

돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) somatolactin cDNA의 분석

강현실 · 여인규 · 이재희*

제주대학교 해양과학대학 해양생물공학과

Characterization of Somatolactin cDNA from Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*)

Hyun-Sil Kang, In-Kyu Yeo and Jehee Lee*

Department of Marine Biotechnology, Cheju National University, 1 Ara 1-Dong, Jeju 690-756, Korea

Abstract

cDNA encoding somatolactin (SL) was obtained by RT-PCR from pituitary glands of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). The full length cDNA of rock bream somatolactin (rbSL) is 1636 bp long. It contains a 696 bp open reading frame encoding a signal peptide of 24 amino acids (aa) and a mature protein of 207 aa. rbSL has seven cysteine residues (Cys⁵, Cys¹⁵, Cys⁴², Cys⁶⁵, Cys¹⁸¹, Cys¹⁹⁸ and Cys²⁰⁶) and two potential N-glycosylation sites at positions Asn¹²¹ and Asn¹⁵³. The rbSL shares 61.1~92.6% amino acid sequence similarities and 63~92.6% nucleotide sequence identities with other teleost SLs, except for goldfish and channel catfish SL. Amino acid sequence alignment revealed that rbSL has four conserved domains (A_{SL}, B_{SL}, C_{SL} and D_{SL}) common to all SLs. Out of these domains, A_{SL}, B_{SL} and D_{SL} are also conserved in all teleost growth hormones and prolactins. The cDNA of rbSL has been cloned into pET expression vector in order to produce recombinant rbSL in *E. coli* BL21(DE3) cells. The recombinant protein showed a molecular weight of 27 kDa in SDS-PAGE.

Key words – Rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, somatolactin, cDNA, cloning

서 론

Somatolactin (SL)은 Atlantic cod (*Gadus morhua*)와 Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)에서 처음 분리된 당 단백질로[17,22], 경골어류의 뇌하수체 중엽에서 생성되는 growth hormone (GH)/prolactin (PRL) family에 속하는 뇌하수체 호르몬이다. 경골어류에서 확인된 SL은 single

chain polypeptide로 약 200~209개의 아미노산과 분자량이 25에서 28 kDa인 glycosylated와 nonglycosylated 형태로 어종에 따라 다양하게 분리되고 있으며, 경골어류와 포유류의 GH와 PRL 아미노산 서열과는 20~30% 상동성을 갖고 있다[6,13,17]. SL의 아미노산 서열은 경골어류와 척추동물의 GH와 PRL에 구조적으로 유사하며, 공통 조상 유전자로부터 증폭과 변이과정을 통해 진화된 것으로 추측되고 있다.

현재까지 Japanese flounder[17]와 Atlantic cod[22]에서 SL 단백질과 cDNA 분석이 이루어진 후, Atlantic halibut

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 064-754-3472, Fax : 064-756-3493
E-mail : jehee@cheju.ac.kr

(*Hippoglossus hippoglossus*)[9], sole (*Solea senegalensis*)[18], gilthead seabream (*Sparus aurata*)[2,5], red drum (*Sciaenops ocellatus*)[28], rabbitfish (*Siganus guttatus*)[3]와 European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[8] 등에서 SL의 분자·생화학적 특성이 설명되고 있다.

현재까지 SL의 기능은 명확하지 않지만, 다양한 생물학적 과정에 관여하는 것으로 추측되고 있다. 그 예로, coho salmon의 성 성숙과 은모화 시기에 혈장 SL의 농도 증가[21], SL에 의한 난소와 정소에서 *in vitro* steroidogenesis 유도[20], sockeye salmon, chum salmon과 chinook salmon의 산란시기에 SL 생산 세포의 활성화가 보고되었다[15,16]. 이들 결과는 SL이 연어과 어류의 생식소 기능 조절에 관여함을 추측할 수 있다. 이와는 달리 무지개 송어에서는 비특이적 환경 스트레스의 작용으로 혈장 SL 농도가 증가되고[11], 고칼슘수에서 저칼슘수로 이동시 SL cell이 자극되며[10,12], SL 생산 세포가 결여된 무지개 송어에서는 비정상적 지질 축적이 관찰되어 지질 대사에도 관여할 것으로 사려된다[13]. 이외에도 red drum에서 배경 변화에 따른 SL 농도 변화[27], 신장내 인산 수송에 관여한다는 연구 결과도 보고되고 있다[13]. 따라서, SL은 GH와 PRL과 같이 다기능성 뇌하수체 호르몬으로 작용할 것으로 생각된다.

본 연구는 우리나라와 일본의 양식 산업에서 주요 양식 대상어종으로 중요한 위치를 차지하는 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*) 뇌하수체에서 발현되는 SL의 기능을 확인하기 위한 첫 단계로 돌돔 뇌하수체에서 mRNA를 분리하여 SL 유전자에 대한 cDNA를 클로닝하고 이 유전자의 구조적 특징을 타어종의 SL과 비교·분석하였다. 그리고, 분리한 cDNA를 발현 벡터에 클로닝하여 *E. coli*에서 발현되는 재조합 단백질을 조사하였다.

재료 및 방법

mRNA 분리와 cDNA 합성

살아있는 돌돔을 마취시켜 뇌하수체를 분리하여 멸균된 microcentrifuge tube에 넣고 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. Messenger RNA는 Micro-FastTrack™ 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 분리하였다. 분리된 mRNA를 이용하여 first-strand cDNA를 double

strand cDNA synthesis kit (Promega, USA)의 protocol에 따라 합성하였다.

Rapid amplification of cDNA ends (RACE)를 이용한 3'과 5' 말단 SL cDNA의 증폭

돌돔 SL cDNA를 클로닝하기 위해 GenBank에 등록되어 있는 경골어류에서 밝혀진 SL 염기서열을 이용하여 multiple alignment를 수행하고 SL 염기서열중 가장 잘 보존된 영역에서 PCR 증폭을 위한 forward primer인 SL-F (5'-CTC AAC AAG ACY(T/C) AAG TGG GT-3')와 reverse primer인 SL-R (5'-ACC ACT TR(G/A) CTC TTG TTG AG-3')을 제작하였다. 돌돔 SL cDNA 3' 말단 부위를 증폭하기 위한 PCR 반응은 50 ng의 first strand cDNA, 1 μM SL-F와 oligo (dT)₁₈ primer, dNTPs, 10× *pfu* polymerase buffer, 2.5 unit의 cloned *pfu* polymerase (Stratagene, USA) 혼합액에 멸균된 증류수를 가하여 최종 부피를 50 μl로 맞추고 DNA minicycler (PTC-150; MJ Research)를 사용하여 PCR 증폭하였다. 3' 말단 돌돔 SL cDNA 증폭은 94°C에서 1분간 predenaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 45°C에서 30 초간 primer annealing, 72°C에서 1 분간 extension을 30회 반복하고, 최종 72°C에서 10 분간 extension 하였다.

5' 말단 SL cDNA를 증폭하기 위해 first strand cDNA의 3' 말단에 dGTP, 5× TdT reaction buffer, terminal deoxynucleotidyltransferase (Amersham Pharmacia, UK) 혼합액을 37°C에서 30분간 반응하여 poly(G) tail을 부착하였다. 이 DNA를 주형으로 SL-R과 oligo (dC)₁₈ primer를 이용하여 PCR 증폭하였다. PCR 반응은 72°C에서 30 초를 제외하고 3' 말단 증폭조건과 동일하게 수행하였다. 증폭된 5'과 3' 말단 PCR 산물을 1.2% agarose gel 전기영동을 수행하여 증폭된 산물의 크기를 확인하였다.

SL cDNA의 클로닝과 DNA 염기서열 분석

증폭된 3' 말단과 5' 말단 cDNA를 cloning하기 위해 PCR 산물을 AccuPrep™ gel purification kit (Bioneer, Korea) protocol에 따라 분리하고, *HincII*로 잘린 pBluescript II SK (-) vector에 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 이용하여 16°C에서 하루동안 ligation 하였다. 다음날 *E. coli* DH5a에 형질전환하고 α-complementation 선택배지에 도

말하여 배양하였다. 이중 white colony를 선택하여 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 담아 원심분리하여 bacteria pellet을 수집하고, AccuPrep™ plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid내 SL cDNA 염기서열 분석은 dye terminator cycle sequencing kit과 ABI 377 DNA sequencer를 사용하고, sequencing을 위한 primer는 pBS II SK(-) vector내 multiple cloning site의 SK와 T7을 이용하여 (주)마크로젠에 의뢰하여 분석하였다.

E. coli BL21(DE3)에서 SL 단백질 발현

돌돔 SL을 암호화하는 open reading frame (ORF)을 클로닝하기 위해 분석된 돌돔 SL cDNA 염기서열에 기초하여 각각 제한효소 *Nde*I과 *Bam*HI 부위를 포함하는 OFSL-N (5'-GAG ACA TAT GCA CAT AAT GAC AGC CAT G-3')과 OFSL-C (5'-GAG AGG ATC CTT ATG CGC AGT TGT ATT TCT CAG-3') primer를 제작하여 ORF의 증폭에 이용하였다. 증폭된 산물은 *Hinc*II로 잘린 pBluescript II SK (-) vector에 subcloning한 다음 제한효소 *Nde*I과 *Bam*HI으로 double digestion하여 SL ORF를 분리하고 동일 제한효소로 잘린 pET-11a vector (Novagen, USA)에 클로닝하였다. 이를 *E. coli* DH5a에 형질전환하고 ampicillin이 첨가된 LB agar에 배양하여 자란 colony를 ampicillin이 함유된 LB broth에 접종후 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA가 완전한 SL DNA를 갖고 있는지 염기서열을 분석하였다.

pET-11a에 cloning된 SL cDNA를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환한 후 얻은 colony를 ampicillin이 들어있는 LB broth 5 ml에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 이를 다음날 새로운 LB-ampicillin broth 5 ml에 1/10 희석하여 접종하고 OD₆₀₀=0.6 까지 배양하였다. 여기에 100 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종농도 0.4 mM이 되도록 넣어 재조합 SL 단백질의 발현이 유도되도록 30°C에서 3 시간동안 배양하였다. 이 배양액을 원심분리하여 cell을 수집하고 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA buffer에 부유한 후 2× SDS sample buffer를 가하여 lysis 시켰다. Cell lysate는 12% SDS-PAGE에 전기영동하여 발현된 SL 단백질의 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

돌돔 SL cDNA 서열 분석

합성된 first-strand cDNA를 주형으로 SL-F와 d(T)₁₈ primer를 이용하여 3' 말단 cDNA를 PCR 증폭한 결과, 약 1180 bp가 증폭되었다 (Clone 1). 3'에 dG oligo를 붙인 first strand cDNA를 SL-R과 d(C)₁₈ primer로 PCR 증폭시 약 480 bp의 5' 말단 cDNA가 증폭되었다 (Clone 2). 이들의 염기서열을 분석한 결과, clone 1은 267 bp의 SL coding region과 915 bp의 3'-untranslated region (UTR)을 갖고 있으며, clone 2는 26 bp의 5'-UTR과 signal peptide 염기서열을 포함하는 458 bp의 SL coding region 서열을 갖고 있다. 이 clone 1과 2에 기초하여 분석된 돌돔 SL의 cDNA 염기서열과 아미노산 서열을 Fig. 1에 나타내었다.

돌돔 SL cDNA의 염기서열은 1636 bp로 확인되었다. 돌돔 SL은 25 bp의 5'-UTR, SL prehormone을 암호화하는 693 bp의 ORF와 865 bp의 3'-UTR로 구성되어 있다. 돌돔 SL은 24개의 aa로 구성되어 있는 signal peptide와 207개의 aa인 mature protein으로 되어 있다. 돌돔 SL의 polyadenylation signal sequence는 poly(A) tail에서 상위 15 bp에 위치하고 있으며, 그 서열은 진핵생물에서 보고되고 있는 consensus sequence인 AATAAA와 동일하다. ORF에 기초한 돌돔 SL의 분자량과 등전점은 약 26775Da과 5.6으로 예측되었다 (Expert protein analysis system-proteomics server from the Swiss Institute of Bioinformatics). 또한, 돌돔 SL 아미노산 서열에서 단백질의 이황화 결합에 관여하는 7개의 시스테인 (Cys⁵, Cys¹⁵, Cys⁴², Cys⁶⁵, Cys¹⁸¹, Cys¹⁹⁸과 Cys²⁰⁶)과 단백질의 탄수화물 결합에 관여하는 두 개의 putative N- glycosylation site를 Asn¹²¹과 Asn¹⁵³ 아미노산 잔기에서 확인하였다.

돌돔 SL cDNA는 총 1636 bp로 전체 염기서열의 약 53%에 해당하는 긴 3'-UTR과 짧은 5'-UTR을 갖고 있으며, 231개의 아미노산을 암호화하는 SL prehormone의 24 aa signal peptide는 아미노산 소수성에 기초하여 결정되었는데 이는 현재까지 알려진 어류의 SL signal peptide에 유사성을 갖고 있다. 또한, 207 aa으로 구성된 mature protein도 보고되어진 어류 SL의 mature protein 204에서 209 aa 범위에 포함되고 있다.

AGAAGACTTCACGACTACTGAAAGAATGCACATAATGACAGCCATGCAGCGGAGTGTATGGGCAGTGTG M H I M T A M Q R S V W A V L	70 -15
CTCTGGCCCTATCTGCTTACCGTAAGCATCCCCTAGACTGTAAGGAAGAGCAGGGCAGCATCTCCCGCT L W P Y L L T V S I P L D C K E E Q G S I S R	140 14
GCCCCTCCATCTCCCAAGAGAAACTTCTCGACCGAGTCATCCAGCATGCTGAGCTCATCTACCGCGTCTC C P S I S Q E K L L D R V I Q H A E L I Y R V S	210 38
AGAAGAATCATGCTCTTTGTTTGAAGAGATGTTTGTCCCTTCCATTGCAGCTCCAGAGGAACCAAGCT E E S C S L F E E M F V P F P L Q L Q R N Q A	280 61
GGCTATGCGTGCATCACAAAACCTTTACCCATCCCCAGCTCCAAAAGTAAATCCAACAGATATCTGACA G Y A C I T K T L P I P S S K S E I Q Q I S D	350 84
AATGGTTGCTCCACTCTGTGCTGATGCTGGTCCAGTCGTGGATCGAGCCTTTGGTCTACCTGCAGACCAC K W L L H S V L M L V Q S W I E P L V Y L Q T T	420 108
ATTGGATCAATACGATGGCGCTCCTGACATGCTACTCAACAAGACCAAGTGGGTGTCTGAGAAATTGATC L D Q Y D G A P D M L L N K T K W V S E K L I	490 131
AGTCTGGAGCAAGGGGTGGTGGTCTCATCAAGAAGATGTTGGATGAGGGAAATGATGACCACAAACTATA S L E Q G V V V L I K K M L D E G M M T T N Y	560 154
GTGAGCAAGGCATATTCCAGCATGATGTGCAGCCAGAGATGCTGGAATCTGTTATGAGAGACTATACCTT S E Q G I F Q H D V Q P E M L E S V M R D Y T L	630 178
GCTCAGCTGCTTCAAGAAAGATGCCATAAGATGGAGACTTTCCTCAAGCTCCTCAAGTGTGACAGACT L S C F K K D A H K M E T F L K L L K C R Q T	700 201
GACAAATACAACGCGCATAAAACATAAAGTGCAGCTTTTAAATAATACAATGTTTAGCTTTAAATTAAT D K Y N C A *	770 207
TCTTGAGGTTGGTAGCTGTGCACTTATAGATGTGACCATGCCTTAGGCAATCCAGCCTTGTGTTGCAATGC AGTACATTCTTTATTGATTGTTTTGGAAACACCTTACACAAAAAATAAGTAGGTGTAATGCTGTGCCCTTT CTTCAGCATACTGCATTTTATATTTCCCTGCTCAGTTGTTATTTAACCTGGCAAAGGCAACAGAGGGCA AACTCCCAAAAAGATTATTTGCGTGTGAGCTGTCAAAAAAATCTGCATATCCTGCCATTGATTTCATTT CCTTTGTTCTTAACTGGAGTTGTATTCTCGCTGGCTCTTGCAGTGTGTTGATTATTTCCACGGCCCCC AGAGTATTCAGTGAGACTCCCGTTTTAAATGGAGTTGGGTTCACTTCTGCATTAGTGAATGAAACACTT TCAGCGGAGATGGGAGTCAAACAGAGAGCAATCACTACTTTAAAAAAGAGACACATTTTGATTGGTGAGA GAGTGTGTGAGAGAGACACAGAGAGAGAACAATACCAGATAAAATGAGAGGCAAGCCTTATCTTGAGTG TTTGGTTAGACACAGGTTTAGATTTGTTGAGTTCATGTAAGAATCGTGAATATTTCTATGCCTAAACG TGCTAATTTAACCTGAGTGTAGTAAAGAAGTTGATTATTCATTTAAATCATCAGGGGATATACAGTT TAAATTTAATCGTTAGATGTTATGAATATGTAATGCAGACTGCACTCTACACTTTTGTACTATCATGTG TAAATAGAAGAAGCCCAATGACTGTGAAAACCTTTCTAGTCGACCACTGTTGATTTAAGGGCGTAAATA AGCAAGTTTTAGAAAAGAAAAA	840 910 980 1050 1120 1190 1260 1330 1400 1470 1540 1610 1636

Fig. 1. The nucleotide sequence of rock bream SL and its deduced amino acid sequence. The signal peptide of 24 aa is underlined. Stop codon is indicated by an asterisk. Seven cysteine residues and the polyadenylation signal are in bold italic letters. Two potential N-glycosylation sites are boxed.

돌돔 SL과 경골어류 SL 비교

밝혀진 돌돔 SL 뉴클레오타이드와 아미노산 서열을 현재까지 밝혀진 경골어류 SL의 뉴클레오타이드와 아미노산 서열 상동성을 비교하였다 (Table 1). Goldfish와 channel catfish를 제외하고 아미노산 서열은 61.1~92.6%, 뉴클레오타이드 서열은 63~92.6%의 서열 일치율을 보였다. 특히,

돌돔이 속한 농어목 (Perciformes) 어류인 European sea bass, red drum, rabbitfish와 gilthead sea bream의 SL 아미노산 서열에는 각각 92.6%, 87.8%, 85.3%, 85.2% (nt. identity 92.6%, 87.8%, 86.4%, 87.4%), 가자미목 (Pleuronectiformes) 어류인 Japanese flounder, Atlantic halibut과 sole에는 88.7%, 85.5%, 83% (nt. identity 87.9%, 86.7%,

Table 1. Comparison of rock bream somatolactin cDNA and deduced protein sequences to those of other teleosts

Fish species	Amino acids (similarity %)	Nucleotides (Identity %)
European sea bass	92.6	92.6
Flounder	88.7	87.9
Red drum	87.8	87.8
Atlantic halibut	85.5	86.7
Rabbitfish	85.3	86.4
Gilthead sea bream	85.2	87.4
Lumpfish	83.1	86.4
Sole	83	84.6
Chum salmon	79.1	78.8
Atlantic cod	75	76.6
White sturgeon	67.4	71
African lungfish	65.2	63
Eel	61.1	66.3
Channel catfish	57.8	61.6
Goldfish	49.3	57.7

84.6%)의 높은 아미노산과 뉴클레오타이드 서열의 일치를 보이지만, goldfish와 channel catfish의 경우 49.3% (nt. 57.7%)와 57.8% (nt. 61.6%)의 낮은 상동성을 보였다. 또한, SL mature protein 사이의 비교에서도 앞의 결과에 일치하는 서열 상동성을 보였다. 따라서, 다양한 어종 사이의 SL 아미노산과 뉴클레오타이드 상동성은 GH와 PRL이 어종 사이에 약 40%의 상동성을 보이는 것과 달리 높은 보존성을 갖고 있음을 알 수 있다.

돌돔 SL 아미노산 서열과 현재까지 밝혀진 경골어류 SL의 아미노산 서열을 이용하여 multiple alignmet를 수행하였다 (Fig. 2). 그 결과, 3개의 variable domain에 의하여 나누어지는 4개의 conserved domain이 15-40 aa, 72-105 aa, 119-146 aa와 173-206 aa에서 확인되었으며, 이들 영역을 domain A_{SL}, B_{SL}, C_{SL}과 D_{SL}로 명명하였다. 돌돔 SL과 타어종간 SL conserved domain 사이에서의 아미노산 서열 상동성은 65.2~100% (A_{SL}), 66.7~100% (B_{SL}), 48.1~100% (C_{SL})와 69.7~97.1% (D_{SL})를 나타냈다. 특히, 농어목과 가자미목 어류에 높은 서열 일치율을 보였으나, eel, goldfish와 channel catfish와는 낮은 서열의 일치율을 보여 앞서 설명된 cDNA와 아미노산 서열에서 보여지는 결과와 일치함을 알

수 있다. 돌돔 SL에서 나타나는 4개의 domain은 경골어류 GH와 PRL에서 이미 보고 되었다. 경골어류 GH의 경우, A, B, C와 D domain은 높은 보존성을 보이고 있어 GH의 생물학적 활성에 관여할 것으로 보고 되어 있으며[6], 돌돔을 포함한 경골어류 SL에 4개의 conserved domain의 존재는 단백질의 3차구조 형성과 생물학적 활성에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

아미노산 서열의 alignment에서 6개의 시스테인 잔기 (Cys³, Cys¹⁵, Cys⁶⁵, Cys¹⁸¹, Cys¹⁹⁸ 과 Cys²⁰⁶)가 모든 어류 SL 아미노산의 동일 아미노산 부위에 위치하고 있음이 확인되었다. 특히, C-말단에 존재하는 4개의 시스테인 잔기 (Cys⁶⁵, Cys¹⁸¹, Cys¹⁹⁸ 과 Cys²⁰⁶)의 위치는 GH와 PRL에서 관찰되는 결과와 일치하며 [6], goldfish와 channel catfish의 N-말단에 1개의 시스테인 잔기 (Cys⁴⁴)가 결손된 경우를 제외하고 이제까지 밝혀진 어류의 SL은 7개의 시스테인 잔기를 갖고 있음이 밝혀졌으나, Atlantic cod에서 분리된 SL은 reduction과 S-carboxymethylation 분석으로 8개의 시스테인 잔기를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다[22]. 시스테인 5와 15, 65와 181, 198과 206 사이에서는 이황화 결합을 형성하지만, 시스테인 42와 180 사이에서는 free SH group으로 존재하여 이황화 결합을 형성하지 않음을 확인하였다[22]. 따라서, 동일 부위의 시스테인 잔기를 갖고 있는 돌돔을 포함한 어류의 SL 단백질은 3개의 이황화 결합을 형성하며, 그외의 시스테인 잔기는 이황화 결합에 관여하지 않을 것으로 생각된다.

N-glycosylation 분석으로 (Asn-X-Ser/Thr) 돌돔 SL은 Asn¹²¹과 Asn¹⁵¹에 두 개의 potential N-glycosylation 부위를 갖고 있지만, 타어종과의 alignment에서 chum salmon, goldfish와 channel catfish를 제외한 어류에서 공통적으로 Asn¹²¹의 N-glycosylation site를 갖고 있음을 확인하였다 (Fig. 2). 경골어류에서 확인된 glycosylation site는 lumpfish는 3개[9], Atlantic cod, Atlantic halibut, sole, eel과 rabbitfish는 2개[3,9,14,18,22], Japanese flounder, gilthead seabream, lungfish, red drum과 European sea bass는 1개를 갖고 있지만[1,2,8,17,28], chum salmon [23]과 rainbow trout[26]은 Asn이 Lys으로 치환되어 있어 goldfish[7], channel catfish[24]와 같이 N-glycosylation site를 갖고 있지 않다. 이처럼 어류에서 glycosylation site는 다양하게 보고되고 있지만, Atlantic cod에서 분리된 SL의 degly-

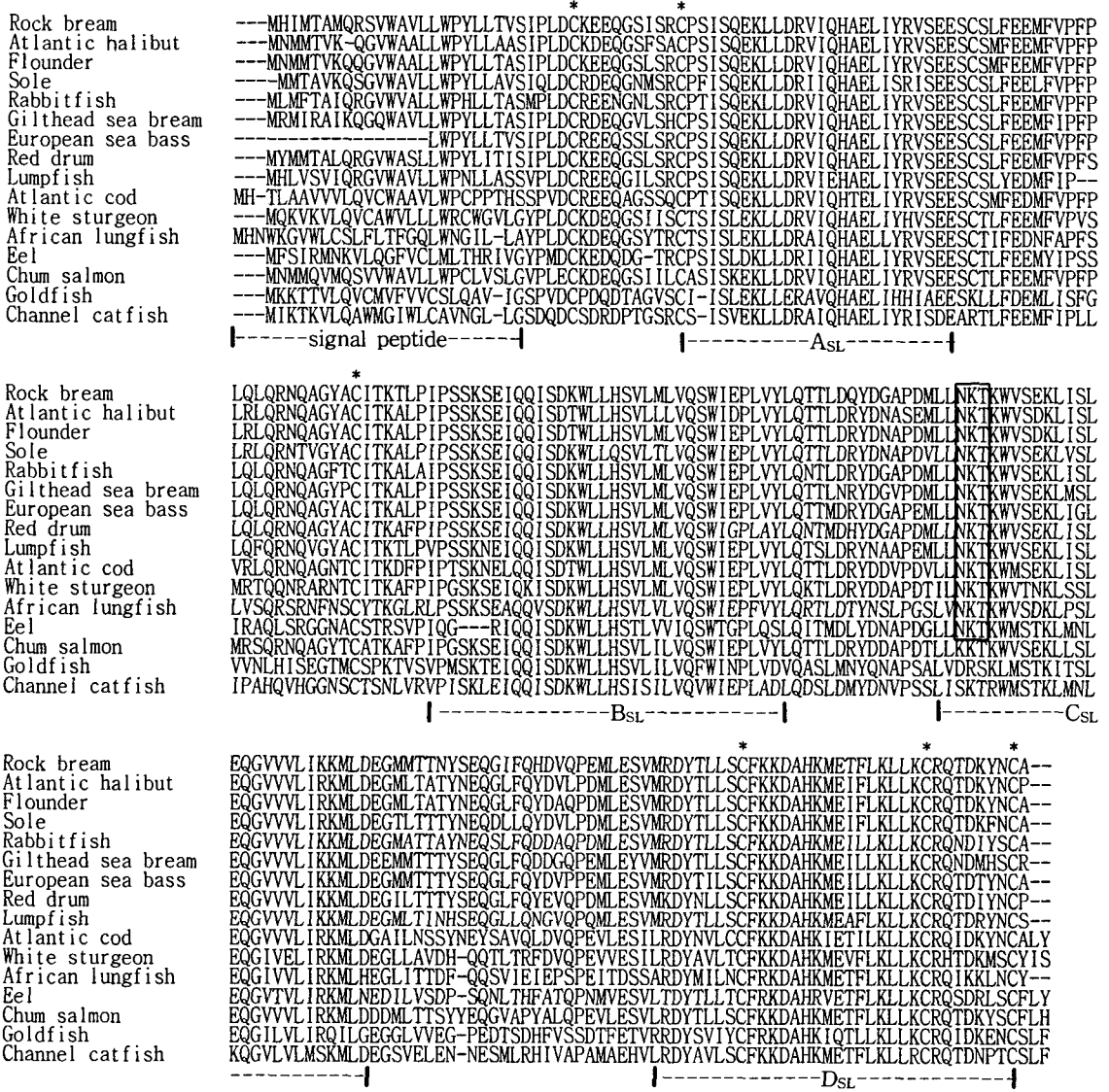


Fig. 2. Alignment of the amino acid sequence of rock bream somatolactin with other teleost fish somatolactins. Six conserved cysteine residues are indicated with asterisks and the conserved potential N-glycosylation site is boxed. The four domains of somatolactins are marked as ASL, BSL, CSL and DSL.

cosylation과 탄수화물 분석으로 Asn¹²¹의 glycosylation site가 단백질의 탄수화물 결합에 관여함을 확인하였다 [22]. 따라서, 너허수체 호르몬의 glycosylation은 호르몬의 분비, 수용체 결합, 신호 전환과 생물학적 잠재성에 중요하므로 특유의 glycosylation 상태는 SL의 생물학적 활성에서 나타나는 생리학적 차이를 예측할 수 있을 것이다.

돌돔 SL의 E. coli 발현

재조합 SL 단백질의 발현 양상을 확인하기 위하여 염기

서열이 분석된 돌돔 SL cDNA 서열에 기초하여 제한효소 부위를 갖는 primer를 제작하여 SL coding region을 증폭하여 pET-11a vector에 삽입하였다. 삽입된 SL cDNA에서 단백질의 발현을 위해 E. coli BL21(DE3)에 형질전환하여 IPTG에 의한 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. IPTG에 의하여 유도된 단백질은 12% SDS-PAGE 전기영동을 수행하여 발현된 단백질을 확인한 결과, 재조합 SL 단백질은 약 27 kDa의 monomer 형태로 과발현되었으며, 이는 앞에서 SL cDNA 서열에 기초하여 예측된 단백질의 크기와 유

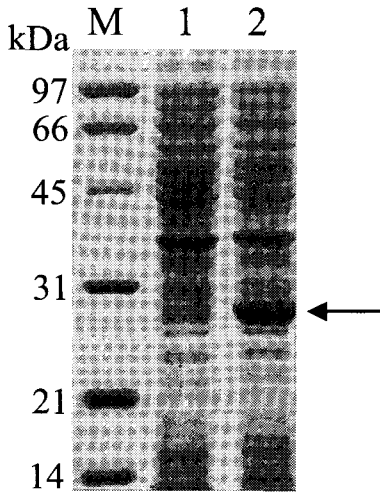


Fig. 3. Expression of rock bream SL in *E. coli* BL21(DE3) cells. Lane M is the molecular marker. Lane 1 and 2 are non-induced and induced *E. coli* cell lysates, respectively. The arrow indicates the expressed SL band.

사함을 알 수 있다 (Fig 3).

현재까지 다양한 어류 뇌하수체로부터 native SL이 분리되고 있지만, 생화학 과정을 통해 획득되는 양은 매우 적어 다양한 생물학적 실험을 위해서는 많은 양의 시료가 요구된다. 또한, 알칼리추출과 용매의 처리로 분리된 호르몬의 생물학적 작용이 변화되기도 한다. 따라서, 이 단백질을 이용한 *in vitro*와 *in vivo*상의 생물학적 작용을 평가하기 위해서는 대량의 재조합 SL 단백질의 이용이 필요하며 일부 어종에서 안정적 재조합 단백질의 생산을 위한 시도가 이루어지고 있다[4,19,25].

아직까지 SL의 생리학적 기능은 명확하지 않다. 일부 생화학, 생리학과 조직학적 연구를 통해 SL 단백질은 뇌하수체의 *pars intermedia* 세포에서 분리되며, 갈습 조절, 이온인산 수송, 산-염기 평형, 배경 적응, 생식과 같은 다양한 범위에 관여한다고 추측되고 있다.

요 약

돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*) SL을 암호화하는 cDNA clone을 뇌하수체로부터 RT-PCR 방법에 의해 획득하였다. 돌돔 SL cDNA의 길이는 1636 bp로서 24개의 아미노산인 signal peptide와 207개의 aa으로 구성된 mature protein을

암호화하는 696 bp의 open reading frame을 갖고 있다. 또한, 돌돔 SL 아미노산에는 이황화 결합에 관여하는 7개의 시스테인 잔기 (Cys⁵, Cys¹⁵, Cys⁴², Cys⁶⁵, Cys¹⁸¹, Cys¹⁹⁸ 과 Cys²⁰⁶)와 두 개의 potential N-glycosylation site인 Asn¹²¹과 Asn¹⁵³을 확인하였다. 돌돔 SL은 goldfish와 channel catfish를 제외한 다른 경골어류 SL에 아미노산 서열은 61.1~92.6%, 뉴클레오타이드 서열은 63~92.6%의 일치율을 나타낸다. 아미노산 서열 alignment에서 돌돔 SL은 다른 어류 SL에 공통적인 4개의 conserved domain (A_{SL}, B_{SL}, C_{SL}과 D_{SL})을 갖고 있음을 확인하였다. 이들중 A_{SL}, B_{SL}과 D_{SL}은 경골어류 growth hormone과 prolactin에도 잘 보존되어 있었다. 재조합 돌돔 SL 단백질을 *E. coli*에서 생산하기 위해 돌돔 SL cDNA를 발현벡터에 클로닝하여 단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분자량 약 27 kDa의 재조합 단백질의 발현을 확인하였다.

감사의 글

주 저자인 강현실은 2003년도 두뇌한국21 연구조교 프로그램에 의하여 지원받았으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Amemiya, Y., Y. Sogabe, M. Nozaki, A. Takahashi and H. Kawauchi. 1999. Somatolactin in the white sturgeon and African lungfish and its evolutionary significance. *Gen. Comp. Endocrinol.* **114**, 181-190.
- Astola, A., C. Pendon, M. Ortiz and M. M. Valdivia. 1996. Cloning and expression of somatolactin, a pituitary hormone related to growth hormone and prolactin from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **104**, 330-336.
- Ayson, F. G., E. G. de Jesus, Y. Amemiya, S. Moriyama, T. Hirano and H. Kawauchi. 1999. Isolation and cDNA cloning of somatolactin in rabbitfish (*Siganus guttatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**, 292-300.
- Calduch-Giner, J. A., C. Pendon, M. M. Valdivia and J. Perez-Sanchez. 1998. Recombinant somatolactin as a stable and bioactive protein in a cell culture bioassay: development and validation of a sensitive and reproducible radioimmunoassay. *J. Endocrinol.* **156**,

- 441-447.
5. Cavari, B., T. Noso and H. Kawauchi. 1995. Isolation and characterization of somatolactin from pituitary glands of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquaculture* **137**, 171-178.
 6. Chen, T. T., A. Marsh, M. Shamblott, K. M. Chan, Y. L. Tang, C. M. Cheng and B. -Y. Yang. 1994. *Fish physiology*. pp. 179-209, Vol. 13, Academic Press. New York.
 7. Cheng, K. W., Y. H. Chan, Y. D. Chen, K. L. Yu and K. M. Chan. 1997. Sequence of a cDNA clone encoding a novel somatolactin in goldfish, *Carassius auratus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 282-287.
 8. Company, R., J. A. Caldach-Giner, M. Mingarro and J. Perez-Sanchez. 2000. cDNA cloning and sequence of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **127**, 183-192.
 9. Iraqi, F., Z. Gong, C. L. Hew and L. Crim. 1993. Isolation and characterization of somatolactin genes from two cold water marine teleosts, lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**, 96-103.
 10. Kakizawa, S., T. Kaneko, S. Hasegawa and T. Hirano. 1993. Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by low environmental calcium. *Gen. Comp. Endocrinol.* **105**, 194-209.
 11. Kakizawa, S., T. Kaneko, S. Hasegawa and T. Hirano. 1995. Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **199**, 1043-1051.
 12. Kaneko, T. and T. Hirano. 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *J. Exp. Biol.* **184**, 31-45.
 13. Kaneko, T. 1996. Cell biology of somatolactin. *Int. Rev. Cytol.* **169**, 1-24.
 14. May, D., C. M. Todd and M. Rand-Weaver. 1997. cDNA cloning of eel (*Anguilla anguilla*) somatolactin. *Gene* **188**, 63-67.
 15. Olivereau, M and M. Rand-Weaver. 1994. Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stages of the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**, 28-35.
 16. Olivereau, M and M. Rand-Weaver. 1994. Immunoreactive somatolactin cells in the pituitary of young, migrating, spawning and spent chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Fish Physiol. Biochem.* **13**, 141-151.
 17. Ono, M., Y. Takayama, M. Rand-Weaver, S. Sakata, T. Yasunaga, T. Noso and H. Kawauchi. 1990. cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4330-4334.
 18. Pendon, C and J. P. Martinez-Barbera, 1994. Cloning of a somatolactin-encoding cDNA from sole (*Solea senegalensis*). *Gene* **147**, 227-30.
 19. Pendon, C., J. P. Martinez-Barbera, M. Oritiz and M. M. Valdivia. 1996. Bacterial production and purification of the fish pituitary hormone somatolactin. *Protein Expr. Purif.* **7**, 389-394.
 20. Planas, J. V., P. Swanson, M. Rand-Weaver and W. W. Dickhoff. 1992. Somatolactin stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**, 1-5.
 21. Rand-Weaver, M., P. Swanson, H. Kawauchi and W. W. Dickhoff. 1992. Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon. *J. Endocrinol.* **133**, 393-403.
 22. Rand-Weaver, M., T. Noso, K. Muramoto and H. Kawauchi. 1991. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry* **30**, 1509-1515.
 23. Takayama, Y., M. Ono, M. Rand-weaver and H. Kawauchi. 1991. Greater conservation of somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family, than of growth hormone in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**, 366-374.
 24. Tang, Y and T. T. Chen. 1993. A study on the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth hormone gene family: structure of growth hormone and prolactin in genes and somatolactin cDNA, their evolutionary implications and expression in pituitary gland. Thesis, University of Maryland, Department of Microbiology, College Park, Maryland, USA.
 25. Vega-Rubin, S. D. C., P. G. Vega-Rubin, J. A. C. G. Vega-Rubin, F. M. Vega-Rubin and J. P. S. Vega-Rubin. 2003. Expression and characterization of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin: assessment of *in vivo* metabolic effects. *Mar. Biotechnol.*

- 5, 92-101.
26. Yang, B. Y., M. Arab and T. T. Chen. 1997. Cloning and characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatolactin cDNA and its expression in pituitary and nonpituitary tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**, 271-280.
27. Zhu, Y and P. Thomas. 1995. Red drum somatolactin: Development of a homologous radioimmunoassay and plasma levels after exposure to stressors or various backgrounds. *Gen. Comp. Endocrinol.* **99**, 275-288.
28. Zhu, Y., Y. Yoshiura, K. Kikuchi, K. Aida and P. Thomas. 1999. Cloning and phylogenetic relationship of red drum somatolactin cDNA and effects of light on pituitary somatolactin mRNA expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**, 69-79.

(Received July 24, 2003; Accepted November 14, 2003)