

혈청 칼슘 농도에 미치는 넙치 유전자 재조합 스타니오칼신의 효과

신지혜·정유정¹·한윤희¹·이균영¹·이경미²·카네코 토요지²·손영창*

강릉원주대학교 해양생명공학부, ¹리제론(주), ²동경대학 농학생명연구과

Effect of Recombinant Olive Flounder Stanniocalcin on Serum Calcium Levels

Jihye Shin, Yujung Jung¹, Yoonhee Han¹, Kyunyoung Lee¹,
Kyung Mi Lee², Toyoji Kaneko² and Young Chang Sohn*

Department of Marine Molecular Biotechnology, Faculty of Marine Bioscience
and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

¹Regeron, Inc., Hi-Tech Venture Town, Chunchon 200-161, Korea

²Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

Stanniocalcin 1 (STC1) is a glycoprotein hormone that is important in the maintenance of calcium and phosphate homeostasis in both fish and mammals. STC1 and its paralog STC2 are expressed in multiple tissues in fishes, although the physiological roles of piscine STCs are still unclear compared with those of mammals. In this study, we cloned olive flounder STC1 (ofSTC1) and ofSTC2 cDNAs into pET28a vector and used *E. coli* Rosetta (DE3) as the host strain for protein expression. Expression experiments were carried out using isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) and nickel affinity chromatography. We could identify the recombinant proteins as single 29.5 kDa (ofSTC1) and 33.2 kDa (ofSTC2) bands in the insoluble fraction on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). These results indicate that ofSTC1 and ofSTC2 were expressed as insoluble proteins in *E. coli*. Furthermore, the injection of ofSTC1 protein into juvenile tilapia resulted in a decrease of the serum calcium level. These results suggest that the purified fish STC1 and STC2 proteins may be used to elucidate the physiological role of STCs in fishes.

Key words: Stanniocalcin, *E. coli*, Protein expression, SDS-PAGE, Serum calcium level

서론

스타니오칼신 (stanniocalcin-1, STC1)은 경골어류에서 칼슘의 흡수를 억제시키는 항과잉칼슘호르몬으로서 그 기능이 최초로 밝혀진 칼시오트로픽 호르몬 (calciotropic hormone)에 속한다 (Butkus et al., 1987; Lu et al., 1994; Sundell et al., 1992). 혈장 내 칼슘의 농도가 증가할 시, 어류의 신장 말단에 매몰되어 존재하는 내분비 기관인 스타니우스 소체로부터 STC1의 합성과 방출이 촉진된다 (Wagner and DiMattia, 2006). 한편, STC1 유전자 염기서열의 분석과 더불어 어류 STC1의 발현이 스타니우스 소체에서만 국한되지 않고, 다양한 조직에서 광범위하게 발현된다는 것이 밝혀졌다 (Amemiya and Youson, 2004; Hang and Balment, 2005; McCudden et al., 2001; Shin et al., 2006). 포유류의 STC1 또한 광범위한 발현 패턴을 가지며, 체내 인산의 재흡수를 촉진하고 칼슘의 과잉 흡수를 억제한다 (Madsen et al., 1998; Olsen et al., 1996; Wagner et al., 1997). 현재까지 보고된 포유류 STC1에 대한 보고에 의하면, STC1은 항과잉칼슘 작용을 할 뿐만 아니라, 대뇌신경세포, 조골세포 및 지방세포의 분화 후기에 특이적으로 높은 발현

수준을 보이며, 난소의 과립막 세포에서 결분비되어 마우스 난소의 성 스테로이드 분비를 조절한다 (Filvaroff et al., 2002; Luo et al., 2004; Zhang et al., 2000).

어류의 STC1 단백질은 연어과 어류에서 최초로 분리되었으며 (Lafeber et al., 1988; Sundell et al., 1992; Wagner et al., 1986; Yamashita et al., 1995), 염기서열은 연어류, 고대어종 (holostean), 유럽넙치 (*Platichthys flesus*), 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 텃돔 (*Scophthalmus maximus*) 등의 다양한 어종에서 확인되었다 (Amemiya et al., 2002; Amemiya and Youson, 2004; Hang and Balment, 2005; Shin et al., 2006; 2008). 어류의 STC1 아미노산 서열은 11개의 시스테인 잔기와 한 개의 당수식 영역(N-linked glycosylation site)이 보존되어 있다. 어류의 STC1은 포유류의 그것과 56~66%의 아미노산 서열의 상동성을 보이며, 동형이량체 당단백질로 생리적 활성을 가진다는 점에서 유사성이 높기 때문에 포유류와 어류의 STC1 호르몬은 기능적으로 유사할 것이라 사료된다 (Hang and Balment, 2005; Ishibashi and Masachi, 2002; Shin et al., 2006; 2008).

STC1 파라로그인 STC2의 존재는 포유동물에서 최초로 확인되었으며 (Chang and Reddel, 1998; DiMattia et al., 1998;

*Corresponding author: ycsohn@gwnu.ac.kr

Ishibashi et al., 1998), 최근 어류에서 복어 (*Takifugu rubripes*), 제브라피쉬 (*Danio rerio*), 넙치의 STC2가 클로닝 되었다. 어류의 STC2 아미노산은 14개의 시스테인 잔기와 한 개의 당수식 영역이 보존되어 있으며, 어류의 STC1 아미노산과 비교하여 아미노산 서열이 길고, 비교적 낮은 상동성 (~30%)을 나타낸다 (Luo et al., 2005; Shin et al., 2009). 포유류와 어류의 STC2는 다양한 조직 내 광범위한 발현 패턴을 보이지만, 포유류와 어류 STC2의 생리적 기능은 명확하지 않다 (Shin et al., 2009).

본 연구에서는 생리학적 기능이 불명확한 넙치의 STC의 기능을 규명하기 위하여, 대장균을 이용하여 유전자재조합 넙치 STC1과 STC2 단백질을 생산 및 정제하였다. 넙치 STC1

단백질을 티라피아 복강 내에 주사하고, 혈청 내 칼슘이온 농도에 미치는 영향을 조사하였다.

Table 1. Oligoprimers used in the polymerase chain reactions

Primer	Direction	Sequence (5'-3')
ofSTC1-EcoR I	F	GCCGAATT <u>CA</u> CGCTGCCGAGGAGG
ofSTC1-Xho I	R	CCCCTCGAGCTATTTCTCGGTGACGTCGCC
ofSTC2-EcoR I	F	CCGAATTCTCGGATATTACTGATATACACGACAG
ofSTC2-Xho I	R	GGCCTCGAGCTTTGCACTTTCACCTCCG

Note. F, forward; R, reverse; underlines, restriction enzyme recognition sites.

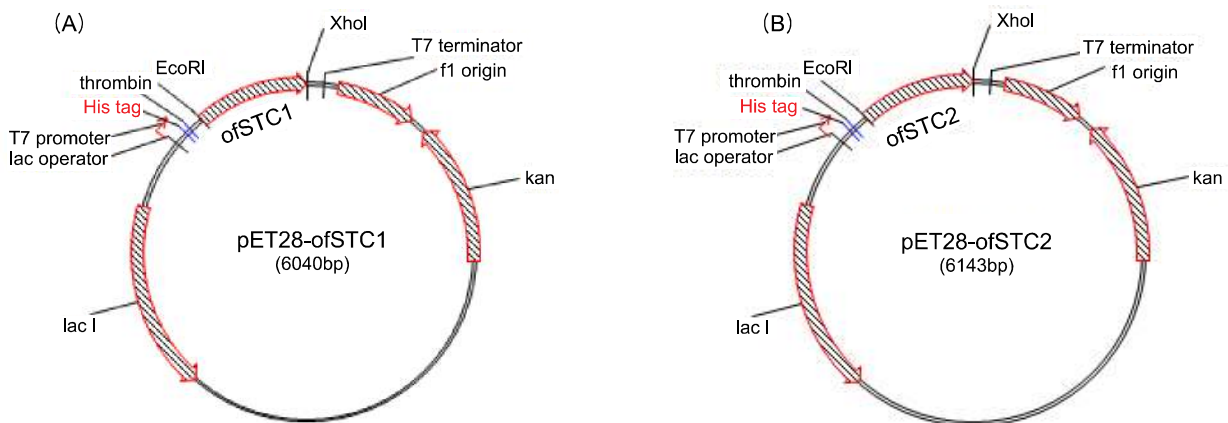


Fig. 2. Schematics of two expression constructs for fusion proteins. The gene encoding ofSTC1 or ofSTC2 was inserted between *EcoR* I and *Xho* I. (A) pET28-ofSTC1 containing His-tag and thrombin inserts. (B) pET28-ofSTC2 containing His-tag and thrombin inserts.

재료 및 방법

호스트 균주와 발현 벡터

분비성 단백질인 넙치 STC1과 STC2의 호스트 균주 내 단백질 생산을 유도하기 위하여 성숙펩타이드 영역을 포함한 플라스미드를 클로닝 하였다. SignalP 3.0 Server를 통해 개시코돈을 포함한 19개의 소수성 아미노산으로 구성된 STC1 신호서열과 20개 소수성 아미노산으로 구성된 STC2 신호서열을 확인하여 각각의 성숙펩타이드 영역을 추정하였다 (Fig. 1). 넙치 STC1과 STC2의 성숙펩타이드 영역을 암호화하는 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)으로 증폭하였고, 이를 위해 발현 벡터의 *EcoR* I -*Xho* I 영역 내 삽입을 위한 제한효소 인식 염기가 포함된 oligoprimers를 제작하였다 (BIONEER, Korea) (Table 1). 넙치 STC1과 STC2의 단백질 번역부위가 포함된 cDNA (Shin et al., 2008; 2009) (50 ng/μL)를 주형으로 10 pmol oligoprimers, 10X reaction buffer 2 μL, 2.5 mM dNTP 1.6 μL, 250U PrimeStar HS DNA polymerase (TaKaRa, Japan) 0.1 μL를 포함하여 총량 20 μL로 PCR 혼합액을 제조하였다. PCR 조건은 초기 denaturation step으로 95°C에서 5분, amplification step으로 95°C에서 30초, 55°C에서 10초, 72°C에서 1분으로 30 cycles 증폭한 후, extension step으로 72°C에서

5분 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 확인하였다. 증폭된 각 PCR 산물은 Gel purification kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 정제하였으며, *EcoR* I -*Xho* I (TaKaRa, Japan)으로 절단하여 단백질 정제를 위한 Histidine-Tag가 표지된 대장균 발현 벡터인 pET28a(+) (Invitrogen, USA)의 *EcoR* I -*Xho* I 영역에 삽입 한 후, *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, USA)에 형질전환 하였다. 클로닝한 각각의 플라스미드, pET28-ofSTC1과 pET28-ofSTC2에 대한 염기분석은 DNA sequencing 의뢰를 통하여 염기서열을 재확인하였다 (Fig. 2).

넙치 STC1과 STC2 재조합 단백질의 발현

pET28-ofSTC1과 pET28-ofSTC2은 각각 *E. coli* Rosetta (DE3) (Invitrogen, USA)에 형질전환 한 후, 단일 콜로니를 50 μg/mL kanamycin 항생제가 포함된 LB medium 30 mL에 접종하여 37°C/200 rpm 진탕배양기 (Vision, Korea)에서 15시간 동안 배양하였다. 배양된 균주액을 50 μg/mL kanamycin 항생제가 포함된 LB medium 1 L에 접종한 후, 동일한 배양 조건으로 흡광도 (OD 600)가 0.6이 될 때까지 배양하였다. 넙치 STC1과 STC2 재조합 단백질의 발현을 유도하기 위해 배양액 내 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG, Fluka, USA)를 첨가한 후, 추가로 5시간

혹은 18시간 배양하였다. 세포는 $8,000 \times g$ 에 15 분간 원심분리하여 회수하였으며, 완충용액 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)으로 세정하였다. 분리된 세포 2.5 g (습시료 중량)을 얼음위에서 100 mL 파쇄용액 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)으로 현탁한 후, 초음파 분쇄하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 $10,000 \times g$ 로 30분간 원심분리하여 세포 침전물 (불용성 단백질 분획)을 회수하였다.

넙치 STC1과 STC2 재조합 단백질의 정제

니켈 친화 크로마토그래피 겔 (Ni-NTA beads, Novagan, USA)에 흡착용액 (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 8.0)을 투여하여 평형화 시킨 후, 파쇄용액으로 현탁한 세포 침전물의 불용물 (insoluble fraction)을 투여하여 흡착시켰다. 흡착용액을 추가로 투여하여 겔을 세정 한 후, 용출용액 (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 300 mM Imidazole)으로 용출하였다. 용출액은 농축겔림 (Centricorn-YM30 milipore, Amicon, USA)을 사용하여 단백질을 농축한 후, 완충용액 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)으로 용매교환을 하였다. 정제된 단백질은 실험 전까지 -20°C 에 저장하였다.

전기영동

Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Bio-rad, USA) 분석은 15% resolving gel (단백질 분리용 gel)과 4% stacking gel (단백질 농축용 gel)을 사용하여 각 100 V, 130 V의 전압으로 전기영동 하였다. 단백질은 염색액 (ExWay™ Protein-Blue Staining Solution, KOMABIOTECH, Korea)으로 염색 후, 탈색액 (10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 탈색하여 확인하였다.

생체 내 넙치 STC1

평균체중 3.0 ± 0.5 g의 틸라피아 (*Oreochromis mossambicus*) 치어를 두 그룹으로 나누고 (각n=6), 넙치 STC1 단백질 (1.5 $\mu\text{g}/150\mu\text{L}$) (실험군) 및 용매 Phosphate buffer (20 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.0)(150 μL) (대조군)를 각각 준비하였다. 틸라피아 복강 내 넙치 STC1 단백질 용액 및 carrier 용액을 각각 주사한 후 24시간 뒤 모세관을 이용하여 미부정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 모세관은 10°C , 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈액으로부터 혈청을 분리하였다. 혈청 내 칼슘 이온농도는 이온분석기(Toadkk IA-200, Japan)을 이용하여 측정하였다. 통계처리는 독립표본 t-test를 이용하여 평균 사이의 유의성을 검정하였다 ($P < 0.05$).

결 과

재조합 STC1과 STC2 단백질의 발현

IPTG 유도 후 5시간과 18시간 배양시점에서 세포를 회수한 후, 초음파 파쇄를 통해 분획된 불용성 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동하였다 (Fig. 3). pET28-ofSTC1이 형질전환된 대장균으로부터 발현된 ofSTC1 (예상 분자량 29.5 kDa) 단백질은 IPTG 유도 5시간 후부터 예상 분자량과 근접한 26 kDa과 34 kDa 사이에서 단백질 밴드가 확인되기 시작하여 18시간

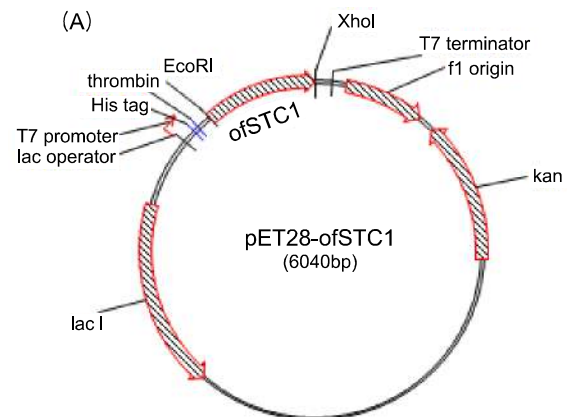


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of induced ofSTC1 (29.5 kDa) and ofSTC2 (32.9 kDa) proteins in *E. coli* by 0.1 mM IPTG. Lane M: protein molecular weight marker; Lanes 1, 3, 6: soluble proteins from cells cultured for 5 hr without IPTG induction; Lanes 2, 4, 7: soluble proteins from cells cultured for 5 hr after IPTG induction; Lanes 5, 8: soluble proteins from cells cultured for 18 hr after IPTG induction.

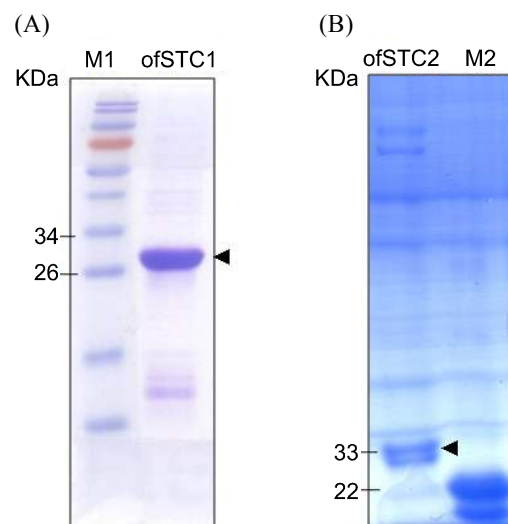


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of 6xHis-fused ofSTC1 (29.5 kDa) and ofSTC2 (32.9 kDa) proteins by nickel affinity chromatography. Lanes M1 and M2 indicate a commercial molecular weight marker and recombinant human growth hormone, respectively.

후 현저히 증가되는 경향을 관찰하였다. pET28-ofSTC2 또한 IPTG 유도 5시간 후에 대략 34 kDa의 ofSTC2 (예상 분자량 32.9 kDa) 단백질의 밴드를 확인하였으며, 18시간 배양이 지속될수록 단백질 발현이 증가되는 경향을 관찰하였다.

재조합 STC1과 STC2 단백질의 정제

Histidine-Tag가 표지된 pET28-ofSTC1 및 pET28-ofSTC2가 형질전환된 대장균 배양액으로부터 세포 침전물 회수하였다. 불용성 단백질을 분획하여 불용물을 니켈 크로마토그래피에 흡착시킨 후 용출 및 농축과정을 통해 단백질을 정제하였다.

정제된 단백질은 SDS-PAGE 전기영동을 통하여 26 kDa과 34 kDa 사이에서 단일밴드로 나타난 ofSTC1 (29.5 kDa) 단백질을 확인할 수 있었다. ofSTC2 단백질은 비교단백질 (22 kDa)과 비교하여 약 30 kDa 분자량의 이중밴드로 발견되는 것을 확인하였다 (Fig. 4).

STC1 주사에 의한 혈중 칼슘농도

정제된 ofSTC1의 생리학적 작용을 조사하기 위하여, 틸라피아 치어의 복강에 주사하고, 24시간 후의 혈청 내 칼슘농도를 조사하였다. 용매 phosphate buffer를 주사한 대조군(Ctrl)과 비교하여 (6.37 mM±1.04), ofSTC1 단백질을 주사한 실험군(ofSTC1)의 혈청 내 칼슘 농도는 유의적으로 감소하였다 (2.49 mM±0.22; $P<0.05$) (Fig. 5).

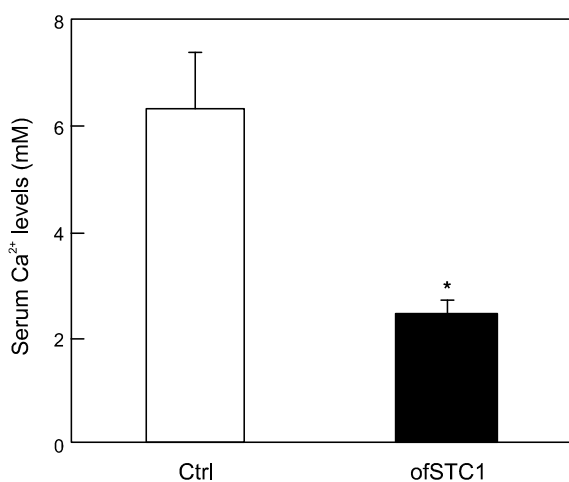


Fig. 5. Concentration of serum calcium ion in tilapia treated with ofSTC1 protein in vivo. Control group (Ctrl) and experimental group (ofSTC1) indicate serum calcium level in fish injected with phosphate buffer and purified ofSTC1 protein solution (1.5 µg), respectively. Data were represented by the mean±S.E.M. of six independent samples ($P<0.05$).

고찰

본 연구는 분비성 당단백질 호르몬인 넙치 STC1과 STC2 단백질 번역영역 중, 신호서열을 제외한 성숙펩타이드의 코딩영역 cDNA를 클로닝하였다. 넙치 STC1 성숙펩타이드는 11개의 시스테인 잔기와 당수식 영역 (Fig. 1)을 포함하고 있으며, 이는 포유류 (인간, 마우스) (Chang et al., 1995, 1998)와 더불어 고대어종 (아로와나, 아미아) (Amemiya et al., 2002; Amemiya and Youson, 2004) 및 연어과 어류 (연어, 무지개송어) (Wagner et al., 1992; Yamashita et al., 1995)를 포함한 다양한 어류에서 보존된다. 넙치 STC2 성숙펩타이드는 14개의 시스테인 잔기와 한 개의 당수식 영역 (Fig. 1)을 포함하며 포유류 (Chang and Reddel, 1998; DiMattia et al., 1998; Ishibashi et al., 1998)와 어류 (Luo et al., 2005) STC2 성숙펩타이드에서 잘 보존되어 있다.

본 연구에서는 넙치 STC1과 STC2 성숙펩타이드 코딩영역

cDNA를 각각 플라스미드 pET28a (+)에 삽입하고, 그 플라스미드로 *E. coli* Rosetta (DE3)를 형질전환하여 재조합 STC1과 STC2 단백질 생산을 유도하였다. 0.1 mM IPTG를 이용하여 단백질 발현을 유도하였으며, 세포 과쇄를 통해 불용성 단백질을 분획하여 SDS-PAGE로 전기영동하였다. 발견된 넙치 STC1과 STC2는 각각의 예상분자량 (STC1, 29.5 kDa; STC2, 32.9 kDa)과 일치하는 분자량으로 IPTG에 의해 단백질 생산이 증가됨을 확인하였다. 또한, 히스티딘 잔기 6개가 포함된 넙치 재조합 STC1 (pET28-ofSTC1)과 STC2 (pET28-ofSTC2)를 정제하기 위하여 니켈 친화 크로마토그래피 겔에 불용성 단백질을 흡착시킨 후, 용출 및 농축 과정을 통하여 단일밴드의 ofSTC1과 이중밴드의 ofSTC2 단백질을 정제할 수 있었다. 포유동물세포를 이용한 STC1과 STC2 단백질 발현 유도 및 정제가 이루어진 연구결과가 보고된 바 있다. 햄스터 난소 세포주에서 발현된 STC1 (인간) (Zhang et al., 1997)과 인간 배아 신장세포주에서 발현된 STC2 (인간, 제브라피시) (Luo et al., 2005)는 각각 동형 이량체를 이루는 분비성의 당단백질이며, 특히 인간 STC1은 포유동물 혹은 곤충세포 내 형질전이에 의하여 분비된 STC1 호르몬의 성숙펩타이드 영역이 분석되었다 (Zhang et al., 1997). 포유동물을 이용한 분비성 당단백질의 생산은 단백질의 구조와 활성이 높게 보존 될 수 있는 장점이 있으나, 생산량의 제한과 높은 비용의 단점이 있다. 반면 대장균을 이용한 단백질 생산은 높은 생산량과 낮은 비용이 장점이나 다수의 시스테인 잔기를 포함하거나 당이 수식되는 분비성 당단백질인 경우, 단백질의 낮은 생산수율과 생리적 활성이 감소될 수 있다. 본 연구에서 대장균을 이용하여 생산된 넙치 STC1과 STC2 성숙펩타이드는 단량체의 단일밴드 혹은 이중밴드로 정제되었다. 어류의 STC1 (터봇) (Shin et al., 2006)과 STC2 (제브라피시) (Luo et al., 2005) 또한 포유동물 세포를 통한 단백질 정제시 이량체의 당단백질로 분비되어지며, 연어의 스타니우스 소체 조직에서 직접 분리된 생리적 활성을 가지는 STC1 단백질 또한 이량체의 당단백질 형태를 가진다는 보고가 있다 (Wagner et al., 1998). 한편, 동물세포에서 생산된 이량체 당단백질 형태가 아닌 대장균에서 생산된 단량체 STC1 및 STC2는 활용 측면에서 반응성의 문제가 제기 될 수 있지만, 본 연구에서 정제된 ofSTC1 단백질의 틸라피아 복강 내 주사를 통해 혈청 내 칼슘농도 저하 효과가 확인되었으므로, 대장균에서 생산된 STC 단백질은 생물학적 활성을 발휘할 수 있다고 추정된다. 본 연구 이외에도, STC1의 N 말단 합성펩타이드가 어류 아가미 조직내 칼슘이동 및 혈중 칼슘 농도를 감소시켰다는 보고가 있다 (Milliken et al., 1990; Verbost et al., 1993). 따라서, 대장균으로부터 생산된 단백질은 STC의 생리 기능을 규명하는데 기여할 것으로 사료된다.

최근, 형질전환된 대장균 BL21 균주를 이용하여 생산된 인간 STC1 단백질로부터 3차원구조가 조사되었다 (Trindade et al., 2009). 불용물에서 넙치의 STC1과 STC2 단백질의 발현을 확인할 수 있었던 결과와 유사하게 인간 STC1 또한 특이적으로 불용성 단백질로서의 발현 양상을 나타내었다. 또한, 인간 STC1은 다수의 알파 나선구조와 시스테인 잔기를 포함

하며, 11개 시스테인 중 10개가 단백질의 접힘을 통한 전체적인 입체구조 형성에 관여하고, C 말단의 12번째 시스테인은 단백질의 이량체 형성에 기여할 것으로 추측 된다 (Trindade et al., 2009).

현재까지도 포유류의 STC1/STC2와 어류의 그것들을 비교하여 각각에 관한 생리 기능과 작용 메커니즘을 밝힌 연구 결과는 아직 보고된 바 없다. 하지만, 포유류와 어류 사이의 높은 아미노산 상동성과 잘 보존된 시스테인 잔기를 근거로 판단하면, 어류의 STC1과 STC2의 기능이 포유류의 그것들과 크게 이질적이지 않을 것으로 추정된다. 따라서, 광염성 어류 넙치의 STC1과 STC2 단백질의 생산과 정제는 어류의 이온과 삼투조절에 관여하는 STC1의 메커니즘 동정과 어류 STC2의 생리적 작용을 연구하기 위한 중요한 연구재료로 이용될 수 있으리라 사료된다.

사 사

본 연구는 국토해양부의 해양 유전자변형생물체 평가 및 대응 기술 개발 사업의 지원 (#20088033-1)으로 수행되었으며, 저자 신지혜는 학술진흥재단 2단계 BK21핵심사업팀의 수혜대학원생임을 밝히며 이에 사의를 표합니다.

참고문헌

- Amemiya Y, Marra LE, Reyhani N and Youson JH. 2002. Stanniocalcin from an ancient teleost: a monomeric form of the hormone and a possible extracorporeal distribution. *Mol Cell Endocrinol* 188, 141-150.
- Amemiya Y and Youson JH. 2004. Primary structure of stanniocalcin in two basal Actinopterygii. *Gen Comp Endocrinol* 135, 250-257.
- Butkus A, Roche PJ, Fernley RT, Haralambidis J, Penschow JD, Ryan GB, Trahair JF, Tregear GW and Coghlan JP. 1987. Purification and cloning of a corpuscles of Stannius 15 protein from *Anguilla australis*. *Mol Cell Endocrinol* 54, 123-133.
- Chang AC, Janosi J, Hulsbeek M, de Jong D, Jeffrey KJ, Noble JR and Reddel RR. 1995. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 112, 241-247.
- Chang AC and Reddel RR. 1998. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2. *Mol Cell Endocrinol* 141, 95-99.
- DiMattia GE, Varghese R and Wagner GF. 1998. Molecular cloning and characterization of stanniocalcin-related protein. *Mol Cell Endocrinol* 146, 137-140.
- Fenwick JC and Verbost P. 1993. A C-terminal fragment of the hormone stanniocalcin is bioactive in eels. *Gen Comp Endocrinol* 91, 337-343.
- Filvaroff EH, Guillet S, Zlot C, Bao M, Ingle G, Steinmetz H, Hoeffel J, Bunting S, Ross J, Carano RA, Powell-Braxton L, Wagner GF, Eckert R, Gerritsen ME and French DM. 2002. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. *Endocrinol* 143, 3681-3690.
- Hang X and Balment RJ. 2005. Stanniocalcin in the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): Primary structure, tissue distribution, and response to altered salinity. *Gen Comp Endocrinol* 144, 188-195.
- Ishibashi K, Miyamoto K, Taketani Y, Morita K, Takeda E, Sasaki S and Imai M. 1998. Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2). *Biochem Biophys Res Commun* 250, 252-258.
- Lafeber FP, Hanssen RG, Choy YM, Flik G, Herrmann-Erlee MP, Pang PK and Wendelaar Bonga SE. 1988. Identification of hypocalcin (teleocalcin) isolated from trout *Stannius corpuscles*. *Gen Comp Endocrinol* 69, 19-30.
- Lu M, Wagner GF and Renfro JL. 1994. Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. *Am J Physiol* 267, 1356-1362.
- Luo CW, Kawamura K, Klein C and Hsueh AJ. 2004. Paracrine regulation of ovarian granulosa cell 8 differentiation by stanniocalcin (STC) 1: mediation through specific STC1 receptors. *Mol Endocrinol* 18, 2085-2096.
- Luo CW, Pisarska MD and Hsueh AJ. 2005. Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary. *Endocrinol* 146, 469-476.
- Madsen KL, Tavernini MM, Yachimec C, Mendrick DL, Alfonso PJ, Buergin M, Olsen HS, Antonaccio MJ, Thompson AB and Fedorak RN. 1998. Stanniocalcin; a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine, *Am J Physiol* 274, 96-102.
- Milliken CE, Fargher RC, Butkus A, McDonald M and Copp DH. 1990. Effects of synthetic peptide fragments of teleocalcin (hypocalcin) on calcium uptake in juvenile rainbow trout (*Salmon gairdneri*).

- Gen Comp Endocrinol 77, 416-422.
- McCudden CR, Kogon MR, DiMattia GE and Wagner GF. 2001. Novel expression of the stanniocalcin gene in fish. J Endocrinol 171, 33-44.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S and Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng 10, 1-6.
- Olsen HS, Cepeda MA, Zhang QQ, Rosen CA and Vozzolo BL. 1996. Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 93, 1792-1796
- Shin J, Oh D and Sohn YC. 2006. Molecular characterization and expression analysis of stanniocalcin-1 in turbot (*Scophthalmus maximus*). Gen Comp Endocrinol 147, 214-221.
- Shin J and Sohn YC. 2008. Molecular cloning of stanniocalcin 1 and its extracorporeal regulation by salinity and Ca²⁺ in the Japanese flounder. Zool Sci 25, 728-738.
- Shin J and Sohn YC. 2009. cDNA cloning of Japanese flounder stanniocalcin 2 and its mRNA expression in a variety of tissues. Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr Physiol 153, 24-29.
- Sundell K, Bjornsson BT and Kawauchi H. 1992. Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calcium uptake in Atlantic cod (*Gadus morhua*). J Comp Physiol 162, 489-495
- Trindade DM, Silva JC, Navarro MS, Torriani IC and Kobarg J. 2009. Low-resolution structural studies of human Stanniocalcin-1. BMC Struct Biol 27, 9-57.
- Wagner GF and DiMattia GE. 2006. The stanniocalcin family of proteins. J Exp Zool 305, 769-780.
- Wagner GF, DiMattia GE, Davie JR, Copp DH and Frisen HG. 1992. Molecular cloning and cDNA sequence analysis of coho salmon stanniocalcin. Mol Cell Endocrinol 90, 7-15.
- Wagner GF, Hampong M, Park CM and Copp DH. 1986. Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius. Gen Comp Endocrinol 63, 481-491.
- Wagner GF, Jaworski E.M and Haddad M. 1998. Stanniocalcin in the seawater salmon: structure, function, and regulation. Am J Physiol 274, 1177-1185.
- Wagner GF, Vozzolo BL, Jaworski E, Haddad M, Kline RL, Olsen HS, Resen CA, Davidson MB and Renfro JL. 1997. Human stanniocalcin inhibits renal phosphate excretion in the rat. J Bone Miner Res 12, 165-171.
- Yamashita K, Koide Y, Itoh H, Kawada N and Kawauchi H. 1995. The complete amino acid sequence of chum salmon stanniocalcin, a calcium-regulating hormone in teleosts. Mol Cell Endocrinol 112, 159-167.
- Zhang J, Alfonso P, Thotakura NR, Su J, Buerger M, Parmelee D, Collins AW, Oelkuct M, Gaffney S, Gentz S, Radman DP, Wagner GF and Gentz R. 1997. Expression, Purification, and Bioassay of Human Stanniocalcin from Baculovirus-Infected Insect Cells and Recombinant CHO Cells. Protein Expr Purif 12, 390-398.
- Zhang K, Lindsberg PJ, Tatlisumak T, Kaste M, Olsen HS and Andersson LC. 2000. Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 97, 3637-3642.

2009년 12월 2일 접수

2010년 7월 9일 수정

2010년 8월 13일 수리