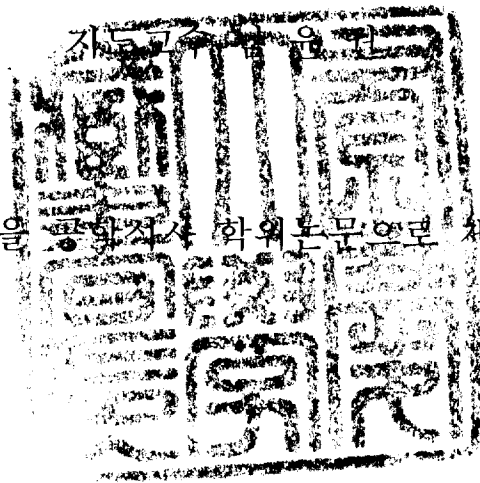


공학석사 학위논문

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)
metallothionein 유전자의 분리 및 중금속
노출에 의한 유도 발현 분석

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.



2005년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

해양생명공학 협동과정

하 은 미

하은미의 공학석사 학위논문을 인준함

2005년 8월 31일

주 심 이 학 박 사 김 성 구



위 원 이 학 박 사 김 기 홍



위 원 수 산 학 박 사 남 윤 권



Molecular characterization of mud loach (*Misgurnus mizolepis*) metallothionein gene and expression study during exposure to heavy metals.

Eun Mi Ha

*Interdisciplinary Program of Marine Biotechnology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

A metallothionein (MT) gene and its promoter sequence were isolated from mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and the stimulated expression during experimental acute exposures to various heavy metals including cadmium (Cd), zinc (Zn) and copper (Cu) were characterized. The full-length mud loach MT cDNA was comprised of 79 bp 5' untranslated region (UTR), 183 bp of a single open reading frame (ORF) encoding 60 amino acids and 259 bp of 3'-UTR including poly (A) tail. Mud loach MT shared significant homology with orthologues from other vertebrates with well-conserved features of vertebrate MTs like a high content of cysteine (33%). The genomic ORF sequence of mud MT isolated by PCR comprised of three exons intervened by two introns. Putative regulatory sequence of mud loach MT contained putative MREs, CCAAT box and TATA box. Evolutionary

relationships based on molecular phylogenetic analysis also represent the general agreement with known taxonomic positions. Expression of mud loach MT was significantly elevated during the heavy metal-exposures. The most potent inducer for the MT expression in mud loach liver was copper. The amount of stimulation was dependent upon the dose levels of metal ions (0-10 μ M) and duration of exposures (up to 21 days) in general, as assessed by semi-quantitative RT-PCR analysis.

목 차

영문요약 (Abstract)	i
목차 (Content)	iii
표목차 (List of Tables)	v
그림목차 (List of Figures)	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
2.1. 실험어	3
2.2. 미꾸라지 metallothionein (MT) cDNA 클로닝	3
2.2.1. Degeneracy primer 및 cDNA library를 이용한 미꾸라지 MT cDNA의 vectorette PCR 클로닝	3
2.2.2. Full-length MT cDNA 염기서열 분석	3
2.2.3. Phylogenetic 분석	5
2.3. 미꾸라지 MT genomic 유전자 및 프로모터 영역의 클로닝	5
2.3.1. 미꾸라지 MT 유전자의 genomic ORF sequence 분리	5
2.3.2. 미꾸라지 MT 유전자의 프로모터 영역 분리	8
2.3.3. Southern blot hybridization 분석	11
2.4 미꾸라지 18s rRNA 클로닝	11
2.4.1 Degeneracy primer를 이용한 RT-PCR 클로닝	11
2.5. 미꾸라지 MT 유전자의 발현 분석	12
2.5.1. 미꾸라지 조직에서의 total RNA 분리	12

2.5.2. MT mRNA의 조직 분포 양상	13
2.5.3. 중금속 종류 및 농도에 따른 실험어 노출	13
2.5.4. 중금속 노출에 의한 MT 유전자의 발현 양상 분석	14
III. 결과	16
3.1. 미꾸라지 MT 유전자 cDNA의 염기서열 특징	16
3.2. 미꾸라지 MT genomic ORF 및 프로모터 영역의 구조	16
3.3. 미꾸라지 MT 유전자의 phylogenetic 분석	20
3.4. Southern blot hybridization 분석	20
3.5 미꾸라지 18s rRNA 클로닝 및 염기서열	23
3.6. MT mRNA의 조직 분포 양상	23
3.7. 중금속 처리에 의한 MT mRNA 발현의 time course	23
IV. 논의	29
국문요약	33
감사의 글	34
참고문헌	35

List of Tables

Table 1. Oligonucleotide primers used for this study	4
Table 2. Metallothionein protein sequences used in phylogenetic analysis	6

List of Figures

Figure 1. Nucleotide sequence of mud loach MT cDNA and its deduced amino acid sequence	17
Figure 2. Genomic sequence of mud loach MT gene	18
Figure 3. Phylogenetic assumption of mud loach MT genes based on the N-J analysis	21
Figure 4. Southern hybridization analysis of mud loach MT gene	22
Figure 5. Sequence of 18s rRNA segment from mud loach	24
Figure 6. Tissue distribution of mud loach MT mRNA based on RT-PCR	25
Figure 7. Quantitative of analysis of MT transcripts during exposures to different heavy metals, based on RT-PCR	26
Figure 8. Time course expression of mud loach MT and during exposure to different concentration of cadmium	28

I. 서 론

수서환경의 위해성 관리를 위해서는 환경의 오염인자 또는 스트레스 인자들이 생물에 미치는 영향을 정밀·정량화 할 수 있는 기술이 중요시 된다 (Dabrio et al., 2002). 그 연구대상 생물로서 어류는 외부 오염/스트레스 자극에 대해 육상동물에 비해 훨씬 민감한 반응을 나타내는 것이 보고되기 시작하면서 최근 ecotoxicology의 소재로서 많은 관심을 받고 있다. 때문에 어류로부터 오염원 및 스트레스에 반응하는 유전자 및 단백질 표지를 발굴 바이오표지로 개발하고자 하는 연구들이 진행되고 있다 (Ron et al., 2003; Andrew et al., 2004; Valavanidis et al., 2005).

수서동물의 오염에 대한 생체 표지로서 여러 유전자 및 단백질 소재들이 검토되고 있으며, 이 중 중금속 오염원에 대한 바이오표지로서 metallothionein 유전자가 활발히 연구되고 있다 (Hayes et al., 2004; Chana et al., 2004; Cheung et al., 2004). Metallothionein은 6-7 kDa의 저분자량 단백질로서, 금속의 이온과 thionein 결합을 형성할 수 있는 cysteine 잔기가 풍부한 특징을 가지고 있다. 세포 내에서 MT는 진핵생물의 생체 내에서 필수 미량원소로 작용하는 Zn^{2+} 와 같은 금속이온들의 농도를 조절하며, 생체내로 유입되어진 Cd과 같은 유해한 중금속의 독성을 제거하는 기능을 갖고 있다 (Aschner et al., 1996; Carol et al., 2002). 뿐만 아니라 MT는 중금속 외에도 glucocorticoid, interferon, 활성산소 (reactive oxygen species), 기아 (starvation) 등을 포함하는 다양한 스트레스 인자들에 대한 생물학적 방어 및 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Kojima et al., 1988; Miles et al., 2000; John et al., 2005).

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)는 우리나라 대부분의 하천에 서

식하는 주요 담수어종으로서 아가미 호흡과 장호흡을 병행하며, 용존산소가 낮은 수질에서도 잘 견디고 급격한 주변 생활환경의 변화에 대한 적응력도 뛰어나며, 수질오염에도 강한 종으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 본 어종은 소형의 어체 크기, 높은 산란력, 빠른 난발생 속도, 짧은 생식주기 그리고 실험실에서의 연중산란 등 ecotoxicogenomic 연구모델로서 많은 장점들을 가지고 있으며 아울러 그간 많은 유전자 및 염색체 조작기술이 정착되어있어 (Kim et al., 1995; Nam et al., 1999) 분자 바이오표지 개발에도 매우 유리한 이점이 있다.

이에 본 논문에서는 미꾸라지를 ecotoxicogenomic 연구모델 시스템으로 개발하기 위한 연구의 일환으로 미꾸라지로부터 MT cDNA 및 gDNA 유전자를 클로닝하고, MT 유전자의 조절 부위 영역의 특징을 규명하며, 다양한 중금속 노출에 의한 MT 유전자의 발현 특성을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

2.1. 실험어

본 실험에 사용한 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)는 부경대학교 양식학과 유전자원공학 연구실에서 사육중인 어체중 13~16 g 내외의 미꾸라지를 이용하였다.

2.2. 미꾸라지 metallothionein (MT) cDNA 클로닝

2.2.1. Degeneracy primer 및 cDNA library를 이용한 vectorette PCR 클로닝

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 보고된 잉어과 어류 5종, 9개 MT 유전자를 바탕으로 2개의 degeneracy primer인 uniMT 3F와 uniMT 4F를 제작하였다. 상기 primer들을 포함하여 본 연구에 사용된 primer들의 정보는 Table 1에 나타내었다. PCR을 위해 *Taq* DNA polymerase가 들어있는 AccuPower PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하였으며, template는 본 연구실에서 제작한 미꾸라지 liver cDNA library를 이용하였다. PCR 반응은 icycler (BioRad, USA)를 이용하여, 94℃ 2 분의 initial denaturation step을 1 차례 수행한 후, 94℃ 45 초, 53℃ 45 초 및 72℃ 1 분의 순환 반응을 30 회 반복하였다. PCR 반응이 완료되면, PCR product 1 ul를 1.2% agarose gel에 전기영동 한 후 ethidium-bromide (EtBr)로 염색하여 Quantity-One 이미지 분석 프로그램 (BioRad, USA)을 이용하여 분석하였다.

2.2.2. Full-length MT cDNA 염기서열 분석

PCR을 통해 얻어진 product를 PCR purification kit (Bioneer,

Table 1. Oligonucleotide primers used for this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose
uniMT 3F	TGCYACCTGCAAGTGYACCAA	cDNA
uniMT 4F	TGCYACCTGCAAGTGYACTAA	cloning
Fi18s rRNA 1F	TAACGGGGAATCAGGGTTCGAT	RT-PCR
Fi18s rRNA 1R	CAAGAATTTACCTCTAGCGGC	
MLMT 1F	TACAGCAAAGGAACCTTC	RT-PCR and gDNA cloning
MLMT 2F	ACCTTCGGGAAC TTAAAC	
MLMT 1R	AAGAAGTGAAACCCACCC	
MLMT 2R	CTGATAGTAACTGGAGGTC	
MLMT 3R	GACCTCCTCATTGACAAC	

Korea)를 사용하여, purification 한 후, pGEM-T-easy vector (Promega, USA) 내로 16 시간동안 ligation 한 후에 대장균 XL1 blue MRF' strain에 형질전환 하였다. 얻어진 transformant들로부터 alkaline lysis 방법 (Sambrook et al., 2001)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 정확한 크기의 insert를 확인하기위해 제한효소인 *EcoRI* (Promega, USA)으로 절단하여 확인하였다. 선별된 clone들을 자동염기서열기 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 하였고, 확보된 partial MT cDNA 염기서열을 바탕으로 5'-UTR 및 3'-UTR 영역을 포함한 전체 ORF 염기서열 역시 vectorette PCR을 통해 확보하였다. 최종 얻어진 full-length cDNA 염기서열을 염기서열분석 프로그램인 Sequencher (Version 4.0, Gene Codes, USA)를 이용하여 editing을 수행하였고, Genbank database를 대상으로 homology 검색을 수행하였다. Genbank DB 탐색은 blastx와 blastn을 동시에 수행하였고, 분석된 clone 중 MT 유전자와 상동성을 가지는 유전자를 확인하였다.

2.2.3. Phylogenetic 분석

염기서열은 NCBI의 GenBank에서 blast 검색을 통해 다른 어류의 MT 유전자와의 상동성을 확인하였다. 이렇게 얻어진 염기서열과 아미노산 서열을 이용하여 multiple sequence alignment를 수행하였다. MT 유전자의 서열을 이용한 분자 계통도는 PAUP* 4.0β를 이용하여 GenBank 내 등록된 다른 어류의 MT 아미노산 서열 (Table 2) 들과 함께 phylogenetic tree를 제작하였다.

2.3. 미꾸라지 MT genomic 유전자의 클로닝

2.3.1. 미꾸라지 MT 유전자의 genomic open reading frame (ORF)

Table 2. Metallothionein protein sequences used in phylogenetic analysis.

Label	Species	MT protein	Label	Species	MT protein
1	<i>Misgurnus mizolepis</i>	MT	36	<i>Notothenia coriiceps</i>	MT-A
2	<i>Barbatula barbatula</i>	MT	37	<i>Notothenia coriiceps</i>	MT-B
3	<i>Carassius auratus</i>	MT	38	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MT
4	<i>Carassius auratus</i>	MT	39	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MT
5	<i>Carassius cuvieri</i>	MT-A	40	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MT-A
6	<i>Carassius cuvieri</i>	MT-B	41	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MT-B
7	<i>Chaenocephalus aceratus</i>	MT-A	42	<i>Oreochromis mossambicus</i>	MT
8	<i>Chaenocephalus aceratus</i>	MT-A	43	<i>Oreochromis mossambicus</i>	MT
9	<i>Chaenocephalus aceratus</i>	MT-B	44	<i>Oreochromis aureus</i>	MT
10	<i>Chionodraco hamatus</i>	MT-A	45	<i>Oryzias latipes</i>	MT
11	<i>Chionodraco hamatus</i>	MT-A	46	<i>Pagotheni borchgrevinki</i>	MT-A
12	<i>Chionodraco hamatus</i>	MT-B	47	<i>Pagotheni borchgrevinki</i>	MT-B
13	<i>Chionodraco rastrispinosus</i>	MT-A	48	<i>Parachaenichthys charcoti</i>	MT-A
14	<i>Chionodraco rastrispinosus</i>	MT-B	49	<i>Parachaenichthys charcoti</i>	MT-B
15	<i>Chrysophrys major</i>	MT	50	<i>Perca fluviatilis</i>	MT
16	<i>Cyprinodon sp.</i>	MT-A	51	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	MT

Table 2. Continued

Label	Species	MT protein	Label	Species	MT protein
17	<i>Cyprinus carpio</i>	MT	52	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	MT-B
18	<i>Cyprinus carpio</i>	MT-A	53	<i>Plecoglossus altivelis</i>	MT
19	<i>Cyprinus carpio</i>	MT-B	54	<i>Pleuronectes platessa</i>	MT
20	<i>Danio rerio</i>	MT	55	<i>Rutilus rutilus</i>	MT
21	<i>Danio rerio</i>	MT	56	<i>Salvelinus alpinus</i>	MT-A
22	<i>Danio rerio</i>	MT-B	57	<i>Salvelinus alpinus</i>	MT-A
23	<i>Dicentrarchus labrax</i>	MT	58	<i>Salvelinus alpinus</i>	MT-A
24	<i>Dicentrarchus labrax</i>	MT-B	59	<i>Salvelinus alpinus</i>	MT-B
25	<i>Esox lucius</i>	MT	60	<i>Salvelinus alpinus</i>	MT-B
26	<i>Gadus morhua</i>	MT	61	<i>Salmo salar</i>	MT-A
27	<i>Gadus morhua</i>	MT	62	<i>Salmo salar</i>	MT-B
28	<i>Gobionomorphus cotidianus</i>	MT	63	<i>Sparus aurata</i>	MT
29	<i>Gymnodraco acuticeps</i>	MT-A	64	<i>Sparus aurata</i>	MT-A
30	<i>Gymnodraco acuticeps</i>	MT-B	65	<i>Trematomus bernacchii</i>	MT-A
31	<i>Ictalurus punctatus</i>	MT	66	<i>Trematomus bernacchii</i>	MT-B
32	<i>Lithognathus mormyrus</i>	MT	67	<i>Thermarces cerberus</i>	MT-A
33	<i>Liza aurata</i>	MT	68	<i>Thermarces cerberus</i>	MT-A
34	<i>Morone saxatilis</i>	MT	69	<i>Zoarces viviparus</i>	MT
35	<i>Morone saxatilis</i>	MT-B	70	<i>Danio rerio</i>	MT-A

sequence 분리

미꾸라지 MT cDNA 염기서열을 바탕으로 specific primer인 MLMT 1F와 MLMT 1R (Table 1)을 제작하였다. Template는 미꾸라지 혈액으로부터 순수 분리된 genomic DNA를 사용하였으며, PCR을 위해 *Taq* DNA polymerase가 들어있는 AccuPower PCR premix (Bioneer, Korea)를 사용하였다. PCR 반응은 icycler (BioRad, USA)를 이용하여, 94℃ 2 분의 initial denaturation step을 1 차례 수행한 후 94℃ 45 초, 57℃ 45 초 및 72℃ 2 분의 순환 반응을 30 회 반복하였다. 성공적인 PCR을 전기영동을 통해 확인 한 후, PCR product를 앞에서와 언급한 것과 같이 PCR purification 과정을 거쳐 pGEM-T-easy vector (Promega, USA)에 클로닝하였다. Genomic ORF의 염기 서열분석을 통해 exon과 intron의 구조를 분석하였다.

2.3.2. 미꾸라지 MT 유전자의 프로모터 영역 분리

미꾸라지 MT 유전자의 프로모터 영역을 분리하기 위해 본 연구실에서 제작한 미꾸라지 genomic DNA library를 이용하여 filter hybridization을 수행하였다.

Filter hybridization은 제조사의 manual (Genomic cloning technical manual, Promega, USA)을 따라 수행하였다. 0.2% maltose LB에 KW251을 inoculation하여, KW251이 OD₆₀₀=0.6~0.8이 될 때까지 배양을 시킨 후, KW251에 gDNA library를 infection 하여 37℃에서 30 분간 반응시켰다. 이를 melted LB top agar 와 잘 섞어주어 prewarmed LB plate에 붓고, agarose가 완전 굳은 후 37℃에서 배양하였다. Plaque 크기가 pinpoint size가 되면 배양을 끝내고, membrane으로 옮기기 위해 nylon membrane (Roche, Germany)을 plate에 부착하고, membrane의

위치를 표시한다. Plate에서 membrane을 떼어내서 건조시킨 후, denaturation solution (0.2 M NaOH, 1.5 M NaCl), neutralization solution (0.4 M Tris, 2x SSC), 2x SSC 과정을 각 1-2 분 동안 수행한 후, membrane을 충분히 말린 다음, UV crosslinker (Ultra-Violet Products LTd., UK)로 고정화하여 hybridization을 수행하였다. Hybridization은 제조사의 manual (DIG DNA labelling & detection kit, Roche, Germany)에 따라 65℃에서 prehybridization을 1 시간동안 실시한 후, 16 시간동안 hybridization을 실시하였다. 이때 사용한 probe는 specific primer set 인 MLMT 1F/1R (Table 1)로 PCR을 수행하여 제조한 probe이며, 11-dUTP-digoxigenin (Roche, Germany)을 사용하여 probe에 표지하였다. Hybridization을 완료한 후, wash solution I (2x SSC, 0.1% SDS)을 이용하여 실온에서 5 분간 2 회, wash solution II (0.5x SSC, 0.1% SDS)를 이용하여 68℃에서 15 분 간 2 회 stringent washing을 수행하였다. 새 용기로 membrane을 옮긴 후, 실온에서 maleic acid buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5)로 5 분간 교반하여 잔여 SDS를 제거하였다. 1% blocking solution에 45 분간 천천히 교반한 후, anti-digoxigenin-AP (Roche, Germany)을 넣은 1% blocking solution에 넣고 1 시간 동안 천천히 교반하였다. Maleic acid buffer를 이용하여 15 분간 2 회 교반하였고, detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5)에 membrane 을 3 분 동안 반응시켰다. 그 후, color solution (225 ul NBT + 175 ul BCIP in 50 ml detection buffer)로 옮겨서 hybridization signal을 분석했다. Detection 과정을 통해 signal이 확인된 plaque를 plate에서 분리하여 1 ml SM buffer에 넣고, 실온에서 1 시간을 반응시켜 얻은 상층액을 KW251에 infection 했다. 이후에는 위와 동일한 방법으로 membrane replica 및 filter hybridization을 수행하였다. 이렇게 얻어진 phage를 0.2%

maltose와 10 mM MgSO₄가 첨가된 LB에 inoculation 하여 overnight 한 후, KW251과 적정량의 phage를 섞어주고 37℃에서 20 분간 반응시킨 후, 10 mM MgSO₄가 첨가된 100 ml LB broth에서 5-7 시간동안 배양을 한 후, 배양액에 0.5 ml chloroform/100 ml LB을 첨가하여 37℃에서 15 분간 반응을 시켰다. 4℃에서 10000×g로 20 분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, DNase 와 RNase를 각 1 ug/ml의 농도로 처리하여, 37℃에서 30 분간 배양을 한 후, NaCl 5.8 g과 PEG 8000 9.3 g를 넣고 완전히 녹을 때까지 섞어준 다음 얼음에서 1 시간동안 반응시켰다. 이 배양액을 4℃에서 8000×g의 속도로 20 분간 원심분리를 수행하여, pipet을 이용하여 상층액을 제거한 후, tube를 뒤집어서 상층액을 완전 제거하고, 10 mL/100 ml LB 의 phage buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄)를 넣고 조심스럽게 inverting 하여 pellet을 풀어주고, 8000×g에서 2 분간 원심분리한 후, 15 ml tube로 옮긴 후, 50 ul 20% SDS와 100 ul 0.5 M EDTA를 넣어서 68℃에서 15 분간 반응시켰다. 반응한 샘플을 1.5 ml tube로 옮겨, 동량의 TE-saturated phenol/chloroform과 잘 섞어준 후, 12000 rpm에서 5 분간 원심분리했다. 상층액을 분리하여, 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1)과 잘 섞어서 12000 rpm 5 분간 원심분리하고, 분리한 상층액을 동량의 isopropanol 과 섞어주고, -20℃에서 1 시간동안 반응시킨 후, 12000 rpm에서 10 분간 원심분리한다. 상층액을 제거한 후, 70% ethanol을 이용하여 pellet을 한 차례 washing을 한 후, alcohol을 완전 제거하고, 20 ug/ml 의 TE-RNase A에 녹여 미꾸라지 MT λ DNA를 확보하였다. 확보된 MT λ DNA와 specific primer (Table 1)을 이용하여 PCR을 수행하였고, 획득한 PCR 산물을 PCR purification (Bioneer, Korea) 과정을 거쳐 자동염기서열기 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 확인하였다. 확보된 프

로모터 영역의 염기서열은 transcriptional element search system (TESS)를 이용하여 분석하였다.

2.3.3. Southern blot hybridization 분석

Southern blot을 위해 암수 각 6마리에서 분리한 genomic DNA를 *Dra*II와 *Hind*III (Promega, USA)로 각각 절단하여, 1.0% agarose gel 상에서 35 V로 16 시간동안 전기영동 하였다. 전기영동이 완료되면 실온에서 denaturation 및 neutralization 과정을 수행하였으며, capillary transfer 방법 (Sambrook et al., 1989)을 이용하여, DNA를 nylon membrane (Roche, Germany)으로 옮긴 후, UV crosslinker (Ultra-Violet Products LTd., UK)로 고정화하였다. 제조사의 manual (DIG DNA labelling & detection kit, Roche, Germany)에 따라 수행하였다.

2.4. 미꾸라지 18s rRNA 클로닝

2.4.1. Degeneracy primer 이용한 RT-PCR 클로닝

Semi-quantitative RT-PCR을 할 때 internal control로 사용하기 위해 미꾸라지 18s RNA segment를 클로닝 하였다. NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 보고된 5개 어종의 5개 18s rRNA 유전자를 바탕으로 2개의 degeneracy primer인 Fi18s rRNA 1F/1R을 제작하였다 (Table 1). PCR을 위해 *Taq* DNA polymerase가 들어있는 AccuPower RT-PCR premix (Bioneer, Korea)를 사용하였으며, template는 미꾸라지 liver total RNA를 이용하였다. 100 ng total RNA를 대상으로 42℃에서 1 시간동안 역전사 반응을 수행하였고, 94℃ 4 분의 initial denaturation 과정을 한차례 수행하고, 94℃ 45 초, 55℃ 1 분, 72℃ 1.5 분의 순환반응을 28 회 반복하여 증폭된 PCR 산물을 확보하였다. RT-PCR에 의해 증폭된

미꾸라지 18s rRNA 유전자 단편은 상기와 같이 pGEM-T-easy vector (Promega, USA)를 이용한 TA 클로닝 한 후 염기서열 분석을 수행하였다.

2.5. 미꾸라지 MT gene의 발현 분석

2.5.1. Total RNA 분리

Total RNA 는 RNeasy Mini kit (Quiagen, USA)를 이용하여 제조사 manual에 따라 실온에서 분리하였다. 드라이아이스 위에서 적정량 (30 mg)으로 준비한 조직을 0.7 ml RLT buffer에 넣고, ultra-homogenizer (Proscientific, USA)를 이용하여 균질화한 후 14000 rpm에서 3 분간 원심 분리했다. 원심분리 후 분리된 상층액을 새로운 tube 로 옮겨 담고, 동일한 양의 70% ethanol을 넣는 즉시 pippet으로 섞어준 후, 2 ml tube에 담긴 RNeasy mini column에 700 ul의 sample을 넣고 12000 rpm에서 15 초간 원심분리를 하였다. Flow-through를 제거한 후 350 ul RW1 buffer를 넣어 준 후, 12000 rpm에서 15 초간 원심분리를 한 후, column을 새로운 1.5 ml tube로 옮겨주었다. 10 ul DNase I stock solution 과 70 ul RDD buffer를 섞은 80 ul를 column에 넣고, 25℃에서 15 분간 반응시킨 후, 350 ul RW1 buffer를 넣어준 후 12000 rpm에서 15 초간 원심분리를 하였다. Column 을 새로운 2 ml tube 에 옮겨 담은 후, RPE buffer 500 ul을 넣고, 12000 rpm에서 15 초간 원심분리를 한 후, flow-through 를 제거하고, 2 회 반복 하였다. 14000 rpm 에서 1 분간 원심분리하여 column에서 buffer를 완전 제거하고, 새로운 1.5 ml tube에 옮겨 담아 40 ul RNase-free water를 넣고, 10 분간 실온에서 반응시킨 후, 12000 rpm에서 1 분간 원심분리를 하였다. 1 ul의 eluted RNA sample과 8 ul RNA loading buffer를 함께 6 5℃에서 3 분간 반응시킨 후, 1% formaldehyde agarose gel을 이용하여 100 V로 전기영동을 수행하였다. 분리된 total RNA의 integrity는 18s vs

28s rRNA ratio를 통해 확인하였으며, 분리된 RNA를 GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech., USA)를 이용하여 농도를 측정하여, 0.5 ug/ul 로 정량화한 후 RT-PCR에서 template로 사용하였다.

2.5.2. MT mRNA의 tissue distribution

미꾸라지 MT의 조직 발현 분포 양상을 알아보기 위해 수행한 semi-quantitative RT-PCR의 template는 fin, liver, spleen, kidney, intestine, ovary, testis 그리고 brain 등의 8개 조직에서 분리한 total RNA를 이용하였다. Primer는 MLMT 2F와 MLMT 3R (Table 1)을 사용하였고, AccuPower RT-PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하였다. MT의 PCR 반응은 icycler (BioRad, USA)를 이용하여, 42℃에서 60 분간의 역전사 반응을 수행한 후, 94℃ 4 분의 initial denaturation step을 1 차례 수행하고, 94℃ 45 초, 60℃ 45 초 및 72℃ 1 분의 순환 반응을 23 회 반복하였다. Internal control인 18s RNA는 Fi18s rRNA 1F/1R primer를 사용하였고, 42℃에서 60 분간의 역전사 반응을 수행한 후, 94℃ 4 분의 initial denaturation step을 1 차례 수행한 후 94℃ 45 초, 60℃ 45 초 및 72℃ 1 분의 순환 반응을 20 회 반복하였다. PCR 반응이 완료되면, PCR product 6 ul를 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 EtBr로 염색 하여 Quantity-One 이미지 분석 프로그램 (BioRad, USA)을 이용하여 분석하였다.

2.5.3. 실험어의 중금속 노출

In vivo 실험은 금속의 종류와 그 농도에 따라 미꾸라지 MT 유전자의 발현 양상의 차이를 비교하기 위해 수행되었다. 먼저 노출된 금속에 따른 미꾸라지 MT의 발현양상의 차이를 비교하기 위해 미꾸라지를 노출

시킬 금속을 선택하기 위한 예비 실험으로 구리, 아연, 카드뮴에 노출시켰다. 금속의 종류가 유전자 발현에 어떤 영향을 미치는가에 대한 비교임으로 각각의 금속 10 uM에 실험어를 48 시간동안 노출시켰다. 대조구는 금속에 노출되지 않은 미꾸라지를 사용하였다. 각 실험구는 4 마리로 구성되었으며, 하루 1 회 환수와 3 회 먹이 (상품 사료 45% 조단백) 투여를 기준으로 하였다. 노출 실험이 종료되면 실험어를 리도카인으로 마취한 후, 조직 시료를 분리하여 드라이아이스에 얹어 조직을 급속냉동 한 후, -80℃에서 보관하였다.

노출 시간과 노출 농도에 따른 발현양상을 확인하기 위해 카드뮴을 이용한 노출 실험을 수행하였다. 노출 시간은 0, 1, 3, 7, 14, 21 day였으며, 노출 농도는 2, 5, 10, 25, 50 uM였다. 대조구는 금속에 노출되지 않은 미꾸라지를 사용하였고, 각 노출 조건별 실험구는 4 마리로, 실험 기간동안 하루 2 회 환수와 3 회 먹이 (상품 사료 45% 조단백) 투여를 실시하였다. 조직 시료의 적출 및 보관은 상기와 동일하게 하였다.

2.5.4. 중금속 노출에 의한 MT 유전자의 발현 양상 분석

미꾸라지 MT 유전자의 발현을 분석하기 위해 제조사 manual에 따라 RNeasy Mini kit (Quiagen, USA)를 이용하여 간조직에서 분리한 total RNA를 0.5 ug/ul 로 정량화했다. 정량화한 RNA를 template로, MLMT 2F와 MLMT 3R을 primer (Table 1)로 사용하였으며, AccuPower RT-PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. PCR 반응은 icycler (BioRad, USA)를 이용하여, 42℃에서 60 분간의 역전사 반응을 수행한 후, 94℃ 4 분의 initial denaturation step 을 1 회 수행하여 역전사 효소를 불활성화 시켰다. 이 후 94℃ 45 초, 60℃ 45 초 및 72℃ 1 분의 순환 반응을 23 회 반복하였다. MT mRNA 발현양의

normalization을 위해서 internal 대조구로서 미꾸라지 18s rRNA를 선발하였으며, Fi18s rRNA 1F/1R primer를 사용하여 수행한 18s rRNA의 RT-PCR은 42℃에서 60 분간 역전사 반응을 수행한 후, 94℃ 4 분의 initial denaturation step을 통해 역전사 효소를 불활성화 시켰다. 이 후 94℃ 45 초, 58℃ 45 초, 및 72℃ 1 분의 순환 반응을 20 회 반복하였다. PCR 반응이 완료되면, PCR product 6 ul를 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 EtBr로 염색하여 Quantity-One (BioRad, USA) 이미지 분석 프로그램으로 확인하였다.

III. 결 과

3.1. 미꾸라지 MT 유전자 cDNA의 염기서열 특징

미꾸라지 liver cDNA library로부터 degeneracy primer를 이용한 vectorette PCR을 통해 얻어진 산물의 염기서열을 분석한 결과 미꾸라지 MT cDNA 유전자는 515 bp로 60개의 아미노산으로 구성된 peptide coding sequence, 73 bp의 5'-untranslated region (UTR)과 259 bp의 3'-UTR이 확인되었고, 종결 코돈인 TGA 이후 polyadenylation signal sequence인 aataaa와 20 bp의 poly (A) sequence가 확인되었다. cDNA 염기서열로부터 유추한 60개의 아미노산 서열에는 다른 척추동물에서와 같이 cysteine 잔기가 전체의 33.3% (20/60)로 풍부하였고, 2가 금속 이온이 결합할 수 있는 위치인 cys-X-cys 혹은 cys-xx-cys 부위가 8 곳에서 관찰되었다 (Fig. 1).

3.2. 미꾸라지 MT genomic ORF 및 프로모터 영역의 구조

cDNA 염기서열을 이용하여 제작한 primer MLMT 1F와 MLMT 1R을 이용하여 미꾸라지 gDNA를 대상으로 genomic ORF 염기서열을 PCR로 분리하였다. 분리된 미꾸라지 MT genomic ORF는 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있었으며, exon-intron boundary 영역에서는 gt/ag rule이 잘 보전되어 있었다 (Fig. 2).

미꾸라지 gDNA library를 이용한 filter hybridization을 통해 6개의 phage를 확보할 수 있었다. 이들 phage를 이용하여 얻어낸 λ DNA를 template로 이용하여 수행한 PCR 산물을 이용하여 염기서열분석을 한 결과, 미꾸라지 프로모터 영역의 염기서열을 확보하였다. 그 결과 미꾸라지 프로모터는 1.1 kb의 염기서열로 이루어져있고, 3개의 MRE

1	ggctcaatcacaaa	14
15	<u>tttgtgaaacgatacagcaaaggaaccttcg</u> ggaactttaacggatactctaagggaaa	73
74	ATG GAT CCT TGT GAT TGC TCA AAA ACT GGA ACT TGC AAC TGT GGT	118
1	M A P C A C S L T G T C A C G	15
119	GCC ACC TGC AAG TGC ACT AAC TGC AAG TGT ACA ACC TGC AAG AAG	163
16	A T C L C T A C L C T T C L L	30
164	AGT TGC TGT TCT TGC TGC CCA TCA GGC TGC AGC AAG TGC GCC TCT	208
31	S C C S C C P S G C S L C A S	45
209	GGA TGC GTT TGT AAG GGC AAT TCC TGT GAC TCC AGC TGT TGT CAA	253
46	G C V C L G A S C A S S C C G	60
254	tagggaggtcgacgcgccgtttgctacaatgtgaactctgtccgaacttcgtgtcttc	311
	*	
312	attgtacattaatgtctttttgaaat aataaaa tgacctccagttactatcagatt	366
367	tgtttcatgttgccaagatcactttttg <u>gggtgggtttcacttctt</u> gtagtgt	421
422	taaagagcctactatgtatgttcttcataaatgtaaaattgtaacttttcatgtg	476
477	ttcaaatatataattaagcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	515

Figure 1. Nucleotide sequence of mud loach MT cDNA and its deduced amino acid sequence. The termination codon is indicated by an asterisk, and the putative polyadenylation signal (aataaa) is in bold-face and boxed. Sequences of primers MLMT 1F and MLMT 1R are underlined.

-1100 tattcggtattcggttttatttttctctaaaatttcaaagaatctgcacata
 -1050 tgttcggttttctgggtgtattctacagtgaggataatggaaaaataccac
 -1000 cggtcaaaaccgagtggtggccaagtgcaaatcaacgc tttgtttactgt
 -0950 gtgggtgttctcacgggtaagtaagtgcagacgtgttgagcacatgctttt
 -0900 tggtagtatgcgcttttacacaccacagtgcacatcgtgtgacaagt tcc
 -0850 ctttttcccatgtgcaaactgaaagagtgcacaaatatttgtttggatagc
 -0800 agattgaaaacatttaataaagcttagaaagctatatactctctgaaaaatg
 -0750 acaaatctggttaaaaaataacataacttttcttataaaatagttttata
 -0700 attgttgtaaaattgggttttaaaatccaa⁺⁺⁺⁺tagagattacatgcaggagct
 -0650 attagagacaagcaatatgttaacaaactgc ttttggagcgatat taaaa
 -0600 gagatctctgggtcactcaaatatatttttatgtttaaaaatacttttagt
 -0550 cttcactgactaaatcatagctgtttaccttcacgtgttgaccttagcaa
 -0500 tttgtgtgtgtgttttaattgtgtatataaaatgtgtttaatatgaaaatt
 -0450 aatatattaatcttggcatggactttatatctcaatgggtctctccttgt
 -0400 aaaaaaagctcaaacaataaaaataactttcaaaatcaatcttctaagt
 -0350 aaaaaaaacaacatattacattattaacatgctaacagccccattaa
 -0300 tgttcagtggcgtggaaaagaagttatataattttataaacaacacattg
 -0250 atcaaacaggggtgggtgtgtgtgatttgtgatcgtttgatgatttgcaccc
 >>MREf>
 -0200 agttgcatgaataagtaatgaatgagtaacaccgtgtgcaggctctgggtg
 <<MREb<
 -0150 ggcgtgggttttgcactcgtcctgtaagcactgagctctataaaaccaaga
 >>MREa>
 -0100 caggcacat taagctggtaccatctacaactcattcacaaatttgtgaaa
 -0050 cgatacagcaaaggaaccttgcggaactttaaaggatactctaaggga

MLMT 1F

(Continued)

```

0000  ATGGATCCTTGTGATTGCTCAAAAAgtaagtatttcaggctgtgttgagt
0050  cacatTTTTGGACATTGGAATAAGGTTATGGATGTGGAGTAATTTGTG
0100  cttgtTTAATTTGCTGTTTTCTTTGTAGCTGGAACCTGCAACTGTGGTG
0150  CCACCTGCAAGTGCCTAACTGCAAGTGTAACCTGCAAGAAGAgtaag
0200  tttaCTTTAATCATAACTTAAATCATGTTAGACATTGTTAAACGGTTCAG
0250  tccagacagTTAacttgTTTTTTCTGTcatagGTTGCTGTTCTTGCT
0300  GCCCATCAGGCTGCAGCAAGTGCGCCTCTGGATGCGTTTGTAAAGGGCAAT
0350  TCCTGTGACTCCAGCTGTTGTCAATgaggaggtcgacgcgccgtttgcta
0400  caatgtgaactctgtccgaacttcgtgtcttcattgtacattaatgtctt
0450  ttTgaaataataaatgacctccagttactatcagattgtttcatgttgc
0500  caagatcacTTTTGGGGTGGGTTTcacttctttg

```

MLMT 1R

Figure 2. Genomic sequence of mud loach MT gene. Sequences of primers MLMT 1F and MLMT 1R are underlined. Exons are shown with uppercase letters. The MRE consensus sequences are underlined and labeled above with orientation noted. The consensus TATA box is typed in boldface and consensus CCAAT (above +++) box is noted .

(metal regulatory element), 1개의 CCAAT box 그리고 TATA box가 확인되었다 (Muhammad et al., 1988; Susan et al., 2001; Robert et al., 1987). MREa 는 -133부터 -140까지, MREb는 -161부터 -167까지, MREf는 -201부터 -207까지 그리고 TATA box는 -109부터 -113까지 위치하고 있으며, CCAAT box는 -669부터 -674에 위치했다. 미꾸라지 프로모터에 있는 것으로 확인된 MRE는 정방향과 역방향을 띄고 있었다 (Fig. 2). GC box 는 확인되지 않았다.

3.3. 미꾸라지 MT 유전자의 phylogenetic 분석

Fig. 3은 미꾸라지 MT 유전자 염기서열에서 추정되는 아미노산 배열과 알려져 있는 어류의 MT 염기서열에서 추정되는 아미노산 배열을 비교하여 phylogenetic tree로 나타낸 것이다. 미꾸라지의 MT 는 다른 잉어과 어류의 MT와 상당히 유사한 아미노산 서열을 가지고 있었다. 또한 다른 어종의 MT와 마찬가지로 20개의 cysteine 잔기를 가지고 있었으며, 그 위치 또한 유사했다. 잉어과 어류의 아미노산 서열과의 유사도는 86%이상이었고, 전체 어류과의 아미노산 서열과 비교했을때, 그 유사도는 70-93%를 나타내었다 (Fig. 3).

3.4. Southern blot hybridization 분석

미꾸라지 genome에서 MT 유전자의 존재양상을 확인하기 위해 MT genomic ORF 염기서열에 절단부위가 없는 2가지 제한효소 *DraII*와 *HindIII*를 이용하여 미꾸라지 genomic DNA를 절단하고 southern hybridization을 수행하였다 (Fig. 4). 동일한 제한효소를 이용하여 절단하였음에도 동일한 pattern이 관찰되지 않고, 각 개체별로 3개에서 6개의 다양한 크기의 band를 확인할 수 있었다.

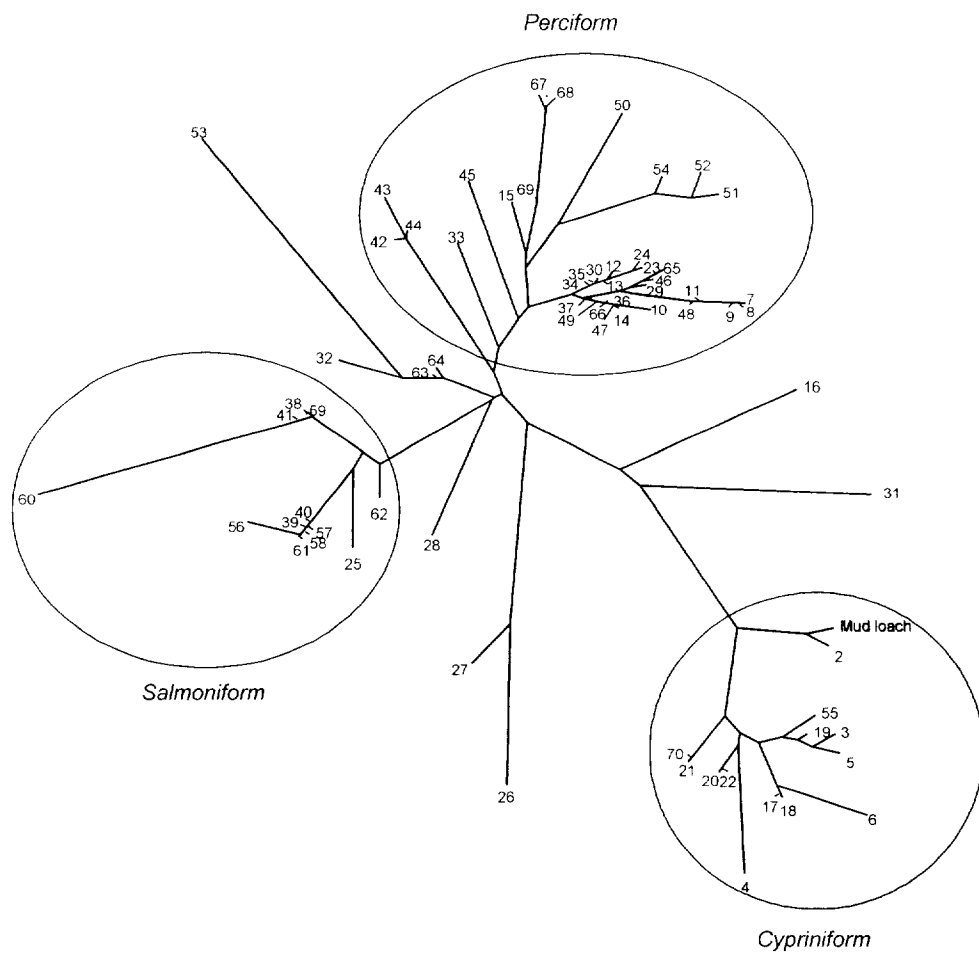


Figure 3. Phylogenetic assumption of mud loach MT gene base on the N-J analysis.

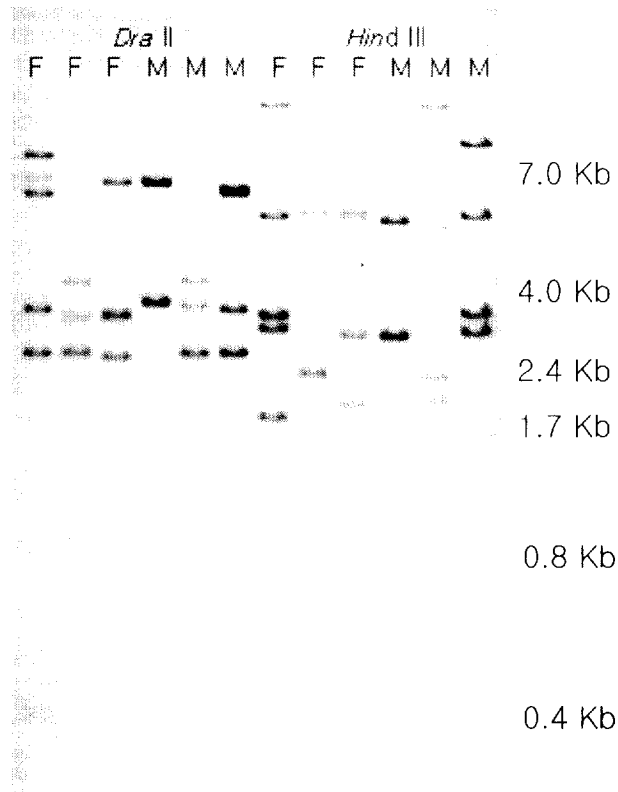


Figure 4. Southern hybridization analysis of mud loach MT gene. Genomic DNAs were obtained from three females (F) and three males (M), digested with *Dra*II or *Hind*III, separated onto 1% agarose gel, and probed with dig-labeled mud loach MT-gDNA fragment.

3.5 미꾸라지 18S rRNA 클로닝 및 염기서열

미꾸라지 liver total RNA로부터 Fi18s rRNA 1F/1R primer를 이용한 RT-PCR을 수행한 결과 전기영동 사진에 약 570 bp에 해당하는 산물이 증폭되었으며, 얻어진 산물의 염기서열을 분석한 결과 577 bp에 해당하는 염기서열을 확인되었다 (Fig. 5).

3.6. MT mRNA의 조직 분포 양상

미꾸라지 MT mRNA의 조직분포양상을 확인하기 위해 fin, liver, spleen, kidney, intestine, ovary, testis, brain 등의 8개 조직에서 분리한 total RNA를 template로 MLMT 2F/3R primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 8개 조직에서 모두에서 MT transcription들이 검출되었다 (Fig. 6). 18s rRNA band로 normalization을 수행한 결과 MT mRNA는 특히 ovary에서 가장 높은 발현량을 보였으며, fin에서는 다른 조직에 비해 가장 발현량이 적었다.

3.7. 중금속 처리에 의한 MT 발현의 time course

실험어와 대조구에서 분리한 total RNA를 template로 MT 발현을 확인하기 위해 MLMT 2F/3R primer를 이용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. 먼저 노출된 금속의 종류에 따른 MT 발현의 차이를 비교하기 위해 구리, 아연, 카드뮴을 동일한 농도 (10 uM)에 48 시간동안 노출시킨 후 실험어와 대조구에서 분리한 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 2개의 internal control 인 EF- α 와 18s rRNA는 대조구와 실험구간에 발현량의 차이는 거의 없었으나, 구리에 노출시킨 실험어에서 발현을 가장 많이 하였다 (Fig. 7). Time course에 따른 MT 발현 실험을 수행은 카드뮴으로 선택하였다. 그 이유는 구리는

GATTCAAGAATTTACCTCTAGCGGCGCAATACGAATGCCCCGGCCGTCCCTCTCAATCA
TGGCCCCGGGTTCGGAAACCCACAAAATAGAACGGAGTCCTATTCCATTATTCTAGCT
GAGATATTCAGGCGGGCTGCGGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTCAAAGTAAACGCTC
CGGGCCCCGGACCGGACACCCAGTTAAGGGCATCCGGGGGGCGCCGGGAGGCAGGGGTACG
GGACGTGCGGTGGCTCGCCTCGCGGCGGACCGCAAGCTCGCTCCCGAGATCCAACTACGAG
CTTTTTAACTGCAGCAACTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGC
ACCAGACTTGCCCTCCAATGGGTCCTCGCCCATGGGTTTAGGATACGCTCATTCCAATTAC
AGGGCCTCGAAAGAGACCTGTATTGTTATTTTTCGTCACTACCTCCCCGAGTCGGGAGTGG
GTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCG
GAATCGAACCTGATTCCCCGTAAATC

Figure 5. Sequence of 18s rRNA segment from mud loach.

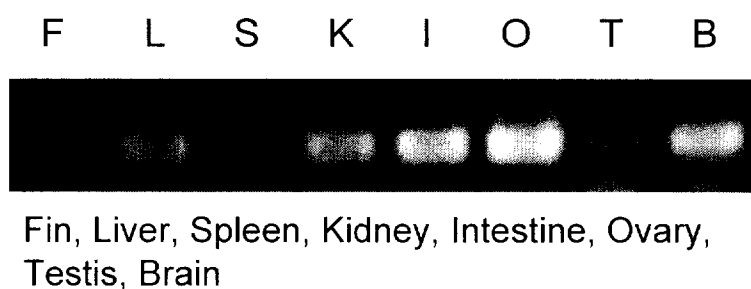


Figure 6. Tissue distribution of mud loach MT mRNA based on RT-PCR.

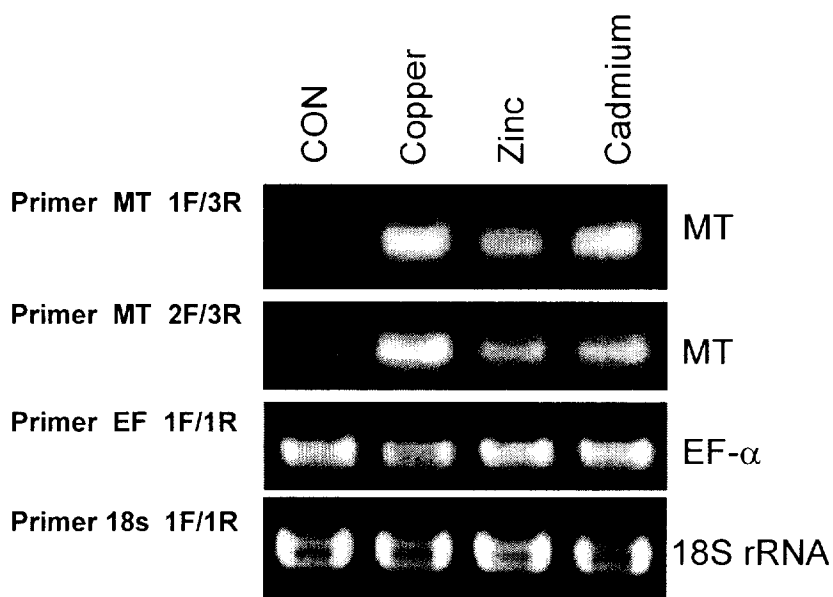


Figure 7. Quantitative of analysis of MT transcripts during exposures to different heavy metals, based on RT-PCR. Two internal controls (EF-α and 18s rRNA) were used for the normalization of MT expression.

어체에 대해 강한 독성을 보여 폐사를 유발하여 제외하였고, 아연은 카드뮴에 비해 발현율에서 큰 차이를 보이지 않았다. 그리하여 고농도에서도 폐사를 유발하지 않고, 가장 많은 MT 유전자의 발현을 유도하는 카드뮴을 선택하여 저농도의 카드뮴 2, 5, 10 uM와 고농도의 카드뮴 50 uM의 농도에서 0-21 일동안 각 농도와 시간의 흐름에 따른 미꾸라지 MT 발현 경향을 확인하였다 (Fig. 8). 그 결과 internal control group 은 시간의 경과에따른 차이를 확인할 수 없었지만, 실험구의 경우에는 시간과 노출 농도에 비례하여 발현량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 2 uM 노출구에서는 7 일, 5 uM 노출구에서도 7일, 10 uM 노출구에서는 4 일까지는 노출 시간이 증가할수록 MT의 발현량이 증가되는 것을 관찰 할 수 있었으나, 50 uM에 노출된 실험구의 경우에는 노출 1일부터 대조군과 확연한 차이를 보였으나, 시간의 흐름에 따른 MT의 뚜렷한 발현양의 증가를 관찰할 수가 없었다.

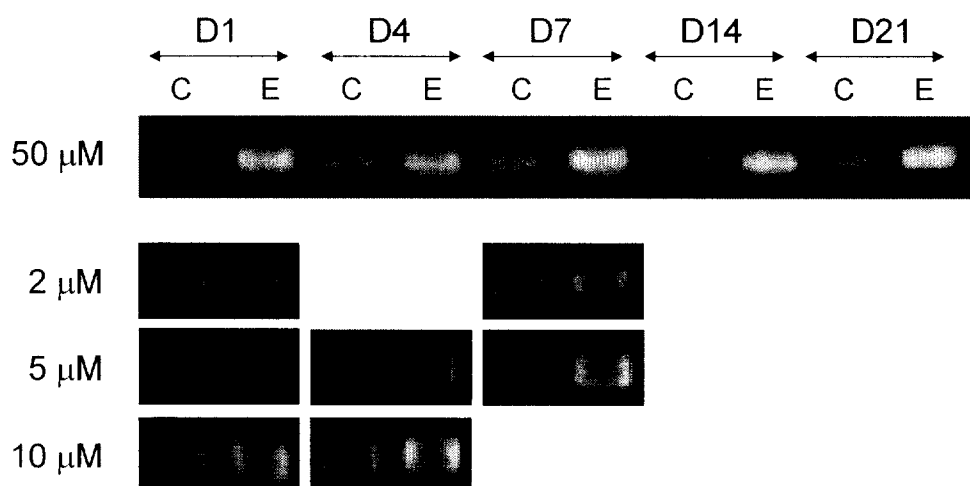


Figure 8. Time course expression of mud loach MT and during exposure to different concentration of cadmium (C: non-exposed control, E: exposed).

IV. 논 의

미꾸라지의 MT cDNA 염기서열로부터 유추한 60개의 아미노산 서열에서는 다른 척추동물에서와 같이 cysteine 잔기가 전체의 33.3%로 풍부하였으며, 척추동물 MT의 특징인 lysin, arginine 및 histidine 등의 방향성 잔기들은 관찰되지 않았다 (Kägi et al., 1974). 또한 본 연구의 미꾸라지를 포함하여 여타 척추동물의 MT를 구성하는 cysteine 잔기들은 진화적으로 매우 잘 보존되어져 있는 것으로 알려져 있으며, 이 잔기들은 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 와 같은 2가 금속이온과 결합하여 metal-thiolate polynuclear cluster를 형성한다 (Kojima et al., 1976; Stillman et al., 1992). 금속이온을 제거하는 역할을 하는 cys-x-cys 혹은 cys-cys 염기배열이 미꾸라지 MT에서 8곳의 결합부위가 관찰되었으며, 이는 일반적으로 어류 및 포유류에서 관찰되는 빈도와 거의 일치함으로써 진화적으로 잘 보존되어 있는 MT의 특징을 잘 보여주고 있다(Kojima et al., 1976).

본 연구에서 발굴된 미꾸라지 MT mRNA는 간을 포함하는 다양한 조직에서 발현하는 것으로 나타났고, 그 발현 수준은 조직별로 차이가 있었다. MT는 미생물에서 척추동물에 이르는 다양한 생물에 존재하며, 다양한 조직에서 발현하는 것으로 알려져 있다. 이 중 진핵 생물의 MT isoform은 2종류 이상이며, 하나의 생물체에서 발현되는 MT라 하더라도 이들을 유도하는 물질 (금속, 호르몬, 각종 물리·화학적 스트레스 등)과 발현되는 조직에 따라 발현되는 MT의 종류에는 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Kojima et al., 1988; Miles et al., 2000; John et al., 2005). 예를 들면 포유류의 MT는 4종류의 isoform이 있으나, 이들을 발현되어지는 조직에 따라 분류하면, 크게 3종류로 나누어진다. 와 같이 모든 조직에서 발현이 되는 MT-I와 MT-II, 신경조직 특히 뇌에서 주로 발현

을 하는 MT-III, 상피세포조직과 같은 층상 구조를 가진 조직에서만 발현되어지는 MT-IV로 나뉘어진다.

어류의 경우에는 NCBI에 보고되어진 전체 MT 유전자 497개 중 68개를 차지하고 있는데, 이중 미꾸라지가 속해있는 잉어과 어류는 5개 어종 9개 유전자가 보고되어져있다. 어류의 MT isoform은 2가지 종류로 분류되어져 있으며, 대부분의 장기에서 발현된다. 잉어과 어류 중 가장 유사도가 높은 어종은 *Noemacheilus barbatulus* (stone loach)으로, 미꾸라지 MT 염기서열과의 유사도는 93%로 나타났고 여타 잉어과 어류와도 86%이상의 상동성을 보임으로써 MT 유전자의 특성을 잘 보여주고 있다. 그 외에 척추동물에 속하는 포유류의 MT I 과 MT II 역시 45-57%의 유사성을 보여주었다.

MLMT 1F/1R을 이용한 PCR 결과 확보되어 genomic sequence는 583 bp였으며, 미꾸라지 MT genomic ORF는 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있었으며, 각각의 exon의 길이는 exon I 은 25 bp, exon II 는 66 bp, exon III은 89 bp였고, exon-intron boundary 영역에서는 gt/ag rule이 잘 보존되어 있었다.

미꾸라지 gDNA library를 이용한 filter hybridization을 통해 염기서열분석을 한 결과, 미꾸라지 프로모터 영역의 염기서열을 확보하였다. 그 결과 미꾸라지 프로모터는 1.1 kb의 염기서열로 이루어져있고, 3개의 MRE와 1개의 CCAAT box와 TATA box로 이루어져 있었다. 미꾸라지 MT 5'-flanking region에는 GC%가 75%에 달하는 mouse (Searle et al. 1984)와 human (Varshney et al., 1986)의 경우와는 달리 AT%가 66%에 달했는데, 이는 무지개송어의 경우와 유사한 결과를 보여주고 있다 (Muhammad et al., 1988). MT promoter 영역에는 MRE core sequence인 TGCRNCG sequence가 위치하고 있는데, 미꾸라지 MT 영역

에서 3개의 MRE가 확인되었고, 정방향성과 역방향성을 띄고 있었다.

미꾸라지 MT의 발현을 유도하는 금속 이온 중에서 가장 발현 유도를 많이 하는 금속 이온을 찾기 위해 먼저 구리, 아연, 카드뮴을 이용하여 동일한 농도 (10 uM)로 48 시간동안 노출시킨 후 MT mRNA의 발현양을 조사한 결과, 구리에 노출시킨 실험어에서 유도발현이 가장 높게 나타났으며, 그 다음이 카드뮴, 아연 순으로 발현되었다. 이는 동일 농도에서 카드뮴 및 아연에 노출시킨 실험어보다 유의적으로 높은 폐사율이 구리 노출군에서 관찰된 결과와도 상관 관계를 갖는 것으로 판단된다. MT가 중금속 이온 농도 외에도 다양한 생물학적 스트레스에도 반응하는 연구 결과를 미루어 볼 때 (Vašák et al., 2000), 구리에 노출된 실험어가 다른 중금속 노출군에 비해 훨씬 더 많은 스트레스에 노출된 것으로 생각된다. 농도별 time course 별 카드뮴 중금속 노출 실험에서 간조직의 MT 발현은 일반적으로 노출 농도에 비례하여 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 간조직 외에 여타 다른 조직에서 나타나는 MT transcript의 증감 양상에 관해서는 후속 연구가 요구되며 이는 MT의 isotype별, 중금속 노출 경로 및 중금속의 종류에 따라 각 조직이 서로 다른 역할을 담당할 수 있음이 보고되고 있기 때문이다 (Edit et al., 2001; Vasconcelos et al., 2002; Filipovi et al., 2003).

포유류에서는 구리에 의해 유도되어지는 MT는 간에서 먼저 구리 2가 이온과 결합을 한 후 구리의 장내 흡수를 조절하는 역할을 담당하며, 아연에 의해 유도되어지는 MT의 경우에는 효소의 활성도에 관여하는 apoenzyme에게 아연을 전달해주는 역할을 담당하며, 특히 장에서 유도되어지는 Zn-MT의 경우에는 경구적으로 체내로 유입된 아연의 조절에 관여한다 (Kojima, 1988). 카드뮴에 의해 유도되어지는 MT의 경우에는 만성감염의 경우 특정 기관에서 MT의 축적과 합성이 증가되는 것

이 확인되었다 (Brady, 1991).

카드뮴을 이용한 노출실험에서 MT 발현은 Cd 노출 지속기간에 따라 일반적으로 증가하는 경향을 보임으로써 가장 낮은 농도인 2 uM의 경우 처리 후 7일부터, 5 uM의 경우에는 처리 후 4일부터, 10 uM의 경우에는 처리 1일부터 대조구와 유의적인 차이를 보였다. 그리고 고농도 실험 50 uM의 경우 노출 처리 1일부터 확연한 차이가 관찰되었다. 이러한 최초 차이는 노출기간이 증가함에 따라 보다 유의적으로 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 증가 양상은 앞서 잉어와 무지개 송어 등의 어종에서 관찰된 결과와 유사한 경향을 보인다 (Smet et al., 2001; Lange et al., 2002). 빠른 증가 후에 관찰되는 포화 양상 역시 카드뮴 50 uM의 결과와 일치 되는데 이는 간 조직에 있어 금속 이온의 유입/유출 기작에 의한 중금속 축적량의 포화와 연관이 있으리라 판단된다. 따라서 향후 조직 내 실제 축적된 카드뮴 양의 추적이 동시에 이루어진다면 보다 자세한 MT 유전자 발현 기작 규명이 가능하리라 판단된다.

본 연구를 통해 실험 모델로 설정한 미꾸라지의 MT 유전자 구조를 규명하고 이의 발현 특성을 분석하였으며, 본 자료를 기반으로 중금속 노출에 의한 생체 분자표지의 발현 기작 규명과 정밀 biomarker 개발에 활용될 수 있으리라 판단된다.

국문 요약

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)로부터 분리한 metallothionein (MT) 유전자와 프로모터 염기서열을 분석하고, 카드뮴 (Cd), 아연 (Zn), 구리 (Cu)를 포함하는 다양한 중금속에 급성 노출을 하여 발현양상을 살펴보았다. 미꾸라지 MT cDNA는 79 bp의 5'-UTR, 183 bp의 ORF와 poly A 염기서열을 포함하는 259 bp의 3'-UTR로 이루어져있다. 미꾸라지 MT는 33% 의 cysteine 잔기를 가지고 있으며, 다른 척추동물의 MT와 유사하였으며 특히 어류의 MT와는 최대 93%의 homology를 나타내었다. Vectorette PCR을 이용하여 분리한 genomic ORF 염기서열은 3개의 exon과 2개의 intron을 가지고 있었다. Genomic library를 이용한 filter hybridization을 통해 발굴된 미꾸라지 MT 5'-UTR 및 promoter 영역은 1.1 kb로, 3개의 MRE (metal regulatory element), TATA box 및 CCAAT box가 확인되었다. Genomic outhern blot에서는 개체별로 다양한 밴드 양상이 검출되었다. 금속의 종류에 따른 미꾸라지에서의 MT 발현 양상을 확인한 결과, 구리가 가장 높은 MT mRNA 발현을 유도하였으며, 다음이 카드뮴, 아연 순으로 나타났다. 카드뮴을 이용한 노출 농도와 노출 시간에 차이를 둔 미꾸라지의 MT 발현율을 확인 한 결과, 노출 농도와 노출 시간이 비례하여 MT 발현양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

실험을 하고 하나하나 배워가는 게 좋아서 무턱대고 다시 시작한 공부인데, 저야 항상 재밌고 좋은 시간였지만, 저로 인해 주위사람들에게 도움을 주기보단 폐만 끼치게 된 거 같아서 늘상 죄송스럽기만 했었는데, 졸업 논문의 한 귀퉁이를 빌어 저를 도와주신 주위 분들께 감사의 말씀을 전하려합니다.

먼저 턱없이 부족하고 아는 것 없던 저에게 때로는 따끔한 꾸중과 따스한 격려를 해 주시며 여기까지 저를 이끌어주신 남운권 교수님께 깊이 고개숙여 감사드립니다. 언제나 바쁘신 와중에도 부족한 저를 지켜봐주시며 한 발짝씩 앞으로 나아갈수 있게 이끌어주신 김성구 교수님과 김기홍 교수님께도 깊이 감사드립니다. 그리고 부족함이 많아 실수를 연발하는 저를 항상 곁에서 지켜봐주시며 조언을 아끼지 않으셨던 조영선님께 감사드립니다. 또한 본 논문이 나올 때까지 말없이 도움을 줬던 유전자원공학실험실원들에게도 감사드립니다.

같이 학위과정 중이라 힘들었을텐데도 불구하고 항상 웃는 얼굴로 저에게 격려를 아끼지 않았던 권세련, 최희정양에게 감사를 표합니다. 바쁘다는 핑계로 항상 연락두절하며 사는 저를 친구라고 늘 챙겨주는 양양, 진순, 은임 등의 친구에게도 감사드립니다.

그리고 마지막으로 항상 제멋대로에 짜증만 부리는 저를 말없이 뒤에서 지켜봐주시며 보살펴 주신 부모님과 언제나 당신 손녀딸을 최고라 여기시며 사랑하시는 외할아버지, 그리 멀진 않지만 타국땅에서 혼자 생활하며 공부하고 있는 동생, 가족이라는 울타리 안에서 항상 내 편이 되어주고 편안함과 든든함을 안겨 주었던 사랑하는 우리 가족에게 이 논문을 바칩니다.

참고문헌

Andrews G.K.. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal Ions. *Biochemical Pharmacology* 59, 95-104.

Aschner M., Cherian M.G., Klaassen C.D., Almiter R.D., Erickson J.C. and Bush A.I.. 1997. Metallothioneins in brain-The role in physiology and pathology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142, 229-242.

Athanasios V., Thomais V., Manos D. and Michael S.. 2005. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental safety*.

Brady F.O.. 1991. Induction of metallothionein in rats. *Metallobiochemistry part B. metallothionein and related molecules*. San Diego, CA., Academic press.

Carol H.M.Y. and King M.C. 2002. Characterization of zebrafish metallothionein gene promoter in a zebrafish caudal fin cell-line, SJD.1. *Marine Environmental Research* 54 , 335-339.

Chana P.C., Shiu C.K.M., Wong F.W.Y., Wong J.K.Y., Lama K.L., and Chan K.M.. 2004. Common carp metallothionein-1 gene : cDNA cloning, gene structure and expression studies. *Biochimica et*

Biophysica Acta 1676, 162-171.

Cheung A.P.L., Lam T.H.J. and Chan K.M.. 2004. Regulation of tilapia metallothionein gene expression by heavy metal ions. Marine Environmental Research 58, 389-394.

Dabrio M., Rodriguez A.R., Bordin G., Bebianno M.J., Ley M.D., Šestáková I., Vašák M. and Nordberg M.. 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. Journal of Inorganic Biochemistry 88, 123-134.

Filipovi V. and Raspor B.. 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the eastern Adriatic sea. Water Research 37, 3253-3262.

Edit H., Magdolna A. and Janos N. 2001. Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 128, 457-465.

John H.B., Hannah L.H.O., Shona M.W., John R.A., Kwun I.S., Gabrielle M. H., and Heather M.W.. 2005. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. Toxicology Letters 157, 69-78.

Kägi J.H.R., Himmelhoch S.R., Whanger P.D., Bethune J.L. and Vallee B.L.. 1974. Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition and metal content. *Journal of Biological Chemistry* 249, 3537-3542.

Kim D.S., Nam Y.K. and Park I.S. 1995. Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquaculture* 135, 257-265.

Kojima Y.. 1988. Metalloproteins : chemical properties and biological effects. *Bioactive Molecules* 8, 539-544.

Kojima Y., Berger C., Vallee B.L. and Kagi J.H.R.. 1976. Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 3413-3417.

Lange A., Ausseil O. and Segnera H.. 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131, 231-243.

Linde A.R., Sánchez-Galán S., Klein D., García-Vázquez E. and Smet H.D., Wachter B.D., Lobinski R. and Blust R.. 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp

Cyprinus carpio during cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 52, 269-281.

Muhammad Z., Keith B., and Lashitew G. 1988. Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Molecular and Cellular Biology* 8, 4469-4476.

Nam Y.K., Noh C.H. and Kim D.S. 1999. Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture* 172, 229-245.

Robert D.A., Susan J.T., Sandy W., Greg B., Bill L., and Harvey R.H. 1987. Metal-dependent binding of a factor in vivo to the metal-responsive elements of the metallothionein 1 gene promoter. *Molecular and Cellular Biology* 7, 3574-3581.

Ron V.D.O., Jonny B., Nico P.E. and Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13. 57-149.

Ruth A.H., Simona R., Matthew J.W., Patrick J.B., Elisabetta A., Edwin W.T., and Kevin C.. 2004. Cloning of a chub metallothionein cDNA and development of competitive RT-PCR of chub metallothionein mRNA as a potential biomarker of heavy metal exposure. *Marine Environmental Research* 58, 665-669.

Sambrook J., Russell D.W. and Sambrook. J.. 2001. Molecular cloning : A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Searle P.F., Davison B.L., Stuart G.W., Wilkie M., Norstedt G., and Palmiter R.D.. 1984. Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Molecular and Cellular Biology* 4, 1221-1230.

Stillman, Shaw M.J., Suzuki C.F. and Kazuo T.. 1992. Metallothionein : synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatin and metal-thiolate complexes. VCH Publishers.

Summer K.H.. 1999. Metallothionein and Heavy metals in brown trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): A comparative study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 168-173.

Suzuki, Imura K.T., Nobumasa and Kimura M.. 1993. Metallothionein III: biological roles and medical implications.

Varshney U., Jahroudi N., Foster R., and Gedamu L.. 1986. Structure, organization, and regulation of human metallothionein IF gene : differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. *Molecular and Cellular Biology* 6, 26-37.

Vašák M. and Hasler D.W.. 2000. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 177-183.

Vasconcelos M.H., Tam S.C., Hesketh J.E., Reid M. and Beattie J.H.. 2002. Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182, 91-97.