

기수산 물벼룩의 유충 호르몬(Juvenile hormone) 신호전달경로 관련 유전자의 특성 분석

조하영, 유제원, 이영미*

상명대학교 융합공과대학 생명공학과

Molecular characterization of juvenile hormone signaling pathway-related genes in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*

Hayoung Cho, Jewon Yoo and Young-Mi Lee*

Department of Biotechnology, College of Convergence Engineering, Sangmyung University, Seoul 03016, Republic of Korea

*Corresponding author

Young-Mi Lee

Tel. 02-2287-5448

E-mail. ymlee70@smu.ac.kr

Received: 28 July 2022

Revised: 25 August 2022

Revision accepted: 29 August 2022

Abstract: In crustaceans, molting is regulated by interactions between ecdysteroid and juvenile hormone (JH) signaling pathway-related genes. Unlike the ecdysteroid signaling pathway, little information on the role of JH signaling pathway-related genes in molting is available in zooplanktonic crustaceans. In this study, three genes (juvenile hormone acid O-methyltransferase (*JHAMT*), methoprene-tolerant (*Met*), and juvenile hormone epoxide hydrolase (*JHEH*)) which are involved in the synthesis, receptor-binding, and degradation of JH were identified using sequence and phylogenetic analysis in the brackish water flea, *Diaphanosoma celebensis*. Transcriptional changes in these genes during the molting cycle in *D. celebensis* were analyzed. Sequence and phylogenetic analysis revealed that these putative proteins may be functionally conserved along with those of insects and other crustaceans. In addition, the expression of the three genes was correlated with the molting cycle of *D. celebensis*, indicating that these genes may be involved in the synthesis and degradation of JH, resulting in normal molting. This study will provide information for a better understanding of the role of JH signaling pathway-related genes during the molting process in Cladocera.

Keywords: Juvenile hormone pathway, brackish water flea, gene expression, molting cycle, sequence analysis

서 론

탈피 (molting) 과정은 절지동물의 정상적인 성장, 발달, 생식에 중요하다 (Žitňan *et al.* 2007). 곤충에서 탈피는 ecdysteroid와 juvenile hormone (JH) 신호전달경로 관련 유

전자의 상호 작용을 통해 조절된다 (Miyakawa *et al.* 2018). 내분비계에 영향을 미치는 다양한 외부 스트레스 요인에 노출되면 두 경로에 속하는 유전자의 발현이 변화하고, 이는 탈피 주기에 변화를 유도함으로써 결과적으로는 개체의 성장, 발달과 생식에 악영향을 끼친다 (Palli *et al.* 2000).

JH 합성은 전구물질인 farnesyl pyrophosphate (farnesyl-PP)가 farnesoic acid (FA)로 변형된 후 FA는 juvenile hormone acid O-methyltransferase (JHAMT)에 의해 methyl farnesoate (MF)로 전환된다(Rivera-Perez *et al.* 2014). 곤충에서는 MF가 methyl farnesoate epoxidase (MFE)에 의해 active form인 JH III로 전환되고 이후 JH III에서 변형된 JH diol이 JH receptor와 결합하여 downstream 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Jiang *et al.* 2017). 그러나 기존 연구와 비교 시 갑각류에는 MFE를 암호화하는 유전자 서열이 존재하지 않는 것으로 확인되었다(Daimon and Shinoda 2013). 따라서 갑각류에서는 곤충과 달리 JH III로의 변형 없이 MF가 JH의 최종 active form인 것으로 추정된다(Sin *et al.* 2015). 최근까지 갑각류에서 ecdysteroid는 탈피를 조절하는 대표적인 호르몬으로 관련 경로의 유전자 동정과 탈피에서의 역할 등에 대한 연구가 활발하게 이루어진 것(Kato *et al.* 2007; Nakagawa and Henrich 2009; Miyakawa *et al.* 2018)과 달리 JH의 역할과 관련 경로 유전자들의 정보나 생활사에서의 역할과 ecdysteroid 신호전달 경로와의 상호 작용에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 특히 갑각류에서 탈피는 내분비계 교란 특성을 갖는 환경 오염물질을 검출하기 위한 바이오마커로 사용되고 있기 때문에(Giraud *et al.* 2017; Chen *et al.* 2021), 탈피에 영향을 미치는 내분비계에 대한 분자 수준의 연구가 필요하다.

기수산 물벼룩인 *Diaphanosoma celebensis*는 절지동물문(Arthropoda), 갑각강(Crustacean), 지각목(Cladocera)에 속하며 해양생태계에서 1차 소비자이며 상위 영양단계에 에너지 전달자로서 중요한 역할을 담당한다. 배양이 쉽고, 생활사가 짧으며(4~5일), 단성생식(parthenogenesis)을 하는 등 모델 생물로서의 장점을 가지고 있어 생태독성연구에 사용되고 있다(Marcial and Hagiwara 2007; Kim *et al.* 2018; Kim *et al.* 2021). 최근 *D. celebensis*에서 ecdysteroid 신호전달경로에 관여하는 *cyp314a1*, ecdysone receptor (*EcR*), *HR3*, *E75* 등과 같은 유전자가 확인되었고, 탈피 주기와 관련이 있음을 보고한 바 있다(In *et al.* 2019, 2020, 2021).

본 연구에서는 기수산 물벼룩에서 JH 신호전달경로 관련 유전자를 동정하고, 탈피 주기에서의 이들 유전자의 발현 패턴을 비교하여 그 역할을 확인하였다. 이는 지각류에서 JH 신호전달경로 유전자의 탈피 관련 기능을 이해하는데 도움이 될 것이다.

재료 및 방법

1. 시험생물

본 연구에서 실험생물로 사용한 기수산 물벼룩(*Diaphanosoma celebensis*)은 상명대학교 분자독성학실험실에서 배양하고 있는 것을 사용하였다. 배양액은 해수염(Instant Ocean, Aquarium systems, Sarrebourg, France)을 증류수에 녹인 후 0.2 µm 필터로 걸러 15 psu의 인공해수를 제조하여 사용하였다. 사육 조건은 수온 25±1°C, 광주기 12 : 12(light : dark)로 유지하였고, 먹이는 *Chlorella vulgaris*를 1.0~3.0×10⁵ cells mL⁻¹의 밀도로 매일 공급하였다.

2. 유전자서열 및 계통분석

기수산 물벼룩의 JH 신호전달경로 유전자(*JHAMT*, *Met*, and *JHEH*)는 *D. celebensis* RNA seq. local transcriptome database (상명대학교 분자독성학실험실) (Kim *et al.* 2018)에서 얻었다. Sequence identity는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 blast X search tool을 사용하였고, conserved domain은 NCBI의 conserved domain searching site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)를 통해 분석하였다. 계통 분석을 위해 Clustal X (version 1.83)를 이용하여 다중배열을 수행한 후 MEGA (version 6.0)에서 neighbor-joining (NJ) 방법으로 분석하였다. 계통 분석에서 bootstrap은 1,000회 반복하였고, *p*-distance model을 사용하였다. 서열 및 계통 분석에 사용한 생물의 GenBank accession number는 Table 1에 나타냈다.

3. RNA 추출 및 cDNA 합성

탈피 주기에 따른 JH 신호전달경로 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 태어난 지 4일 된 기수산 물벼룩 개체(약 150마리/시료)를 6일간 24시간마다 eppendorf tube에 모았다. 시료는 Trizol® reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Ambion, MA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 1% 아가로스 겔 전기영동과 MaestroNano Spectrophotometer (Maestrogen Inc., Hsinchu, Taiwan)을 이용하여 정량하고 순도 측정하였고, A260/A280 비율이 1.8~2.0인 RNA만을 실험에 사

Table 1. GenBank accession number of the amino acid sequences used for sequence and phylogenetic analyses in the study

Gene status	Protein name	Common name	Species	Accession No.
JH biosynthesis	JHAMT	Brackish water flea	<i>Diaphanosoma celebensis</i>	OL411969
		Water flea	<i>Daphnia magna</i>	XP_032780651
		Giant tiger prawn	<i>Penaeus monodon</i>	XP_037788542
		American lobster	<i>Homarus americanus</i>	XP_042234172
		Gazami crab	<i>Portunus trituberculatus</i>	ALT10380
		Fruit fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	BAC98836
		Silk moth	<i>Bombyx mori</i>	NP_001036901
		Western honey bee	<i>Apis mellifera</i>	NP_001314896
JH receptor	Met	Brackish water flea	<i>Diaphanosoma celebensis</i>	OL411970
		Water flea	<i>Daphnia magna</i>	BAM83855
			<i>Daphnia pulex</i>	BAM83853
		Chinese mitten crab	<i>Eriocheir sinensis</i>	QLH01997
		Gazami crab	<i>Portunus trituberculatus</i>	ALT10381
		Fruit fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001285132
		Silk moth	<i>Bombyx mori</i>	ACJ04052
JH degradation enzymes	JHEH	Brackish water flea	<i>Diaphanosoma celebensis</i>	OL411971
		Water flea	<i>Daphnia magna</i>	XP_032783666
		Whiteleg shrimp	<i>Penaeus vannamei</i>	XP_027223682
		Giant freshwater prawn	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	AKL71620
		Gazami crab	<i>Portunus trituberculatus</i>	ALT10382
		Fruit fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	ACV04637
		Silk moth	<i>Bombyx mori</i>	NP_001037201
		Mosquito	<i>Aedes aegypti</i>	AAM88326

용하였다. cDNA는 0.5 µg RNA를 이용하여 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo Co., Osaka, Japan)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 합성한 후 1/10배 희석하여 사용하였다.

4. Quantitative real time reverse transcription - polymerase chain reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR은 KAPA SYBR FAST (Kapa Bioassay systems, MA, USA)를 이용하여 CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)에서 진행하였다. 타겟 유전자의 증폭을 위해 사용된 primer는 primer test를 통해 특이성을 확인하였고, PCR efficiency (90~105%)와 각 서열 정보는 Table 2에 나타났다. 각 PCR mixture는 primer set (각 10 pmol), cDNA 3 µL, 그리고 2×SYBR premix (5 µL)을 포

함하여 최종 용량을 10 µL로 제조하였다. PCR의 반응 조건은 95°C 10분, 95°C 15초, 60°C 1분을 35회 반복하였고, 특이적인 반응산물의 확인을 위하여 melting curve를 얻고자 95°C에서 15초, 60°C에서 1 min 반응시키며 초당 0.5°C씩 올려 반응을 진행하였다. 타겟 유전자의 threshold cycle (Ct) 값은 *EF-1b* 유전자(Lee et al. 2021)로 보정하였고, 각 실험은 3회 반복하였다.

5. 통계분석

데이터는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation; S.D.)로 표시하였다. 통계적 유의성은 Sigmaplot version 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 *t*-test로 비교하였다. 분석 결과 *p* 값이 0.05보다 낮은 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

Table 2. Primers used in this study

Gene	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	PCR efficiency (%)
<i>Dc_JHAMT</i>	F: GCGGATTTGCTGGATTCATAC R: GGTCAGACGATAGTGGATGG	102	103.84
<i>Dc_JHEH</i>	F: CCAGCAGTATTACATCCAAGG R: CAACGAACCCAAGCCCAG	151	99.31
<i>Dc_MET</i>	F: CTCGCTGATTTACCTCAACTC R: GATTTCTTCACGCCTTCG	115	90.22
<i>Dc_EF-1b</i>	F: CGGCTGTGTCGT TGAAGA R: GGCAATGTCCAC ACTCTG	91	104.83

결과 및 고찰

1. 유충호르몬(JH) 신호전달경로 관련 유전자의 확인

본 연구에서는 JH 신호전달경로 관련 유전자 중 *JHAMT*, *Met* 그리고 *JHEH* 유전자를 동정하였다. *JHAMT*는 JH 신호전달경로에서 FA에서 JH III로의 methylation에 작용하며 곤충에서 최종 산물인 JHs 생합성에 관여하는 효소로 알려져 있다(Shinoda and Itoyama 2003). 지금까지 *JHAMT*는 주로 곤충에서 알려져 있었으나 최근 갑각류인 *Daphnia pulex* (Hui et al. 2010)를 비롯하여 *Neocaridina denticulate* (Sin et al. 2015)에서도 발견되면서 곤충에서와 달리 갑각류에서는 *JHAMT*가 FA에서 MF로의 methylation에 작용하며 최종산물인 MF 생합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Defelipe et al. 2011).

유전자 분석 결과 *D. celebensis JHAMT* (*Dc_JHAMT*)의 cDNA 서열은 147 bp의 5'-UTR, 810 bp의 open reading frame (ORF), 54 bp의 3'-UTR로 구성되어 있으며, 269개의 아미노산을 암호화한다. *Dc_JHAMT* 아미노산 서열을 Blast X로 분석한 결과 *Daphnia magna*의 *JHAMT* 단백질 (XP_032780651.1)과 44%로 가장 높은 시퀀스 상동성을 보였다. Conserved domain searching 결과 *Dc_JHAMT*는 S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases (AdoMet-MTases or SAM) domain (37-124 aa)을 가지고 있으며 *B. mori*의 *JHAMT*과 같이 잘 보존된 SAM-binding motif (E/DXGXG/AXG)를 확인하였다(Martin and McMillan 2002; Guo et al. 2021). 이는 절지동물의 *JHAMT*에서 공통적으로 발견되는 domain으로 AdoMet-MTase는 methyltransfer를 위해 AdoMet를 기질로 사용하여 S-adenosyl-

L-homocysteine (AdoHcy) product를 생성하는 효소이다. AdoMet-MTases domain에는 기질인 S-adenosylmethionine이 결합하는 S-adenosylmethionine binding site가 고도로 보존되어 있는 것으로 알려져 있다(Li et al. 2013). 본 연구에서도 AdoMet-MTases domain 내 S-adenosylmethionine binding site는 특히 절지 동물 간에 비교적 잘 보존되어 있었다(Fig. 1A). 계통 분석 결과 *Dc_JHAMT*는 다른 갑각류의 *JHAMT*와 함께 cluster를 이루었으며 같은 지각류인 담수산 물벼룩 *D. magna*의 *JHAMT*와 가장 가까이 위치하였으며 대형 갑각류와는 서로 구분되었다(Fig. 1B).

Met는 JH receptor로 알려져 있으며, 하위 유전자의 JH response elements (JHRE)에 결합함으로써 JH 신호를 전달하는 중요한 역할을 담당한다(Miura et al. 2005; Zhu et al. 2010). 본 연구에서 *Dc_Met* cDNA partial 서열은 820 bp의 5'-UTR와 1,753 bp의 ORF로 구성되어 있으며 584개의 아미노산을 암호화하는 것으로 나타났다. Blast X searching 결과 *D. magna*의 methoprene-tolerant 단백질 (BAM83855.1)로 총 695개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 40%의 시퀀스 상동성을 보였다. *Dc_Met* 유전자의 N-terminal의 584개 아미노산을 부분적으로 확보하였음에도 불구하고 *D. magna*의 Met 단백질과 비교하면 약 100개의 아미노산이 부족함에도 불구하고 해당 단백질의 conserved domain이 주로 N-terminal 부근에 위치하고 있기 때문에 유전자 동정이 가능하였다. Met는 bHLS-PAS family에 속하는 단백질로서 JH 신호전달경로에서 최종 생성물인 MF와 결합하는 수용체로 알려져 있다(Jindra et al. 2013). Conserved domain searching 결과 *Dc_Met* 아미노산 서열은 bHLS-PAS family protein에 존재하는 bHLS-PAS domain (10-62 aa)을 비롯하여 2개의 Per-Arnt-Sim (PAS) domain (PAS-A,

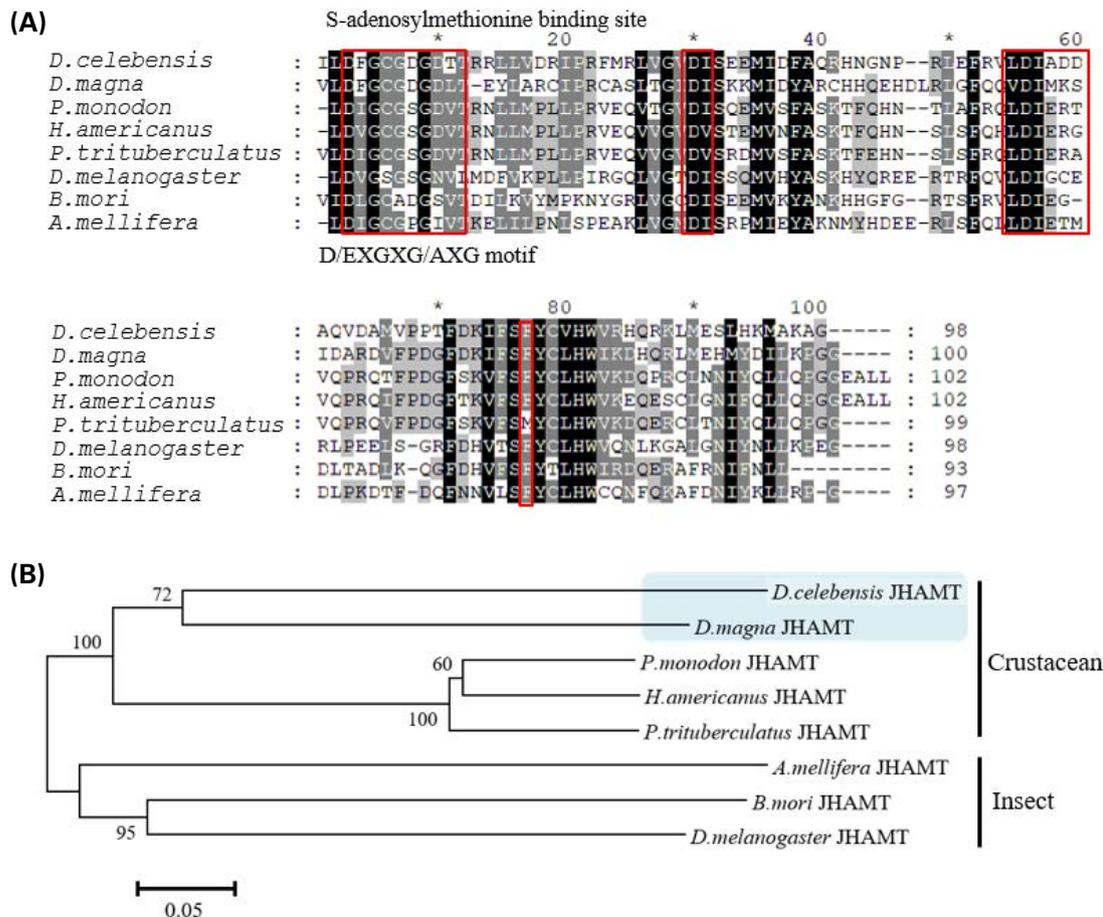


Fig. 1. (A) Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of the AdoMet-MTase domain of *Diaphanosoma celebensis* JHAMT with those of insects and other crustaceans. The red boxes indicate the S-adenosylmethionine binding site. (B) Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of *Diaphanosoma celebensis* JHAMT and those of insects and other crustaceans. The tree was constructed with 1,000 bootstrap replicates.

110-185 aa; PAS-B, 255-359 aa)이 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2A). 특히 PAS-B domain에는 고도로 보존된 8개의 소수성 아미노산 잔기(Tyr²⁵⁶, Thr²⁵⁸, Ile²⁶⁶, Val²⁸⁴, Ser³⁰¹, Leu³²⁰, Ser³³², Cys³⁴⁹)는 ligand binding site를 나타낸다(Miyakawa *et al.* 2013; Li *et al.* 2021). 이들 중 6개의 잔기는 JH-binding pocket을 형성하는 데 관여하는 것으로 알려져 있다(Li *et al.* 2011). 최근 *Daphnia* Met에서 PAS-B domain 내 나머지 2개의 잔기에서 아미노산 치환이 보고된 바 있다(Miyakawa *et al.* 2013). Fig. 2A의 PAS-B domain의 다중배열에서 보여지는 것처럼 보존된 잔기 중 5번째 위치가 곤충에서 Valine이나 *Daphnia*에서는 Threonine으로 치환되었다. 그러나 *D. celebensis*와 십각류에서는 Serine(Ser³⁰¹)으로 치환된 것을 확인할 수 있다. 한편 7번째 잔기의 경우 곤충에서는 Threonine인데, *D. celebensis*를 포함한

갑각류에서는 모두 Serine(Ser³³²)으로 치환된 것을 확인할 수 있었다. Miyakawa *et al.* (2013)은 PAS-B domain 내에 이러한 한 개 또는 두 개의 아미노산 변이가 곤충과 갑각류 간에 ligand에 대한 Met의 결합 특이성의 차이에 기여했을 것으로 추정하였다. 계통 분석을 진행한 결과에서도 Dc_Met는 같은 지각류인 *Daphnia* sp.와 가장 가깝게 cluster를 형성하였다(Fig. 2B).

JHEH는 곤충에서 성장, 발달, 탈피 및 번식이 진행되는 동안 JH 분해에 중요한 역할을 하는 효소이다(Zhang *et al.* 2005; Mackert *et al.* 2010). 또한 JHEH는 microsomal epoxide hydrolase (EC 3.3.2.9) family에 속하며 epoxide hydrolases (EHs) 중에서 넓게 분포하는 family 중 하나이다(Zhou *et al.* 2014). 특히 EHs는 epoxides를 변형시켜 그 화학적 활성을 줄이고, 용해도를 높임으로써, 생물학적 활성을 변형

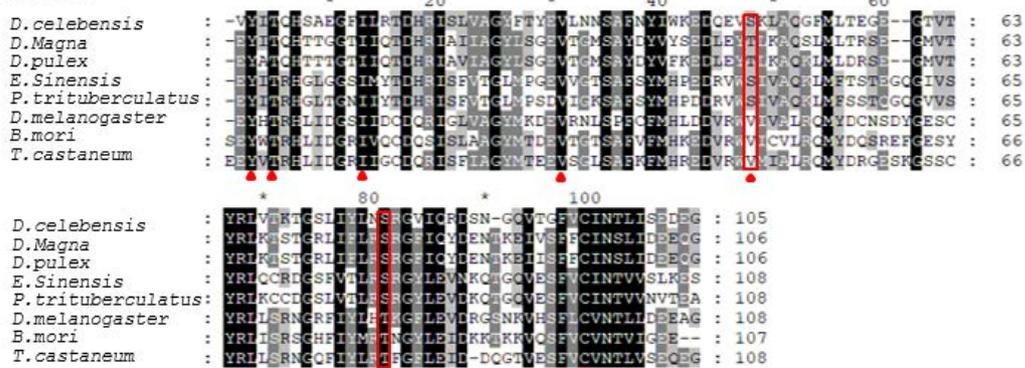
(A) bHLS_PAS



PAS-A



PAS-B



(B)

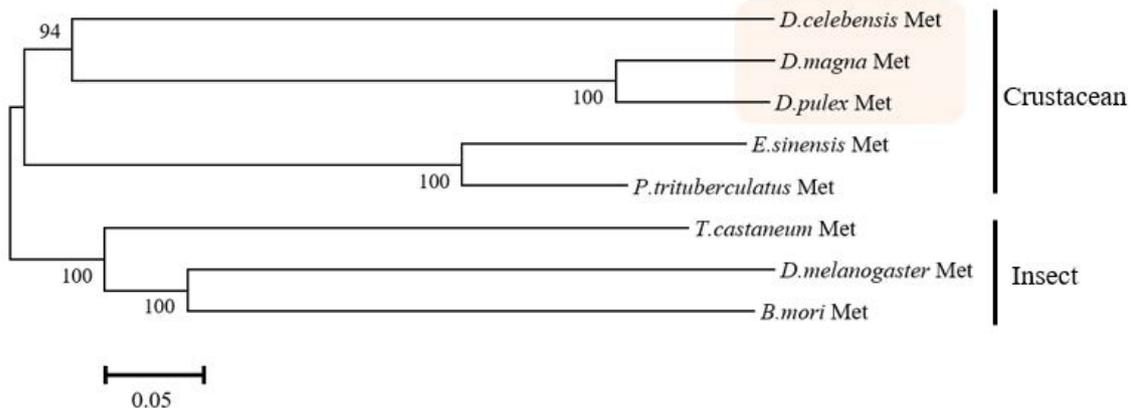


Fig. 2. (A) Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of bHLS_PAS, PAS-A, and the PAS-B domain of *Diaphanosoma celebensis* Met with those of insects and other crustaceans. Red triangles indicate ligand-binding sites, and red boxes are modified residues. (B) Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of *Diaphanosoma celebensis* Met and those of insects and other crustaceans. The tree was constructed with 1,000 bootstrap replicates.

시키는 역할을 한다(Arand *et al.* 2005). 최근 JHEH는 갑각류에서도 곤충에서와 유사한 방식으로 작용할 것으로 추정되고 있다(Hyde *et al.* 2019).

본 연구에서 *Dc*_JHEH cDNA는 442 bp의 5'-UTR, 1,350 bp의 ORF, 그리고 93 bp의 3'-UTR로 이루어져 있으며, 449 개의 아미노산을 암호화한다. Conserved domain searching

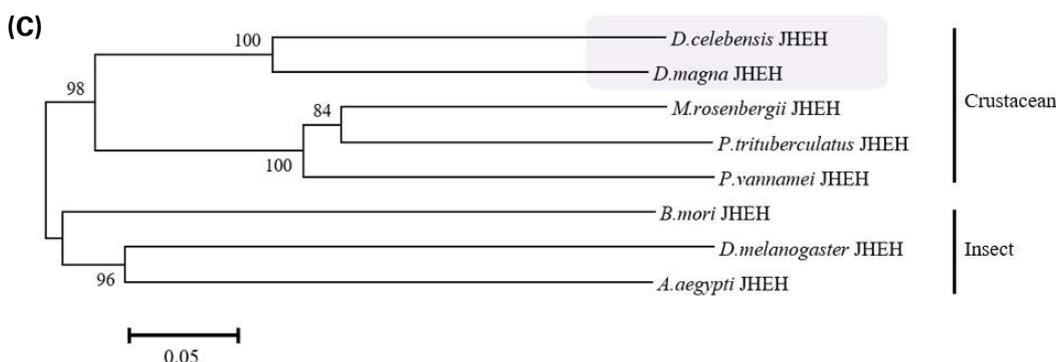
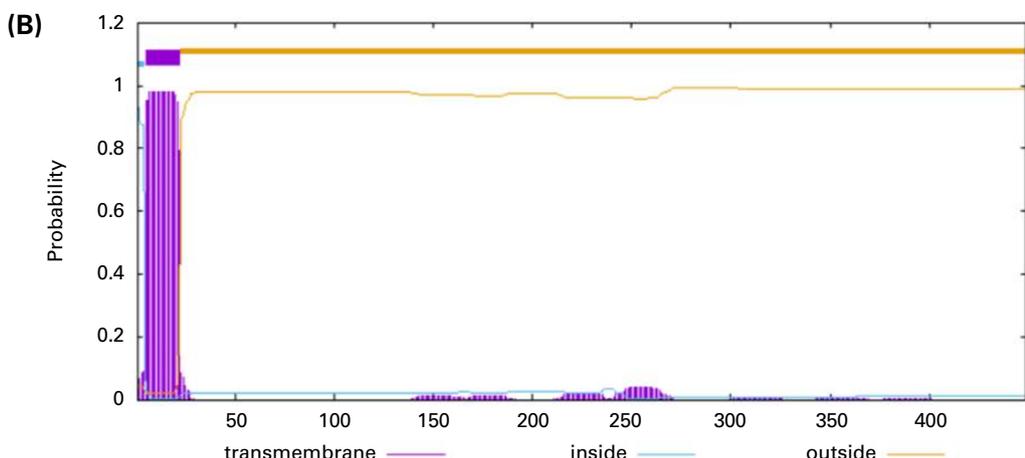
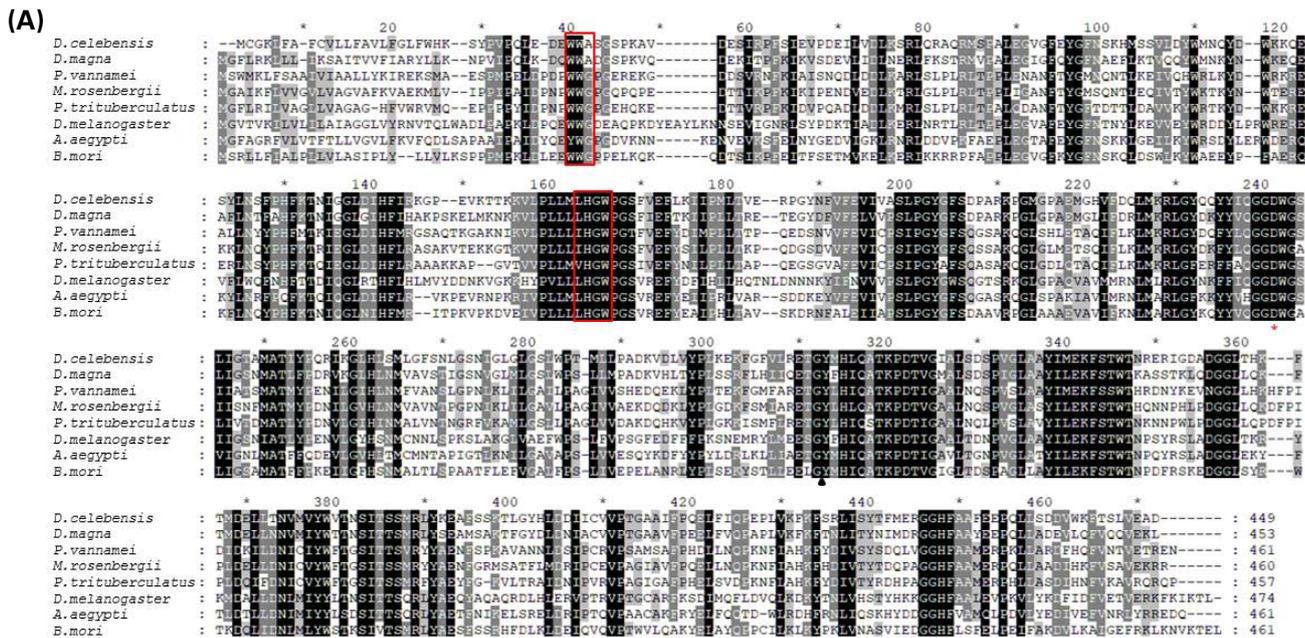


Fig. 3. (A) Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *Diaphanosoma celebensis* JEH with those of insects and other crustaceans. The red boxes indicate the conserved motif. Red asterisks and black triangles are typically conserved residues. (B) Transmembrane domains of JEH in *D. celebensis* predicted using TMHMM 2.0. (C) Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of *Diaphanosoma celebensis* Met and those of insects and other crustaceans. The tree was constructed with 1,000 bootstrap replicates.

을 통해 Dc-JHEH가 고도로 보존된 2개의 domain, epoxide hydrolase N-terminus (EHN) domain (47-156 aa)과 alpha/beta hydrolase fold인 Abhydrolase domain (142-382 aa)를 가지고 있음을 확인하였다. Dc_JHEH는 다른 생물의 JHEH에서 공통적으로 보존된 motif인 “HGWP”를 가지고 있으며, 3개의 catalytic residues인 Asp²²², His⁴²⁵, Glu³⁹⁸과 2개의 tyrosine 잔기(Tyr²⁹³, Tyr³⁶⁹)를 가지고 있었다(Fig. 3A).

특히 JHEH에서 공통적으로 발견되는 N-terminal membrane anchor motif인 “WWG”는 고등한 생물에서는 잘 보존되어 있는 반면, 균류, 원핵생물, 원생생물에서는 발견되지 않는 것으로 알려져 있다(Zhou *et al.* 2014). 그러나 본 연구에서 다중배열 결과 “WWG” motif는 곤충류와 대형 갑각류에서는 잘 보존되어 있으나, *D. celebensis*를 포함하는 소형 갑각류인 지각류에서는 “WWS” 형태로 변형되어 있었다. “WWG” motif는 JHMH가 존재하는 소포체 막에 결합하는 anchor로서 기능하는 것으로 알려져 있다(Gilbert *et al.* 2000). 따라서 변형된 motif를 갖는 Dc_JHEH가 transmembrane domain을 갖는지 알아보기 위해 TMHMM 2.0 분석을 한 결과 “WWG”를 갖는 *Bombyx mori* (Zhou *et al.* 2014)와 *Lymantria dispar* (Wen *et al.* 2018)의 JHEH와 같이 N-terminal signal sequence를 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

또한 잘 보존되어 있는 catalytic triad와 2개의 tyrosine 잔기는 α/β hydrolase 효소에서 전형적으로 나타나는 epoxide ring의 산소 원자에 양성자를 제공하며 안정하게 해 주는 역할을 한다(Yamada *et al.* 2000). 추가로 “HGWP” motif는 Trp¹⁴⁹의 주 사슬의 질소와 친핵성 잔기인 Asp²²⁷ 사이에 수소결합을 형성하면서 촉매 작용을 용이하게 해 주는 역할을 한다(Zhou *et al.* 2014). 따라서 본 연구 결과 Dc-JHEH는 α/β hydrolase 효소로서 막 결합 단백질임을 알 수 있다. 계통 분석 결과는 다른 두 유전자와 마찬가지로 지각류 JHEH가 함께 clustering되었으며 갑각류의 clade는 곤충의 것과 뚜렷하게 구분되었다(Fig. 3C).

아미노산 서열 분석 및 계통 분석 결과를 통해 *D. celebensis*의 JH 경로 관련 유전자 *JHAMT*, *Met* 그리고 *JHEH*는 갑각류 및 곤충의 해당 단백질과 기능적으로 유사할 것으로 추정된다. 이러한 결과는 이들 유전자가 *D. celebensis*의 탈피와 발생 및 생식에 관여할 것임을 제시한다.

2. 탈피 기간 동안 JH 신호전달경로 관련 유전자 발현 변화

JH는 20-hydroxyecdysone (20E)와 함께 곤충과 갑각류의 탈피와 변태 과정을 조절하는 중요한 역할을 담당한다(Wen *et al.* 2015). 20E는 탈피와 변태를 촉진하는 역할을 하고, JH는 유충에서 성체로의 발생을 억제하는 역할을 한다(Riddiford *et al.* 2003). *D. celebensis*의 탈피 주기는 성적 성숙 이전에는 매일 진행되지만 성적 성숙 이후에는 2일에 한 번씩 일어난다고 알려져 있다(Segwa and Yang 1990). In *et al.* (2019)은 본 연구와 유사한 배양 조건에서 5일과 7~8일에 탈피가 관찰되었다고 보고한 바 있다. 그 결과 대표적인 탈피 호르몬인 20E의 합성을 촉매하는 *cyp314A1* 유전자와 20E의 수용체인 *EcR*의 유전자 발현이 5일과 7~8일 차에 최대 발현량을 보임으로써 탈피 주기와 관련이 있다고 보고하였다. 그러나 갑각류에서 탈피 주기에 따른 JH 경로 유전자의 발현 양상은 연구가 매우 드물다.

본 연구에서는 JH 경로에 관여하는 *JHAMT*, *Met*, 그리고 *JHEH* 유전자의 탈피 주기 내에서의 발현 양상을 추가로 조사하였다. JH 생합성 경로에 관여하는 *JHAMT* 유전자의 발현은 20E 합성에 관여하는 *cyp314A1* 유전자와 유사한 양상을 보였으며 *D. celebensis*의 탈피 주기와 일치하는 경향을 보였다(Fig. 4A). 한편 MF의 잠재적 수용체인 *Met* 유전자의 발현은 탈피와 탈피 사이에 발현이 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4B). MF 분해를 통해 체내 MF 농도 유지에 중요한 역할을 하는 *JHEH* 유전자의 경우 *JHAMT* 유전자가 최대 발현량을 나타내는 5일 이후 증가하였다가 점차 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4C).

MF 유사체인 [3H]-farnesyl diazoketone binding activity 실험 결과 Lobster hemolymph에서 탈피 주기 동안 MF binding activity가 탈피 후에 감소하다가 다음 탈피가 일어나기 전까지 점차 증가하는 양상을 보인 바 있다(Chang *et al.* 1993). 이와 함께 본 연구에서 MF 합성을 담당하는 *JHAMT* 유전자의 발현이 탈피 주기와 일치하는 경향을 보임으로써 MF가 탈피에 관여한다는 것을 알 수 있다. 한편, *D. melanogaster*의 *JHAMT* 유전자의 knockdown 실험 결과 변태 과정을 방해하여 개체의 치사를 유도한 바 있으며(Niwa *et al.* 2008), *Tribolium castaneum*에서 *JHAMT*의 RNA interference 실험의 결과에서도 3령기 개체에서 변태 과정이 촉진된다고 보고된 바 있다(Minakuchi *et al.* 2008).

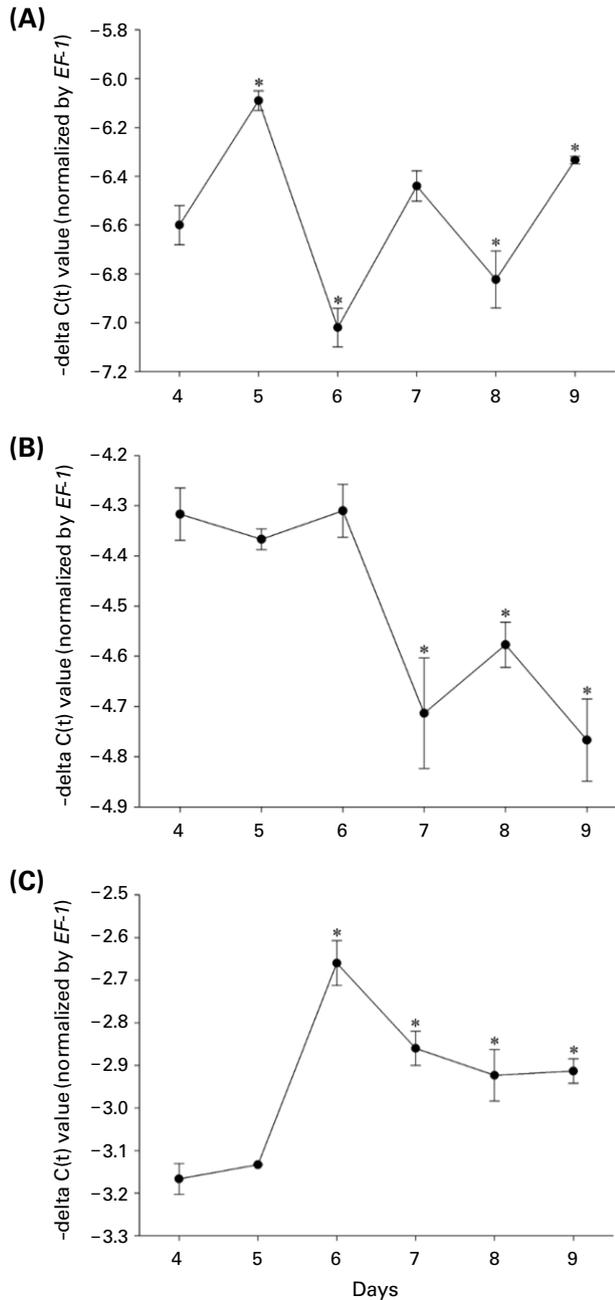


Fig. 4. Relative mRNA expression of *JHAMT* (A), *Met* (B), and *JHEH* (C) during molting in *Diaphanosoma celebensis* (4–9 days old). Asterisk indicates data with significant differences by *t*-test ($p < 0.05$).

따라서 *JHAMT*가 JH 생합성에 관여함으로써 탈피 조절 뿐만 아니라 정상적인 발생과정에도 중요한 역할을 한다 (Guo *et al.* 2021).

*Met*는 ecdysteroid receptor (EcR)와 retinoid X receptor

(RXR)과도 반응할 수 있어서 엑디손 신호 전달을 조절함으로써 탈피와 변태를 유도하는 데 관여할 수 있다 (Shin *et al.* 2015). *B. mori*에서 *Met* RNAi 실험 결과 조직의 재형성이 억제되면서 20E에 의해 조절되는 경로가 억제되고, 개체의 치사를 유도한 바 있다 (Guo *et al.* 2012). 한편 Lepidopteran *Helicoverpa armigera*의 *Met1* 유전자의 발현이 탈피 시기보다는 탈피와 탈피 중간 시기에서 더 높은 발현 양상을 보여 *Met1* 유전자가 유충의 발생 시기 동안에 조절된다고 제시하였다 (Li *et al.* 2021). 이러한 결과는 본 연구 결과와 일치하였다. 또한 저자들은 20E와 JH III가 *Met1* 유전자의 발현을 증가시킬 수 있으며, 20E의 농도가 더 높아지면 *Met1*의 발현이 오히려 억제되는 양상을 보임으로써 *Met1*의 유전자 발현이 JH와 20E에 의해 조절된다고 제시하였다. 이러한 결과는 탈피 과정 중 JH와 20E의 cross-talk를 의미한다 (Li *et al.* 2019).

JHEH는 세포 내 JH의 농도를 조절하는 역할을 담당한다. *Lymantria dispar* 3령기 유충에서 *JHEH1* 유전자의 발현을 12시간마다 확인한 결과 가장 높은 발현이 탈피 후 12~24시간에서 관찰된 후 120시간까지 점차 감소하는 양상을 보였다 (When *et al.* 2018). 유사한 결과가 *B. mori* *JHEH*에서도 관찰된 바 있으며 (Zhang *et al.* 2005), 본 연구 결과도 이와 같이 탈피 후 증가했다가 점차 감소하는 양상을 보였다. 완전 변태를 하는 곤충에서 높은 농도의 JH는 유충의 탈피 과정을 유도한다고 알려져 있으며 (Dubrovsky 2005), 따라서 *JHEH*의 발현량의 감소는 JH의 양을 증가시켜 탈피를 유도할 것으로 추정된다 (When *et al.* 2018). 또한 갑각류에서는 탈피가 일어나기 전에 점차적으로 MF와 엑디손 양이 증가하다가 탈피 시기 근처에서 최대치에 도달한 후 MF와 엑디손이 빠르게 감소되는데 이는 성공적으로 탈피가 이루어지는 데 결정적인 요소가 된다 (Lee *et al.* 1998). 이에 따라 본 연구에서 *D. celebensis* *JHEH* 유전자 발현이 탈피 시기부터 점차 증가하여 탈피가 이루어진 이후 가장 높게 발현된 결과는 이 시기에 JH의 양을 빠르게 감소시킴으로써 정상적인 탈피가 이루어지는 데 기여했을 것으로 추정된다. 한편 상기 곤충과 갑각류에서 보이는 탈피 기간에 따른 *JHEH*의 발현 양상의 차이는 생물 간의 탈피 및 유충 발생의 시기의 차이에 따라 서로 다른 시료 채집 시기에 영향을 받을 수 있다 (Chen *et al.* 2021). 따라서 탈피 및 발생 시기에 따른 JH 경로 관련 유전자의 정확한 역할을 이해하기 위해 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 기수산 물벼룩 *D. celebensis*의 JH 신호전달 경로에 관여하는 *JHAMT*, *Met* 그리고 *JHEH* 유전자의 서열 분석과 계통 분석을 실시하고, 탈피 주기에 따른 이들 유전자의 역할을 이해하고자 유전자발현 분석을 추가로 진행하였다. *D. celebensis*의 JH 관련 유전자는 잘 보존된 domain을 가지고 있었으며, 아미노산 서열 분석과 계통 분석을 통해 곤충 및 갑각류의 해당 유전자와 기능적으로 유사할 것으로 나타났다. 또한 *D. celebensis*의 탈피 주기에 따른 세 유전자의 발현변화 결과를 통해 이들 유전자가 JH 합성 및 분해에 관여함으로써 성공적인 탈피에 기여할 것임을 제시하였다.

적 요

갑각류에서 탈피는 ecdysteroid와 juvenile hormone (JH) 신호 경로에 관여하는 유전자의 상호작용에 의해 조절된다. Ecdysteroid와 달리, 탈피 과정에서 JH 신호 경로 유전자의 역할은 부유성 갑각류에서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구는 기수산 물벼룩 (*Diaphanosoma celebensis*)의 JH 신호 경로에서 JH 합성, 수용체, 분해 등에 관여하는 3종의 유전자 (*JHAMT*, *Met*, *JHEH*)의 염기서열 분석과 계통 분석을 실시하였다. 또한 탈피 주기에서 이들 유전자의 mRNA 발현양상을 분석하였다. *D. celebensis*의 JH 관련 유전자는 잘 보존된 domain을 가지고 있었으며, 아미노산 서열 분석과 계통 분석 결과는 이들 단백질이 곤충 및 다른 갑각류의 해당 단백질과 기능적으로 유사한 특징을 나타낸다. 또한 탈피 주기에 따른 유충 호르몬(JH) 신호전달경로 관련 유전자의 발현변화 결과를 통해 이들 유전자가 JH의 합성 및 분해에 관여함으로써 *D. celebensis*에서 성공적인 탈피에 기여할 것임을 제시하였다. 본 연구는 지각류에서 탈피 주기에서 JH 경로 유전자의 역할을 이해하는 데 도움이 될 것이다.

CRedit authorship contribution statement

H Cho: Sequence and phylogenetic analysis, Draft writing. JW Yoo: Gene expression analysis and statistical analysis. YM Lee: Experiment design, Writing & Revise, and Funding.

사 사

본 연구는 한국연구재단 과제 (NRF-2020R1F1A1069736) 연구비 지원을 받아 수행하였다.

REFERENCES

- Arand M, A Cronin, M Adamska and F Oesch. 2005. Epoxide hydrolases: structure, function, mechanism, and assay. *Methods Enzymol.* 400:569-588. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00032-7)
- Chang ES, MJ Bruce and SL Tamone. 1993. Regulation of crustacean molting: A multi-hormonal system. *Am. Zool.* 33:324-329. <https://doi.org/10.1093/icb/33.3.324>
- Chen X, Q Gao, H Cheng, F Peng, C Wang and B Xu. 2021. Molecular cloning and expression pattern of the juvenile hormone epoxide hydrolase gene from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* during larval development and the moult cycle. *Aquac. Res.* 52:3890-3899. <https://doi.org/10.1111/are.15233>
- Daimon T and T Shinoda. 2013. Function, diversity, and application of insect juvenile hormone epoxidases (CYP15). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 60:82-91. <https://doi.org/10.1002/bab.1058>
- Defelipe LA, E Dolgih, AE Roitberg, M Nouzova, JG Mayoral, FG Noriega and AG Turjanski. 2011. Juvenile hormone synthesis: "esterify then epoxidize" or "epoxidize then esterify"? Insights from the structural characterization of juvenile hormone acid methyltransferase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41:228-235. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.12.008>
- Dubrovsky EB. 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab.* 16:6-11. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.11.003>
- Gilbert LI, NA Granger and RM Roe. 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:617-644. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00034-5)
- Giraud M, M Douville, G Cottin and M Houde. 2017. Transcriptional, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine-disrupting potential and molting effects. *PLoS One* 12:e0171763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171763>
- Guo E, Q He, S Liu, L Tian, Z Sheng, Q Peng, J Guan, M Shi, K Li and LI Gilbert. 2012. MET is required for the maximal action of 20-hydroxyecdysone during *Bombyx* metamorphosis. *PLoS One* 7:e53256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053256>
- Guo P, Y Zhang, L Zhang, H Xu, H Zhang, Z Wang, Y Jiang, D Molloy, P Zhao and Q Zia. 2021. Structural basis for juvenile hormone biosynthesis by the juvenile hormone acid methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 297:101234. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101234>
- Hui JHL, A Hayward, WG Bendena, T Takahashi and SS Tobe. 2010. Evolution and functional divergence of enzymes involved in sesquiterpenoid hormone biosynthesis in crustaceans and insects. *Peptides* 31:451-455. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.10.003>

- Hyde CJ, A Elizur and T Ventura. 2019. The crustacean ecdysone cassette: A gatekeeper for molt and metamorphosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 185:172–183. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.08.012>
- In S, H Cho and YM Lee. 2021. Identification of ecdysteroid pathway-related genes and their transcriptional modulation in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* exposed to bisphenol analogs. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 13:261–268. <https://doi.org/10.1007/s13530-021-00103-8>
- In S, H Cho, KW Lee, EJ Won and YM Lee. 2020. Cloning and molecular characterization of estrogen-related receptor (ERR) and vitellogenin genes in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* exposed to bisphenol A and its structural analogues. *Mar. Pollut. Bull.* 154:111063. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111063>
- In S, HW Yoon, JW Yoo, H Cho, RO Kim and YM Lee. 2019. Acute toxicity of bisphenol A and its structural analogues and transcriptional modulation of the ecdysone-mediated pathway in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Ecotox. Environ. Safe.* 179:310–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.065>
- Jiang M, S Lü and Y Zhang. 2017. Characterization of juvenile hormone related genes regulating cantharidin biosynthesis in *Epicauta chinensis*. *Sci. Rep.* 7:2308–2311. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02393-w>
- Jindra M, SR Palli and LM Riddiford. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* 58:181–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700>
- Kato Y, K Kobayashi, S Oda, N Tatarazako, H Watanabe and T Iguchi. 2007. Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. *J. Endocrinol.* 193:183–194. <https://doi.org/10.1677/JOE-06-0228>
- Kim BM, S Kang, RO Kim, JH Jung, KW Lee, JS Rhee and YM Lee. 2018. De novo transcriptome assembly of brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* based on short-term cadmium and benzo[a]pyrene exposure experiments. *Hereditas* 155:36. <https://doi.org/10.1186/s41065-018-0075-3>
- Kim DH, BS Choi, HM Kang, JC Park, MS Kim, A Hagiwara and JS Lee. 2021. The genome of the marine water flea *Diaphanosoma celebensis*: Identification of phase I, II, and III detoxification genes and potential applications in marine molecular ecotoxicology. *Comp. Biochem. Physiol. D-Genomics Proteomics* 32:100787. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100787>
- Lee KJ, RD Watson and RD Roer. 1998. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a moult cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:624–627. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9215>
- Lee YM, H Cho, RO Kim, S In, SJ Kim and EJ Won. 2021. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in chemical exposed and at different age's brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Sci. Rep.* 11:23691. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03098-x>
- Li G, Q Sun, X Liu, J Zhang, W Dou, J Niu and J Wang. 2019. Expression dynamics of key ecdysteroid and juvenile hormone biosynthesis genes imply a coordinated regulation pattern in the molting process of a spider mite, *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 78:361–372. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00396-y>
- Li M, EA Mead and JS Zhu. 2011. Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:638–643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013914108>
- Li W, ZY Huang, F Liu, Z Li, L Yan, S Zhang, S Chen, B Zhong and S Su. 2013. Molecular cloning and characterization of juvenile hormone acid methyltransferase in the honey bee, *Apis mellifera*, and its differential expression during caste differentiation. *PloS One* 8:e68544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068544>
- Li YX, D Wang, WL Zhao, JY Zhang, XL Kang, YL Li and XF Zhao. 2021. Juvenile hormone induces methoprene-tolerant 1 phosphorylation to increase interaction with Taiman in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 130:103519. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103519>
- Mackert A, K Hartfelder, MMG Bitondi and ZLP Simões. 2010. The juvenile hormone (JH) epoxide hydrolase gene in the honey bee (*Apis mellifera*) genome encodes a protein which has negligible participation in JH degradation. *J. Insect Physiol.* 56:1139–1146. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.007>
- Marcial HS and A Hagiwara. 2007. Multigenerational effects of 17 β -estradiol and nonylphenol on euryhaline cladoceran *Diaphanosoma celebensis*. *Fish. Sci.* 73:324–330. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01338.x>
- Martin JL and FM McMillan. 2002. SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:783–793. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00391-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00391-3)
- Minakuchi C, T Namiki, M Yoshiyama and T Shinoda. 2008. RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase gene causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *FEBS J.* 275:2919–2931. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06428.x>
- Miura K, M Oda, S Makita and Y Chinzei. 2005. Characterization of the *Drosophila* Methoprene-tolerant gene product: Juvenile hormone binding and ligand dependent gene regulation. *FEBS J.* 272:1169–1178. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04552.x>
- Miyakawa H, K Toyota, I Hirakawa, Y Ogino, S Miyagawa, S Oda, N Tatarazako, T Miura, JK Colbourne and T Iguchi. 2013. A muta-

- tion in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans. *Nat. Commun.* 4:1856. <https://doi.org/10.1038/ncomms2868>
- Miyakawa H, T Sato, Y Song, KE Tollefsen and T Iguchi. 2018. Ecdysteroid and juvenile hormone biosynthesis, receptors and their signaling in the freshwater microcrustacean *Daphnia*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 184:62–68. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.12.006>
- Nakagawa Y and VC Henrich. 2009. Arthropod nuclear receptors and their role in molting. *FEBS J.* 276: 6128–6157. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07347.x>
- Niwa R, T Niimi, N Honda, M Yoshiyama, K Itoyama, H Kataoka and T Shinoda. 2008. Juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:714–720. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.04.003>
- Palli SR, TR Ladd, WL Tomkins, S Shu, SB Ramaswamy, Y Tanaka, B Arif and A Retnakaran. 2000. *Choristoneura fumiferana* entomopoxvirus prevents metamorphosis and modulates juvenile hormone and ecdysteroid titers. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:869. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00060-6)
- Riddiford LM, K Hiruma, X Zhou and CA Nelson. 2003 Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33:1327–1338. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.06.001>
- Rivera-Perez C, M Nouzova, I Lamboglia and FG Noriega. 2014. Metabolic analysis reveals changes in the mevalonate and juvenile hormone synthesis pathways linked to the mosquito reproductive physiology. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.001>
- Shinoda T and K Itoyama. 2003. Juvenile hormone acid methyltransferase: a key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:11986–11991. <https://doi.org/10.1073/pnas.2134232100>
- Sin YW, NJ Kenny, Z Qu, KW Chan, KWS Chan, SPS Cheong, RWT Leung, TF Chan, WG Bendena, KH Chu, SS Tobe and JHL Hui. 2015. Identification of putative ecdysteroid and juvenile hormone pathway genes in the shrimp *Neocaridina denticulate*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 214:167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.018>
- Wen D, C Rivera-Perez, M Abdou, Q Jia, Q He, X Liu, O Zyann, J Xu, WG Bendena, SS Tobe, FG Noriega, SR Palli, J Wang and S Li. 2015. Methyl farnesoate plays a dual role in regulating *Drosophila* metamorphosis. *PLoS Genet.* 11:e1005038. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006559>
- Wen R, B Wang, B Wang and L Ma. 2018. Characterization and expression profiles of juvenile hormone epoxide hydrolase from *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae) and RNA interference by ingestion. *J. Insect Sci.* 18:13. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey002>
- Yamada T, C Morisseau, JE Maxwell, MA Argiriadi, DW Christianson and BD Hammock. 2000. Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 275:23082–23088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001464200>
- Zhang QR, WH Xu, FS Chen and S Li. 2005. Molecular and biochemical characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:153–164. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.10.010>
- Zhou K, N Jia, C Ju, YL Jiang, JP Yang, Y Chen, S Li, WF Li and CZ Zhou. 2014. Crystal structure of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm *Bombyx mori*. *Proteins* 82: 3224–3229. <https://doi.org/10.1002/prot.24676>
- Zhu J, JM Busche and X Zhang. 2010. Identification of juvenile hormone target genes in the adult female mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.004>
- Žitňan D, YJ Kim, I Žitňanová, L Roller and ME Adams. 2007. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153:88–96. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.04.002>