

꼼치에서 특징적으로 발현되는 새로운 유전자 곱신의 분리 및 동정

송인선 · 이석근 · 손진기[†]

강릉대학교 해양생명공학과, [†]강릉대학교 치과대학 구강병리학교실

Molecular Cloning and Identification of Novel Genes, Gomsin, Characteristically Expressed in Snailfish, *Liparis tanakae*

In Sun Song, Suk Keun Lee and Jin Ki Son[†]

Department of Faculty of Marine Bioscience and Technology, [†]Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kangnung National University, Kangnung, Gangwon-do 210-702, Korea

ABSTRACT : In order to obtain the specific genes of snailfish a subtracted cDNA library was constructed, and analysed by sequencing and GenBank search. Among them C90-171 clone was turned out to be genes showing low homology and nonredundant genes. This novel clone was named Gomsin(C90-171). Gomsin was shown to be intensely expressed in the epithelial cells, some mesenchymal cells, and sheaths of muscle bundles in the result of immunohistochemistry. In the cross reaction assay of Gomsin antibody against various human tissues, the Gomsin was strongly expressed in the ductal and acinar cells of salivary glands, which was similar to the expression patterns of proline-rich proteins(PRP) of human. The antibody raised against the Gomsin was clearly cross-reacted with human salivary PRPs and also recombinant proteins of human PRPs in the Western blot and immunoprecipitation analysis. Contrast to the salivary PRPs, the Gomsin was not easily degraded in the mixed saliva, but rapidly attached on the cultured keratocytes *in vitro*. The simulated protein structure of Gomsin was similar to the whorled pattern of PRPs, even though the amino acid sequence of Gomsin was quite different from those of PRPs. These data suggest that the Gomsin is a characteristic matrix protein in the skin and body of snailfish, which is also utilized for the tissue protection in the similar way to the PRPs of human muco-secretory organs.

Key words : Snailfish, Novel gene, Gomsin, PRPs.

요 약 : 점액질이 풍부한 꼼치 조직에서 NIH 3T3 세포주를 이용하여 subtracted cDNA 라이브러리를 얻어 200례의 클론을 제작하였다. 이 클론 중에서 비반복성 유전자를 선택하고, RNA *in situ* hybridization을 실행하여 꼼치 조직에서 특이하게 발현되는 곱신 클론(C90-171)을 선택하였다. 이 클론은 사람의 타액선 조직에서도 특이하게 발현되는 유전자로서 이를 확인하기 위하여 C90-171(곱신) 항체를 제작하였다. 꼼치의 cDNA 라이브러리에서 곱신의 항체를 통하여 스크리닝한 결과 PRP(proline-rich protein)와 가장 많이 교차반응하며, 면역조직화학적 염색으로 PRP와 유사한 양성반응으로 나타나 PRP와 유사한 기능을 하는 단백질로 사료된다. 또한 타액 내에서의 꼼치 단백질의 분해에 대한 실험결과 거의 분해가 일어나지 않는 것으로 보아, 곱신은 꼼치의 몸통을 보호하는 유전물질일 뿐만 아니라, PRP와 유사하게 조직을 보호하는 안정된 새로운 기능성 단백질로 사료된다.

서 론

어류에서 유전자와 관련한 연구는, 이미 다른 생물에서 밝혀진 특정 유전자의 유사성(homology)을 대상으로 하고 있는 연구와(Amemiya et al., 1999; Davey et al., 2000; Katagiri et

al., 1999; Lee et al., 2000; Murphy et al., 2000; Robertsen et al., 1997; Rogers et al., 2000; Stegeman, 2000; Touhata et al., 2001; Wang & Gong, 1999), 미토콘드리아에서의 특정 DNA의 염기 서열과 아미노산 배열을 비교 분석하여 어류를 계통발생학적으로 구분하는 연구가 진행되었다(Akihito et al., 2000; Mitsuo et al., 2001; Rasmussen & Arnason, 1999; Sih et al., 2000; Tohyama et al., 2000; Tokita et al., 2001).

꼼치는 경골어강(Osteichthyes), 쏨뱅이목(Scorpaeniformes), 꼼치과(Liparidae)에 속하는 어류로서 우리나라 전 해역과 일본, 동중국해에 분포한다(정, 1977). 꼼치는 주로 수심이 80~300m 되는, 바닥이 펄질인 곳에서 서식하는 심해어로서, 12

*본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 지원사업(R11-2002-001)지원으로 수행되었음.

[†]교신저자: 강원도 강릉시 지변동 123, 강릉대학교 생명과학대학 해양생명공학부, (우) 210-702, (전) 033-640-2411, (팩) 033-640-2410, E-mail: sonjk@kangnung.ac.kr

월에서 3월에 걸쳐 산란을 위해 연안으로 이동한다. 수컷이 암컷보다 비교적 크며, 체장은 30~40cm이다. 몸은 전방으로 두툼하고 꼬리부위는 빈약하다. 주둥이가 작고 뭉뚝하며 변형된 방추형 모습을 띠고 있다. 그리고, 아가미 형태, 지느러미 구조, 머리와 몸통의 뼈대구조가 유연한 어류이다. 이러한 꼼치과 어류는 전 세계적으로 약 177종(21속)이 서식하고 있는 것으로 알려져 있고(Nelson & Joseph, 1994), 우리나라에서는 지금까지 총 7종(2속)이 보고되어 있다.

꼼치에 대한 연구는 심해어라는 특성 때문에 분류학적인 연구가 주로 이루어지고 있다(Busby & Chernova, 2001; Matallanas & Pequeño, 2000). 최근, 꼼치에서 항동결 단백질을 추출한 연구(Evans & Fletcher, 2001)가 보고되고 있으나, 분자생물학적인 연구로 유전자를 검색하고 그 특징을 밝히는 연구는 아직 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 선택된 클론이 proline-rich proteins(PRP)와 유연관계가 있는 것으로 나타나, 상호 유연관계를 각각의 항체로 면역조직화학적 방법과 Western blot을 실시하고 가상의 단백질 구조를 만들어 비교 분석하여, 꼼치에서 새로운 특이 유전자를 얻어냄과 동시에 그 유연관계를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. cDNA 라이브러리 제작

신선한 꼼치 조직을 GTC(4.0M guanidinium thiocyanate, 0.1M Tris-Cl(pH 7.5), 1% β -mercaptoethanol) 용액과 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25 : 24 : 1) 그리고, cesium chloride-EDTA 용액 [96.0 g CsCl₂ in 100mL DEPC(Diethylpyrocarbonate) H₂O, 0.01M EDTA, pH 7.5]을 이용하여 total RNA를 얻었다. Oligotex(Qiagen, CA, USA)를 이용해서 mRNA를 순수 분리한 후, Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV) reverse transcriptase(Stratagene, CA, USA)로 single strand cDNA를 만들고 RNase H(1.5U/ μ L)와 DNA polymerase I(9.0U/ μ L)을 이용해서 second strand cDNA를 제작하였다. 이 cDNA는 Uni-ZAP XR 벡터를 이용하여 subtracted cDNA 라이브러리를 제작하였다.

2. 클로닝과 염기서열 분석

꼼치의 추출된 cDNA 라이브러리에서 배양된 클론 중 모두 200개 cDNA 클론을 선택하고, 각각의 클론을 ALF-express(Pharmacia Biotech, CA, USA)의 autocycle sequence kit를 이용하여 염기서열을 얻어냈다. 여기서 얻은 염기서열 분석 결과를 NCBI(National Center for Biotechnology Information,

USA)의 Blast 검색 프로그램을 통하여 유사성 검색을 하고, 유사성이 적은 유전자는 RNA *in situ* hybridization을 시행하였다.

3. RNA *in situ* hybridization

꼼치에서 분리된 곰신 클론과 사람의 악하선 조직에서 분리된 PRP 클론으로 사람의 악하선 조직에서 발현되는 양상을 알기 위하여, 사람의 악하선 조직을 4% 중성 paraformaldehyde로 고정시킨 후 파라핀 블록을 만들어 4 μ m 두께로 절편하여 silanized 유리 슬라이드에 부착시켰다. 그리고, RNA *in vitro* transcription 반응[DNA template(270 μ g/mL), 10 \times reaction 완충액(2 μ L), RNase inhibitor(1 μ L), dNTP(DIG-dUTP) mixture(1 μ L), T3 또는 T7 RNA polymerase(2 μ L)]으로 각 클론의 RNA 프로브를 제작하였다. RNA *in situ* hybridization은 Lee 등(2001)의 방법으로 실시하였다.

4. 단백질 특색 검색 및 가상 단백질 구조

cDNA 염기서열을 바탕으로 하여, 클론의 가상 단백질 구조를 제작하는 유닉스 컴퓨터의 Sybyl 프로그램(버전 6.6)에 아미노산 서열을 셋팅한 다음, 단백질 구조를 관찰하였다. 이때 결합에너지를 최소화하기 위한 컴퓨터 환경설정은 다음과 같이 설정하였다. Method는 Powell로 하고, Termination Gradient는 0.01Kcal/(mol*A)로 하였으며, Max Iteration은 1,000,000으로 하였다. Energy Setup에서 Force Field는 Kollman Unite로 하였고, Charges는 Kollman으로 하여 3일간 gradient가 0.01 Kcal/(mol*A)까지 떨어지도록 진행시켜 가상의 단백질 구조를 입체적으로 얻었다.

5. 항체 제작 및 면역조직화학적 염색

RNA *in situ* hybridization에서 상피조직, 근육조직 그리고 섬유기질 조직 등에 양성반응을 보이는, 곰신 클론을 선택하고, 여기서 얻은 추정 아미노산 서열을 이용하여 합성 펩타이드(RTCNYCTEQTVMLWWFSE)를 만든 다음 토끼(English-spot)를 이용하여, polyclonal 항체(Gomsin polyclonal antibody; 이하 곰신 항체라 함)를 제작하였다. 이렇게 얻은 곰신 항체를 이용하여 꼼치 조직과 사람의 악하선 조직에 각각 특이한 반응을 보기 위하여 면역조직화학적 반응으로 관찰하였다. 면역조직화학적 염색은 꼼치 조직과 사람의 악하선 조직에 토끼에서 얻은 항체로 DAKO LSAB[®] kit(DAKO, Denmark)를 이용하여 streptavidin- peroxidase 방법으로 면역조직화학적 염색을 하였다.

6. 단백질 two dimensional gel 및 Western blot

폼치 조직을 protein 용액 200 μ L(250 μ g/mL)를 rehydration 완충액(9M Urea, 4% CHAPS, 100mM dithiothreitol, carrier Ampholytes 0.2%, bromophenol blue 0.001%)에 넣고, immobilized pH gradient strip(IPG strip; pH 3~10; BioRad, CA 163~2007, USA)을 이용하여 rehydration시켜, Isoelectric focusing (IEF)을 실시하였다. 20°C, 250V에서 15분 동안 염분을 제거하고, 20°C에서 250V에서 10,000V까지 5시간 동안 램핑시켰다. 그리고 나서 20°C에서 60,000 VH(voltage \times hour)까지 포커싱을 실시하였다. 포커싱을 마친 후, SDS-PAGE를 실시하였다(Piñeiro C et al., 1999; Hoover GJ et al., 1998). 전기영동을 마친 후, Western blot으로 관찰하였다.

7. Immunoprecipitation

곰신 항체로, immunoprecipitation하여 얻은 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하여, transfer membranes(PVDF, millipore, USA)에 blotting한 후, 곰신 항체로 hybridization시킨 후, DAKO LSAB[®] kit(DAKO, Denmark)를 이용하여 streptoavidin-peroxidase 방법으로 membrane에 hybridization을 하였고, 항원 multiple sites에 결합하게 하는 방법으로, 항원에 가장 결합력이 좋은 곰신 항체를 이용하여 곰신 클론의 크기를 측정하였다.

8. 곰신 클론의 재조합 단백질

곰신의 재조합 단백질의 발현을 알아보기 위하여, 폼치에서 얻은 클론을 5'쪽과 3'쪽에 프라이머 C90-171-1 (GAGGG-GATCCGGAAGTTGCTCTTCGCTTCGA)과 C90-171-2(GAGGAAGCTTCGCTACTGCCCGATTTGACC)를 고안하여 프라이머 제작기로 제작한 후, PCR을 실시하였다. 이렇게 증폭된 cDNA를 5'쪽과 3'쪽을 각각 제한 효소 *Hind*III와 *Bam*HI으로 각각 소화시킨 후, pQE-30(Qiagen, CA 33303, Germany) 벡터를 이용하여 형질전환시켜 배양 후, IPTG를 이용해서 단백질의 발현을 증가시켜 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후, Western blot으로 재조합된 단백질의 크기를 측정하였다.

9. 곰신 항체를 이용한 유전자 스크리닝

앞서 제작된 사람의 악하선 조직의 cDNA 라이브러리와 폼치의 몸통 조직의 cDNA 라이브러리에 곰신 항체를 hybridization시키고, Western blot에서 이용했던 DAKO LSAB[®] kit(DAKO, Denmark)와 Streptoavidin Magnetic Particles(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)에 반응시켰고, 여기서 얻어진 라이브러리를 ampicillin-LB agar(10g tryptone, 5g yeast extract, 5g NaCl, 1mL 1N NaOH, in 1L H₂O, 100 μ g/mL am-

picillin)에 배양하는 방법으로 스크리닝을 실시하였다.

10. 재조합 PRPs와 acidic PRP의 단백질 구조

위의 방법으로 사람의 악하선 cDNA 라이브러리와 폼치 조직의 cDNA 라이브러리에서 유전자들을 스크리닝한 결과, 사람의 악하선 cDNA 라이브러리에서 PRP가 가장 많이 분리되었다. PRPs는 전기영동적 및 화학적 특성에 따라 acidic, basic, glycosylated PRPs(aPRP, bPRP, gPRP)로 분류되고 있다(Joo, 2001). 이들 PRPs 중, 곰신 단백질과 유사한 가상의 단백질 구조를 찾기 위하여, 곰신 단백질 아미노산 서열로 가상의 단백질을 만들 때와 같은 방법으로 세 종류의 PRP의 아미노산 배열을 바탕으로 가상의 단백질 구조를 제작하였다.

11. 타액 내에서의 곰신 단백질의 분해

사람의 타액과 이하선을 얻어낸 다음, 곰신 단백질을 SDS loading 완충액(0.06M Tris-Cl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 0.1M DTT)과 혼합하고 끓는 물에서 5분간 끓인 후, 각각 SDS-PAGE를 실시하였다. 사람의 타액 내에서의 곰신 단백질의 분해를 관찰하기 위하여, 타액과 곰신 단백질(1:1)을 혼합하여, 30분간 실온에 둔 다음, 앞 샘플과 마찬가지로 SDS loading 완충액과 혼합하여 끓는 물에서 5분간 끓인 후, 각각 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동이 끝난 후, Western blot으로 각각의 밴드를 확인하였다.

결 과

1. RNA *in situ* hybridization 관찰

1) 폼치 조직

Subtracted cDNA 라이브러리에서 얻은 비반복성 유전자의 클론들을 폼치의 몸통 조직에 RNA *in situ* hybridization을 한 결과, 곰신 클론 C90-171은 상피조직, 근육조직 그리고 섬유기질 조직에 널리 강한 양성반응을 나타냈으며 교원피 조직에서도 양성반응을 나타냈다. 특히, 상피세포에서 매우 강한 양성반응이 관찰되었는데 기저막 부위에 있는 섬유성 세포에서는 뚜렷한 양성반응이 관찰되었다. 한편, 근육다발 내부에서도 흔하게 강한 양성반응이 관찰되었다.

2) 사람의 악하선 조직

사람의 악하선 조직에 곰신 클론의 RNA 프로브를 만들어 사람의 악하선 조직에 RNA *in situ* hybridization을 실시하였고(Fig. 1-1a, 1b), 사람의 악하선 조직에서 클로닝한 유전자중

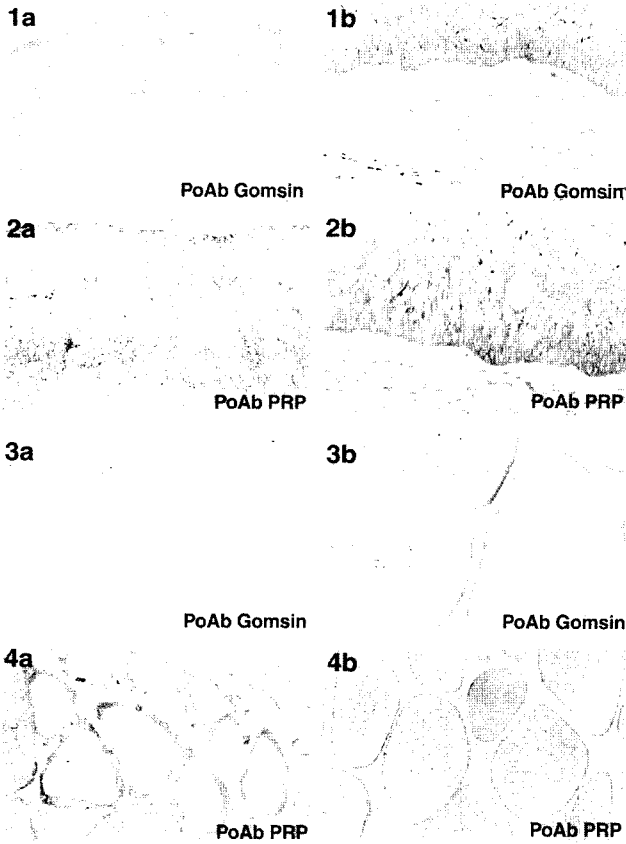


Fig. 1. Comparison of immunohistochemical stain between Gomsin polyclonal antibody and proline-rich protein polyclonal antibody in snailfish tissues. 1a(×200) - b(×400): Gomsin polyclonal antibody stain in snailfish skin. 2a(×400) - b(×400): PRP polyclonal antibody stain in snailfish skin. 3a(×100) - b(×200): Gomsin polyclonal antibody stain in snailfish muscle. 4a(×100) - b(×200): PRP polyclonal antibody stain in snailfish muscle.

aPRP의 유전자로 확인된 클론을 선택하여 RNA *in situ* hybridization을 실시한 결과(Fig. 1-2a, 2b), 두 클론 모두 타액선의 도관 세포와 선포 세포에서 전반적인 양성반응이 나타났으며, 장액성 선포 세포가 점액성 선포 세포보다는 강한 양성반응이 관찰되었다. 도관 세포에서는 선조관, 분비관 모두에서 양성반응이 관찰되었으며, 기저세포보다는 관강 세포에서 좀 더 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 가상의 단백질 구조 관찰

RNA *in situ* hybridization을 통해 선택된 클론에서 C 말단 펩타이드로 추정되는 아미노산 서열을 바탕으로 단백질 구조를 컴퓨터 시뮬레이션을 통하여 제작하였고(Fig. 2), 곰신 단백질을 인식하는 항체를 사용하여 사람의 악하선 cDNA 라이브러리를 스크리닝한 결과, PRPs가 가장 많이 클로닝

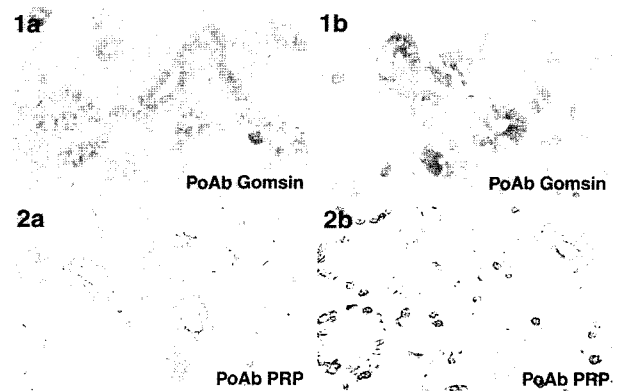


Fig. 2. Comparison of immunohistochemical stain between Gomsin polyclonal antibody and PRP polyclonal antibody in the human submandibular gland tissues. 1a-b(a:×100, b:×200): Gomsin polyclonal antibody stain in the human submandibular gland tissues. 2a-b(a:×100, b:×200): PRP polyclonal antibody stain in the human submandibular gland tissues.

되어(17.5%), PRPs(aPRP, bPRP, gPRP) 중 곰신의 가상 단백질 구조와 유사한 aPRP를 선택하여 가상의 단백질 구조를 제작하여 비교 관찰하였다(Fig. 2).

1) 꿈치

클론의 정확한 염기서열을 확인한 후 예상되는 아미노산 배열을 관찰하였는데, C90-171 클론은 C 말단 118개의 추정되는 아미노산 배열의 단백질 구조를 가상하여 관찰한 결과, 4부분의 나선형 구조가 관찰되었고, C 말단부분도 acidic PRP와 유사한 나선구조가 나타났다. 특히 한 부분은 다른 어류에서도 나타나는 CXXC의 zinc finger motif를 갖고 있었으며, 4개의 나선 구조가 중심을 향하여 둘러싸여 있는 구조를 보였다. 특히 N 말단 염기서열이 serine, threonine이 풍부하며 친수성인 아미노산으로 구성되어 있으며, 4부분의 나선 구조는 leucine, alanine, tryptophan 등의 소수성인 아미노산으로 이루어져 있었다. 전체적으로 leucine이 가장 많은 아미노산으로 배열되어 있었고, leucine zipper-like와 같은 아미노산 배열로 나타났다. 특히 이 펩타이드 구조는 leucine zipper-like와 같은 동시에 leucine rich protein이기도 하다(Figs. 9, 10a).

2) aPRP

aPRP의 아미노산 서열을 바탕으로 하여 가상 단백질 구조를 관찰하였다(Fig. 2b). aPRP는 소수성 아미노산과 친수성 아미노산이 각각 62개와 105개의 아미노산으로 총 167개의 아미노산 배열로 되어 있다. casein kinase II phosphorylation site와 1개의 N-myristoylation site가 있으며 pI값은 4.47로 나

타나고 있다. N 말단에는 선형모양이 나타나고 있으며 C 말단 쪽에는 꼬치 클론과 비슷한 나선 구조를 이루고 있다. 2개의 나선 구조를 갖고 있으며 그 중 하나는 C 말단 부분에 위치해 있다. 아미노산 배열을 보면 C 말단 쪽에서 PQQPPQGG가 6번 반복해서 나타나고 있으며 그 사이에 PPPQGGK가 4번 반복해서 나타나고 있다. proline이 다른 아미노산 배열에 비해 많이 나타나고 있으나 전체 아미노산 배열 중 친수성 아미노산이 63%를 차지하고 있다.

3. 면역조직화학적 연구

곰신 항체를 이용하여, 꼬치 조직과 사람의 악하선 조직에 각각 면역조직화학적 염색을 실시하였고, 사람의 타액에 많은 PRP를 이용하여 꼬치에서 실시한 방법으로 항체를 얻어 (Joo, 2001), 꼬치 조직과 사람의 악하선 조직에 각각 면역조

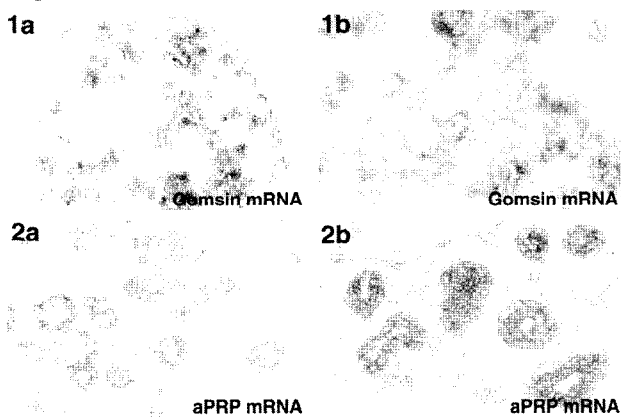


Fig. 3. Comparison of RNA *in situ* hybridization between Gomsin RNA probe and PRP RNA probe in the human submandibular gland. 1a(×40) - b(×100): Gomsin RNA probe, 2a(×100) - b(×200): PRP RNA probe.

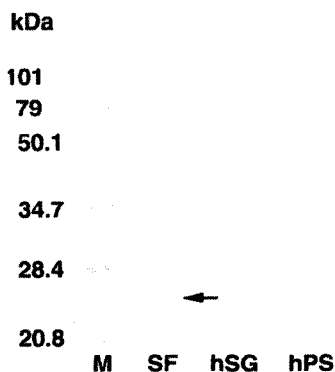


Fig. 4. Western blot analysis with in snailfish protein(SF) and human submandibular gland protein(hSG) and human parotid saliva protein(hPS).

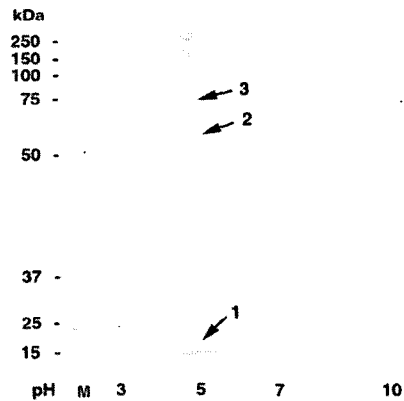


Fig. 5. Two-dimensional electrophoresis by isoelectric focusing and electrophoresis with snailfish protein and then Western blot and stain with Gomsin polyclonal antibody. 1: precursor protein, 2-3: conjugated proteins.

직화학적 염색을 하여 비교 분석한 결과(Fig. 3), 꼬치 조직에서는 상피조직, 근육조직 그리고 섬유기질 조직에 널리 강한 양성반응을 나타냈으며, 특히 꼬치의 RNA *in situ* hybridization과 거의 비슷한 양상으로 피하조직에서 두 항체 모두 유사한 양성반응을 보였다(Fig. 4-1b, 2b). 또한 근육의 피막조직에서도 두 항체 모두 강한 양성반응을 보였다(Fig. 4-3a~4b).

사람의 악하선 조직에서도 RNA *in situ* hybridization과 거의 비슷한 양상으로, 곰신 항체로 염색한 조직(Fig. 5-1a, 1b)과 PRP 항체로 염색한 조직(Fig. 5-2a, 2b) 모두, 도관 세포와 선조관 세포에서 강한 양성반응을 나타냈으며, 장액성 세포 세포에서도 중등도의 양성반응을 나타내었다.

4. Western blot 및 2D-전기영동

꼬치 단백질을 Western blot한 결과, 약 25 kDa 정도로 나타났다(Fig. 6). 또한 사람의 악하선 타액에서는 90 kDa과 45 kDa에 나타났으며, 이하선 타액에서는 약 40 kDa으로 나타났다(Fig. 6).

꼬치 단백질은 isoelectric point(pI)가 3~10사이에서 넓은 분포를 보였으며, Western blot한 결과, 주로 pI가 5인 부근에서 발현이 많이 되었고, 70 kDa과 50 kDa 그리고 15 kDa 부근에서 발현되었다(Fig. 7-1~3).

5. immunoprecipitation

꼬치의 단백질에서 곰신 항체로 immunoprecipitation을 하고 SDS-PAGE를 하여 Western blot한 결과, 48 kDa 부근에서 항체 밴드가 나타났고, 약 100 kDa 부근에서 강한 양성반응

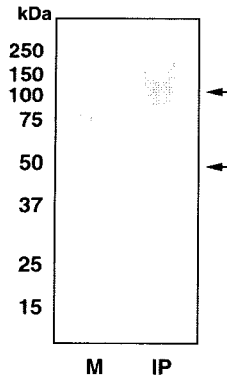


Fig. 6. Immunoprecipitation of snailfish protein and Western blot with Gomsin antigen and Gomsin polyclonal antibody complex. M: marker, IP: Gomsin antigen and Gomsin polyclonal antibody complex by immunoprecipitation. Upper arrow is Gomsin and polyclonal antibody. Lower arrow is polyclonal antibody.

의 밴드가 나타나(Fig. 3), 곰신의 크기가 50 kDa 안에 속하는 것으로 추정하였다. 샘플을 SDS loading 완충액에 넣고, 끓는 물에서 5분간 끓인 후 SDS-PAGE를 실시하였으나, 밴드의 발현 정도로 보아 곰신과 항체가 잘 분리되지 않은 것으로 추정된다.

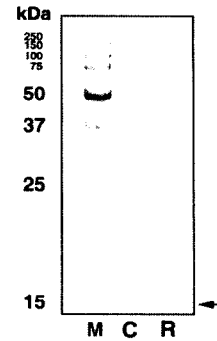


Fig. 7. Gomsin recombinant protein from C90-171 clone of snailfish clones and Western blot and stain with streptavidin-peroxidase method by Gomsin polyclonal antibody. M: marker, C: control, R: recombinant protein.

6. 곰신 항체에 교차반응을 보이는 단백질 유전자의 클로닝

곰신 항체를 이용하여, 사람의 악하선 조직의 mRNA로 제작한 cDNA 라이브러리(C75, C76)와 곰치의 mRNA에서 제작한 cDNA 라이브러리(C90)를 스크리닝한 결과, 총 60개의 클론 중에서 PRP가 7개로 가장 많이 클로닝되었으며, 이외에 histatin이 4레, cystatin이 1레, statherin이 1레가 클로닝되었다

Table 1. Screening in the human submandibular gland clones(C75, C76) and snailfish clone(C90) by Gomsin polyclonal antibody

cDNA	No.			cDNA	No.			
	clone	C75	C76		C90	clone	C75	C76
Thioesterase	9			Lectin	1			
Myosin	8			Statherin	1		1	
Creatine kinase	7			Secretory carrier membrane protein	1			
Skeletal alpha-actin	6			Keratin type 1	1			
Parvalbumin beta	5			Desmin	1			
Ribosomal protein	5	2	1	Chloroplast	1			
Type I collagen	3			Muscle tropomyosin	1			
Muscle troponin	3			ATP synthase	1			
Dopamine receptor	2			Ribonucleoprotein	1			
Histatin	2	3	1	Non-redundant		15	4	10
Heat shock protein	2			The rest gene		A	B	C
Cystatin	1		1	Total	62	30	10	20
The rest gene								
A(C75)			B(C76)			C(C90)		
1. prolactin-induced protein			1. prolactin-induced protein			1. 3-ketoacyl-ACP synthase(Kas4)		
2. proline-rich protein(7case)			2. proline-rich protein			2. interphotoreceptor matrix proteoglycan 200 (IMPG2)		
3. amylase								
4. Human mitochondrion								
10			2			2		

(Table 1). 이처럼 다른 클로닝보다 PRP가 다른 클론에 비해 많이 나타났다.

이외에도 C75와 C76의 라이브러리에선 prolactin-induced protein, amylase, human mitochondrion, prolactin-induced protein 이 각각 1례씩 나왔으며, C90의 라이브러리에서도 3-ketoacyl-ACP synthase(Kas4)와 interphotoreceptor matrix proteoglycan 200(IMPG2)이 각각 1례씩 나타났다. 이외에도 아직 알려지지 않은 클론이 19개가 나타났다. 이러한 결과로 곱신 항체가 PRP와 높은 빈도로 교차반응하는 것으로 나타났다(Table 1).

7. 재조합 단백질 관찰

1) 꼼치

expression 벡터인 pQE-30(Qiagen, CA 33303, Germany) 벡터로 곱신의 재조합 단백질을 제작한 다음, SDS-PAGE를 거쳐 Western blotting하여 곱신 항체에 hybridization한 결과, 15 kDa 부근에서 하나의 밴드로 나타났다(Fig. 8).

2) PRP

acidic PRP(aPRP)와 basic PRP(bPRP)의 재조합된 단백질을 SDS-PAGE를 실시하여 위와 같은 방법으로 blotting한 후, 곱신 항체로 hybridization시킨 결과, 20 kDa 부근에서 하나의 밴드로 나타났다(Fig. 9).

8. 타액 내에서의 곱신과 PRP의 특성

사람의 타액 내에서의 곱신 단백질이 분해되는 것을 관찰

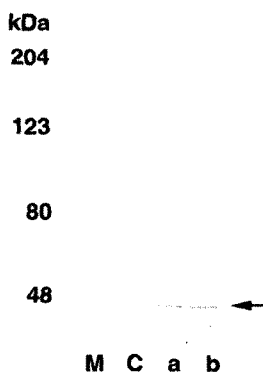


Fig. 8. Recombinant protein of acidic proline-rich protein and basic proline-rich protein from human protein. Western blot stain with streptoavidin-peroxidase method by Gomsin polyclonal antibody. M: marker, C: control, a: acidic proline-rich protein, b: basic proline-rich protein.

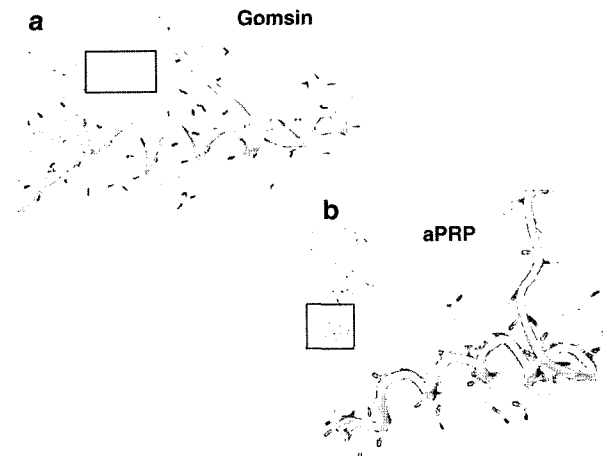


Fig. 9. Protein structure simulation of Gomsin and aPRP. High magnification of C-terminal a: Gomsin, b: aPRP.

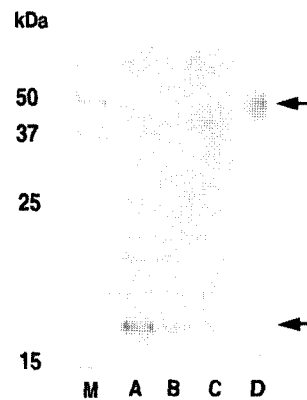


Fig. 10. Gomsin degradation assay by Western blot. a: mixture of Gomsin and human saliva, b: Gomsin c: human saliva, d: human parotid saliva.

하기 위하여 Western blot을 실시한 결과, 타액과 곱신 단백질을 섞은 후 일정시간 배양한 경우에도 곱신 단백질이 타액내 풍부한 단백분해효소에 의하여 분해되지 않고 뚜렷한 단일 밴드로 나타났다. 이에 비하여 사람의 타액내 PRP는 구강내로 분비되기 전의 이하선 타액에서는 뚜렷한 PRP 밴드가 관찰되었으나 구강내 타액에서는 PRP 밴드가 거의 발견되지 않았다(Fig. 10).

고찰

꼼치 조직에서 새로운 유전자를 얻기 위하여, mRNA에서 cDNA를 제작하여 subtraction법을 거쳐 클로닝하는 방법으로 꼼치의 유전자를 분석한 결과, ribosomal protein, secretory carrier membrane protein, keratin, lectin, desmin 등과 같은 일

반적인 단백질뿐만 아니라 histatin, cystatin, statherin 등과 같은 사람의 악하선 조직에서 주로 나타나는 특수한 단백질 (Castagnola et al., 2001; Nam et al., 1997) 등이 다수 발견되고 있어, 꼼치는 해양동물에서도 간질조직의 성분이 잘 발달되어 있는 동물임을 알 수 있었다(Table 1).

곰신에서 C 말단부분의 특징적인 유전물질을 검색함으로써, 비교적 C 말단 부분의 아미노산은 유전물질의 특이한 기능과 관련되는 부분이 많고, 대략 50 아미노산 이상의 아미노산 배열만 가지면 전체 단백질 구조의 주요 motif를 파악할 수 있기 때문에, 클로닝을 통한 염기서열 분석과 Northern blot, RNA *in situ* hybridization, 가상의 단백질 구조를 분석하고, 주요 motif를 파악함으로써 새로운 유전자의 역할을 추측할 수 있었다.

이 유전물질의 가상 단백질 구조를 보면, 4개의 나선형 구조를 이루고 있었는데, 이 나선형 구조 일부가 zinc finger motif 뿐만 아니라 4개의 나선 형태가 중앙부위를 관상으로 둘러싸는 형태를 이루고 있었고, leucine zipper-like와 같은 아미노산 배열로 나타났으며 이와 동시에 leucine rich protein으로 나타났다.

이 클론의 특성을 알아보기 위하여, 점액질이 풍부한 사람의 타액과 관련이 있을 것으로 사료되어 토끼에서 제작된 곰신 항체로 사람의 악하선 조직의 cDNA 라이브러리에서 스크리닝을 하여 클론을 얻었다. 그 결과 PRPs가 가장 많이 클로닝되어 나왔다. 이를 바탕으로 사람의 악하선 조직에서 RNA *in situ* hybridization을 실시하였고, PRP의 염기서열을 조사한 뒤 가상의 단백질 구조를 만들어, 꼼치의 곰신 클론의 가상 단백질 구조와 비교 분석하였다. PRPs에서 알려져 있는 3분류의 PRPs(aPRP, bPRP, gPRP)와 비교 분석한 결과 곰신 클론의 가상 단백질 구조는 aPRP의 구조와 유사한 것을 볼 수 있었다(Fig. 2).

사람의 악하선 조직에 풍부하게 존재하는 aPRP의 가상의 단백질 구조를 보면 N 말단 부분은 꼼치와는 달리 커다란 원형 구조를 이루고 있는 반면, C 말단 부위는 전형적인 나선 구조로 되어 있고(Joo, 2001), 꼼치의 C 말단 부위 구조와 흡사한 형태를 보이고 있었다(Fig. 2). 그러나 꼼치 클론의 아미노산 서열과 aPRP의 아미노산 서열에 있어서 일치하는 점은 찾아 볼 수가 없었다.

이렇게 아미노산 서열은 다르지만, 꼼치 조직과 사람의 악하선 조직에서의 RNA *in situ* hybridization을 한 결과와(Song et al., 2000), 곰신 항체와 PRP 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 통한 관찰에서는 거의 비슷한 양상으로 상피조직, 근육조직 그리고 섬유기질 조직에도 널리 강한 양성반응을

나타냈으며, 사람의 악하선 조직에서는 선조관세포에서 강한 양성반응을 나타냈으며, 장액성 선세포에도 중등도의 양성반응을 나타내었다. 그리고 Western blot 등을 통한 관찰로 상당한 유사성을 발견할 수 있었다.

단백질의 외모는 단백질 기능 자체에 매우 중요한 위치를 차지하고 있는데, 단백질 서열이 다르더라도 외모가 비슷하면 비슷한 기능을 하는 것으로 알려져 있어(Via et al., 2000), 이 두 클론 사이에도 비슷한 기능을 하리라 예측되었다.

이처럼, 꼼치의 몸통에서 다량으로 발견되는 꼼치 클론인 곰신은 leucine, threonine, alanine 등이 풍부한 물질로서, 사람의 타액에서 풍부하게 존재하는 PRP와 유사한 면역반응을 보이며, 사람의 타액선 조직 내에서도 PRP와 교차반응을 하며, 사람의 타액선 내에서의 PRP와 유사한 조직내 분포를 나타냈으며, 곰신의 가상 단백질 구조와 사람의 타액에서 얻은 PRP의 가상 단백질 구조와 유사하게 나타나(Fig. 2), PRP와 유사한 기능을 하는 단백질로 사료되었다.

따라서 본 연구에서는 꼼치의 몸통에서 풍부하게 발견되는 C90-171 물질을 곰신(Gomsin)이라 명명하게 되었으며 이 곰신은 PRP protein의 기능과 유사하여, 꼼치의 몸통이 외부의 자극이나 감염으로부터 보호하는 역할을 할 것으로 추측하였다.

또한 타액 내에서의 곰신의 분해를 SDS-PAGE를 거쳐 Western blot으로 나타난 밴드의 양상으로 보아(Fig. 10), 곰신은 꼼치의 몸통을 보호하는 물질일 뿐만 아니라, PRP와 유사하게 조직을 보호하고, PRP보다 안정된 새로운 기능성 단백질로 사료되었다.

따라서, 꼼치의 몸통에서 풍부하게 존재하는 곰신은 사람이 복용하였을 때, 장관내의 PRP와 유사한 기능을 함으로써 장관의 기능을 원활하게 하고 장관막을 보호해 줄 것으로 추정되며, PRP보다는 안정된 기능성 단백질로 사료되며, 특이한 기호식품으로서 새로운 유용어종으로 개발될 수 있는 어류로 사료된다.

인용문헌

- Amemiya Y, Lakahashi A, Meguro H, Kawauchi H (1999) Molecular cloning of lungfish proopiomelanocortin. *Gen Comp Endocrinol* 115:415-421.
- Akihito, Iwata A, Kobayashi T, Ikeo K, Imanishi T, Ono H, Umehara Y, Hamamatsu C, Sugiyama K, Ikeda Y, Sakamoto K, Fumihito A, Ohno S, Gojbori T (2000) Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis

- of mitochondrial cytochrome b genes. *Gene* 259:5-15.
- Busby MS, Chernova NV (2001) Redescription of the festive snailfish, *Liparis marmoratus* (Scorpaeniformes: Liparidae), with a new record from the northern Bering Sea. *Ichthyol Res* 48:187-191.
- Castagnola M, Congiu D, Denotti G, Nunzio AD, Fadda MB, Melis S, Messana I, Misiti F, Murtas R, Olianias A, Piras V, Pittau A, Puddu G (2001) Determination of the human salivary peptides histatins 1, 3, 5 and statherin by high-performance liquid chromatography and by diode-array detection. *J Chromatography B* 751:153-160.
- Davey GC, Caplice NC, Martin SA, Powell R (2000) A survey of genes in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) as identified by expressed sequence tags. *Gene* 263:121-130.
- Evans RP, Fletcher GL (2001) Isolation and characterization of type I antifreeze proteins from Atlantic snailfish (*Liparis atlanticus*) and dusky snailfish (*Liparis gibbus*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1547:235-244.
- Gilis D, Rooman M (2001) Ab initio structure predictions using a hierarchical approach applied to 434 cro and the *Drosophila* homeodomain. *Theor Chem Acc* 106:69-75.
- Hoover GJ, El-Mowafi A, Simko E, Kocal TE, Ferguson HW, Hayes MA (1998) Plasma proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) isolated by binding to lipopolysaccharide from *Aeromonas salmonicida*. *Comp Biochem Physiol B* 120:559-569.
- Joo JY (2001) A molecular biological study on the expression pattern and functional protein structures of proline-rich proteins in human salivary glands. *Kangnung Nat Univ* pp36.
- Katagiri T, Hirono I, Aoki T (1999) Molecular analysis of complement component C8 β and C9 cDNAs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics* 50:43-48.
- Kronnie Gt, Stroband H, Schipper H, Samallo J (1999) Zebrafish CTH1, a C3H zinc finger protein, is expressed in ovarian oocytes and embryos. *Dev Genes Evol* 209:443-446.
- Lee JY, Hirono I, Aoki T (2000) Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Develop Comp Immuno* 24:407-415.
- Lee SK, Kim YS, Song IS, Lee SS, Lee YJ, Kim WH, Chi JG (2001) Improved technique of digoxigenin labeled RNA *in situ* hybridization. *Korean J Path* 35:98-110.
- Matallanas J, Pequeño G (2000) A new snailfish species, *Paraliparis orcadensis* sp. nov. (Pisces: Scorpaeniformes) from the Scotia Sea (Southern Ocean). *Polar Biol* 23:298-300.
- Mitsuo R, Sato M, Itakura T (2001) Cloning, sequencing, and phylogenetic analysis of complementary DNA of novel cytochrome P450 CYPIA in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Mar Biotechnol* 3:218-223.
- Murphy M, Harte T, McInerney J, Smith TJ (2000) Molecular cloning of an Atlantic salmon nucleoside diphosphate kinase cDNA and its pattern of expression during embryogenesis. *Gene* 257:139-148.
- Nam YS, Madapallimattam G, Drzymala L, Bennick A (1997) Characterization of human sublingual-gland protein kinase by phosphorylation of a peptide related to secreted proteins. *Archs oral Biol.* 42:527-537.
- Nelson JS (1994) *Fishes of the World* (3rd edition). pp523.
- Piñeiro C, Barrow-Velázquez J, Sotelo CG, Gallardo JM (1999) The use of two-dimensional electrophoresis in the characterization of the water-soluble protein fraction of commercial flat fish species. *Z Lebensm Unters Forsch A* 208:342-348.
- Rasmussen AS, Arnason U (1999) Phylogenetic studies of complete mitochondrial DNA molecules place cartilaginous fishes within the tree of bony fishes. *J Mol Evol* 48:118-123.
- Robertsen B, Trobridge G, Leong JA (1997) Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Develop Comp Immuno* 21:397-412.
- Rogers SA, Llewellyn L, Wigham T, Sweeney GE (2000) Cloning of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) estrogen receptor- α gene. *Comp Biochem Physiol* 125:379-385.
- Sih A, Kats LB, Maurer EF (2000) Does phylogenetic inertia explain the evolution of ineffective antipredator behavior in a sunfish-salamander system? *Behav Ecol Sociobiol* 49:48-56.
- Song IS, Lee SK, Son JK (2000) Molecular cloning of novel genes specifically expressed in snailfish, *Liparis tanakae*. *Dev Reprod* 4:67-77.
- Stegeman JJ (2000) Cytochrome P450 gene diversity and function in marine animals: past, present, and future. *Mar Envir Res* 50:61-81.
- Tohyama Y, Ichimiya T, Kasama-Yoshida H, Cao Y, Hasegawa

- M, Kojima H, Tamai Y, Kurihara T (2000) Phylogenetic relation of lungfish indicated by the amino acid sequence of myelin DM20. *Mol Brain Res* 80:256-259.
- Tokita M, Ishii S, Iwami T, Miyazaki JI (2001) Phylogenetic analysis of antarctic notothenioid fishes based on two-dimensional gel electrophoresis. *Polar Biology* © Springer-Verlag 2001 DOI 10.1007/s003000100324.
- Touhata K, Tanaka H, Yokoyama Y, Sakaguchi M, Toyohara H (2001) Structure of a full-length cDNA clone for the pro- α 1(V/XI) collagen chain of red seabream. *Biochimica et Biophysica Acta* 1517:323-326.
- Via A, Ferrè F, Brannetti B, Helmer-Citterich M (2000) Protein surface similarities: a survey of methods to describe and compare protein surfaces. *Cell Mol Life Sci* 57:1970-1977.
- Wang H, Gong Z (1999) Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3. *BBA* 1446:156-160.
- 정문기 (1977) 한국어도보. 일지사 727pp.