

## 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서 멜라닌 농축 호르몬 cDNA 유전자의 클로닝

전정민 · 송영환\*  
부경대학교 미생물학과

### Cloning of Melanin Concentrating Hormone cDNA Gene from Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Jeong Min JEON and Young Hwan SONG\*  
Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Melanin concentrating hormone (MCH) regulating color change of fish skin was identified from brain cDNA library of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the analysis of Expressed Sequence Tags (ESTs). Olive flounder MCH gene consisted of 598 nucleotides encoding 150 amino acids. Olive flounder MCH protein revealed to contain signal peptide of 19 amino acid residues, pro-MCH of 131 amino acids being processed to biologically active and mature form of hormone with 25 amino acid residues at the carboxyl terminus. A comparative structural analysis revealed that Olive flounder MCH precursor had low sequence identity with other fish species and mammalian counterparts, while the amino acid sequences of mature hormone had a relatively high identity and more conserved. RT-PCR analysis revealed that olive flounder MCH precursor gene was expressed spectically only in the brain and not in other tissues.

Key words: Melanin concentrating hormone (MCH), cDNA library, *Paralichthys olivaceus*, Melanophore

#### 서 론

어류를 포함한 척추동물에 존재하는 멜라닌 색소포 (melanophores)는 주위 환경에 따라 피부색을 변화시키는 세포구조이다. 피부색의 변화는 신경 또는 호르몬의 작용에 의해 이루어지며, 어류에서는 피부 멜라닌 색소포 (integumentary melanophore)내의 멜라닌 과립 (melanosome)을 이동시킴으로써 농축 또는 분산시키는 작용을 하는 melanin concentrating hormone (MCH)과 melanin stimulating hormone (MSH), 즉 두개의 상반된 작용의 호르몬에 의해 조절된다.

멜라닌 색소포내의 멜라닌 과립을 농축시키는 MCH는 메기 (*Parasilurus asotus*) 뇌하수체의 연구에서 기능이 제안되었으며 (Enami, 1955), 연어 (chum salmon, *Oncorhynchus keta*)에서 처음으로 분리되어 구조가 환상형 펩타이드 (cyclic peptide)로 밝혀졌으며 틸라피아의 피부에서 멜라닌 색소의 농축 활성을 확인하였다 (Kawauchi et al., 1983). 특히 나노몰 (nmoles) 농도의 MCH가 틸라피아의 농축 활성을 유도한다는 결과가 유기 합성된 MCH 유도체 연구를 통하여 밝혀졌으며 (Wilkes et al., 1984), MCH 펩타이드내에 위치한 tryptophan이 농축 활성의 결정적인 인자로 판명되었다 (Matsunaga et al., 1989).

피부색 변화 기능 외에 MCH는 송어의 시상하부로부터 Corticotrophin Releasing Factor (CRF)에 의해 유도되는 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)의 분비 저해 기능이 있음을 *in vitro* (Baker et al., 1985)와 *in vivo* (Baker et al., 1986)상에서 확인되었고, 특히 MCH를 체내에 주입하였을 경우 MSH

의 방출 억제와 멜라닌 생성이 감소되는 현상을 보였다. 또한 수중의 염도 변화에 따른 MCH의 발현을 조사한 결과 염분의 농도를 증가시켰을 경우, MCH의 발현이 증가되어 MCH가 어류의 삼투압 조절 (osmoregulation)에 작용함을 확인하였으며 (Francis et al., 1997), 송어의 신장을 MCH와 효모 세포가 첨가된 슬라이드 글라스에서 배양할 경우 식균 작용이 증가하여 MCH가 면역 시스템에 작용하는 것으로 밝혀졌다 (Harris and Bird, 1998).

Posttranslational cleavage에 의해 생성되는 MCH 펩타이드는 prepro-MCH 형태의 전구체 (precursor)를 구성하며 전구체의 DNA 염기서열이 연어 (chum salmon, *Oncorhynchus keta*)에서 처음으로 밝혀졌다 (Ono et al., 1988). 또한 차위차연어 (chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*) (Minth et al., 1989), 은연어 (coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*) (Nahon et al., 1991), 틸라피아 (*Oreochromis mossambicus*) (Groneveld et al., 1993) 그리고 부지개송어 (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) (Baker et al., 1995)에서도 cDNA의 분석을 통해 유전자 구조와 특성이 밝혀졌으며, 포유동물의 경우 쥐의 시상하부 (Nahon et al., 1989)와 인간의 뇌 (Presse et al., 1990)에서도 MCH가 발현되었고 이들로부터 MCH 전구체의 구조가 밝혀졌다.

본 연구는 국내의 대표적인 양식어종의 하나인 넙치 (Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)의 뇌로부터 추출한 mRNA를 바탕으로 cDNA library를 구축하고 컴퓨터 프로그램 (www.pcs.edu/biomed/genedoc)과 NCBI BLAST를 이용하여

\*Corresponding author: yhsong@pknu.ac.kr

유전자의 Expressed Sequence Tags (ESTs) 분석으로 MCH 유전자를 클로닝하여 MCH 유전자에 대한 구조 분석과 그 발현 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료 채취

본 연구에 이용된 넙치는 부산 남구 남천 활어시장에서 구입한 무게 300-500 g의 양식 넙치로서 뇌 조직을 채취하여 -130°C의 액체질소에 동결시킨 다음 잘 파쇄하여 분말 상태를 만들어 사용하였다.

#### 넙치의 뇌 조직을 이용한 cDNA library 구축

mRNA 추출은 분말 상태로 파쇄된 100 mg의 뇌 조직을 이용하여 Micro-FastTract™ 2.0 kit (Invitrogen, USA)에서 제공된 mRNA 상태로 분리 순서에 따라 실시하였고, ZAP cDNA synthesis Kit (Stratagene, USA)를 이용하여 이미 추출된 mRNA로부터 뇌 cDNA를 합성하였다 (Cai et al., 1997). 이때 cDNA 클론들의 5' 말단과 3' 말단에 EcoRI site (5'-AATTC-GGCACGAG-3')와 XhoI site (5'-TCGAGTTTTTTT-3')를 지니는 어댑터를 붙인 다음, 클론들을 Lambda Uni-ZAP XR vector내의 EcoRI과 XhoI site내에 클로닝하였다. 클로닝된 Lambda vector는 Gigapack III Gold Packaging Extract Kit를 이용하여 packaging한 후, NZY Top agar 배지 [NaCl 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2%, yeast extract 0.5%, NZ amine 1%, pH 7.5, agarose 0.7%]에서 phage가 감염된 plaque를 관찰하였다. 이와 같은 방법에 의해 총 1.6×10<sup>6</sup> pfu/mL의 넙치 뇌의 초기 cDNA library를 확보하였다.

#### 플라스미드 DNA의 추출과 cDNA library 클론의 무작위 염기서열

확보된 phage 형태의 cDNA library 클론들을 helper phage를 이용하여 pBluescript SK(-) phagemid내로 kit를 이용하여 *in vivo* Excision시킨 후, ampicillin (60 µg/mL)을 함유한 LB agar 배지 [NaCl 1%, tryptone 1%, yeast extract 0.5%, pH 7.5, agar 1.5%]에서 12-18시간 배양하여 무작위로 선별하였다 (Sambrook et al., 1989). 무작위로 선별된 클론의 재조합 DNA의 크기가 500 bp 이상되는 클론을 확보하여 Wizard miniprep Kit (Promega, USA)에 의해 플라스미드 DNA를 추출하여 이 클론의 DNA 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열은 ABI PRISM dye terminator cycle sequencing kit (PE Biosystem, USA)를 사용하여 DNA를 증폭시킨 다음, ABI 310 automatic sequencer (PE Biosystem, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열들은 ESTs 분석을 위해 유사성 조사에 적용하였다.

#### DNA 염기서열과 아미노산 서열 분석

무작위로 선별된 클론들의 ORF를 구성하는 부위의 5' 방향에서 결정된 DNA 염기서열은 염기서열 편집 프로그램인

GeneDoc (www.pcs.edu/biomed/genedoc)으로 정렬하였으며 DNA 염기서열과 아미노산의 유사성은 NCBI의 BLAST search (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)를 이용하여 조사하였다. 넙치 MCH 유전자의 아미노산 서열과 GenBank에 등록된 생물의 MCH 유전자와 다중 비교 및 분석은 EMBL-EBI의 CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw)를 사용하여 분석하였으며 EMBL-EBI에서 제공되는 ClustalX 프로그램을 사용하여 계통도를 작성하였다 (Saitou and Nei, 1987). MCH의 비교 분석에 이용된 타 생물의 아미노산 서열은 GenBank에 등록된 아미노산 서열을 이용하였다.

#### 넙치 조직에서의 RT (Reverse Transcription)-PCR 분석

넙치 MCH 유전자의 조직 특이적인 발현 양상은 어류의 뇌, 신장, 비장, 근육, 간 등으로부터 분리한 total RNA (Chomczynski and Sacchi, 1987)를 기질로 이용하여 RT (reverse transcription)-PCR을 실시하여 조사하였다. 각 조직의 RNA 1 µg을 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)에 의해 MCH의 reverse primer인 Mchp-R로 역전사 반응을 실시하였다. 넙치의 MCH cDNA 염기서열로부터 약 490 bp에 해당하는 MCH 전구체의 ORF 부위를 증폭할 수 있는 forward primer인 Mchp-F를 이용하여 PCR을 실시하였다. 사용된 primer의 염기 서열은 아래와 같다. Mchp-F primer; 5'-TACC-ATGGTCTCAGCATAT TCC-3', Mchp-R primer; 5'-TGTAACACACGAGGAAGAGCTC-3'.

42°C에서 60분간의 역전사 반응 후에 바로 94°C에서 1분간의 denaturation, 56°C에서 1분간의 annealing, 72°C에서 1분간의 polymerization의 단계를 35회 반복하여 수행하였다. RT-PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기 영동하여 ethidium bromide로 염색 후 확인하였다. 또한 대조군으로는 넙치의 대부분의 조직에서 발현되는 β-actin 유전자의 620 bp를 증폭할 수 있는 Bactinp-F; 5'-CGGTTCCCTTAAAGCGAAAA-3'와 Bactinp-R; 5'-TTCATGAGGTTAGTCTGTGAGGT-3' primer를 이용하여 동일한 RT-PCR을 실시하였다.

### 결 과

#### 넙치 MCH cDNA의 클로닝

넙치의 뇌 cDNA library에서 무작위로 선별되어 *in vivo* mass excision을 통해 pBluescript SK(-) phagemid내로 도입된 400여개 클론들은 phagemid내의 클로닝 site의 5' 방향에 위치한 SK primer (5'-CGCTCTAGAAGTAGTGGATC-3')를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 그 중에서 355 클론들이 NCBI BLASTX의 아미노산 서열 유사성 조사에 의해 추정적인 유전자인 것으로 밝혀졌으며, ESTs 분석을 위한 무작위 염기서열 결정과 NCBI 데이터베이스 검색을 통하여 MCH 전구체를 결정하는 유전자를 분리할 수 있었다 (Fig. 1). 이 유전자는 넙치의 MCH 전구체 단백질을 구성하는 유전자로 GenBank에 등록되었다 (AF236090, Feb. 2000).

gacagcct tcagagctaa atatcgtaga tacc <u>ATG</u> GTC TCA GCA TAT TCC ATC	55
<u>M V S A Y S I</u>	7
CTT TTT ACG CTA GTG CTG TTT TCT GAG CTG AAC AGC CAC TTG CTA ACT	103
<u>L F T L V L F S E L N S H L L T</u>	23
GTA GCT TCA CCT GCG ACT AAA GTA GAA GAT GGC GAA ATA GAG CAA GAT	151
<u>V A S P A T K V E D G E I E Q D</u>	39
GGC CTG AGT TCC TTA CTG GGT GAC GAC CCC ATT AAC GAA CAC GCC ATG	199
<u>G L S S L L G D D P I N E H A M</u>	55
GTC CCG CCT GCC TAC AGA GGA CGC CTC ATG CTG GAC AAC AGC ATC AGG	247
<u>V P P A Y R G R L M L D N S I R</u>	71
GAC GAA GAC GGG AAC CGC AAA ATC ATC ATC ATC TCG GAC ATG AGG CAG	295
<u>D E D G N R K I I I I S D M R Q</u>	87
AGG GGA CGC GGT ACT CGT GGG CTG AAC TCG GTC CTC ACC CGG AGC CTT	343
<u>R G R G T R G L N S V L T R S L</u>	103
CCC CTG CTC GCA GAC CAA AAG TTG AGC CGC GCT CCG GCC GAG TAC AGT	391
<u>P L L A D Q K L S R A P A E Y S</u>	119
TTC AAA ATA GAT CGC AGA <u>GAC ACT GAC TTC AAC ATG CTG CGG TGT ATG</u>	439
<u>F K I D R R D T D F N M L R C M</u>	135
ATA GGA CGA GTG TAC CGA CCC TGC TGG GAA TCT TCC AAC ATC CCC TGA	487
<u>I G R V Y R P C W E S S N I P</u> ***	150
atgttcagtg gagagctctt cctcgtgtgt tacactgaaa tgcatttcta tgtagaaaaa	547
aaaaaaagag tgcacaaaca tgtaaaacta <u>aataaa</u> actt tattaataatt c	598

Fig. 1. Sequence of cDNA encoding MCH of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the deduced amino acid sequence. A putative signal peptide and a polyadenylation signal (aataaa) are underlined. The boxed region includes the mature form of MCH and star marks indicate stop codon.

#### 넙치 MCH 유전자와 아미노산 서열의 분석

넙치 MCH 유전자의 DNA 염기서열과 추정 아미노산 서열은 Fig. 1에 나타나 있다. MCH 유전자는 polyadenylation 위치까지 598 bp를 가진 유전자이고 34 bp의 5'-UTR (untranslated region)과 114 bp의 3'-UTR 및 150개의 아미노산을 암호화하는 450개의 뉴클레오타이드의 전구체 구조를 형성하고 있었다. SignalP V1.1 program (<http://genome.cbs.dtu.dk/hbin/nplsmh-webface>)에 의해 open reading frame (ORF)의 5' 위치의 Met부터 19개의 아미노산이 signal peptide로 지정되었으며 (Nielsen et al., 1997), pro-MCH peptide는 131개의 아미노산으로 구성됨을 확인할 수 있었다. AATAAA의 염기서열로 이루어진 polyadenylation signal도 관찰할 수 있었다.

MCH 펩타이드는 전구체의 C 말단에 위치하는데, 넙치의 MCH도 동일하게 mature form의 호르몬을 생성하는 표식 (hallmark)으로 간주되는 dipeptide cleavage site인 124-125번째 (Arg-Arg) 뒤에 위치하고 있었으며 25개의 아미노산으로 구성

된 환상형의 구조를 지니고 있었다. 넙치 MCH는 어류의 MCH 펩타이드에 비해 8개, 포유동물의 MCH 펩타이드에 비해서는 6개의 아미노산이 부가적으로 첨가된 구성을 나타내지만, 환상형 펩타이드의 구조를 결정하는 9번째와 18번째의 cysteine disulfide bond와 농축활성에 중요한 8번째 아미노산인 arginine부터 19번째 아미노산인 tryptophan을 포함하고 있어 어류 및 포유류에 유사한 구조체를 형성하고 있었다.

GenBank에 등록된 어류 및 포유동물과 넙치의 MCH 전구체의 아미노산에 의한 다중 비교 (multiple alignment)에 의한 특성은 Fig. 2에 나타나 있다. 연어류와 무지개 송어 사이의 상동성은 77%를 보였으며 포유동물 사이의 상동성도 81%의 높은 유연관계를 나타내었다. 그러나 포유동물은 연어류와의 상동성이 16%로 낮은 편이나 C 말단의 mature form 부위에서만 유사성을 보였으며 넙치와 연어류와의 상동성도 포유동물과 유사한 결과를 나타내었다. 이와 같이 유사성을 지니고 있는 mature form MCH 아미노산 서열을 Fig. 3과 같이 정렬한

Chum-s MCH I	---MRHYVLSISFAVALF-----LECYTPSTAISIGKMDDVALEQ	37
Chinook-s MCH II	---MRHSVLSISFAVALF-----LECYTPSTAIPIGKMDDVALEQ	37
Rainbow-t MCH I	---MRHSVLSISFAVALF-----LECYTPSTAIPIGKMDDVALEQ	37
Coho-s MCH	---MRDSVLSVIFALALF-----LECYTPSMAIPMGKMEDTALEQ	37
Chinook-s MCH I	---MRDSVLSVIFALALF-----LECYTPSMAIPMGKMEDTALEQ	37
Rainbow-t MCH II	---MRDSVLSVIFALALF-----LECYTPSMAIPMGKMEDTALEQ	37
Chum-s MCH II	---MRDSVLSVIFALALF-----LECYTPSMAIPMGKMEDTALEQ	37
Tilapia MCH	---MRQRSLSIIFAAALF-----FKCYALTVALPMAKAEDGSLEK	37
Human MCH	MAKMNLSYILILTFSLFSQGILLSASKSIRNLDMMVFNTRFLGKGFQKEDTAEKSVIA	60
Rat MCH	MAKMSLSSYMLMLAFSLFSGILLSASKSIRNVEDDIVFNTRFMGKAFQKEDTAERSVVA	60
Flounder MCH	----MVSAYSILFTLVLFSE-----LNShllTVASPATKVEDGEIEQ	38
	**	
Chum-s MCH I	DTLDSLLSVEV--SENSP-DSVGRSSK-----IVLLADSGLWMN---LNRGLPFYKLR	85
Chinook-s MCH II	DTLDSLLRVEV--SENSP-DSVGRSSK-----IVLLADSGLWMN---LNRGLPFYKLR	85
Rainbow-t MCH I	DTLDSLLRVEV--SENSP-DSVGRSSK-----IVLLADSGLWMN---LNRGLPLYKLI	85
Coho-s MCH	DTLDSLLNESV--ADKNP-DSVRS GSSK-----IIVLADSGMWKN---LNRGLPLYKLK	85
Chinook-s MCH I	DTLDSLLNEEV--ADKNP-DSVRS GSSK-----IIVLADSGMWKN---LNRGLPLYKLK	85
Rainbow-t MCH II	DTLDSLLNEEV--ADKNP-DSVRS GSSK-----IIVLADSGMWKN---LNRGLPLYKLK	85
Chum-s MCH II	DTLDSLLNEEV--ADKNP-DSVRS GSSK-----IIVLADSGMWKN---LNRGLPLYKLK	85
Tilapia MCH	DAFTSLNDEA--TENSLGDAELSSMTKSRAPRVIVIAADANLWRDLRVLHNGLPLYKRR	95
Human MCH	PSLEQYKNDSESSFMNEEENKVS KNTGSK---HNFLNHGLPLNLAIKGYQALKG-SVDFPA	116
Rat MCH	PSLEGYKNDSESGFMKDDDDKTKNTGSK---QNLVTHGLPLSLAVKPYLALKG-PAVFPA	116
Flounder MCH	DGLSLLGGDP--INEHAMVPPAYRGRMLDNSIRDGDGNRKIIISDMRQRGRGTRGLN	96
	*	
Chum-s MCH I	AAAAGPDRALTLDRREAGQDLSPSISIVRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	132
Chinook-s MCH II	AAAAGPDRALTLDRQEAQDLSPSISIVRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	132
Rainbow-t MCH I	AAAAGPDRALTLDRREAGQDLSPSISIVRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	132
Coho-s MCH	AAAAGLDRALTLDRREADQDLSPSISIVRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	132
Chinook-s MCH I	AAAAGLDRALTLDRREADQDLSPSISIVRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	132
Rainbow-t MCH II	AAAAGLDRALTLDRREADQDLSPSISIVRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	132
Chum-s MCH II	AAAAGLDRALTLDRREADQDLNSSISIVRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	132
Tilapia MCH	V DENNQ---VVEHKDVGQDLT--IPILRRDT - - - MRCMV GRVYRPCWEV----	136
Human MCH	ENG VQNTTESTQEKREIGDEENSAKFPIGRRDFD--MLRCML GRVYRPCWQV----	165
Rat MCH	ENG VQNTTESTQEKREIGDEENSAKFPIGRRDFD--MLRCML GRVYRPCWQV----	165
Flounder MCH	S-VLTRS LPL LADQKLSRAPAEYSFKIDRRD TDFNMLRCMI GRVYRPCWESSNI	150
	* * * * * * * * * * * * * * P	

Fig. 2. Multiple alignment of the deduced Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) MCH amino acid sequences with other MCH sequences previously registered in the NCBI data base. Two Arginine residues denoted in bold are hallmark to indicate mature hormone processed from precursor protein. Data base Accession numbers are as follows: Chum-s MCH I (Chum salmon MCH I, M27872), Chinook-s MCH II (Chinook salmon MCH II, M25755), Rainbow-t MCH I (Rainbow trout MCH I, X73837), Rainbow-t MCH II (Rainbow trout MCH II, X73838), Coho-s MCH (Coho salmon pro-MCH, P56943), Chinook-s MCH I (Chinook salmon MCH I, M25754), Chum-s MCH II (Chum salmon MCH II, M27871), Tilapia MCH (Mosambique tilapia MCH, X81144), Human MCH (human MCH, M57703), Rat MCH (Norway rat MCH, M29712) and Flounder MCH (Olive flounder MCH, AF236090). \*: The same amino acid of the MCH precursor.

Eel		<b>N</b>	T	M	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>M</b>	V	G	R	V	Y	R	P	C	W	E	V							
Teleost fishes		D	T	M	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>M</b>	V	G	R	V	Y	R	P	C	W	E	V							
Mammals		D	F	D	M	L	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>M</b>	L	G	R	V	Y	R	P	C	W	Q	V					
Olive flounder	<u><b>D</b></u>	<u><b>T</b></u>	D	F	<b>N</b>	M	L	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>M</b>	<b>I</b>	G	R	V	Y	R	P	C	W	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>P</b>

Fig. 3. Alignment of mature form of MCH between fishes and mammals. The loop structure is formed by the disulfide bridge of the two cysteine residues. Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) MCH residues which differ from fishes and mammals sequences are in bold. Amino acid residues extended in the N terminus (two amino acids) and C terminus (four amino acids) are underlined and the identical amino acids are boxed.

경우, 넙치의 아미노산 구조는 Fig. 2에서 조사된 어류들과 포유동물의 mature form MCH와 각각 70%와 78%의 높은 상동성을 보였다. 이것은 아미노산 유도체 연구 (Matsunaga et al.,

1989)에서 확인된 mature form MCH의 아미노산 서열 (boxed region in Fig. 3)이 넙치도 지니고 있어 전구체 부분이 상이한 구조임에도 불구하고 호르몬의 활성화에 관여하는 부분이 잘

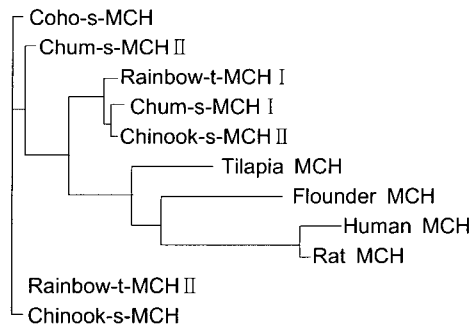


Fig. 4. Phylogenetic analysis of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), other fish species and mammals MCH precursor amino acid sequences.

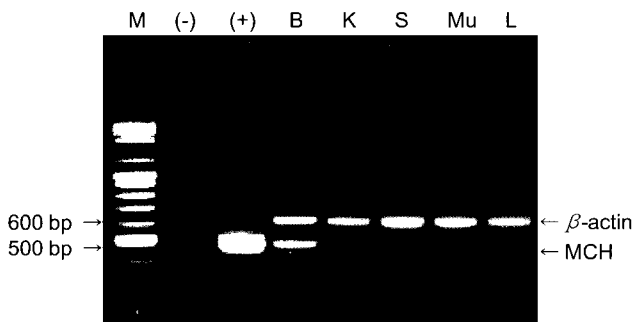


Fig. 5. Tissue specific expression profile of MCH gene of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by RT-PCR analysis. M, 100bp ladder; (-), negative control (pUC19); (+), positive control amplified with pMCH cDNA; B, brain; K, kidney; S, spleen; Mu, muscle; L, liver.

보존되어 있음을 알 수 있었다. 이 결과를 토대로 MCH 아미노산 서열을 이용하여 넙치 MCH의 진화학적인 상관관계를 알아보기 위해 계통도 (phylogenetic tree)를 작성하였다 (Fig. 4). Neighbor-joining 방법에 의한 계통도를 통해서 연어류에서 틸라피아, 넙치 그리고 포유류의 MCH로 진화학적인 분화가 이루어짐을 알 수 있었으며, 넙치의 MCH는 어류에 비해 상대적으로 포유류에 더 유사한 것으로 나타났다.

#### MCH 유전자의 조직 특이적 발현 분석

RT-PCR의 결과 (Fig. 5)에 의하면 넙치의 MCH 유전자는 어류의 뇌, 신장, 비장, 근육, 간에서 분리한 RNA 시료 중 유일하게 뇌 조직에서만 특이적으로 증폭되었으며, 뇌 cDNA library에서 분리한 MCH 전구체 유전자인 pMCH cDNA의 PCR 산물의 크기와 정확히 일치하여 뇌 조직에서만 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다.

#### 고찰

MCH 유전자는 진화적으로 대부분의 척추동물에서 존재하는 것으로 알려져 있으며 (Griffond and Baker, 2002), 어류에서

는 MCH 유전자 구조가 연어 (Ono et al., 1988), 무지개 송어 (Baker et al., 1995), 틸라피아 (Groneveld et al., 1993)에서만 분석되었다. 본 연구에서는 이들 어류 외의 국내에서 양식되는 대표적인 어종인 넙치의 뇌 cDNA library에서 ESTs 분석을 통해 어류 피부색을 조절하는 호르몬인 MCH 전구체 유전자를 처음으로 분리하고 특성을 조사하였다.

연어류 사이의 상동성은 75% 이상을 나타내어 높은 유연관계를 나타내는 반면, 넙치 MCH 전구체는 연어류와 26-35%의 낮은 상동성을 보여주었다. 틸라피아의 MCH 전구체의 경우도 연어류와 47%, 포유류와 20%의 낮은 상동성을 나타내었다. 그러나 틸라피아의 mature form MCH의 펩타이드의 구조는 진화학적으로 잘 보존되어 있었으며, 넙치의 경우도 어류와 포유동물과 높은 상동성을 보였고 상대적으로 어류에 비해 포유동물에 더 가까운 상동성을 보였다 (Fig. 3). 이것은 MCH 전구체의 아미노산을 이용한 계통도에서도 넙치의 MCH가 어류에 비해 포유동물에 더 유사한 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 이와 같이 어류와 포유동물 사이의 상동성 비교를 통해 MCH 전구체의 구조가 틸라피아의 MCH 연구 (Groneveld et al., 1993)에서 알 수 있듯이 생물종에 따라 낮은 보존성을 지님을 알 수 있었으며 mature form MCH의 구조는 진화학적으로 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다.

Mature form MCH 및 이를 바탕으로 한 여러 종류의 유도체를 유기합성하여 무지개 송어에서 활성을 비교한 결과, 천연 상태의 MCH와 동일한 활성을 보이는 최소한의 유도체 구조는 N 말단의 1-4번째와 C 말단의 16-17번째 아미노산을 제외한 5-15번째까지의 아미노산 구조 (Cys-Met-Val-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp)임이 밝혀졌으며 (Matsunaga et al., 1989), 환상형의 구조를 이루는 Cys-Cys sulfide bond와 15번째의 tryptophan이 완전한 MCH 활성화에 필수적인 구성요소로 밝혀졌다. 이러한 구조적 특성은 넙치 MCH에서도 잘 보존되어 있어 연어의 7번째 valine이 isoleucine으로 치환된 것을 제외하면 동일한 활성 구조 (Cys-Met-Ile-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp)를 형성하고 있었다 (Fig. 3). 다만 7번째 isoleucine의 기능적 특이성과 MCH 펩타이드 N 말단에 Asp-Thr과 C 말단에 Ser-Asn-Ile-Pre이 추가된 아미노산 구조가 농축이나 분산 이외의 특이적 활성 또는 다른 생리적인 기능을 가지는지는 별도의 활성 연구를 통하여 밝혀질 수 있을 것이다.

어류에서 피부색 조절에 관여하는 순환계 호르몬의 기능과 척추동물에서 신경전달물질 및 신경조절물질의 기능을 갖는 MCH는 연어와 틸라피아의 뇌하수체 (Ono et al., 1988) 나 뇌의 시상하부 (Groneveld et al., 1993)에서 조직 특이적 발현 현상을 보였다. 포유류인 쥐의 경우 뇌 조직뿐만 아니라 심장, 대장, 고환, 비장에서 MCH 발현이 northern blotting에 의해 확인되었고 (Breton et al., 1993), MCH 유전자의 alternative splicing에 의해 MCH와 다른 MCH gene-overprinted polypeptide (MGOP)가 발현되어 MCH와 다른 독립적

인 기능을 밝히기도 하였다 (Toumaniantz et al., 2000). 이와 같이 어류의 MCH는 포유동물의 MCH에서 나타나는 신경조절물질로서의 기능에 대한 연구가 미진하므로 다양한 어종으로부터 MCH 유전자구조 분석과 조절 기능에 관한 연구 및 포유동물에서 알려진 번역기능이나 섭식행동에 대한 연구 등이 진행되어야 할 것이다.

본 연구에서는 척추동물에서 일반적으로 발현되는 MCH 전구체 유전자 구조를 넙치에서 처음으로 분리하여 그 구조와 특성을 파악하였다. 넙치의 MCH 전구체 유전자의 경우 기존에 연구된 어류의 MCH 전구체 유전자와는 매우 상이한 구조로 이루어져 있으나, 호르몬의 기능을 결정하는 구조는 진화적으로 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 2000년도 부경대학교 발전기금 재단의 학술연구비 지원으로 수행되었다.

참 고 문 헌

Baker, B.I., D.J. Bird and J.C. Buckingham. 1985. Salmonid melanin-concentrating hormone inhibits corticotrophin release. *J. Endocrinol.*, 106, R5-R8.

Baker, B.I., D.J. Bird and J.C. Buckingham. 1986. Effects of chronic administration of melanin-concentrating hormone on corticotrophin, melanotrophin, and pigmentation in the trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 63, 62-69.

Baker, B., A. Levy, L. Hall and S. Lightman. 1995. Cloning and expression of melanin-concentrating hormone genes in the rainbow trout brain. *Neuroendocrinology*, 61, 67-76.

Breton, C., F. Presse, G. Hervieu and J. Nahon. 1993. Structure and regulation of the mouse melanin-concentrating hormone mRNA and gene. *Mol. Cell. Neurosci.*, 4, 271-284.

Cai, C.X., D.E. Birk and T.F. Linsenmayer. 1997. Ferritin is a developmentally regulated nuclear protein of avian corneal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 272, 12831-12839.

Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.

Enami, M. 1955. Melanophre-contracting hormone (MCH) of possible hypothalamic origin in the catfish, *Parasilurus*. *Science*, 121, 36-37.

Francis, K., M. Suzuki and B.I. Baker. 1997. Responses of melanin-concentrating hormone mRNA to salt water challenge in the rainbow trout. *Neuroendo-*

*crinology*, 66, 195-202.

Griffond, B. and B.I. Baker. 2002. Cell and Molecular cell biology of melanin-concentrating hormone. *Internat. Rev. Cytol.*, 213, 233-277.

Groneveld, D., M.J. Hut, P.H.M. Balm, G.J.M. Martens and S.E. Wendelaar Bonga. 1993. Cloning and sequence analysis of hypothalamus cDNA encoding tilapia melanin-concentrating hormone. *Fish Physiol. Biochem.*, 11, 117-124.

Harris, L. and D.J. Bird. 1998. Alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) and melanin-concentrating hormone (MCH) stimulate phagocytosis by head kidney leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.*, 8, 631-638

Kawauchi, H., I. Kawazoe, M. Tsubokawa, M. Kishida and B.I. Baker. 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 305, 321-323.

Matsunaga, T.O., A.M. Castrucci, M.E. Hadley and V.J. Hruby. 1989. Melanin concentrating hormone (MCH): synthesis and bioactivity studies of MCH fragment analogues. *Peptides*, 10, 349-354.

Minth, C.D., H. Qiu, H. Akil, S.J. Watson and J.E. Dixon. 1989. Two precursors of melanin-concentrating hormone: DNA sequence analysis and in situ immunohistochemical localization. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 86, 4292-4296.

Nahon, J.L., F. Presse, J.C. Bittencourt, P.E. Sawchenko and W. Vale. 1989. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology*, 125, 2056-2065.

Nahon, J.L., F. Presse, R. Schoepfer and W. Vale. 1991. Identification of a single melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid in coho salmon: structural relatedness with ribonucleic acid. *J. Neuroendocrinol.* 3, 173-183.

Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Protein Eng.*, 10, 1-6.

Ono, M., C. Wada, I. Oikawa, I. Kawazoe and H. Kawauchi. 1988. Structures of two kinds of mRNA encoding the chum salmon melanin-concentrating hormone. *Gene*, 71, 433-438.

Presse, F., J.L. Nahon, W.H. Fischer and W. Vale. 1990. Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. *Mol. Endocrinol.*, 4, 632-637.

- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 545.
- Toumaniantz, G., P.C. Rerreira, I. Allaey, J.C. Bittencourt and J.L. Nahon. 2000. Differential neuronal expression and projections of melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH gene-overprinted polypeptide (MGOP) in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 12, 4367-4380.
- Wilkes, B.C., V.J. Hruby, A.M. Castrucci, W.C. Sherbrooke and M.E. Hadley. 1984. Synthesis of a cyclic melanotropic peptide exhibiting both melanin-concentrating and -dispersing activities. *Science*, 224, 1111-1113.

---

2003년 8월 4일 접수

2003년 10월 11일 수리