

3세대 DNA 염기서열 분석과 Hi-C기술을 이용한 꼬막 게놈의 유전체 연구

김진무¹ · 이승재¹ · 조은아^{1,2} · 최은경¹ · 조민주¹ · 신소령³ · 이정식^{3*} · 박현^{1*}

¹고려대학교 생명공학과

²한국해양과학기술원 부속 극지연구소

³전남대학교 수산생명의학과

Chromosomal Assembly of *Tegillarca granosa* Genome using Third-generation DNA Sequencing and Hi-C Technology

Jinmu Kim¹, Seung Jae Lee¹, Euna Jo^{1,2}, Eunkyung Choi¹, Minjoo Cho¹,
 So Ryung Shin³, Jung Sick Lee^{3*}, Hyun Park^{1*}

¹Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

²Unit of Research for Practical Application, Korea Polar Research Institute (KOPRI), Incheon 21990, Korea

³Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

Corresponding Author

Hyun Park

Division of Biotechnology, College of Life
 Sciences and Biotechnology, Korea
 University, Seoul 02841, Korea
 E-mail : hpark@korea.ac.kr

Jung Sick Lee

Department of Aqualife Medicine,
 Chonnam National University, Yeosu
 59626, Korea
 E-mail : ljs@chonnam.ac.kr

Received : November 18, 2021

Revised : November 18, 2021

Accepted : November 25, 2021

꼬막은 해양 어업으로써 아시아 전 지역에 있어서 중요한 수산자원 중 하나이다. 하지만, 공장
 의 산업화, 해양 환경오염, 그리고 지구 온난화로 인해 해양 어업 생산량이 급격히 떨어졌다.
 우리나라 남해안의 주요 수산자원인 꼬막의 유전적 특성을 파악하기 위하여 꼬막의 전장유전
 체를 해독하고 염색체 서열을 규명하였다. 915.4 Mb의 게놈을 조립하였고, 19개의 염색체 유전자
 서열을 식별하였다. 꼬막의 유전체에서 25,134개의 유전자들을 확인하였고, 그 중에 22,745개
 의 유전자들에 대한 기능을 확인했으며, 4,014개의 유전자들에 대한 KEGG pathway를 분석하
 였다. 꼬막유전체와 8종의 다른 패류와 비교유전체 분석을 통하여 확장/감소(gene gain and
 loss) 분석을 수행한 결과, 725개의 유전자군의 확장과 479개의 유전자군의 감소를 확인하였다.
 꼬막의 homeobox 유전자 클러스터는 척수동물 내에서도 잘 보존된 유전자 구조를 보였다.
 또한, 꼬막은 3개의 hemoglobin 유전자들이 피조개의 hemoglobin과 높은 유사성을 보였다.
 꼬막의 전장유전체 정보를 통해 꼬막의 환경 적응과 진화의 유전적 특성과 생리적 특성뿐만
 아니라, 꼬막 양식의 효율성을 높이는 양식산업에 널리 이용될 수 있는 유전적 정보를 제공
 할 것이다.

Tegillarca granosa, is one of the most important fishery resources throughout Asia. However, due to industrialization factories, marine environmental pollution, and global warming, the marine fishery production has drop sharply. In order to understand the genetic factors of the blood clam, which is a major fishery resource on the southern coast of Korea, the whole genome of blood clam was studied. The assembled genome of *T. granosa* was 915.4 Mb, and 19 chromosomes were identified. 25,134 genes were identified, and 22,745 genes were functionally annotated. As a result of performing gene gain and loss analysis between the blood clam genome and eight other types of shellfish, it was confirmed that 725 gene groups were expanded, and 479 gene groups were contracted. The homeobox gene cluster of blood clam showed a well-preserved genetic structure within lophotrochozoan ancestor. *T. granosa* genome showed high similarity between three hemoglobin genes with *Scarpharca broughtonii*. The blood clam genome will provide information for the genetic and physiological characteristics of blood clam adaptation, evolution, and the development of aquaculture industry.

Keywords: *Tegillarca granosa*(꼬막), Gene gain-and-loss analysis(유전자 확장/감소 분석), Homeobox(호메오박스), Phylogenetic tree(계통수), Hemoglobin(헤모글로빈)

서론

꼬막(*Tegillarca granosa*)은 연체동물문에서 이매패강 중 돌조개과에 속하는 종으로서, 주로 인도 태평양 연안의 갯벌과 동아시아에 서식하고, 동남아시아의 갯벌에서 넓게 분포하고 있다. 또한, 한국, 중국, 일본의 서태평양 연안에서 수산업에 있어서 매우 중요한 자원이고 많은 생산량을 차지하고 있다(Liu et al., 2017). 하지만, 최근에 환경오염, 다양한 수산질병 발생 및 지구 온난화로 인하여 꼬막의 최대 생산지역인 아시아에서 조개 어업에 심각한 문제를 겪고 있다(Abbas Alkarkhi et al., 2008). 이러한 문제점들을 해결하면서 어업 생산량을 증가시키기 위해 *T. granosa* 및 굴, 홍합, 가리비와 같은 다양한 패류의 유전적 정보와 전사체의 정보에 대해서 연구가 다양하게 진행이 되고 있다(Bai et al., 2019).

수산양식의 생산을 더 효율적이고 안전하게 만들기 위해 다양한 유전적 연구가 수행되고 있다. 패류는 바이러스나 박테리아에 의해 손상되고 감염되면, 면역세포로 간주되고 있는 혈구세포가 면역방어 반응에 관여하게 된다(Bao et al., 2011). 패류의 혈구 또는 순환세포로 불리는 것은 리소좀 효소, 독성 산소 중간체 및 다양한 항균 펩타이드와(Canesi et al., 2002) 같은 병원균 및 기생충에 대한 방어 메커니즘을 담당하게 된다. 대부분 패류의 혈구에는 붉은색을 나타내는 hemoglobin이 없지만 피조개(*Scapharca broughtonii*)와 (Bai et al., 2019) 같은 종에 대해서 붉은색을 띠는 hemoglobin이 발견되었다. Hemoglobin은 프로피린 고리의 중심에 있는 철 원자와 폴리펩타이드 사슬의 히스티딘 잔기 사이에 산소 및 기타 기체 리간드를 결합하게 해주는 heme 단백질질을 갖고 있으며(Abbas Alkarkhi et al., 2008), 이를 통해, 신체 내에 산소를 공급함으로써 유산소 신진대사를 도와준다(Jiang et al., 2007). 최근에 hemoglobin의 항균 활성이 *Scapharca subcrenata* 및 *T. granosa*에서 보고되었지만(Liu et al., 2017) 아직까지도 근본적인 원인에 대해서 여전히 확인이 되지 않았다(Wang et al., 2021).

다양한 패류의 유전적 정보와 관련하여 또 다른 관심분야로 연구되고 있는 부분은 hox 유전자이다. Hox 유전자는 신체의 올바른 위치에 올바른 구조가 형성되도록 위치의 특성을 암호화하며 지정하게 된다. 예를 들어, 곤충의 hox 유전자는 분절에 어떤 부속기관이 형성되는지 지정하게 되며 척추동물에서는 hox 유전자가 척추의 유형과 모양을 지정하게 된다(Barucca et al., 2003). 또한, hox 유전자는 전사 인자를 암호화하고 진화적으로 생물 내에 잘 보존되어 있다(Hajirnis and Mishra, 2021).

본 연구에서는 꼬막의 전장유전체(whole-genome sequencing)를 3세대 염기서열 기술을 이용하여 해독하고, 꼬막의 유전체 분석을 기반으로 피조개와 hemoglobin 유전자들에 대한 비교 및 패류 내에 hox 유전자들에 대한 유전적 구조를 비교분석 하였다. 본 연구에서 제시된 꼬막의 전장유전체 정보는 꼬막의 환경 적응, 진화의 유전적 특성 및 생리적 특성뿐만 아니라 꼬막 양식의 효율성을 높이는 양식산업에 널리 이용될 수 있는 유전적 정보를

제공할 것이다.

재료 및 방법

1. 시료 및 유전자 추출

*T. granosa*는 2019년 9월 대한민국 순천 벌교에서 채집했으며(Fig. 1A), 꼬막의 근육 조직에서 DNA를 phenol: chloroform: isoamyl alcohol 방법을 이용하여 추출하였다. DNA의 정량 및 품질 확인을 위해서 Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA)와 BioAnalyzer (Agilent Technologies, CA, USA)을 이용하여 확인하였다.

RNA 추출을 위하여 꼬막의 아가미, 혈액, 비장, 난소, 소화관을 해부하여 액체질소에 즉시 냉동하였고 -80°C에 보관하였다. RNA 추출은 TRIzol (Invitrogen, USA)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. RNA 정량은 Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, USA)를 사용하여 확인하였고, RNA의 integrity에 대해서 Fragment Analyzer Systems (Agilent Technologies, USA)을 사용하여 확인하였다. RNA 샘플에 대한 표준 RNA 품질은 RIN > 7.0 (RNA Integrity Number)이었으며, 2.0 < O.D. 260/280 < 2.2 RNA 샘플에 대해서 PacBio와 Illumina 라이브러리를 제작하여 시퀀싱에 사용되었다.

2. PacBio Sequencing 및 Hi-C Sequencing

PacBio 플랫폼을 이용한 DNA 염기서열 분석을 위하여, SMRT bell (single-molecule real-time sequencing) 라이브러리를 구축하였고, 이를 만들기 위해, PacBio DNA Template Prep Kit 1.0 (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA)을 사용하였다. 각각의 라이브러리에 대해 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)을 이용하여 품질과 정량을 확인하였다. 제작한 DNA 라이브러리는 SMRT cell (Pacific Biosciences, Sequel SMRT Cell 1M v2)을 사용하여 시퀀싱하였고, 총 10개의 SMRT cell을 사용하였다.

꼬막의 근육 조직을 이용하여 염색체 기반의 Hi-C chromatin contact map을 제작하기 위해 Illumina 라이브러리를 구축하였다. Hi-C 분석을 위한 근육 조직 고정, 염색질 분리 및 라이브러리 구성은 제조사의 방식에 의해 수행되었다(Belton et al., 2012). 생성된 라이브러리의 농도, 삽입 크기 및 적절한 농도를 확인한 후 최종 라이브러리를 사용해서 Illumina NovaSeq 플랫폼(Illumina, USA)에 시퀀싱하여 데이터를 생산하게 되었다.

3. RNA sequencing

각 기관별 추출한 RNA는 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Japan)을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 1~5 µg의 풀링

된 cDNA를 사용하여 라이브러리를 제작 후, 총 2개의 SMRT cell 을 PacBio Sequel system (Pacific Bioscience)을 사용하여 분석하였다. 시퀀싱된 데이터는 SMRT link (ver. 6.0)을 이용하여 필터링 및 클러스터링을 수행하여 full-length cDNA를 추출하였다.

4. 꼬막의 게놈 조립 및 유전자 주석

꼬막유전체의 *de-novo* assembly을 위해, FALCON-Unzip assembler (ver. 0.4)을 사용하였다(Chin et al., 2016). 게놈 조립 품질을 향상시키기 위해 FALCON-Unzip assembler는 정렬되지 않은 BAM 파일을 raw data로 사용하고, 기존에 디폴트 값으로 되어 있는 알고리즘을 사용하여 파일을 정제하였다.

FALCON-Unzip을 사용한 후, Hi-C 라이브러리를 사용하여 3D-denovo 조립(3D-DNA) 파이프라인에 있는 디폴트 파라미터를 이용해서 꼬막의 scaffold에 mapping하였다(Dudchenko et al., 2017). 꼬막의 유전체 크기는 K-mer 기반의 기존 연구를 이용하여 예측하였다(Kim et al., 2021).

꼬막의 염색체 수준 어셈블리의 완성도를 확인하기 위해, 어셈블된 scaffold를 Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs

(BUSCO) (ver. 3.0)을 사용하였다. BUSCO에서 사용된 리니지 데이터 세트 옵션은 metazoan odb9 데이터 베이스를 사용하였다(Manni et al., 2021).

다음으로, RepeatModeler (ver. 1.0 RRID: SCR_015027)에 있는 디폴트 파라미터를 사용하여, *de novo* repeat 라이브러리를 구축하였고, tandem repeats을 포함하여 simple repeats, satellites, 그리고 low-complexity repeats에 대해서 분류하였다(Bao and Eddy, 2002).

유전자 주석은 Maker (ver. 2.28)를 이용하였고, 총 3라운드 of 반복 훈련을 사용하였다(Cantarel et al., 2008). 첫 번째 라운드에서 ab initio 유전자 예측은 Snap (Snap, RRID: SCR_002127) 및 Augustus (Augustus: Gene Prediction, RRID:SCR_008417)을 사용하였다. 또한, 전사체 정보로서 Iso-Seq 데이터와 NCBI에서 얻은 패류의 단백질 서열 정보를 사용하였다. 두 번째 라운드에서 유전자 예측을 위해 재 훈련된 HMMS를 사용하였다. 최종 라운드를 진행한 후, 그 결과는 꼬막의 유전자 예측에 사용이 되었으며, 본 데이터를 바탕으로 꼬막의 유전체 분석을 진행하였다.

Maker을 이용하여 나온 최종 데이터를 기반으로, 단백질 시퀀스는 NCBI nr database ($E < 10^{-10}$)에 BlastP (ver. 2.2.29)를 사용하여 분석하였다. 단백질의 도메인 분석은 Interproscan5를 사용하였

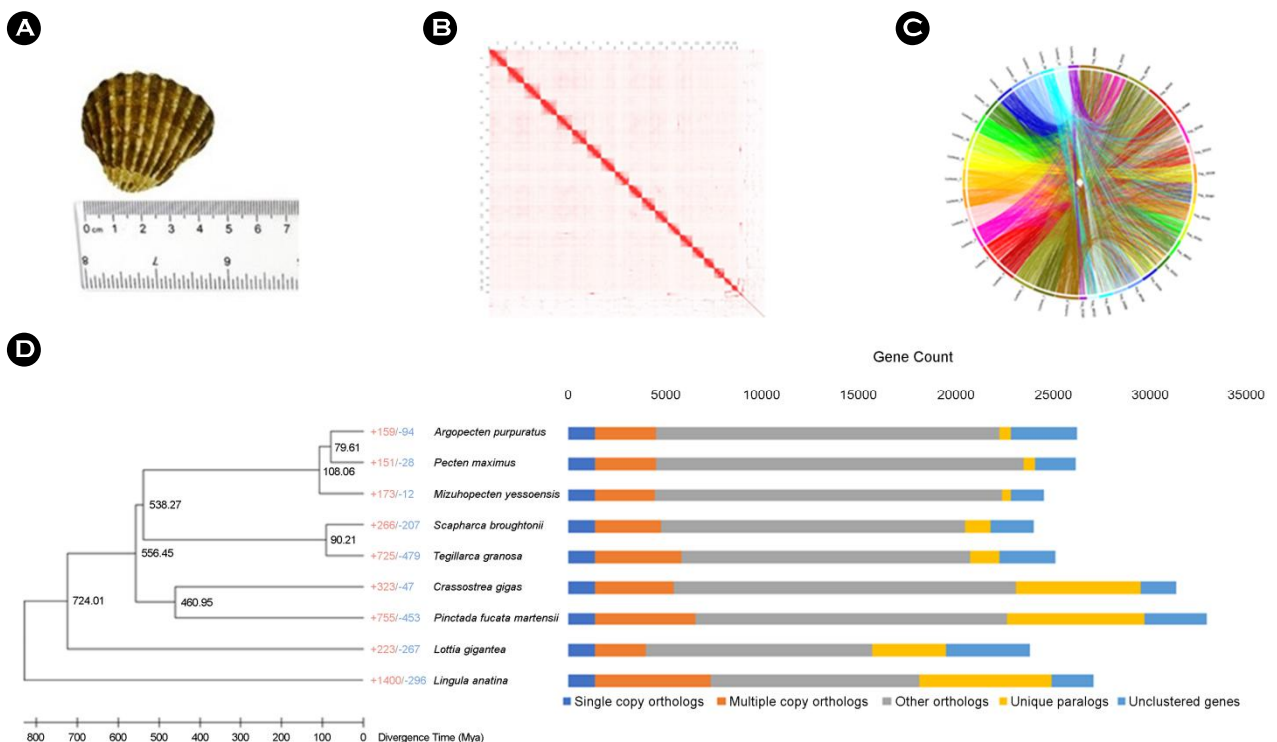


Fig. 1. *De-novo* assembly of *T. granosa* genome. (A) shows the blood clam used in this study and (B) represents the Hi-C based chromatin contact maps interaction. (C) represents the gene synteny relationship between *T. granosa* and 19 chromosomes of *S. broughtonii* based on Mummer4. (D) represents the phylogenetic tree depending on single copy orthologue sequences of 9 species in bivalves. This tree also represents gene family gain-and-loss analysis, including the number of lost gene families (-) and gained gene families (+). The standard of divergence time was compared with *C. gigas* and *P. fucata martensii* for all 9 species of bivalves.

Table 1. *T. granosa* genome assembly sequencing data statistics

Library type	Platform	Num. of Reads (bp)	Num. of sequences (bp)	Data size (Gb)	Application
Long read	PacBio Sequel	11,835,915	101,402,060,221	101.4	Genome assembly
Hi-C	NovaSeq	152,971,304	23,098,666,904	23.09	Chromosome construction
Iso-Seq	PacBio Sequel	4,802,335	13,163,234,613	13.1	Annotation

고, Blast2GO 기반의 유전자 온톨로지(GO) 분석(ver. 4.19) (Gotz et al., 2008)과 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al. 2017) 데이터 베이스를 이용하여 생물학적 시스템의 기능 및 유틸리티를 확인하였다.

5. 염색체의 gene synteny와 유전자 확장/감소 분석

꼬막의 염색체와 피조개의 염색체 간에 gene synteny를 확인하기 위해 Mummer4 (Marcais et al., 2018)을 이용하여 염색체 서열을 정렬하였다. 꼬막과 피조개의 정렬된 염색체 서열을 사용하여 Circos (Krzywinski et al., 2009)을 통해 gene synteny를 비교하였다.

꼬막과 다른 패류 간 유전자 확장/감소(gene gain-and-loss) 분석을 위해 유전체 정보가 알려진 8종의 패류종(Table 6) 정보를 이용하여 OrthoFinder (Emms and Kelly, 2019)을 사용하였다. OrthoFinder를 통해 나온 결과를 이용하여 9종의 패류 간 유전자 확장/감소를 확인하였고, 9종의 패류에 해당되는 single-copy orthologue 서열들을 이용하여 MegaX (Kumar et al., 2018)을 통해 계통도를 완성하였다. 꼬막을 포함한 9종 간의 divergence time을 확인하기 위해 TimeTree (Kumar et al., 2017)을 이용하여 *Crassostrea gigas*와 *Pinctada fucata martensii* 종의 divergence time 기점으로 다른 종에 대해서도 예측하였다(Fig. 1D).

6. Hox 및 hemoglobin 유전자 비교분석

9종의 패류 게놈 데이터 바탕으로(Table 6), 척추동물 조상에서 나타난 parahox와 hox 클러스터를 참고하여 꼬막 및 다른 패류 내에 hox 유전자들에 대한 gene synteny를 비교하였다. 각 클러스터에 해당되는 유전자들의 구조와 방향성을 확인하였으며, 꼬막과 피조개에서 hox 유전자를 구성하고 있는 염색체의 위치에 관해서도 확인하였다. 척추동물과 패류에서 hemoglobin 유전자를 가진 종에 해당되는 데이터를 사용하여 Mega X에서 bootstrap 500을 설정하고 계통도를 완성하였다. Hemoglobin 유전자를 가진 종과 myoglobin 유전자를 가진 종에 관한 NCBI accession number는 계통도에 나열하였다. 꼬막, 피조개, 그리고 척추동물들이 가지는 hemoglobin 유전자 사이에 진화적으로 잘 보존되어 있는지 확인하기 위해, hemoglobin 유전자들의 아미노산 서열을 ClustalW를 이용하여 비교분석하였다. 꼬막과 피조개 사이에 hemoglobin

Table 2. *T. granosa* genome assembly statistics

Assembly	Falcon-Unzip	Hi-C
Num. of contigs (scaffolds)	4,789	923
Total size of contigs (bp)	947,232,568	915,458,251
Longest contigs (bp)	2,933,992	58,541,600
N50 contigs length (bp)	475,315	45,661,362
Num. of scaffolds > 10M	0	19
Gap (%)	0	0.03

유전자에 관한 gene synteny를 확인하기 위해 염색체 수준에서 비교분석 하였다. Hemoglobin 및 neuroglobin 유전자를 포함하여 다른 유전자들에 대한 방향성을 확인하였고, 유전자의 삽입 및 삭제 그리고 두 종 사이에 hemoglobin 유전자를 구성하고 있는 염색체의 위치에 관해서도 분석하였다.

결 과

1. 꼬막의 게놈 시퀀싱 및 염기서열 분석

꼬막의 게놈 조립을 수행하기 위해 PacBio Sequel 플랫폼을 이용하여 10개의 SMRT cell을 사용하여 101.4 Gb의 유전자 서열을 생산하였다. 또한, 꼬막의 염색체 scaffolding을 위하여 NovaSeq 플랫폼을 사용하여 총 23.09 Gb의 Hi-C 라이브러리를 생산하였다. 마지막으로, 전사체 정보 분석을 위하여 PacBio Sequel 플랫폼을 이용하여 Iso-Seq 데이터 13.1 Gb를 생산하였다(Table 1).

유전체 조립은 long-read 서열을 이용하여 FALCON-Unzip assembler를 이용하였다. 조립된 게놈의 총 크기는 947 Mb였고, N50 길이가 475,315 bp로 확인되었다. 다음으로, Hi-C superscaffolding을 수행하여 최종적으로 915.4 Mb의 완성된 게놈 서열을 얻었으며, N50 길이가 총 45.6 Mb로 산출되었다(Table 2). 조립된 꼬막의 유전체로부터 총 19개의 염색체 서열이 확인되었다. 염색체 길이의 합은 823.2 Mb이며, 90 Mb의 서열은 염색체에 포함되지 않았다(Table 3, Fig. 1B).

조립된 유전체의 완성도를 평가하기 위해, BUSCO 분석은

Table 3. 19 chromosomes and un-assigned lengths of assembled genome in *T. granosa*

No.	Gene name	Length (bp)
1	Teg_00468	58,541,600
2	Teg_01531	56,170,467
3	Teg_00744	55,300,394
4	Teg_00310	53,683,276
5	Teg_01906	51,137,090
6	Teg_02156	48,950,330
7	Teg_02123	47,321,304
8	Teg_02159	46,421,195
9	Teg_01487	45,661,362
10	Teg_02155	43,992,338
11	Teg_02161	43,329,271
12	Teg_00533	41,888,547
13	Teg_02157	41,656,170
14	Teg_01034	41,104,375
15	Teg_00758	38,421,462
16	Teg_01856	34,128,261
17	Teg_00039	32,747,395
18	Teg_00722	25,956,391
19	Teg_01164	16,833,835
	Chromosome Sum	823,245,063
	Unassigned	90,040,188
	Total length	915,485,251

metazoan odb9 데이터 세트를 통하여 확인하였다. 전체적으로 978개의 BUSCO 그룹이 확인되었으며, complete BUSCO는 95.7%로 확인되었다(Table 4).

2. 꼬막의 유전자 주석 분석

꼬막의 유전자 주석을 위하여 조립한 유전체 서열은 Repeat-Modeler를 사용해서 게놈 안에 있는 반복요소를 식별하고, 주석을 위한 반복 라이브러리를 생산하였다. 꼬막의 유전자 주석 분석은 꼬막전사체 Iso-Seq 데이터와 근연종의 단백질 서열을 사용하여 Maker를 이용하여 총 3번의 라운드를 통해, 총 25,134개의 유전자에 대한 structural annotation이 분석되었다. 유전자 기능 분석은 NCBI nr database에 BlastX를 통하여 유전자를 정의하고,

Table 4. The completeness of BUSCO results in genome assembly by using metazoan odb9 dataset

Metazoan_odb9	No.	%
Complete BUSCOs (C)	936	95.7
Complete and single-copy BUSCOs (S)	876	89.3
Complete and duplicated BUSCOs (D)	63	6.4
Fragmented BUSCOs (F)	10	1.0
Missing BUSCOs (M)	32	3.3
Total BUSCO groups searched	978	

Table 5. The genome annotation statistics of *T. granosa* using Blast2GO

With Blast results	22,745
GO annotation	9,396
KEGG annotation	4,014
Gene length sum (bp)	405,386,273
Gene count	25,134
Exon length sum (bp)	53,570,540
Exon count	209,772
CDS length sum (bp)	30,892,998
CDS count	189,053

Blast2GO 프로그램을 통하여 유전자 온톨로지(GO) 분석 및 KEGG 분석을 수행한 결과, 22,745개의 유전자가 확인되었고, 그 중 9,396개는 GO mapping 되었으며, 4,014개의 유전자는 KEGG pathway에 mapping 되었다(Table 5).

3. Gene synteny와 gene gain-and-loss

꼬막과 피조개의 염색체에서 유전자 구조적 상동성을 확인하기 위해 Mummer4를 이용하여 염색체 서열을 정렬하였다. 정렬된 염색체 서열은 Circos를 이용하여 시각화 하였고, 두 종 간 염색체 사이에서 높은 상동성이 확인되었다(Fig. 1C).

꼬막 및 다른 패류 사이에 유전자 확장/감소 분석을 위해 게놈 조립이 완료된 9종에 대한 단백질 서열 바탕으로(Table 6) OrthoFinder를 이용하여 상동유전자를 분석하였다. 9종의 패류에서 single copy orthologs는 1,351개로 확인되었으며, 꼬막에서 multiple copy orthologs, un-clustered gene, unique paralogs는 4,471개, 2,895개, 그리고 1,479개 순으로 확인되었다(Fig. 1D).

1,351개의 single copy orthologs 서열을 이용하여 9종에 해당되는 패류의 계통도를 Mega X를 통해 완성하였고, *C. gigas*와 *P. fucata martensii* 종의 divergence time을 기점으로 꼬막 및 다른 종의 divergence time을 예측하였다. 꼬막과 피조개는 90.21 Mya (million years ago)의 분기시점을 가진 것으로 확인되었다(Fig. 1D).

Table 6. The shellfish used for genome comparison analysis

Common name	Scientific name	Data access
Blood clam	<i>Tegillarca granosa</i>	This Study
Peruvian scallop	<i>Argopecten purpuratus</i>	Giga Science DB
Ark clam	<i>Scapharca broughtonii</i>	Giga Science DB
Pacific oyster	<i>Crassostrea gigas</i>	NCBI GenBank
Owl limpet	<i>Lottia gigantea</i>	NCBI GenBank
Yesso scallop	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	NCBI GenBank
Great scallop	<i>Pecten maximus</i>	NCBI GenBank
Akoya pearl oyster	<i>Pinctada fucata martensii</i>	Giga Science DB
Common Oriental Lamp Shell	<i>Lingula anatina</i>	NCBI GenBank

패류 9종에 대한 유전자 확장/감소 분석결과, 꼬막에서 725개의 유전자가 확장되었고, 479개의 유전자가 감소되었다. 9종 중에 *Lingula anatina*가 1,400개의 유전자로 가장 높게 확장되었으며, *Pecten maximus*가 151개로 가장 낮게 확장되었다(Fig. 1D).

4. Hox 및 hemoglobin 유전자 비교분석

척추동물 조상에 있는 parahox와 hox 클러스터를 참고하여 9종에 해당되는 패류의 hox 유전자에 대한 유전적 구조를 비교분석 하였다. 9종에 해당되는 계통도는 Fig. 1D를 참고하였고, 피조개에서 parahox 클러스터는 LG11에 존재했으며, 꼬막에서는 11번 염색체에서 확인되었다. Hox 클러스터에 관여하는 유전자들에 대해서는, 꼬막은 16번 염색체에서 확인되었으며, 피조개에서는 LG15에 존재하였다. 척추동물 조상의 parahox와 hox 클러스터 바탕으로 9종의 패류에서 homeobox 유전자 클러스터가 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

패류 및 척추동물에서 hemoglobin 유전자를 가진 단백질 서열을 이용하여 Mega X를 통해 계통도를 확인하였으며, 꼬막에서 hemoglobin 관련 유전자들은 피조개가 갖고 있는 hemoglobin 유전자와 같은 범주로 묶이는 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 또한, 꼬막, 피조개 및 척추동물의 hemoglobin 아미노산 서열을 ClustalW를 이용하여 비교분석 한 결과, 30~49 bp, 64~81 bp, 90~113 bp, 그리고 167~179 bp 사이에 있는 아미노산 서열들이 척추동물 및

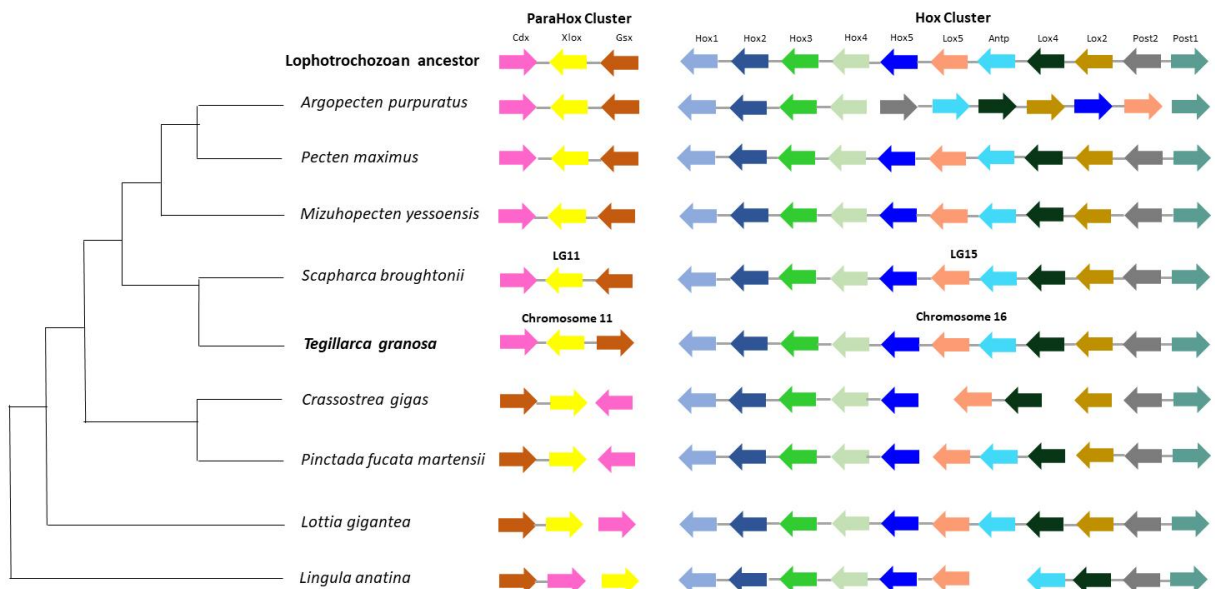


Fig. 2. Homeobox gene clusters are compared with lophotrochozoan ancestor and 9 species in bivalves are represented in phylogenetic tree. The color of each homeobox gene clusters is represented on the lophotrochozoan ancestor labeled above. The direction of the transcription orientation is showed as arrow shape of each homeobox gene. Parahox cluster and hox cluster are not connected in one chromosome for 9 species represented in the figure.

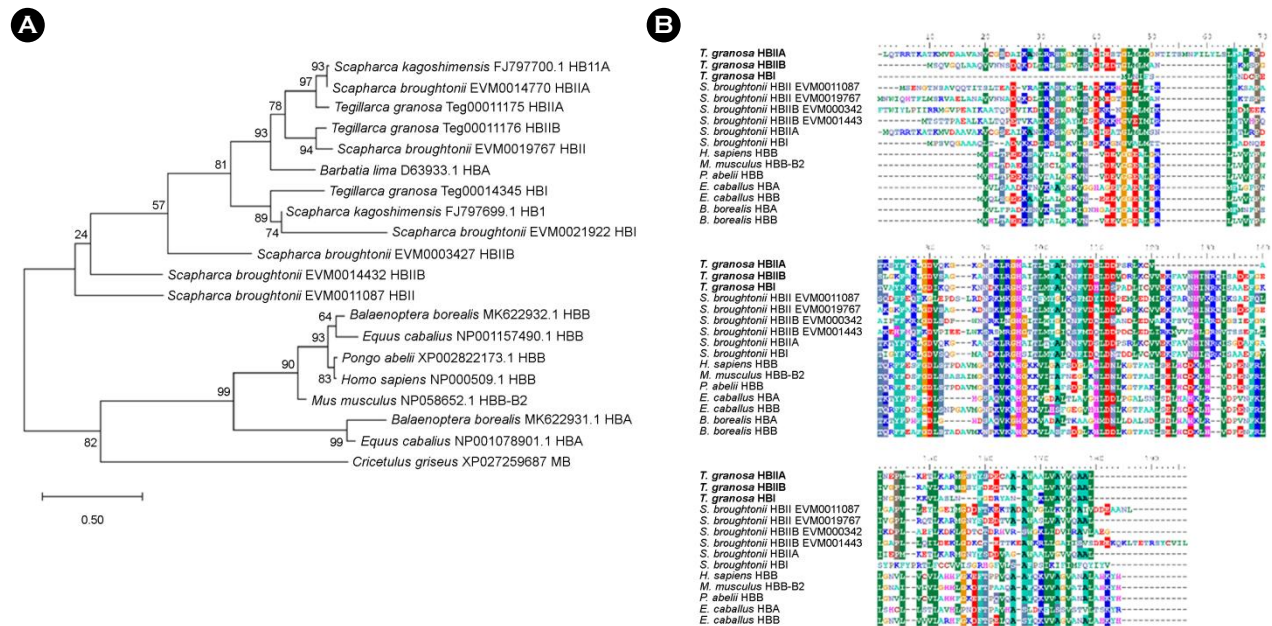


Fig. 3. Phylogenetic tree and comparison of hemoglobin genes. (A) represents the phylogenetic tree of *T. granosa* hemoglobin genes between shellfish and vertebrate by using Mega X. (B) represents the comparison of hemoglobin protein sequences in *T. granosa*, *S. broughtonii*, and vertebrate by using ClustalW. The accession number of amino acid sequences which are used is represented in (A).

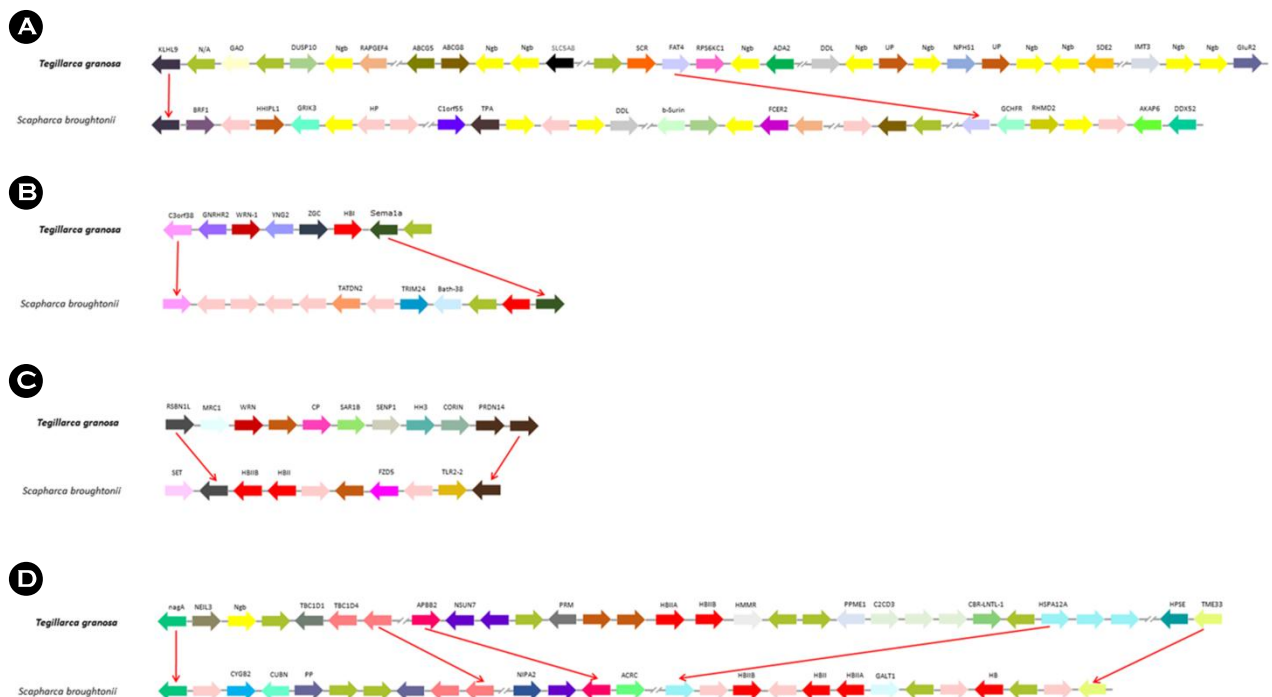


Fig. 4. Hemoglobin gene synteny between 2 blood clams (*T. granosa*, *S. broughtonii*) are compared in chromosome level. The direction of transcription orientation is represented by arrow shape of each gene and thin red arrows shows gene insertion or deletion between hemoglobin and neuroglobin. Double slash between gene synteny shows the long distance between the genes that is showed in chromosome level. (A) Neuroglobins are in chromosome 2 and LG2 in *T. granosa* and *S. broughtonii*. (B) HBI are in chromosome 7 and LG5. (C) HB11B and HB11 are only located in LG6 of *S. broughtonii*. (D) Other HB are in chromosome 11 and LG11 between 2 species.

꼬막과 피조개에서 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3B). Hemoglobin 유전자를 가진 피조개와 꼬막 사이에 gene synteny를 확인하였다. Fig. 4A에서 꼬막과 피조개의 neuroglobin은 각각 11번 염색체와 LG11에서 확인되었고, 꼬막에서 11개의 neuroglobin이 존재했으며, 피조개에서는 5개의 neuroglobin이 관찰되었다. Fig. 4B에서 HBI는 꼬막에서 7번 염색체에서 관찰이 되었고, 피조개에서는 LG5에서 확인되었으며, 2종에서 각각 1개씩 식별되었다. Fig. 4C에서 HBIB와 HBII는 피조개의 LG6에서만 확인되었고, 꼬막에서는 식별이 되지 않았다. Fig. 4D에서는 다른 hemoglobin 유전자들이 꼬막의 11번 염색체에 존재했으며, 피조개에서는 LG11에 존재하는 것으로 확인되었다.

고찰

꼬막은 아시아 전역의 해양 어업을 위한 보편적이고 주요한 자원이다. 이 종은 주로 얕은 해안과 갯벌에 서식하며, 다른 패류와 다르게 혈액에 hemoglobin을 갖고 있으며, 이와 관련된 다양한 연구들이 활발히 진행 중이다(Liu et al., 2017). 본 연구에서는 꼬막의 19개의 염색체를 포함한 전체 게놈 정보를 해독하였다. 해독된 꼬막의 유전체를 기반으로 8종의 패류들의 유전체 정보와 비교분석한 결과, 이들 사이의 총 1,351개의 single copy orthologs가 확인되었으며, 꼬막은 종 특이적으로 725개의 유전자가 확장되었고, 479개의 유전자가 감소된 것을 확인하였다.

Hox 유전자는 신체의 올바른 위치에 대한 구조를 형성하도록 위치의 특성을 암호화하여 저장하게 되고, 종 간에 진화적으로 잘 보존되어 있다(Hajimis and Mishra, 2021). 축수담류동물 조상의 parahox와 hox 클러스터의 유전자들 바탕으로 9종의 패류에 해당되는 homeobox 유전자 클러스터를 완성하였고, 그 중에 꼬막의 parahox 클러스터는 11번 염색체에 존재하는 것으로 확인되었다. Hox 클러스터는 16번 염색체에 존재했으며, 꼬막과 피조개 사이에 parahox 클러스터에는 Gsx 유전자에 대한 방향성이 서로 달랐으며, hox 클러스터를 구성하는 11개의 유전자에 대한 방향성이 모두 동일하였다. 이를 통해 두 종 간 homeobox 유전자 클러스터는 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다.

다양한 패류의 연구분야 중 하나인, 혈구는 순화세포로 불리고, 이를 이용하여 다양한 항균 펩타이드, 독성 산소 중간체 및 리소좀 효소와(Canesi et al., 2002) 같은 병원균 및 기생충에 대한 방어 메커니즘을 담당하게 된다. 반면, 꼬막의 혈구에는 대부분 hemoglobin으로 구성되어 있고, 이는 붉은색을 띄게 해주는데(Abbas Alkarkhi et al., 2008), 이를 이용하여 신체 내에 산소를 공급함으로써 유산소 신진대사를 도와주게 된다(Jiang et al., 2007). 최근 연구에서는 항균 활성에 관한 부분이 보고되었지만, 아직까지 근본적인 원인에 대해서는 확인되지 않았다(Wang et al., 2021). 꼬막의 게놈 조립을 통해, hemoglobin 유전자를 가지고 있는 패류 및 척추동물의 서열을 이용하여 계통도를 완성하였고,

꼬막에 존재하는 hemoglobin 관련 유전자들은 *Scapharca kago-shimensis*, *S. broughtonii*와 *Barbatia lima* 종과 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 피조개의 hemoglobin 유전자와 gene synteny를 비교분석한 결과, neuroglobin 유전자는 꼬막에서 11번 염색체에서 11개가 확인되었으며, 피조개에서는 총 5개의 neuroglobin이 LG11에서 확인되었다. 꼬막과 피조개의 염색체 내에 neuroglobin 외에 다양한 hemoglobin 유전자와 관련하여 gene synteny를 완성하였고(Fig. 4), 유전자들 사이에 삽입과 삭제가 이루어지면서 정확한 원인에 대해서는 확인이 되지 않지만, 두 종 사이에 유전적 변이를 통해 생물학적 다양성이 존재할 것이라고 예상하였다(Barton and Zeng, 2019).

대부분의 꼬막 생산량을 이루고 있는 순천 및 여수 갯벌은 최근 폐수, 중금속 과다노출, 그리고 온도변화로 인하여 심각한 환경적인 문제를 겪고 있다. 이와 관련하여, 본 연구에서 해독한 꼬막의 유전체 정보 기반으로, 중금속 노출 및 온도변화에 따른 다양한 유전자 발현변화를 확인하여, 향후 꼬막의 양식 효율성을 높이기 위한 기초자료를 제공할 것이고, 이 외에도 꼬막의 생리, 생화학적 연구, 환경적응성과 진화 특성에 대한 연구 기초자료를 제공할 것이다.

사사

이 논문은 2021년도 정부(해양수산부)의 재원으로 해양수산과학기술진흥원 포스트게놈다부처유전체사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 20180430).

참고문헌

- Abbas Alkarkhi FM, Ismail N, Easa AM. 2008. "Assessment of arsenic and heavy metal contents in cockles (*Anadara granosa*) using multivariate statistical techniques". *Journal of Hazardous Materials* 150: 783-789.
- Bai CM, Xin LS, Rosani U, Wu B, Wang QC, Duan XK, Liu ZH, Wang CM. 2019. "Chromosomal-level assembly of the blood clam, *Scapharca* (*Anadara*) *broughtonii*, using long sequence reads and Hi-C". *Gigascience* 8.
- Bao Y, Wang Q, Lin Z. 2011. "Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-Hbl) is involved in the immune response against bacterial infection". *Fish & Shellfish Immunology* 31: 517-523.
- Bao Z, Eddy SR. 2002. "Automated de novo identification of repeat sequence families in sequenced genomes". *Genome Res* 12: 1269-1276.
- Barton HJ, Zeng K. 2019. "The Impact of Natural Selection on Short Insertion and Deletion Variation in the Great Tit Genome".

- Genome Biol Evol 11: 1514-1524.
- Barucca M, Olmo E, Canapa A. 2003. "Hox and paraHox genes in bivalve molluscs". *Gene* 317: 97-102.
- Belton JM, McCord RP, Gibcus JH, Naumova N, Zhan Y, Dekker J. 2012. "Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes". *Methods* 58: 268-276.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C. 2002. "Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves". *Microsc Res Tech* 57: 469-476.
- Cantarel BL, Korf I, Robb SM, Parra G, Ross E, Moore B, Holt C, Sanchez Alvarado A, Yandell M. 2008. "MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes". *Genome Res* 18: 188-196.
- Chin CS, Peluso P, Sedlazeck FJ, Nattestad M, Concepcion GT, Clum A, Dunn C, O'Malley R, Figueroa-Balderas R, Morales-Cruz A, Cramer GR, Delledonne M, Luo C, Ecker JR, Cantu D, Rank DR, Schatz MC. 2016. "Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing". *Nat Methods* 13: 1050-1054.
- Dudchenko O, Batra SS, Omer AD, Nyquist SK, Hoeger M, Durand NC, Shamim MS, Machol I, Lander ES, Aiden AP, Aiden EL. 2017. "*De novo* assembly of the *Aedes aegypti* genome using Hi-C yields chromosome-length scaffolds". *Science* 356: 92-95.
- Emms DM, Kelly S. 2019. "OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics". *Genome Biol* 20: 238.
- Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talon M, Dopazo J, Conesa A. 2008. "High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite". *Nucleic Acids Res* 36: 3420-3435.
- Hajimis N, Mishra RK. 2021. "Homeotic Genes: Clustering, Modularity, and Diversity". *Front Cell Dev Biol* 9: 718308.
- Jiang N, Tan NS, Ho B, Ding JL. 2007. "Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy". *Nat Immunol* 8: 1114-1122.
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. 2017. "KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs". *Nucleic Acids Res* 45: 353-361.
- Kim J, Lee SJ, Jo E, Choi E, Kim HJ, Lee JS, Park H. 2021. "Genome Survey and Microsatellite Marker Selection of *Tegillarca granosa*". *Journal of Marine Life Science* 6: 38-46.
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA. 2009. "Circos: an information aesthetic for comparative genomics". *Genome Res* 19: 1639-1645.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms". *Mol Biol Evol* 35: 1547-1549.
- Kumar S, Stecher G, Suleski M, Hedges SB. 2017. "TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times". *Mol Biol Evol* 34: 1812-1819.
- Liu B, Teng S, Shao Y, Chai X, Xiao G, Fang J, Zhang J, Wang C. 2017. "A Genetic Linkage Map of Blood Clam (*Tegillarca granosa*) Based on Simple Sequence Repeat and Amplified Fragment Length Polymorphism Markers". *Journal of Shellfish Research* 36: 31-40.
- Manni M, Berkeley MR, Seppely M, Simao FA, Zdobnov EM. 2021. "BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes". *Mol Biol Evol* 38: 4647-4654.
- Marcais G, Delcher AL, Phillippy AM, Coston R, Salzberg SL, Zimin A. 2018. "MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system". *PLoS Comput Biol* 14: e1005944.
- Wang S, Yu X, Zhang S, Jin H, Chen Z, Lin Z, Bao Y. 2021. "Cu²⁺ Inhibits the Peroxidase and Antibacterial Activity of Homodimer Hemoglobin From Blood Clam *Tegillarca granosa* by Destroying Its Heme Pocket Structure". *Frontiers in Marine Science* 8: 2296-7745.