

볼락(*Sebastes inermis*) 근육단백질 유전자의 성장단계별 발현양상과 parvalbumin 유전자 클로닝

장요순*

한국해양연구원 동해연구소 동해특성연구부

Expression Pattern of Skeletal-Muscle Protein Genes and Cloning of Parvalbumin mRNA in Dark-banded Rockfish (*Sebastes inermis*) by Yo-Soon Jang* (East Sea Environment Research Institute, KORDI, Gyeongbuk 767-813, Korea)

ABSTRACT Differentially Expressed Gene (DEG) was obtained from Differential Display Reverse Transcription (DDRT)-PCR using Annealing Control Primer (ACP) to search and clone genes related to developmental stages of *Sebastes inermis*. By using 120 ACPs, the nucleotide sequences obtained from 16 DEGs showing higher expression in 6-month-old skeletal muscle than 18-month-old ones and from 22 DEGs displaying stronger expression in 18-month-old than 6-month-old were analyzed and BLAST was conducted. The results identified that DEGs shared 69~95% homology with genes of parvalbumin (PVALB), nucleoside diphosphate kinase (NDK) B, tropomyosin (TPM), troponin I (Tnl), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), muscle-type creatine kinase (CKM2), small EDRK-rich factor 2 (SERF2), adenosine monophosphate deaminase (AMPD), Trimeric intracellular cation channel type A (TRICA), Rho GTPase-activating protein 15 (ARHGAP15), S-formylglutathione hydrolase (Esterase D; ESD), heat shock protein 70 (hsp70), type 1 collagen alpha 2 (COL1A2), glutathione S-transferase, Mid1-interacting protein 1 (Mid1lip1), myosin light chain 1 (MYL1), sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1B (SERCA1B), and ferritin heavy subunit (FTH1). Expression pattern by developmental stage of DEG14 and PVALB exhibiting strong expression in 6-month-old skeletal muscle was investigated using real time PCR. Expression was reduced as *Sebastes inermis* grew. Expression of PVALB gene was extremely low after 6 months of age. Expression of CKM2 showed higher expression in 18-month-old skeletal muscle than in 6-month-old muscles, and increased continuously until 4 years old, after which CKM2 expression became gradually reduced. By analysis of tissue-specific expression patterns of DEG, DEG14 was expressed mainly in skeletal muscle, liver, kidney and spleen tissues, whereas PVALB expression was expressed in skeletal muscle and kidney, but not in liver and spleen tissues. CKM2 was expressed in skeletal muscle, kidney, and spleen tissues, but not in liver tissues. PVALB gene was composed of 110 amino acids, which constituted 659 bp nucleotides. The results reported here demonstrate that the expression patterns of parvalbumin and CKM2 could be used as molecular markers for selecting fishes exhibiting fast growth.

Key words : Skeletal muscle protein, Annealing Control Primer (ACP), parvalbumin, creatine kinase 2 (muscle-type), *Sebastes inermis*

*교신저자: 장요순 Tel: 82-54-780-5326, Fax: 82-54-780-5349,
E-mail: jangys@kordi.re.kr

서 론

어류 무게의 절반 이상을 결정하는 근육의 양은 어류의 성장과 직접적인 연관이 있고, 일생동안 계속적으로 근육이 성장하는 독특한 성장과 발달패턴을 가지고 있다(Johnston, 1999; Mommsen, 2001). 어류의 근육은 구조를 이루고 수축에 관여하는 근원섬유단백질과 근장단백질로 이루어져 있다. Actin과 myosin은 근원섬유단백질이고, tropomyosin, troponin, parvalbumin은 근장단백질에 속한다(Poempuang and Panprommin, 2010). 어류 근육단백질의 다양한 isoform은 이들 단백질을 암호화하는 유전자의 중복과 alternative splicing 같은 분자기작으로 인하여 만들어진다. 근육단백질의 다양한 isoform은 어류의 연령에 따라 다르게 발현되지만(Focant *et al.*, 1999), 성장에 따른 발현양상을 포함한 정확한 기능은 밝혀져 있지 않다.

Parvalbumin은 크기가 10~12.5 kD의 분자량이 적은 근육단백질로 근육세포 내에서 칼슘이온과 결합하여 근육 수축을 진행한다(Arif *et al.*, 2007; Arif, 2009). 어류의 여러 종에서 발달단계에 따라 2~8개의 isoform이 존재하지만, 대부분의 어류는 발달과정에서 3~5개가 발현된다(Gillis, 1985; Chikou *et al.*, 1997; Huriaux *et al.*, 2002; Focant *et al.*, 2003; Arif *et al.*, 2007; Arif, 2009). Brownridge *et al.* (2009)은 잉어(*Cyprinus carpio*) 근육에서 8개의 parvalbumin isoform이 발현되었지만 2~3개의 isoform만 발현량이 많았다고 보고하였다. 최근까지는 parvalbumin이 fast-twitch muscle에만 있는 것으로 알려져 있었지만(Zawadowska and Supiková, 1992; Berchtold *et al.*, 2000; Chauvigné *et al.*, 2005), Sanuki *et al.* (2003)은 white muscle에서도 2~3개의 isoform이 발현된다고 보고하였다. Parvalbumin (PA)은 발달단계에 따라 발현되는 isoform에 따라 크게 'laval' isoform (PAII)과 'adult' isoform (PAIII, PAIV, PAV)으로 분류되며(Focant *et al.*, 1992, 1999, 2000; Huriaux *et al.*, 1996, 1997), Focant *et al.* (2003)은 parvalbumin이 *Brycon moorei*과 같은 성장이 빠른 종에서 발견된다고 밝혔다.

유전자의 기능을 파악하기 위한 연구의 접근방법으로 differential screening은 목적인 시료의 mRNA 변화를 비교 분석하고, 특히 발현 유전자를 확보하여 기능 분석이 가능한 1차적인 분석법이다. DD-PCR (differentially display-PCR)을 응용한 ACP (annealing control primer)-base GeneFishing™ PCR은 비교하고자 하는 두 개 이상의 시료 간 mRNA 발현 차이를 보이는 유전자 (differentially expressed gene, DEG)를 ACP로 확보하는 방법이다. 1차 PCR (annealing temperature, Ta=50°C)에서는 target 영역만 primer 기능을 하도록 하고, 비 target 영역은 기능을 차단하게 하며, 2차 PCR (Ta=65°C)단계에서는 비 target 영역만 특이적으로

annealing하여 많은 DNA를 얻을 수 있도록 하는 방법이다. 기존의 DD-PCR과 다른점은 (1) 3개 이상의 anchor dT (A anchored dT, G anchored dT, C anchored dT)를 사용하여 cDNA를 3개 이상의 sub-population으로 구성하는 것과 (2) arbitrary ACP와 oligo-dT ACT 조합으로 PCR을 수행하여 발현량 차이가 정확한 PCR 산물만 얻을 수 있으며, 그 PCR 산물을 agarose gel 상에서 쉽고 간편하게 확인이 가능하다는 점이다.

본 연구는 볼락 근육조직에서 발현되는 근육특이 단백질 (MSP, muscle-specific protein)의 성장단계별 발현양상을 비교하여, 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 유전자를 선별한 후, 빠른 성장능력을 가진 어류를 성장 초기에 선별할 수 있는 분자마커 개발 후보 유전자를 확보하고자 수행하였다. 어류의 성장단계별 근육조직에서 차등발현 유전자를 확보한 기존의 연구는 보고된 바 없으며, 성장 초기에 발현량이 많은 parvalbumin 유전자는 분자마커 개발에 이용하기 위하여 근육조직에서 발현되는 mRNA 영역을 클로닝하였으며, 성장속도에 차이를 나타낸 볼락의 개체간 parvalbumin 유전자 발현양상과 유전정보는 향후 분자마커 개발 관련 연구에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

경남 통영시 소재의 한국해양연구원 통영 MRC에서 일반적인 관리방법으로 사육된 6, 18, 30개월령과 4년생 볼락을 각 10개체씩 확보하여 근육 조직, 간 조직, 신장 및 비장 조직을 유전자 분석에 사용하였다.

2. Total RNA 분리

볼락의 근육, 간, 신장 및 비장조직을 각각 100 mg씩 취한 후, TRIzol® Reagent (Invitrogen, USA) 1 mL을 첨가하여 homogenizer로 파쇄하였다. 상온에서 5분간 반응시킨 후 chloroform 0.2 mL을 첨가하여 vortex를 이용하여 강하게 섞은 후, 상온에서 5분간 반응시켰다. 원심분리 (12,000xg, 4°C, 15분) 후 상층액을 회수하여 isopropyl alcohol 0.6 mL을 첨가하고, 상온에 10분간 두었다가 원심분리 (12,000xg, 4°C, 10분)하여 RNA를 분리하였다.

3. ACP (annealing control primer)-based GeneFishing™ PCR

GeneFishing™ PCR을 수행하기 위한 한 가닥 cDNA는 볼락 근육조직으로부터 분리·정제한 total RNA 3 µg,

GeneFishing™ DEG Kits (Seegene, Korea) 내 10 μM dT-ACP1 (5'-CGTGAATGCTGCGACTACGATIIIII(T)₁₈-3' 2 μL, 5x reaction buffer 4 μL, dNTPmix (each 2 mM) 5 μL, RNasin® RNase Inhibitor (40 U/μL, Promega) 0.5 μL, M-MLV RTase (200 U/μL, Promega) 1 μL를 첨가하여 42°C에서 1시간 30분 동안 반응시켜 합성하였다. 합성된 한 가닥 cDNA는 5배 희석하여 실험에 이용할 때까지 -20°C에 보관하였다. ACP-based PCR 방법 (Kim *et al.*, 2004)에 따라 DEG (differentially expressed gene)를 screening하였다. 두 가닥 cDNA는 PCR의 첫 번째 단계에서 합성하였으며, 희석된 한 가닥 cDNA 50 ng, dT-ACP2 (10 μM) 1 μL, 10 μM arbitrary ACP 1 μL, 2x Master Mix 10 μL를 혼합하여 94°C에서 1분, 50°C에서 3분, 72°C에서 1분간 반응시켰다. 두 가닥 cDNA의 합성이 끝난 다음 두 번째 단계의 PCR은 94°C에서 40초, 65°C에서 40초, 72°C에서 40초의 조건으로 40회 반응하였다. 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동하고, EtBr로 염색하였다.

4. DEG (differentially expressed gene)의 클로닝과 염기서열 결정

발현량 차이를 나타낸 단편은 pGEM T easy vector (Promega, USA)를 이용하여 클로닝하였고, DEG 클론은 Big-Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)으로 반응시켰다. 정제한 염기서열 반응산물은 ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였고, Chromas v2.30과 BioEdit v 5.0.6 프로그램을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

5. Real-time quantitative PCR 분석

Total RNA 2 μg을 oligo (dT)₁₈₋₂₀와 AMV reverse transcriptase 20 U (Promega, USA)을 사용하여 42°C에서 1시간 반응시켜 한 가닥 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR에 사용할 target 유전자의 primer (Table 1)는 poly(A)+ 부근이 증폭되고, 증폭 단편의 크기는 70~200 bp이며, T_M 값이 58~60°C가 되도록 설계하였다. Pre-PCR로 primer 및 cDNA 상태를 확인하였다. cDNA 5 ng, primer (forward+reverse, 10 pM) 0.8 μL, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) 10 μL를 첨가하여 최종 부피가 20 μL가 되도록 조정 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 40회 반응시켰다. 양적인 분석을 위하여 동일 유전자에 대해 3회 반복 실험하였으며, real-time PCR 분석은 Applied Biosystem prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 수행하였다.

Table 1. Primer sequences used for quantitation of differentially expressed genes

DEG No.	Target gene	Primer sequence (5'→3')
DEG 14	Unknown	FW: CAGAGTGAACAGATATGGAAC RV: TACGAAGGGGATAGTGCTGA
DEG 38	Parvalbumin	FW: TCATCCGCAGTGAGGCTGCT RV: CTCATCACTGCCTACCACCA
DEG 60	Creatine kinase 2 (muscle-type)	FW: CTTACGGATGTGCGACATCAC RV: GACTACCTCATGAAGATCCTG

6. RACE (rapid amplification cDNA ends) PCR을 이용한 cDNA 클로닝

목적하는 cDNA 단편은 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)을 이용하여 cDNA 말단 염기서열을 포함하는 단편을 얻었다. RACE PCR에 사용한 primer는 GC 함량이 50~70%, 길이는 23~28염기, T_M 값은 70°C 이상이 되도록 설계하여 합성하였으며, 5' 및 3'-RACE-Ready cDNA는 total RNA 1 μg을 5'-CDS primer [5'-(T)₂₅VN-3']와 3'-CDS primer A [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀VN-3']와 SMART II A oligo [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3']를 이용하여 합성하였다. 5' 및 3'-RACE PCR은 10배 희석한 cDNA 2.5 μL, primer 10 pM, 10x Universal Primer A (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') 5 μL, dNTP mix 10 mM, 50xBD polymerase mix를 최종부피가 50 μL가 되도록 조정하여, 94°C에서 30초, 72°C에서 3분간 5회 반응시켰고, 94°C에서 30초, 70°C에서 30초, 72°C에서 3분의 조건으로 5회 추가로 반응시킨 후에 94°C에서 30초, 68°C에서 30초, 72°C에서 3분 조건으로 25회 반응시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였고, target 단편을 회수하여 pGEM T easy vector system을 사용하여 TA cloning하였다.

결 과

볼락의 성장단계 관련 기능성 유전자를 탐색하여 확보하기 위하여 성장초기인 6개월령 근육조직과 성장의 절정기인 18개월령 근육조직에서 발현되는 유전자를 120개의 ACP를 사용하여 비교하였다. 동일한 양의 mRNA로부터 ACP에 의해 생성된 유전자 단편을 전기영동하여 6개월령 근육조직에서 발현량 차이를 나타낸 DEG (differentially expressed gene) 16개와 18개월령 근육조직에서 발현량 차이를 나타낸 22개의 DEG를 확인하였다 (Fig. 1). DEG는 cDNA 단편의 크기를 300 bp~1 kb 범위로 정하였으며, 동일한 ACP로 만들어진 단편들의 상대적인 밝기를 고려하여

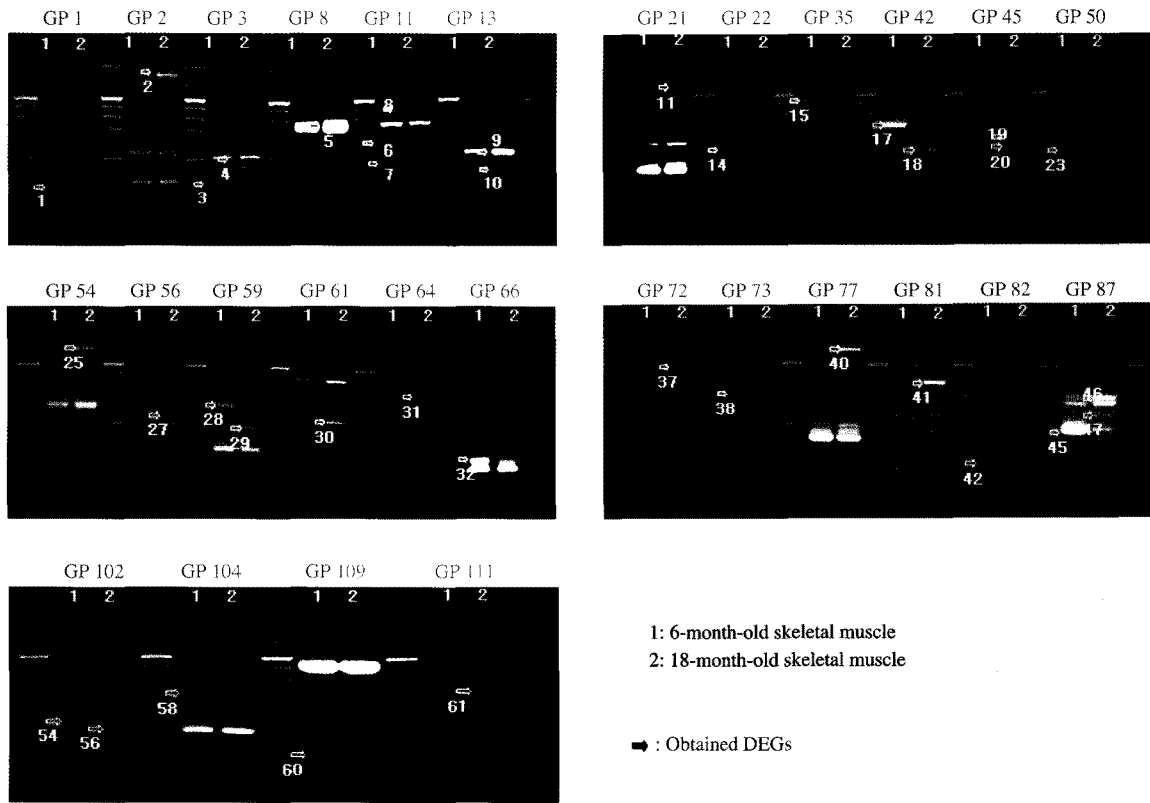


Fig. 1. Results of ACP-based PCR for identification of differentially expressed genes (DEGs) from two developmental stages of the dark-banded rockfish. The amplified cDNA products are separated on 2% agarose gels and stained with EtBr.

선발하였다. Fig. 1에서 화살표로 표시한 단편을 DEG로 선정하였으며, 발현량 차이는 나타낸 단편중 크기가 300 bp 미만이거나 1 kb 이상인 단편은 잘못 합성된 단편일 오류를 피하기 위하여 이후의 분석에서 제외하였다.

성장단계에서 차등발현 양상을 나타내어 선발한 DEG는 염기서열을 분석하여 유전자 정보를 확보하고 대략적인 기능을 파악하였다 (Table 2). 36개의 DEG 중 2개는 기능이 밝혀지지 않은 유전자에 해당하였고, 18개월령 근육조직보다 6개월령 근육조직에서 발현량이 많은 DEG는 parvalbumin (PVALB), nucleoside diphosphate kinase (NDK) B, tropomyosin (TPM), troponin I (TnI) 유전자에 해당하였고, 69~95%의 상동성을 나타내었다. 18개월령 근육조직에서 발현량이 많은 DEG는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), muscle-type creatine kinase (CKM2), small EDRK-rich factor 2 (SERF2), adenosine monophosphate deaminase (AMPD), Trimeric intracellular cation channel type A (TRICA) RHO GTPase-ACTIVATING PROTEIN 15 (ARHGAP15), S-formylglutathione hydrolase (Esterase D; ESD), heat shock protein 70 (hsp70), type 1 collagen alpha 2 (COL1A2), glutathione S-transferase, Mid1-interacting protein 1 (Mid1lip1), myosin light chain 1 (MYL1), sarcoplasmic/

endoplasmic reticulum calcium ATPase 1B (SERCA1B), ferritin heavy subunit (FTH1) 유전자에 해당하였다. 이들 유전자들의 기능은 큰 범주에서 볼 때 근육수축과 에너지 대사에 관련된 유전자 그룹에 속한다.

성장단계에 따라 차등발현 양상을 나타낸 DEG 중 6개월령 근육조직에서 발현량이 많은 parvalbumin과 기능이 밝혀지지 않은 DEG14, 18개월령 근육조직에서 발현량이 많은 creatine kinase muscle-type 2 (CKM2) 유전자의 발현양상을 연령이 다른 근육조직 시료를 이용하여 실시간 mRNA 정량법으로 비교하였다 (Fig. 2). DEG14는 6개월령 근육조직에서 가장 많이 발현되며 성장함에 따라 발현량이 감소하였으며, 4세어에서는 발현량이 거의 없었다. Parvalbumin 유전자는 성장초기인 6개월령에 가장 많이 발현되었고, 연령이 증가함에 따라 발현량이 급격히 감소하였다. Parvalbumin은 성장초기의 근육에서만 발현되는 것으로 판단된다. CKM2 유전자는 성장함에 따라 발현량이 증가되어 30개월령 근육조직에서 가장 많이 발현되었으며 성장이 둔화됨에 따라 발현량도 감소하는 양상을 보였다. 이와 같은 결과는 parvalbumin 유전자는 어류의 성장초기에 근육 성장에 관여하는 유전자 그룹에 속하며, CKM2 유전자는 성장절정기까지 작용하는 유전자 그룹에 포함됨을 시사한다.

Table 2. Identified skeletal muscle cDNA of dark-banded rock fish that were selected in the ACP-based PCR

DEG No.	Specificity	GeneBank accession No.	Sequence homology search
DEG01	6M	AY626067	Lates calcarifer isolate UKM/01 parvalbumin (PVALB) mRNA
DEG03	6M	GU982527	Epinephelus coioides nucleoside diphosphate kinase (NDK) B mRNA
DEG06	6M	AB045645	Pennahia argentata mRNA for tropomyosin (TPM)
DEG07	6M	GU982554	Epinephelus coioides troponin I (TnI)-like mRNA
DEG14	6M		Unknown
DEG15	6M	GU982554	Epinephelus coioides troponin I (TnI)-like mRNA
DEG17	6M	AY550962	Sparus aurata parvalbumin (PVALB)-like protein mRNA
DEG23	6M	AY550962	Sparus aurata parvalbumin (PVALB)-like protein mRNA
DEG28	6M	CR731712	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA
DEG32	6M	AY626067	Lates calcarifer isolate UKM/01 parvalbumin (PVALB) mRNA
DEG38	6M	AY550962	Sparus aurata parvalbumin (PVALB)-like protein mRNA
DEG42	6M	GU982527	Epinephelus coioides nucleoside diphosphate kinase (NDK) B mRNA
DEG45	6M	AY550962	Sparus aurata parvalbumin (PVALB)-like protein mRNA, complete cds
DEG54	6M	AY550962	Sparus aurata parvalbumin (PVALB)-like protein mRNA
DEG02	18M	AY863148	Dicentrarchus labrax glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA
DEG04	18M	BX649445	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-177H9
DEG05	18M	AY034098	Oreochromis mossambicus muscle-type creatine kinase (CKM2) mRNA
DEG08	18M	CR724420	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA
DEG09	18M	AY522631	Oreochromis mossambicus small EDRK-rich factor 2 (SERF2)-like mRNA
DEG10	18M	EZ847777	TSA: Oncorhynchus mykiss 84443.Onmycontig mRNA
DEG11	18M	AY660017	Platichthys flesus adenosine monophosphate deaminase (AMPD) mRNA
DEG18	18M	BT082672	Anoplopoma fimbria Trimeric intracellular cation channel type A (TRICA) putative mRNA
DEG19	18M	BT059062	Salmo salar Rho GTPase-activating protein 15 (ARHGAP15) putative mRNA
DEG20	18M	BT083221	Anoplopoma fimbria S-formylglutathione hydrolase (Esterase D; ESD) putative mRNA
DEG25	18M	AY436787	Rhabdosargus sarba inducible heat shock protein 70 (hsp70) mRNA
DEG27	18M		Unknown
DEG29	18M	GU982549	Epinephelus coioides type 1 collagen alpha 2 (COL1A2) mRNA
DEG30	18M	EU719618	Siniperca chuatsi glutathione S-transferase mRNA
DEG31	18M	AY034098	Oreochromis mossambicus muscle-type creatine kinase (CKM2) mRNA
DEG37	18M	CR697755	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA
DEG40	18M	BT049024	Salmo salar Mid1-interacting protein 1 (Mid1lip1) putative mRNA
DEG41	18M	CR687638	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA
DEG46	18M	AB042040	Pennahia argentata mRNA for myosin light chain 1 (MYL1)
DEG47	18M	MNU65229	Makaira nigricans sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1B (SERCA1B) mRNA
DEG56	18M	DQ915952	Epinephelus awoara ferritin heavy subunit (FTH1) mRNA
DEG60	18M	AY034098	Oreochromis mossambicus muscle-type creatine kinase (CKM2) mRNA

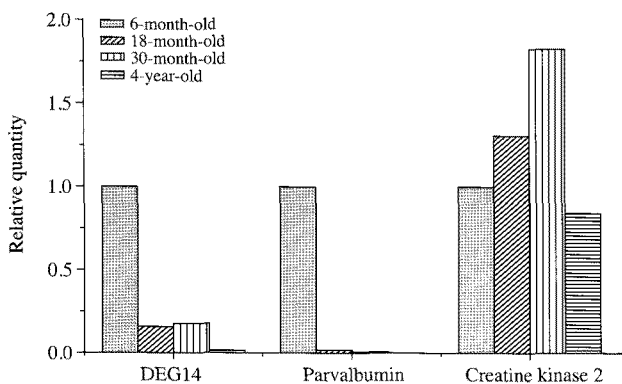


Fig. 2. Relative expression levels of differentially expressed genes in the different growth stage of dark-banded rockfish skeletal muscle, as quantified by real-time PCR.

볼락의 연령별 근육조직에서 발현량 차이를 나타낸 연구 결과를 토대로 기능을 추정하고 이후의 연구에 활용하고자

조직 특이적인 발현양상을 분석하였다. DEG14, parvalbumin, creatine kinase muscle-type 2 (CKM2) 유전자의 조직 특이적인 발현양상을 조사한 결과 (Fig. 3), DEG14는 근육 조직을 포함하여 간, 신장 및 비장 조직에서도 모두 발현되었으며, parvalbumin 유전자는 근육과 신장조직에서는 발현되었으나 간과 비장조직에서는 발현되지 않았다. CKM2 유전자는 근육, 신장 및 비장조직에서는 발현되었으나 간조직에서는 발현되지 않았다. Parvalbumin과 CKM2 유전자가 간 조직에서는 발현되지 않은 결과로 이들 유전자를 근육성장 관련 분자마커 개발에 활용이 가능함을 확인하였다.

볼락의 성장초기인 6개월령 근육조직에서 최대 발현양상을 나타낸 parvalbumin 유전자를 어류의 초기성장관련 분자마커 개발에 활용하기 위하여 RACE-PCR 방법으로 mRNA 영역을 클로닝 하였다. 염기서열을 분석한 결과 (Fig. 4), 볼락의 parvalbumin mRNA 크기는 659 bp이었으며, 110 개의 아미노산으로 이루어진 작은 단백질을 암호화하는 것

을 확인하였다. 볼락 근육조직에서 클로닝한 parvalbumin의 mRNA 염기서열을 BLAST 검색한 결과, mRNA 수준에서는 *Siniperca chuatsi* parvalbumin 3 mRNA와 88% (569/652), *Sparus aurata* parvalbumin-like protein mRNA과 87% (575/666), *Epinephelus coioides* parvalbumin 2 mRNA과 87% (565/652), *Oreochromis mossambicus* parvalbumin과 86% (484/566), *Lepidorhombus whiffiagonis* parvalbumin과 80% (522/654)가 일치하였다. 아미노산 수준에서는 *Epinephelus coioides*의 parvalbumin 2와 92개의 아미노산이 동일하여

84%의 일치성을 나타냈고, *Sparus aurata* parvalbumin-like protein과 81% (89/110), *Siniperca chuatsi* parvalbumin 3과 81% (89/110), *Oreochromis mossambicus* parvalbumin과 80% (88/110) 그리고 *Cyprinus carpio* parvalbumin과 80% (88/110)가 일치하였다.

고 찰

골격근은 몸의 움직임이나 운동성을 위한 중요한 조직이다. 근육의 수축성 기구는 myosin과 myosin-binding protein으로 구성된 thick filament, actin과 troponin 및 tropomyosin으로 구성된 thin-filament, Z-line protein, sarcomere 조립과 관련이 있는 giant protein으로 이루어졌다(Zhu *et al.*, 2009). 골격근은 기본적인 helix-loop-helix myogenic regulatory factor에 의한 다단계 과정을 거쳐 형성된다(Lluís *et al.*, 2006). 대표적인 근육단백질인 actin, tropomyosin, troponin은 thin filament protein이며, Venkatesh *et al.* (1996)은 *Fugu rubripes*에서 9개의 actin isoform을 확인하여 보고하였는데, 6개는 muscle-type actin [alpha-skeletal actin 2개, alpha-cardiac actin 3개, alpha-anomalous (testis type) actin 1개]이고, 3개는 cytoplasmic actin [beta-cytoplasmic actin 2개, beta-cytoplasmic (vascular type) actin 1개]이었다. Tropomyosin은 hetero- 또는 homodimer 형태로 존재하며 (Lees-Miller and Helfman, 1991), tropomyosin cDNA 클론은 MacLeod and Gooding (1988)이 사람의 근육조직 library에서 분리하였다.

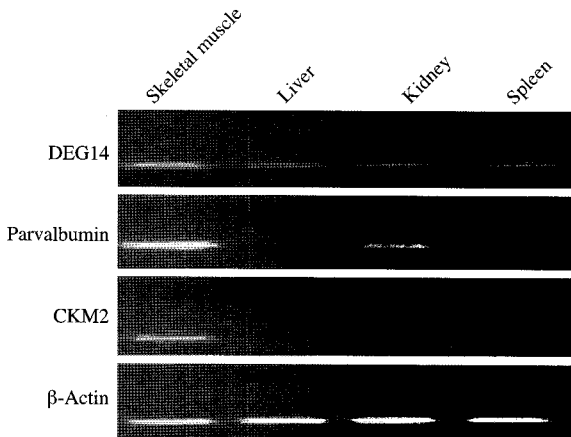


Fig. 3. Tissue distribution of the DEGs in dark-banded rockfish. Tissue-specific expression of the mRNAs corresponding to the DEG14, parvalbumin and creatine kinase muscle-type (CKM2) was examined by RT-PCR.

```

1 TGGCGGGCCGTCCTCGCCCTCACGCACCCCAAAGAATAAAAAAATGGCCTTCGCTGGTTT 60
                                     M A F A G F
61 CCTCAGTGGTACTGATATCAAAGCCGCCCTGGCTGGCTGCTCTGCTGCTGACTCCTTCAG 120
   L S G T D I K A A L A G C S A A D S F S
121 CCACAAGACCTTCTTCAAGGCATGCGGCCTGGCCAGCAAGTCCGCCGATGAGTTGAAAAA 180
   H K T F F K A C G L A S K S A D E L K K
181 GGCTTCGCCATCATTGACCAGGACAACAGCGCCTACATTGAGGAGGAGGCTCAAAC 240
   A F A I I D Q D N S A Y I E E E L K L
241 GTTCCTGCAGAACTTCGCTGCTGGAGCCAGAGCTCTCACCAGACAAGGAGACCAAGACTTT 300
   F L Q N F A A G A R A L T D K E T K T F
301 CCTCGCCGCTGGAGACAGCGATGGTATGGCAAGATTGGAGTCGATGAGTTCACCTGCACT 360
   L A A G D S D G D G K I G V D E F T A L
361 TGTAAGGCATAAAATTTCCACTGACCAAGATCCACTTCTTTTCATGGAACGGAGAGCTCC 420
   V K A *
421 TTGCAAGATTCGGTAACCACCAGCTGAAAGAATATTTTTTATATCTTATTTATGAGTTG 480
481 CCTGCGGATTATTTCTTAACATGGTACACATAATTTTACTGTGAATGTTATCCTCAGATG 540
541 TGTAAATGTTCTGAATGACTCTTGCAAACCTGTATAACACCATATGCACTTTTGAGGAAG 600
601 AGTGAAAACCAGGAATAAATACTCTTTTGGTTTAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 659
    
```

Fig. 4. Complete cDNA and predicted amino acid sequence of dark-banded rock fish parvalbumin. The start and stop codons are bolded (GenBank Accession No. DQ374441).

15개의 exon으로 구성된 척추동물의 alpha-tropomyosin 유전자는 5개의 exon이 모든 전사체에서 발견되는 반면, 다른 10개의 exon은 다른 alpha-tropomyosin RNA에서 번갈아서 이용된다. Tropomyosin 유전자는 4개의 형태가 알려져 있고, 조직특이적인 방법으로 발현되며, alternative splicing 기작에 의해 조절되고 (Lees-Miller and Helfman, 1991, striated muscle isoform은 심장 조직과 근육조직에서 발현된다. Troponin은 troponin-T, troponin-I, troponin-T, troponin-C와 같이 3개의 subunit이 존재한다 (Benzonana *et al.*, 1974). Troponin-I은 횡문근의 수축을 조절하는 myofibrillar protein으로 3개의 isoform이 존재하며, 근섬유 특이적 방법으로 발현된다 (Wade *et al.*, 1990). Parvalbumin은 칼슘이온과 결합하는 단백질로 어류의 fast-contracting muscle에서 많이 발현되고 뇌 조직과 분비관련 조직에서는 발현량이 적은 것으로 알려져 있다 (Berchtold *et al.*, 1987). Nucleoside-diphosphate kinase (NDK)는 ATP합성에 필요한 효소이고 (Biggs *et al.*, 1990), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 탄수화물 대사에서 에너지 생산에 중요한 역할을 하는 glycolytic protein이다 (Chuang *et al.*, 2005). Small EDRK-rich factor 2 (SERF2)는 helix-turn-helix protein 이고 (Scharf *et al.*, 1998), adenosine monophosphate deaminase (AMPD)는 근육조직에서 deamination 반응에 관여하며 조직특이적인 발현양상에 따라 AMPD1은 근육조직에서 많이 발현되는 isoform이고, AMPD2는 뇌 조직에서 발현된다 (Morisaki *et al.*, 1990). 성장단계별 차등발현 유전자들은 근육수축 작용, 세포 내외의 스트레스에 반응하는 유전자, 세포내 에너지 유지 기능을 갖는 유전자들이었다. Poompuang and Panprommin (2010)은 *Clarias macrocephalus*가 6개월령에 도달했을 때, parvalbumin 4 유전자가 가장 많이 발현된다고 보고하였다. Creatine kinase (muscle-type) 2 유전자는 연령이 증가함에 따라 발현량도 증가했으며, 30개월령 근육조직에서 최대 발현량을 나타내어, 6개월령 근육조직에서 발현량의 1.8배가 되었다. 4세어 근육조직에서는 발현량이 감소되었으며, 그 양은 30개월령 근육조직에서 발현하는 양의 50%이었다. Creatine kinase는 dimer 형태로 존재하는 isozyme으로 근육세포 내의 ATP 양을 유지하는 기능을 가지며 (Dawson *et al.*, 1968), Chen *et al.* (2010)은 CK-M1 (creatine kinase, muscle-type 1) 유전자가 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 metamorphosis 과정 동안 발현량이 증가한다고 보고하였다.

어류가 성장함에 따라 근육이 생성되고, 성장 시기에 따라 작용하는 근육단백질 종류와 발현량 차이를 조사하기 위하여 성장 초기인 6개월령 근육조직과 성장 절정기인 18개월령 근육조직의 mRNA를 비교하여 분석한 결과, Table 2에 나타낸 것과 같이 연령에 따라 발현되는 유전자의 종류와 발현량의 차이가 있었다. 성장 초기인 6개월령 근육조

직에서는 thin filament protein에 속하는 tropomyosin과 troponin 유전자의 발현량이 많은 반면에, 18개월령 근육조직에서는 thick filament protein인 myosin 유전자의 발현량이 많았으며, 18개월령 근육조직 유래 DEG에서도 tropomyosin과 troponin 유전자는 확인되지 않았다. 이와 같은 연구결과로부터 어류의 근육성장에 관여하는 근육단백질 관련 유전자는 성장시기에 따라 발현되는 유전자가 다를 수 있었으며, 연령에 따라 발현량 차이를 나타낸 근육단백질 유전자의 발현양상을 어류의 성장패턴과 성장속도를 예측할 수 있는 분자마커 개발에 활용할 수 있을 것으로 판단하였다.

볼락의 성장초기인 6개월령 근육조직에서 차등발현 양상을 나타내어 선발한 14개의 DEG중 6개를 차지한 parvalbumin 유전자는 근육내에서 칼슘이온과 결합하는 단백질로 연령별 발현양상 분석 결과 (Fig. 2)에서 성장초기에 발현량이 급증하고 이후에는 발현량이 거의 없음을 확인하였다. 이와 같은 연구결과는 6개월령 *Clarias macrocephalus*에서 parvalbumin 4 유전자의 발현량이 가장 많았다는 Poompuang and Panprommin (2010)의 보고와 일치하였으며, 볼락의 초기 성장과 관련된 분자마커 개발에 활용하기 위하여 mRNA 영역을 클로닝하여 유전정보를 확보하였다. 볼락의 연령이 증가함에 따라 발현량이 증가하여 성장이 둔화됨에 따라 발현량도 감소한 CKM2 유전자 또한 성장관련 유전자로 판단된다. Parvalbumin 유전자와 CKM2 유전자가 근육조직에서는 발현되지만, 간조직에서 발현되지 않은 결과는 이들 유전자가 어류의 기초대사 관련 유전자가 아님을 시사하며, 근육대사 관련 유전자로 어류의 근육성장 관련 분자마커 개발에 활용 가능성을 제시한다. 본 연구에서 확인한 parvalbumin과 CKM2 유전자의 발현양상 분석 결과로는 이들 유전자가 어류의 성장에 관여하는 정확한 기능을 해명할 수 없지만, 초기 성장에 작용하는 유전자와 성장 절정기에 작용하는 유전자가 다르며, 동일한 유전자도 성장 단계에 따라 발현량이 다른 사실을 확인하였다. 어류의 성장단계별 발현 유전자와 발현양상 분석결과를 비롯하여 성장관련 분자마커 적용사례는 아직까지 보고된 바 없으나, 성장 차이를 보인 개체를 선발한 후, parvalbumin과 CKM2 유전자의 발현양상을 각각 비교하고, 기능영역 내 변이 또는 발현 조절영역 내 변이를 분석하는 방법을 적용하면 어류의 성장관련 분자마커 개발이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

ACP (annealing control primer)를 사용하여 DDRT (differential display reverse transcription)-PCR 방법으로 볼락의 성장단계에 따라 발현량 차이를 나타내는 DEG (differentially

expressed gene)를 확보하였다. ACP 120개를 분석하여 18개월령 근육조직에서보다 6개월령 근육조직에서 발현량이 많은 DEG 16개와 6개월령 근육조직에서보다 18개월령 근육조직에서 발현량이 더 많은 DEG 22개의 염기서열을 분석하였다. DEG 염기서열을 BLAST 검색한 결과, parvalbumin (PVALB) 등 18개의 유전자 (PVALB, NDKB, TPM, TnI, GAPDH, CKM2, factor 2 SERF2, AMPD, TRICA, ARHGAP15, ESD, hsp70, COL1A2, GST, Mid1lip1, MYL1, SERCA1B, FTH1)와 69~95%의 상동성을 나타냈다. Real time PCR 분석법으로 6개월령 근육조직에서 발현량이 많은 DEG14와 PVALB 유전자의 성장단계별 발현양상을 조사한 결과, 볼락이 성장함에 따라 발현량이 감소하였으며, 특히 PVALB 유전자는 6개월령 이후에는 발현량이 극히 적었다. 6개월령 근육조직에서보다 18개월령 근육조직에서 발현량에서 많았던 CKM2 유전자는 성장함에 따라 발현량이 계속 증가하였고, 4세 이후에는 발현량이 감소하였다. DEG의 조직특이적 발현양상을 분석한 결과, DEG14는 근육, 간, 신장, 및 비장조직에서 발현되었으며, PVALB 유전자는 근육과 신장조직에서 발현되었고, 간과 비장조직에서는 발현되지 않았다. CKM2 유전자는 근육, 신장 및 비장조직에서 발현되었고, 간 조직에서는 발현되지 않았다. PVALB 유전자의 mRNA 크기는 659 bp이며, 110개의 아미노산으로 구성되어 있다. Parvalbumin과 CKM2 유전자는 성장속도가 빠른 어류 선발에 이용할 수 있는 분자마커 개발에 활용하고자 한다.

사 사

이 연구는 한국해양연구원의 「동해온배수와 심층수 활용에 기반을 둔 해양식량어류자원의 유전적 관리체계 구축」 연구과제의 지원을 받아 수행되었다.

인 용 문 헌

- Arif, S.H. 2009. A Ca²⁺-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *BioEssays*, 31: 410-421.
- Arif, S.H., M. Jabeen and A. Hasnain. 2007. Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumins: the major fish-food allergens. *J. Food Biochem.*, 31: 121-137.
- Benzonana, G., L. Kohler and E.A. Stein. 1974. Regulatory proteins of crayfish tail muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 368: 247-258.
- Berchtold, M.W., H. Brinkmeier and M. Müntener. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol. Rev.*, 80: 1216-1265.
- Berchtold, M.W., P. Epstein, A.L. Beaudet, M.E. Payne, C.W. Heizmann and A.R. Means. 1987. Structural organization and chromosomal assignment of the parvalbumin gene. *J. Biol. Chem.*, 262: 8696-8701.
- Biggs, J., E. Hersperger, P.S. Steeg, L.A. Liotta and A. Shearn. 1990. A Drosophila gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell*, 63: 933-940.
- Brownridge, P., L. Vieira de Mello, M. Peters, L. McLean, A. Claydon, A.R. Cossins, P.D. Whitfield and I.S. Young. 2009. Regional variation in parvalbumin isoform expression correlates with muscle performance in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Exp. Biol.*, 212: 184-193.
- Chauvigné, F., C. Cauty, C. Ralliére and P.Y. Rescan. 2005. Muscle fiber differentiation in fish embryos as shown by in situ hybridisation of a large repertoire of muscle specific transcripts. *Dev. Dyn.*, 233: 659-666.
- Chen, Y., Q. Zhang, J. Qi, Z. Wang, X. Wang, Y. Sun, Q. Zhong, S. Li and C. Li. 2010. Cloning and stage-specific expression of CK-M1 gene during metamorphosis of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *China. J. Ocean. Limnol.*, 28: 558-564.
- Chikou, A., F. Huriaux, P. Laleye, P. Vandewalle and B. Focant. 1997. Isoform distribution of parvalbumins and of some myofibrillar proteins in adult and developing *Chrysichthys auratus* (Geoffroy St. Hilaire, 1808) (Pisces, Cloroteidae). *Arch. Physiol. Biochem.*, 105: 611-617.
- Chuang, D.M., C. Hough and V.V. Senatorov. 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 269-290.
- Dawson, D.M., H.M. Eppenberger and M.E. Eppenberger. 1968. Multiple molecular forms of creatine kinases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151: 616-626.
- Focant, B., F. Huriaux, P. Vandewalle, M. Castelli and G. Goessens. 1992. Myosin, parvalbumin and myofibril expression in barbel (*Barbus barbus* L.) lateral white muscle during development. *Fish Physiol. Biochem.*, 10: 133-143.
- Focant, B., F. Mélot, S. Collin, A. Chikou, P. Vandewalle and F. Huriaux. 1999. Muscle parvalbumin isoforms of *Clarias gariepinus*, *Heterobranchius longifilis* and *Chrysichthys auratus*: isolation, characterisation and expression during development. *J. Fish Biol*, 54: 832-851.
- Focant, B., P. Vandewalle and F. Huriaux. 2003. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms during the development of a flatfish, the common sole *Solea solea*: comparison with the turbot *Scophthalmus maximus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 135: 493-502.
- Focant, B., S. Collin, P. Vandewalle and F. Huriaux. 2000. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms in white muscle of the developing turbot *Scophthalmus maxi-*

- mus* (Pisces, Pleuronectiformes). *Basic Applied Myol.*, 10: 269-278.
- Gillis, J.M. 1985. Relaxation of vertebrate skeletal muscle. A synthesis of the biochemical and physiological approaches. *Biochim. Biophys. Acta*, 811: 97-145.
- Huriaux, F., F. Mélot, P. Vandewalle, S. Collin and B. Focant. 1996. Parvalbumin isotypes in white muscle from three teleost fish: Characterization and their expression during development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 113: 475-484.
- Huriaux, F., P. Vandewalle and B. Focant. 2002. Immunological study of muscle parvalbumin isotypes in three African catfish during development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 132: 579-584.
- Huriaux, F., S. Collin, P. Vandewalle, J.C. Philippart and B. Focant. 1997. Characterization of parvalbumin isotypes in white muscle from the barbel and expression during development. *J. Fish Biol.*, 50: 821-836.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177: 99-115.
- Kim, Y.J., C.I. Kwak, Y.Y. Gu, I.T. Hwang and J.Y. Chun. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Bio Techniques*, 36: 424-426, 428, 430.
- Lees-Miller, J.P. and D.M. Helfman. 1991. The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *BioEssays*, 13: 429-437.
- Lluís, F., E. Perdigueró, A.R. Nebreda and P. Muñoz-Cánovesa. 2006. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends in Cell Biology*, 16: 36-44.
- MacLeod, A.R. and C. Gooding. 1988. Human hTM- α gene: expression in muscle and nonmuscle tissue. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 433-440.
- Mommsen, T.P. 2001. Review: paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 129: 207-219.
- Morisaki, T., R.L. Sabina and E.W. Holmes. 1990. Adenylate deaminase: a multigene family in humans and rats. *J. Biol. Chem.*, 265: 11482-11486.
- Poompuang, S. and D. Panprommin. 2010. Expression of four muscle proteins at different growth stages of Günther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. *Aquaculture Research*, 41: e144-e154.
- Sanuki, H., M. Hata and M. Takeuchi. 2003. Distribution of calcium bound to parvalbumin in water-soluble fractions in some fish muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 69: 387-392.
- Scharf, J.M., M.G. Endrizzi, A. Wetter, S. Huang, T.G. Thompson, K. Zerres, W.F. Dietrich, B. Wirth and L.M. Kunkel. 1998. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nature Genet.*, 20: 83-86.
- Venkatesh, B., B.H. Tay, G. Elgar and S. Brenner. 1996. Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *J. Mol. Biol.*, 259: 655-665.
- Wade, R., R. Eddy, T.B. Shows and L. Kedes. 1990. cDNA sequence, tissue-specific expression, and chromosomal mapping of the human slow-twitch skeletal muscle isoform of troponin I. *Genomics*, 7: 346-357.
- Zawadowska, B. and I. Supiková. 1992. Parvalbumin in skeletal muscles of teleost (*Tinca tinca* L. and *Misgurnus fossilis* L.). Histochemical and immunohistochemical study. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 30: 63-68.
- Zhu, J., Y. Sun, F.Q. Zhao, J. Yu, R. Craig and S. Hu. 2009. Analysis of tarantula skeletal muscle protein sequences and identification of transcriptional isoforms. *BMC Genomics*, 10: 117.