

금붕어, *Carassius auratus*의 성 성숙에 따른 Connexin 43 mRNA 발현량의 변화

최철영[†] · 김봉석^{*}

미국 국립보건원, ^{*}국립수산과학원

Expression Pattern of Connexin 43 mRNA during Sexual Maturation in Female Goldfish, *Carassius auratus*

Cheol-Young Choi[†] and Bong-Seok Kim^{*}

Laboratory of Gene Regulation and Development, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD 20892

^{*}Biotechnology Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

Connexin (Cx) is an important and essential protein in induction of oocyte maturation, which is present in almost all mammalian tissues except circulating blood cells and adult skeletal muscles. In this study, goldfish Cx43 cDNA sequence is available in GenBank under the accession number AB078505. Homology analyses using the GenBank and EMBL general database searches indicated that goldfish Cx43 cDNA has a high homology with carp Cx43 (95.1% identity), zebrafish Cx43 (90.5% identity), and chicken Cx43 (81.9% identity). Goldfish Cx43 is similar to the Cx family in its general features, and all the typical Cx consensus sequences are also found. Moreover, significantly increased Cx43 transcripts were observed in mature goldfish (GSI; 18.3~21.7) pituitary and ovary when compared with immature goldfish (GSI; 4.9~6.0). Cx43 transcripts were weakly detected in both liver and kidney of immature and mature goldfish. There is possible that Cx43 activity was relation to oocyte maturation in the goldfish.

Key words : Connexin 43, Goldfish, RT-PCR, Sexual maturation, Tissue distribution

육상동물인 소의 경우 야생의 '버펄로'로부터 시작되어 현재의 '홀스타인'으로 인간이 사육하기 쉽게 가축화 되어 있으나, 어류의 경우 한정된 몇 종에서만 완전 양식이 가능할 뿐, 아직도 야생의 어종을 그대로 사육하고 있는 경우가 많다.

어류의 성숙과 산란을 효율적으로 제어하여 양식어류의 채란이 계획적으로 이루어진다면 그만큼 종묘생산 효율의 향상이 기대되는 것이라 할 수 있다. 이러한 어류의 인위적인 성숙유도에는 성숙·산란의 제어기술의 확립이 요구되어지나, 어류의 성숙·산란 메커니즘을 밝히

고자 하는 분자내분비학적 수준에서의 연구는 거의 수행되고 있지 않다.

최근, 대서양산 민어 (*Mycropogonias undulatus*)에서는 알이 성숙해 감에 따라, gap junction이라고 불리는 일종의 터널형태의 구조가 난모세포와 과립막세포 사이에서 형성되는 현상이 관찰되었다 (York *et al.*, 1993). 지금까지 알려져 있는 gap junction 구조는 세포와 세포를 연결해 주고 있는 터널형태의 구조로서, 각종 이온이나 핵산, 아미노산, cyclic AMP 및 cyclic GMP 등의 1,000~2,000 Da 이하의 대사산물이 농도구배에 의하여 자유로이 왕래할 수 있는 구조이다

[†]Corresponding Author : Cheol-Young Choi, Tel : +1-301-402-3202, Fax : +1-301-402-1323, E-mail : choi_cy@hotmail.com

(Stagg and Fletcher, 1990; Yoshizaki *et al.*, 1997). 이와 같은 gap junction은 혈구나 골격근육을 제외한 거의 모든 동물조직에 분포하며, 전기 시냅스간의 시그널 전달 및 동물의 초기발생시 형태형성에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Kumar and Gilula, 1986). Gap junction은 세포막을 관통하고 있는 connexon 이라고 하는 통 모양의 분자가 각각의 세포간 하나씩 서로 연결되어 있는 구조를 갖고 있다. 이들 connexon 단백질은 6 분자의 connexin (Cx) 으로 이루어져 있으므로, 결국 1개의 gap junction은 2개의 connexon 결합체이며, 즉 12개의 Cx으로 이루어진 구조를 갖고 있다 (Kandel *et al.*, 1991; Yoshizaki *et al.*, 1997).

어류에 있어서 gap junction을 구성하고 있는 Cx cDNA는 대서양산 민어 (*M. undulatus*) (Yoshizaki *et al.*, 1994), 점가오리 (*Rana erinacea*) (O'Brain *et al.*, 1996), perch (O'Brain *et al.*, 1996), 은어 (*Plecoglossus altivalis*) (Choi *et al.*, 1999; Choi and Chang, 2000) 및 참돔 (*Pagrus major*) (Choi and Takashima, 2000; Choi and Takemura, 2001)에서 보고되었다. Spray *et al.* (1981)은 어류에서 최초로 *Fundulus*에서 gap junction의 존재를 보고한 이래, zebrafish (*Danio rerio*) (Kessel *et al.*, 1985) 등에서 gap junction의 존재가 보고되었다. 특히, York *et al.* (1993)은 대서양산 민어 (*M. undulatus*) (York *et al.*, 1993)에서 gap junction의 존재는 난황형성 과정 중에 많이 관찰되었으나, 난황형성 종료와 동시에 감소하였다고 보고하였다. 또한, Yoshizaki *et al.* (1994) 및 Yoshizaki and Patino (1995)은 대서양산 민어의 난모세포가 최종성숙 하는 과정 중에 특이적으로 gap junction이 형성 되었음을 관찰하여, 난성숙과 gap junction과의 밀접한 관련성을 보고하였다. Choi and Takashima (2000) 역시 참돔의 난소에서 gap junction을 구성하고 있는 Cx31.5 mRNA가 난성숙 능력의 획득에 관여한다고 보고하였다.

본 연구는 금붕어 (*Carassius auratus*) 를 이용

하여 gap junction을 구성하고 있는 유전자인 Cx43 mRNA의 조직별 분포와 성 성숙에 따른 Cx mRNA의 발현량의 변화를 관찰하여, 어류의 난 성숙과 관련한 기초자료를 얻고자 실시되었다.

실험어로서는 캐나다 켈거리대학교 생물학과 실험실에서 수온 17°C의 반순환 여과식으로 사육 중이던 전장 9-12 cm의 금붕어 암컷을 사용하였다. GSI (생식소 속도지수)에 의하여 미성숙어 (GSI; 4.9-6.0)와 성숙어 (GSI; 18.3-21.7)를 구분한 후, 각각의 조직을 적출하여 -80°C 냉동고에 급속 동결 보관하면서 실험에 사용하였다. GSI는 생식소 중량/어체중량×100의 식을 이용하여 계산하였다.

본 실험에서 사용한 금붕어 Cx43 cDNA는 GenBank에 등록되어 있는 AB078505의 염기배열을 이용하였다. 우선, 금붕어 Cx43 cDNA가 Cx family 유전자로서의 공통필수적인 Cx consensus 배열을 만족하고 있는가를 파악하였다. 제1세포의 domain에 존재하는 consensus 배열인 C(D,N)TXQPGCX2VCYD 및 제2세포의 domain내의 Cx family consensus 배열인 CX₃₀₄PCX₃(L,I,M,V)(D,E,N)C(F,Y)(L,I,V,M)(S,A)(K,R)P (Yoshizaki *et al.*, 1994)는 본 cDNA의 아미노산 44-57과 177-193에서 각각 확인되었다. 3번째 세포막 관통 domain에 존재하는 amphipathic helix-forming consensus인 TX₃SX₃(K,R)X₃E (Hoh *et al.*, 1991)의 Cx family consensus 배열은 본 cDNA의 아미노산 144-156에서 확인되었다. 또한, C-말단에 존재하는 Cx family consensus 배열인 QNX₆S (Hoh *et al.*, 1991)는 본 cDNA의 아미노산 234-243에서 확인되었다 (Fig. 1). 이상과 같이, consensus 배열 등의 조건이 Cx family의 공통적인 특징을 만족시키는 점으로 보아, 본 연구에서 사용된 cDNA는 금붕어 Cx43인 것으로 확인되었다. 또한, 유전자 database인 GenBank에서 금붕어 Cx43 아미노산과의 상동성을 검색해 본 결과, 잉어 (*Cyprinus carpio*) (AY008286)와 95.1%, zebrafish (*D. rerio*) (AF035481)와 90.5%, 닭 (*Gallus gallus*)

1	CTTGACAAGGTGCAGGCCTACTCCACGGCCGGAGGGAAGATCTGGCTCTCTGTGCTCTTC LeuAspLysValGlnAlaTyrSerThrAlaGlyGlyLysIleTrpLeuSerValLeuPhe	20
61	ATCTTCCGGATCCTAGTTCTGGGAACAGCAGTGGAGTCGGCCTGGGGTGACGAGCAGTCA IlePheArgIleLeuValLeuGlyThrAlaValGluSerAlaTrpGlyAspGluGlnSer	40
121	GCGTTCAAGTGCAATACCCAGCAGCCCGGTTGTGAGAATGTCTGCTATGACAAATCGTTC AlaPheLysCysAsnThrGlnGlnProGlyCysGluAsnValCysTyrAspLysSerPhe	60
	o o o o o o o o o o o o o o o	
181	CCCATCTCGCACGTGCGCTTGTGGGTCCTTCAGATCATCTTCGTGTCCACGCCTACGCTC ProIleSerHisValArgLeuTrpValLeuGlnIleIlePheValSerThrProThrLeu	80
241	CTGTACCTGGCGCACATTTTCTATCTGATGCGCAAGGAGGAGAAGCTCAACCGCAAGGAG LeuTyrLeuAlaHisIlePheTyrLeuMetArgLysGluGluLysLeuAsnArgLysGlu	100
301	GAGGAGCTGAAGGCCGTACAGAACGACGGTGGTGACGTCGAGCTCCATCTCAAGAAGATC GluGluLeuLysAlaValGlnAsnAspGlyGlyAspValGluLeuHisLeuLysLysIle	120
361	GAGCACAAGAAGTTCAAGCACGGCCTGGTGGAGCACGGCAAGGTGAAGATGAAGGGTGCC GluHisLysLysPheLysHisGlyLeuValGluHisGlyLysValLysMetLysGlyAla	140
421	CTGCTGCGCACCTACATCGTCAGCATCCTTTTCAAGTCCATCTTTGAGGTGGGCTTCCTG LeuLeuArgThrTyrIleValSerIleLeuPheLysSerIlePheGluValGlyPheLeu	160
	Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ	
481	TTGCTCCAGTGGTACATCTACGGCTTCACCCTGGCCCGCGTGTACACGTGCGAGCGTTTG LeuLeuGlnTrpTyrIleTyrGlyPheThrLeuAlaAlaValTyrThrCysGluArgLeu	180
	• • • •	
541	CCTTGCCCCATCAGGTGGACTGTTTCTCTCCCGACCTACGGAGAAGACCATCTTTATT ProCysProHisGlnValAspCysPheLeuSerArgProThrGluLysThrIlePheIle	200
	• • • • • • • • • • • • • •	
601	GTCTTCATGCTCGTGGTTPCGCTTGTCTCACTTATGCTCAACATCATCGAGCTCTTCTAC ValPheMETLeuValValSerLeuValSerLeuMetLeuAsnIleIleGluLeuPheTyr	220
661	GTGCTCTTCAAACAGATCAAGGACCGAGTGAAAGGCCGCAAACGAGTTCAAACCGGC ValLeuPheLysGlnIleLysAspArgValLysGlyArgGlnAsnGluPheGlnThrGly	240
	▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲	
721	ACCTTGAGCCCCACGTCAAAGGAGTTGTCCACAACCAAATACGCCTACTACAACGGTTGC ThrLeuSerProThrSerLysGluLeuSerThrThrLysTyrAlaTyrTyrAsnGlyCys	260
	▲ ▲ ▲	
781	TCCTCTCCTAATGCGCCGCTCTCGCCAATGTCGCCTCCGGGCTACAAGCTAGCCACCGGC SerSerProAsnAlaProLeuSerProMetSerProProGlyTyrLysLeuAlaThrGly	280
841	GAGCGGACCAACTCTTGTGCGCAATTACAACAAGCAGGCCAACGAGCAGAAGCTGGGCCAAC GluArgThrAsnSerCysArgAsnTyrAsnLysGlnAlaAsnGluGlnAsnTrpAlaAsn	300
901	TACAGCGCAGA TyrSerAla	

Fig. 1. Nucleotide sequence of the goldfish (*Carassius auratus*) connexin (Cx) 43 and putative amino acid sequence. The nucleotide number is shown of the left, and the amino acid residue number is shown on the right. Open and filled circles indicate Cx consensus sequences in each extracellular domain. Open triangles indicate the predicted amphipathic helix-forming consensus sequence of the third transmembrane domain. Filled triangles indicate a consensus sequence in the C-terminal, cytoplasmic domain.

(M29003)와 81.9%의 높은 상동성을 나타내었다.

금붕어의 성 성숙에 따라 발현하는 Cx43 유전자의 발현량의 차이를 RT-PCR 방법을 이용하여 분석하였다. RT-PCR을 위한 primer는 종내·종간을 통하여 잘 보존되어져 있는 첫 번째 세포의 domain과 두 번째 세포막 관통 domain의 경계영역에서 forward primer [5'-TAGTTCTGGGAACAGCAGTG-3']를, 두 번째 세포의 domain과 네 번째 세포막 관통 domain의 경계영역에서 reverse primer [5'-AGATG-GTCTTCTCCGTAGGT-3']를 설계하였다. 미성숙 및 성숙 금붕어로부터 적출한 뇌하수체, 난소, 간 및 신장에서 각각 추출한 total RNA 1 µg을 이용하여, RT-PCR을 실시하였다. PCR 반응은 열변성을 94°C에서 1분간, 55°C에서 45초간, 72°C에서 45초간 총 28회 실시하고, 최종 신장 반응을 72°C에서 5분간 실시한 후, 1.0% agarose gel로 전기영동하여 각각의 조직과 성숙에 따른 Cx43 mRNA의 발현량을 측정하였다. RT-PCR의 내부표준으로서 금붕어 18S ribosomal RNA (rRNA)(GenBank, AF047349)를 사용하여, Cx43의 발현량을 18S rRNA의 발현량에 대한 비율로 환산하여 Cx43의 발현량을 표준화하였다.

Figure 2에서 나타난 바와 같이 미성숙 금붕어의 경우, Cx43 mRNA는 뇌하수체와 난소에서 발현이 관찰되었으나, 간과 신장에서는 매우 낮은 발현량을 보였다. 성숙 금붕어의 뇌하수체에서는 Cx43 mRNA의 높은 발현량이 관찰되었으며, 특히 난소에서는 미성숙어와 비교하여 볼 때, 현저하게 높은 Cx43 mRNA의 축적이 관찰되었다. 성숙 금붕어의 간과 신장에서 Cx43의 발현량은 미성숙 금붕어에서의 발현량과 비교하여 볼 때, 약간 높은 발현량이 관찰되었지만 유의한 수준에서 유의차는 인정되지 않았다. Cx43 mRNA는 미성숙시기의 금붕어 뇌하수체에 존재하고, 금붕어가 성숙함에 따라서 뇌하수체에서 분비되는 gonadotropin (GTH)의 영향에

의하여 성숙 금붕어의 난소내로 축적되어 가는

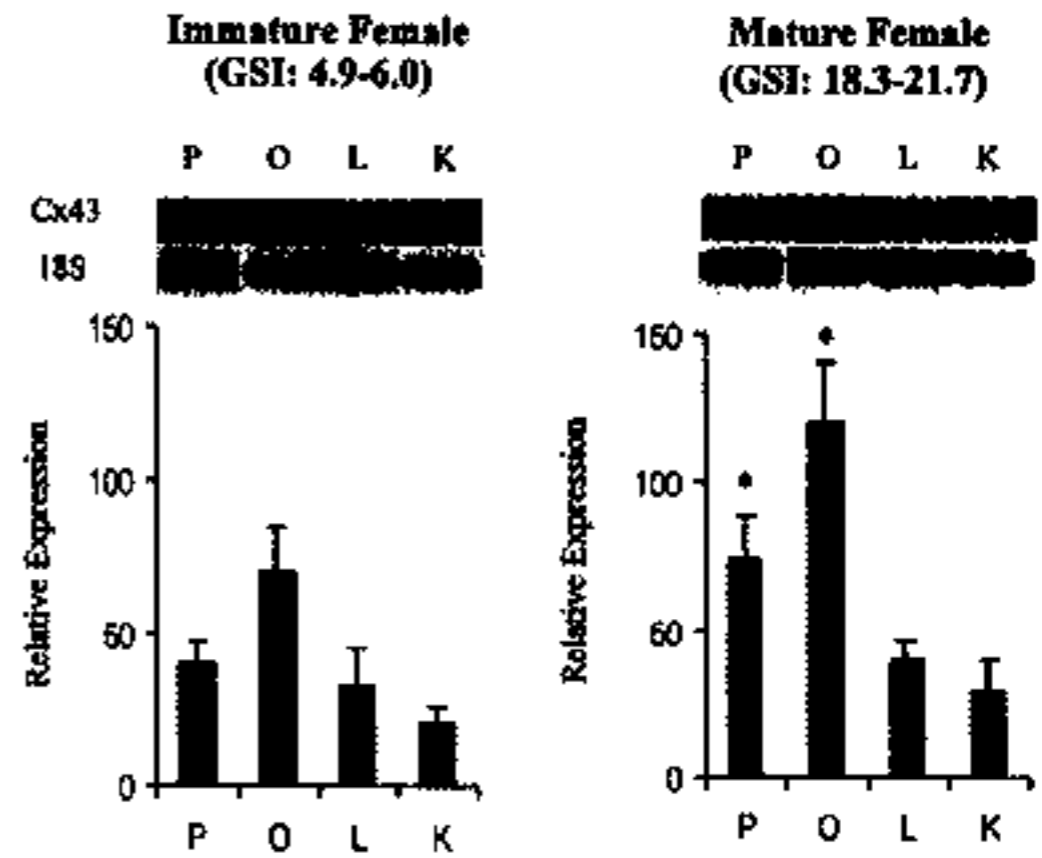


Fig. 2. One microgram of total RNA prepared from pituitary (P), ovary (O), liver (L) and kidney (K) was reverse transcribed and amplified in immature and mature female goldfish (*Carassius auratus*) using connexin (Cx)43 specific primer. Tissue distribution of goldfish Cx43 was analyzed by RT-PCR. The expression of goldfish 18S rRNA mRNA was evaluated in each RT reaction product as a loading control. The expression level of each tissue was normalized with respect to the goldfish 18S rRNA signal, and expressed as relative expression level. An asterisk indicates a significant difference compared with the respective control value ($P < 0.05$).

이와 같은 본 연구의 결과는 난황축적이 완료된 대서양산 민어의 난소내에 난성숙 관련 유전자인 Cx32.2가 다량으로 존재한다는 Yoshizaki *et al.* (1994)의 보고와 GTH-II에 의하여 참돔의 난여포내에서 Cx43 mRNA의 발현율이 높게 나타났다는 Choi and Takashima (2002)의 보고와 일치하였다. 이와 같은 결과로 보아, Cx43은 금붕어의 난성숙과 관련이 있는 것으로 사료된다. 앞으로, 어류의 난성숙 기구와 관련된 기초적인 연구로서, 난여포 이외의 난소내 조직에서의 Cx 유전자의 역할 뿐만 아니라, Cx 유전자의 수용체에 관한 연구도 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

Beyer, E.C., Paul, D.L. and Goodenough, D.A.: Connexin 43: a protein from rat heart

- liver. *J. Cell Biol.*, 105 : 2621-2629, 1987.
- Choi, C. Y. and Chang, Y. J. : Molecular cloning and nucleotide sequence of connexin 35 cDNA in the ovary from the sweetfish, *Plecoglossus altivelis*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 33 : 565-571, 2000.
- Choi, C. Y. and Takashima, F.: 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, 2000.
- Choi, C. Y. and Takemura, A. : Molecular cloning and expression of connexin 32.3 cDNA in the ovary from the red seabream (*Pagrus major*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 129 : 767-775, 2001.
- Choi, C. Y., Yamamoto, Y. and Chang, Y. J. : Molecular cloning of sweetfish, *Plecoglossus altivelis* connexin 44. 1 cDNA expressed in ovary. *Dev. Reprod.*, 3 : 249-253, 1999.
- Hoh, J.H., John, S.A. and Revel, J.P.: Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin-31. *J. Biol. Chem.*, 266 : 6524-6531, 1991.
- Kandel, E.L., Siegelbaum, S.A. and Schwartz, J.H.: Synoptic transmission. In: Principles of Neural Science. Kandel, E.L., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. ed., Appleton & Lange. Norwalk, CT. pp. 123-134, 1991.
- Kessel, R.G., Tung, H.N., Roberts, R. and Beams, H.W.: The presence and distribution of gap junctions in the oocyte-follicle cell complex of the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Submicrosc. Cytol.*, 17 : 239-253, 1985.
- Kumar, N.M. and Gilula, N.B.: Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.*, 103 : 767-776, 1986.
- O'Brain, J., Al-Ubaidi, M.R. and Ripps, H.: Connexin 35: a gap junction protein expressed preferentially in the skate retina. *Mol. Biol. Cell*, 7 : 233-243, 1996.
- Spray, D.C., Harris, A.L. and Bennett, N.V.L.: Gap junction conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science (Washington DC)*, 211 : 712-715, 1981.
- Stagg, R.B. and Fletcher, W.H.: The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endocrine Rev.*, 11 : 302-325, 1990.
- York, W.S., Patino, R. and Thomas, P.: Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92 : 402-418, 1993.
- Yoshizaki, G. and Patino, R.: 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, 1995.
- Yoshizaki, G., Patino, R. and Takashima, F. : Molecular genetic approach. In *Fish DNA*, pp. 379-389, Aoki, T., Takashima, F. and Hirano, T., Kouseisha, Tokyo, 1997.
- Yoshizaki, G., Patino, R. and Thomas, P. : 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, 1994.

Manuscript Received : June 1, 2003

Revision Accepted : July 24, 2003

Responsible Editorial Member : Sang-Hun Choi
(Kunsan Univ.)