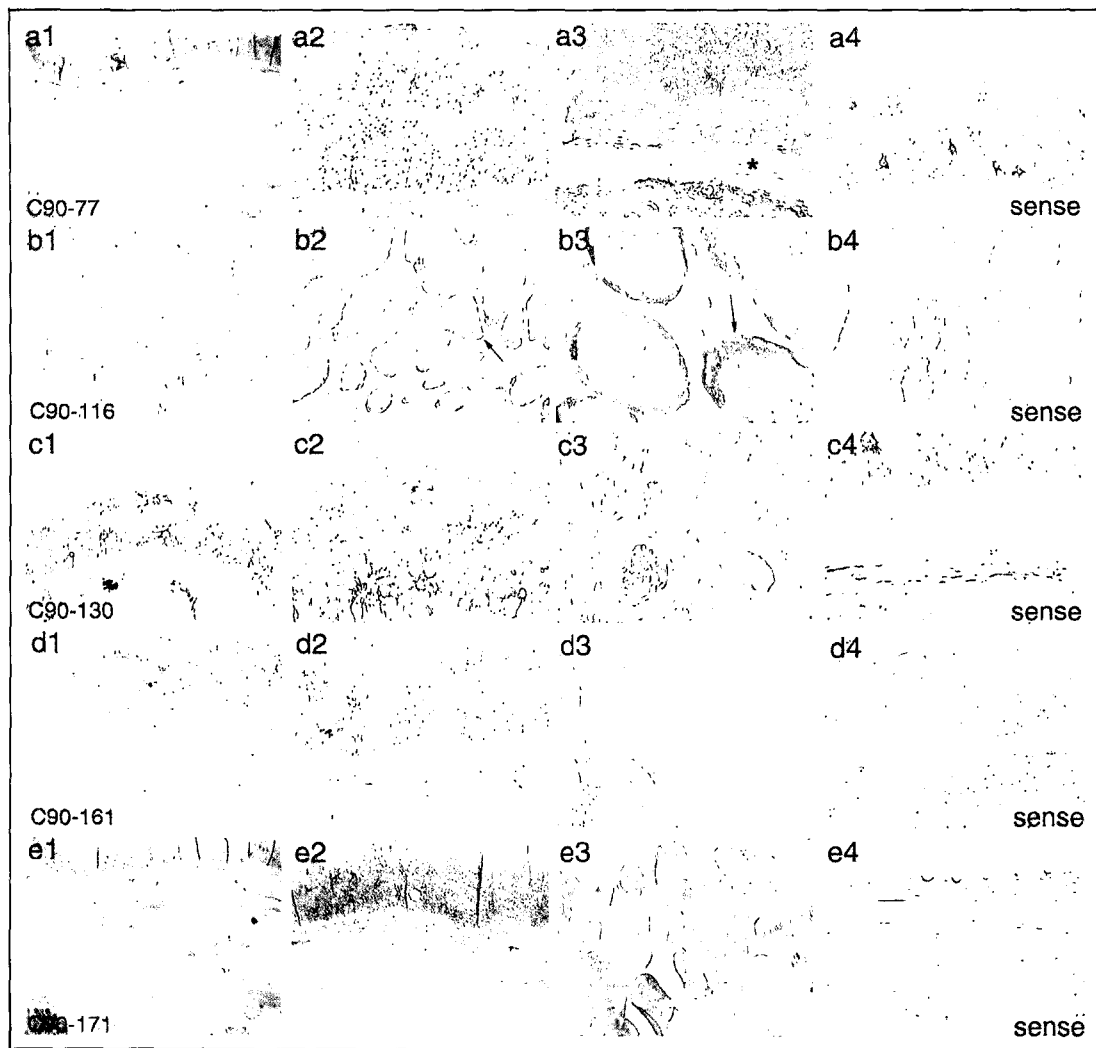


Fig. 2. In situ hybridization. a1~a4: C90-077 clone, a1~a3; antisense probe, positive in epithelial cells and mesenchymal cells of juxtaepithelial hyalinoid tissue. a4; sense probe, negative. b1~b4: C90-116 clone, b1~b3; antisense probe, positive in the peripheral cells of muscle bundles. b4; sense probe, negative. c1~c4: C90-130 clone. c1~c3; antisense probe, positive in the epithelial cells and mesenchymal cells. Noted pigmented melanocytes in c1 and c2. c4; sense probe, negative. d1~d4: C90-161 clone. d1~d3; antisense probe, weakly positive in the epithelial cells and fibrous fascia cells of muscle bundle. d4; sense probe, negative. e1~e4: C90-171 clone. e1~e3; antisense probe, strongly positive in the epithelial cells and in the muscle cells. e4; sense probe, negative.

- 1) C 말단 67개의 예상되는 아미노산 배열의 단백질 구조를 시뮬레이션하여 관찰한 결과, C 말단 부분에 산만한 단백질 구조를 보였는데, 그곳에는 다발성의 인산화 부위 (CK2, PKC, CAMP, Try)가 관찰되었으며, 일부 ASN 글리코사이드 부위도 나타났다. C 말단 단백질 구조는 일정한 형태를 만드는 구조라기보다는 외부로 널리 노출되어 있는 형태였으며, 비교적 친수성이고 여러 종류의 인산화 부위가 분산되어 있음을 확인하였다.
- 2) C 말단 116개의 예상되는 아미노산 배열의 단백질 구조를 시뮬레이션하여 관찰한 결과, C 말단 구조가 뭉쳐진 형태의 구조를 보였고, 이 뭉쳐진 부위에는 serine, threonine이 풍부하게 존재하였으며, 다양한 인산화 부위 (CK2, PKC, CAMP)들이 집중되어 있었고, 일부 ASN 글리코사이드 부위도 나타났다. N 말단 부위로 갈수록 단백질구조가 선상의 구조를 이루었다. N 말단 부위에서는 커다란 버섯모양의 펼쳐진 구조를 보였는데, 이 부분은 비교적 소수성인 단백질인 leucine, proline,

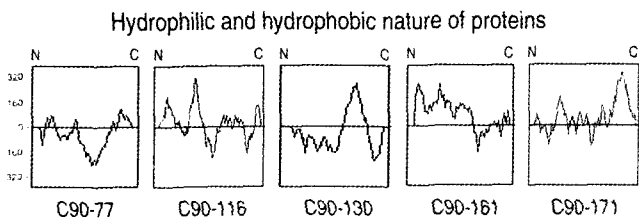
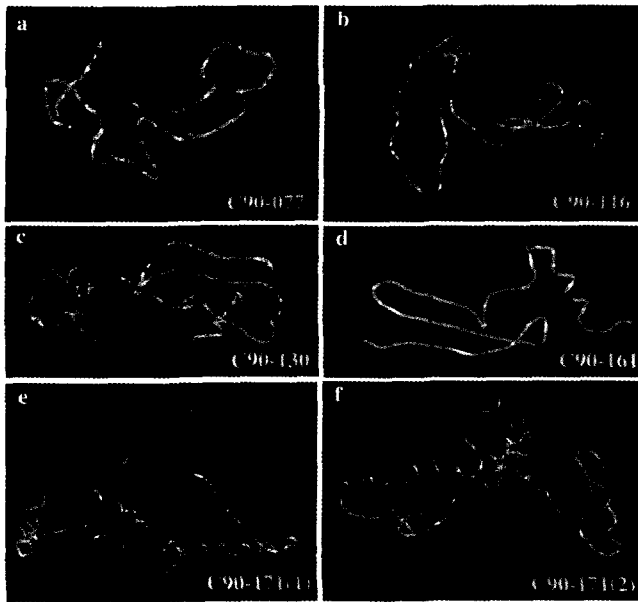


Fig. 3. Protein structures. C90-077: Putative protein structure simulation with 67 amino acid. C-terminal sites are multiful phosphorylation sites(CK2, PKC, CAMP, Try) in C-terminal part and partially are ASN glycosylation site. C90-116: Putative protein structure simulation with 116 amino acid. C-terminal sites are various phosphorylation sites(CK2, PKC, CAMP) with abundant serine, threonine and partially present ASN glycosylation site. N-terminal sites show linear structure and mushroom form. These sites are relatively hydrophobic amino acid with leucine, proline, tryptophan. Mid sites show linear hydrophobic structure with isoleucine, alanine. C90-130: Putative protein structure simulation with 79 amino acid. C-terminal sites are some PKC phosphorylation sites and ASN glycosylation sites that are complex hydrophobic with leucine rich protein. Protein structure massed in mid site are complex and consolidate by cysteine binding. C90-161: Putative protein structure simulation with 62 amino acid. C-terminal sites are concentrated hydrophobic coiling structure with histidine, leucine, isoleucine. N-terminal sites are hydrophilic structure with serine, threonine. These sites present various phosphorylation site(PKC, CK2) and consist of one cysteine, so that is not made disulfide structure. But hydrophilic part consist of glutamine(4), arginine(7) and phenylalanine. C90-171: Putative protein structure simulation with 118 amino acid. There are 4 coil pattern structure. Especially One site present zinc finger motif of CXXC-H. N-terminal sequence consist of hydrophilic amino acid by many serine threonine and 4 coil structure consist of hydrophobic amino acid by leucine, alanine, tryptophan.

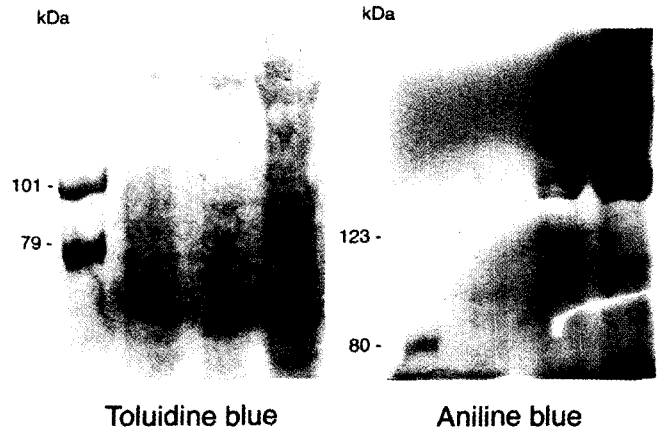


Fig. 4. Western blot. Toluidin blue and aniline blue staining for the protein extract from Snailfish.

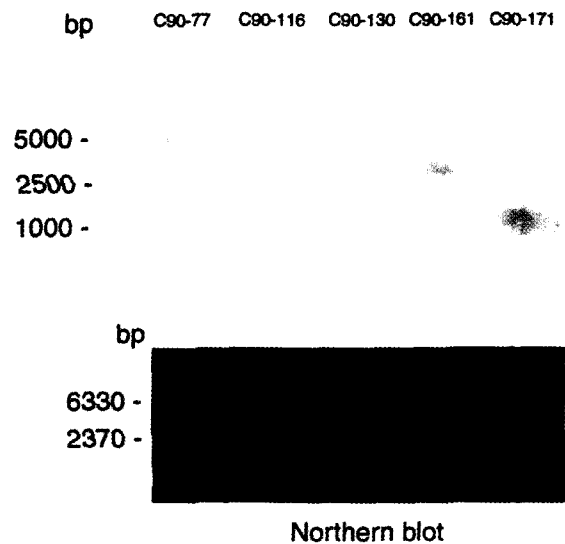


Fig. 5. Northern blot. a: C90-77, b: C90-116, c: C90-130, d: C90-161, e: C90-171. Lower gel: total RNA bands for 28S and 18S

tryptophan 등의 아미노산 등이 집중되어 있었다. 그리고 C 말단과 N 말단 중간 부분에는 isoleucine, alanine 등의 소수성인 아미노산이 선상의 구조를 보였다.

3) C 말단 79개의 예상되는 아미노산 배열의 단백질 구조를 시뮬레이션하여 관찰한 결과, 매우 복잡하게 엉켜진 구조를 보였는데, 전체적으로는 leucine이 풍부한 단백질로 소수성이었으며, 일부 PKC 인산화 부위와 ASN 글리코사이드 부위가 관찰되었다. 복잡하게 엉켜진 부분에서는 cysteine에 의한 결합력이 증가되어서 전체적인 단백질 구조가 중앙으로 밀집되어 있는 형태로 나타

났다.

- 4) C 말단 62개의 예상되는 아미노산 배열의 단백질 구조를 시뮬레이션하여 관찰한 결과, 단백질 구조는 C 말단 부분에 코일 구조를 보이며, leucine, isoleucine의 소수성인 아미노산이 밀집되어 있었고, N 말단으로 갈수록 serine, threonine이 풍부한 친수성인 구조를 이루었다. 특히, 이 부분에서는 다양한 종류의 인산화 부위 (PKC, CK2)가 관찰되었다. 전체적인 단백질 구조는 산만한 형태를 이루었는데, cysteine이 1개만 관찰되어서 이황화 구조를 만들지는 않았지만, glutamine이 4개 arginine이 7개 phenylalanine이 3개 등으로 친수성인 부분에 밀집되어 나타나므로 다른 단백질과 밀접한 관계가 있는 것으로 추측되었다.
- 5) C 말단 118개의 추정되는 아미노산 배열의 단백질 구조를 가상하여 관찰한 결과, 4부분의 코일형 구조를 관찰하였는데 특히 한 부분은 CXXC-H의 zinc finger motif를 갖고 있었으며(Bolivar et al., 1999), 4개의 코일 구조가 중심을 향하여 둘러싸여 있는 구조를 보였다. 특히 N 말단 염기서열이 serine, threonine이 풍부하며 친수성인 아미노산으로 구성되어 있으며, 4부분의 코일된 구조는 leucine, alanine, tryptophan 등의 소수성인 아미노산으로 이루어져 있었다.

고 찰

꼼치는 깊은 바닷물 바닥에서 사는 해양동물로서 그 생태계가 잘 알려져 있지 않지만, 겉모양이나 신체구조 및 조직학적 특성으로 보아, 해저생물을 주식으로 하며, 비교적 운동성이 적어서 바다 밑을 기어다니는 등의 생태를 보이므로 몸통 및 지느러미 등이 일부 퇴화되어지는 경향을 갖는 어류이다. 특히, 근골계가 해저를 유영하기에 편리하도록 진후방으로 전신적 운동을 하지 않고, 두개골, 척추골, 기타 몸통의 뼈대들의 연결이 긴밀하지 않으며 근육다발의 발달이 미약하고, 석회화가 매우 저조한 양상 등을 보이는 것은 해저어류가 변형을 일으키는 현상으로서 꼼치가 진화학적으로 매우 중요한 어류임을 알 수 있다. 여러 생물에서 cDNA를 무작위로 선택하여 염기서열을 행하는 방법으로 유전인자의 발현형태가 분석되고 있으며(Gong et al., 1997; Collet and Joseph, 1994; Gong et al., 1994; Hoog, 1991; Keith, 1993; Kim et al., 1993; Okubo et al., 1992; Park et al., 1993; Uchimiya et al., 1992), 염기서열분석으로 계통발생학적 및 분자생물학적 진화론 연구도 이루어지고 있다(Lio and Goldman, 1999;

Zardoya and Doadrio, 1999; Elliott et al., 1999; Amemiya et al., 1999; Xia et al., 2000). 본 연구에서는 꼼치의 피부조직, 간질조직 그리고 근육조직 등에서 특이하게 발현되는 cDNA 클론들을 얻기 위하여 추출된 cDNA library를 제작하였는데 이 들에서 밝혀진 클론의 예는 이러한 꼼치의 특성을 잘 보여 주었다. 꼼치의 몸통에서는 ribosomal protein, histatin, cystatin, lectin, statherin, secretory carrier membrane protein, keratin, desmin 등의 특수한 단백질 등이 다수 발현되어서 꼼치는 해양동물에서도 간질조직의 성분이 매우 잘 발달되어 있는 동물임을 알 수 있었다. 그런데, 본 연구에서는 추출된 cDNA 클로닝이 꼼치에서 특이하게 발현되는 cDNA 클로닝을 얻기 위한 것이므로 전체의 69%(138례)가 Genbank search에서 비 반복성로 나타났다. 이들 138례는 모두 꼼치에서 특이하게 발현되는 유전인자로 지목할 수 있는데 본 연구에서는 이들 클론을 이용하여 in situ hybridization을 실시한 결과, 이 중에서 5례가 특정 조직세포에 강한 양성반응을 보였다. 이렇게 꼼치에서 그 발현양이 매우 커서 in situ hybridization에서도 어느 특정한 세포에 강한 양성반응을 보이는 것은 아마도 이 유전인자가 그 특정세포에 매우 중요하게 작용하고 있다는 것을 의미한다. 그러므로 이렇게 선택되어진 5례의 클론을 집중적으로 조사하여 이들 유전인자들이 꼼치에서 어떤 역할을 하는가를 알기 위한 연구를 수행하였다. 한편, 본 연구에선 Northern blot을 통하여 mRNA의 전체 기능을 추정하였는데, C90-171의 경우에는 전체 mRNA 길이가 대략 1.0kb로서 본 연구에서 밝혀진 cDNA 염기서열은 약 400bp 정도가 잘려진 것으로 나타났다.

첫째로 C90-77은 in situ hybridization에서 상피조직과 점액 조직에서 강한 양성반응을 보였는데, 특히 기저막을 이루고 있는 섬유성세포에서 매우 강한 양성반응을 보였으며 Northern blot에서 약 5000bp의 큰 mRNA로 예상된다. 따라서 가상의 단백질 구조는 주로 C 말단 부분만 관찰할 수 있었는데 다양한 인산화 부위가 산만하게 흩어져서 외부로 널리 노출되어 있는 구조를 나타내고 있으므로 아마도 이 단백질은 세포의 기질로서 다른 기질 단백질들과 쉽게 반응하여 결합체를 이루거나 어떤 종류의 다른 단백질과 결합하여 기질구조를 이루는 유전인자일 것으로 추측된다. 둘째로 C90-116은 상피조직과 섬유조직에서 약한 양성반응을 보였지만 근육다발 주위세포에서는 매우 강한 양성반응을 보였으며 Northern blot에서 mRNA의 크기가 약 1500bp로 나타났다. 가상의 단백질 구조에서 주로 C 말단의 단백질 구조를 관찰할 수 있는데 등근 부채모양의 단백질 구조에 다양한 인산화 부위가 있고, N 말단 부위로 갈수록 버섯모양으로 펼쳐져 있는 부분이

소수성인 아미노산으로 이루어져 있었으며, 이들 사이에는 선상의 구조가 길게 연결되어 있었다. 따라서 본 단백질은 주로 근육을 둘러싸는 근육다발 주위세포에서 매우 흔하게 사용되는 단백질로서 그 가상의 단백질 구조로 보아 막투과성의 특성을 갖고(Lio and Goldman, 1999) 세포 안에는 C 말단이 있고, 세포 밖에는 N 말단 구조를 가지는 단백질일 것으로 추측된다. 특히 C 말단 쪽의 phenylalanine, alanine 등의 소수성인 아미노산의 존재로 보아서 이 유전인자는 근육조직에 신호전달을 매개하는 유전단백질일 것으로 추측된다. 셋째로 C90-130은 상피조직, 근육조직 그리고 점액조직에서 고르게 양성반응을 보였고, 특히 상피조직에 강한 양성반응을 보였는데, Northern blot에서 mRNA의 크기가 약 1200bp로 나타났다. 따라서 주로 C 말단의 가상의 단백질 구조를 관찰하였는데 전체적으로 서로 엉켜진 복잡한 구조로 여러 부분이 cysteine에 의한 결합구조를 가지고 있으며, 전체적으로는 소수성인 구조를 보이고 있었다. 따라서 C90-130의 유전인자는 주로 상피세포에 흔하게 발현되는 유전인자로서 상피세포에서 세포분화 중에 세포질 내에서 사용되어지는 유전물질로 생각되었다. 넷째로 C90-161은 상피조직과 근육조직 그리고 점액성 섬유조직에서 약한 양성반응을 보였지만, 상피조직 기저부분에서 특히 강한 양성반응을 보였는데, Northern blot에서 mRNA의 크기가 약 2000bp로 나타났다. 가상 단백질 구조에서 주로 C 말단 부분에 소수성인 아미노산이 밀집되어 있고, 코일 구조를 보였으며 N 말단 부분으로 갈수록 소수성인 아미노산에 의해 다양한 구조의 인산화 부위가 나타났다. 그래서 이 유전물질은 특히, 상피세포와 기저막세포에 흔하게 발현되는 물질로 주로 세포막에 부착되어 세포의 기질과 반응하여 세포 신호전달에 영향을 미치는 특이한 유전물질일 것으로 추측되었다(Blom et al., 1999). 다섯째로 C90-171은 상피조직, 근육조직 그리고 섬유기질 조직에 널리 강한 양성반응을 보였으며, Northern blot에서 mRNA의 크기가 약 1000bp로 나타났다. 이 유전물질의 가상 단백질 구조에서 4개의 코일형의 구조를 이루었는데 이 코일형 구조 일부가 zinc finger motif를 가지고 있었으며 4개의 코일 형태가 중앙부위를 관상으로 둘러싸는 형태를 이루고 있었다. 따라서, 본 유전물질은 아마도 zinc finger 단백질의 한 종류로서 여러 조직에 흔하게 발현되는데 (Blancafort et al., 1999), 그 중에서 특히 세포의 증식이나 분화성이 높은 세포들에 강한 발현을 보이고 있고, 4개의 코일된 구조물인 zinc finger 구조가 중심을 향하여 관상으로 뭉들고 있는 것으로 보아, DNA 결합을 통하여 세포의 분화를 조절하는 특징적인 전사와 관련된 유전자의 일종일 것으로 추측되었다. 따라서, 본 연구에

서는 꿈치에서 특이하고 풍부하게 발현되는 새로운 유전인자 5 클론을 얻었는데, 앞으로 5'-말단의 확장을 통하여, 염기서열 전체 길이를 얻기 위한 실험을 계속해 나가야 할 것이다.

본 연구를 통하여 꿈치의 몸통조직에는 조직화학적인 방법으로 당단백질이 풍부하게 존재하는 것을 관찰하였으며 특히 조직학적으로 꿈치 몸통조직의 피부기저막, 간질조직 그리고 근육기적막 부위에 매우 풍부한 당단백질이 관찰되었다. 이들 당단백질은 주로 세포의 기질로 존재하면서 인접하는 세포들을 부착시키고 세포의 이동, 증식 및 분화 등을 조절하는 중요한 기능을 하고 있으므로 이들 당단백질이 꿈치가 깊은 해저에서 생존하는데 반드시 필요한 유전물질로 추측된다.

본 연구에서는 이러한 가설에 의해서 꿈치의 생존 또는 진화에 관여하는 중요한 유전인자들을 발견하기 위하여 추출된 cDNA library를 이용해서 cloning과 sequencing을 수행하였다. 결과적으로 C90-77, C90-130, C90-161은 아마도 세포의 기질단백질일 것으로 추측되고 C90-116은 C 말단에 다양한 인산화 부위들이 몰려 있고 N 말단으로 갈수록 소수성인 구조가 2개의 상구조를 나타내므로 막투과성 단백질로써 신호전달에 관여하는 단백질일 것으로 추측하였으며, C90-171은 꿈치의 몸통조직에서 풍부하게 발현되는 전자유전자로 추측되었다. 결국 꿈치의 추출된 cDNA library를 통하여 효과적으로 주요 mRNA를 동정하였는데, 꿈치가 저인망에 의해 잡혀 RNA 분리시까지 신선한 상태를 유지하기 어려워 적절한 전체 mRNA를 얻을 수 없었지만 세밀한 클로닝과 시퀀싱을 통하여 C 말단 부분의 아미노산배열을 얻을 수 있었다.

결과적으로 이러한 연구를 통하여 C 말단의 특징적인 유전물질을 검색할 수 있었는데, 모두 60 아미노산 배열보다 많은 아미노산 배열을 DNA 염기서열을 통하여 얻을 수 있었다. 그리고 비교적 C 말단 부분의 아미노산은 유전물질의 특이한 기능과 관련되는 부분이 많았으며, 대략 50 아미노산 이상의 아미노산 배열만 가지면 전체 단백질 구조의 주요 motif를 파악할 수 있기 때문에 본 연구에서 나타난 실험연구 결과는 매우 의의가 있다 하겠다. 따라서 앞으로 전체 cDNA 염기서열을 얻기 위한 실험을 계속하여야 하며, 가상 단백질 구조에서 특이한 기능이 예상되는 아미노산 배열 부위에서 얻은 재조합 단백질이나, 합성단백질을 이용해서 항체를 만든 후 그 항체의 특이한 반응을 관찰하는 연구가 계속되어야 할 것이다.

인용문헌

- Amemiya Y, Lakahashi A, Meguro H, Kawauchi H (1999) Molecular cloning of lungfish proopiomelanocortin. *Gen Comp Endocrinol* 115: 415-421.
- Blancafort P, Steinberg SV, Paquin B, Klinck R, Scott JK, Cedergren R (1999) The recognition of a noncanonical RNA base pair by a zinc finger protein. *Chem Biol* 6: 585-97.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294: 1351-1362.
- Bolivar J, Diaz I, Iglesias C, Valdivia MM (1999) Molecular cloning of a zinc finger autoantigen transiently associated with interphase nucleolus and mitotic centromeres and midbodies. Orthologous proteins with nine CXXC motifs highly conserved from nematodes to humans. *J Biol Chem* 274: 36456-64.
- Collet C, Joseph R (1994) The identification of nuclear and mitochondrial genes by sequencing randomly chosen clones from a marsupial mammary gland cDNA library. *Biochem Genet.* 32: 181-188.
- Elliott JK, Loughheed SC, Bateman B, McPhee LK, Boag PT (1999) Molecular phylogenetic evidence for the evolution of specialization in anemonefishes. *Pro Royal Soc London-Biol Sci* 266: 677-685.
- Frederick M. ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. moore, J. G. Seidman, John A. Smith, Kevin struhl (1999) Short protocols in molecular biology(fourth edition).
- Gong Z, Hu Z, Gong ZQ, Kitching R, Hew CL (1994) Bulk isolation and identification of fish genes by cDNA clone tagging. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 243-251.
- Gong Z, Yan T, Liao J, Lee SE, He J, Hew CL (1997) Rapid identification and isolation of zebrafish cDNA clones. *Gene* 201: 87-98.
- Hibiya T (1982) An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features.
- Hoog C (1991) Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res* 19: 6123-6127.
- Keith CS, Hoang DO, Barret BM, Feigelman B, Nelson MC, Thai H, Baysdorfer C (1993) Partial sequence analysis of 130 randomly selected maize cDNA clones. *Plant Physiol* 101: 329-332.
- Kim C, Markiewicz P, Lee J, Schierle C, Miller J (1993) Studies of the hyperthermophile *Thermotoga maritima* by random sequencing of cDNA and genomic libraries. Identification and sequencing of the trpEG (D) operon. *J Mol Biol* 231: 960-981.
- Lio P, Goldman N. (1999) Using protein structural information in evolutionary inference: Transmembrane proteins. *Mol Biol Evol* 16: 1696-1710.
- Okubo K, Hori N, Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, Matsubara K (1992) Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nature Genetics* 2: 173-179.
- Park YS, Kwak JM, Kim YS, Lee DS, Cho MJ Lee HH, Nam HG (1993) Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of *Brassica napus* by single-run partial sequencing. *Plant Physiol* 103: 359-370.
- Uchimiya H, Kidou S, Shimazaki T, Takamatsu S, Hashimoto H, Nishi R, Aotsuka S, Matsubayashi Y, Kidou N, Umeda M, Kato A (1992) Random sequencing of cDNA libraries reveals a variety of expressed genes in cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J* 2: 1005-1009.
- Xia Z, Gale WL, Chang X, Langenau D, Patino R, Maule AG (2000) Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of a Channel Catfish estrogen receptor beta. *Gen Comp Endocrinol* 118: 139-149.
- Zardoya R, Doadrio I (1999) Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *J Mol Evol* 49: 227-237.
- 해양수산부 · 국립수산진흥원 (1999) 태평양산 원양어류도감. 한글그라피스.