



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수 산 학 석 사 학 위 논 문

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)
alpha actin 유전자의 isoform별
구조 및 발현 특징 분석



2016년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 정 애

수 산 학 석 사 학 위 논 문

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)
alpha actin 유전자의 isoform별
구조 및 발현 특징 분석

지도교수 남 윤 권

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.

2016 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 정 애

이정애의 수산학석사 학위논문을
인준함.

2016 년 2 월 26 일

위 원 장 이 학 박 사 김 동 수



위 원 농 학 박 사 공 승 표



위 원 수 산 학 박 사 남 윤 권



목 차

목차	i
표 목차(List of Tables)	iv
그림 목차(List of Figures)	v
영문 요약(Abstract)	viii
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	4
2.1. 미꾸라지 alpha actin 유전자 isoform들의 cDNA 클로닝	4
2.1.1. NGS 데이터베이스 및 GenBank 염기서열 정보 검색.....	4
2.1.2. Isoform별 full-length cDNA 클로닝.....	5
2.2. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 genomic DNA 클로닝	10
2.2.1. Genomic DNA의 PCR 분리.....	10
2.2.2. Genome walking을 이용한 5'-upstream 조절영역 클로닝	11
2.3. 생물정보 분석.....	12
2.3.1. 분자계통 및 아미노산 서열 특징 분석.....	12
2.3.2. 프로모터 전사조절 인자 부착 예측 분석	17

2.4. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 조직별 및 발생단계별 발현분석	18
2.4.1. 실험어, 생체 시료 및 핵산 시료 확보	18
2.4.2. End-point RT-PCR 분석	19
2.4.3. Real-time RT-PCR 분석	20
III. 결과	22
3.1. 미꾸라지 alpha actin isoform들 (ACTA1, ACTC1 및 ACTA2)의 cDNA 및 아미노산 서열의 특징	22
3.2. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 분자계통학적 분석	31
3.3. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 genomic DNA 구조	41
3.4. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 프로모터 구조 및 관련 전사조절 인자들의 예측	44
3.5. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 mRNA 조직분포 및 발현 특징	47
3.6. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 발생단계별 발현 양상 분석	54
IV. 논의	60
국문 요약	68
감사의 글	70

참고 문헌	72
-------------	----



표 목차(List of Tables)

Table 1. Oligonucleotides used in this study.....6

Table 2. Information on alpha actin genes used for molecular
phylogenetic analysis..... 13

Table 3. Summarized information on the mud loach alpha actin
isoforms..... 43

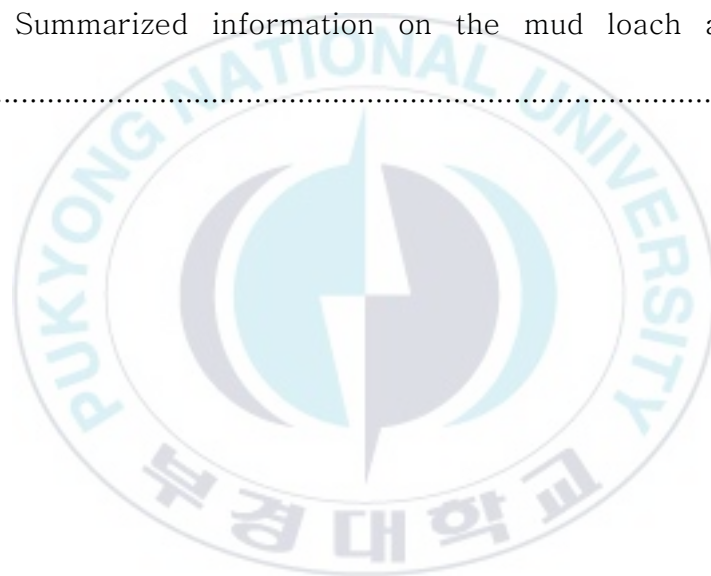


그림 목차(List of Figures)

Fig 1. Representative cDNA sequence and deduced amino acid sequence of mud loach ACTA1	23
Fig 2. Representative cDNA sequence and deduced amino acid sequence of mud loach ACTC1	25
Fig 3. Representative cDNA sequence and deduced amino acid sequence of mud loach ACTA2	27
Fig 4. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach alpha actin isoforms	30
Fig 5. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach ACTA1 along with orthologues from teleosts and human	32
Fig 6. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach ACTC1 along with orthologues from teleosts and human	34
Fig 7. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach ACTA2	

along with orthologues from teleosts and human.....36

Fig 8. Molecular phylogenic tree of alpha actin amino acid sequences
assessed by MEGA program based on neighbor-joining algorithm ...38

Fig 9. Schematic drawing to show genomic DNA structure of mud
loach *ACTA1*, *ACTC1* and *ACTA2* isoforms42

Fig 10. Comparison of transcription factor binding motifs in the
regulatory regions of mud loach *ACTA1*, *ACTC1* and *ACTA2* genes...
.....45

Fig 11. Distribution patterns and expression levels of alpha actin
transcripts in female and male mud loach tissues, as assessed by
end-point RT-PCR.....48

Fig 12. Distribution patterns and expression levels of *ACTA1* (A),
ACTC1 (B) and *ACTA2* (C) transcripts in female and male mud loach
tissues, as assessed by real-time RT-PCR.....49

Fig 13. Distribution and expression levels of alpha actin transcripts in
developing embryos and early larvae assessed by end-point RT-PCR

(A) and real-time RT-PCR (B) assays	55
---	----



Gene structure and expression analysis of mud loach (*Misgurnus mizolepis*)
alpha actin isoform genes

Jung Ae Lee

Department of Fisheries Biology, The Graduate School
Pukyong National University

Abstract

Three alpha actin isoform genes were isolated and characterized from mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Mud loach alpha actin isoforms [i.e., α -skeletal (*ACTA1*), α -cardiac (*ACTC1*) and α -smooth (*ACTA2*)] shared a significant homology one another at both coding nucleotide sequence and amino acid sequence levels; also they revealed highly conserved features typically known for other vertebrate counterparts with a considerable degree of sequence homology in the vertebrate lineage. At amino acid level, several amino acid residues are isoform specific, allowing each isoform type to be distinguished from other isoforms. Molecular phylogenetic analysis of alpha actin genes revealed that vertebrate alpha actin genes formed a monophyletic group. Overall, *ACTA1*, *ACTC1* and *ACTA2* are divergently visualized in the phylogenetic tree. Within each isoform group, the tree topology was in accordance with the patterns of known taxonomic appraisal. Genomic isoform genes of mud loach alpha-actins showed an identical structure in terms of the presence of a non-translated exon, 8 translated exons and 8 introns including one following the non-translated exon. Conserved gt/ag rule was

consistent in every exon–intron boundary region. From the bioinformatic analysis of the regulatory upstream region of each actin isoform, various putative motif sites targeted by different transcription factors were predicted. They included sites for ATF–1, C/EBP, GKLf, MyoD, MEF–2, and SMAD3, which have been known to be involved in cell differentiation and growth. In addition, motifs for stress/immune–response factors such as AP1, AHR, GR, MTF–1, HIF–1 and IRFs as well as potential binding sites for some factors related with lymphocytes such as E2A, LEF–1 and TCF–1 were also predictable. In spite of very high sequence identity among actin isoforms, their mRNA expression patterns were highly isoform–dependent and the patterns of tissue distribution were generally in congruent with their proposed functions. Mud loach *ACTA1* mRNA was observable in wide array of tissue types including gonadic tissues; however, in a quantitative term, its basal expression level was highly predominant in skeletal muscle. In case of *ACTC1*, mRNA expression was detectable in less number of tissues than was *ACTA1* with the highest expression level in heart. On the other hand, *ACTA2* showed more ubiquitous distribution of mRNA expression across tissues in which highest expression was found in intestine/spleen. During embryonic development *ACTA1/ACTC1* mRNA expression began to appear at the time of myotome formation, peaked at the period from hatching to yolk sac absorption and reduced afterward the first feeding (3 days post hatching). On the other hand, *ACTA2* mRNA expression was not clearly observable during pre–hatching period. Onset expression was apparent from hatching, peaked at the period from 2 to 4 days after hatching, and then reduced afterward. In summary, findings from this study suggest that the three actin isoforms from mud loach be regulated highly in an isoform–specific manner in adult tissues and developing embryos, in spite of their

extremely high structural homology. Data from the present study could be a good basis for future study not only to gain a deeper insight into the functional diversification or neofunctionalization of alpha actin isoforms in vertebrate lineage and also to utilize the actin regulators for genetic manipulation with various theoretical and practical research purposes.



I. 서론

Actin은 근육 수축, 세포의 운동성, 세포 분열, 기관 운동, 세포 신경전달, 세포 결합이나 세포 형태 형성 등 진핵 세포에서 다양한 기능을 담당하는 필수적인 단백질이다(Doherty and McMahon, 2008). 척추동물의 경우 크게 alpha, beta 그리고 gamma의 분류로 나누어지며 기능에 따라 sub-isoform을 가진다. 이 중 alpha actin은 α -skeletal, α -aortic smooth 그리고 α -cardiac의 sub-isoform이 있으며 actin isoform은 아미노산 수준에서 매우 유사한 형태이지만 세포 내에서 각각의 독립된 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다(Perrin and Ervasti, 2010). 포유류에서 일반적으로 알려진 alpha actin의 sub-isoform별 기능을 보면 α -skeletal actin은 골격근육 형성(Gunning et al., 2000), α -aortic smooth actin은 근육섬유모세포 형성(Nagamoto et al., 2000)하며 α -cardiac actin은 근육원섬유 마디 형성에 관여한다(Sartorelli et al., 1993). 어류의 경우는 대부분 종에 성장 단계에 따라 그 정도는 차이가 있지만 일반적으로 생활사 전반에 걸쳐 근육성장이 이루어지는 차이점이 있다(Johnston et al., 2011). 때문에 어류를 대상으로 한 근육 성장 관련 유전자들의 발굴과 연구는 척추동물의 근육 성장에 관한 기능 분화(functional diversification)

및 분자 진화(molecular evolution)의 연구 측면에서 중요시될 뿐만 아니라, 유용 어류(양식 어류)의 성장 관련 형질의 기능 해석 및 이를 기반으로 한 육종 연구의 소재로서도 중요시된다(Koumans et al., 1993; Watabe, 1999). 하지만 actin의 기능들에 관한 많은 연구 정보가 축적되어 있는 포유류와 달리, 어류에서는 그간 여러 어종들에서 actin 염기서열의 정보가 GenBank등 공개된 데이터베이스에 등록되어 있음에도 불구하고, 대부분 단일 actin isoform의 단편적인 정보들이 대부분이며 특정 단일 어종으로부터 다양한 actin isoform 서열들을 함께 비교, 분석한 연구 정보는 일부 보고들을 제외하면 극히 제한적인 상태이다(Venkatesh et al., 1996). 뿐만 아니라 어류에서는 세 종류의 alpha actin isoform들의 조직 별 발현 및 발생단계에서의 차등 발현 등을 동일 어종에서 비교한 정보가 거의 없음은 물론(Venkatesh et al., 1996; Kusakabe et al., 1999; Kim and Nam, 2009), actin isoform들간 차등 발현 조절을 기본적으로 담당하는 각 isoform의 프로모터 및 조절영역(upstream regulatory region)에 관한 비교 연구는 어류에서 거의 이루어진 바 없다.

미꾸라지(mud loach, *Misgurnus mizolepis*)는 분류학적으로 경골어강(Osteichthyes) 잉어목(Cypriniformes), 미꾸리과(Cobitidae)에 속하는 종으로 우리나라 전 하천 영역에 존재하는 주요 담수어류로서 식용 등의 목적으로 생산되는 양식 어종이다. 상업적 생산뿐만 아니라 미꾸라지는 척추동물 유전학 및 육종학 연구를 위한 실험 모델 동물로서도 많은 장점을

갖고 있다. 예컨대, 미꾸라지는 단일 개체로부터 충분한 수의 자손을 한번에 확보할 수 있는 높은 산란(포란)력을 가지며, 체외 수정을 통해 투명하고 빠른 난 발생을 보이는 시료의 확보가 매우 용이하고, 적절히 조절되는 실험실 사육 조건에서의 인공 다산란(induced multiple spawning) 기술이 정착되어 있으며, 성분화(sex differentiation)의 인위적인 조절이 가능한 여러 장점을 갖고 있다(Nam et al., 1999). 이러한 장점에 힘입어 그간 배수체(Nam et al., 2001a), 단성 집단 생산(Nam et al., 2002), 잡종 유도(Park et al., 2006) 및 유전자 이식(Nam et al., 2001b) 등 분자유전육종 연구 소재는 물론, 최근 본 어종으로부터 유용 유전자 발굴 및 기능 분석에 관한 연구들 (Nam et al., 2011; Cho et al., 2012; Kim et al., 2014)이 활발히 이루어지고 있다. 이에 본 연구는 미꾸라지를 실험 모델로 이용하여, 경골 어류의 alpha actin isoform들의 구조와 기능을 비교연구함으로써 어류 alpha actin 유전자의 기능 분화와 조절에 관한 기초 정보를 제공하고자 하였으며, 나아가 향후 actin 유전자 및 프로모터를 기반으로 한 분자유전육종 연구 및 유전자조절 기술 개발에 유용 소재를 제공하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 연구 목표를 달성하기 위해서 미꾸라지(*M. mizolepis*)에서 발현하는 서로 다른 alpha actin 유전자를 분리, 유전자의 구조적 특징을 분석하고 이와 아울러 각 isoform들의 조직별 및 발생단계별 차등 발현 특징을 분석함으로써 해당 isoform들의 기능 분화를 분석하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

2.1. 미꾸라지 alpha actin 유전자 isoform들의 cDNA 클로닝

2.1.1. NGS 데이터베이스 및 GenBank 염기서열 정보 검색

Alpha actin isoform들을 탐색하기 위해 사용한 미꾸라지의 next generation sequencing (NGS) 데이터베이스는 배(embryo), 치어의 전어체(whole body) 및 미꾸라지 성체의 다양한 조직들을 대상으로 구축된 데이터베이스였다. 데이터베이스 검색을 통해서 각 isoform을 탐색하여 Sequencher (Gene Codes, USA) 분석 프로그램을 이용하여 contig를 제작, 각 isoform별로 FASTA 파일을 확보하였다. 각 isoform 단편들을 대상으로 GenBank BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 검색을 통해 GenBank에 등록된 서열들과의 상동성을 확인하였다. 또한 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)를 이용하여 확보한 염기서열 단편들의 open reading frame (ORF) 영역의 보존상태를 확인하였다.

2.1.2. Isoform 별 full-length cDNA 클로닝

비번역 영역(untranslated region)에서 cDNA 클로닝 용 프라이머와 alpha actin 유전자의 isoform별 RT-PCR 프라이머를 디자인 하였다 (Table 1). 디자인 한 cDNA 클로닝 용 프라이머를 이용해 *ACTA1*은 근육 조직, *ACTC1*은 심장과 근육 조직, *ACTA2*는 장 조직에서 추출한 미꾸라지 cDNA를 산물로 하여 PCR을 수행하였다. PCR은 AccuPower® Profi Taq PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하였으며, PCR cycle은 35회로 95 °C로 pre-denaturation 2 분, 95 °C로 denaturation 20 초, 58 °C로 annealing 20 초, 72 °C로 extension 80 초 수행하였다. PCR 산물은 1.0 % agarose gel에 전기영동 하여 확인하였고, 하나의 밴드로 나타난 결과를 GeneAll® PCR SV kit (GeneAll, Korea)를 이용해 정제하였으며 실험 방법은 kit의 프로토콜을 따랐다. 정제산물은 (주)마크로젠에 시퀀싱 의뢰하였고 결과는 Sequencher (Version 4.9, Gene Codes, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석한 cDNA 염기서열을 바탕으로 vectorette PCR 프라이머를 디자인하였으며 vectorette PCR을 수행하여 cDNA의 전체 염기서열 중 5' 및 3' 비번역 영역을 결정하였다. Vectorette PCR에는 미꾸라지의 cDNA library (excised phagemid stock)와 AccuPower® Profi Taq PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하였고, PCR cycle은 35

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Purpose	Primer	Sequence (5' to 3')	Thermal cycling conditions
Isolation of full-length cDNA	MM ACTA1 1F	ACCAACCAGTAAAACCAAC	35 cycles at 95 °C for 20 s, 58 °C for 20 s, 72 °C for 80 s
	qMM ACTA1 1R	ACGGCTGAGGCTGATA	
	MM ACTC1 1F	CAGTCTGTGCTACAACCTC	
	qMM ACTC1 1R	AGACGGACGGGTAGCT	
	MM ACTA2 1F	GAGTAAGGAAGGACATCCGA	
	MM ACTA2 1R	GGGGAAGTAAAGGGTACGTT	
Vectorette PCR to 5'-upstream region of <i>ACTA1</i> and <i>ACTA1</i>	SK	CGCTCTAGAACTAGTGGATC	35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 30 s (1 st)
	MM ACT iso vec 1R	GTGTGGTGCCAGATCTTCTC	
	MM ACT iso vec 2R	CTCTTGCTCTGAGCCTCATC	
Vectorette PCR to 5'-upstream region of <i>ACTA2</i>	SK	CGCTCTAGAACTAGTGGATC	35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 20 s (2 nd)
	MM ACTA2 vec 1R	CCACACGAAGCTCGTTGTAGAATGAA	
	MM ACTA2 vec 2R	ATCACTCCCTGGTGTCTGGGTCGA	
Vectorette PCR to 3'-downstream region of <i>ACTA1</i> and <i>ACTC1</i>	MM ACT iso vec 1F	GTGCGACATTGACATCCGTA	35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 30 s (1 st)
	MM ACT iso vec 2F	TGACCGTATGCAGAAGGAGA	
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
Vectorette PCR to 3'-downstream region of <i>ACTA2</i>	MM ACTA2 vec 1F	CACCATGTACCCCGGTATTGCTGATA	35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 20 s (2 nd)
	MM ACTA2 vec 2F	CTGGTTCCTAATTCTGCTATTGCTT	
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	

End-point RT-PCR	qMM ACTA1 1F	GTACTCTGTCTGGATCGGT	28 cycles at 95 °C for 20 s, 60 °C for 20 s, 72 °C for 20 s
	qMM ACTA1 1R	ACGGCTGAGGCTGATA	
	qMM ACTC1 1F	GTACTCGGTTTGGATTGGC	
	qMM ACTC1 1R	AGAGCACGTCACAACCTTTTA	
	qMM ACTA2 1F	CAAGTACTCCGTATGGATCG	
	qMM ACTA2 1R	TAGCAGAATTAGGGAACCAG	
Real-time RT-PCR	qMM ACTA1 1F	GTACTCTGTCTGGATCGGT	45 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 20 s, 72 °C for 20 s
	qMM ACTA1 1R	ACGGCTGAGGCTGATA	
	qMM ACTC1 1F	GTACTCGGTTTGGATTGGC	
	qMM ACTC1 1R	AGAGCACGTCACAACCTTTTA	
	qMM ACTA2 1F	CAAGTACTCCGTATGGATCG	
Real-time RT-PCR of 18S rRNA	qMM ACTA2 1R	TAGCAGAATTAGGGAACCAG	
	qMM 18S 1F	AAGCTCGTAGTTGGATCTCG	
	qMM 18S 1R	GCCTGAATACGCAGCTAGG	

회이며, 94 °C로 pre-denaturation 2 분, 94 °C로 denaturation 30 초, 58 °C로 annealing 30 초, 72 °C로 extension 30 초(primary PCR) 및 20 초(nested PCR) 수행하였다. 5' 및 3' 방향으로 PCR을 연속 2 회 수행하였으며, 1.5 % agarose gel에 전기영동을 하고 Gel Doc™ XR (Bio-Rad, USA)과 소프트웨어 프로그램인 Image Lab(version 3.0; Bio-Rad)으로 분석하였다. 전기영동 분석은 primary 및 nested PCR 산물을 모두 확인하였지만 nested PCR 결과에서 사이즈가 큰 밴드를 분리·정제하여 시퀀싱 하였다. 정제는 GeneAll® Gel SV kit (GeneAll, Korea)를 이용하였으며 실험 방법은 kit의 프로토콜을 따랐다. PCR 산물 15 µl를 1.0 % agarose gel에서 130 V 전기영동 수행한 후 UV illuminator에서 목적 밴드를 절단하여 1.5 ml tube에 넣고 gel 무게를 측정하였다. 측정한 Gel 무게의 3 배 volume의 GB (gel binding) buffer를 넣고 녹인 후, gel 무게의 1 배 volume의 iso-propanol을 넣고 mixing 하였다. 이를 gel binding spin column에 옮긴 후 원심분리를 수행하였고 Collection tube에 모인 용액을 제거 한 후 NW (nuclear washing buffer) buffer로 washing을 2 회 수행하였다. Spin column의 membrane에 남아 있는 ethanol 성분을 완전히 제거하기 위해 추가로 원심분리를 수행하고 spin column을 1.5 ml tube에 옮겨 정제산물을 EB (elution buffer)로 회수하였다. 정제산물 1 µl와 1X dye solution 5 µl를 혼합하여 1.0 %

agarose gel에서 정제결과를 확인하였고, 3 μ l의 정제산물을 TA cloning에 이용하였다. 3 μ l의 정제산물에 1 μ l (50 ng)의 pGEM T-easy vector (Promega, USA), 5 μ l의 2X Rapid ligation buffer 그리고 1 μ l의 T4 DNA ligase (3 units / μ l)를 처리하여 10 μ l volume으로 12 $^{\circ}$ C에서 12 시간 반응하였다. 박테리아 transformation은 XL-1 blue MRF' (Stratagene, USA)를 숙주로 이용하였다. Competent cell glycerol stock (-80° C)은 얼음에서 녹여 재조합 벡터와 혼합하였으며, 재조합 벡터를 박테리아에 삽입하기 위해 42 $^{\circ}$ C에서 90 초간 heat shock 반응을 가하고 ice에서 2 분간 반응시켰다. 이를 800 μ l의 SOC 배지와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 50 분간 배양하고, 배양된 균을 X-gal/IPTG ampicillin LB에 도말하였다. 배지는 37 $^{\circ}$ C에서 15 시간 배양 후 GeneAll® Exprep™ Plasmid SV mini (GeneAll, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 결과는 0.7 % agarose gel에 전기영동 하여 확인하였고 plasmid DNA는 PCR product와 함께 시퀀싱 분석에 이용하였다.

이와 같이 vectorette PCR을 통해 확보한 full-length cDNA를 최종적으로 확인하기 위해 염기서열의 5' 및 3' 말단에 가까운 위치의 프라이머로 RT-PCR을 수행하였다. 주형산물은 처음 cDNA 실험에 이용한 조직별 샘플에 해당하며 *ACTA1*은 근육, *ACTC1*은 심장과 근육, *ACTA2*는 장 조직을 이용했다. 실험 조건과 분석 방법은 상기의 방법과 동일하며 시

퀵싱 완료 후에 genomic 유전자와 multiple alignment 수행하여 일치하는 지 확인하였다.

2.2. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 genomic DNA 클로닝

2.2.1. Genomic DNA의 PCR 분리

앞서 확보한 cDNA 염기서열을 바탕으로 genomic DNA의 구조를 밝히기 위해 gDNA를 이용한 PCR을 수행하였다. PCR은 Kyratec PCR cycler (Kyratec, Germany)와 AccuPower® Profi Taq PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하였으며 미꾸라지 성체에서 확보한 gDNA 2 μ l로 PCR을 수행하였다. 프라이머는 cDNA 클로닝에 사용한 것과 동일한 것을 이용하였다(*ACTA1*: MM ACTA1 1F-qMM ACTA1 1R, *ACTC1*: MM ACTC1 1F-qMM ACTC1 1R, *ACTA2*: MM ACTA2 1F-MM ACTA2 1R). PCR cycle 수는 35회 였으며, 열 순환 조건은 95 $^{\circ}$ C로 pre-denaturation 2 분, 95 $^{\circ}$ C로 denaturation 30 초, 58 $^{\circ}$ C로 annealing 30 초, 68 $^{\circ}$ C로 extension 6 분, 68 $^{\circ}$ C로 final extension 5 분을 수행하였다. 결과를 확인

하기 위해 0.7 % agarose gel에서 130 V로 전기영동 수행하였고 Gel Doc™ XR (Bio-Rad, USA)과 소프트웨어 프로그램 Image Lab (version 3.0; Bio-Rad)으로 분석하였다. 분석 후 PCR 산물을 GeneAll® Gel SV kit (GeneAll, Korea)를 이용하여 정제하였으며 정제 방법은 프로토콜을 따랐다. 정제한 산물은 TA cloning을 하였고 plasmid DNA 추출 후 양 방향으로 primer walking 방법을 통해 시퀀싱을 실시하였고 Sequencher (Version 4.9; Gene Codes, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.2.2. Genome walking을 이용한 5'-upstream 조절영역 클로닝

프로모터는 유전자의 전사조절인자(transcription factor)들이 결합하는 염기서열 부위로 전사조절인자는 유전자의 정보를 읽고 RNA 중합효소와 결합하여 전사를 조절하는 역할을 한다. 즉 유전자의 발현 과정을 담당하는 전사인자를 분석하기 위해 genome walking으로 프로모터 영역의 염기서열을 확인하였다. Genomic DNA libraries는 Genome Walker™ Universal Kit (Clontech, USA)을 이용하여 kit의 프로토콜을 따라 제작한 것을 사용하였다. 이는 미꾸라지의 DNA를 *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* 및 *StuI* 네 종류의 restriction enzyme으로 각각 처리한 후 genome walker adaptor를 부착 후 정제를 통해 제작하였다. Genomic DNA libraries를

주형으로 이용하여 genome walking은 첫 번째 exon부터 5' 방향으로 진행하였으며, non-translated exon upstream 쪽으로 충분한 길이(> 2 kb)의 염기서열을 확보하기 위해서 genome walking PCR을 반복 수행 하였다. Isoform별로 반복 수행 횟수는 *ACTA1*은 5 회, *ACTC1*은 2 회 그리고 *ACTA2*는 3 회 반복하였다.

2.3. 생물정보 분석

2.3.1. 분자계통 및 아미노산 서열 특징 분석

미꾸라지의 alpha actin 유전자 isoform들을 비롯하여 현재 GenBank에 등록된 여러 어류 및 사람의 alpha actin 유전자를 대상으로 분자계통 분석을 수행하였다. GenBank에 등록된 alpha actin 유전자들은 isoform의 종류를 확인 가능한 것과 그렇지 않은 것이 있었으며 검색결과 중 partial로 확보할 수 있는 아미노산은 데이터에서 제외시켰으며, 이렇게 정리한 아미노산 서열은 총 71개였다(Table 2). 각 isoform별로 분류 가능한 서열들은 ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) 프로그램을 이용하여 다중 서열 배열 분석(multiple sequence alignment)을 수행하였다.

Table 2. Information on alpha actin genes used for molecular phylogenetic analysis

Species	Gene name	Gene ^a	Accession No.
<i>Carassius auratus</i>	skeletal alpha-actin	<i>acta1</i>	AY690421
<i>Callorhinchus milii</i>	actin, alpha, cardiac muscle 1	<i>ACTC1</i>	NM_001292164
<i>Callorhinchus milii</i>	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	<i>ACTA2.1</i>	JX208181
<i>Callorhinchus milii</i>	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	<i>ACTA2.2</i>	JX207891
<i>Cobitis choii</i>	skeletal alpha-actin 1.1	<i>acta1.1</i>	GU568244
<i>Cobitis choii</i>	skeletal alpha-actin 1.2	<i>acta1.2</i>	GU568245
<i>Coryphaenoides acrolepis</i>	skeletal alpha-actin type-2	<i>acta1.2</i>	AB021650
<i>Coryphaenoides acrolepis</i>	skeletal alpha-actin type-1	<i>acta1.1</i>	AB021649
<i>Coryphaenoides cinereus</i>	skeletal alpha-actin type-2	<i>acta1.2</i>	AB021652
<i>Coryphaenoides cinereus</i>	skeletal alpha-actin type-1	<i>acta1.1</i>	AB021651
<i>Coryphaenoides armatus</i>	skeletal alpha-actin type-2a	<i>acta1.2a</i>	AB086240
<i>Coryphaenoides armatus</i>	skeletal alpha-actin type-2b	<i>acta1.2b</i>	AB086241
<i>Cyprinus carpio</i>	skeletal muscle alpha-actin	<i>ACTA1.1</i>	AY395870
<i>Cyprinus carpio</i>	skeletal alpha-actin	<i>acta1</i>	D50028
<i>Cyprinus carpio</i>	skeletal muscle actin, partial	<i>acta1</i>	AY309091
<i>Clupea harengus</i>	actin, alpha cardiac muscle 1-like	<i>ACTC1</i>	NM_001309832

<i>Clupea harengus</i>	alpha actin	–	GQ455648
<i>Clupea harengus</i>	actin, alpha skeletal muscle 2-like	<i>acta1.2</i>	NM_001309834
<i>Clupea harengus</i>	alpha actin	–	EF495203
<i>Danio rerio</i>	Actin, alpha 1, skeletal muscle	<i>ACTA1</i>	BC045406
<i>Danio rerio</i>	cardiac muscle alpha actin 1	<i>ACTC1</i>	NM_001002066
<i>Danio rerio</i>	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	<i>acta2.2</i>	BC075896
<i>Danio rerio</i>	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	<i>acta2.2</i>	AY398305
<i>Danio rerio</i>	actin, aortic smooth muscle	<i>acta2</i>	NM_212620
<i>Danio rerio</i>	actin, alpha cardiac muscle 1	<i>acta1</i>	NM_131591
<i>Danio rerio</i>	actin, alpha skeletal muscle	<i>actc1</i>	NM_214784
<i>Danio rerio</i>	actin, alpha cardiac muscle 1	<i>actc1.1</i>	NM_001001409
<i>Danio rerio</i>	actin, gamma-enteric smooth muscle	<i>actg1</i>	NM_001017750
<i>Dicentrarchus labrax</i>	alpha actin	–	FJ716131
<i>Epinephelus coioides</i>	alpha actin	–	GU982542
<i>Gadus chalcogrammus</i>	alpha skeletal actin-1	<i>acta1.1</i>	AB073379
<i>Gadus chalcogrammus</i>	alpha skeletal actin-2	<i>acta1.2</i>	AB073380
<i>Gadus morhua</i>	fast skeletal muscle alpha-actin	<i>acta1</i>	AF500273
<i>Hemibarbus mylodon</i>	skeletal alpha-actin	<i>acta1</i>	FJ713567
<i>Hemibarbus mylodon</i>	aortic alpha-actin	<i>acta2</i>	FJ713568

<i>Hemibarbus mylodon</i>	muscle actin type 1	–	FJ713569
<i>Homo sapiens</i>	actin, alpha skeletal muscle	<i>ACTA1</i>	NM_001100
<i>Homo sapiens</i>	alpha-cardiac actin	<i>ACTC1</i>	J00070
<i>Homo sapiens</i>	alpha-actin	<i>ACTA2.1</i>	J05192
<i>Homo sapiens</i>	actin, aortic smooth muscle	<i>ACTA2.2</i>	J05192
<i>Ictalurus punctatus</i>	actin alpha sarcomeric/cardiac	<i>ACTC1</i>	NM_001201266
<i>Ictalurus punctatus</i>	alpha actin	–	AF228714
<i>Larimichthys crocea</i>	Actin, alpha cardiac muscle 1	<i>ACTC1</i>	KQ042511
<i>Nannobranchium regale</i>	alpha actin	–	AF503592
<i>Notothenia coriiceps</i>	alpha actin	<i>ACTA1</i>	AF503590
<i>Oreochromis mossambicus</i>	alpha-actin	<i>ACTA1</i>	AB037866
<i>Oryzias latipes</i>	actin, alpha skeletal muscle	<i>OIMA1</i>	NM_001104806
<i>Oryzias latipes</i>	cardiac muscle actin	<i>ACTC1</i>	AB016259
<i>Pagrus major</i>	skeletal muscle alpha actin 1	<i>ACTA1.1</i>	AB360966
<i>Pagrus major</i>	cardiac muscle alpha actin	<i>ACTC1</i>	AB360965
<i>Pagrus major</i>	skeletal muscle alpha actin 2	<i>ACTA1.2</i>	AB360967
<i>Pleurogrammus azonus</i>	alpha skeletal actin	<i>acta1</i>	AB073381
<i>Rachycentron canadum</i>	alpha actin-3	–	HM754623
<i>Salmo salar</i>	actin alpha 1-1	<i>actc1.1</i>	BT043779

<i>Salmo salar</i>	actin, alpha 1-2	<i>actc1.2</i>	BT043780
<i>Salmo salar</i>	actin, alpha 1-3	<i>actc1.3</i>	BT043781
<i>Salmo trutta</i>	alpha actin	–	AF267496
<i>Salmo trutta</i>	cardiac muscle actin	<i>actc1</i>	AF303985
<i>Scleropages formosus</i>	actin, alpha cardiac muscle 1-like	<i>ACTC1</i>	JAR002004142
<i>Scleropages formosus</i>	actin, alpha cardiac muscle 1-like	<i>ACTC1</i>	JAR002007090
<i>Scomber scombrus</i>	alpha actin	–	EF607093
<i>Siniperca chuatsi</i>	skeletal muscle alpha-actin	<i>ACTA1</i>	AY395872
<i>Sparus aurata</i>	skeletal alpha-actin	<i>ACTA1</i>	AF190473
<i>Sphyraena idiastes</i>	alpha actin	–	AF503593
<i>Takifugu rubripes</i>	alpha actin	<i>actc1.1</i>	U38959
<i>Takifugu rubripes</i>	alpha actin	<i>acta1.2</i>	U38958
<i>Takifugu rubripes</i>	alpha actin	<i>actx</i>	U38962
<i>Takifugu rubripes</i>	alpha actin	<i>actc1.3</i>	U38961
<i>Takifugu rubripes</i>	alpha actin	<i>actc1.2</i>	U38960
<i>Takifugu rubripes</i>	alpha-skeletal actin1	<i>acta1.1</i>	U38850
<i>Trematomus bernacchii</i>	alpha actin	–	AF503589

^a The gene nomenclature not provided.

MEGA program (version 6.0; <http://www.megasoftware.net/>)을 이용하여 분자계통 분석을 하기 위해 multiple sequence alignment 수행 전 output format을 FASTA로 설정하여 수행하였다. Alignment하여 저장된 FASTA 파일은 MEGA program에서 분석하기 위해 이를 MEGA format으로 변환하였다. Alpha actin 유전자의 중간 유연관계를 확인하기 위해 neighbor-joining method를 통하여 검색을 실시하였고(Kim and Nam, 2009) 결과값에 따라 model을 Jones-Taylor-Thornton (JTT)로 선정하였다. 이 때 계통 수(phylogenetic tree)의 topology (clade 형성)의 신뢰도를 평가하기 위해서 bootstrap 분석을 1,000회 반복되도록 실시하였고 gaps/missing data는 삭제 없이 분석하였다.

2.3.2. 프로모터 전사조절 인자 부착 예측 분석

Alpha actin 유전자 isoform들의 프로모터에 존재하는 전사조절 인자 부착 위치들의 분포를 확인하기 위해 BIOBASE의 TRANSFAC (<https://portal.biobase-international.com/>)을 이용하여 alpha actin 유전자 isoform들의 non-translated exon을 기점으로 5' 방향 염기서열 2 kb를 분석하였다. 설정 항목의 analysis method는 match-search for TF binding site를 선택하고, profile (group of matrices)은 척추동물(vertebrate)로 설정하였으며 cut-offs는 minimize false

positive를 기본으로 하여 1차 선별하였다. 이 가운데 종래의 문헌 등을 참고하여 alpha actin 유전자의 기본적인 역할 및 기능과 관련이 있다고 판단되는 인자들, 그리고 alpha actin 유전자의 잠재적인 차등 발현 유발과 관련이 있을 수 있다고 판단되는 인자들을 위주로 재선별하였다. 선정한 인자들은 core score와 matrix score의 점수 중 한 가지는 1.00점을 가지며 나머지 또한 0.99점 이상인 것을 선정하여 isoform별 비교 분석에 이용하였다.

2.4. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 조직별 및 발생 단계별 발현 분석

2.4.1. 실험어, 생체 시료 및 핵산 시료 확보

미꾸라지 alpha actin 유전자 isoform별로 성체의 조직 별 발현 패턴을 조사하기 위해 실험실에서 사육하고 있는 성숙한 암컷 6미와 수컷 6미의 개체를 조직별로 샘플링을 수행하였다. 모든 미꾸라지 개체 (30.1 ± 3.6 g)로부터 뇌, 눈, 지느러미, 아가미, 심장, 장, 신장, 간, 근육, 비장, 피부 및 암컷의 난소와 수컷의 정소 또한 확보하였다. 그리고 시간대별 수정란

및 자어 확보를 위하여 6미의 암컷과 수컷에서 확보한 pooling된 알과 정액을 수정시켰다. 산란을 위한 호르몬 처리 및 인공 산란 유도 기술은 선행 연구를 참고하였다(Kim et al., 1994). 수정란 유지 온도는 25 ± 1 °C로 부화까지 유지하였다. 평균 수정률과 부화율은 각각 98.5 % 및 89.3 %였고, 샘플링을 위하여 약 300 개의 수정란과 100미에서 150미 가량의 자어를 사용하였다. 샘플링은 수정 후 0 (수정 직후), 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 및 24 시간(hours post fertilization, HPF)까지 수행하였고, 부화 직후 0 일부터 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7 일(days post hatching, DPH)까지 자어를 샘플링 하였다.

2.4.2. End-point RT-PCR 분석

End-point RT-PCR은 AccuPower® PCR premix 20 (Bioneer, Korea)를 이용하였고, 내재 대조군(internal control) 유전자로 미꾸라지 18S rRNA를 사용하였다(Kim et al., 2014). RT-PCR은 각 조직에서 순수 분리한 total RNA로부터 역전사(reverse transcription) 반응을 통해 합성한 cDNA를 4배 희석 후 2 μ l를 주형으로 사용하였다. PCR은 95 °C에서 2 분간 pre-denaturation 1회 수행 후 95 °C로 denaturation 20 초, 60 °C로 annealing 20 초, 72 °C로 elongation 20 초의 순환반응을 28회 진행하였다. 이때 사용한 프라이머 쌍은 *ACTA1*의 경우 forward로 qMM

ACTA1 1F, reverse로 qMM ACTA1 1R, *ACTC1*의 경우 forward로 qMM ACTC1 1F, reverse로 qMM ACTC1 1R, *ACTA2*의 forward로 qMM ACTA2 1F, reverse로 qMM ACTA2 1R를 사용하였다. 예상 되는 증폭산물의 크기는 *ACTA1*은 148 bp, *ACTC1*은 151 bp 그리고 *ACTA2*는 163 bp였다. End-point RT-PCR의 결과는 1.5 % agarose gel에 전기영동을 수행하였고, 이를 Gel Doc™ XR (Bio-Rad, USA)의 소프트웨어 프로그램인 Image Lab (version 3.0; Bio-Rad)을 이용하여 분석하였다.

2.4.3. Real-time RT-PCR 분석

Real-time RT-PCR은 LightCycler® 480 II Real-Time PCR System (Roche Life Science, Swiss)과 앞서 end-point PCR에 사용한 cDNA 주형을 이용하여 실시하였다. Multiwell Plate 96를 이용하여 4 배 희석한 cDNA 2 μ l와 3 차 증류수 4 μ l, forward/reverse primer 2 μ l, 그리고 LightCycler® 480 SYBR Green I Master 10 μ l를 혼합하여 PCR 반응 조성물을 제조하였고 이를 실험에 이용하였다. Alpha actin 유전자 isoform별로 사용한 프라이머 쌍은 end-point RT-PCR에 사용한 것과 동일한 것을 사용하였으며, internal control gene으로 사용한 18S rRNA의 경우 forward primer로 qMM 18S 1F와 reverse primer로 qMM 18S

1R를 이용하였다. Real-time RT-PCR 결과는 소프트웨어 프로그램 LightCycler® 480 Software (version 1.5; Roche Life Science, Swiss)으로 실시간 관측하였다. PCR 결과 분석을 위해 2^{-ddCt} 방법으로 조직별 및 발생단계별 샘플의 발현을 비교하였고, Student's *t* test 또는 one-way ANOVA (Duncan's multiple range test)를 이용하여 통계적 유의차를 $P = 0.05$ 수준에서 검증하였다.



III. 결과

3.1. 미꾸라지 ACTA1, ACTC1 및 ACTA2의 cDNA 및 아미노산 서열의 특징

미꾸라지의 *ACTA1*의 cDNA는 5' untranslated region (UTR)이 44 bp, 단백질을 암호화 하고 있는 영역인 ORF (종결코돈 제외)가 1131 bp, 그리고 3' UTR (종결코돈 taa 포함)이 123 bp로 구성되어 있었다. Polyadenylation signal은 poly (A+) tail로부터 - 20 bp에 위치하고 있었고 염기서열은 aataaa로 나타났다(Fig 1). 두 번째로 *ACTC1*의 cDNA는 44 bp의 5' UTR, 1131 bp의 ORF, 그리고 121 bp의 3' UTR 로 구성되어 있었다. 또한 *ACTC1*의 polyadenylation signal은 poly (A+) tail로부터 - 23 bp에 있었으며 염기서열은 aataaa로 나타났다(Fig 2). 마지막으로 *ACTA2*의 cDNA는 5' UTR이 76 bp, ORF가 1131 bp, 3' UTR이 421 bp로 나타났으며, polyadenylation signal은 poly (A+) tail로부터 - 26 bp와 - 10 bp로 두 곳을 확인하였으며 염기서열은 aataaa로 나타났다(Fig 3).

-44 catcagtcttgtgataacaacttgaccaaccagtaaaaccaacc
1 ATGTGTGACGACGAGGAGACTACCGCCCTCGTGTGCGACAACGGC 15
M C D D D E T T A L V C D N G
46 TCTGGCTTGGTCAAGGCTGGATTGCGGAGATGACGCTCCCGT 30
S G L V K A G F A G D D A P R
91 GCTGTCTTCCCTCCATTGTTGGAAGACCCCGTCACCAGGGTGTG 45
A V F P S I V G R P R H Q G V
136 ATGGTCGGTATGGGTGAGAAAGACAGCTACGTAGGTGATGAGGCT 60
M V G M G Q K D S Y V G D E A
181 CAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACTCTGAAGTACCCCATGAGCAC 75
Q S K R G I L T L K Y P I E H
226 GGTATCATCACTAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCAC 90
G I I T N W D D M E K I W H H
271 ACCTTCTACAATGAGTTGCGTGTGGCACCTGAGGAGCACCCAACC 105
T F Y N E L R V A P E E H P T
316 CTGCTCACTGAAGCCCCCTTAACCCCAAGGCAACAGAGAGAAG 120
L L T E A P L N P K A N R E K
361 ATGACACAGATCATGTTTGAACCTTCAACGTCCCTGCCATGTAT 135
M T Q I M F E T F N V P A M Y
406 GTGGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTACGCTCCGGCCGTACC 150
V A I Q A V L S L Y A S G R T
451 ACCGGTATCGTGCTGGACGCCGGTGATGGTGTGACCCACAATGTC 165
T G I V L D A G D G V T H N V
496 CCAAGTCTATGAGGGTTACGCTCTTCTCAGCCATCATGCGTCTG 180
P V Y E G Y A L P H A I M R L
541 GATCTGGCCGGTCCGGATCTTACCGACTATCTGATGAAGATCCTG 195
D L A G R D L T D Y L M K I L
586 ACTGAGAGAGTTACTCTTTCGTGACAACCGCCGAGCGTGAGATC 210
T E R G Y S F V T T A E R E I
631 GTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCTCTGGACTTT 225
V R D I K E K L C Y V A L D F
676 GAGAACGAGATGGCCACCGCCGCTCCTCCTCCTCCCTGGAGAAG 240
E N E M A T A A S S S S L E K
721 AGCTACGAGTTGCCCGACGGTCAGGTATCACCATCGGAAACGAG 256
S Y E L P D G Q V I T I G N E
766 CGTTTCCGTTGCCCCGAGACCCTCTTCCAGCCATCCTTCATTGGT 270
R F R C P E T L F Q P S F I G
811 ATGGAGTCCGCTGGTATCCATGAGACCGCTTACAACAGCATCATG 285
M E S A G I H E T A Y N S I M
856 AAGTGCACATTGACATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACAATGTC 300
K C D I D I R K D L Y A N N V
901 TTGTCCGGTGGTACCACCATGTACCCTGGTATTGCTGACCGTATG 315
L S G G T T M Y P G I A D R M
946 CAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCCCCAGCACCATGAAGATCAAG 330
Q K E I T A L A P S T M K I K
991 ATCATTGCTCCTCCTGAGCGTAAGTACTCTGTCTGGATCGGTGGC 345
I I A P P E R K Y S V W I G G
1036 TCCATCCTGGCTTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCACC 360
S I L A S L S T F Q Q M W I T
1081 AAGCAGGAGTACGATGAGGCTGGTCCATCCATTGTCCACAGGAAG 375
K Q E Y D E A G P S I V H R K
1126 TGCTTCTaaatcatcagcaatatcagcctcagcgtacatttgta 377
C F *
1171 ccgtctcttttactgtatatatcatgtaattgtgtaataaaacag
1216 atcaatgataacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Fig 1. Representative cDNA sequence and deduced amino acid sequences of mud loach ACTA1. Figures on left and right sides indicate number of nucleotides and amino acids, respectively. Coding sequence and amino acids are noted by boldface letters. Asterisk indicates the stop codon (taa). Putative polyadenylation signal (aataaa) is underlined. Three amino acid residues and their codons proposed for the isoform signature motif are boxed.

-42 cagtcttgtgctacaactcggaccacctacaccaaaccaatc
1 ATGTGTGACGACGATGAAACTACCGCCCTCGTGTGCGACAACGGT 15
M C D D D E T T A L V C D N G
46 TCCGGTTTGGTCAAGGCTGGATTGCGCGGTGATGATGCTCCCGT 30
S G L V K A G F A G D D A P R
91 GCTGTCTTTCCCTCTATCGTTGGCAGACCCCGTCACCAGGGTGTG 45
A V F P S I V G R P R H Q G V
136 ATGGTGGGTATGGGTGAGAAGGACAGCTACGTCGGAGATGAGGCT 60
M V G M G Q K D S Y V G D E A
181 CAGAGCAAGAGGGGTATCCTCACTCTTAAATACCCCATCGAGCAC 75
Q S K R G I L T L K Y P I E H
226 GGCATCATACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCACCAC 90
G I I T N W D D M E K I W H H
271 ACTTTCACAAAGAGTTGCGCGTTGCCCCGTGAGGAGCATCCCACC 105
CTGCTCACTGAAGCCCCTCTTAAACCCCAAGCCAACAGGGAGAAG
316 L L T E A P L N P K A N R E K 120
ATGACACAGATCATGTTTGAGACCTTCAACGTTCCCTGCCATGTAC
361 M T Q I M F E T F N V P A M Y 135
GTTGCCATTACAGGCTGTGCTGTCCCTGTACGCCTCTGGCCGTACC
406 V A I Q A V L S L Y A S G R T 150
ACCGGTATTGTGCTGGATTCTGGTGATGGTGTGACCCACAATGTC
451 T G I V L D S G D G V T H N V 165
CCAATCTATGAGGGTTATGCTCTCCTCAGCCATTATGCGTTTG
496 P I Y E G Y A L P H A I M R L 180
541 GATCTGGCCGGTCGTGACCTGACTGACTACCTCATGAAGATCTTG
D L A G R D L T D Y L M K I L 195
586 ACCGAGCGTGGTACTCTTTCGTGACCACAGCCGAGCGTGAGATT
T E R G Y S F V T T A E R E I 210
631 GTGCGTGACATTAAAGAGAAGCTGTGCTACGTGCGTTTGGACTTT
V R D I K E K L C Y V A L D F 225
676 GAGAACGAGATGGCCACCGCTGCCTCTTCTCCTCCCTGGAGAAA
E N E M A T A A S S S S L E K 240
721 TCCTACGAGTTGCCCCGACGACAGGTCATCACCATTGGCAATGAG
S Y E L P D G Q V I T I G N E 256
766 CGTTTCCGCTGCCCGAGACCCTCTTCCAGCCCTTTTCATTGGA
R F R C P E T L F Q P S F I G 270
811 ATGGAGTCTGCTGGTATCCATGAGACTGCCTACAACAGCATTATG
M E S A G I H E T A Y N S I M 285
856 AAGTGCACATTGACATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACAATGTC
K C D I D I R K D L Y A N N V 300
901 CTGTCCGGTGGTACCACCATGTACCCTGGTATTGCTGACCGTATG
L S G G T T M Y P G I A D R M 315
946 CAGAAGGAGATCACTGCTCTCGCCCCTAGCACAATGAAAATCAAG
Q K E I T A L A P S T M K I K 330
991 ATCATTGCTCCCCCTGAGCGTAAGTACTCGGTTTGGATTGGCGGC
I I A P P E R K Y S V W I G G 345
1036 TCTATCCTGGCTTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGC
S I L A S L S T F Q Q M W I S 360
1081 AAGCAGGAGTATGATGAGGCAGGCCCTCCATTGTCCACAGGAAG
K Q E Y D E A G P S I V H R K 375
1126 TGCTTCTaaacttttattaaccaagctaccogtccgtctgagttt
C F * 377
1171 gtactgtgccttttgcgtgtatatacattgtaccogtgtgtaataaaa
1216 gttgtgacgtgctctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Fig 2. Representative cDNA sequence and deduced amino acid sequences of mud loach ACTC1. Figures on left and right sides indicate number of nucleotides and amino acids, respectively. Coding sequence and amino acids are noted by boldface letters. Asterisk indicates the stop codon (taa). Putative polyadenylation signal (aataaa) is underlined. Three amino acid residues and their codons proposed for the isoform signature motif are boxed.

-75 taaatccccccgccccgcccagcactgtca
 -45 ggtgattgtctcctgtttgagtaaggaaggacatccgacttgaaa
 1 ATGTGTGACGACGAAAGAAAGCACCGCCCTGTGTGTGATAATGGA
 M C D D E E S T A L V C D N G 15
 46 TCAGGTCGTGTAAAGCAGGCTTCGCCGGGATGATGCTCCAGA
 S G L C K A G F A G D D A P R 30
 91 GCGGTGTTCCCTCTATAGTGGGTCGACCCAGACACCAGGGAGTG
 A V F P S I V G R P R H Q G V 45
 136 ATGGTGGGAATGGGGCAGAAAGACAGTTATGTTGGTGATGAGGCG
 M V G M G Q K D S Y V G D E A 60
 181 CAAAGCAAAGGGGAATCCTGACCCTCAAGTACCCCATAGAGCAT
 Q S K R G I L T L K Y P I E H 75
 226 GGCATCATCACAACTGGGACGACATGGAAGATCTGGCATCAT
 G I I T N W D D M E K I W H H 90
 271 TCATTCTACAACGAGCTTCGTGTGGCTCCAGAGGAGCATCCGACA
 S F Y N E L R V A P E E H P T 105
 316 TTGCTGACAGAGGCGCTCTTAACCCAAAGCCAACAGGGAGAAG
 L L T E A P L N P K A N R E K 120
 361 ATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAATGTTCCAGCCATGAT
 M T Q I M F E T F N V P A M Y 135
 406 GTAGCTATTCAGCGGTGCTATCCCTCTACGCCCTCTGGTCGCACA
 V A I Q A V L S L Y A S G R T 150
 451 ACAGGCATGTTCTCGACTCTGGTGATGGTGTCACCCACAATGTG
 T G I V L D S G D G V T H N V 165
 496 CCCATTACGAGGGCTACGCTCTTCCCCACGCCATTATGCGTTTG
 P I Y E G Y A L P H A I M R L 180
 541 GATTGCGCGCGGTGATCTCACCAGTACCTCATGAAGATCCTA
 D L A G R D L T D Y L M K I L 195
 586 ACTGAACGAGGCTACTCATTGCTACCACTGCTGAAGAGAAATT
 T E R G Y S F V T T A E R E I 210
 631 GTCCGTGACATCAAGGAGAAGTTGTGCTACGTGCGCTGGACTTT
 V R D I K E K L C Y V A L D F 225
 676 GAGAACGAGATGGCCACCGCTGCCCTCTTCTCTTCCCTGGAGAAG
 E N E M A T A A S S S S L E K 240
 721 AGCTATGAACCTCCCGACGGACAGGTGATCACCATTGGCAACGAG
 S Y E L P D G Q V I T I G N E 256
 766 AGATTTCTGTTGCCCTGAGACGCTCTTCCAGCCATCCTTTATCGGA
 R F R C P E T L F Q P S F I G 270
 811 ATGGAGTCTGCCGGCATCCATGAGACCCTATAACAGCATCATG
 M E S A G I H E T T Y N S I M 285
 856 AAATGCGACATTGACATCCGTAAGGACCTTTATGCCAACACGTG
 K C D I D I R K D L Y A N N V 300
 901 CTGCTGTGGTACCACCATGTACCCCGTATTGCTGATAGAATG
 L S G G T T M Y P G I A D R M 315
 946 CAGAAGGAGATCACTGCTTTGGCACCCAGTACCATGAAGATCAAG
 Q K E I T A L A P S T M K I K 330
 991 ATCATTGCCCCACCTGAGCGCAAGTACTCCGTATGGATCGGCGGG
 I I A P P E R K Y S V W I G G 345
 1036 TCCATCCTGGCGTCCCTTTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATAAGC
 S I L A S L S T F Q Q M W I S 360
 1081 AAGCAGGAGTATGATGAGGCCGGGCCATCCATTGTGCATCGCAAG
 K Q E Y D E A G P S I V H R K 375
 1126 TGCTTTtaagcgccacctctgaccccttctggttccttaattctg
 C F * 377
 1171 ctattgcttcatagcctgtaaactgtgaacgtaccctttaacttcc
 1216 ccctattgtattgtccttgcaactgcccacatctggttgaaatgttt
 1261 agatttgatggtgtcctcaagatatagtggtatttccgatgggtc
 1306 gaaaagcttaatgcgctgtcatgatgaaaagattggggatgatgta
 1351 gcaagactccagagatgagtggtatcttgaaagttttacaatgg
 1396 aggaacaaaagcttatttaaccttaagtgttaaaaaaatcttgagg
 1441 taacactgctgtgggctttcaggcagctctgtatggatatcgtatc
 1486 atatgataatgccatgaaggaaataagctctgcaataataaacag
 1531 caaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Fig 3. Representative cDNA sequence and deduced amino acid sequences of mud loach ACTA2. Figures on left and right sides indicate number of nucleotides and amino acids, respectively. Coding sequence and amino acids are noted by boldface letters. Asterisk indicates the stop codon (taa). Putative polyadenylation signal (aataaa) is underlined. Three amino acid residues and their codons proposed for the isoform signature motif are boxed.

미꾸라지의 *ACTA1*, *ACTC1* 및 *ACTA2*의 아미노산 서열 수는 모두 377개이며, 등전점(pI) 값과 분자량이 비슷한 특징이 있었다. 등전점은 *ACTA1*과 *ACTC1*은 5.22로 동일하고 *ACTA2*는 5.23였으며, 분자량은 *ACTA1*이 41958.9, *ACTC1*은 41974.9 그리고 *ACTA2*는 41994.9로 나타났다. 또한 세 가지 미꾸라지 actin isoform들을 alignment할 경우 8 곳에서 차이가 관찰되었다. 종래의 연구들을 참고하여(Venkatesh et al., 1996; Kusakabe et al., 1999) 앞서 차이가 있는 아미노산 잔기 중 5, 157 및 167번째 아미노산 잔기를 기준으로 미꾸라지 각 isoform의 motif signature를 명명하였다[*ACTA1*의 경우 Asp⁵/Ala¹⁵⁷/Val¹⁶⁷ (D/A/V form), *ACTC1*의 경우 Asp⁵/Ser¹⁵⁷/Ile¹⁶⁷ (D/S/I form), *ACTA2*의 경우 Glu⁵/Ser¹⁵⁷/Ile¹⁶⁷ (E/S/I form)] (Fig 4). 미꾸라지의 alpha actin 유전자의 각 isoform과 다른 어류 및 사람의 orthologue들을 alignment한 결과, 미꾸라지의 *ACTA1*은 잉어목(Cypriniformes) 어류인 잉어(*Cyprinus carpio*), 어름치(*Hemibarbus mylodon*)와 99 % 이상의 상동성을 보였고 잉어목 외의 여러 어류들의 경우에도 97 % 이상의 높은 상동성을 보였다. 상기 미꾸라지 *ACTA1*의 motif로 설정한 DAV signature는 alignment한 모든 어종의 *ACTA1* orthologue에서 공통적으로 나타나지는 않았으며, 잉어목(Cypriniformes)의 잉어(*C. carpio*), 농어목(Perciformes)의 쏘가리(*Siniperca chuatsi*)·참돔(*Pagrus major*)·모잠비크 틸라피아(*Oreochromis mossambicus*) 및 지중해 돔(*Sparus aurata*)에서 미꾸라

ACTA1	MCDDDETALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEA		
ACTC1	...D.T.....V.....		
ACTA2	...E.S.....C.....		
ACTA1	QSKRGILTLYKPIEHGII TNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK		
ACTC1	T.....		
ACTA2	S.....		
ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVLDAEDGVTHNVPVTEGYALPHAIMRL		
ACTC1	S.....I.....		
ACTA2	S.....I.....		
ACTA1	DLAGRDLDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEK		
ACTC1			
ACTA2			
ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDLYANNV		
ACTC1	A.....		
ACTA2	T.....		
ACTA1	LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIT		
ACTC1	S		
ACTA2	S		
ACTA1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	pI	MW
ACTC1		5.22	41958.9
ACTA2		5.22	41974.9
		5.23	41994.9

Fig 4. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach alpha actin isoforms. Dots in ACTC1 and ACTA2 indicate the same amino acids with ACTA1 at respective positions. Three amino acid residues proposed for isoform signature motifs are boxed. Calculated molecular weight (Da) and theoretical pI value for each isoform are also provided.

지와 동일하게 DAV motif가 관찰되었다(Fig 5). *ACTC1*을 alignment 한 결과, 열 종의 어류 중 잉어목(Cypriniformes)의 제브라피쉬(*Danio rerio*), 메기목(Siluriformes)의 차넬메기(*Ictalurus punctatus*), 동갈치목(Beloniformes)의 송사리(*Oryzias latipes*), 복어목(Tetraodontiformes)의 자주복(*Takifugu rubripes*) 그리고 농어목(Perciformes)의 참돔(*P. major*)은 미꾸라지와 동일하게 D/S/I의 아미노산 motif 형태를 보였으며 모든 어류는 미꾸라지와 97 % 이상의 아미노산 상동성이 나타났다(Fig 6). *ACTA2*는 아미노산 alignment 결과 모든 어류에서 98 % 이상의 상동성을 보였고 motif 또한 모두 E/S/I의 형태로 보였다. 함께 alignment 한 어류의 종류로는 잉어목(Cypriniformes)의 어름치(*H. mylodon*)와 제브라피쉬(*D. rerio*), 은상어목(Chimaeriformes)의 통소상어(*Callorhinchus milii*)가 포함되어 있다(Fig 7).

3.2. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 분자계통학적 분석

Alpha actin 유전자의 분자계통학적 분석 결과 본 논문의 분석에서 이용한 사람과 어류의 alpha actin 유전자들은 monophyletic group을 형성하였다(Fig 8). Tree의 시작 지점에서 크게 두 개의 가지로 나뉘는데 한 쪽

*

MM. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
CC. ACTA1. 1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
CC. ACTA1. 2	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
HM. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
OL. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
DR. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
TR. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
SC. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
PM. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
NC. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
OM. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
SA. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK
HS. ACTA1	MCDD D ETTALVCDN S SSLVKAGFAGDDAPRAVFP S IVGRPRHQ S VMVGMGQKD S YVGDEA Q SKRGILTLKYPIEHGIITNMWDM E KIWHHTFYNELRVAP E EHPTLLTEAPLN P KANREK

* *

MM. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
CC. ACTA1. 1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
CC. ACTA1. 2	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
HM. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
OL. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
DR. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
TR. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
SC. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
PM. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
NC. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
OM. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
SA. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK
HS. ACTA1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR T TGIVL D AGDGVTHN V VEGYALPHAIMRDL D LAGRDLTDYLMKILTERGY S FTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATA A SSSSLEK

MM. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
CC. ACTA1. 1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
CC. ACTA1. 2	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
HM. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
OL. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
DR. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
TR. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
SC. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
PM. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
NC. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
OM. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
SA. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT
HS. ACTA1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETL F Q S FIGMESAGIHETAYNSIMCKDIDIRKDLYANNVL S GGTTMPG I ADRM Q KEITALAPSTMKIKI I APPERKY S VMIGGSILASLST F Q Q MMIT

	Identity	pI	MW	Accession #
MM. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	5.22	41958.9	Present study
CC. ACTA1. 1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	99 %	41928.8	AAR04425.1
CC. ACTA1. 2	RQEYDEAG S PIVHR K CF	100 %	41958.9	BAA08755.1
HM. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	99 %	5.23	41972.9
OL. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	99 %	5.23	41958.9
DR. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	99 %	5.23	41982.9
TR. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	98 %	5.22	41976.8
SC. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	99 %	5.22	41944.8
PM. ACTA1	RQEYDEAG S PIVH G KCF	99 %	5.15	41829.7
NC. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	99 %	5.23	41972.9
OM. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	99 %	5.22	41944.8
SA. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	97 %	5.28	41869.6
HS. ACTA1	RQEYDEAG S PIVHR K CF	98 %	5.23	42051.0
				NP_001091.1

Fig 5. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach ACTA1 along with orthologues from teleosts and human. Three amino acid residues proposed for signature motif of mud loach alpha actin isoforms are indicated by asterisks. In the alignment, the residues showing the same amino acids with mud loach ACTA1 are shaded. Species abbreviations are as follow. MM=*Misgurnus mizolepis*, CC=*Cyprinus carpio*, HM= *Hemibarbus mylodon*, OL=*Oryzias lateipes*, DR=*Danio rerio*, TR= *Takifugu rubripes*, SC= *Siniperca chuatsi*, PM= *Pagrus major*, NC=*Notothenia coriiceps*, OM=*Oreochromis mossambicus*, SA=*Sparus aurata*, HS=*Homo sapiens*

MM.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
OL.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
IP.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
DR.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
TR.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
PM.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
LC.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
CH.ACTC1	MCDEETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
CM.ACTC1	MCDEETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
SF.ACTC1	MCDEETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP
HS.ACTC1	MCDD D ETTALVCDNSSLVKAGFAGDDAPRAVFPSSIVGRPRHQGVVMVGQKD SYVGDEAQSKRGILTLKYP

MM.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
OL.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
IP.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
DR.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
TR.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
PM.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
LC.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
CH.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
CM.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
SF.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA
HS.ACTC1	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSIYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYBGYALPHAIMRLDLA

MM.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
OL.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
IP.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
DR.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
TR.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
PM.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
LC.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
CH.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
CM.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
SF.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
HS.ACTC1	SVLEPDGQVITIGNERFRCPETLFPQSPFIGMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT

MM.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	Identity	pI	MM	Accession #
OL.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	100 %	5.22	41974.9	Present study
IP.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	99 %	5.22	41974.9	BAA31946.1
DR.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	99 %	5.22	41988.9	NP_001188195.1
TR.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	100 %	5.22	42004.9	NP_001002066.1
PM.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	100 %	5.22	41974.9	AAC59894.1
LC.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	100 %	5.22	41974.9	BAF80058.1
CH.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	98 %	5.23	42022.9	KKF14002.1
CM.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	97 %	5.18	41975.9	NP_001296761.1
SF.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	98 %	5.24	42017.0	NP_001279093.1
HS.ACTC1	KQEYDEAGPSIVHRKCF	99 %	5.23	42037.0	KFP69064.1
	KQEYDEAGPSIVHRKCF	99 %	5.23	42018.9	AAB59619.1

Fig 6. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach ACTC1 along with orthologues from teleosts and human. Three amino acid residues proposed for signature motif of mud loach alpha actin isoforms are indicated by asterisks. In the alignment, the residues showing the same amino acids with mud loach ACTC1 are shaded.

Species abbreviations are as follow. MM=*Misgurnus mizolepis*, IP=*Ictalurus punctatus*, DR=*Danio rerio*, TR=*Takifugu rubripes*, PM=*Pagrus major*, LC=*Larimichthys crocea*, CH=*Clupea harengus*, CM=*Callorhinchus milii*, SF=*Scleropages formosus*, HS=*Homo sapiens*

MM. ACTA2	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHSFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
HM. ACTA2	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHSFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
DR. ACTA2.1	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHSFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
DR. ACTA2.2	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHSFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
DR. ACTA2.3	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHSFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
CM. ACTA2.1	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKP-IEHGIITNMDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
CM. ACTA2.2	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
HS. ACTA2.1	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHSFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK
HS. ACTA2.2	MCDD E STALVCDNSSLCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSRRGILTLKYPIEHGIITNMDDMEKIWHHSFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK

MM. ACTA2	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
HM. ACTA2	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
DR. ACTA2.1	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
DR. ACTA2.2	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
DR. ACTA2.3	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
CM. ACTA2.1	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
CM. ACTA2.2	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
HS. ACTA2.1	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA
HS. ACTA2.2	MTQIMPEFNFVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHNVP I YEGYALPHAIMRLDLA

MM. ACTA2	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
HM. ACTA2	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
DR. ACTA2.1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
DR. ACTA2.2	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
DR. ACTA2.3	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
CM. ACTA2.1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
CM. ACTA2.2	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
HS. ACTA2.1	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT
HS. ACTA2.2	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDIYANNVLSGGT

MM. ACTA2	RQEYDEAGPSIVHRKCF	Identity	pI	MW	Accession #
HM. ACTA2	RQEYDEAGPSIVHRKCF	100 %	5.22	41994.9	Present study
DR. ACTA2.1	RQEYDEAGPSIVHRKCF	100 %	5.23	41994.9	ACN61632.1
DR. ACTA2.2	RQEYDEAGPSIVHRKCF	99 %	5.23	42055.0	AAH75896.1
DR. ACTA2.3	RQEYDEAGPSIVHRKCF	99 %	5.23	42055.0	NP_997785.1
CM. ACTA2.1	RQEYDEAGPSIVHRKCF	98 %	5.24	41842.8	AFM86495.1
CM. ACTA2.2	RQEYDEAGPSIVHRKCF	98 %	5.24	42034.0	AFM86205.1
HS. ACTA2.1	RQEYDEAGPSIVHRKCF	98 %	5.24	42108.0	AAA51577.1
HS. ACTA2.2	RQEYDEAGPSIVHRKCF	99 %	5.24	42008.9	NP_001135417.1

Fig 7. Multiple amino acid sequence alignment of mud loach ACTA2 along with orthologues from teleosts and human. Three amino acid residues proposed for signature motif of mud loach alpha actin isoforms are indicated by asterisks. In the alignment, the residues showing the same amino acids with mud loach ACTA2 are shaded.

Species abbreviations are as follow. MM=*Misgurnus mizolepis*, HM=*Hemibarbus mylodon*, DR=*Danio rerio*, CM=*Callorhinchus milii*, HS=*Homo sapiens*

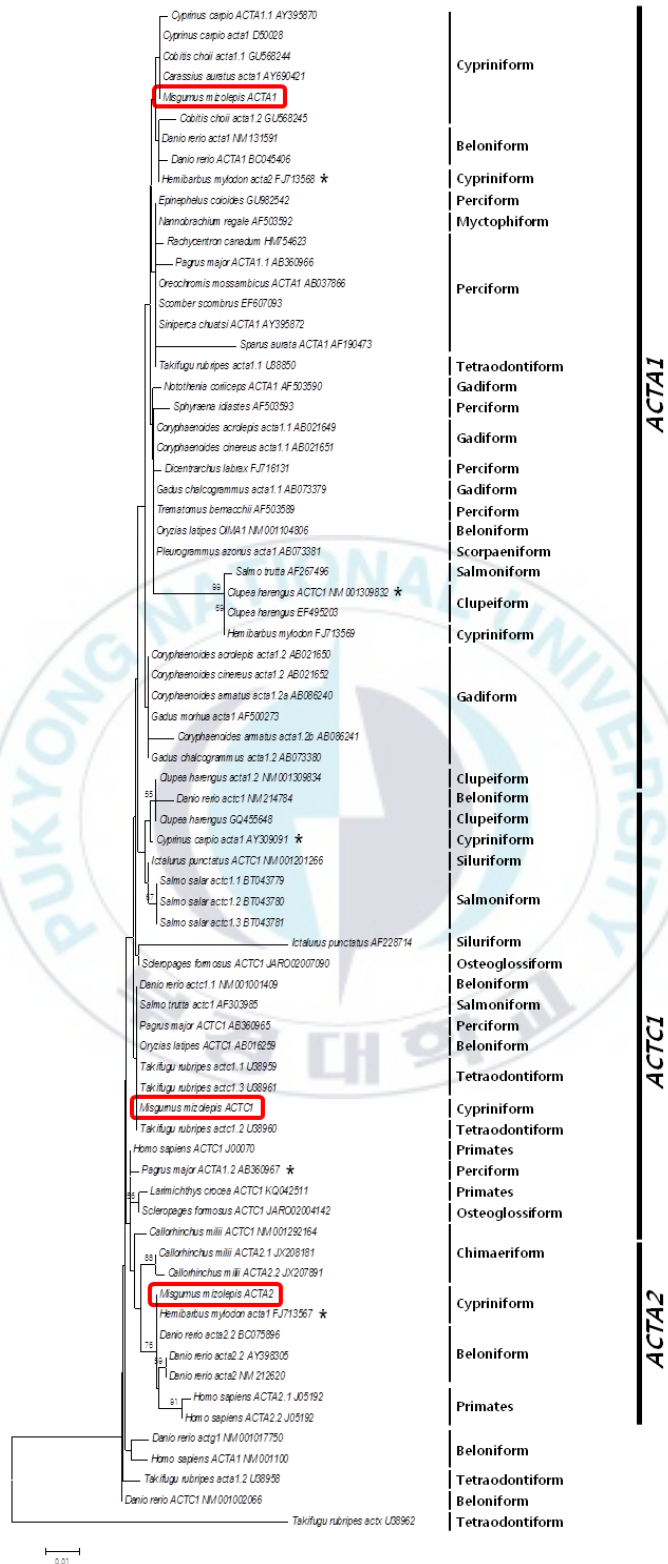


Fig 8. Molecular phylogenic tree of alpha actin amino acid sequences assessed by MEGA program based on neighbor-joining algorithm. Mud loach alpha actin isoforms are boxed. Different isoform of amino acids in any clade are indicated by asterisks. Bootstrap values only higher than 50% are noted on the clades.

은 자주복(*T. rubripes*)의 *actx*가 있고, 나머지 한 쪽은 세 종류의 isoform들이 큰 그룹을 형성하였다. 세 종류의 isoform은 각각의 clade를 이루었고, 각 isoform에는 같은 목(order)의 어류가 묶이는 것도 있었다. *ACTA1*은 잉어목과 대구목 어류, *ACTC1*은 연어목 어류 그리고 *ACTA2*는 은상어목의 어류가 clade를 이루는 것을 볼 수 있고 그 외의 clade에는 여러 종류의 어류가 혼재하여 나타났다. 각각의 isoform clade에는 다른 isoform이 나타나는 경우도 있었는데 *ACTA1*의 clade에는 어름치(*H. mylodon*)의 *ACTA2*와 청어(*Clupea harengus*) *ACTC1*의 아미노산 서열이 하나씩 더 포함되어 있었고, *ACTC1* clade에는 청어(*C. harengus*), 잉어(*C. carpio*), 참돔(*P. major*)의 *ACTA1*이 포함되어 있었다. 그리고 *ACTA2* clade에는 어름치(*H. mylodon*) *ACTA1*의 아미노산 서열 한 가지만 포함되어 있었다. 미꾸라지의 *ACTA1*은 잉어목 어류끼리 형성된 clade에 있었으며 이 그룹에는 잉어(*C. carpio*), 금붕어(*Carassius auratus*), 미호종개(*Cobitis choii*)가 포함되어 있었다. 미꾸라지 *ACTC1*은 잉어목 어류를 제외한 동갈치목의 송사리(*O. latipes*), 연어목의 브라운송어(*Salmo trutta*), 복어목의 자주복(*T. rubripes*) 어류가 같은 clade에 있었으며 목(order)은 다르지만 isoform의 종류는 같은 것으로 나타났다. 미꾸라지 *ACTA2*는 *ACTA1* clade와 같이 잉어목 어류도 포함되어 있지만 은상어목의 통소상어(*C. mili*)와 영장류인 사람(*Homo sapiens*)도 포함되어 있었다.

3.3. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 genomic DNA 구조

미꾸라지의 alpha actin 유전자 isoform들의 genomic DNA 염기서열을 바탕으로 유전자 구조를 결정하였다(Fig 9). 미꾸라지 alpha actin 유전자 isoform들은 모두 1개의 non-translated exon, 8개의 exon, 그리고 8개의 intron으로 구성되어 있었으며, 각 exon-intron boundary 영역에서 gt/ag 규칙을 잘 따르고 있었다. 또한 모든 isoform의 1 번 exon에는 cDNA의 5' UTR 일부 염기서열을 포함하여, 개시코돈 ATG가 *ACTA1*의 21 bp, *ACTC1*는 23 bp 그리고 *ACTA*는 44 bp에 위치하였다. Alpha actin 유전자 isoform들의 exon 길이는 모든 isoform에서 동일하게 나타나는데 그 길이는 1 번 exon이 129 bp (untranslated region 제외), 2 번 exon이 129 bp, 3 번 exon이 111 bp, 4 번 exon이 85 bp, 5 번 exon이 162 bp, 6 번 exon이 192 bp, 7 번 exon이 182 bp 그리고 8 번 exon이 144 bp로 확인되었다. Intron의 길이는 isoform별로 서로 다르게 나타났으며 각 intron의 길이는 Table 3에 나타내었다. 미꾸라지 alpha actin 유전자의 길이를 비교해봤을 때 non-translated exon부터 종결코돈까지 *ACTA1*은 3,011 bp, *ACTC1*은 3,107 bp 그리고 *ACTA2*는 5,636 bp로 확인되었다.

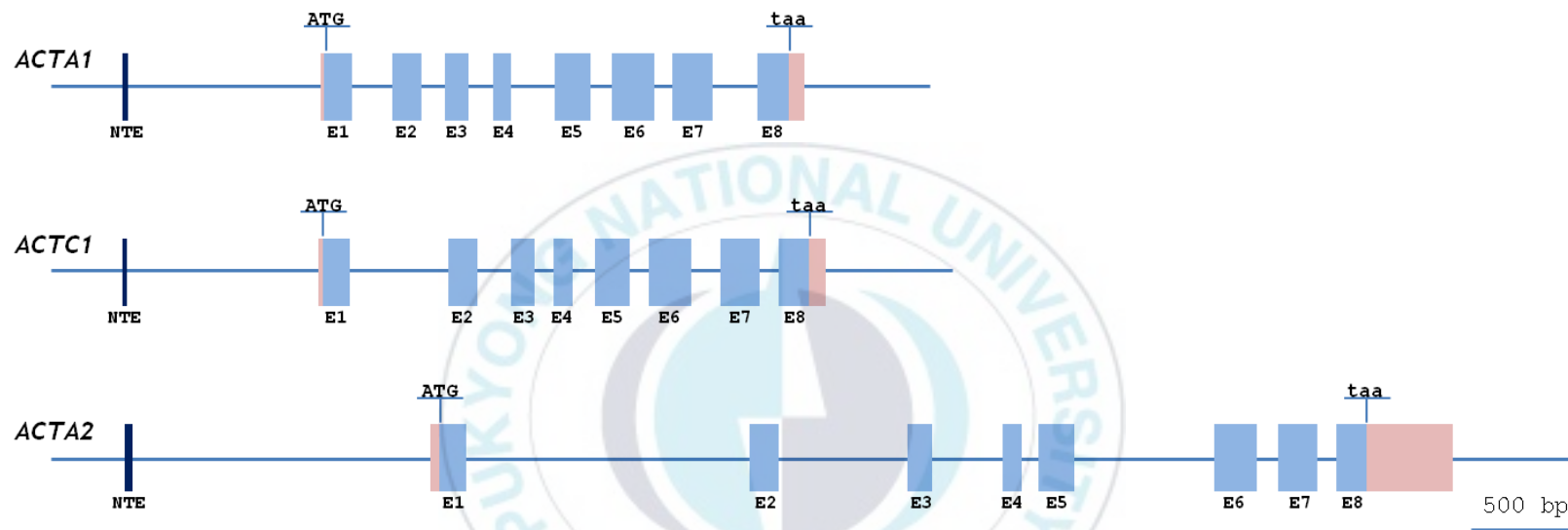


Fig 9. Schematic drawing to show genomic DNA structure of mud loach *ACTA1*, *ACTC1* and *ACTA2* isoforms.

Each isoform possesses non-translated exon (NTE), 8 translated exons (noted by E1 to E8) and 8 introns including one following the NTE. Start codon (ATG) and stop codon (taa) are also indicated.

Table 3. Summarized information on the mud loach
alpha actin isoforms.

		<i>ACTA1</i>	<i>ACTC1</i>	<i>ACTA2</i>
cDNAs	Total length (bp) ^a	1268	1273	1607
	5' UTR (bp)	44	44	76
	3' UTR (bp) ^b	123	121	421
	ORF (bp) ^c	1131	1131	1131
	Stop codon	taa	taa	taa
	Polyadenylation signal	aataaa	aataaa	aataaa
Amino acids	No. amino acids	377	377	377
	Molecular weight	41958.9	41974.9	41994.9
	Theoretical pI	5.22	5.22	5.23
	Amino acid motifs	DAV	DSI	ESI
gDNAs	Non-translated exon (bp)	24	22	33
	Intron I (bp) ^d	876	849	1290
	Exon I (bp) ^e	149 (20)	151 (22)	172 (43)
	Intron II (bp)	182	445	1300
	Exon II (bp)	129	129	129
	Intron III (bp)	99	147	598
	Exon III (bp)	111	111	111
	Intron IV (bp)	99	77	329
	Exon IV (bp)	85	85	85
	Intron V (bp)	211	103	86
	Exon V (bp)	162	162	162
	Intron VI (bp)	87	91	646
	Exon VI (bp)	192	192	192
	Intron VII (bp)	82	138	88
	Exon VII (bp)	182	182	182
	Intron VIII (bp)	197	79	89
	Exon VIII (bp)	144	144	144

^a Excluding poly A(+) tail.

^b Including stop codon and excluding poly A(+) tail.

^c Excluding stop codon.

^d Between non-translated exon and exon I.

^e Exon I composed of untranslated region and translate region. In parentheses, length of untranslated region are indicated.

3.4. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 프로모터 구조 및 관련 전사조절 인자들의 예측

Genome walking을 수행한 결과 *ACTA1*은 3,143 bp, *ACTC1*은 3,020 bp 그리고 *ACTA2*는 2,370 bp의 프로모터 영역 염기서열을 확보하였다. 그러나 동일한 길이의 염기서열에서 전사조절 인자를 비교하기 위해 모든 isoform에서 2 kb의 프로모터만 분석에 이용하였다(Fig 10). 분석한 결과 세 isoform은 모두 *TATA*-less 형태로 확인되었다. *ACTC1*에서 *CCAAT* box는 non-translated exon으로부터 - 915 bp, *ACTA2*의 경우는 - 1,849 bp에 위치했으며, *ACTA1*에서는 동일한 범위 내에 확인되지 않았다. CArG box (CC[W=A/T]₆GG)로 추정되는 부분은 *ACTA1*과 *ACTC1*의 경우 *ccctaaaagg*의 염기서열로 동일하게 나타났고, 위치는 non-translated exon부터 - 912, - 936 bp 지점으로 다르게 나타났다. *ACTA2*는 3 곳의 염기서열이 CArG box로 추정되며, 염기서열은 *ccaatgttgg* (- 643 bp), *ccctataagg* (- 144 bp), *ccttgtttgg* (- 92 bp)가 있었다. 전사인자 중에는 근육 성장과 분화에 관련된 인자들이 있었으며 세 가지 isoform에서 공통으로 나타난 종류는 myocyte enhancer factor-2 (MEF-2)와 MyoD가 있었다. 또한 세포의 발생과 분화, 분열 등에

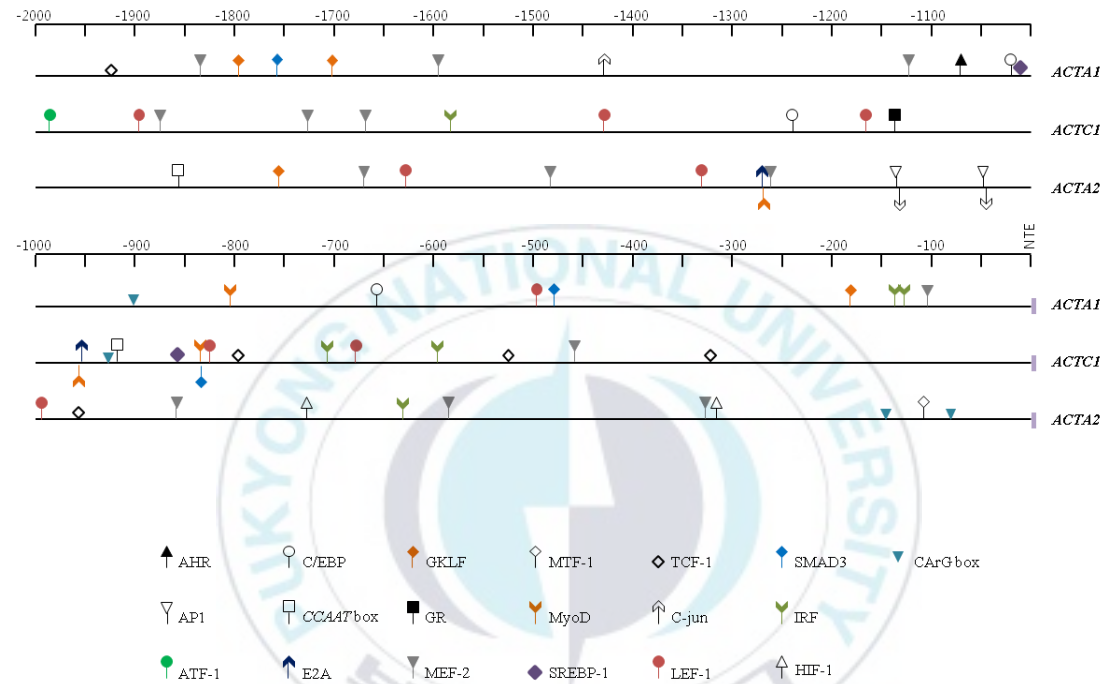


Fig 10. Comparison of putative transcription factor binding motifs in the regulatory regions of mud loach *ACTA1*, *ACTC1* and *ACTA2* genes. The 5'-flanking region (2 kb) upstream from non-translated exon of each isoform was analyzed with TRNASFAC software (<https://portal.biobase-international.com/>).

관련된 인자로는 CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP), kruppel-like factor 4 (GKLF), activating transcription factor 1 (ATF-1) 그리고 mothers against decapentaplegic homolog 3 (SMAD3)가 확인되었고, ATF-1의 경우는 *ACTC1*에만 확인하였다. *ACTA1*과 *ACTC1*에 공통으로 있는 면역관련 인자로는 interferon regulatory factors (IRFs)가 있었고, 이는 바이러스에 감염 시 항단백질을 생산하는 인터페론을 조절한다. 그 외의 *ACTA1*의 면역관련 인자는 aryl hydrocarbon receptor (AHR)과 c-jun이 있었으며, *ACTC1*은 glucocorticoid receptor (GR)을 갖고 있었다. *ACTA2*의 면역관련 인자는 activator protein 1 (AP1), c-jun과 metal regulatory transcription factor 1 (MTF-1)이 있었으며, c-jun은 *ACTA1*에도 동일하게 나타났다. MTF-1은 metallothionein의 발현과 관련된 인자로 중금속의 해독 및 대사와 관계가 있다. 저산소 자극에 반응하는 인자로는 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)가 확인되었는데 이는 *ACTA1*과 *ACTA2*에서 볼 수 있었다. Alpha actin isoform에서 림프구 생성과 관련된 인자도 확인할 수 있었으며, 공통으로 확인된 인자로는 lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), transcription factor 7 (TCF-1) 등이 확인되었고 *ACTC1*과 *ACTA2*에는 E2A도 추가로 확인하였다.

3.5. 미꾸라지 alpha actin isoform 들의 mRNA 조직분포

및 발현 특징

미꾸라지 alpha actin mRNA의 조직분포 양상을 확인하기 위해 암컷과 수컷 개체의 12개 조직을 대상으로 end-point RT-PCR을 우선적으로 수행하였다(Fig 11). *ACTA1*의 end-point RT-PCR 결과 눈, 아가미, 장, 신장, 근육, 비장, 피부 조직에서 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었고 뇌, 지느러미, 심장 그리고 간 조직에서는 다소 연한 밴드를 확인할 수 있었다. *ACTC1*의 end-point RT-PCR 결과 눈, 심장, 장, 근육 및 피부 조직에서 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었으며, 그 외의 조직에서는 상대적으로 낮은 발현을 예상할 수 있었다. *ACTA2*의 end-point RT-PCR 결과, 실험 한 모든 조직에 분포하고 있는 것을 전기영동 밴드로 확인할 수 있었고 조직에 따라 발현의 차이가 다소 나타났다. End-point RT-PCR 결과를 바탕으로 isoform들의 조직별 발현 양상을 정량적으로 비교하기 위해 real-time RT-PCR을 수행하였다(Fig 12). Isoform별로 real-time RT-PCR을 수행하여 얻은 C_p 값은 각 조직별 18S rRNA의 C_p 값에 대해 ΔC_t 값을 구하고, ΔC_t 값이 가장 큰 조직을 calibrator로 하여 $\Delta\Delta C_t$ 값을 구하였다. 상기 방법을 따라 분석한 결과, *ACTA1*은

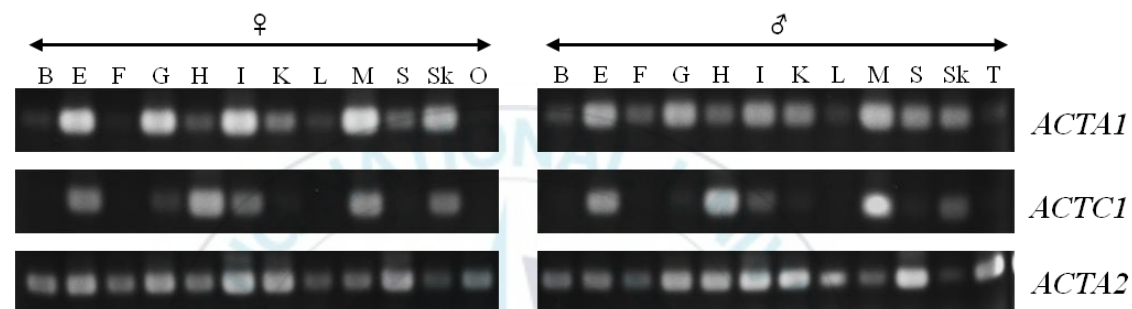
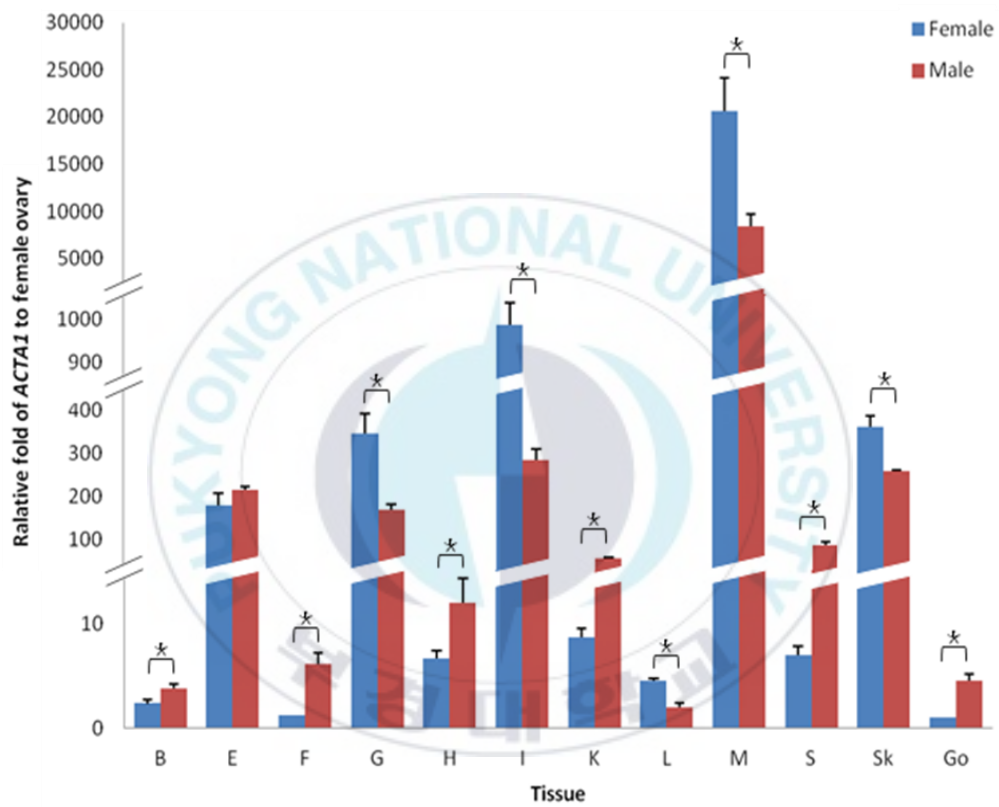
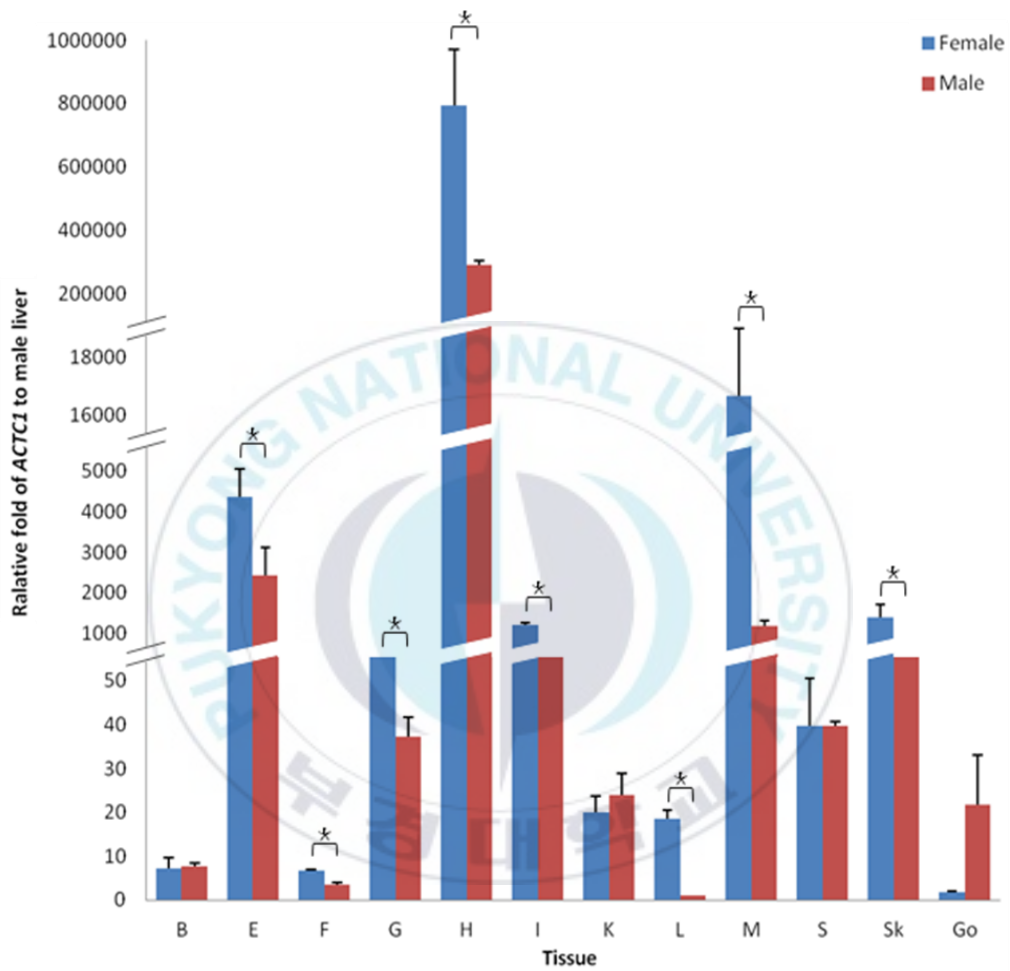


Fig 11. Distribution patterns and expression levels of alpha actin transcripts in female and male mud loach tissues, as assessed by end-point RT-PCR. Abbreviations for tissue types are brain (B), eye (E), fin (F), gill (G), heart (H), intestine (I), kidney (K), liver (L), skeletal muscle (M), spleen (S), skin (Sk), ovary (O) and testis (T).

(A)



(B)



(C)

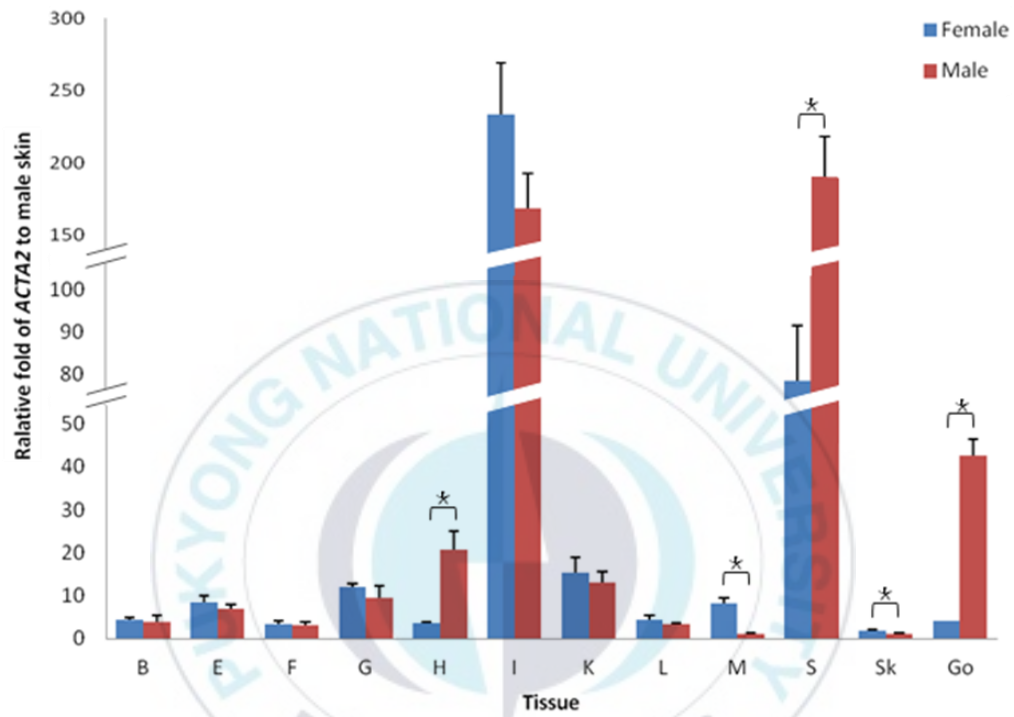


Fig 12. Distribution patterns and expression levels of *ACTA1* (A), *ACTC1* (B) and *ACTA2* (C) transcripts in female and male mud loach tissues, as assessed by real-time RT-PCR. In real-time RT-PCR, Cp value calculated by SYBR Green I. Abbreviations for tissue types are brain (B), eye (E), fin (F), gill (G), heart (H), intestine (I), kidney (K), liver (L), skeletal muscle (M), spleen (S), skin (Sk) and gonad (Go). Asterisks indicate the significant difference in expression level between female and male based on the Student's *t* test ($P < 0.05$).

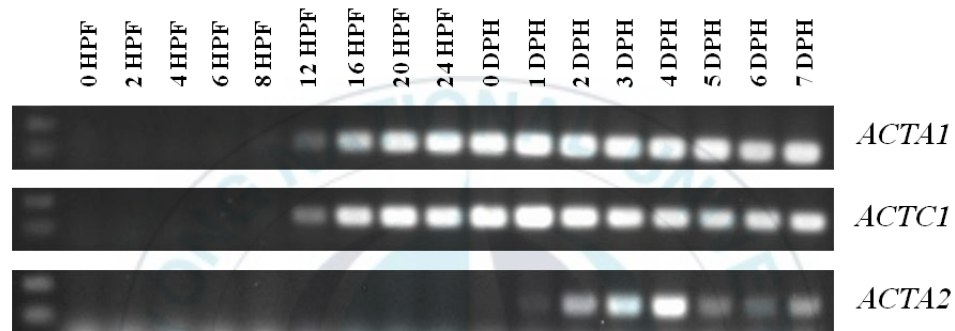
암컷의 난소(*ACTA1*의 calibrator)에 대해 암컷과 수컷 모두 근육 조직에서 가장 높은 발현을 보였으며, 암컷의 근육은 20,664배, 수컷의 근육은 8,361배 높은 값을 나타냈다. 근육 조직을 비롯하여 암컷과 수컷의 조직 간에 발현 차이를 확인할 수 있었고 아가미, 장, 간 그리고 피부 조직은 수컷보다 암컷에서 더 높은 발현을 보였다. 암수에서 근육 조직 다음으로 높은 발현을 보이는 조직으로는 공통적으로 장과 피부로 나타났다. 암컷과 수컷 간의 *ACTA1* 유의성을 검정하기 위해 Student's *t* test (독립표본 *T* 검정)를 수행하였고, 통계처리는 $P < 0.05$ 수준에서 검토했다. 암컷과 수컷 간 발현은 뇌, 지느러미, 아가미, 장, 간, 근육, 비장 그리고 피부 조직에서 유의한 차이가 나타났다. *ACTC1*의 real-time RT-PCR 결과, calibrator는 수컷의 간 조직을 이용하였으며, 수컷의 간에 대해 암컷과 수컷의 심장 조직에서 가장 높은 발현을 보였다. Calibrator를 기준으로 암컷의 심장은 79만 배, 수컷의 심장은 28만 배 이상의 값을 나타냈고, 동일한 조직임에도 불구하고 암수 간의 발현차이가 약 2.8 배 차이가 나타났다. 또한 심장을 비롯하여 눈, 지느러미, 아가미, 장, 간, 근육, 비장 그리고 피부 조직에서 수컷보다 암컷의 *ACTC1*이 더 높은 발현을 하였다. 심장 조직의 다음으로 높은 발현을 하는 조직은 암컷은 근육, 수컷은 눈 조직으로 나타났다. 암수 간 *ACTC1*의 유의성은 Student's *t* test를 수행하여 확인하였으며, 그 결과 눈, 지느러미, 아가미,

심장, 장, 간, 근육 그리고 피부에서 유의한 차이가 나타났다($P < 0.05$). *ACTA2*의 real-time RT-PCR 결과, calibrator는 수컷의 피부 조직을 이용하였으며 가장 높은 fold 값을 보이는 것으로 암컷의 경우는 장과 비장 조직, 수컷은 비장과 장 조직 순으로 나타났다. 암컷과 수컷 사이에 조직별 *ACTA2* 발현을 비교했을 때 수컷의 심장, 비장 그리고 정소 조직의 발현은 암컷보다 높았으며 특히 정소의 *ACTA2*는 난소의 것보다 10.5배 높은 발현이 나타났다. Student's *t* test를 통해 암수 간의 유의성을 검정하였으며, 그 결과 심장, 근육, 비장, 피부, 난소 및 정소 조직에서 유의한 차이를 확인하였다($P < 0.05$).

3.6. 미꾸라지 alpha actin isoform들의 발생단계별 발현 양상 분석

미꾸라지의 발생단계별 alpha actin mRNA 발현 양상을 분석하기 위해 9 단계의 embryo 및 8개의 부화 자어 단계에 대한 end-point RT-PCR을 수행하였다(Fig 13a). 전기영동으로 확인한 결과, 근절(myotome)이 생기기 시작하는 단계인 수정 후 12 시간째(12 HPF)에 *ACTA1*과

(A)



0 HPF: Fertilization
 2 HPF: 32-64 cells
 4 HPF: Blastula stage
 6 HPF: Gastrulation
 8 HPF: Post-gastrula stage
 12 HPF: Optic vesicles 3-4 myotomes
 16 HPF: 20-21 myotomes
 20 HPF: Formation of eye lens, specialization of brain
 HPF: Hours Post Fertilize
 DPH: Days Post Hatching

(B)

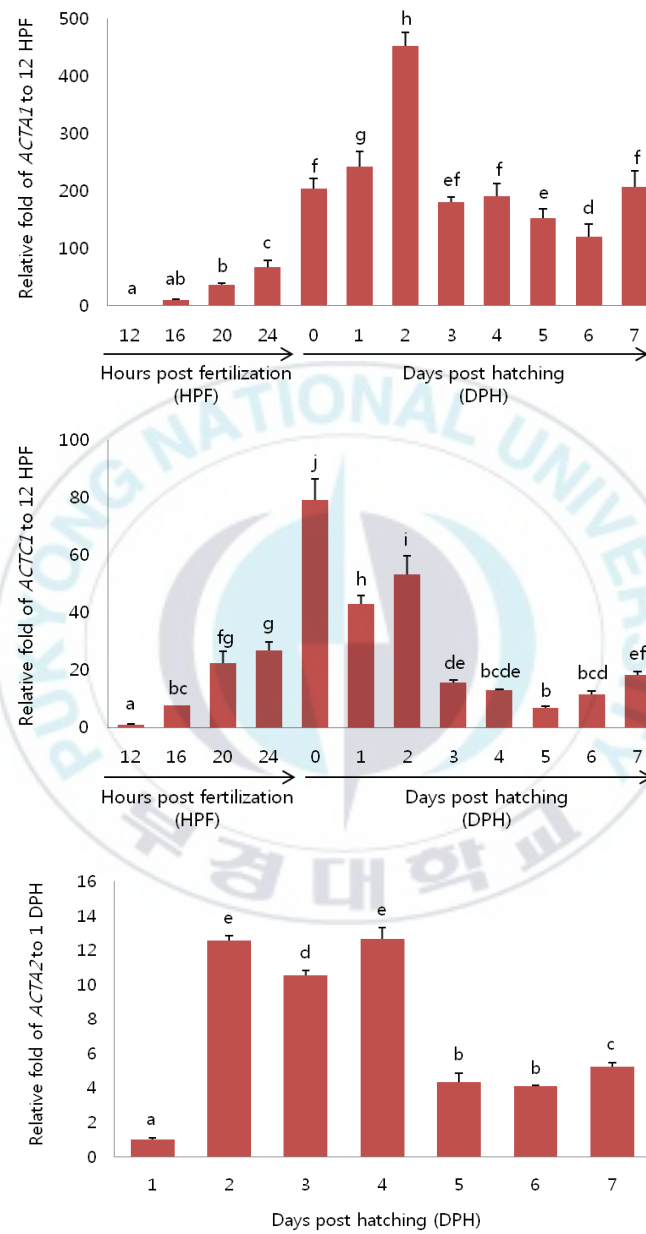


Fig 13. Distribution and expression levels of alpha actin transcripts in developing embryos and early larvae assessed by end-point RT-PCR (A) and real-time RT-PCR (B) assays. In (B), C_p value calculated by SYBR Green I in real-time. Means with different letters are significantly different based on the ANOVA followed by Duncan's multiple range tests at $P < 0.05$.

*ACTC1*의 밴드를 처음 확인할 수 있었으며 *ACTA2*는 부화 후 1 일째(1 DPH)에 밴드를 확인하였다. 첫 밴드가 나타난 시점 이후에는 계속 발현하는 것을 알 수 있었고, 발생단계에 따라 밴드 사이즈의 차이가 다소 나타났다. End-point RT-PCR 실험 결과를 바탕으로 real-time RT-PCR 수행하여 alpha actin isoform들의 발현을 분석 하였다(Fig 13b). Isoform별로 real-time RT-PCR을 수행하여 얻은 C_p 값은 각 발생단계별 18S rRNA의 C_p 값에 대해 ΔC_t 값을 구하고, end-point RT-PCR 결과를 참고하여 최초 발현 시점으로 보는 발생단계를 calibrator로 하여 $\Delta\Delta C_t$ 값을 구하였다. 이때 *ACTA1*과 *ACTC1*의 calibrator는 12 HPF, *ACTA2*의 calibrator는 1 DPH로 설정하였다. *ACTA1*의 실험 결과, 12 HPF부터 발현이 점차 증가하며 2 DPH에 상대적으로 가장 높은 발현이 있었고, 2 DPH의 발현량은 12 HPF의 452배에 해당하였다. 2 DPH 이후에는 다시 감소하여 0 DPH의 발현량 이상으로 증가하지 않았다. 반면 *ACTC1*은 12 HPF부터 증가하여 0 DPH에 가장 높은 발현을 보였고 0 DPH의 발현량은 12 HPF의 79배에 달했다. 또한 *ACTA1*과 유사한 경향으로 3 DPH 이후는 20 HPF보다 더 높은 발현이 나타나지 않는 것으로 나타났다. *ACTA2*는 1 DPH를 기준으로 2 DPH부터 4 DPH까지 10 배 이상 높은 발현을 유지하였다. 5 DPH부터는 다시 발현이 감소하였으며, 2 - 4 DPH 수준으로 증가하지

않았다. Alpha actin isoform들의 발생단계별 통계적 유의성을 검증하기 위해 $P = 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA를 수행하였으며, 평균값이 낮은 그룹부터 알파벳 오름차순으로 그룹화하여 그래프에 표기하였다.



IV. 논의

본 논문에서는 우리나라 하천에 서식하는 대표적인 담수 어류인 미꾸라지를 실험 모델로 사용하여 alpha actin 유전자의 세 종류 isoform들을 분리하고, 유전자 구조를 분석하였으며, 아울러 이들 isoform들의 전사 발현 특징을 조사하였다.

미꾸라지 alpha actin 유전자 isoform들(*ACTA1*, *ACTC1* 및 *ACTA2*)의 cDNA 염기서열을 분석한 결과 모두 377개의 아미노산을 암호화하고 있는 1131 bp의 염기배열을 구성하고 있었고, 아미노산 서열은 서로 97 % 이상의 유사도를 나타내었다. 아미노산 서열은 다른 어류에서도 isoform에 관계없이 대체로 377개로 나타났으며 어류가 아닌 종에서도 동일하거나 비슷한 개수로 나타났다(Hanauer et al., 1983; Reddy et al., 1990; Venkatesh et al., 1996; Moutou et al., 2001; Wang et al., 2008). 미꾸라지 Alpha actin 유전자 isoform들의 아미노산을 alignment 했을 때 5, 157 그리고 167 번째의 아미노산을 기준으로 isoform별 motif를 설정하였으며 이는 동갈치목의 송사리(*O. latipes*) alpha actin과 복어목의 자주복(*F. rubripes*)의 actin isoform을 alignment했을 때 차이가 생기는 부분을 기준으로 하였다(Venkatesh et

al., 1996; Kusakabe et al., 1999) *ACTA1*의 motif는 Asp/Ala/Val (D/A/V form), *ACTC1*는 Asp/Ser/Ile (D/S/I form), *ACTA2*의 경우는 Glu/Ser/Ile (E/S/I form)으로 나타났다. Motif 부분 외에 7, 19, 91, 280, 360번째 아미노산도 차이를 보였지만 이는 다른 종류의 어류에도 적용 가능한지, isoform별로 차이점을 가지는지에 대한 비교가 더 필요하였다. 미꾸라지와 다른 어종들간의 isoform별 아미노산 alignment 결과에서는 DAV, DSI, ESI motif를 모두 따르지 않았지만 *ACTA1*은 DAV form으로 나타난 것이 미꾸라지를 제외한 12개 서열 중 6개, *ACTC1*은 DSI form이 11개 서열 중 5개, *ACTA2*는 ESI form이 8개 전체로 나타났다. 이 결과는 각각의 motif가 모든 어류에 통용하여 쓰이기는 어렵지만 같은 분류의 어류를 비롯한 다양한 개체의 비교가 더 필요할 것으로 나타났다. 또한 *ACTA2*의 ESI form은 alignment하여 비교한 개체 수가 다른 isoform에 비해 적고, 비교한 개체들의 *ACTA2* sub isoform을 함께 비교한 점에서 motif로 적절한지 판단을 내리기 어려웠다. 모든 isoform에서 7, 19, 91, 280 그리고 360번째 아미노산의 일정한 패턴은 찾을 수 없었다.

아미노산을 서열로 분자계통 분석을 한 결과 monophyletic group을 형성하며 유연관계에 있는 종이나 isoform의 종류는 clade를 형성하는 것으로 나타났다. 이는 alpha actin 유전자가 하나의 조상으로부터 분화되었다는 것과 alpha actin 유전자는 종 분화 이전에 isoform의

분화가 먼저 일어났음을 보여준다. Isoform에 따른 clade 형성은 전반적인 분자계통분류가 상당히 높은 정확도를 가지는 형태로 보이나 세분화 되는 과정에서는 bootstrap value가 낮아 정확한 분류가 되지 않음을 확인하였다. 또한 *ACTC1*, *ACTA2*가 포함 된 clade에는 2 종류 이상의 isoform이 하나의 clade에서 나타나기도 했는데 이것은 분자계통분석에 이용한 데이터의 양이 부족하거나 유전자의 분화 및 진화가 진행중인 것으로 이해할 수 있다. 이와 같은 결과를 바탕으로 다른 어종이나 포유류의 아미노산을 포함할 경우 alpha actin은 isoform별로 그룹을 형성할 것이라는 점과 진화 과정에서 isoform의 분화가 어떻게 되는가를 추측 할 수 있다(Kim and Nam, 2009).

미꾸라지의 *ACTA1*, *ACTC1*, *ACTA2*의 gDNA는 공통적으로 1개의 non-translated exon, 8개의 exon과 8개의 intron을 가지며 gt/ag rule이 잘 보존되어 있지만 intron의 길이 차이로 *ACTA1*, *ACTC1*은 *ACTA2*와 약 2배 정도의 길이 차이가 있음을 보였다. 미꾸라지의 alpha actin 유전자 구조는 다른 생물들과 차이를 가지는데 동일한 잉어목 어류인 제브라피시(*D. rerio*) alpha actin의 유전자 구조를 비교해 봤을 때(Bertola et al., 2008) exon은 8개로 동일한 개수를 확인했으나 non-translated exon은 확인할 수 없었으며 다른 어류의 경우나 포유류를 확인했을 때도 non-translated exon은 확인하지 못하였다(Min and Foster, 1990; Miwa et al., 1991; Kim et al., 2000). 또한 상기 종들은

non-translated exon의 유무를 비롯하여 exon과 intron의 수 또한 다양하였다. 동일한 종의 alpha actin isoform별로 구조가 다른 것도 있었는데, 사람의 경우가 그 예로 α -skeletal, α -cardiac은 6개의 exon과 6개의 intron을 가지지만 α -smooth는 exon과 intron이 8개로 확인되었다. 어류의 alpha actin 유전자 구조를 isoform별로 비교한 경우가 없어 미꾸라지의 모든 isoform과 비교할 수는 없었지만 위의 내용을 바탕으로 미꾸라지의 alpha actin 유전자 구조는 다른 종과 차이가 있음을 확인하였다.

미꾸라지 alpha actin 유전자의 전사조절 인자를 분석한 결과 세 isoform은 모두 TATA-less 형태이며 CArG box (CC[W=A/T]₆GG)를 확인할 수 있었다. 또한 *ACTC1*과 *ACTA2*에는 CCAAT를 확인할 수 있었으나 *ACTA1*에서는 확인하지 못하였다. Alpha actin 유전자의 특징을 잘 보여주는 인자로 근육 성장 및 분화에 관련된 인자들을 확인할 수 있었으며 세 가지 isoform에서 공통으로 나타난 종류는 myocyte enhancer factor-2 (MEF-2)와 MyoD가 있었다. MEF-2는 근발생(myogenesis)에 있어서 결정적인 역할을 담당하며 심장, 골격 및 내장 근육 계통의 발생에서 발현한다고 알려져 있다(Black and Olson, 1998; Ju et al., 1999; Funkenstein et al., 2007). 또한 MyoD도 근발생이 일어날 때 발현하며 MEF-2와 함께 협력하여 작동한다(Wang et al., 2001). 앞의 인자들과 유사한 역할로, 세포의 발생과 분화, 분열

등에 관련된 인자로는 *CCAAT*-enhancer-binding proteins (C/EBP), *kruppel*-like factor 4 (GKLF) 그리고 *mothers against decapentaplegic* homolog 3 (SMAD3)가 공통적으로 확인되었고, activating transcription factor 1 (ATF-1)의 경우는 *ACTC1*에만 확인하였다. GKLF는 특히 폐, 장 및 정소 조직 등 smooth muscle의 발생에서 높은 발현을 보이며 다음으로는 심장과 비장, 골격 근육 순으로 높은 발현을 보인다(Adam et al., 2000). 또한 ATF-1은 저산소에 적응하는데 적합한 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)과 결합하여 작용하는 것으로 보아 저산소 스트레스에 의한 적응을 예상할 수 있었다(Kvietikova et al., 1995). *ACTA1*과 *ACTC1*에 공통으로 있는 면역관련 인자로는 interferon regulatory factors (IRFs)가 있었고, 이는 바이러스에 감염 시 항단백질을 생산하는 인터페론을 조절한다. 모든 isoform에서 나타나는 c-jun은 AP1과 함께 JUN gene이라고 불리는 유전자 그룹의 종류로 세포질의 면역과 산화 스트레스, 바이러스에 반응하는 역할을 한다(Rao et al., 1995; Turner et al., 1998). *ACTA2*에서 확인한 metal regulatory transcription factor 1 (MTF-1)은 metallothionein의 발현과 관련된 인자로 중금속의 해독 및 대사와 관계가 있다(Heuchel et al., 1994; Saydam et al., 2002). MTF-1은 카드뮴, 아연, 구리 그리고 은과 같은 중금속에 대해 작용하기 때문에 중금속 노출에 대한 발현을 기대할 수 있을 것이다. 그 외에 면역관련 인자로 *ACTA1*의 aryl hydrocarbon

receptor (AHR), *ACTC1*의 glucocorticoid receptor (GR)은 모두 생체 이물에 대해 면역반응을 하는 인자로 바이러스 등에 작용을 한다. Alpha actin isoform에서 림프구 생성과 관련된 인자도 확인할 수 있었는데, 공통으로 확인된 인자로는 lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), transcription factor 7 (TCF-1) 등이 확인되었고 *ACTC1*과 *ACTA2*에는 E2A도 추가로 확인하였다. 림프구 생성 또한 면역과 관계되며 B-cell 및 T-cell의 생산과 혈관, 림프계 조직에서 식세포 작용을 일으키는 중요한 인자들에 해당한다(O'Riordan and Grosschedl, 1999; Reya et al., 2000; Yu et al., 2012).

미꾸라지 alpha actin 유전자의 조직별 발현 양상과 발생단계별 발현양상을 end-point RT-PCR과 real-time RT-PCR을 통하여 확인하였다. 세 가지 isoform을 암컷과 수컷 조직 12개를 대상으로 비교한 결과, *ACTA1*은 근육, *ACTC1*은 심장, *ACTA2*는 장과 비장에서 가장 높은 발현을 보였다. 이와 같은 결과는 일반적으로 알려진 isoform별 특징을 잘 보여주며 타 어류들과 비슷한 발현 양상을 나타냈다(Venkatesh et al., 1996; Kusakabe et al., 1999; Glenn et al., 2012). 미꾸라지의 *ACTA1*은 근육 조직에 이어 장과 피부 조직에 높은 발현을 나타냈는데, 장은 smooth muscle에 해당하지만 muscular wall이 장 표면에 분포하고 있으며, 피부 또한 근육 조직과 밀접한 위치에 있기

때문인 것으로 추측할 수 있었다. *ACTC1*은 심장 조직에 이어 근육과 눈 조직에서 높은 발현을 나타냈으며, *ACTA2*는 수컷의 정소와 심장 조직에서 높은 발현을 보였다. Alpha actin의 isoform들은 암수 간에 유사한 발현을 하는 조직도 있지만, 매우 상이한 발현 차이를 나타내는 조직이 있는 것도 확인하였다. 이는 성별에 의한 발현 차이가 있음을 전제로 하여 연구가 더 필요한 점을 시사하였다. 미꾸라지의 발생단계별 mRNA 발현을 비교한 결과, *ACTA1*과 *ACTC1*은 수정 후 12 시간째부터 점차 발현하였고 이 때는 근절(myotome)이 형성되기 시작하는 시점에 해당한다(Kim et al., 1987). 근절이 생성되는 것은 골격 근육이 형성되는 것이며 비슷한 시간대에 심장이 형성되고 혈액이 흐르는 것 또한 현미경을 통해 확인할 수 있었다. *ACTA1*과 *ACTC1*은 공통적으로 부화 후 3 일 이후부터는 부화 후 2 일째까지 보이는 상승세가 나타나지 않으며 큰 변화 없이 7 일째까지 유지되었다. 반면 *ACTA2*는 embryo 시기에는 발현을 보이지 않다가 부화 후에 점차 발현하는 것으로 나타났고 부화 후 4 일째까지 높은 발현을 보이다가 5 일째에 발현량이 절반 가량으로 감소하는 양상을 보였다. 이런 양상을 보이는 까닭은 척추동물인 미꾸라지가 발생학에서 후구동물의 특징을 가지기 때문에, 장과 같은 평활근(smooth muscle) 조직이 골격 근육(skeletal muscle)보다 늦게 발생이 진행되는 것으로 추측한다(Virta and Cooper, 2009).

본 연구를 통하여 미꾸라지에서 발현하는 세 종류의 alpha actin 구조와

특징을 조사 및 분석하여 보았다. 이 연구를 토대로 하여 앞으로 더욱 다양한 종에서 alpha actin 유전자의 구조와 전사조절 인자의 분석이 필요하며 이어서 발생학적 분석, 자극 조건에 따른 유전자의 발현 및 다양한 연구 분야의 바탕자료로 제시되었다고 기대된다.



국문 요약

Actin은 진핵 생물의 세포 기능에 있어 cell division이나 migration, transcriptional regulation, cell shape regulation 등 넓은 범위의 역할을 한다. 본 연구는 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)로부터 alpha actin (α -actin) 유전자의 3가지 isoform에 대한 유전자 구조와 발현 특징을 분석하였다. 분리된 α -actin isoform의 종류는 α -skeletal muscle (*ACTA1*), α -smooth muscle (*ACTA2*), α -cardiac (*ACTC1*)으로 각 isoform은 공통적으로 아미노산 서열이 높은 상동성을 보이며 genomic 유전자는 모두 1개의 non-translated exon, 8개의 exon과 8개의 intron으로 이루어져 있었고, gt/ag rule이 잘 보존되어 있었다. 모든 isoform의 exon은 각각의 길이가 같으나 intron의 길이가 다양하였다. α -actin 유전자의 전자조절 인자를 조사한 결과 모든 isoform은 TATA-less 형태로 CCAAT box, CArG box를 확인하였다. 그 외에 근육의 생성과 분열에 관계되는 MEF-2와 MyoD, 세포 분열 및 분화에 관계 있는 C/EBP, GKLf, SMAD3, ATF-1이 있었다. 면역 및 스트레스 관련 인자로써는 공통적으로 IRFs가 있고 c-jun, AP1, AHR, GR, MTF-1, HIF-1이 있었다. 림프구 형성과 관계 있는 인자도 확인할 수 있었으며

그 종류에는 LEF-1, SREBP-1, TCF-1, E2A가 있었다. α -actin 유전자의 isoform별 조직 내 mRNA 발현율을 조사한 결과, *ACTA1*은 근육 조직, *ACTA2*는 장과 비장 조직, *ACTC1*은 심장 조직에서 가장 높은 발현을 보였다. 이는 골격 근육, 근육 섬유 모세포, 근육원섬유 마디 형성에 관여하는 각 α -actin isoform의 특징을 잘 보여주었다. 또한 α -actin 유전자의 isoform별 발생단계에 따른 mRNA 발현율을 조사한 결과, *ACTA1*과 *ACTA1*은 발생 단계에서 근절이 생기는 시점부터 발현이 증가하며 부화 후 3 일째부터는 급감하는 양상을 보였다. 이와 달리 *ACTA2*는 부화 이전에는 발현하지 않고 부화 직후부터 발현하여 부화 후 4 일차까지 높은 발현을 유지하다가 5 일차에 감소하는 양상을 보였다.

감사의 글

연구 분야에 흥미를 느끼고 실험실에 들어 온지도 벌써 2 년이라는 시간이 흘렀습니다. 그 동안 여러 종류의 생물을 다루고 연구할 수 있었고, 더불어 논문이 나오기까지 많은 분들의 도움과 격려가 있었습니다. 그 분들께 모두 감사의 인사를 드리고 싶습니다. 우선 저를 가르치고 이끌어주신 선생님인 남윤권 교수님께 가장 감사합니다. 저의 서툴고 부족한 점은 항상 바로잡아 주셨고 미처 깨닫지 못한 것은 다시금 생각하도록 지도해 주셔서 감사합니다. 또한 연구를 위해 다양한 지식을 알려주시고 조언을 아끼지 않으신 김동수 교수님, 공승표 교수님께 진심으로 감사합니다. 더불어 우리 학과의 교수님들께도 감사의 말씀을 올립니다.

논문의 주제를 설정하고 실험의 이해를 위해 많은 도움을 주신 김이경 교수님, 실험을 하면서 가장 가까이 지켜보고 조언을 해 준 상윤 선배님, 새로운 아이디어를 제시해 주거나 부족한 점을 체크해 준 David 선배와 민수 선배님, 바쁜 와중에 많은 도움을 준 소정 후배님, 은정 후배님에게도 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 박철홍 선배님, 김연경 선배님, 정효선 선배님, 류준형 선배님께도 감사합니다. 쓴 소리를 해도 마음에 담아두지 않고 편한 선배로 대해 준 학부생 후배들과 학부, 석사

생활을 함께 한 동기들도 감사합니다. 학교 생활을 하는 데에는 교수님과 선후배들 외에도 버팀목이자 든든한 후원자가 있었습니다. 그 중 저의 가장 큰 버팀목인 부모님과 남동생 용재에게 사랑하고 감사한다고 전하고 싶습니다. 가끔 지치고 외로울 때, 언제 찾더라도 반겨주던 song wave 가족들, 우리 동기들, 후배 회수도 감사합니다.

실험을 하고 논문을 완성하며 스스로 부족한 부분이 무엇인지, 배우고 많이 성장한 점이 무엇인지도 알게 되었습니다. 많이 부족하지만 석사 과정의 결실인 이 논문을 모두에게 바치겠습니다.



참고 문헌

- Adam PJ, Regan CP, Hautmann MB, Owens GK (2000) Positive- and negative-acting Krüppel-like transcription factors bind a transforming growth factor β control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker *sm22 α* in vivo. The Journal of Biological Chemistry, 275:37798-37806
- Arnone MI, Davidson EH (1997) The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. Development, 124:1851-1864
- Bertola LD, Ott EB, Griepsma S, Vonk FJ, Bagowski CP (2008) Developmental expression of the alpha-skeletal actin gene. BMC Evolutionary Biology, 8:1-12
- Black BL, Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 14:167-196
- Blank RS, McQuinn TC, Yin KC, Thompson M, Takeyasu K, Schwartz RJ, Owens GK (1992) Elements of the smooth muscle α -

actin promoter required in cis for transcriptional activation in smooth muscle. The Journal of Biological Chemistry, 267:984–989

Carlini DB, Reece KS, Graves JE (2000) Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (mollusca: cephalopoda). Molecular and Cellular Biology, 17:1353–1370

Carroll SL, Bergsma DJ, Schwartz RJ (1986) Structure and complete nucleotide sequence of the chicken α -smooth muscle (aortic) actin gene. The Journal of Biological Chemistry, 261:8965–8976

Chang KS, Zimmer WE JR., Bergsma DJ, Dodgson JB, Schwartz RJ (1984) Isolation and characterization of six different chicken actin genes. Molecular and Cellular Biology, 4:2498–2508

Cho YS, Kim BS, Kim DS, Nam YK (2012) Modulation of warm-temperature-acclimation-associated 65-kDa protein genes (*Wap65-1* and *Wap65-2*) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments. Fish and Shellfish Immunology, 32:662–669

Doherty GJ, McMahon HT (2008) Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. Annual Review of Biophysics, 37:65–95

Frech K, Quandt K, Werner T (1998) Muscle actin genes: a first step

- towards computational classification of tissue specific promoters. In *Silico Biology*, 1:29–38
- Funkenstein B, Skopal T, Rapoport B, Rebhan Y, Du SJ, Radaelli G (2007) Characterization and functional analysis of the 5' flanking region of myosin light chain-2 gene expressed in white muscle of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2:187–199
- Glenn NO, McKane M, Kohli V, Wen KK, Rubenstein PA, Bartman T, Sumanasa S (2012) The W-Loop of alpha-cardiac actin is critical for heart function and endocardial cushion morphogenesis in zebrafish. *Molecular and Cellular Biology*, 32:3527–3540
- Gunning PW, Ferguson V, Brennan KJ, Hardeman EC (2000) α -Skeletal actin induces a subset of muscle genes independently of muscle differentiation and withdrawal from the cell cycle. *Journal of Cell Science*, 114:513–524
- Hall TE, Cole NJ, Johnston IA (2003) Temperature and the expression of seven muscle-specific protein genes during embryogenesis in the Atlantic cod *Gadus morhua* L. *The Journal of Experimental Biology*, 206:3187–3200
- Hanauer A, Levin M, Heilig R, Daegelen D, Kahn A, Mandell JL (1983)

- Isolation and characterization of cDNA clones for human skeletal muscle α actin. Nucleic Acids Research, 11:3503–3516
- Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W (1994) The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. The EMBO Journal, 13:2870–2875
- Johnston IA, Bower NI, Macqueen DJ (2011) Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. The Journal of Experimental Biology, 214:1617–1628
- Ju B, Xu Y, He J, Liao J, Yan T, Hew CL, Lam TJ, Gong Z (1999) Faithful expression of green fluorescent protein(GFP) in transgenic zebrafish embryos under control of zebrafish gene promoters. Developmental Genetics, 25:158–167
- Karns LR, Kariya K, Simpson PC (1995) M-CAT, CarG, and Sp1 elements are required for α_1 -adrenergic induction of the skeletal α -actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. The Journal of Biological Chemistry, 270:410–417
- Kim DS, Jo JY, Lee TY (1994) Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development

and growth. *Aquaculture*, 120:263–270

Kim JA, Jonsson CB, Calderone T, Unguez GA (2004) Transcription of MyoD and myogenin in the non-contractile electrogenic cells of the weakly electric fish, *Sternopygus macrurus*. *Development Genes and Evolution*, 214:380–392

Kim KY, Nam YK (2009) Isolation and molecular phylogeny of three muscle actin isoforms of an endangered freshwater fish species *Hemibarbus mylodon* (Cypriniforms; Cyprinidae). *Journal of Aquaculture*, 22:83–91

Kim S, Karsi A, Dunham RA, Liu Z (2000) The skeletal muscle α -actin gene of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and its association with piscine specific SINE elements. *Gene*, 252:173–181

Kim YK, Cho YS, Lee SY, Nam YK (2014) Genomic organization and isoform-dependent expression patterns of *Wap65* genes in various tissues during immune challenges in the mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 17:471–478

Kim YU, Park YS, Kim DS (1987) Development of eggs, larvae and juveniles of loach, *Misgurnus mizolepis* GÜNTHER. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20:16–23

- Koumans JTM, Akster HA, Booms GHR, Osse JWM (1993) Growth of carp (*Cyprinus carpio*) white axial muscle; hyperplasia and hypertrophy in relation to the myonucleus/sarcoplasm ratio and the occurrence of different subclasses of myogenic cells. *Journal of Fish Biology*, 43:69–80
- Kumar MS, Hendrix JA, Daniel Johnson A, Owens GK (2003) Smooth muscle α -actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix–loop–helix proteins. *Circulation Research*, 92:840–847
- Kusakabe R, Kusakabe T, Suzuki N (1999) In vivo analysis of two striated muscle actin promoters reveals combinations of multiple regulatory modules required for skeletal and cardiac muscle–specific gene expression. *The International Journal of Developmental Biology*, 43:541–554
- Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M (1995) The transcription factors ATF–1 and CREB–1 bind constitutively to the hypoxia–inducible factor–1 (HIF–1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Research*, 23:4542–4550
- Lee SY, Kim DS, Nam YK (2012) Genomic organization, intronic duplications, and promoter characteristics of the fast skeletal myosin light chain–2 gene (*mlc2f*) from Javanese ricefish *Oryzias javanicus*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 15:325–

- Lee SY, Kim DS, Nam YK (2012) Molecular characterization of cytoskeletal beta-actin and its promoter in the Javanese ricefish *Oryzias javanicus*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 15:317–324
- Lee SY, Kim DS, Nam YK (2013) Molecular characterization of fast skeletal muscle-specific myosin light chain 2 gene (*mlc2f*) in marine medaka *Oryzias dancena*. *Genes and Genomics*, 35:289–303
- Lee SY, Kim KH, Nam YK (2009) Molecular characterization of rockbream (*Oplegnathus fasciatus*) cytoskeletal β -actin gene and its 5'-upstream regulatory region. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 12:90–97
- Min BH, Foster DN (1990) The 5' -flanking region of the mouse vascular smooth muscle α -actin gene contains evolutionarily conserved sequence motifs within a functional promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:16667–16675
- Minty A, Blau H, Kedes L (1986) Two-level regulation of cardiac actin gene transcription: muscle-specific modulating factors can accumulate before gene activation. *Molecular and Cellular Biology*, 6:2137–2148
- Minty A, Kedes L (1986) Upstream regions of the human cardiac

actin gene that modulate its transcription in muscle cells:
presence of an evolutionarily conserved repeated motif.
Molecular and Cellular Biology, 6:2125–2136

Miwa T, Manabe Y, Kurokawa K, Kamada S, Kanda N, Bruns G,
Ueyama H, Kakunaga T (1991) Structure, chromosome
location, and expression of the human smooth muscle (enteric
type) γ -actin gene: evolution of six human actin genes.
Molecular and Cellular Biology, 11:3296–3306

Morita T (2000) Amino acid sequences of α -skeletal muscle actin
isoforms in two species of rattail fish, *Coryphaenoides*
acrolepis and *Coryphaenoides cinereus*. Fisheries Science,
66:1150–1157

Moutou KA, Socorro S, Power DM, Mamuris Z, Canario AVM (2001)
Molecular cloning and sequence of gilthead sea bream
(*Sparus aurata*) α -skeletal actin: tissue and developmental
expression. Comparative Biochemistry and Physiology Part B,
130:13–21

Muscat GE, Gustafson TA, Kedes L (1988) A common factor
regulates skeletal and cardiac α -actin gene transcription in
muscle. Molecular and Cellular Biology, 8:4120–4133

Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC (2000) Alpha-smooth muscle actin
expression in cultured lens epithelial cells. Investigative

Ophthalmology and Visual Science, 41:1122–1129

Nam YK, Choi GC, Park DJ, Kim DS (2001a) Survival and growth of induced tetraploid mud loach. *Aquaculture International*, 9:61–71

Nam YK, Cho YS, Cho HJ, Kim DS (2002) Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture*, 209:257–270

Nam YK, Cho YS, Lee SY, Kim BS, Kim DS (2011) Molecular characterization of hepcidin gene from mud loach (*Misgurnus mizolepis*; Cypriniformes). *Fish and Shellfish Immunology*, 31:1251–1258

Nam YK, Noh CH, Kim DS (1999) Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture*, 172:229–245

Nam YK, Noh JK, Cho YS, Cho HJ, Cho, Kim CG, Kim DS (2001b) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research*, 10:353–362

Nam YK, Park IS, Kim DS (2004) Triploid hybridization of fast-growing transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis* male to

- cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus* female: the first performance study on growth and reproduction of transgenic polyploid hybrid fish. *Aquaculture*, 231:559–572
- O’Riordan M, Grosschedl R (1999) Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*, 11:21–31
- Park IS, Nam YK, Kim DS (2006) Growth performance, morphometric traits and gonad development of induced reciprocal diploid and triploid hybrids between the mud loach (*Misgurnus mizolepis* Günther) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus* Cantor). *Aquaculture Research*, 37:1246–1253
- Perrin BJ, Ervasti JM (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton*, 67:630–634
- Rao GN, Alexander RW, Runge MS (1995) Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 96:842–847
- Ream RA, Johns GC, Somero GN (2003) Base compositions of genes

encoding α -actin and lactate dehydrogenase-a from differently adapted vertebrates show no temperature-adaptive variation in G + C content. *Molecular Biology and Evolution*, 20:105–110

Reddy S, Ozgur K, Lu M, Chang W, Mohan SR, Kumar CC, Ruley HE (1990) Structure of the human smooth muscle α -actin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:1683–1687

Reya T, O’Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R (2000) Wnt Signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*, 13:15–24

Riggs KJ, Merrell KT, Wilson G, Calame K (1991) Common factor 1 is a transcriptional activator which binds in the *c-myc* promoter, the skeletal α -actin promoter, and the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Molecular and Cellular Biology*, 11:1765–1769

Sartorelli V, Hong NA, Bishoprics NH, Kedes L (1992) Myocardial activation of the human cardiac α -actin promoter by helix-loop-helix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:4047–4051

Sartorelli V, Webster KA, Kedes L (1990) Muscle-specific

- expression of the cardiac α -actin gene requires MyoD1, CArG-box binding factor, and Spl. *Genes and Development*, 4:1811–1822
- Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH (2002) Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:20438–20445
- Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY (1998) Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30:1789–1801
- Venkatesh B, Tay BH, Elgar G, Brenner S (1996) Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *Journal of Molecular Biology*, 259:655–665
- Virta VC, Cooper MS (2009) Ontogeny and phylogeny of the yolk extension in embryonic cypriniform fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 312B:196–223
- Wang DZ, Valdez MR, McAnally J, Richardson J, Olson EN (2001) The *Mef2c* gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development.

Development, 128:4623–4633

Wang Z, Wu Z, Jian J, Lu Y (2008) Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850). Marine Genomics, 1:63–67

Watabe S (1999) Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. Journal of Fish Biology, 55:18–18

Yu S, Zhou X, Steinke FC, Liu C, Chen SC, Zagorodna O, Jing X, Yokota Y, Meyerholz DK, Mullighan CG, Knudson CM, Zhao DM, Xue HH (2012) The TCF-1 and LEF-1 transcription factors have cooperative and opposing roles in T cell development and malignancy. Immunity, 37:813–826