

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*) Apolipoprotein A-I cDNA의 구조, 분자계통 및 발현 특징 분석

이윤호¹, 노재구¹, 김근용², 조영선², 남윤권^{2,3}, 김동수^{2,3,*}

¹국립수산물과학원, ²부경대학교 양식학과,
³부경대학교 해양수산형질전환생물연구소

Characterization of Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*) Apolipoprotein A-I: cDNA Cloning, Molecular Phylogeny and Expression Analysis

Youn Ho Lee¹, Jae Koo Noh¹, Keun Yong Kim², Young Sun Cho²,
Yoon Kwon Nam^{2,3} and Dong Soo Kim^{2,3,*}

¹National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

²Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

³Institute of Marine Living Modified Organisms, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Full length complementary DNA encoding apolipoprotein A-I (apoA-I) was isolated and characterized in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Mud loach apoA-I cDNA encoding 24 bp of 5'-untranslated region (UTR), 762 bp of single open reading frame (ORF) consists of 254 amino acids and 293 bp of 3'-UTR excluding stop codon and poly (A+) tail. Two overlapping polyadenylation signals (AATAAAATAAA) was found 9 bp prior to the poly (A+) tail. Mud loach apoA-I represented considerable homology to those from other teleost species at amino acid level with conserving common features of vertebrate apoA-I. Molecular phylogenetic analysis inferred the phylogenetic hypothesis that was generally in accordance with the previous taxonomic relationship. Apolipoprotein A-I mRNA was detected in various tissues, but the mRNA levels were quite varied depending on tissues based on semi-quantitative RT-PCR. Liver and brain showed the significantly higher levels of apoA-I transcripts than other tissues. mRNA expression of apoA-I was quite low in very early stage of embryonic development, however dramatically enhanced from 8 hours post fertilization. This increased mRNA level was retained consistently up to 14 days post hatching.

Keywords: Mud loach, Apolipoprotein A-I, Phylogeny, Gene expression

서 론

Lipoprotein들은 척추동물의 혈중 내 지질을 운반하는 주요 단백질로서 입자의 밀도(particle density)를 기준으로 chylomicrons, low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL) 및 high density lipoprotein (HDL)로 대별되며, lipoprotein의 단백질 성분인 다양한 apolipoprotein들은 lipoprotein들의 구조와 기능을 결정하는 직접적인 인자로 작용한다(Boguski et al., 1985; Frank and Marcel, 2000). 이중 HDL은 혈중 농도 감소 시 인간 및 포유류에 있어 심각한 심장질환을 야기시키는 것으로 알려져 있으며, 때문에 본 HDL을 구성하는 apolipoprotein 단백질 및 이를 암호화하고 있는 유전자들은 많은 의학학 분야에서 중요한 연구대상이 되고 있다 (Khuseyinova and Koenig, 2006).

척추동물군 중 가장 낮은 진화 단계를 차지하는 어류는 탄수화물을 주 에너지 성분으로 사용하는 포유류와는 달리 지질을 주요 에너지원으로 이용하기 때문에 포유류와는 다른 지질 대사 작용 기작을 갖고 있으리라 예상된다. 또한 지질 대사는 변온동물인 어류에 있어 온도변화에 대한 항상성 유지(homeostasis regulation)에도 매우 중요시된다(Kondo et al., 2001). 어류의 경우 포유류에 비해 유의적으로 높은 HDL 혈중 농도를 유지하는 것으로 보고된 바 있으며 아울러 HDL의 주요 단백질 구성성분인 apoA-I 역시 포유류 등 고등 척추동물에 비해 어류에서 매우 높은 농도로 검출된 바 있다(Babin, 1987; Wallaert and Babin, 1994). 따라서 apolipoprotein 유전자들의 구조와 기능 해석은 향온동물(warm-blooded animal)군과 어류의 지질 대사에 관한 기능 비교 연구 그리고 양식 어류의 지질대사 조절 연구에 유용한 정보를 제공할 수 있다고 여겨지고 있다.

특히 apolipoprotein A-I (apoA-I)은 HDL내 가장 높은 농도

*Corresponding author: donsokim@pknu.ac.kr

로 존재하는 단백질 성분으로서 인간을 위시한 대부분의 척추동물에 존재하는 것으로 알려져 있으나 동물의 분류 위치 (taxonomic position) 및 진화거리 등에 따라 비교적 높은 염기 및 아미노산 서열 차이를 나타내는 것으로 보고된 바 있다. 때문에 multigene family로 존재하는 척추동물 apolipoprotein 유전자군의 진화와 분화 연구에도 중요한 연구소재이다(Frank and Marcel, 2000; Kondo et al., 2005).

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*; Cyprinidae)는 우리나라 전 하천 영역에 존재하는 주요 담수 식용어류로서 척추동물의 유전자 기능 연구와 유전체 조작 연구의 모델로서 많은 장점을 갖고 있으므로(Nam, 2005), 본 연구는 어류 apoA-I 유전자의 기능 분석과 지질 대사 조작 연구의 일환으로 본 어종으로부터 apolipoprotein cDNA의 분리, 구조 분석, 분자계통 해석 및 mRNA 발현 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

미꾸라지 apoA-I cDNA의 분리

미꾸라지 간(liver)조직의 expressed sequence tag (EST) 데이터베이스로부터 척추동물의 apolipoprotein A-I과 높은 유사성을 보이는 EST 클론들을 검색 후 선발하였다. 검색을 통해서 총 22개의 클론을 선발하였고 염기서열 분석 프로그램인 Sequencher 3.1.1 (Gene Codes Co., USA)를 이용하여 contig 분석을 실시하였다. Contig내 염기서열을 바탕으로 5'-UTR region과 개시 코돈(ATG)을 보유하고 있는 대표(representative) 클론들을 선발하여 primer walking방법을 통해 full-length cDNA insert의 양방향 염기서열을 확보하였다. 확보된 염기서열을 이용하여 Genbank BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 통해 여타 어류의 apoA-I 유전자와의 상동성을 확인하였다.

미꾸라지 apoA-I의 구조적 특성 분석

유전자의 구조 및 특징 분석은 CGG 염기 서열 분석 프로그램 (<http://genomic.sanger.ac.uk/gf/gfb.html>)을 이용하여 실시하였고 유추된 apolipoprotein 아미노산 서열의 hydrophathy plot은 ProtScale (<http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/protscale.pl>)을 이용하여, 그리고 서열 내 signal peptide의 유무 및 cleavage sites의 예측은 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)를 이용하여 분석하였고, PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)와 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 등의 프로그램을 이용하여 발현된 apolipoprotein 단백질의 sorting signal과 세포 내 위치 등을 예측하였다. 또한 단백질의 3차 구조 예측을 위해서 SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>)을 이용하였고 이때 기존의 구조가 알려진 종들과의 apolipoprotein A-I의 3차 구조를 재구성하여 비교하였다.

아미노산 염기서열의 다중배열과 유사도 계산

본 연구에서 확보한 미꾸라지의 apoA-I cDNA로부터 유추한 아미노산 서열과 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 수집한 진골어류(teleosts) 종들과 인간(*Homo sapiens*), 닭(*Gallus gallus*) 또는 생쥐(*Mus musculus*)의 apoA-I, apoA-IV 및 ApoE의 염기서열 정보를 함께 다중배열 하였고, 다중배열은 European Bioinformatics Institute (EBI)의 Clustal W를 이용하였다(Chenna et al., 2003). 다중 정렬된 염기서열 matrix는 BioEdit (Hall, 1999)를 이용하여 최종적으로 편집하였고, 동일 프로그램 내 Sequence Identity Matrix를 이용하여 생물종들간의 유사도를 계산하였다.

계통분석

다중 정렬된 아미노산 염기서열 matrix를 MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004)에서 불러들여 근린결합법(Neighbor-joining method)의 Dayhoff Matrix 모델을 이용하여 계통수를 작성하였으며, bootstrap 분석은 1,000회 실시하였다. 또한 최대절약분석(Maximum parsimony analysis)을 위한 tree search method는 Close-Neighbor-Interchange (CNI) 옵션을 사용하였고 random addition tree는 101회 실시하였다. 이때 bootstrap 분석은 1,000회 실시하였다.

미꾸라지 apoA-I mRNA의 조직 분포 및 발생 단계별 발현 분석

미꾸라지 apoA-I mRNA의 조직 분포를 조사하기 위해서 25°C에서 사육하고 있던 미꾸라지 성어 18개체로부터(암컷 10마리 및 수컷 8마리) 분리된 8개 조직(뇌, 지느러미, 장, 신장, 간, 비장, 난소 및 정소)들을 대상으로 Tripure Reagent (Roche, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 시료로부터 DNA를 제거하기 위해서 total RNA를 대상으로 RNase-free DNase (Roche, Germany)를 10 U/μg의 농도로 37°C에서 1시간 처리하였다. 처리가 완료되면 80°C에서 20분간 DNase를 불활성화시킨 후에 RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 RNA만을 순수분리 후 실험에 사용하였다. Semi-quantitative RT-PCR을 위한 예비 실험을 통해 input RNA의 양, PCR cycle 수 및 기타 반응 조건 등을 최적화 하였다. 예비 실험 결과를 바탕으로 조직별 RNA 주형 각 500 ng씩을 이용하여 RT-PCR을 수행하였으며 semi-quantitative RT-PCR은 AccuPower RT-PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하였다. 제조사의 권고 방법에 의거하여 42°C에서 60분간의 역전사 반응(reverse transcription; RT)을 실시하였고 RTase의 불활성화(94°C; 4분) 단계를 거친 후 94°C에서 30초, 58°C에서 30초 및 72°C에서 45초의 26회 PCR 반응을 실시하였다. 이때 사용한 oligonucleotide primer는 mApoA-I 1F (5'-GGCTGTGATAGAGAAGCACT-3') 및 mApoA-I 1R (5'-ATAGCCTCAAAGTGGGGCTT-3')이었으며 예상 RT-PCR 산물의 크기는 375 bp 였다. 조직간 internal control을 준비하기 위해서 미꾸라지 18S rRNA를 각 조직 시료로부터 apoA-

과 함께 증폭하였으며 이때 사용한 primer는 m18S rRNA 1F (5'-TAACGGGAATCAGGGTTCGAT-3') 및 1R (5'-GCCGCTA-GAGGTGAAATTCTTG-3')로서 569 bp의 18S rRNA internal fragment를 증폭하도록 설계하였다. RT-PCR 산물은 agarose 전기영동 및 ethidium bromide 염색 후 image 분석 프로그램인 Quantity-one (Bio-Rad, USA)을 이용하여 18S rRNA band를 대상으로 상대 정량을 실시하였다.

아울러 apoA-I 유전자가 미꾸라지 발생 단계별로 발현하는 특징을 조사하기 위해서 인공산란을 통해 발생 단계별 embryo 및 초기 부화 자어들의 total RNA를 확보하였다. 인공 수정은 Kim et al. (1994)의 방법에 의거 습식(wet method)으로 실시하였으며, 배 발생과 초기 자어 사육은 25 ± 1°C 항온에서 실시하였다. 수정 후 0 (수정 직후), 4, 8, 12 및 24 (부화) 시간 켜 배체 시료(구간별 각 300 배체 또는 부화 자어)를 채취하였으며, 그리고 부화 후 1, 4, 7 및 14일 켜 자어(구간별 각 50 마리)를 역시 채취하여 total RNA를 추출하였다. 상기 언급된 방법을 통해 total RNA를 분리한 후 RT-PCR 분석을 실시하였다. RT-PCR 반응은 상기와 동일하게 수행하였고 미꾸라지 apoA-I

mRNA의 시료들간 상대 정량치를 구하기 위해서 18S rRNA 대조구를 이용하여 normalization을 수행하였다. 조직 또는 발생 단계별 시료들간의 상대 정량치를 평가하기 위해 normalization 된 자료를 이용하여 ANOVA test와 Duncan's multiple ranged test를 실시하여 P=0.05 수준에서 유의성을 평가하였다(P=0.05).

결과 및 고찰

미꾸라지 apoA-I cDNA 염기서열 및 유추된 아미노산 서열의 구조 특징

미꾸라지 apolipoprotein cDNA는 총 1,102 bp의 길이로 구성되어 있었고 이중 762 bp의 open reading frame이 254개의 아미노산을 coding하고 있었다. 개시 코돈 앞에 24 bp의 5'-untranslated region (UTR) 영역과 TAA stop codon으로부터 275 bp 뒤에 conserved polyadenylation signal 서열(AATAAA)이 2개가 중첩되어 관찰되었고 이로부터 9 bp 후부터 poly (A) 서열이 확인되었다(Fig. 1). 이들 염기서열로부터 유추된 254개의 아미노산 서열로 이루어진 apolipoprotein은 분자량이 약 29.3 KDa,

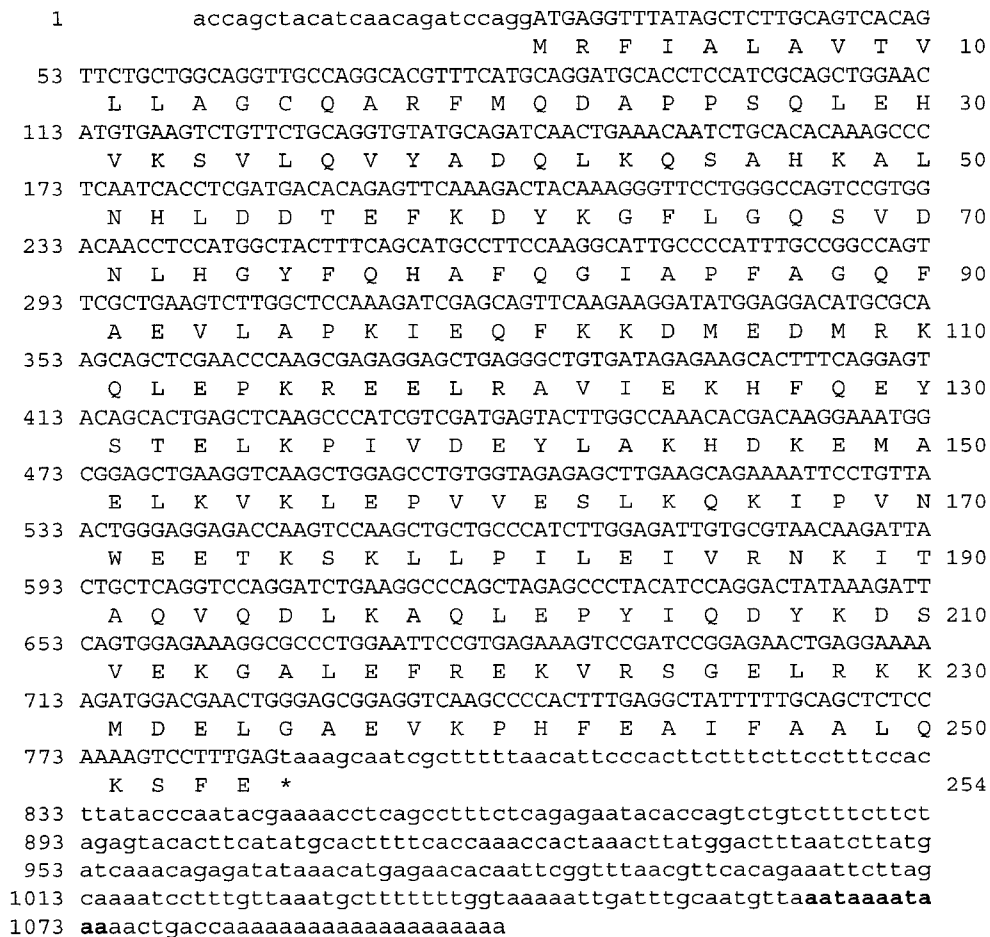


Fig. 1. Complementary DNA and its deduced amino acid (in a single letter code) sequences of mud loach apolipoprotein A-I. Stop codon (TAA) was noted by an asterisk and two overlapping polyadenylation signals were shown in bold.

의 예측은 sorting signal에 의해 secretion되는 extracellular의 형태로 나타났다.

미꾸라지 apoA-I의 아미노산 염기서열을 다른 진골어류 종들과 온혈 척추동물들(warm-blooded vertebrates; 닭, 인간)의 서열과 함께 다중 정렬하여 Fig. 2에 나타내었다. 진골어류와 온혈 척추동물 간의 먼 진화적 거리에도 불구하고, 이 두 분류군의 apoA-I의 구조, 즉 signal peptide 영역, propeptide 영역, N-말단 영역, 11개의 염기가 3개의 unit을 형성하는 A1-3 영역, 11개 또는 22개 염기서열이 반복적으로 나타나서 양극성의 α -나선형 2차 구조를 형성하는 10개 repeat structures (A1-4~A1-13 영역)는 잘 보존되어 있었다(Fig. 2). 또한 SWISS-MODEL을 이용한 3차 구조의 예측에서도 비교적 유연관계가 먼 3종의 어류(미꾸라지, zebrafish, *Danio rerio* 및 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*)에서 apoA-I들이 유사한 topology를 보임은 물론, 주형으로 사용된 포유류 apoA-I과 비교 시 많은 아미노산 서열의 차이에도 불구하고 유사한 3차 구조를 나타내었다(data not shown).

본 연구에서 분리된 미꾸라지의 apoA-I의 아미노산 염기서열의 1차 구조는 zebrafish (XM_696149)와 가장 유사하였다. 진골어류 중에서 signal peptide 영역이 17개의 염기로 구성된

미꾸라지와 zebrafish (XM_696149)를 제외한 나머지 어류는 18개 염기로 구성되었으며, 온혈 척추동물들과 비교하여 그 길이와 염기서열의 보존성이 높았다. Propeptide와 N-말단 영역은 어류 종 간에는 비교적 잘 보존되었지만, 닭, 인간과는 많은 차이를 보였다. 한편, A1-3 영역은 33개의 염기로 구성되어 있는 닭, 인간과는 달리 어류에서는 1개 염기의 deletion에 기인해 32개의 염기로 구성되었다. 한편, 10개 repeat structures (A1-4~A1-13 영역) 중에서 A1-5 영역에서 미꾸라지는 zebrafish (XM_696149)와 공통으로 4개의 염기가 deletion되었으며, A1-12 영역에서는 미꾸라지, zebrafish (XM_696149), 뱀장어(*Anguilla japonica*)에 특이적인 2개 염기의 deletion이 확인되었다.

미꾸라지에서 분리된 apoA-I 유전자와 다른 생물들에서 분리된 유전자들과의 유사도를 비교한 결과, 미꾸라지는 같은 잉어과에 속하는 zebrafish (XM_696149)와 66.7%의 가장 높은 유사도를 보였다. 그러나, 또 다른 zebrafish (Y13653)와는 35.8%의 유사도를 보였다. 한편, 뱀장어와는 44.4%의 유사도를, 연어목(Salmoniformes)에 속하는 3종의 어류와는 평균 39.1%의 유사도를, 극기상목(Acanthopterygii)에 속하는 3종의 어류와는 평균 36.1%의 유사도를 보였다. 또한 미꾸라지 apoA-I 유전자는 닭, 인간과 각각 20.4%, 19.1%의 유사도를 보였다(Table 1).

Table 1. List of vertebrate taxon used in phylogenetic analysis of apolipoprotein A-I, A-IV and E and their GenBank accession numbers.

Species	Common name	Gene	GenBank accession no.
<i>Anguilla japonica</i>	Japanese eel	ApoA-I	AB046203
<i>Anguilla japonica</i>	Japanese eel	ApoA-IV	AB046204
<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp	ApoA-I	AJ308993
<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	-	NM_001020565
<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	ApoA-I	XM_696149
<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	ApoA-I	Y13653
<i>Danio rerio</i>	Zzebrafish	ApoA-IV	BC093239
<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	ApoE	Y13652
<i>Gallus gallus</i>	Chicken	ApoA-I	M17961
<i>Gallus gallus</i>	Chicken	ApoA-IV	Y16534
<i>Homo sapiens</i>	Human	ApoA-I	M27875
<i>Homo sapiens</i>	Human	ApoA-IV	X13629
<i>Homo sapiens</i>	Human	ApoE	M12529
<i>Mus musculus</i>	House mouse	ApoE	M12414
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	ApoA-I -1	AF042218
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	ApoA-I -2	AF042219
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	ApoE	AJ132620
<i>Platichthys flesus</i>	European flounder	ApoA-I	AJ844288
<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon	ApoA-I	X52237
<i>Salmo trutta</i>	Brown trout	ApoA-I	L49383
<i>Sparus aurata</i>	Gilthead seabream	ApoA-I	AF013120
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	ApoA-I	AB183289
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	ApoA-IV-1	AB183290
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	ApoA-IV-2	NM_001032719
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	ApoA-IV-3	NM_001032720
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	ApoA-IV-4	NM_001032721
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	ApoE-I	AB183295
<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	ApoE-II	AB183296

척추동물의 apoA-I, apoA-IV 및 apoE의 계통적 유연관계

척추동물의 apoA-I, apoA-IV 및 apoE를 이용해 작성된 근린접합에 의한 계통수와 최대절약법에 의한 계통수 상에서 척추동물은 apoA-I, apoA-IV 및 apoE로 구성된 세개의 큰 분지로 나뉘었다(Fig. 3). 이들 세개 apolipoprotein 유전자들이 형성한 분지 내에서 인간, 닭 또는 생쥐로 구성된 온혈 척추동물 분류군과 진골어류 분류군은 계통적으로 명확하게 분리되었으며 각각 강하게 지지되는 단계통군들을 형성하였다.

본 연구에서 분리된 미꾸라지 apoA-I 유전자를 포함하는 첫 번째 분지는 제일 많은 어류 종들로 구성되었으며, 이들은 99% bootstrap 값으로 지지되는 단계통군을 이루었다. 또한 근린접합 계통수에서 이들 어류들은 닭, 인간과 77% bootstrap 값으로 지지되는 clade를 형성하였다. 이 분지 내에서 미꾸라지는 동일 잉어목(Cypriniformes)에 속하는 잉어(*Cyprinus carpio*), zebrafish (XM_696149)와 계통적으로 가장 밀접하게 근연하였다(99% 이상의 bootstrap 지지값). 두 번째 분지는 닭, 인간 및 어류의 apoA-IV 유전자들로 구성되었으며, 이 clade는 근린접합 계통수에서 51%의 비교적 낮은 bootstrap 값으로 지지되었다. 이들 중 어류는 99%의 bootstrap 값을 가지는 단계통군이 있었다. 세 번째 분지는 포유류(생쥐, 인간)와 어류의 apoE 유전자들로 구성되었으며 매우 강하게 지지되는 단계통 clade를 형성하였다. 또한 어류도 근린접합 계통수와 최대절약 계통수에서 각각 89%와 94% bootstrap 값들을 가지는 단계통군이 있었다(Fig. 3).

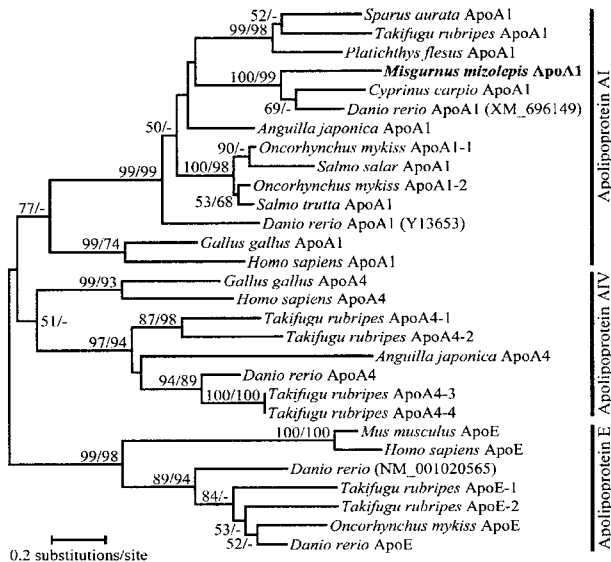


Fig. 3. Unrooted Neighbor-joining tree inferred from amino acid sequences of apolipoprotein A-I, A-IV and E of teleosts and warm-blooded vertebrates. Numbers at each branch node indicate neighbor-joining and maximum-parsimony bootstrap values above 50%. *Misgurnus mizolepis* apoA1 analyzed in this study is boldface. GenBank accession number for each sequence can be referred to Table 1.

Apolipoprotein multigene family의 진화 과정에서 apoA-I, apoA-IV 및 apoE 유전자들은 가장 최근에 유전자 복제에 의해 분화(divergence) 하였다(Li et al., 1988). 본 연구의 계통수는 조기류(Actinopterygii)와 육기류(Sarcopterygii; 총기어류와 사지동물)가 계통적으로 분리되기 이전의 공동 조상이 이들 세가지 apolipoprotein 유전자를 모두 가졌다는 것을 시사하고 있다. Apolipoprotein 유전자들의 염기서열 유사도, repeat structures와 exon/intron의 구조적 상동성에 기초하여 apoA-I, apoA-IV 및 apoE 유전자들은 단일 공동 조상 유전자로부터 복제와 분화하였으며, 이들 중에서, apoE가 가장 먼저 분화하였고 이후 apoA-I과 apoA-IV가 분화한 것으로 여겨지고 있다(Li et al., 1988). 그러나, 아미노산 염기서열에 기초한 계통수 상에서 이들 세 유전자 간의 명확한 계통적 유연관계는 밝혀지지 않았다.

한편, 일반적으로 단일 apoA-I 유전자만이 존재한다고 알려진 온혈 척추동물과는 달리(Delcuve et al., 1992), 어류에서는 apolipoprotein 유전자들이 훨씬 다양하게 분화하여 apoA-I 분지를 비롯한 apoA-IV와 apoE 분지 내에서 다양한 isoforms가 발견되고 있다(Fig. 3). 예를 들어, zebrafish의 경우 apoA-I과 apoA-IV 분지에서 각각 유전적 거리가 먼 두개의 isoforms이 동시에 존재하고 있으며, 복어(*Takifugu rubripes*)의 경우에도 apoA-I과 apoE 분지에서 유전적 거리가 먼 두개 isoforms이 존재하고 있다. 이러한 결과는 조기어류의 분화 이후 일어난 whole-genome duplication (Christoffels et al., 2004; Jaillon et al., 2004)에 기인한 것이며, 이 때문에 apoA-I, apoA-IV 및 apoE 유전자들에 기초한 계통수가 진골어류의 계통을 잘 반영하지 못하고 있는 것으로 여겨진다. 이와 달리, apoA-I 분지의 경우 무지개송어에서는 비교적 최근, 유전자 복제에 의해 분화한 두개의 isoforms가 발견되었는데, 이는 앞서 언급한 바와 같은 어류의 공동 조상에서 일어난 whole-genome duplication에 의한 것이 아니라, 연어목 내에서 일반적으로 알려져 있는 4배체화(tetraploidization)를 겪음으로써 일어난 또 다른 분화로 여겨진다. 이와 유사하게 Kondo et al. (2001, 2005)는 뱀장어와 복어에서도 최근 진화적으로 apoA-IV 유전자 복제가 일어났다고 보고하였다. 때문에 앞으로 어류의 apolipoprotein 유전자의 계통에 관한 연구에서 동등유전자(orthologous gene)의 탐색과 더 많은 종에서의 apolipoprotein 유전자 분리가 이루어져야만 보다 정확한 계통수 작성이 가능할 것으로 판단된다.

미꾸라지 apoA-I mRNA의 조직 분포

미꾸라지 apoA-I mRNA의 조직 분포와 발생 단계별 발현 양상을 RT-PCR로 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4a에서 보듯이 미꾸라지 apoA-I의 mRNA 발현은 분석한 다른 조직들에 비해 간(liver) 및 뇌(brain) 조직에서 유의적으로 높게 나타났으며 특히 간 조직에서 가장 높은 발현 수준을 보였다. 기타 다른 조직들에서는 장(intestine) 및 비장(spleen)에서 약한 발현이 관찰되었고 신장(kidney), 난소(ovary) 및 정소(testis)에

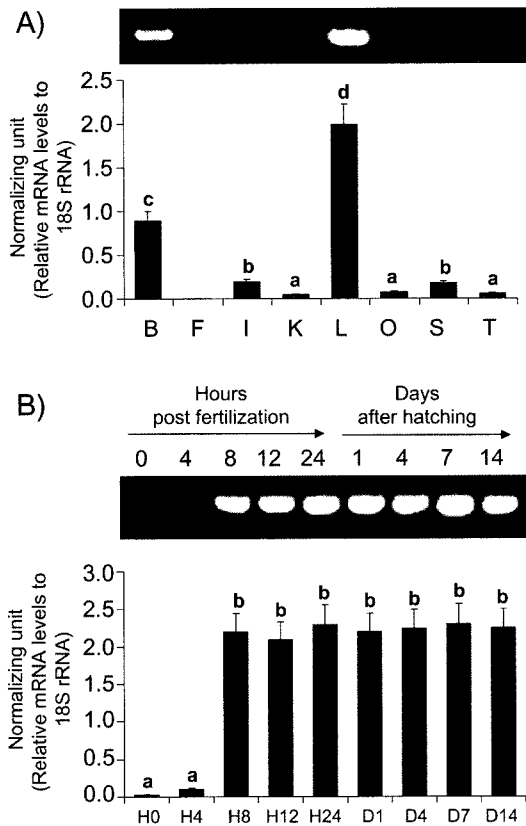


Fig. 4. RT-PCR-based expression assay of mud loach apoA-I mRNA. (A) Distribution of apoA-I mRNA in various somatic and gonadic tissues (B, brain; F, fin; I, intestine; K, kidney; L, liver; O, ovary; S, spleen; T, testis). Representative RT-PCR gel is shown and relative mRNA levels normalized against 18S rRNA control were indicated by histograms. (B) Apolipoprotein A-I mRNA expression in developing embryos (from just fertilization to hatch; H0 to H24) and early larvae (from 1 to 14 days post hatch; D1 to D14). Relative mRNA levels are normalized against to 18S rRNA control and the representative RT-PCR gel is also shown. In both (A) and (B), T bars indicate the standard deviations, and means with different letters are statistically different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

서 더욱 낮은 발현 수준으로 RT-PCR 증폭이 이루어졌다. 반면 지느러미(fin) 조직에서는 본 실험의 semi-quantitative RT-PCR 증폭 조건에서 거의 검출되지 않았다. 본 결과는 척추동물 apoA-I의 일반적인 간 주도적 합성의 결과와 잘 일치하고 있으며 또한 여타 다른 어종들에서 이미 보고된 바 있는 간에 집중된 apoA-I mRNA의 발현 결과와도 동일한 양상을 나타내고 있다(Llewellyn et al., 1998; Kondo et al., 2001). 그러나 어류의 경우 apolipoprotein의 multigene family내 두 개 이상의 apoA-I isoform 유전자들이 존재할 수 있음이 보고된 바 있으므로(Kondo et al., 2005) 차후 미꾸라지 genome내 apolipoprotein multigene family의 구성을 규명하고 apoA-I isoform 특이적인 mRNA 조직 발현의 여부에 관한 연구가 뒤따라야 할 것이다.

배 발생 및 초기 자어에서의 apoA-I mRNA 발현

수정 후 발생이 진행되고 있는 배체에서 apoA-I mRNA의 발현을 추적한 결과, 본 apoA-I mRNA는 25°C에서 수정 8시간째부터 유의적으로 급격한 증가를 나타내었다(Fig. 4b). 수정 직후 apoA-I mRNA는 매우 낮은 수준으로 검출되었으며 이는 상기 apoA-I mRNA 조직 분포 분석 시 생식소 내 낮은 발현 결과와 잘 일치하고 있다. 일반적으로 체외 수정을 하는 어류의 경우, 배체 발생에 필수적인 단백질들은 난황 내 mRNA 전구체 형태로 암컷으로부터 수직 전달되는 것으로 알려져 있으나(Chen et al., 2004) 본 apoA-I mRNA는 부모로부터 특히 암컷 친어로부터 초기 발생을 위해 수직 전달되는 형태보다는 배체 발생 시 새로 전사되어 합성되는 형태인 것으로 나타났다. 이처럼 수정 직후 낮은 mRNA 수준은 후기 morula에서 초기 blastula에 해당하는 수정 4시간째에는 계속 낮게 유지되었다. 그러나 미꾸라지 배체 발생의 post-gastrula시기가 시작되는 수정 후 8시간째 부터는 급격한 mRNA 수준의 증가가 관찰되었고 부화(수정 후 24시간) 및 이후 초기 자어에서도 계속 높은 발현 수준을 나타내었다(Fig. 4b). 아직 어류의 배 발생 과정 중 apolipoprotein들의 자세한 발현 양상 분석에 관해서는 많은 연구가 이루어지지 못한 실정으로 zebrafish에서 apoA-I을 대상으로 whole mount hybridization 분석을 통해 이루어진 바 있으나(Babin et al., 1997) 수정 초기의 분석 결과가 없고 또한 RT-PCR 등을 통한 정량적 분석이 이루어지지 않아 본 연구와의 직접적인 비교는 어렵다. Zebrafish에서도 배 발생 과정 중 및 부화 후 초기 자어에서 높은 apoA-I mRNA의 활성이 검출되었으나 이러한 apoA-I의 발현 개시점에 관해서는 후속 연구가 필요한 상태이다. 본 연구에서 관찰된 점진적인 발현의 증가가 아닌 수정 4-8시간째 급격한 발현 수준의 증폭을 보이는 결과에 대한 정확한 기작은 차후 많은 연구가 뒤따라야 되며, 특히 성체에서 apoA-I mRNA의 합성을 주로 담당하는 간 및 뇌 조직의 형성이 일어나지 않는 초기 자어 단계에서 apoA-I mRNA의 발현 기구의 규명은 발생 유전학 측면에서 중요한 연구소재를 제공할 수 있다고 판단된다. 이에 본 해당 시점의 미세 구간별 발현 조사를 통한 발현 증폭 개시점의 추적, apoA-I 외에 여타 apolipoprotein들 및 관련 유전자들의 발현 추적을 통한 상호 작용 분석에 대한 많은 정보가 수집되어야 할 것이다.

요 약

우리나라 주요 담수어종인 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)로부터 apolipoprotein A-I (apoA-I) cDNA를 분리하고 그 구조, 분자 계통 및 발현 특징을 분석하였다. 미꾸라지 apoA-I cDNA는 254개의 아미노산을 암호화하고 있는 762 bp의 ORF를 포함하고 있었으며 아울러 24 bp의 5'UTR 및 293 bp의 3'UTR (종결 코돈 및 poly A tail 제외)를 갖고 있었다. 미꾸라지 apoA-I은 여타 척추동물 apoA-I과의 다중배열 시 염기서열에서는 많은

차이를 나타내었지만 단백질의 구조적 특징은 높은 상동성을 보였고, 또한 척추동물의 apoA-I들과의 분자계통을 분석한 결과, 종래 알려진 분류학적 위치와 비교적 잘 일치하였다. 미꾸라지 apoA-I mRNA는 RT-PCR 분석을 통해 간 및 뇌 조직에서 분석한 다른 조직보다 유의적으로 높게 발현하는 것으로 나타났다. 특히 간에서 가장 높은 발현을 보였다. 수정시부터 부화 후 14일까지 초기 발생 및 치어에서의 apoA-I mRNA 발현을 조사한 결과 수정 8시간째부터 급격한 발현의 증가가 시작되어 이후 지속적으로 높은 발현 수준을 유지하였다.

참고문헌

- Babin, P., C. Thisse, M. Durliat, M. Andre, M.-A. Akimenko and B. Thisse, 1997. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8622–8627.
- Babin, P. J., 1987. Plasma lipoprotein and apolipoprotein distribution as a function of density in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem. J.*, 246, 425–429.
- Boguski, M. S., N. Elshourbagy, J. M. Taylor and J. I. Gordon, 1985. Comparative analysis of repeated sequences in rat apolipoproteins A-I, A-IV, and E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 992–996.
- Chen, W.Y., J.A.C. John, C.-H. Lin, H.-F. Lin, S.-C. Wu, C.-H. Lin, C.-Y. Chang, 2004. Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat. Toxicol.*, 69, 215–227.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins and J. D. Thompson, 2003. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3497–3500.
- Christoffels, A., E. G. L. Koh, J.-M. Chia, S. Brenner, S. Aparicio and B. Venkatesh, 2004. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol. Biol. Evol.*, 21, 1146–1151.
- Delcuve, G. P., J. M. Sun and J. R. Davie, 1992. Expression of rainbow trout apolipoprotein A-I genes in liver and hepatocellular carcinoma. *J. Lipid Res.*, 33, 251–262.
- Frank, P. G and Y. L. Marcel, 2000. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J. Lipid Res.*, 41, 853–872.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95–98.
- Jaillon, O., J. M. Aury, F. Brunet, J. L. Petit, N. Stange-Thomann, E. Mauceli, L. Bouneau, C. Fischer, et al., 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, 431, 946–957.
- Khuseyinova, N. and W. Koenig, 2006. Apolipoprotein A-I and risk for cardiovascular diseases. *Curr. Atheroscler Rep.*, 8, 365–373.
- Kim, D. S., J. Y. Jo and T. Y. Lee, 1994. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonadal development and growth. *Aquaculture*, 120, 263–270.
- Kondo, H., I. Kawazoe, M. Nakaya, K. Kikuchi, K. Aida and S. Watabe, 2001. The novel sequences of major plasma apolipoproteins in the eel *Anguilla japonica*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1531, 132–142.
- Kondo, H., K. Morinaga, R. Misaki, M. Nakaya and S. Watabe, 2005. Characterization of the pufferfish *Takifugu rubripes* apolipoprotein multigene family. *Gene*, 346, 257–266.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5, 150–163.
- Li, W.-H., M. Tanimura, C.-C. Luo, S. Datta and L. Chan, 1988. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J. Lipid Res.*, 29, 245–271.
- Llewellyn, L., V. P. Ramsurn, T. Wigham, G. E. Sweeney and D. M. Power, 1998. Cloning, characterization and expression of the apolipoprotein A-I gene in the sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1442, 399–404.
- Nam, Y. K., 2005. Tailoring fish genome and transgenic manipulation as exemplified by mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Fish Genet. Breed. Sci.*, 35, 113–121.
- Wallaert, C. and P. J. Babin, 1994. Age-related, sex-related, and seasonal changes of plasma lipoprotein concentrations in trout. *J. Lipid Res.*, 35, 1619–1633.

원고접수 : 2007년 1월 5일

수정본 수리 : 2007년 2월 14일