

Note

RNA-Seq transcriptome 분석을 통한 갈치 광수용체 유전자 탐색 및 mRNA 조직발현

현지연¹ · 김문관² · 임봉수³ · 변준환¹ · 문지성¹ · 강형철² · 허성표^{1*} · 오성립²

¹한국해양과학기술원 제주국제해양과학연구지원센터
(63349) 제주특별자치도 제주시 일주동로 2670

²제주특별자치도 해양수산연구원
(63629) 제주특별자치도 서귀포시 표선면 민속해안로 292

³주솔포투
(63133) 제주특별자치도 제주시 연동8길 19 3층

RNA-Seq Transcriptome Analysis of the Cutlass Fish Reveals Photoreceptors Gene Expression in Peripheral Tissues

Ji-Yeon Hyeon¹, Mun-Kwan Kim², Bong-Soo Lim³, Jun-Hwan Byun¹, Ji-Sung Moon¹,
Hyeong-Cheol Kang², Sung-Pyo Hur^{1*}, and Seong-Rip Oh²

¹*Jeju International Marine Science Research & Logistics Center, KIOST
Jeju 63349, Korea*

²*Jeju Special Self-Governing Province Oceans and Fisheries Research Institute
Jeju 63629, Korea*

³*Solforto Co. Ltd.
Jeju 63133, Korea*

Abstract : The opsin family of light sensitive proteins family makes up are the universal photoreceptor molecules of all visual systems in the vertebrates including teleosts. They can change their conformation from a resting state to a signaling state upon light absorption, which activates the G-protein coupled receptor, thereby resulting in a signaling cascade that produces physiological responses. However, this species is poorly characterized at molecular level due to little sequence information available in public databases. We have investigated the opsin family of nocturnal cutlass fish using the whole transcriptome sequencing method. The opsin genes were cloned and its expression in the tissues and organs were examined by qPCR. We cloned 6 opsin genes (RRH, Opn4, Rh1, Rh2, VA-opsin, and Opn3) in retina and brain tissue. It contained the seven presumed transmembrane domains that are characteristic of the G-protein-coupled receptor family. However, short wavelength sensitive pigment (SWS) and long wavelength sensitive pigment (LWS) were not detected in this study. The mRNA expression of the 6 photoreceptor genes were detected in retina and peripheral tissue. Our studies will lead to further investigation of the photic entrainment mechanism at molecular and cellular levels in cutlass fish and can be used in comparative studies of other fishes.

Key words : cutlass fish, photoreceptors, opsin, transcriptome

*Corresponding author. E-mail : hursp@kiost.ac.kr

1. 서 론

지구상의 생물들은 다양한 환경정보(빛, 수온, 염분 등)를 자신의 특이적인 생애에 맞춰 인식하고 그 정보를 바탕으로 생태적으로 진화하여 왔다. 생물체는 빛을 통해 외부환경을 인식하여 그 정보를 뇌로 전달하고, 생체시계 작동은 동기화하여 신진대사를 작동시키고 멜라토닌과 같은 내분비 호르몬 분비 유도를 통해 생리·생태적 작용을 제어한다(Benoit 1978; Campbell et al. 2001; Falcón et al. 2007). 포유류의 경우 눈의 망막의 원추형세포와 간상세포에 광수용체가 존재하고 이를 통해 빛을 인지한다. 일반적인 광수용체의 단백질 구조는 G-protein coupled receptor family로 seven transmembrane domain 형태의 막수용체이다(Terakita 2005). 광수용체의 종류는 크게 시각-opsin (visual-opsin)과 비시각-opsin(non-visual-opsin) 계열로 나누어진다. 시각-opsin 계열의 광수용체는 빛이 가지고 있는 신호 즉 빛의 파장, 빛의 세기, 빛의 방향을 인지하고, 비시각-opsin 계열의 광수용체는 빛의 주기성을 인지하여 체내 서캐디언 리듬을 제어한다고 보고하였다(Tada et al. 2009). 시각-opsin의 종류는 색을 인지하는 cone-opsin과 명암을 인지하는 rhodopsin1(Rh1)이 알려져 있고, cone-opsin은 Ultraviolet-blue 영역대를 감지하는 SWS1(short-wave sensitive 1 pigment), 단파장 영역대의 청색계열을 감지하는 SWS2(short-wave sensitive 2 pigment), 녹색영역대를 감지하는 Rh2/MWS(rhodopsin2/middle-wave sensitive pigment) 그리고 장파장대의 적색계열을 감지하는 LWS(long-wave sensitive pigment)로 나누고 있다(Yokoyama 2000). 비시각-opsin의 종류는 Encephalopsin (Opn3), Melanopsin(Opn4), Neuropsin(Opn5), Vertebrate ancient opsin(VA-opsin), Retinal G-protein coupled receptor(RGR), Peropsin(RRH), pinopsin, exo-rhodopsin 등이 포유류, 조류, 어류에서 동정되었다(Guido et al. 2010). 최근에는 제브라피쉬, *Danio rerio*를 대상으로 비시각-opsin에 대한 분자생물학적·세포생물학적 접근을 통해 Cryptochrome, Period, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like(Arntl) 등의 시계유전자와의 작동 기전 연구가 진행되고 있다(Davies et al. 2015).

감광성(photosensitivity)에 대한 연구는 일찍이 비포유류에서 빛이 피부에 존재하는 광수용체로 직접 전달되어 체색을 변화시킨다고 보고하였다(Oshima 2001). 또한 조류에서는 뇌에 존재하는 pinopsin, VA-opsin(Soni and Foster 1997)과 어류에서는 제브라피쉬, *D. rerio*에서 송과체에 존재하는 exo-rodopsin이 체색변화나 번식생리에 직접적으로 영향을 미친다는 연구결과들이 보고되었다(Collin et al. 2009). 이와 같이 각 어종별 광수용체의 종류 그리고 조직별 분포 및 기전이 생애에 맞게 진화되어

왔다고 알려져 있다. 그러나 해양의 수중환경에 적응해 진화해온 해양생물들이 육상동물과 비교해 어떤 경로로 광정보를 수용하는지 그리고 생리생태별 광수용체들의 존재여부의 차이점에 대한 연구는 드물다.

갈치(*Trichiurus lepturus*)는 농어목에 속하는 어류로 전 세계의 온대와 열대에 분포하는 난류성 어류이다(김 등 2005). 갈치와 어류는 야행성어류로 주간에는 수심이 깊은 외해의 저층부에 서식하다가 야간에는 섭이 활동 등의 이유로 표층까지 서식범위를 변화하는 종으로 알려져 있다. 갈치는 중요한 수산자원으로써 종묘생산이 불가능하고 집어등을 이용한 어업을 통해 수산자원을 확보하고 있다. 최근 집어등에 의한 포획의 효율성을 증대시키기 위해 LED 광원을 개발하여 어업에 이용하고 있으나 갈치가 생태적으로 빛을 어떻게 인지하는지에 대한 광전달 기전 연구가 알려지지 않았다.

실험동물모델인 제브라피쉬, *D. rerio*나 송사리, *Oryzias latipes* 등은 유전자정보가 잘 알려져 있어 분자생물학 연구에 쉽게 적용할 수 있지만 비동물모델의 경우 유전자 정보가 알려지지 않아 연구를 위한 비용과 시간이 많이 소요된다. 어류에서 RNA-seq Transcriptome 방법은 유럽산 뱀장어, *Anguilla anguilla*(Coppe et al. 2010), 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*(Fox et al. 2014), 가자미목 납서대과 어류, 백련어, *Hypophthalmichthys molitrix*(Beide and Shunping 2012)에서 유전자 탐색, 비교분석 그리고 유전자 발현분석에 대한 연구에 활용되고 있다(Qian et al. 2014). 이번 연구에서는 갈치에서 처음으로 RNA-seq transcriptome 방법을 이용하여 광수용체 유전자의 종류들을 탐색하였다. 그리고 망막 이외의 다른 기관이나 조직에서의 유전자 발현을 조사하여 갈치 광수용체가 생태적·진화적으로 다른 생물과의 광인식기전의 차이점에 대한 비교연구 및 갈치 어업에 활용을 위한 기초자료를 제공하고 자 한다.

2. 재료 및 방법

실험어

실험어는 2016년 9월 제주연안에서 야간에 집어등을 이용하여 채집하였다. 채집된 개체는 실내사육수조(10 ton)로 이동하여 자연환경(광주기, 약 12L: 12D; 수온, $21 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 1주일 간 순치 후 실험에 이용하였다. 실험어의 크기는 체중(71.0–131.0 g) 전장(61.5–69.0 cm)의 갈치를 이용하였다. RNA-seq transcriptome에 사용된 실험어의 해부는 주간(1200 h)과 야간(2400 h)에 0.01%의 2-phenoxyethanol에 마취 후 눈과 전뇌를 적출 하였고 적출한 샘플은 분석까지 -80°C 에서 보관하였다($n = 3$). 광수용체 조직별 발현에 사용된 실험어는 광수용체의 조직별 발현

양상을 보기 위해 주로 활동하는 시간대인 야간(2400 h)에 0.01%의 2-phenoxyethanol(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 마취 후 전장과 체중을 측정하고 눈, 전뇌, 뇌하수체, 아가미, 신장, 간, 비장, 소화관, 피부(근육), 생식선을 적출하였다(n=10). 적출한 샘플은 분석시까지 -80°C에서 보관하였다. 실험어의 모든 야간 해부는 20 Lux 이하의 LED 적색등을 이용하여 암실에서 실시하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA는 RNAiso(TaKaRa-Bio, Otsu, Japan)를 이용하여 분리하였다. 분리된 total RNA는 전기영동과 spectrometer를 이용하여 정량·정성 분석하였다. Genomic DNA contamination를 피하기 위해 DNase I(Promega, Madison, WI, USA)를 처리하였다. cDNA 합성은 1000 ng의 total RNA를 주형으로 Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit(Roche-diagnostics, Indianapolis, IN, USA)를 이용해 합성하였다.

RNA-Seq 분석

RNA-Seq 분석은 주간(1200 h)과 야간(2400 h)에 망막과 전뇌에서 추출한 total RNA를 혼합하여 사용하였다. Total RNA는 TruSeq® Stranded Total RNA Sample Preparation Guide(Illumina)의 “RiboZero Delete and Fragment RNA procedures”으로 ribosomal RNA를 제거하였고, ribosomal RNA가 제거된 total RNA 500 ng은 Illumina TruSeq™ RNA sample preparation kit를 사용하여 cDNA 합성에 사용하였다. cDNA 합성은 Random primer와 역전사 효소(Super-Script II)를 이용하여 준비된 total RNA를 주형가닥으로 합성하였으며, 합성된 cDNA는 library 준비를 위하여 사용되었다. 라이브러리 구성을 위하여 합성된 이중가닥 cDNA는 Illumina TruSeq™ RNA sample preparation kit를 이용하여 준비하였다. 라이브러리의 유효성 검사는 DropSense96(Trinean) 또는 Ribogreen(Invitrogen, Santa Clara, CA, USA)으로 정량을 측정하였으며, 또한 라이브러리의 QC는 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)으로 확인하였다. 전장 전사체 서열 분석은 Illumina NextSeq500 플랫폼을 사용하여 2 × 150 bp로 샘플에 대하여 최소 50M reads 생성으로 실행하였다.

De Novo Transcriptome Assembly

전장 전사체 서열 분석에 의하여 생성된 raw sequencing data의 예비 품질은 FastQC v.0.11.3 application(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)을 통하여 허용 품질의 read를 측정하여 수행되었다. 어댑터의 제거를 위하여, Cutadapt Python package(Chen et al.

2014)을 사용하였고, 어셈블리는 이들 cleaned reads를 가지고 Trinity 프로그램(Grabherr et al. 2011)을 사용하여 실행되었다. 어셈블리는 transrate software(Smith-Unna et al. 2015)로 *de novo* transcriptome assembly 품질을 측정하였다. Gene prediction은 진핵생물에서의 유전자 예측 프로그램인 AUGUSTUS software(Stanke and Morgenstern 2005)로 ORF 서열에 대한 검정을 실시 후, Blastx와 Blastn 알고리즘(Altschul et al. 1990)을 사용하여 기존에 보고된 rhodopsin family 유전자 서열들과 비교 분석하여 갈치 망막 및 전뇌 조직의 rhodopsin family 유전자를 확보하였다. 확보된 유전자들은 NCBI nonredundant(nr) database을 사용하여 그 어셈블리 서열을 확인하였다.

염기서열 분석

Sequencing을 통해 얻은 각각의 염기서열은 BLASTN (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD), 그리고 amino acid sequences는 translator program(ORF Finder, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)을 이용하여 척추동물군과의 아미노산 염기의 상동성을 구하였다. 각각의 유전자의 phylogenetic tree 분석은 MEGA5 software의 pairwise sequence comparisons(pairwise deletion of gaps)를 이용하여 Neighbor-Joining method에 의해 1,000 회 bootstrap trial를 시행하였고 CONSENSE program of PHYLIP를 제작하여 분석하였다.

광수용체 mRNA의 조직발현

각 유전자들의 발현은 정량적 real-time PCR 방법을 이용하여 분석하였다. 분석은 BioRad CFX96™ Real Time System(BioRad, Hercules, CA)와 SYBR Premix EX Taq II(TaKaRa-Bio)를 이용하였다. Primer sequence는 Primer-BLAST program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; Table 1)를 이용해 약 200–300 bp 정도가 되도록 설계하였다. PCR 반응은 50% SYBR Premix EX Taq II(TaKaRa-Bio), 10 μM의 primer, 그리고 20 ng의 cDNA를 이용하여 반응하여 denaturation(45 s, 94°C), annealing(45 s, 58°C), 그리고 extension(1 min, 72°C)에서 40 cycle 증폭하였다. 각 유전자의 발현은 standard DNA와 EF1α(Elongation Factor 1 alpha)의 상대정량을 통해 분석하였다.

3. 결과 및 토의

RNA-Seq Transcriptome 분석을 통한 갈치 광수용체 유전자 탐색

갈치 뇌 및 망막 조직으로부터 추출한 RNA를 NGS 방

Table 1. Primer information for in this study

Gene ID	Oligo ID	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
EF1-alpha	Forward	TCACCCTGGGAGTAAAGCAG	230
	Reverse	TCCATCCCTTGAACCAGGAC	
RRH	Forward	GGCTGGATACCTCATCACCG	294
	Reverse	GTGAGGTAGCGGTCTATGGC	
Opn4	Forward	TGGAGCTCGTACATCCCTGA	259
	Reverse	TCGCCAACTTCCACTCACTC	
Rh1	Forward	GGTGAAGACCAAGCCCATGA	280
	Reverse	GTGATTCTCGGTGAAGCGGA	
Rh2	Forward	CTGGTGGTCACAGCTCAGAA	320
	Reverse	GGACTCCAATTCCTGCATGT	
VA-opsin	Forward	AGACTCGCGCCTTGTAACA	290
	Reverse	AGGCTACTTGCTTGGCTGAG	
Opn3	Forward	GCTTCTGCAACAACGTCGTT	257
	Reverse	GTAGCGCTCATAGGCCAGAG	

Table 2. Sequencing and *de novo* assembly statistics

Raw data	Number of paired-end reads	47,124,713
	Length of paired-end reads (bp)	151
	Number of bases (bp)	14,231,663,326
Raw sequences after QC	Number of paired-end reads	47,121,571
	Length of paired-end reads (bp)	15-151
	Number of bases (bp)	13,997,307,632
<i>De novo</i> assembly	Number of assembled contigs	756,390
	Number of bases (bp)	461,402,669
	Smallest contig (bp)	224
	Largest contig (bp)	22,103
	Average length (bp)	610.01
	Median length (bp)	385
	N50 (bp)	743

식을 이용한 전사체 염기서열 분석은 151 bp의 길이를 가진 read가 총 47,124,713개(14,231,663,326 bp)의 paired-end read들을 얻었으며, 이들 read들로부터 adapter trimming 결과 47,121,571개(13,997,307,632 bp)의 염기서열 paired-end read들을 얻었다. 이들 총 47,121,571개 paired-end read들은 trinity program을 사용하여 *de novo* assembly를 수행한 결과 총 756,390개(461,402,669 bp)의 contig들을 얻었으며, 이들 contig 중 최소 contig 길이는 224 bp였으며, 최장 contig의 길이는 22,103 bp였다. 또한 이들 contig의 평균 길이는 약 610 bp로 확인되었다(Table 2). NGS를 통해 확인된 갈치 광수용체 유전자는 총 6종으로 2종류의 시각-opsin 계열 광수용체인 Rh1(1,065bp; 355aa; GenBank Accession Number, LC_223133), Rh2

(Rh2; 1,068 bp; 356aa; LC_223134)과 4종류의 비시각-opsin 계열 광수용체인 RRH(1,011 bp; 337aa; LC_223136), Opn4(1,680 bp; 560aa; LC_223137), VA-opsin(1,146 bp; 382aa; LC_223138), Opn3(1,218 bp; 406aa; LC_223135)가 동정되었다. 이번 연구에서는 RNA-seq transcriptome 법을 이용하여 총 6종을 동정하였다. 이전 주행성 어류 광수용체에 관한 연구에서 보고된 단파장대영역(청색계열)인 SWS1, 2 그리고 장파장대영역(적색계열)인 LWS의 존재는 이 종에서 확인되지 않았다.

최근 어류의 광수용체에 관한 연구는 서식 수심별 그리고 행동양상 별로 존재하는 광수용체의 종류가 다르고 다른 파장대를 감지한다고 보고하였다(Stenkamp 2011). 일반적으로 주행성 어류에서 cone-opsin 계열의 LWS,

SWS1, 2, RH2의 존재는 제브라피쉬, *D. rerio*(Chinen et al. 2003), 송사리, *O. latipes*(Matsumoto et al. 2006) 파랑돔, *Chrysiptera cyanea*(Takeuchi et al. 2011), winter flounder, *Pleuronectes americanus*(Mader and Cameron 2004)에서 보고되었고 비교적 얕은 수심에 서식하는 제브라피쉬, 송사리, 파랑돔의 경우 장파장대 LWS가 생식선

발달을 자극하고 40–70 m의 수심에 서식하는 winter flounder의 경우 중파장대 영역의 광수용체가 생리적으로 중요하다고 보고하였다. 또한 심해에 사는 어류들은 명암을 인식하는 Rhodopsin이 망막에 존재한다고 보고되었으나(Hunt et al. 2001) cone-opsin에 대한 존재는 아직 보고되지 않았다. 이번 연구에 사용된 갈치와 생태적 생리적

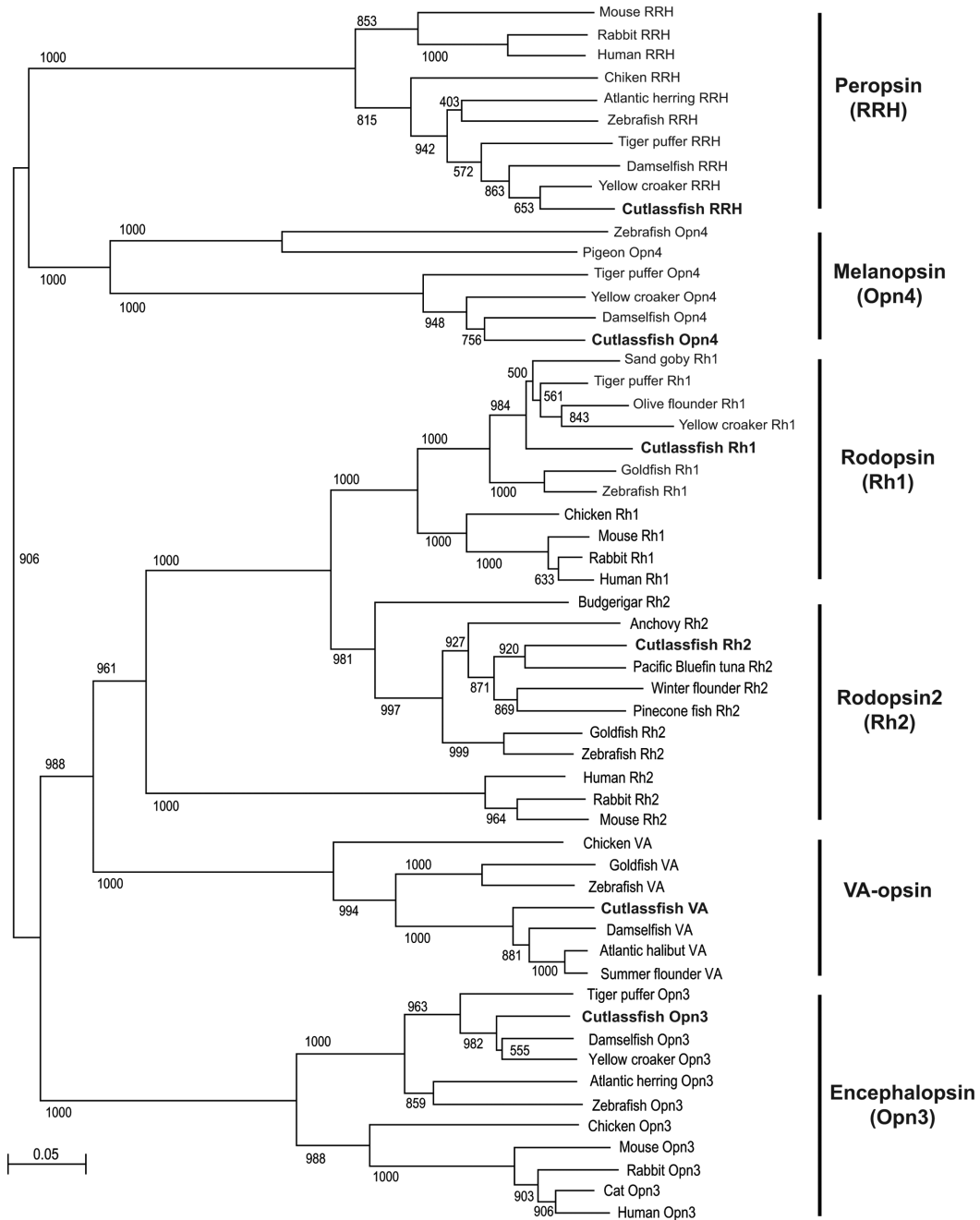


Fig. 1. Phylogenetic tree of photoreceptors in cutlass fish, *Trichiurus lepturus*. Lengths of horizontal lines indicate the genetic distance. One thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes. Analysis was performed with multiple alignments from the amino acid sequences by using the ClustalW program

Table 3. Comparison of the deduced amino acid sequences of the cutlass fish photoreceptors and other vertebrates

Photoreceptors	Species	Homology (%)	Accession no.	
RRH	Human	67	NP_006574	
	Mouse	62	NP_033128	
	Rabbit	68	XP_002717232	
	Chicken	77	NP_001073227	
	Zebrafish	83	NP_001004654	
	Atlantic herring	83	XP_012688455	
	Yellow croaker	91	XP_010755153	
	Tiger puffer	75	XP_003978640	
	Damsel fish	81	XP_008289436	
	Opn4	Pigeon	36	EMC82594
Zebrafish		33	NP_001122233	
Damsel fish		80	XP_008287708	
Yellow croaker		81	XP_010730783	
Tiger puffer		75	XP_003974868	
Rh1	Human	72	NP_000530	
	Mouse	72	NP_254276	
	Rabbit	72	NP_001075818	
	Chicken	76	NP_001025777	
	Zebrafish	83	NP_571159	
	Gold fish	83	AAA49191	
	Tiger puffer	89	NP_001072099	
	Yellow croaker	81	KKF22060	
	Olive flounder	87	ADQ38361	
	Sand goby	87	CAA44275	
	Rh2	Human	41	P04001
		Mouse	38	O35476
		Rabbit	36	O18910
Budgerigar		68	AAC41246	
Zebrafish		78	BAC24132	
Gold fish		77	AAA49168	
Pinecone fish		84	AHJ08689	
Flounder		80	AAT72124	
Bluefin tuna		87	BAG14284	
Anchovy		78	BAM72014	
VA-opsin	Chicken	63	ABM66817	
	Zebrafish	73	BAA94289	
	Gold fish	72	BAG68692	
	Damsel fish	88	BAK19957	
	Atlantic halibut	90	AIH04932	
Opn3	Human	59	NP_055137	
	Mouse	56	NP_001178862	
	Rabbit	57	XP_008266452	
	Chicken	64	XP_426139	
	Zebrafish	77	NP_001104634	
	Tiger puffer	84	XP_003963715	
	Atlantic herring	82	XP_012672463	
	Yellow croaker	89	XP_010732894	
	Damsel fish	90	XP_008278391	

유사 어종인 Scabbard fish, *Lepidopus fitchi*의 경우, SWS1이 UV 영역대의 파장을 감지하고 이를 청색 영역대의 파장으로 인식한다고 보고하고 있다(Tada et al. 2009). 또한 Kim et al. (2016)은 주행성 동물인 제브라피쉬는 간상형세포와 원추형세포의 기능이 뚜렷하게 구분되지만 야행성 동물인 쥐는 파장대 영역 인지하는 원추형 세포가 명암을 구별하는 간상형 세포의 기능을 하도록 진화되었다고 보고하였다. 이 결과 진화적으로 수심이 비교적 깊은 지역(수심 100 m 이상)에서 서식하는 어류나 야행성 어류의 경우 비교적 수심이 얇은 지역에 서식하는 주행성 어류들에 비해 광수용체의 종류가 적거나 광수용체의 파장 인식 범위가 다르게 진화한 것이라 추측된다.

갈치 광수용체 아미노산 구조

갈치 광수용체의 아미노산 염기서열과 다른 척추동물들의과의 상동성은 RRH(어류 72–90%, 조류 77%, 그리고 포유류 62–68%), Opn4(어류 33–80% 그리고 조류 36%), Rh1(어류 83–89%, 조류 76% 그리고 포유류 72%), Rh2(어류 78–87%, 조류 68% 그리고 포유류 36–41%), VA-opsin(어류 72–90%, 조류 63%), Opn3(어류 77–90%, 조류 64%, 포유류 56–59%) 아미노산 염기서열 모두 어류와 비교적 높은 상동성을 보였다(Fig. 1, Table 3). 총 6종의 광수용체의 아미노산 염기서열은 7 transmembrane domain구조의 G-protein coupled receptor를 포함하고 있었다(Fig. 2). 또한 chromophore와 Schiff base linkage를 형성하는 lysine residue(Wang et al. 1980) 그리고 protonated Schiff base인 glutamic acids(Sakmar et al. 1989; Zhukovsky and Oprian 1989)와 disulfide band를 구성하는 cysteine residues(Karnik et al. 1988)를 포함한 기능적 opsin 단백질로 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 다른 어류나 포유류에서 보고된 광수용체 유전자 및 아미노산 서열과 유사하며 구조적으로도 일치한다고 사료된다(Terakita 2005; Collin et al. 2009).

갈치 광수용체 유전자 mRNA의 조직별 발현 양상

갈치 광수용체 유전자 mRNA의 조직별 발현양상은 real-time qPCR를 이용해 각 조직별 발현양상을 조사하였다(Fig. 3). 비시각-opsin 계열의 RRH, Opn4, VA-opsin, Opn3 mRNA는 모든 조직에서 발현되었다. 시각-opsin인 Rh1 mRNA는 망막, 뇌하수체, 아가미, 비장, 소화관, 피부에서 발현이 되었으며, Rh2 mRNA는 망막, 뇌하수체, 아가미, 신장, 비장, 소화관, 피부 그리고 생식선에서 발현이 되었다. 모든 광수용체는 망막에서 비교적 높은 발현 값을 보였으며 Opn3와 Opn4 mRNA는 생식선에서도 비교적 높은 발현값을 보였다.

경골어류 망막에서의 광수용체 조직별 발현에 대한 연

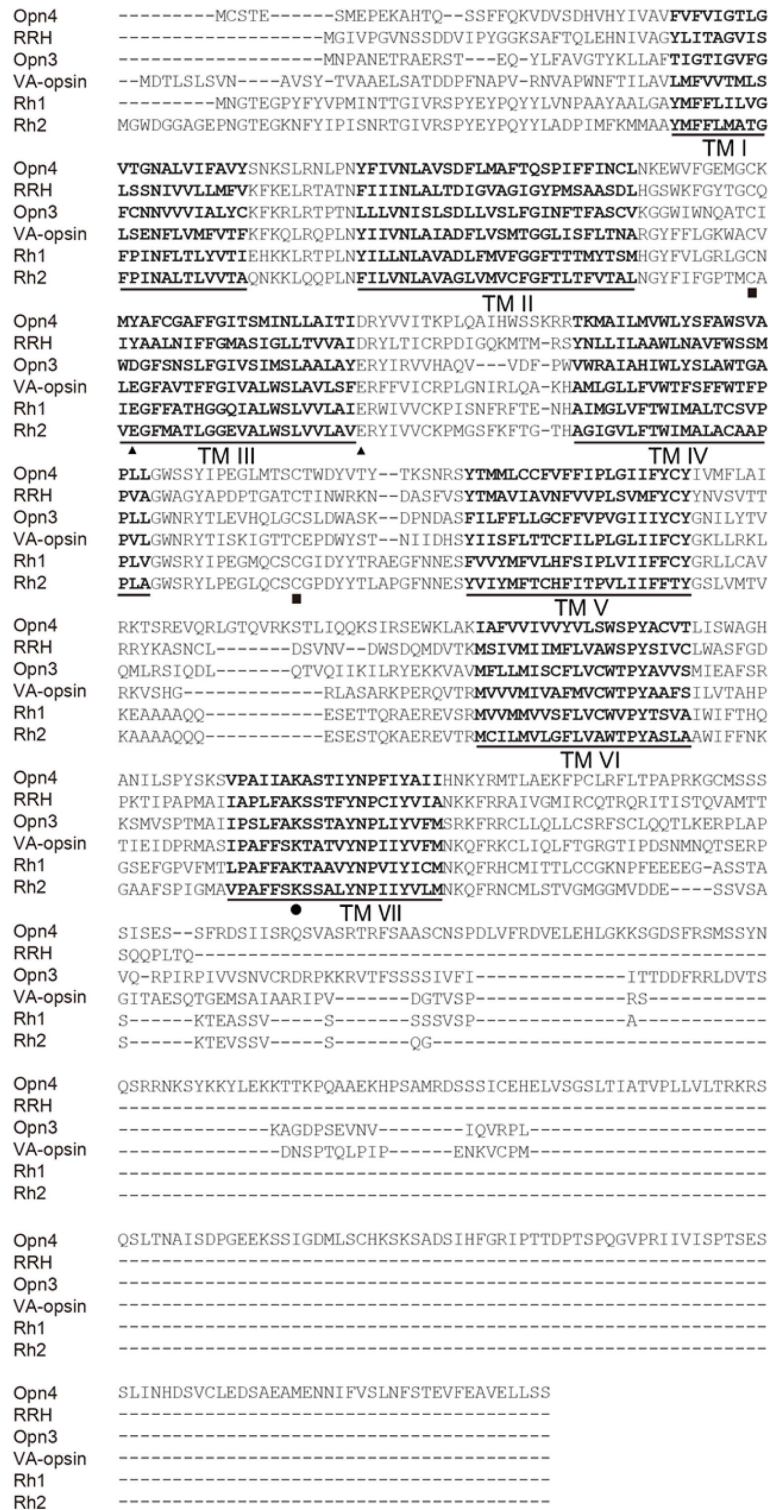


Fig. 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of the photoreceptor in cutlass fish, *Trichiurus lepturus*. The alignment was generated by ClustalW. The seven presumed transmembrane domains (I–VII) are over line. Amino acid residues involved in disulfide bond formation (■ Opn4, C120 and C180; RRH, C100 and C177; Opn3, C96 and C170; VA-opsin, C111 and C188; Rh1, C110 and C187; Rh2, C119 and C196), Counter-ion of the protonated Schiff base (▲ Opn3, E120; VA-opsin, E114 and E135; Rh1, E113 and E134; Rh2, E122 and E153), and lysine residue binding a chromophore (● Opn4, K298; RRH, K286; Opn3, K281; VA-opsin, K293; Rh1, K296; Rh2, K305) are indicated by symbol, respectively

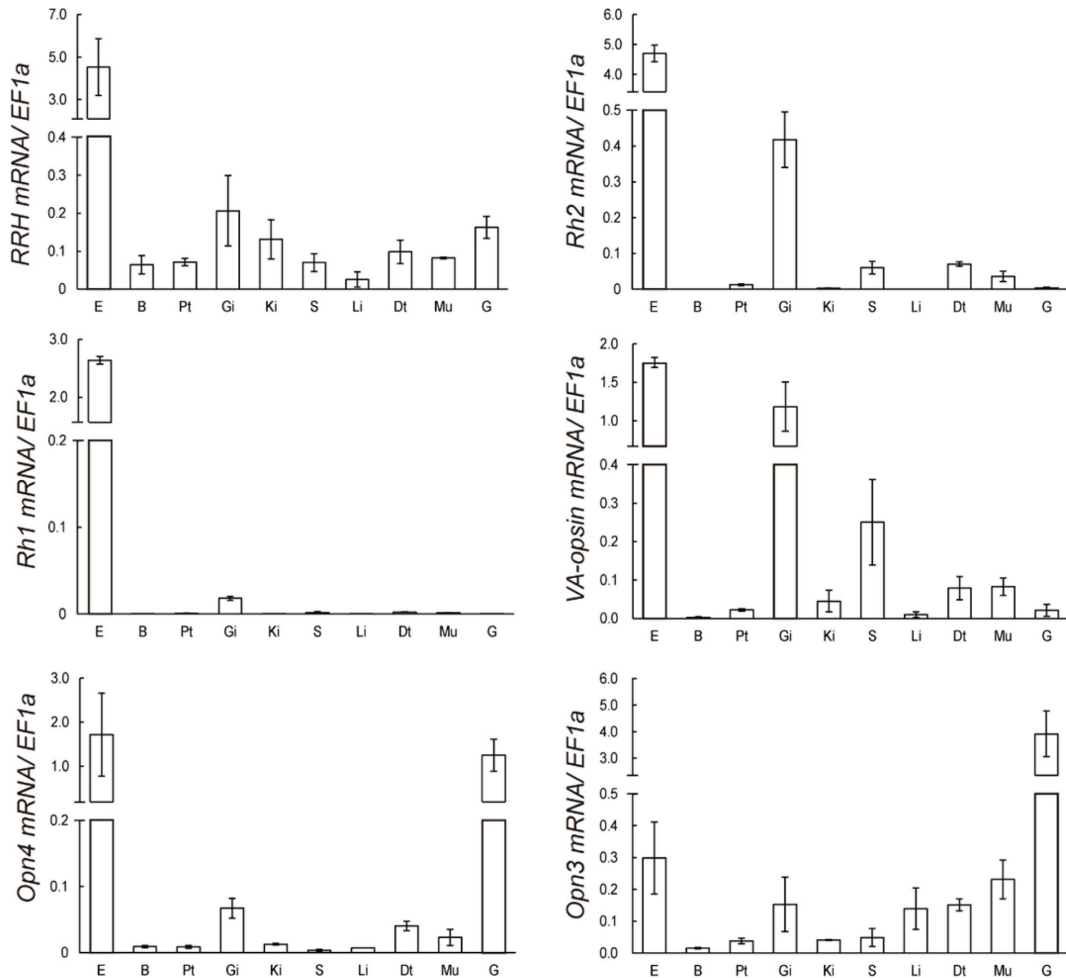


Fig. 3. Distribution of 6 photoreceptors mRNA expressions in the organ and tissue (E, eye; B, brain; Pt, pituitary; Gi, gill; Ki, kidney; S, spleen; Li, liver; Dt, digestive tract; Mu, muscle; G, gonad) of cutlass fish, *Thunnus orientalis*. Organ and tissue samples were collected from the fish (n = 10). The mRNA expression of Elongation factor 1-alpha (EF1a) mRNA was used as reference

구는 은어, *Plecoglossus altivelis* (Minamoto and Shimizu 2003), 대서양 연어, *Salmo salar* (Philp et al. 2000), 뱀장어, *Anguilla japonica* (Zhang et al. 2000)와 농어과 어류들, *Pseudochromis fuscus* (Cortesi et al. 2015)에서 망막과 뇌에서의 rhodopsin 계열 유전자들의 발현을 확인하였다. Belingham et al. (2006)은 포유류에서는 망막의 신경절에서 Opn4의 발현이 확인되었지만, 비포유류에서는 Opn4 mRNA가 망막, 뇌, 피부에서도 발현된다고 보고하였다. 또한 VA-opsin mRNA는 조류 및 어류에서 뇌내 시상하부 및 생식선에서 발현되고 광주기변화에 따른 파장변화를 인식해 번식내분비축의 GnRH를 자극한다고 알려졌다 (Davies et al. 2010; García-Fernández et al. 2015). 또한 제브라피쉬, *D. rerio*의 경우 RRH, Opn3 유전자의 구조나 인식파장대에 대해서는 보고되었으나 (Sugihara et al. 2016), 망막을 제외한 다른 기관에서의 발현양상이나 생리

적 기능에 대해서는 아직 알려지지 않았다.

이러한 결과는 동물군별 생태적 진화 정도에 따라 빛을 인식하는 광수용체의 분포 및 생리학적 기능이 다르게 나타나는 것으로 사료되며 각각의 광수용체에 대한 파장대별 광감성에 대한 생리학적 기능에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

4. 결 론

이번 연구는 야행성어류인 갈치에서 RNA-seq transcriptome 방법을 이용하여 광수용체를 탐색하였고 조직별 발현을 real-time qPCR을 통해 확인하였다. 갈치의 망막과 뇌에서 총 6종으로 2종류의 시각-opsin 계열 광수용체인 Rh1, Rh2와 4종류의 비시각-opsin 계열 광수용체인 RRH, Opn4, VA-opsin 그리고 Opn3가 동정되었고 Rh2를

제외한 나머지 cone-opsin 계열의 광수용체의 존재는 확인되지 않았다. 총 6종의 광수용체의 아미노산 염기서열은 7 transmembrane domain 구조의 G-protein coupled receptor를 포함하고 있었다. 광수용체의 조직별 발현은 망막과 주변조직에서 발현이 확인되었고 망막에서 비교적 강하게 발현되었다. 이 결과는 갈치의 감광성 기전에 대한 분자생물학적·세포학적 연구에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 한국해양과학기술진흥원 수산실용화과제(20150374)의 지원으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사합니다.

참고문헌

- 김익수, 최윤, 이충렬, 이용주, 김병직, 김지현 (2005) 한국어 류대도감. 교학사, 454 p
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3):403–410
- Beide F, Shunping H (2012) Transcriptome analysis of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by paired-end RNA sequencing. *DNA Res* **19**(2):131–142
- Bellingham J, Chaurasia SS, Melyan Z, Liu C, Cameron MA, Tarttelin EE, Iuvone PM, Hankins MW, Tosini G, Lucas RJ (2006) Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *Plos Biol* **4**:e254
- Benoit JM (1978) Chronobiologic study in the domestic duck. II. Physiological mechanism of the chronobiologic action of visible light on the gonads of the male duck. *Chronobiologia* **5**:158–168
- Campbell SS, Murphy PJ, Suhner AG (2001) Extraocular phototransduction and circadian timing systems in vertebrates. *Chronobiol Int* **18**:137–172
- Chen C, Khaleel SS, Huang H, Wu CH (2014) Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol Med* **9**:8
- Chinen A, Hamaoka T, Yamada Y, Kawamura S (2003) Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* **163**(2):663–675
- Collin SP, Davies WL, Hart NS, Hunt DM (2009) The evolution of early vertebrate photoreceptors. *Philos T R Soc Lon B* **364**:2925–2940
- Coppe A, Pujolar JM, Maes GE, Larsen PF, Hansen MM, Bernatchez L, Zane L, Bortoluzzi S (2010) Sequencing, *de novo* annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: eelbase opens new perspectives for the study of the critically endangered european eel. *BMC Genomics* **11**:635
- Cortesi F, Musilová Z, Stieba SC, Hartd NS, Siebeck UE, Malmstrøm M, Tørresen OK, Jentoft S, Cheney KL, Marshall NJ, Carleton KL, Salzburger S (2015) Ancestral duplications and highly dynamic opsin gene evolution in percomorph fishes. *P Natl A Sci USA* **112**(5):1493–1498
- Davies WL, Hankins MW, Foster RG (2010) Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors. *Photoch Photobio Sci* **9**(11):1444–1457
- Davies WL, Tamai TK, Zheng L, Fu JK, Rihel J, Foster RG, Whitmore D, Hankins MW (2015) An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. *Genome Res* **25**:1666–1679
- Falcón J, Besseau L, Sauzet S, Fuentès M, Boeuf G (2007) Melatonin and neuroendocrine regulations in fish. *J Soc Bio* **201**:21–29
- Fox SE, Christie MR, Marine M, Priest HD, Mockler TC, Blouin MS (2014) Sequencing and characterization of the anadromous steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) transcriptome. *Mar Genom* **15**:13–15
- García-Fernández JM, Cernuda-Cernuda R, Davies WI, Rodgers J, Turton M, Peirson SN, Follett BK, Halford S, Hughes S, Hankins MW, Foster RG (2015) The hypothalamic photoreceptors regulating seasonal reproduction in birds: a prime role for VA opsin. *Front Neuroendocrin* **37**:13–28
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* **29**(7):644–652
- Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, Valdez DJ, Nieto PS, Verra DM, Acosta-Rodriguez VA, Zavalía ND, Rosenstein RE (2010) Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system. *Prog Neurobiol* **92**:484–504
- Hunt DM, Dulai KS, Partridge JC, Cottrill P, Bowmaker JK (2001) The molecular basis for spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish. *J Exp Biol* **204**:3333–3344
- Karnik SS, Sakmar TP, Chen HB, Khorana HG (1988) Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *P*

- Natl Acad Sci USA **85**:8459–8463
- Kim JW, Yang HJ, Oel AP, Brooks MJ, Jia L, Plachetzki DC, Li W, Allison WT, Swaroop A (2016) Recruitment of rod photoreceptors from short-wavelength-sensitive cones during the evolution of nocturnal vision in mammals. *Dev Cell* **37**:520–532
- Mader MM, Cameron DA (2004) Photoreceptor differentiation during retinal development, growth, and regeneration in a metamorphic vertebrate. *J Neurosci* **24**(50):11463–11472
- Matsumoto Y, Fukamachi S, Mitani H, Kawamura S (2006) Functional characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* **26**:268–278
- Minamoto T, Shimizu I (2003) Molecular cloning and characterization of rhodopsin in a teleost (*Plecoglossus altivelis*, Osmeridae). *Comp Biochem Phys B* **134**:559–570
- Oshima N (2001) Direct reception of light by chromatophores of lower vertebrates. *Pigm Cell Res* **14**:312–319
- Philp AR, Garcia-Fernandez JM, Soni BG, Lucas RJ, Bellingham J, Foster RG (2000) Vertebrate ancient (VA) opsin and extraretinal photoreception in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Biol* **203**:1925–1936
- Qian X, Ba Y, Zhuang Q, Guofang Z (2014) RNA-seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omics* **18**(2):98–110
- Sakmar TP, Franke RR, Khorana HG (1989) Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin. *P Natl Acad Sci USA* **86**:8309–8313
- Smith-Unna R, Bournsnel C, Patro R, Hibberd JM, Kelly S (2015) Transrate: reference free quality assessment of de-novo transcriptome assemblies. *Genome Res* **26**(8):1134–1144
- Soni BG, Foster RG (1997) A novel and ancient vertebrate opsin. *FEBS Lett* **406**:279–283
- Stanke M, Morgenstern B (2005) AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue):W465–W467
- Stenkamp DL (2011) The rod photoreceptor lineage of teleost fish. *Prog Retin Eye Res* **30**(6):395–404
- Sugihara T, Nagata T, Mason B, Koyanagi M, Terakita A (2016) Absorption characteristics of vertebrate non-visual Opsin, Opn3. *Plos One* **11**(8):e0161215
- Tada T, Altun A, Yokoyama S (2009) Evolutionary replacement of UV vision by violet vision in fish. *P Natl Acad Sci USA* **106**(41):17457–17462
- Takeuchi Y, Jafor Bapary MA, Igarashi S, Imamura S, Sawada Y, Matsumoto M, Hur SP, Takemura A (2011) Molecular cloning and expression of long-wavelength-sensitive cone opsin in the brain of a tropical damselfish. *Comp Biochem Physiol* **160**:486–492
- Terakita A (2005) The opsins. *Genome Biol* **6**:213
- Wang JK, McDowell JH, Hargrave PA (1980) Site of attachment of 11-cis-retinal in bovine rhodopsin. *Biochemistry-US* **19**:5111–5117
- Yokoyama S (2000) Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog Retin Eye Res* **19**:385–419
- Zhang H, Futami K, Horie N, Okamura A, Utoh T, Mikawa N, Yamada Y, Tanaka S, Okamoto N (2000) Molecular cloning of fresh water and deep-sea rod opsin genes from Japanese eel *Anguilla japonica* and expressional analyses during sexual maturation. *FEBS Lett* **469**(1):39–43
- Zhukovsky EA, Oprian DD (1989) Effect of carboxylic acid side chains on the absorption maximum of visual pigments. *Science* **246**(4932):928–930

국문 참고자료의 영어 표기

English translation/Romanization of references originally written in Korean

- Kim IS, Choi Y, Lee CR, Lee YJ, Kim BJ, Kim JH (2005) Illustrated book of Korean fishes. Kyohaksa, 454 p

Received Apr. 17, 2017

Revised May 23, 2017

Revised May 26, 2017