

은어, *Plecoglossus altivelis* 난소에서 발현하는 Connexin 35 cDNA의 해석

최철영 · 장영진
부경대학교 수산과학대학 양식학과

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of Connexin 35 cDNA in the Ovary from the Sweetfish, *Plecoglossus altivelis*

Cheol Young CHOI and Young Jin CHANG
Department of Aquaculture, Pukyong National University,
Pusan 608-737, Korea

Mixed primers based on the high sequence homology of selected regions of known connexins (Cxs) was used for PCR reaction. A full-length connexin cDNA of sweetfish (*Plecoglossus altivelis*) was cloned by rapid amplification of cDNA 5'end (5'RACE) and 3'RACE method. When compared to other known Cx sequences, homology of sweetfish Cx cDNA to Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* Cx32.7, bovine, *Bos taurus* Cx44 and Atlantic croaker Cx32.2 were 63.8%, 61.6% and 56.7%, respectively. This cDNA encoded 308 amino acids (35,028 dalton) and named as sweetfish Cx35. Hydropathicity analysis of predicted amino acid sequences indicated that sweetfish Cx35 have four major hydrophobic regions and four major hydrophilic regions, suggesting its topology is similar to that of known Cxs. The presence of a typical Cx consensus sequences were identified in each of the extracellular loops (first loop and second loop).

Key words: Connexin 35, cDNA cloning, RACE, *Plecoglossus altivelis*

서 론

어류의 인위적인 성숙유도에는 산란·성숙의 제어기술의 확립이 필요하나 분자수준의 제어기술은 아직 미개발된 부분이 많다. 최근, 대서양산 민어, *Micropogonias undulatus*에서는 gap junction이라고 불리워지는 관구조가 난성숙 능력의 획득에 따라 난모세포와 과립막세포의 사이에서 형성되는 것이 보고되었다 (York et al., 1993; Yoshizaki et al., 1994, 1995). Gap junction은 인접하고 있는 세포간을 연결하여 주는 관구조로서, 각종 이온, 뉴클레오티드, 아미노산 그리고 cyclic AMP와 같은 secondary messenger 및 작은 대사산물인 약 1,000 Da 이하의 분자량을 가진 물질이 농도구배에 의하여 자유롭게 왕래할 수 있는 구조이다 (Stagg and Fletcher, 1990). 이러한 gap junction은 혈구와 성숙한 골격근을 제외한 거의 모든 동물조직에 존재하며, 심근의 동조적 수축이나, signal의 전달 혹은 초기발생시의 형태형성에 관련하여 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Kumar and Gilula, 1986; Bruzzone et al., 1996). Gap junction은 세포막을 통과하고 있는 connexon이라고 하는 통모양의 분자가 세포와 세포사이에서 서로의 세포와 domain 부분이 연결됨으로써 형성된다. 이들 connexon은 6분자의 connexin (Cx) 단백질이 결합되어 이루어져 있다. 즉, 1개의 gap junction은 12개의 Cx subunit로 구성되어져 있다 (Kandel et al., 1991; Bruzzone et al., 1996; 吉崎 등, 1997). Cx는 분자량 약 26~56 KDa의 막단백질로서 Cx라는 이름을 붙일 때에는 그 분자량을 증명과 함께 기재한다 (Beyer et al., 1987; Bruzzone et al., 1996).

어류에 있어서의 gap junction은 잉어, *Cyprinus carpio*의 망막

세포 (Teranishi et al., 1983), *Fundulus*의 초기배의 할구 (Spray et al., 1981) 및 난모세포와 과립막세포의 사이 (Cerda et al., 1993)에서 존재한다는 것이 보고되었으며, 전자현미경 관찰에 의하여 송사리, *Oryzias latipes* (Iwamatsu and Ohta, 1981)와 zebrafish, *Brachydanio rerio* (Kessel et al., 1985)에서도 gap junction의 존재가 보고되었다. 한편, Cx의 cDNA는 대서양산 민어, *Micropogonias undulatus*의 난소 (Yoshizaki et al., 1994), 점가오리, *Rana erinacea* and/or *R. ocellata* (O'Brien et al., 1996), perch의 망막 (O'Brien et al., 1998) 및 참돔, *Pagrus major*의 난소 (Choi and Takashima, 2000)에서 cloning되었다. York et al. (1993)은 대서양산 민어의 gap junction이 난황형성 종료와 동시에 감소하였다가, HCG에 의한 난성숙 능력의 향상에 따라 증가한다고 보고하였으며, Yoshizaki et al. (1994)은 대서양산 민어의 난소에서 cloning된 Cx32.2 cDNA가, Choi and Takashima (2000)는 참돔의 난소에서 cloning된 Cx31.5 cDNA가 난성숙 능력의 획득에 관여한다고 보고하였다.

본 연구는 gap junction을 구성하고 있는 유전자인 Cx cDNA를 은어의 난소에서 cloning하여 그 구조를 밝히고, 난성숙과 관련한 기초자료를 얻고자 실시되었다.

재료 및 방법

1. 실험어

일본 수산청 중앙수산연구소에서 수온 약 18°C로 유수식으로 사육 중이던 당년산 은어, *Plecoglossus altivelis*의 난소를 dry ice 위에서 적출하여, 즉시 -80°C로 냉동시켜 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. Total RNA의 추출 및 cDNA의 합성

-80°C에서 냉동 보관된 은어 난소를 1 g 사용하여, Quickprep Total RNA Extraction Kit (Pharmacia Biotech)로서 total RNA를 추출하였다. Total RNA를 2 µg 사용한 cDNA의 합성은 You-Prime First-Strand Bead (Pharmacia Biotech) Kit로서 합성하였다.

3. PCR에 의한 Connexin cDNA의 합성

Cx cDNA의 합성을 위한 mixed primer는 human Cx32 (Kumar and Gilula, 1986), rat Cx43 (Beyer et al., 1987), *Xenopus* Cx30 (Gimlich et al., 1988), Cx38 (Ebihara et al., 1989; Gimlich et al., 1990) 및 Cx43 (Gimlich et al., 1990)의 Cx 배열을 참고로 하여, 종내·종간을 통해서 잘 보존되어 있는 첫번째의 세포의 domain과 두번째의 세포막 관통 domain의 경계영역에서 forward primer (CXF; 5'-TTCCC(CT)AT(ACT)CA(CT)(AG)T(CGT)CG-3')를, 두번째의 세포의 domain과 네번째의 세포막 관통 domain의 경계영역에서 reverse primer (CXR; 5'-GT(CT)TT(CT)TC(ACGT)(AG)TGGG(ACGT)C(GT)(ACT)GA-3')를 작성하였다 (Yoshizaki et al., 1994). 은어 난소의 cDNA를 12.5 ng 사용하여 polymerase chain reaction (PCR) 반응을 실시하였다. PCR 반응은, 열변성을 94°C에서 1분, 50°C에서 45초, 72°C에서 45초간씩 35회 실시한 후, 최종신장 반응을 72°C에서 3분간 실시하여, 증폭된 395 bp의 cDNA 단편을 1.5% agarose gel로 전기영동한 다음 정제하였다.

4. 염기배열의 결정

정제된 395 bp의 cDNA 단편을 pGEM-T Easy Vector (Promega Co.)에 삽입한 후, 이를 대장균 DH5α에 형질전환하여 형성된 colony를 배양하여 PlexiPrep Kit (Pharmacia Biotech)에 의해 plasmid DNA를 정제하였다 (Sambrook et al., 1989). 정제된 plasmid DNA의 sequence 반응은 Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP (Amersham LIFE SCIENCE)로 유도한 후, ALFexpress DNA Sequencer (Pharmacia Biotech)로 염기배열을 결정하였다. 결정된 염기배열은 BLAST의 GenBank를 이용하여, 본 cDNA와의 상동성을 검색하였다.

5. 3'RACE (rapid amplification of cDNA 3'end)

은어 난소의 cDNA 합성시 사용한 oligo (dT) primer 말단에 부착 되어있는 adaptor 배열을 3'RACE의 adaptor primer로서 설계하였다. 또한 3'RACE용 GSP (GSP1, GSP2) (Table 1)도 별도로 설계하여, GSP1과 adaptor primer로서 1st PCR를 실시하였다. 합성된 cDNA를 이용한 PCR에서는 열변성을 94°C에서 45초, 54°C에서 45초, 72°C에서 45초간의 반응을 30회 실시한 후, 최종신장 반응을 72°C에서 3분간 실시하였다. 1st PCR의 반응생성물을 전기영동에 의해 확인한 후, 증폭된 1st PCR의 반응생성물과 GSP 2, adaptor primer로서 nested PCR을 실시하였다. 최종적으로 증폭된 cDNA 단편의 염기배열을 결정하였다.

Table 1. Deoxyoligonucleotide primers used in the 3' and 5' RACE PCR amplification of sweetfish Cx35 cDNA

Primer	Deoxyoligonucleotide sequence
3'RACE	
GSP1	5'-GAAAGAGGTTGGCATGCTCG-3'
GSP2	5'-CAGAGATGATCTGGAGGACC-3'
Oligo (dT) adaptor primer	5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGAGGAA(T)18-3'
3'adaptor primer	5'-TGGAAGAATTCGCGGCCGAG-3'
5'RACE	
GSP1	5'-ACCTGATTGCCAAGATTCTG-3'
GSP2	5'-ACAGGCCAGTACTTCTCTGA-3'
5'RACE anchor primer	5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGIIIG-3'
5'adaptor primer	5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTAC-3'

6. 5'RACE (rapid amplification of cDNA 5'end)

2 µg의 total RNA를 이용한 5'RACE법에 의하여 5'상류측 미지 영역의 cloning 및 그 염기배열을 결정하였다. 5'RACE법은 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 Kit (GIBCO, BRL)를 사용하였으며, 본 유전자의 특이적인 primer (Gene specific primer; GSP) (GSP1, GSP2) (Table 1)를 설계하여, kit 첨부된 anchor primer와의 PCR에 의하여 증폭된 산물은 전술한 방법으로 cloning하여 염기배열을 결정하였다. 염기배열의 결정은 GENETYX-WIN (Software Development Co., Japan) software package에 의하여 이루어졌다.

7. Northern blot 해석

30 µg의 total RNA를 2.2%의 formaldehyde를 함유한 1%의 agarose에서 전기영동한 후, total RNA를 nylon membrane (Hybond N+) (Amersham Co.)에 blotting하였다. 80°C에서 2시간동안 반응시킨 nylon membrane은 rapid hybridization buffer (Amersham)로서 65°C에서 10분간 prehybridization한 후, oligolabelling kit (Amersham)를 사용하여 [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol)를 은어 Cx35 cDNA에 표식한 probe를 첨가하여 65°C에서 3시간 hybridization하였다.

Hybridization 후 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 2×SSC/0.5% SDS 용액으로 65°C에서 15분간 1회, 0.1×SSC/0.5% SDS 용액으로 15분간 2회 세척한 후, FUJIX BAS 1000 bio-imaging analyzer (Fuji Film, Japan)를 이용하여 hybridization signal의 강도를 측정하였다. 내부표준으로는 은어 β-actin를 이용하였다.

결 과

Mixed primer인 CXF primer와 CXR primer를 이용한 PCR에 의하여 증폭된 395 bp의 cDNA 단편을 확인한 후, 3'RACE 및 5'RACE법에 의해 미지의 전영역을 cloning하여, 1436 bp cDNA의 전염기배열 (Fig. 1)을 결정하였다. 전염기배열이 결정된 cDNA를 유전자의 database인 GenBank에서 그 상동성을 검색한 결과, 대서양산 민어, *M. undulatus* Cx32.7 (Yoshizaki et al., 1994)과 63.8%, bovine, *Bos taurus* Cx44 (Gupta et al., 1994)와 61.6% 및 대서양산 민어 Cx32.2와 56.7%의 상동성을 나타냈다 (Fig. 2). 은어

SfCx35.0	1: MGEWDLGRLLDKVQTHSTLIGKVLVSVLFI FRIMVLGAGAEKVVWGDEQSDFCNTDQPG	60
AcCx32.7	1: MGEWDLGRLLDKVQSHSTVI GKVWLTVLFVFRILVLR TGADRVWGDEQSDFCNTQQPG	60
AcCx32.2	1: MGDLGFLSKLLDQVQSHSTVI GKIVMTVLFVFRIMVLGAGAESVWGDEQSDFCNTQQPG	60
BvCx44.0	1: MGDWSFLGRLL ENAQEHSTVI GKVWLTVLF IFRILVLGAAAEVWGDEQSDFCNTQQPG	60
SfCx35.0	61: CENVCYDHAEPISHVRFWV LQIISVSTPTLIYLGHVVHV IHI EKRVREKLQQSQ-DEHA	119
AcCx32.7	61: CENVCYDLAEPISHVRFWV LQIIAVATPKLLYLGHV LHV IHA EKMKERMKKQALDDQT	120
AcCx32.2	61: CENVCYDWTFFISHIRFWV LQIFVSTPTLIYLGHAMHI IQQE---TKLRAR---LSSPG	114
BvCx44.0	61: CENVCYDRAFPISHVRFWV LQIIFVSTPTLIYLGHV LHLVRME---EKRKERE--EPPN	115
SfCx35.0	120: NLFLMKSCMPKYSNDK GKI SMRGRLLRSYV LHLAKILLEVGFITGQYFLYGFITLDARY	179
AcCx32.7	121: NLFLRKAYKVPKYTKSSG KISIRGRLLRSYV YHLVAKIILEVLFIVGQYFLYGFITLDTRY	180
AcCx32.2	115: G--SRLCKQP-KYTNEQGKVKIKGNLLGSYLTQLVFKIIEA AFI VGGYYLYGFIMVPMF	171
BvCx44.0	116: G-WPRGHQDPAPVRDDR GKVRIAGALLRTYVFN IIFKTLFEVGF IAGQYFLYGFQLKPLY	174
SfCx35.0	180: VCSRFPCHQVDCFLSRPTEK SVFIWFMLVVACISLLLSLVELLYLSIRSVKDCM--ACK	237
AcCx32.7	181: VQTRFPCHKVDCFLSRPTEK SVIIFWMLVA AFVSLFSLVELFYLCVKAACECM--ARR	238
AcCx32.2	172: PCSKKPCPFTVECYMSRPTEK TIFIIIFMLVVACV SLLINVI EYFYLICTRVR CG-SRA-H	229
BvCx44.0	175: RQDRWPCPNTVDCFISRPTEK TIFILFMLAVPCV SLLINVLEIYHLGWK KKLKQGMTSPFR	234
SfCx35.0	238: QDYTVTPVTPVTLERKAYENRDQMIQN WVNLEMELQSRKLQGGGGVEGGGIGGGGQAKSV	297
AcCx32.7	239: QDYTVTPVTPPLLARKSFKSHKEVFQNCVN-EPASPENME-EVHI-----	282
AcCx32.2	230: SHKITS-AENPASLSSPRWPTVEDSLKQNKMMN-E-LETSQ-SIGGSLDG-AKEE-KRLL	283
BvCx44.0	235: PDTPGSRAGSVKPVGG SLLLPPNSAPPAVTIGFPYYAPSASSLQASDGLPRASPARAL	294
SfCx35.0	298: ASEDNMGEVHI-----	308
AcCx32.7	283: -----	282
AcCx32.2	284: SH-----	285
BvCx44.0	295: PGPPhRRRRQPGPARRQNWANREAEPQTSSRKASPPAPTRLQPRAPGVAPSSPFRRRGG	354
SfCx35.0	309: -----	308
AcCx32.7	283: -----	282
AcCx32.2	286: -----	285
BvCx44.0	355: ELGRRRDGEGAVTAVELHAPPEPPADPGRSSKASKSSGGRARGDLAI	402

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of the sweetfish, *Plecoglossus altivelis* connexin (Cx)35 (SfCx35.0), Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* Cx32.7 (ArCx32.7), Atlantic croaker Cx32.2 (ArCx32.2) and bovine, *Bos taurus* Cx44 (BvCx44.0). Sweetfish Cx35, Atlantic croaker Cx32.7, Atlantic croaker Cx32.2 and bovine Cx44 sequences were optimally aligned so as to match identical residues, which are indicated by shaded regions. Dashes indicate gaps introduced for optimize alignment.

Cx cDNA의 ATG 개시 codon은 132~134 bp 사이에 위치하고 있었으며, 1,056~1,058 bp에 위치한 TGA 정지 codon 사이에 308 개의 아미노산 및 35,028 Da의 분자량을 갖는 open reading frame (ORF)이 존재하였다 (Fig. 2). 그러므로, 전염기배열이 결정된 은어 Cx는 Beyer et al. (1987)의 명명법에 따라 은어 Cx35로 명명되었다.

은어 Cx35 아미노산 배열의 친수성·소수성 영역의 분포예측은 Kyte and Doolittle (1982) 방법에 기초한 GENETYX-WIN (Software Development Co.) software package에 의하여 분석되었다. 막단백질인 Cx는 4곳의 소수성 영역 (세포막 관통 domain을 형성)과 4곳의 친수성 영역 (2곳의 세포외 domain과 1곳의 세포내 loop 및 아미노산 말단과 C-말단을 형성)을 교차하는 구조를 하고

고 찰

있었다 (Yancey et al., 1989). 본 연구에서 얻어진 은어 Cx35의 구조도 기존의 전형적인 Cx 구조와 일치하였으며 (Fig. 2; Fig. 3), Cx family의 공통·필수적인 배열이라고 알려져 있는 제1세포의 domain의 consensus 배열인 C(D,N)TXQPGCX₂VCYD 및 제2세포의 domain의 consensus 배열인 CX₃₀₋₄PCX₃(L,I,M,V)(D,E,N)C(F,Y)(L,I,V,M)(S,A)(K,R)P (Yoshizaki et al., 1994)가 은어 Cx35에서는 54~67 아미노산에서 제1세포의 domain consensus 배열이, 182~198 아미노산에서 제2세포의 domain consensus 배열이 존재하였다 (Fig. 1).

더욱이, Cx의 C-말단에 존재하는 consensus 배열인 QNX₆₀₋₉S (Hoh et al., 1991)는 은어 Cx35의 263~274 아미노산에서 확인되었다 (Fig. 1; asterisks). 또한, 3번째의 세포막 관통 domain은 기존의 amphipathic helix-forming consensus인 TX₃SX₃(K,R)X₃E (Hoh et al., 1991)의 변형체인 (S,T)X₃(S,Q,H)X₃(K,R)X₃E (Yoshizaki et al., 1994)로서 148~160 아미노산에서 확인되었다 (Fig. 1; open circles). 이상과 같이, 친수성·소수성 영역의 분포 및 consensus 배열 등의 모든 조건이 Cx family 공통의 특징과 일치한 점으로 보아, 본 연구에서 확인된 cDNA의 염기배열은 은어의 난소에서 발현하는 Cx cDNA인 것이 확인되었다. 은어 Cx35의 mRNA가 난소내에서 실제로 발현되는가를 확인하기 위하여 northern blot 해석을 실시한 결과, 은어 Cx35는 난소에서 발현되는 것으로 증명되었다 (Fig. 4).

어류의 Cx 유전자는 아직 zebrafish, 대서양산 민어 및 점가오리 등 몇종의 어류에서만 cloning되어있고, Cx 유전자 및 Cx 유전자가 구성하고 있는 gap junction이 어류의 난성숙 과정에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있기 때문에, 본 연구에서는 은어의 난소에서 발현하는 Cx 유전자를 cloning하였다.

먼저, 은어의 난소에서 cloning된 Cx 유전자의 구조를 해석하였다. 3번째의 세포막 관통 domain에 존재하는 amphipathic helix-forming consensus인 TX₃SX₃(K,R)X₃E (Hoh et al., 1991)는 은어 Cx35에서는 존재하지 않았으나, Yoshizaki et al. (1994)이 보고한 바와 같이 기존의 amphipathic helix-forming consensus의 변형체인 새로운 consensus인 (S,T)X₃(S,Q,H)X₃(K,R)X₃E가 존재하였다. Fig. 2에서와 같이 Cx에서의 세포막 관통 domain과 세포의 domain의 아미노산 배열은 상동성이 높게 나타났으나, 아미노산 말단 domain을 포함한 세포내 loop에서는 매우 낮은 상동성이 나타났다.

특히, 은어의 Cx35 cDNA에서 protein kinase C (PKC)의 인산화 배열인 (S,T)X(R,K) (Kishimoto et al., 1985; Woodget et al., 1986)가 126, 140, 198, 226, 229 및 274 아미노산에서 존재하였으며, casein protein kinase II 인산화 배열인 (S,T)X₂(D,E) (Pinna, 1990)는 114, 218, 229 및 247 아미노산에 존재하였다. 이와

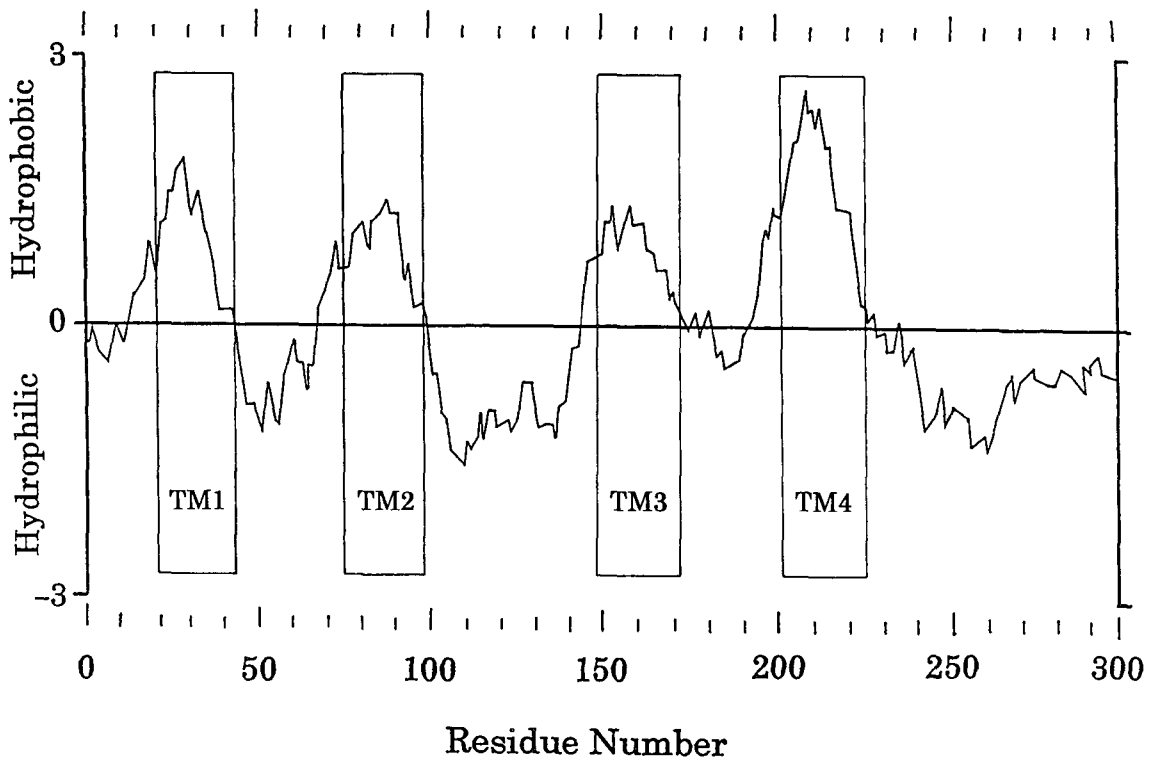


Fig. 3. Hydropathicity plot of sweetfish Cx35. Hydropathicity values were determined using the method of Kyte and Doolittle (1982) with a window size of 20 residues. The amino acid residue number is shown on the X-axis. Negative values hydrophilic and positive values are hydrophobic. TM1, 2, 3, 4: first, second, third and fourth transmembrane domains are boxed.

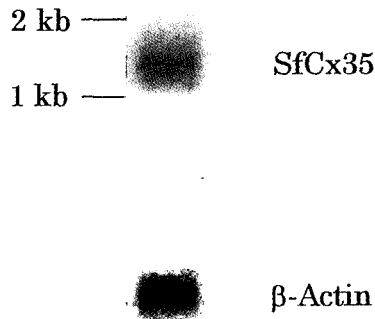


Fig. 4. Northern blot analysis of total RNA (30 μ g) extracted from ovary and hybridized with sweetfish, *Plecoglossus altivelis* Cx35 (SfCx35) and β -actin probes. The positions of RNA molecular makers are shown on the left.

같은 인산화 작용은 동물의 여러 기관에서 조절된다고 보고되었다 (Hoh et al., 1991). Takeda et al. (1987)은 쥐의 Cx32가 PKC에 의하여 인산화된다고 보고하였으며, PKC 및 casein protein kinase II의 인산화 배열을 갖고 있는 참돔 Cx31.5 (Choi and Takashima, 2000)와 Atlantic croaker Cx32.2 (Yoshizaki et al., 1994) 역시 난성숙 능력의 획득에 관여하고 있는 것이 보고되었다. 또한, PKC의 활성화제인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 gap junction의 저해제로 알려져 있고 (Chang et al., 1999), 그 저해는 Cx의 인산화를 통해서 이루어진다고 생각된다. PMA가 대서양산 민어의 난성숙 능력의 획득을 저해한다는 보고 (Chang et al., 1999)를 고려해 보면, 은어에 있어서도 대서양산 민어와 같이 난성숙 능력을 저해하는 어떠한 저해계가 Cx에 의하여 gap junction에 영향을 미치는 과정에서 존재할 가능성이 크다고 할 수 있다. 앞으로 어류의 난성숙 기구와 관련된 기초적 연구로서, Cx 유전자에 관한 연구가 계속적으로 진행되어야 할 것이다.

요 약

기존의 Cx 배열을 참고로 종내·종간을 통하여 잘 보존되어져 있는 영역에서 primer를 설계하고, 은어의 난소를 재료로 하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 cDNA 단편을 이용하여, 5'RACE 및 3'RACE법에 의해 미지의 영역을 cloning하여 난소에서 발현하는 Cx cDNA의 전염기배열을 결정하였다. 기존의 Cx 배열과 상동성을 비교한 결과, 대서양산 민어의 Cx32.7과 63.8%, bovine의 Cx44와 61.6% 및 대서양산 민어의 Cx32.2와는 56.7%의 상동성이 나타났다. 본 cDNA는 35,028 Da의 분자량을 code하는 open reading frame (ORF)으로 구성되어 있어, 은어 Cx35로 명명되었다. 또한 아미노산 배열의 친수성·소수성 영역의 분포예측 결과, 4곳의 소수성 영역과 4곳의 친수성 영역을 교차하는 전형적인 Cx의 구조와

일치하였으며, Cx family의 공통·필수적인 배열인 제1세포외 domain의 consensus 배열 및 제2세포외 domain의 consensus 배열도 존재하였다.

참 고 문 헌

- Beyer, E.C., D.L. Paul and D.A. Goodenough. 1987. Connexin 43: A protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.*, 105, 2631~2629.
- Bruzzone, R., T.W. White and D.W. Paul. 1996. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.*, 238, 1~27.
- Cerda, J.L., T.R. Petrino and R.A. Wallace. 1993. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 160, 228~235.
- Chang, X., R. Patino, P. Thomas and G. Yoshizaki. 1999. Developmental and kinase-dependent regulation of ovarian connexin mRNA and oocyte maturational competence in Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 114, 330~339.
- Choi, C.Y. and F. Takashima. 2000. Molecular cloning and hormonal control in the ovary of connexin 31.5 mRNA and correlation with the appearance of oocyte maturational competence in red seabream. *J. Exp. Biol.*, 203, 3299~3306.
- Ebihara, L., E.C. Beyer, K.I. Swenson, D.L. Paul and D.A. Goodenough. 1989. Cloning and expression of a *Xenopus* embryonic gap junctions protein. *Science*, 243, 1194~1195.
- Gimlich, R.L., N.M. Kumar and N.B. Gilula. 1988. Sequence and developmental expression of mRNA coding for a gap junction protein in *Xenopus*. *J. Cell. Biol.*, 107, 1065~1073.
- Gimlich, R.L., N.M. Kumar and N.B. Gilula. 1990. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J. Cell. Biol.*, 110, 597~605.
- Gupta, V.K., V.M. Berthoud, N. Atal, J.A. Jarillo, L.C. Barrio and E.C. Beyer. 1994. Bovine connexin44, a lens gap junction protein: molecular cloning, immunological characterization, and functional expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35, 3747~3758.
- Hoh, J.H., S.A. John and J.P. Revel. 1991. Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin-31. *J. Biol. Chem.*, 266, 6524~6531.
- Iwamatsu, T. and T. Ohta. 1981. On a relationship between oocytes and follicle cells around the time of ovulation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.*, 54, 17~29.
- Kandel, E.L., S.A. Siegelbaum and J.H. Schwartz. 1991. Synoptic transmission. In: *Principles of Neural Science*. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. ed., Appleton & Lange. Norwalk, CT. pp. 123~134.
- Kessel, R.G., H.N. Tung, R. Roberts and H.W. Beams. 1985. The presence and distribution of gap junctions in the oocyte-follicle cell complex of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Submicrosc. Cyto.*, 17, 239~253.
- Kishimoto, A., K. Nishiyama, H. Nakanish, Y. Uratsuji, H. Nomura, Y. Takeyama and Y. Nishizuka. 1985. Studies on the phosphorylation of myelin basic protein-by-protein kinase C and adenosine 3' : 5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 260, 12492~12499.

- Kumar, N.M. and N.B. Gilula. 1986. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell. Biol.*, 103, 767~776.
- Kyte, J. and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105~132.
- O'Brien, J., M.R. al-Ubaidi and H. Ripps. 1996. Connexin 35: a gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina. *Mol. Biol. Cell.*, 7, 233~243.
- O'Brien, J., R. Bruzzone, T.W. White, M.R. al-Ubaidi and H. Ripps. 1998. Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connexin family. *J. Neurosci.*, 18, 7625~7637.
- Pinna, L.A. 1990. Casein kinase 2: An 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochem. Biophys. Acta*, 1054, 267~284.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1, Ford, N., Nolan, C. Ferguson, M. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 7.43~7.45.
- Spray, D.C., A.L. Harris and N.V.L. Bennett. 1981. Gap junction Conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science (Washington DC)*, 211, 712~715.
- Stagg, R.B. and W.H. Fletcher. 1990. The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endocr. Rev.*, 11, 302~325.
- Teranishi, T., K. Negishi and S. Kato. 1983. Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cell in carp retina. *Nature*, 301, 243~246.
- Woodget, J.R., K.L. Gould and T. Hunter. 1986. Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur. J. Biochem.*, 161, 177~184.
- Yancey, S.B., S.V. John, R. Lal, B.J. Austin and J.P. Revel. 1989. The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization (I), topology (II), and functional domains (III). *J. Cell. Biol.*, 108, 2241~2254.
- York, W.S., R. Patino and P. Thomas. 1993. Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92, 402~418.
- Yoshizaki, G., R. Patino and P. Thomas. 1994. Connexin messenger ribonucleic acids in the ovary of Atlantic croaker: Molecular cloning and characterization, hormonal control, and correlation with appearance of oocyte maturational competence. *Biol. Reprod.*, 51, 493~503.
- Yoshizaki, G. and R. Patino. 1995. Molecular cloning, tissue distribution, and hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a Novel *Xenopus* connexin gene transcript. *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 7~18.
- 吉崎悟朗・R. Patino・隆島史夫. 1997. コネクシン(ギャップ結合タンパク質)遺傳子, 魚類のDNA, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 379~390.

1999년 12월 2일 접수

2000년 11월 22일 수리