

## 볼락(*Sebastes inermis*)의 성장단계별 차등발현 유전자 탐색

장요순\*

한국해양연구원 동해연구소 동해특성연구부

**Investigation of Growth Stage Related Genes in Dark-banded Rockfish *Sebastes inermis* by Yo-Soon Jang\*** (East Sea Environment Research Institute, KORDI, Gyeongbuk 767-813, Korea)

**ABSTRACT** Expression analysis of development-related genes was conducted using differential screening of 6-month-old [18M (-), 6M-18M] specific and 18-month-old [6M (-), 18M-6M] specific subtracted cDNA libraries constructed by subtractive hybridization using skeletal muscle of 6- and 18-month-old dark-banded rockfish *Sebastes inermis*. A total 202 cDNA clones displaying different expression levels in each stage were obtained; among them, 32 clones showing up-regulation were finally selected for further expression analysis. We sequenced the clones and analyzed individual sequences. Genes expressed specifically in 6-month-old skeletal muscle were identified as myosin, adenylate kinase, calsequestrin, dystrobrevin beta, and diphosphate kinase-Z1. Genes showing strong expression in 18-month-old rockfish were identified as desmin, TGFBR2 (transforming growth factor-beta receptor), muscle-type creatine kinase, and cathepsin D. Expression of these genes was checked further in 6-18-30-42 month-old dark-banded rock fish. Rapid reduction of expression was observed in dystrobrevin beta and diphosphate kinase. However, expression of creatine kinase (muscle type) and cathepsin D increased as dark-banded rockfish grew, and remained even after 18 months. The results reported here demonstrate that genes related to muscles contract are expressed at an early stage of development, and genes controlling energy in muscles are predominantly expressed at a late developmental stage.

**Key words :** Differential screening, subtracted cDNA library, growth-related gene, dark-banded rock fish, semiquantitative RT-PCR

### 서 론

성장이란 생물체의 신진대사 결과로 크기, 무게, 부피가 증가하는 현상으로 세포의 증식 또는 피하지방의 축적 등으로 일어난다. 어류도 다른 동물과 같이 성장과정이 1년을 단위 주기로 하여 성장속도에 변이가 생기는데, 이는 먹이와 생식기능 등의 주기적인 변화로 인한 것이다. 어류의 성장은 다른 생물과 같이 환경요인, 특히, 수온과 먹이 섭취량 등에 따라 좌우된다. 어류의 활동이 왕성할수록 식욕이 증가하고, 많은 양의 먹이를 먹게 되어 결과적으로 성장이 빠르다(김, 1978). 어류 성장의 지표가 되는 체장 및 체중의 증

가는 근육량 증가에 기인하며, lactate dehydrogenase (LDH)와 pyruvate kinase (PK) 효소가 활성화되면 근육량이 크게 증가한다(Somero and Childress, 1980).

어류에서 성장은 근섬유(muscle fiber)의 근수축 반응에 참여하는 숫자가 증가하고 크기가 비대해지는 결과이다. 어류의 근육형성은 분화되지 않은 myoblast의 생성, 증식 및 활성화단계로 이루어진다(Johnston, 1999). 어류의 성장은 근수축 필라멘트 합성과 관련 있는 근섬유의 비대로 인한 것이다(Weatherley *et al.*, 1988). 근육형성 초기단계에서 근육분화는 MRFs(myogenic regulatory factor)의 유도과 더불어 복합적인 신호체계에 의해 조절된다(Molkentin and Olson, 1996). Myo D gene family, IGF-1 (insulin-like growth factor-1), myostatin이라 불리는 TGF- $\beta$  (transforming growth factor)

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

**Table 1.** Sequences of the PCR-selected cDNA synthesis primer, adaptors and target PCR primers

Primer	Sequence
cDNA synthesis primer	5'-TTTTGTACAAGCTT <sub>30</sub> N <sub>1</sub> N-3'
Adaptor 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3' 3'-GGCCCGTCCA-5'
Adaptor 2R	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3' 3'-GCCGGCTCCA-5'
PCR primer 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Nested PCR primer 1	5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3'
Nested PCR primer 2R	5'-AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'
G3PDH 5' primer	5'-ACCACAGTCCATCAC-3'
G3PDH 3' primer	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
M13 Forward (-20) primer	5'-GTA AAAACGACGGCCAG-3'
M13 Reverse primer	5'-GTCCTTTGTCGATACTG-3'

family는 근육분화 프로그램을 활성화시킨다(Florini *et al.*, 1991; Olson, 1992; McPherron *et al.*, 1997).

볼락(*Sebastes inermis* Cuvier)은 난태생 경골어류로 김과 한(1993), 김 등(1993)이 종묘 초기단계의 전장 성장에 관하여 보고한 바 있다. 우리나라 볼락 양식 기간은 평균 22.5개월로서 경제성은 양식장 면적, 인건비, 사료비 등에 따라 달라지는데(박 등, 2006), 볼락의 성장속도가 빠를수록 경제성은 좋아질 것이다. 하지만 볼락의 초기성장과정에서 성장특성을 조사한 연구결과(최 등, 2005)는 있지만, 지금까지 어류의 성장단계 특이적 발현 유전자 탐색에 관한 연구 결과는 보고된 바 없다. 본 연구는 볼락의 성장단계에 따라 차등발현 양상을 나타내는 유전자를 differential screening 방법으로 탐색하고 유전자 단편을 확보하여 유전 정보를 분석하고, 성장 초기단계와 성장의 절정기에 도달한 어류의 근육조직에서 발현량이 많은 유전자를 분석하여, 성장능력이 우수한 개체선발에 이용할 분자마커를 개발하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

경남 통영시 소재의 한국해양연구원 통영 MRC에서 일반적인 관리방법으로 사육된 6개월령(6M) 및 18개월령(18M) 볼락을 각각 10개체씩 확보하였고, 각 개체의 근육조직을 library 제작에 이용하였다. 성장단계에 따른 발현량 분석에 사용하기 위하여 30개월령과 42개월령 볼락을 각각 10개체씩 확보하였다.

### 2. Total RNA 분리 및 mRNA 정제

볼락 근육조직 total RNA는 연령별 개체의 근육조직을 각각 100 mg씩 취하여 액체질소를 이용하여 파쇄한 후, TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, USA)와 chloroform을 사용하

여 분리하였다. mRNA는 total RNA로부터 oligo(dT)-latex bead를 사용하는 NucleoTrap<sup>®</sup> mRNA Purification Kits (Clontech, USA)을 이용하여 회수하였다.

### 3. Subtracted cDNA library 제작 및 screening

#### 1) Subtracted cDNA library 제작

6개월령 및 18개월령 볼락 근육조직 특이적인 cDNA library는 PCR-Selected cDNA Subtraction Kit (Clontech, USA)을 사용하여 제작하였다. 각 월령별 볼락 근육조직에서 분리한 mRNA를 AMV reverse transcriptase를 사용하여 한 가닥 cDNA를 합성하였으며, 이를 주형으로 두 가닥 cDNA를 합성하였다. 합성한 두 가닥 cDNA의 말단을 제한효소를 사용하여 blunt-end로 만들고 adaptor 1과 adaptor 2R을 부착하였다. Subtractive hybridization은 두 단계로 나누어 실시하였으며, 첫 번째 단계의 hybridization은 반응액을 98°C에서 90초간 반응시킨 후 68°C에서 8시간 동안 반응시켰다. 두 번째 단계의 hybridization은 driver cDNA를 첨가하여 98°C에서 90초 동안 반응시킨 후, hybridization sample을 혼합하여 68°C에서 하룻밤 동안 반응시켜 완료하였다. 각각의 subtraction 시료를 사용하여 PCR 방법으로 증폭한 cDNA (subtracted cDNA)를 pGEM-T easy vector system (Promega, USA)을 이용하여 subtracted cDNA library를 구축하였다. Subtracted cDNA library 제작시 사용한 PCR primer 및 adaptor의 서열은 Table 1과 같다.

#### 2) Subtracted cDNA library screening

볼락 월령별 근육조직 subtracted cDNA library를 PCR-Selected Differential Screening Kits (Clontech, USA)을 사용하여 분석하였다. Digoxigenin-dUTP (Roche, Germany)로 합성한 4개의 probe로 forward-subtracted [6개월령-18개월령, 18M(-)] cDNA library 및 reverse-subtracted [18개월령-6개월령, 6M(-)] cDNA library를 분석하였다. 각 subtraction 단계에서 얻은 2차 PCR 산물을 probe로 이용하였으며, 각 subtracted cDNA library로부터 확보한 콜로니를 주형으로

**Table 2.** Primers for semi-quantitative RT-PCR

Clone name	Primer sequence (5' → 3')		Annealing temp. (°C)	PCR cycle
6M05A3-40	FW: CAGAGTGAACAGATATGGAAC	RV: TACGAAGGGGATAGTGCTGA	59	18
6M05A3-55	FW: TCATCCGCAGTGAGGCTGCT	RV: CTCATCACTGCCTACCACCA	55	15
6M05A3-58	FW: CTTACGGATGTCGACATCAC	RV: GACTACCTCATGAAGATCCTG	63	17
6M05A3-89	FW: CACGAAATATTCAGCCTCCG	RV: CTCGATGGTCTTGATCAGGA	59	18
6M05A4-02	FW: TGATCGCTGATCACTTCTCTG	RV: TCTCTTACCATCAGCTTGAC	56	18
6M05A4-06	FW: TCTGTCCAGGTTTTTGGACG	RV: ATTAACGGTAGGACTTCTGG	65	16
6M05A4-69	FW: TCATCGATGGGCTCGATCAT	RV: TACTACGAGCAGTTCGCCAA	65	18
6M05A4-71	FW: GCTCCGACGTGGAGAAAGGA	RV: TTCGTGATGTCCAGGAAGTC	65	18
18M05A1-13	FW: TATCGGTCTCTCTGTGCAC	RV: TCAGATTCCCACATGTGCAG	55	18
18M05A1-22	FW: TGACTTTGACTTCGCTGGCC	RV: GACAGGGTGAGTTTCACACC	57	17
18M05A1-26	FW: CAAGGACATCTACAACAAGC	RV: GTACGAACACGGCTGGACAG	57	18
18M05A1-90	FW: ATGGGAGAGAAGCTCAACAT	RV: GCGCTCTTACCAGCTGCTT	59	16
18M05A2-09	FW: TCACACACGTGGAGTCATAT	RV: GAGATTGAAGACCTGAGGATC	61	18
18M05A2-74	FW: GGTATGGTGGGAAGATGAGT	RV: TGAGCCTTGAGAGACTGGAG	58	17
18M05A2-84	FW: ATCGTCGGTCACGAGCACTA	RV: AGGATGCTCTGGAAGCCCTT	59	18
18M05A3-04	FW: ATGGCCTTCGCTGGTTTCCT	RV: CCTGGTTTTCACTCTTCCTC	63	18
GAPDH	FW: ACGACAACGAGTTCGCATAC	RV: CTCACACCTTTACTCCATCTC	62	15

사용하였다. Imager를 이용하여 비교 분석한 blot의 signal은 NBT/BCIP 용액 (Roche, Germany)으로 염색하여 분석하였다.

**4. Semi-quantitative RT-PCR**

볼락 월령별 근육조직으로부터 분리·정제한 total RNA를 oligo (dT)<sub>12-18</sub>와 혼합한 후, SuperScript™II Reverse transcriptase (Invitrogene, USA)를 첨가하여 42°C에서 50분간 반응시켜 한 가닥 cDNA로 전환하였다. *Dicentrarchus labrax*의 GAPDH 염기서열 (GenBank accession No. AY863148)을 기초로 하여 제작한 primer로 한 가닥 cDNA의 합성 여부 및 합성효율을 확인하였으며, semi-quantitation을 위하여 한 가닥 cDNA량을 정량화하였다. 적정량의 cDNA와 target primer를 사용하여 (Table 2) 18 cycle 반응시킨 산물을 agarose gel 전기영동으로 확인하였고, 각각 단편의 밝기 강도를 densitometer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 정량하고 분석하였다.

**5. Northern blot analysis**

볼락 월령별 근육조직으로부터 분리·정제한 total RNA를 RNA sample buffer (64.5% deionized formamide, 8.35% formaldehyde, 0.64x MOPS)와 섞어 65°C에서 15분간 변성시킨 다음, formaldehyde gel-loading buffer (50% glycerol, 1 mM EDTA pH8.0, 0.25% Xylene cyanol FF, 0.25% bromophenol blue)를 첨가하여 1.2% formaldehyde gel 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel에서 formaldehyde를 충분히 제거한 후, nylon membrane으로 RNA를 옮기고 UV-cross-linker (UVP CL-1000, USA)를 사용하여 고정시켰다. Probe

DNA는 subtracted cDNA library를 분석하여 확보한 cDNA를 DIG High Prime을 이용하여 합성하였으며, hybridization 반응은 high SDS hybridization buffer (5x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 7% SDS, 2% blocking reagents, 50% formamide, 50 mM sodium phosphate buffer, pH7.0)를 사용하여 반응강도를 높여 실시하였다. 반응이 끝난 nylon membrane은 CDP-star (Roche, Germany)를 사용하여 X-ray film에 노출시켜 signal을 확인하고 분석하였다.

**6. 염기서열 분석**

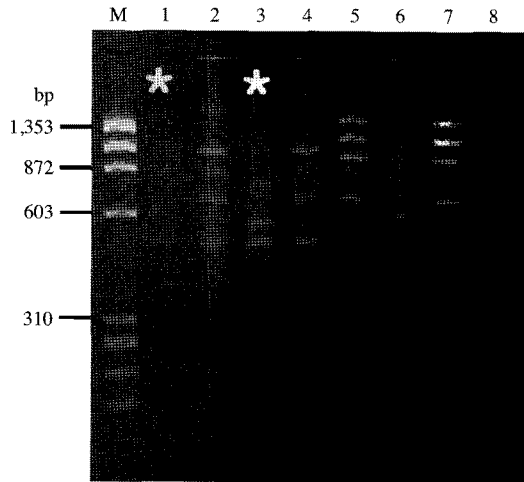
재조합체로부터 plasmid DNA를 회수한 후, BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 염기서열 결정반응을 실시하였다. 반응이 끝난 산물은 ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였으며, Chromas 2.30과 BioEdit v 5.0.6 프로그램을 사용하여 비교 분석하였다.

**결 과**

**1. Subtracted cDNA library 제작 및 differential screening**

볼락의 성장관련 기능성 유전자를 탐색하기 위하여 6개월령 및 18개월령 근육조직 특이적인 subtracted cDNA library를 제작하였다. 6개월령 근육조직 특이적인 cDNA library [18M(-), 6M-18M]는 6개월령 근육조직 cDNA library에서 18개월령 근육조직에서 발현되는 유전자와 일치하는 cDNA를 제거하여 제작한 것으로 18개월령 근육조직과 공통으로 발현되는 유전자가 없는 상태의 cDNA library이다.

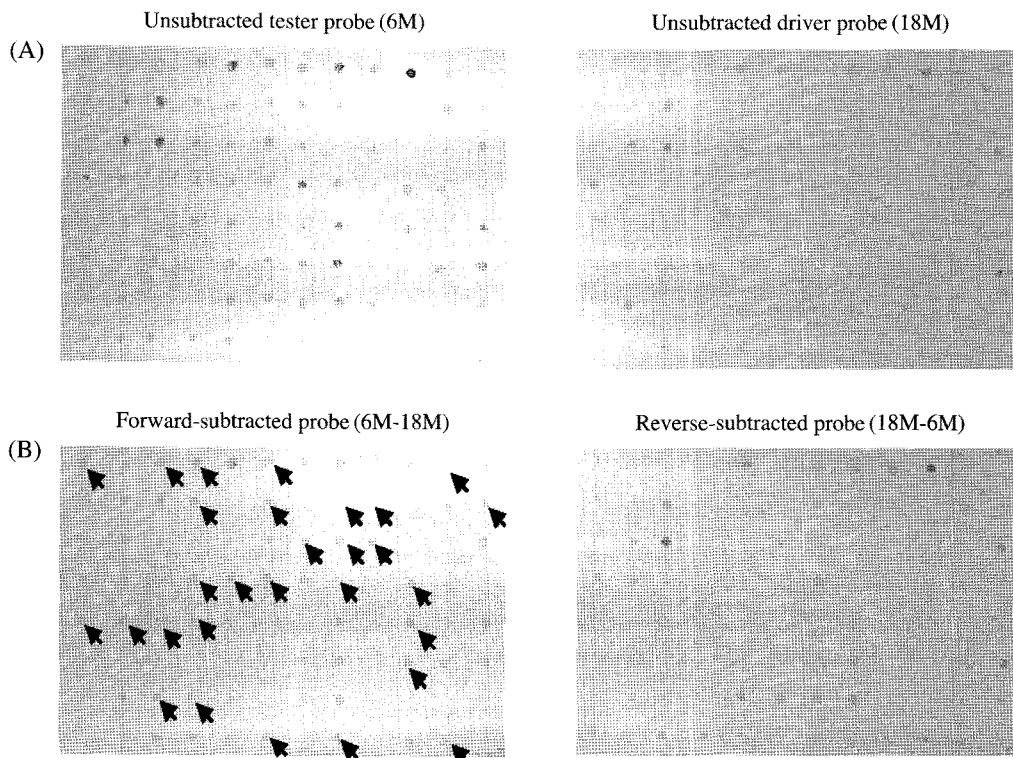
이와 반대의 방법으로 18개월령 근육조직 특이적인 cDNA library [6M(-), (18M-6M)]를 제작하였다. 제작한 subtracted cDNA library는 본 연구에서 사용한 kit 내에 있는 control



**Fig. 1.** Results of the dark-banded rockfish skeletal muscle subtraction according to the Suppression Subtractive Hybridization. M, X174 DNA/*Hae*III marker; 1, 18M-6M (subtraction); 2, Unsubtracted (18M); 3, 6M-18M (subtraction); 4, Unsubtracted (6M); 5, Subtracted control skeletal muscle cDNA; 6, Unsubtracted tester control for the control subtraction; 7, PCR control subtracted cDNA (positive control); 8, Negative control.

을 이용하여 정상적으로 subtraction 되었는지 여부를 전기 영동방법으로 확인하였다. Fig. 1의 1번 lane (18M-6M cDNA library)과 3번 lane (6M-18M cDNA library)과 같이 정상적으로 제작되어, 4개의 subtracted library를 probe 이용하여 양방향으로 비교 가능하도록 differential screening을 실시하였다(Fig. 2). Fig. 2B에서 화살표로 표시한 것과 같이 강한 시그널을 나타낸 cDNA 클론을 성장단계 특이발현 후보 유전자로 선발하였다. 6개월령 근육조직에서 발현량이 많은 클론 112개와 18개월령 근육조직에서 발현량이 많은 클론 90개를 확보하였고, hybridization 반응 강도를 높여 subtracted cDNA library를 반응시켜 최종적으로 32개 (6개월령 근육조직에서 발현량 증가: 13개, 18개월령 근육조직에서 발현량 증가: 19개)의 각 성장단계 특이적인 차등 발현유전자를 선택하여 염기서열을 분석하였다(Table 3).

염기서열을 BLAST 검색한 결과, 6개월령 특이적 발현 cDNA 클론에는 myosin, adenylate kinase, calsequestrin 1, Dystrobrevin, diphosphate kinase에 해당하는 유전자 단편이 있었고, 18개월령 특이적 발현 cDNA 클론에는 transforming growth factor, desmin, muscle-type creatine kinase, Hsp 90 (heat shock protein 90), Grp94 (glucose-regulated protein 94), cathepsin, TCTP (translationally-controlled tumor protein), calreticulin, lactate dehydrogenase-A에 해당하는 유전자 단편이 있었다. 어류 유전자의 정보로 인하여 BLAST 검색결



**Fig. 2.** Differential screening results of dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*, skeletal muscle subtracted cDNA libraries.

**Table 3.** Growth-stage related genes identified in a cDNA library prepared by suppression subtract hybridization using dark-banded rockfish skeletal muscle

Clone name	Length (bp)	GenBank No. (Nucleotide)	Best BLASThit <sup>a</sup>	Identity <sup>b</sup> (%)	GenBank No. (EST)
6M05A3-40	349	CR704132	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	111/131 (84%)	GT758010
6M05A3-55	394	BT027417	Gasterosteus aculeatus clone CFW272-A05 mRNA	328/394 (83%)	GT758024
6M05A3-58	470	AB042037	Euthynnus pelamis mRNA for myosin light chain 1	387/451 (85%)	GT758027
6M05A3-61	465	FJ426139	Epinephelus coioides adenylate kinase 1-2 mRNA	372/431 (86%)	GT758030
6M05A3-66	289	CR729021	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	224/273 (82%)	GT758035
6M05A3-74	371	AB042046	Trachurus trachurus mRNA for myosin light chain 1	271/341 (79%)	GT758043
6M05A3-89	618	AB442012	Solea senegalensis CASQ1 mRNA for calsequestrin 1	227/275 (82%)	GT758058
6M05A3-94	386	CR678600	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	308/376 (81%)	GT758063
6M05A4-02	457	AK300019	Homo sapiens cDNA FLJ60874, highly similar to Dystrobrevin beta	135/182 (74%)	GT758067
6M05A4-06	455	BT082672	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-525-239 Trimeric intracellular cation channel type A putative mRNA	225/256 (87%)	GT758071
6M05A4-14	302	CR694671	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	180/223 (80%)	GT758079
6M05A4-69	470	FJ426115	Epinephelus coioides nucleoside diphosphate kinase-Z1 mRNA	350/431 (81%)	GT758134
6M05A4-71	384	FJ374271	Siniperca knerii myosin light chain 3 mRNA	340/379 (89%)	GT758136
18M05A1-13	333	NM_001159566	Bos taurus transforming growth factor, beta receptor II (70/80 kDa) (TGFB2), mRNA	214/293 (73%)	GT757793
18M05A1-21	561	FJ438518	Epinephelus coioides desmin mRNA	332/461 (72%)	GT757801
18M05A1-22	609	AY034098	Oreochromis mossambicus muscle-type creatine kinase CKM2 mRNA	551/597 (92%)	GT757802
18M05A1-26	287	DQ662233	Paralichthys olivaceus heat shock protein 90 alpha (Hsp90alpha) mRNA	242/275 (88%)	GT757806
18M05A1-30	358	BT083019	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-524-201 Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog putative mRNA	330/352 (93%)	GT757810
18M05A1-47	806	FJ613633	Siniperca chuatsi muscle-type creatine kinase mRNA	313/350 (89%)	GT757827
18M05A1-53	418	DQ662235	Paralichthys olivaceus glucose-regulated protein 94 (Grp94) mRNA	358/415 (86%)	GT757833
18M05A1-84	292	BT026617	Gasterosteus aculeatus clone CEC24-B04 mRNA	164/196 (83%)	GT757864
18M05A1-90	310	BT044692	Salmo salar clone ssal-rgf-002-373 Tob1 putative mRNA	234/306 (76%)	GT757870
18M05A2-09	284	EU143237	Lates calcarifer cathepsin D mRNA	168/208 (80%)	GT757884
18M05A2-17	757	BT026632	Gasterosteus aculeatus clone CEC28-E02 mRNA	344/373 (92%)	GT757892
18M05A2-22	510	DQ821474	Paralichthys olivaceus voltage-dependent anion channel (VDAC) mRNA	428/489 (87%)	GT757897
18M05A2-69	343	EU413401	Hippoglossus hippoglossus creatine kinase mRNA	295/325 (90%)	GT757943
18M05A2-74	332	BT083075	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-521-379 Translationally-controlled tumor protein putative mRNA	232/314 (73%)	GT757948
18M05A2-84	319	BT058985	Salmo salar clone ssal-rgf-517-369 Calreticulin precursor putative mRNA	132/167 (79%)	GT757958
18M05A2-86	540	FJ772429	Lutjanus argentimaculatus cathepsin S mRNA	260/326 (79%)	GT757960
18M/5A2-92	275	FJ438518	Epinephelus coioides desmin mRNA	213/239 (89%)	GT757966
18M05A3-04	475	AF170710	Lycodichthys dearborni lactate dehydrogenase-A mRNA	412/464 (88%)	GT757974
18M05A3-09	279	BT026686	Gasterosteus aculeatus clone CEC40-B03 mRNA	190/249 (76%)	GT757979

<sup>a</sup>Best result obtained by BLASTN analysis using the cDNA sequence as a query in the nr database at NCBI

<sup>b</sup>Number of (percentage) nucleotide sequence identities to the best BLAST hit in the segment compared

과, ‘unnamed protein’으로 명명된 클론도 있었다.

## 2. 성장단계에 따른 차등발현 유전자 발현양상

각 월령별 근육조직 subtracted cDNA library로부터 선발한 차등발현 유전자의 발현양상을 분석하기 위하여 볼락 6, 18, 30, 42개월령 근육조직에 대한 semiquantitative RT-PCR을 실시하였다(Table 4). 6개월령 특이적 발현양상을

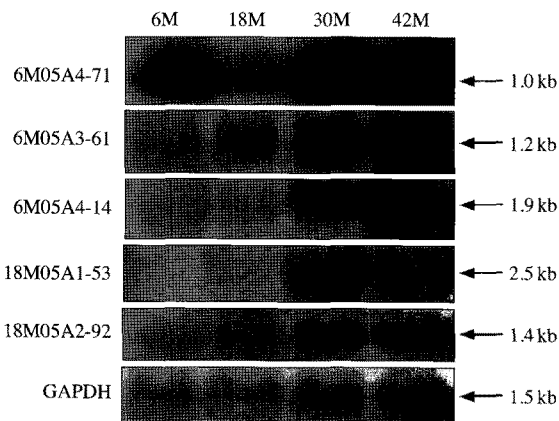
나타낸 6M05A3-40, 6M05A3-55, 6M05A3-58, 6M05A4-06, 6M05A4-69 cDNA 클론은 볼락이 성장함에 따라 발현량이 급격히 감소하여 30개월령 이후에는 발현량이 극소량이였다. Calsequestrin 1 유전자 단편인 6M05A3-89 클론은 6개월령 근육조직에서 발현량이 가장 많았으며, 18개월령 이후 급격히 감소하다가 42개월령 근육조직에서는 발현되지 않았다. 6M05A4-02 클론은 dystrobrevin beta 유전자 단편이었으며, 6개월령 근육조직에서 발현량이 많았고, 18개월령 이

**Table 4.** Semi-quantitative RT-PCR analysis of selected cDNA clones

Clone name	Relative expression level <sup>a</sup>				Clone name	Relative expression level <sup>a</sup>			
	6M <sup>b</sup>	18M <sup>b</sup>	30M <sup>b</sup>	42M <sup>b</sup>		6M <sup>b</sup>	18M <sup>b</sup>	30M <sup>b</sup>	42M <sup>b</sup>
6M05A3-40	+++	+	-	-	18M05A1-13	++	+++	++	++
6M05A3-55	+++	++	++	++	18M05A1-22	+	+++	+++	+++
6M05A3-58	+++	++	+	+	18M05A1-26	-	+++	+	+
6M05A3-89	+++	+	+	-	18M05A1-90	-	+++	+	-
6M05A4-02	+++	-	-	-	18M05A2-09	++	+++	+++	+++
6M05A4-06	+++	++	+	-	18M05A2-74	-	+++	++	++
6M05A4-69	+++	-	-	-	18M05A2-84	++	+++	+	-
6M05A4-71	+++	-	+++	+++	18M05A3-04	++	+++	++	-

<sup>a</sup>For each gene, 100% corresponds to its highest expression level in the different stages analyzed. Relative expression levels between: 0~20%, 21~50%, 51~80% and 81~100% are indicated as -, +, ++ and +++, respectively

<sup>b</sup>Growth stages; 6M (6-month-old), 18M (18-month-old), 30M (30-month-old), 42M (42-month-old)



**Fig. 3.** Northern blot analysis of differential expressed genes in various growth stage of dark-banded rockfish skeletal muscle. The internal control gene *GAPDH* was performed on samples.

후 근육조직에서의 발현량은 극히 미미하였다. Myosin에 해당하는 6M05A4-71 클론은 6개월령에서 발현량이 많았고, 18개월령 근육조직에서 발현량이 급격히 감소하였으나, 30개월령과 42개월령 근육조직에서는 급격히 증가하는 발현양상을 나타내었다. 18개월령 특이적인 발현양상을 나타낸 creatine kinase (muscle type)와 cathepsin D에 해당하는 단편인 18M05A1-22과 18M05A2-09는 성장단계에 따른 특이적 발현량증가 없이 지속적으로 발현량이 높았고, 18M05A1-13 (TGFB2)과 18M05A2-74 (TCTP) 클론은 성장함에 따라 약 20%의 발현량 감소가 있었다. 18M05A1-26, 18M05A1-90, 18M05A2-84, 18M05A3-04 클론은 30개월령 이후에는 발현량이 급속히 감소하였다.

Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 발현양상 분석결과에서 추가분석이 요구되거나 발현량이 많은 유전자에 대해서는 northern hybridization 분석으로 발현양상을 재확인하였다 (Fig. 3). 발현양상은 semi-quantitative RT-PCR 분석결과와 크게 다르지 않았으며, cDNA clone 6M05A4-71에 해

당하는 유전자는 볼락의 성장초기에 발현량이 많다가 18개월령에는 발현량이 감소하였고, 이후의 성장단계에서는 발현량이 다시 증가하는 패턴을 나타내었다. 6M05A3-61 클론은 성장단계에 따른 발현량 증가는 없었으며, 6M05A4-14 클론은 18개월령 조직에서 발현량이 다소 감소하였으나, 42개월령 조직에서는 발현량이 높았다. 18M05A1-53 (Grp 94)는 30개월령에서 가장 많이 발현되었고, 그 이후에는 감소하였다. 18M05A2-92 (desmin)는 성장함에 따라 발현량이 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

## 고 찰

유전자의 발현 유무와 발현량 차이를 탐색하는 differential screening 방법 중 subtractive cDNA hybridization은 시료 간 차등발현 유전자를 확보하는 데 있어 접근방법으로 알려져 있다 (Duguin and Dinauer, 1990; Hara *et al.*, 1991). mRNA differential display (Liang *et al.*, 1992)와 arbitrary primed PCR에 의한 RNA fingerprinting (Welsh *et al.*, 1992)은 발현양상이 다른 유전자를 찾아내는 빠른 방법이지만, 이들 두 방법은 확보한 클론이 false positive일 확률이 높고, 차등발현 유전자의 copy수가 많을 때 유용한 방법이다 (Bertioli *et al.*, 1995). Subtracted cDNA hybridization은 하나의 집단 (tester)에서 유래된 cDNA를 다른 집단 (driver)에서 유래한 cDNA와 hybridization 반응을 실시하여 두 집단에 동시에 존재하는 동일한 유전자는 제거하는 단계와 hybridization 되지 않은 fraction (target)을 분리해내는 과정으로 크게 나눌 수 있으며, 본 연구에서는 볼락 연령별 근육조직을 각각 tester와 target으로 정하여 양방향으로 subtraction 하였다.

어류의 성장관련 유전자를 확보하기 위하여 최 등 (2005)이 보고한 볼락의 산출 후의 체중변화 자료에 기초하여 성장초기인 6개월령과 성장의 절정단계라 할 수 있는 18개월

령의 근육조직을 활용하여 볼락의 성장단계 관련 유전자를 탐색하였다. Subtraction 결과로 얻은 차등발현 유전자 중 기능이 밝혀진 유전자들은 근육의 분화나 수축에 관여하는 근육대사 관련 유전자와 에너지 대사 관련 유전자들이 있었고, 기능이 밝혀지지 않은 유전자 단편도 있었다. 특히 myosin 유전자의 발현량은 18개월령에서는 적었으나 성장 초기 6개월령 근육조직에서는 많았으며, 모두 myosin light chain인 것으로 나타났다. myosin은 근육 수축시 ATPase 활성을 조절하며 (Mugue and Ozernyuk, 2006), adenylate kinase는 세포사멸과 암 발달에 관여하는 것으로 보고되었다 (Chen *et al.*, 2006). Calsequestrin은 glycoprotein으로 근소포체 내의 칼슘을 수송하는 단백질을 암호화하며, 367개의 아미노산으로 구성되어 있고, 토끼 calsequestrin 유전자 크기는 약 14 kb로 11개의 exon이 있다 (Fujii *et al.*, 1990). Dystrobrevin beta는 골격 근육 단백질로 근육조직과 뇌에서만 발현되고 (Blake *et al.*, 1998), diphosphate kinase-Z1은 ATP 생산 효소를 암호화하는 유전자 (Yeh *et al.*, 2008)이다. 6개월령 근육조직에서 발현량이 많은 클론들은 근육대사 관련 유전자에 해당하였다. 볼락의 성장 초기 단계인 6개월령에는 근육의 분화가 활발히 이루어지고, 에너지 대사율 또한 높을 것으로 판단된다.

18개월령 근육조직에서 발현량이 많은 desmin은 근육 특이적인 cytoskeletal protein으로 468개의 아미노산으로 구성되어 있고 분자량은 53 kD이며, 전체유전자는 크기가 8.4 kb이고 9개의 exon 영역이 있다 (Li *et al.*, 1989). TGFBR2 (transforming growth factor-beta receptor)는 serine-threonine kinase family에 속하고 (Lin *et al.*, 1992), creatine kinase는 세포내에서 일정한 양의 ATP 양 유지 기능을 갖는다 (Dawson *et al.*, 1968). Cathepsin D (EC 3.4.23.5)는 lysosomal proteinases로 단백질 분해, cell invasion, apoptosis 기능을 가지는 것으로 알려져 있다 (Steinfeld *et al.*, 2006). 18개월령 특이적 발현 유전자에는 heat shock protein 90, chaperone protein GP 96, cathepsin, translationally control tumor protein 등의 유전자가 있었으며, 이 시기에는 면역관련 유전자를 포함하여 외부의 환경변화에 적응에 필요한 유전자들이 발현되는 것으로 추정이 가능하다. 기능이 알려져 있지 않은 유전자의 성장단계에 따른 발현양상 분석결과와 성장단계 특이적 발현 유전자의 발현양상 재확인을 위하여 실시한 northern blot 분석결과로부터, 볼락의 성장초기부터 성장의 절정기에 도달하기까지 발현량이 많다가 18개월령 이후 근육조직에는 급속도로 발현량이 감소하는 유전자 그룹이 존재함을 알 수 있다.

6개월령 근육조직 특이 발현 유전자인 dystrobrevin beta와 diphosphate kinase-Z1의 발현량이 6개월령 이후의 근육조직에서 급격히 감소하는 것은 이 유전자를 어류의 성장 관련 down-regulation 분자마커 개발 후보로 활용 가능함을

시사하는 것이다. 또한 볼락의 성장 절정기인 18개월령에 발현량이 많고, 그 후의 성장에서도 발현량이 많은 creatine kinase (muscle type)와 cathepsin D 유전자의 발현양상은 이 유전자를 이용하여 개발한 분자 마커로 볼락의 성장 초기 단계에서 빠른 성장능력을 가진 개체의 선발 가능성을 시사해 준다.

성장단계가 다른 볼락 근육조직으로부터 확보한 차등발현 유전자들은 근육의 수축, 근섬유 생성, 근육 내 ATP 양을 유지하는 기능과 관련이 있었다. 이와 같은 결과로부터 어류의 근육발달은 성장초기부터 성장 절정기까지 꾸준히 진행되며, 성장단계에 따라 각각 다른 근육대사 관련 유전자가 관여하여 근육발달을 지속시키는 것을 확인하였다. 근육세포를 배양할 때 myosin 유전자가 많이 발현되며 (Silberstein *et al.*, 1986), myosin 발현량은 cardiac myosin heavy chain (MHC)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다 (Lyons *et al.*, 1990). 본 연구에서도 myosin 등 근육의 수축과 분화에 관련된 유전자는 대체로 성장초기에 많이 발현되었으며, 근육 내 에너지양을 조절하는 기능을 가진 유전자들은 성장 절정기에 많이 발현되었다. 본 연구수행 결과로 확보한 유전자 정보와 cDNA 클론은 빠른 성장능력을 가진 볼락의 개체 선발을 위한 분자마커 개발에 유용한 결과이다. 볼락의 근육에서 성장단계에 따라 특이적인 발현양상을 나타냈지만 기능이 정확하게 밝혀지지 않은 유전자 단편에 대한 발현양상 분석을 비롯한 추가적인 연구는 염기서열 분석을 포함하여 유전자의 정보와 기능을 해석하는 접근방법으로 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

볼락의 성장단계에 따른 차등발현 유전자를 탐색하기 위하여 6개월령 및 18개월령 근육조직을 사용하여 subtracted cDNA library를 제작하였고, 각각의 연령에서 발현량 차이를 나타낸 202개의 cDNA 단편을 확보하였으며, 발현량 차이가 뚜렷한 32개의 cDNA 클론은 성장단계별 특이발현 후보유전자로 선발하여 염기서열을 분석하였다. Myosin, adenylate kinase, calsequestrin, dystrobrevin beta, diphosphate kinase 유전자는 6개월령 근육조직에서 발현량이 많았으며, desmin, TGFBR2 (transforming growth factor-beta receptor), creatine kinase (muscle type), cathepsin D 유전자는 18개월령 근육조직에서 발현량이 많았다. 볼락의 성장초기와 성장 절정기에서 차등발현 양상을 나타낸 유전자는 6, 18, 30, 42개월령 근육조직에서 연령 증가에 따른 발현양상을 분석하였으며, dystrobrevin beta와 diphosphate kinase-Z1은 6개월령 이후에는 발현량이 급격히 감소하여 18개월령, 30개월령 및 42개월령에서는 발현량이 극히 적었으며, creatine

kinase (muscle type)와 cathepsin D 유전자는 연령이 증가함에 따라 발현량이 증가되어 18개월령 이후, 30개월령과 42개월령 근육조직에서도 발현량이 많았다. 이와 같이 성장단계에 따른 차등발현 유전자를 탐색하고 연령 증가에 따른 발현양상을 비교·분석한 결과로부터 본 연구에서는 어류의 성장 초기단계 근육조직에서는 근육수축 관련 유전자가 많이 발현되고, 성장 절정기에는 근육 내 에너지 양 조절 관련 유전자가 많이 발현되는 것을 확인하였다.

## 사 사

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

## 인 용 문 헌

- 김용익. 1978. 어류학 총론. 태화출판사, pp. 159-170.
- 김용익·한경호. 1993. 볼락, *Sebastes inermis*의 초기생활사에 관한 연구. 1. 인위적 방법에 의한 수조내에서의 난발생과정과 부화자어의 형태. 한국수산학회지, 26: 458-464.
- 김용익·한경호·변순규. 1993. 볼락, *Sebastes inermis*의 초기생활사에 관한 연구. 2. 산출 자치어의 외부형태 및 골격 발달. 한국수산학회지, 26: 465-476.
- 박영병·어윤양·황현숙·이선희·이정아·박수현. 2006. 조피볼락 양식의 경제성 분석 보고서 (보고서번호: IB92007-04190662), 해양수산부 (주관부처).
- 최희정·홍경표·오승용·노충환·박용주·명정구·김종만·허준욱·장창익·박인석. 2005. 양식산 볼락, *Sebastes inermis* Cucier의 성장 특성. 한국양식학회지, 18: 147-153.
- Bertioli, D.J., U.H.A. Schichter, M.J. Adams, P.R. Burrows, H.H. Steinbiss and J.F. Antoniw. 1995. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. Nucleic Acids Res., 23: 4520-4523.
- Blake, D.J., R. Nawrotzki, N.Y. Loh, D.C. Gorecki and K.E. Davies. 1998. Beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. Proc. Nat. Acad. Sci., 95: 241-246.
- Chen, Q., R. Hui, C. Sun, X. Gu, M. Luo and X.F. Zheng. 2006. Soluble expression, purification, and stabilization of a proapoptotic human protein, CARP. Protein Expr. Purif., 45: 329-334.
- 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.
- Duguin, J.L. and M.C. Dinauer. 1990. Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res., 18: 2789-2792.
- Florini, J.R., D.Z. Ewton and S.L. Roof. 1991. Insulin-like growth factor-1 stimulates terminal differentiation by induction of myogenin gene expression. Mol. Endocrinol., 5: 718-724.
- Fujii, J., H.F. Willard and D.H. MacLennan. 1990. Characterization and localization to human chromosome 1 of human fast-twitch skeletal muscle calsequestrin gene. Somat. Cell Molec. Genet., 16: 185-189.
- Hara, E., T. Kato, S. Nakada, L. Sekiya and K. Oda. 1991. Subtractive cDNA cloning using oligo (dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. Nucleic Acids Res., 19: 7097-7104.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. Aquaculture, 177: 99-115.
- Li, Z., A. Lilienbaum, G. Butler-Browne and D. Paulin. 1989. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. Gene, 78: 243-254.
- Liang, P., L. Averboukh, K. Keyomarsi, R. Sager and A.B. Pardee. 1992. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res., 52: 6966-6968.
- Lin, H.Y., X.-F. Wang, E. Ng-Eaton, R.A. Weinberg and H.F. Lodish. 1992. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. Cell, 68: 775-785.
- Lyons, G.E., S. Schiaflino, D. Sassoon, P. Barton and M. Buckingham. 1990. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. J. C. B., 111: 2427-2436.
- McPherron, A.C., A.M. Lawler and S.-J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-b superfamily member. Nature, 387: 83-90.
- Molkentin, J.D. and E.N. Olson. 1996. Defining the regulatory networks for muscle development. Curr. Opin. Genet. Dev., 6: 445-453.
- Mugue, N.S. and N.D. Ozernyuk. 2006. Comparative structural analysis of myosin light chains and gene duplication in fish. Biol. Bul., 33: 30-34.
- Olson, E.N. 1992. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. Dev. Biol., 154: 261-272.
- Silberstein, L., S.G. Webster, M. Travis and H.M. Blau. 1986. Developmental progression of myosin gene expression in cultured muscle cells. Cell, 46: 1075-1081.
- Somero, G.N. and J.J. Childress. 1980. A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger-size fish. Physiol. Zool., 53: 322-337.
- Steinfeld, R., K. Reinhardt, K. Schreiber, M. Hillebrand, R. Kraetzer, W. Bruck, P. Saftig and J. Gartner. 2006. Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder. Am. J. Hum. Genet., 78: 988-998.



Weatherley, A.H., H.S. Gill and A.F. Lobo. 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic muscle growth and ultimate size. *J. Fish Biol.*, 33: 851-859.

Welsh, J., K. Chada, S.S. Dalal, D. Ralph, L. Cheng and M. McClelland. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA.

*Nucleic Acids Res.*, 20: 4965-4970.

Yen, C.-H., Y.-S. Chen, M.-S. Wu, C.-W. Chen, C.-H. Yuan, K.-W. Pan, Y.-N. Chang, N.-N. Chuang and C.-Y. Chang. 2008. Differential display of grouper iridovirus-infected grouper cells by immunostaining. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 372: 674-680.