



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

참가리비(*Patinopecten yessoensis*)로부터  
*myostatin* 유사 유전자에 대한 특성 연구



해양생물학과

박 창 욱

이 학 박사 학 위 논 문

참가리비(*Patinopecten yessoensis*)로부터  
myostatin 유사 유전자에 대한 특성 연구

지도교수 유 명 숙

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함.

2007 년 8 월

부경대학교 대학원

해양생물학과

박 창 욱

박창욱의 이학석사 학위논문을 인준함.

2007. 7. 12



주 심 이 학 박 사 김 현 우 (인)

위 원 수 산 학 박 사 남 기 완 (인)

위 원 농 학 박 사 유 명 숙 (인)

## 목 차

<i>Abstract</i> .....	ii
<i>I. 서 론</i> .....	1
<i>II. 실험재료 및 방법</i> .....	3
1. 실험재료 .....	3
2. Cloning Py-MSTN gene .....	4
3. Quantification of expression Py-MSTN gene .....	5
4. Amino acid sequence analysis .....	5
5. Molecular modeling .....	6
<i>III. 결과 및 고찰</i> .....	8
1. Cloning of Py-MSTN gene .....	8
2. Amino acids sequence comparison .....	12
3. Expression of Py-MSTN .....	16
4. Modeling of Py-MSTN .....	19
<i>IV. 요약</i> .....	24
<i>V. 참고문헌</i> .....	25

*Characterization of myostatin-like gene from the scallop,  
Patinopecten yessoensis*

Chang Uk Park

*Department of Marine Biology, Pukyong National University  
Busan 608-737, Korea*

**Abstract**

Myostatin (GDF8) is a growth factor that limits muscle tissue growth and development in vertebrates. We isolated a myostatin-like gene (Py-MSTN) from the marine invertebrate, scallop (*Patinopecten yessoensis*). Py-MSTN was highly expressed in the adductor muscle and in the gill unexpectedly. Amino acid analysis showed that Py-MSTN has 49% amino acid sequence identity and 64% similarity to human myostatin (Hs-MSTN), and 42% identity and 61% similarity to myoglianin, the only invertebrate homolog. These results indicated that Py-MSTN may be functionally similar to the vertebrate MSTN than the invertebrate homolog. Phylogenetic analysis suggested that Py-MSTN is an ancestral form of vertebrate MSTN and GDF11 and does not belong to other TGF- $\beta$  family members. Molecular modeling showed that Py-MSTN exhibits a similar tertiary structure to mammalian BMP7, a member of TGF- $\beta$  family. In addition, the amino acid residues which contact extracellular domain of the receptor were relatively conserved. Given these results, we propose that Py-MSTN is a functionally active member of the TGF- $\beta$  family and is involved in muscle growth and regulation.

## I 서 론

Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )는 polypeptide 성장인자이다. TGF의  $\alpha$ 와  $\beta$  두 종류가 있지만, 이들 이름은 임의적으로 지어진 것으로 분자 구조적, 유전적으로 아무런 연관이 없고 또한 다른 수용 메카니즘을 가진다. Myostatin이 속하는 TGF- $\beta$ 는 많은 isoform을 가지며 이들이 가지고 있는 기능은 매우 다양하여 세포의 증식, apoptosis, 분화, 그리고 각 기관의 형태형성뿐 아니라 경골과 연골의 형성과 유지에 각기 독특한 작용들을 하는 것으로 알려져 있다 (Massague and Chen, 2000; Yamaguchi et al., 2000). Myostatin은 TGF- $\beta$ 의 superfamily 중 Growth differentiation factor (GDF) 중 8번째에 속하며 조직의 성장과 발달에 관여한다. GDF 계열은 성장과 분화에 관여한다고 알고 있었으나 그 정확한 기능과 메카니즘에 대해서 밝혀지지 않아 이름 대신 번호로 명명되어 왔다.

소 (McPherron and Lee 1997)와 쥐 (McPherron, Lawler et al. 1997)의 이중근육화 현상을 연구하던 중 이 현상이 GDF-8의 돌연변이에 의한 것이라는 사실을 최초로 발견하였고 GDF-8은 근육의 성장과 발달에 억제자 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 이후 인간, 돼지, 닭, 어류를 포함하는 다양한 척추동물로부터 많은 myostatin 유전자들을 분리하고 분류하여 연구하였다. 어류에서는 대부분 myostatin 유전자의 duplication이 나타나는 특징이 있는데, 이것은 포유류와의 중요한 차이점이다.

포유류에서 근육 발달을 억제하는 기능을 하는 이 역할자를 제거하였을 때 근육이 증가하였다. 최근 연구에서 *Danio rerio* 의 myostatin-1 gene을 knock-down 하였더니 MyoD와 myogenin뿐만 아니라 IGF-II 같은 muscle-specific 전사 요인들의 발현이 증가하였다. 더 최근에 zebrafish에

dsRNA를 주입하였더니 early development 단계에서 myostatin mRNA의 격감으로 증생 (hyperplasia) 또는 비대 (hypertrophy) 현상이 나타났다. 이처럼 척추동물에서의 myostatin 연구는 많이 이루어져왔지만, 무척추동물의 myostatin homolog에 대해서는 연구가 거의 전무한 실정이다. 가장 유연 관계가 가까운 myostatin homolog 중 하나는 *Drosophila melanogaster*의 myoglianin이다. 하지만 단백질 크기가 척추동물의 것보다 훨씬 큰 598개의 아미노산잔기를 가진다.

*Patinopecten yessoensis*는 내한성 종으로 북태평양에 서식하며 한국에서는 반도 북동부 강원도가 주요산지이다. 가리비의 패각근은 식용으로 한국 해산물 시장에 중요한 위치를 차지한다. 가리비의 양성기간은 약 2~3년인데, 가리비의 근 성장과 발달을 조절할 수 있다면 수확기간을 줄일 수 있고 상품가치를 높일 수 있을 것으로 예상된다.

그러므로 가리비의 골격근 성장과 발달의 조절에 대한 이해와 연구는 다른 무척추동물 근육 발달 조절 메커니즘의 연구에 기여할 수 있어 과학적으로 매우 중요한 연구일 뿐만 아니라, 근육 성장과 발달에 관여하는 분자 메커니즘을 조절해서 근육 성장의 조절과 제어를 통해 상업적으로 적용하여 사용할 수 있는 가능성이 있다.

우리는 참가리비 *Patinopecten yessoensis*에서 무척추동물의 myostatin 유사 유전자를 분리하였다. 가리비의 myostatin 유사 유전자 (Py-MSTN)도 다른 MSTN과 마찬가지로 근육에서 많이 발현되는 것으로 나타났다. 그리고 sequence alignment 결과와 구조 모델 분석 결과를 통해서 Py-MSTN이 척추동물의 MSTN와 같은 또는 유사한 유전자에서 유래했을 것이라고 예상할 수 있었다. 또한 Py-MSTN과 척추동물의 MSTN은 같은 수용기가 결합하고 그 신호전달체계가 매우 유사한 것으로 생각되어진다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

참가리비 *Patinopecten yessoensis*는 우리나라 동해와 일본에 많이 분포하는 한류성 이매패류로 사새목 가리비과에 속한다. 주로 10~30m 모래자갈 바닥에 서식하며 각장 약 20cm, 각고 19.5cm, 각폭은 5cm 정도에 이른다. 좌패각은 자갈색으로 오목하고 우패각은 흰색을 띄며 좌패각보다 더 오목하며, 원형에 가까운 부채 모양이다. 방사륜은 24~26개이며 우패각 귀 부분에 족사가 나오는 홈이 있고 좌패각 표면에는 섬세한 비늘 모양이 있으며 패각 안쪽은 흰색을 띤다.

양 패각을 힘껏 여닫으며 해수를 밀어내면서 이동하는 만큼 패각근이 잘 발달한 종으로서, 그 패각근은 식용으로 큰 상업적 가치를 가지기 때문에 한국 해산물 시장에 중요한 위치를 차지한다. 최근 해수온난화 현상과 먹이의 부족, 해양오염의 심화 등으로 품질이 저하되고 생산량이 감소하면서, 품종 개량의 필요성이 커지고 있다.

이 연구는 myostatin이 가리비의 근육 성장과 발달에 관여하는 분자 메커니즘을 구명함을 목적으로 수행하였다.

## 2. Cloning Py-MSTN gene

RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 가리비의 폐각근 조직에서 total RNA를 추출한 다음 Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen)로 total RNA로부터 mRNA를 분리하였다. 정제된 mRNA는 정량분석한 후 cDNA 합성할 때까지 deepfreezer에  $-80^{\circ}\text{C}$ 로 보관하였다. mRNA는 MMLV reverse transcriptase (Invitrogen)으로 역전사하고 oligo-dT primer를 사용하여 PCR 증폭하였다.

GeneBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 얻어진 다양한 myostatin 아미노산 서열을 분석하여 degenerate primer를 만들어 nested RT-PCR로 myostatin의 cDNA를 합성하였다.

MSTN F1과 R1으로 1차 PCR ( $94^{\circ}\text{C}$ , 30s;  $50^{\circ}\text{C}$ , 20s;  $72^{\circ}\text{C}$ , 30s; 35 cycles) 증폭하였고 1차 PCR product  $1\mu\text{l}$ 를 template으로 사용하여 1차 PCR과 같은 조건으로 2차 nested PCR을 하였다. 증폭된 PCR product를 2% agarose gel에 전기 영동하여 확인하고 정제하여 TOPO/pCR 2.1 (Invitrogen)로 cloning 하였다. 양성의 colony들을 선별하여 LB broth 배지에 배양하였다. Plasmid는 QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)을 사용하여 정제하였고 automated DNA sequencer를 사용하여 DNA sequence를 구하였다. RACE (Rapid amplification of cDNA ends) system (Invitrogen Inc.)을 사용하여 mRNA 일부 염기서열로부터 3' 말단부까지 염기서열을 증폭하였다. 2차 nested PCR에 두 개의 forward primer를 3' RACE에 사용하였다 (Table 1).

### *3. Quantification of expression Py-MSTN gene*

RT-PCR로 조직별 Py-PSTN 발현 정도를 추정하였다. 합성된 cDNA로부터 Py-MSTN을 cloning하였다. 그리고 DNase (Promega Inc.) 처리하여 cDNA mixture 안에 genomic DNA를 제거하였다. 정량화한 후에 조직별로 cDNA 500ng을 template으로 하나의 specific forward primer와 reverse primer를 디자인하였다. PCR 조건은 94°C, 30s; 62°C, 20s; 72°C, 30s; 35 cycles로 하고 PCR product는 2% agarose gel에 전기 영동하여 확인하고  $\beta$ -actin을 증폭하여 대조군으로써 비교하였다.

DNA Engine Opticon 2 Real-Time PCR Detection System (Bio-rad)으로 Real-time PCR 하여 조직별 발현 정도를 측정하였다. 조직별로 정량한 cDNA를 합성하여 100ng씩 각 반응에 사용하였다. SYBR premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa Bio Inc.)를 사용하여 위 PCR과 같은 조건으로 real-time PCR을 수행하였다. 모든 PCR product는 agarose gel에 전기 영동하여 재확인하였다. 정량분석한 카피수는 standard curve로 나타냈다 (Kim, Chang et al. 2005).  $\beta$ -actin gene의 발현 또한 발현 단계를 표준화하여 의뢰하였다.

### *4. Amino acid sequence analysis*

아미노산 코딩영역을 확인하기 위하여 웹 기반의 ORF finder 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)을 이용해서 Py-MSTN의 nucleotide sequence와 다른 TGF- $\beta$  멤버들과 align하였다. 7개의 MSTN (gil6016121, gil48314966, gil6754752, gil113912357, gil47825371, gil14646885, gil14646883),

4개의 GDF11 (gil6649914, gil47085753, gil109480148, gil6649923), 3개의 bone morphogenetic protein (BMP3) (gil8392993, gil27734166, gil4557371) 무척추동물의 homolog인 myoglianin (gil4580679)의 아미노산 sequence를 multi align하였다. 어류에서는 두 개씩의 MSTN 유전자들의 카피가 나타났는데, 대표적으로 무지개 송어의 MSTN 아미노산 sequence (om-MSTN1 &2)를 포함시켰다. 인터넷의 clustalw 프로그램 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)으로 각 단백질의 peptide을 분석하고 phyldraw 프로그램 (<http://pearl.cs.pusan.ac.kr/phyldraw>)을 사용하여 계통수를 만들어 Py-MSTN과 다른 종의 MSTN 그리고 TGF- $\beta$  family내 다른 멤버들 간의 진화적 유연관계를 비교하였다.

## 5. Molecular modeling

Py-MSTN의 모델링은 공간 구속조건에 기초한 방법을 이용한 단백질 구조의 비교모형 프로그램인 MODELLER (<http://salilab.org/modeller>)를 사용하였다. 이 방법은 template가 되는 단백질의 아미노산들 또는 원자들 사이의 거리를 측정 후, 이 거리를 조건 (restraint)으로 사용하여 query 단백질의 3차 구조를 만들어낸다.

모델링은 single template를 기초로 하여 이것과 비교한 모델링을 다음 5 단계로 조직하였다; 관계구조 동정, template 선택, 구조 배열, template 구조에 기초한 모델 구축, 모델 평가. 밝혀진 Py-MSTN 구조와 잠재적으로 관계있는 sequence 중 중복되지 않는 PDB (Protein Data Bank) sequence들을 찾고 sequence 일치도와 e-value에 의해 유사한 대표 표지 template을 선택하였다. 우리는 10개의 후보 template를 구하였다. 이들

template들은 대부분 적합성을 검토하여 1bmp의 sequence를 선택하였다. Py-MSTN sequence는 1bmp에 대하여 align하였다. Py-MSTN의 3D 모델은 1bmp의 구조를 기초로 automodel module MODELLER를 사용하여 자동 계산하였다. MODELLER의 DOPE potential과 PROCHECK 프로그램으로 MODELLER의 objective 기능에 의해 산출된 5 모델 중에서 최소값을 선택하여 평가하였다.



### III. 결과 및 고찰

#### 1. Cloning of *Py-MSTN* gene

*Py-MSTN*의 유전자를 클로닝하기 위해서 아미노산들이 결합하여 한 기능을 하기 때문에 다른 종들의 *MSTN* 아미노산단백질을 형성할 때 같은 아미노산 서열을 가지면 그 단백질이 유사로부터 degeneracy primer를 디자인하고 nested PCR 하였다. PCR 결과 예상한 size에서 밴드가 형성되었고 이 파살의 sequencing 결과 *MSTN*과 유사한 sequence를 구했다. 이 sequence를 가지고 RACE를 primer를 디자인하여 PCR 하였다.

*MSTN* homolog로 동정된 두 개의 sequence는 오버랩 되는 영역을 포함하고 있었다. 두 연속된 sequence를 specific primer와 “TAA”를 stop codon으로 사용하여 3' RACE를 확인하였다. 5' RACE 또한 5' upstream sequence로 실행하였으나 실패하였다. 비록 우리는 모든 frame을 얻지는 못했지만 *MSTN*의 기능하는 전체 sequence의 충분한 sequence를 확보하였다 (Fig. 1).

Table 1. Oligonucleotide primers used for the study of scallop myostatin

name	sequence	description
MSTN F1	5'-RTNGARGCNYTNGAYGAR-3'	degenerate forward primer-1
MSTN F2	5' TGYTGYMGNTAYCCNYT-3'	degenerate forward primer-2
MSTN R1	5'-SWRCANCCRCANCKATC-3'	degenerate reverse primer-1
MSTN R2	5'-RCANCCRCANCKATCNAC-3'	degenerate reverse primer-2
Py-MSTN F1	5'-TTTGGGTGGGACTTTGTGATAGCTC-3'	first primer for 3'RACE
Py-MSTN F2	5'-TGATTCAGCAAGCACCGTCCCCAACA-3'	nested primer for 3'RACE
Py-MSTN F3	5'-AAAGTTCCAACCAAACGAGAAATCGG-3'	specific primer for RT-PCR
Py-MSTN R1	5'-CTATCACAAAGTCCCACCAAACGC-3'	specific primer for RT-PCR



```

GCA GAG GCT TTG GAT GAG ACT GGC CGC AAC GTG GTA GTG CTT CCC CCA ACT TTT GGG GTA
A E A L D E T G R N V V V L P P T F G V
AAT GAC GGA TAC GAA CCA ATG TTG GAC ATG CGT ACA TCT CTA AGG AAG AGT ACA CGC TCC
N D G Y E P H L D H R T S L R K S T R S
AGG AGR TCA ACA GAG CTC TAT TGT GAC CAG CGA GAA GAG ACC GCC TGC TGC AGR TAT CCG
K R S T E L Y C D Q R E E T A C C R Y P
TTG GAA GTT GAT TTT GTT GCG TTT GGG TGG GAC TTT GTG ATA GCT CCT TTA ACT TAC GCT
L E V D F V A F G W D F V I A P L T Y A
GCC TAT CRC TGC GCC GGT GAA TGC AAG GGT GAA CAA TTG GAC GAT ACT CTT CAT GCT CAC
A Y H C A G E C K G E Q L D D T L H A H
GTG ATT CAG CAA GCA CCG TCC CCA ACA CTA AGC CCG CCA CAG TCA GCG CTG AGC AAT GTC
V I Q Q A P S P T L S P P Q S A L S N V
GGT CCG TGC TGC ACC CCG ACT AAA ATG TCC GAC CTA GCC ATG CTT TTC TTC GAT CAT AAC
G P C C T P T K H S D L A H L F F D H N
TCC AAC ATA GCA TTA ACG CGA TTG CCC AGG ATG AAA GTA GAC AGR TGT GGT TGT GCG TAA
S N I A L T R L P R H K V D R C G C A *

```

**Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the C-terminus of Py-MSTN.**

The proteolytic processing site (RXXR) is underlined. All nine conserved cysteine residues are boxed. The asterisk indicates the stop codon.

Py-MSTN의 분석결과 몇 가지 흥미로운 사실들이 나타났다. 먼저, 단백질 분해 과정이 일어나는 site (RSKR)를 발견하였다. proprotein convertase의 family에 속하는 furin이라 불리는 serine protease에 의해 척추동물 MSTN이 만들어진다 (PC) (Lee and McPherron 2001). Furin이 보존된 RXXR sequence를 인지하고 분열시켜 N-terminal Latency Associated Peptide (LAP)와 C-terminal mature MSTN peptide를 분리시킨다 (Thomas, Langley et al. 2000). 이 결과 가리비의 Py-MSTN이 furin-like 단백질의 기질이 된다는 것을 밝혀졌다. 인간은 적어도 9개의 다른 proprotein convertase를 가지고 있지만 가리비나 그 homolog에 대한 논문은 아직 보고되지 않았다.

Py-MSTN 또한 9개의 cysteine 잔기가 보존되어 있다 (Fig. 1). MSTN은 다른 TGF- $\beta$  family와 같이 3개의 이황화물 고리가 달려있는 형태로 6개의 cysteine 잔기가 아주 잘 보존되어 있다. cysteine 2번과 3번 형태가 cysteine 5번과 6번과 함께 이황화물 띠로 되어있고, 3번째 띠가 cysteine 1번과 4번 사이에 세번째 띠로 각각 이루어져 있다. Py-MSTN cysteine 잔기는 잘 보존되어있어 다른 MSTN과 TGF- $\beta$  family와 비슷한 3차원 구조를 가지는 Py-MSTN이 표지된다. 척추동물의 MSTN과 비교하여 Py-MSTN은 추가적으로 specific receptor에 결합하기 위해 중요한 'heel'이라 부르는  $\alpha$  helix 구간을 포함하며 9개의 아미노산 잔기가 cysteine 3번과 4번 사이에 가진다.

## *2. Amino acids sequence comparison*

Py-MSTN과 다른 종들의 MSTN 아미노산 유사성을 비교해보기 위해서 MSTN들의 아미노산 서열과 같은 TGF- $\beta$  family에 속하지만 기능적으로 유사하지 않은 다른 BMP3의 아미노산 서열을 함께 multiple alignment 하였다. 검은색으로 나타나 보이는 것이 아미노산이 잘 보존되어 있는 것을 나타낸다 (Fig. 2). 척추동물의 BMP3와는 차이가 있으면서 무척추동물의 myoglianin보다는 척추동물의 MSTN과 더 유사한 것을 확인할 수 있었다.

Py-MSTN의 mature peptide는 모든 다른 MSTN과 GDF11에 비하여 9개의 잔기가 더 길어 104개의 아미노산 잔기를 포함한다. 실제로 MSTN과 GDF11 사이의 아미노산 사이에는 gap이 없었으며 다른 척추동물과 비교하여 90% 이상의 아미노산이 유사하였다.

		1		2	3					
Mm-MSTN	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EFVF	---	LQKYPHTHLVHQA	:	50
Hs-MSTN	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EFVF	---	LQKYPHTHLVHQA	:	50
Ss-MSTN	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EFVF	---	LQKYPHTHLVHQA	:	50
Gg-MSTN	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EFVF	---	LQKYPHTHLVHQA	:	50
Bt-MSTN	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EFVF	---	LQKYPHTHLVHQA	:	50
Om-MSTN2	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EYMH	---	LQKYPHTHLVNKA	:	50
Om-MSTN1	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EYMH	---	LQKYPHTHLVNKA	:	50
Hs-GDF11	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EYMF	---	MQKYPHTHLVQQA	:	50
Rn-GDF11	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EYMF	---	MQKYPHTHLVQQA	:	50
Mm-GDF11	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EYMF	---	MQKYPHTHLVQQA	:	50
Dr-GDF11	:	CCRYPLTVDFEAFGW	-	DWIIAPKRYKANY	CSGCE	EYMF	---	MQKYPHTHLVQQA	:	50
Py-MSTN	:	CCRYPLEVDFEAFGW	-	DFVIAPLTYAAYHCAGE	CKGEO		---	LDDTLHARVIQQA	:	50
Dm-MGLN	:	CCRYPLKVNFTSEGW	-	HFVVAPTSFDAYEC	SGDCK	VG	---	LEQYPHTHLAALT	:	50
Rn-BMP3	:	CARRYLKVDADIGWSEWII	SPKSF	DAYCSGAC	QFPMPKSLKPSNHATI	Q	SIV	:	54	
Mm-BMP3	:	CARRYLKVDADIGWSEWII	SPKSF	DAYCSGAC	QFPMPKSLKPSNHATI	Q	SIV	:	54	
Hs-BMP3	:	CARRYLKVDADIGWSEWII	SPKSF	DAYCSGAC	QFPMPKSLKPSNHATI	Q	SIV	:	54	

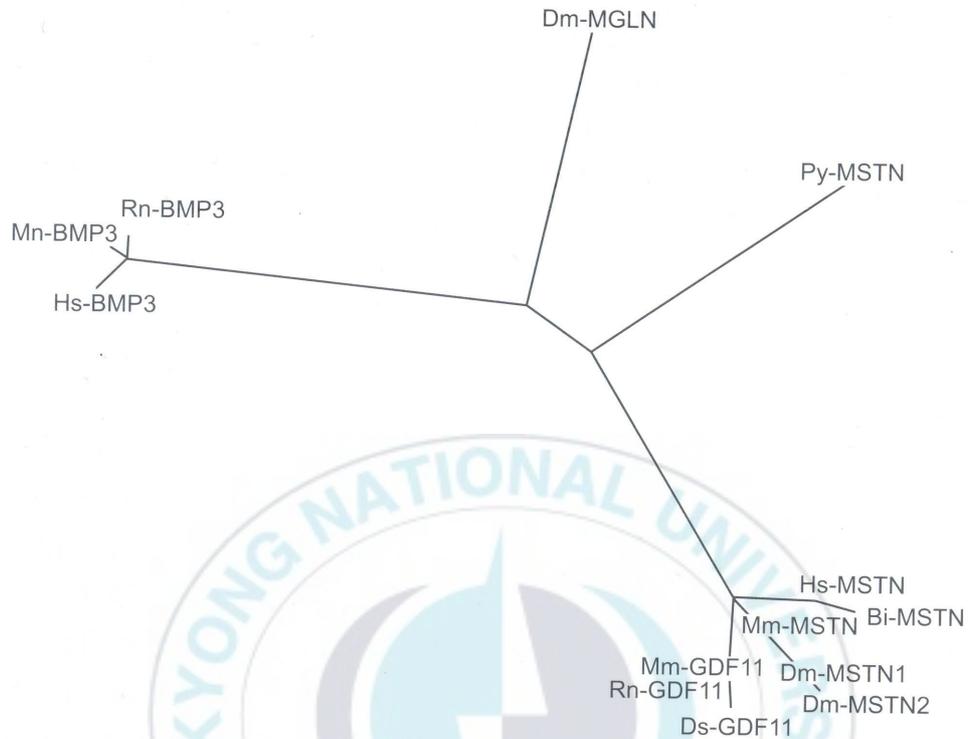
  

			4		5	6	
Mm-MSTN	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNGKEQII	YGKIPAMVVDRCCCS		: 95
Hs-MSTN	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNGKEQII	YGKIPAMVVDRCCCS		: 95
Ss-MSTN	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNGKEQII	YGKIPAMVVDRCCCS		: 95
Gg-MSTN	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNGKEQII	YGKIPAMVVDRCCCS		: 95
Bt-MSTN	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNGEGQII	YGKIPAMVVDRCCCS		: 95
Om-MSTN2	:	N-----PR---	GTAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNRKEQII	YGKIPSMVVDRCCCS		: 95
Om-MSTN1	:	N-----PR---	GTAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNRKEQII	YGKIPSMVVDRCCCS		: 95
Hs-GDF11	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNDKQOII	YGKIPGMVVDRCCCS		: 95
Rn-GDF11	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNDKQOII	YGKIPGMVVDRCCCS		: 95
Mm-GDF11	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNDKQOII	YGKIPGMVVDRCCCS		: 95
Dr-GDF11	:	N-----PR---	GSAGPCCTPTKMSPI	NMLYFNDKQOII	HGKIPGMVVDRCCCS		: 95
Py-MSTN	:	PSPTLSPPPQSALS	NVGPCCPTPTKMSD	LAMLFFDHNSNIAL	TRLP	RMKVDRCCCA	: 104
Dm-MGLN	:	T-----SAT	PCCSPKMSLS	LLYFDNHNLL	LSVIP	PNMSVEGCSCS	: 92
Rn-BMP3	:	R-----AVGVV	SGIPEPCCVPEKMS	LSILFFDENKNV	LKVYP	NMTVDS	CACR : 103
Mm-BMP3	:	R-----AVGVV	SGIPEPCCVPEKMS	LSILFFDENKNV	LKVYP	NMTVDS	CACR : 103
Hs-BMP3	:	R-----AVGVV	SGIPEPCCVPEKMS	LSILFFDENKNV	LKVYP	NMTVDS	CACR : 103

**Fig. 2. Comparison of the deduced amino acid sequences of the TGF- $\beta$  family.**

The sequence of Py-MSTN was aligned with other vertebrate myostatins (MSTNs), growth and development factors (GDF11s), and bone morphogenic factors (BMP-3s) using ClustalW program. Arabic numerals indicate the conserved cysteine residues for intra-molecular disulfide bonds.

이들 결과는 척추동물의 MSTN과 GDF11이 Py-MSTN과 기능적으로 매우 비슷하다는 것을 보여준다. Py-MSTN과 인간의 MSTN과 67%, GDF11과 65%로 유사하게 나타났다. 포유류의 GDF11은 골격근 뿐만 아니라 뇌, 지아 (limb bud), 치수 (dental pulp)와 같은 몇몇 다른 조직에서도 발현된다 (Nakashima, Toyono et al. 1999). 각 조직에서와 발달단계에서의 자세한 기능은 아직 명백하지 않지만, GDF11은 중축골격과 척추동물 발생에 필요하다고 보인다 (McPherron, Lawler et al. 1999). 결과로부터 Py-MSTN은 척추동물 GDF11, MSTN과 같은 유전자로부터 기원하여 최근에 GDF11과 MSTN으로 분화하였다고 생각되며 이는 계통수 분석 결과로 이 가설을 얻을 수 있었다 (Fig. 3). Py-MSTN은 척추동물의 MSTNs, GDF11s, BMP3 그리고 다른 TGF- $\beta$  family들과도 거의 같았으며 이는 Py-MSTN이 MSTN과 GDF11 그리고 다른 TGF- $\beta$ 들과 같은 원시 유전자로부터 기원하였다고 생각된다. GDF11과 MSTN의 두 그룹으로 분화된 이후, 어류의 MSTN에서 최근에 중복되어 두 개의 카피를 가지게 되는 것을 보여 준다.



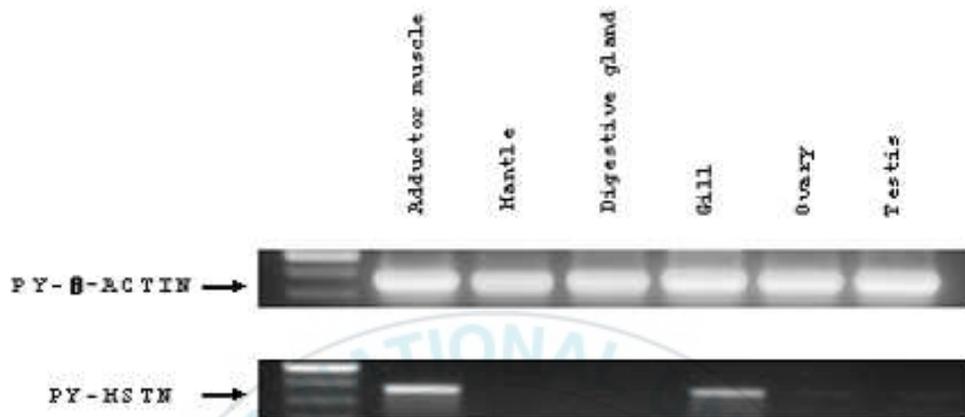
**Fig. 3. Phylogenetic tree of the TGF- $\beta$  family members based on the amino acid sequence similarity.**

The phylogenetic tree for TGF- $\beta$  was generated using the neighbor-joining method with the GeneDoc program. The distance along each branch represents the unbiased unrooted evolutionary distance. Genebank accession numbers :gi|6016121, gi|48314966, gi|6754752, gi|113912357, gi|47825371, gi|14646885, gi|14646883, gi|6649914, gi|47085753, gi|109480148, gi|6649923, gi|8392993, gi|27734166, gi|4557371, gi|4580679.

### 3. Expression of Py-MSTN

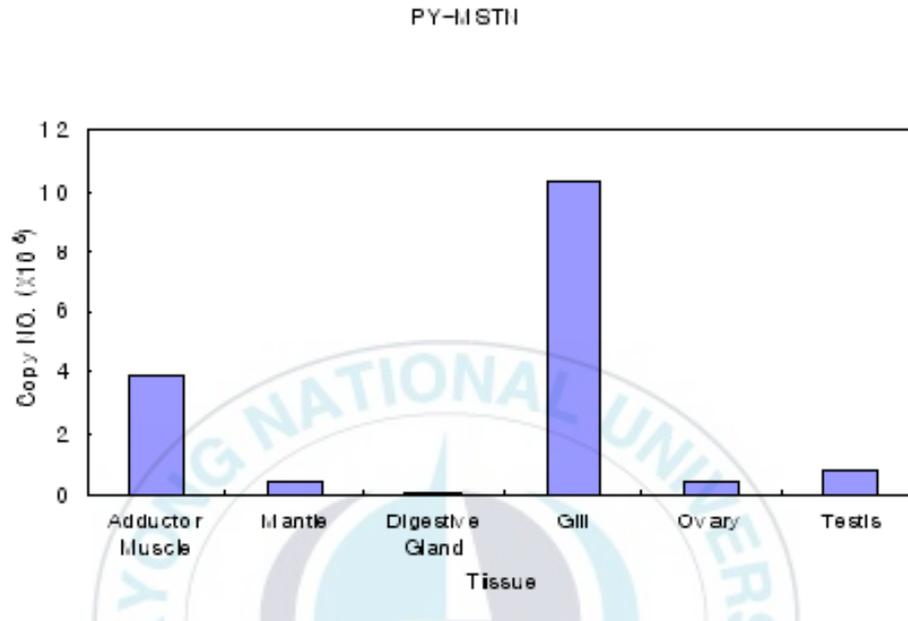
Py-MSTN이 조직별로 발현되는 것을 확인하기 위하여 PCR 하였더니 예상대로 폐각근에서 밴드가 확인되었다. 이 결과는 Py-MSTN이 가리비의 근육 성장 조절에 관여한다는 사실을 강하게 뒷받침해준다. 하지만 예상외로 아가미에서도 MSTN이 발현하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). Real time PCR 결과 폐각근보다 오히려 아가미에서 두 배 이상 MSTN이 발현되는 것으로 나타났는데, 이 현상에 대한 연구는 근육 발달의 자세한 기작과 함께 더 많은 연구가 필요하다 (Fig. 5). 또한 난소와 정소, 외투막에서도 적은 양이 발현되는 것을 확인하였다.

포유류는 근육의 발달에 있어서 억제자로서 그 역할이 규명되어있으나 적어도 두 개 카피의 MSTN 유전자를 포함하는 어류에 있어서는 그 발현 양상이 다소 다르다 (Rescan, Jutel et al. 2001). 이외에도 Py-MSTN mRNA의 양 또한 난소와 정소, 외투막 등 다른 조직들에 비해 적다. 어류에 있어서 Py-MSTN의 발현은 생식기관에 있어서 성공적인 배 발생을 위해서 중요하다 (Vianello, Brazzoduro et al. 2003).



**Fig. 4. Expression of Py-MSTN genes in various tissues.**

Regular RT-PCR was carried out and amplicons were run on 2% agarose gel for 20 min. The  $\beta$ -actin gene was used as a positive control (a).



**Fig. 5. Real-time RT-PCR analysis of Py-MSTN mRNA expression in different tissues.**

Each copy number out of 100ng of total RNA was measured by constructing the standard curves referring threshold (Ct) values of Py-MSTN. T<sub>m</sub> values were used to reconfirm each value.

#### 4. Modeling of Py-MSTN

Py-MSTN의 모델링은 알려진 3차 구조의 template으로 대상이 되는 Py-MSTN sequence의 alignment와 함께 시행되었다. 다음 Py-MSTN sequence와 구조의 관계에 대하여 연구하였다. 데이터베이스에서 구한 35개의 sequence 중에 10개의 구조 (PDB ID codes 1bmp, 3bmpA, 1es7a, 1es7C, 1lx5A, 1lxiA, 1reuA, 1rewA, 1rewB and 1m4uL)가 e-value 제로로 Py-MSTN sequence의 40%를 차지하였다. 이들 구조들은 이후에 비교하고 cluster하였다. 마지막으로, alignment가 가장 길고 sequence가 일정하며 결정 해상도가 좋은 1bmp가 single template으로 선택되었다.

Py-MSTN이 TGF- $\beta$  family와 동일한 구조를 가지는지 알아보기 위하여 아직 알려지지 않은 MSTN 대신 기능적으로 유사한 bone morphogenic protein-7 (1bmp) BMP7의 3차원 구조 모델과 비교하였다. 앞에서 설명한 다른 TGF- $\beta$ 의 구조와 같이 finger와 heel이 이항결합되어 있었다.

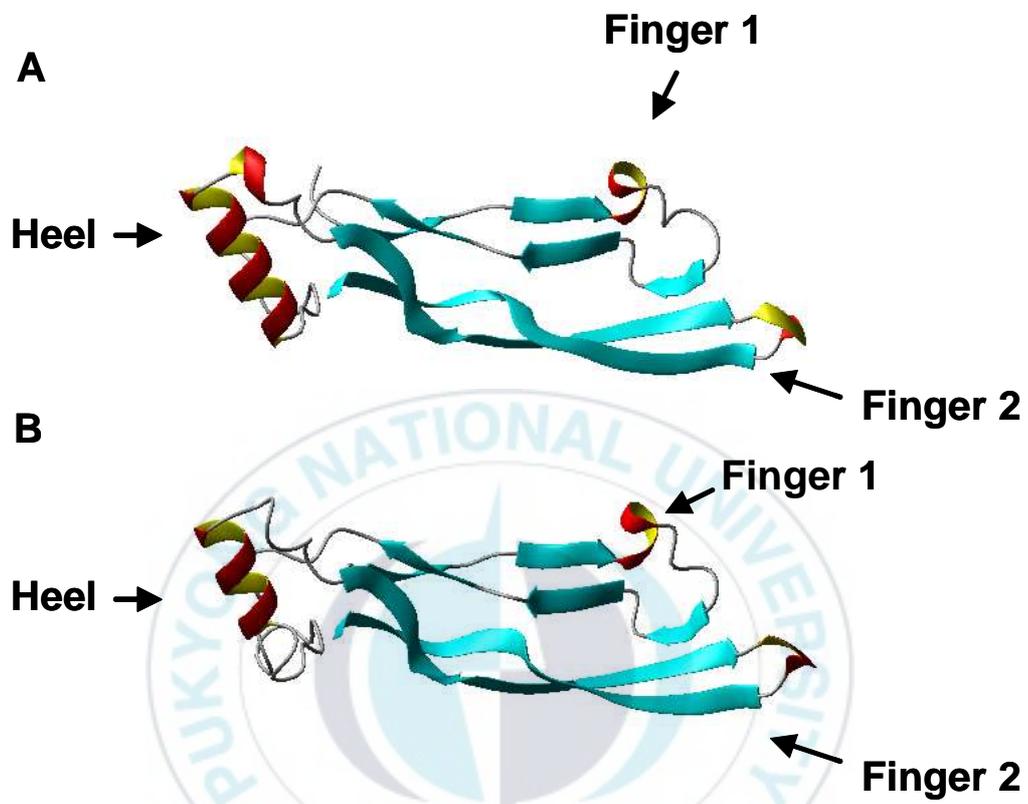
모델의 질은 MODELLER의 모델 평가 모듈과 PROCHECK 프로그램으로 평가하였다. 에너지 레벨은 전자의 모듈을 사용하여 구하였으며 모델의 에너지가 1bmp template와 비교하여 얻었다. Ramachandran plot Py-MSTN 구조는 bone morphogenic protein-7의 결정구조와 Py-MSTN 입체화학적 질 전체와 비교하여 후자의 프로그램을 이용하여 추정하였다. Py-MSTN 구조 모델의 Ramachandran plot 분석 결과, 가장 좋은 구간에서 잔기는 88.6%, 가장 낮은 구간에서 10.2%로 나타났다. 이들 평가로 전체 모델이 알맞은 것으로 확인되었다. 이 결과 Py-MSTN는 TGF- $\beta$  family의 멤버로 기능적으로 유사한 3차원 구조를 가지는 것으로 밝혀졌다.

Py-MSTN은 Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )의 하나인 단백질이다. TGF- $\beta$  superfamily에는 많은 X-ray 결정 구조가 있을 수 있다

(Griffith, Keck et al. 1996; Allendorph, vale et al. 2006). 이 superfamily와 유사하게 공유하는 sequence의 C말단 부분은 Py-MSTN 모델과 비교하여 같은 fold를 가진다 (Fig. 6). 모델은 세가지 구조 요소를 가진다; finger 1, 2 그리고 heel. 두 finger-like가 투영된 것은 역평행  $\beta$ -sheet 형태의 4대 요소이다.  $\alpha$ -helix은 두 finger를 축으로 수직으로 위치한다.

TGF- $\beta$  superfamily는 TGF- $\beta$ , activin (세포분화를 촉진), BMP (골형성성장인자), inhibin (뇌하수체에서 FSH(follicle stimulating hormone 여포자극호르몬)분비를 억제), growth/differentiation factor (GDF, 성장분화 인자) 등을 포함하는 단백질성 cytokine들의 일족으로, 특이한 cystine-knot 구조 (S-S결합에 의해 매듭처럼 묶인 구조)들을 가지며, dimer를 형성하고, 처음 발현, 분비되었을 때는 활성이 없는 latent form으로 분비되는 특징을 가지고 있다.

TGF- $\beta$  superfamily의 멤버들은 특정 type I과 type II serine/threonine kinase 수용기에 상호 작용하여 생물학적인 기능을 실행한다. Figure 7A에서 BMP-7의 잔기는 수용기에 녹색으로 하이라이트 되어 나타냈다. TGF- $\beta$ 의 하나인 Py-MSTN은 유사한 수용기를 가지는 BMP-7과 비교했을 때 수용기가 결합하는 위치가 아주 유사한 사실로 미루어보아 활성화되었을 때 기능적으로도 아주 유사할 가능성이 높을 것이라 생각된다 (Fig. 7).



**Fig. 6.** Ribbon representation of 3D structures of (A) BMP-7 (PDB ID code 1bmp, template) and (B) Py-MSTN (target).

The  $\beta$ -sheets are displayed as arrows and the  $\alpha$ -helix is represented as a tube.



Py-MSTN의 아미노산 sequence 49%가 인간의 myostatin (Hs-MSTN)과 64% 일치, Drosophila의 무척추 homolog 61%와 42%만 일치하는 것은 Py-MSTN이 무척추동물의 homolog보다 척추동물의 MSTN과 더 기능적으로 유사하다는 것을 의미한다.

계통수 분석 결과, Py-MSTN이 척추동물의 MSTN과 GDF11 그리고 TGF- $\beta$ 의 다른 family의 원시적인 형태로 나타났다.

분자 모델링 결과, Py-MSTN이 TGF- $\beta$  family 중 포유류의 BMP7의 3차 구조와 유사하게 나타났으며 BMP7과 Py-MSTN의 수용기에 결합하는 아미노산 잔기가 유사하게 보존되어 나타났다. 이러한 결과들로부터 Py-MSTN이 TGF- $\beta$  family로써 기능하고 근육의 성장과 조절에 크게 관여한다는 사실을 알 수 있었다. 현재 가리비를 제외한 다른 해양무척추동물에서의 myostatin 유사 유전자에 대한 연구는 전무한 실정이다. 이후 좀 더 많은 연구를 통해서 근육성장의 조절과 제어가 가능해진다면 본 종의 품종 개량을 통하여 양식현장에 적용할 수 있을 것으로 본다.

## IV. 요약

Myostatin(GDF-8)은 척추동물 근육 조직의 성장과 발달을 제한하는 성장 인자이다. 우리는 해양 무척추동물 가리비 (*Patinopecten yessoensis*)로부터 myostatin 유사 유전자 (Py-MSTN)를 분리했다. Py-MSTN은 패각근 뿐만 아니라 아가미에서도 많이 발현되는 것으로 나타났다. 아미노산 분석에 의하면 Py-MSTN의 아미노산 sequence 49%가 인간의 myostatin (Hs-MSTN)에 대하여 64% 일치하는 반면 *Drosophila*의 무척추 homolog 61%에 대하여 42%만 일치하는 것으로 나타났다. 이 결과는 Py-MSTN이 무척추동물의 homolog보다 척추동물의 MSTN과 기능적으로 더 유사하다는 것을 의미한다. 계통수 분석 결과, Py-MSTN이 척추동물의 MSTN과 GDF11 그리고 TGF- $\beta$ 의 다른 family의 원시적인 형태인 것으로 나타났다. 분자 모델링 결과, Py-MSTN이 TGF- $\beta$  family 중 하나인 포유류의 BMP7의 3차 구조와 유사하게 나타났다. 또한, BMP7과 Py-MSTN의 수용기에 결합하는 아미노산 잔기가 유사하게 보존되는 것으로 나타났다. 이들 결과로부터 우리는 Py-MSTN이 TGF- $\beta$  family의 한 종류로 기능하고 근육의 성장과 조절에 크게 관여한다는 것을 밝혔다.

## V. 참고문헌

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., Gonzalez, O., and Estrada, M.P. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol* 119(4): 324-331.
- Allendorph, G.P., Vale, W.W., and Choe, S. 2006. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20): 7643-7648.
- Amali, A.A., Lin, C.J., Chen, Y.H., Wang, W.L., Gong, H.Y., Lee, C.Y., Ko, Y.L., Lu, J.K., Her, G.M., Chen, T.T., and Wu, J.L. 2004. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev Dyn* 229(4): 847-856.
- Biga, P.R., Roberts, S.B., Iliev, D.B., McCauley, L.A., Moon, J.S., Collodi, P., and Goetz, F.W. 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141(2): 218-230.

- Griffith, D.L., Keck, P.C., Sampath, T.K., Rueger, D.C., and Carlson, W.D. 1996. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 878–883.
- Jespersen, J., Kjaer, M., and Schjerling, P. 2006. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scand J Med Sci Sports* 16(2): 74–82.
- Kim, H.W., Chang, E.S., and Mykles, D.L. 2005a. Three calpains and ecdysone receptor in the land crab *Gecarcinus lateralis*: sequences, expression and effects of elevated ecdysteroid induced by eyestalk ablation. *J Exp Biol* 208(Pt 16): 3177–3197.
- Kim, H.W., Lee, S.G., and Mykles, D.L. 2005b. Ecdysteroid-responsive genes, RXR and E75, in the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: differential tissue expression of multiple RXR isoforms generated at three alternative splicing sites in the hinge and ligand-binding domains. *Mol Cell Endocrinol* 242(1–2): 80–95.
- Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, T.T., Wu, J.L., Chen, J.C., and Lu, J.K. 2006. Molecular Cloning of Myostatin Gene and Characterization of Tissue-Specific and Developmental Stage-Specific Expression of the Gene in Orange Spotted Grouper, *Epinephelus coioides*. *Mar Biotechnol* (NY).

Kocabas, A.M., Kucuktas, H., Dunham, R.A., and Liu, Z. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim Biophys Acta* 1575(1-3): 99-107.

Lee, K.J., Kim, H.W., Gomez, A.M., Chang, E.S., Covi, J.A., and Mykles, D.L. 2007. Molt-inhibiting hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: Cloning, tissue expression, and expression of biologically active recombinant peptide in yeast. *Gen Comp Endocrinol* 150(3): 505-513.

Lee, S.J. and McPherron, A.C. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9306-9311.

Lo, P.C. and Frasch, M. 1999. Sequence and expression of myoglianin, a novel *Drosophila* gene of the TGF-beta superfamily. *Mech Dev* 86(1-2): 171-175.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387(6628): 83-90.

- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. 1999. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth / differentiation factor 11. *Nat Genet* 22(3): 260-264.
- McPherron, A.C. and Lee, S.J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12457-12461.
- Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A., and Joyner, A. 1999. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 80(2): 185-189.
- Nishi, M., Yasue, A., Nishimatu, S., Nohno, T., Yamaoka, T., Itakura, M., Moriyama, K., Ohuchi, H., and Noji, S. 2002. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 247-251.
- Rescan, P.Y., Jutel, I., and Ralliere, C. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 204(Pt 20): 3523-3529.
- Stratil, A. and Kopecny, M. 1999. Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. *Anim Genet* 30(6): 468-470.

Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., and Kambadur, R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275(51): 40235-40243.

Vianello, S., Brazzoduro, L., Dalla Valle, L., Belvedere, P., and Colombo, L. 2003. Myostatin expression during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *J Endocrinol* 176(1): 47-59.

Yang, J., Ratovitski, T., Brady, J.P., Solomon, M.B., Wells, K.D., and Wall, R.J. 2001a. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 60(3): 351-361.

Yang, W., Wang, H.X., Chen, Y., Zhang, Y., and Zhu, D.H. 2001b. Cloning, expression and purification of the chicken growth and differentiation factor-8. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 17(4): 460-462.

Massague J and Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000;14:627-644.