

두릅상어(*Scyliorhinus torazame*) Metallothionein cDNA의 cloning 및 이의 분자적 특성

노재구 · 남윤권 · 김동수[†]
부경대학교 양식학과

Molecular Cloning and Characterization of a Novel Metallothionein Isoform Expressed in Tiger Shark (*Scyliorhinus torazame*)

Jae Koo Noh, Yoon Kwon Nam and Dong Soo Kim[†]

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

A complementary DNA encoding metallothionein (MT), a heavy metal-responsive protein was cloned from a cartilaginous shark species, *Scyliorhinus torazame*. An expressed sequence tag (EST) from the shark liver, which showed high similarity with a MT gene, was isolated and its full-length sequence (390 bp) was determined. The putative shark MT cDNA sequence contained an open reading frame consisting 68 amino acids and 182 bp of 3-untranslated region including the poly (A+) signal. The deduced amino acid sequence was 41-54% identical to those of other animals including mammals and fish species. Tiger shark MT cDNA showed high conservation in the Cys regions, however, peculiarly contained not only additional five amino acids just prior to the conserved beta-domain but also a Ser residue at C terminal, which has not been seen in other MT sequences.

Key word : Metallothionein, Tiger shark (*Scyliorhinus torazame*), EST

최근 급속한 산업화에 따른 해양 생태계의 중금속 유입은 해양 생태환경의 파괴 및 먹이사슬 등을 통해 결국 인간에게까지 영향을 미칠 수 있다. 이에 따라 해양 생물체의 중금속 축적정도를 측정함으로써 해양 생태환경의 중금속 오염정도를 평가할 수 있는 **biomonitoring** 생물체(Rainbow, 1995; Chan, 1995)의 개발과 함께, **biomarker**로서 metallothionein 유전자의 연구가 진행되고 있다(Chan, 1995; Khoo and Patel, 1999).

Metallothioneins(MT)은 박테리아로부터 균류, 고등식물, 사람을 포함한 척추동물에 이르기까지 모든 생물체에 존재하며, Zn, Cu, Cd, Ni 등 중금속과 thiolate 결합을 형성하는 cysteine 잔기를 풍부하게 함유한 작은 분자량의 세포질 단백질로서 중금속의 세포내 농도 조절과 환경으로부터 흡수한 유해 중금속의 해독작용 등의 기능을 수행한다(Hamer, 1986; Kägi, 1991; Vallee, 1991). 포유동물, 갑각류, 연체류를 포함하는 Class I MT는 4개의 2가 이온이 11

개의 cysteines과 cysteinyl thiolate bridges를 형성하는 α -domain과 3개의 2가 이온과 결합하는 9개의 cysteines을 포함하는 β -domain 등 2개의 metal-binding domain을 갖는다(Kägi, 1991; Kojima, 1991). 포유류의 MT는 모든 조직에서 발현되는 MT1, MT2, 신경계에서 발현하는 MT3 (Masters *et al.*, 1994), 그리고 상피세포에서 발현하는 MT4 (Quaife *et al.*, 1994) 등 4개의 MT isoform으로 구분되며, 많은 포유동물들에서 유전자의 중복현상으로 인한 다수의 MT isoform이 보고되었으며(Stennard *et al.*, 1994; Hunziker *et al.*, 1995), 사람의 경우 13개의 MT 1 type 유전자 중 적어도 10종 이상의 기능적 단백질이 확인되고 있다(Quaife *et al.*, 1994). 어류의 경우 무지개 송어(Bonham *et al.*, 1987; Olsson *et al.*, 1995), 넙치(Chan *et al.*, 1989) 금붕어와 틸라피아(Chan, 1994), stonch loach와 pike (Kille *et al.*, 1991), 남극서식어류(Bargelloni *et al.*, 1999) 등을 비롯하여 약 20 여종 이상의 어류에서 MT 유전자가 보고되고 있으며, 포

[†]Corresponding Author

유류와 비교하여 하등 척추동물들에서는 하나 또는 두 종류의 MT isoform만이 발견됨으로써 서로 다른 경로로 MT 유전자의 분자적 진화가 진행되어 왔음을 시사한다(Bargelloni *et al.*, 1999). 그러나 이들 MT isoform들은 각기 아미노산 서열의 차이에 불구하고 cysteine 잔기에 의한 중금속 결합능력은 진화적으로 잘 보존되어 있다(Ebadi and Babin, 1989).

MT는 해양 생태환경의 biomarker로써 어류 뿐 아니라 패류(Roesijadi *et al.*, 1989; Khoo and Patel, 1999)와 성게(Harlow *et al.*, 1989) 등 연안 저서생물들에서도 활발한 연구가 진행 중이다. 이에 비해 현재까지 연구되어 온 어종들은 모두 경골어류들로서 원시어종인 연골어류의 MT 유전자에 대한 보고는 전무한 실정이다. 수해양은 인류의 가장 방대한 유전자원의 보고로서 유전자원의 확보 및 이의 생명공학 적 활용을 위해 expressed sequence tag (EST) 등을 통한 어패류의 신규 유용 유전자 탐구가 진행되고 있으며(Douglas *et al.*, 1999), 특히 심해 및 원시어류들은 인간을 위시한 고등 척추동물에서는 그 기능이 진화적으로 소실된 유전자들이 높은 활성을 유지한 채 보존되어 있거나, 특수 기능 유전자들을 보유하고 있어(Nam *et al.*, 2001), 원시어류의 유전자 탐색은 이를 이용한 기능성 단백질 및 분자 진화적 유연관계 등의 연구에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 원시 연골어류인 두툽상어(*Scyliorhinus torazame*)로부터 EST를 이용하여 MT 유전자를 cloning 한 후 이의 분자적 특성을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

두툽상어 간조직 mRNA의 추출 및 cDNA library의 제조

두툽상어속(Genus *Scyliorhinus*)의 저서성 어류인 두툽상어의 간조직 100 mg을 적출하여 1 ml의 TriPure™ Isolation Regent (Boehringer Mannheim, Germany)하에서 마쇄하고 제조사의 방법에 의거 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA 250 μ g으로부터 mRNA Isolation Kit (BM, Germany)를 이용하여 biotin-labeled oligo d(T)₂₀와 혼성화 후 streptavidin magnetic particle로 mRNA만을 순수분리하였다. cDNA library의 제조는 ZAP-cDNA Synthesis Kit와 ZAP cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Strata-

gene, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 cDNA를 합성한 후 cDNA library를 제조하였다.

plasmid subcloning과 염기서열 분석

λ phage에 포함되어 있는 cDNA clone들을 plasmid vector에 subcloning하기 위해 helper phage를 이용하여 *in vivo* excision을 수행하였다. Excised phage를 SOLR 세포에 감염시켜 cDNA를 포함하는 colony를 얻었으며, alkali lysis 방법으로 plasmid DNA를 추출하여 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 분석은 형광 표지된 ddNTP를 포함하는 BigDye terminator (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 PCR 반응 후, ABI Prism 377 DNA sequencer (PE, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

유전자 특성분석

EST 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank를 blastx 검색을 통해 MT 유전자와의 상동성을 확인하였다. 또한 얻어진 염기서열과 아미노산 서열은 MultAlin (Corpet, 1988)과 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) 등 서열 다중배열 프로그램을 이용하여 상동성을 비교 분석하였다. MT 유전자의 아미노산 서열을 이용한 계통도 작성은 PRODIST를 통해 얻어진 distance matrix를 NEIGHBOR의 Neighbor-Joining 방법으로 분석하여 drowtree 프로그램으로 작성하였다.

결론 및 고찰

두툽상어의 간조직 cDNA library의 EST를 통해 MT 유전자를 cloning하였다. 염기서열 분석 결과 두툽상어의 MT 유전자는 204 bp의 coding 영역과 182 bp의 3' UTR 영역으로 구성되어 있었으며, 종결코돈 이후 162 bp의 polyadenylation 신호서열과 이로부터 15 bp 이후의 poly(A) 서열 등이 확인되었다(Fig. 1).

염기서열로부터 유추한 68개의 아미노산 서열에는 다른 척추동물에서와 같이 Cys 잔기가 전체의 29.4% (20/68)로 풍부하였으며, MT의 특징인 Lys, Arg, His 등의 aromatic 잔기는 없었다(Fig. 1).

알려진 다른 종들과의 아미노산 서열 다중분석 결과 포유류와는 43~54%, 어류들과는 41~45%의 서열 상동성을 보였으며, 특히 20개의 Cys은 어류

AAATGTCTGACACGAAGCCCTGTGTGTGCTCGATGGATGCTGCTCTGTGAAAACACCT 60
 M S D T K P C V C L D G S C S C E N T C 20
 GCAGGTGCTCGACTGCCGATGTCCACCAGCAAGCTGGACCTGCCAGAAAAGTTGCT 120
 R C S D C R C P T S K A G R C Q K S C C 40
 GCTCTGTCTGCTCTGACGAGATGCACGAAGCTGGCCAAAGGCTGTGTGTATAAAGCCAAAG 180
 S C C P A G C T N C A N G C V C K G K A 60
 CCTCTGACAAATGTAGTGTCTGCTGAAACACCGCCACCTCAGACACAATATCTGAAA 240
 S D K C S C C S * 68
 TATTGCCCATATGTATGTATTCACACACTGGATGTTTTCAGTGTCTATATCTCTGATGAG 300
 TTGTGTTTACATAAAGAAATGAAAAGTGTATGAAAATATTGAATTTACTGTTATTGTTG 360
 TCATGTATTGGAATAAATTTCATAATTACC 390

Fig. 1. Nucleotide sequence of tiger shark metallothionein cDNA with derived amino acid sequence. Predicted 68 amino acid sequence is shown with a single letter code below the corresponding codons. Numbering of the nucleotide and amino acid sequences is given at the right. The polyadenylation signal sequence is underlined.

와 18개가, 다른 척추동물과는 19개가 잘 보존되어 있었다. 두툽상어 MT는 특이하게 모든 척추동물에서 잘 보존된 β -domain 끝 쪽의 9번째 Cys 앞에 5개의 아미노산을 더 갖고 있었으며, 경골어류 MT의 특징(Binz and Kägi, 1999)인 4번째 위치의 gap이 없고, 18번째 Cys의 위치가 어류와 달리 다른 척추동

Human MT IA -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Mouse MT I -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-ADKTKCA
 Human MT IB -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Bovine MT IIA -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Mouse MT II -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Human MT IIIA -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Bovine MT IA -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Human MT IV -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Mouse MT IV -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Human MT IIIA -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Bovine MT III -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Mouse MT III -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Pigeon MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Chicken MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Frog MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Grasshopper fish MT B -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Rockcod MT B -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Sea bream MT A -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Perch MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Winter flounder MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Atlantic cod MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Tilapia -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Atlantic salmon MT B -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Galouet MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Rainbow trout MT A -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Rainbow trout MT B -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Northern pike MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Goldfish MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Roach MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Zebrafish MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Stone loach MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA
 Tiger shark MT -DEPW-CISATGSECTGSRKXKKEKQNS-CKSS-CKSPFNSKAKAGSIC-CKSA-SEKNSCKA

Fig. 2. Comparison of tiger shark MT amino acid sequence to vertebrate MTs. Asterisks are shown conserved amino acid of known MTs.

Table 1. The characteristics and comparison of tiger shark MT with vertebrate MTs

Family subfamily	Known characteristics
Family 1 : Vertebrate MTs	Sequence pattern : K-x(1,2)-C-C-x-C-C-P-x(2)-C located at the beginning of the third exon 60-68 aa, 20 Cys (19 Cys totally conserved) two structural domains, composed of 3 exons, 2 introns
m1: mammalian MT-1	61-62 aa, 20 conserved Cys, A at C-term
m2: mammalian MT-2	61aa, 20 conserved Cys, A at C-term
m3: mammalian MT-3	66-68 aa (insert of 4-6 aa near the C-term) 20 conserved Cys, Q at C-term
m4 : mammalian MT-4	62 aa 20 conserved Cys, P at C-term
m : mammalian MT	60-61 aa, 20 conserved Cys
a : avian MT	63 aa (Q insert after pos 3, P insert after pos 52), 20 conserved Cys, H at C-term
a1: avian MT-1	62 aa (H at pos 49), N at C-term
a2: avian MT-2	60 aa, MDCAC at N-term, additional aa before pos 53
b : batracian MT	60-61 aa, 20 Cys, 19 Cys conserved with all vertebrate MTs (Cys 55 instead of Cys 57), gap at pos 4,
ba : anura MT	Q at C-term
t : teleost MT	
Tiger shark MT	68 aa (insert of 5 aa end of second exon), 19 conserved Cys (not allow Cys substitution at pos 55 and 57, but 5 aa insertion before Cys 29) no gap at pos 4, S at C-term

물들과 같았다. 또한 C 말단의 아미노산 잔기는 포유류의 Ala, 양서류의 Asn, 조류의 His, 어류의 Gln (Binz and Kägi, 1999)과는 모두 다른 Ser을 갖는 특징을 나타내었다(Fig. 2, Table 1). 이와 같은 특징들은 각각의 분류군에 속하는 생물체들, 특히 어류와 다른 척추동물군들과 달리 연골어류인 두툽상어는 이들과는 다른 분자적 진화경로를 거쳐 진화되었음을 알 수 있다(Fig. 3).

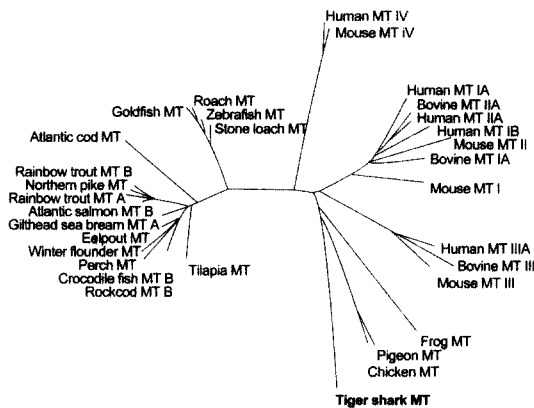


Fig. 3. Phylogenetic tree of vertebrate MT amino acids inferred using a Neighbor-joining program. Lines are proportional to the estimated branch lengths.

따라서 많은 생물체에서 그 기능이 잘 보존되어 있는 MT유전자의 이와 같은 특징들은 분자적 진화 과정을 알 수 있는 분자 표지유전자로 이용할 수 있을 것이다(Bargelloni *et al.*, 1999).

어류의 MT가 *Sebastes seaboides*에서 최초로 확인된 이래(Olafson and Tompson, 1974), 여러 어종들에서 MT 단백질(Hidalgo *et al.*, 1985), 중금속 내성 관련(Anadu *et al.*, 1989), 실험 또는 환경오염 조건에서 MT의 정량분석(Weber *et al.*, 1992) 등의 연구가 진행되고 있다. 특히 어류에서 체내 중금속 수준의 조절기작은 중간에 차이를 보이며, 중금속의 농도, 종, 기관, 연령, 발생단계 및 여러 생리적 요인 등에 따라 광범위한 차이를 보인다(Kägi and Schaffer, 1988; Linde *et al.*, 1999; Rotchell *et al.*, 2001). 따라서 해양 생물체들의 이러한 특성들의 분석을 통해 해양 생태환경의 중금속 오염 평가의 bioindicator로써 이용될 수 있을 것이다(Rainbow, 1995; Linde *et al.*, 2001; Rotchell *et al.*, 2001).

또한 MT의 발현은 중금속 뿐 아니라 glucocorti-

coid, catecholamine hormone의 처리(Bremner, 1991)와 기아(McNamara and Buckley, 1994), 온도(Hermesz *et al.*, 2001) 등에 의해서 MT의 발현 증가가 보고되고 있으며, 이에 따라 무지개송어(Samson *et al.*, 2001), 남극서식어류(Scudiero *et al.*, 2001), stone loach와 pike (Olsson and Kille, 1997) 등에서 MT 유전자 발현에 대한 다양한 조절 부위에 대한 연구가 진행되고 있다. 이러한 조절부위에 대한 연구는 향후 신기능성 형질전환 어류 등의 제조를 위해 어류 특이적인 유도 가능한 조절부위로 이용할 수 있을 것이다.

따라서 Cu, Zn 등 생체 중금속 대사기능 유지와, 해로운 중금속의 해독 등 모든 생물체에서 그 기능이 잘 보존된 MT 유전자는 분자 진화적인 표지유전자로써, 그리고 환경오염의 biomarker로 더 나아가 조절부위의 이용 가능성 등 그 유용성에 의거 원시어류를 포함하여 보다 여러 어종들에서 다양한 연구들이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

두툽상어의 간조직 cDNA library의 EST를 통해 중금속의 세포내 농도 조절과 환경으로부터 흡수한 유해 중금속의 해독작용 등의 기능을 수행하는 MT 유전자를 cloning하였다. 염기서열 분석 결과 두툽상어의 MT 유전자는 204 bp의 coding 영역과 182 bp의 3'UTR 영역으로 구성되어 있었으며, 종결코돈 이후 162 bp의 polyadenylatin 신호서열과 이로부터 15 bp 이후의 poly (A) 서열 등이 확인되었다. 염기서열로부터 유추한 68개의 아미노산 서열에는 다른 척추동물에서와 같이 Cys 잔기가 전체의 29.4% (20/68)로 풍부하였으며, 아미노산 서열 수준에서 포유류와는 43~54%, 어류들과는 41~45%의 상동성을 나타내었다. 특히 20개의 Cys는 어류와 18개가 다른 척추동물과는 19개가 잘 보존되어 있었다. 두툽상어 MT는 특이하게 모든 척추동물에서 잘 보존된 β -domain 끝 쪽의 9번째 Cys 앞에 5개의 아미노산을 더 갖고 있었으며, 경골어류 MT의 특징인 4번째 위치의 gap이 없고, 18번째 Cys의 위치가 어류와 달리 다른 척추동물들과 같았다. 또한 C 말단의 아미노산 잔기가 다른 생물체와는 모두 다른 Ser을 갖는 특징을 나타내었다. 이와 같은 두툽상어 MT유전자의 특징들은 연골어

류의 분자적 진화과정을 알 수 있는 분자 표지유전자로 이용할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 BK21과 NRL 연구비 지원으로 수행되었음.

참고 문헌

- Anadu, D.I., Chapman, G.A., Curtis, L.R. and Tubb, R.A. : Effect of zinc exposure on subsequent acute tolerance to heavy metals in rainbow trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43 : 329-336, 1989.
- Bargelloni, L., Scudiero, R., Parisi, E., Carginale, V., Capasso, C. and Patarnello, T. : Metallothioneins in antarctic fish : Evidence for independent duplication and gene conversion. *Mol. Biol. Evol.*, 16 : 885-897, 1999.
- Binz, P.A. and Kägi, J.H.R. : Metallothionein: molecular evolution and classification. In metallothionein IV, pp. 7-13., Klaassen, C. ed., Birkhauser Verlag, Basel, 1999.
- Bonham, K., Zafarullah, M. and Gedamu, L. : The rainbow trout metallothioneins: molecular cloning and characterization of two distinct cDNA sequences. *DNA*, 6 : 519-528, 1987.
- Bremner, I. : Nutritional and physiological significance on metallothionein. *Experientia Suppl.*, 52 : 81-107, 1991.
- Chan K.M., Davidson, W.S., Hew, C.L. and Fletcher, G.L. : Molecular cloning of metallothionein cDNA and analysis of metallothionein gene expression in winter flounder tissues. *Can. J. Zool.*, 67 : 2520-2527, 1989.
- Chan, K.M. : Metallothionein: potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Mar. Pollu. Bull.*, 31 : 411-415, 1995.
- Chan, K.M. : PCR-cloning of goldfish and tilapia metallothionein complementary DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205 : 368-374, 1994.
- Corpet, F. : Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, 16 : 10881-10890, 1988.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Bullerwell, C.E., Wolff, C., Munholland, J. and Reith, M.E. : Winter flounder expressed sequence tags: establishment of an EST database and identification of novel fish genes. *Mar. Biotechnol.*, 1 : 458-464, 1999.
- Ebadi, M. and Babin, D. : The amino acid composition of the zinc-induced metallothionein isoforms in rat brain. *Neurochem. Res.*, 14 : 69-73, 1989.
- Hamer, D.H. : Metallothionein. *Annu. Rev Biochem.*, 55 : 913-951, 1986.
- Harlow, P., Watkins, E., Thornton, R.D. and Nemer, M. : Structure of an ectodermally expressed sea urchin metallothionein gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol. Cell. Biol.*, 9 : 5445-5455, 1989.
- Hermesz, E., Abraham, M. and Nemcsok, J. : Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 128 : 457-465, 2001.
- Hidalgo, J., Tort, L. and Flos, R., : Cd-, Zn-, Cu-binding protein in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 81 : 159-165, 1985.
- Hunziker, P.E., Kaur, P., Wan, M. and Kanzig, A. : Primary structures of seven metallothioneins from rabbit tissue. *Biochem. J.*, 306 : 265-270, 1995.
- Kägi, J.H.R. : Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.*, 205 : 613-626, 1991.
- Kägi, J.H.R. and Schaffer, A. : Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27 : 8509-8515, 1988.
- Khoo, H.W. and Patel, K.H. : Metallothionein cDNA, promoter, and genomic sequences of the tropical green mussel, *Perna viridis*. *Exp. Zool.*, 284 : 445-453, 1999.
- Kille, P., Stephens, P.E. and Kay, J. : Elucidation of cDNA sequences for metallothioneins from rainbow trout, stone loach and pike liver using the polymerase chain reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1089 : 407-410, 1991.
- Kojima, Y. : Definitions and nomenclature of metallothionein. *Methods Enzymol.*, 205 : 8-10, 1991.
- Linde, A.R., Sanchez-Galan, S., Klein, D., Garcia-Vazquez, E. and Summer, K.H. : Metallothionein and heavy metals in brown trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44 : 168-173, 1999.
- Linde, A.R., Sanchez-Galan, S., Valles-Mota, P. and Garcia-Vazquez, E. : Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49 : 60-63, 2001.
- Masters, B.A., Quaipe, C.J., Erickson, J.C., Kelly, E.J., Froelick, G.J., Zambrowicz, B.P., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. : Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J. Neurosci.*, 14 : 5844-5857, 1994.
- McNamara, P.T. and Buckley, L.J. : Identification and characterization of metallothionein cDNA from mRNA transcripts induced by starvation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3 : 252-260, 1994.
- Nam, Y.K., Cho, Y.S., Douglas, S.E., Gallant, J.W., Reith, M.E. and Kim, D.S. : Isolation and transient expression of a cDNA encoding L-gulonolactone oxidase, a key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis, from the tiger shark *Scyliorhinus torazame*. *Aquaculture*, in printing, 2001.

- Olafson, R.W. and Tompson, J.A.J. : Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.*, 28 : 83-86, 1974.
- Olsson, P.E., Kling, P., Erkell, L.J. and Kille, O. : Structural and functional analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein-A gene. *Eur. J. Biochem.*, 230 : 344-349, 1995.
- Olsson, P.E., and Kille, P. : Functional comparison of the metal-regulated transcriptional control regions of metallothionein genes from cadmium-sensitive and tolerant fish species. *Biochim. Biophys. Acta*, 1350 : 325-334, 1997.
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. and Palmiter, R.D. : Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, 33 : 7250-7259, 1994.
- Rainbow, P.S. : Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Pollu. Bull.*, 31 : 183-192, 1995.
- Roesijadi, G., Kielland, S. and Klerks, P. : Purification and properties of novel molluscan metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 273 : 403-413, 1989.
- Rotchell, J.M., Clarke, K.R., Newton, L.C. and Bird, D.J. : Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination : age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Mar. Environ. Res.*, 52 : 151-171, 2001.
- Samson, S.L., Paramchuk, W.J. and Gedamu, L. : The rainbow trout metallothionein-B gene promoter: contributions of distal promoter elements to metal and oxidant regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1517 : 202-211, 2001.
- Scudiero, R., Carginale, V., Capasso, C., Riggio, M., Filosa, S. and Parisi, E. : Structural and functional analysis of metal regulatory elements in the promoter region of genes encoding metallothionein isoforms in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* (icefish). *Gene*, 274 : 199-208, 2001.
- Stennard, F.A., Holloway, A.F., Hamilton, J. and West, A.K. : Characterization of six additional human metallothionein genes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1218 : 357-365, 1994.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. : CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22 : 4673-4680, 1994.
- Vallee, B.L. : Introduction to metallothionein. *Methods Enzymol.*, 205 : 3-7, 1991.
- Weber, D.N., Eisch, S., Spieler, R.E. and Petering, D.H. : Metal redistribution in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in response to restraint stress and dietary cadmium: role of metallothionein and other metal-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 101 : 255-262, 1992.