

# 암수동체 어류 점박이송사리 *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) $\beta$ -Actin 2 유전자의 클로닝 및 종내 변이

정상운 · 이영미 · 이창주<sup>1</sup> · 이재성\*

한양대학교 대학원 환경과학과, <sup>1</sup>한양대학교 자연과학대학 생명과학과

## Cloning and Intraspecific Variation of $\beta$ -Actin 2 Gene from the Hermaphroditic Fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

Sang-Oun Jung, Young-Mi Lee, Chang Joo Lee<sup>1</sup> and Jae-Seong Lee\*

Department of Environmental Science, Graduate School, Hanyang University,  
Seoul 133-791, Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University,  
Seoul 133-791, Korea

The full sequence analysis of 16 different  $\beta$ -actin genes isolated from a single *Rivulus marmoratus* was performed. The numbers of isolated  $\beta$ -actin genes varied from 1764 to 1769. They showed different amino acid residues at the exon 1 region. We named this new gene *R. marmoratus*  $\beta$ -actin 2 gene. Intraspecific variation of *R. marmoratus*  $\beta$ -actin 2 gene was also examined. Major differences of 16 isolated  $\beta$ -actin genes, compared to already reported *R. marmoratus*  $\beta$ -actin gene (GenBank AF168615), were observed in both deduced amino acid sequences (1~2%) and intron 2 sequences (4~5%). In this paper, we confirmed the intraspecific variation of  $\beta$ -actin gene in this species.

**Key words** : *Rivulus marmoratus*,  $\beta$ -actin, fish, intraspecific variation

### 서 론

Actin 단백질은 진핵세포에 있어서 가장 풍부하게 존재하는 단백질로서, 그 DNA 및 아미노산 서열은 진화과정 동안 매우 잘 보존되어진 것으로 알려져있다 (Gallwitz and Sures, 1980; Ng and Abelson, 1980). 포유류에서 발

견되는 actin 단백질은 근육형 (muscle type)과 비근육형 (non-muscle type)으로 크게 나뉘어지고, 각각 4개의 근육형과 두개의 비근육형의 유사형태가 보고되어져있다 (Vandekerckhove and Weber, 1979). 근육형 actin 단백질은 특정 조직에서만 발현되고 근육수축에 관련된 기능을 수행하는 반면, 비근육형 actin은 모든 유형의 세포에서 발견되며 세포운동, 유사분열, 세포골격 (cytoskeleton)의 유지 등과 같은 다양한 기능을 가지고 있다 (Clarke and Spudich, 1977; Lazarides and Revel, 1979).

\*Corresponding author: jslee2@hanyang.ac.kr

최근  $\beta$ -actin 유전자 서열정보를 계통학적으로 분석하는 방법이 다양한 생물체에 대해 시도되어졌고, 특히 비근육형 actin 단백질에 하나인  $\beta$ -actin은 높은 유사도 (similarity)를 나타내고 다양한 속 (genus)들의 서열정보가 풍부하게 존재하기 때문에 계통학적인 표지유전자로서의 연구가 활발히 이루어지고있다 (Venkatesh *et al.*, 1996; Lee, 2000; Lee *et al.*, 2000a, b; Lee and Gye, 2001). 특히 intron 2 부분에 대한 sequence variation을 이용하여 어류의 속 (genus) level에서의 분류가 시도되었고 (Lee and Gye, 2001), 요각류 *Tigriopus japonicus*에서 종내변이 (intraspecific variation)에 관한 연구도 진행되었다 (Kim *et al.*, 2003).

점박이송사리 *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae)는 자가수정이 가능한 암수동체 어류로서 환경생물학, 발달기전 및 형태유전학 등에 있어 중요한 동물실험 모델로 제시되어왔다 (Lee *et al.*, 1994, 1995, 1998, 1999, 2000c; Park *et al.*, 1994; Kweon *et al.*, 1998). 점박이송사리  $\beta$ -actin 유전자에 대한 DNA 서열은 2000년에 발표되었고 (Lee, 2000; GenBank AF18615), 인간을 비롯한 6종의 어류들 (Atlantic salmon, common carp, grass carp, sea bream, zebrafish, medaka)의  $\beta$ -actin 단백질과 아미노산 서열을 비교한 결과 점박이송사리와 98.4~98.9%의 높은 상동성 (homology)을 나타내는 것으로 보고되었다 (Lee, 2000). 특히 Lee and Gye (2001)의 논문에 따르면,  $\beta$ -actin 유전자의 intron 2의 DNA 서열이 어류의 분류학적인 표지인자로서 사용될 수 있다고 보고되어  $\beta$ -actin 유전자의 분자계통학적으로 유용성이 강조되고있다.

본 연구에서는 유전적으로 동일한 종 (species)에서의 특정 유전자의 염기서열 변화를 확인하고자, 암수동체로서 유전적으로 완전한 동형접합체 (homozygosity)를 만드는 점박이송사리의  $\beta$ -actin 유전자 16개의 염기서열을 분석하고 비교함으로써 암수동체 어류에서의 유전적 다양성 및 변이 pattern을 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 점박이송사리 사육

점박이송사리, *Rivulus marmoratus*는 한양대학교 자연과학대학 생명과학과 박은호 교수에게서 분양받았고, 이들의 사육은 점박이송사리 표준사육법에 따라 실험실내 수조에서 12시간 간격으로 빛을 비추면서 실온에서 사육하였다. 실험재료는 체장 3~4 cm 내외의 성체를 선

택하여 사용하였다.

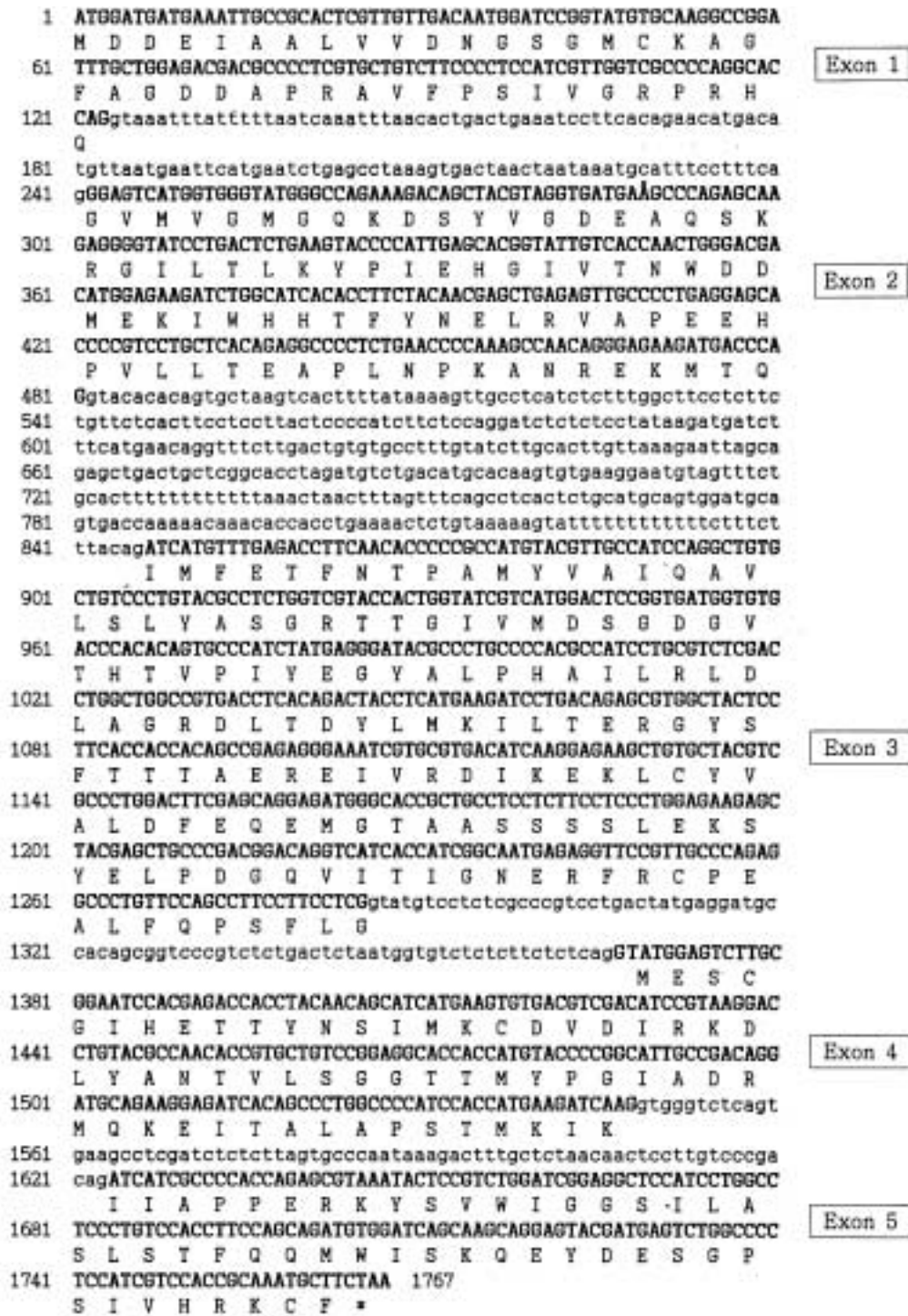
### 2. Genomic DNA의 추출, PCR 증폭 및 클로닝

점박이송사리 간으로부터 genomic DNA의 추출은 이전에 발표된 방법 (Lee *et al.*, 1995)에 따라 수행되었다. 약 100 mg의 간 조직을 적출하여 추출 용액 (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 100  $\mu$ g/mL proteinase K, 1  $\mu$ g/mL RNase)에서 균질화한 후, 55°C 항온수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 반응액을 페놀과 클로로포름으로 처리하고, genomic DNA는 0.2배의 10 M ammonium acetate와 0.5배의 isopropanol을 첨가하여 9,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 genomic DNA는 70% 에탄올로 세정한 후 TE 용액 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여 4°C에 보관하였다.  $\beta$ -actin 유전자의 증폭은 특이적인 5'-F (5'-ATG GAT GAT GAA ATT GCC G-3')과 3'-R (5'-TTA GAA GCA TTT GCG GTG-3')의 PCR 프라이머와 5 unit의 *Taq* polymerase (Stratagene)를 사용하여 위에서 분리된 genomic DNA (1 ng)을 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 온도 조건은 95°C 1분, 53°C 1분, 72°C 2분으로 전체 30 cycle을 수행하였다. 증폭된  $\beta$ -actin 유전자는 pCR 2.1 벡터 (Invitrogen, USA)에 클로닝하였다. 선별된 재조합클론을 대상으로 벡터의 multicloning site 양끝에 위치하는 M13F 및 M13R 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 또한 필요에 따라 walking primer로 내부의 염기서열 또한 분석하였다. 염기서열의 분석은 ALF express automated DNA sequencer를 이용하였다.

확인된 DNA 염기서열은 Clustal X (version 1.81)를 이용하여 다중정렬 (multiple alignment)하였고, 이미 보고된 점박이송사리의  $\beta$ -actin 유전자 (GenBank AF168615)와 송사리 (*Oryzias latipes*)의  $\beta$ -actin 유전자 (GenBank S74868)에 대한 염기서열정보와 비교 분석하였다.

## 결과 및 고찰

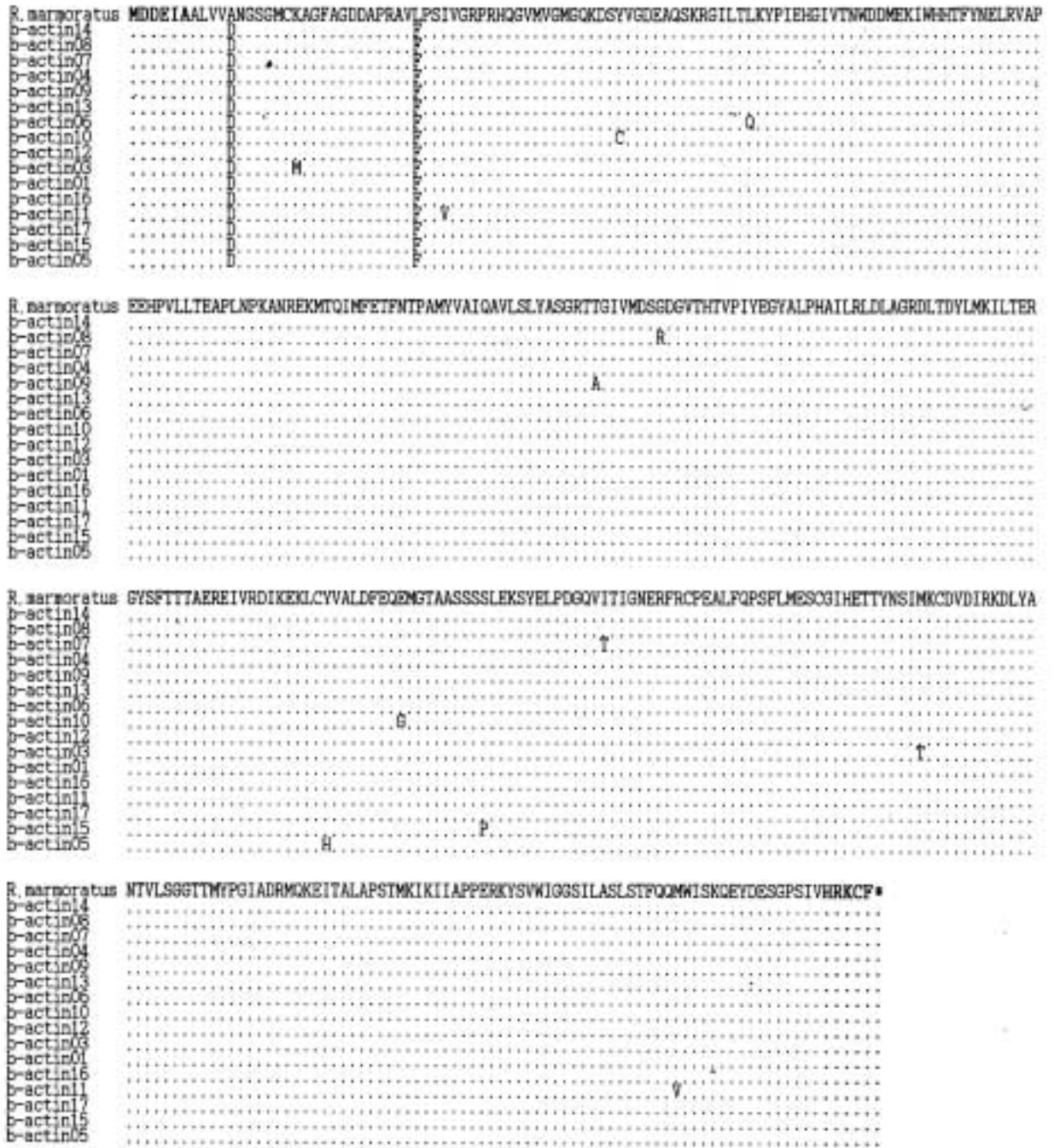
점박이송사리, *Rivulus marmoratus*에서 클로닝한 16개의  $\beta$ -actin 유전자는 1,764~1,769 bp로서 기존에 보고된 점박이송사리를 비롯한 6개 어류 (Southern top mouth minnow, common fat minnow, common carp, grass carp, medaka, European flounder, fugu)의  $\beta$ -actin 유전자의 구조와 거의 동일하였지만 (Lee and Gye, 2001), exon 1 지역 및 intron 2 부위에서 차이를 나타내



**Fig. 1.** The representative  $\beta$ -actin gene originated from *R. marmoratus* individual. The information of exon/intron structure was obtained from Lee (2000).

어 이를 점박이송사리  $\beta$ -actin 2 유전자로 명명하였다. 16개 점박이송사리  $\beta$ -actin 2 sequence간의 차이를 보 기위하여 Clustal X로 multiple alignment를 수행하였다

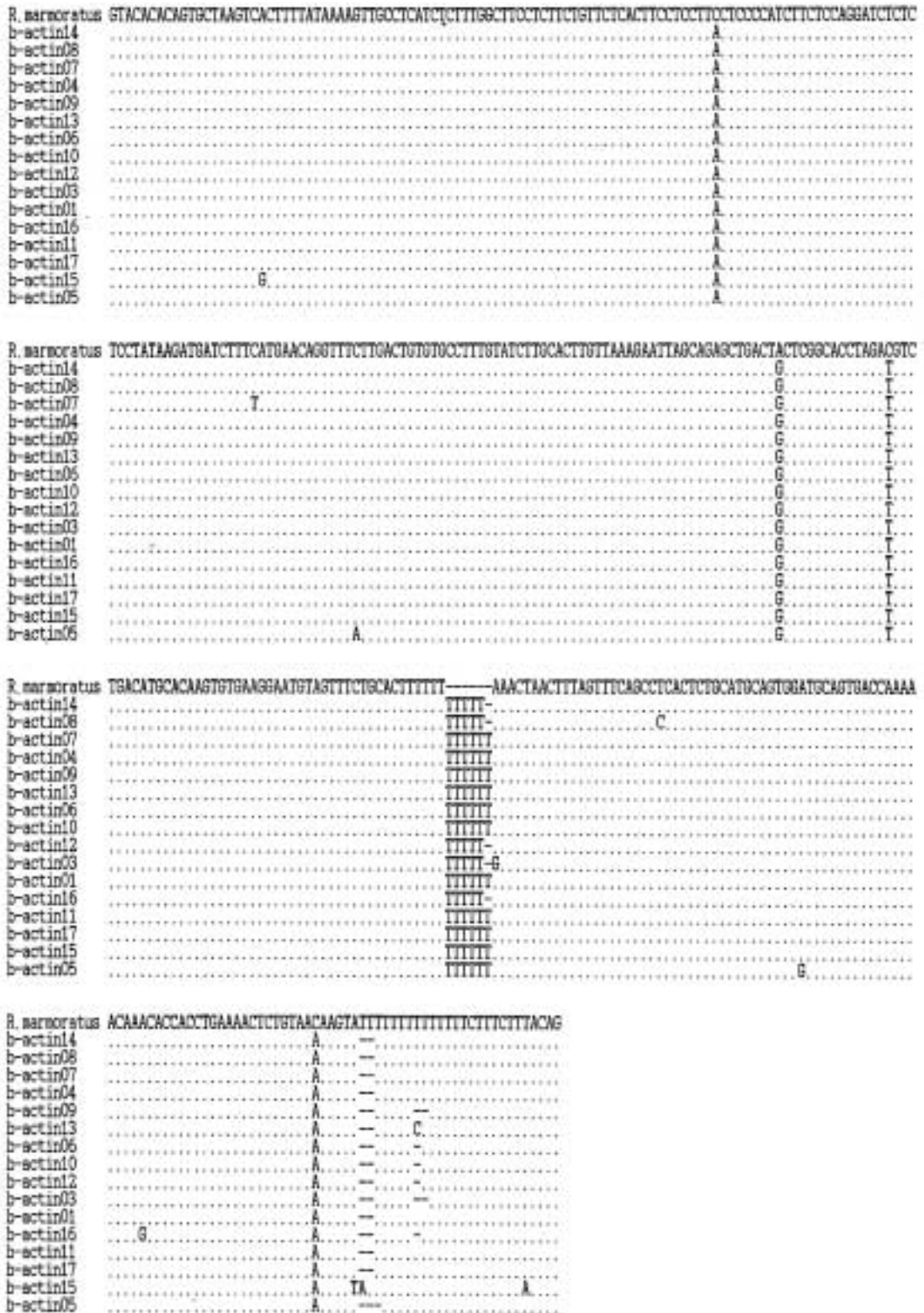
(Fig. 1). 기존의 점박이송사리  $\beta$ -actin 유전자 (AF168615) 와 본 실험에 사용된 점박이송사리  $\beta$ -actin 유전자의 아미노산 수준에서의 차이는 약 1~2% 정도였다. 예컨



**Fig. 2.** Comparison of 18  $\beta$ -actin amino acid sequences by multiple alignment method. Sixteen  $\beta$ -actin amino acid sequences were deduced from the DNA sequences of *R. marmoratus*. The amino acid sequences of *R. marmoratus*  $\beta$ -actin (AF168615) was obtained from GenBank database. The deduced amino acids sequences were aligned by multiple alignment method using Clustal X program. The identical sequences were presented as dot. The primer region was presented as bold character.

대, 실험에 사용된 16개 점박이송사리들은 모두 동일하게 aspartic acid (11번째)와 phenylalanine (31번째)인 반면에 GenBank에 등록되어져 있는 점박이송사리 (AF168615)는

alanine (11번째)과 leucine (31번째)으로 차이를 나타내었다. 그리고 exon 1부위의 leucine (L)도 phenylalanine (F)으로 바뀌었다 (Fig. 2). 또한, 각각의 singleton마다



**Fig. 3.** Comparison of sequence variations in intron 2 region of *R. marmoratus*  $\beta$ -actin 2 gene. The 16  $\beta$ -actin 2 DNA sequences were obtained from this study. The DNA sequence of *R. marmoratus*  $\beta$ -actin (AF168615) was obtained from GenBank database. After confirmation of the exon and intron information in obtained  $\beta$ -actin genes, only intron 2 sequences were used in multiple alignment. The identical sequences were presented as dot and the gaps were presented as dash.

분석된  $\beta$ -actin 유전자간에 한두개의 돌연변이 양상이 나타났다. 이는 점박이송사리가 유전적으로 homozygous 함에도 불구하고 개체내에서 다양한 모양의 variation을 보여주는 증거이다.

$\beta$ -actin 2 유전자의 intron 2 영역의 DNA 서열에서도 실험에 사용된 점박이송사리와 GenBank에 등록된 점박이송사리 (AF168615)간에 약 4~5% 정도의 차이를 나타내었다 (Fig. 3). 그러나 다른 intron이나 exon 부분에서는 큰 변화가 없었다. 점박이송사리에 있어 intron 2 sequence의 차이 유형은 주로 intron 2 뒷부분의 T가 연속되어지는 영역에서 발생하였는데, 이미 보고된 점박이송사리  $\beta$ -actin 유전자 (AF168615)에서는 6~7개 T의 결실이 확실하게 보였다. 그러나 이부분에 있어 송사리  $\beta$ -actin 유전자 (S74868)는 연속되는 T의 영역이 없어서 점박이송사리와 확실한 구분이 가능하였다. 또한 intron 2의 78번 (A), 189번 (G), 203번 (T) 그리고 339번 (A)의 DNA 염기서열에 있어 보고된 점박이송사리와 실험에 사용된 16개체들과 뚜렷한 차이를 나타내고 있다.

따라서 이상과 같은 결과에 의해 본 논문에서 확인된 점박이송사리의  $\beta$ -actin 2 유전자는 이미 보고되어져 있는 점박이송사리 (AF168615)의  $\beta$ -actin 유전자와는 다른 이성체 (isoform)인 것으로 확인되었다. 이러한  $\beta$ -actin 유전자의 종내변이는 이미 다른 종에서도 보고되어져 있는데, 요각류 *Tigripus japonicus*에서 3가지 (AF466279, AF466280, AF466281), *Artemia* species에서 4가지 (X52602, X52603, X52604, X52605), zebrafish (*Danio rerio*)에서 2가지 (AF025305, AF057040), 송사리 (*Oryzias latipes*)에서 2가지 (S74868, D89627), 자주복 *Takifugu rubripes*에서 3가지 (U37499, U38848, U38849), *Coryphaenoides acrolepis*에서 2가지 (AB021650, AB021652)의 다른 유형들이 각각 GenBank에 등록되어져 있다 (Macias and Sastre, 1990; Kim *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2002).

점박이송사리는 이미 알려진 것처럼 척추동물에서 유일한 자웅동체의 개체로서 자가수정을 통하여 번식하는 복제계통 (clonal lineage)으로 개체간의 유전형질이 유사하다. 또한 집단내에서 유전적 재조합이 발생하지 않는 것으로 알려져 있어 종내변이에 대한 확률이 매우 적으며 실제로 자연계에서 형성된 점박이 송사리 집단은 거의 homozygote clone인 것으로 보고되어졌다 (Turner *et al.*, 1990). 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 점박이송사리  $\beta$ -actin 2 유전자의 뚜렷한 종내변이가 exon과 intron에서 모두 확인되었다. 점박이송사리 집단에서의 유전적인 복제다양성 (clonal diversity)은 DNA fingerprinting 방법의 도입으로 인하여 1992년에 Tur-

ner *et al.* (1990, 1992)에 의해 실험실에서 번식이 되는 계통은 물론 자연적으로 채집된 집단에서도 확인되었다. 일반적으로 점박이송사리에서는 유전자 재조합에 대한 내용이 보고되어 있지 않아 이러한 변이는 돌연변이를 통하여 발생하는 것으로 추정되었다 (Turner *et al.*, 1992). 그러나 실제로 종내변이의 빈도가 높은 부분 (loci)에 대한 돌연변이율은 비교적 적은 것으로 확인되었으며 현장적용연구 (field transplantation study)를 통하여 몇세대 이후까지 개체의 유전형질이 보존되는 것이 확인됨에 따라 이러한 종내변이의 원인이 돌연변이는 아닌 것으로 추정되었다 (Laughlin *et al.*, 1995).

이것은 본 연구에서 확인된  $\beta$ -actin 2 유전자의 종내변이 역시 실험개체의 단순한 돌연변이는 아니라는 것을 의미한다. 이와 관련하여, 최근 Sato *et al.* (2002)은 8개 다른 지역에서 채집된 점박이송사리 major histocompatibility complex (Mhc) class I 유전자의 서열분석에서 약 44%에서 heterozygote Mhc loci를 가지는 것으로 확인되어 점박이송사리에 있어 allelic lineage의 조상이 있으며 현재의 자웅동체성 (hermaphrodite)은 진화과정에서 돌연변이를 통하여 획득한 형질이라고 추정하였다 (Sato *et al.*, 2002). 따라서 이번에 확인된  $\beta$ -actin 2 유전자의 종내변이 유형은 이전의 진화단계에서 얻어진 유전형질일 것으로 추정되며 이를 확인하기 위하여 다양한 지역에서 채집된 많은 개체들의 genomic DNA 서열은 물론 mRNA 수준에서의 염기서열 또한 분석하여 진화적인 관점에서 고찰하여야 할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

점박이송사리, *Rivulus marmoratus*에서 기원된 16개의  $\beta$ -actin 유전자의 염기서열 분석 결과 1,764~1,769 bp 범위를 가지는  $\beta$ -actin 유전자를 분리하였다. 이는 기존에 보고된 점박이송사리  $\beta$ -actin 유전자와 exon 1 및 intron 2지역에서 다소의 차이를 보여 우리는 이를 점박이송사리  $\beta$ -actin 2 유전자라 명명하였다. Multiple alignment를 이용하여 유전자 서로간의 차이를 비교한 결과, 점박이송사리  $\beta$ -actin 유전자는 variation을 볼 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 점박이송사리에 있어  $\beta$ -actin 유전자의 종내 변이 (intraspecific variation)를 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 ABRL의 지원 (R14-2003-

036-01002-0)으로 이루어졌다.

## 인 용 문 헌

- Clarke, M. and J.A. Spudich. 1977. Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination. *Ann. Rev. Biochem.*, 46 : 797 ~ 822.
- Gallwitz, D. and I. Sures. 1980. Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 2546 ~ 2550.
- Hwang, U.-W., M.S. Han, I.-C. Kim, Y.-S. Lee, Y. Aoki and J.-S. Lee. 2002. Cloning and sequences of  $\beta$ -actin genes from *Rhodeus notatus* and the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Cyprinidae) and the phylogeny of cyprinid fishes inferred from  $\beta$ -actin genes. *DNA Seq.*, 13 : 153 ~ 159.
- Kim, I.-C., Y.J. Kim, S.J. Song, J.-S. Lee and W. Lee. 2003. The intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda)  $\beta$ -actin gene: cloning, sequence and intraspecies variation. *DNA Seq.*, 14 : 279 ~ 284.
- Kweon, H.-S., E.-H. Park and N. Peters. 1998. Spermatozoon ultrastructure in the internally self-fertilizing hermaphroditic teleost, *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Copeia*, 1998 : 1101 ~ 1106.
- Laughlin, T.F., B.A. Lubinski, E.-H. Park, D.S., Taylor and B.J. Turner. 1995. Clonal stability and mutation in the self-fertilizing hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*. *J. Hered.*, 86 : 399 ~ 402.
- Lazarides, E. and J.P. Revel. 1979. The molecular basis of cell movement. *Sci. Amer.*, 240 : 100 ~ 113.
- Lee, J.-S. 2000. The internally self-fertilizing hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae)  $\beta$ -actin gene: amplification and sequence analysis with conserved primers. *Mar. Biotechnol.*, 2 : 161 ~ 166.
- Lee, J.-S., J. Choe and E.-H. Park. 1994. Absence of the intron-D-exon of c-Ha-ras oncogene in the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* (Teleostei: Rivulidae). *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34 : 921 ~ 925.
- Lee, J.-S., J. Choe and E.-H. Park. 1995. Genomic structure of c-Ki-ras proto-oncogene of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* (Teleostei: Rivulidae). *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 35 : 57 ~ 63.
- Lee, J.-S., E.-H. Park and J. Choe. 1998. Nucleotide sequence of exon 2 to 4 of R-ras gene in the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *DNA Seq.*, 8 : 229 ~ 234.
- Lee, J.-S., E.-H. Park and J. Choe. 1999. Absence of the c-Ha-ras and c-Ki-ras oncogene mutations in the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* papillary thyroid carcinomas induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Appl. Ichthyol.*, 15 : 93 ~ 96.
- Lee, J.-S., T.M. Franklin and J.K. Chipman. 2000a. Cloning of the  $\beta$ -actin gene from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *DNA Seq.*, 11 : 83 ~ 86.
- Lee, J.-S., S.-H. Lee and M.C. Gye. 2000b. The  $\beta$ -actin gene of two species of Southern top mouth minnow (*Pseudorasbora parva*) and the common fat minnow (*Rhynchocypris oxycephalus*) from the family Cyprinidae. *DNA Seq.*, 11 : 301 ~ 307.
- Lee, J.-S., E.-H. Park, J. Choe and J.K. Chipman. 2000c. N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induces papillary thyroid tumours which lack ras gene mutations in the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Teratog. Carcinog. Mutag.*, 20 : 1 ~ 9.
- Lee, J.-S. and M.C. Gye. 2001. Use of  $\beta$ -actin gene intron 2 as a phylogenetic marker in fish taxonomy. *DNA Seq.*, 12 : 71 ~ 76.
- Macias, M.T. and L. Sastre. 1990. Molecular cloning and expression of four actin isoforms during *Artemia* development. *Nucleic Acids Res.*, 18 : 5219 ~ 5225
- Ng, R. and J. Abelson. 1980. Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 3912 ~ 3916.
- Park, E.-H., H.-H. Chang, W.N. Joo, H.-S. Chung and H.-S. Kwak. 1994. Assessment of the estuarine hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* as a useful euryhaline species for acute toxicity tests as shown using cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51 : 280 ~ 285.
- Sato, A., Y. Satta, F. Figueroa, W.E. Mayer, Z. Zaleska-Rutczynska, S. Toyosawa, J. Travis and J. Klein. 2002. Persistence of Mhc heterozygosity in homozygous clonal killifish, *Rivulus marmoratus*: implications for the origin of hermaphroditism. *Genetics*, 162 : 1791 ~ 1803.
- Turner, B.J., J.F. Elder, JR., T.F. Laughlin and W.P. Davis. 1990. Genetic variation in clonal vertebrates detected by simple-sequence DNA fingerprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 5653 ~ 5657.
- Turner, B.J., J.F. Elder, JR., T.F. Laughlin and W.P. Davis. 1992. Extreme clonal diversity and divergence in populations of a selfing hermaphroditic fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 10643 ~ 10647.
- Vandekerckhove, J. and K. Weber. 1979. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow

skeletal muscle. A protien-chemical anlaysis of muscle actin differentiation. *Differentiation*, 14 : 124 ~ 133.  
Venkatesh, B., B.H. Tay, G. Elgar and S. Brenner. 1996.

Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *J. Mol. Biol.*, 259 : 655 ~ 665.

Received: December 1, 2004  
Accepted: February 7, 2005