

참전복 (*Haliotis discus hannai*) Myostatin 유전자의 cDNA 동정 및 발현 분석

이상범 · 김정환¹ · 조미진 · 오미영 · 박흠기² · 진형주*
강릉원주대학교 해양생명공학부 해양분자생명전공, ¹부경대학교 생물공학과
²강릉원주대학교 해양생명공학부 해양자원육성전공

Molecular Cloning and Expression Pattern of Abalone (*Haliotis discus hannai*) Myostatin cDNA

Sang Beum LEE, Jeong Hwan KIM¹, Mi Jin JO, Mi-Young OH,
Heum Gi PARK² and Hyung-Joo JIN*

Division of Marine Molecular Biotechnology, Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea
¹Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
²Division of Marine Food Science & Technology, Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

We cloned and sequenced the open reading frame (ORF) cDNA encoding myostatin from the muscle of abalone (*Haliotis discus hannai*). The ORF cDNA of the abalone myostatin is 1134 bp and encoded 377 amino acid residues that were 60-96% homologous with the amino acids of other organism myostatins. In addition, the ORF contained a conserved proteolytic cleavage site (RXRR) and nine conserved cysteine residues in the C-terminus. Semi-quantitative RT-PCR revealed the presence of myostatin mRNA in various tissues. The strongest expression was observed in the mantle of female abalone, and the gills and heart of male abalone.

Key words: Abalone, GDF-8, *Haliotis discus hannai*, Myostatin, TGF-β

서 론

근육에서 특이적으로 많이 발현되는 myostatin (GDF8)은 transforming growth factorβ (TGF-β) superfamily의 하나로써 골격근육의 성장과 발달을 억제하는 조절자로서 알려져 있다. 소와 생쥐 등에서 myostatin 유전자의 돌연변이는 과도한 근육축적을 유도한다고 보고되었고 근섬유 발달과정에서 myostatin의 기능들이 확인되었다(McPherron et al., 1997). Myostatin 내에서 돌연변이된 double muscled 소 품종으로는 Belgian Blue 와 Piedmontese가 보고되었다(Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997). 생쥐에서는 돌연변이나 knock-out에 의한 유전자 발현 억제가 지방 함량을 감소시키면서 근섬유 수와 크기의 증가에 의해 야생형 보다 골격근의 무게가 증가되는 것으로 보고되었다. 근섬유 소실을 초래하는 근육이영양증 (muscular dystrophy) 동물모델에 대한 myostatin 단백질 기능 억제는 근육발달을 향상시키는 결과를 보였다(Tomas et al., 2000; McPherron et al., 2002; Lin et al., 2002; Acosta et al., 2005).

최근 myostatin 유전자는 여러 척추동물들 뿐만 아니라 해양 동물들에서도 밝혀지고 있으며, myostatin 유전자는 중간에 잘 보존되어 있고, 생물학적 기능 또한 동일할 것으로 추정되

고 있다(Gonzalez-Cadavid et al., 1998; McPherron and Lee, 1997; Kocamis et al., 1999; Xu et al., 2003; Amali et al., 2004; Biga et al., 2005). 이러한 결과는 인간의 근육 소모관련 질병에 대한 치료 및 예방의 가능성을 시사하며, 많은 육상 및 해양 동물의 양식 산업의 생산성을 향상시킬 수 있을 것이라 기대되고 있다.

대부분의 해양동물의 myostatin 발현은 육상동물과는 달리 근육에만 국한되지 않고 모든 조직에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 또한 brook trout의 경우 발생단계별 암수에 따라 근육에서 myostatin RNA의 발현정도가 차이가 나는 것이 보고가 되었다(Robet and Goetz, 2003).

본 연구는 해양생물 myostatin 유전자 분석과 double-muscling 연구의 일환으로 주요 양식어종인 패류 참전복 (*Haliotis discus hannai*)의 myostatin cDNA 분리, 구조 분석, 분자계통 해석 및 암수 조직에서의 mRNA 발현 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채집 및 primer 합성

강원도 강릉시 주문진외 전복 양식장에서 구입한 암컷 3마리 그리고 수컷 3마리 참전복은 신선한 상태로 근육, 외투막, 심장, 아가미, 입, 식도를 적출하였다. 분리한 각 조직들은

*Corresponding author: hj-jin@nukw.ac.kr

사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다.

참전복 myostatin을 암호화 하고 있는 open reading frame (ORF)을 밝히기 위하여 NCBI GenBank에 등록된 경골어류 넙치 (Accession No. DQ412048)와 조피볼락 (Accession No. DQ423474)의 myostatin cDNA의 염기서열을 이용하여 primers를 합성하였다 (Table 1).

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

Trizol reagent (Invitrogen, USA)와 CTAB 방법 (Sambrook et al., 1989)을 사용하여 근육조직에서 total RNA를 추출하였다. -80°C에 보관되어 있는 참전복의 근육조직을 멸균된 의료용 메스로 100 mg씩 절단하여 2 mL eppendorf tube에 넣고 CTAB 용액(2% CTAB, 2% PVPP, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% β-mercaptoethanol) 750μL를 첨가하였다. Homogenizer를 이용하여 파쇄 시킨 후 65°C에서 5분간 반응시켰다. 이후 750μL의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 용액을 넣어 잘 섞어주고 4°C 원심분리기에서 14,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였고, 이 과정을 2번 반복하였다. 원심분리 후, 상등액을 2 mL eppendorf tube에 회수하고 Trizol reagent 1 mL을 넣었다. 상온에서 5분간 보관 후, 0.2 mL의 chloroform을 넣어주고 15초 강하게 흔들어서 주었다. 3분간 상온에서 반응 후 4°C 원심분리기에서 12,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하였다. 원심분리 후 상층액만 새로운 eppendorf tube에 옮기고 0.5 mL의 isopropyl alcohol을 넣어준 뒤 상온에서 10분간 반응시킨 뒤 12,000 rpm으로 4°C에서 15분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 tube에 남아있는 pellet을 DEPC water가 처리된 75% ethanol로 2회 washing 후 ethanol을 제거하고 건조시킨 뒤 DEPC water에 용해하여 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다. cDNA합성은 추출된 total RNA 0.5 ug 을 주형으로 하여 Invitrogen 사의 SuperscriptTMII Reverse Transcriptase를 이용하였다.

참전복 myostatin cDNA 클로닝

iCycler thermal cycler (Bio-rad, USA) 을 이용하여 RT-PCR을 시행하였으며 RT-PCR 반응액은 cDNA 2μL, 10X Ex TaqTM buffer 2.5μL, 25 mM MgCl₂ 1μL, 10 mM dNTP 0.5μL, 10 pM forward primer 0.5μL, 10 pM reverse primer 0.5μL, TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.2μL, DDW 17.8μL를 넣어 total

volume 25μL로 하였다. RT-PCR 조건은 94°C 3분(pre-denaturation), 94°C 1분, 57°C 30초, 72°C 1분 20초간 35 cycles 반응하였으며 final extension으로 72°C에서 10분간 반응하였다. 1st RT-PCR은 NF13-NR23 primer를 사용하였고, 1st RT-PCR products를 template로 하여 2nd RT-PCR을 pro-domain과 mature 영역으로 나누어 NF13-NR24, NF14-NR23 primers로 각각 시행하였다.

증폭된 단편은 1% agarose gel에 전기영동 하여 각 단편의 크기를 확인하였고, Gel purification kit (Bioneer)을 이용하여 정제하였다. 염기서열을 밝히기 위하여 pGEM[®]-T easy vector (promega, USA)을 이용하여 삽입하였다. pGEM[®]-T easy vector (promega, USA)에 삽입된 cDNA 단편을 DH5α competent cell에 형질 전환시킨 다음 50 ug/mL ampicillin, 40 ug/mL X-gal 을 함유한 LB plate에 도말하였다. LB plate 상의 white colony를 5 mL LB-ampicillin (50 ug/mL) 액체배지에 overnight 배양한 후에, plasmid extract kit (Bioneer)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. Target gene의 vector에 삽입여부는 Promega 사의 EcoR I (12 U/μL)을 사용하여 제한효소 처리 후 전기영동 하여 확인하였다. 추출된 plasmid DNA는 ABI prismTM BigdyeTM terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1을 이용하여 자동 염기서열 분석 장치인 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer 로 염기서열을 확인하였다.

아미노산 염기서열의 다중배열과 유사도 계산

본 연구에서 확보한 참전복 myostatin cDNA로부터 유추한 아미노산 서열과 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 수집한 경골어류 (teleosts)종들과 인간 (*Homo sapiens*), 닭 (*Gallus gallus*), 생쥐 (*Mus musculus*), 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) 그리고 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*)의 myostatin의 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 4.0.2

Table 1. The primers used in this study

	Primer name	Sequence	Reference GenBank Accession No.
Forward primer	NF13	5'-ATGCATCTGTCTCACATTGTGCT-3'	DQ412048
	NF14	5'-GACGCGGGCCTGGACTGTGAC-3'	DQ423474
	F 9	5'-GGACTGGATTATTGCCCAA-3'	AY319437
	18S rRNA(F)	5'-CCCTGGACATCTAAGGGCAT-3'	
Reverse primer	NR23	5'-TCAAGAGCACCCGCAACGGTC-3'	DQ412048
	NR24	5'-TCTCCTGACTCGCTTTGGGCCGT-3'	DQ423474
	R6	5'-GGGGATCTTGCCGTAGATGA-3'	AY319437
	18S rRNA(R)	5'-GCCTGCGGCTTAATTTGACT-3'	

(Kumar et al., 2004)에서 근린결합법 (Neighbor-joining method) 및 Kimura 모델 (Kimura, 1980)을 이용하여 계통수를 작성하였고, bootstrap 분석은 1,000회 실시하였다.

참전복 myostatin mRNA의 조직별 발현패턴 분석

참전복 myostatin mRNA의 조직 분포를 조사하기 위해서 암컷 3마리 그리고 수컷 3마리 참전복에서 분리된 6개 조직 (근육, 외투막, 심장, 아가미, 입, 식도)들을 대상으로 Trizol reagent (Invitrogen, USA)와 CTAB 방법 (Sambrook et al., 1989)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 시료로부터 DNA를 제거하기 위해서 total RNA를 대상으로 RNase-free DNase (Promega, USA)를 37°C에서 1시간 처리하고, 75°C에서 20분간 DNase를 불활성한 후 cDNA 합성은 total RNA 0.5 ug을 주형으로 하여 Invitrogen 사의 Superscript™II Reverse Transcriptase를 이용하였다. 각 조직별 합성된 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 하였으며, RT-PCR 반응액은 각 조직별 cDNA 1µL, 10X Ex Taq™ buffer 2.5µL, 25 mM MgCl₂ 1µL, 10 mM dNTP 0.5µL, 10 pM forward primer 0.4µL, 10 pM reverse primer 0.4µL, TaKaRa Ex Taq (5 U/µL) 0.2µL, DDW 19µL를 넣어 total volume 25µL로 하였다. RT-PCR 조건은 94°C에서 3분 (pre-denaturation), 94°C 1분, 57°C 30초, 72°C 1분 20초간 35 cycles 반응하였으며 final extension으로 72°C에서 10분간 반응하였다. 이때 사용한 oligonucleotide primer는 F9-R6 (Table 1)이었으며 예상 RT-PCR 산물의 크기는 각각 220 bp 이었다. RT-PCR 산물은 agarose 전기영동 및 ethidium bromide 염색 후 image 분석 프로그램인 Quantity-one (BioCapt v99, Viber lourmat, Marne La Vallee, France)을 이용하여 β-actin band를 대상으로 상대 정량을 실시하였다. 사용한 primer는 18S rRNA (F) 및 18S rRNA (R) 로서 299 bp의 fragment를 증폭하도록 설계하였다.

결과 및 고찰

참전복 myostatin cDNA 염기서열 및 아미노산 서열 구조의 특징

참전복 myostatin cDNA의 ORF을 클로닝 한 결과 1,134 bp의 길이로 구성되어 있었으며, 377개의 아미노산을 encoding 하고 있었다. 추정된 염기서열은 myostatin 의 특징인 proteolytic cleavage site인 RXRR 부위를 포함하고 있었다 (Fig. 1). 본 연구를 통하여 참전복의 근육으로부터 total RNA를 추출하여 myostatin을 암호화하고 있는 것으로 추정되는 ORF 부위의 cDNA를 cloning 하고 그 염기서열을 규명하였다.

참전복 myostatin의 아미노산 염기서열을 다른 경골어류, 무척추동물 (대하) (Lee et al., 2007), 조류 그리고 포유류의 서열과 함께 다중 정렬하여 Fig. 2에 나타내었다. 경골어류, 조류, 포유류 그리고 무척추 동물간의 먼 진화적 거리에도 불구하고 myostatin은 TGF-β superfamily 의 공통적인 구조, 즉 signal peptide 영역, prodomain 영역, proteolytic cleavage

M H L S H I V L Y L S L L V A L G P V V	20
<u>atgatctctctcacatctgtgggctatctcagtttctggttgccttgggtccagtagtt</u>	60
NF13	
L S D Q E T H H Q Q P S A S S P E D A E	40
ctgagcgaccacaagagacgcaccatcagcagccctcggccagcagcccgagagcgcggag	120
Q C A T C D V R Q Q I K T M R L N A I K	60
cagtgccgaccctcgcgacgtccggcagcagataaaaaccatgagcactaaacgcgatcaaa	180
S Q I L S K L R M K E A P N I S R D I V	80
tctcagattctgagcaaacctgcaatgaaggaagctccgaacatcagccgagacattgtg	240
K Q L L P K A P P L Q Q L L D Q Y D V L	100
aagcagctcctgcccacaagcaccgcccctgcagcagcttctcaccagctacgacgtgctg	300
G D D N R D V V M E D D D E H A T T E T	120
ggagcagcaacaacagggatgtggctcagggatgatgatgagcagccaccacagagaca	360
I M M M A T E P E P I V Q V D A E P K C	140
atcatgatgatggccaccgaaccccgagccatcgtccaggtggatgcccagcccaagtgcc	420
C F F S F T I Q K F Q A S R I V R A Q L W	160
tgctttttctctttaccacaaaagtccaagccagtcagctcgtcggcgccagctctgg	480
V Y L R P A D E A T T V F L Q I S R L M	180
gtctactctcggcggcgagcagggcagccaccggttctcctcagatctcggcctgatg	540
P V T D G S R H I R I R S L K I D V N A	200
ccggtcaaggcggggcagggcagccacatcggatccgctccctcgaagattgagctgaacgcc	600
G L S S W Q S I D V K Q V L T V W L R Q	220
ggctcagctcctggcaagatagacgctcaaaccaagtgctgactgctggtgctgctgag	660
P E T N W G I E I N A F D S R G N D L A	240
ccggagaccaactggggcatcagatataagccctcagatcaggggggaaacgacttggcc	720
V T S T E P G E E G L Q P F M E V K I T	260
gtgacctccacagagccggagaggaaggatgcaaccattcattggagtggaagatcacc	780
D G P K R V R R D A G L D C D E N S P E	280
gagggcccaaacgagctcaggagagcagcggcctgagctgtagcgaaaactcccagag	840
NR24	NF14
T R C C R Y P L T V D F E D F G W D W I	300
accggtgctgctccgctatccgctcacagttgacttggagacttggctgggactggatt	900
F9	
I A P K R Y K A N Y C S G E C E Y M H L	320
<u>atgcccacaagcgtacaaggccaactattgctctggggagtgtagtacctgacttg</u>	960
Q K Y P Y T H L V N K A N P R G T A G P	340
cagaagtatccctacacccacccctgggtgaacaaagccacccacagagccgcaagcccc	1020
C C T P T K M S P I N M L Y F N R K E Q	360
tgctgacccccacaagatgtcgccatcaacatgctctactttaaactgcaagagcag	1080
I I Y G K I P S M V V D R C G C S *	377
<u>atcatctacggcaagatccccctccatggtgggacgctgctggcttga</u>	1134
NR23	

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the *H. discus hannai* myostatin. The proteolytic processing site (RXRR) is underlined. Location of primers (NF13, NF14, NR23, NR24, F9, R6) used to obtain the ORF myostatin and semiquantitative RT-PCR fragment denoted with arrows. The nucleotide sequence data of myostatin appear in the GenBank database under the accession number FJ644688. Prodomain region is from NF13 to NR24. Mature region is from NF14 to NR23.

site 그리고 mature 영역이 보존되어 있었다 (Fig. 2). 참전복의 myostatin을 암호화 하는 ORF cDNA의 염기서열로부터 추정된 단백질은 1-22번째 위치의 아미노산의 signal peptide 서열과 41-259번째 위치의 아미노산의 prodomain 서열 279-377번째 위치의 아미노산의 mature peptide 서열을 포함한 377개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 추정되었다. 추정된 참전복 myostatin은 보고된 다른 포유류, 조류 및 경골어류와 마찬가지로 9개의 cysteine 잔기가 보존되어 있다 (Fig. 2). 보고된 경골어류의 myostatin은 9개의 cysteine 잔기를 가지고 있는데 이는 분자간 이황화 결합의 형성을 매개함으로써 그 호르몬의 3차원 구조를 형성하게 하는데 기여하는 것으로 알려져 있다.

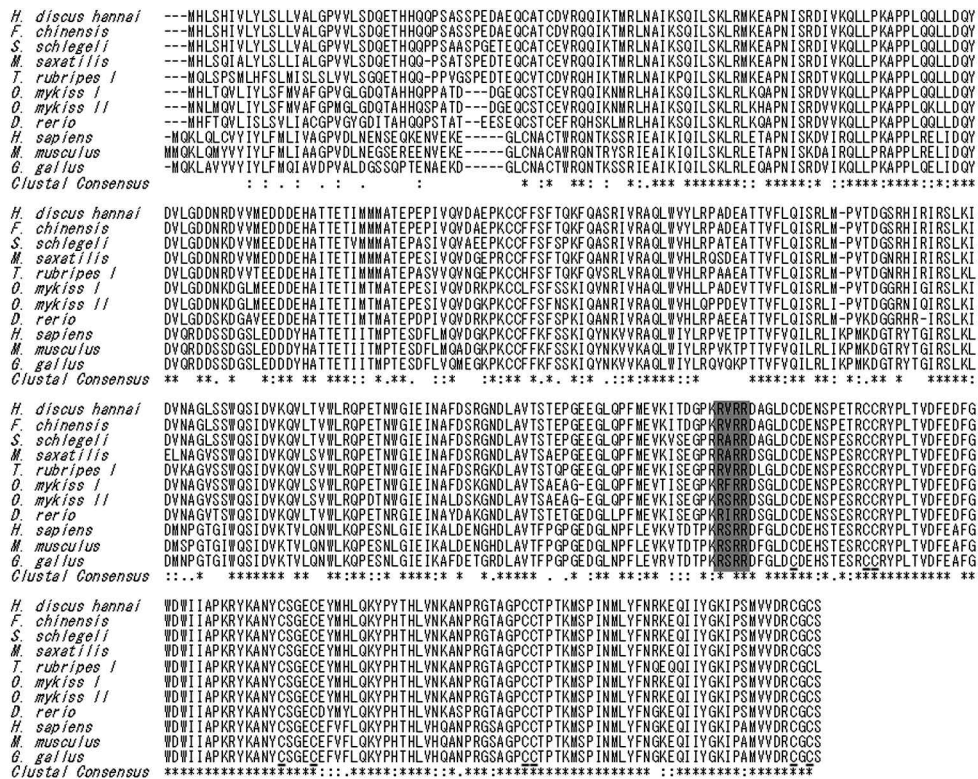


Fig. 2. Alignment of the amino acid sequence of abalone (*H. discus hannai*, GenBank Accession No. FJ64468), rockfish (*S. schlegeli*, GenBank Accession No. DQ423474), shrimp (*F. chinensis*, GenBank Accession No. EU131093), Striped sea-bass (*M. saxatilis*, GenBank Accession No. AF290910), fugu (*T. rubripes* I, GenBank Accession No. AY445322), rainbow trout (*O. mykiss* I, GenBank Accession No. AF273035), rainbow trout (*O. mykiss* II, GenBank Accession No. AF273036), zebrafish (*D. rerio*, GenBank Accession No. AL672217), human (*H. sapiens*, GenBank Accession No. DQ927096), mouse (*M. musculus*, GenBank Accession No. NM_010834) and chicken (*G. gallus*, GenBank Accession No. NM_001001461). Grey box indicate RXRR proteolytic cleavage site and conserved cysteine are indicated with underlines. Consensus symbols below the sequence matrix are as follows: asterisks (*) indicate that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment, double dots (:) indicate that conserved substitutions have been observed, and single dots (.) indicate that semi-conserved substitutions have been observed according to Chenna et al. (2003). Gaps indicated by dashes are inserted to optimize the alignment.

Myostatin은 진화적으로 mature 영역이 잘 보존이 되어 있으나, prodomain 영역은 종에 따라 많은 차이를 보인다고 알려져 있다. 참전복 myostatin 아미노산의 염기서열을 인간 (*H. sapiens*), 쥐 (*M. musculus*), 닭 (*G. gallus*), 제브라피쉬 (*Danio rerio*), 무지개송어 2종 (*O. mykiss* I, II), 자주복 (*Takifugu rubripes* I), 줄무늬농어 (*Morone saxatilis*), 배스 (*Micropterus salmoides*), 조피볼락 (*S. schlegeli*), 그리고 대하 (*F. chinensis*)와 비교한 결과 참전복의 myostatin은 육상동물보다는 해양동물과 높은 상동성이 나타났으며, 특히 제브라피쉬, 무지개송어 2종, 조피볼락 그리고 배스보다는 대하와 높은 상동성을 보였으며, mature 영역은 육상동물과 해양동물에서 prodomain 영역과 비교하여 상대적으로 높은 상동성을 보여 진화적으로 잘 보존이 되어 있는 것을 확인할 수 있다 (Table 2, Fig. 3).

참전복 myostatin mRNA의 조직별 발현

참전복 myostatin mRNA의 조직 분포와 발현 양상을 RT-PCR로 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4 A, B에서

보듯이 기존에 밝혀진 육상동물의 myostatin 발현 패턴과는 다른 양상을 보였다. 기존 육상동물의 경우 대부분 근육에서 발현이 되고, 근육을 제외한 다른 조직에서는 발현이 나타나지 않았으며, 일부 연구결과에서는 심장조직에서도 발현이 되었다는 보고가 있다 (Sharma et al., 1999). 해양동물의 경우 모든 조직에서 발현이 되지만, 일반적으로 근육에서 가장 많은 발현이 된다고 알려져 있다. 참전복 myostatin의 발현은 수컷과 암컷의 구별 없이 모든 조직에서 발현하였다. 암컷의 경우 외투막에서 가장 많은 발현이 되었고, 수컷의 경우는 아가미와 심장에서 가장 많은 발현이 되었다. 하지만, 발현 정도의 차이는 있지만, 근육보다는 다른 조직에서 myostatin RNA의 발현이 더 높게 나타났다. 최근 보고된 칠레넵치 myostatin의 발생시기별 발현패턴에 대한 연구에 의하면, 조직별 발현이 발생시기별 차이가 있으며, 또한 근육조직 중 red muscle이 white muscle보다 훨씬 더 많이 발현되었으며, white muscle의 경우는 다른 조직보다 발현이 더 낮게 되었다고 보고

Table 2. Amino acid sequence identified of myostatins from various organisms

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Unprocessed region											
1. <i>H. sapiens</i>	100										
2. <i>M. musculus</i>	96	100									
3. <i>G. gallus</i>	91	90	100								
4. <i>H. discus hannai</i>	64	63	64	100							
5. <i>F. chinensis</i>	65	63	64	99	100						
6. <i>S. schlegeli</i>	63	62	63	93	93	100					
7. <i>M. saxatilis</i>	64	62	63	92	93	92	100				
8. <i>T. rubripes I</i>	60	59	61	86	86	87	88	100			
9. <i>O. mykiss I</i>	65	64	65	84	84	85	86	81	100		
10. <i>O. mykiss II</i>	66	65	64	83	83	83	86	79	94	100	
11. <i>D. rerio</i>	68	66	66	80	81	82	81	77	86	84	100
Prodomain region											
1. <i>H. sapiens</i>	100										
2. <i>M. musculus</i>	94	100									
3. <i>G. gallus</i>	88	87	100								
4. <i>H. discus hannai</i>	55	53	55	100							
5. <i>F. chinensis</i>	55	53	55	100	100						
6. <i>S. schlegeli</i>	53	51	53	91	91	100					
7. <i>M. saxatilis</i>	53	52	52	91	91	89	100				
8. <i>T. rubripes I</i>	50	48	51	83	83	83	85	100			
9. <i>O. mykiss I</i>	56	54	55	79	79	79	81	75	100		
10. <i>O. mykiss II</i>	57	55	54	78	78	77	80	73	92	100	
11. <i>D. rerio</i>	60	57	56	75	75	77	76	70	83	80	
Mature region											
1. <i>H. sapiens</i>	100										
2. <i>M. musculus</i>	100	100									
3. <i>G. gallus</i>	100	100	100								
4. <i>H. discus hannai</i>	87	87	87	100							
5. <i>F. chinensis</i>	88	88	88	99	100						
6. <i>S. schlegeli</i>	88	88	88	98	99	100					
7. <i>M. saxatilis</i>	88	88	88	97	98	99	100				
8. <i>T. rubripes I</i>	86	86	86	93	94	95	95	100			
9. <i>O. mykiss I</i>	88	88	88	97	98	99	100	95	100		
10. <i>O. mykiss II</i>	88	88	88	97	98	99	100	95	100	100	
11. <i>D. rerio</i>	88	88	88	92	93	94	95	91	95	95	100

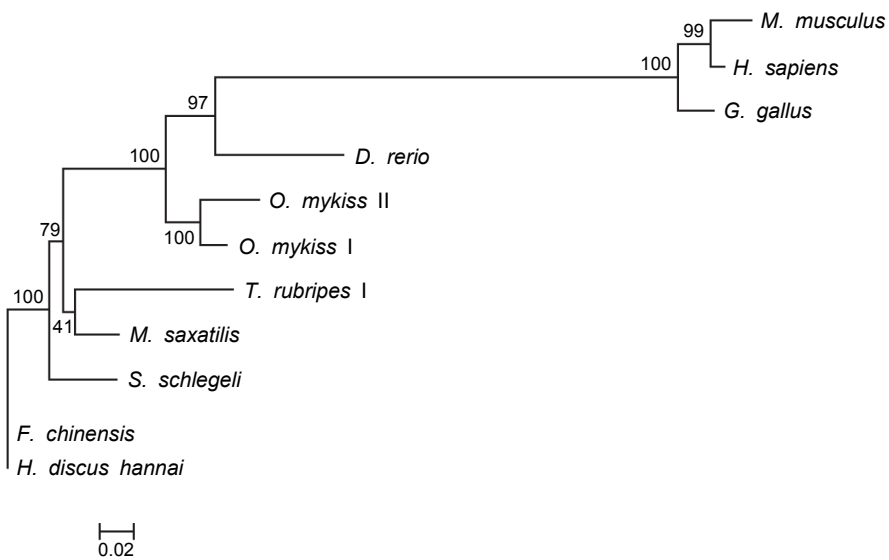


Fig. 3. Neighbor-joining tree was constructed by the Kimurás (1980) distance matrix. Clustal analysis is based on alignment amino acid sequence of myostatins. Numbers at branches indicate bootstrap probabilities in 1,000 bootstrap replications. Bar equals 0.02 of Kimarás (1980) distance.

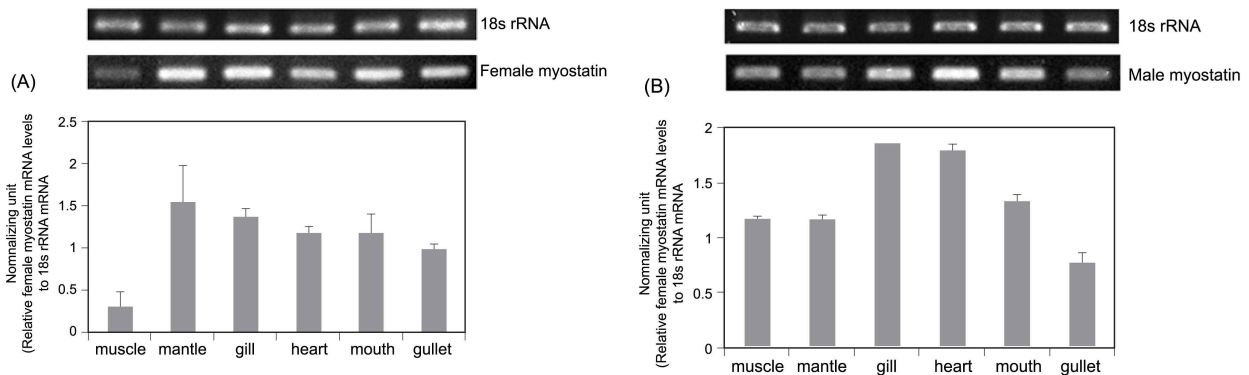


Fig. 4. RT-PCR-based expression assay of abalone myostatin mRNA. Distribution of female (A) and male (B) abalone mRNA in various tissues (muscle, mantle, gill, heart, mouth, gullet). Representative agarose gel of RT-PCR is shown and relative mRNA levels normalized against 18S rRNA control were indicated by histograms.

하였다 (Delgado et al., 2008). 이러한 결과는 해양동물의 발생 단계별 암수조직에서 myostatin이 서로 다르게 발현되며 또한 그 기능도 차이가 있을 것으로 추론할 수 있다. 본 연구결과는 myostatin 기능 및 메카니즘 등의 연구에 기초자료로서 이용될 수 있을 것으로 사료되며, 앞으로, 전복의 각 발생단계별 암수에 따른 myostatin의 발현패턴과 그 기능에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

사 사

본 연구는 강릉대학교 특성화 연구지원 사업 (2007-0137)에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Amali, A.A., C.J. Lin, Y.H. Chen, W.L. Wang, H.Y. Gong, C.Y. Lee, Y.L. Ko, J.K. Lu, G.M. Her, T.T. Chen and J.L. Wu. 2004. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev. Dyn.*, 229, 847-856.
- Acosta, J., Y. Carpio, I. Borroto, O. Gonzalez and M.P. Estrada. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.*, 119, 324-331.
- Biga, P.R., S.B. Roberts, D.B. Iliev, L.A. McCauley, J.S. Moon, P. Collodi and F.W. Goetz. 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 141, 218-230.
- 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.
- Grobet, L., L.J. Marvatin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Menissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset and M. Georges. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *NAT. Genet.*, 17, 71-74.
- Delgado, I., E. Fuentes, S. Escobar, C. Navarro, T. Corbeaux, A.E. Reyes, M.I. Vera, M. Alvarez and A. Molina. 2008. Temporal and spatial expression pattern of the myostatin gene during larval and juvenile stages of the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 151, 197-202.
- Gonzalez-Cadavid, N.F., W.E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver and S. Bhasin. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14938-14943.
- 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.
- Kambadur, R., M. Sharma, T.P. Smith and J.J. Bass. 1977. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.*, 7, 910-916.
- Kimurá, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16, 116-120.
- Kocamis, H., D.C. Kirkpatrick-Keller, J. Richter and J. Killefer. 1999. The ontogeny of myostatin, follistatin

- andactivin-B mRNA expression during chicken embryonic development. *Growth Dev. Aging*, 63, 143-150.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5, 150-163.
- Lin, J., H.B. Arnold and M.A. Della-Fera. 2002. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochme. Biophys. Res. Commun.*, 291, 701-706.
- Lee, S.B., Y.S. Kim, M.G. Yoon, S.K. Kim, I.K. Jang, H.J. Lim and H.J. Jin. 2007. Characterization and expression pattern of the partial myostatin cDNA in shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* *J. Marin Biotech. Biosci.*, 2, 224-229.
- McPherron, A.C. and S.J. Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12457-12461.
- McPherron, A.C. and S.J. Lee. 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 109, 595-601.
- Robert, S.B. and F.W. Goetz. 2003. Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 210, 9-20.
- Sambrook, T., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Habor Laboratory Press, New York.
- Sharma, M., R. Kambadur, K.G. Matthews, W.G. Somers, G.P. Devlin, J.V. Conaglen, P.J. Fowke and J.J. Bass. 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell. Physiol.*, 180, 1-9.
- Tomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass and R. Kambadur. 2000. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation *J. Biol. Chem.*, 275, 40235-40243.
- Xu, C., G. Wu, Y. Zohar and S.J. Du. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.*, 206, 4067-4079.

2009년 1월 30일 접수
 2009년 3월 12일 수정
 2009년 4월 9일 수리