

터봇(*Scophthalmus maximus*) 및 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 STC1 단백질과 삼투압차이에 따른 조직내 STC1 유전자 발현변화

신지혜 · 박우동 · *김대중 · *이철호 · *이채성 · **오달균 · 손영창
강릉대학교 · *국립수산과학원 · ***(주)리제론

서론

스타니오칼신(STC)은 어류의 신장 내에 매몰된 스타니우스소체에서 최초로 발견된 이량체 당단백질이며, 그 후 여러 조직에서 광범위하게 발현되고 있음이 알려졌다 (McCudden *et al.* 2001). 최근 포유류에서도 STC1과 STC2가 발견되었으며, 어류의 STC는 포유류의 STC1과 상동성이 높다. STC는 경골어류에서 칼슘과 인산염의 항상성을 유지하고, 포유류에서는 조골세포 활성화 단백질이라고도 알려져 있다 (Yoshiko *et al.* 1999). 본 연구에서는 다양한 STC의 기능을 밝히기 위하여 터봇(*Scophthalmus maximus*)과 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 STC1 cDNA의 염기서열 분석과 유전자재조합 단백질을 생산하고, STC1의 조직별 발현과 염분에 따른 발현 양상을 RT-PCR로 확인하였다.

재료 및 방법

1. 터봇과 넙치의 STC1 cDNA의 전체염기서열

터봇과 넙치의 스타니우스 소체에서 각각 mRNA를 추출 (QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)한 후, cDNA 합성 (First-strand cDNA Synthesis Kit, Amersham Pharmacia Biotech)을 실시하였다.

어류 STC1 염기서열을 기초로 하여 oligo primer를 제작하였다. 먼저 STC1의 partial cDNA를 PCR 방법으로 클로닝한 후, 5'- 및 3'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR 방법으로 STC1 cDNA의 전체 부분을 증폭하였다. 다음으로 각각의 PCR 산물을 cloning vector에 삽입하여 염기서열을 5'- 및 3'- 방향으로 각각 분석하였다.

2. 조직별 STC1 발현 및 염분에 따른 발현 변화 조사

터봇의 뇌하수체, 뇌, 심장, 신장, 간, 생식소, 근육, 스타니우스소체 조직에서 mRNA를 추출한 후 역전사반응으로 합성한 cDNA를 이용하여, RT-PCR 방법으로 조직별 STC1의 유전자발현을 확인하였다. 또한, 넙치를 32ppt, 25ppt, 20ppt, 15ppt, 10ppt의 해수에 각각 순차사육한 후, RT-PCR 방법으로 염분별 STC1의 발현정도를 확인하였다.

3. STC1 유전자재조합 단백질

신호서열을 포함한 터봇 STC1 번역틀내의 cDNA를 mammalian expression plasmid인

pcDNA3 (Invitrogen, USA) vector에 삽입하여, CHO 및 293T 세포주에 형질도입시키고 분비된 단백질을 분리/정제하였다. 단백질의 확인은 Western blotting 방법, 당의 수식여부는 de-N-glycosidase F처리로 조사하였다.

결과 및 요약

터봇의 STC1 cDNA의 전체 크기는 1246 bp 이며, 번역부위는 744 bp (248 aa)인 것을 확인하였다. 터봇의 STC1은 유럽산 이체류 *Platichthys flesus*과 상동성이 가장 높았으며 (86%), 포유류의 STC2보다 STC1과 유사하였다. 넙치의 전체 염기서열은 터봇과 그 크기가 비슷하였으며 (1338 bp), *Platichthys flesus*와 상동성이 가장 높았다 (95%). 조직별 STC1 발현을 RT-PCR로 확인한 결과, 스타니우스소체를 포함하여 조사한 모든 조직에서 STC1이 발현되어지는 것을 확인하였다. 아가미, 신장, 장에서는 환경수의 염분이 낮을수록 STC1의 발현이 감소되어지는 경향이 확인되었다. 포유동물 세포내에 STC1을 도입하여 단백질을 생산한 결과, STC1은 이량체의 당단백질이며 분비성 호르몬으로 확인되었다.

참고문헌

- McCudden, C. R., Kogon, M. R., DiMattia, G. E., Wagner, G. F. 2001. Novel expression of the stanniocalcin gene in fish. *J. Endocrinology* 171: 33-44.
- Yoshiko, Y, Son, A., Maeda, S., Igarashi, A., Takano, S., Hu J., Maeda, N. 1999. Evidence for stanniocalcin gene expression in mammalian bone. *Endocrinology* 140: 1869-1874.