

붉바리 (*Epinephelus akaara*)의 성장호르몬 cDNA의 Cloning과 *E. coli*에서의 발현

강거영 · 송춘복 · 이제희*
제주대학교 해양생물공학과

Cloning of Growth Hormone Complementary DNA from Red-Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*) and Its Expression in *E. coli*

Geo-Young Kang, Choon-Bok Song and Je-Hee Lee*
Department of Marine Biotechnology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

We have cloned and sequenced the cDNA encoding growth hormone (GH) from pituitary poly(A)⁺ RNA of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). The cDNA of red-spotted grouper GH is 883 base pairs (bp) consisting of 21 bp of 5' untranslated region (UTR), 615 bp of an open reading frame (ORF) and 247 bp of 3' UTR. The polyadenylation signal, AATAAA, was 20 bp upstream of polyadenylation site. Based on the nucleotide sequences, the deduced putative polypeptide contains 204 amino acids (aa), representing 17 aa of a signal and 187 aa of a mature polypeptide. The putative GH cDNA encodes a polypeptide with four cysteine residues and only one N-glycosylation site. Comparative sequence alignment shows that red-spotted grouper GH exhibits high similarity with its corresponding other Perciformes species GH cDNAs.

Keywords: Growth hormone, cDNA, Red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*, Expression in *E. coli*

서 론

어류의 성장호르몬은 약 21~22 kDa의 single chain polypeptide로서, 뇌하수체 전엽의 somatotrophs(growth hormone cells 또는 α cells)에서 생산되어, vascular system으로 방출된다(Rand-Weaver and Kawachi, 1993). 이 호르몬은 다양한 생물학적 활성을 가진 다기능성 호르몬으로서(Björnsson, 1997), 척추동물에서 체성장의 조절과 질소, 지질, 탄수화물 및 무기물 대사에 관여한다(Chen et al., 1994). 또한, 성장호르몬은 연어과 어류에서 해수 적응 시기의 삼투압 조절(Dickhoff et al., 1997; Sakamoto et al., 1997)과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 성장호르몬의 활성은 insulin-like growth factor I에 의하여 매개되는 것으로 알려져 있다(Gray and Kelley, 1991; Moriyama et al., 2000).

Niall et al.(1971)과 Miller and Eberhardt(1983)는 nucleotide와 아미노산 서열 분석에 근거하여 성장호르몬 유전자의 진화적 기원에 대한 모델을 제안하였다. 즉, 성장호르몬(growth hormone, GH), prolactin(PRL), placental lactogen(PL)과 somatolactin

(SL)은 공동의 조상 호르몬으로부터 중복, 결실, 삽입과 치환 등을 통하여 진화된 것으로 여겨지고 있다(Rand-Weaver and Kawachi, 1993).

어류의 성장호르몬은 양식 산업에서 잠재적인 성장 촉진 인자로서 그 중요성을 인정받아 본 호르몬을 암호화하고 있는 유전자들의 물리·화학적 특성에 대한 연구가 진행되고 있다. 또한, 성장호르몬의 투여가 일부 어종에서 성장률을 증가시킨다고 보고되었다(Agellon et al., 1988a; Du et al., 1992; Ayson et al., 2000). 최근까지, 농어목에서 분리된 성장호르몬 cDNA는 tuna(Sato et al., 1988), yellow tail(Watahiki et al., 1988), red sea bream(Momota et al., 1988), gilthead seabream (Funkenstein et al., 1991), European sea bass(Doliana et al., 1992), yellowfin porgy(Tsai et al., 1993), rabbitfish(Ayson et al., 2000), dolphinfish(Peduel et al., 1994) 등에서 그 염기서열들이 밝혀졌다. 성장호르몬의 genomic sequence는 rainbow trout (Agellon et al., 1988b), Atlantic salmon(Johansen et al., 1989), common carp(Chiou et al., 1990), barramundi(Yowe and Epping, 1995), gilthead sea bream(Almuly et al., 2000), flounder(Tanaka et al., 1995) 등에서 확인되었다.

붉바리는 농어목(Perciformes), 바리과(Serranidae), 우레기속

*Corresponding author: jehee@cheju.ac.kr

(*Epinephelus*)에 속하며, 전장 400 mm 내외까지 성장하는 온수성 어류로서, 우리나라와 일본에서 고가의 어종으로 수요가 많아 일찍부터 양식기술개발이 시도되고 있다. 그러나 붉바리의 종묘생산기술은 확립되지 않은 실정이다.

붉바리와 같이 성장이 느리고 경제적으로 중요한 어종은 성장호르몬과 같은 성장 촉진인자의 처리에 좋은 대상종이 되므로, 우리는 이 연구에서 양식기술개발이 이루어진 후에 그 공급과 수요가 증대될 것으로 예상되는 붉바리로부터 성장호르몬을 암호화하고 있는 cDNA를 cloning하여 그 염기서열을 밝히고 아미노산 서열을 추정하였으며, *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 그 단백질 산물에 대한 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

시료채취 및 primer의 설계

어시장에서 채집한 살아있는 제주산 붉바리(*E. akaara*)를 마취시켜 신선한 상태로 뇌하수체를 적출하였다. 분리한 뇌하수체는 액체질소로 급속 동결하고, 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.

GenBank에 등록된 이미 밝혀진 진골어류의 성장호르몬 cDNA의 염기서열을 이용하여 붉바리로부터 성장호르몬을 암호화하고 있는 Open reading frame(ORF)을 포함한 5' untranslated region(UTR)과 3' UTR을 증폭할 수 있도록 상동성이 가장 높은 부분(3' 말단에 가까운 한 부분)의 염기서열을 3'과 5' partial

| | | | |
|-----|--|-----------------------------|-----|
| 1 | | 5' -- GGACCTAATCCCAGACCAGCC | 21 |
| 22 | ATG GAC CGA GTC GTC CTC CTG CTG TCA GTA GTG TCT CTG GGC GTT TCC TCT CAG CCA ATC | | 81 |
| 1 | M D R V V L L L S V V S L G V S S Q P I | | 20 |
| 82 | ACA GAC GGC CAG CGA CTG TTC TCC ATC GCT GTC AGC AGA GTT CAA CAT CTC CAC CTG CTT | | 141 |
| 21 | T D G Q R L F S I A V S R V Q H L H L L | | 40 |
| 142 | GCT CAG AGA CTC TTC TCC GAC TTT GAG AGC AGT CTG CAG ACA GAG GAG CAG CGA CAG CTC | | 201 |
| 41 | A Q R L F S D F E S S L Q T E E Q R Q L | | 60 |
| 202 | AAC AAG ATC TTC CTG CAG GAC TTT TGT AAC TCT GAT TAC ATC ATC AGC CCC ATT GAC AAG | | 261 |
| 61 | N K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K | | 80 |
| 262 | CAT GAG ACG CAG CGC AGC TCC GTG TTG AAG CTG TTG TCG ATC TCC TAT CGG TTG GTG GAG | | 321 |
| 81 | H E T Q R S S V L K L L S I S Y R L V E | | 100 |
| 322 | TCC TGG GAG TTC CCC AGT CGG TCC CTG TCC GGA GGT TCT GCT CCC AGA AAT CAG ATT TTT | | 381 |
| 101 | S W E F P S R S L S G G S A P R N Q I F | | 120 |
| 382 | CCC AAA CTG TCT GAA TTG AAA ACT GGG ATC CTG CTG CTG ATC AGG GCC AAT CAG GAC GGA | | 441 |
| 121 | P K L S E L K T G I L L L I R A N Q D G | | 140 |
| 442 | GCG GAG CTC TTT CCT GAC ACG TCC GCC CTC CAG TTG GCT CCT TAT GGG AAC TAT TAT CAG | | 501 |
| 141 | A E L F P D T S A L Q L A P Y G N Y Y Q | | 160 |
| 502 | AGT CTG GGC GCA GAC GAG TCG CTG CGA CGA ACG TAC GAA CTG CTG GCG TGT TTC AAG AAA | | 561 |
| 161 | S L G A D E S L R R T Y E L L A C F K K | | 180 |
| 562 | <u>GAC ATG CAC AAG GTG GAG ACC</u> TAC CTG ACG GTG GCT AAA TGT CGA CTC TCT CCT GAG GCC | | 621 |
| 181 | D M H K V E T Y L T V A K C R L S P E A | | 200 |
| 622 | AAC TGT ACC CTG TAG CCCCGCCTCCAGTATGAAGACAAGCCCCATGTGGATGATGTAATGCTGTGTGTCT | | 695 |
| 201 | N C T L * | | 204 |
| 686 | GTAGTCCCGCCACATGTTTCTGACTCTGCTAATTAGCATTAGTGTTAGCCACAGTGTAGCCTGTGTTTCAGTGGTTT | | 774 |
| 775 | GTTGGAGCAGGTGTTATTATGATGACAGCCGTCGACAGGAAGTGATGTCATTTGCCACCATGTGT AATAA AGTGTGT | | 852 |
| 853 | GCTGTGTTGCATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA -- 3' | | 883 |

Fig. 1. The nucleotide sequence of growth hormone complementary DNA from red-spotted grouper, *E. akaara* and its deduced amino acid sequence. The amino acid residues are numbered. The termination codon is indicated by an asterisk. The four cysteine residues and the polyadenylation signal are in bold. The nucleotide sequences used for amplification of the cDNA are underlined.

cDNA clone을 증폭하는 primer로 사용하였으며, 이 primer의 염기서열을 Fig. 1에 밑줄로 나타내었다. 이 primer들은 각각 3'과 5' partial cDNA clone들의 증폭을 위한 특이적인 primer (Eaka-F1, 5'-GACATGCACAAGGTGGAGAC-3'; Eaka-R1, 5'-GTCTCCACCTTGTGCATGC-3')들로서 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성하였다.

mRNA 분리, 성장호르몬 cDNA의 3'과 5' 단편의 PCR 증폭 및 cloning

북바리의 뇌하수체 조직 0.1 g으로부터 Micro FastTrack™ Kit (Invitrogen)을 이용하여 mRNA를 추출하여 정제하였다. 정제된 mRNA를 주형으로 하여 1st-strand cDNA Synthesis Kit (Clontech)를 이용하여 single strand cDNA를 합성하였다. cDNA를 주형으로 사용하고 poly(A) tail과 상보적인 dT(20 nt) primer와 Eaka-F1 primer, Pfu DNA polymerase (Stratagene)를 사용하여 북바리 성장호르몬 cDNA의 3' 일부분을 증폭하였다. 3' cDNA 단편의 증폭을 위한 PCR 조건은 94°C에서 2분간 denaturation 과정을 거친 후에, 94°C에서 1분 동안의 denaturation, 50°C에서 1분 동안의 annealing, 72°C에서 40초 동안의 extension 반응을 30 주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다.

그리고 5' partial region을 증폭하기 위하여 single strand cDNA의 3' 말단에 terminal deoxynucleotidyl transferase (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 poly(G) tail을 인위적으로 붙였다. Terminal deoxynucleotidyl transferase에 의해 생성된 poly(G) tail과 상보적인 dC(18 nt) primer와 Eaka-R1 primer를 이용하여 5' cDNA 단편을 증폭하였다. 5' cDNA 단편의 증폭을 위한 PCR 조건은 3' cDNA 단편의 증폭을 위한 반응 조건과 동일하게 하였다. 증폭된 DNA 단편은 1% agarose gel에 전기영동하여 각 cDNA 단편의 크기를 확인하였다. 증폭된 3'과 5' cDNA 단편을 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals)을 이용하여 정제하였다. 3'과 5' cDNA 단편의 염기서열을 밝히기 위하여 *HincII*로 절단된 pBluescript SK(-) vector에 T4 DNA ligase (Takara)를 이용하여 삽입하였다.

성장호르몬 cDNA의 염기서열 결정

pBluescript SK(-) vector에 삽입된 cDNA 단편을 DH5 α competent cell에 형질전환시킨 다음 100 μ g/ml의 ampicillin, 80 μ g/ml의 X-gal, 1 mM의 IPTG를 함유한 LB plate에 도말하였다. LB plate 상의 white colony를 1.5 ml LB-ampicillin(100 μ g/ml) 액체배지에 overnight 배양한 후에, High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다.

추출된 plasmid DNA를 Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 자동염기서열분석장치인 SEQ 4 \times 4 personal sequencing

system (Amersham Pharmacia Biotech)으로 염기서열을 확인하였다. 결정된 염기서열은 Clustal W (Thompson et al., 1994)를 이용하여 이미 밝혀진 다른 어류의 성장호르몬 cDNA 자료와 그 상동성을 조사하였고, 아미노산 서열을 추정하였다.

*E. coli*에서 북바리 성장호르몬 cDNA의 발현

이미 실험을 통하여 확인된 3'과 5' partial region의 염기서열에 근거하여 제작된 한 쌍의 primer (Eaka-N, 5'-GAGACATATGGACCGAGTCGTCCTCTCT-3'; Eaka-C, 5'-TCTCGGATCCCTACAGGGTACAGTTGGCCT-3')를 이용하여 완전한 cDNA clone을 first strand cDNA로부터 증폭하였다. *E. coli*에서의 북바리 성장호르몬 cDNA의 발현실험은 signal peptide를 포함한 성장호르몬 전체 peptide를 암호화하고 있는 부위(615 bp; 204 aa)와 mature peptide 만을 암호화하고 있는 부위(564 bp; 187 aa)에 대하여 수행되었다. 각각의 polypeptide를 암호화하고 있는 염기서열 부위를 *NdeI*과 *BamHI* 제한부위가 삽입되도록 특이적으로 디자인된 primer들을 이용하여 각각 PCR 증폭한 후에, 그 PCR 산물들을 pET-11a vector (Novagen)의 *NdeI*과 *BamHI* site에 T4 DNA ligase (Takara)를 이용하여 ligation한 후 DH5 α 에 형질전환시켰다. 형질전환체는 ampicillin(100 μ g/ml)을 포함한 LB plate에서 선별하였다. 선별된 colony로부터 plasmid DNA를 분리한 후, *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하여 삽입된 북바리의 GH 유전자를 확인하였다.

확인된 plasmid DNA를 T7 RNA polymerase 유전자를 가지고 있는 BL21(DE3) cell로 형질전환하고 ampicillin(100 μ g/ml)을 포함한 LB plate에 도말하여 overnight 배양하였다. 생성된 single colony를 ampicillin(100 μ g/ml)을 포함한 LB 액체배지(3 ml, starter culture)에 접종하여 37°C 교반기에서 overnight 배양하였다. Overnight시킨 배양액 중에서 약 200 μ l를 ampicillin이 포함된 2 ml의 LB 액체배지에 접종하여 OD₆₀₀가 0.6이 될 때까지 37°C 교반기에서 배양하였다. 단백질 발현의 유도를 위하여 이 배양액에 IPTG를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 30°C 교반기에서 3시간 더 배양하였다. 배양액 250 μ l를 원심분리하여(16,000 \times g, 5분) 상등액을 제거하였다. 상등액을 제거한 cell pellet에 50 μ l의 ddH₂O와 50 μ l의 Laemmli sample buffer를 첨가하여 잘 부유시켰다. 부유된 cell을 95°C에서 10분 동안 단백질 변성시킨 후 12%의 resolving gel과 4%의 stacking gel의 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 분석을 수행하였다. Resolving gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 6시간 염색한 후 하루동안 탈색시켜 확인하였다.

결 과

북바리 성장호르몬 cDNA의 염기 서열과 아미노산 서열 추정

이 실험을 통하여 밝혀진 북바리의 완전한 cDNA 서열과 추정된 아미노산 서열을 Fig. 1에 나타내었다. 북바리의 완전한

cDNA 서열은 전체 883 bp로서, 615 bp로 이루어진 ORF와 21 bp의 5' UTR과 247 bp의 3' UTR로 이루어진 non-coding region을 포함하고 있다. 대부분의 진핵생물 mRNA들에서 관찰되는 것처럼, polyadenylation site의 시작 위치로부터 20 bp 상류 쪽에 polyadenylation signal인 AATAAA가 위치하였다. 염기서열에 근거하여 추정된 붉바리의 성장호르몬은 187 aa의 mature

peptide 서열과 17 aa의 signal peptide 서열을 포함한 204개의 아미노산으로 이루어진 polypeptide로 추정되었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 붉바리의 성장호르몬 cDNA를 증폭하기 위하여 사용된 Eaka-F1와 Eaka-R1 primer 부위는 cDNA 염기서열의 562-581번째 위치에 있는 것으로 밝혀졌다.

염기서열에 근거하여 추정된 붉바리의 성장호르몬을 암호화

| | | |
|----------------------------------|---|-----|
| <i>Epinephelus akaara</i> | MDRVVLLLSV VSLGVSSQPI TQGQRLFSIA VSRVQHLHLL AQLRFSDFES SLQTEEQRQL | 60 |
| <i>Epinephelus coioides</i> | ----- | 60 |
| <i>Acanthopagrus latus</i> | ----M-- L----- | 60 |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | --AI-----L-V-----E-----E--HN-----E----- | 60 |
| <i>Lates calcarifer</i> | -----L-----S-----R-E----- | 60 |
| <i>Oreochromis mossambicus</i> | -NS--Q--C--Q--S--N--T--Y----- | 60 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | -NS-----C--Q--S--N--T----- | 60 |
| <i>Perca flavescens</i> | -E-A----L L-----I-E----- | 60 |
| <i>Pseudosciaena crocea</i> | ---L----LT----Q IEN---MD AT----- | 60 |
| <i>Seriola quinqueradiata</i> | -----L-----S-H-----I-N-----N--T--D-- | 60 |
| <i>Sparus aurata</i> | -----M----- | 60 |
| <i>Trichogaster trichopterus</i> | --K-L-F- L-----S-----T-----I----- | 60 |
| <i>Epinephelus akaara</i> | NKIFLQDFCN SDYIISPDK HETQRSSVLK LLSISYRLVE SWEFPPSRSL GGSAPRNQIF | 120 |
| <i>Epinephelus coioides</i> | -----S----- | 120 |
| <i>Acanthopagrus latus</i> | -----A-----S | 120 |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | -----I-----V-P-A--S | 120 |
| <i>Lates calcarifer</i> | -----S-----D-S | 120 |
| <i>Oreochromis mossambicus</i> | -----G-----SL--S | 120 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | -----G-----SL--S | 120 |
| <i>Perca flavescens</i> | -----VS--S | 120 |
| <i>Pseudosciaena crocea</i> | -----S | 120 |
| <i>Seriola quinqueradiata</i> | -----S-F--L--S | 120 |
| <i>Sparus aurata</i> | -----S | 120 |
| <i>Trichogaster trichopterus</i> | -----I-----Y--Q-Y--S | 120 |
| <i>Epinephelus akaara</i> | PKLSELKTGI LLLIRANQDG AELFPDTSAL QLAPYGNYYQ SLGADESLRR TYELLAC CF KK | 180 |
| <i>Epinephelus coioides</i> | -----S----- | 180 |
| <i>Acanthopagrus latus</i> | -----H--E--S--D--P-T----- | 180 |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | -----V--G--M--S-T----- | 180 |
| <i>Lates calcarifer</i> | -----M-S-S----- | 180 |
| <i>Oreochromis mossambicus</i> | -R-----E--NY--DT- H-----GN--Q | 180 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | -R-----E--NY--DT- H-----GN--Q | 180 |
| <i>Perca flavescens</i> | -----K-SE--S--ST----- | 180 |
| <i>Pseudosciaena crocea</i> | -----M-----A--I--N-----SGE----- | 180 |
| <i>Seriola quinqueradiata</i> | -R-----Q--T--M-S-V--F--GE-L--N----- | 180 |
| <i>Sparus aurata</i> | -----H--E--I--S-----T----- | 180 |
| <i>Trichogaster trichopterus</i> | -----MR- Q--K--M-S-GVVP-----E-----S----- | 180 |
| <i>Epinephelus akaara</i> | DMHKVETYLT VAKCRLSPEA NCTL | 204 |
| <i>Epinephelus coioides</i> | ----- | 204 |
| <i>Acanthopagrus latus</i> | ----- | 204 |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | ----- | 204 |
| <i>Lates calcarifer</i> | ----- | 204 |
| <i>Oreochromis mossambicus</i> | ----- | 204 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | ----- | 204 |
| <i>Perca flavescens</i> | ----- | 204 |
| <i>Pseudosciaena crocea</i> | ----- | 204 |
| <i>Seriola quinqueradiata</i> | ----- | 204 |
| <i>Sparus aurata</i> | ----- | 204 |
| <i>Trichogaster trichopterus</i> | ----- | 204 |

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequence of red-spotted grouper GH with other Perciformes GHs. Dashes (-) indicate amino acid residues identical to those of red-spotted grouper GH. Four highly conserved cysteins are in bold. The sequence of red-spotted grouper (*E. akaara*) GH is compared with the sequences of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, AY038606, unpublished), yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*, S58867, Tsai et al., 1993), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, X65716, Doliana et al., 1992), barramundi perch (*Lates calcarifer*, U16816, Yowe and Epping., 1995), Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*, AF033805, unpublished), tilapia (*Oreochromis niloticus*, M84774, unpublished), yellow perch (*Perca flavescens*, AY007303, unpublished), croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*, AF231941, unpublished), yellow tail (*Seriola quinqueradiata*, M35627, Watahiki et al., 1988), gilthead seabream (*Sparus aurata*, AF195646, Almuly et al. 2000), and three spot gourami (*Trichogaster trichopterus*, AF157633, unpublished) GHs.

하고 있는 coding region은 전체 615 base들로서, 22-24번째 위치에 있는 번역 개시코돈인 ATG로 시작되어 634-636번째 위치에 있는 번역 종결코돈인 TAG로 종결되며, 17 aa의 signal peptide 서열과 187 aa의 matured peptide 서열을 포함한 204개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 추정되었다. 또한, 단백질의 C 말단 쪽의 201-203 번째 위치에 추정상의 N-glycosylation site(Asn-Xaa-Thr/Ser)가 존재하는 것으로 추정되었다. Fig. 2에서 보면, 붉바리 성장호르몬의 추정된 아미노산 서열은 69, 177, 194와 202번째 위치에 4개의 cysteine 잔기를 포함하고 있는 것으로 밝혀졌는데, 비교한 다른 농어목 어류들과 동일한 위치에 위치하고 있었다.

붉바리 성장호르몬 coding region의 염기서열을 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 다른 농어목 어류와 비교해 본 결과 orange-spotted grouper, gilthead seabream, yellowfin seabream, barramundi perch, yellow tail, croceine croaker, yellow perch, European sea bass, tilapia, Mozambique tilapia와 three spot gourami에 대하여 각각 96.9%, 88.6%, 88.0%, 86.7%, 85.7%, 85.5%, 85.0%, 84.6%, 83.4%, 82.4%와 80.8%의 높은 유사성을 보였고, 추정된 아미노산 서열은 각각 98.5%, 96.1%, 95.1%, 95.1%, 88.7%, 90.7%, 92.6%, 90.7%, 89.7%, 88.7%와 87.7%의 높은 상동성을 보였다(Table 1). 한편, 사람(GenBank accession number, AAA98618)과 소(GenBank accession number, AAA30543)의 성장호르몬 아미노산 서열과 비교한 결과는 각각 33.8%와 37.6%의 낮은 상동성을 보였다(data not shown).

*E. coli*에서 붉바리 성장호르몬 cDNA의 발현

붉바리 성장호르몬 coding region의 아미노산 조성으로부터 추정된 signal peptide와 mature peptide를 포함한 전구체호르몬과 mature peptide 만을 포함한 성숙한 성장호르몬의 분자량은 Compute pI/Mw tool을 사용하여 계산하였으며, 각각 약 23.1 kDa과 21.3 kDa이었다(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html). SDS-PAGE 분석결과 *E. coli*에서 발현된 성장호르몬 산물은 추정된 단백질의 분자량과 일치하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 3).

고 찰

본 연구를 통하여 붉바리의 뇌하수체로부터 mRNA를 분리·정제하여 성장호르몬을 암호화하고 있는 것으로 추정되는 완전한 cDNA를 cloning하고 그 염기 서열이 규명되었다. 같은 우레기 속에 속하는 GenBank에 등록된 orange-spotted grouper (*E. coioides*)의 성장호르몬 ORF 염기서열과 아미노산서열을 이 연구를 통하여 밝혀진 붉바리의 성장호르몬 ORF 염기서열과 아미노산서열과 비교한 결과, 각각 96.9%와 98.5%로서 매우 높은 상동성을 보였다(Table 1).

붉바리의 성장호르몬을 암호화하는 것으로 여겨지는 완전한 cDNA의 염기서열은 Rapid Amplification of cDNA Ends

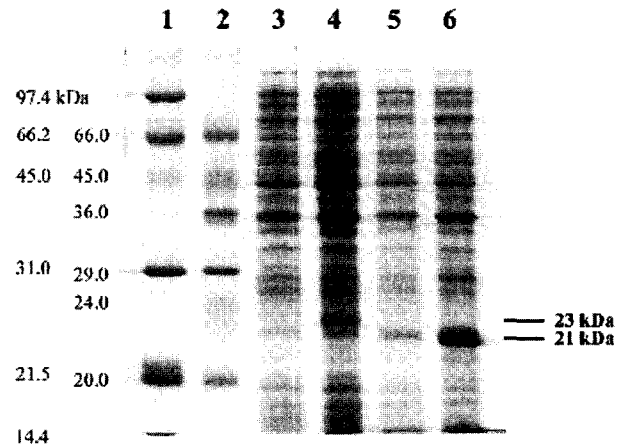


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the crude GH protein of the red-spotted grouper expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cell cultures following induction and non-induction of transformants. The transformed cells presented in lanes 4 and 6 were induced by IPTG as described in Materials and Methods. Lane 1: SDS-PAGE molecular weight standards, low range (BIO-RAD). Lane 2: The low molecular weight range (Sigma). Lane 3: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the GH ORF region (non-induced with IPTG). Lane 4: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the GH ORF region (induced with IPTG). Lane 5: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the mature GH region (non-induced with IPTG). Lane 6: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the mature GH region (induced with IPTG). The GH proteins expressed are indicated. These bands are absent in the non-induction *E. coli* BL21 (DE3) crude lysate presented in lanes 3 and 5.

(RACE) 방법을 (Schaefer, 1995) 응용하여 밝혀졌는데, 밝혀진 완전한 cDNA의 염기서열로부터 추정된 붉바리 성장호르몬 단백질은 17 aa의 signal peptide와 178 aa의 mature peptide로 구성되어 있는 것으로 추정되었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 붉바리의 signal peptide는 17 aa으로 이루어져 있는데, 인간 GH(26 aa; Seeburg, 1982), 소 GH(27 aa; Seeburg et al., 1983) 및 Indian catfish GH(22 aa; Anathy et al., 2001)와 비교하여 짧은 것으로 추정되었다.

추정된 붉바리 성장호르몬은 지금까지 보고된 다른 농어목 어류와 마찬가지로 4개의 cysteine 잔기가 매우 보존된 위치에 위치하고 있다(Fig. 2). 지금까지 보고된 경골어류의 성장호르몬 대부분은 4개의 cysteine 잔기를 가지고 있는데, 이는 2개의 분자간 이황화 결합의 형성을 매개함으로써 그 호르몬의 3차원 구조를 형성하게 하는데 기여하는 것으로 알려져 있다(Schneider et al., 1992; Somers et al., 1994; Carlacci et al., 1991). Schneider et al.(1992)은 이러한 영역의 존재로 인하여 척추동물 성장호르몬 서열 간의 강한 상동성이 진화적으로 유지되는 것으로 보고하였다. 일부 어종의 경우에 있어서 5개의 cysteine 잔기가 존재한다고 보고되었으며, Mahmoud et al.(1996)은 이러한 추가적인 cysteine 잔기는 common carp에서 수용체에 결합하는데 영향을 줄 수 있다고 보고하였다.

Table 1. Percentage nucleotide and amino acid sequence homology of the GH cDNAs of Perciformes species. The values below the diagonal are the similarity of amino acid sequences among Perciformes (total 204 amino acid residues), the numbers above the diagonal are the similarity of nucleotide sequences (total 615 nucleotides) for each pair.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. <i>Epinephelus akaara</i> | - | 96.9 | 88.0 | 84.6 | 86.7 | 82.4 | 83.4 | 85.0 | 85.5 | 85.7 | 88.6 | 80.8 |
| 2. <i>Epinephelus coioides</i> | 98.5 | - | 89.6 | 86.8 | 88.3 | 83.6 | 84.6 | 87.0 | 86.8 | 86.7 | 90.4 | 81.8 |
| 3. <i>Acanthopagrus latus</i> | 95.1 | 95.6 | - | 88.0 | 87.8 | 83.3 | 84.1 | 87.0 | 88.3 | 86.5 | 97.6 | 83.3 |
| 4. <i>Dicentrarchus labrax</i> | 90.7 | 91.2 | 88.7 | - | 86.8 | 82.4 | 83.3 | 85.5 | 86.8 | 85.0 | 88.8 | 80.3 |
| 5. <i>Lates calcarifer</i> | 95.1 | 95.6 | 93.1 | 90.7 | - | 84.6 | 85.2 | 87.6 | 86.2 | 89.6 | 88.6 | 84.9 |
| 6. <i>Oreochromis mossambicus</i> | 88.7 | 88.2 | 85.8 | 83.3 | 86.3 | - | 98.7 | 81.0 | 83.6 | 82.6 | 84.1 | 79.2 |
| 7. <i>Oreochromis niloticus</i> | 89.7 | 89.2 | 86.3 | 84.3 | 87.3 | 99.0 | - | 82.1 | 84.1 | 83.7 | 84.7 | 80.0 |
| 8. <i>Perca flavescens</i> | 92.6 | 93.1 | 92.6 | 89.2 | 92.2 | 84.3 | 85.3 | - | 84.7 | 84.6 | 86.7 | 81.0 |
| 9. <i>Pseudosciaena crocea</i> | 90.7 | 90.7 | 88.7 | 86.3 | 89.2 | 85.3 | 86.3 | 87.3 | - | 85.4 | 89.8 | 80.5 |
| 10. <i>Seriola quinqueradiata</i> | 88.7 | 89.7 | 87.3 | 85.3 | 90.7 | 83.3 | 84.3 | 85.8 | 84.8 | - | 87.0 | 84.6 |
| 11. <i>Sparus aurata</i> | 96.1 | 96.6 | 97.5 | 89.7 | 94.1 | 87.3 | 87.7 | 93.1 | 90.2 | 88.2 | - | 83.9 |
| 12. <i>Trichogaster trichopterus</i> | 87.7 | 87.7 | 86.8 | 84.8 | 88.7 | 81.4 | 82.4 | 84.8 | 83.8 | 84.8 | 87.3 | - |

Venkatesh and Brenner(1997)는 참복과 다른 진골어류의 성장호르몬 아미노산 서열의 비교를 통하여 signal peptide를 포함하는 N 말단 부위가 가장 분기가 심하고, C 말단은 고도로 보존되어 있다고 보고하였다. 또한, 그들은 진골어류 성장호르몬 모두에 있어서 C 말단의 13 잔기(CFKKDMHKVETYL)가 매우 보존되어 있으며, 진골어류에 특이적인 이러한 보존된 잔기들은 진골어류 성장호르몬과 그 수용체들 간의 상호작용에 중요한 잔기일 것이라고 추정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 이 연구를 통하여 밝혀진 붉바리 성장호르몬과 지금까지 밝혀진 다른 농어목 어류의 성장호르몬 아미노산의 비교에서도 N 말단 부위의 signal peptide 부위가 가장 분기가 심하고, C 말단 부위가 가장 잘 보존되어 있는 것으로 밝혀졌다. 그리고 Venkatesh and Brenner(1997)가 보고한 진골어류 특이적인 보존된 13잔기들도 동일한 위치에 존재하는 것으로 밝혀졌다.

양식 생산성의 개선을 위한 성장호르몬의 응용은 수많은 어류 성장호르몬의 cloning, 염기서열 결정 및 어류에 대한 형질 전환 기법의 개발에 기인하여 가능하게 되었다. 실제로 Zhu et al.(1985)이 생쥐의 metallothioneine gene promoter와 사람의 성장호르몬 유전자를 금붕어에 이식한 것을 시작으로 성장 촉진 등의 목적으로 빠르게 성장할 수 있는 형질전환 어류의 생산에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다. 최근에는 Nam et al.(2001)이 미꾸라지 β -actin promoter와 성장호르몬 유전자를 융합한 미꾸라지 유래의 유전자를 미세주입법에 의하여 형질전환시킴으로써 성장촉진 효과와 다음 세대로의 안정적인 전달을 보고한 바 있다.

이 연구는 붉바리 유래의 성장호르몬 유전자와 그 산물인 성장호르몬을 이용하여 속성장 및 초기감포현상이 일어나는 위험 시기의 성장기간을 단축시키려는 연구의 기초실험으로 성장호르몬의 cDNA를 cloning하고 *E. coli*에서의 발현을 유도하였다. 그러나 아직까지 붉바리의 종묘생산이 안정적으로 이루어지지 않아 붉바리를 대상으로 성장호르몬과 그 유전자의 이용은 어려운 실정이지만 현재 아시아의 여러 국가에서 붉바리의 종묘

생산에 대한 연구가 진행되고 있으며, 같은 속에 속하는 농성어류의 종묘생산에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다. 따라서, 멀지 않은 장래에 붉바리의 종묘생산이 안정적으로 이루어지게 된다면 이 연구의 결과를 유용하게 이용할 수 있으리라고 여겨진다.

요 약

붉바리(*E. akaara*)의 뇌하수체에서 추출한 mRNA로부터 RACE 방법으로 cDNA를 cloning하고 염기서열을 분석하였다. 붉바리의 성장호르몬 cDNA는 5' UTR, open reading frame, 3' UTR이 각각 21 bp, 615 bp, 247 bp인 전체 883 bp로 구성되어 있다. Adenylation signal로 작용하는 sequence인 AATAAA는 poly(A)로부터 20 bp upstream에 위치하는 것을 확인하였다. 염기서열을 바탕으로 추정된 성장호르몬은 204개의 아미노산으로 구성된 단백질로서 signal peptide(17 aa)와 mature protein(187 aa)을 포함하고 있으며 mature protein의 분자량은 21.3 kDa로 나타났다. 이 호르몬은 단백질의 3차 구조에 중요한 이황화 결합을 할 수 있는 4개의 cysteine 잔기와 1개의 N-glycosylation site를 가지고 있었다. 붉바리 성장호르몬의 염기서열은 농어목에 속하는 다른 어류의 성장호르몬 염기서열과의 유사도가 높게 나타났으며 orange-spotted grouper, gilthead seabream과 각각 96.9%, 88.6%의 상동성을 보였다.

사 사

이 논문은 해양수산부 수산특정연구개발사업에 의해 지원되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

Agellon, L. B., C. J. Emery, J. M. Jones, S. L. Davies, A. D. Din-

- gle and T. T. Chen, 1988a. Promotion of rapid growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by a recombinant fish growth hormone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**: 146–151.
- Agellon, L. B., S. L. Davies, T. T. Chen and D. A. Powers, 1988b. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5136–5140.
- Almuly R., B. Cavari, H. Ferstman, O. Kolodny and B. Funkenstein, 2000. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: identification of minisatellite polymorphism in intron I. *Genome*, **43**: 836–845.
- Anathy, V., T. Venugopal, R. Koteeswaran, T. J. Pandian and S. Mathavan, 2001. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). *J. Biosci.*, **26**: 315–324.
- Ayson, F. G., E. G. de Jesus, Y. Amemiya, S. Moriyama, T. Hirano and H. Kawauchi, 2000. Isolation, cDNA cloning, and growth promoting activity of rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **117**(2): 251–259.
- Björnsson, B. Th., 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiol. Biochem.*, **17**: 9–24.
- Carlacci, L., K. C. Chou and G. M. Maggiora, 1991. A heuristic approach to predicting the tertiary structure of bovine somatotropin. *Biochemistry*, **30**: 4389–4398.
- Chiou, C. S., H. T. Chen and W. C. Chang, 1990. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta.*, **1087**: 91–94.
- Chen, T. T., A. Marsh, M. Shablott, K. M. Chan, Y. L. Tang, C. M. Cheng and B. Y. Yang, 1994. Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes. (in) *Fish Physiology 8*, (eds) W. S. Hoar, et al., Academic Press, New York, pp. 179–209.
- Dickhoff, W. W., B. R. Beckman, D. A. Larsen, C. Duan and S. Moriyama, 1997. The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification. *Fish Physiol. Biochem.*, **17**: 231–236.
- Doliana, R., M. Bortolussi and L. Colombo, 1992. Cloning and sequencing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) growth hormone cDNA using polymerase chain reaction and degenerate oligonucleotides. *DNA Seq.*, **3**: 185–189.
- Du, S. J., Z. Gong, G. L. Fletcher, M. A. Shears, M. J. King, D. R. Idler and C. L. Hew, 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct. *Bio/Technology*, **10**: 176–181.
- Funkenstein, B., T. T. Chen, D. A. Powers and B. Cavari, 1991. Cloning and sequencing of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene*, **103**: 243–247.
- Gray, E. S. and K. M. Kelley, 1991. Growth regulation in the gobiid teleost, *Gillichthys mirabilis*: roles of growth hormone, hepatic growth hormone receptors and insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.*, **131**: 57–66.
- Johansen, B., O. C. Johnsen and S. Valla, 1989. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, **77**: 317–324.
- Mahmoud, S. S., M. M. Moloney and H. R. Habibi, 1996. Cloning and sequencing of the goldfish growth hormone cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **101**: 139–144.
- Miller, W. L. and N. L. Eberhardt, 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrinol. Rev.*, **4**: 97–130.
- Momota, H., R. Kosugi, H. Hiramatsu, H. Ohgai, A. Hara and H. Ishioka, 1988. Nucleotide sequence of cDNA encoding the pregrowth hormone of red sea bream (*Pagrus major*). *Nucleic Acids Res.*, **16**: 3107.
- Moriyama, S., F. G. Ayson and H. Kawauchi, 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**: 1553–1562.
- Nam, Y. K., J. K. Noh, Y. S. Cho, K. N. Cho, C. G. Kim and D. S. Kim, 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.*, **10**: 353–362.
- Niall, H. D., M. L. Hogan, R. Sauer, I. Y. Rosenblum and F. C. Greenwood, 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 866–869.
- Peduel, A. D., A. Elizur and W. Knibb, 1994. Cloning and sequencing of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*, Coryphaenidae) growth hormone-encoding cDNA. *DNA Seq.*, **5**(2): 121–123.
- Rand-Weaver, M. and H. Kawauchi, 1993. Growth hormone, prolactin and somatolactin: a structural overview. (in) *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 12*, (eds) P. W. Hochachka, and T. P. Mommsen, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, pp. 39–56.
- Sakamoto, T., B. S. Shepherd, S. S. Madsen, R. S. Nishioka, K. Siharath, N. H. Richman III, H. A. Bern and E. G. Grau, 1997. Osmoregulatory Actions of Growth Hormone and Prolactin in an Advanced Teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **106**: 95–101.
- Sato, N., K. Watanabe, K. Murata, M. Sakaguchi, Y. Kariya, S. Kimura, M. Nonaka and A. Kimura, 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochem. Biophys. Acta.*, **949**: 35–42.
- Schaefer, B. C., 1995. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.*, **227**: 255–273.
- Schneider, J. F., S. H. Myster, P. B. Hackett and A. Faras, 1992. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for northern pike (*Esox lucius*) growth hormone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **1**: 106–112.
- Seeburg, P. H., 1982. The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA*, **1**: 239–249.
- Seeburg, P. H., S. Sias, J. P. Adelman, H. A. de Boer, J. Hayflick, P. Jhurani, D. V. Goeddel and H. L. Heyneker, 1983. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA*, **2**: 37–45.
- Somers, W., M. Ultsch, A. M. D. Vos and A. A. Kossiakoff, 1994. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature*, **372**: 478–481.
- Tanaka, M., Y. Toma, T. Ohkubo, S. Sudo and K. Nakashima, 1995.

- Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene*, **165**: 321–322.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673–4680.
- Tsai, H. J., K. L. Lin and T. T. Chen, 1993. Molecular cloning and expression of yellowfin porgy (*Acanthopagrus latus houttuyn*) growth hormone cDNA. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **104**: 803–810.
- Venkatesh, B. and S. Brenner, 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes. *Gene*, **187**: 211–215.
- Watahiki, M., M. Tanaka, N. Masuda, M. Yamakawa, Y. Yoneda and K. Nakashima, 1988. cDNA cloning and primary structure of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) pregrowth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **70**: 401–406.
- Yowe, D. L. and R. J. Epping, 1995. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. *Gene*, **162**: 255–259.
- Zhu, Z., G. Li, L. He and S. Z. Chen, 1985. Novel gene transfer into the goldfish (*Crassius auratus* L. 1758). *Angew Ichthyol.*, **1**: 31–34.

원고접수 : 2003년 3월 13일

수정본 수리 : 2003년 4월 11일

책임편집위원 : 윤종만