J. Korean Fish. Soc. 35(6), 676~681

한수지, 35(6), 676~681, 2002

쥐노래미 (*Hexagrammos otakii*) 성장호르몬 cDNA 유전자의 염기서열 변이 및 발현 특성

남윤권[+] · 김동수
부경대학교 양식학과

Molecular Cloning and Alternative Splicing of Growth Hormone Transcripts in Greenling, *Hexagrammos otakii*

Yoon Kwon NAM[+] and Dong Soo KIM
Fish Genetic Manipulation Laboratory, Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Different types of transcripts encoding growth hormone (GH) were identified from cDNA libraries constructed with pituitaries of a marine fish species, greenling (*Hexagrammos otakii*). GH-homologous cDNA clones were isolated using the high-density filter hybridization and the expressed sequence tag techniques. Of 39 full-length positive cDNA clones, 31 clones (79%) displayed an identical sequence, however, remaining 8 clones exhibited several polymorphisms in their sequences including (1) the length and sequence variability in the 5′ upstream region, (2) insertional sequences in open reading frame, and (3) deletion and/or single nucleotide polymorphism in the untranslated 3′ region. Based on RT-PCR and RNA dot blot analyses, these transcripts were proven to be expressed in a pituitary-specific manner.

Key words: *Hexagrammos otakii,* GH, cDNA, Sequence variation

서 론

어류는 척추동물 중 가장 다양한 유전적 다양성을 포함하고 있는 분류군으로서 포유류등 고등 육상 동물에서는 존재하지 않거나 진화적으로 소실된 유용 유전자들을 보유하고 있음이 알려지고 있다 (Douglas et al., 1999; Nam and Kim, 2001). 현재 어류 유전자 자원을 탐색 및 발굴하고자 하는 많은 노력들이 이루어지고 있으며 이중 성장호르몬 유전자는 양식 생물산업에 가장 중요한 형질과 직접적인 관련을 갖는 다는 이유로 많은 어종에서 형질전환 소재로서 널리 이용되고 있다. 1986년 무지개송어 성장호르몬 유전자 cDNA가 클로닝된 이래 (Agellon and Chen, 1986) 많은 어종에서 성장호르몬 유전자들이 탐색된 바 있고 이중 연어류 (Devlin et al., 1995), 미꾸라지 (Nam et al., 2001) 및 잉어 (Hinits and Moav, 1999) 등에서는 클로닝된 성장호르몬 유전자 gDNA 또는 cDNA들은 형질전환 벡터에 포함되어 고속성장 어류 개발에 사용된 바 있다 (see also Dunham and Devlin, 1999). 그러나 해산 어종에서는 담수 어종에 비해 아직 형질전환을 목적으로한 성장호르몬 유전자 개발 실적이 비교적 미비한 실정이며 더욱이 형질전환 벡터로 개발되어 성공적인 효과를 거둔 예는 전무한 실정이다.

쥐노래미 (*Hexagrammos otakii*)는 우리나라 주요 해산 어종으로서 비교적 풍부한 자원량이 연안에 서식하는 하는 것으로 알려져 있으나 최근들어 연안의 오염 및 어장 상실 등으로 인해 그 자원량이 점차 감소 추세에 있으며 가까운 미래에 양식기술에 의한 종묘 생산, 품종 보존, 육종 및 자원 확대 등이 중요시 될 것으로 예상된다. 특히 본 어종은 그 알의 크기가 크고, 한 개체에서 생산된 난의 부화율이 비교적 일양하며 또한 수온을 이용한 장시간에 걸친 발생속도 조절이 가능함에 따라 자세한 발생과정의 추적과 배 발생과 관련한 유전자 발현 조사가 유리한 점 등 발생유전학 및 형질전환 연구 모델로서 많은 장점을 갖고 있다. 이에 본 연구는 쥐노래미를 해산어 유전자 조작 및 형질전환 모델로 개발하기 위한 유전육종학적 연구의 일환으로 본 어종으로부터 성장호르몬 유전자 cDNA를 탐색, 발굴하고 이들의 염기서열 구조, 및 발현 특성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

부산 남천동 민락 활어 시장 및 경남 통영의 활어시장으로부터 쥐노래미 성어 (200~350 g) 암수를 구입하여 부경대학교 양식학과 연구실로 옮겨 실험에 사용하였다. 암 · 수 각 6마리로부터 해부학적 기법을 통해 뇌하수체 조직을 적출하여 cDNA library제작에 이용하였다.

cDNA library 제작

cDNA library를 제작하기 위해 뇌하수체 조직으로부터 Total RNA를 분리하였다. Total RNA 분리는 Tripure Reagent RNA Isolation Kit (Roche Molecular Biomedicals, Germany)를 이용하였으며 조직 1 g당 10 mL의 Tripure reagent를 첨가한 후 조직을 균질화 시키고 chloroform 2 mL와 혼합 후 원심 분리를 통하여 RNA를 포함하는 상등액, 단백질 계면층 및 DNA를 포함하는 유기용매층으로 분리하였다. 분리된 상등액에 동일량의 isopropanol을

[+]Corresponding author: yoonknam@pknu.ac.kr

첨가하여 RNA를 침전시켰으며 최종 분리된 total RNA 500 μg으로부터 poly (A) tail을 지닌 mRNA만을 다시 분리하였다. mRNA 분리는 magnetic particle을 이용하여 역시 Roche사의 mRNA isolation 방법대로 수행하였으며 DEPC가 처리된 증류수에 0.5 μg/μL의 농도로 mRNA를 녹여 실험에 이용하였다. cDNA library제작은 Lambda Zap cDNA synthesis kit (Stratagene, USA)를 이용하여 수행하였다. Reverse transcription 반응을 통해 cDNA strand들을 합성하였고 합성된 cDNA pool로부터 600 bp 이상의 cDNA 분자들만을 선택적으로 회수하기 위해 spin column (CHROMA-400, Clonetech, USA)을 수행하였다. 분리된 cDNA 분획을 UniZap XL1 vector (Stratagen USA)에 ligation시켰으며 ligation된 반응물을 lambda phage내로 packaging하였다. 제작된 primary library의 titer를 조사한 후 plate method를 이용하여 phage들을 증폭시켰으며 *in vivo* mass excision 방법을 통해 pBluescript SK plasmid 벡터내로 cDNA들을 클로닝하였다. 암·수 뇌하수체 조직으로부터 각각의 cDNA library를 제작하였다.

Filter hybridization 및 EST

제작된 뇌하수체 cDNA library들로부터 성장호르몬 유전자와 유사성을 갖는 transcript들을 확보하기 위해 두 가지 방법을 병행하였다. 첫째, 기존에 보고되어 있는 어류 성장호르몬 유전자의 염기서열 분석을 바탕으로 어류 성장호르몬 유전자내 보존적인 염기서열에 대한 degeneracy primer를 제작, probe로 사용할 RT-PCR product를 합성하여 high-density filter hybridization을 수행하였고 둘째, 자동화 염기서열 분석기를 이용하여 random clone들을 대상으로 expressed sequence tag를 수행, 어류 성장호르몬 유전자와 유사성을 보이는 clone들을 발굴하였다. Filter hybridization의 probe 합성을 위해 사용한 degeneracy primer의 염기서열은 다음과 같다.

UniGH1F 5′-GTCTCSACCTTGTGCATGTC-3′
UniGH1R 5′-TTCCYNCWGKMYTTCTGYAACTC-3′

본 염기서열을 바탕으로 성장호르몬 cDNA 단편 약 350 bp가 증폭되도록 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 쥐노래미 뇌하수체 total RNA 1 μg을 대상으로 Titan One Tube RT-PCR kit (Roche)를 이용하여 수행하였으며 제조사의 방법대로 50℃에서 30분간 역전사 반응을 수행 후 곧 94℃ 1 min, 55℃ 30 sec 및 72℃ 1 min의 30회 순환 증폭 반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 대상으로 nest PCR 방법을 통해 PCR 산물을 11-digoxygenin-dUTP로 표지하여 probe로 이용하였다. Filter hybridization 후 클론의 정확한 선발을 용이하게 하기 위해 cDNA library로부터 mass excision에 의해 얻은 재조합 clone들을 대상으로 25 cm×25 cm 내에 등간격의 2,500개 (50×50)의 박테리아 클론 배열을 만들어 분석하였다. 총 7,500개의 클론들을 대상으로 filter hybridization을 수행하였으며 hybridization 및 detection의 전 과정은 Roche사의 Non-radioactive Labeling and Detection Kit를 이용하였다.

Expressed sequence tag를 수행하기 위해 증폭된 cDNA library로부터 무작위로 선발한 재조합 플라스미드들의 insert 길이를 제한효소 (ApaI 및 SacI) 처리를 통해 확인하고 어류 성장호르몬 유전자가 속하리라 예상되는 700~1,200 bp 범위의 insert 길이를 포함하는 클론 192개를 선발하여 single pass sequencing을 수행하였다. Sequencing primer는 insert의 5′쪽에 vector상에 위치하는 SK primer (5′-CGCTCTAGAACTAGTGGATC-3′)를 이용하였다.

염기서열 분석

클론들의 염기서열 분석은 BigDye terminator sequencing kit (ABI, USA)를 이용하여 수행하였으며 primer extension 반응을 위한 열 순환 반응은 96℃에서 10초, 50℃에서 5초 및 60℃에서 4분간으로 설정하여 25회 반복하였다. 반응이 완료된 extension 산물에서 잔여 primer 및 ddNTP들을 제거하기 위해 spin column (CHROMA-100, Clonetech, USA)을 수행하였고 최종 반응 산물 3 μL를 취하여 ABI 377 자동염기서열 분석기를 통해 염기서열 단편에 관한 정보를 수집하였다. 수집된 1차 염기서열 정보를 대상으로 염기서열 편집 프로그램인 Sequencher (ver. 4.0; Gene Codes Co. USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였으며 NCBI의 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)내 포함되어 있는 데이터 베이스를 대상으로 BLAST search를 수행함으로써 성장호르몬 유전자와 유사성을 갖는 transcript들을 확보하였다.

확보된 클론들의 insert 전체 염기서열 분석을 수행하였다. 재조합 박테리아로부터 플라스미드들을 분리하고 상기 SK primer이외에 T3 (5′-ATTAACCCTCACTAAAGGA-3′) 및 T7 (5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′) sequencing primer들의 조합을 이용하여 상기의 조건대로 염기서열을 결정하였다. Sequencher 프로그램을 이용하여 contig 작성 및 transcript들간의 염기서열 변이 검색을 수행하였으며 (Nam et al., 2002) 아울러 5′-upstream의 보존 여부, 정확한 open reading frame (ORF)의 존재 여부 및 3′-downstream의 보존 여부 등을 조사하였다. 또한 transcript들간 single nucleotide polymorphism의 여부 역시 검색하였고 각 클론당 최소 3반복 염기서열을 양방향으로 분석하였다.

RT-PCR 및 RNA dot blot을 통한 조직특이적 발현 여부 분석

성장호르몬 cDNA transcript들의 뇌하수체 특이적 발현 분포 양상을 확인하기 위해 다양한 조직을 대상으로 RT-PCR 및 RNA dot blot을 수행하였다. 염기서열 정보를 바탕으로 약 630 bp의 RT-PCR 산물을 증폭시킬 수 있는 primer set를 합성하였으며 (HexaGH 1F 5′-CCAGAAGTGATCCCAGACCAGCCA-3′ 및 HexaGH 1R 5′-GGGCTACAGGGTGCAGTTGGCT-3′) 이들을 이용하여 조직별로 분리된 total RNA들을 대상으로 reverse-transcription PCR 및 RNA dot bot을 수행하였다. 조직은 간 (liver), 뇌하수체 (pituitary), 장 (intestin), 위 (gut), 근육 (muscle), 표피 (skin), 신장 (kidney) 및 비장 (spleen)을 대상으로 하였으며 조직별로 분리된 total RNA에 DNase를 (10 U/μg RNA) 처리하여 DNA 오염을 제거시킨 후 분석에 이용하였다. RT-PCR은 분리된 1 μg의 조직별 total RNA를 이용하여 Titan One-tube RT-PCR kit (Roche)를 이용하였으며 dot blot은 2 μg의 RNA를 nylon

membrane에 고정화시킨 후 상기 HexaGH 1F 및 1R primer로 증폭된 PCR product를 probe로 이용하여 hybridization을 수행하였다.

결 과

쥐노래미 뇌하수체 cDNA library

쥐노래미 뇌하수체로부터 제작된 cDNA library들의 특징을 Table 1에 나타내었다. 제작된 cDNA primary library의 크기는 1.1~1.2×10^6 pfu/mL로서 뇌하수체에서 발현할 수 있는 다양한 유전정보를 포함하고 있음을 알 수 있었으며 또한 amplified library 및 excised library 역시 재조합 클론 함유 비율이 98% 이상으로 높게 나타났다. 무작위로 선발된 cDNA 클론들의 insert 평균 길이를 조사한 결과 1.6 kb 이상으로 나타남으로 full-length 클론들이 다수 함유되어 있음을 알 수 있었다 (Table 1).

Table 1. Summary of cDNA library construction from pituitary of greenling (*Hexagrammos otakii*)

	Library I (female)	Library II (male)
Size of primary library (pfu/mL)	1.2×10^6	1.1×10^6
Size of amplified library (pfu/mL)	2.5×10^{10}	1.0×10^{11}
Size of excised library (cfu/mL)	4.5×10^6	5.0×10^6
Percent recombinant clones*	99.5	98.0
Average length of inserts (Kb)**	1.67	1.73

*Percent recombinant clones were assessed based on X-gal/IPTG method.

**Average lengths of inserts were determined by restrction digestion of randomly chosen 36 clones and analyzed by electrophoresis onto agarose gel.

Filter hybridization에 의한 성장호르몬 cDNA 탐색

제작된 membrane array를 이용하여 총 7,500개의 클론들을 검색한 결과 각 2,500개의 무작위 클론을 포함하는 membrane array당 19개, 14개 및 11개의 클론들이 degeneracy primer로 제작한 probe와의 hybridization에서 강력한 양성반응을 보였으며 이들의 단편 염기서열을 분석한 결과 각각 19개 (100%), 14개 (100%) 및 10 (91%)개의 클론들이 성장호르몬 유전자와 유사성을 갖는 것으로 나타났다.

EST를 이용한 성장호르몬 cDNA 탐색

상기 filter hybridization 방법과 병행하여 수행한 EST 검색에서 총 192개의 클론들을 대상으로 염기서열 표지를 수행한 결과 4개의 EST 클론들이 성장호르몬 유전자와 유사성을 갖는 것으로 나타났고 이들 모두 5′쪽 upstream region과 ATG 개시 코돈이 보존된 full-length cDNA clone의 가능성을 나타내었다. 아울러 성장호르몬 EST 클론들 이외에도 다양한 EST 정보들이 확보되었으며 성성숙 관련, DNA 복제, 전사 등과 관련된 염기서열들이 탐색되었다 (data not shown).

Full-length 염기서열 및 transcript들간 염기서열 변이 분석

최종 탐색 선발된 43개의 성장호르몬 유사 transcript들을 대상으로 전체 염기서열 분석을 양방향으로 반복 분석함으로써 양쪽 끝의 cloning site의 보존 유무, 5′ upstream 부위, 개시코돈 및 종결코돈을 포함한 open reading frame, 3′ downstream 부위 및 poly (A) tail의 보존 유무를 분석하였다. 분석된 43개 중 39개 클론들이 상기 부위들 모두를 잘 보존하고 있는 것으로 나타났으나 모두 동일한 염기 서열을 갖고 있지는 않았다. 최종 선발된 39개의 클론들의 염기서열은 3가지 형태의 변이를 나타내었다. 전체 39개 중 79%에 해당하는 31개 클론들이 동일한 염기서열을 갖고 있어 가장 높은 빈도의 대표성을 띄고 있었으며 (Fig. 1) 본 cDNA clone들은 70 bp의 5′-upstream 부위, 203개의 아미노산을 포함하는 609 bp의 ORF, TAG 종결 코돈, 266 bp의 poly (A) tail을 포함하는 3′-downstream 부위로 구성되어 있었다. 해당 염기서열을 여타 어종들 (연어류, 틸라피아, 농어류, tuna류, 가자미류 등)의 성장호르몬 cDNA들과 유사성을 비교한 결과 무지개 송어 및 연어종들과는 66~67%, 농어류와는 85~87%, 틸라피아류와는 87~88%, tuna류와는 87~92%의 유사성이 펩타이드 수준에서 관찰되었다. 한편 대표형 GH transcript외에도 검출된 다른 GH transcript들은 5′쪽의 염기서열 결손 및 변이, frame-shift 현상을 나타낼 수 있는 ORF내의 염기서열 삽입, 3′쪽의 단일 염기서열의 변이 등을 나타내었다 (Fig. 2).

조직특이적 별현 분석

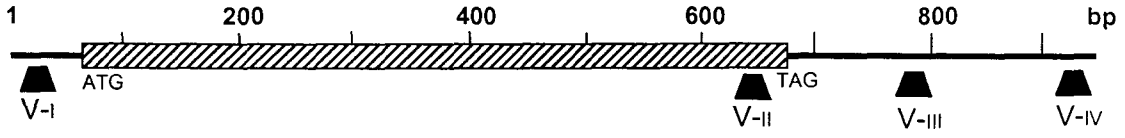
RT-PCR 분석 결과, 본 연구에서 탐색된 성장호르몬 transcript들은 뇌하수체 특이적인 발현양상을 나타내는 것으로 관찰되었다. 간 조직을 포함한 총 8종류의 조직을 대상으로한 RT-PCR 반응에서 오직 뇌하수체에서만 증폭된 산물이 검출되었으며 증폭된 산물의 전기영동상 길이 역시 예상되는 transcript 길이와 정확히 일치하는 것으로 나타났다 (Fig. 3A). Digoxygenin으로 표지된 성장호르몬 cDNA probe를 이용한 RNA dot blot 분석에서도 역시 뇌하수체 조직에서만 hybridiztion 양성 반응이 검출되어 본 연구에서 탐색된 transcript들이 뇌하수체 특이적인 성장호르몬 cDNA 유전자임을 잘 보여 주고 있다 (Fig. 3B).

고 찰

어류 성장호르몬은 약 22,000 dalton에 해당하는 단일 가닥 단백질 (single chain polypeptide hormone)로서 대부분 어종에서 뇌하수체 특이적으로 발현하며 체세포 성장이외에도 회유성 어종의 해수 적응 능력 (Young et al., 1989), 탄수화물 및 지방 대사 (Nam et al., 2001), 연골 성장 (Devlin et al., 1995) 등에도 널리 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 중요성 때문에 많은 유용 어종 대상으로 성장호르몬 유전자를 발굴하기 위한 활발한 연구가 진행되고 있고 특히 형질전환을 통한 고속성장 어류 개발의 핵심적인 유전자 소재로서 널리 이용되고 있으며 (Dunham and Devlin, 1999), 또한 일부 연어과 어종에서 성장호르몬 pseudo gene이 성 (sex)과 연관되어 있음이 밝혀지면서 분자생물학적인 성 판독

```
  1  GGCACGAGGCTGACCTAAGATCCGATAAAGCAGAACCTGAACCTGAACCAGAAGTGATCCCAGACCAGCC ATG GAC AGA GTT GTC CTC CTG   91
  1                                                                          M   D   R   V   V   L   L     7

 92 CTG TCG GTG GTG TGT CTG GGC GTC TCC TCT CAG CCG ATC ACA GAC GGA CGT CTG TTC TCC ATC GCT GTC GGC AGA  166
  8 L   S   V   V   C   L   G   V   S   S   Q   P   I   T   D   G   R   L   F   S   I   A   V   G   R   32

167 GTT CAA CAC CTC CAC CTG CTC GCT CAG AGA CTC TTC TCT GAT TTT GAG AGT TCT CTG CAA ACC GAG GAG CAA CGT  241
 33 V   Q   H   L   H   L   L   A   Q   R   L   F   S   D   F   E   S   S   L   Q   T   E   E   Q   R   57

242 CAA CTC AAC AAA ATC TTC CTG CAA GAT TTC TGC AAC TCT GAT TAC ATC ATC AGC CCC ATC GAC AAG CAC GAG ACC  316
 58 Q   L   N   K   I   F   L   Q   D   F   C   N   S   D   Y   I   I   S   P   I   D   K   H   E   T   82

317 CAA CGC AGC TCT GTG TTG AAG CTG TTA TCC ATC TCC TAT CGA TTG GTT GAG TCT TGG GAG TTT CCT AGT CGT TCC  391
 83 Q   R   S   S   V   L   K   L   L   S   I   S   Y   R   L   V   E   S   W   E   F   P   S   R   S   107

392 CTG TCT GGA GGT TCT GCT CCT AGA ATC CAG ATT TCC CCC AAA CTG TCC GAA TTG AAG ACG GGA ATC CTG CTG CTG  466
108 L   S   G   G   S   A   P   R   I   Q   I   S   P   K   L   S   E   L   K   T   G   I   L   L   L   132

467 ATA AAA GCC AAT CAG GAT GGA GCA GAT CTC TTC CCT GAT AGC TCC GCC CTG CAG CTG GCT CCT TAT GGA AAC TAC  541
133 I   K   A   N   Q   D   G   A   D   L   F   P   D   S   S   A   L   Q   L   A   P   Y   G   N   Y   157

542 TAT CAA AGT CTG GGA GCC GAT GAG TCG CTG AGA AGA ACA TAC GAA CTA CTG GCC TGT TTC AAG AAA GAC ATG CAC  616
158 Y   Q   S   L   G   A   D   E   S   L   R   R   T   Y   E   L   L   A   C   F   K   K   D   M   H   182

617 AAG GTC GAG ACC TAC CTG ACG GTG GCT AAA TGT CGA CTC TCT CCA GAA GCC AAC TGC ACC CTG TAG CCCCGCCTCTC  693
183 K   V   E   T   Y   L   T   V   A   K   C   R   L   S   P   E   A   N   C   T   L   *              203

695 TACTCTGAGGCCACGCCTCGTGTGGATGATGTAATCCTGTGTTTTCTGTAGCCCCGCCTCCATGTCATCTAACTCTGTTAACTAGCAATAGTGTTAGTG  792
795 TTAGGCTCAGTTCAGTGGTTTGTTGAGTGTCTCTGTGCTGATGATGAAATGTTTTCTGATGTTATGATGATGACAGTTGTGAACAGGAAGTGGTGTCAT  891
895 ACTGTCAAGATGTGAAATAAAGTGTTCTGTGTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                          948
```

Fig. 1. The complete nucleotide sequence of the main type of GH cDNA expressed in pituitary of greenling. Deduced amino acid sequences are shown with a single letter code below the corresponding codons. The oligonucleotide primers used for RT-PCR in analysis of tissue distribution were underlined. Polyadenylation signal sequences at 3'-end is shown in boldface letters.



V-I

```
N GGCACGAGG:::::CTGACCTAAGATCCGATAAAGCAGAACCTGAACCTGAACCAGAAG
I GGCACGAGGGAACAACTGACCTAAGATCCGATAAAGCAGAACCTGAACCTGAACCAGAAG
D GGCACGAGG:::::::::::CTAAGATCCGATAAAGCAGAACCTGAACCTGAACCAGAAG
D GGCACGAGG:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::CCAGAAG
```

V-II

```
N CTGTTTCAAGAAAGACATGCACAAG:::::::::::::::::::GTCGAGACCTACCTGA
I CTGTTTCAAGAAAGACATGCACAAGATGATGTTTGAGTTTACAGGTCGAGACCTACCTGA
```

V-III

```
N TGTCATCTAACTCTGTTAACTAGCAATAGTGTTAGTGTTAGGCTCAGTTCAGTGGTTTGT
D TGTCATCTAACTCTGTTAACTAGCAATAGTGTTAGTGTT:::::::TTCAGTGGTTTGT
P TGTCATCTAACTCTGTAAACTAGCAATAGTGTTAGTGTTAGGCTCAGTTCAGTGGTTTGT
                  *
```

V-IV

```
N CAGGAAGTGGTGTCATACTGTCAAGATGTGAAATAAAGTGTTCTGTGTTGCAAAAAAAAA
D & P CAGGAAGTGGTGTCATAGTGTCAA:::::::::::::::::::TGTGTTGCAAAAAAAAA
                  *
```

N: normal sequence I: inserted sequence
D: deleted sequence P: point mutated sequence

Fig. 2. Sequence variations of greenling GH transcripts. The variation includes sequence and length differences at 5'-end (V-I), additional insertion in ORF (V-II), and deletion and/or single nucleotide polymorphism at 3'-end (V-III & V-IV). Hatched box indicates the open reading frame of GH transcript.

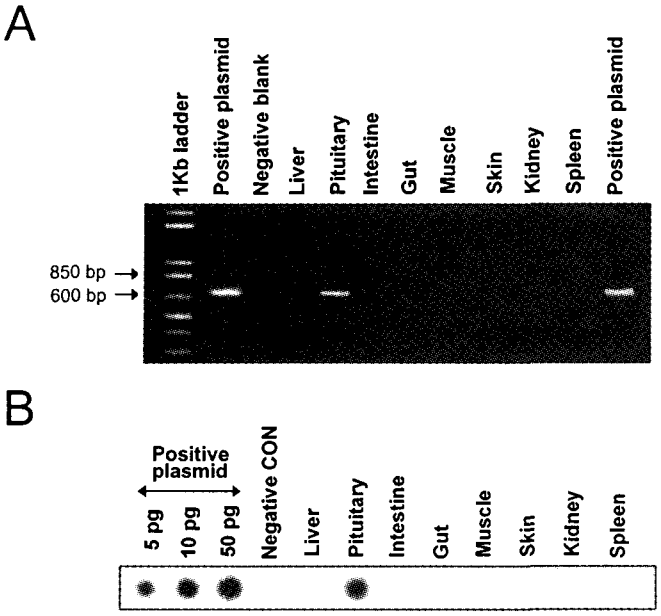


Fig. 3. Tissue distribution of GH transcripts. (A) RT-PCR analysis to show the pituitary-specific amplification. Primer sequences are shown in Fig. 2. (B) RNA dot blot assay with total RNAs (2 μg each) obtained from various tissue sources. Positive controls were made with 5~50 pg of plasmids containing full-length of GH cDNA. Negative CON was the 100 pg of plasmid vector containing no insert.

(molecular sexing)의 도구로도 중요시되고 있다 (Forbes et al., 1994).

쥐노래미는 우리나라 연안역에 널리 서식하는 주요 해산 품종으로서 산란 유도가 비교적 쉽고, 알의 크기가 매우 크고, 배발생 단계별 자세한 유전자 발현 관찰이 용이함에 따라 발생유전학적 형질전환 연구모델로서 많은 장점을 갖고 있을 뿐만아니라 최근 들어 양식 개발 대상으로서도 그 가치를 인정받고 있다. 따라서 본 연구에서는 쥐노래미를 해산어 분자육종 모델로 개발하기 위한 연구의 일환으로 본 종으로부터 성장 및 성숙 관련 발현 정보를 다량 포함하고 있으리라 판단되는 뇌하수체 조직으로부터 발현하는 유전자 정보를 library화하고 성장호르몬 cDNA 유전자를 발굴하고자 하였다.

쥐노래미 뇌하수체에서는 최소 3종류의 성장호르몬 transcript들간 변이가 관찰되었으며 가장 높은 빈도 (79%)로 발현하는 대표성 transcript 형태외에도 5′- 및 3′ 쪽의 염기서열 변이와 결실들은 물론 단일 염기서열 변이 역시 검출되어 흥미로운 결과를 나타내었다. 이는 기존의 어류 성장호르몬 염기서열을 보고하는 다른 논문들과는 달리 본 연구에서 성장호르몬 유전자 transcript들을 다량 확보함으로써 얻어진 결과로서 어류 성장호르몬 유전자의 발현 조절과 관련해서 흥미로운 연구 방향을 제공할 수 있다고 판단된다. 이러한 성장호르몬 transcript들간 다양성은 일반적으로 여타 다른 유전자들과 마찬가지로 하나의 성장호르몬 유전자 (genomic gene)에서 pre-mRNA가 합성된 후 post-transcriptional modification/editing 과정에서 형성된 alternative splicing의 산물로 판단되나 (Brett et al., 2000) 이들 서로 다른 transcript들이 어떠한 다른 생물학적인 미세 기능을 담당하는 지에 대해서는 향후 많은 연구가 이루어져야 할 것이다. 특히 본 연구에서 관찰된 ORF내에 frame-shift 현상은 매우 드문 경우로서 cDNA 클로닝 과정 중 발생한 오류일 수도 있으나 실제 쥐노래미 뇌하수체에서 유도된 alternative splicing의 산물일 경우, translation을 통해 3′쪽 아미노산 배열에 심각한 변화를 야기시키고 생물학적 기능을 손실하거나 또는 다른 기능을 갖는 단백질의 합성이 예상된다. 따라서 이들 변이에 대한 보다 자세한 추적을 위해 genomic fragment의 PCR typing, *in vitro* translation 및 proteome 추적 등에 관한 실험이 뒤따라야할 것으로 판단된다. Alternative splicing에 의한 유전자 발현은 proteome을 포함한 생체내 발현 산물의 다양성을 극대화하기 위한 기작으로 알려지면서 최근 많은 관심이 집중되고 있다 (Graveley, 2001). 인간의 성장호르몬의 경우 intron splice enhancer (ISE)이 관여하는 alternative splicing에 의해 최소 3가지 형태의 성장호르몬 transcript들이 관찰된 바 있으며 이들은 남성의 생식능력과 관계되는 것으로 알려지고 있다 (McCarthy and Phillips, 1998; Untergasser et al., 2000). 한편 어류에서도 하나의 유전자에 대해 중복된 EST 정보들이 축적되기 시작하면서 어류 유전자의 pre-mRNA editing에 관한 연구들이 이루어지고 있으며 이에 최근 모델 어류인 zebrafish에서 발생에 관여하는 유전자인 neogenin I (NeoI) 유전자의 alternative splicing이 보고된 바 있다 (Shen et al., 2002).

그러나 alternative splicing 가능성 이외에도 본 연구의 GH transcripts들간 변이가 mRNA가 아닌 gDNA 수준에서 야기되었을 가능성 역시 완전히 배제할 수는 없다. 본 연구에서 사용된 실험어, 쥐노래미가 연어종처럼 배수화 (i.e. genome tetraploidization)를 통해 진화해온 종은 아니나 틸라피아의 경우에서처럼 진화과정 중 유전체 (genome)내에서 성장호르몬 유전자의 duplication 등이 일어났을 가능성 (Ber and Daniel, 1993) 또는 잉어에서처럼 두 개의 성장호르몬 gDNA 유전자에 의한 서로 다른 GH mRNA들이 생산되었을 가능성 역시 향후 연구를 통해 규명해야만 할 것이다 (Chiou et al., 1990). 뿐만아니라 본 연구에서 검출된 성장호르몬내 단일 염기 변이성 (single nucleotie polymorphism)과 관련해서는 이들 변이 형태가 개체간 변이 인지 또는 개체내 transcript들간 변이인지를 규명함으로써 유전자 표지로서 활용 가능성 여부를 타진해야 할 것이다 (Gallo et al., 2002).

본 연구에서 얻어진 쥐노래미 성장호르몬 유전자의 정보를 바탕으로, 성장호르몬 유전자 genomic clone의 분리 및 구조 해석, 발현 기작 규명, 형질전환 벡터 개발 등이 가속화 될 것으로 판단되며 아울러 다양한 변이형태를 갖는 쥐노래미 transcript들의 생물학적 미세기능 추적 그리고 이들의 유전체내 존재 양상 등을 분석함으로써 쥐노래미 분자육종 기술 개발에 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

요 약

우리나라 주요 해산 어종인 쥐노래미 (*Hexagrammos otakii*)로부터 성장호르몬 유전자 cDNA를 클로닝하고 이의 염기서열과

발현 특성을 분석하였다. 뇌하수체 조직으로부터 cDNA library를 제작하였으며 membrane filter hybridization 및 expressed sequence tag기술을 이용하여 성장호르몬 cDNA transcript들을 대량 발굴하였다. 총 확보된 full-length clone 39개중 31개가 동일한 형태로 나타났으나 나머지 클론들에서는 5′쪽의 염기서열 변이, ORF내의 염기서열 삽입, 3′쪽의 염기서열의 변이 등이 검출되었다. RT-PCR과 RNA dot blot 분석을 수행한 결과 본 연구에서 얻어진 쥐노래미 성장호르몬 transcript들은 뇌하수체 특이적인 전형적인 어류 성장호르몬 발현 특성을 나타내었다.

참 고 문 헌

Agellon, L.B. and T.T. Chen. 1986. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. DNA, 5, 463~471.

Ber, R. and V. Daniel. 1993. Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. Gene, 125, 143~150.

Brett, D., J. Hanke, G. Lehmann, S. Haase, S. Delbruck, J. Reich and P. Bork. 2000. EST comparison indicates 38% of human mRNA contain possible alternative splice forms. FEBS Lett., 474, 83~86.

Chiou, C.-S., H.-T. Chen and W.-C. Chang. 1990. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). Biochim. Biophy. Acta, 1087, 91~94.

Devlin, R.H., T.Y. Yesaki, E.M. Donaldson, S.J. Du and C.L. Hew. 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52, 1376~1384.

Douglas, S.E., J.W. Gallant, C.E. Bullerwell, C. Wolff, J. Munholland and M.E. Reith. 1999. Winter flounder expressed sequence tags: establishment of an EST database and identification of novel fish genes. Mar. Biotechnol., 1, 458~464.

Dunham, R.A. and R.H. Devlin. 1999. Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness. In: Transgenic Animals in Agriculture: Murray J.D., G.B. Anderson, A.M. Oberbauer and M.N. McGloughlin (eds). pp. 209~229. CAB International, Wallingford, UK.

Forbes, S.H., K.L. Knudsen, T.W. North and F.W. Allendorf. 1994. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1628~1631.

Gallo, A., E. Thomson, J. Brindle, M.A. O'Connell and L.P. Keegan. 2002. Micro-precessing events in mRNAs identified by DHPLC analysis. Nucleic Acids Res., 30, 3945~3953.

Graveley, B.R. 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. Trends Genet., 17, 100~107.

Hinits, Y. and B. Moav. 1999. Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 173, 285~296.

McCarthy, E.M.S. and J.A. Phillips III. 1998. Characterization of an intron splice enhancer that regulates alternative splicing of human GH pre-mRNA. Hum. Mol. Genet., 7, 1491~1496.

Nam, Y.K. and D.S. Kim. 2001. Bioinformatics in fish: its present status and perspectives with particular emphasis on expressed sequence tags - brief review. J. Aquacult., 14, 9~16.

Nam, Y.K., J.K. Noh, Y.S. Cho, H.J. Cho, K.N. Cho, C.G. Kim and D.S. Kim. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Transgenic Res., 10, 353~362.

Nam, Y.K., Y.S. Cho, S.E. Douglas, J.W. Gallant, M.E. Reith and D.S. Kim. 2002. Isolation and transient expression of a cDNA encoding L-gulono-g-lactone oxidase, a key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis, from the tiger shark *Scyliorhinus torazame*. Aquaculture, 209, 271~284.

Shen, H., H. Illges, A. Reuter and C.A.O. Stuermer. 2002. Cloning, expression, and alternative splicing of neogenin 1 in zebrafish. Mech. Dev., 118, 219~223.

Young, G., B.T. Bjornsson, P. Prunet, R.J. Lin and H.A. Bern. 1989. Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol. Gene. Comp. Endocrinol., 74, 335~345.

Untergasser, G., M. Hermann, H. Rumpold, G. Pfister and P. Berger. 2000. An unusual member of the human growth hormone/placental lactogen (GH/PL) family, the testicular alternative splicing variant hPL-A2: recombinant expression revealed a membrane-associated growth factor molecule. Mol. Cell. Endocrinol., 167, 117~125.

2002년 9월 13일 접수
2002년 11월 25일 수리