

미토콘드리아 유전자, 치토그롬 옥시다제(subunit I)의 염기서열을 이용한 새치성게(*Strongylocentrotus intermedius*)의 진화과정 분석

이 윤 호*

한국해양연구소 극지연구센터

Evolution of sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* Based on DNA Sequences of a Mitochondrial Gene, Cytochrome c Oxidase Subunit I

YOUN-HO LEE*

Polar Research Center, Korea Ocean Research and Development Institute Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea

우리나라 동해안에 서식하는 새치성게(*Strongylocentrotus intermedius*)는 등근성게과(*Strongylocentrotidae*)에 속하는 냉수성 해양 무척추동물이다. 등근성게과에는 현재 9종의 성게가 속해 있으나, 아직 종간의 분류 기준, 계통분류학적 유연관계, 진화과정 등이 잘 밝혀져 있지 않다. 본 연구는 유전자 염기서열이라는 분자형질을 이용하여 새치성게의 종 분류기준을 확립하고 이 종의 계통진화 및 분화 시기를 파악하고자 수행되었다. 이를 위하여 변화율이 빠르고 모계로만 유전되는 특성을 가진 미토콘드리아의 한 유전자인 cytochrome c oxidase subunit I(COI)을 분석하였다. 새치성게의 생식소에서 DNA를 추출하고 증합효소연쇄반응으로 COI 유전자 단편을 선택적으로 증폭하였으며, 클로닝과 시퀀싱 과정을 거쳐 COI 유전자의 단편 1077개 염기쌍 순서(염기서열)를 확정하였다. 이 염기서열과 유전자 데이터베이스(GenBank)에 들어있는 다른 성게 및 해삼, 불가사리의 유전자를 비교하고 그 분자 계통수를 작성함으로써 새치성게의 진화과정을 분석하였다. COI 유전자 계통수는 새치성게가 태평양 동쪽 연안에 서식하는 *S. purpuratus*와 계통적으로 자매군(sister species)의 관계에 있음을 보였다. 두 종의 분화 시기는 계통수 상 분지의 길이와 화석연대를 고려하여 산출했을 때 지구 온도의 변동이 심했던 약 890만년 전으로 추정되었다. 태평양의 동안과 서안으로 분리된 두 종의 현재 분포와 중분화 시기의 지구 환경조건은 두 종간의 분화가 환경변화에 따른 개체군의 지리적 분리(vicariance)에 의한 것임을 시사해 준다. 한편, 새치성게의 COI 유전자 염기서열은 이 종을 대표하는 분자형질로서 등근성게과의 성게들을 서로 구분할 수 있는 종분류의 기준이 될 것이다.

Sea urchin *S. intermedius* occurring in the Korean east coast is a cold water species that belongs to the family Strongylocentrotidae of Echinoidea. Although it is known that there are nine species in the family, species identification criteria, phylogenetic relationships, time and process of evolution of the family members have not been uncovered clearly. In the present study, I tried to find some clues to such problems for *S. intermedius* by means of DNA sequences. For this, cytochrome c oxidase subunit I (COI), one of the mitochondrial genes that evolve fast and follow maternal inheritance was analyzed. DNA was extracted from the female gonad of *S. intermedius*, a segment of COI gene amplified by polymerase chain reaction (PCR), and finally a total of 1077 base pair sequence of COI obtained by cloning and sequencing the PCR product. The sequence was compared with homologous genes of other sea urchins and echinoderm species. Phylogenetic trees of the COI gene segment revealed that *S. intermedius* is a sister species of *S. purpuratus* which lives along the east coast of the Pacific. With reference to the fossil records of sea urchins and genetic distances in the molecular phylogenies, it is estimated that the two species were separated about 0.89 million years ago when the earth temperature fluctuated significantly. The current disjunct distribution patterns of the two species and the climate change of the earth at the time of separation suggest that speciation might have occurred by vicariance. The COI gene sequence obtained here now can be used as a molecular character which discerns *S. intermedius* from the other sea urchin species of Strongylocentrotidae.

서 론

유전자 염기서열은 생물의 개체군, 종(species), 혹은 생물군 분류 각 단계의 독특한 분자형질(molecular character)로 간주되어 개체군간 유전적 변이 파악, 종의 분류, 계통 분석, 분화 시기 추정 등에 이용되고 있다(Avise, 1994; Lee and Vacquier, 1995; Palumbi and Cipriano, 1998). 특히, 미토콘드리아 유전자는 모계로만 유전되며 변화율이 빠르다는 특징이 있어 계통분류상 하위 단계인 종과 개체군을 구분하는 데 널리 이용되고 있다(Avise, 1994). 이 연구 방법은 해양생물 연구에도 광범위하게 적용되고 있으며 연어의 계통 분석(Domanico and Phillips, 1995), 해삼류의 유생 동정(Medeiros-Bergen *et al.*, 1995), 열새우류의 개체군간 유전적 변이 분석(France and Kocher, 1996), 크릴의 계통진화 분석(Patarnello *et al.*, 1996), vestimentiferan의 종 분류(Kojima *et al.*, 1997) 등이 미토콘드리아 유전자의 염기서열을 분석함으로써 이루어졌다. 수산자원학에서도 분자형질을 바탕으로 한 개체군의 규명(혹은 계군의 규명; stock identification)이 중요한 과제로 다루어지고 있다. 수산자원의 관리와 활용의 기본단위가 계군으로서 이에 대한 정확한 규명이 필요하기 때문이다.

우리 나라의 바다는 생물상이 다양하며 개체군의 유전적 구조(population genetic structure) 또한 복잡하리라 생각된다. 지구 북반구 중위도 지역에 위치한 우리 나라의 지리적 특성상 난류성 생물과 한류성 생물이 모두 출현하고 있으며, 동해, 남해, 그리고 서해는 각각 독특한 해양환경을 형성하여 서로 다른 특성의 해양생물이 서식할 수 있는 여건을 제공하고 있기 때문이다. 그런데, 우리 나라의 해양생물에 대한 유전학적 연구는 아직 매우 미흡한 상태이다. 우리 나라 해양생물의 종 다양성, 유전적 다양성, 개체군의 생물지리학적 분포, 일본과 중국 등 주변국 연안에 서식하는 생물과의 계통, 진화관계 등이 충분히 파악되지 않았다. 다만, 연체동물과 새우 등 몇몇 생물군에서 단편적인 연구가 이루어졌을 뿐이다(윤 등, 1996; Hwang, 1996).

성게류는 우리 나라 연안 전체에 분포하는 대표적인 저서생물군으로서 주요 수산자원이기도 하다. 우리 나라 동해안에는 새치성게(*S. intermedius*), 등근성게(*S. nudus*), 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*) 등 등근성게과(Strongylocentrotidae) 성게들이 다량 출현한다. 등근성게과 성게들은 정형성게로서 태평양과 대서양, 그리고 북극해 연안 등 지구 북반구의 온대 및 한대 해역(북위 30°

이북)에 널리 분포한다(Fig. 1). 이들은 대체로 수심 50 m 이내에 서식하나 *S. pallidus*와 *Alloccentrotus fragilis* 경우는 수심 1,500 m 까지 내려간다(Jensen, 1974). 이 성게들의 분류는 지금까지 보대공(pores)의 수, 대혹의 모양(primary tubercles), 대극(primary spine)의 단면이나 표면의 형태, 선낭차극(globiferous pedicellaria)의 모양, 이빨의 구조 등 형태적 형질에 의하여 이루어 졌다(Jensen, 1974; 신과 노, 1996). 그런데, 형태적 형질은 서식환경이나 개체의 크기에 따른 변이가 심하여(Bazhin, 1998) 학자마다 종을 분류하는데 큰 차이가 있었다(14종, Mortensen 1943; 10종, Jensen 1974; 9종, Bazhin 1998). 우리 나라의 새치성게도 분류가 까다로운 종의 하나였으며 최근 Bazhin(1998)에 의하여 *S. pulchellus*를 포함하는 한 종으로 분류되었다.

등근성게과 성게에 대한 계통진화 관계와 종분화의 연구는 지금까지 주로 태평양 동쪽 연안에 서식하는 종들을 대상으로 이루어 졌다. Smith(1988)는 화석자료를 근거로 등근성게과 성게가 약 5,000만년 전에 진화하였으며, 현생 종들의 종분화는 약 2,000만년 전부터 시작되었다고 보고하였다. 형태적 형질을 바탕으로 한 연구에서 등근성게과의 *S. purpuratus*는 진화적으로 *S. droebachiensis*와 가깝고 *S. franciscanus*에 멀다고 알려졌다(Roberts *et al.*, 1985). 이러한 유연관계는 분자형질을 분석한 결과와도 일치하였던 바, Hall *et al.*(1980)은 종간의 DNA-DNA 결합(hybridization)의 안정성을 측정하여 핵 유전자의 진화속도가 약 0.5%/백만년이라고 보고하면서 *S. purpuratus*와 *S. droebachiensis*가 약 700만년 전에, *S. purpuratus*와 *S. franciscanus*는 약 2,000만년 전에 분화되었다고 추정하였다. 최근 Biermann(1998)은 새치성게와 등근성게를 제외한 7 종의 등근성게과 성게들로부터 bindin이라는 정자 단백질의 유전자 염기서열을 분석하고 이를 비교함으로써, 종간의 유전적 거리가 *S. purpuratus*, *S. droebachiensis*, *S. pallidus*, *S. polyacanthus*, *A. fragilis*에서 매우 가깝고 다음으로 말뚝성게, *S. franciscanus* 순서로 멀어진다고 밝혔다. 한편, 새치성게와 등근성게 등 우리 나라 연안에 서식하는 종들의 계통진화에 대해서는 알려진 것이 거의 없다.

본 연구는 그 동안 유전적, 진화적인 연구가 거의 이루어지지 않았던 우리 나라 동해안 등근성게과 성게들을 대상으로 그 분자형질(유전자 염기서열)을 파악하여 종의 분류기준을 확보하고 나아가 계통진화적 유연관계와 종분화의 시기를 분석하려는 연구의 첫 단계로서, 새치성게의 미토콘드리아 유전자의 하나인 cytochrome c

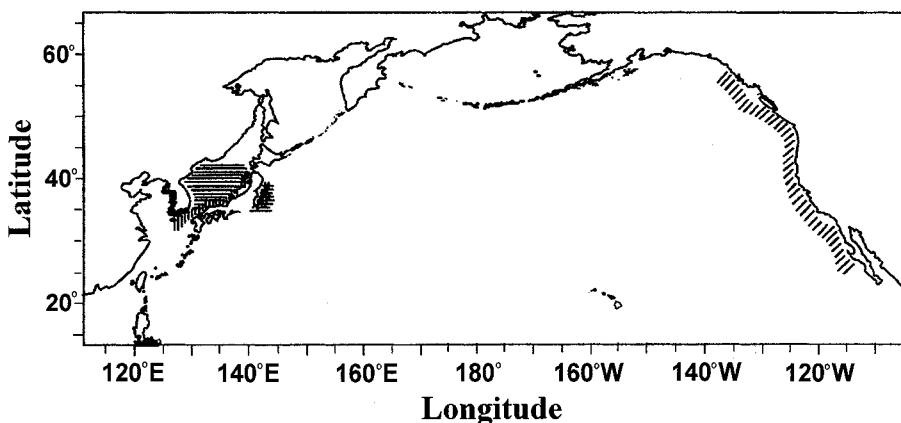


Fig. 1. A map of the north Pacific Ocean showing geographical distribution patterns of three sea urchin species: horizontal lines, *S. intermedius*; vertical lines, *H. pulcherrimus*; hatched lines, *S. purpuratus*.

oxidase subunit I(COI) 유전자 단편 1,077개 염기쌍 순서(염기서열)를 파악하였다. 또한, 이 염기서열을 이미 알려진 다른 성계들의 COI 유전자 및 해삼, 불가사리 COI 유전자와 비교하고 그 분자 계통수를 작성함으로써 새치성계가 언제 분화되어 나타났으며 다른 성계들과 어떠한 계통진화 관계를 보이는가를 밝혔다.

재료 및 방법

새치성계 시료 채집과 DNA 추출

새치성계는 강원도 주문진 앞 바다 수심 약 20 m 지점에서 채집하였다. 성숙한 개체 열 마리의 난소를 떼내어 50 ml 플라스틱 튜브에 담고 드라이아이스로 얼린 후 실험실로 운반하였다. 한개의 난소 시료에서 High pure PCR template preparation kit(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 먼저, 약 400 mg의 난소를 꺼내어 물로 씻은 후 유리 분쇄기에 옮겼다. 여기에 분해용액(lysis buffer; 4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH7.4) 1.6 ml를 넣고 분쇄막대로 난소 덩어리를 분쇄시켰다. 이 용액을 8개의 1.5 ml 튜브에 0.2 ml씩 분주하였다. 각각의 튜브에 20 mg/ml proteinase K 40 μ l를 넣고 55°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액에 결합용액(binding buffer; 6 M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100, pH4.4) 200 μ l를 첨가하고 72°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이 후, isopropanol 100 μ l를 넣고 섞어준 후 약 10초 동안 원심분리하여(8,000 rpm) 용해되지 않은 덩어리를 가라앉혔다. 상등액을 펠터튜브로 옮기고 회수튜브를 밑에 받친 상태에서 8,000 rpm으로 1분 동안 원심분리하였다. 회수튜브에 모아진 여과 용액을 따라버리고 펠터튜브에 세척용액(20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH7.5, 80% ethanol) 500 μ l를 넣고 다시 8,000 rpm으로 1분 동안 원심분리하였다. 이 세척과정을 1회 더 반복한 후 회수튜브의 용액을 따라버리고 최종적으로 10초 동안 13,000 rpm으로 원심분리하여 남아 있는 미량의 세척용액을 제거하였다. 회수튜브를 버리고 새로운 1.5 ml 튜브로 펠터튜브를 받쳤다. 70°C로 가열된 회수용액(10 mM Tris, pH8.5) 200 μ l를 펠터튜브에 넣고 약 1분 동안 기다린 후 8,000 rpm으로 1분 동안 원심분리하여 DNA 용액을 1.5 ml 튜브에 받았다. DNA의 추출여부는 DNA 용액 10 μ l를 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하여 확인하였으며, DNA 농도는 DNA 용액 15 μ l를 물로 20배 희석한 후 자외선 흡광도를 측정하여 산출하였다.

COI 유전자 증폭과 클로닝, 플라스미드 DNA 추출

추출된 전체 DNA에서 새치성계 COI 유전자를 선택적으로 증폭하기 위하여 증합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 실시하였다. 이때 사용된 PCR 프라이머는 *S. purpuratus* 미토콘드리아 DNA 염기서열에 근거하여 COI 유전자 내에 진화적으로 잘 보존된 지역에서 만들었다(LCOI1490N: 5'-TCTACAAAC-CACAARGAYATTGG-3'와 HCOIN: 5'-CCCATTGAAAGAACG-TAGTGAAAGTG-3'; *S. purpuratus* 미토콘드리아 DNA 상 위치 5807-5829와 6935-6960)(Jacobs *et al.*, 1988). 증합효소연쇄반응은 50 μ l의 반응용액(1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 25 pmole primers, 0.5 μ g DNA, 1 unit Taq polymerase)을 만든 후, 온도

조건을 95°C 2 min; 35 cycle의 95°C 1 min, 45°C 1 min, 72°C 1.5 min; 72°C 7 min으로 맞추고 진행시켰다. PCR이후 10 μ l를 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하여 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

PCR로 증폭된 DNA는 TOPO TA cloning kit(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)를 이용하여 pCRII-TOPO 벡터에 연결하고 대장균에 클로닝하였다. 연결반응(ligation)은 5 μ l 용액을 만들어(PCR 산물 2 μ l, 벡터 1 μ l, 물 2 μ l) 상온에서 5분 동안 진행시켰고, 이 후 반응액을 얼음에 놓아두었다. 클로닝 박테리아(TOP10 *E. coli* cells, Invitrogen)는 냉동고에서 꺼내어 얼음에서 녹이고 여기에 0.5 M β -mercaptoethanol 2 μ l를 첨가하였다. 클로닝 박테리아에 연결반응 용액 2 μ l를 첨가하고 30분 동안 얼음에 놓아두었다. 이 박테리아에 42°C 열충격(heat shock)을 30초 동안 가하고 다시 얼음에 옮겨 2분 동안 놓아두었다. 여기에 상온의 SOC 배양액 250 μ l를 넣고 37°C에서 30분 동안 진탕배양하였다(250 rpm). 한편, LB-agar ampicillin 배지는 LB-agar와 ampicillin을 혼합하여 만들고(최종 농도, 100 μ g/ml) 사용하기 30분전에 배양기에서 37°C로 데웠다. 배지를 사용하기 직전 40 mg/ml X-gal 40 μ l를 배지 표면에 도포하였다. 이렇게 준비된 배지에 박테리아 SOC 배양액 50-100 μ l를 도포하고 37°C에서 밤샘 배양하였다(약 16시간). 외부에서 넣어 준, PCR로 증폭된 DNA가 포함된 박테리아는 배양 후 흰색이나 옅은 청색을 띤 콜로니로 자라났다.

흰색이나 옅은 청색의 콜로니 중에서 원하는 크기의 DNA를 포함하는 콜로니를 PCR로써 구분하였다. PCR 프라이머로서 M13-forward(-21)(5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')와 M13reverse(5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3')를 사용하였다. PCR이 끝난 후 반응용액 10 μ l를 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하여 증폭된 DNA의 크기를 확인하였다. PCR 결과에 근거하여 원하는 크기의 DNA를 포함하는 콜로니를 LB-ampicillin(100 μ g/ml) 배양액 4 ml이 담긴 배양 튜브로 옮기고 37°C에서 밤샘 배양한 후, 박테리아로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 플라스미드 DNA 추출에 QIAprep spin miniprep kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였다.

시퀀싱 및 유전자 데이터베이스 검색

위에서 얻은 플라스미드 DNA로부터 시퀀싱을 통하여 클로닝한 DNA의 염기서열을 결정하였다. 먼저, 시퀀싱 반응용액 10 μ l를 만들고(100 ng의 플라스미드 DNA, 1.6 pmole M13forward 혹은 M13-reverse primer, 4 μ l BigDye ready reaction mix)(PE Biosystems, Foster City, USA) 이를 25cycle의 PCR(96°C, 10초; 50°C, 5초; 60°C, 4분)로 cycle sequencing reaction 과정을 수행하였다. PCR이 끝나면 이 반응용액을 1.5 ml 튜브에 옮기고 여기에 40 μ l 물, 5 μ l 3 M NaOAc pH 4.6, 125 μ l 100% ethanol을 넣고 얼음 위에 10분간 놓아둔 후 약 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. DNA 침전물을 70% ethanol로 세척한 후, 진공원심분리기로 10분 동안 건조시켰다. 이렇게 준비된 DNA를 ABI prism 377 DNA sequencer(PE Biosystems)에 전기영동시켜 그 염기서열(시퀀스)을 결정하였다. 이후, MacVector 프로그램(Oxford Molecular, Oxford, UK)으로 염기서열을 정리하고, 유전자 데이터베이스(GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 검색하여 이미 보고된 유전자들 중 본 연구에서 얻은 유전자와

비슷한 염기서열을 가진 상동유전자(다른 생물의 COI 유전자)를 찾아내었다.

유전자 분석, 진화과정 분석

새치성계 COI 유전자의 핵산 구성 비율, 유전자 코드 사용빈도, transition/transversion ratio 등은 MEGA 프로그램(version 1.0.1; Kumar *et al.*, 1993)을 이용하여 파악하였다. 이 유전자와 상동유전자들의 염기서열 정렬(sequence alignment)을 위하여 ClustalW 프로그램(Thompson *et al.*, 1994)을 사용하였다. 유전자 염기서열을 바탕으로 한 종간의 계통수는 근린결합분석(Neighbor-Joining analysis; MEGA, Kumar *et al.*, 1993)과 최대절약분석(Maximum parsimony analysis; PAUP version 3.1.1, Swofford, 1993)의 방법으로 작성하였다. 근린결합분석에서는 계통수 작성에 포화효과(saturation effect)를 최소화하기 위하여 transversion 변이만을 이용하였고(Martin *et al.*, 1992), Kimura 2-parameter model(Kimura, 1980)을 선택하여 염기서열의 분기율을 계산하였다. 계통수에서 각 분지의 신뢰도를 평가하기 위하여 500회의 bootstrap 분석을 실시하였다. 최대절약분석에서는 transition과 transversion 변이에 1:5의 가중치를 두었으며, branch-and-bound 방법을 사용하였다. Branch swapping은 TBR algorithm을 사용했으며 10회의 random sequencing addition으로 계통수를 구하였다. 최적계통수는 1000회의 bootstrap 분석을 통하여 50% majority rule consensus 계통수로 나타내었다.

새치성계의 진화시기는 먼저 등근성계과 성계와 *P. lividus*의 분리가 이루어진 5,000만년 전을 기준 시점으로 삼고 근린결합분석으로 작성된 계통수에서 등근성계과 단계통군의 평균 분지길이(변이정도, nucleotide substitutions/site)를 5,000만년으로 나눔으로써 평균변이속도(nucleotide substitutions/site/million year)를 구하고, 등근성계과 공통조상에서 새치성계가 분리된 마디까지의 분지길이를 평균변이속도로 나눔으로써 산출하였다. 이 산출과정을 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\mu(x) = \frac{1}{t(x)N} \sum Si(x) \tag{1}$$

$$t(y) = t(x) - \frac{S(x) - S(y)}{\mu(x)} \tag{2}$$

- x : 등근성계과 단계통군과 *P. lividus*의 분기점
- y : 새치성계의 분기점
- $\mu(x)$: 등근성계과 단계통군의 평균변이속도
(nucleotide substitutions/site/million year)
- t(x) : 현재부터 x 까지의 시간(50 million years)
- t(y) : 현재부터 y 까지의 시간(million years)
- N : 등근성계과의 종 수
- Si(x) : 등근성계과 i 종의 x 까지의 분지 길이(변이 정도)
(nucleotide substitutions/site)
- S(x), S(y) : 새치성계의 x, y 까지의 분지 길이

결 과

새치성계 COI 유전자 증폭, 클로닝, 시퀀싱

일반적으로 난소와 난자는 미토콘드리아를 다량 함유하고 있어

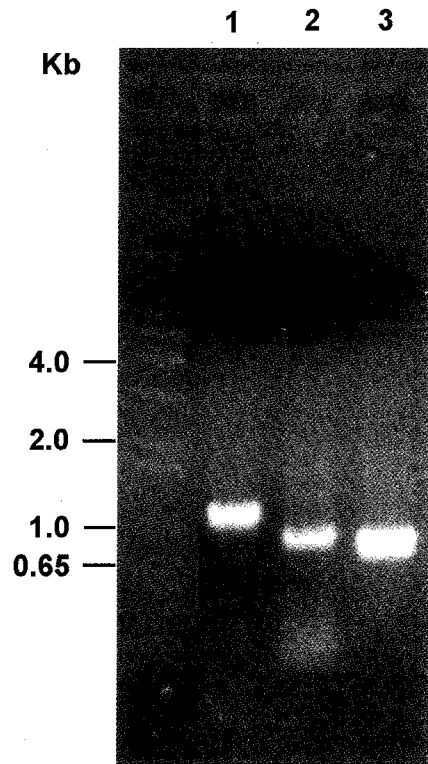


Fig. 2. PCR-amplified DNA bands of *S. intermedius* mitochondrial genes: lane 1, COI; lane 2, 12S rDNA/control region; lane 3, NADH dehydrogenase(NDI).

미토콘드리아 DNA를 추출하기에 좋은 시료이다. 본 연구에서는 새치성계의 난소에서 DNA를 추출하고, 이로부터 미토콘드리아 COI 유전자에 상보적인 프라이머(LCOI1490과 HCOIN, 재료 및 방법 참조)를 가지고 PCR을 실시하여 DNA 단편 1.1 kb를 증폭하였다. 이 PCR 산물은 0.8% 아가로스 젤에서 단일 밴드 DNA로 나타났다(Fig. 2).

PCR로 증폭된 DNA 단편은 pCR II-TOPO 벡터(Invitrogen)에 삽입되고 대장균 박테리아에 클로닝되었다. 클로닝된 DNA를 갖고 있는 박테리아는 LB-agar ampicillin 배지에서 흰색이나 옅은 청색을 띤 콜로니로 자라났다. 이 중 삽입(insert) DNA 크기가 1.1 kb 정도인 것은 약 75%이었다. 배양후 1.1 kb DNA를 가진 콜로니에서 플라스미드 DNA가 추출되었고, M13forward 프라이머와 M13reverse 프라이머에 의한 양측 시퀀싱으로 1.1 kb DNA의 염기서열이 결정되었다. 이 염기서열은 서로 다른 두 개의 콜로니에서 동일하게 나타났다. 이렇게 얻어진 염기서열은 유전자 데이터 베이스(GenBank)에 이미 들어있는 성계, 해삼, 불가사리와 같은 극피동물문 생물들의 COI 유전자와 매우 유사한 것으로 나타나(일치도>75.0%, Table 1), COI 유전자의 단편임이 증명되었다.

새치성계 COI 유전자의 구조

성계류의 미토콘드리아 COI 유전자 전체는 약 1554개 염기쌍(518개의 아미노산)으로 이루어진다. 본 연구에서는 새치성계 COI 유전자의 5' 말단 부위 1,077개 염기쌍 순서와 이에 따른 359개 아미노산 순서가 밝혀졌다(Fig. 3). COI 유전자 염기서열을 아미

Table 1. Percent identity of nucleotide (above diagonal) and amino acid sequences (below diagonal) of a mitochondrial gene, cytochrome oxidase subunit I among the echinoderm species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. intermedius</i> (1)		89.3	82.2	77.6	78.4	77.4	77.3	76.5	76.5	76.5
<i>S. purpuratus</i> (2)	95.8		80.5	76.6	77.4	76.1	75.6	76.0	75.7	75.9
<i>P. lividus</i> (3)	100.0	95.8		80.0	83.0	79.7	81.6	79.9	80.8	80.9
<i>A. lixula</i> (4)	96.9	93.6	96.9		77.1	79.2	77.3	76.8	77.8	77.6
<i>C. miniata</i> (5)	94.9	92.8	94.9	93.5		86.8	93.5	78.7	80.1	80.8
<i>C. lubrica</i> (6)	94.6	92.4	94.6	93.1	98.9		86.4	79.6	80.4	82.1
<i>C. pallida</i> (7)	94.2	92.0	94.2	92.8	99.3	98.2		78.6	80.3	80.9
<i>P. pseudoexigua</i> (8)	93.9	90.3	93.9	93.0	93.5	93.1	92.8		81.3	81.6
<i>A. pectinifera</i> (9)	93.9	90.0	93.9	93.3	93.5	93.1	92.8	98.3		90.2
<i>A. miniata</i> (10)	93.9	90.0	93.9	93.3	93.5	93.1	92.8	98.3	100.0	

```

1  ACACITTTATTTGATTTTTTGGAGCTTGAGCTGGAATGGTAGGCACAGCTATGAGTGTGATT
   T L Y L I F G A W A G M V G T A M S V I
61  ATCCGCGCCGAGTTGGCACACCTGGTCTCTACTAAAAGACGATCAAATATACAAAGTG
   I R A E L A Q P G S L L N D D Q I Y N V
121  GTCGTACCACACATGCCCTGATCATGATTTTTTTTATGGTAATGCCAATTAATGATTGGT
   V V T A H A L V M I F F M V M P I M I G
181  GGATTTGGAATTTGACTCATTCCACTGATGATCGGTGCACCAGACATGGCCTTCTCTCGG
   G F G N W L I P L M I G A P D M A F P R
241  ATGAAAATATGAGTTTTTGGCTCATCCCCCTTCTCTTATATTAATTTTAGCATCTGCA
   M N N M S F W L I P P S F I L L L A S A
301  GGGTAGAGAGAGGAGCAGGAAGCTGGCTGAAGTATCTATCCCCCTCTCTCTAGTAAAATA
   G V E S G A G T G W T I Y P P L S S N I
361  GCACACCGCGGTGGATCTGTTGACTTAGCGATCTTTCCCTCCACCTTGCCTGCTCCT
   A H A G G S V D L A I F S L H L A G A S
421  TCTATCTTGGCCCTCAATTAATTTATAACAACAATTAATTAACATCGCGACACCAGGAATG
   S I L A S I N F I T T I I N M R T P G M
481  TCTTTTGCAGCTTCTCTTTATTTGTTCTGATCCGCTTTTGTACCCTGCTTCTGCTCCTC
   S F D R L P L F V W S V F V T A F L L L
541  CTTTCTCTCCAGCTTAGCAGGAGCAATACAATGCTCCTCACAGATCGTAAAATAAAC
   L S L P V L A G A I T M L L T D R N I N
601  ACAACTTTCTCGATCCAGCAGGAGGGATCCAAATCTGTTCCAACACTTATTTCTGA
   T T F F D P A G G G D P I L F Q H L F W
661  TTTTGGCCACCAGAAGTACATCTTATCTTCCCTGGATTGGTATGATTTTCCACAC
   F F F G H P E V Y I L I L P G F G M I S H
721  GTTATAGCTCATTACTCTGGTAAGCGGAGCCTTTTGGATACCTAGGGATGTTTATGCC
   V I A H Y S G K R E P F G Y L G M V Y A
781  ATGATTGCAATAGGAGTTTTGGGATTCCTTGTCTGAGCCCATCATATGTTACGGTAGGA
   M I A I G V L G F L V W A H H M F T V G
841  ATGGATGTTGATACAGCACTACTCTACTGCGCCGACAGATGATCTGCTGTTCCAAAC
   M D V D T R A R Y F T A A T M I I A V P T
901  GGGATCAAGGTTTTAGATGAATGGCAACACTCCAGGGGCTAATCTACAATGAGAGACT
   G I K V F S W M A T L Q G S N L Q W E T
961  CCCTTATTATGAGCCCTGGGATTCGATTTTTTGTTCACGTTGGGGGACTTACAGGTATT
   P L L W A L G F V F L F T L G G L T G I
1021  GTTCTCGCCAATCTCTATTGACGTTGTTCTTCATGATACCTACTACGTAGTGGCT
   V L A N S S I D V L H D T Y Y V V A
    
```

Fig. 3. A partial DNA sequence of *S. intermedius* mitochondrial gene, COI. Translated amino acids are listed below the DNA sequence.

노산 순서로 번역할 때, 새치성계는 성계류 특유의 미토콘드리아 유전암호(genetic code)를 사용하고 있음을 보여 주었다. 즉, 유전 암호 TGA는 Tryptophan, AAA는 Asparagine, AGA는 Serine 아미노산에 해당되었다. 본 연구에서 얻은 새치성계 COI 유전자 단편의 핵산 구성 비율은 Thymine, Adenine, Guanine, Cytosine이 각각 32.6%, 23.6%, 22.6%, 21.3%로서 Thymine의 이용빈도가 가장 높았다. 또한, 각 코돈의 세 번째 위치에서는 네 가지 핵산

이 각각 32.6%, 28.7%, 16.2%, 22.6%로서 G+C 함량이 38.8%에 불과하였다.

새치성계의 COI 유전자 염기서열은 성계뿐만 아니라 해삼류(*C. miniata*, *C. lubrica*, *C. pallida*)와 불가사리류(*P. pseudoexigua*, *A. pectinifera*, *A. miniata*) 등 극피동물문 생물들의 COI 유전자와 높은 유사도를 보였다(Fig. 4와 Table 1). Fig. 4는 새치성계 COI의 염기서열을 위 극피동물의 COI 유전자와 비교/정렬한 것으로, 염기가 같은 것은 점으로 표시하고 서로 다른 염기는 명기하였다. 염기서열상 삽입(insertion)이나 결실(deletion)은 없었으며 해삼류의 경우 829번째 이후의 염기가 아직 알려져 있지 않았다. 이 유전자들은 서로 다른 종간에 75% 이상 동일한 염기서열을 갖는 것으로 나타났다(Table 1, 대각선 위쪽). 새치성계(*S. intermedius*)의 COI 유전자는 *S. purpuratus* 유전자와 가장 높은 일치도(89.3%)를 보였으며 다음이 *P. lividus*이었다(82.2%). 아미노산 순서에서는 90% 이상 서로 일치하였다(Table 1, 대각선 아래쪽). 특기할 것은, 새치성계의 COI 아미노산 순서가 *S. purpuratus* 보다 *P. lividus*의 COI 아미노산 순서와 더 높은 일치도를 보인 점이다(95.8%와 100%). *A. pectinifera*와 *A. miniata*의 비교에서도 염기서열의 일치도는 90.2%이었으나 아미노산 순서는 서로 일치하였다(100%).

새치성계 계통수와 진화 시기

새치성계 COI 유전자의 염기서열을 다른 성계 및 해삼, 불가사리 유전자와 비교하여 Fig. 4와 같이 정렬했을 때, 총 1,077 염기쌍 중에서 변이를 보인 염기 수(variable site)는 425개였고 계통 정보를 가진 염기 수(informative site)는 모두 340개이었다. 이 염기서열 간 transition/transversion 비율은 유사도가 높은 종 사이에서 4.9(새치성계와 *S. purpuratus*)와 4.7(*A. pectinifera*와 *A. miniata*)이었으나 유사도가 낮은 종 사이에서는 1.0 이하의 값을 보였다(Table 2, above diagonal). 염기의 transversion 변이만을 고려하여 Kimura 2-parameter 모델로 염기서열의 분기율(genetic distance)을 산출했을 때(Table 2, below diagonal) 새치성계는 *S. purpuratus*와 가장 분기율이 낮았다(0.0199 nucleotide substitutions/site). 새치성계의 분기율은 *P. lividus*와 *A. lixula* 성계로 가면서 점차 증가하였다.

COI 유전자의 염기서열로부터 작성된 계통수에서 새치성계는 같은 속(genus)의 *S. purpuratus*와 단계통군을 이루어 비교대상 중 가장 유연관계가 가까움을 보였다(Fig. 5). 염기서열간의 분기

	60
<i>S. intermedius</i>	ACACTTTATTTGATTTTGGAGCTTGAGCTGGAATGGTAGGCACAGCTATGAGTGTGATT
<i>S. purpuratus</i>A.....G..C.....C.....
<i>P. lividus</i>A.....T..C.....A..C.....A..T..A.....A..A.....
<i>A. lixula</i>	..T.....C..T..C.....A..C.....A.....C.....A..T...
<i>C. miniata</i>C..CC.AC.A..C..T..C.....A.....A.C..G.....A.....A..A...
<i>C. lubrica</i>	..C..C..CC.TC.A.....C.....A.....C..G.....A.....A..A..A
<i>C. pallida</i>C..CC.AT.A.....T..C.....A.....A.C..G.....A.....A..T...
<i>P. pseudoexigua</i>A..C..T..A.....C..G.....ACC.....T..A.....G..A...
<i>A. pectinifera</i>	..C.....C..T..C.....G.....C.....CC..A.....A.....C..A..A
<i>A. miniata</i>	..C.....C..T..C.....C.....G.....CC..A.....A.....A..A
	120
<i>S. intermedius</i>	ATCCGCGCCGAGTTGGCACAACCTGGTTCTCTACTAAAAGACGATCAAATATACAAAGTG
<i>S. purpuratus</i>T.....G..G.....T..C..G.....
<i>P. lividus</i>A.....AC.A.....A..G..T..T.G.....C.....T.....
<i>A. lixula</i>	..T..A..T..AC.T..T.....C.....G..TC.....T..C.....T.....T..A
<i>C. miniata</i>AA....AC.C.....A..C.....T.....C..G.....ACT
<i>C. lubrica</i>	..A..AA....A..A.....T..T.....ACC
<i>C. pallida</i>AA.A..AC.T.....A..C.....T.....C.....ACC
<i>P. pseudoexigua</i>	..A..AA.A..AC.A..C..G..A..A..A..C..C.....T.....A
<i>A. pectinifera</i>	..A..AA.A..AC.A..G.....A..CT...GC.....C.....A
<i>A. miniata</i>	..A..GA.A..AC.A.....A..CT...C.....C.....A
	180
<i>S. intermedius</i>	GTCGTTACCGCACATGCCCTAGTCATGATTTTTTTTATGGTAATGCCAATAATGATTGGT
<i>S. purpuratus</i>G.....C..C.....
<i>P. lividus</i>	..A.....T.....C..A.....A.....T.....A..A
<i>A. lixula</i>	..A.....T.....T.....C..A.....C.....T.....C..G
<i>C. miniata</i>	A.A..G..A..C..C..T.....C..C.....G.....A..A
<i>C. lubrica</i>	A.A.....A..C..C..A.....A..C..C.....A..A
<i>C. pallida</i>	A.A.....A..C..C..T..A.....C..C..C.....A..A
<i>P. pseudoexigua</i>	A.T.....A.....C..AT.....A.....C.....T.....A
<i>A. pectinifera</i>	A.A.....T.....C.....C.....G.....C.....A
<i>A. miniata</i>	A.A.....T.....C.....A..C..C.....T.....A
	240
<i>S. intermedius</i>	GGATTGGAAATTGACTCATTCCACTGATGATCGGTGCACCAGACATGGCCTTTCCTCGG
<i>S. purpuratus</i>G.....A.....G.....T.....C..C..C
<i>P. lividus</i>C.....T..C.....A.....T..A.....T.....C..C..A
<i>A. lixula</i>T..C..T..A..C..C..A.....T.....C..C..T.....T..C.....A
<i>C. miniata</i>C.....T..A..C..C..A.....A..A..C..T.....A
<i>C. lubrica</i>C.....T..A..C..C..A.....A..A..C.....C..A..A
<i>C. pallida</i>	..G..C.....C.....T..A..C..C..A.....A..A..C..C..T.....C.....A
<i>P. pseudoexigua</i>A.....T..A.....A..A..C..C..T.....A.....A..A
<i>A. pectinifera</i>C..G..C.....A..A..T..A.....A..T.....C..C..A
<i>A. miniata</i>C.....C.....A..A..GT..A.....A..C..T.....C..A
	300
<i>S. intermedius</i>	ATGAAAAATATGAGTTTTTGGCTCATCCCCCTTCTTTATATTACTTTTAGCATCTGCA
<i>S. purpuratus</i>A..T..T.....T.....G..C...
<i>P. lividus</i>C.....A..C..T..A.....T.....T..G..C..C..A...
<i>A. lixula</i>C.....C.....AT..A..T..T.....T.....CC.....A.....T.....C
<i>C. miniata</i>A..C..A..A.....A.....TC..C..C..G..C..C...
<i>C. lubrica</i>T..C.....A..C..A..A.....A.....C..CC..C..A.....T..A..C
<i>C. pallida</i>A..C..A..A.....C..A.....TC.....C..G..C..C...
<i>P. pseudoexigua</i>T..A.....A..C..A..A..T..T.....A..CT...G..AA.....A..C
<i>A. pectinifera</i>C.....A..C..A..A.....C..CC..C..A.....T.....
<i>A. miniata</i>C.....A..C..A..A..T.....A.....C..C..TT..A.....T..C...
	360
<i>S. intermedius</i>	GGGGTAGAGAGAGGAGCAGGAAGCTGGCTGAACTATCTATCCCCCTCTCTAGTAAAATA
<i>S. purpuratus</i>	..A.....A..A.....C..T.....
<i>P. lividus</i>	..A.....A.....C..G..A..A.....C..A..C.....C..A.....T
<i>A. lixula</i>A.....A..G.....C..T.....T..C..A..A.....
<i>C. miniata</i>	..A.....A..A.....G..C..A.....A.....C.....A..A..A.....T
<i>C. lubrica</i>	..C.....A..A.....A..A.....A..T.....T..C..A..A.....
<i>C. pallida</i>	..A.....A..A.....G..A..A.....A.....C.....A..A.....
<i>P. pseudoexigua</i>	..A.....A.....T..T..G..C..G..G..C..A..C..A.....A..C..AGG..C..
<i>A. pectinifera</i>	..T.....A.....T..T.....A..A.....G.....C..T.....T..G.....GGG..T..
<i>A. miniata</i>	..C..G..A.....C.....A..A.....A.....C.....AT..A.....AGG..T..

Fig. 4. DNA sequences of the mitochondrial gene, COI of 10 echinoderm species. Dots denote the same nucleotide to *S. intermedius*. Except the sequence of *S. intermedius*, the other sequences are retrieved from the sequence database, GenBank.(Accession numbers are X12631, *S. purpuratus*; J04815, *P. lividus*; X80396, *A. lixula*; U32215, *C. miniata*; U32216, *C. lubrica*; U32210, *C. pallida*; U50051, *P. pseudoexigua*; S16397, *A. pectinifera*; U50056, *A. miniata*).

420

S. intermedius GCACACGCCGGTGGATCTGTTGACTTAGCGATCTTTCCCTCCACCTTGCCGGTGCCCTCT
S. purpuratus A.....A.G..C.....T.....A.....C.....T.....G.....
P. lividus ..C.....A..A..C..A..A.....A.....T..C..A.....T.....G.....
A. lixulaT.G.....A..TC..T..T.....T..A..T.G.....C.....
C. miniata ..C.....A..A..G..A.....C.C.....C..T.....A..A..A.....
C. lubrica ..C..T..A..A.....A.....C..A..T.....T..T.....A..A..A.....
C. pallida ..C.....A..A.....A.....C..T.....A.....C..T..A.....A.GG..A..T..A
P. pseudoexiguaT..A..A.....C..A..C.G..C..A..C.....T..A.....A.....
A. pectinifera ..G..T..T..C.....A..A.....G.....A..C..A..T.....G..G..A..T..C
A. miniata ..C.....T..A.....A..A.....A..A.....T.....A..G..A..T..C

480

S. intermedius TCTATCTTGGCCTCAATTAAATTTATAACAACAATTATTACATGCGGACACCAGGAATG
S. purpuratus ..C.....G..CTC.....T.....T.....G..G...
P. lividusC.A.....C.....C.....T.....A..G..G.....
A. lixula ..C.....A.....A..T.....T..T.....A..T.....A..G.....GG.C
C. miniata ..A..C..T..T.....A.....T..T.....A..A.....A.G.....A
C. lubrica ..A..C..C.....C..A.....T..C.....A..A.....A.GC..T..T..A
C. pallida ..A..AC..T..T.....A.....T..T.....A..A.....A.GT.....A
P. pseudoexigua ..A.....A..T..C..A.....C.....A..A.....A..C.....G.A
A. pectinifera ..A..TC..T..T.....A.....TG.....A..T.....A..C..T.....T
A. miniata ..A..AC..T.....A.....TG.....A..A.....A.....T

540

S. intermedius TCTTTTGACCGTCTTCCTTTATTTGTCTGATCCGTCCTTTGTTACCGGTTCTTGCTCCTC
S. purpuratusG..T.....C.....C..T..C.....
P. lividusA..A.....G.....T..G.....T.....A..A..C..A..T..T
A. lixulaT..A..CC..T.....G.....A..CA..A..A..T..TC..TT..GT..A
C. miniata A.....C.....A..A.....A.....A..T..CA..A..A..C..TC..T..T...
C. lubrica A..C.....T..C..A..C.....C..A.....A..T..CA..A..A..AT..TC..C..T...
C. pallida A.....A..A..AC.....T.....A..T..CA..A..A..C..TC..T..T..T
P. pseudoexigua ..A.....T..A.....CC..C.....A.....A..A..C.....A..C..C..A..T...
A. pectinifera ..A.....A.....CC.....A..A.....A..A..T..C..C..A..T...
A. miniata ..A.....A.....G.....A..G..A..A..C..A..A..T..C.....T

600

S. intermedius CTTTCTCTCCAGTCTTAGCAGGAGCAATTACAATGCTCCTCACAGATCGTAAAATAAAC
S. purpuratusA.....T.....T.....G.....
P. lividusA.....AC.....G.....T.....T..A.....C.....T...
A. lixula T..A.....A.....TC.....G..T..A..T..T..AT..A.....C..A..T..T..A
C. miniata ..AG..C.....AC.....C..A.....A.....C..A..C..C..A
C. lubrica ..AGA..C..T..TC.....A.....T..T.....C..A..C..T..A
C. pallida ..AGC..C.....C.....C..A.....A.....C..A..C..C..A
P. pseudoexigua T..A..A..A..G.....T..C.....C..C.....T..A.....C..A..G.....
A. pectinifera ..A..C..A.....AC..T.....T.....G.....T..T.....C..A..G..C..T
A. miniata ..A..CT..A.....AC..T.....T.....A.....T..T.....C..A..G..T..T

660

S. intermedius ACAACTTTCTTCGATCCAGCAGGAGGGGATCCAATTCTGTCCAACACTTATTCTGA
S. purpuratusT..C..T.....G..A.....A..T.....C.....G
P. lividusA..T.....C.....A..C.....T.....T.....
A. lixula ..C..C..T..T..C.....T.....A..C..T..TAT.....TC..T...
C. miniata ..T..A.....C..C.....A..C..T..A..C..T.....
C. lubrica ..T..A..T.....C..T.....T.....T..C..A.....C.....
C. pallida ..T..A.....C..C.....A..C.....A..C.....
P. pseudoexiguaC..T..T..C..C..C.....T.....C.....T..G..C..T...
A. pectinifera ..C..C..T..T..C..C.....G..A..C..C.....A..T.....
A. miniata ..C..C..T.....C..C.....A..C..T..CT..A..T.....

720

S. intermedius TTTTTTGGCCACCCAGAAGTGTACATTCTTATCTTGCCCTGGATTTGGTATGATTCACAC
S. purpuratus C.....A.....C..G.....T.....A..G.....C.....
P. lividusT.....C.....A..T.....A..AC..A..C.....A.....
A. lixula ..C.....A.....T.....A..T..T..A..C..T.....C.....A.....C...
C. miniata ..C.....T.....T..T..C.....AC..A..C.....C..A.....A..T...
C. lubrica ..C.....T.....C.....A.....C..C.....C..A.....A.....
C. pallidaT.....A..T..C..C..AC..C..C.....C..A.....A.....
P. pseudoexiguaT..G..A..T.....TC..C..A.....A.....A..C...
A. pectinifera ..C..C..T.....C..T.....TC..T..C.....C..A.....C..T
A. miniata ..C.....T.....T.....TC..T.....A.....C..T...

Fig. 4. continued.

780

S. intermedius GTTATAGCTCATTACTCTGGTAAGCGGGAGCCTTTTGGATACCTAGGGATGGTTTATGCC
S. purpuratusC.....A.....C.....G...T.....
P. lividus ..A.....C..C.....A..G.....A..A.....G..A.....C..C...
A. lixula ..A.....TG...G...A..A..A.....T...A...G...T
C. miniata ..A.....C..TAGA..A...AA..A.....G.....A...A..C..A
C. lubrica ..A.....C.....TAGA..G...AA..A.....C.....TT...A...C..A
C. pallida ..A.....C..C..TAGA..A...AA.....G..TT.....A..C..A
P. pseudoexigua ..A.....C.....G.....A..A..A..A..C..C...T..A...C..A
A. pectinifera ..A..T..C..C.....G..A..A..A..A..C.....T..T..C..A...C..C...
A. miniata ..A..C..C..C.....G..A..A..A..A..A.....T.....C..A...C..C...

840

S. intermedius ATGATTGCAATAGGAGTTTGGGATTCCTTGTCTGAGCCCATCATATGTTTACGGTAGGA
S. purpuratusA.....A.....G.....C.....A.....G
P. lividusA..G..C.....CC..T.....A..T.....T..C.....A..T...
A. lixulaT.....AC..A.....A..T.....C..C.....T..C...
C. miniata ...G..G.....C..TA..CC..A.....A..A.....A..C.....
C. lubrica ...G..AA..C..T...A..C..A.....T..A.....C..C...
C. pallida ...G..A.....TA..AC..A.....T..A..A.....A..C.....
P. pseudoexigua ..AG..AT..C.....A..AC..T.....A..A.....C..C.....
A. pectinifera ..AG..T..T..T...A..CC..A.....TT..A..T.....C.....A..T...
A. miniata ..AG..T..T..T...A..C..A..G..TT..A..T.....C..C.....A..C..G

900

S. intermedius ATGGATGTTGATACACGAGCGTACTTCACTGCCGCCACGATGATCATGCTGTTCCAACA
S. purpuratusA.....A.....A.....T.....C.....
P. lividusC..A..C.....T..A..T.....A.....A..A..A..A..C...
A. lixulaC..A.....C.....C..T..T..A..A..G..T.....T..A.....C..T..C
C. miniata
C. lubrica
C. pallida
P. pseudoexiguaC..A.....A.....T.....A.....A.....T..A.....A..T...
A. pectiniferaC.....C.....A.....T..A..G..A..C.....T..A..A..A..A..T
A. miniataC.....C..C.....A.....T..A..A..A..C.....T..A..A..A..A..T

960

S. intermedius GGGATCAAGGTTTTTTCAGATGAATGGCAACACTCCAGGGGTCTAATCTACAATGAGAGACT
S. purpuratus ..AT..A.....AG.....A.....AGACTC
P. lividus ..A..T...A..T.....C..T..A..A...C.....A...
A. lixulaT.....A..T..C.....C.....A.....T.....G..GAGAC.C
C. miniata
C. lubrica
C. pallida
P. pseudoexigua ..C..T...A..T.....TT..A..A..AAGA..CT...G.....T..C
A. pectinifera ..T..A.....A..T..C.....G..G..A.....AGA..C..T..G..G..C..A
A. miniata ..T..A.....A..T..C.....A..A..AAGG...C..G.....C..A

1020

S. intermedius CCCTTATTATGAGCCCTGGGATTCGTATTTTGTTCACGTTGGGGGACTTACAGGTATT
S. purpuratus ..T.....A..T...GA..T.....A...A..A..A...C.....
P. lividus ..TC..C.....G..C.....T..C..C..A.....CC..A..C.....T..A...
A. lixula ..TC..T.....A..T...T..T..C..C..T..AC..A.....T..A.....
C. miniata
C. lubrica
C. pallida
P. pseudoexigua ..A...C.....AT..A.....T.....A..T..TA..T..A.....A..C..AG.C
A. pectinifera ..T.....G..A..T...T.....C..A..T..CA..T..A..G..A..C..AG..
A. miniata ..TC..C.....A..T.....C..A..T..CA..T..T.....A..C..AG..

1077

S. intermedius GTTCTCGCCAATTCCCTCTATTGACGTTGTTCTTCATGATACCTACTACGTAGTGGCT
S. purpuratusT.....C.....T.....G..A...
P. lividusA..A...T...A...A..A.....C..A.....T..T..C
A. lixula C..AT..A..T..C.....A.....G..A..A..C.....T.....T..C
C. miniata
C. lubrica
C. pallida
P. pseudoexigua A..CT..G..A..A..T..A..A..A..A..T..A..C..C.....T.....G..A..A
A. pectinifera A...T..A..A..A..C..C.....CA..C..C..C.....T..C
A. miniata A..C..T..A..A..A..C.....A.....C..C..C..T.....T.....C..C

Fig. 4. continued.

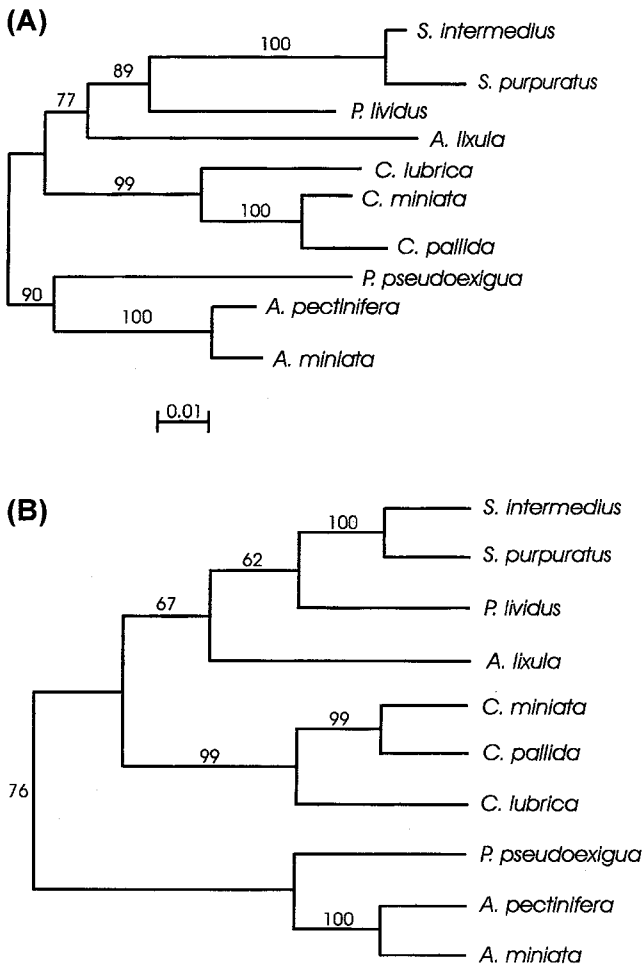


Fig. 5. Phylogenetic relationships among the 10 echinoderm species inferred from DNA sequences of the mitochondrial gene, COI. (A) Neighbor-joining distance tree (scale bar, genetic distance of 0.01 transversal nucleotide substitutions per site calculated using Kimura's two-parameter model; numbers beside branches are bootstrap values, 500 replications); (B) a phylogenetic tree constructed by maximum parsimony analysis using PAUP program (50% majority rule consensus tree, numbers beside branches bootstrap values, 1,000 replications).

울에 근거한 근린결합분석(Neighbor-Joining analysis)과 염기서열 상의 염기쌍 각각을 독립된 형질로 보고 계통관계를 구축하는 최대절약분석(PAUP) 모두 새치성계와 *S. purpuratus*가 진화적으로 밀접한 관계임을 보였으며(Fig. 5-A, 5-B), 다음으로 *P. lividus*와 *A. lixula*가 가까운 것으로 나타났다. 새치성계와 *S. purpuratus*가 이루는 단계통군 마디는 bootstrap 분석에서 100%로 나타나 통계적으로도 매우 유의함을 보였다. 한편, 해삼류와 불가사리류는 각각 단계통군을 형성했으며, 성계들은 불가사리보다 해삼에 진화적으로 더 가깝다는 것을 보여주었다.

새치성계가 속하는 등근성계과(Strongylocentrotidae)와 *P. lividus*가 속하는 Echinidae의 분리는 화석 자료의 연구 결과 약 5,000만년 전에 이루어졌음이 알려져 있다(Smith, 1988). 본 연구에서 이 시점을 기준으로 등근성계과 계통군의 염기서열 변이속도를 계산한 결과, 식(1)에 의하여 평균변이속도 $\mu(x)$ 가 0.113%/

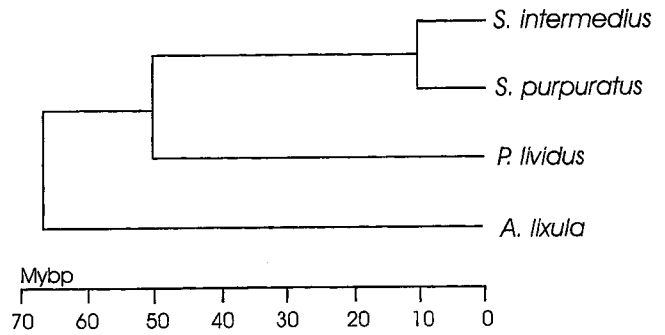


Fig. 6. Divergence time of the four sea urchin species. The time was calculated based on the genetic distances among the species taking 50 million years before present(Mybp) as a reference time point at which separation between Echinidae and Strongylocentrotidae occurred.

백만년(transversal nucleotide substitutions/site/million year)이었고, 새치성계와 *S. purpuratus*의 분리 시기는 식(2)에 의하여 약 890만년 전으로 나타났다(Fig. 6).

토 의

새치성계의 분자형질

우리나라 성계의 유전자에 대한 연구는 지금까지 전무한 실정이었으며, 본 연구에서 밝혀진 새치성계의 미토콘드리아 COI 유전자가 그 처음이다. 우리나라에서 성계가 주요 수산생물종일 뿐만 아니라 발생학 및 환경독성학의 실험모델로 널리 이용되고 있음에도 불구하고(유, 1998) 이에 대한 분자형질은 지금까지 확립되지 않았다. 본 연구에서 밝혀진 COI 유전자의 염기서열(Fig. 3)은 이제 새치성계라는 종을 구분할 수 있는 분자형질로 쓰일 수 있다. 등근성계과 성계들의 분류가 최근까지 형태적 형질에만 의존하여 종의 구분이 불명확했던 점을 감안하면(Jensen, 1974; Bazhin 1998), 새치성계의 COI 유전자 염기서열의 확립은 그 의미가 크다. 예를 들어, COI 염기서열을 이용하면 *S. pulchellus*가 새치성계(*S. intermedius*)와 동일한 종이라는 Bazhin(1998)의 주장을 검증할 수 있을 것이다. 한편, 분자형질에 근거한 등근성계과 성계들의 종 분류의 확립은 역으로 종간의 차이가 분명한 새로운 형태적 형질을 찾는 연구의 기반이 될 것이다.

유전자 염기서열을 생체지표로써 이용할 수 있는 분야는 다양하다. 종의 분류뿐만 아니라(Kojima *et al.*, 1997), 계통진화에 대한 연구(Lee and Vacquier, 1995; Patarnello *et al.*, 1996), 플랑크톤 유생의 동정(Medeiros-Bergen *et al.*, 1995), 그리고 계군 분석을 통한 수산자원의 분석과 관리, 어패류의 박테리아나 바이러스에 대한 감염 진단, 기후 변동에 따른 해양생물의 변동 추적 등등에 분자형질이 이용될 수 있다. 본 연구에서 DNA의 추출, COI 유전자의 선별 증폭, 클로닝과 시퀀싱이라는 몇 단계의 실험으로 COI 유전자의 염기서열이 밝혀졌다. 이제, 분자생물학적 방법론이 보편화되어 있어 우리 나라의 해양생물유전학 연구도 활발해 질 것으로 예상된다.

COI 유전자 변이의 특징

새치성계 COI 유전자의 염기서열과 다른 성계 및 해삼, 불가사

Table 2. Ratio of transitional and transversional substitutions (above diagonal) and Kimura 2-parameter distances (transversions only; below diagonal) of a mitochondrial gene, cytochrome oxidase subunit I among the echinoderm species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. intermedius</i> (1)		4.9237	1.3930	1.1249	0.9661	0.9079	0.9666	1.0927	1.2829	1.0744
<i>S. purpuratus</i> (2)	0.0199		1.2683	1.0629	0.9079	0.9357	0.9416	1.0594	1.1484	1.0510
<i>P. lividus</i> (3)	0.0859	0.1004		1.0648	0.8824	0.9382	0.7649	0.8750	0.8725	0.8247
<i>A. lixula</i> (4)	0.1261	0.1369	0.1131		1.1728	0.7627	1.1168	0.8513	1.1237	1.0637
<i>C. miniata</i> (5)	0.1303	0.1414	0.1029	0.1272		1.4197	1.6325	0.6370	1.0266	0.9646
<i>C. lubrica</i> (6)	0.1414	0.1495	0.1226	0.1382	0.0603		1.2576	0.7258	1.2552	1.0535
<i>C. pallida</i> (7)	0.1382	0.1528	0.1195	0.1288	0.0260	0.0671		0.6304	0.8687	0.8238
<i>P. pseudoexigua</i> (8)	0.1357	0.1418	0.1249	0.1505	0.1528	0.1382	0.1544		1.1764	1.1888
<i>A. pectinifera</i> (9)	0.1249	0.1381	0.1189	0.1249	0.1149	0.1014	0.1226	0.0993		4.6879
<i>A. miniata</i> (10)	0.1297	0.1431	0.1213	0.1297	0.1134	0.0999	0.1210	0.0970	0.0189	

리 등 극피동물문의 여러 생물의 비교는 COI 유전자의 진화가 높은 선택압(selection pressure)을 받고 있음을 나타낸다. COI 유전자의 염기서열에서 삽입과 탈락 구조가 전혀 발견되지 않았으며(Fig. 4), 유연관계가 가까운 종들에서 염기의 변화가 주로 silent substitution에 머물고 아미노산의 변화로 이어지지 않았다(Table 1). 새치성계와 *P. lividus*의 비교, 그리고 *A. pectinifera*와 *A. miniata*의 비교에서 염기서열의 분기율은 각각 0.0859와 0.0189 nucleotide substitutions/site이었음에도 아미노산의 변이는 전혀 없었다(Table 1과 2). 특히, 새치성계와 *P. lividus*의 염기서열의 일치도는 82.2% 임에도 아미노산 순서는 완벽히 일치하여(100%), COI 단백질의 구조를 유지하기 위한 선택압이 매우 강함을 잘 반영해 주었다.

염기서열 간 transition/transversion(TS/TV) 비율은 염기서열 변이의 saturation 효과를 나타내는 지수로 쓰일 수 있다(Olsen, 1998). 본 연구에서 중간 COI 염기서열의 비교 중 새치성계와 *S. purpuratus*, *A. pectinifera*와 *A. miniata* 비교만 5.0에 가까운 값을 보였으며 그 외 경우에는 TS/TV 비율이 급격히 낮아져 1.0 내외에 불과한 값을 보였다(Table 2, above diagonal). 이는 COI 변이가 쉽게 saturation에 도달하며 본 연구에서 비교된 대다수 종들 사이에서 saturation 효과가 나타났음을 시사한다. 따라서, 본 연구에서는 종간의 계통수를 구성하는 자료로서 saturation 효과를 거의 받지 않는다고 알려진 transversion 변이(Higuchi et al., 1984; Vigilante et al., 1991)만을 이용하였다. TS/TV 비율은 또한 계통진화의 유연관계를 나타내는 지수로도 쓰일 수 있다(Larson, 1991). 즉, 유연관계가 가까운 종에서는 TS/TV 비율이 높고, 유연관계가 먼 경우 TS/TV 비율도 낮아진다. Table 2의 TS/TV 값은 Fig. 5의 계통수에서 보여지는 종들간의 유연관계를 잘 반영하고 있다.

새치성계의 진화

미토콘드리아 COI 유전자의 염기서열에 근거하여 작성된 계통수에서 새치성계는 같은 속(genus)의 *S. purpuratus*와 비교대상 중 가장 유연관계가 가까움을 보였다(Fig. 5). 염기서열 전체의 분기율에 근거하는 근린결합분석(Neighbor-Joining 분석, Saitou and Nei, 1987; Kumar et al., 1993)과 염기서열 상의 염기쌍 각각을 독립된 형질로 보고 계통관계를 구축하는 최대절약분석(PAUP 분석, Fitch, 1977; Swofford, 1993) 모두 새치성계와 *S. purpuratus*

를 단계통군으로 묶었고, 다음으로 *P. lividus*와 *A. lixula*가 이 계통군에 연결된 것으로 나타났다(Fig. 5-A, 5-B). 새치성계와 *S. purpuratus*가 이루는 단계통군 마디는 bootstrap 분석에서도 100%로 나타나 통계적으로 매우 유의함을 보였다. 새치성계와 *S. purpuratus*의 이러한 계통관계와 태평양의 동안과 서안으로 서로 분리된 이 두 종의 지리적 분포를 고려할 때(Fig. 1), 두 종의 종분화는 소위 allopatric speciation의 종분화 과정을 거쳤을 것으로 생각된다. 즉, 동아시아와 북아메리카 연안을 따라 분포하던 두 종의 공통조상이 태평양의 동안과 서안으로 개체군이 나뉘어지고 서로 격리된 개체군은 각기 새로운 종으로 발전하는 과정을 겪었을 것으로 생각된다. 이러한 vicariance 종분화 과정은 태평양 연안에 서식하는 연체동물에서도 보고된 바 있으며(Vermeij, 1989; Lee and Vacquier, 1995), 그 원인으로 지구온도 변화에 따른 빙하기와 간빙기의 반복현상이 거론되고 있다.

한편, 성계 정자 단백질인 bindin 유전자 연구에서(Biermann, 1998) *S. purpuratus*는 계통진화적으로 우리 나라 동해안에 서식하는 말뚝성계보다 북태평양과 북극해에 분포하는 등근성계과의 *S. droebachiensis*, *S. pallidus*, *S. polyacanthus*, *Alloccentrotus fragilis* 등에 가깝다고 알려졌다. 말뚝성계와 같이 동해안에 서식하는 새치성계가 말뚝성계와 *S. purpuratus* 중 어느 종에 더 가까운가는 계통분류학상 또 하나의 중요한 질문이었던 바, 아직 발표되지 않은 12S rDNA/control region 유전자 자료에서 새치성계는 말뚝성계보다 *S. purpuratus* 및 그 근린관계의 종들과 더 가까운 것으로 나타났다.

성계의 화석을 연구한 Smith(1988)에 따르면 새치성계가 속하는 등근성계과(Strongylocentrotidae)와 *P. lividus*가 속하는 Echinidae의 분리는 약 5,000만년 전에 이루어졌다. 이 시점을 기준으로 할 때, 새치성계와 *S. purpuratus*로 구성되는 등근성계과 단계통군의 COI 유전자 transversion 변이속도 $\mu(x)$ 는 식(1)에 의하여 0.113%/백만년(transversional nucleotide substitutions/site/million year)으로 산출되었다. 이 수치는 게(crab)의 계통연구에서 밝혀진 transversion 평균변이속도 0.17%-0.155%/백만년(Cunningham et al., 1992)보다 낮은 값으로서 성계의 미토콘드리아 유전자가 게의 미토콘드리아 유전자보다 느린 속도로 변하고 있음을 암시한다. $\mu(x)$ 값을 이용하여 새치성계와 *S. purpuratus*의 분리 시기를 식(2)에 의하여 산정하면, 약 890만년이 얻어진다(Fig. 6). 이 시점은 등근성계과 내에서 *S. purpuratus*와 *S. droebachiensis*

의 분리가 이루어진 약 700만년 전(Hall *et al.*, 1980)과 크게 다르지 않아, 이 시기를 전후하여 등근성계과 내에서 종분화가 빠르게 이루어졌을 것이라 추측을 가능케 한다. 실제로, 이 시기는 지구의 온도가 급격히 변동하던 시기와 일치한다(Miller *et al.*, 1987). 이미 연체동물에서 알려졌듯이(Vermeij, 1989; Lee and Vacquier, 1995) 지구 온도 변화 및 이에 따른 해수면의 변화가 북태평양 연안에 서식하는 등근성계과 성계의 종분화에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과는 결론적으로 우리 나라 동해안에 서식하는 새치성계가 태평양 동쪽 연안에 서식하는 *S. purpuratus*와 진화적으로 가까우며, 두 종간의 종분화가 등근성계과 내에서 종분화가 활발히 이루어지던 약 890만년 전에 allopatric speciation(vicariance)에 의하여 이루어졌음을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 한국해양연구소 1998년도 고유연구사업 지원사업(PE98724, PE98745)에서 연구비를 지원받아 수행되었습니다. 연구수행 중 실험 및 자료처리에 많은 도움을 준 한국해양연구소 극지연구소센터의곽재일 씨, 김아델 박사, 그리고 시료 채집에 도움을 주신 강릉수산종묘배양장 여러분께 깊은 감사의 뜻을 전합니다. 논문을 심사하여 주신 두 분의 심사위원께도 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- 신 숙, 노분조, 1996. 한국동식물도감, 제36권 동물편(극피동물). 교 육부, 서울, 775 pp.
- 유춘단, 1998. 성계 알을 이용한 생물검정에 의한 연안해수 수질평가에 관한 연구. 한국해양학회지, 3: 170-174.
- 윤승희, 문승여, 최병래, 김 원, 1996. 복족류(연체동물)의 18S ribosomal DNA의 염기서열 분화. 한국패류학회지, 17: 85-90.
- Avise, J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York, 511 pp.
- Bazhin, A.G., 1998. The Sea Urchin Genus *Strongylocentrotus* in the Seas of Russia Taxonomy and Ranges. In: Echinoderms: San Francisco, edited by Mooi, R. and M. Telford, Rotterdam, pp. 563-566.
- Biermann, C.H., 1998. The molecular evolution of sperm bindin in six species of sea urchins(*Echinoidea: Strongylocentrotidae*). *Mol. Biol. Evol.*, 15: 1761-1771.
- Cunningham, C.W., N.W. Blackstone and L.W. Buss, 1992. Evolution of king crabs from hermit crab ancestor. *Nature*, 355: 539-542.
- Domanico, M.J. and R.B. Phillips, 1995. Phylogenetics analysis of pacific salmon(Genus *Oncorhynchus*) based on mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phlogene. Evol.*, 4: 366-371.
- Fitch, W.M., 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am. Nat.*, 111: 223-257.
- France, S.C. and T.D. Kocher, 1996. Geographic and bathymetric patterns of mitochondrial 16S rRNA sequence divergence among deep-sea amphipods, *Eurythenes gryllus*. *Mar. Biol.*, 126: 633-643.
- Hall, T.J., J.W. Grula, E.H. Davidson and R.J. Britten, 1980. Evolution of sea urchin non-repetitive DNA. *J. Mol. Evol.*, 16: 95-110.
- Higuchi, R., B. Bowman, M. Freiburger, O.A. Ryder and A.C. Wilson, 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312: 282-284.
- Hwang, G.-L., 1996. Stock Characterization of the Fleishy Prawn (*Penaeus chinensis*) in the Yellow Sea by intraspecific sequence variation of the Cytochrome *c* Oxidase Subunit I gene. *J. Korean Fish. Soc.*, 29: 876-881.
- Jacobs, H.T., D.J. Elliott, V.B. Math and A. Farquharson, 1988. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. *Mol. Biol.*, 202: 185-217.
- Jensen, M., 1974. The *Strongylocentrotidae*(*Echinoidea*), A morphologic and systematic study. *Sarsia*, 57: 113-148.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- Kojima, S., R. Segawa, J. Hashimoto and S. Ohta, 1997. Molecular phylogeny of vestimentiferans collected around Japan, revealed by the nucleotide sequences of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.*, 127: 507-513.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei, 1993. *MEGA: molecular evolutionary genetic analysis*, version 1.01 The Pennsylvania State University, University Park. 130 pp.
- Larson, A., 1991. Evolutionary Analysis of Length-Variable Sequences: Divergent Domains of Ribosomal RNA. Phylogenetic Analysis of DNA Sequences. Oxford University Press, Oxford, pp. 221-248.
- Lee, Y.-H. and V.D. Vacquier, 1995. Evolution and systematics in *Haliotidae*(*Mollusca: Gastropoda*): inferences from DNA sequence of sperm lysin. *Mar. Biol.*, 124: 267-278.
- Martin, A.P., G.P. Naylor and S.R. Palumbi, 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, 357: 153-155.
- Medeiros-Bergen, D.E., R.R. Olson, J.A. Conroy and T.D. Kocher, 1995. Distribution of holothurian larvae determined with species-specific genetic probes. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 1225-1235.
- Miller, K.G., R.G. Fairbanks and G.S. Mountain, 1987. Tertiary oxygen isotope synthesis, sea level history, and continental margin erosion. *Paleoceanography*, 2: 1-19.
- Mortensen, Th., 1943. A monography of the *Echinoidea*. III(3) *Camarodonta* II. C.A. Reitzel, Copenhagen. 446 pp.
- Olsen, J.L., M. Valero, I. Meusnier, S. Boele-Bos and W.T. Stam, 1998. Mediterranean *Caulerpa taxifolia* and *C. mexicana*(chlorophyta) are not conspecific. *J. Phycol.*, 34: 850-856.
- Palumbi, S.R. and F. Cipriano, 1998. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *J. Hered.*, 89: 459-464.
- Patarnello, T., L. Bargelloni, V. Varotto and B. Battaglia, 1996. Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. *Mar. Biol.*, 126: 603-608.
- Roberts, J.W., S.A. Johnson, P. Kier, T.J. Hall, E.H. Davidson and R.J. Britten, 1985. Evolutionary conservation of DNA sequences expressed in sea urchin eggs and early embryos. *J. Mol. Evol.*, 22: 99-107.
- Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new

- method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**: 406–425.
- Smith, A.B., 1988. Phylogenetic relationship, divergence times, and rates of molecular evolution for Camarodont sea urchin. *Mol. Biol. Evol.*, **5**: 345–365.
- Swofford, D.L., 1993. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 3.1. Laboratory of Molecular Systematics, Smithsonian Institution, Washington DC, 257 pp.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson, 1994. *CLUSTAL W*: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, **22**: 4673–4680.
- Vermeij, G.J., 1989. Geographical restriction as a guide to the causes of extinction: the case of the cold northern oceans during the Neogene. *Paleobiology*, **15**: 335–356.
- Vigilante, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes and A.C. Wilson, 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, **253**: 1503–1507.
-
- 1999년 11월 29일 원고접수
2000년 3월 7일 수정본 채택
담당편집위원: 나기환