

최 종
연구보고서

양식어류의 성장과 내병성 관련 유전자 확보 및 산업화

Isolation and Use of the Genes Related to Growth and
Disease Resistance of Aquacultural Fishes

2005. 12

제주대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “양식어류의 성장과 내병성 관련 유전자 확보 및 산업화” 과제의
최종보고서로 제출합니다.

2005년 12월 20일

주관연구기관명 : 제주대학교

총괄연구책임자 : 송 춘 복

연 구 원 : 이 제 희

연 구 원 : 허 문 수

연 구 원 : 여 인 규

연 구 원 : 전 유 진

요 약 문

I. 제 목

양식어류의 성장과 내병성 관련 유전자 확보 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

유전자 조작기술을 통하여 소의 성장호르몬 유전자 분리와 재조합 성장호르몬의 생산이 가능하게 되어 가축 단백질의 생산성 향상과 젖소로부터 우유생산의 생산성 극대화를 위해 실용화하고 있는 단계에 있다. 그러나 어류를 비롯한 양식생물을 대상으로 한 유전자재조합 기술의 응용은 상대적으로 소수에 불과하다. 어류의 재조합 성장호르몬 생산은 벨기에나 일본과 같은 외국에서는 어류의 성장호르몬 유전자 분리와 재조합 기술을 이용하여 생산된 재조합 호르몬을 물질 특허화 하고 있다. 우리나라에서도 최근에 미꾸리, 범가자미, 자바리 등 소수의 어류 성장호르몬 유전자가 분리된 바 있다. 따라서 특허를 통한 외국으로부터의 기술장벽을 최소화하고 선진국의 기술패권주의를 극복하여 21세기의 우리나라 양식산업의 국제 경쟁력 강화를 위해서 주요 양식 어류의 성장관련 유전자의 분리가 최단 시간 내에 조속히 이루어져야 하겠다.

성장호르몬(GH)은 Agnatha(무악구동물)를 제외한 전 척추동물에서 발견되며 척추동물분류 집단 간에 상당한 차이가 있다. 그런데 기본적으로 하나의 유전자에서 진화되어 온 단백질의 구조 및 기능은 일반적으로 유전적인 유연관계가 가까우면 가까울수록 효율적으로 작용할 것으로 예상되기 때문에 성장호르몬 처리나 유전자도입을 통한 보다 안정적이고 효율적인 성장증진 효과를 가져 오기 위해서는 양식대상 어류와 동일한 성장관련 유전자 및 promotor를 대상으로 한 연구가 필요하다고 생각된다.

형질전환동물에 관한 연구는 생물학의 많은 분야에 있어서 획기적인 공헌을 하게 되었다. 즉, 발생의 조절기작, 조직특이적인 유전자 발현, 면역학적 연구, 암연구 등

에 이용되어 왔다. 보다 최근에는 이러한 연구의 산업적 응용방안 특히, 가축이나 양식어류를 대상으로 생산성에 관련되는 형질 즉 성장증진, 내병성, 내한성 등에 관해서 활발하게 연구가 진행되고 있다. 왜냐하면 선택교배를 통한 전통적인 방법에 의한 생산성에 관련된 표현형질의 개량은 높아야 연 1-3%로 매우 느리며, 선택교배 시 목표로 하는 특정형질과 바람직하지 못한 형질의 분리 개량이 어려운 점, 그리고 대부분의 경우 중간교배가 불가능하기 때문이다. 이러한 장점에도 불구하고 transgenic 어류의 산업화를 위하여서는 아직까지 해결해야 할 몇 가지 문제가 있다. 즉 성장관련 유전자를 이용한 형질전환어류생산의 목적이 사람들의 소비를 위한 어류의 생산성 향상에 있기 때문에 gene construction시에 건강의 유해 가능성과 소비자들의 소비기피를 막을 수 있도록 하는 것을 고려해야 한다. 즉 중금속을 이용한 promotor induction이나 viral promotor의 이용을 통한 성장증진을 피해야 할 것이다. 따라서, vector 개발시 이러한 점을 고려하여 대상 어류근원의 유전자를 분리 사용해야 한다고 생각된다.

어병은 소독과 정확한 진단을 통한 항생제 또는 화학약품을 사용하여 어느 정도 억제할 수 있으나 때때로 비용이 많이 들어 경제성의 문제가 있으며 사용약품이 유출되어 주위 환경을 오염시킬 수 있고 특히 항생제의 반복사용으로 인한 내성균의 출현이 심각한 실정에 있다. 최근에는 백신개발을 통하여 어병을 예방하기 위한 기술개발을 시도하고 있으나 성공한 경우는 극히 소수에 불과하며 수많은 어병에 대한 개별적인 백신개발은 한계를 나타내고 있는 실정이다. 따라서, 어병에 대한 장기적인 대책으로 어류 자체가 가지는 내병성 관련 유전자에 관한 연구가 시도되고 있으며 이는 다양한 종류의 병원 미생물에 범용적으로 작용하기 때문에 여러 수산 선진국에서 활발히 연구가 진행되고 있어 우리나라에서도 어병의 신속진단이나 백신개발과 단기적인 어병 대책과 함께 장기적인 어병대책이 필요하다고 생각된다.

한편, 유전자 재조합기술의 발전을 통해 다양한 유용 유전자가 분리, 이식되어 산업적으로 이용되고 있으나 이들 재조합 단백질의 인체 안전성 문제에 관해서 많은 논란을 벌여왔다. 따라서 양식 어류의 유용 유전자 확보를 통한 산업화를 이루기 위해서는 인체의 안전성 문제가 전제되어야 하기 때문에 이 연구에서는 우리나라의 주요 양식대상 어류의 세포를 배양하여 외래 유전자의 도입에 의해 생성된 물질의 성질을 천연물질과 직접 비교함과 동시에 인간의 세포주에 있어서 미치는 영향이 어떠한가를 파악하여 인체에 미치는 유해성 여부를 판단하여야 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 주요양식어류로부터 총 10개의 유용유전자를 분리, 확보한다.
 - * 성장호르몬 cDNA 유전자 분리 : 주요양식어류(조피볼락, 붉바리, 능성어, 돌돔, 넙치류, 참복, 뱀장어, 쏘가리)중 4종으로부터 분리
 - * Insulin-like growth factor (IGF-1) : 8종의 주요양식어류(조피볼락, 붉바리, 능성어, 돌돔, 농어, 참복, 뱀장어, 쏘가리) 중 3종으로부터 분리
 - * Zebrafish로부터 내병성관련 cDNA 유전자인 transferrin과 thioredoxin 유전자 분리
 - * 백터 개발을 위한 promotor로서 대상어류의 β -actin 유전자 분리
- 연구대상 어류의 재조합 성장호르몬 단백질 생산한다.
- 재조합 단백질을 급이하거나 백터 주입 실험을 통하여 성장효과를 검증한다.
- 연구대상 어류의 속성장 형질전환어류를 생산한다.
- 모델어류를 이용하여 내병성 유전자로 형질전환시킨 후 감염실험을 통해 효과를 검증한다.
- 연구대상 어류의 세포배양법 확립한다.
- 형질전환어류 및 재조합성장호르몬 급이 어류의 식품으로서의 안전성을 검증한다.

IV. 연구개발 결과

- 주요양식어류 6종(붉바리, 참복, 능성어, 넙치, 돌돔, 감성돔)으로부터 성장호르몬 cDNA 유전자 분리하였음.
- 주요양식어류 5종(자주복, 능성어, 붉바리, 돌돔, 자바리)으로부터 Insulin-like growth factor (IGF-1)의 분리하였음.
- Zebrafish로부터 내병성관련 transferrin과 thioredoxin (natural killer cell enhancement factor) cDNA 유전자를 분리하였으며 주요양식어류 5종(능성어, 조피볼락, 돌돔, 붉바리, 자주복)의 transferrin internal sequence 단편을 얻음.
- 백터개발을 위한 promotor로서 넙치, 참복, 돌돔, 붉바리, 자바리, 능성어의 6종으로부터 β -actin 유전자와 zebrafish의 thioredoxin promotor 분리하였음.

- 계획서 상에 총 10개의 유용유전자를 분리하는 것으로 했으나 5개의 transferrin internal sequence 단편을 포함하면 총 25개의 유전자를 분리하였음.
- 연구대상 어류의 재조합 성장호르몬 단백질 생산하였음.
- 재조합 단백질의 성장효과를 검증하였음.
- 모델어류를 이용하여 이식백터의 발현양상을 조사하였음.
- 연구대상 어류의 세포 계대배양법을 확립하였음.
- 재조합성장호르몬의 식품으로서의 일부의 안전성을 검증하였음.

V. 활용에 대한 건의

Cavari et al (1993)은 사람과 소의 growth hormone (GH)을 해산어인 *Sparus aurata*에 적용하여 15%의 성장효과를 가져왔고, Heo et al (1996)도 recombinant bovine somatotropin (rBST)을 넙치에 투여하여 현저한 성장효과가 있었다고 보고하였고, 무지개 송어를 비롯한 이스라엘 잉어, 뱀장어, 넙치를 대상으로 rBST 처리구와 대조구 간의 성장 차이를 조사한 결과 무지개 송어는 1회 투여한 지 1-2주, 이스라엘 잉어의 경우는 3-4주, 뱀장어는 1-2주, 넙치는 3-4주부터 현저하게 나타나서 성장호르몬 투여효과를 보이는 시기는 어종에 따라 차이가 있는 것으로 보고하였다.

성장호르몬의 투여효과와 수온간의 관계에 관하여 Danzmann et al (1990)은 수온을 높혀 사육한 무지개송어에서는 bGH, rtGH의 성장 촉진 능력이 제한된다는 것을 증명하였다. 연어계 어류를 온수온에서 혹은 거의 비슷하게 하여 사육하면, GH 투여가 성장률에는 별 영향이 없지만, 비축된 에너지를 활성화할 수 있게 재배치함으로써 다른 생리학적 과정을 변화시킬 수 있다. 고수온에서 사육한 무지개 송어에서도 GH 투여가 성장률보다 생식선과 다른 신진대사 작용에 크게 영향을 미쳤다고 보고하였다. 즉, 여분의 에너지가 유용할 때만 체중 증가를 자극하기 때문에 rtGH, bGH 투여는 오직 저수온에서 사용했을 때만이 효과적으로 성장을 자극한다고 하였다. 그리고 성장향상을 위한 외인성 성장호르몬(GH)의 효과에 관한 대부분의 연구결과가 성장에 적합한 높은 수온보다는 낮은 수온에서 성장이 증가하였다고 보고하였다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 성장호르몬은 넙치를 비롯한 다양한 어종에서 성장 호

과가 인정되었고, 신진대사 값이 비교적 낮은 저수온에서 그 효과는 더 확실하였다. 따라서, 자연해수를 이용하여 사육을 하거나, 적수온내에서 사육수온이 비교적 낮은 동절기에 성장호르몬을 이용한다면, 성장촉진 효과와 더불어 출하시기를 앞당길 수 있고, 난방비의 절약으로 생산비의 절감을 가져올 수 있어 경제적으로 큰 이익을 가져올 것으로 기대되나, 산업적으로 이용이 가능하려면 상품 단가의 절충이 먼저 이루어져야 할 것으로 생각되며, 각기 다른 어류들은 다른 종류의 성장호르몬에 다르게 반응하므로(Cavari et al., 1993) 이 연구에서 얻은 자바리 재조합 성장호르몬은 앞으로 개발 유망품종인 능성어류의 양식 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 생각된다.

또한, 이 연구에서 개발된 형질전환 어류생산을 위한 백터와 관련 기술을 양식대상 해산어류를 대상으로 활용함으로써 보다 효율적인 양식생산성 향상을 추구할 수 있을 것으로 생각되며 이들 연구 결과는 앞으로 개발 기술의 산업화에 역점을 둔 연구를 계속할 필요가 있다고 생각된다.

한편, Heo et al (1996)이 아급성 독성실험 결과에 의하면 100, 200 mg/kg/day를 사료에 혼합하여 30일간 투여한후 60일간 섭이, 성장, 폐사상황 등을 관찰한 결과 모든 어종에서 폐사 개체는 물론 아무런 이상을 발견할 수 없었다. 또한 반수생존농도(TLm_{48h})는 넙치의 경우 2,000 ppm 이상이었고, 성어의 경우 1,000 ppm 이하에서는 폐사 개체가 전혀 없었으며, 외관상 또는 임상증상에 있어 이상 소견이 관찰되지 않는 결과를 얻어서 급이 대상 어류에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이와 관련하여 앞으로 재조합 성장 호르몬을 투여한 어류의 시판을 위하여 재조합 성장 호르몬을 급이한 어류를 포유류에 급이하여 아급성 독성실험을 통하여 인체에의 유해 가능성을 조사함으로써 향후 있을지 모를 소비자의 소비기피 성향에 적극적으로 대처할 필요가 있다고 생각된다.

Summary

I . Research subject

Isolation and use of the genes related to growth and disease resistance of aquacultural fishes

II . Purpose and importance of the research

DNA recombinant technology can allow us to artificially reconstruct the gene in vitro. The gene is transferred to the host cell and it can replicate and express steadily in the cell. According to the development of such technologies, physiologically vital peptides or proteins including human insulin, growth hormone, interferon, virus vaccine are utilized to overcome some inherent or acquired diseases. In addition, as the industrial importance of enzyme reaction was recognized, the related market size has been increased dramatically. Also, in order to apply such techniques for dairy husbandry, cattle's growth hormone gene was separated to produce the recombinant growth hormone (GH). The recombinant GH was fed to domestic animals for maximization of milk production. Therefore, the technology of gene recombination is embossed as a promising field for the 21th century and one of greatest technological revolution that the human achieved in the 20th century (Primose, 1991). On the other hand, the research or practical application of gene recombination technology to aquatic farm animals including fishes have been relatively few. Sekine et al (1985) was reported on the production of growth hormone cDNA separation of chum salmon. At the foreign countries such as Belgium and Japan, separated fish growth hormone genes and recombinant hormones (e.g. Patent US 4849359 ; US 5545808) were registered as material patents. In Korea, the growth hormone genes from muddy loach, spotted halibut, kelp grouper have been isolated and insulin-like growth factor (IGF) was from olive flounder. Therefore, the separation of growth and disease associated genes of major hatchery fishes has to be achieved as soon as possible in order to minimize technology wall from advanced nations through

patent, and to enhance international competitiveness as well. Growth hormone (GH) exists in all vertebrate except Agnatha and there are considerable differences in structure and function between taxonomic groups of vertebrates. It was previously observed that non-mammalian GH did not affect to the human beings. Due to the structural differences, the GH receptor of the human cells and tissues has low affinity to the non-mammalian GH (Lesniak and Roth, 1976). Some reports said that the growth hormone of bony fishes hardly affects mammalian growth but the growth hormone of cattle promotes growth of bony fishes, whereas other report mentioned that abhorrent effect of cattle growth hormone on the growth of fishes (see Wallis, 1989). As the effects of growth-related proteins on fish growth would not be a simple but complex pathways of physiological process in the body, there are many things to be clarified with regard to the function of growth-related proteins in the body. However, many proteins have evolved from their ancestral protein originated from one gene, and thus a protein isolated from the more closely related species usually act more effectively than a protein from distantly related species. Growth enhancement with transgenic fish or recombinant growth hormone treatment will be more effective when we use the growth hormone gene or a proper promotor originated from the same fish species that we want them to grow faster. Transgenic animal study has begun with the mouse as a model animal since the beginning of the 1980s (Gordon et al . 1980) and largely contributed to many fields of the biology including control mechanism of development, tissue specific gene expression, cancer research, etc. Later, such transgenic researches had been expanded to several other animals such as *Xenopus*, *Drosophila*, rabbit, sheep, pig, etc. The problems of genetic improvement related to productivity through traditional selective breeding are as followed: 1) by using such method, the phenotypic characters can be changed by 1 to 3% annually. 2) during the selective breeding, it would be very hard to separate a desirable character from an undesirable one. 3) interspecific cross breeding are impossible in most occasions.

The research on a transgenic fish using the growth hormone gene had begun with inserting the human growth hormone gene and the promoter of mouse metallothionein gene into the goldfish by Zhu et al (1985). Later, many researches focused on the improvement of transgenic efficiency, confirmation of transgene and transgene expression by using Chanel catfish, tilapia, crucian carp, rainbow trout, etc. With the isolated growth hormone cDNAs from rainbow trout and chinook salmon, the transgenic researches have

been attempted by several researchers. For example, Du et al (1992) reported growth augmentation of average 2–6 time in the transgenic Atlantic salmon, whereas Delvin et al (1994) mentioned that the transgenic coho salmon showed growth effect of maximum 37 times with weight gain of average 11 times than control group when they were 14 months old. Success production of transgenic loach were reported in our country. In spite of this study, there are some problems to be solved for industrialization of transgenic fishes. That is, because the purpose of transgenic fish production using growth-related genes is to elevate productivity for people's consumption, we must consider that there is no poisonous possibility of health and consumption evasion of consumers due to transgene construction. That is, we should avoid promotor induction using heavy metals or viral promotor for growth improvement. Therefore, it would be better to use the genes of target fish origin when transgenic vector is constructed. On the other hands, as the farmed fishes are faced with various kinds of environmental changes including habitat movement (nature to nursery), increase of rearing density, environmental deterioration, and living together with the mixed populations having a different origin, they would be vulnerable to fish pathogens. Fish diseases are partly controllable by disinfection or using antibiotics or chemicals after correct diagnosis. However, there is still several problems to be solved such as economic performance due to too much expenses, environmental pollution by the discharge of antibiotics or chemicals to surroundings, and appearance of antibiotic resistant bacteria due to the repeated use of antibiotics. Recently, the attempts to overcome fish disease by way of vaccine development has nearly succeeded (Engelking and Leong, 1989) and such strategies were shown to have a limitation. Therefore, in the advanced countries the study on the fish genes related with disease endurance has attempted as a long-term countermeasure about fish disease, which can be applicable to various kinds of pathogenic bacteria. We also need both a short-term and long-term plan to minimize economic losses due to fish disease. On the other hand, there are a lot of controversies about safety issues of recombination protein, although many isolated genes are utilized for industrial through development of DNA recombination technology. When bovine growth hormone is medicated to the cattle, it brought 10–25% augmentation of milk production. The FDA concluded that no harmfulness caused by consuming milk of the cattle was detected due to the bovine growth hormone (Wallis, 1989). No studies have been attempted to understand the effects of the growth-related proteins or other recombinant

proteins expressed in the fish body on the human health so far. In order to accomplish industrialization through using the economically important genes of hatchery fishes, the safety of such products on the human body should be premised. Therefore, this study was conducted to judge the possibilities of harmfulness of transgenically produced proteins in the cultured fish cells either by comparing to the naturally produced proteins or by examining the effect on the human cell line.

III. The proposed research contents and scope

- Separation of total 10 useful genes from major hatchery fishes.
 - * Separation of the growth hormone cDNA genes from 4 out of 8 fish species (black rock fish, red grouper, seven banded grouper, rock bream, flatfishes, purple puffer, eel, mandarin fish).
 - * Separation of the Insulin-like growth factor (IGF-1) from 3 out of 8 fish species (black rock fish, red grouper, seven banded grouper, rock bream, sea bass, purple puffer, eel, mandarin fish).
 - * Separation of cDNAs of transferrin and thioredoxin from the zebrafish.
 - * Separation of β -actin gene to be used as a promoter in the expression vector.

- Production of recombinant growth hormone from a selected fish.

- Growth effects are verified by either the administration of recombinant proteins or microinjection of the constructed vector.

- Production of a fast-growing transgenic fish.

- Growth effects are verified with the disease resistant transgenic zebrafish through a challenge test.

- Establishment of cell culture method of the olive flounder.

- Safety verification of transgenic fishes and the fishes provided recombinant growth

hormone as food fishes.

IV. The results of research

- Separated growth hormone cDNA genes from 6 major hatchery fish species (red grouper, purple puffer, seven banded grouper, olive flounder, black bream, black porgy).
- Separated Insulin-like growth factor (IGF-1) from 5 major hatchery fish species (red grouper, purple puffer, seven banded grouper, black bream, kelp bass).
- Separated cDNAs of transferrin and thioredoxin from the zebrafish and got internal transferrin DNA sequence fragments from 5 major hatchery fish species (red grouper, purple puffer, seven banded grouper, black bream, black rock fish).
- Separated β -actin genes from 6 fish species (olive flounder, purple puffer, black bream, red grouper, kelp bass, seven banded grouper) and promotor region of the zebrafish thioredoxin gene to be used as a promotor.
- Total 10 useful genes are supposed to be isolated according to the proposal, whereas the total of 25 genes were isolated if 5 internal sequence fragments of the transferrin gene are included.
- Produced recombinant protein of the growth hormone from black bream.
- Verified the effect of recombinant protein on the growth of the fish.
- Investigated the patterns of transgene expression in the zebrafish.
- Established cell culture method for olive flounder.
- Verified the safety of recombinant fish growth hormone by administering it to the mouse.

V. The plan for the practical uses of research results.

Cavari et al (1993) reported the growth effect of 15% when human and bovine growth hormone were treated to a marine fish, *Sparus aurata*. Heo et al (1996) medicates recombinant bovine somatotropin(rBST) to flatfish and there was obvious growth effect. In addition, when rBST was administered to various fishes, distinct growth effects after a treatment were shown 1–2 weeks later in rainbow trout, 3–4 weeks later in Israel carp, 1–2 weeks in eel and 3–4 weeks in olive flounder. Therefore, the effects were varied according to the kinds of fish species. Danzmann et al (1990) verified that the degree of growth promotion of both bovine (bGH) and rainbow trout growth hormone (rtGH) is limited at the culture condition of high temperature. However, salmonids may change their physiological processes in their body although there is no obvious effects on their growth at the warm water temperature. That is, the treated growth hormone at the condition of high temperature seemed to affect the reproductive gland and other metabolism rather than their growth of the rainbow trout.

In other words, rtGH or bGH medication can stimulate the growth effectively at the low water temperature, not at the high temperature. Most of studies on the effect of exogenetic growth hormone (GH) for growth elevation indicated that the growth was increased at lower than at higher water temperature. Based on the results mentioned above, growth promotion effect of growth hormone was recognized in various kinds of fishes including flatfish, and it was especially obvious at the condition of lower water temperature. Therefore, if the growth hormone is used for the fishes rearing at the natural water or during the winter time, fishes will be marketable earlier than usual and the heating cost will be also largely reduced. A large amount of economical benefit will be gained due to the dramatic increase of productivity. Also, the techniques relating to the production of transgenic fishes in this study will be applied to other major hatchery fishes and the productivity elevation of such fishes can be achieved by development of the technologies emphasizing the aspect of industrialization. Concerning on the safety of the recombinant growth hormone (rGH), Heo et al (1996) reported that there was no abnormal or dead individuals during the observation period of 60 days when the feed was mixed with the bovine growth hormone (100, 200mg/kg/day) and fed them to fish for 30 days. In addition, TLm (tolerance concentration, median) was higher than 2,000 ppm in olive flounder and no external or clinical abnormalities were observed in the adult

fishes cultivated at the rGH concentration of less than 1,000 ppm. However, only few researches regarding on this issue have been conducted so far. In the future, through the more detail and active investigations on the possibility of being poisonous to the human body can be tested by doing sub-acute toxicity experiments. It will be necessary to actively cope with consumer's consumption evasion by investigating on the fish treated with recombinant growth hormone.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적 및 필요성

1. 기술적 측면
2. 경제·산업적 측면
3. 사회·문화적 측면

제 2 절 연구개발 범위

1. 연차별 연구목표 및 범위
2. 최종 연구목표 및 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술현황

제 2 절 국내 기술현황

제 3 절 문제점

제 4 절 앞으로의 전망

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구방법

1. 성장과 내병성 관련 유전자의 cloning 및 염기서열 결정
2. 재조합 성장호르몬의 생산
3. 형질전환 어류생산
4. 유용유전자 단백질의 경구 투여에 의한 성장효과
5. Transgenic fish의 유전자 이식 및 발현 확인
6. 어류병원성 세균 균주 확보 및 감염시험을 통한 내병성 검증
7. 어류세포의 배양법 확립

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 유용유전자 분리

- 가. 성장호르몬 유전자
 - 나. 베타액틴 유전자
 - 다. Insulin-like growth factor
 - 라. Natural killer cell enhancement factor (NKEF) 유전자
 - 마. 내병성관련 유전자인 zebrafish의 transferrin 유전자 분리
 - 바. 주요 양식대상어종의 transferrin 유전자 단편 분리
2. 재조합 성장호르몬의 생산
- 가. 서론
 - 나. pET expression system을 이용한 돌돔 성장호르몬의 발현 및 분리
 - 다. 돌돔 재조합 성장호르몬의 급이에 의한 성장효과 검증실험
3. 분리된 베타액틴 유전자를 이용한 이식벡터개발
- 가. 유전자 이식 벡터 개발
 - 나. 형질전환 어류생산 조건의 최적화와 생산율의 비교
 - 다. 모델 어류 내에서의 재조합 형질전환 벡터(pFV4aEGF-GH)의 발현 양상
4. 분리 병원균의 병원성 시험
5. 순환여과수조에서 수정란 확보를 위한 감성돔 친어관리 및 산란 유도
- 가. 서론
 - 나. 친어의 확보와 사육
 - 다. 산란유도
 - 라. 난 침강률 측정
 - 마. 난 부화율 측정
 - 바. 치어의 생존율 측정
 - 사. 고찰
6. 해산어류 세포의 계대배양기술개발 및 재조합 단백질의 식품 안전성
- 가. 어류세포의 분리 및 배양조건 확립
 - 나. 쥐의 재조합 성장호르몬의 급성독성 검증

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

Contents

Chapter 1. Introduction of research background

1. Purpose and importance of the research
 - A. Technical aspects
 - B. Economic and industrial aspects
 - C. Social and cultural aspects
2. Scope of the research
 - A. Annual research aims and scope
 - B. Final research aims

Chapter 2. Present status of worldwide technique development

1. Present status of foreign techniques
2. Present status of domestic techniques
3. Problems
4. Future perspective

Chapter 3. Research contents to be done and Results

1. Methods
 - A. Cloning and DNA sequencing of growth and disease resistance-related genes
 - B. Production of recombinant growth hormone (rGH)
 - C. Production of transgenic fish
 - D. Growth effects of rGH by oral administration
 - E. Gene transfer and transgene expression in transgenic fish
 - F. Challenge test with an isolated fish pathogen
 - G. Establishment of culture methods for the fish cell
2. Results
 - A. Isolation of useful genes
 - (1) Growth hormone genes

- (2) β -actin genes
- (3) Insulin-like growth factor genes
- (4) Natural killer cell enhancement factor (NKEF) genes
- (5) zebrafish transferrin genes
- (6) Isolated fragments of transferrin genes from fishes

B. Production of rGH

- (1) Introduction
- (2) Expression and isolation of black seabream's rGH
by using pET expression system
- (3) Test for the effects of rGH on black seabream's growth

C. Vector development using β -actin genes

- (1). Transgenic vector development
- (2) Establishment of the conditions for transgenic fish production
to improve fish survival rates
- (3) Expression patterns of the constructed vector (pFV4aEGF-GH) in the zebrafish

D. Pathogenicity test of isolated fish pathogen

E. Management of fish breeder and spawning induction in the recirculating fish tank

F. Establishment of fish cell culture method and safety test of rGH as food

- (1) Isolation of fish cells and establishment of culture conditions
- (2) Acute toxicity test of rGH on the mouse

Chapter 4. Achievement of this research and contribution on relevant research fields

Chapter 5. Future plan for application of the results

Chapter 6. Scientific information collected from the foreign countries
during this research

Chapter 7. References

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

DNA 재조합기술에 의한 유전자 조작으로 유전자를 인위적으로 재구성하고, 경우에 따라서는 종이 다른 생물의 세포 속에 도입하여 그 숙주 내에서 안정하게 복제 유지되도록 하며 나아가서는 그들의 형질발현도 일으킬 수 있게 되었다. 이러한 유전자 재조합 기술을 이용하여 사람의 인슐린, 성장호르몬, 인터페론, 바이러스 백신 등의 생리활성 펩티드나 단백질을 생산함으로써 사람의 선천성 또는 후천성 질병의 극복에 이용하고 있을 뿐만 아니라 제한효소를 비롯한 효소반응의 이용이 여러 방면으로 중요시 됨에 따라 각종 실험용 및 산업용 효소 생산의 시장 규모는 기하급수적으로 증가되고 있다. 또한, 유전자 조작기술을 통하여 소의 성장호르몬 유전자 분리와 재조합 성장호르몬의 생산이 가능하게 되어 가축 단백질의 생산성 향상과 젖소로부터 우유생산의 생산성 극대화를 위해 실용화하고 있는 단계에 있다. 따라서, 유전자 재조합 기술을 이용한 기술분야가 21세기의 가장 고부가가치를 지니는 유망한 분야로 부각되고 있으며 20세기에 인간이 이룬 가장 위대한 기술혁명 중의 하나로 손꼽히고 있다 (Primose, 1991).

반면에, 어류를 비롯한 양식생물을 대상으로 한 유전자재조합 기술의 응용은 상대적으로 소수에 불과하다. 어류의 재조합 성장호르몬 생산은 외국의 경우 Sekine et al (1985)에 의해 chum salmon 성장호르몬 cDNA의 분리 및 *E. coli* vector를 이용한 발현이 보고된 이후 벨기에나 일본과 같은 외국에서는 어류의 성장호르몬 유전자 분리(e.g. Patent US 4849359; US 5545808)와 재조합 기술을 이용하여 생산된 재조합 호르몬을 물질 특허화하고 있다. 우리 나라에서도 최근에 미꾸리(부경대학교), 범가자미(국립수산진흥원), 자바리(제주대학교) 등 소수의 어류 성장호르몬 유전자가 분리된 바 있으며 IGF 유전자의 분리도 넓치에 국한되어 소수 그치고 있는 실정이다. 따라서,

특허를 통한 외국으로부터의 기술장벽을 최소화하고 선진국의 기술패권주의를 극복하여 21세기의 우리 나라 양식산업의 국제 경쟁력 강화를 위해서 주요 양식어류의 성장 관련 유전자의 분리가 최단 시간내에 조속히 이루어져야 하겠다.

성장호르몬(GH)은 Agnatha(무악구동물)를 제외한 전 척추동물에서 발견되며 척추동물분류 집단간에 상당한 차이가 있다. 성장호르몬의 종 특이성에 관해서 non-primate mammalian GH가 사람에 거의 영향을 미치지 않는다는 것이 일찍이 관찰되었으며 구체적으로 이들이 사람의 세포나 조직의 GH receptor에 대단히 낮은 친화성을 보였고 그것은 이들 단백질 사이의 구조상의 차이에 기인하는 것으로 보고된 바 있다(Lesniak and Roth, 1976). 또한, 경골어류의 성장호르몬은 포유류의 성장에 거의 영향을 미치지 않으나 포유류 중 소의 성장호르몬이 경골어류의 성장을 촉진시킨다는 보고가 있으나 오히려 성장저해를 가져온다는 상반된 결과의 보고도 있다(see Wallis, 1989). 어체 내에서의 성장관련 단백질의 효과는 그 자체만으로 만 이루어지는 것이 아니며 이를 받아들이는 receptor 등 생체 내에서 복잡한 반응경로를 통해 이루어지기 때문에 아직까지 생체 내에서의 정확한 역할에 대해서는 밝혀지지 않은 부분이 많다. 그러나, 기본적으로 하나의 유전자에서 진화되어 온 단백질의 구조 및 기능은 일반적으로 유전적인 유연 관계가 가까우면 가까울수록 효율적으로 작용할 것으로 예상되기 때문에 성장호르몬 처리나 유전자도입을 통한 보다 안정적이고 효율적인 성장증진 효과를 가져오기 위해서는 양식대상 어류와 동일한 성장관련 유전자 및 promotor를 대상으로 한 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

1980년대 초기에 모델동물인 mouse를 대상으로 시작된 transgenic animal 연구(Gordon et al., 1980)는 생물학의 많은 분야에 있어서 획기적인 공헌을 하게 되었다. 즉, 발생의 조절기작, 조직특이적인 유전자 발현, 면역학적 연구, 암연구 등에 이용되어 왔다. 그 이후로 transgenic 연구는 *Xenopus*, *Drosophila*, 토끼, 양, 돼지 등으로 확대되어 갔다. 보다 최근에는 이러한 연구의 산업적 응용방안 특히, 가축이나 양식어류를 대상으로 생산성에 관련되는 형질 즉 성장증진, 내병성, 내한성 등에 관해서 활발하게 연구가 진행되고 있다. 왜냐하면 선택교배를 통한 전통적인 방법에 의한 생산성에 관련된 표현형질의 개량은 높아야 연 1-3%로 매우 느리며, 선택교배시 목표로 하는 특정형질과 바람직하지 못한 형질의 분리 개량이 힘든다는 점, 그리고 대부분의 경우 중간교배가 불가능하기 때문이다. 성장호르몬 유전자를 이용한 transgenic fish에 관한 연구는 Zhu et al (1985)이 사람의 성장호르몬 유전자와 생쥐의 metallothionein gene

promoter를 금붕어에 성공적으로 이식한 것을 시작으로 Chourrout et al (1986) 등 많은 연구자들에 의해 주로 이식효율 개선과 이식한 유전자의 확인 및 발현유무에 관한 연구를 차넬메기, 틸라피아, 붕어, 무지개송어 등을 대상으로 행해졌다. 최근에는 rainbow trout와 chinook salmon의 성장호르몬 cDNA가 분리됨에 따라 이를 이용한 유전자이식 연구가 활발히 진행되어 왔으며 실제로 Du et al (1992)는 1세어인 transgenic Atlantic salmon이 평균 2-6배의 성장증가를 보고한 바 있으며, Delvin et al (1994)은 14개월된 transgenic coho salmon의 경우 대조군의 어류에 비해 평균 11배의 체중 증가와 함께 최대 37배의 성장효과를 보고 한 바 있다. 우리나라의 경우에도 담수어류인 미꾸리의 형질전환 어류의 성공 예가 보고된 바 있다. 이러한 연구에도 불구하고 transgenic 어류의 산업화를 위하여서는 아직까지 해결해야 할 몇가지 문제가 있다. 즉 성장관련 유전자를 이용한 형질전환어류생산의 목적이 사람들의 소비를 위한 어류의 생산성 향상에 있기 때문에 gene construction시에 건강의 유해 가능성과 소비자들의 소비기피를 막을 수 있도록 하는 것을 고려해야 한다. 즉 중금속을 이용한 promoter induction이나 viral promoter의 이용을 통한 성장증진을 피해야 할 것이다. 따라서, vector 개발시 이러한 점을 고려하여 대상 어류근원의 유전자를 분리 사용해야 한다고 생각된다.

양식 어류의 경우 자연의 서식처로부터 양식장으로 서식처를 옮김으로써 여러 가지 환경의 변화를 수반하게 된다. 즉, 사육밀도의 증가, 환경의 악화, 기원이 다른 개체군의 혼생과 같은 조건들이 발병률을 높이게 된다. 어병은 소독과 정확한 진단을 통한 항생제 또는 화학약품을 사용하여 어느 정도 억제할 수 있으나 때때로 비용이 많이 들어 경제성의 문제가 있으며 사용약품이 유출되어 주위 환경을 오염시킬 수 있고 특히 항생제의 반복사용으로 인한 내성균의 출현이 심각한 실정에 있다. 최근에는 백신개발을 통하여 어병을 예방하기 위한 기술개발을 시도하고 있으나 성공한 경우 (Engelking and Leong, 1989)는 극히 소수에 불과하며 수많은 어병에 대한 개별적인 백신개발은 한계를 나타내고 있는 실정이다. 따라서, 어병에 대한 장기적인 대책으로 어류 자체가 가지는 내병성 관련 유전자에 관한 연구가 시도되고 있으며 이는 다양한 종류의 병원 미생물에 범용적으로 작용하기 때문에 여러 수산 선진국에서 활발히 연구가 진행되고 있어 우리나라에서도 어병의 신속진단이나 백신개발과 단기적인 어병대책과 함께 장기적인 어병대책이 필요하다고 생각된다. 또한 성장관련 유전자와 내병성 유전자를 이용하여 형질전환어류를 생산할 계획이기 때문에 연구비를 경제적으로

사용할 수 있으리라 생각된다.

한편, 유전자 재조합기술의 발전을 통해 다양한 유용 유전자가 분리, 이식되어 산업적으로 이용되고 있으나 이들 재조합 단백질의 인체 안전성 문제에 관해서 많은 논란을 벌여왔다. 그러나, 소의 성장호르몬을 젖소에 투여할 경우 10-25%의 산유량 증가를 가져오며 미국의 FDA에서 성장호르몬을 사용한 소의 우유를 소비함으로써 생기는 인체의 해로움은 없는 것으로 결론 지었다(Wallis, 1989). 그리고, 유전자 재조합 기술에 의한 재조합 단백질이나 형질전환어류가 생산하는 어체 내의 성장관련 단백질이 인체에 미치는 영향에 대해서는 이제까지 세계적으로 연구가 추진된 바 없다. 따라서, 양식어류의 유용 유전자 확보를 통한 산업화를 이루기 위해서는 인체의 안전성 문제가 전제되어야 하기 때문에 이 연구에서는 우리 나라의 주요 양식대상어류의 세포를 배양하여 외래 유전자의 도입에 의해 생성된 물질의 성질을 천연물질과 직접 비교함과 동시에 인간의 세포주에 있어서 미치는 영향이 어떠한가를 파악하여 인체에 미치는 유해성 여부를 판단하고자 한다.

2. 경제·산업적 측면

우리 나라의 주요 양식어류는 넙치와 조피볼락으로 양식해산어 생산고의 대부분을 차지하고 있어서 때때로 과잉생산에 의한 가격폭락으로 양식어민들의 안정적 소득확보에 문제점으로 지적되고 있어서 양식어종의 다양화를 통한 수익의 안정과 소비자들의 기호충족을 위하여 양식어류의 품종 다양화를 위한 연구가 활발히 추진되고 있다. 그러나, 일반적으로 고부가가치를 가진 고급 어종은 대체로 성장이 느린 생물학적인 특성을 가지고 있으며, 어류양식의 중심지인 남해안의 겨울철 월동 수온이 7℃ 내외로서 고급 난류성 어류의 생존이 어려울 뿐만 아니라 해황 특성상 저수온기간이 너무 길어서 저수온기의 성장 저해로 인하여 상품화 크기까지 성장시키는데 많은 비용과 시간이 소요된다. 따라서 성장관련 재조합 단백질과 형질전환어류의 생산을 통하여 상품화 크기까지의 양식기간을 단축시킴으로써 국내 양식산업의 활성화에 크게 기여할 뿐만 아니라 수산 관련 바이오텍산업의 활성화를 가져와서 산업 경제적인 이득을 확보할 것으로 생각된다. 그리고 가까운 장래에 물질 또는 생물특허 획득을 통하여 외화획득 및 수입대체효과를 거두리라고 생각된다. 그리고 어류의 질병은 때때로 육상 수조식 또는 가두리 양식 어류의

대량 폐사를 초래하여 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. 올해에도 남해안의 양식장들에서 iridovirus의 만연으로 큰 경제적 피해를 입고 있는 실정이다. 따라서 우리 나라의 주요 양식종을 대상으로 성장 및 내병성 관련 유전자 확보하여 이들의 산업적 응용을 통하여 양식업의 생산성 향상을 도모하고 필요한 연구기관 및 연구자에게 제공할 수 있는 기반을 조성함으로써 수산업 관련 생물공학 분야의 대외 경쟁력을 향상시키고 최근의 개방화와 선진국의 기술패권주의에 대비하기 위해서도 시급히 추진되어야 한다고 생각된다.

3. 사회·문화적 측면

우리 나라는 현재 IMF의 여파로 인하여 많은 사람들이 실업과 저소득으로 어려움을 겪고 있으며 수산물 시장의 전면 개방 경쟁체제에 있다. 더구나 한중일 어업협상이 진행되면서 서로간 자국의 어장확보와 자원의 보호를 위하여 치열한 각축전을 벌이고 있는 실정이다. 따라서, 우리 나라 수산업은 잡는 어업에서 기르는 어업이 주축이 되는 방향으로의 개편이 불가피한 실정이다. 한편, 국내에서는 사료비 및 원자재가격 등의 상승으로 인하여 생산성 및 가격 경쟁력이 갈수록 떨어져 양식어업 종사자들을 비롯한 수산업 종사자의 사기저하를 초래하고 있기 때문에 획기적인 생산성 향상을 도모해야 할 필요에 직면하게 되었다. 따라서 유전자재조합 기술을 양식산업에 접목시켜 가격 및 기술의 국제경쟁력 재고를 통하여 획기적으로 생산성을 향상시킴으로써 어민들의 복지향상에 이바지할 수 있으며 고부가가치 창출을 통하여 일차산업으로서의 수산업에 대한 인식변화를 도모하고 관련 분야의 전문인력을 양성시킴으로써 21세기의 수산업을 주도해나갈 우수한 수산인력의 배출에 크게 이바지할 것으로 생각된다. 한편, 현재까지 건강 식품으로 알려져 왔던 수해양의 식품들을 이용한 유전자 이식된 어류의 유해성의 판단기준을 제시함으로써 인류에 미치는 피해를 사전에 방지하고, 국민 건강에 이바지하고자 한다.

제 2 절 연구개발 범위

1. 연차별 연구목표 및 범위

구 분	목 표	내용 및 범위
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> - 유용유전자 분리(1) - 어병발생 양상파악 - 세포배양법 확립 	주요양식어류 중 4종으로부터 성장호르몬 유전자분리 내병성관련 유전자인 zebrafish의 thioredoxin 유전자분리 연구대상어류의 β -actin 유전자 분리 병어로부터 병원균 분리 병원균의 간이동정 어류세포의 분리조건 확립 어류세포의 배양조건 확립 어류세포의 초대배양법 개발
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> - 유용유전자 분리(2) - 주요 어병원인균의 균주 확보 - 어류세포의 계대배양법 개발 	주요양식어류 중 3종으로부터 IGF- I 분리 내병성관련 유전자인 zebrafish의 transferrin 유전자분리 β -actin 유전자 분리 주요 어병원인균의 생물학적, 생화학적 성장조사를 통한 균주확보 어류세포의 계대배양법 확립
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합성장호르몬의 생산 - 형질전환어류 생산 - 이식백터개발 - 재조합성장호르몬의 영향 조사 	연구대상어류의 재조합성장호르몬의 최적백터 탐색 연구대상어류의 형질전환어류 생산을 위한 사육 시스템 구축과 친어확보 내병성관련 유전자인 natural killer cell enhancement factor(NKEF) 유전자의 프로모터 분리 β -actin과 NKEF 유전자의 프로모터를 이용한 이식백터개발 재조합성장호르몬의 다양한 어류 세포의 성장 및 형태 변이에 미치는 영향 조사
4차 년도	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합 성장호르몬의 급이에 의한 성장효과검정 - 속성장 형질 전환어류의 생산 - 내병성 형질전환어류 생산을 위한 challenge test 시스템 구축 - 재조합 성장호르몬의 농도별 인체 유해성 검정 	연구대상어류에 재조합성장호르몬을 급이함으로써 나타나는 성장효과 조사 속성장 형질전환어류 생산을 위한 순환수조내 산란 유도 Challenge test 시스템 구축을 위한 바이러스의 병원성 조사 재조합 성장호르몬이 포유동물에 미치는 영향 조사
5차 년도	<ul style="list-style-type: none"> - 내병성 관련 형질전환 모델어류의 생산 - 속성장 형질전환어류의 생산 	이식백터의 발현 확인 및 내병성 형질전환 어류생산 박테리아 challenge test 시스템 구축 성성숙 유도를 위한 광주기, 수온조절 등 친어관리를 통한 수정란 확보 및 종묘생산 그리고 형질전환어류생산

2. 최종 연구목표 및 범위

가. 주요양식어류로부터 총 10개의 유용유전자를 분리, 확보한다.

나. 성장호르몬 cDNA 유전자 분리 : 주요양식어류(조피볼락, 붉바리, 능성어, 돌돔, 넙치류, 참복, 뱀장어, 쏘가리)중 4종으로부터 분리

다. Insulin-like growth factor (IGF-1) : 8종의 주요양식어류(조피볼락, 붉바리, 능성어, 돌돔, 농어, 참복, 뱀장어, 쏘가리) 중 3종으로부터 분리

라. Zebrafish로부터 내병성관련 cDNA 유전자인 transferrin과 thioredoxin 유전자 분리

마. 백터개발을 위한 promotor로서 대상어류의 β -actin 유전자 분리

바. 연구 대상어류의 재조합 성장호르몬 단백질 생산한다.

사. 재조합 단백질을 급이하거나 백터주입 실험을 통하여 성장효과를 검증한다.

아. 연구대상어류의 속성장 형질전환어류를 생산한다.

자. 모델어류를 이용하여 내병성 유전자로 형질전환시킨 후 감염실험을 통해 효과를 검증한다.

차. 연구대상어류의 세포배양법 확립한다.

카. 형질전환어류 및 재조합성장호르몬 급이 어류의 식품으로서의 안전성을 검증한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술현황

1. 어류의 재조합 성장호르몬의 대량생산

성장호르몬(growth hormone, GH)은 척추동물의 시상하부에서 생산되는 polypeptide hormone으로 척추동물의 초기발생과 정상적인 성장에 관여하는 것으로 알려져 있으며, prolactin (PRL)과 경골어류의 pituitary somatolactin (SL) 그리고 다양한 종류의 포유류 태반단백질과 함께 GH/PRL family를 구성하며 이들은 동일한 primordial gene으로 부터 유래된 것으로 믿어지고 있다. 성장호르몬에 관한 연구는 일찍이 1920년대에 포유류의 pituitary hormone에 관한 연구가 시작된 이후로 Li et al (1966)은 처음으로 사람의 성장호르몬의 아미노산 염기서열이 밝혔다. 그 이후로 조류, 소, 말, 돼지의 아미노산 염기서열이 보고되었다. 그러나, 아미노산의 염기서열결정은 많은 시간과 노력을 필요로 하기 때문에 연구의 진행속도는 상대적으로 상당히 느렸다. 그러다가, 1970년대에는 분자생물학이 빠른 속도로 발달함에 따라 1977년에 유전자 재조합기술을 이용하여 쥐의 cDNA 염기서열로 부터 아미노산 염기서열이 추정·보고되었으며(Seeburg et al., 1977), 대부분의 연구는 주로 포유류를 대상으로 많은 연구가 되었다. 한편, 포유류 성장호르몬의 연구를 기반으로 한 어류 성장호르몬 유전자의 분리 및 발현에 관한 연구는 1985년에 chum salmon 성장호르몬 cDNA의 분리하여 *E. coli* vector에서의 발현을 보고한 이후 rainbow trout, tilapia, yellow tail, tuna 등을 대상으로 활발한 연구가 진행되었다. 그 결과, 1990년도 초기에 벨기에에서 어류재조합 성장호르몬 그리고 일본에서는 뱀장어의 재조합 성장호르몬의 물질특허를 이미 받아 놓고있는 상태이며 선진 각국에서도 어류의 재조합 성장호르몬에 관한 연구가 진행 중이다. 그러나 이들 물질의 효과에 관한 연구결과는 주로 연어과 어류를 대상으로 하고 있어서 우리 나라의 경우 주요 양식어류를 대상으로 한 연구가 체계적으로 이루어져야 하겠다.

2. 성장호르몬 유전자 이식을 통한 품종개량

Gordon 등이 1980년에 생쥐의 수정란의 전핵에 플라스미드 DNA에 herpes simplex virus와 simian virus 40 viral DNA를 재조합한 DNA를 미세주입하여 형질전환 포유동물의 생산가능성을 시사한 이후로 Palmiter 등(1982)은 쥐(rat)의 성장호르몬 유전자를 생쥐의 수정란에 주입하여 대조군의 생쥐보다 성장이 훨씬 빠른 super mouse를 생산하는데 성공하였다. 그 이후 토끼, 양, 돼지를 대상으로 사람의 성장호르몬 유전자의 도입을 통한 형질전환 시도의 결과 도입 유전자의 발현이 토끼와 돼지에서 관찰되었다(Hammer et al., 1985). 한편, Maclean and Talwar(1984)가 어류에서는 최초로 rainbow trout 수정란에 cloned gene을 미세주입하여 형질전환 개체의 생산을 시도한 후, 사람의 성장호르몬, 소의 성장호르몬, 닭의 crystallin gene, 박테리아의 각종 marker gene의 도입에 관한 연구가 carp, trout, loach, salmon, tilapia, medaka, zebrafish 등을 대상으로 행하여져 다양한 결과가 보고된 바 있다. 한편, 어류의 유전자를 어류에 도입시키는 형질전환어류생산에 관한 연구는 상대적으로 미약하나 대부분 1990년 이후부터 활발하게 진행되어 왔으며(See Table 1) 최근에는 rainbow trout와 chinook salmon의 성장호르몬 cDNA가 분리됨에 따라 이를 이용한 유전자이식 연구의 성공 예가 발표되었다. 즉, Du et al (1992)는 1세어인 transgenic Atlantic salmon이 평균 2-6배의 성장증가를 보고한 바 있으며, Delvin et al (1994)은 14개월된 transgenic coho salmon의 경우 대조군의 어류에 비해 평균 11배의 체중 증가와 함께 최대 37배의 성장효과를 보고 한 바 있다.

3. 해산어류세포주 수립과 재조합 단백질의 인체 유해성 검증

최근, 해산식량의 중요성이 부각되기 시작함에 따라 어류의 배양세포를 이용한 연구가 이루어져, 어류질병에 관련하여 몇몇의 배양세포주가 이용되고 있다. 그 대부분의 어류세포주는 전세계적으로, 어류 중 가장 중요한 자원으로 인식되고 있는, 연어과 어류를 중심으로 질병, 생리활성 및 약리학적인 연구 등 매우 다양하게 이루어지고 있다. 연어과 어류를 제외한 배양세포는 담수산 어류의 배양세포가 소수 이용되고 있는 형편이다. 한편, 재조합 성장호르몬의 인체 유해성 검증은 미국과 유럽의 경우 주로

가축인 소를 중심으로 연구되어 왔다. Peel et al (1989)은 소에게 재조합 성장호르몬을 2주일 마다 0.5 g을 투여하였을 경우 아무런 문제가 없었다고 보고하였다. 그러나, 어류의 재조합 성장호르몬의 어류 또는 인체의 유해성 문제는 연구된 바 없다.

제 2 절 국내 기술현황

국내의 경우 어류의 재조합 성장호르몬에 관한 연구는 제주대학교 해양생물공학과에서 자바리의 재조합 성장호르몬 생산과 유전자 도입에 관한 기초기술개발 과제를 수행 중에 있으며 자바리의 성장호르몬 cDNA 유전자를 분리하여 발현백터에서 발현이 확인되었으며 pilot규모의 생산을 위한 최종년도 연구가 진행 중이다. 그리고 국립연구소와 기업체에서도 관련 연구가 진행되고 있으나 아직 초보적인 단계에 머물러 있는 실정이다. 또한, 본 연구진에 의해 recombinant bovine somatotropin을 넙치에 급이하여 성장에 미치는 영향에 관해 산업적인 사육 규모로 1년간 실험을 실시한 바 있다(Rho et al, 1999). 한편, 형질전환어류의 경우 부경대학교 양식학과 김동수 박사팀에 의해 담수어류인 미꾸리를 대상으로 성공한 예가 보고되었으며 올해부터 산업화를 위한 관련 연구가 수행 중에 있다. 그러나, 순수한 해산어류를 대상으로 한 성공의 예는 세계적으로 보고된 바 없으며 앞으로 양식 생산고의 주류를 이루고 있는 해산어를 대상으로 한 연구가 필요한 실정이다. 그리고, 형질전환어류나 재조합 성장관련 단백질의 인체 안전성 문제에 대해서는 아직 시도된 바 없으며 도입 유전자의 발현 효율 등을 검증할 수 있는 in vitro system 구축을 위해 필수적인 해산어를 대상으로 한 cell line은 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다. 한편, 어병에 대한 연구는 주로 신속진단방법의 개발과 백신 개발에 초점을 맞추어서 추진하였으나 이렇다 할 성과는 나오지 못하고 있는 실정이지만 계속적으로 활발히 연구가 수행 중이다. 따라서 장기적인 어병대책의 일환으로 어류자체가 가지고 있는 내병성 관련 유전자의 연구를 수행하고자 하며 국내의 경우 이와 관련한 연구는 아직 매우 초보적인 단계에 있는 실정이다.

제 3 절 문제점

앞에서 기술한 바와 같이 어류 성장호르몬의 대량생산 기반조성과 성장호르몬 유전자도입에 의한 형질개량, 생산성 향상에 관한 연구는 선진국의 경우 1980년 중반부터의 지속적인 연구로 상당한 수준에 이미 도달해 있으며 몇몇 성공의 예가 발표되었다. 그리고 일부 어류의 재조합 성장호르몬은 물질특허를 받았거나 받기 위한 관련 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나, 우리 나라의 경우 이와 관련된 연구분야의 연구활동이 부경대학교 유전육종실험실의 경우 13년 동안의 꾸준한 연구결과 미꾸리를 대상으로 한 형질전환어류생산의 성공의 예가 있으며 산업화를 위해서 관련 조건의 개선을 통한 어류생산 효율의 최적화 및 생태계에 미칠 수 있는 영향 등에 관한 연구를 진행 중에 있다. 이를 제외한 관련 분야는 거의 초보단계에 머물러 있다. 왜냐하면, 이와 같은 연구는 장기간이 소요되며, 단기간에 결과를 내어야 하는 연구사업으로는 연구목표를 달성하기가 어렵기 때문이다. 따라서, 앞으로 예상되는 어류성장호르몬의 물질 특허화나 유전자 도입 기술의 장벽에 대처하기 위하여서도 관련기술의 개발에 대한 꾸준한 관심과 연구투자가 있어야 하겠다. 특히 이러한 연구가 대부분 담수어류나 연어과 어류에 국한되고 있으며 이는 물론 여러 가지 이유를 들 수 있으나 해산어류를 대상으로 유전자 재조합 기술을 응용할 경우 해산어의 종묘생산기술 및 친어 사육기술을 확보하고 있어야만 관련 연구를 수행할 수 있기 때문으로 생각된다. 따라서, 본 연구진은 해산어류의 종묘생산 및 친어관리 성성숙 유도에 관한 충분한 지식과 경험을 확보하고 있어 이와 같은 기본적인 문제점은 해결할 수 있다고 생각된다.

한편, 비록 몇몇 어류에 있어서 성공적인 외래유전자의 도입과 발현 그리고 도입된 외래 유전자의 자손으로의 전달 등을 확인하였으나 이 기술의 수산·양식업에 응용은 다음의 여러 가지 해결해야 할 기술적인 문제점들이 있다.

- 1) 효율이 높은 대단위 유전자 도입의 방법개발
- 2) 외래유전자의 도입유무를 보다 쉽고 빠르게 그리고 정확히 확인할 수 있는 방법 개발
- 3) 도입된 외래 유전자를 효율적으로 발현시킬 수 있는 promotor의 개발
- 4) 도입된 유전자의 발현을 최대화 할 수 있는 생리, 영양, 면역학적 그리고 환경적인 요인분석

- 5) 외래 유전자 이식 어류의 식품으로서의 안전성 분석
- 6) 형질전환 어류가 생태계에 미칠 수 있는 영향 분석

따라서, 본 연구진은 제시된 문제점들을 고려하여 대단위 유전자 도입 방법으로 electroporation을 통한 최적 조건을 확립하고, 생산하고자 하는 어종에서 promoter와 유용 유전자를 분리해내고 최적의 효율을 가지는 이식vector와 발현백터를 개발한 후 동일 어종의 조직으로부터 cell line을 구축함으로써 in vivo와 in vitro system에서 유용 유전자 발현효율을 조사하고 형질전환 어류를 생산하는 한편 생산된 형질전환 어류와 재조합 단백질을 투여한 어류를 대상으로 성장증진효과 및 내병성을 검정하고 어체내에서 생산 또는 잔류하는 재조합 단백질의 인체 유해 여부를 조사함으로써 산업화를 하고자 한다.

제 4 절 앞으로의 전망

이 사업의 목표가 달성될 경우 다양한 종류의 주요 양식어종으로부터 성장과 내병성 관련 유전자를 분리, 확보함으로써 선진국의 기술패권주의를 극복할 수 있을 것으로 생각되며, 어류재조합 성장호르몬의 대량생산을 통한 산업화 그리고 어류성장호르몬 유전자 이식을 통한 신품종개발 기술을 확립할 수 있게되어 향후 고부가가치를 가지는 다른 유용양식 대상종에 직접적으로 응용하여 성장촉진을 통한 생산성 향상과 양식기간 단축을 통한 어민소득 증대, 그리고, 재조합 성장호르몬의 대량생산을 위한 생물공정(bioprocessing)에 관한 기술확립을 이루어 수산 증양식 뿐만아니라 관련 바이오업계의 활성화를 가져올 것으로 전망된다. 또한 해산어류의 cell culture 방법과 cell line 구축은 어류의 세포조작 등으로 확대 활용할 수 있어서 관련 연구분야의 활성화에 기여할 것으로 생각된다. 또한, 형질전환어류의 자체생산 성장관련 호르몬이나 투여로 인해 잔류하는 재조합 단백질의 인체의 유해성을 규명함으로써 식품으로써의 안전성 문제를 검증하며 이는 관련 양식산업의 활성화 뿐만 아니라 유전자 조작에 의해 생산되는 동식물이나 관련 물질의 유해성 판단기준을 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 유용 유전자를 이용한 내병성 어종이 개발될 경우 어병 대책의 획기적인 전기를 마련할 것으로 생각되며 이 방법을 점차 유용양식 어종으로 확대 적용함으로써 양식산업의 생산성 향상에 획기적으로 기여할 것으로 생각된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구방법

1. 성장과 내병성 관련 유전자의 cloning 및 염기서열 결정

가. 어류의 뇌하수체로부터 성장호르몬 mRNA 분리

어류의 뇌하수체는 살아있는 어류로부터 분리한다. 분리된 뇌하수체는 액체질소로 급속 동결하고 eppendorf tube에 넣어 분리할 때까지 -80°C 에 보관한다. 적정량의 lysis buffer를 뇌하수체가 들어있는 tube에 넣어 45°C 에서 15-20분 lysis한다. Lysis 되지 않은 큰 조각은 18-21 gauge 주사 바늘이 부착된 주사기를 이용하여 여러번 통과시켜 homogenization한다. Lysis된 조직은 $4000 \times g$ 에서 5분간 원심분리한 후 상등액만을 취하여 mRNA를 분리하는데 이용한다. 5M의 NaCl를 적정량 넣어 NaCl의 농도를 0.5M로 맞춘후 Oligo (dT) Cellulose를 첨가한다. Tube를 가끔 흔들어주어 Oligo (dT) Cellulose와 조직을 녹인 액이 잘 섞이게 하고 이 단계를 30분간 지속한다. Tube를 $4000 \times g$ 에서 원심분리하여 Oligo (dT) Cellulose를 침전시킨다. 상등액은 aspirator를 이용하여 제거하고 1.3ml의 Binding buffer를 넣어 조심스레 resuspension한 다음 다시 원심분리하여 상등액을 제거한다. 이 단계는 상등액이 투명할 때까지 반복하여 깨끗한 mRNA를 얻고자 노력한다. 침전된 Oligo (dT) Cellulose를 spin column에 옮겨 세척과 mRNA elution을 용이하게 한다. Non-polyadenylated RNA는 적정량의 Low Salt Wash Buffer를 사용하여 여러번 세척한다. Polyadenylated RNA는 100ul의 Elution Buffer를 사용하여 elution한다. 이 elute된 용액에 녹아있는 polyadenylated RNA는 glycogen, sodium acetate, 100% ethanol을 이용하여 -70°C 에서 침전시킨다. Polyadenylated A RNA는 사용할 때까지 ethanol에 침전된 상태로 보관한다.

나. 어류의 간에서 IGFs mRNA의 분리

동결되어 있는 간은 멸균된 막자사발을 이용하여 homogenization한다. Homogenization하는 동안 가끔 액체질소를 막자사발에 추가하여 homogenization을 용이하게 한다. 간에서부터 polyadenylated RNA 분리는 위에서 설명한 방법을 이용한다.

다. 분리된 mRNA를 template로 한 Single strand cDNA 합성

약 50ng의 polyadenylated RNA를 DEPC-treated된 물과 300ng의 oligo (dT) primer를 첨가하여 volume이 31ul가 되도록 하고, 65°C에서 5분간 incubation 한 다음 천천히 room temperature로 식혀 primer가 RNA에 annealing되게 한다. Primer가 anneal된 RNA는 5ul 10x buffer, 1ul RNase block ribonuclease inhibitor, 2ul 100mM dNTPs, 1ul AMV reverse transcriptase(50U/ul)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응한다. 반응이 끝난 다음 90°C에서 5분간 incubation하여 reverse transcriptase를 불활성화 시킨다. 합성된 first strand cDNA는 DNA purification kit을 이용하여 free nucleotide와 cDNA 합성에 이용된 buffer를 제거한다.

라. 어류 유용유전자의 PCR amplification

(1) 3' ends amplification

이미 밝혀진 어류의 성장관련 유전자 (내병성 유전자)를 data base에서 fetch한 다음 multiple alignment를 이용하여 nucleotide sequence level에서의 homology를 비교한다. homology가 가장 높은 두 부분(5'에 가까운 한 부분(F1)과 3'에 가까운 한부분(R1))의 sequence를 cDNA를 amplify하는데 primer로 이용할 것이며 그 길이는 20 - 30 nucleotide이고 이미 밝혀진 sequence와는 85 - 90% 같은 sequence이다. Cloning 하고자 하는 유전자에 따라 약간의 차이는 있지만 일반적으로 그림 1과 같은 방법으로 cloning 하고자 한다. mRNA를 5'에서 3'으로 나타내었고 2개의 primer는 F1(forward primer1), R1(reverse primer)로 나타내었다. 3' 말단을 cloning 하기 위하여 poly(A)와 상보적인 dT(20nt)와 F1을 primer로 사용하고 polymerase에 의한 mutation을 줄이기 위하여 3'-5' proofreading activity가 있는 *pfu* polymerase를 사용한다. 30 cycle의 PCR amplification reaction을 행할 것이며 denaturation은 94°C에서

1분, annealing은 45°C에서 2분, extension은 amplify하고자 하는 길이에 따라 시간을 조절할 것이며(1000nucleotides/min) 마지막 cycle에서의 extension은 5분간 반응하려고 한다. 예상되는 fragment는 Fig. 1의 아래에 Product 1로 나타내었다. Amplify된 DNA fragment는 PCR purification kit을 사용하여 DNA를 정제하고 polynucleotide kinase를 이용하여 phosphorylation을 시킨다. Phosphorylation된 DNA fragment는 SmaI으로 절단되고 dephosphorylation된 pUC19에 T4 DNA ligase를 이용하여 삽입시킨다.

(2) 5' end amplification

DNA purification kit로 정제한 single strand cDNA의 3' 말단에 standard protocols에 따라 terminal deoxynucleotidyltransferase를 사용하여 poly(A) tail을 인위적으로 붙인다. Fig. 2는 5' end를 amplification하는 실험을 모식화 한 것으로 mRNA는 5'-3'방향으로 나타내었고 mRNA를 template로 하여 합성한 single strand cDNA는 3'-5'방향으로 나타내었다. Terminal deoxynucleotidyltransferase에 의해 생성된 poly(A) tail은 진한 글자로 나타내었고 R1과 dT(20nt)를 primer로 이용하여 amplify될 fragment는 Product 2로 나타내었다. Amplify된 fragment는 3' end amplification에서 설명한 방법과 같은 방법으로 pUC19의 SmaI restriction site에 삽입할 것이다.

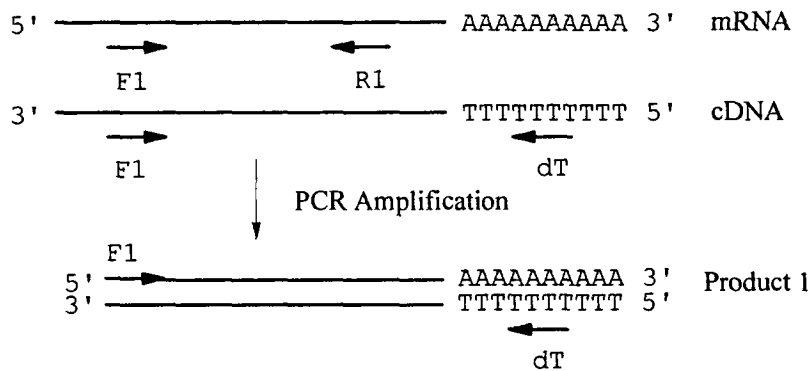


Fig. 1. Single strand cDNA로부터 PCR을 이용한 3' end의 PCR amplification 방법
mRNA의 방향은 5'에서 3'으로 나타내었고 mRNA를 template로 하여 reverse transcriptase에

의해 합성된 cDNA는 3'에서 5'으로 나타내었다. PCR amplification에 이용된 primer는 F1 (forward primer 1), R1(reverse primer 1), dT(20 nucleotide의 deoxythymidine polymer)로 나타내었다. F1과 dT를 primer로 사용하여 amplification된 3' end fragment를 Product 1로 나타내었다.

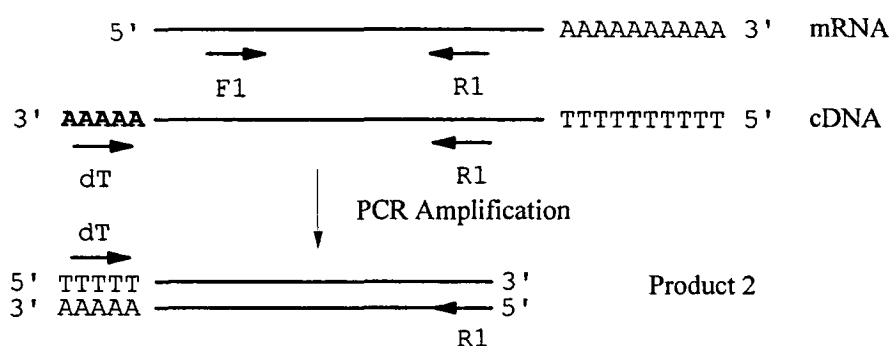


Fig. 2. Single strand cDNA로부터 PCR을 이용한 5' end의 PCR amplification 방법.

mRNA를 template로 reverse transcription된 single strand cDNA는 3'에서 5'으로 나타내었다. 5' end를 amplification 하기 위하여 single strand cDNA의 3' end에 dATP와 terminal deoxytransferase를 사용하여 poly(A) tail를 합성하였다. 합성된 poly(A)는 cDNA의 3' end에 진한글자로 나타내었다. dT와 R1을 primer로 PCR amplification하여 얻어진 생성물을 Product 2로 나타내었다.

마. Complete cDNA의 cloning

위에서 설명한 방법에 의해 pUC19 vector에 삽입된 3' 말단 DNA fragment와 5' 말단 DNA fragment는 BioRad 회사의 Gene Pulser II system을 이용하여 DH5a cell에 transformation한 다음 ampicillin이 100ug/ml 함유한 LB plate에 도말한다. 얻어진 colony를 1.5ml LB-ampicillin(100ug/ml) 배지에 overnight 키워 plasmid purification kit을 사용하여 plasmid DNA를 분리한다. 분리한 plasmid는 Amershampharmacia Biotech사의 SEQ4X4 Personal Sequencing System을 이용하여

nucleotide sequence를 확인한다. 확인된 5' 부분의 DNA fragment와 3' 부분의 DNA fragment는 중간 부분이 중복되므로 완전한 유전자의 sequence를 확인할 수 있다. 확인된 3'과 5' ends의 sequence를 바탕으로 완전한 cDNA를 cloning 하기 위하여 2개의 primer를 만든다. 2개의 primer에는 각각 다른 restriction site를 두어 단백질 발현 vector에 cloning을 용이하게 할 뿐 아니라 유전자 이식 vector에의 cloning도 용이하게 할 것이다.

2. 재조합 성장호르몬의 생산

가. pET expression system을 이용한 유용유전자의 발현 및 분리

(1) pET expression system의 특성

Cloning한 유용유전자들로부터 재조합 단백질을 생산하기 위하여 pET expression system을 사용할 것이다. pET expression system은 이제까지 상업적으로 available한 expression vector중에서 단백질을 가장 많이 발현하는 vector중 하나이다. 이 expression vector는 bacteriophage T7 promoter를 가지고 있으며, T7 RNA polymerase를 host cell 내에서 제공하여 줌으로써 promoter의 down stream에 cloning된 target gene의 발현이 유도되어 진다. T7 RNA polymerase는 T7 promoter에만 선택적으로 붙으며 활성이 매우 높아 대장균 전체 단백질의 약 50%에 해당되는 재조합 단백질을 얻을 수 있다.

pET expression system에는 수십 종류의 vector가 있는데 그중에서 pET-11a와 16b를 사용하고자한다. pET-16b vector에는 NcoI restriction site에 개시 codon이 있으며 발현되는 재조합 단백질의 아미노 말단에 10개의 연속되는 Histidine이 발현되어 단백질의 분리 및 정제가 용이하다. pET-11a vector에는 NdeI restriction site가 translation 개시 codon에 있다. 이 vector를 NdeI과 BamHI restriction enzyme으로 절단하고 유용유전자를 이 vector에 cloning 한다면 intact한 유용유전자의 단백질을 발현할 수 있다.

(2) pET expression vector에 유용유전자 cloning

Novagen으로부터 구입한 pET-16b와 pET-11a plasmid를 NdeI/BamHI 제한효소로 절단한 후 1% agarose gel상에서 절단된 plasmid 단편을 분리한다. 5'과 3'에 각각 NdeI과 BamHI 제한효소 절단부위를 가진 유용 유전자 단편을 얻기 위하여 두 개의 primer를 고안하여 PCR reaction을 한다. 얻어진 DNA fragment는 NdeI/BamHI restriction enzyme으로 double digestion하고 절단된 fragment를 DNA purification kit을 이용하여 분리한다. 같은 두 제한효소로 자른 pET-16b, pET11 vector와 double digestion된 유용유전자 단편을 섞은후 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation한다. Ligation된 vector를 *E. coli* DH5a strain (*recA*-)에 transformation하여 얻은 colony를 ampicilin이 50ug/ml 들어있는 1.5ml LB media에 접종하여 키운 후 plasmid DNA를 추출한다. 추출한 DNA를 제한효소 NdeI과 BamHI으로 절단한 후 agarose gel 전기영동하여 유용유전자가 삽입된 clone을 확인한다. 이와 같이 확인된 clone을 재 확인하기 위하여 T7 primer를 이용하여 sequencing한다.

(3) BL21(DE3) *E. coli* strain에서의 단백질 발현

유용유전자가 삽입된 pET expression vector로부터 단백질을 발현시키기 위해서는 앞에서 설명한 것과 같이 T7 RNA polymerase가 필요하다. T7 RNA polymerase를 안정적으로 또한 원하는 시기에 공급하기 위하여 염색체에 T7 RNA polymerase 유전자를 가진 *E. coli* strain BL21(DE3)을 사용하였다. 이 strain은 bacteriophage λ 의 derivative인 DE3 lysogen으로서 *lacI*, *lacUV5* promoter 그리고 T7 RNA polymerase 유전자를 가지고 있다. *E. coli*내에서 T7 polymerase의 발현은 *lacUV5* promoter에 의해 조절되며 lactose 유사물질인 IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)에 의해 전사가 유도된다. Sequencing하여 얻은 clone으로부터 DNA를 추출하여 BL21(DE3) strain에 transformation한다. Transformation에 의해 생성된 colony를 ampicillin(amp)이 50ug/ml 들어있는 1.5ml LB에 접종하여 37°C에서 shaking하면서 overnight culture를 한다. 다음날 overnight culture를 fresh한 1.5ml의 LB-ampicilin 배지에 10배 희석시켜 배양한다. 2시간 배양한 다음 100mM의 IPTG를 넣어 final 농도가 0.4mM이 되게하여 T7 RNA polymerase의 발현을 유도하는 동시에 재조합 단백질의 발현을 유도

한다. 단백질 발현은 30°C shaking incubator에서 3시간동안 지속한다. 단백질이 발현된 culture를 원심분리하여 cell을 harvest한다. Harvest된 cell을 50ul의 50mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA buffer에 resuspension하고 50ul의 2X sample loading buffer를 첨가하여 잘 섞은다음 95°C에서 5분간 반응하여 cell을 완전히 lysis시킨다. cell lysate 5-10ul를 12% SDS gel에 전기영동한다. 전기영동한 gel은 commasie brilliant staining solution으로 staining한 다음 재조합 단백질의 발현을 확인하고 단위 ml의 culture당 어느 정도 단백질이 발현되는지를 계산한다.

(4) 발현된 단백질의 순수분리

pET-16b vector에 삽입된 유용유전자는 단백질이 발현될 때 아미노 말단에 10개의 연속적인 histidine을 가진 fusion 단백질 형태로 생성된다. 이와 같이 10개의 연속되어 발현되는 peptide를 His·Tag이라고 부르며 이 부분은 2가 양이온을 띠는 금속(Ni^{2+})에 강하게 붙는다. 이와 같은 성질을 이용하여 단백질 분리를 빠르고 용이하게 할 수 있다. 1liter의 배지로부터 얻은 발현된 cell을 40 ml binding buffer에 suspension한다. Suspension된 cell을 100ml 비이커에 옮긴 후 비이커를 얼음위에 올려놓은 상태로 sonication하여 cell을 break한다. Cell lysate를 40,000 x g에서 30분간 원심분리하여 단백질이 녹아있는 상등액(supernatant)과 cell debris로 나눈 후, 상등액으로부터 Ni^{2+} column을 이용하여 단백질을 분리하고 cell debris는 4°C에 보관한다. Binding buffer로 equilibrate되어 있는 Ni^{2+} column에 준비한 상등액을 loading하고 상등액이 완전히 내려간 후 column 부피의 10배에 해당하는 양의 binding buffer로 column을 세척한다. 그리고 다시 column의 6배되는 양의 wash buffer로 세척한 후 Ni^{2+} column에 붙어있는 fusion 단백질을 elution buffer로 elution한다. elution된 단백질을 12% SDS gel 전기영동을 하여 단백질의 순도와 yield를 측정한다. 4°C에 보관한 cell debris는 2X sample buffer로 녹인다음 적정량을 전기영동하여 insoluble한 단백질의 양을 측정한다. 일반적으로 growth hormone은 강한 promoter를 이용하여 *E. coli*에서 발현시킬 경우 insoluble한 inclusion body상태로 존재한다고 보고되어있다.

(5) Inclusion body로부터 단백질의 분리

Insoluble한 단백질을 추출하기 위해서는 먼저 단백질을 녹여야 한다. 단백질을 soluble하게 하는 방법은 여러 가지 종류가 있지만 가장 많이 사용되는 방법은 urea나 guanidine HCl을 이용하는 것이다. Cell lysate를 원심분리 한 후 상등액을 제거하고 남은 cell debris는 많은 양의 단백질을 inclusion body상태로 함유하고 있다. Inclusion body로부터 단백질을 분리하는 방법은 다음과 같다. Soluble한 단백질을 분리하고 남은 cell debris를 40ml의 binding buffer에 resuspension한 후 다시 원심분리하여 상등액을 제거한다. 이때 soluble한 단백질은 제거되고 insoluble한 단백질만 남게 된다. 남은 cell debris를 위와 같은 방법을 되풀이하여 cell debris에 남아 있는 soluble한 단백질을 가능한 한 많이 제거하고 마지막 단계에서 cell debris를 6M urea 또는 guanidine HCl이 포함된 binding buffer로 insoluble한 단백질을 녹인다. 녹여낸 단백질을 위에서 설명한 방법과 같은 방법으로 단백질을 추출한다. 이와 같이 분리된 단백질은 inclusion body로부터 녹여 낼 때 사용한 시약 (urea, guanidine HCl)에 의해 변성되어 native 단백질의 모양과 활성을 가지고 있지 않다. 단백질을 녹이기 위하여 사용한 denaturing 시약은 dialysis하면서 천천히 제거하여 refolding되고 활성을 가진 단백질을 얻을 수 있다.

나. pET expression vector를 이용한 단백질의 대량생산

위에서 설명한 Ni^{2+} column을 이용한 방법은 affinity chromatography의 일종으로 단백질의 아미노 말단이나 카르복시 말단에 His·Tag를 붙여 단백질을 쉽게 분리할 수 있었지만 Ni^{2+} column의 가격이 비싸기 때문에 대량생산의 경우 경제적성이 좋지 않다. Urea와 같은 값싼 시약을 이용하여 특정한 column을 사용하지 않으면서 경제적이고 쉽게 분리하는 방법을 이용하였다.

3. 형질전환 어류생산

가. 어류의 β -actin promoter의 cloning

β -actin promoter를 cloning하기 위하여 β -actin cDNA를 먼저 cloning한다.

cDNA cloning은 어류의 성장 및 내병성 유전자 cloning하는 방법과 같은 방법으로 어류의 뇌로부터 cloning한다. QIAGEN의 Genomic-tip System을 사용하여 간으로부터 genomic DNA를 추출한다. 추출한 DNA를 restriction enzyme으로 절단하고 이 절단된 genomic DNA를 restriction cassette에 ligation시킨다. Ligation된 DNA를 template로 사용하고 β -actin 유전자의 5'에 해당되는 reverse primer와 restriction cassette에 해당되는 forward primer를 만들어 LA-PCR를 한다. Specific한 band가 생성되지 않을 경우 nested PCR를 한다. LA-PCR에 의해 얻어진 DNA를 cloning vector (예, pUC19)에 cloning한 다음 plasmid DNA를 추출하여 Amersham pharmacia Biotech사의 SEQ4X4 Personal Sequencing System을 이용하여 실험실에서 nucleotide sequence를 확인하거나 상업적으로 염기서열 결정을 해주는 회사를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

나. 유전자 이식 vector construction

이 연구에서 clonin한 β -actin promoter는 유용유전자를 어류에서 발현하는데 이용하였다. 그리고 cDNA cloning에서 밝혀진 polyadenylation signal을 사용하여 polyadenylation을 유도하였다. 다시 요약하면 유전자 이식에 필요한 vector는 같은 어류의 DNA로부터 만들어진 부분과 vector를 *E. coli*에서 amplification하기 위해 필요한 DNA로 구성하였으며 유전자 이식단계에서 어류의 DNA만으로 구성된 부분을 이식하였다.

다. 유전자 이식방법

유전자 이식을 위하여 microinjection 방법과 더불어 electroporation 방법을 사용하여 대량이식방법의 최적조건을 확립하여 사용하였다. 이를 위한 기자재 및 기본적인 테크닉은 확보되어 있는 상태이다.

라. Transgenic fish에 있어서의 유용유전자의 발현정도의 검토

유용유전자의 이식에 의해 형성된 transgenic fish에서는 다양한 체세포에서 유

용유전자의 발현이 일어나게 된다. 이러한 발현은 각 조직 간에 있어서의 발현 정도의 차이 또는 어류의 체내에서 일어나는 feed back 작용 등에 의해서 생리적으로 조절된다고 추정된다. 그러므로 유용유전자의 발현을 세포단위에서 파악을 함으로써 transgenic fish의 생리적 mechanism을 추정하여 최종 목표인 산업화에 있어서 필요한 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

4. 유용유전자 단백질의 경구 투여에 의한 성장효과

연구대상 어류의 사육은 실험에 필요한 충분한 수조가 시설되어 있는 제주대학교 해양과학대학 어류 유전육종실험실에서 실시하였다.

가. 예비사육(순치사육)

연구대상어류 중 체형이 비정상적으로 보이는 개체와 월등하게 크기의 차이가 인정되는 것은 선별 제거한 후 사료는 EWOS사의 직경 3mm의 고압팽창사료(extruded pellet)를 매일 아침 10시, 오후 2시, 6시 3회 걸쳐 공급하면서 15일간 예비사육하였다.

나. 실험어 사육

순치사육이 끝난 치어를 1차 사육을 실시하며 각 시험구별로 2반복으로 수행한다. 그리고 1차 사육이 끝난 후에 실험어의 성장에 따라 사육수조내의 과밀 현상을 피하기 위해서 각 시험구당 사육미수를 무작위로 추출하여 2반복으로 재설정한다.

다. 사료공급

시험 기간동안 EWOS사의 고압팽창사료(extruded pellet, EP)를 1일 3회(오전 10시, 오후 2시, 6시) 충분히 공급하고 사료의 크기는 성장함에 따라 바꾸어 준다.

라. 어류의 재조합 성장 호르몬 투여

유전자 재조합 기술로 대량 생산된 recombinant fish somatotropin (rFST)을 분말 제제화 하여 사용하였다. 시험구의 설정은 rFST의 공급시기를 평균 체중을 고려하여 주기적으로 공급하며 급이 농도별로 3개의 시험구와 하나의 대조구를 설정하여 사육한다.

마. 사육환경 및 성장조사

실험 기간중의 수온, 용존산소(dissolved oxygen, DO), pH, 염분을 매일 오전 10시에 측정한다. 각 실험어의 어체측정은 스트레스를 최대한 줄이기 위해 15일간의 순치사육이 끝난 후 2주 간격으로 실험대상 어류의 전미수를 대상으로 전장과 체중을 측정한다. 체중은 top loading 저울(모델 TS-asks)을 이용하여 0.1 g까지 측정하고, 전장은 자체 제작한 측정판을 이용하여 1 mm까지 측정한다. 그리고 어체를 측정하는 날은 아침에 사료를 공급하지 않았다.

바. 조사항목 및 통계분석

모든 자료의 통계분석은 SAS 통계처리 소프트웨어를 이용하였으며, ANOVA-test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정한다.

5. Transgenic fish의 유전자 이식 및 발현 확인

가. RT-PCR analysis

조직으로부터 total RNA 또는 mRNA를 분리하여 어류의 유용유전자에 해당되는 primer를 두 개(forward와 reverse primer) 합성하고, RT-PCR로 이식된 유전자가 발현되는지를 확인하였다.

나. GFP (Green fluorescent protein)를 이용한 조직에서의 단백질 발현 확인

어류로부터 분리한 β -actin promoter의 downstream에 GFP 유전자를 cloning한다. 이 cloning된 vector를 *E. coli*에 transformation하여 vector를 대량생산한다. 이 vector를 수정된 어류의 one cell stage의 embryo에 microinjection 하거나 electroporation을 이용하여 유전자 이식을 한다. 배가 발생하는 동안 GFP의 expression을 현미경하에서 발현되는 pattern과 발현정도를 관찰하였다.

6. 어류병원성 세균 균주 확보 및 감염시험을 통한 내병성 검정

가. 어류병원균의 분리 및 동정

병어 시료 채집은 제주도의 어류 양식장을 중심으로 매월 1-2회 세균성 질병에 감염된 것으로 추정되는 병어의 병소, 간, 신장, 그리고 비장에서 균을 채집하여 TSA 한천배지에 stamp하여 백금으로 도말하고 25℃에서 48시간 배양한다. 발육한 colony를 생물학적, 생화학적 성상을 조사한다

sampling from skin lesion, liver, spleen, and kidney



TSA(25℃,48hr)



Primary test



Biological test, Biochemical test



Identification

(병어에서 분리한 세균의 동정체계)

나. 생물학적 성상

(1) 각종 배지에서의 발육

동정된 원인균을 2% NaCl을 첨가, 보통한천배지에서 18~24시간 배양한 배양액을 멸균 생리식염수 3ml에 현탁시켜 이 균액의 1백금이씩을 2%NaCl첨가 SS한천배지, MacConkey한천배지, BHI한천배지, TSA배지, TCBS한천배지, 그리고 BTB teepol한천배지에 도말하여 25℃에서 48시간 배양한 후 발육의 유무를 관찰한다. 또 보통한천배지에서의 발육상태를 관찰하기 위하여 24시간 배양한 균의 형태, 크기, Gram염색 반응, 운동성, Colony의 형태, 색소생성유무, 그리고 swarming을 관찰한다.

(2) 온도별 발육

동정된 원인균을 2% NaCl 첨가 TSA 배지에서 24시간 배양하고 여기에서 취한 1백금이의 배양균을 멸균생리식염수(3ml)에 현탁시킨 다음 이 균액의 0.1ml씩을 3ml의 1%펩톤수(NaCl 2%첨가)에 접종하여 10, 15, 20, 25, 30, 그리고 37°C의 온도구간에서 48시간 배양한 후 그 발육의 정도를 spectrophotometer에 의해 측정한다.

(3) 염분 농도별 발육

동정된 원인균을 2% NaCl첨가 TSA 배지에서 24시간 배양하고 여기에서 취한 1백금이의 배양균을 멸균생리식염수(3ml)에 현탁시킨 다음 이 균액의 0.1ml씩을 0~8% NaCl을 각각 첨가한 3ml의 1%인 peptone수 (pH7)에 접종하여 25°C에서 48시간 배양한 후 그 발육의 정도를 spectrophotometer에 의해 측정한다.

(4) pH별 발육

동정된 원인균을 2% NaCl 첨가 TSA 배지에서 24시간 배양하고 여기에서 취한 1백금이의 배양균을 멸균생리식염수(3ml)에 현탁시킨 다음 이 균액의 0.1ml씩을 pH4~10으로 각각 조정한 3ml의 1%인 peptone 수 (NaCl 2%)에 접종하여 25°C에서 48시간 배양한 후 그 발육의 정도를 spectrophotometer로서 측정한다.

다. 분리 병원균의 병원성 시험

동정된 각 균주를 BHI broth에서 24시간 증균시킨 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여채균하고, 이것을 다시 멸균생리식염수로 3회 씻은 다음 실험어 체중 100g당 균습중량 1.0mg씩을 등지느러미 아래 근육에 주사 2일 후 실험어의 신장으로부터 균을 재분리하여 어체를 2회 통과시킴으로서 균의 독력을 회복시킨 균주를 BHI broth에서 24시간 증균하여 앞의 방법과 같이 채균한다. 그리고 어체중 100g당 1.0mg씩을 실험어 10미에 주사하여 7일이내에 폐사여부로서 병원성을 판단하고 대조구의 어체는 멸균 BHI broth를 어체중 100g당 1.0ml씩 역시 근육 주사한다.

실험기간중 실험어를 0.5ton의 원형 FRP수조에서 유수식으로 수용하고, 수온은 22±2°C 범위로 순환여과식으로 사육한다. 실험어 어체중은 20g 사용한다. 실험에 앞서 사전

감염여부를 조사하기 위해 무작위로 선발하여 신장, 비장에서 병원균의 분리를 시도한다.

라. 내병성 transgenic fish의 내병성 검정

병어로부터 분리 동정된 균주를 TSA broth 배지에 접종하여 24시간 전 배양한 후 5,000rpm으로 원심분리하여 Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS, pH7.2)에 현탁시킨 후 3회 원심세척하여 침지(immersion) 및 근육피하주사(intramuscular injection)에 의한 감염시험을 행한다. 실험어는 내병성 transgenic 어류를 사용하여 감염시험을 행하는데 대조구는 같은 어종을 사용한다. 실험기간 중 실험어를 0.1ton의 원형 FRP수조에서 수온을 25℃내외에서 실시하여 폐사미수를 확인한다.

7. 어류세포의 배양법 확립

어류세포의 실험실 배양은 유해성 검정은 물론, 내병성과 같은 치료법연구에도 중요시되는 연구기술이라 할 수 있다. 그러나, 어류의 세포배양기술은 현재까지 미흡한 상태이며, 특히 우리 나라의 주요 양식대상이 되는 대부분의 해산어류의 세포배양기술은 전혀 이루어지지 않고 있다. 세포배양기술은 대부분 포유류의 연구를 토대로 이루어지고 있으나, 어류에 있어서는 단순히 그 서식 온도가 다를 뿐만 아니라, 종에 따른 세포의 성질에 많은 차이를 가지고 있어 배양기술의 확립에 어려움을 겪고 있는 것이 사실이다. 특히 주 양식어류인 대부분의 해산어류의 경우에 있어서는 세포배양에 있어서의 연구가 전무한 상태이다. 리고, 현재 과학의 발달을 통한 다양한 유전자 도입법이 개발되고 이에 따른 상품들이 증가하고 있는 것이 사실이다. 이에 동반하여 인체에 미치는 유해성의 우려 또한 증가하고 있어, 이러한 유해성을 미리 판별하는 것은 매우 중요한 관건이라 할 수 있다. 이러한 점을 해결할 수 있는 가장 안전하고 확실한 방법이 배양세포를 이용한 방법이라고 할 수 있다.

가. 어류의 세포분리 및 배양 조건의 확립

현재, 어류의 세포분리에는 Collagenase 또는 Trypsin과 같은 포유류의 효소가 사용되어 지고 있다. 이러한 효소는 그 활성 온도가 36℃전후이기 때문에 어류세포에 있어서는 효소활성에 따른 세포 손상이 나타난다(Yeo and Mugiya, 1997). 그렇기 때문에 어종에 따라 적합한 세포분리법의 검토가 이루어져야 한다. 배양온도는 어류의 서식온도를 기준으로 20~35℃ 사이에서 최적온도를 설정한다. 배양상태를 유지시키기 위한 성장인자 및 혈청의 첨가를 통하여 보다 좋은 세포를 배양할 수 있는 조건을 확립시킨다.

나. 어류 세포의 초대배양법 개발

어류의 세포는 0.01% 2-Phenoxyethanol 로 마취시켜, 조직을 분리한 후 화학적 세포 분산법에 의해 세포를 분리한다. 어류에서 분리된 조직은 Ca^{2+} 이 포함되지 않은 buffer (120 mM NaCl, 1.22 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4 , 23 mM $NaHCO_3$, pH7.4)를 이용하여 세척한 후 Collagenase (0.5 mg/ml; Wako Pure Chemicals) 및 소 혈청 알부민 (0.98 mg/ml; Sigma)을 포함한 buffer 에 약 20분간 (5~8 ml/min.) 분산시킨다. 그 후 2mM EDTA를 첨가하여 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 을 buffer로 세척을 한다. 세척한 조직은 50ml의 buffer 내에서 해부가위로 잘게 분산시켰다. 분산된 세포는 pipet으로 더욱 분리 여과시킨 후에 원심분리 (500rpm, 2분)를 3회 반복하여 과열 세포, 세포의 파편 및 적혈구 등을 제거하여 목적으로 하는 세포를 분리한다. 분리 후 플라스틱 배양접시에 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 개를 넣어 배양한다. 배양에는 0.2 μ M Bovine insulin (Sigma), Streptomycin (100 μ g/ml), Penicillin (70 μ g/ml), 및 $NaHCO_3$ (23 mM)을 첨가한 William's medium, MEM 및 L-15배지를 이용한다. 간세포의 배양은 배양액 3 ml를 첨가하고, 배양액은 매일 교환한다.

다. 어류의 cell-line 수립

초대배양한 세포를 이용하여 계대배양을 실시한다. 초대배양에 의해 세포층이 형성되면 0.05%의 trypsin을 이용하여 1분간 방치한다. 그 후 trypsin 용액을 제거하고, 실온에서 가볍게 진동을 가한다. 위상차현미경을 통해 세포가 구형화된 것을 확인한

후, 세포를 피펫으로 꺼내어 초대배양과 동일한 방법으로 배양한다. 배양액 내에는 성장촉진인자를 첨가하여 세포의 활성을 높이고, 계대배양을 지속함으로써 증식 능력이 약한 세포주를 도태시키고 시험관 내에 적합한 배양세포주를 수립한다.

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 유용유전자 분리 및 발현

가. 성장호르몬 유전자

(1) 붉바리

(가) 서 론

어류의 성장호르몬은 약 21~22 kDa의 single chain polypeptide로서, 뇌하수체 전엽의 somatotrophs (growth hormone cells 또는 α cells)에서 생산되어, vascular system으로 방출된다 (Rand-Weaver and Kawauchi, 1993). 이 호르몬은 다양한 생물학적 활성을 가진 다기능성 호르몬으로서 (Björnsson, 1997), 척추동물에서 체성장의 조절과 질소, 지질, 탄수화물 및 무기물 대사에 관여한다 (Chen et al., 1994). 또한, 성장호르몬은 연어과 어류에서 해수 적응 시기의 삼투압 조절 (Dickhoff et al., 1997; Sakamoto et al., 1997)과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 성장호르몬의 활성은 insulin-like growth factor I에 의하여 매개되는 것으로 알려져 있다 (Gray and Kelley, 1991; Moriyama et al., 2000).

Niall et al. (1971)과 Miller and Eberhardt (1983)는 nucleotide와 아미노산 서열 분석에 근거하여 성장호르몬 유전자의 진화적 기원에 대한 모델을 제안하였다. 즉, 성장호르몬 (growth hormone, GH), prolactin (PRL), placental lactogen (PL)과 somatolactin (SL)은 공동의 조상 호르몬으로부터 중복, 결실, 삽입과 치환 등을 통하여 진화된 것으로 여겨지고 있다 (Rand-Weaver and Kawauchi, 1993).

어류의 성장호르몬은 양식 산업에서 잠재적인 성장 촉진 인자로서 그 중요성을 인정받아

본 호르몬을 암호화하고 있는 유전자들의 물리·화학적 특성에 대한 연구가 진행되고 있다. 또한, 성장호르몬의 투여가 일부 어종에서 성장률을 증가시킨다고 보고되었다 (Agellon et al., 1988a; Du et al., 1992; Ben-Atia et al., 1999; Ayson et al., 2000). 최근까지, 농어목에서 분리된 성장호르몬 cDNA는 tuna (Sato et al., 1988), yellow tail (Watahiki et al., 1988), red sea bream (Momota et al., 1988), gilthead seabream (Funkenstein et al., 1991), European sea bass (Doliana et al., 1992), yellowfin porgy (Tsai et al., 1993), rabbitfish (Ayson et al., 2000), dolphinfish (Peduel et al., 1994) 등에서 그 염기서열들이 밝혀졌다. 성장호르몬의 genomic sequence는 rainbow trout (Agellon et al., 1988b), Atlantic salmon (Johansen et al., 1989), common carp (Chiou et al., 1990), barramundi (Yowe and Epping, 1995), gilthead sea bream (Almuly et al., 2000), flounder (Tanaka et al., 1995) 등에서 확인되었다.

붉바리는 농어목 (Perciformes), 바리과 (Serranidae), 우레기속 (*Epinephelus*)에 속하며, 전장 400 mm 내외까지 성장하는 온수성 어류로서, 우리나라와 일본에서 고가의 어종으로 수요가 많아 일찍부터 양식기술개발이 시도되고 있다. 그러나 붉바리의 종묘생산기술은 확립되지 않은 실정이다.

붉바리와 같이 성장이 느리고 경제적으로 중요한 어종은 성장호르몬과 같은 성장 촉진인자의 처리에 좋은 대상종이 되므로, 우리는 이 연구에서 양식기술개발이 이루어진 후에 그 공급과 수요가 증대될 것으로 예상되는 붉바리로부터 성장호르몬을 암호화하고 있는 cDNA를 cloning하여 그 염기서열을 밝히고 아미노산 서열을 추정하였으며, E. coli 발현 시스템을 이용하여 그 단백질 산물에 대한 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

(나) 결 과

붉바리 성장호르몬 cDNA의 염기 서열과 아미노산 서열 추정

그림 3는 붉바리 성장호르몬의 전체 cDNA를 cloning하기 위하여 성장호르몬 cDNA의 5'과 3' 말단을 RT-PCR로 증폭한 DNA 단편이다. RT-PCR에 사용된 primer로부터 5' 말단은 620 bp 정도의 크기로 되어 있으며 3' 말단의 크기는 약 340 bp이다(Fig. 3). RT-PCR에 의해

증폭된 5'과 3'말단 DNA 단편을 pUC19 vector의 SmaI 제한효소자리에 삽입하여 plasmid를 분리하였으며 sequencing하였다. cDNA 염기서열을 확인한 후 성장호르몬 coding sequence의 개시 codon과 종결 codon을 가지고 있는 primer를 제작하여 coding sequence를 분리하였다.

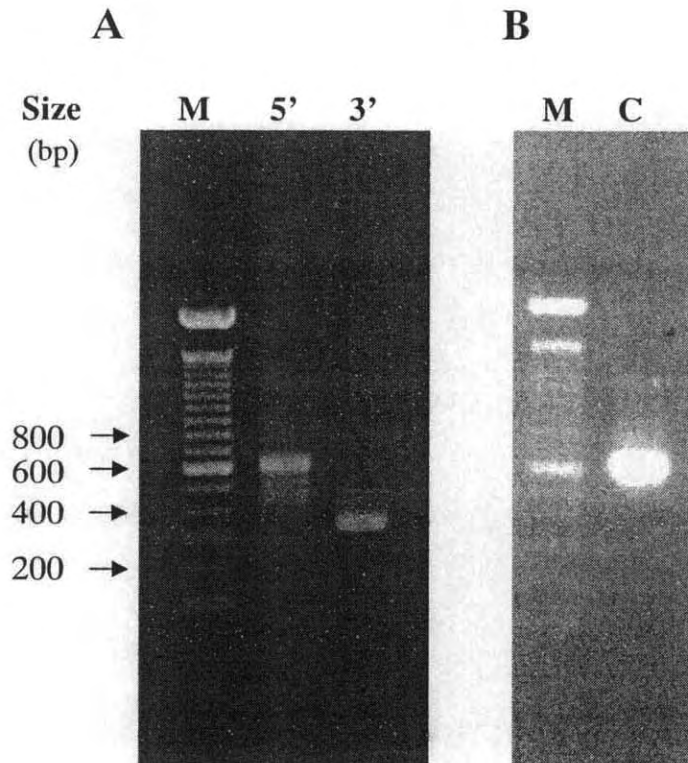


Fig. 3. RT-PCR을 이용한 붉바리 성장호르몬 유전자의 5' 말단, 3'말단 그리고 coding sequence의 증폭.

A는 5'과 3' 말단을 증폭한 결과이고 B는 coding sequence를 증폭한 결과이다. M은 size marker를 나타내며 크기를 나타내었다. 5'과 3'은 성장호르몬의 5'과 3' 말단을 나타내며 C는 coding sequence를 나타낸다.

이 실험을 통하여 밝혀진 붉바리의 완전한 cDNA 서열과 추정된 아미노산 서열을 Fig. 4에 나타내었다. 붉바리의 완전한 cDNA 서열은 전체 883 bp로서, 615 bp로 이루어진 ORF와 21 bp의 5' UTR과 247 bp의 3' UTR로 이루어진 non-coding region을 포함하고 있다. 대부분의 진핵생물 mRNA들에서 관찰되는 것처럼, polyadenylation site의 시작 위치로부터 20 bp 상류 쪽에 polyadenylation signal인 AATAAA가 위치하였다. 염기서열에 근거하여 추정된 붉바리의 성장호르몬은 187 aa의 mature peptide 서열과 17 aa의 signal peptide 서열을 포함한 204개의

아미노산으로 이루어진 polypeptide로 추정되었다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이, 붉바리의 성장호르몬 cDNA를 증폭하기 위하여 사용된 Eaka-F1와 Eaka-R1 primer 부위는 cDNA 염기서열의 562-581번째 위치에 있는 것으로 밝혀졌다.

1		5' -- GGACCTAATCCCAGACCAGCC	21
22	ATG GAC CGA GTC GTC CTC CTG CTG TCA GTA GTG TCT CTG GGC GTT TCC TCT CAG CCA ATC		81
1	M D R V V L L L S V V S L G V S S Q P I		20
82	ACA GAC GGC CAG CGA CTG TTC TCC ATC GCT GTC AGC AGA GTT CAA CAT CTC CAC CTG CTT		141
21	T D G Q R L F S I A V S R V Q H L H L L		40
142	GCT CAG AGA CTC TTC TCC GAC TTT GAG AGC AGT CTG CAG ACA GAG GAG CAG CGA CAG CTC		201
41	A Q R L F S D F E S S L Q T E E Q R Q L		60
202	AAC AAG ATC TTC CTG CAG GAC TTT TGT AAC TCT GAT TAC ATC ATC AGC CCC ATT GAC AAG		261
61	N K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K		80
262	CAT GAG ACG CAG CGC AGC TCC GTG TTG AAG CTG TTG TCG ATC TCC TAT CGG TTG GTG GAG		321
81	H E T Q R S S V L K L L S I S Y R L V E		100
322	TCC TGG GAG TTC CCC AGT CGG TCC CTG TCC GGA GGT TCT GCT CCC AGA AAT CAG ATT TTT		381
101	S W E F P S R S L S G G S A P R N Q I F		120
382	CCC AAA CTG TCT GAA TTG AAA ACT GGG ATC CTG CTG CTG ATC AGG GCC AAT CAG GAC GGA		441
121	P K L S E L K T G I L L L I R A N Q D G		140
442	GCG GAG CTC TTT CCT GAC ACG TCC GCC CTC CAG TTG GCT CCT TAT GGG AAC TAT TAT CAG		501
141	A E L F P D T S A L Q L A P Y G N Y Y Q		160
502	AGT CTG GGC GCA GAC GAG TCG CTG CGA CGA ACG TAC GAA CTG CTG GCG TGT TTC AAG AAA		561
161	S L G A D E S L R R T Y E L L A C F K K		180
562	<u>GAC ATG CAC AAG GTG GAG ACC</u> TAC CTG ACG GTG GCT AAA TGT CGA CTC TCT CCT GAG GCC		621
181	D M H K V E T Y L T V A K C R L S P E A		200
622	AAC TGT ACC CTG TAG CCCC GCCTCTCCAGTATGAAGACAAGCCCCCATGTGGATGATGTAATGCTGTGTCT		695
201	N C T L *		204
686	GTAGTCCCGCCACATGTTTTCTGACTCTGCTAATTAGCATTAGTGTAGCCACAGTGTAGCCTGTTCAGTGGTTT		774
775	GTTGGAGCAGGTGTTATTATGATGACGCCGTCGACAGGAAGTGATGTCAATTTGCCACCATGTGTAATAAAGTGTGT		852
853	GCTGTGTTGCATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA -- 3'		883

Fig. 4. The nucleotide sequence of growth hormone complementary DNA from red-spotted grouper, *E. akaara* and its deduced amino acid sequence. The amino acid residues are numbered. The termination codon is indicated by an asterisk. The four cysteine residues and the polyadenylation signal are in bold. The nucleotide sequences used for amplification of the cDNA are underlined.

염기서열에 근거하여 추정된 붉바리의 성장호르몬을 암호화하고 있는 coding region은 전체 615 base들로서, 22-24번째 위치에 있는 번역 개시코돈인 ATG로 시작되어 634-636번째 위치에 있는 번역 종결코돈인 TAG로 종결되며, 17 aa의 signal peptide 서열과 187 aa의 matured peptide 서열을 포함한 204개의 아미노산을 암호화하고 있는 것으로 추정되었다. 또한, 단백질의 C말단 쪽의 201-203 번째 위치에 추정상의 N-glycosylation site (Asn-Xaa-Thr / Ser)가 존재하는 것으로 추정되었다. Fig. 5에서 보면, 붉바리 성장호르몬의 추정된 아미노산 서열은 69, 177, 194와 202번째 위치에 4개의 cysteine 잔기를 포함하고 있는 것으로 밝혀졌는데, 비교한 다른 농어목 어류들과 동일한 위치에 위치하고 있었다.

붉바리 성장호르몬 coding region의 염기서열을 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 다른 농어목 어류와 비교해 본 결과 orange-spotted grouper, gilthead seabream, yellowfin seabream, barramundi perch, yellow tail, croceine croaker, yellow perch, European sea bass, tilapia, Mozambique tilapia와 three spot gourami에 대하여 각각 96.9%, 88.6%, 88.0%, 86.7%, 85.7%, 85.5%, 85.0%, 84.6%, 83.4%, 82.4%와 80.8%의 높은 유사성을 보였고, 추정된 아미노산 서열은 각각 98.5%, 96.1%, 95.1%, 95.1%, 88.7%, 90.7%, 92.6%, 90.7%, 89.7%, 88.7%와 87.7%의 높은 상동성을 보였다 (Table 1). 한편, 사람 (GenBank accession number, AAA98618)과 소 (GenBank accession number, AAA30543)의 성장호르몬 아미노산 서열과 비교한 결과는 각각 33.8%와 37.6%의 낮은 상동성을 보였다 (data not shown).

*E. coli*에서 붉바리 성장호르몬 cDNA의 발현

붉바리 성장호르몬 coding region의 아미노산 조성으로부터 추정된 signal peptide와 mature peptide를 포함한 전구체호르몬과 mature peptide 만을 포함한 성숙한 성장호르몬의 분자량은 Compute pI/Mw tool을 사용하여 계산하였으며, 각각 약 23.1 kDa과 21.3 kDa이었다 (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html). SDS-PAGE 분석결과 *E. coli*에서 발현된 성장호르몬 산물은 추정된 단백질의 분자량과 일치하는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 6).

<i>Epinephelus akaara</i>	MDRVVLLLSV	VSLGVSSQPI	TDQQRLFSIA	VSRVQHLHLL	AQRLFSDFES	SLQTTEEQRQL	60
<i>Epinephelus coioides</i>	-----	-----	-----	-----	-----	T-----	60
<i>Acanthopagrus latus</i>	---M---	L-----	-----	-----	-----	-----	60
<i>Dicentrarchus labrax</i>	--AI---	L-V-----	-E-----	-E-HN---	-----	-E-----	60
<i>Lates calcarifer</i>	-----	L-----	-S-----	-----	-----	-R-E-----	60
<i>Oreochromis mossambicus</i>	-NS-Q---	C-----	Q-----	-S-----	-N-T-Y---	-----	60
<i>Oreochromis niloticus</i>	-NS-----	C-----	Q-----	-S-----	-N-T-----	-----	60
<i>Perca flavescens</i>	-E-A---	L-----	-----	-----	-----	-I-E-----	60
<i>Pseudosciaena crocea</i>	---L---	LT-----	Q IEN---	MD AT---	-----	-----	60
<i>Seriola quinqueradiata</i>	-----	L-----	-S-H---	-I-N---	-----	-N-T-D---	60
<i>Sparus aurata</i>	---M---	M-----	-----	-----	-----	-----	60
<i>Trichogaster trichopterus</i>	-K-LF-F-	L-----	-S-----	-----	-----	-T-----	60
<i>Epinephelus akaara</i>	NKIFLQDFCN	SDYIIISPDK	HETQRSSVLK	LLSISYRLVE	SWEFFPSRSL	GGSAAPRNQIF	120
<i>Epinephelus coioides</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----S	120
<i>Acanthopagrus latus</i>	-----	-----	-----	-----	-----	A-----S	120
<i>Dicentrarchus labrax</i>	-----	-----	-----	I-----	-----	V-P-A-S	120
<i>Lates calcarifer</i>	-----	-----	-----	-----	S-----	D-S	120
<i>Oreochromis mossambicus</i>	-----	-----	-----	G-----	-----	SL-S	120
<i>Oreochromis niloticus</i>	-----	-----	-----	G-----	-----	SL-S	120
<i>Perca flavescens</i>	-----	-----	-----	-----	-----	VS-S	120
<i>Pseudosciaena crocea</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----S	120
<i>Seriola quinqueradiata</i>	-----	-----	-----	-----	S-F---	L-S	120
<i>Sparus aurata</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----S	120
<i>Trichogaster trichopterus</i>	-----	-----	-----	I-----	-----	Y-Q-Y-S	120
<i>Epinephelus akaara</i>	PKLSELKTGI	LLLIRANQDG	AELFPDTSAL	QLAPYGNYYQ	SLGADESRRR	TYELLAQCFKK	180
<i>Epinephelus coioides</i>	-----	-----	S-----	-----	-----	-----	180
<i>Acanthopagrus latus</i>	-----	H-----	E-----	S-----	D-----	P-T-----	180
<i>Dicentrarchus labrax</i>	-----	-V-G---	M-S-T---	-----	-----	-----	180
<i>Lates calcarifer</i>	-----	-----	M-S-S---	-----	-----	-----	180
<i>Oreochromis mossambicus</i>	-R-----	-----	E-----	NY-DT-	H-----	GN-Q-----	180
<i>Oreochromis niloticus</i>	-R-----	-----	E-----	NY-DT-	H-----	GN-Q-----	180
<i>Perca flavescens</i>	-----	K-SE---	S-----	-----	-----	ST-----	180
<i>Pseudosciaena crocea</i>	---M---	-----	A-I-N---	-----	SGE---	-----	180
<i>Seriola quinqueradiata</i>	-R-----	Q-T---	M-S-V---	F-----	GE-L---	N-----	180
<i>Sparus aurata</i>	-----	H-----	E-----	I-S---	-----	T-----	180
<i>Trichogaster trichopterus</i>	---MR---	Q-K---	M-S-GVVP	-----	-----	E-S-----	180
<i>Epinephelus akaara</i>	DMHKVETYL	VAKCRLSPEA	NCTL	204	-----	-----	204
<i>Epinephelus coioides</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Acanthopagrus latus</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Dicentrarchus labrax</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Lates calcarifer</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Oreochromis mossambicus</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Oreochromis niloticus</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Perca flavescens</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Pseudosciaena crocea</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Seriola quinqueradiata</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Sparus aurata</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204
<i>Trichogaster trichopterus</i>	-----	-----	-----	204	-----	-----	204

Fig. 5. Alignment of the amino acid sequence of red-spotted grouper GH with other Perciformes GHs. Dashes (-) indicate amino acid residues identical to those of red-spotted grouper GH. Four highly conserved cysteins are in bold. The sequence of red-spotted grouper (*E. akaara*) GH is compared with the sequences of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, AY038606, unpublished), yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*, S58867, Tsai et al., 1993), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, X65716, Doliana et al., 1992), barramundi perch (*Lates calcarifer*, U16816, Yowe and Epping., 1995), Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*, AF033805, unpublished), tilapia (*Oreochromis niloticus*, M84774, unpublished), yellow perch (*Perca flavescens*, AY007303, unpublished), croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*, AF231941, unpublished), yellow tail (*Seriola quinqueradiata*, M35627, Watahiki et al., 1988), gilthead seabream (*Sparus aurata*, AF195646, Almuly et al. 2000), and three spot gourami (*Trichogaster trichopterus*, AF157633, unpublished) GHs.

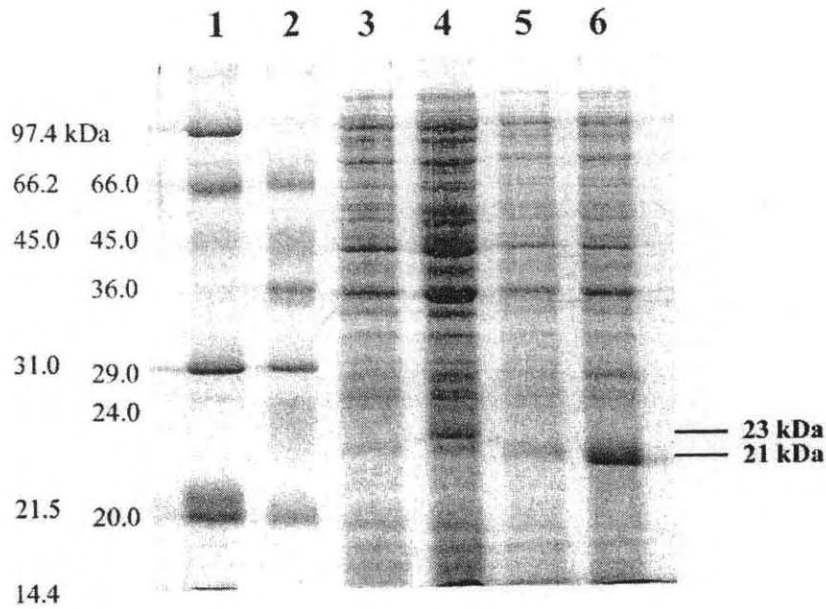


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of the crude GH protein of the red-spotted grouper expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cell cultures following induction and non-induction of transformants. The transformed cells presented in lanes 4 and 6 were induced by IPTG as described in Materials and Methods. Lane 1: SDS-PAGE molecular weight standards, low range (BIO-RAD). Lane 2: The low molecular weight range (Sigma). Lane 3: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the GH ORF region (non-induced with IPTG). Lane 4: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the GH ORF region (induced with IPTG). Lane 5: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the mature GH region (non-induced with IPTG). Lane 6: Crude lysate of the *E. coli* harbouring pET11a vector with the mature GH region (induced with IPTG). The GH proteins expressed are indicated. These bands are absent in the non-induction *E. coli* BL21 (DE3) crude lysate presented in lanes 3 and 5.

(다) 고 찰

본 연구를 통하여 붉바리의 뇌하수체로부터 mRNA를 분리·정제하여 성장호르몬을 암호화하고 있는 것으로 추정되는 완전한 cDNA를 cloning하고 그 염기 서열이 규명되었다. 같은

우래기 속에 속하는 GenBank에 등록된 orange-spotted grouper (*E. coioides*)의 성장호르몬 ORF 염기서열과 아미노산서열을 이 연구를 통하여 밝혀진 붉바리의 성장호르몬 ORF 염기서열과 아미노산서열과 비교한 결과, 각각 96.9%와 98.5%로서 매우 높은 상동성을 보였다 (Table 1).

Table 1. Percentage nucleotide and amino acid sequence homology of the GH cDNAs of Perciformes species. The values below the diagonal are the similarity of amino acid sequences among Perciformes (total 204 amino acid residues), the numbers above the diagonal are the similarity of nucleotide sequences (total 615 nucleotides) for each pair.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Epinephelus akaara</i>	-	96.9	88.0	84.6	86.7	82.4	83.4	85.0	85.5	85.7	88.6	80.8
2. <i>Epinephelus coioides</i>	98.5	-	89.6	86.8	88.3	83.6	84.6	87.0	86.8	86.7	90.4	81.8
3. <i>Acanthopagrus latus</i>	95.1	95.6	-	88.0	87.8	83.3	84.1	87.0	88.3	86.5	97.6	83.3
4. <i>Dicentrarchus labrax</i>	90.7	91.2	88.7	-	86.8	82.4	83.3	85.5	86.8	85.0	88.8	80.3
5. <i>Lates calcarifer</i>	95.1	95.6	93.1	90.7	-	84.6	85.2	87.6	86.2	89.6	88.6	84.9
6. <i>Oreochromis mossambicus</i>	88.7	88.2	85.8	83.3	86.3	-	98.7	81.0	83.6	82.6	84.1	79.2
7. <i>Oreochromis niloticus</i>	89.7	89.2	86.3	84.3	87.3	99.0	-	82.1	84.1	83.7	84.7	80.0
8. <i>Perca flavescens</i>	92.6	93.1	92.6	89.2	92.2	84.3	85.3	-	84.7	84.6	86.7	81.0
9. <i>Pseudosciaena crocea</i>	90.7	90.7	88.7	86.3	89.2	85.3	86.3	87.3	-	85.4	89.8	80.5
10. <i>Seriola quinqueradiata</i>	88.7	89.7	87.3	85.3	90.7	83.3	84.3	85.8	84.8	-	87.0	84.6
11. <i>Sparus aurata</i>	96.1	96.6	97.5	89.7	94.1	87.3	87.7	93.1	90.2	88.2	-	83.9
12. <i>Trichogaster trichopterus</i>	87.7	87.7	86.8	84.8	88.7	81.4	82.4	84.8	83.8	84.8	87.3	-

붉바리의 성장호르몬을 암호화하는 것으로 여겨지는 완전한 cDNA의 염기서열은 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 방법을 (Schaefer, 1995) 응용하여 밝혀졌는데, 밝혀진 완전한 cDNA의 염기서열로부터 추정된 붉바리 성장호르몬 단백질은 17 aa의 signal peptide와 178 aa의 mature peptide로 구성되어 있는 것으로 추정되었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 붉바리의 signal peptide는 17 aa으로 이루어져 있는데, 인간 GH (26 aa; Seeburg, 1982), 소 GH (27 aa; Seeburg et al., 1983) 및 Indian catfish GH (22 aa; Anathy et al., 2001)와 비교하여 짧은 것으로 추정되었다.

추정된 붉바리 성장호르몬은 지금까지 보고된 다른 농어목 어류와 마찬가지로 4개의 cysteine 잔기가 매우 보존된 위치에 위치하고 있다 (Fig. 5). 지금까지 보고된 경골어류의 성장호르몬 대부분은 4개의 cysteine 잔기를 가지고 있는데, 이는 2개의 분자 간 이황화 결합의 형성을 매개함으로써 그 호르몬의 3차원 구조를 형성하게 하는 데 기여하는 것으로 알려져 있다

(Schneider et al., 1992; Somers et al., 1994; Carlacci et al., 1991). Schneider et al. (1992)은 이러한 영역의 존재로 인하여 척추동물 성장호르몬 서열 간의 강한 상동성이 진화적으로 유지되는 것으로 보고하였다. 일부 어종의 경우에 있어서 5개의 cysteine 잔기가 존재한다고 보고되었으며, Mahmoud et al. (1996)은 이러한 추가적인 cysteine 잔기는 common carp에서 수용체에 결합하는데 영향을 줄 수 있다고 보고하였다.

Venkatesh and Brenner (1997)는 참복과 다른 진골어류의 성장호르몬 아미노산 서열의 비교를 통하여 signal peptide를 포함하는 N 말단 부위가 가장 분기가 심하고, C 말단은 고도로 보존되어 있다고 보고하였다. 또한, 그들은 진골어류 성장호르몬 모두에 있어서 C 말단의 13 잔기 (CFKKDMHKVETYL)가 매우 보존되어 있으며, 진골어류에 특이적인 이러한 보존된 잔기들은 진골어류 성장호르몬과 그 수용체들 간의 상호작용에 중요한 잔기일 것이라고 추정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 이 연구를 통하여 밝혀진 붉바리 성장호르몬과 지금까지 밝혀진 다른 농어목 어류의 성장호르몬 아미노산의 비교에서도 N 말단 부위의 signal peptide 부위가 가장 분기가 심하고, C 말단 부위가 가장 잘 보존되어 있는 것으로 밝혀졌다. 그리고, Venkatesh and Brenner (1997)가 보고한 진골어류 특이적인 보존된 13잔기들도 동일한 위치에 존재하는 것으로 밝혀졌다.

양식 생산성의 개선을 위한 성장호르몬의 응용은 수많은 어류 성장호르몬의 cloning, 염기서열 결정 및 어류에 대한 형질전환 기법의 개발에 기인하여 가능하게 되었다. 실제로 Zhu et al. (1985)이 생쥐의 metallothionein gene promoter와 사람의 성장호르몬 유전자를 금붕어에 이식한 것을 시작으로 성장 촉진 등의 목적으로 빠르게 성장할 수 있는 형질전환 어류의 생산에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다. 최근에는 Nam et al. (2001)이 미꾸라지 β -actin promoter와 성장호르몬 유전자를 융합한 미꾸라지 유래의 유전자를 미세주입법에 의하여 형질전환시킴으로써 성장촉진 효과와 다음 세대로의 안정적인 전달을 보고한 바 있다.

이 연구는 붉바리 유래의 성장호르몬 유전자와 그 산물인 성장호르몬을 이용하여 속성장 및 초기감모현상이 일어나는 위험시기의 성장기간을 단축시키려는 연구의 기초실험으로 성장호르몬의 cDNA를 cloning하고 E. coli에서의 발현을 유도하였다. 그러나 아직까지 붉바리의 종묘생산이 안정적으로 이루어지지 않아 붉바리를 대상으로 성장호르몬과 그 유전자의 이용은 어려운 실정이지만 현재 아시아의 여러 국가에서 붉바리의 종묘생산에 대한 연구가 진행되고 있으며, 같은 속에 속하는 능성어류의 종묘생산에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다. 따라서, 멀지 않은 장래에 붉바리의 종묘생산이 안정적으로 이루어지게 된다면 이 연구의 결과를 유용하게 이용할 수

있으리라고 여겨진다.

(2) 능성어

(가) 서론

성장 호르몬은 일반적인 형태와 유사한 생물학적 특성을 가진 prolactin, 태반의 lactogen, somatolactin을 포함한 단백질 그룹이 속하는 single chain 단백질이다(Watahiki et al., 1988). 뇌, 뇌하수체, 면역 시스템, 태반, 유선, 정소를 포함하는 다수의 조직은 성장 호르몬 생산, 조절, 작용에 관여한다(Harvey and Hull, 1997). 이것은 신체의 성장과 뼈의 성숙 분열의 촉진과 보존을 위해 필수적이다.

성장 호르몬은 성장, 세포질 단백질 합성, 세포내 지방분해, 몸 전체의 칼슘과 인, 더 작은 양의 나트륨 대사와 오줌의 배설 뿐만 아니라 콘드로이친 황산과 콜라겐의 합성 자극 같은 다수의 중요한 생물학적 활동에 관여한다. 성장 호르몬은 또한 당뇨병 유발에 영향을 끼치지만 정확한 작용기작은 알려져 있지 않다(Hadley, 1996).

경골어류에서 성장 호르몬은 적극적으로 삼투조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이것은 이미 연어를 이용한 광범위한 연구를 통해 여러 중요한 기능이 설명되어졌다. 성장 호르몬은 성장하는 동안 먹이의 전환, 식욕 증진 뿐만 아니라 지질과 글리코겐 감소의 촉진에 이용한다. 성장 호르몬은 해수 적응과 성 성숙분열에 관여한다. 그리고 어린 연어과 어류의 유영 능력 뿐만 아니라 우세한 먹이 행동을 증진 시킨다(Bjornsson, 1997).

인간과 소와 동물의 성장 호르몬은 어린이의 불충분한 성장 호르몬 분비로 인한 성장 저해를 치료하기 위한 치료제로, 그리고 소의 우유 생산량의 증가를 위해 각각 사용되며, 현재 상업적으로 생산되어진다.

*E. coli*에서 생성된 어류의 성장 호르몬을 경구 투여한 연구에서 어류의 생존률 뿐만 아니라 성장의 증진을 보인다는 보고가 있다(Jeh et al., 1998; Ben-Aia et al., 1999).

이 연구에서는 경골어류의 일종인 능성어(seven-band grouper, *Epinephelus*

septemfasciatus)로부터 clone된 성장호르몬 cDNA를 분리하여 서열 결정 후 분석하였으며 *E. coli*에서 발현이 확인되어서 어류 양식에서 장차 성장 인자로서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 7은 RT-PCR에 의해 합성된 능성어의 성장호르몬 유전자를 보여준다. Fig. 7A는 5' 말단과 3'말단을 증폭한 결과이며 그림 7.B는 성장호르몬의 coding sequence를 증폭한 결과이다. 5'말단의 크기는 약 650 bp이고 3' 말단은 약 300 bp이며 coding sequence는 약 600 bp이다.

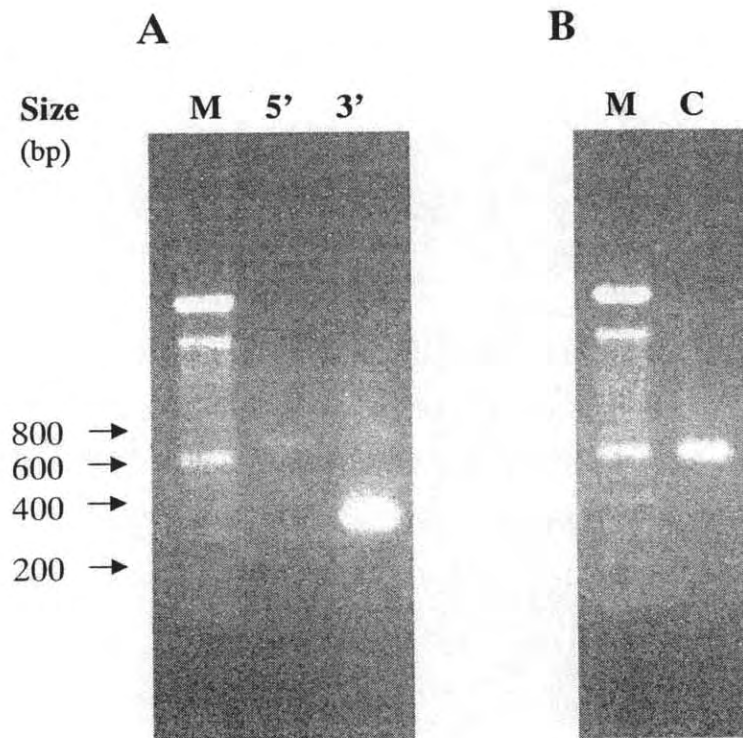


Fig. 7. RT-PCR을 이용한 능성어의 성장호르몬 유전자의 5' 말단, 3'말단 그리고 coding sequence의 증폭.

A는 5'과 3' 말단을 증폭한 결과이고 B는 coding sequence를 증폭한 결과이다. M은 size marker를 나타내며 크기를 나타내었다. 5'과 3'은 성장호르몬의 5'과 3' 말단을 나타내며 C는 coding sequence를 나타낸다.

RACE PCR에 의한 성장 호르몬 cDNA 3'-말단의 증폭

어류 성장 호르몬 서열의 정렬에 의해 확인된 어류 성장 호르몬에서 가장 보존된 3' 부분과 일치하게 primer F1 (5'-GACATGCACAAGGTGGAGAC-3')은 합성되어졌다. 이 primer는 주형으로 first strand cDNA를 사용한 성장호르몬 cDNA의 3'-말단 증폭을 위한 oligo(dT)18 primer로 사용되어졌다. 반응물 mix는 1x cloned Pfu buffer, 0.2 mM each dNTP, 100 ng의 first strand cDNA, 250 ng의 primer와 5.0 units의 cloned Pfu DNA polymerase (Stratagene, USA)가 포함되었다. PCR 조건은 94°C에서 45초 간 가열, 53°C에서 45초 간 primer 결합, 72°C에서 2분간 primer 신장 단계 25cycles 거쳐 95°C에서 1분간 최초 가열을 하고 72°C에서 10분간 최종 신장을 한다(DNA minicycler PTC-150, MJ research). PCR을 통해 얻어진 산물은 정제, 클로닝하여 서열화하였다.

RACE PCR에 의한 성장 호르몬 cDNA 5'-말단의 증폭

Poly(G) tail은 2.5 units의 종결 deoxynucleotidyl 전이효소(Amersham Pharmacia Biotech, USA), 1x TdT reaction buffer, 0.25 mM dGTP와 100 ng의 first strand cDNA가 포함된 전체 100 µL reaction volume을 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 합성된 first strand cDNA의 3' 말단에 더해졌다. Oligo(dC)18 primer로 어류 성장 호르몬에서 가장 보존된 3'-말단 부위와 일치되어 합성되어진 primer R1 (5'-GTC TCC ACC TTG TGC ATG TC-3')은 성장 호르몬 cDNA 3'-말단 증폭에 사용된 조건과 동일한 조건으로 성장 호르몬 cDNA 5'-말단 증폭에 사용하였다.

성장호르몬 coding region의 증폭

Signal peptide를 포함하는 coding region은 F2 (5'-GAG ACA TAT GGA CCG AGT CGT CCT C-3') forward primer와 R2 (5'-GAG AGG ATC CCT ACA GGG TAC AGT TGG CCT-3') reverse primer를 사용하여 증폭하였으며 처음 cDNA의 증폭 조건과 동일하다. 반면 signal peptide를 포함하지 않는 coding region은 앞서 설명한 동일한 조건으로 증폭하되 F2 primer 대신 F3 (5'-GAG ACA TAT GCA GCC AAT CAC AGA CGG C-3')

primer를 사용하였다.

Escherichia coli [BL21 (DE3)] 세포에서의 성장호르몬 발현

signal peptide를 포함하거나 하지 않는 coding region의 증폭은 NdeI 와 BamHI 로 절단한 후 겔 추출하여 pET11a 발현 벡터를 이용하여 클로닝하였다. 이 벡터는 클로닝하기 전에 NdeI and BamHI 로 절단한 후 새우의 알칼리성 탈인산화 가수분해효소를 이용하여 탈인산화 처리하였다. Ligation 후 제조자의 방법에 따라 BL21 cells 로 삽입하여 암피실린(100 μ L/mL)이 포함된 plate에 도말한다. 삽입된 콜로니를 선별하기 위하여 Novagen's vector-specific primers를 사용한 direct colony PCR을 수행한다.

BL21 (DE3) 세포안에 타겟으로한 플라스미드를 삽입하고 성장호르몬의 발현을 유도하기 위하여 매뉴얼에 따라 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 최종농도 1mM 이 되도록 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 3시간동안 배양하여 OD600=0.6이 되도록 한다. 그 후 세포배양액의 15 μ L를 90 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시켜 12% SDS 겔에 걸고 Coomassie Blue R-250 염색시약으로 염색한다(Fig. 11).

발현 단백질의 용해성을 결정하기 위하여 18 $^{\circ}$ C와 30 $^{\circ}$ C에서 세포를 배양한 후 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)의 3 mg/mL lysozyme으로 세포를 용해시키고 얼리고 녹이는 과정을 세 번 거친다. 그 후 세포는 초음파 분해하여 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 16,000 g로 원심분리하여 상층액과 펠렛을 분리하고 앞에서 말한 겔 상에 전기영동한 후 확인한다.

뉴클레오타이드와 아미노산의 염기서열 분석

성장호르몬 전구체의 N-말단 signal peptide는 SignalP World Wide Web server 에 나타나 있으며 분절부위(cleavage sites)와 signal peptide/non-signal peptide 예측은 웹사이트 상의 프로그램으로 행하였다. 그리고 이차 구조의 예측은 nnpredict에서 수행하였으며, 이 프로그램은 아미노산 서열에 있는 각 잔기의 2차 구조 타입을 예측하는 프로그램이다. 이 프로그램의 기본 원리는 two-layer, feed-forward neural network 알고리즘을 이용하여 예측하는 것이다. sbgGH 서열은 알려져 있는 다른 성장호르몬의 염기서열과 CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Program (version 1.8, 1999)을 통해 비교하였고 다른 모든 분석들은 국립 생물정보

센터(National Center for Biotechnology Information,NCBI) 에 의해 개발된 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program으로 수행 되었으며 사용가능한 모든 염기서열 데이터의 유사도를 조사하였다.

(나) 결과 및 토의

E. septemfasciatus 성장호르몬의 cloned cDNA 염기서열은 612 bp의 open reading frame을 포함하고 있으며 류신(15.7%)과 세린(12.3%)을 주요 구성성분으로 하는 분자량 23028.3 g/mol (theoretical isoelectric point =6.90) 의 폴리펩타이드를 코딩한다(Fig. 8). 예측된 단백질은 signal peptide로 추정되는 17개 아미노산을 갖으며 이것은 전사 후 변형 과정에서 연속적으로 분화된 것이다. 어떤 데이터도 성숙 단백질의 아미노산 서열에 관해서 이용할 수 없다. 그러나 염기서열분석결과 N-말단에서 다른 물고기의 성장호르몬 17번째와 18번째 분절부위(cleavage site) 사이의 signal peptides 와 높은 유사성을 보이는 17개의 높은 소수성 잔기의 뻗침(stretch)을 확인 하였으며 이것은 이 부분이 성장호르몬 전구체의 signal peptide를 포함 할 것이라는 뜻을 내포한다. 이 signal peptide는 연어류[무지개송어(Agellon and Chen, 1986), 참연어(Sekine et al., 1989), 은연어(Gonzalez-Villasenor et al., 1988), 대서양연어(Lorens et al., 1989), 이들은 22개의 아미노산], 실루리과 어류 [indian catfish는 22개의 아미노산(Anathy et al., 2001)], 포유동물[쥐(Rohn and Weigent, 1995), 사람(Roskam and Rougeon, 1979), 소 성장호르몬(Santome et al, 1973)은 26개의 아미노산] 보다 짧은 것으로 나타났다. 성숙 단백질은 187개의 아미노산을 포함하며 이것은 이미 알려져 있는 참치(Kariya et al., 1989), gilthead seabream (Funkenstein et al., 1991)와 yellow tail (Watahiki et al., 1988)의 성숙단백질과 같은 크기이다. 하지만 몇 종류의 어류[잉어(Chao et al., 1989), 참연어(Sekine et al. 1985), 은연어(Gonzalez-Villasenor, 1988), 무지개송어 (Rentier-Delrue et al., 1989)]의 성장호르몬 보다는 한개의 아미노산이 부족하여 짧다. 그러나 이것은 red seabream의 성장호르몬 보다 한개의 아미노산을 더 가지고 있으며(Momota et al., 1988), 이것은 L65 아미노산 이다. L65 는 소수성 아미노산들 가운데 위치하는 아미노산 이며, 이것이 결손되면 호르몬의 결정적인 효과를 잃게 될 수도 있을 것이다.

네 개의 시스테인 잔기들은(Cys52, Cys160, Cys177, Cys185) 성숙한 sbgGH에서 발견되었으며 물고기, 닭(Lamb et al., 1988)과 포유동물[rat (Rohn and Weigent, 1995), 소 (Santome et al., 1973), 돼지(Kato et al., 1990), 염소(Yamano et al., 1988), 말 (Ascacio-Martinez and Barrera-Saldana, 1994), 사람(Roskam and Rougeon, 1979)]의 다른 성장호르몬과 거의 같은 자리에 위치해 있었다. 시스테인 잔기들 사이에 두개의 S-S결합의 존재는 몇 개의 포유동물의 성장호르몬에서 설명되었으며 이들의 S-S결합은 구조적 완전함과 호르몬의 생물학적 활성에 매우 중요하다고 밝혀졌다(Anathy et al., 2001).

한가지 가능한 N-glycosylation site (Asn-X-Ser or Asn-X-Thr)는 sbgGH의 아미노산서열에 존재 하였으며 알려진 다른 성장호르몬에서는 Asn184 위치에 해당한다. 예측된 2차 구조 구성에 따르면 sbgGH의 52.5%의 α -helixes 구조와 5.9%의 확장된 가닥들로 구성되었다. 이것은 주로 친수성으로 signal peptide 부위에서 약간 높은 친수성을 보이며 66.2% 정도의 잔기가 용매에 대해 16% 이상의 잔기 표면이 용해 될 것으로 예상된다. 예상대로 이것은 소마토트로핀 호르몬 그룹의 보존적 호르몬 범위를 포함하고 있으며 5번째부터 202번째 아미노산 까지 연결되었다. sbgGH는 또한 4번째부터 17번째 아미노산에 낮은 복잡성 부위를 포함하고 있으며 이것은 BLAST-P program을 이용하여 다른 서열과 비교하는 동안에는 무시되었다. 148번째부터 204번째 아미노산 사이의 매우 보존적인 부위는 다른 종류에서의 성장호르몬을 확인하기 위한 probe 제작에 매우 유용할 것이다.

“All non-redundant GenBank CDS database”에서의 서열과 sbgGH 아미노산 서열의 비교는 BLAST-P program 과 analysis of 450 proteins을 사용하여 그것의 다른 어류강 종의 최대 homology를 밝혔다. 기대에 따라 homology의 정도는 어류, 양서류, 조류, 파충류와 포유류의 순서로 감소했다. *Caranx delicatissimus* (hard-tail jack)의 상피의 성장 요인에 유달리 높은 동일성(67%)을 보여주었다. 그것은 그것이 연어, 잉어, 메기, 거피와 약간의 뱀장어 같은 다른 약간의 어류 성장 호르몬과 공유했던 동일성보다 높았다. hard-tail jack의 상피 성장 인자 서열 사용의 의혹으로 이것을 재검토되었고 사실임을 알았다. 흥미있는 또 다른 발견은 멀리 떨어진 관련 분류학상의 그룹도 sbgGH의 높은 homology를 갖는 성장 호르몬의 존재로 밀접하게 관련된 그룹에서도 성장호르몬이 비교되어졌다. 예를 들어 양볼락목 경골어류 *Cottus kazika* 성장호르몬은 *E. septemfasciatus*과 87%의 동일성을 동시에 농어목 경골어류 *Periophthalmus modestus*와는 오직 64%의 동일성을 보였다. 거의 전부 분석되는 분류학의 그룹에서, 더 가까운 관계의 분류학상의 그룹에서 낮은 score의 성장 호르몬은 높은 score의 다음 떨어진 관계의 분류학상의 그

룹 보다 sbgGH 서열이 낮은 homology를 보였다. 예를 들면, 경골어류 *Abramis brama*의 성장 호르몬은 sbgGH에 양서류의 *Xenopus laevis* 성장 호르몬 보다 낮은 서열의 유사성을 가졌다 (Fig. 10). 이것은 다른 먼 관계의 동물일지라도 같은 polypeptide 서열을 유지하려는 경향이 진화적으로 보인다. 이것은 polypeptide 서열 분석으로 동물에서 진화 관계의 추정을 복잡하게 한다.

Watahiki (1989)는 4개의 Cystein을 포함하는 37 잔여물을 확인했다. 그것은 20개의 성장 호르몬의 6개의 뚜렷한 영역(GD5, ILA와 GD1)에서 보존된다. 분자 내부의 GD5 영역이 구조 형성에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 기대되는 것과 동시에 분자 표면에서 찾은 GD1, GD2, GD3, GD4 에 대응하는 지역은 다른 잔기와 성장호르몬의 특별한 결합에 관련된다고 생각되어진다. 이 GD5 지역 안의 4개의 보존 된 Cys 잔기에서의 3개의 존재는 분자의 안정화에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. ILA 지역은 인슐린과의 상호작용에 관여하는 것으로 알려져 있으며 모든 이 37 잔기는 sbgGH에서 발견된다(Fig. 8).

CGAGCAGCTGAACTCAGACCTGATCCACCAGAGCCAGACCTGATCCACCAGAGCCAGACCAGATCCCAGACCAGCC	76
ATGGACCGAGTCGTCCTCCTGCTGTCAGTAGTGTCTCTGGGCGTTTCTCTCAGCCAATCACAGACGGCCAGCGTCTGTTC	157
<u>M D R V V L L L S V V S L G V S S Q P I T D G Q R L F</u>	27
TCCATCGCCGTCAGCAGAGTTCAACACCTCCACCTGCTTGCTCAGAGACTCTTCTCTGACTTTGAGAGCACTCTGCAGACG	238
<u>S I A V S R V Q H L H L L A Q R L F S D F E S T L Q T</u>	54
GAGGAGCAGCGACAGCTCAACAAGATCTTCTGCAGGACTTCTGTAACTCTGATTACATCATCAGCCCCATCGACAAGCAC	319
<u>E E Q R Q L N K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K H</u>	81
GAGACGCAGCGCAGCTCCGTGTTGAAGCTGTTGTCAATCTCCTATCGGTTGGTGGAGTCTGGGAGTTCCCAGTCGGTCC	400
<u>E T Q R S S V L K L L S I S Y R L V E S W E F P S R S</u>	108
CTGTCCGGAGTTCTGCTCCAGAAACCAGATTTCTCCAAACTGTCTGAATTGAAGACCGGGATCCTGCTGCTGATCAGG	481
<u>L S G G S A P R N Q I S P K L S E L K T G I L L L I R</u>	135
GCCAATCAGGACGGAGCGGAGCTCTCCCTGACACGTCCGCCCTCCAGTTGGCTCCTTATGGGAACTATTATCAGAGTCTG	562
<u>A N Q D G A E L F P D T S A L Q L A P Y G N Y Y Q S L</u>	162
GGCGCCGACGAGTCGCTGCGACGAACGTACGAACTGCTGGCGTGTTC AAGAAAGACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTG	643
<u>G A D E S L R R T Y E L L A C F K K D M H K V E T Y L</u>	189
ACGGTGGCTAAGTGTGACTCTCTCCTGAGGCCAACTGTACCCTGTAGCCCAGCCTCTCCAGTATCAAGACACGCCCCAT	724
<u>T V A K C R L S P E A N C T L</u>	204
GTGTATGATGTAATGCTGTGTGTTCTGTAGTCTGCCACATGTTTTCTGACTCTGCTAATTAGCATTAGCATTAGTGTTA	805
GCCACAGTGTTAGCCTGTGTTCAAGTGGTTTGTGGAGCAGGTGTTATTATGATGACAGCCGTCGACAGGAAGTATGTCAT	886
ACTGTCAACATGTGT aataaa GTGTGTGCTGTGTGCATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Fig. 8. Nucleotide sequence and the putative amino acid sequence of *Epinephelus septemfasciatus* growth hormone cDNA. The poly(A) tail is highlighted and the polyadenylation signal is given in bold simple case letters. The putative signal peptide sequence is underlined and the evolutionary conserved five domains (GD1 to GD5) and the region correlated with insulin like activity (ILA) are indicated.


```

E. akaara      MDRVLLLLSVVSLGVSSQP | TDGQRLFS | AVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLQTEEQRQL
E. awoara     MDRVLLLLSVVSLGVSSQP | TDGQRLFS | AVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLQTEEQRQL
E. septemfasciatus MDRVLLLLSVVSLGVSSQP | TDGQRLFS | AVSRVQHLHLLAQRLFSDFESTLQTEEQRQL
E. coioides   MDRVLLLLSVVSLGVSSQP | TDGQRLFS | AVSRVQHLHLLAQRLFSDFESTLQTEEQRQL
                *****-*****

E. akaara      NK | FLQDFCNSDY | | SP | DKHETQRSSVLKLLS | SYRLVESWEFPSRSLSGGSAPRNQ | F
E. awoara     NK | FLQDFCNSDY | | SP | DKHETQRSSVLKLLS | SYRLVESWEFPSRSLSGGSAPRNQ | F
E. septemfasciatus NK | FLQDFCNSDY | | SP | DKHETQRSSVLKLLS | SYRLVESWEFPSRSLSGGSAPRNQ | S
E. coioides   NK | FLQDFCNSDY | | SP | DKHETQRSSVLKLLS | SYRLVESWEFPSRSLSGGSAPRNQ | S
                *****-

E. akaara      PKLSELKTG | LLL | IRANQDGAELFPDTSALQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLACFKK
E. awoara     KLSELKTG | LLL | IRANQDGAELFPDSSALQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLACFKK
E. septemfasciatus PKLSELKTG | LLL | IRANQDGAELFPDTSALQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLACFKK
E. coioides   PKLSELKTG | LLL | IRANQDGAELFPDSSALQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLACFKK
                *****-*****

E. akaara      DMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL
E. awoara     DMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL
E. septemfasciatus DMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL
E. coioides   DMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL
                *****

```

Fig. 9. Multiple sequence alignment of known *Epinephelus* growth hormone amino acid sequences. Asterisks show identical sequences while polymorphic regions are shown by dashes. *Epinephelus septemfasciatus* growth hormone had score % of 99.5, 99.0 and 98.5 with *Epinephelus coioides* (AY038606, unpublished), *Epinephelus akaara* (Kang et al., 2003) and *Epinephelus awoara* (AF232711, unpublished), respectively.

어류는 가장 오래된 척추동물이며 약 5억년 전에 진화되었다고 생각된다. 농어목은 어류 중 가장 다양한 어종을 포함하는 어류의 목(Order)이며 가장 큰 척추 동물목이다. 농어목에 속하는 *E. septemfasciatus*는 4종의 *Epinephelus* 성장호르몬과 함께 서열화 되어졌다. 아미노산의 비교는 *E. septemfasciatus* growth hormone과 다른 알려진 3개의 *Epinephelus* growth hormones을 대상으로 Multiple Sequence Alignment Program으로 수행되어졌다(Fig. 9). 이 염기 정렬은 높은 유사도를 나타냈고 오직 147번째만 다형을 나타내었다. 아미노산 다형은 51번째 120번째 147번째 지역에서 보여진다. 제 51 위치에서 많은 경골어류 발견되는 serine 잔기는 *E. septemfasciatus*와 *E. coioides*에서 threonine과 바뀌었으며, 그것은 인슐린과 같은 활동에 책임이 있다고 기대되어지는 지역에 있다. 이것은 양쪽 아미노산이 유사한 기능을 공유함으로써 가능할지 모른다. 다른 2 다형은 보존되었던 영역 밖에서 발견된다. family에 속하고 성장 호르몬이 공동 조상에서 복제와 확산으로 유래되어지거나, 조상의 유전자가 더 작은 유전자 또는 코딩 지역이 연속되고 추가 영역의 삽입에 의해 일어났다고 생각한 이후 sbgGH sequence는 다수의 어류와 somatotropin hormone family에 속하는 고등척추동물과 비교되어졌다. 이것은 비교 연구에서 종간 진화의 관계를 입증하고, paralogs 또는 orthologs뿐만 아니라 진화의 패턴을 알아보기 위해 유용하다. 다른 혈통(주로 바다의 동물) 동물의 성장 호르몬 서열의 세계적인 다중 정렬은 보존되는 양쪽 조상 척추 동물 예를 들어 agnatha(무악구동물), chondrichthyes(연골어류)와 현대 포유류 같은 그룹에서 25개의 아미노산을 풀었다. 이 25 잔기로 제한된 GD5 지역 내에서 찾은 분자 10개는 흥미롭다. 이것들은 3개의 leucine (Leu174, 175, 189)을 포함한다. 그것은 아마 분자의 소수성 중심의 안정화에 관련될지도 모른다. Threonine 187, Tyrosine 188 and Lysine 179, Aspartic acid 181, Histidine 183의 강렬한 잔기는 그들 자신과 친수성 상호작용을 만들어 분자의 안정화를 수반할 지도 모른다. 다른 경골어류 성장 호르몬과 같이, sbgGH는 다른 더 높은 척추동물 그룹과 *Prionace glauca* (푸른상어)와 비교되는 ILA 지역에서 낮은 homology보여준다. 이 관찰은 경골어류 성장 호르몬이 매우 낮은 인슐린과 같은 활동을 갖는다는 이전의 연구와 일치할지도 모른다.

sbgGH는 *E. coli* (BL21)에서 발현되어졌으며, 겔위의 분석은 IPTG에 유도된 샘플과 IPTG 없는 샘플과 비교하여 높은 강도의 다른 밴드 나타내었다. 이것에서 pre-성장 호르몬과 성숙한 단백질의 분자량은 이론적인 값과 유사했다. 거의 전부 30°C에서 발현되는 sdgGH는 세포 내에 함유물으로써 존재하며, 우리는 온도를 18°C로 낮추어서 발현을 시도하였으며 이를 경우 총체

적인 산물은 온도의 감소와 함께 감소했으나 총 산물의 10-20%를 더 용해되어 용해율의 상승을 가져왔다. 그러므로 용해 형을 얻기 위해서는 30℃보다 18℃가 좋다고 생각된다. 그것은 또한 guanidium 염산염과 urea와 같은 온화한 세제를 사용하고 있는 신체 함유물에서 단백질을 용해 할 수 있을지도 모른다. *E. coli*에서의 높은 수준의 성숙한 성장호르몬의 발현은 양식을 위해 sbgGH의 공급원으로써 이 시스템을 사용할 수 있을 것이라 제안한다. 우리는 zebrafish 배아에 마이크로주입을 통하여 sbgGH의 활동을 분석할 수 있을 것이다.

Gallus MAPGSWFSPLLI AVVTLGLPQEAATFPAMPLSNLFANAVLRAQHLHLLAAETYKEFERT 60
Chelonia -----AFPAMPLSSLFANAVLRAQHLHLLAADTYKEFERT 35
Delphinus MAAGPRTSMLLAFALLCLPWTQEVGAFPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERA 60
Prionace -----YPLLPLSDLFAKAVHRAQHLHLVAAETTKDFERK 34
Rana -MASGLGSSLVLLVVICLQSPQGFNAFPRVSLSNLFTNAVIRAQHLHQMVAADTYRDYERT 59
Epinephelus -----MDRVVLLL SVVSLGVSSQPITDQQR LFSI AVSRVQHLHLLAQRLFSDFFEST 51
Petromyzon MKGGSLAQLLLVMSVLARDAWGRPAARDNDPLRDLNLAIPIAEFVYHLSSQAYAEKQEP 60

* * *

Gallus YIPEQQRYSNKN--SQA AFCYSETIPAPT GKDDAQKSDMELLRFSVLV IQSWLTPVQYL 118
Chelonia YIPEEQRHSNKI--SQSASCYSETIPAPT GKDDAEQKSDMELLRFSLIL IQSWLNPVQFL 93
Delphinus YIPEGQRYSIQN--TQA AFCFSETIPAPT GKDEAQRSDVELLRFSLLL IQSWLGPVQFL 118
Prionace YIPEEQRHSNKH--SPSAFCQSETIPAPT GKEDAQRSDRELLYSLLL IQSWLNP IQNL 92
Rana YIPEQQRLSNKH--SYSVYCYSETIPAPTDKDNTHQKSDIDL RFSLTLLQSWMTP IQIV 117
Epinephelus LQTEEQRQLNKI--FLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFPSRSL 109
Petromyzon YHGEPPRVAPWSPPNVMSCHPASWQAPSKKDEV LHKTDDELLRISLEVLESWSG----- 115

* * * * * ** * **

Gallus SKVFTNNLVFGTSDRVFEKLRDLEEGIQALMRELEDR---SPRGPQLLRPTYDKFDIHLR 175
Chelonia SRVFTNSLVFGTSDRVYEKLRDLEEGIQALMRELEDG---SLRGFQVLRPTYDKFDINLR 150
Delphinus SRVFTNSLVFGTSDRVYEKLRDLEEGIQALMRELEDG---SPRAGQILKQTYDKFDTNMR 175
Prionace S-----AFRTSDRVYDKLRDLEEGIFALMKTLEDGG--SSQGF AWWKFSYERFDGNLS 143
Rana NRVFGNNQVFGNIDRVYDRLRDLDEGLHILIRELDDG---NVRNYGVLTFYDKFDVNLR 174
Epinephelus SG-----GSAPRNQISPKLSELKTGILLLLIRANQDGAELFPDTSALQLAPYGNYYQSLG 163
Petromyzon -----VFLRTHAIP LAKQLAAMQRLLDQG-VATMSEGRKPALEFTSVGALPP 161

* *

Gallus NEDALLKNY--GLLSCFKKDLHKVETYLKVMKCRRFGESNCTI 216
Chelonia NEDALLKNY--GLLSCFKKDLHKVETYLKLMKCRRFGESNCTI 191
Delphinus SDDALLKNY--GLLSCFKKDLHKAETYLKVMKCRRFVRESSCAF 216

<i>Prionace</i>	-EEALMKNY--GLLACFKKDMHKVETYLKVMNCKRFAESNCTV	183
<i>Rana</i>	SEEGRAKNY--GLLSCLKKDMHKVETYLKVVKCRRFVESNCTF	215
<i>Epinephelus</i>	ADESLRRTY--ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL	204
<i>Petromyzon</i>	VDESLLRNHRQDLLSCFKNDAHRVVTYLKVIKCRRFHDCSKP-	203

* * * * * * * * *

Fig. 10. Global multiple alignment of growth hormone sequences from animals from different lineages. Jawless fish, *Petromyzon marinus* (sea lamprey, BAC15763), vertebrates *Prionace glauca* (blue shark - a cartilaginous fish, P34006), *Epinephelus septemfasciatus* (a bony fish), *Rana catesbeiana* (bullfrog - an amphibian, AAP04356), *Chelonia mydas* (green sea turtle - a reptile, P34005), *Gallus gallus* (chicken - an aves, A60509), *Delphinus delphis* (saddleback dolphin - a mammal, CAD37292) growth hormone sequences were compared and the amino acid residues conserved in all seven lineages are marked with asterisks.

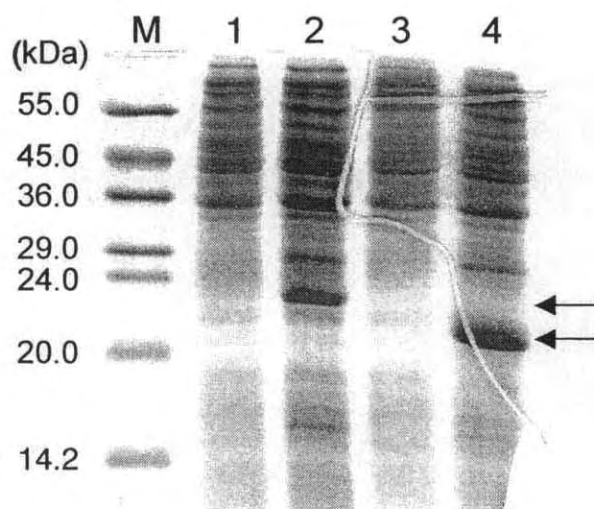


Fig. 11. Analysis of total proteins expressed in *Escherichia coli* (BL21) cells containing *Epinephelus septemfasciatus* growth hormone coding region in a 12% denaturing polyacrylamide gel. Lanes M, SDS-PAGE low range molecular weight standards (Sigma, USA); lanes 1 and 2, *Escherichia coli* (BL21) cells containing *Epinephelus septemfasciatus* pre-growth hormone coding region without and with induction. Lanes 3 and 4, *Escherichia coli* (BL21) cells containing *Epinephelus septemfasciatus* mature-growth hormone coding region without and with induction. The arrows indicate the position of the bands corresponding to pre and mature hormones.

(3) 돌돔

(가) 서론

Somatolactin (SL)은 Atlantic cod (*Gadus morhua*)와 Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)에서 처음 분리된 당 단백질로 (Ono et al., 1990; Pendon and Martinez-Barbera, 1994), 경골어류의 뇌하수체 중엽에서 생성되는 growth hormone (GH)/prolactin (PRL) family에 속하는 뇌하수체 호르몬이다. 경골어류에서 확인된 SL은 single chain polypeptide로 약 200-209개의 아미노산과 분자량이 25에서 28 kDa인 glycosylated와 nonglycosylated 형태로 어종에 따라 다양하게 분리되고 있으며, 경골어류와 포유류의 GH와 PRL 아미노산 서열과는 20-30% 상동성을 갖고 있다 (Chen., 1994; Kaneko, 1996; Ono et al., 1990). SL의 아미노산 서열은 경골어류와 척추동물의 GH와 PRL에 구조적으로 유사하며, 공통 조상 유전자로부터 증폭과 변이과정을 통해 진화된 것으로 추측되고 있다.

현재까지 Japanese flounder (Ono et al., 1990)와 Atlantic cod (Rand-Weaver et al., 1991)에서 SL 단백질과 cDNA 분석이 이루어진 후, Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Iraqi et al., 1993), sole (*Solea senegalensis*) (Pendon and Martinez-Barbera, 1994), gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Astola et al., 1996; Cavari et al., 1995), red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Zhu et al., 1999), rabbitfish (*Siganus guttatus*) (Ayson et al., 1999)와 European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Company et al., 2000) 등에서 SL의 분자·생화학적 특성이 설명되고 있다.

현재까지 SL의 기능은 명확하지 않지만, 다양한 생물학적 과정에 관여하는 것으로 추측되고 있다. 그 예로, coho salmon의 성 성숙과 은모화 시기에 혈장 SL의 농도 증가 (Rand-Weaver et al., 1992), SL에 의한 난소와 정소에서 in vitro steroidogenesis 유도 (Planas et al., 1992), sockeye salmon, chum salmon과 chinook salmon의 산란시기에 SL 생산 세포의 활성화가 보고되었다 (Olivereau and Rand-Weaver, 1994a: 1994b). 이들 결과는 SL이 연어과 어류의 생식소 기능 조절에 관여함을 추측할 수 있다. 이와는 달리 무지개 송어

에서는 비특이적 환경 스트레스의 작용으로 혈장 SL 농도가 증가되고 (Kakizawa et al., 1995), 고칼슘수에서 저칼슘수로 이동시 SL cell이 자극되며 (Kakizawa et al., 1993; Kaneko and Hirano, 1993), SL 생산 세포가 결여된 무지개 송어에서는 비 정상적 지질 축적이 관찰되어 지질 대사에도 관여할 것으로 사려된다 (Kaneko, 1996). 이외에도 red drum에서 배경 변화에 따른 SL 농도 변화 (Zhu and Thomas, 1995), 신장내 인산 수송에 관여한다는 연구 결과도 보고되고 있다 (Kaneko, 1996). 따라서, SL은 GH와 PRL과 같이 다기능성 뇌하수체 호르몬으로 작용할 것으로 생각된다.

본 연구는 우리나라와 일본의 양식 산업에서 주요 양식대상어종으로 중요한 위치를 차지하는 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*) 뇌하수체에서 발현되는 SL의 기능을 확인하기 위한 첫 단계로 돌돔 뇌하수체에서 mRNA를 분리하여 SL 유전자에 대한 cDNA를 클로닝하고 이 유전자의 구조적 특징을 타어종의 SL과 비교·분석하였다. 그리고, 분리한 cDNA를 발현 벡터에 클로닝하여 E. coli에서 발현되는 재조합 단백질을 조사하였다.

(나) 방법

cDNA ends (RACE)를 이용한 3'과 5' 말단 SL cDNA의 증폭

돌돔 SL cDNA를 클로닝하기 위해 GenBank에 등록되어 있는 경골어류에서 밝혀진 SL 염기서열을 이용하여 multiple alignment를 수행하고 SL 염기서열중 가장 잘 보존된 영역에서 PCR 증폭을 위한 forward primer인 SL-F (5'-CTC AAC AAG ACY(T/C) AAG TGG GT-3')와 reverse primer인 SL-R (5'-ACC ACT TR(G/A) CTC TTG TTG AG-3')을 제작하였다. 돌돔 SL cDNA 3' 말단 부위를 증폭하기 위한 PCR 반응은 50 ng의 first strand cDNA, 1 μ M SL-F와 oligo (dT)18 primer, dNTPs, 10 \times pfu polymerase buffer, 2.5 unit의 cloned pfu polymerase (Stratagene, USA) 혼합액에 멸균된 증류수를 가하여 최종 부피를 50 μ l로 맞추고 DNA minicycler (PTC-150; MJ Research)를 사용하여 PCR 증폭하였다. 3' 말단 돌돔 SL cDNA 증폭은 94 $^{\circ}$ C에서 1 분간 predenaturation, 94 $^{\circ}$ C에서 30 초간 denaturation, 45 $^{\circ}$ C에서 30 초간 primer annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1 분간 extension을 30회 반복하고, 최종 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 extension 하였다.

5' 말단 SL cDNA를 증폭하기 위해 first strand cDNA의 3' 말단에 dGTP, 5 \times TdT reaction buffer, terminal deoxynucleotidyltransferase (Amersham Pharmacia, UK) 혼

합액을 37°C에서 30 분간 반응하여 poly(G) tail을 부착하였다. 이 DNA를 주형으로 SL-R과 oligo (dC)18 primer를 이용하여 PCR 증폭하였다. PCR 반응은 72°C에서 30 초를 제외하고 3' 말단 증폭조건과 동일하게 수행하였다. 증폭된 5'과 3' 말단 PCR 산물을 1.2% agarose gel 전기영동을 수행하여 증폭된 산물의 크기를 확인하였다(Fig. 12).

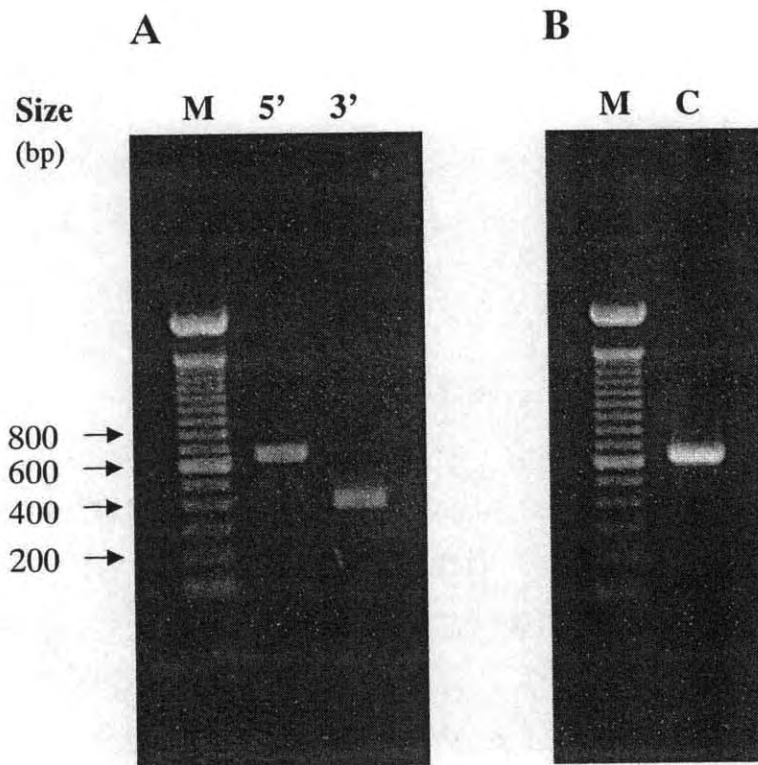


Fig. 12. RT-PCR을 이용한 돌돔의 성장호르몬 유전자의 5' 말단, 3'말단 그리고 coding sequence의 증폭

A는 5'과 3' 말단을 증폭한 결과이고 B는 coding sequence를 증폭한 결과이다. M은 size marker를 나타내며 크기를 나타내었다. 5'과 3'은 성장호르몬의 5'과 3' 말단을 나타내며 C는 coding sequence를 나타낸다.

SL cDNA의 클로닝과 DNA 염기서열 분석

증폭된 3' 말단과 5' 말단 cDNA를 cloning하기 위해 PCR 산물을 AccuPrep™ gel purification kit (Bioneer, Korea) protocol에 따라 분리하고, HincII로 잘린

pBluescript II SK (-) vector에 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 이용하여 16°C에서 하루동안 ligation 하였다. 다음날 E. coli DH5a에 형질전환하고 α -complementation 선택배지에 도말하여 배양하였다. 이중 white colony를 선택하여 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 담아 원심분리하여 bacteria pellet을 수집하고, AccuPrep™ plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid내 SL cDNA 염기서열 분석은 dye terminator cycle sequencing kit과 ABI 377 DNA sequencer를 사용하고, sequencing을 위한 primer는 pBS II SK(-) vector내 multiple cloning site의 SK와 T7을 이용하여 (주)마크로젠에 의뢰하여 분석하였다.

E. coli BL21(DE3)에서 SL 단백질 발현

돌돔 SL을 암호화하는 open reading frame (ORF)을 클로닝하기 위해 분석된 돌돔 SL cDNA 염기서열에 기초하여 각각 제한효소 NdeI과 BamHI 부위를 포함하는 OFSL-N (5'-GAG ACA TAT GCA CAT AAT GAC AGC CAT G-3')과 OFSL-C (5'-GAG AGG ATC CTT ATG CGC AGT TGT ATT TCT CAG-3') primer를 제작하여 ORF의 증폭에 이용하였다. 증폭된 산물은 HincII로 잘린 pBluescript II SK (-) vector에 subcloning한 다음 제한효소 NdeI과 BamHI으로 double digestion하여 SL ORF를 분리하고 동일 제한효소로 잘린 pET-11a vector (Novagen, USA)에 클로닝하였다. 이를 E. coli DH5a에 형질전환하고 ampicillin이 첨가된 LB agar에 배양하여 자란 colony를 ampicillin이 함유된 LB broth에 접종후 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA가 완전한 SL DNA를 갖고 있는지 염기서열을 분석하였다.

pET-11a에 cloning된 SL cDNA를 E. coli BL21(DE3)에 형질전환한 후 얻은 colony를 ampicillin이 들어있는 LB broth 5 ml에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 이를 다음날 새로운 LB-ampicillin broth 5 ml에 1/10 희석하여 접종하고 OD600=0.6 까지 배양하였다. 여기에 100 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 최종농도 0.4 mM이 되도록 넣어 재조합 SL 단백질의 발현이 유도되도록 30°C에서 3 시간동안 배양하였다. 이 배양액을 원심분리하여 cell을 수집하고 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA buffer에 부유한 후 2× SDS sample buffer를 가하여 lysis 시켰다. Cell lysate는 12%

SDS-PAGE에 전기영동하여 발현된 SL 단백질의 band를 확인하였다.

(다) 결과 및 고찰

돌돔 SL cDNA 서열 분석

합성된 first-strand cDNA를 주형으로 SL-F와 d(T)18 primer를 이용하여 3' 말단 cDNA를 PCR 증폭한 결과, 약 1180 bp가 증폭되었다 (Clone 1). 3'에 dG oligo를 붙인 first strand cDNA를 SL-R과 d(C)18 primer로 PCR 증폭시 약 480 bp의 5' 말단 cDNA가 증폭되었다 (Clone 2). 이들의 염기서열을 분석한 결과, clone 1은 267 bp의 SL coding region과 915 bp의 3'-untranslated region (UTR)을 갖고 있으며, clone 2는 26 bp의 5'-UTR과 signal peptide 염기서열을 포함하는 458 bp의 SL coding region 서열을 갖고 있다. 이 clone 1과 2에 기초하여 분석된 돌돔 SL의 cDNA 염기서열과 아미노산 서열을 Fig. 13에 나타내었다.

AGAAGACTTCACGACTACTGAAAGAATGCACATAATGACAGCCATGCAGCGGAGTGTATGGGCAGTGTG	70
<u>M H I M T A M Q R S V W A V L</u>	-15
CTCTGGCCCTATCTGCTTACCGTAAGCATCCCCTAGACTGTAAGGAAGAGCAGGGCAGCATCTCCCGCT	140
<u>L W P Y L L T V S I P L D C K E E Q G S I S R</u>	14
GCCCCTCCATCTCCAAGAGAAACTTCTCGACCGAGTCATCCAGCATGCTGAGCTCATCTACCGGTCTC	210
<u>C P S I S Q E K L L D R V I Q H A E L I Y R V S</u>	38
AGAAGAATCATGCTCTTTGTTTTGAAGAGATGTTTGTCCCTTCCCATTGCAGCTCCAGAGGAACCAAGCT	280
<u>E E S C S L F E E M F V P F P L Q L Q R N Q A</u>	61
GGCTATGCGTGCATCACAAAACCTTACCCATCCCCAGCTCCAAAAGTGAAATCCAACAGATATCTGACA	350
<u>G Y A C I T K T L P I P S S K S E I Q Q I S D</u>	84
AATGGTTGCTCCACTCTGTGCTGATGCTGGTCCAGTCGTGGATCGAGCCTTTGGTCTACCTGCAGACCAC	420
<u>K W L L H S V L M L V Q S W I E P L V Y L Q T T</u>	108
ATTGGATCAATACGATGGCGCTCCTGACATGCTACTCAACAAGACCAAGTGGGTGCTGAGAAATTGATC	490
<u>L D Q Y D G A P D M L L N K T K W V S E K L I</u>	131
AGTCTGGAGCAAGGGTGGTGGTCCCTCATCAAGAAGATGTTGGATGAGGGAATGATGACCACAACTATA	560
<u>S L E Q G V V V L I K K M L D E G M M T T N Y</u>	154
GTGAGCAAGGCATATTCCAGCATGATGTGCAGCCAGAGATGCTGGAATCTGTTATGAGAGACTATACCTT	630
<u>S E Q G I F Q H D V Q P E M L E S V M R D Y T L</u>	178
GCTCAGCTGCTTCAAGAAAGATGCCATAAGATGGAGACTTTCCTCAAGCTCCTCAAGTGTGCAGACT	700
<u>L S C F K K D A H K M E T F L K L L K C R Q T</u>	201
GACAAATACAAGTGGCATAAAAACATAAAGTGCAGCTTTTAAATAATACAATGTTTAGCTTTAAATTAAT	770
<u>D K Y N C A *</u>	207

TCTTGAGGTTGGTAGCTGTGCACTTATAGATGTGACCATGCCTTAGGCAATCCAGCCTTGTTTGCAATGC	840
AGTACATTCTTTATTGATTGTTTTGGAACACCTTCACACAAAATAAGTAGGTGTAATGCTGTGCCCTTT	910
CTTCAGCATACTGCATTTTATATTTCCCTGCTCAGTTGTTATTTAACCTGGCAAAGGCAACAGAGGGCA	980
AACTCCCAAAGATTATTTGCGTGTGAGCTGTCAAAAAAATCTGCATATCCTGCCATTGATTTCCATTT	1050
CCTTTGTTCTTAAGTGGAGTTTGTATTCCTCGCTGGCTCTTGCAAGTGTGTTTATTCCACGGCCCCC	1120
AGAGTATTCAGTGAGACTCCCGTTTTAAATGGAGTTGGTTCACTTCTGCATTAGTAAAATGAAACACTT	1190
TCAGCGGAGATGGGAGTCAAACAGAGAGCAATCACTACTTTAAAAAAGAGACACATTTTGATTGGTGAGA	1260
GAGTGTGTGAGAGAGACACAGAGAGAGAACAATACCAGATAAAATGAGAGGCAAGCCTTATCTTGAGTG	1330
TTTGGTTAGACACAGGTTTAGATTTGTTGAGTGTCATGTAAGAATCGTGAATATTTCTATGCCTAAACG	1400
TGCCTAATTTAACCTGAGTGTAGTAAAAGAAGTTGATTATTCATTTAAATCATCAGGGATATACAGTT	1470
TAAATTTAATCGTTAGATGTTATGAATATGTAATGCAGACTGCACTCTACACTTTTGTACTATCATGTG	1540
TAAATAGAAGAAGCCCAATGACTGTGAAAACCTTTCTAGTCGACCACTGTTGATTTAAGGCGCT <i>AAATA</i>	1610
<i>AGCAAGTTTTAGAAAGAAAAA</i>	1636

Fig. 13. The nucleotide sequence of rock bream SL and its deduced amino acid sequence. The signal peptide of 24 aa is underlined. Stop codon is indicated by an asterisk. Seven cysteine residues and the polyadenylation signal are in bold italic letters. Two potential N-glycosylation sites are boxed.

Rock bream ---MHIMTAMQRSVWAVLLWPYLLTVSIPLDCKEEQGSISRCPSSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLFEEMFVFPF
Atlantic halibut ---MNMMTVK-QGVWAALLWPYLLAASIPLDCKDEQGSFSACPSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSMFEEFVFPF
Flounder ---MNMMTVKQGVWAALLWPYLLTASIPLDCKEEQGSLSRCPSSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSMFEEFVFPF
Sole ----MNTAVKQSGVWAVLLWPYLLAVSIQLDCRDEQGNMSRCPFSISQEKLLDRVIQHAELISRISEESCSLFEELFVFPF
Rabbitfish ---MLMFTAIRQGVWVALLWPHLLTASMPLDCKREENGNSRCPFSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLFEEMFVFPF
Gilthead sea bream ---MRMIRAIKQGVWVALLWPYLLTASIPLDCKDEQGVLSHCPSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLFEEMFIPFP
European sea bass -----LWPYLLTVSIPLDCKREEQSSLSRCPSSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLFEEMFVFPF
Red drum ---MYMTALQRGVWASLLWPYLITISIPLDCKEEQGSLSRCPSSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLFEEMFVFPF
Lumpfish ---MHLVSVIRQGVWVALLWPNLLASSVPLDCKREEQGISRCPSSISQEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLYEDMFIP--
Atlantic cod MH-TLAAVVVLQVCWAAVLPCCPTHSSPVDCREEQAGSSQCPTISQEKLLDRVIQHTELIYRVSEESCSMFEDMFVFPF
White sturgeon ---MQKVKVLQVCWVALLWRCWGLVGPLDCKDEQGSISCTSISLEKLLDRVIQHAELIYHVSEESCSLFEEMFVPS
African lungfish MHNWKGWVLSLFLTFGQLWNGIL-LAYPLDCKDEQGSYTRCTSISLEKLLDRVIQHAELLYRVSEESCTIFEDNFAPFS
Eel ---MFSIRMNKVLQGFVCLMLTHRIVGYPMDCKEDQDG-TRCPSISLDKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLFEEMYIPSS
Chum salmon ---MNMVMQSVVWVALLWPCLVSLGVPLECKDEQGSILCASISKEKLLDRVIQHAELIYRVSEESCSLFEEMFVFPF
Goldfish ---MKKTTVLQVCMVFWVCSLQAV-IGSPVDCPDQDTAGVSCI-ISLEKLLERAVQHAELIHHIAESKLLFDEMLISFG
Channel catfish ---MIKTKVLQAWMGIWLCVAVNGL-LGSDQDCSDRPTGSRCS-ISVEKLLDRVIQHAELIYRISDEARTLFEEMFIPLL

Rock bream LQLQRNQAGYACITKTLPISSKSEIQQISDKWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQTTLDQYDGPDMLLNKTKWVSEKLSL
Atlantic halibut LRLQRNQAGYACITKALPISSKSEIQQISDTWLLHSVLLVQSWIDPLVYLQTTLDRYDNAEMLLNKTKWVSDKLSL
Flounder LRLQRNQAGYACITKALPISSKSEIQQISDTWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQTTLDRYDNAPDMLLNKTKWVSDKLSL
Sole LRLQRNTVGYACITKALPISSKSEIQQISDKWLLQSVLTLVQSWIEPLVYLQTTLDRYDNAPDMLLNKTKWVSEKLVSL
Rabbitfish LQLQRNQAGFTICITKALAIPISSKSEIQQISDKWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQNTLDRYDGPDMLLNKTKWVSEKLSL
Gilthead sea bream LQLQRNQAGYPCITKALPISSKSEIQQISDKWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQTTLNRYDGPDMLLNKTKWVSEKLSL
European sea bass LQLQRNQAGYACITKALPISSKSEIQQISDKWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQTTMDRYDGAPEMLLNKTKWVSEKLSL
Red drum LQLQRNQAGYACITKALPISSKSEIQQISDKWLLHSVLMVQSWIEPLAYLQNTMDHYDGPDMLLNKTKWVSEKLSL
Lumpfish LQFQRNQVGYACITKTLPISSKSEIQQISDKWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQTTSLDRYNAPEMLLNKTKWVSEKLSL
Atlantic cod VRLQRNQAGNTCITKDFPIPTSKNELQQISDTWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQTTLDRYDDVPDMLLNKTKWVSEKLSL
White sturgeon MRTQQNRARNTCITKALPIPGSKSEIQQISDKWLLHSVLMVQSWIEPLVYLQKTLDRYDDAPDITLNKTKWVTKLSSL
African lungfish LVSQRNRNFNSCYTKGLRLLPSSKSEAQQVSDKWLHSVLLVQSWIEPFVYLQRTLDYNSLPGSLVKNKTKWVSDKLSL
Eel IRAQLSRGNACSTRSVP IQG---RIQQISDKWLLHSTLVVQSWIEPLVYLQTTLDRYDDAPDITLNKTKWVTKLSSL
Chum salmon MRSQRNQAGYTCATKALPIPGSKSEIQQISDKWLLHSVLLVQSWIEPLVYLQTTLDRYDDAPDITLNKTKWVSEKLSL
Goldfish VVNLHISEGTMCSPKTVSVPMSKTEIQQISDKWLLHSVLLVQFWINPLVDVQASLMNYQNAPSALVDRSKLMSTKITSL
Channel catfish IPAHQVHGGNSCTSILVRVPI SKLEIQQISDKWLLHSVLLVQVWIEPLADLQDSLDMYDNPSSLSKTRWVTKLSSL

Rock bream EQGVVVL IKKMLDEGMMITNYSEQIFQHVDQPEMLESVMRDYTLSCFKKDAHKMEIFLKLKCRQTDKYNCA--
Atlantic halibut EQGVVVL IRKMLDEGMLTATYNEQGLFYDVLPMLESVMRDYTLSCFKKDAHKMEIFLKLKCRQTDKYNCP--
Flounder EQGVVVL IRKMLDEGMLTATYNEQGLFYDAQDPMLESVMRDYTLSCFKKDAHKMEIFLKLKCRQTDKYNCA--
Sole EQGVVVL IRKMLDEGLTTTYNEQDQLQYDVLPMLESVMRDYTLSCFKKDAHKMEIFLKLKCRQTDKFNCA--

Rabbitfish	EQGVVVLIKKMLDEGMATTAYNEQSLFQDDAQPDMLLESVMRDYTLSCFKKDAHKMEILLKLLKCRQNDIYSCA--
Gilthead sea bream	EQGVVVLIKKMLDEEMMTTYSEQLFQDDGQPEMLEYVMRDYTLSCFKKDAHKMEILLKLLKCRQNDMHSCR--
European sea bass	EQGVVVLIKKMLDEGMMTTYSEQLFQYDVPPEMLESVMRDYTILSCFKKDAHKMEILLKLLKCRQTDIYNCA--
Red drum	EQGVVVLIKKMLDEGILTTTYSEQLFQYEVQPDMLLESVMKDYNLSCFKKDAHKMEILLKLLKCRQTDIYNCP--
Lumpfish	EQGVVVLIKKMLDEGMLTINHSEQGLLQNGVQPQMLESVMRDYTLSCFKKDAHKMEAFLLKLLKCRQTDRYNCS--
Atlantic cod	EQGVVVLIRKMLDGAAILNSSYNEYSAVQLDVQPEVLESILRDYAVLTCFKKDAHKMEVFLKLLKCRQIDKYNCALY
White sturgeon	EQGIVELIRKMLDEGLLAVDH-QQTLTRFDVQPEVVESILRDYAVLTCFKKDAHKMEVFLKLLKCRHTDKMSCYIS
African lungfish	EQGIVVLIRKMLHEGLITTFD-QQSVIEIEIPEIPEITDSSARDYMLNCFRKAHKKMETFLKLLKCRQIKKLNKY--
Eel	EQGVTVLIRKMLNEDILVSDP-SQNLTHFATQPNMVESVLTDYTLTLCFRKDAHRVETFLKLLKCRQSDRLSCFLY
Chum salmon	EQGVVVLIRKMLDDMLTTSYEQVAPYALQPEVLESVLRDYTLSCFKKDAHKKMETFLKLLKCRQTDKYSCFLH
Goldfish	EQGILVLIHQILGEGGLVVEG-PEDTSDHFVSSDTFETVRRDYSVIYCFRKAHKKIQTLLKLLKCRQIDKENCSLF
Channel catfish	KQGVVLMSKMLDEGSVELEN-NESMLRHIVAPAMAHEVLRDYAVLSCFKKDAHKKMETFLKLLRCRQTDNPTCSLF

Fig. 14. Alignment of the amino acid sequence of rock bream somatolactin with other teleost fish somatolactins. Six conserved cysteine residues are indicated with capital letters and the conserved potential N-glycosylation site is boxed.

돌돔 SL cDNA의 염기서열은 1636 bp로 확인되었다. 돌돔 SL은 25 bp의 5'-UTR, SL prehormone을 암호화하는 693 bp의 ORF와 865 bp의 3'-UTR로 구성되어 있다. 돌돔 SL은 24개의 aa로 구성되어 있는 signal peptide와 207개의 aa인 mature protein으로 되어 있다. 돌돔 SL의 polyadenylation signal sequence는 poly(A) tail에서 상위 15 bp에 위치하고 있으며, 그 서열은 진핵생물에서 보고되고 있는 consensus sequence인 AATAAA와 동일하다. ORF에 기초한 돌돔 SL의 분자량과 등전점은 약 26,775 Da과 5.6으로 예측되었다 (Expert protein analysis system-proteomics server from the Swiss Institute of Bioinformatics). 또한, 돌돔 SL 아미노산 서열에서 단백질의 이황화 결합에 관여하는 7개의 시스테인 (Cys5, Cys15, Cys42, Cys65, Cys181, Cys198과 Cys206)과 단백질의 탄수화물 결합에 관여하는 두 개의 putative N-glycosylation site를 Asn 121과 Asn 153 아미노산 잔기에서 확인하였다.

돌돔 SL cDNA는 총 1636 bp로 전체 염기서열의 약 53%에 해당하는 긴 3'-UTR과 짧은 5'-UTR을 갖고 있으며, 231개의 아미노산을 암호화하는 SL prehormone의 24 aa signal peptide는 아미노산 소수성에 기초하여 결정되었는데 이는 현재까지 알려진 어류의

SL signal peptide에 유사성을 갖고 있다. 또한, 207 aa으로 구성된 mature protein도 보고 되어진 어류 SL의 mature protein 204에서 209 aa 범위에 포함되고 있다.

돌돔 SL과 경골어류 SL 비교

밝혀진 돌돔 SL 뉴클레오타이드와 아미노산 서열을 현재까지 밝혀진 경골어류 SL의 뉴클레오타이드와 아미노산 서열 상동성을 비교하였다 (Table 2). Goldfish와 channel catfish를 제외하고 아미노산 서열은 61.1-92.6%, 뉴클레오타이드 서열은 63-92.6%의 서열 일치율을 보였다. 특히, 돌돔이 속한 농어목 (Perciformes) 어류인 European sea bass, red drum, rabbitfish와 gilthead sea bream의 SL 아미노산 서열에는 각각 92.6%, 87.8%, 85.3%, 85.2% (nt. identity 92.6%, 87.8%, 86.4%, 87.4%), 가자미목 (Pleuronectiformes) 어류인 Japanese flounder, Atlantic halibut과 sole에는 88.7%, 85.5%, 83% (nt. identity 87.9%, 86.7%, 84.6%)의 높은 아미노산과 뉴클레오타이드 염기서열의 일치율을 보이지만, goldfish와 channel catfish의 경우 49.3% (nt. 57.7%)와 57.8% (nt. 61.6%)의 낮은 상동성을 보였다. 또한, SL mature protein 사이의 비교에서도 앞의 결과에 일치하는 염기서열 상동성을 보였다. 따라서, 다양한 어종 사이의 SL 아미노산과 뉴클레오타이드 상동성은 GH와 PRL이 어종 사이에 약 40%의 상동성을 보이는 것과 달리 높은 보존성을 갖고 있음을 알 수 있다.

돌돔 SL 아미노산 서열과 현재까지 밝혀진 경골어류 SL의 아미노산 서열을 이용하여 multiple alignment를 수행하였다 (Fig. 14). 그 결과, 3개의 variable domain에 의하여 나누어지는 4개의 conserved domain이 15-40 aa, 72-105 aa, 119-146 aa와 173-206 aa에서 확인되었으며, 이들 영역을 domain ASL, BSL, CSL과 DSL로 명명하였다. 돌돔 SL과 타어종간 SL conserved domain 사이에서의 아미노산 서열 상동성은 65.2-100% (ASL), 66.7-100% (BSL), 48.1-100% (CSL)와 69.7-97.1% (DSL)를 나타냈다. 특히, 농어목과 가자미목 어류에 높은 서열 일치율을 보였으나, eel, goldfish와 channel catfish와는 낮은 서열의 일치율을 보여 앞서 설명된 cDNA와 아미노산 서열에서 보여지는 결과와 일치함을 알 수 있다. 돌돔 SL에서 나타나는 4개의 domain은 경골어류 GH와 PRL에서 이미 보고 되었다. 경골어류 GH의 경우, A, B, C와 D domain은 높은 보존성을 보이고 있어 GH의 생물학적 활성에 관여할 것으로 보고 되어 있으며 (Chen et al., 1994), 돌돔을 포함한 경골어류 SL에 4개의

conserved domain의 존재는 단백질의 3차구조 형성과 생물학적 활성화에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

Table 2. Comparison of rock bream somatolactin cDNA and deduced protein sequences to those of other teleosts

	amino acids (similarity %)	Nucleotides (Identity %)
European sea bass	92.6	92.6
Flounder	88.7	87.9
Red drum	87.8	87.8
Atlantic halibut	85.5	86.7
Rabbitfish	85.3	86.4
Gilthead sea bream	85.2	87.4
Lumpfish	83.1	86.4
Sole	83.0	84.6
Chum salmon	79.1	78.8
Atlantic cod	75.0	76.6
White sturgeon	67.4	71.0
African lungfish	65.2	63.0
Eel	61.1	66.3
Channel catfish	57.8	61.6
Goldfish	49.3	57.7

아미노산 염기서열의 alignment에서 6개의 시스테인 잔기 (Cys5, Cys15, Cys65, Cys181, Cys198 과 Cys206)가 모든 어류 SL 아미노산의 동일 아미노산 부위에 위치하고 있음이 확인되었다. 특히, C-말단에 존재하는 4개의 시스테인 잔기 (Cys65, Cys181, Cys198 과 Cys206)의 위치는 GH와 PRL에서 관찰되는 결과와 일치하며 (Chen et al., 1994), goldfish와 channel catfish의 N-말단에 1개의 시스테인 잔기 (Cys42)가 결손된 경우를 제외하고 이제까지 밝혀진 어류의 SL은 7개의 시스테인 잔기를 갖고 있음이 밝혀졌으나, Atlantic cod에서 분리된 SL은 reduction과 S-carboxymethylation 분석으로 8개의 시스테인 잔기를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다(Rand-Weaver et al., 1991). 시스테인 5와 15, 65와 181, 198과 206 사이에서는 이황화 결합을 형성하지만, 시스테인 42와 180 사이에서는 free SH group으로 존재하여 이황화 결합을 형성하지 않음을 확인하였다(Rand-Weaver et al., 1991). 따라서, 동일 부위의 시스테인 잔기를 갖고 있는 돌돔을 포함한 어류의 SL 단백질은 3개의 이황화 결합을 형성하며, 그외의 시스테인 잔기는 이황화 결합에 관여하지 않을 것으로

생각된다.

N-glycosylation 분석으로 (Asn-X-Ser/Thr) 돌돔 SL은 Asn121과 Asn151에 두 개의 potential N-glycosylation 부위를 갖고 있지만, 타어종과의 alignment에서 chum salmon, goldfish와 channel catfish를 제외한 어류에서 공통적으로 Asn121의 N-glycosylation site를 갖고 있음을 확인하였다 (Fig. 14). 경골어류에서 확인된 glycosylation site는 lumpfish는 3개 (Iraqi et al., 1993), Atlantic cod, Atlantic halibut, sole, eel과 rabbitfish는 2개 (Ayson et al., 1999; Iraqi et al., 1993;14, Pendon and Martinez-Barbera, 1994; Rand-Weaver et al., 1991), Japanese flounder, gilthead seabream, lungfish, red drum과 European sea bass는 1개를 갖고 있지만 (Amemiya et al., 1999; Astola et al., 1996; Company et al., 2000; Ono et al., 1990; Zhu et al., 1999), chum salmon (Takayama et al., 1991)과 rainbow trout (Yang et al., 1997)은 Asn이 Lys으로 치환되어 있어 goldfish (Cheng et al., 1997), channel catfish (Tang and Chen, 1993)와 같이 N-glycosylation site를 갖고 있지 않다. 이처럼 어류에서 glycosylation site는 다양하게 보고되고 있지만, Atlantic cod에서 분리된 SL의 deglycosylation과 탄수화물 분석으로 Asn121의 glycosylation site가 단백질의 탄수화물 결합에 관여함을 확인하였다 (Rand-Weaver et al., 1991). 따라서, 뇌하수체 호르몬의 glycosylation은 호르몬의 분비, 수용체 결합, 신호 전환과 생물학적 잠재성에 중요하므로 특유의 glycosylation 상태는 SL의 생물학적 활성에서 나타나는 생리학적 차이를 예측할 수 있을 것이다.

돌돔 SL의 E. coli 발현

재조합 SL 단백질의 발현 양상을 확인하기 위하여 염기서열이 분석된 돌돔 SL cDNA 서열에 기초하여 제한효소 부위를 갖는 primer를 제작하여 SL coding region을 증폭하여 pET-11a vector에 삽입하였다. 삽입된 SL cDNA에서 단백질의 발현을 위해 E. coli BL21(DE3)에 형질전환하여 IPTG에 의한 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. IPTG에 의하여 유도된 단백질은 12% SDS-PAGE 전기영동을 수행하여 발현된 단백질을 확인한 결과, 재조합 SL 단백질은 약 27 kDa의 monomer 형태로 과발현되었으며, 이는 앞에서 SL cDNA 서열에 기초하여 예측된 단백질의 크기와 유사함을 알 수 있다 (Fig. 15).

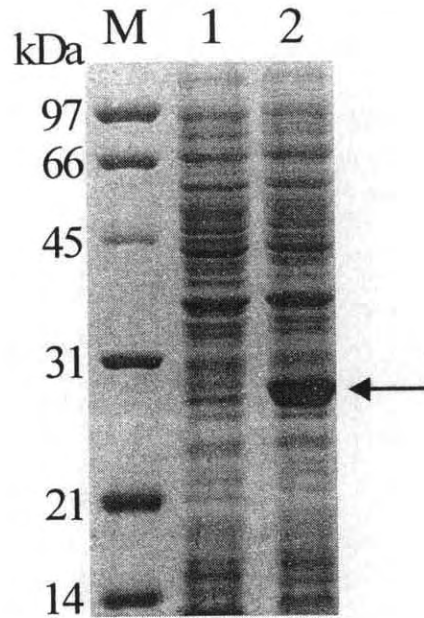


Fig. 15. Expression of rock bream SL in *E. coli* BL21(DE3) cells. Lane M is the molecular marker. Lane 1 and 2 are non-induced and induced *E. coli* cell lysates, respectively. The arrow indicates the expressed SL band.

(4) 참복

참복 성장호르몬 cDNA cloning

그림 5은 참복 성장호르몬의 5'과 3'말단 DNA 단편을 RT-PCR을 이용하여 증폭한 그림이다. 증폭된 DNA는 5'과 3'말단이 각각 600bp와 300bp로 되어있으며 증폭된 DNA 단편을 pUC19 vector에 삽입하여 sequencing 하였다. Fig. 16은 sequence 결과를 바탕으로 coding sequence만을 PCR 증폭한 것이다.

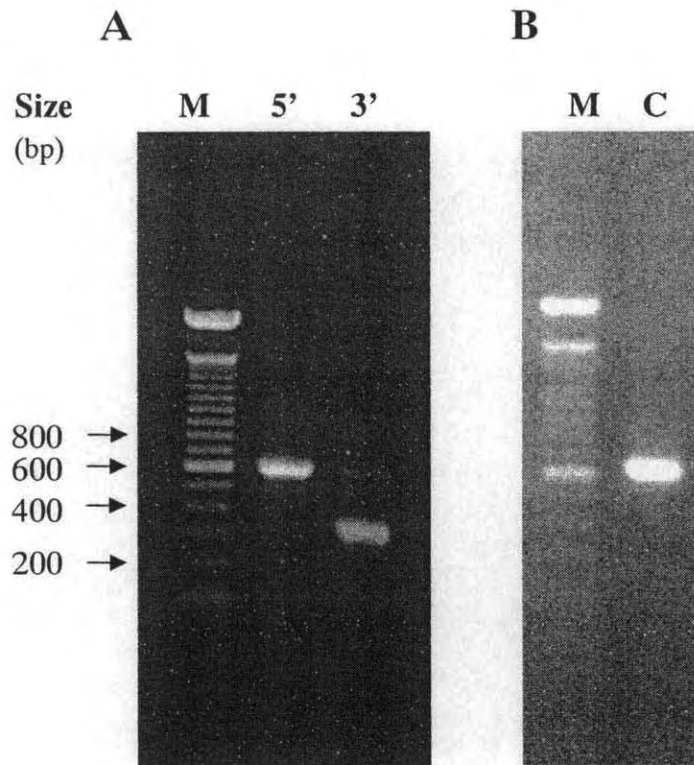


Fig. 16. RT-PCR을 이용한 참복 성장호르몬 유전자의 5' 말단, 3'말단 그리고 coding sequence의 증폭.

A는 5'과 3' 말단을 증폭한 결과이고 B는 coding sequence를 증폭한 결과이다. M은 size marker를 나타내며 크기를 나타내었다. 5'과 3'은 성장호르몬의 5'과 3' 말단을 나타내며 C는 coding sequence를 나타낸다.

Fig. 17은 참복 성장호르몬의 염기서열 일부분을 나타낸 것으로 전체 cDNA의 길이는 864bp이며 5' untranslated 부분과 3' untranslated 부분은 각각 49bp와 224bp이다. 그리고 cDNA는 196개의 amino acid를 암호화하며 17개의 예상되는 signal peptide를 가지고 있다. 이미 밝혀진 어류의 성장호르몬과 비교한 결과 단백질 단위에서 참돔, 조피볼락, 넙치와 각각 75.4, 74.5, 58.8% 동일하다.

ATGGACAAAGTGATACTCGTGTGCTGATGTCTTTGGGCGCGTCCTCTCAGCCACTTACA	60
GACTCTCCACGTTTGTCTCCATGGCTGTGAGCAGGGTTCAACACCTCCACCTGCTTGCT	120
CAGAGACTTTTCGCAGATTTTGAGAGTTCCTTGCAAACCGATGAGCAGCGACAGCTTAAC	180
AAAAAATTCCTCCCTTTCTGCAACTCCGATTCCATCATCAGCCCCAATGATAAACACGAG	240
ACCCAGCGTAGTTCGGTCTCAAGCTATTGTCCATTTCTATCGACTGATTGAGTCTTGG	300
GATTTCCAGTCTTCTCTCTCTGGTGGGCTTTCACCAAACTGTCTGACCTGAAGACA	360
GGTATCTTACTTCTCATCAAGGCCAGTCAGGATGGAGCTGATATGTTTTCTGAGAGCACA	420
ACTCTTCAGCTAGGTCCCTATGAAAACTATTATCAAAATCTGGGAGGAGAGGAGCCACTG	480
AAAAGAACATATGAACTTTTAACATGTTTTAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAGACCTAC	540
CTAACTGTTGCCAAATGTAGACTCTCTCCTGAAGCCAACCTGCACTCTTTAA	591

Fig. 17. 참복의 성장호르몬 cDNA 염기서열.

Nucleotide sequence 옆에 있는 번호는 같은 줄의 마지막 nucleotide의 번호를 나타내며 amino acid의 번호는 amino acid sequence 옆에 나타내었다. 5'과 3' untranslated 부분 염기서열은 나타내지 않았으며 염기서열과 아미노산 서열의 n은 확인하였으나 나타내지 않은 서열이다.

(5) 넙치

넙치 성장호르몬 coding sequence cloning

Fig. 18은 넙치의 성장호르몬 coding sequence를 증폭한 결과이다. Coding sequence를 증폭하기 위하여 이미 밝혀진 성장호르몬의 개시 codon과 종결 codon을 가지고 있는 두 개의 primer를 합성하였다. 이 primer에 제한효소 절단부위를 두어 cloning을 용이하게 하였다. 증폭

된 coding sequence는 약 580bp이며 크기는 밝혀진 sequence의 크기와 동일하다. 증폭된 coding sequence 단편을 pUC19의 SmaI 절단부위에 cloning하였다. 넙치의 성장호르몬 유전자임을 확인하기 위하여 sequencing하였으며 이미 밝혀진 유전자와 같은 결과를 얻었다.

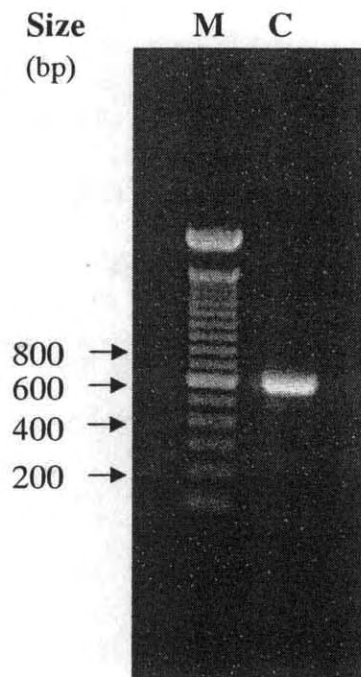


Fig. 18. RT-PCR을 이용한 넙치의 coding sequence 증폭.

증폭된 coding sequence 단편은 약 600bp이다. M은 size marker를 나타내며 marker의 크기는 왼쪽 옆에 나타내었다. C는 coding sequence를 나타낸다.

나. 베타액틴 유전자

(1) 자주복 (*Takifugu rubripes*)

(가) 서론

어류는 현재까지 존재하는 척추동물 중 지구상에서 가장 오래되고, 척추동물 종들의 약 60%를 차지하고 있는 가장 큰 집단으로서 진화적으로는 물론 분류학적으로도 매우 다양한 형태로 존재하고 있다(Nelson, 1994). 따라서 지금까지 많은 분자 생물학적인 연구들이 토끼나 생쥐 등의 포유류를 대상으로 진행되어 왔었으나, 최근에는 분자 생물학의 발달에 따라 새로운 실험동물 모델로서 어류에 대한 관심이 높아졌다 (Powers, 1989; Sin, 1997). 이에 따른 어류의 분자 생물학적인 연구는 현재까지 알려진 생물들의 유전자 구조, 특징, 발현 조절 기작 등의 비교 연구에 훌륭한 척추동물 모델로 매우 중요하게 다루어지게 되었다 (Powers, 1989; Liu et al., 1990b).

어류는 포유류에 비해 다량의 난 (egg)을 산란할 수 있으며 실험실내에서도 산란 및 부화가 가능하고 수정란의 크기도 클 뿐만 아니라 투명하여 발생, 분화 과정의 관찰과 조작이 용이하기 때문에 초기 발생, 분화와 관련된 유전자의 기능 분석 등에 매우 유용히 사용되고 있다 (Streisinger, 1981; Powers, 1989; Kimmel, 1989; Liu et al., 1990b) 어류의 유전자는 매우 높은 상동성을 나타내지만 포유류보다 게놈(genome)의 사이즈가 훨씬 작아 유전자 cloning이나 유전자의 특성을 분석하는데 용이하다(Brenner et al., 1993; Elgar et al., 1996). 최근에는 형질전환 어류 (transgenic fish)의 제조를 통해 발생 관련 유전자의 분리 및 기능 분석 등에 관한 연구와 외래의 유용한 유전자를 도입함으로써 새로운 형질을 갖는 어류 육종 방법에 따른 연구가 많이 진행되고 있다. 대표적으로 틸라피아 (Brem et al., 1988; Rahman et al., 1992; Martinez et al., 1996), 무지개송어 (Gayomard et al., 1989), Atlantic salmon (Shears et al., 1991), African catfish (Volckaert et al., 1994) 등이 그 예이다. 이러한 transgenic fish 제작 연구에는 성장호르몬 등의 다양한 유용 유전자의 개발은 물론 우리가 선택한 유전자를 잘 발현시킬 수 있는 조절요소(regulatory elements)에 관한 연구가 많이 이루어져야 한다. 그리하여 많은 연구진들은 CMV promoter 등 바이러스나 포유류에서 유래한 조절인자를 밝혀내어 발현을 성공시켰지만 이들을 어류에 적용하였을 경우 aberrant 되거나 nil expression 되는 경우가 종종 발생하게 되었다(Hourrout et al., 1990; Penman et al., 1991). 이런 문제점을 보완하기 위하여 어류에서 유래한 조절인자를 어류에 적용시키게 되었는데 viral origin이나 포유동물에서 유래한 조절요소보다 훨씬 효과가 높다는 연구들이 발표되었다(Maclean et al, 2000). transgenic fish 생산의 연구가 더욱 진행되어졌다. (Hwang et al, 2003)

어류에서 유래한 조절인자들은 대표적으로 연어의 protamine 유전자 (Jankowski and Dixon, 1984), 무지개송어의 metallothionein A and B 유전자 (Olsson et al., 1995; Zafaulah

et al., 1988), 제브라피쉬의 myosin heavy chain gene (Muller et al., 1997), 넙치의 항동결 단백질 유전자 (Du et al., 1992; Gong et al., 1995), grass carp β -actin 유전자 (Liu et al., 1990a), common carp β -actin 유전자 (Liu et al., 1990b), 송사리 (*Oryzias latipes*) β -actin 유전자 (Takagi et al., 1994) 등 효과적인 transgenic fish line를 만들기 위한 promoter의 연구가 이루어졌다(Noh et al., 2003).

β -actin 유전자는 진핵 세포에 있어서 가장 잘 보존되어 있는 단백질이다. 이 유전자의 산물은 세포 운동성과 구조 등에 관여하며 모든 조직에서 강하게 발현되지만 각각의 유전자의 종류에 따라 조직 특이적, 발생 특이적 발현양상을 보여주는 특징이 있어(Gunning et al., 1987; Kusakabe, 1997) 식물, 척추동물, 무척추 동물의 연구에 actin promoter를 많이 이용하고 있다. (Liu et al., 1990a; McElroy et al., 1991; Moav et al., 1992). (Marta et al., 1999).

특히, β -actin promoter의 경우 각 종간에 높은 상동성을 보이고 모든 어류 중에서 충분히 기능을 발휘할 수 있기 때문에 β -actin promoter에 관한 연구는 다양한 어류에서 이루어져왔다. 이 중 carp (Liu et al., 1989), grass carp (Liu et al., 1990c), zebrafish (Kelly and Reversade., 1997), pufferfish (Venkatesh et al., 1996), European flounder (Lee et al., 2000a), southern top mount minnow (Lee et al., 2000b), common fat minnow (Lee et al., 2000b)가 현재 보고되었다. 이러한 β -actin promoter를 이용하여 transgenic medaka (Takagi et al., 1994; Keliko et al., 1998)을 생산하였으며 미꾸리의 β -actin gene의 3.2-kb upstream sequences에 GH를 연결한 expression vector를 이용하여 control에 비해 30배나 더 무거운 형질 전환 미꾸리를 생산하는 연구도 이루어졌다(Noh et al., 1999; Nam et al., 2001a, 2001b).

자주복(*Takifugu rubripes*)은 분류학상 복어목 (Tetraodoniformes), 참복과 (Tetraodonitidae)에 속하는 연안성 어류로서 우리 나라를 비롯한 일본 홋카이도 이남, 동중국해에 널리 분포하고 우리나라와 일본을 비롯한 동남아시아 지역에서는 맛이 좋고 영양이 풍부하여 식용으로 각광받는 고부가가치 어류이다. 자주복은 대략 380 Mb의 유전자를 가지고 있고 다른 척추동물들의 유전자들 중에서 가장 조밀한 구조로서 암호화되는 부분이 인간을 포함한 다른 척추동물의 Intron 부분을 미리 제거시킨 것과 같다는 보고에 의해서(Shin et al., 1997; S. Brenner et al., 1993; Elgar et al., 1996) 많은 연구자들이 자주복을 통한 유전자 연구에 높은 관심을 갖고 있다. 또한 자주복의 완전한 유전자 서열이 밝혀짐(Aparicio et al., 2002)에 따라 더욱 연구에 박차를 가하고 있다. 모든 어류 중에서 유용 유전자를 발현시키는데 적합한 어류기원의 유전자 조절 부위를 제공하고 이러한 유전자 조절부위를 포함하는 발현 벡터를 제조함으로써 다양한 형질 전환

어류 연구의 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 기존에 밝혀진 자주복의 β -actin 유전자 서열을 바탕으로 β -actin 유전자의 조절 부위를 분리하여 그 구조적 특징을 분석하고 녹색 형광단백질(Enhance Green Fluroscent Protin : EGFP) 인 reporter 유전자를 이용하여 β -actin 유전자 조절 부위의 기능을 어류 세포 주에서 비교 분석하고, 또한 앞서 클로닝한 재조합 발현 벡터를 microinjection을 통하여 실험 모델어종인 zebrafish의 수정란에 주입하여 발현양상을 확인하였다.

(나) 결과

자주복으로부터 분리한 β -actin 조절 부위 염기서열 분석

자주복으로부터 β -actin 유전자 조절부위를 증폭시키기 위한 primer를 제작하기 위하여 이미 알려진 β -actin cDNA의 염기서열을 바탕으로 한 쌍의 primer를 제작하였으며 이것을 이용하여 자주복의 β -actin 유전자를 확인하였다. 확인된 유전자의 염기서열을 이용하여 R1, R2 primer를 제작하였으며 이것을 이용하여 LA-PCR을 수행하여 β -actin gene의 promoter 부분을 얻을 수 있었다.

LA-PCR 을 통하여 확인된 자주복의 β -actin gene의 promoter 부분을 pBluescript SK(-) vector에 cloning하여 염기서열 분석을 의뢰하였다. 이를 통하여 밝혀진 자주복의 β -actin 유전자 조절부위의 서열을 Fig. 19에 나타내었다. 증폭된 자주복의 β -actin 유전자 조절부분의 서열은 전체 총 2659 bp로서 transcription start site, exon I , Intron I , exon II 의 앞부분이 증폭되었음을 Fig. 19에 나타내었다. Exon I은 총 114 bp로서 1153 bp ~1238 bp 에 위치하며 이는 단백질을 암호화하지 않는 mRNA 의 시작부위인 5' UTR (5' untranslated region)임을 확인할 수 있었다.

진핵생물들의 promoter를 예측할 수 있는 PPNN (promoter prediction by neural network)의 프로그램을 이용하여 1113 - 1163 bp의 위치의 염기서열들을 promoter로 예측하였으며 이와 더불어 TATA box를 예측해주는 TATA box prediction 프로그램과 TATA box를 비롯한 다른 조절부위 요소를 예측해주는 SIGNALSGAN 프로그램을 이용하여 다른 진핵생물의 mRNA에서 확인할 수 있는 TATA box, CAAT box, CArG motif 그리고 E-box를 예측하였다. 이는 Fig. 19에서 볼 수 있듯이 80, 305, 388, 698, 1124 bp 위치에서 TATA box (TATAA), 1059 bp 위치에서 CAAT box (CCAAT), 1089 bp 위치에서 CArG motif (CC(A/T)₆GG), 그리고 130, 422 bp 위치에서 E-box (CA**TG)를 예측함으로써 transcrip

tion을 조절하는 부분임을 확인시켜주었다. 이와 더불어 exon I이 끝나는 부분에서 GT 서열과 Intron I이 끝나는 부분의 서열 AG는 splicing이 일어나는 엑손-인트론의 연결 부위로 GT-A G 법칙이 적용되고 있음을 확인할 수 있었다.

염기서열을 분석함과 동시에 자주복의 β -actin promoter 부분이 다른 어류 종의 것과 얼마나 유사한지를 알아보기 위해 다른 어류들에서 밝혀진 β -actin promoter 서열들과의 비교분석하였다. 그 결과, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia)종의 promoter 서열이 80% 상동성으로 우리가 얻어낸 서열과 가장 많이 일치되었으며 그 다음 *Oryzias latipes* (Japanese medaka)종 경우에도 77%정도의 상동성을 보여주었다. 이를 바탕으로 Fig. 20에서 promoter 부분이 포함하고 있는 보존된 서열인 TATA box, CAAT box, CArG motif를 carp를 비롯한 다양한 어종의 promoter 부분과 multiple alignment를 수행하여 정리하였다. Alignment 결과 현재 알려진 어류들이 β -actin promoter에서 가지고 있는 보존된 서열들을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 비교대상이 된 다른 어종들은 담수어임에도 불구하고 해수어인 자주복과 유사한 promoter의 조절 요소를 가지고 있다는 것도 확인하였다.

AAGCTTATAGAGATGGAATCATTAAAAGCAGCCACTAGAAAGGATAATTCAGTGGG 60
AATAAACTGAATAAATACATATAAAGGATGCCACTCAGAAAGGAAAAGCAAGTGGCAAAG 120
TATA box
TAAGACAAGCACATGTATCTGTGGGTGCTGGTTAAAAGGGGAAGTTGCTCAACAGTTGA 180
E-box
GAGGAACTCGGGTGTGAAAATGGTTCACCTTATAGTTAGATTCGAACATTTTGGTGT 240
GTCATCGTCTCATTTTTGAAGATGTGAGCAGAATAAAGTAGTATTTAACAATATTAGACA 300
GTGGTATAAGGGTTTCTGTATGGTTGAACTGCAGCTGAAAGCACAACAGATAGTGCTC 360
TATA box
TCCACACTCCATTGTGTTAATTTAATATAATCTGAAAACTTGCTGTTTAAACACCT 420
GCATGTGCAATGCTGCAGGCAATGCAATCTAAATATGATGACTGCCATATCTGTGACTGA 480
E-box
AAACCAGACACATACAGCACAAAGAGCTTGATCAATAAGGGAGTCTTAGCAGCTGAGGAGT 540
GCAGAGAAGCGATGGCCTACATATGTGGTCATCCCCAGCCCTGCCAGGAATCTTGTGT 600
GTGTCATATGATTGACCTGGTGTGAACTGGCTGTGAGCCACAGTGAAGTTTTGCAAAT 660
CGAATGCTTACATCTGCATCGCCTCTGACATCGTTGATATAAAGTAAAAGAAGAGGGCA 720
TATA box
GCCATTGACTAGCAGCCTTGGTGGAGTCTGTACAGGGAGGGTCCCGAGTACAAATCTCT 780
TCCGTTAACTTAAGTATGACTGAAGTCTTGGTGGCAGGTGCAGGGGCTGTTGAAGA 840
AAGTCCCGCATCTGTAATTGCTAATCAACCGATTAGCAATCTATTATCTTATTAGACC 900
TCGTGGCATTACCCACGTTCTTTTATTTCTTCAGTTCTTGTCTATTATCGCCGCTCAT 960
TCTCAACCTCTCTCTCCCTCTCTCTCTCTCCCTCAAATCGTAGCCCCAGTGACG 1020
CAGTGTGCACGGCAGTGCCCTGGTGCATGACGCTGGACCAATCAGAAGGCACGATTCCG 1080
CAAT box
AAAGTTACCTTTTATGGCTCGAGCCCGGGCAGCTGACCTAGTTATAAAGACAAGCGCC 1140
CArG motif TATA box
CACAATCCATAGACTCACTCTGAGCGTCGTCACACGCAGCTTGTGCGGATTCATTTGCCT 1200
Exon I
GTACCGGTTTCCCTTAAGCGAAAACCCCCACCCAAAGgtAAGGCTATGGAGACGTTTAC 1260
AAATGCTTAACATTAGAACGATGTTTACTACGTAAGTGGTGACGTGGCAATTTGTTTTTC 1320
ATAGTTTTTACGAAATTTGGCACCGGACACGAGGTTCTTTGTTAATCACTGACACTAAA 1380
CGAAGTTCTTACCCTAATGTTTAAAATGTTGTACAACGTATTTTGAGGCGTCTACAG 1440
TAATTAATCGGGGTATTGCTGGCCGACAGGTGCTTTCGGATGCAGCCGGCTTTTGTCTC 1500
ATGCGATAGGAAATAACGGTTTACGGTTTTGATAAGTCATGACTTATGTGCGGATTC 1560
GGACTAGCTTGCCCGGTATGATTCAAACGATGTGGAGTAGATGATTAAGGTCCTGCTGC 1620

TCCCTTGTGCAAATGCAGACGGGTGTGACCTACTTAGTAAGCACGTAAGCTACGACCGCC	1680
TAAGTAAAAACGCCTAACAGCCTGCTTTTGGAAACATGCCTGTGGGTACAGGCTGAATGA	1740
AAACCTGAATGAAATCATAAACCATTAAGGGTTTTGATAAGTCATGACTTATGTGCGGAT	1800
TCTGTACTAGCTTGCCCGGTATGATTCCAACGATGTGGAGTTAGATGATTTAGGTTCCGG	1860
CTGCTCCCTTTGTGCGACTGCGACGGGGTGTGACCTACTTTAGTTAGCACGTTATGCCTA	1920
GCCGCACTATGCTAACACCGCCCTACACGCCATGCATTTTTGAAAACCTGCCTGTGGTTC	1980
ACGGTCGTAGGAAATCTCGTAGGTAACCTCAAATTTACATATTTGGACTTGTATACGAT	2040
TTTTTTTTGTCTTCGTCTCTATTCAACGTGCCGGTTACATAAAGGGCAATTTATGAATG	2100
ACGATCAGTCTGGCGAAAGGCGTGGCTTTCGGGAAATTAAGATCAGTCTGGAAC TTGA	2160
CCCATTCAATGAATCGGCATGAGTAATGACGCAACCCCCATTAAGGCGTCAGTAATCAGC	2220
CCGAGTTAAAGGATATTAAGCGAGCCGCTGTGACGCAGCTAAATTTAAGTTGCGCGTGA	2280
TTCATTGTAAAAGCATAAAGACGTGAGTAGGGGGGAGGAAGCTAGGGACGACAAGGAAGT	2340
CTGGCTTGTAAGTAGAGGAGTGGTCGCTCAGCTCTGGGCCGTTAACGCGTAAGTCCG	2400
TTATGGATGTTCTGGCAGCCGCATGGCGCCGGTAGCCGCAAAGCTGCTCGAAAACGAA	2460
GTTGGGTAACGGCGCCCTGTCTGCGGTTCACTCGACCTGCAGTCTGATCAAAGAGTGA	2580
GCTCATCGAAGCGGATGCTGGAAAGGAGATCTGATACTTTAACGTTTTTCTCCCCCTCC	2620
CTTTTCCTGCag <u>TTGAGCC</u>	2659

Exon II →

Fig. 19. Nucleotide Sequences of the Takifugu rubripes β -actin gene and its upstream region. Genomic and predicted nucleotide sequences. Sequence in lowercase correspond to the non-transcribed promoter and intron. Sequences in italics correspond to the 5' untranslated region. First and second exon is indicated with capitals and underline. non-capitals represented GT/AG role. The underlined sequences correspond to putative regulatory elements.

common carp	43	CCGGGTGTGTGACGCTGGA CCAAT CAGAGCG	73
grass carp	23	CCGGGTGTGTGACGCTGGA CCAAT CAGAGGG	53
medaka	92	CCCCAGTGAGTGACGCTGGA CCAAT CACATGC	123
black carp	23	CCGGGTGTGTGACGCTGGA CCAAT CAGAGGG	53
Nile tilapia		GTGAGTGACGCCGGA CCAAT CAGGAGG	27
oryzias latipes	92	CCCCAGTGAGTGACGCTGGA CCAAT CACATGC	123
stinging catfish	82	CCCCAGTGAGTGACGCTGGA CCAAT CACA-GC	112
fugu	10	CCCTGGTGCATGACGCTGGA CCAAT CAGAAGG	41
common carp	74	CAGAGCTCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG CTAG	105
grass carp	54	CAGAGCTCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG CTAG	85
medaka	124	CGCGATTCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG AAAG	155
black carp	54	CAGAGCTCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG CTAG	85
Nile tilapia	28	CGCAATCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG CTAG	59
oryzias latipes	124	CGCGATTCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG AAAG	155
stinging catfish	113	CGCGATTCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG AAAG	144
fugu	42	CACGATTCCGAAAGTTTA CCTTTTATGG CTCG	73
common carp	106	AGCC-GG-CATCTGCCGTCA- TATAAA AGAG	133
grass carp	86	AGCC-GG-CATATGCCGTCA- TATAAA AGAG	113
medaka	156	AGCC-GGGCAACGGACGGAC- TATAAA TACCA	185
black carp	86	AGCC-GGGCATATGCCGTCA- TATAAA AGAG	114
Nile tilapia	60	AGCC-AGGCAACCGACTGAG- TATAAA AATCA	89
oryzias latipes	156	AGCC-GGGCAACGGACGGAC- TATAAA TACCA	185
stinging catfish	145	GGCC-GGGCAACGGACGGAC- TATAAA TACCA	174
fugu	74	AGCCCGGGCAGCTGACCTAGT TATAAA AGACA	105

Fig. 20. Alignment of the conserved region sequences of pufferfish β -actin promoter with other Perciformes β -actin promoters. The sequence of puffer fish (*Takifugu rubripes*) β -actin promoter is compared with the sequences of common carp (accession number of M244113), grass carp ,medaka, black carp(M25013), Nile tilapia, *Oryzias latipes*, stinging catfish. The three boxes indicate a known conserved region in CAAT box (CCAAT), CArG box (CC(A/T)6GG), TATA box (TATAA).

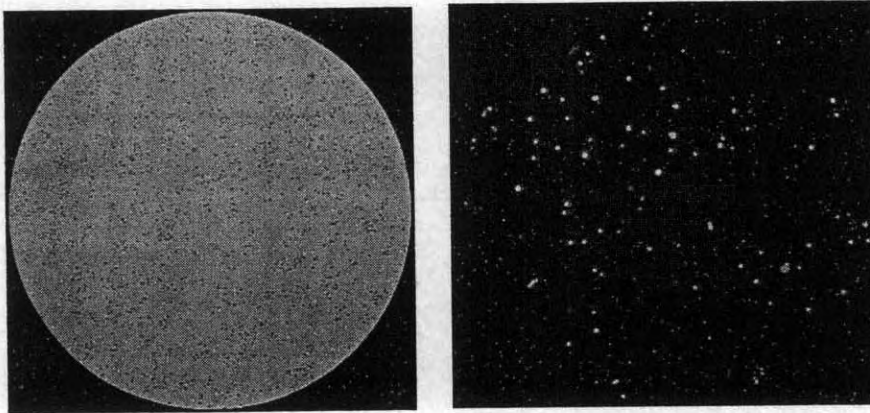
배양 세포주를 이용한 자주복의 β -actin 조절 부위 발현양상 확인

자주복 β -actin 유전자의 조절 부위와 reporter 유전자인 EGFP 유전자를 연결하여 제작한 pFAP-EGFP와 CMV promoter를 가진 pEGFP-C1의 발현 양상을 세포주를 이용하여 비교 분석하기 위해 mammalian cell line의 한 종류인 vero cell line, 연어 배아 세포주인 CHSE-214 cell line, 잉어 세포주인 EPC cell line에 transfection하여 EGFP의 발현을 확인하였다.

Mammalian cell line 중 하나인 Vero cell line에서 두 벡터의 발현을 Fig. 3에서 관찰할 수 있었다. Fig. 21(A)는 pEGFP-C1을 Lipofectamine과 1:1의 비율로 transfection한 EGFP 발현을 확인한 결과이다. 왼쪽 사진이 광학현미경을 통하여 관찰한 vero cell의 사진이고 오른쪽이 형광현미경하에서 EGFP 발현을 찍은 사진으로서 CMV promoter로 인한 단백질 발현이 잘 되었음을 확인할 수 있다. 다음 Fig. 21(B)는 자주복 β -actin promoter에 의해 EGFP가 발현을 확인한 사진으로서 β -actin promoter의 발현율은 형광현미경 상에서 positive control인 pEGFP-C1의 결과에 못지않게 고른 발현이 되었다는 것을 확인할 수 있다. 하지만 이 결과들은 광학 현미경으로 육안관찰만 하였기 때문에 정확한 발현양은 측정할 수 없었다. 다만 각각의 결과들의 발현은 각 세포들마다 전체적으로 고른 발현패턴을 나타내어 제작한 발현벡터가 작동하고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다.

연어 배아 세포주인 CHSE-214 cell line에서 transfection을 하여 세포내의 EGFP 단백질 발현 양상을 비교한 사진을 Fig. 4에 정리하였다. Fig. 22(A)는 CMV promoter에 의한 EGFP 발현 결과이고 Fig. 22(B)는 자주복의 β -actin promoter에 의한 EGFP의 발현 결과를 보여주는 사진이다. CHSE-214 cell line에서의 두 발현벡터의 transfection은 어류 주화 세포의 특성으로 mammalian cell line만큼 많진 않았지만 발현된 세포의 발광정도는 육안으로 관찰했을 때 mammalian cell line에서와 비슷한 발광 정도를 관찰할 수 있다. 정리해서 Lipofectamine을 이용한 transfection의 효율은 각 세포주의 종류와 세포들의 상태에 따라 다르게 나타났지만 β -actin promoter에 의해 발현되는 EGFP의 발현 정도는 차이가 없는 것으로 판단되었다.

(A)



(B)

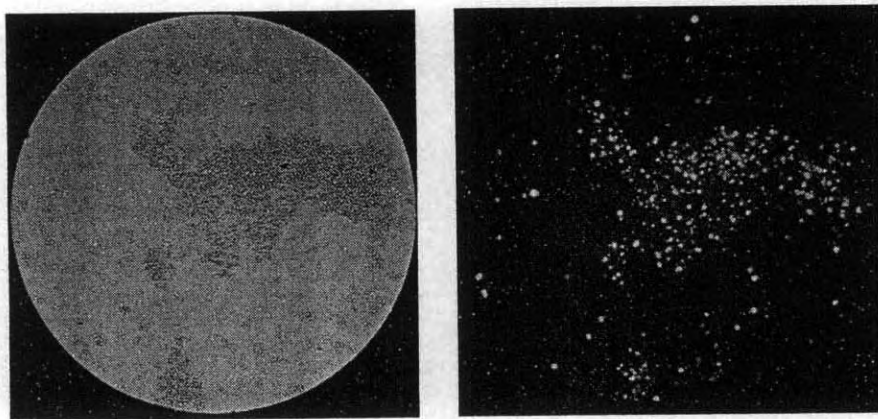
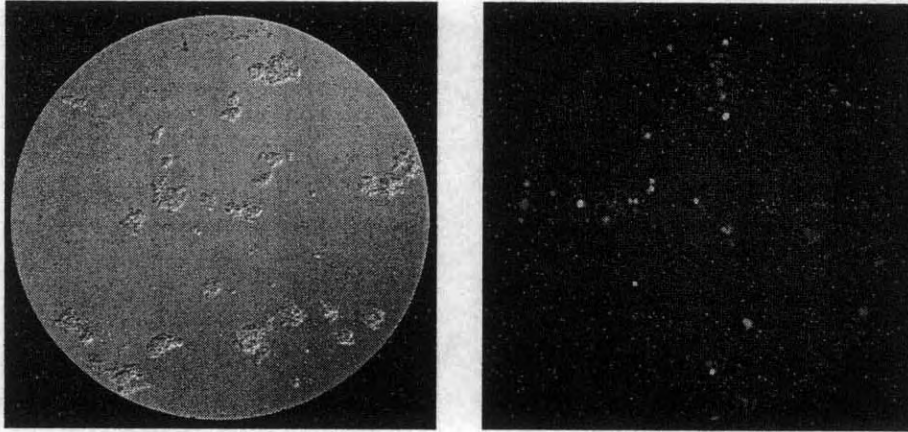


Fig. 21. Expression of EGFP report gene in the mammalian cell lines observed by bright field microscopy and fluorescent microscopy. (A) Transfected pEGFP-C1 ($1\mu\text{g} / 2\mu\text{l}$: DNA / lipofectamine), (B) Transfected pFAP-EGFP ($2.2\mu\text{g} / 4\mu\text{l}$: DNA / lipofectamine).

(A)



(B)

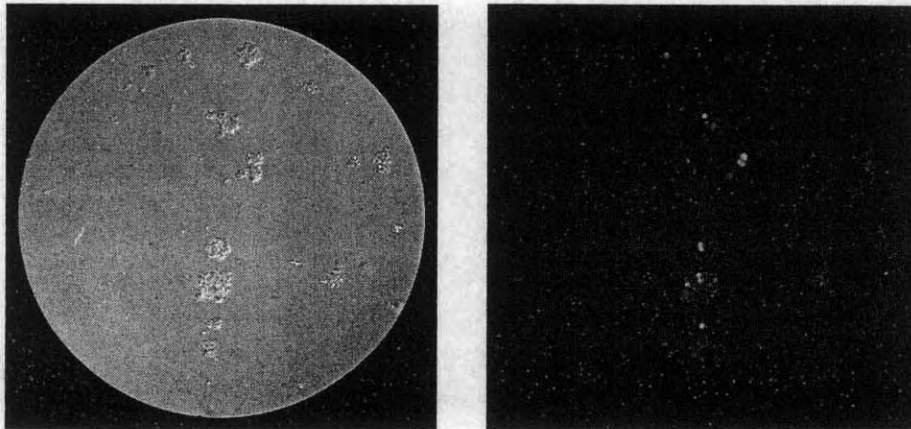


Fig. 22. Expression of EGFP report gene in the CHSE-214 cell lines observed by bright field microscopy and florescent microscopy. (A) Transfected pEGFP-C1 ($1 \mu\text{g} / 2 \mu\text{l}$: DNA / lipofectamine), (B) Transfected pFAP-EGFP ($1.1 \mu\text{g} / 2 \mu\text{l}$: DNA / lipofectamine).

모델 어류 내에서의 재조합 벡터(pFAP-EGFP)의 발현 양상

LA-PCR을 통하여 증폭된 자주복의 β -actin gene의 조절영역과 형광단백질인 EGFP를 재조합한 pFAP-EGFP와 CMV promoter를 가지고 있는 pEGFP-C1 발현벡터를 어류의 실험모델로 사용되고 있는 zebrafish의 one-cell stage 수정란에 미세주입 시켰다. 주입된 transgene의 발현 유무는 reporter 유전자인 EGFP 발현으로 확인 할 수 있었는데 발현은 대개 수정 후 12시간에서 처음으로 관찰되었으나 발현이 매우 약하게 나타났으며 그 후 발현량은 점차 증가하는 경향을 나타내었다.

One-cell stage의 수정란에 미세 주입한 후 48시간 경과 시 pFAP-EGFP와 pEGFP-C1의 EGFP의 발현 양상은 Fig. 24 에서 보는 바와 같이 주로 zebrafish 몸체의 근육에서 상대적으로 강한 발현 양상을 보였으며 그 외에도 난황을 덮고 있는 표피세포와 두부 및 눈 주위에서도 형광발현양상을 확인 할 수 있었다. 이들의 발현패턴은 DNA를 미세주입할 경우 나타나는 전형적인 mosaic expression pattern 을 보였다(Fig. 23). 대부분 어체 전반에 걸쳐서 발현이 관찰되었으며 특히 근육 주변에는 발생이 진행될수록 막대 모양의 발현을 이루었다(Fig. 23). 이외에도 심장에서도 EGFP의 발현이 관찰되었는데 심장이 뛰게 되면 형광발현도 같이 깜박이는 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 어떤 개체의 경우에는 눈 주위와 아가미 주위에도 발현을 관찰 할 수 있었으며 난황과 꼬리부분에서도 mosaic 발현패턴을 확인할 수 있었다(Fig. 24). 부화 후 5일이 경과한 후 개체의 따른 변이는 있지만 발현 양상이 다소 줄어드는 경향을 보였으며 발현하는 근육조직에서는 더욱 굵고 뚜렷한 발현을 나타내었고 어체의 전체에 걸쳐서 산발적으로 발현을 보였다. 이와 같은 결과를 보면서 기존에 사용되고 있는 CMV promoter에 의한 발현뿐만이 아니라 β -actin promoter에 의한 발현도 어체에 전반적으로 발현됨을 확인 할 수 있었다.

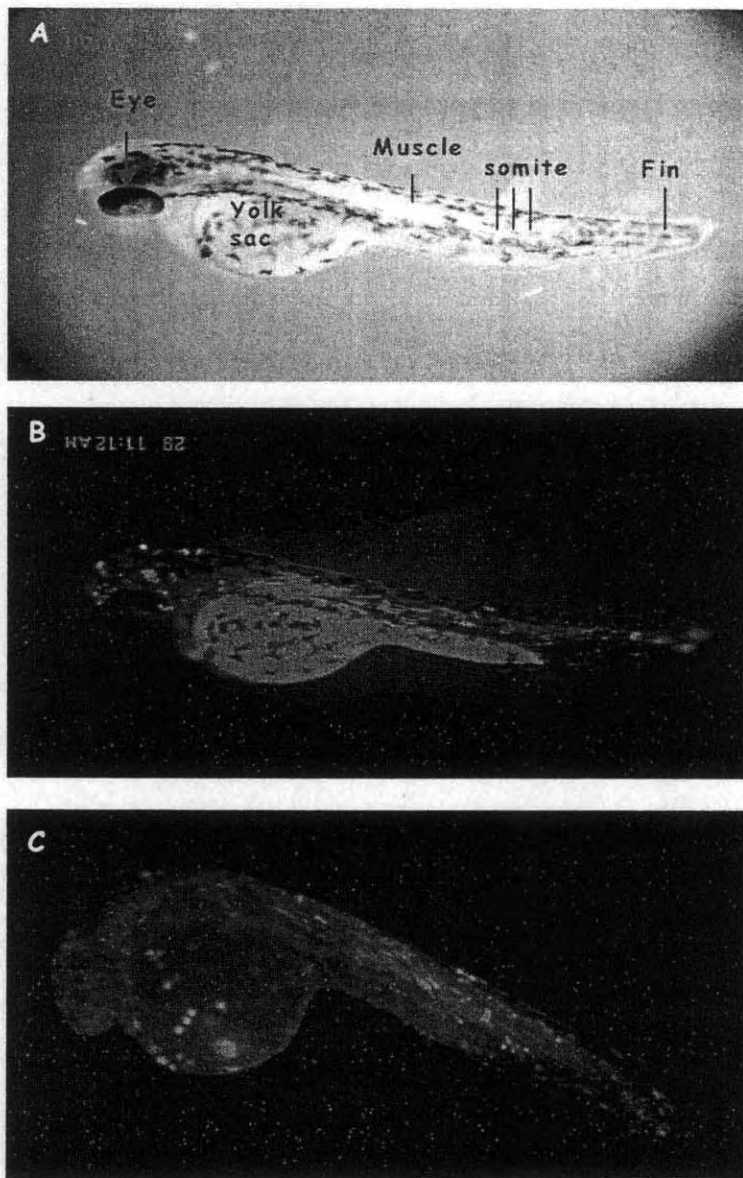


Fig. 23. Expression of EGFP reporter gene of pFAP-EGFP and pEGFP-C 1 into zebrafish in the two-day-old transgenic zebrafish. (A) non-injected zebrafish observed by bright field microscopy; (B) Injected pEGFP-C1 observed by fluorescence microscopy; (C) Injected pFAP-EGFP observed by fluorescence microscopy.

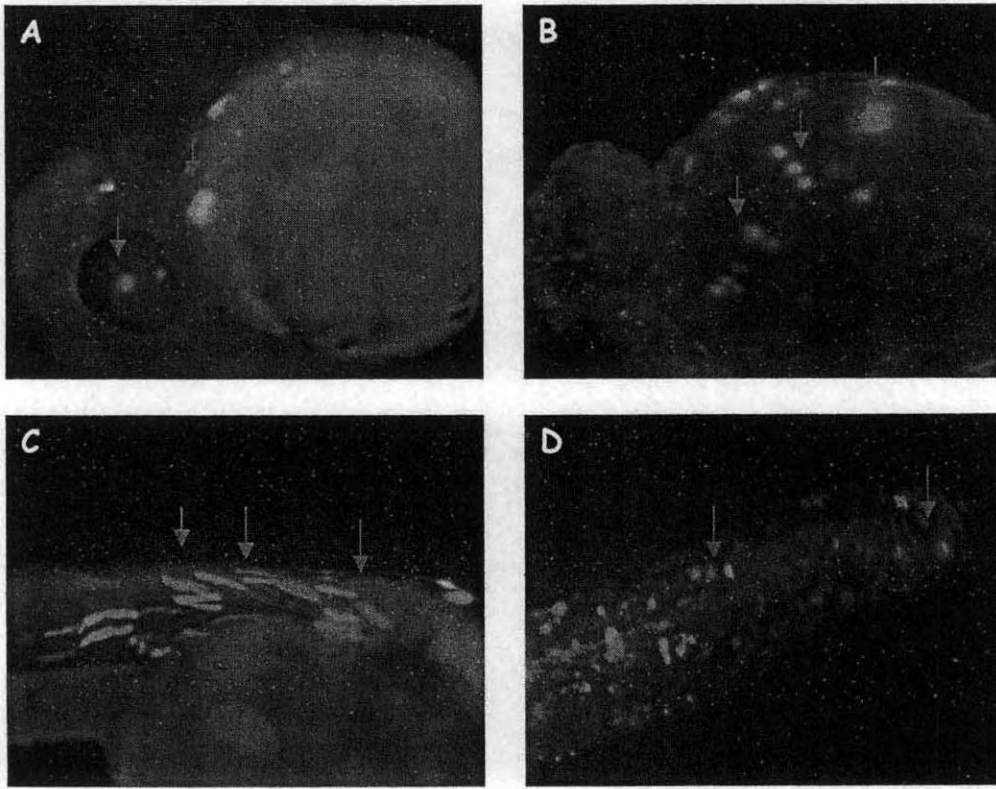


Fig. 24. Expression of EGFP report gene in the 48hr transgenic zebrafish. Red arrow represented fluorescence expression pattern. (A) Expressed on its heart and eye; (B) Expressed on yolk sac; (C) Expressed on its muscles and somite; (D) Expressed on its tail.

(나) 고찰

우리나라에서 유전적 조작을 이용한 형질 전환 어류에 관한 연구는 대표적으로 담수 어류인 미꾸리를 대상으로 성공한 예가 보고되고 있다. 그러나 양식 생산고의 주류를 이루고 있는 해산어를 대상으로 한 연구는 미미한 실정이다. 또한 주로 신속 진단법이나 백신 개발에 대한 연구가 진행되고 있으나 장기적인 어병 대책으로 어류 자체가 가지고 있는 내병성 관련 유전자의 연구도 요구되고 있으며 이에 따른 경제적인 유용성은 물론이고 형질전환 어류의 생체 내에 작용 기작 등을 더 깊게 연구 할 수 있는 계기를 마련하기 때문에 많은 연구진들이 관심을 보이고 있다.

이러한 목표에 도달하기 위해서는 서론에서 언급한 것과 같이 효용가치가 있는 유전자를 밝히는 것은 물론 이들 새로운 유전자를 수정란으로 안정하게 효율적으로 도입시키는 방법들의 개발과 함께 도입된 유전자의 적절한 발현을 유도할 수 있는 어류 특이적 발현 벡터의 제조가 중요하다. 하지만 이러한 벡터를 제조하는데 있어 우리가 원하는 유전자를 효과적으로 발현시킬 수 있는 조절 부위의 선택은 무엇보다도 중요하며 특히 어류 특이적인 발현 벡터를 제조함에 있어서는 어류 유래의 조절 부위가 가장 적합하다는 연구 결과가 나오면서(Maclean et al., 2000) 형질 전환 어류의 조절부위에 관한 연구는 더욱 활발하게 진행되고 있다(Hwang et al., 2003).

이 연구에서는 형질 전환 어류를 제조하기 위한 시작 단계로서 원하는 유전자의 적절한 발현을 유도하기 위하여 자주복으로부터 모든 조직에서 강력하게 발현을 유도함은 물론이고 종간의 상동성이 높아 다양한 종에서 작용할 수 있다는 장점을 가지고 있는 β -actin gene의 조절 부위를 증폭하여 그 염기서열과 유전자의 구조 및 특성을 분석하였으며 β -actin의 조절 부위의 발현 능력을 확인해 봄으로써 어류 특이적 발현 벡터 생산의 길을 제시하였다.

클로닝 된 자주복의 β -actin 유전자의 조절부위 염기서열 분석 결과 Fig. 19에서 나타낸 것과 같이 5' UTR 부분의 exon I 과 exon II를 포함하며 2659bp의 β -actin 유전자의 조절 부위를 얻을 수 있었다(Fig. 19).

자주복의 β -actin gene의 조절부위 중 promoter 부분은 종간에 conserved 된 sequence가 존재한다. 각 종에 따라 다르지만 transcription start site에서 대략 200 bp 안에 존재하며 전사의 활성화에 관여하며 각 인자들의 서로 다른 결합에 의해 유전자의 발현이 조절된다고 알려져 있다(Quitschke, 1989). 이러한 promoter의 특징은 증폭된 자주복에서도 찾아볼 수 있었는데 CAAT box, TATA box, E-box 등을 유전자분석프로그램을 통하여 예측할 수 있었다. 또한 TATA box와 CAAT box 외에도 전형적인 전사조절 요소의 하나로 심근과 골격근에서 뿐만 아니라 모든 actin 유전자에 존재하며, 특히 α -actin의 경우 근육 특이적 발현에 필수적인 서열로 보고되어진 (Minty and Kedes, 1986; Miwa and Kedes, 1987) CArG motif (CC(A/T)6GG)도 확인 할 수 있었다. 이 서열은 Lui et al (1990)에서 강조되었듯이 CAAT box 와 TATA box 사이에 존재하며 증폭된 자주복의 서열에서는 exon I 시작서열을 기준으로 한 상위 -29 위치의 TATA box 와 -94 위치의 CAAT box 사이인 -64 위치에서 (CCTTTTATGG) 확인할 수 있었다. 다양한 종에서 actin promoter의 특징을 알 수 있게 하는 서열로 알려져 있기 때문에 (Chung and Keller, 1990; Lui et al., 1990b; Kirchhammer et al., 1996; Mange et al., 1996) 증폭된 자주복의 경우에도 β -actin promoter의 특징적인 요소가 있

음을 확인할 수 있었다. promoter를 이루는 요소인 CAAT box, CAAT motif와 transcription start site간에는 거리는 다양한 것으로 보고되고 있지만, 대개 Cap signal 에서 220 bp 안에 존재하며 TATA box의 upstream에 존재하는 것이 일반적이다(Larsen et al., 1995). 자주복의 경우에도 마찬가지였으며 다른 종에 비해 비교적 짧은 promoter를 가지고 있음에도 불구하고 배양세포주에서나 수정란에 인젝션하여 관찰한 EGFP 발현양상에서 CMV promoter를 이용한 pEGFP-C1의 발현 못지않은 발현율을 나타낸 것으로 보아 짧지만 전사조절에 꼭 필요한 요소들을 갖추고 있는 것으로 생각된다. 또한 consensus binding site의 효과와 더불어 binding factor와 consensus sequence 사이의 상호작용은 발생과정 동안 다른 조직에서 발현되는 actin의 발현 양상을 결정한다는 보고를 보면(Kichhammer et al., 1996; Kusakabe, 1997; Robinson and Cooley, 1997) 자주복의 경우도 발생과정을 거칠수록 그 발현 패턴이 변화되는 것이 위와 같은 이유라 여겨진다. 그 외로 전사과정에서 splicing이 되는 intron I의 시작(GT)과 끝(AG)을 나타내는 intron-exon junction은 conserved sequence로서(Breathnach and Chambon, 1981) Fig. 19에서 볼 수 있듯이 자주복의 exon I 과 exon II 사이에서 GT-AG 서열을 확인할 수 있었으며 BLAST 결과, 비번역 exon I 과 intron I 의 경우에는 몇몇 담수 양식어종과 유사하나 서로 높은 상동성은 없었다.

위와 같이 분석된 자주복의 β -actin promoter를 포함한 조절부위를 이용하여 제작한 pFAP-EGFP는 기존에 시판되는 pEGFP-C1 벡터와 함께 배양 세포주 내, zebrafish의 수정란에 주입함으로써 그 발현 양상을 비교분석할 수 있었다. Fig. 21은 포유동물 유래의 vero cell line에서 EGFP 발현의 양상을 비교한 그림인데 제작한 pFAP-EGFP는 단순한 현미경 관찰에서도 pEGFP-C1의 발현 못지않은 발현율을 보인다는 것을 확인하였다. Fig. 21와 22는 어류 유래의 배양 세포주인 CHSE-214 cell과 EPC cell line 상에서의 발현을 나타낸 사진이다. Mammalian cell line에서만만큼의 transfection 효율은 나타내지 않았지만 현미경 상의 발현양상으로 보아 우리가 제작한 pFAP-EGFP 벡터가 pEGFP-C1의 발현과 비슷한 강도의 발현을 보인다는 것을 확인할 수 있으며 이로 형질전환어류의 생산에 있어 자주복의 β -actin promoter가 높은 단백질 발현을 유도할 것으로 생각된다. 또한 세포주를 이용한 실험에서 β -actin promoter의 발현정도와 세포주의 종류에 따른 발현정도를 정량적으로 분석하기 위해서는 발현세기를 수치로 확인하고 control과 비교해야 하는데 발현 정도를 정량적으로 확인하기 위해서는 RT-PCR, cell counting, β -galactosidase assay, luciferase assay 등의 실험을 수행해야 될 것으로 생각된다.

배양 세포주에서 실험한 것과 같이 zebrafish의 수정란에 미세주입법을 통하여 in vivo

상에서도 주입한 EGFP 발현이 가능한지를 확인한 결과를 Fig. 6,7,8에 정리하였다. 주입된 발현 벡터의 발현 유무는 reporter 유전자인 EGFP 의 발현으로 알 수 있었는데 주입된 두 벡터의 발현은 대개 수정 후 12시간에서 처음 관찰되었다. 그 발현이 매우 약하게 나타났으며 발현양이 점차 증가하는 경향을 확인하였다. 부화 후 48시간 경과 시 EGFP는 더욱 강한 발현을 나타내었으며 zebrafish에서 전형적인 mosaic expression pattern을 보였다(Fig. 24). 제작된 pFAP-EGFP나 pEGFP-C1 모두 어체 전반적으로 관찰되었으며 근육의 경우 주로 막대모양의 발현을 나타내었다. 이들은 zebrafish의 주로 근육에서 강하게 발현하였으나 발현의 범위와 level은 매우 mosaic하고 다양하여 β -actin 유전자의 특징적인 발현 패턴임을 알 수 있었다(Patwary et al., 1996; B. Venkatesh et al., 1996 (참고 10,20)). Mosaic 발현양상의 정확한 요인은 밝혀지지 않았으나 DNA injection방법임으로 발현되지 않은 세포의 핵으로부터 방출된 DNA 때문일 것이라고 기술하고 있다. 즉, construct는 세포의 핵 내에 들어가야만 효과적인 전사과정이 이루어진다는 의미이다. Zebrafish의 발생시 분할과정에서 똑같이 transgene의 분배가 되지 않는 현상일 것이라 생각되며 이는 injected embryo에서 흔히 볼 수 있는 현상이다 (Maclean et al., 1994). 또한 다른 하나의 이유로 생각해 볼 수 있는 것은 각 세포의 transgene의 복제수가 다르기 때문에 발현의 정도도 달라진다는 것이다(Rohmna et al., 2000). 이와 같은 결과는 zebrafish, medaka, tilapia와 carp에서도 보고되어있음을 확인할 수 있었다(Stuart et al., 1990; Tsai et al., 1995; Hwang et al., 2003).

미세주입한 후 60시간 후 발현을 조직별로 관찰한 결과, β -actin promoter로 인하여 눈을 비롯한 심장, 난황, 어체의 체표와 꼬리 등 거의 모든 몸에서 발현함을 확인할 수 있었으며 발현으로 인한 형광색의 심장을 박동이 있을 때마다 관찰할 수 있었다. 이로 앞서 설명한 바와 같이 수정 직후 바로 one-cell -stage에서 인젝션을 하게 된다면 Fig. 24와 같이 심장을 비롯한 어떠한 조직에서도 발현을 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

부화 후 3일 경과 후 zebrafish는 시간이 지날수록 막대 모양의 형광 단백질의 발현이 크고 굵은 면적으로 발현됨을 확인할 수 있는데 보통 인젝션 후 10일이 지나면 형광발현이 사라지는 경향을 보인다. 하지만 가끔 DNA construct가 매우 강하거나 어류에 따라 2주이상 약하지만 발현을 하는 개체도 관찰 할 수 있었다. 이러한 현상은 DNA의 injection인 경우 조직 특이적인 발현패턴이 많이 나타나기 때문이라고 보고되어지고 있다.

따라서 β -actin promoter를 이용한 발현 벡터는 형질전환 어류생산에 관한 연구는 물론 다양한 어류유전자 연구에서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 positive control로

사용된 CMV promoter를 삽입한 재조합 벡터와 비교하였을 때 자주복으로부터 제조한 재조합 벡터가 control 못지않은 발현 양상을 관찰함으로써 reporter 유전자인 EGFP 의 발현은 EGFP 의 5'쪽에 위치하고 있는 자주복의 β -actin promoter의 세기를 간접적으로 시사하고 있기 때문에 우리가 제조한 벡터의 조합이 성공적이었다고 생각된다. 이에 따라 보고된 미꾸리의 β -actin promoter나 carp의 β -actin promoter에서 처럼 각각의 transcription regulatory element을 결손 시킨 벡터를 제조하여 각 조절 요소들이 얼마나 발현양에 영향을 미치는지를 확인하는 것뿐만 아니라 더 나아가 이를 배양세포주 또는 어류의 수정란에 직접 주입하여 각 영역별 발현능을 확인하는 연구도 필요할 것으로 사료된다. 자주복의 β -actin 유전자의 promoter가 향후 형질 전환 어류 제조를 위한 발현 벡터 제조 시, 도입하고자하는 유용 유전자의 필요한 만큼의 유용한 조절부위로서 그 기능을 수행할 수 있을 것이라 생각한다.

(2) 자주복 (*Takifugu rubripes*)이외의 6종(넙치, 능성어, 돌돔, 붉바리, 자바리, 참복)으로부터의 베타액틴 유전자분리

이제까지 밝혀진 어류의 beta-actin 유전자를 나열하고 잘 보존된 두 부분을 선택하여 2개의 primer를 합성하였다. 2종의 어류 genomic DNA (넙치, 돌돔)를 주형으로 하여 PCR 반응을 한 결과 약 1200 bp 정도의 DNA 단편을 얻었다. 증폭된 2종 어류의 beta-actin 유전자를 pUC19 cloning하여 염기서열을 확인하였다. 그림 10-11은 넙치, 돌돔의 beta-actin 염기서열의 일부분을 나타낸 것이다. 밝혀낸 염기서열을 이용하여 beta-actin 촉진유전자(promoter)를 cloning하였으며 촉진유전자의 크기는 3 - 3.5 kb이다. Cloning 한 촉진유전자의 염기서열을 확인하고 있다.

```

AnnnnnnAGAnnnnnnAATnnnnnnTTCnnnnnnGTTnnnnnnATTnnnnnnCTCnnnnn 60
nTTTCTCCACACTCCGCTCTATTCTTCTCTATAAACCTCCTCTCCTCTCCTCCTGGTG 120
TCAACGCACAGCAAACATGTGCATGCACACATGTACATCACTGTGATCCTTCTCCATT 180
TGTCCAGCCACATGCACGGCAGCTCCCTCCACCATTAGAGTTATAATTAATCCGACTGC 240
TCCTGTGACAGAGCAGAGGAGGCGGGTAAGGTTTCAGCTGTTGGCTGTTTCTGTGGTTCT 300

```


GAATTCTACTGTAAGTTTATGAGTCTTTGTCCAGTGCCTTATTGAGTTAAACAGCACC 60
CTGACACACCCACTTAAGTCTCTGGTCAACTTACAGTATGAGATGAGCTTTGCATGATGA 120
CTTCCAAGTGTGTTATCATAAAAGAAAAAATCTAAACAAGTAATACAGGTTAGAGATGC 180
ACCATCCCTGTGTGCATACCTTGGGTGTGTCTATGAGCAGGTGTATATGCATATCAGCGT 240
GAGTCACATTCTGAATAGTAATTTCAATTCAGCACCAATATAGGTATGTTCCGGAGAG 300
TGCACACCTGTCTATTACATCACTAAGGCAAGCAAGGTTAACCTGCACCCTCCACTCACT 360
TAAGCATTACAGGGATGAGAGATAAGAGATTTACACCCTCCTAAGTGTGTTGCTGTAAC 420
ATACCTCAGCTTGACCACATGTATCACTGTCGCTCTGACCTGCATGTGTGTGTGTGTG 480
TGTATGTGTGAGACACTGGTATGCCAGGCAGACGTGTTAATCAGGGTGTAAACAGTGTG 540
TCAGTGACCCACGTCCTGGCACTACTGACCACGAGTGTCTGCCATGAATTTGCAAATGC 600
ATTAGCACAGTCTTCAGTGCAGTCTTTGCATTCCCTCATATCCTTCACTTGCATTAGAT 660
GAATCACGGATCTGTTTGTCTGCACCTTTCCACCAATGCACAAATATAGAGCAGAAGACA 720
ATAGCATGGGTATATGAATCAAATGAGACTTTGTGTAATCAGGATGTGTAAGCCCCCTC 780
CCAATGTGCATGATGTCGTGGATTAATACTCTAACAGTGGAGACAGTTCAGTAGAAAATA 840
ACATAAAGCACATATTTCAACTTGTTCACACTCAAGGACTCTGCTGTGGGTTTTGCAG 900
CTGTGATTTGTTGCCACGTGTGTATCACCACATTGAGATCACAATAaTGATGAAGAAG 960
GATATAAAAATGTGTTTTATTGAACACTGAACGACCCAGATTGGTAGTATTGATAGTAT 1020
ATAGGTTAGTTTTGGTGTCTGTGCCCCCTGTCTTGTGTCAGAGCGCAGGACCGTTATGC 1080
ATGCGCCACACCCAGTGGATGCGGCAGGACCAATCAGAGGGCGCCGTGCGGAAAGTTCTC 1140
CTTTTATGGAGAGGGGCTGCAGCGGAGCTCTGATAAAACCCTGCAATTTATTGGCGTCC 1200
ATTGCAGTCAAGTTCAGACACTAAATCTACCGGAGTGTAGCGCTCAGTCACAGCCTTCCT 1260
AACGCCGACAACCTCCCTCTAACAGGTAAGACAACCTGCGGAGTGAAGATGAAAGTTTCT 1320
GTCACATTTAAATGCCTTTGTTTTAACACAAGTGTGTGAATATCACAGCCAGGCGCCG 1380
GTTAAGTTATGATGTGGTTTTCTGTGTGACTTCCAAGTTGAAGCAACCGTTACAACCTGC 1440
TAACTGAAATTCAGTAGCCTGTCAATTCATTAACGTTACATGTTTTGACTGGGCACCGTT 1500
ACAGCTTAAGGGATGCTGCCGGTAACCTTTAAGTGTGGCTGTTGTGGCATGCTGTGCG 1560
TTTGTTTTAAAGAGTTGGTGTGAAATAACCCGGCTGCTCCGTGCTGTCACCACTTCATCA 1620
CTTTAACAAATCAGACGGGTTAAAAAAGCTTGACCTTCTCGTTACATGTAAGCATCTG 1680
CTTTGGCACGGTCCCCGGGCTGCTGTCTCCGATTCACACACGGACAGATGATGGCAGA 1740
TTAGACGGATTAaACTTAAAGACTTCACTTAAATTGCGTGGAGACATAAGaAAATGTTG 1800
CAGTGACATTACAGCCATAATGTCATTTGGTGATCAAGTTAACGTTACGTCTGGCAAATG 1860
TCAGAAGTTGCTATTTATCATATAACCTTGAAGTATGAATGATGGTCACGACAAAACCG 1920
TGCATCTGATGACTGACATGATAGTGAATGGAAGTTTATGCACATCGGAACCTGCTGATG 1980
AAATTGTGCGTTAGAGATGTGTGGTTGGTTAATTCAGTGTGTTGATCCCGGTAAGGGA 2040
GTGGCCGGCTGTCGGTGTCAATTTGAGGTTTAAACGGCACACGGGGCGGCTTCACGGGCCG 2100

GTGCCGCCGTCTCTAAGCTGCTCTCACTTTTGCCTTATATGGCCATGGCCAGACCGAGGG 2160
 AGAAACTGCCTTTGTTTCTCAGCTCTGGATTGGGCTGGGACCTGCGCCACTGCGACATC 2220
 CAGCGTCCAGTCTCCATAATGACAAGGCTTTCATCCAGTTGATGTTTGCAGATGTAAC 2280
 CATAACTGTCACAGAGCATCAGTTGTAACCATCCTTCTCTTTTTCATCCTTCTCCTGT 2340
 TCAGAAAATGGATGATGAAAATcGCCGCCCTCGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAA 2400
 AGCTGGCTTTGCAGGAGATGATGCTCCACGTGCTGTGtTCCCCTCCATTGTAGGACGTCC 2460
 CAGACATCAGGTACAGTTTGTGCATAATCTCATATAAAACATTAATACCTAAACTTGCC 2520
 TACCTTTGCTTGATTTAACTCCTGTCTTCTTCCCCAGGGTGTGATGGTGGTATGGG 2580
 CCAGAAGGACAGCTATGTTGGTGTGAGGCACAGAGCAAAGGGGCATCCTGACCCGTAA 2640
 GTACCCCATGAGCACGGTATTGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCA 2700
 CACCTTCTACAACGA 2715

Fig. 26. 넙치의 beta-actin 유전자의 프로모터 영역의 염기서열

GAATTCCTAGTGTAAGTTTATGAGTCTTTGTCCGGTACCCTTATTGAGTTAAAACAGCAC 60
 CCCGAGCCACCCTAGGTCAACTATAAGATGAGCTTTGCAATAGAGTGTAACCGTAAAA 120
 ATAAATATGACGGGTAAACAAGTATTTTCAGGTTAGAGATGTGCAAAGACTCACCTCGTGT 180
 GACTCATTGGGTGTGTGCATGAGCAGGTGTGTACATGCAAAATCAAAGTGAGTCACATTC 240
 CTCCCATGATAATAATTTTCATAACAGGGCTCGTAGTTTAATTTGGACACCAAATTAGTTT 300
 AATTTGGACGCCAAATTAACACTACTAATTAACACTACTGCATCTCATGGAGACGAGCAGGG 360
 GTAATCTGTCCCCTCCACTCACTTAAACATCACAAGTGATGAGAGATATGAGATTTACAG 420
 CCCACTGAGTGTGTTGCTGTAACATACCTCAGCTTGATCCACATGTATCACCGTCACTCT 480
 GCTCTGCATGTGTGTGTGTGTGTGTGAGACTGGCATGCCAGACGTGTCAGGGTGTGA 540
 CAGCGCTGTCAAGTACCCTGAGATTGCAACCACACCATATCCTGGCACTGCTAACCACGA 600
 GTATCTGCCATGAGTAAAGATTTTTTTTTTTTGGCTTTGCAGATGCATTAGCACAGTCTTC 660
 TAATGCAATCCAGCTCTATTGCATTCCTTATGCCTGCACTTAAATTAGATGAATCATG 720
 AATCTGCTTGCTGTGTTCTGCACTTAGATATACCTCCAATGCACAAATAGACAGAATAG 780
 AAAGCAATAGCATGAGCATATTGTTAAATGTGTATTGTGAACCCAGGATATGTAGTCCC 840
 CTTCCCAGTGTGAATGATGTCATGGATTAAGCTTATTTTAGTATAGACAGAATTACATGA 900
 AAATGAGCTCAGAGAATACAAAAAGCACTCATTAAACTTGTTCATGCTCAAGGACTC 960
 AAGCCAGAGTTACGTGACTTGTGCTCACGCGTATCATCAATAATGTTGAAGAAATAT 1020
 ATTTTAAAAAATGTGTTTTATTGAGCGGTGAACGACTCCAGATTGATAATATTGACAGTC 1080
 TATAGGTTAGTTTTCGTGTGCTCGTCCAGTCCCTGTCAGAGCGCAGTAACGTTATCTGC 1140
 ATGCGCCACACCAGTGGATGCCGCAGAACCaATCAGAGGGCGCCGTGCGGAAAGTTCTC 1200
 CTTATATGGAGAGCGGCTGCAGCACGAGCTCCGATAAAACCTGCGATTTATTGGCCTCT 1260

ATTGCAGTCAAGCCCAGACATTAAACCTACCGGAGTGTAGCGCTCAGTCACAGTCTCCT 1320
 AAGCCGAGAACCCTCCCTCATACAGGTAAGACTACTGCGGGACGAGGATGAAAGTTGTTA 1380
 GTCATATTTTGAATGCTTTTTTTTAAAAATAAAGTACCGCAAACGAATTTAGTCCGCC 1440
 GGTAAAGTTATGATGTGAGGTTTCTGTGTGACTTCTCTCAAGTTGAAGCAGCCGTTGGA 1500
 ACTCATTTAAATTCGCTCGGTCACTCGTTATACTTTTTCCGTTATATTACAGTTGGCT 1560
 ACCTGTGCAGGTTATGTGTACATATGTGTTGGCAGCTGTGTCGTTTATATTTAACTAAA 1620
 CAGATAAGTGTGAACATACACCCGGCTGCTCCCGGTTGTCATCGTTCGTCAGTTTTAA 1680
 CAAATCAGACTGCGTTAAACGGCTTGACCTTCTCGCTTACATGTAAGCATCTGCTCCGGC 1740
 ACGGTGTCGCGGTCGCGTCTCCGATTACACACATAGACAGATGATGGCAGATTAGAC 1800
 GGATTCACTTTAAAGACTTAACTGAAATCGCAGGTTAGACGTGTAGAAATGTTAAAAT 1860
 TGCTGTGAAATTACAGCTATTAAGTCATTTGGCAATCAAGTTACATGTAAGCAGCGAAT 1920
 GTCTGTAGAAAGTTGGCTTTTTTCCCCCTCATAACTATGGTGGTCACGACATAACGGTA 1980
 GCCTACACCTGATGACTGACATGACAGGGGATGGGAGTTCATTACCTCAACTGTAAAAA 2040
 CGGCTGTTTTTAAAGTGTACACTCGCGATGTGTGGATGAGTAATTCAGTTGTGATGATT 2100
 CCGGTGAAGGGAGTGGCCCTCTGTCGGTGTCAATTTGAGGTTAACGACACACGGGGCGGC 2160
 TTCACGGGCCGCGTCCCGCCCTCTAAAGCTGCTCTCACTTTTGCCTTATATGGCCATC 2220
 GCCAGACCGAGGGAGAAACTGCCTTTGTTCCAGCTCTGGATTTGGACTGGAACCTGCG 2280
 CCACTGCGACATCCAGCGTCCAGTCTCCATAATGACAAGGCTTTTAACCCAGCTGATGTT 2340
 TGCCAGATGTAACCCATAGCTGTCACAGAGCATCCGTTTTAAATATTATCCCTCCTCTCC 2400
 CTCTCTGTCCAGAAAATGGAAGACGAAATTGCCGCCCTGTTGTTGACAACGGATCCGGT 2460
 ATGTGCAAAGCTGGCTTTGCGAGAGATGATGCTCCACGTGCTGTGTTCCCTCCATTGTT 2520
 GGACGTCCCAGACATCAGGTACAATCTCCTTCCAATATTATATAAGTCATAAACTAACAA 2580
 AGCTTGAAAAACTATTCTACAGTTCTGTATTAAGTTTTCTGTTTGCAGGGTGT 2640
 GATGGTTGGTATGGCCAGAAAGACAGCTATGTTGGTGTGAGGCACAGAGCAAAGGGG 2700
 TATCCTGACCTGAAGTACCCATTGAGCACGGTATCGTACCACAACTGGGATGACATGGA 2760
 GAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAAG

Fig. 27. 능성어 beta-actin DNA 염기서열

GAATTCTACTGTAAGTTTATGAGTCTTTGTCGGTGCCCTTATTGAGTTAAACAGCACC 60
 CTGACACACCCACTTACGCTCTGGTCAACTTACAGTATGAGATGAGCTTTGCATGATGA 120
 CTTCCAAGTGTATATCATAAAAGAAAAATCTAAACATGTAATACAGGTTAGAGATGC 180
 ACCATCCCTGTGTGCATACTTGGGTGTCTATGAGCAGGTGTATATGCATATCAGCGT 240
 GAGTCACATTCCTGAATAGTAATTTTATTTTCCAGCACCATAATAGGTATGTTCCGGAGAG 300
 TGCACACCTGTCTATTACATCACTAAAGCAAGCAAGATAAACCTGCACCCTCCACTCACT 360

TAAGCATTACAGGCGATGAGAGATAAGAGATTTACGCCCTCCTAAGTGTGGTGTAAAT 420
 ATACCTCAGCTTGACCACATGTATCACTGTCGCTCTGATCTGCATGTGTGTGTGTGTG 480
 TATGTGTGAGACACTGGTATGCCAGGCAGACGTGTTAATCAGGGTGTAAACAGTGTGT 540
 CAGTGACCCACAGTCTGGTACTACTGACCACGAGTGTCTGCCATGAATTTGCAAATGCA 600
 TCAGCAGAGTCTCAGTGCAGTCCFTTGCATTCCCTCATATCCTTCACTTGCATTAGATG 660
 AATCACGGATCTGTTTGTCTGCACTTTCCACCAATGCACAGAAGACAATAGCATGGGT 720
 TATGATTCAAATGAGACTTTGTGTAATCAGGATGTGTAAGCCCCCTTCCAATGTGCATG 780
 ATGTCATTGATTAATATTATAACAGTGGAGACAGTTCAGTAGAAAATAACATAAAAGCAC 840
 ATATTTCAACTTGTTCACACTCAAGGACTCTGCTGTGGGTTTTGCAGCTGTGATTTGTT 900
 GCCCATGTGTGTATCACCCACATTGAGATCATAATAATGATGAAGAAGGATATAAAAAT 960
 GTGTTTTATTGAACACTGATCGACCCAGATTGGTAGTATTGATAGTATATAGGTTAGTT 1020
 TCGGTGCTGCTTGTCCCCCTGTCTTGTGAGAGCGCAGGACCGTTATGCATGCGCCACAC 1080
 CCAGTGGATGCGGCAGGACCAATCAGAGGGCGCCGTGCGGAAAGTTCTCTTTTATGGAG 1140
 AGGGGCTGCAGCGCAGCTCTGATAAaACCCTGCAATTTATTGGCGTCCATTGCAGTCAA 1200
 GTTCAGACACTAAATCCTACCGGAGTGTAGCGCTCAGTCACAGCCTTCTAACGCCGACA 1260
 ACCCTCCCTCAAACAGGTAAGACAACCTGCGGCAGGAAGATGAAAGTTTCTGTCACATTT 1320
 AAATGCCTTTGTTTTAACACAAGTGTGTATTATCACAGCCAGGCGCCGGTTAAGTTAC 1380
 AAAGTGGGGTTTTCTGTGTGACTTCCAAGTTGCAGCAACCGTTTCACTGCTAACTGAAA 1440
 TTCACGTAGCTGTCAATCATTACATGTCTTTGAATGGGCACCGTTAAAGTTTAAAGGGGA 1500
 TGCTGCCGGTAACCTTTAACGCCTCTAAGTGTGGCTGTTTGTGCGCATGCTGTCGTTTGT 1560
 ATTAAGAGCTGGTGTGAATAAACC GGCTGCTCCGTGCTGTACC ACTTCATCACTTAA 1620
 ACAAAATCAGACGGCGTTAAAAAAGCTTGACCTTCTCGCTTACATGTAAGCATCTGCTTTG 1680
 GCACGGTCCCCGGTCTGCTGTCTCCGATTCACACACGACGGATGATGGCAGATTATA 1740
 CGGATTGAATTTAAAGACTTCACTTAAATTGCGTGGAGACATAAAAAAAGGTTGCAGT 1800
 GACATTACAGCCACAATGTCAATTTGATGATCAAGTTAACGTTACGTCTGGCAAATGTCAG 1860
 AAGTTGCTATTTATCATATAACCTTGTAGGTATGAATGATGGTCACGACAAAACCTGCATC 1920
 TGATGTGCTGACATGATAGTGAATGGAAGTTTATGCACATCAAACCTGCTGTATGAGATT 1980
 GTGCGTTAGAGATGTGTGGTTGGTTAATTCAGTGTGGTATCCCGGTAAGGAGTGGC 2040
 CGGCTGTGGTGTCAATTTGAGGTTAACGACACACGGGGCGGCTTACGGGCCGCGTGCC 2100
 GCCGTCTCTAAGCTGCTCTCACTTTTGCCCTTATATGGCCATGGCCAGACCGAGGGAGAAA 2160
 CTGCCCTTGTCTCAGCTCTGGATTTGGGCTGGGACCTGCGCCACTGCGACATCCAGCG 2220
 TCCAGTCTCCATAATGACAAGGCTTTCATCCAGCTGATGTTTGGCAGATGTAACCTATAA 2280
 CTGTACAGAGCATCAGTTGTAACCATGCTTCCCTTTTTTTCATCCTCCTCTTGCTCAG 2340
 AAAATGGATGATGAAATCGCCGCCCTCGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCT 2400
 GGCTTTGCAGGAGATGATGCTCCACGTGCTGTGTTCCCTCCATTGTTGGAGTCCCAGA 2460
 CATCAGGTACAGTTTGTGAGAATGTGATACCAAACATTAATACCTAAACTGTTCTACA 2520
 TTTGCTTGATTTAACCTCCTGTCATCTTCCCTAGGGTGTGGTGGTGGTATGGGCCAG 2580

AAGGACAGCTATGTCGGTGATGAGGCACAGAGCAAAAGGGGCATCCTAACCCCTGAAGTAC 2640
 CCCATTGAGCACGGTATTGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACC 2700
 TTCTACAA 2708

Fig. 28. 돌돔의 beta-actin DNA 염기서열

GAATTCCTACTGTAAGTTTATGAGTCTTTGTCGGTGCCCTTATTGAGTTAAAACAGCAC 60
 CCTGACACACCCACTTAAGTCTCTGGTCAACTTACAGTATGAGATGAGCTTTGCATGATG 120
 ACTTCCAAGTGTGTATCATAAAAGAAAAAATCTAAACCTCTAATACAGGTTAGAGATG 180
 CACCATCCCTGTGTGCATACCTTGGGTGTGTCTATGAGCAGGTGTATATGCATATCAGCA 240
 TGAGTCACATTCCTGAATAGTAATTTCAATTCAGCACCAAATATAGGTATGTTCCGGAGA 300
 GTGCACACCTGTCTATTACATCACTAAAGCAAGCAAGGTTAACCTGCACCCCTCCACTCAC 360
 TTAAGCATTACAAGCGATGAGAGATAAGAGATTTACACCCCTCTAAGTGTGGCTGTAAA 420
 CATACTCAGCTTGACCACATGTATCACTGCCGCTCTGATCTGCATGTGTGTGTGTGA 480
 GACACTGGTATGCCAGGCAGACGTGTTAATCAGGGTGTAAACAGCGCTGTCAGTGACCCC 540
 ACGTCTGGCACTACTGACCACGAGTGTGCCATGAATTTGCAAATGCGTTACGACAGT 600
 CTTCAGTGCAGTCTTTGCATTCCCTCAAATCCTTCACTTAAACTAGATGAATCACGGAT 660
 CTGTTTGTCTGCACCTTTCCACCAATGCACAAATATAGAGCAGAAGACAATAGCTCGCGT 720
 ATATGAATCAAATGAGACTTTGTGTAAATCAGGATGTGTAAGCCCCCTTCCCAATGTGCAT 780
 GATGTCATGGATTAATACTATAACAGTGGAGACAGTTCAGTAGAAAATAACATAAAGCAC 840
 ATTTCAACTTGTTCACACTCAAGGATTCTGCTGGGTGTTTTGCAGCTGTGATTGGTTGC 900
 GCATGTGTATATACCCACATTGAGATCTAATAATGATGAAGAAGGATATAAAAATGTGT 960
 TTTATTGAACACTGAACCCAGATTGGTAGTATTGATAGTATATAGGTTAGTTTTGGTGC 1020
 TGCTTGTCCCCCTGTCTTGTGAGAGCAGGACGGTTATGCATGCCACACCCAGTGG 1080
 AAGCGGCAGGACC_aTCAGAGGGCGCGTGCAGAAAGTTCTCCTTTTATGGAGAGGGGCT 1140
 GCAGCGCGAGCTCTGATAAAACCCCTGCAATTTATTGGCGTCCATTGCAGTCAAGTTCAGA 1200
 CACGAAATCCTACCGGAGTGTAGCGCTCAGTCACAGCCTTCCTAACGCCGACAACCCCTCC 1260
 CCCTTACAGGTAAGACAACCTGCGGTGCGAAGATCAAAGTTTCTGTCACATTTAAATACC 1320
 TTTGTTTTAACACAAGTGTGTGAATATCACAG_ccTGGCGC_cGGTTAAGTTCGATGTGGG 1380
 GTTTTCTGTGTGACTTCCAAGTTGCAGCAGC_cGTTACAACCTGCAACTGAAATTCACGTAG 1440
_cCTGTCATTCAATTACATGTCTTTGAATGGGCACCGTTAAAGTTTAAGGGGATGCTGCCGG 1500
 TAATATTTAACGCCTTTAAGTGTGGCTGTTTGTGGCATGCTGTGCTTTGTATTAAGAG 1560
 CTGGTGTGAAATAACCCGGCTGCTCCGTGCTGTACCACCTTCACCACTGAAACAAATCAG 1620
 ACGGCGTTAAAAAAGCTTGACCTTCTCGCTTACATATAAGCATCTGCTTTGGCGGGTCC 1680
 CCGGGTCTGCTGTCTCCGATTTACACACCGGACAGATGATGGCAGATTAGACGGATTAAA 1740

CTTAAAAGACTTCACTAAATGCATGGAGACATAAGAAAAGGTTGCGTTGACATTACAGCC 1800
 ACAATGTCATTTGGTGATCAAGTTAACGTTACGTCTAGCAAATGTCAGAAGTTGTATT 1860
 ATCATGTAACCTTGTAGGTATGAATAATGGTCACGACAAAAGTGTGCATCTGATGGCTGA 1920
 CATGATAGTGAATGGAAGTTTATGCACATCAAAAGTGTGTATGAAATTGTGCGTTAGAG 1980
 ATGCGTGGTTGGTTAATTCAGTGATGGTGATCCCGGTAAGGGAGTGGCCGGCTGTCGGT 2040
 GTCATTTGAGGTTAACGACACACGGGGCGGCTTCACGGGCCGCGTGCCGCCGTCTCTAA 2100
 GCTGCTCTCACTTTTGCCTTATATGGCCATGGCCAGACCGAGGGAGAAAGTGCCTTTGTT 2160
 TCTCAGCTCTGGATTTGGGCTGGGACCTGCCACTGCGACATCCAGCGTCCAGTCTCCA 2220
 TAATGACAAGGCTTTCATCCAGTTGATGTTTCCAGATGTAAGTCTGTAAGTGTACAGAG 2280
 CATCAGTTGTAACCATCCTTCCTCTTTTTTTCATCCTTCCTCCTGCTCAGAAAATGGATGA 2340
 TGAAATCGCCGCCCTCGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGTGGCTTTGCAGG 2400
 AGATGATGCTCCACGTGCTGTGTTCCCTCCATTGTTGGACGTCCAGACATCAGGTACA 2460
 GTTGTGCAGAATATCATATCAACATTAATACCTAAAGTGTCTACATTTGTCTTGAT 2520
 TTTAACCTTCTGTCTTCTCCCTAGGGTGTGATGGTGGTATGGGCCAGAAGGACAGCTA 2580
 TGTGCGTGATGAGGCACAGAGCAAAAGGGGCATCCTGACCCTGAAGTACCCATTGAGCA 2640
 CGGTATTGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCA 2682

Fig. 29. 붉바리의 베타액틴

AAGCTTATAGAGATGGAATCATTAAAAGCAGCCACTAGAAGGATAATATTCAGTGGG 60
 AATAAACTGAATAAATACATATAAAGGATGCCACTCAGAAAGGAAAAGCAAGTGGCAAAG 120
 TAAGACAAGCAGATGTATCTGTGGTGTGGTTAAAAGGGGAAGTTGCTCAACAGTTGA 180
 GAGGAAACTCGGGTGTGAAAATGGTTCACCTTATAGTTAGATTTGGAACATTTTGGTGTT 240
 GTCATCGTCTCATTTTGAAGATGTGAGCAGAATAAAGTAGTATTTAACAATATTAGACA 300
 GTGGTATAAGGGTTTCTGTATGGTTGAACTGCAGCTGAAAGCACAACAGATAGTGCTCT 360
 TCCACACTTCCATTGTGTTAATTTAATATAATCTGAAAAACTTGCTTGTTTTAACACCT 420
 GCATGTGCAATGCTGCAGGCAATGCAATCTAAATATGATGACTGCCATATCTGTGACTGA 480
 AAACCAGACACATACAGCACAAGAGCTTGATCAATAAGGGAGTCTTAGCAGCTGAGGAGT 540
 GCAGAGAAGCGATGGCCTACATATGTGGTCATTCCCAGCCCTGCCAGGGAATCTTGTT 600
 GTGTCATATGATTGACCTGGTGATGAACTGGCTGTGAGCCACAGTGAAGTTTTTGCAAAT 660
 CGAATGCTTACATCTGCATCGCTCTGACATCGTTGATATAAAGTGAAGAAGAGGGCA 720
 GCCATTGACTAGCAGCCTTGGTGGAGTCTGTACAGGGAGGGTCCCGAGTACAAAATCTCT 780
 TCCGTTAACACTTAAGTATGACTGAAGTCTTGGTGGCAGGTGCAGGGGCTGTTTGAAGA 840
 AAGTCCCGGCATCCTGTAATTGCTAAaTCAaCCGATTAGCaAACTATTATCTTATTAGA 900
 CCTCGTGGCATTACCCACGTTCTTTTTATTTCTTCAGTTCTTTGCTATTATCGCCGCTC 960

ATTCTCAACCTCTCTCTCCCTCTCTCTCTCTCCCTCAAATCGCTAGCCCCAGTGC 1020
 AGCAGTGTGCACGCGACGTGCCCTGGTGCATGACGCTGGACCAATCAGAAGGCACGATTC 1080
 CGAAAGTTTACCTTTTATGGCTCGAGCCGGGCAGCTGACCTAGTATAAAAGACAAGCGCC 1140
 CACAATCCATAGACTCACTCGGAGCGTCTGCACACGACGCTGTGCCGGATATCATTGGCC 1200
 TGTAAaCCGGTTTTCTTAAGCGAAAACCCCCACCCAAAGGTAAGGCTATGGAGACGTTT 1260
 ACAAATGCTTAACATTAGAACGATGTTTACTACGTAAGTGGTACGTGGCAATTTGTTTT 1320
 TCATAGTTTTTACGAAATTTGGCACCGGACACGAGTTCTTTGTTAATCACTGACACTA 1380
 AACGAAGTTCTTTACCCTAATGTTTAAAAATGTTGTACAACGTATTTTGAGGCGTCTAC 1440
 AGTAATTAATCGGGCGTATTCGCTGGCCGAGGTGCTTTCCGATGCAGCCGGCTTTTGTC 1500
 TCATGCGATGGAAATAACGGTTTTACGGGTTTTGATAAGTCATGACTTATGTGCCGATTC 1560
 TGACTAGCTTGCCCGGTATGATTCaAACGATGTGGAGTTAGATGATTTAGGTTCCGGC 1620
 TGCTCCCTTTGTGCGACTGCGACGGGGTGTGACCTACTTTAGTTAGCACGTTAGCCTAGC 1680
 CGCACTATGCTAACACCGCCCTACACGCCATGCA tTTTTGAAAACCTGCCTGTGGTTCAC 1740
 GGTCGTAGGAAATCTCGTAGGTAaCTCAAAATTTACATATTGGACTTGTATACGATTTT 1800
 TTTTGTCTTCGCTCTATTCAACGTGCCGTTACATAAAGGGCAATTTATGAATGACGA 1860
 TCAGTCTGGCGAAAGGCGTGGCTTTCCGGAAATTAAGATCAGTCTGGAACCTTGACCCA 1920
 TTCATGAATCGGCATGAGTAATGACGCAACCCCCATTAAGGGCTCAGTAATCAGCCCGA 1980
 GTTAAAGGATATTAAGCGAGCCGTCTGTGACGCAGCTAAATTTAAGTTGCGCGTGATTCA 2040
 TTGTAAGCATAAAGACGTGAGTAGGGGGAGGAAGCTAGGGACGACAAGGAAGTCTGG 2100
 CTTGTGAAGTAGAGGGAGTGGTCGCTCAGCTCTGGGCCGTTAACGCGTAAGTCCGTTAT 2160
 GGATGTTCTTGGCAGCCGCATGGCGCCGTAGCCGCAAAGCTGCTCGAAAACGAAGCAT 2220
 GTCCATATATGGTAACGATGGGATGCGGCCCATTTTCTTTTGTCTGAGTCGGAATGTTG 2280
 GGTAACGGCGCCCCCTGTCTGCGGTTACGTCGACCTGCAGTCTGATCAAAGAGTGAGCTC 2340
 ATCGAAGCGGATGCTGGAAGGAGATCTGATACTTTAACGTTTTTCTCCCCCTCCCTTT 2400
 TCCTGCAGTTGAGCCATGGAAGATGAAATCGCCGCACTCGTTG tTGACAT tGGATCCGGT 2460
 ATGTGCAAAGCCGGATTGCTGGAGACGACGCCCTCGTGTCTTCCCCTCCATCGTT 2520
 GGTGCCCCAGGCATCAGGTAACCTATTTCTATGGCATTAACTGATACTTTCATTAAT 2580
 GGTCTTGAATATAGTTAACCCATTTATTTATTTGTGTTTCAGGGTGTGATGGTGGGTAT 2640
 GGGCCAGAAAGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCCAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCT 2700
 CAAGTACCCAATTGAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAGTCTGGCATC 2760
 ACACCTTCTACAACGA 2776

Fig. 30. 자바리의 베타액틴 유전자 프로모터 영역의 염기서열

다. Insulin-like growth factor (IGF-1) 유전자 분리

(1) 자주복 IGF-I의 염기서열

ATGTCTAGCGCTCTTTCTTTTCAGTGGCATTATGTGATGTCTTCAAGAGTGCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGCCACACCCTCTCACTACTGCTGT
GCGTCCTCGCCCTGACTCCGACGGCAACAGGGGCGGGCCAGAGACCCTGTGCGGGCGGAGCTGGTCGACACGCTGCAGTTTGTGTGGAGAGAG
AGGCTTTTATTTTCAGTAAACCAACAGGTTATGGCCCCAATGCACGGCGGTACAGTGGCATTGTGGACGAATGCTGCTTCCAAAGCTGTGAGCTGCGG
CGCCTGGAGATGTAAGTGTGCACCTGCCAAGACTAGCAAGGCTGCTCGCTCTGTGCGTGCACAGCGCCACACAGACATGCCGAGAGCACCCAAGGTTA
GTACCGCAGGGCACAAGTGGACAAGGGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCAGCCAGACATGACAAAAACAAGAAGAGACCTTTACCTGGACATAG
TCATTCATCCTTCAAGGAAGTGCATCAGAAAACTCAAGTCGAGGCAACACGGGGGCAGAACTACAGAATGTA

(2) 능성어 IGF-I의 염기서열

ATGTCTAGCGCTCTTTCTTTTCAGTGGCATTATGTGATGTCTTCAAGAGTGCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGCCACACCCTCTCACTACTGCTGT
GCGTCCTCACCCTGACTCCGACGGCAACAGGGGCGGGCCAGAGACCCTGTGCGGGCGGAGCTGGTCGACACGCTGCAGTTTGTGTGGAGAGAG
AGGCTTTTATTTTCAGTAAACCAACAGGTTATGGCCCCAATGCACGGCGGTACAGTGGCATTGTGGACGAATGCTGCTTCCAAAGCTGTGAGCTGCGG
CGCCTGGAGATGTAAGTGTGCACCTGTCAAGACTAGCAAGGCTGCTCGCTCTGTGCGTGCACAGCGCCACACAGACATGCCGAGAGCACCCAAGGTTA
GTACCGCAGGGCACAAGTGGACAAGGGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCAGCCAGACAAGACAAGAGAGACCTTTACCTGGACATAG
TCATTCATCCTTCAAGGAAGTGCATCAGAAAACTCAAGTCGAGGCAACACGGGGGCAGAACTACAGAATGTA

(3) 북바리 IGF-I의 염기서열

ATGTCTAGCGCTCTTTCTTTTCAGTGGCATTATGTGATGTCTTCAAGAGTGCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGCCACACCCTCTCACTACTGCTGT
GCGTCCTCACCCTGACTCCGACGGCAACAGGGGCGGGCCAGAGACCCTGTGCGGGCGGAGCTGGTCGACACGCTGCAGTTTGTGTGGAGAGAG
AGGCTTTTATTTTCAGTAAACCAACAGGTTATGGCCCCGATGCACGGCGGTACAGTGGCATTGTGGACGAATGCTGCTTCCAAAGCTGTGAGCTGCGG
CGCCTGGAGATGTAAGTGTGCACCTGTCAAGACTAGCAAGGCTGCTCGCTCTGTGCGTGCACAGCGCCACACAGACATGCCGAGAGCACCCAAGGTTA
GTACCGCAGGGCACAAGTGGACAAGGGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCAGCCAGACAAGACAAGAGAGACCTTTACCTGGACATAG
TCACTCATCCTTCAAGGAAGTGCATCAGAAAACTCAAGTCGAGGCAACACAGGGGGCAGAACTACAGAATGTA

(4) 돌돔 IGF-I의 염기서열

ATGTCTAGCGCTCTTTCTTTTCAGTGGCATTATGTGATGTCTTCAAGAGTGCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGCCACACCCTCTCACTACTGCTGT
GCGTCCTCACCCCTGACTCCGACGGCAACAGGGGCGGGCCAGAGACCCTGTGCGGGGCGGAGCTGGTCGACACGCTGCAGTTTGTGTGGAGAGAG
AGGCITTTATTTTCAGTAAACCAACAGGCTATGGCCCCAATGCACGGCGGTACGTGGCATTGTGGACGAGTGTGCTTCCAAAGCTGTGAGCTGCGG
CGCCTGGAGATGTAAGTGTGACCTGCCAAGACTAGCAAGGCTGCTCGCTCTGTGCGTGCACAGCGCCACACAGACATGCCGAGAGCACCTAAGGTTA
GTAAGTGCAGGGCACAAAGTGGACAAGGGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCAGCCAGACAAGACAAAAACAAGAAGAGACCTTTACCTGGACATAG
TCATTCTTCAAGGAAGTGCATCAGAAAACTCAAGTCGAGGCAACACGGGGGCGAGAACTACAGAATGTAG

(5) 자바리 IGF-I의 염기서열

ATGTCTAGCGCTCTTTCTTTTCAGTGGCATTATGTGATGTCTTCAAGAGTGCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGCCACACCCTCTCACTACTGCTGT
GCGTCCTCGCCCTGACTCCGACGGCAACAGGGGCGGGCCAGAGACCCTGTGCGGGGCGGAGCTGGTCGACACGCTGCAGTTTGTGTGGAGAGAG
AGGCITTTATTTTCAGTAAACCAACAGGTTATGGCCCCAATGCACGGCGGTACGTGGCATTGTGGACGAATGTGCTTCCAAAGCTGTGAGCTGCGG
CGCCTGGAGATGTAAGTGTGACCTGCCAAGACTAGCAAGGCTGCTCGCTCTGTGCGTGCACAGCGCCACACAGACATGCCGAGAGCACCCAAGGTTA
GTACCGCAGGGCACAAAGTGGACAAGGGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCACCCAGACAAGACAAAAACAAGAAGAGACCTTTACCTGGACATAG
TCATTCTTCAAGGAAGTGCATCAGAAAACTCAAGTCGAGGCAACACGGGGGCGAGAACTACAGAATGTAG

라. Natural killer cell enhancement factor (NKEF) 유전자 분리

```
gtgcgctgcatcaaggcaaagagaactttctcgtccacacagaacagtaccaacaagcaagcttcaagATGTCTGCTGGAAACGCTAAGATCGGTC
AGCCTGCTCCTCAGTTCAAGGCCACAGCAGTGGTAGATGGACAGTTTAAAGACATTCAGCTCTCAGACTACAGAGGGAAGTATGTTGTGTTT
CTATCCCCTTGATTTACACCTTTGTGTGTCCCACCGAGATCATTGCGTTCAGCGAGCGGGCAGCTGAGTTTCGTA AAATCGGTGTGGAGCTCATCGCT
GCCTCCACAGACTCTCATTTCAGCCATCTAGCATGGATCAACACACCACGGAAGCAGGGTGGCCTTGGCTCCATGAACATCCCGCTGGTGGCCGACC
TGACGCAGTCCATCTCCCGTGATTACGGAGTTCTGAAGGAGGACGAGGGCATCGCCTACAGAGGTCTGTTTGTGATTGACGATAAGGGCATCTTGAG
GCAGATCACCATCAATGACCTGCCGGTGGTGCATCTGTGGACGAGACTCTTCGACTGGTGCAGGCCTTCCAGCACACCACAAAATACGGAGAAGTT
TGTCTGCTGGATGGAAGCCAGGAAGTGACACCATTGTTCCCAGCGTGCAGAAGAGCAAGGAGTTTTTCTCCAAGCAGTAAcagctctctatttctgc
attcgctgggctgttgaagcacttaaatcagcctgaggggcttagaaaagttgatttagccatcgtacaacacaggttaaatgcactagttag
tctgatttctgtctgtctgaagaagctgttccagccagcgtctctcatgcactgaataatctgagtttggtgtcagctagttagctctgcatgcat
at ttggctactctgtaacatagctggttttaaatctctcaagttgttggcttctggtgatttgcaataatctctgttaataaacaggctgttat
tgctaaaaaaaa
```

Fig. 31. Zebrafish NKEF 유전자의 cDNA 염기서열.

마. 내병성관련 유전자인 zebrafish의 transferrin 유전자 분리

Zebrafish 한 개체를 액체질소로 급속 동결한 후 막자사발을 사용하여 분쇄하였다. 전체 mRNA는 IGF-I mRNA 분리와 같은 방법으로 mRNA를 분리하고 single strand cDNA를 합성하였다. 이미 밝혀진 zebrafish의 partial sequence를 바탕으로 5'과 3'에 맞는 sense와 antisense primer를 제작하여 PCR한 결과 약 1500 bp 길이의 DNA 단편을 얻을 수 있었다. 이 단편을 pBluescript SK(-)에 cloning하여 sequencing하였다. 확인된 염기서열을 밝혀진 transferrin 유전자와 비교한 결과 무지개송어, 넙치, 산천어와 각각 58, 53, 60%의 identity를 나타내었다.

ctgccagaatcgctggtgaagcccagatgaaggtcctgctcatctcttctgctgggatgctggttggcactgccatcagccagcgcttaa
aagaaagtcaaatggtgtgtgacaacacaaaatgagcagagcaaatgcaggcatctcgccaccaaagcagcagacattgagtgtcatctcc
aaccactgtcattgactgcatgaggagcatagcggctggtggaacggatattgttacagtagatggagcaaatgtttcactggtggacta
aataattatctgctccgtccaatcattgcagagaaaaaaagaatgctgttatgctgtggctgcagtaaaggctggctctgcttcaatatcaa
tgagcttaaaggaagagttcctgtcacagctgttatcagaggtctggaggtggaataactcctattggaaaactgattgcaaccaataagat
tacatgggagggtcctaagagATGCCTGTCGAGAGGGGCTGTGTCAGAATTCTTCTCGAGCAGTTGT
GTCCCTGGTGTATCTAAACCCAAATACCCAAACCTGTGCAAAGCCTGTCAGGGTACTGC
AGCTGCTCACACAACGAGAAGTACTTCGGTGTATGACGGAGCCTTCCAGTGCCTGAAAAAT
GATAATGGACAGGTTGCATTTGTTTGCCACCATGCAATCCCAGAGAGTGAGAGGCAGAA
CTACGAGCTGTTGTGCATGGACGGCAGCAGGAAAAGTGTGGAGGATTATAAGACATGCA
ACTTCGCCAGAGAGCCTGCCCGCACTGTCATTGCTCGCACCGATACTGATTTACAATATG
TTTATGATGTCCTGAAGCAGATTCCGGCCTCAGATCTTTTCTCTTCTCAAGCTTTTGGT
GGTAAAGACCTGATTTTCTCAGACTCTGCGACTGAGCTGATGCTGCTTCTAAAAGAAC
AGACTCCCTCCTCTACCTGAAGGAAGAATATTAATGAGGCCATGCAAGCCTTTAAAGATG
GGAACCCGTCAGCACCTACAAGTCAAATAAATTGGCCATGTGTACCATTGGCCATGCAG
AGAAAAATAAGTGTGACAGTTTGGATCATGTTAAGAAGTCGTGCATTTTGGAAAGCATC
TGTGGATGATTGCATCGAGAAAATCAAGCGCAAAGAAGCAGATTTCTTAGCAGTTGATG
GTGGCCAGGTGTATATTGCTGGAAAGTGTGGTCTAGTTCCAGTCATGGCTGAACAATCC
AATTCACAAAGCTGCTCTAGTGGTTCAGGAGGGACCGCAAGTACTACGCTGTGGCTGT
TGTGCGTAAGGGCTCAGGTTTAAAGTGAATAACCTAGAAGGAAAGAAGTCCTGCCACA
CTGGCCTGGGTCGCAGTGCTGGTTGGAAAATCCCAGAGTCAGCCATATGTGGCGAAAAAG
ATAAATGTACCCTTGACAAGTTCTTTAGCGAAGGCTGCGCTCCTGGTGTGACCCTACAT
CAAACATGTGTAAACTGTGTAAAGGCAGTGGGAAGGCTGTTGGAGATGAAAGCAAATGC
AAACCCTCTGCTGAGGAGCAGTATTATGGCTATGATGGGGCTTTCAGGTGTCTTGCAGA
AAAAGCTGGTGTGTTGCTTTTATTAAGCACACTGTGGTTCGGGGACTACACAGATGGTA
AAGGAAAGGACTGGGCAAAGGATTTAAAGTCAGAGGATTTTGAACCTATTTGTCCAAAC
ACACCAGACACAACAATGAAATACACTGACTTTGAAAAGTGTAAACCTTGCCCAAGTGCC
AGTTCATGCTGTGATTACCCGGGAAGATGCGCGCAGTGCTGTGGTGTCTTTTTGTCTGA
CATTCAAAGCAAAAATAATGACCTTTTCACCTCCAAAGATGGGAAAAATCTCCTTTTCA
CTGATGGCACTAAATGCCTTCAAGAGATAAAAGGATCTGTGGATGATTTCTGACGAAA
AAGTACATCGATATGATTGAGAGGACCTACAAGACTAGCCAGAATGTACCAGATCTGGT
GAAGGCATGCACTTTGGGCAACTGTATTAGCTCTAGtacctatcttacgggtcatcaaacacatcaaacagtc
atagatgtgatcaggtttctgtttt

Fig. 32. Zebrafish transferrin cDNA 염기서열.

바. 주요 양식대상어종의 transferrin 유전자 단편 분리

주요 양식대상어종의 transferrin 유전자는 간에서 추출한 mRNA를 주형으로 cDNA를 합성한 다음 internal primer를 제작하여 PCR 반응을 한 결과 약 100 bp의 DNA 단편을 얻었다. 이 DNA 단편을 cloning vector에 cloning하여 염기서열을 확인하였다. 다음은 5종 어류 transferrin 유전자의 internal sequence의 염기서열을 나타내었다.

(1) 능성어 transferrin internal sequence

AGATCATGCGTAAAGAGGCAGATGCCATAGCGGTGGATGGAGGACAGGTGTACACCGCTGGGAAGT
GTGGTCTGGTCCCTGTCATGGTGGAGCAGTATGATG

(1) 조피볼락 transferrin internal sequence

AGATCATGCGTAAAGAGGCAGATGCCATAGCAGTGGATGGAGGACAGGTGTACACAGCGGGGAAGT
GTGGTCTGGTCCCTGTCATGGTGGAGCAGTATGATG

(3) 돌돔 transferrin internal sequence

AGATCATGCGTAAAGAGGCAGATGCCATAGCAGTGGATGGAGGACAGGTGTACACAGCTGGGAAGTGT
GGTCTGGTCCCTGTCATGGTGGAGCAGTATGATG

(4) 붉바리 transferrin internal sequence

AGATCATGCGTAAAGAGGCAGATGCCATAGCAATGGATGGAGGAGAGGTGTACACCGCTGGGAAGT
GCGGTCTGGTCCCTGTCATGGTGGAGCAGTATGATG

(5) 자주복 transferrin internal sequence

AGATCATGCGTAAAGAGGCAGATGCCATAGCAGTGGACGGAGGACAGGTGTACACGGCCGGGAAGT
GCGGTCTGGTCCCTGTCATGGTGGAGCAGTATGATG

2. 재조합 성장호르몬의 생산

가. 서론

어류양식의 기본적인 전제조건은 최소의 비용으로 단기간 내에 상품크기로 성장을 유도하는 데 있다. 이러한 측면에서 어류의 성장효율을 향상시키기 위한 사료원의 개발, 사료질의 고급화와 더불어 성전환, 3배체 어류의 생산, 그리고 선발육종과 같은 생명공학 기법을 이용하고 있다. 또한 내분비학적 측면의 연구가 시도되어 각종 호르몬 물질이 여러 분야에서 사용되고 있다(Li et al., 1982; Kang and Jang, 1996), 종묘생산에서는 산란용 어미의 성성숙 촉진이나 산란 유발을 위하여 생식선 자극 호르몬이 실용화되고 있고(Suzuki et al., 1988b), 성에 따른 성장 효과를 얻기 위하여 성전환 기법이 효과적으로 이용되고 있다(Jo et al., 1995; Jang et al., 1996). 어류의 성장은 다른 척추동물과 마찬가지로 뇌하수체로부터 분비되는 성장호르몬에 의해 조절되며, 어류의 성장 촉진을 위한 성장호르몬의 사용은 현재 활발한 연구가 진행되고 있다. 연어의 성장호르몬과 같은 어류의 성장호르몬을 다른 어종에 투여한 결과 성장촉진 효과가 입증되었다(Bilton et al., 1982; Kawauchi et al., 1992; Steiny et al., 1984; Suzuki et al., 1988a; Wagner et al., 1985). 이밖에 포유류의 호르몬 중에 돼지의 성장호르몬(Komourdjian et al., 1976) 이나 소의 성장호르몬이 어류의 성장을 촉진시킨다는 것이 많은 연구에 의하여 확인되었다 (Bewely and Li, 1972; Higgs et al., 1975, 1976, 1977, 1978; Leatherland and Nuti, 1981; Market et al., 1977; Danzmann et al., 1990; Santome et al., 1973; Walis, 1973). Komourdjian et al (1976)은 돼지의 성장호르몬(Growth Hormone, GH)을 뇌하수체가 절제된 무지개송어에 투여한 성장을 촉진시켰으며, Gill et al (1985)은 recombinant bivariate growth hormone이 은연어의 유어의 성장촉진에 효과가 있다고 보고하였다. Agellon et al (1988)은 삼투압 쇼크 후에 침지처리에 의해 무지개송어에 recombinant salmon GH를 투여하여 성장이 향상되었다고 보고하였으나, Schulte et al (1989)은 무지개송어에 삼투압자극 없이 recombinant bovine GH 투여 방법을 시도하여 성장 효과를 보았다. Weatherley and Gill (1982)은 무지개송어 치어에 bovine GH를 투여하여 성장 효과를 증명하였다. Cook et al (1983)은 소나 잉어의 성장호르몬을 주사하여 금붕어의 성장률을 32%나 증가시켰다고 보고하였다.

이러한 연구들은 대부분이 연어류와 송어류 등 냉수성 어류에 국한되어 왔을 뿐 해산 어류에 적용된 예는 거의 없다. 해산어류에 있어서 성장호르몬을 적용하여 성장 효과를 알아본 연구로서는 Cavari et al (1993)은 사람, 소, 돼지, 닭의 GH를 가지고 황금머리돔(gilthead seabream, *Sparus aurata*)에 주사한 결과 사람이나 소의 GH에 대해서만 성장이 촉진(15%)되었다고 보고하였으며, 국내에서는 Heo et al (1996)이 양식어류 (무지새송어, 뱀장어, 넙치, 이스라엘 잉어)에 recombinant bovine somatotropin을 투여하여 성장촉진 효과와 독성에 관하여 연구하였다. 이 밖에 Ishioka et al (1992)는 재조합된 참돔의 성장호르몬을 참돔 유어에 주사하여 성장의 증가를 증명하였다.

한편, bovine somatotropin (BST)은 소의 뇌하수체 분비선에 의해 생성되면 191개의 아미노산으로 구성된 단백질계 호르몬이다. BST와 유사한 호르몬은 모든 종류의 동물에서 생성되면, 이 호르몬은 모든 동물의 성장, 발생, 그리고 그 밖의 신체 기능에 매우 중요하다. 1930년대에는 젖소에 BST를 주사하여 우유 생산량의 명백한 증가를 발견하였다. BST 원료는 도축된 소의 뇌하수체에서만 얻을 수 있어 이용할 수 있는 BST양은 매우 적고 비싸다. 최근 첨단 생명공학의 일종인 유전자 재조합 기술 (recombinant DNA technology)의 발달로 대량 생산할 수 있게 됨에 따라 1970년대 말부터 상품으로서 개발이 본격화되었다. 이러한 제품들의 안전성에 대하여 미국 FDA (Food and Drug Administration ; 미 식품의약국)은 BST 투여로 생산된 우유에 대한 일반 시판의 허용 및 인체에 대한 안전성을 공식적으로 승인하였다. 따라서 이러한 재조합 성장호르몬의 산업적인 이용은 점차 증가할 것으로 예상된다.

나. pET expression system을 이용한 돌돔 성장호르몬의 발현 및 분리

(1) pET expression system의 특성

Cloning한 돌돔의 성장호르몬 유전자로부터 재조합 성장호르몬을 생산하기 위하여 pET expression system을 사용하였다. pET expression system은 이제까지 상업적으로 available한 expression vector중에서 단백질을 가장 많이 발현하는 vector중 하나이다. 이 expression vector는 bacteriophage T7 promoter를 가지고 있으며, T7 RNA polymerase를 host cell 내에서 제공하여 줌으로써 promoter의 down stream에 cloning된 target gene의 발현이 유

도되어 진다. T7 RNA polymerase는 T7 promoter에만 선택적으로 붙으며 활성이 매우 높아 대장균 전체 단백질의 약 50%에 해당되는 재조합 단백질을 얻을 수 있다.

pET expression system에는 수십 종류의 vector가 있는데 그중에서 pET-11a와 16b를 사용하였다. pET-16b vector에는 NcoI restriction site에 개시 codon이 있으며 발현되는 재조합 단백질의 아미노 말단에 10개의 연속되는 histidine이 발현되어 단백질의 분리 및 정제가 용이하다. pET-11a vector에는 NdeI restriction site가 translation 개시 codon에 있다. 이 vector를 NdeI restriction 효소로 절단하고 complete cDNA의 coding region을 이 vector에 cloning하여 성장호르몬을 발현하였다.

(2) pET expression vector에 성장호르몬 유전자의 coding sequence cloning

Novagen으로부터 구입한 pET-16b와 pET-11a plasmid를 각각 NcoI과 NdeI 제한효소로 절단한 후 1% agarose gel상에서 절단된 plasmid 단편을 분리하였다. pET16b에 성장호르몬을 cloning은 다음과 같이 하였다. 5'과 3'에 각각 NcoI 제한효소 절단부위를 가진 완전한 coding region DNA fragment를 얻기 위하여 두 개의 primer를 고안하여 PCR reaction하였다. 얻어진 DNA fragment는 NcoI restriction enzyme으로 digestion하였고 절단된 fragment를 DNA purification kit을 이용하여 분리하였다. pET11a에 성장호르몬 유전자를 cloning하는 방법은 pET16b를 cloning 하는 방법과 같다. 다만 NcoI 제한효소대신 NdeI 제한효소를 사용하였다. 제한효소로 자른 pET-16b, pET11a vector와 같은 제한효소로 자른 성장호르몬 단편을 섞은 후 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. Ligation된 vector를 *E. coli* DH5a strain (*recA-*)에 transformation하여 얻은 colony를 ampicillin이 100 ug/ml 들어있는 1.5 ml LB media에 접종하여 키운 후 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 제한효소로 절단한 후 agarose gel 전기영동하여 성장호르몬 유전자가 삽입된 clone을 확인하였고, T7 primer를 사용하여 sequencing하여 clone을 확인하였다.

(3) BL21(DE3) *E. coli* strain에서의 성장호르몬 발현

돌돌 성장호르몬이 삽입된 pET expression vector로부터 단백질을 발현시키기 위해서는 앞에서 설명한 것과 같이 T7 RNA polymerase가 필요하다. T7 RNA polymerase를 안정적으로 또한 원하는 시기에 공급하기 위하여 염색체에 T7 RNA polymerase 유전자를 가진 *E. coli* strain BL21(DE3)을 사용하였다. 이 strain은 bacteriophage λ 의 derivative인 DE3 lysogen

으로서 *lacI*, *lacUV5* promoter 그리고 T7 RNA polymerase 유전자를 가지고 있다. *E. coli*내에서 T7 polymerase의 발현은 *lacUV5* promoter에 의해 조절되며 lactose 유사물질인 IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)에 의해 전사가 유도된다.

Sequencing하여 얻은 clone으로부터 DNA를 추출하여 BL21(DE3) strain에 transformation하였다. Transformation에 의해 생성된 colony를 ampicillin이 100 ug/ml 들어있는 1.5 ml LB에 접종하여 37°C에서 shaking하면서 overnight culture하였다. 다음날 overnight culture를 fresh한 1.5 ml의 LB-ampicilin 배지에 10배 희석시켜 배양하였다. OD₆₅₀가 0.6이 될 때까지 배양한 다음 100 mM의 IPTG를 넣어 final 농도가 0.4 mM이 되게하여 T7 RNA polymerase의 발현을 유도하는 동시에 재조합 성장호르몬의 발현을 유도하였다. 단백질 발현은 30°C shaking incubator에서 3시간동안 지속하였다. 단백질이 발현된 culture를 원심분리하여 cell을 harvest하였다. Harvest된 cell을 50 ul의 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA buffer에 resuspension하였고 50 ul의 2X sample loading buffer를 첨가하여 잘 섞은다음 95°C에서 5분간 반응하여 cell을 완전히 lysis시켰다. Cell lysate 5-10 ul를 12% SDS gel에 전기영동 한 다음 commasie brilliant staining solution으로 staining하여 재조합 성장호르몬의 발현을 확인하였다. Fig. 33은 pET11a, pET16b에 삽입된 돌돔 성장호르몬 유전자의 prepro GH (growth hormone) 와 mature GH의 발현을 나타낸 그림이다.

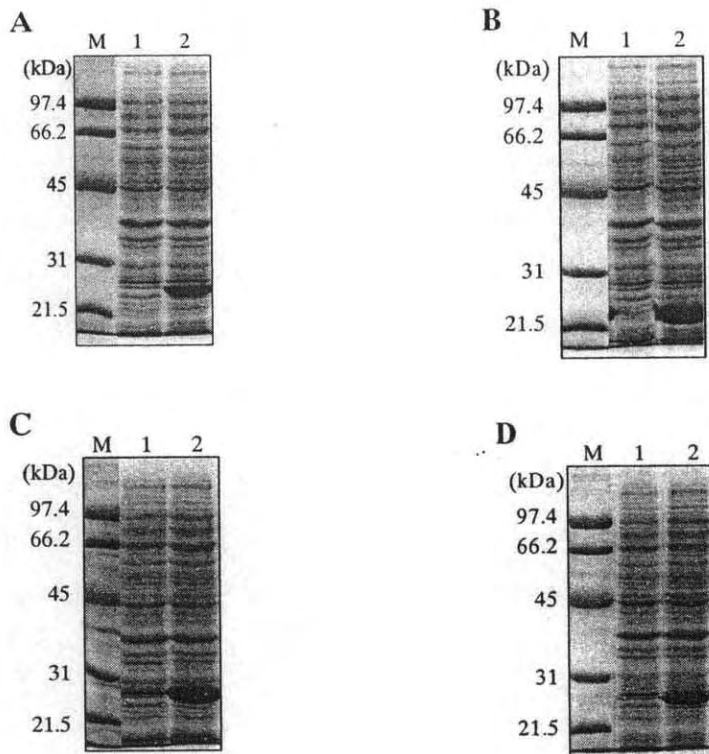


Fig. 33. 돌돔 성장호르몬의 발현 pattern.

(A) pET11a vector를 이용한 돌돔 성장호르몬의 prepro GH 발현 pattern. (B) pET11a vector를 이용한 돌돔 성장호르몬의 mature GH 발현 pattern. (C) pET16b vector를 이용한 돌돔 성장호르몬의 prepro GH 발현 pattern. (D) pET16b vector를 이용한 돌돔 성장호르몬의 mature GH 발현 pattern. 각 그림에서 Lane 1은 protein marker를 나타내며 lane 2는 uninduced cell lysate, lane 3은 induced cell lysate을 나타낸다. pET11a에 삽입된 성장호르몬 유전자의 induction pattern에서 21.5kDa와 31kDa marker 사이의 진한 band가 induced된 성장호르몬이다. pET16b에 cloning된 성장호르몬의 발현은 pET11a에서 발현된 단백질보다 10개의 histidine 만큼 그 size가 크다.

(4) 발현된 성장호르몬의 순수분리

pET-16b vector에 삽입된 성장호르몬 유전자는 단백질이 발현될 때 아미노 말단에 10개의 연속적인 histidine을 가진 fusion 단백질 형태로 생성된다. 이와 같이 10개의 연속되어 발

현되는 peptide를 His·Tag이라고 부르며 이 부분은 2가 양이온을 띠는 금속(Ni^{2+})에 강하게 붙는다. 이와 같은 성질을 이용하여 단백질 분리를 빠르고 용이하게 할 수 있었다. 1 liter의 배지로부터 얻은 발현된 cell을 40 ml binding buffer에 suspension하였다. Suspension된 cell을 100 ml 비이커에 옮긴 후 비이커를 얼음위에 올려 놓은 상태로 sonication하여 cell을 분쇄하였다. Cell lysate를 40,000 x g에서 30분간 원심분리하여 단백질이 녹아있는 상등액(supernatant)과 cell debris로 나눈 후, 상등액으로부터 Ni^{2+} column을 이용하여 단백질을 분리하였다. Binding buffer로 equilibrate되어 있는 Ni^{2+} column에 준비한 상등액을 loading하였고 상등액이 완전히 내려간 후 column 부피의 10배에 해당하는 양의 binding buffer로 column을 세척하였다. 그리고 다시 column의 6배되는 양의 wash buffer로 세척한 후 Ni^{2+} column에 붙어있는 fusion 단백질을 elution buffer로 elution하였다. elution된 단백질을 12% SDS gel 전기영동을 하여 단백질의 순도와 yield를 측정하였다. Fig. 34는 column으로부터 elution된 단백질의 pattern을 보여준다. 분리된 성장호르몬의 약 80%의 순도를 나타내었다. lane 1은 molecular size marker, lane 2는 분리된 단백질의 10 μ l를 SDS-PAGE한 것으로 전체 분리된 돌돌의 성장호르몬은 약 7 mg으로 발현된 단백질의 (150 mg/liter culture) 약 5% 정도이다. 이와 같이 분리된 단백질의 양이 적은 이유는 대부분의 발현된 단백질이 insoluble한 상태인 inclusion body로 존재하기 때문이다.

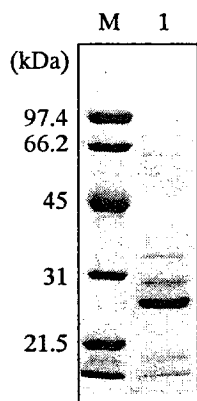


Fig. 34. 분리한 돌돌 mature GH의 SDS-PAGE.

다. 돌돔 재조합 성장호르몬의 급이에 의한 성장효과 검정실험

재조합 성장 호르몬의 생산에 관련한 연구 방법은 연구내용 및 결과 부분에서 같이 기술하고 있으며 분리 재조합 성장호르몬의 성장 효과 검정을 위한 성장 실험 및 성장호르몬의 처리 방법은 다음과 같다.

(1) 실험을 위한 수조 설계 및 제작

시험에 사용된 사육수조는 FRP재질의 기부가 편평한인 3개의 원형수조($\varnothing 190\text{cm} \times$ 깊이 80cm : 약 1.2톤)에 각각 사각형 여과조를 연결하여 필요시 각자 순환할 수 있도록 하고 성장 실험과 같은 동일한 사육조건이 필요할 경우에는 밸브를 사용하여 사육수조 사이에 물이 서로 교환될 수 있도록 설계하였으며 수질유지를 위하여 산소와 오존 반응조를 제작 설치하였다 (Fig. 35). 각 사육수조내의 물교환은 20 l/min .으로 순환시켰으며 각 수조 연결사용시에는 일부 오존 반응조로 유입된 물이 각 여과조로 흘러가도록 되어있어서 사육조건 사육조건을 최대한 동일하도록 하였다. 한편, 반복구를 둔 실험을 위하여 수량 250 리터의 순환여과수조 6개를 제작하여 실험에 사용하고 있다.

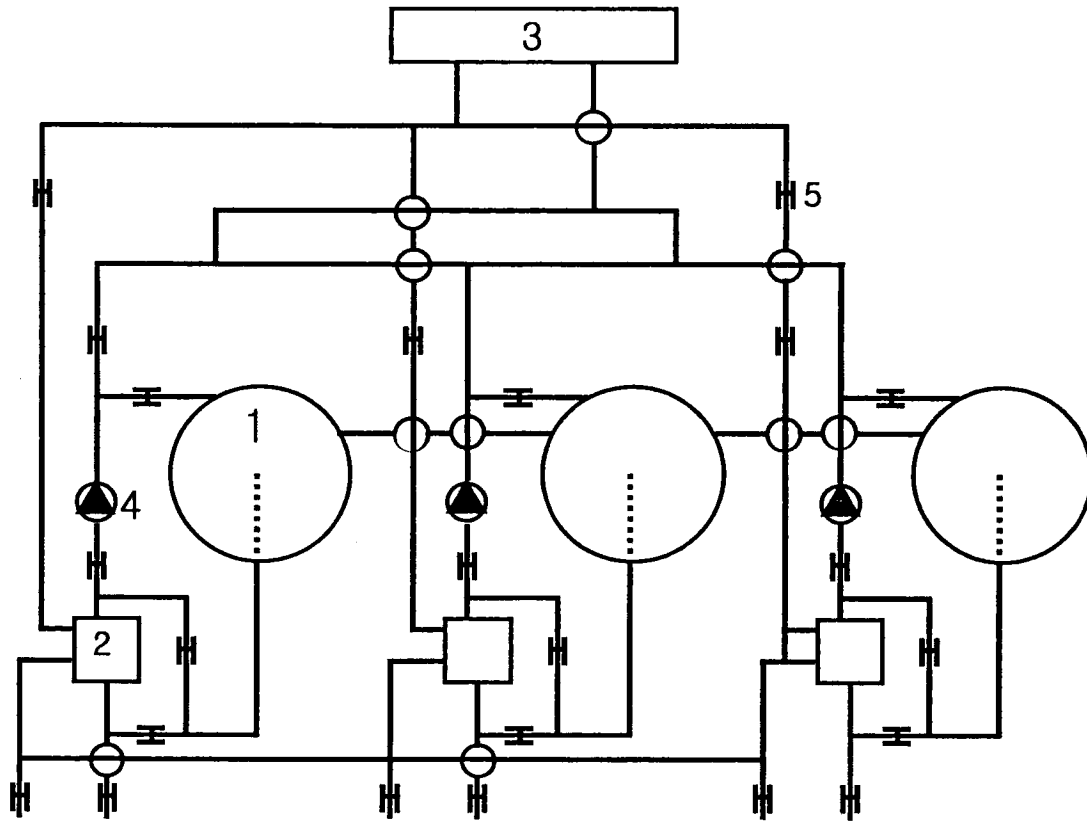


Fig. 35. 성장실험을 위한 순환여과 수조 모형도.

1. 사육수조; 2. 여과조; 3. 오존 및 산소 반응조; 4. 펌프; 5. 밸브

(2) 재조합 성장호르몬의 분리

pET11a 발현백터에 cloning된 돌돔 성장호르몬의 발현을 위해서 E. coli strain BL21(DE3)을 LB-ampicillin broth 5 ml에 접종하여 37°C, 250 rpm으로 배양하였다. 밤새 배양된액을 LB-ampicillin broth 50 ml에 접종하여 3-4시간 동안 다시 배양하였다. 이를 LB-ampicillin broth 1ℓ에 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀ = 0.5가 될 때까지 배양하였다. 여기에 1M IPTG를 최종농도 400 mM이 되도록 400 μl을 가하여 30°C에서 3시간 동안 induction을 하였다. induction된 배양액을 얼음에서 30분간 방치한 후, 4°C 4000 rpm에서 30분간 원심분리하였다.

상층액을 제거하고 cell pellets을 1×PBS 용액에 부유시킨후, 다시 4℃ 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하여 cell pellets을 수집하였다. 여기에 1×PBS을 g당 5 ml씩 첨가하여 cell을 부유시키고, 여기에 lysome을 3 mg/g이 되도록 가하여 얼음에서 10분마다 inverting을 하면서 1시간 동안 lysis을 수행하였다. cell lysate에 1× PBS solution을 20 ml/g이 되도록 첨가하여 ultrasonic homogenizer (Bandelin inc.)를 이용하여 30초씩 6회간 cell을 분쇄시켰다. 분쇄된 cell lysate을 각각 10 ml씩 나누어 -70℃에 보관하였다가 먹이 투여시 녹여서 섭취시켰다. 발현된 성장호르몬의 농도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE을 통하여 농도를 확인하였다.

(3) 굵이에 의한 성장 실험

성장 실험을 위하여 구입한 돌돔은 3월 28일에 부화한 치어로써 이들 중 114미를 무작위로 표본하여 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. 체중은 평균 1.74 g이었으며 구입한 치어 1500미를 제작한 순환여과 수조의 3개의 사육조에 분산 수용하여 사육하기 시작하였다. 먹이는 일일 전체 체중의 약 3% 정도를 하루에 3회(오전 10시, 오후 2시 그리고 오후 6시)로 나누어서 굵이하였으며 성장에 따라 체중에 상응할 수 있도록 굵이량을 늘려주었다. 실험 시작시에 체장이 7.28 cm 그리고 체중은 9.27 g이었다. 이들 돌돔은 무작위로 체포하여 3개의 사육수조에 각각 300미를 수용하였으며 수조는 대조구(A 실험구), 3일간격 성장호르몬 투여구(B 실험구), 그리고 매일 투여구(C 실험구)로 구분하여 실험을 실시하였다. 하루에 투여하는 성장호르몬은 약 40 mg/어체중kg으로 먹이에 침투시켜서 굵이하였다. 그리고 측정은 2주 간격으로 체중과 전장을 각 수조 당 30미를 대상으로 실시하였다.

Table 3. 최초 구입한 돌돔 치어의 체중, 전장 그리고 체장

Items measured	WEIGHT(체중)	TL(전장)	SL(체장)
N of cases	114	114	114
Minimum	1.110	3.500	2.800
Maximum	3.010	5.300	4.100
Range	1.900	1.800	1.300
Sum	198.470	495.300	391.200
Median	1.655	4.300	3.400
Mean	1.741	4.345	3.432
95% CI Upper	1.811	4.403	3.480
95% CI Lower	1.671	4.287	3.383
Std. Error	0.035	0.029	0.024

돌돔의 재조합 성장호르몬을 급이하여 성장 효과를 알기 위하여 6주간 실험한 결과는 Fig. 36에 나타나 있다. 실험 결과, 실험 시작시 체중 9.27 g, 전장 7.29 cm이던 돌돔은 실험 종료시 체중 27.95 g, 체장 10.90 cm로 6주 동안 현저한 체중 증가를 보여 거의 3배 정도의 무게를 나타내었다. 절대치에 있어서는 성장호르몬 투여구가 대조구에 비해서 일반적으로 다소 나은 성장치를 보였으나 각 측정 시 수집한 자료를 two sample t-test와 ANOVA로 분석한 결과 측정시기 내 대조구와 실험구 사이 즉 A, B, C 실험구 간의 체중과 전장의 유의차 95% 신뢰구간에서 인정되지 않은 반면 측정시기 사이의 성장 차이는 두가지 통계검증에서 모두 유의성이 인정되었다. 따라서 이 실험 결과 급이에 의한 성장 증진 효과는 관찰되지 않았다.

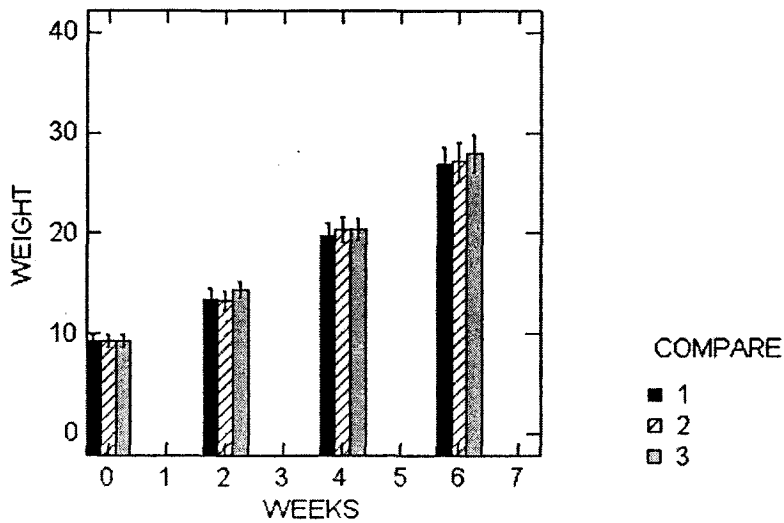


Fig. 36. 돌돔의 재조합 성장호르몬 투여를 통한 돌돔의 성장비교.

1. 대조구(A); 2. 3일간격 투여구(B); 3. 매일 투여구(C)

3. 분리된 베타액틴 유전자를 이용한 이식벡터개발

가. 유전자 이식 벡터 개발

넙치의 수정란에 넙치 유래 성장호르몬의 성공적인 이식을 위하여 다음과 같이 발현 벡터를 제작하였다. 발현 벡터를 제작하기 위하여 다음과 같이 4개의 fragment를 Pfu DNA polymerase를 이용하여 PCR 증폭하였다. 넙치 β -actin의 promoter 부위와 첫 번째 intron 부위를 포함한 영역(2018 bp, Fragment 1)은 EcoRI과 SalI 제한부위를 삽입하여 디자인된 primer (Vector-F1, 5'-CGA ATT CAA GCT TGA GAA TTT GTA ATT TG-3', EcoRI 제한부위 삽입; Vector-R1, 5'-TGT CGA CGG CTT CTG TGA GGA GAT GGA-3', SalI 제한부위 삽입)를 이용하여 PCR 증폭하였고, 넙치 성장호르몬 mRNA의 poly(A)-signal 부위를 포함한 넙치 성장호르몬 mRNA precursor 영역(834 bp, Fragment 2)은 SalI과 BamHI 제한부위를 삽입하여 디자인된 primer (Vector-F2, 5'-CGT CGA CAC TGA AGA ACT GAA CCA GTA-3', BamHI 제한부위 삽입; Vector-R2, 5'-AGG ATC CGA CTG AAT GAA ATC TTT ATT-3', EcoRI 제한부위 삽입)를 이용하여 PCR 증폭하였다. 또한, ampicillin과 ColE1 origin 부위를 포함한 2043 bp의 영역(Fragment 3)은 pBluescript II SK(-)에서 EcoRI과 BamHI 제한부위를 삽입하여 디자인된 primer (Vector-F3, 5'-CGG ATC CTC ACT GCC CGC TTT CCA GTC-3', BamHI 제한부위 삽입; Vector-R3, 5'-TGA ATT CGC CGC TAC AGG GCG CGT CAG-3', EcoRI 제한부위 삽입)를 이용하여 PCR 증폭하였다. 이와 더불어 SalI과 BamHI 제한부위를 삽입하여 디자인된 primer (Vector-F4, 5'-CGT CGA CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA-3', SalI 제한부위; Vector-R4, 5'-AGG ATC CGC AGT GAA AAA AAT GCT TTA-3', BamHI 제한부위)를 이용하여 Ad-EGFP vector로부터 poly(A)-signal 부위를 포함한 EGFP를 암호화하고 있는 영역(924 bp, Fragment 4)을 PCR 증폭하였다.

이와 같이 증폭된 PCR product들을 0.8% agarose gel 상에서 확인하여 예상되는 길이의 fragment를 포함하고 있는 부위를 잘라내어 QIAEX II Gel Extraction Kit

(QIAGEN Inc., USA)을 이용하여 정제하고 pBluescript SK(-)의 HincII restriction site에 subcloning하였다. Subclonedmf 적절한 제한효소(Fragment 1, EcoRI-Sall; Fragment 2, Sall-BamHI; Fragment 3, BamHI-EcoRI; Fragment 4, Sall-BamHI)를 이용하여 절단한 후에 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., USA)을 이용하여 정제하였다.

이렇게 정제된 cohesive end를 가진 fragment들은 pFVfGH (Fragment 1 - Fragment 2 - Fragment 3)와 pFVfGH-EGFP (Fragment 1 - Fragment 4 - Fragment 3) 벡터를 제작하기 위하여 T4 DNA ligase (Takara Shuzo Co., Ltd)를 이용하여 ligation시켰다. ligation된 산물은 42°C에서 1분 30초 동안 heat shock을 가하여 NovaBlue competent cell (Novagen)로 형질전환시킨 후에, 100 µg/ml의 ampicillin을 포함한 LB (Luria-Bertani) plate에 도말하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 그 배지에서 single colony를 선발하여 ampicillin이 들어있는 LB broth 배지에서 37°C에서 교반시키면서 밤새 배양하였다.QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc.)을 이용하여 이렇게 밤새 배양된 배지로부터 plasmid DNA를 정제 수집하였다. 다음 그림은 유전자이식 vector를 나타낸 것이다. Fig. 37A는 넙치의 성장호르몬 cDNA를 넙치의 배타액틴 promoter의 첫 번째 intron 다음에 삽입한 vector이며 Fig. 37B는 넙치의 액틴 promoter downstream에 Green fluorescent protein (GFP) 유전자를 삽입한 것으로 넙치 액틴 promoter 유전자의 조절과 발현 정도를 분석하는데 사용될 것이다.

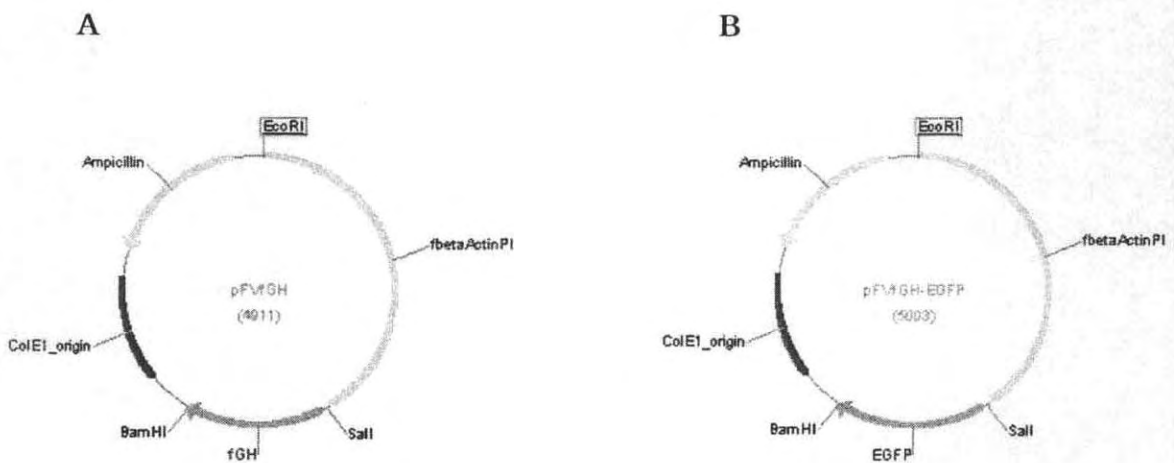


Fig. 37. 재조합된 이식과 발현 벡터.

나. 형질전환 어류생산 조건의 최적화와 생산율의 비교

유전자 이식을 위한 zebrafish의 난은 아침 8시경에 자연 산란한 난을 수거하거나 인공 수정시켜서 실험에 사용하였다. zebrafish의 1-cell stage 기간은 26℃에서 수정 후 약 40분 동안이었으며, stereo microscope(Olympus, SZX9)에 장착된 micromanipulator (WPI, USA)와 Bio-rad의 electroporator를 사용하여 microinjection 방법과 electroporation 방법을 사용하여 실험하였다. electroporation의 최적조건을 알기 위한 예비실험 결과 전압을 올릴수록 생산율이 낮아지는 경향을 보였으며 capacitance의 경우에는 수치를 낮게 할수록 생산율이 낮아졌다. 이와 같은 예비실험 결과를 바탕으로 한 결과 최적조건은 전압 0.05 KV, capacitance 25 μ F, pulse number 1, 그리고 무한대의 저항에서 가장 높은 생산율을 보였다. 이 조건에서 electroporation한 수정란과 미세주입한 수정란의 부화율과 부화 후 10일까지의 초기 생산율을 비교한 결과는 다음과 같다. 총 11번의 미세주입 실험을 한 결과 실험구에서 부화율은 13.3-60.0%로 변이가 심하였으며 대조구의 경우에는 93.3%의 높은 부화율을 보였다. 또한 부화 후 10일째의 생산율은 10-40%였으며 대조구는 86.7%의 높은 생산율을 보였다. Pandian et al (1991)은 zebrafish를 대상으로 미세주입한 결과 25-85% 범위의 부화율을 보였다고 보고하였고 이는 본 연구 결과보다 다소 높은 수치를 나타내었으며 부화율과 이식유전자의 integration 비율과는 별로 상관관계가 없는 것으로 보고하였다. 한편 electroporation 방법을 이용하였을 경우 부화율은 실험구에서 3-35%, 초기 생산율은 0-21%로 대조구의 각각 91%와 84%에 비해서 훨씬 낮은 수치를 보였다. 따라서, transgenic fish는 미세주입 방법을 사용하는 것이 효과적이라고 생각되어 형질전환 어류 제작은 미세주입 방법을 사용하여 실시하였다.

다. 모델 어류 내에서의 재조합 형질전환 벡터(pFV4aEGF-GH)의 발현 양상

분리한 자바리의 성장호르몬과 EGF를 재조합한 pFV4aEGF-GH 벡터를 zebrafish의 one-cell stage 수정란에 미세주입하였고 주입된 transgene의 발현 유무는

reporter 유전자의 발현으로 알 수 있었다. 주입된 transgene의 발현은 대개 수정 후 12시간에서 처음으로 관찰되었으나 발현이 매우 약하게 나타났으며 그 후 발현량이 점차 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 promotor인 actin gene의 발현시기에 좌우된다고 생각된다. 1-cell stage의 수정란에 미세 주입한 후 24시간 경과시 EGF의 발현 양상은 주로 zebrafish 몸체(trunk)의 근육들에서 상대적으로 강한 발현을 보였으며 그 외에도 난황을 덮고 있는 표피세포와 두부 및 눈 주위에서도 약한 발현을 보였다.

부화 후 5일 경과시에는 EGF의 발현이 강하게 나타났으며 전형적인 mosaic expression pattern을 보였다(Fig. 38). 어체의 전반에 걸쳐서 발현이 관찰되었으나 주로 막대모양의 발현을 나타내어 이들이 근육에서 강하게 발현하는 것으로 생각되며 이는 백터의 발현을 위한 promotor를 actin 유전자로 사용하였기 때문으로 생각된다. 이외에도 심장에서 GFP의 발현이 관찰되었다.

부화 후 10일이 경과한 후 개체에 따른 변이는 있지만 발현 양상이 수적으로는 다소 줄어드는 경향을 보였으며 발현하는 근육조직은 더욱 굵고 뚜렷한 발현을 나타내었고 어체의 전체에 걸쳐서 뛰엄뛰엄 발현을 보였다. 그리고 어떤 개체의 경우에는 눈 주위와 아가미 주위에도 발현을 관찰할 수 있어서 actin 유전자의 발현은 어체에 전반적으로 일어났다. 따라서, actin promotor는 transgene이 어체에 전반적으로 발현되길 원할 경우에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 이 실험에 있어서 reporter 유전자인 EGF의 발현은 EGF의 5' 쪽에 위치하고 있는 넵치의 성장 호르몬이 발현된다는 것을 간접적으로 시사하고 있어서 백터 조합이 성공적이었다고 생각된다.

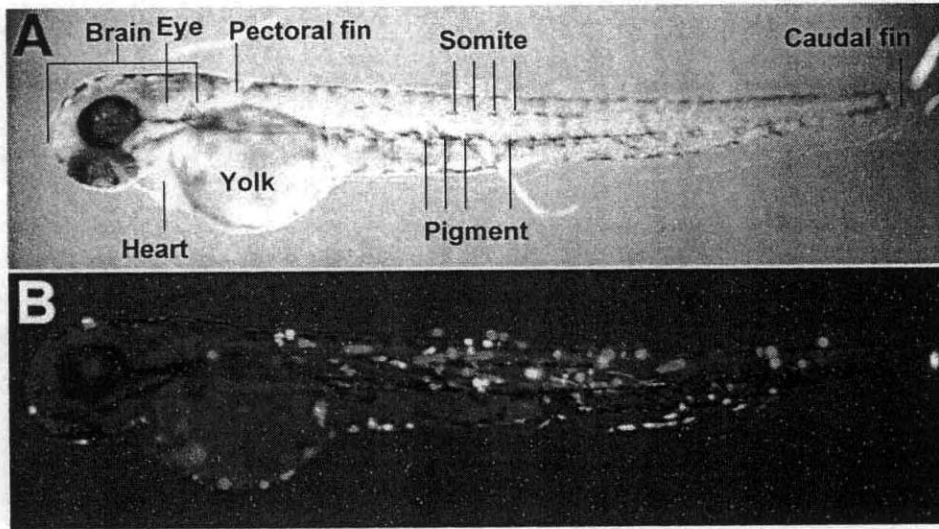


Fig. 38. Zebrafish에서의 transgene의 발현 양상.

(1) 형질전환 어류생산 벡터 조합

성공적인 외래유전자의 이식효율의 비교, 도입과 발현 그리고 도입된 외래 유전자의 자손으로의 전달 등을 확인하기 위해서는 다음의 여러 가지 해결해야 할 기술적인 문제점들이 있다. 즉 효율이 높아야하며, 외래유전자의 도입유무를 보다 쉽고 빠르게 그리고 정확히 확인할 수 있어야 한다. 그리고, 도입된 외래 유전자를 효율적으로 발현시킬 수 있는 promotor를 가지고 있어야 한다. 이와 같은 점들을 고려하여 pFV3CAT와 pFV4aCAT vector system을 용도에 따라 사용하였으며 어체에서의 도입유전자의 발현을 보기 위해서 reporter 유전자로는 GFP gene을 사용하였다. SpeI 과 BamH1 제한효소 절단부위를 첨가한 primer를 사용하여 green fluorescence protein (GFP) 유전자를 증폭한 다음 pFV4aCAT 벡터의 동일제한 효소부위를 절단한 다음에 ligation하였다. 그리고 SstII와 SpeI site를 가진 primer를 사용하여 NKEF 유전자의 cDNA의 coding region를 증폭한 다음 GFP의 5' 쪽에 삽입하였다.

(2) 유전자 도입 방법

(가) 미세주입

재조합한 plasmid DNA는 XL-1 blue 에 transformation 한 후 plasmid prep를 사용하여 분리하였다. 그리고 spectrophotometer를 사용하여 plasmid DNA의 양을 정량한 다음 0.1M KCl로 희석하여 100 ng/ μ l로 만든 후 지시시약으로 phenol red를 최종농도 0.5%되게하여 1 μ l를 채취하여 대개 1개의 one-cell stage 수정란에 100 pg을 미세주입하였다. 미세주입은 WPI micromanipulator를 사용하였으며 수정란은 holding slide를 사용하여 한쪽 방향으로 정렬시켜서 주입시간을 최소화하였다.

(나) Electroporation

Electroporation을 위하여 Gene Pulser II (Biorad, USA)를 사용하였다. 수정한 직후의 알을 수집하여 깨끗이 세척한 후 FPS buffer를 사용하여 electroporation하였다. 최적 조건을 찾기 위하여 처음에 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 KV의 전압과 1, 3, 10, 25, 50 μ F의 capacitance의 범위에서 저항을 무한대로 둔채 electroporation하였다. 최적조건을 찾은 후 다시 pulse number를 각각 1, 2, 3, 4, 5를 주어서 생존율을 비교한 다음 실험 조건을 확정하였다. 그리고 DNA의 농도는 각각 50, 75, 100, 200 μ g를 사용하여 비교하였다.

(3) 형질전환 어류생산 조건의 최적화와 생산율의 비교

유전자 이식을 위한 zebrafish의 난은 아침 8시경에 자연 산란한 난을 수거하거나 인공 수정시켜서 실험에 사용하였다. zebrafish의 1-cell stage 기간은 26 $^{\circ}$ C에서 수정 후 약 40분 동안이었으며, stereo microscope(Olympus, SZX9)에 장착된 micromanipulator (WPI, USA)와 Bio-rad의 electroporator를 사용하여 microinjection 방법과 electroporation 방법을 사용하여 실험하였다. electroporation의 최적조건을 알기위한 예비실험 결과 전압을 올릴수록 생산율이 낮아지는 경향을 보였으며 capacitance의 경우에는 수치를 낮게 할수록 생산율이 낮아졌

다. 이와 같은 예비실험 결과를 바탕으로 한 결과 최적조건은 전압 0.05 KV, capacitance 25 μ f, pulse number 1, 그리고 무한대의 저항에서 가장 높은 생산율을 보였다. 이 조건에서 electroporation한 수정란과 미세주입한 수정란의 부화율과 부화 후 10일까지의 초기 생산율을 비교한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 총 11번의 미세주입 실험을 한 결과 실험구에서 부화율은 13.3-60.0%로 변이가 심하였으며 대조구의 경우에는 93.3%의 높은 부화율을 보였다. 또한 부화 후 10일째의 생산율은 10-40%였으며 대조구는 86.7%의 높은 생산율을 보였다. Pandian et al (1991)은 zebrafish를 대상으로 미세주입한 결과 25-85% 범위의 부화율을 보였다고 보고하였고 이는 본 연구 결과보다 다소 높은 수치를 나타내었으며 부화율과 이식유전자의 integration 비율과는 별로 상관관계가 없는 것으로 보고하였다. 한편 electroporation 방법을 이용하였을 경우 부화율은 실험구에서 3-35%, 초기 생산율은 0-21%로 대조구의 각각 91%와 84%에 비해서 훨씬 낮은 수치를 보였다. 따라서, transgenic fish는 미세주입 방법을 사용하는 것이 효과적이라고 생각되어 형질전환어류 제작은 미세주입 방법을 사용하여 실시하였다.

Table 4. 서로 다른 유전자도입 방법 사용시 zebrafish 알의 부화율과 초기 생산율 비교

Trials of microinjection	Microinjection		Electroporation	
	Hatching success (%)	Early survival rate (%)	Hatching success (%)	Early survival rate (%)
1	12/30(40.0)	7/30(23.3)	-	-
2	15/30(50.0)	9/30(30.0)	3/100(3.0)	0/100(0.0)
3	14/30(23.3)	7/30(23.3)	-	-
4	4/30(13.3)	3/30(10.0)	27/100(27.0)	15/100(15.0)
5	9/30(30.0)	6/30(20.0)	-	-
6	11/30(36.7)	5/30(16.7)	-	-
7	12/30(40.0)	7/30(23.3)	-	-
8	18/30(60.0)	12/30(40.0)	35/100(35.0)	20/100(21.0)
9	10/30(33.3)	6/30(20.0)	-	-
10	15/30(50.0)	12/30(40.0)	-	-
Control	28/30(93.3)	26/30(86.7)	91/100(91.0)	84/100(84.0)

(4) Zebrafish 내에서의 재조합 형질전환 벡터(pFV4aEGF-NKEF)의 발현양상

분리한 NKEF 유전자와 EGF를 재조합한 pFV4aEGF-NKEF 벡터를 zebrafish의 one-cell stage 수정란에 미세주입하였고 주입된 transgene의 발현 유무는 reporter 유전자의 발현으로 알 수 있었다. 주입된 transgene의 발현은 대개 수정 후 12시간에서 처음으로 관찰되었으나 발현이 매우 약하게 나타났으며 그 후 발현량이 점차 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 promotor인 actin gene의 발현시기에 좌우된다고 생각된다. 1-cell stage의 수정란에 미세 주입한 후 24시간 경과시 EGF의 발현 양상은 주로 zebrafish 몸체(trunk)의 근육들에서 상대적으로 강한 발현을 보였으며 그 외에도 난황을 덮고 있는 표피세포와 두부 및 눈 주위에서도 약한 발현을 보였다.

부화 후 5일 경과시에는 EGF의 발현이 강하게 나타났으며 전형적인 mosaic expression pattern을 보였다. 어체의 전반에 걸쳐서 발현이 관찰되었으나 주로 막대모양의 발현을 나타내어 이들이 근육에서 강하게 발현하는 것으로 생각되며 이는 벡터의 발현을 위한 promotor를 actin 유전자로 사용하였기 때문으로 생각된다. 이 외에도 심장에서 GFP의 발현이 관찰되었다.

부화 후 10일이 경과한 후 개체에 따른 변이는 있지만 발현 양상이 수적으로는 다소 줄어드는 경향을 보였으며 발현하는 근육조직은 더욱 굵고 뚜렷한 발현을 나타내었고 어체의 전체에 걸쳐서 뛰엄 뛰엄 발현을 보였다(Fig. 39). 그리고 어떤 개체의 경우에는 눈 주위와 아가미 주위에도 발현을 관찰할 수 있어서 actin 유전자의 발현은 어체에 전반적으로 일어났다. 따라서, actin promotor는 transgene이 어체에 전반적으로 발현되길 원할 경우에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 이 실험에 있어서 reporter 유전자인 EGF의 발현은 EGF의 5' 쪽에 위치하고 있는 넵치의 성장 호르몬이 발현된다는 것을 간접적으로 시사하고 있어서 벡터 조합이 성공적이었다고 생각된다

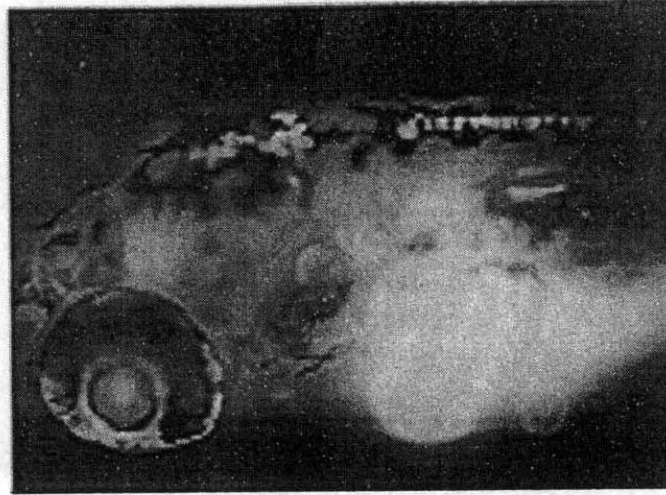


Fig. 39. 부화 후 10일째의 형질전환 지브라피쉬의 도입 유전자 발현양상.

4. 분리 병원균의 병원성 시험

수조에서 우연히 발생하여 거의 100% 치사율을 보이는 세균성질병 원인균을 zebrafish의 신장으로부터 TSA 배지를 이용하여 *Aeromonas hydrophila*를 분리하였으며 그들의 동정은 API 20E kit로 실시하고(Table 5), 항생제 저항 테스트 결과는 Table 6에 나타내었다. 분리 후 균주의 병원성 시험은 균주를 TSA broth에서 24시간 증균시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 채균하고, 이것을 다시 멸균생리식염수로 3회 씻은 다음 적정 농도로 희석하여 실험어 체중 1 g당 균습중량 50 ul씩을 등지느러미 아래 근육에 주사 2일 후 실험어의 신장으로부터 균을 재분리하여 어체를 2회 통과시킴으로서 균의 독력을 회복시킨 균주를 TSA broth에서 24시간 증균하여 채균한다. 그리고 어체중 1 g당 50 ul씩을 실험어 10mm에 주사하여 7일이내에 폐사여부로서 병원성을 판단하고 대조구의 어체에는 멸균 TSA broth를 어체중 1 g당 50 ul씩 역시 근육 주사한다.

실험기간 중 실험어를 15 L의 사각유리수조에 수용하고, 수온은 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 범위로 간이며 과기를 설치하여 사육하였다. 실험어 어체중은 1 - 2 g 사용한다. 실험에 앞서 사전 감염여부를 조사하기 위해 무작위로 선발하여 신장에서 병원균의 분리를 하였다.

Table 5. The results of API 20E Kit test for isolated bacteria from the zebrafish

Tests	Zebrafish	쏘가리	표준균주 (KCTC2944)
ONPG	+	+	+
ADH	+	+	+
LDC	+	+	+
ODC	-	-	-
CIT	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	+	+	+
VP	+	+	+
GEL	+	+	+
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	-	-
SOR	-	-	-
RHA	-	-	-
DAC	+	+	+
MEL	-	-	-
AMY	-	-	-
ARA	+	+	+
OX	+	+	+

Table 7. Inhibition diameter (mm) by antibiotic discs against *Aeromonas hydrophila* isolated from the zebrafish

Antibiotics	Trials		
	First	Second	Third
Doxycycline (30 μg)	2.1	2.0	2.1
Ampicillin (10 μg)	-	-	-
Sulfadiazine (0.25 mg)	1.6	1.6	1.5
Trimoghoprirm-Sulfamethoxazole (25 μg)	2.5	2.3	2.3
Chloramphenicol (30 μg)	3.0	2.6	2.6
Lincomycine (2 μg)	-	-	-
Cephalothin (30 μg)	-	-	-
Neomycine (30 μg)	1.9	2.0	1.8
Amoxicillin/Clavulanicacid acid (30 μg)	-	-	-
Norfloxacin (10 μg)	3.1	3.0	3.1
Gentamicine (10 μg)	2.2	2.0	1.9
Tetracycline (30 μg)	2.1	2.2	2.0
Novobiocin (5 μg)	-	-	-
Ciprofloxacin (5 μg)	3.1	3.4	3.3
Erythromycine (15 μg)	1.4	1.5	1.4
Kanamycine (30 μg)	2.2	2.0	2.2
Nalidixic acid (30 μg)	2.2	2.1	2.5

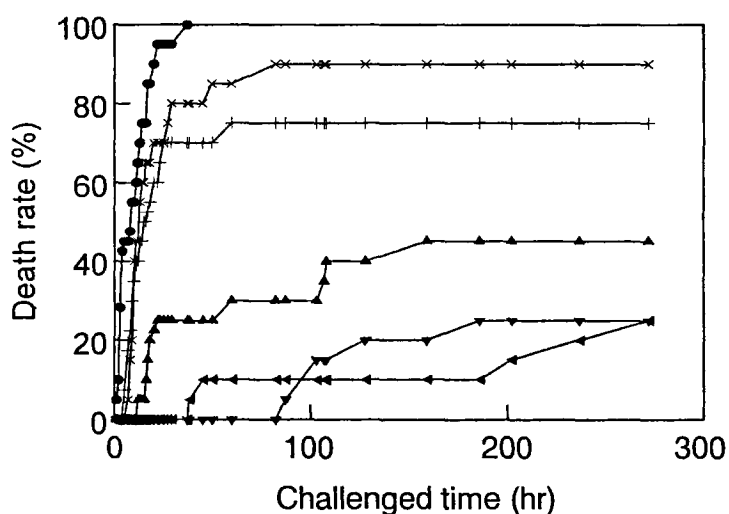
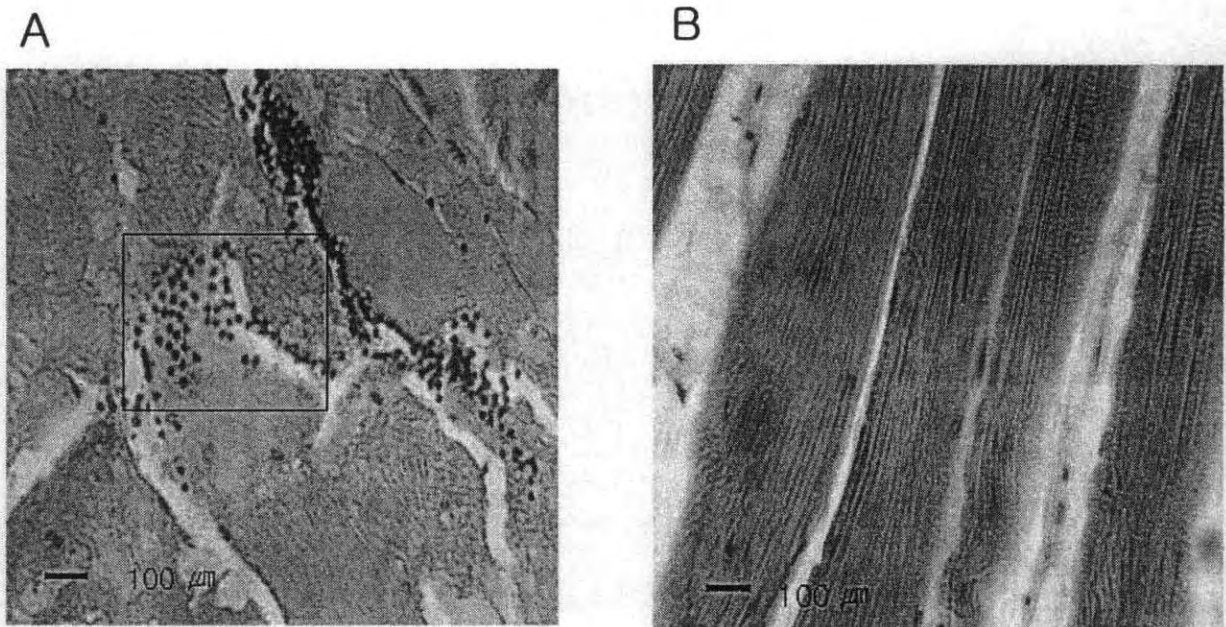


Fig. 40. Death rate (%) of the zebrafish during the 272 hr-challenge test with 6 different concentrations of bacteria.

병어로부터 분리 동정된 균주를 TSA broth 배지에 접종하여 6시간 전 배양한 후 5,000 rpm으로 원심분리하여 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 현탁시킨 후 3회 원심세척하여 침지(immersion) 및 근육피하주사(intramuscular injection)에 의한 감염시험을 수행하였다. 감염시험 중 병원균의 농도를 조정하기 위하여 병원균의 수와 OD간의 관계를 알기 위하여 시간별 균체수와 OD를 측정하였으며 이를 기준으로 대강의 세균농도를 추정하였으며 정확한 세균수는 실험 후의 시료를 일정량 TSA 배지에 도말한 후 세균수를 계수하였다. 실험어는 내병성 transgenic 어류를 사용하여 감염시험을 행하는데 대조구는 같은 어종을 사용한다. 실험기간 중 실험어를 15 L의 사각유리수조에 수용하고, 수온은 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 범위에서 실시하여 폐사미수를 확인한다. 그 결과는 Fig. 40에 나타내었다. 그리고 감염 근육 부위에서 병원균을 관찰할 수 있었다(Fig. 41).



A : 감염된 zebrafish의 근육

B : control(근육)

Fig. 41. *Aeromonas hydrophila*에 감염된 zebrafish의 근육조직

바이러스, SHRV(snakehead rhabdovirus)를 증식하기 위하여 EPC (Epithelioma papulosum cyprini) cell을 사용하였다. EPC cell은 22에서 minimal essential medium에 10% fetal calf serum과 2 mM L-glutamine (MEM-10) 보완하여 사용하였다. 바이러스는 0.5 MOI로 EPC cell에 감염시켰으며 이때의 배양액은 MEM-2를 사용하였다. 그리고 70%의 CPE를 보일 때 감염된 EPC cell을 수거한 다음 zebrafish cell line (ZEM2)을 이용하여 다시 증식킨 후 plaque assay를 실시하였으며 적정농도의 바이러스를 어체의 복강에 주사하여 내병성을 조사하였으며 이 때 반드시 대조군을 두었다. 그 결과는 아래에 나타내었다.

Table 7. Mortality of challenged zebrafish with virus

Days post-injection	Group 1 (N=6) Previously CCV exposed for 12 days	Group 2 (N=5) Previously SHRV exposed for 12 days	Group 3 (N=10) Previously control exposed to culture medium for 12 days	Group 4 (N=10) Injected culture medium only
1				
2				
3	1			
4			4	
5	3	1	1	
6			1	
7				
8			1	
9				
10			1	
11				
12	still 1 male sick	1		
13				
Percent mortality	83%	40%	80%	0%

- Previous mortality was 40 to 50 % with SHRV from EPC cell
- Those virus was recovered from infected zebrafish and pass them through the ZEM2 zebrafish cell line.
- The period of non-specific immune response after virus challenge last less than 12 days, which is much shorter than rainbow trout.
- The fish previously exposed to SHRV showed 40 percents of mortality during the repeated exposure to SHRV.
- So far, the viruses including SHRV, RPS, CCV, GSV had been tested.

5. 순환여과수조에서 수정란 확보를 위한 감성돔 친어관리 및 산란 유도

가. 서론

어류의 성숙과 배란 및 산란은 생식 분비계 지배에 의해 조절되지만 이들의 조절을 유도하는 것은 환경요인이다(Vlaming, 1975; Lee and Hanyu, 1984). 환경요인에 관한 초기 연구는 1937년 Hoover에 의해 이루어 졌으며 그 후 다양한 생물을 대상으로 한 연구들이 활발히 이루어 졌다(An, 1995; Lee et al., 1984). 특히 광주기와 수온은 생식소 활성화에 강하게 작용하는 것으로 담수어류와 해산어류에서 보고 되고 있으며 이들 광주기와 수온을 이용한 산란유도에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다(Jeong et al., 1998; Kim and Hur, 1991). 이러한 연구결과 산란 유도에 관여하는 광주기와 수온은 복합적으로 작용하며, 종에 따라 범위가 각기 다르게 나타나는 것으로 보고 되고 있다(Kim and Hur, 1991; Kim et al., 1993).

또한, 염분의 변화는 해산어류의 삼투압 조절에 영향을 미침으로써 이온과 수분 평형에 혼란을 일으켜 어체의 생리조건 악화 및 성장지연을 초래하며(Singley and Chavin, 1971), 극심한 염분변화는 어류의 사망을 초래 할 수 있다(Hur and Chang, 1999; Chang et al., 1991). 이러한 염분변화를 통한 성장과 생존이 높은 어종을 생산하기 위해 초기 치어의 성장과 생존 및 난 부화에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 이와 관련하여 Milk fish의 연구에서는 염분과 온도의 상호작용을 통해 난발생 및 먹이전환효율에 영향을 주는 것으로 보고 되었고(Swanson, 1996) 넙치, *Paralichys olivaceus* 난 및 자·치어의 염분내성(Chun and Rho, 1991), 자주복, *Takifugu rubripes*의 난 및 자·치어의 염분내성(Go, 1993), 붉바리의 난의 발생에 미치는 수온 및 염분의 영향(Song, 1998) 등이 알려져 있다.

우리나라에서 대부분 양식종은 넙치(*Paralichthys olivaceus*)나 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)으로 치중하고 있어 양식대상 품종의 다양한 개발이 뒤따르고 있으며 그 중 양식 산업에 적합한 어종의 개발 차원에서 돔류는 매우 중요하게 인식되고 있다. 감성돔, *Acanthopagrus schegeli*은 내만성 어류로서 우리나라 및 일본의 연안 등에 분포한다. 이 어종은 2-3년생부터 수컷에선 암컷으로 성전환하며 우리나라의 연안에 4-6경에 산란한다(Chyung, 1977). 국내의 감성돔 종묘생산은 산란기에 포획하여 채란하거나 친어를 인위적으로 양성하여 수조 내에서 자연 산란시키고 있다. 산란에 관련된 연구에 있어서는 인공수정에 의한 종묘생산에 보고 되고 있지만

(Lee and Rho, 1987) 순환여과수조 내에서 인위적으로 수온과 염분 및 광주기의 유도를 통한 종묘생산은 전무한 상태이며 수온과 염분에 의한 난 발생과 차치어의 생존에 관해 부족한 실정이다. 이와 더불어 국내외 시장에 수요가 많아 양식 생산량이 계속 증가하고 있으며 해수어 양식 산업에서 중요한 종이지만 성장속도가 넙치와 조피볼락에 비해 떨어져 양식 산업 종으로서 경쟁력에 약화되고 있다. 따라서 종묘의 조기 생산과 산업적 경쟁력 강화 일환으로 순환 수조에서의 종묘생산에 관련하여 온도, 염분 및 광주기 조절을 통한 감성돔의 산란 유도과 감성돔 자치어의 생존과 배발생에 미치는 최적 수온과 염분을 구명하여 종묘생산에 이바지하기 위해 이 연구를 수행하였다.

나. 친어의 확보와 사육

실험에 사용된 감성돔 68마리는 2003년 6월경 순천항대에서 제주대학교 해양과학대학 어류유전육종실험실로 운반하여 어병 예방을 위해 약욕을 실시한 후 2개의 1 ton 수조에 수용하였다. 감성돔은 산란을 유도하기 위해서 2개조의 6ton 수조를 사용하였다. Tank I에는 1월 5일에 40 마리와 tank II에는 3월 3일에 28 마리를 옮겨 사육하였다. 옮겨진 감성돔의 체중은 550-800 g이고 전장은 28-31.8 cm 이었다. 산란 전까지 먹이는 시판되고 있는 부상사료를 매일 2회(아침, 저녁)로 나누어서 충분한 시간적 여유를 가지고 각 수조의 전체 사육어 체중의 2% 정도를 공급하였으며 첫 산란이 일어난 이후에는 물의 오염을 최소화하기 위해 매일 1회의 먹이를 공급하였고 매일 수온(Fig. 42)과 염분(Fig. 43) 및 DO(Fig. 44)를 측정하였다.

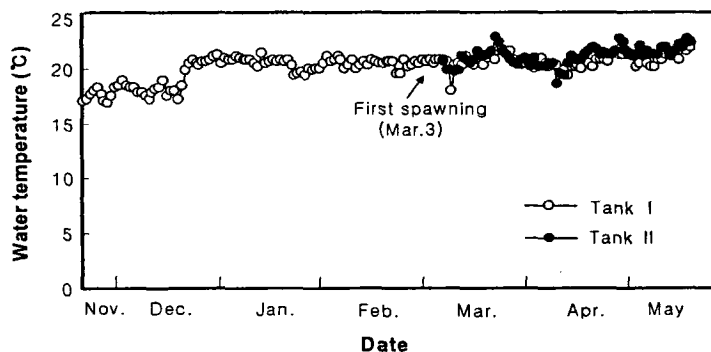


Fig. 42. Water temperature of tank cultured in Black seabream fish.

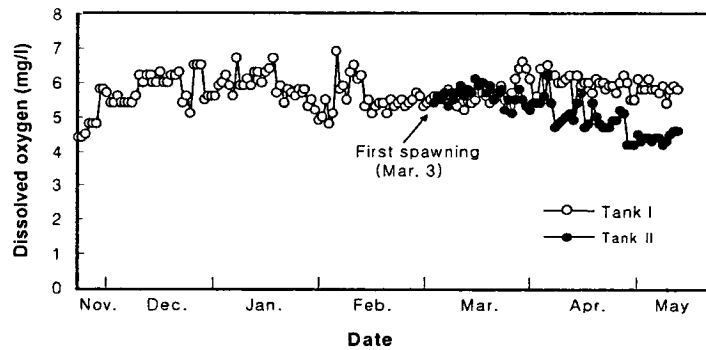


Fig. 43. Dissolved oxygen of tank cultured in Black seabream fish.

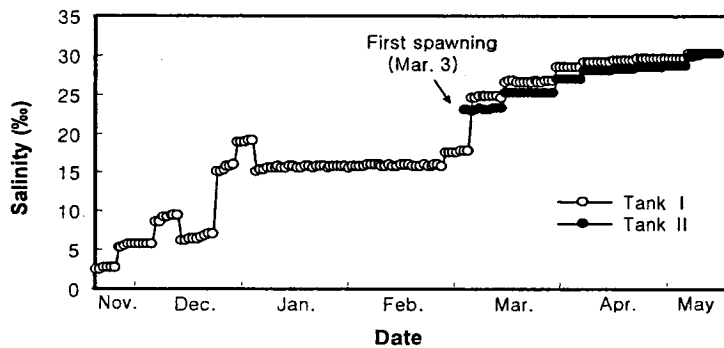


Fig. 44. Changes of salinity in the recirculated culture tanks.

다. 산란유도

자연 산란을 위해 수온은 19-22 °C을 유지하였고, 광주기는 폐쇄식 순환여과 수조에 자연광을 차단하였으며 백열전구(100 W)를 이용하여 일장주기를 15 : 9(L : D)에서 12 : 12(L : D)까지 서서히 증가시켰다(Fig. 45).

산란된 알은 망목 100 μm 인 Müller 가제로 만든 채란조로 유도하였으며 매일 오전 8시 경에 난을 수거하였다. 수거한 난은 부성난과 침성난을 분리하여 각각의 산란량을 계산하였고, 각

수조당 30개의 난을 수거 후에 각각 난경과 유구경은 만능투영기(PJ300, Mitutoyo)를 이용하여 0.001mm까지 측정하였다.

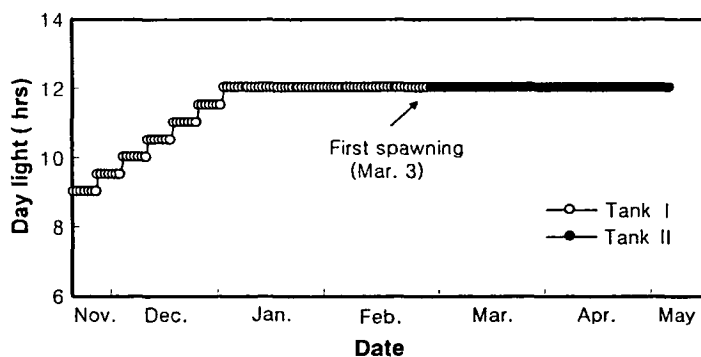


Fig. 45. Photoperiod manipulated for spawning of the black seabream.

폐쇄식 순환여과에서 사육된 친어는 tank I 과 tank II에서 모두 3월 3일에 첫 산란이 시작되었다. 총 채란 양은 3,139,100개(tank I, 1,818,000개; tank II, 1,321,100개)였으며, 부상란량은 1,546,300개(tank I, 805,000개; tank II, 741,300개)였다. 부상률은 tank I 과 tank II에서 각각 45.0%와 62.0%으로 평균 53.5%였다. 수정란의 난경은 0.83-1.02 mm였고, 유구경은 0.18-0.22 mm였다. 그리고 수정란의 난경과 유구경은 산란이 진행되면서 작아지는 것을 확인할 수 있었으며 어류의 산란이 휴식 후 다시 산란이 되었을 때 난경과 유구경의 크기가 더 작아지는 것을 확인할 수 있었다.

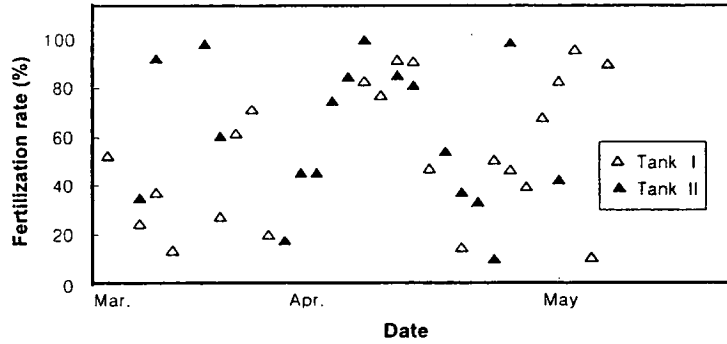


Fig. 46. Fertilization rate of the floating eggs during the spawning period.

라. 난 침강률 측정

사육 수조의 바닥에 있는 세균 및 기생충에 의한 감염을 방지하기 위해서 다양한 염분범위에서 부유 수위를 측정하였다. 염분농도 22, 23, 24, 25 및 26‰에서 물의 수위를 5단계 (surface, upper, middle, lower, bottle)로 구분하여 부유 비율을 측정하였으며 2개의 반복구를 두어 각 실험구당 난 10개씩 사용하였다.

염분별 난의 침강률을 조사한 결과 22‰에서는 난이 모두 침강하였으며 25‰의 염분에서는 모든 난이 부유된 것이 관찰되었다. 또한 26‰에서는 물 표면에서 모두 위치한 것이 관찰되었다(Table 8).

Table 8. Percentage distribution of eggs at water level of different salinities

	Salinity (‰)				
	22	23	24	25	26
Surface	-	-	35	55	100
Upper	-	40	15	35	-
Middle	-	25	25	10	-
Lower	-	25	15	-	-
Flat	100	10	15	-	-

Table 9. Effect of salinity and temperature on survival rate (%) of Black seabream egg, *Acanthopagrus schegeli*

W.T Salinity		Elapsed time (hours)								
		0	6	12	18	24	30	36	42	48
15°C	10‰	100	98.3±1.6 ^a	78.7±6.5 ^b	69.3±8.9 ^b	54.7±4.7 ^b	49.3±1.5 ^b	42.7±3.1 ^b	34.0±8.2 ^b	0 ^b
	20‰	100	99.3±0.6 ^a	97.3±1.5 ^a	93.3±1.5 ^a	91.0±1.0 ^a	87.0±2.0 ^a	75.0±3.6 ^a	81.3±0.6 ^a	78.7±2.1 ^a
	35‰	100	96.3±4.6 ^a	92.0±4.6 ^a	84.3±5.5 ^a	78.0±2.9 ^c	76.7±4.5 ^c	75.0±3.6 ^a	74.3±4.0 ^a	73.3±3.5 ^a
20°C	10‰	100	94.3±0.6 ^a	78.7±3.2 ^b	70.9±8.1 ^b	64.3±7.6 ^b	56.7±4.5 ^b	49.0±6.1 ^b	41.3±6.7 ^b	0 ^b
	20‰	100	93.7±1.5 ^a	95.3±0.6 ^a	90.1±2.1 ^a	84.0±2.7 ^a	82.3±4.0 ^a	79.7±1.5 ^a	77.0±1.0 ^a	74.7±1.2 ^a
	35‰	100	98.0±1.5 ^a	95.3±3.0 ^a	88.7±0.6 ^a	86.3±0.6 ^a	84.7±0.6 ^a	84.3±1.2 ^a	84.0±1.0 ^a	83.7±0.6 ^c
25°C	10‰	100	97.0±2.0 ^a	78.7±3.1 ^b	70.7±5.5 ^a	60.3±7.6 ^a	48.7±6.5 ^a	39.3±3.1 ^a	18.3±6.7 ^a	18.3±6.7 ^a
	20‰	100	98.3±1.2 ^a	88.0±3.0 ^a	71.7±3.8 ^a	68.3±7.6 ^a	67.7±2.5 ^{ab}	67.7±2.5 ^{ab}	67.7±2.5 ^{ab}	67.7±2.5 ^{ab}
	35‰	100	98.3±1.2 ^a	94.3±3.1 ^a	90.0±3.1 ^b	85.0±2.7 ^b	83.3±3.8 ^c	83.3±3.8 ^c	83.3±3.8 ^c	83.3±3.8 ^c

마. 난 부화율 측정

온도와 염분의 상호작용을 통한 난 부화율을 측정하기 위해서 15, 20 및 25°C의 3단계 수온별 실험구와 10, 20 및 35‰의 3단계의 염분별 실험구를 설정한 후에 이를 조합하여 총 9개의 실험구를 만들었으며 각 실험구 당 3반복구를 두어 수행하였고 각각의 실험구는 1 ℓ 비이커에 알 100개씩 수용하여 48시간 동안 알의 부화율 및 생존율을 측정하였다.

온도 범위 15, 20, 25°C와 염분 범위 10, 20, 35‰ 에서의 난의 생존율을 6시간 마다 측정한 결과 20°C의 35‰에서 83.7% 생존율이 나타나 염분과 온도를 조합한 다른 실험구보다 가장 높은 생존율이 나타났다(Table 9). 모든 온도 조건하에서의 염분별 생존율은 10‰과 20‰ 보다 35‰에서 생존율이 높았다. 이러한 결과를 통해 높은 염분일수록 생존율이 높게 나타나는 것이 관찰되었다. 부화속도는 낮은 염분인 10‰와 20‰ 보다 35‰에서 높았으며 그와 더불어 높은 온도일수록 높은 현상이 보였다. 즉 높은 온도와 염분에서 부화속도가 높은 것이 관찰되었다. 또한

모든 온도와 염분에서의 실험구에서 48시간 이후에는 모든 난이 부화된 것을 관찰 할 수 있었으며 15℃와 20℃인 경우 10‰에서 모든 난의 사망한 것이 관찰되었다. 실험 종결시 염분간 난의 생존율은 유의한 차이를 나타냈다($P < 0.05$).

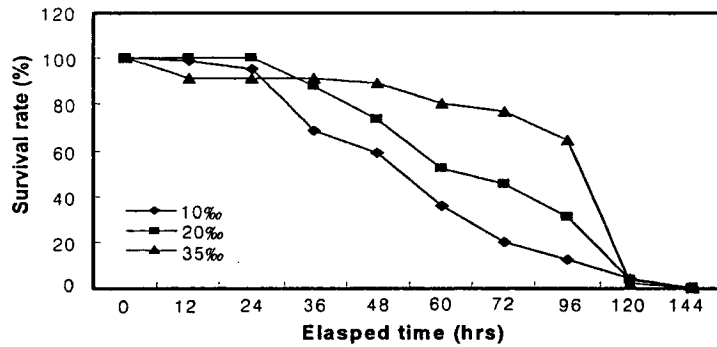


Fig. 47. Survival rates of the 1-day-old fingerling exposed to different salinities without supply of feed.

바. 치어의 생존율 측정

실험어는 20℃에서 각각 부화 후 1일, 7일된 치어를 사용하였고, 염분범위 10, 20 및 35‰ 3단계를 설정하였으며 각 실험구 당 3 반복구를 두었다. 실험구 당 치어 30개체씩 수용한 후 12시간 마다 측정하였고 72시간이후에는 24시간마다 측정하였으며 먹이의 공급은 Rotifer를 ml 당 약 200개체씩 5ml를 하루에 세 번 공급하였다. 부화 후 1일된 치어를 먹이 공급없이 염분별 (10, 20 및 35‰) 생존율을 측정하기 위해 실험 구 당 치어 30개체씩 수용한 후 실시하였다.

부화 후 1일된 치어를 이용하여 생존율을 조사였다(Fig. 47). 35‰에서 생존율은 10‰과 20‰의 생존율보다 감소하였지만 실험개시 후 24시간까지 유의차는 관찰되지 않았다($p > 0.05$). 24시간 이후부터 96시간까지 염분간 유의차는 나타났다($p < 0.05$). 120시간 이후 모든 염분에서 치어의 생존율은 급격히 감소하였으며, 144시간 이후 모든 염분에서의 치어는 모두 사망한 것을 확인할 수 있었다.

부화 1일된 치어와 7일된 치어의 먹이 급이시 염분별 생존율을 조사하였다. 1일된 치어경우 35%의 생존율은 24시간이후 10%과 20% 보다 급격하게 감소하였고 7일된 치어 경우 35%의 생존율은 12시간 이후 10%과 20% 보다 급격하게 감소하였으며 그 후 72시간까지 계속되었다. 72시간이후에는 35%보다 20% 생존율이 낮았지만 유의차는 관찰되지 않았다($p>0.05$). 실험 종결시 10%, 20%, 35% 염분에서의 자·치어의 생존율은 1일된 자어에서 25.6%, 40.0%, 38.9%가 나타났고, 20%에서 치어의 생존율은 다른 염분보다 가장 높게 관찰되었지만 염분간 유의성은 나타나지 않았다($P>0.05$). 7일된 치어에서 실험 종결시 10%, 20%, 35% 염분에서 각각 42.2%, 34.5%, 42.2% 나타났고, 35%에서 치어의 생존율은 다른 염분보다 가장 높게 관찰되었지만 염분간 유의성은 나타나지 않았다($P>0.05$). 시간에 따른 염분간 유의성을 검증한 결과, 1일된 자어와 7일된 치어 모두에서 36시간과 60시간 사이에서는 염분간 유의성이 나타났지만($P<0.05$), 60시간 경과이후부터 실험 종결시까지 유의성은 나타나지 않았다($P>0.05$).

사. 고찰

우리나라에서 대부분 양식종은 넙치나 조피볼락으로 치중하고 있어 양식대상 품종의 다양한 개발이 뒤따르고 있으며 그 중 양식 산업에 적합한 어종의 개발 차원에서 돔류는 매우 중요하게 인식되고 있다. 그러나 돔류는 넙치와 조피볼락보다 성장이 나빠 양식어종으로서 단점을 갖고 있다. 그러나 최근에 들어 다양한 방법으로 통한 보다 성장이 높은 어류를 생산하고자 많은 시도를 하고 있다(Gaumet et al., 1995; Partridge and Jeckins, 2002). 그 중 온도와 염분 등과 같은 환경적 요인의 조절을 통해 어류의 성장 및 먹이전환효율에 관한 연구가 진행되고 있으며 그러한 결과, *Acanthopagrus butcheri*는 자연해수보다 24%에서 성장이 더 좋다고 보고 되고 있다(Partridge and Jeckins, 2002). 특히 해양에서 서식하는 어류를 순치시켜 소비시장에서 짠 가격과 신선한 횡감을 공급하기 위해 많은 어류를 대상으로 한 염분별 생존 및 성장에 관한 연구가 진행되고 있으며(Gaumet et al., 1995; Han et al., 2001) 특히 돔류에 있어서 감성돔과 유사종인 *Acanthopagrus butcheri*는 담수에서 순치가 가능한 것으로 보고 되고 있다(Partridge and Jeckins, 2002). 그와 더불어 추가적으로 해수보다 낮은 염분에서 사육된 어류의 체성분에 대해서 연구가 진행되고 있다.

환경오염 및 일년 내내 산란을 유도하기 위해서 순환여과수조에서 광주기 및 온도의 조절을 통한 산란에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Jeong et al., 1998). 산란기의 결정은 종 특유의 수온과 광주기에 대한 반응성으로 나타나며, 일반적으로 봄에 산란하는 어류는 생식소 성숙의 시작과 산란기의 시작은 수온의 상승에 의하여 유도되는 것으로 보고되고 있다(Vlaming, 1975). 수온과 광주기가 친어의 성숙과 산란에 미치는 영향에 관하여 참돔의 경우에 최저 수온을 12℃ 이상으로 설정하여 사육한 실험구와 19℃의 자연해수를 직접 사용한 실험구의 산란기 차이는 없었으나 동계 가온사육인 산란기간을 1.5개월 앞당길 수 있었다고 하였다. 본 연구에서도 수온과 광주기를 점진적으로 조절과 더불어 염분의 농도를 증가시켜 산란조건을 만들어진 결과 정(1991)이 보고한 자연산란에 비해 1 달 빨리 산란이 이루어졌다. 순환수조내에서 수온 20.2℃, 염분 23.8‰, 12L/12D에서 첫 산란이 유도되어졌으며 산란기간 동안에 수온은 20~22℃인 3월에서 5월까지 약 3개월 동안 지속으로 유지되었다. 초기 약 한 달 동안 산란된 알의 부상된 비율은 침성된수보다 적었다가 4월이 되면서 증가하였으며 친어의 산란량은 산란기간 동안 전·후반기 구분 없이 대체로 일정하였다. 3개월 동안 5‰보다 낮은 염분에서 사육하다가 점진적으로 염분농도를 증가하여 산란유도가 일어난 결과, 5‰와 같은 저염분이 어류의 생식능력에 영향을 주지 않아 생식활성에 관여하지 않는 것을 확인 할 수가 있었으며 복족류 중 담수 달팽이 경우 염분 증가에 따라 난의 생산량에 있어 거의 영향을 받지 않는 것으로 보고 있다(Kefford and Nugegoda, 2005). 이는 염분 변화가 생물의 생식에 관여하는 호르몬 등과 같은 생리적 변동에 영향을 주지 않는 것을 추측할 수 있다. 이러한 결과를 통해 감성돔의 저 염분에 사육시 산란에 영향을 주지 않으며 온도와 광주기를 조절을 통해 순환수조내에서 자연 상태보다 빨리 종묘생산이 가능 할 것으로 사료된다.

난생어(卵生魚)의 알은 산출된 알의 비중이 주위의 물 또는 해수보다도 크고 작음에 따라 침성난과 부성난으로 나누어지며 참돔과에 속하는 어류는 대부분 분리부성난으로 1개의 유구를 가지고 있다(水戸, 1976). 본 연구에서도 참돔과 같은 어류에서 대부분 경우 1개의 유구를 관찰 할 수 있었지만, 때때로 2개 이상 관찰 되었다. 이러한 결과는 계속적인 산란으로 인한 어류의 영양 상태의 악화로 인해 발생하는 것으로 사료된다. 염분별 알의 부유 수위를 측정한 결과 26‰에서 모든 알의 표층에 뜨는 것을 확인되었다. 이러한 결과를 통해서 염분범위 26‰이상에서 종묘생산이 가능하다고 생각된다.

본 연구에서의 감성돔의 난경과 유구경은 각각 0.83-1.02 mm, 0.18-0.22 mm 였고, 다른 연구자의 결과를 살펴보면 妹尾(1912)는 0.75-0.90mm, 0.21mm, 平野 (1969)는

0.74-0.94mm, 0.17-0.23mm 伏見等 (1980)은 $0.89 \pm 0.02\text{mm}$ 로 보고하였고, Kim(1970)은 0.81-0.96mm 범위로서 5월초순의 이후의 것은 초기의 것보다 더 크다고 보고 되고 있지만 본 연구에 있어서는 초기에 산란된 난경과 유구경의 크기가 컸으며 점점 산란하면서 크기가 작아져 다소 차이를 보이고 있다. 이러한 결과는 순환수조내에서 충분한 영양공급을 통해 난경 및 크기가 큰 것으로 사료된다.

어류의 난은 온도에 의존하여 서식수온 범위 내 수온에 비례하여 발생 또는 부화 속도가 결정되지만 알의 부화율 또는 생존율은 이와 같은 상호작용은 일어나지 않으며 수온의 높낮이에 상관없이 최적수온 범위 내에서 최상으로 나타나는 것으로 Lee et al.,(1997)와 Han et al., (2001)의 연구에서 보고 되고 있으며 광염성 어류로 잘 알려진 농어는 가장 좋은 온도인 14°C 에서 부화율이 더 높은 것으로 보고 되고 있다(Han et al., 2001). 본 연구에서는 35‰에서 사육시 15와 20°C 보다 25°C 에서 수온에 비례하여 부화 속도가 빠르지만 20°C 에서 가장 높은 부화율이 나타났다. 염분과 관련하여, 35 ‰의 염분에서 가장 높은 부화율이 나타났으며, 이러한 연구결과는 *Penaeus merguensis* 어류의 연구에서도 나타내고 있다(Zacharia and Kakati, 2004). 일반적으로 경골어류 알은 성어의 체액 삼투도 (300-400 mosm)에 가까운 체내 삼투농도를 유지하며 (Alderdice, 1988), 일부 어종에서 낭배 형성기에 삼투조절과 이온전이(Alderdice, 1988) 및 배체 (embryo) 내 염세포의 존재 (Guggion, 1980; Hwang and Hirano, 1985)가 확인되었다. 이것은 중간 차이는 있을 수 있으나, 수정란이 초기 발생 동안 삼투조절이 능력을 갖고 있는 것이다. 그러나 삼투조절능력은 미세하고, 발달중인 배엽의 세포간 조밀성과 난막의 불침수성에 주로 의존적이어서 수동적 경향이 강하게 나타난다(Alderdice, 1988). 이것은 적은 경향이지만 부화시간 및 부화율에 영향을 미칠 수 있다는 것이다. 이와 관련하여 본 실험인 25°C , 10°C 에서 난의 부화가 되는 것을 관찰 할 수 있었으며 가자미의 난의 부화의 연구에서도 같은 결과가 나타났다(Lee et al., 1997). 이는 수정란이 모두 바닥으로 가라앉았다해서 폐사하는 것은 아니며 삼투조절을 갖고 있다는 것을 추측할 수 있다.

어류마다 삼투압 조절의 차이로 인해 성장과 생존은 각기 다른 차이를 보인다고 알려져 있다(Boeuf and Payan, 2001). 광염성 어류로 잘 알려진 송어에 있어서는 50%나 25% 해수에서 사육된 어류가 자연수보다도 생존율이 더 높은 결과를 얻었으며(Chang, et al., 1996), 농어에 있어서는 13, 20, 27, 37 ‰의 실험조건에서 사육된 어류 중 13 ‰에서 가장 높은 생존이 결과를 얻었지만(Han et al., 2001) 본 연구에서는 실험 종결시 10, 20, 35‰의 실험조건에서 사육된 어류 중 35 ‰에서 생존율이 가장 높아 기존의 연구자와 다소 다른 차이를 보였지만 감성돔의 종묘생

산에 관한 연구(Lee and Rho, 1987)에서 부화 후 1일된 자어에서 연구결과와는 유사하며 이는 어류마다 삼투압조절능력의 차이로 인해 발생하는 것으로 사료된다. 이러한 감성돔은 염분내성에 강한 어종일 것을 추측할 수 있으며 자치어의 사육시 염분에 상관없이 양식이 가능할 것을 생각된다. 그렇지만 이러한 염분의 변화는 어류의 생리적 변동 및 아가미구조의 변화를 가져와 성장둔화를 가져올 수 있기 때문에 염분에 따른 성장 실험이 뒤따라야 해야 한다.

결론적으로 광주기와 수온 및 염분농도의 조절을 통한 감성돔의 산란은 자연산란보다 빠른 결과를 얻었으며 이를 통해 일년 내내 인위적으로 산란이 가능할 것으로 사료되며 염분별 난발생은 20℃, 35‰에서 가장 높았다. 또한, 자치어의 염분별 생존율은 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 그와 더불어 추가적으로 종묘를 조기에 생산하여 우리나라의 양식 산업 활성화를 위해 다양한 어종을 이용하여 광주기와 수온 및 염분을 조절을 통한 효과적인 산란유도 및 좋은 종묘를 얻기 위한 지속적인 연구가 진행되어야 하며 이를 통해 생산된 어종의 다양한 염분에서 성장 및 생존에 관련된 연구들이 계속적으로 진행되어야 한다.

6. 해산어류 세포의 계대배양기술개발 및 재조합 단백질의 식품 안전성

가. 어류세포의 분리 및 배양조건 확립

(1) 넙치의 간세포의 배양

최근, 해산식량의 중요성이 부각되기 시작함에 따라 어류의 배양세포를 이용한 연구가 이루어져, 어류질병에 관련하여 몇몇의 배양세포주가 이용되고 있다. 그 대부분의 어류세포주는 전세계적으로, 어류 중 가장 중요한 자원으로 인식되고 있는, 연어과 어류를 중심으로 질병, 생리활성 및 약리학적인 연구 등 매우 다양하게 이루어지고 있다. 연어과 어류를 제외한 배양세포는 담수산 어류의 배양세포가 소수 이용되고 있는 형편이다. 도입 유전자의 발현 효율 등을 검증할 수 있는 in vitro system 구축을 위해 필수적인 해산어를 대상으로 한 cell line은 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 해산어류의 세포 분리 및 배양조건 확립을 위해 수행하였다.

현재, 어류의 세포분리에는 Collagenase 또는 Trypsin과 같은 포유류의 효소가 사용되어 지고 있다. 이러한 효소는 그 활성 온도가 36°C 전후이기 때문에 어류세포에 있어서는 효소활성에 따른 세포 손상이 나타난다(Yeo and Mugiya, 1997). 그렇기 때문에 어종에 따라 적합한 세포분리법의 검토가 이루어져야 한다.

본 연구에서는 기존의 어류 세포배양 기술을 바탕으로 넙치의 간세포의 분리를 실시하였다. 간세포의 경우에는 무지개송어의 간세포배양 기술을 도입하여 collagenase를 이용하였다. 넙치의 간세포의 경우 담수오류인 무지개송어에 비해 그 크기가 크고 혈관계 또한 복잡하여 무지개송어의 관류에서와 같이 관류액의 흐름이 용이하지 못하였다. 따라서 본 실험에서는 간세포의 표면의 모세혈관을 자른 상태에서 관류를 함으로서 원활한 관류를 할 수가 있었다. 그러나, 모세혈관을 잘라내어 collagenase가 포함된 관류액이 침투되지 못한 세포들은 분리가 이루어지지 않으므로 3회 세척 시에 제거하였다. 이상의 방법을 이용하여 다음과 같은 순서를 통하여 간세포 초대배양을 실시하였다.

넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 제주대학교 해양연구소에서 사육한 체중 640 ± 24 g을 사용하였다. 넙치는 0.01% 2-phenoxyethanol로 마취를 시킨 후, 담낭과 같이 간장을 분리하였다. 간문맥에 Ca^{2+} 이 포함되지 않은 관류용 buffer (120 mM NaCl, 1.22 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4 , 23 mM $NaHCO_3$, pH 7.4)를 약 10분간 관류하였다 (5~8 ml/min.). 그 후 Collagenase (0.3 mg/ml; Sigma) 및 소혈청 알부민 (0.98 mg/ml; Sigma)을 포함한 관류용 buffer 에 약 20분간 (5~8 ml/min.), 2 mM EDTA를 첨가하여 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 을 제거한 관류용 buffer 에 약 10분간 각각 관류하였다. 관류 후 간장은 100ml 비이커에 넣어 Ca^{2+} -free 관류용 buffer로 3회 세척한 후, 50 ml의 관류용 buffer 내에서 해부가위로 잘게 분산시켰다. 분산된 간세포는 pipet

으로 더욱 분리 여과시킨 후에 원심분리 (700 rpm, 2분)를 3회 반복하여 간싯질세포 이외의 성분 (비싯질세포, 파열 세포, 세포의 파편 및 적혈구 등)을 제거하였다.

간세포는 positive-charge를 행한 250 ml T/C 플라스크 (Falcon)에 2×10^6 개를 넣어 배양하였다. 배양에는 0.2 μ M Bovine insulin (Sigma), Streptomycin (100 μ g/ml), Penicillin (70 μ g/ml), 및 NaHCO₃ (23 mM)을 첨가한 William's medium (Life Technol. Inc.)을 이용하였다. 간세포는 배양액 20 ml를 첨가하여 배양하였다. 사전 배양은 3일간 행하고, 배양액은 3일 간격으로 교환하였다. 배양세포의 생존율은 실험 종료 후 0.03% EDTA를 포함한 인산Buffer (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄)를 첨가해 진동시켜 배양접시로부터 분리시켰다. 핵 염색은 0.05% crystal violet이 포함된 0.1M citric acid로 2시간 동안 행하였고, 핵 수는 Thomas 혈구계산판을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 넙치의 간세포는 collagenase에 의해 한 마리 당 8.5×10^8 개의 간세포가 분리되었으며, 그때의 생존율은 90% 이상으로 나타났다.

한편, 배양세포의 상태는 3일간의 사전배양을 통해 T/C 플라스크에 넓게 확산되어 부착되었다. 그 후 배양을 지속함에 따라 7~10개 정도의 작은 세포덩어리가 점점 하나의 큰 덩어리로 중합되어 단층으로 확산되었다.

그러나, 상기에서 사용한 William's medium을 첨가하지 않고 일반적으로 많이 이용되는 Leibovitz-15 medium을 사용했을 경우에는, 전체적인 배양시간의 연장은 가능하였으나, William's medium에 비해 세포의 단층부착의 시간은 다소 늦어지는 것으로 나타났다. 또한 세포에서 생성되는 전체 단백질의 양을 배양 후 10일째 측정된 결과 약 18%로 William's medium을 사용하여 배양한 결과가 높은 것으로 나타났다.

세포의 생존율과 단층확산 정도는 배양액 외에도 사용되어진 플라스크의 종류에 따라서도 큰 차이를 나타내었다. 본 연구에서 주로 사용한 Falcon사의 positive-charge를 한 플라스크가 보다 간세포의 생존에는 적합한 것으로 나타났다. 대조군으로 사용된 TPP사의 플라스크에서는 세포의 확산이 다소 늦어지는 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 해양어류의 간세포의 배양에는 positive-charge를 한 플라스크가 보다 적합한 것으로 여겨진다.

다음으로 배양적정온도를 조사하기 위하여 15°C ~ 30°C의 구간에서 2.5°C 간격으로 7구간을 설정하여 실험을 하였다. 적정온도의 판정은 생존세포수의 판별을 통하여 이루어졌다.

15~30℃의 7구간의 실험군에 대한 배양 간세포의 생존율을 나타낸 것이다. 넙치의 배양 간세포는 27.5℃에서 배양 후 4일 및 8일에 각각 14.9% 및 17.9%로 감소하여 가장 높은 생존율을 나타내었다. 그러나, 20~27.5℃에서의 배양조건에서는 유의한 차이는 나타나지 않았다. 17.5℃에 있어서는 생존율이 가장 높은 27.5℃ 실험군에 비해 유의하게 낮은 생존율을 나타내었다($P<0.05$). 특히, 15℃의 저온에서는 배양 후 4일 및 8일에 각각 39.6% 및 47.6%로 급격히 생존율이 감소하였으며, 생존 세포에 있어서도 간세포배양에서 나타나는 작은 세포 덩어리를 형성하지 못하였다.

어류에 있어서의 간세포 배양은 뱀장어, 무지개송어를 대상으로 이루어져 왔으나(Peyon et al., 1993; Yeo, 1998), 포유류에 비해 세포의 부착 및 성장에 있어 미흡한 면이 많다. 특히, 해산어류에 있어서의 간세포 배양에 관한 연구는 전무한 상태이다. 어류는 그 종에 따라 서식 환경, 특히 적정수온이 달라 간세포배양에 이용되는 효소(collagenase)의 작용과 세포에 적합한 온도의 설정이 사전에 이루어져야 한다. 본 연구에서는 15℃~30℃의 범위에서 간세포를 배양한 결과, 27.5℃가 가장 높은 생존율을 나타내었다 (Fig. 48). 배양 간세포의 생존율은 17.5℃이하에서 급격히 낮아지는 경향을 나타내었다. 일반적으로 넙치의 산란기 수온은 11℃~23℃로 알려져 있으므로, VTG의 합성을 위한 간세포 배양 적정온도는 27.5℃의 생존율과 유의한 차이를 나타내지 않은 20℃~25℃의 범위가 적합한 것으로 여겨진다.

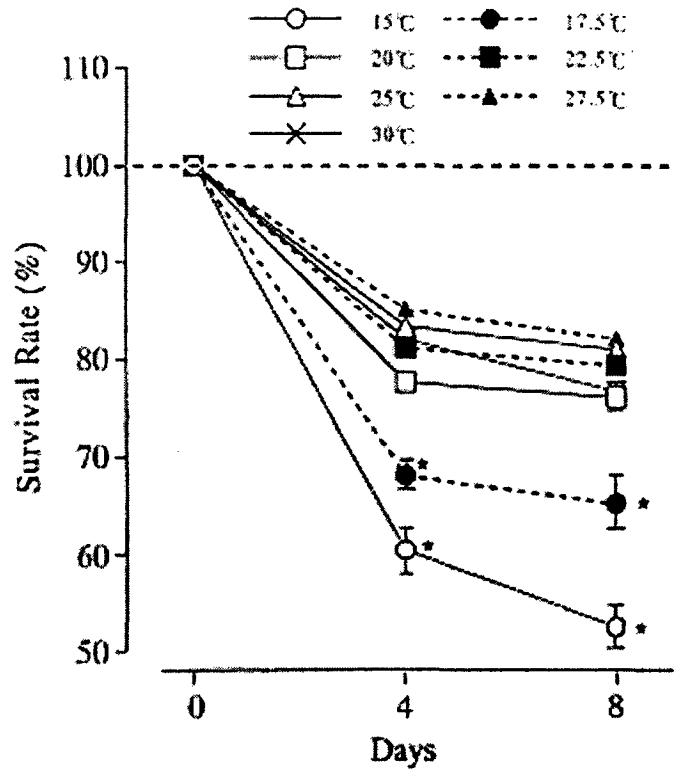


Fig. 34. Effect of temperature on the survival rate in primary culture of olive flounder hepatocytes for 8 days. Vertical bars represent the average (mean±SE) percentage of five experiments. $P < 0.01$ for 27.5°C.

(2) 넙치의 비장세포의 계대 배양

넙치의 비장세포의 배양은 다음과 같은 순서로 배양을 실시하였다. 먼저, 비장 세포를 PBS (KH_2PO_3 0.82g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$ 3.41g, NaCl 7.01g, NaN_3 1g / 1ℓ)로 3회 세척하여 가위로 잘게 썰러 분리하였다. 분리된 비장세포는 거즈로 여과한 후 positive-charge를 행한 250 ml T/C 플라스크 (Falcon)에 2×10^{-6} 개를 넣어 배양하였다. 배양액은 minimum essential medium(MEM, pH 7.2~7.4))를 사용하였다. MEM에는 fetal bovine serum(FBS), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin (70 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 및 NaHCO_3 (7.5%)를 첨가하여 사용을 하였다. 배양온도는 24°C로 하였으며, 배양 10일 후의 세포는 0.1M EDTA로 가볍게 세척한 후 Versen-Trypsin 용액 (NaCl 8g, KH_2PO_4 0.2g,

KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g, EDTA 0.2g / 1 ℓ with 0.1% trypsin)을 1~2분간 처리한 후 깨끗하게 제거하였다. 그 후 다시 1ml의 Versen-Trypsin 용액을 첨가하여 4~6분간 처리하여 세포를 분리하여 새로운 MEM을 2ml 첨가하여 진동시켜 세포를 완전히 부유시킨 후 세포를 계수하였다. 계수 후 2×10⁻⁶M의 세포가 되도록 조정하여 다시 배양을 하였다. 배양액의 회수시에 이때 비장의 세포수는 약 113% 증가하는 것으로 나타났다. 이상과 같은 작업을 반복하여 계대배양을 실시하고 있다.

(3) 어류의 cell line 수립

비장세포의 계대배양법은 효소를 이용한 분리법은 물리적인 방법에 비해 회수율이 약 1.7배 이상 높은 것으로 나타나, 세포의 분리는 효소를 이용한 분리가 보다 효과적인 것으로 판단되었다. 배양온도는 24℃로 하였으며, 배양 10일 후의 세포는 배양 시작의 세포보다 평균 125%의 증가가 나타났다. 계대배양된 배양세포의 증가는 일반적으로 계대배양이 이루어지고 있는 세포주에 비해 증식이 늦은 것으로 나타났다. 한편, 배양세포에서 생산된 단백질의 농도는 현저히 낮게 나타났다. 즉, *in vitro*의 비장세포는 그 활성이 *in vivo*에 비하여 대단히 낮은 것으로 여겨진다.

동결보존에 따른 간세포의 생존율은 동결보존제의 사용 전에는 82.3%를 나타내었다. DMSO의 15%가 가장 높은 51.3%를 나타내었으나, 10% 첨가구와 유의한 차이를 나타내지 않았다. 5%의 첨가구에서는 가장 낮은 생존율을 나타내었다(Fig. 49).

안정적인 동결보존제로 알려진 액체질소에 최종 보존한 완속동결구인 실험구 3과 급속동결구인 실험구 4에서는 각각 생존율이 약 32.5% 및 30%의 감소를 나타내어 -80℃ 보존 실험구보다 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과로 토대로 동결보존의 경시적 경과에 따른 생존율의 변화를 조사하였다. 그 결과 완속동결법을 이용한 방법 및 급속동결법을 이용한 방법에서 경시적인 변화에 따른 생존율의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 50, 51).

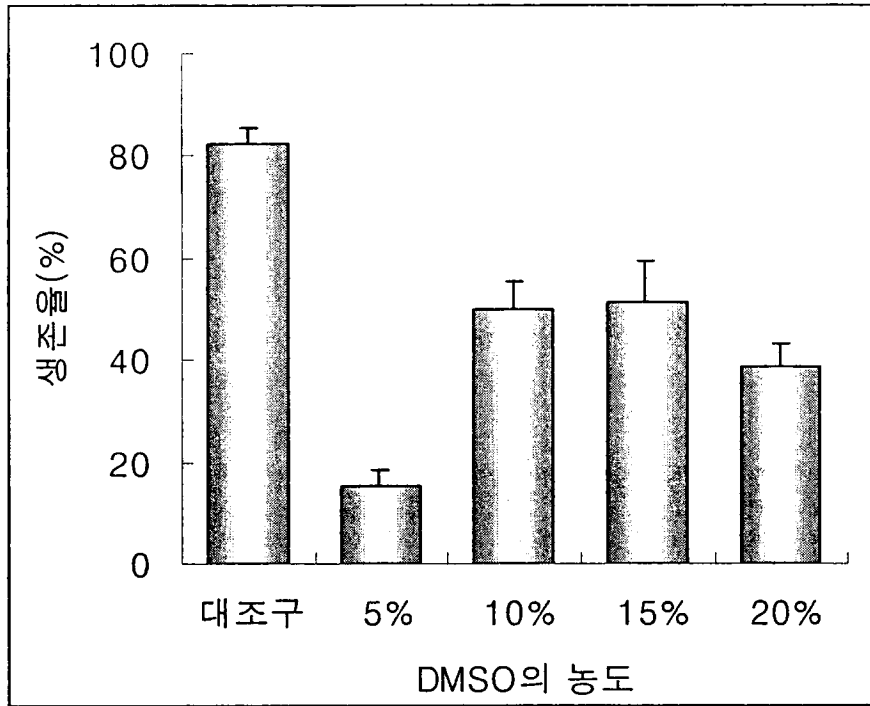


Fig. 49. 동결보존액인 DMSO의 농도에 따른 세포의 생존율.

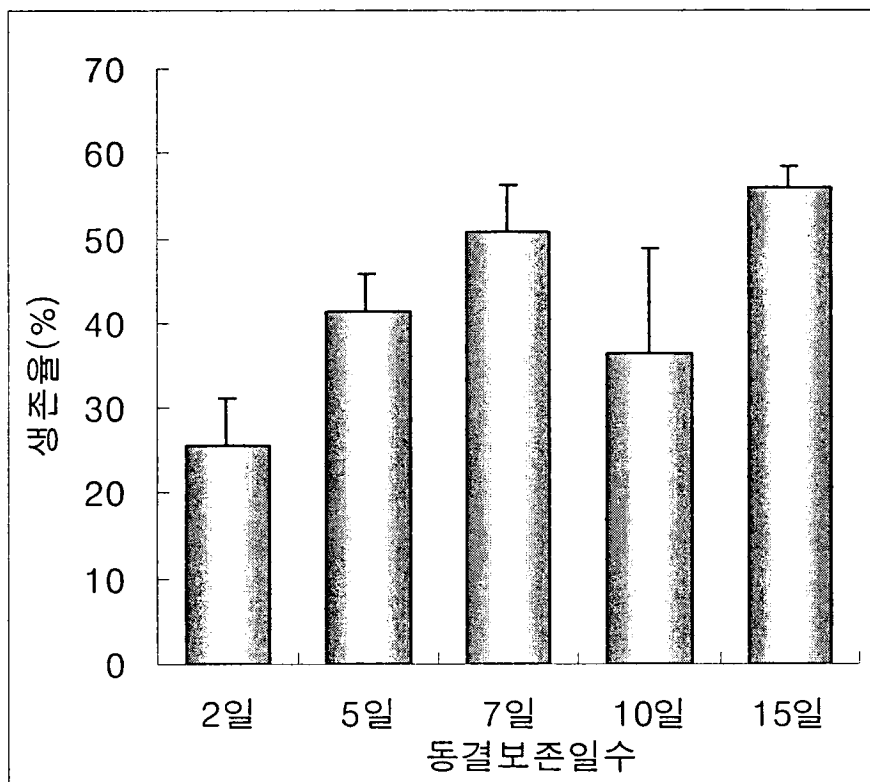


Fig. 50. 완속동결보존에 따른 경시적 배양세포 생존율의 변화.

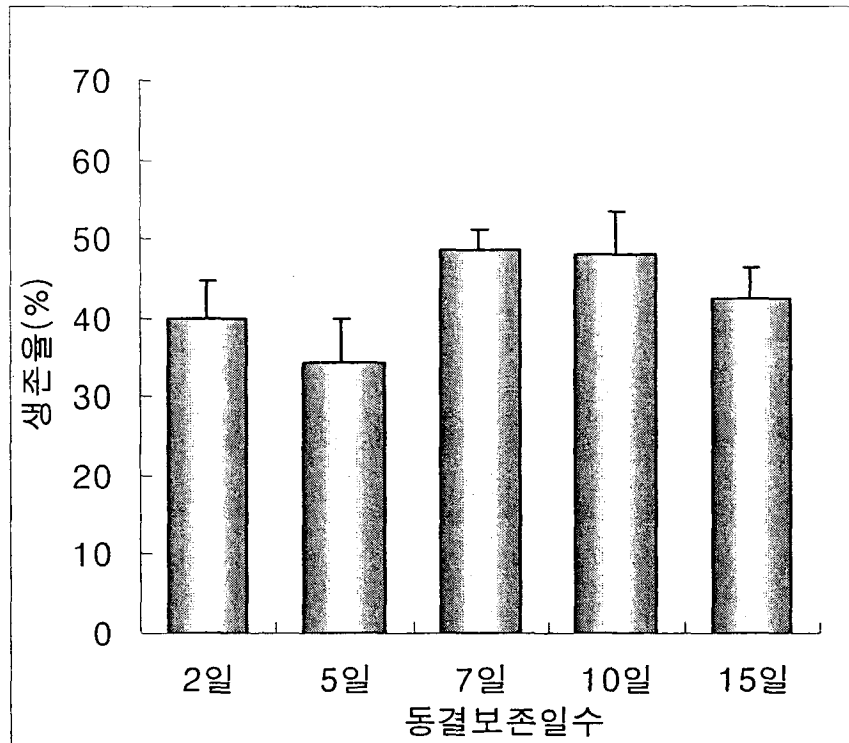


Fig. 51. 급속동결보존에 의한 경시적 배양세포 생존율의 변화.

나. 쥐의 재조합 성장호르몬의 급성독성 검정

각 동물에 고유한 성장호르몬들이 유전공학적 기법으로 대량으로 생산됨으로써 유전적으로 변이된 동물들을 섭취하는 인간에 대한 안전성 문제가 대두되고 있다. 아직까지 유전공학적으로 제조된 성장 호르몬으로 사육한 동물에 대한 이상적 증상에 관한 보고는 매우 드문 편이지만 성장 호르몬 그 자체가 단백질로서 예기치 못하는 면역반응을 야기시킬 수가 있다. 또한 근육 등에 축적된 성장 호르몬에 의한 인간의 면역 반응에 대하여 그 안전성이 명확하게 검토되어야 할 것이다.

본 시험에는 한국화학연구소 안전성 연구부 실험동물 육종실로부터 입수한 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 5~6주령의 암·수 각각 30 마리씩 총 60 마리를 입수한 후 1주일간 검역과 순화 사육을 거쳐 평균 체중에 가까운 건강한 암·수 각각

25 마리씩 선정하여 총 50 마리를 선별해 시험에 사용하였다. 선별된 랫드는 1 마리씩 각각 별도의 케이지에 넣고 사육하였다. 본 실험은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 5 %, 환기 회수 10~12 회/hr, 조명시간 12 hr, 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시되었다. 사료는 실험동물용 고형사료(삼양사료주식회사)를, 물은 상수도수를 자유 섭취시켰다.

암·수 각각 5마리씩의 랫드에 시험물질을 넙치의 성장호르몬으로서 최적 효능을 나타낼 것으로 추정된 용량의 1, 10, 100 및 1000배인 랫드 체중 kg 당 1, 10, 100, 및 1000 mg을 투여하였지만(Table 10), 모든 실험 동물군에서 전혀 사망한 예를 관찰하지 못하였다(Table 11). 시험 전기간을 통하여 넙치 성장 호르몬을 경구투여한 랫드에서, 본 시험물질에 의한다고 생각되는 특이한 임상증상도 전혀 관찰되지 않았다. 체중변화 또한 시험 전기간을 통하여 경구투여한 각 랫드의 암·수 투여군 모두에서, 대조군과의 유의성 있는 차이는 전혀 관찰되지 않았다(Table 12). 그리고, 생존동물의 부검에서도 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 병변현상은 발견되지 않았다(Table 13). 따라서, 대장균에서 발현시킨 넙치 성장 호르몬에 대한 생체내 안전성을 검토하고자, Sprague-Dawley 랫드를 대상으로 급성독성시험을 실시하였다. 넙치 성장 호르몬을 효능 용량인 1 mg/kg보다 1000배인 1,000mg/kg을 경구투여한 후 7일간 관찰한 결과 사망이나, 체중변화 및 병변현상 등을 전혀 발견할 수 없었으며, 병리조직학적 관찰에서도 대조구에 비하여 유의한 증상은 발견하지 못하였다. 이러한 결과로 미루어, 넙치 성장 호르몬은 생체내 급성독성현상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

Table 10. Experimental design for acute oral toxicity study of flounder growth hormone (FGH)

Group	Dose (mg/kg)	No. of Animals	
		Male	Female
Control	-	5	5
FGH1 (critical dose)	1	5	5
FGH2 (10 times dose)	10	5	5
FGH3 (100 times dose)	100	5	5
FGH4 (1000 times dose)	1000	5	5

Table 11. Mortality and clinical findings in SD rats administered orally with FGH

Group	Dose (mg/kg)	Final Mortality		Clinical Findings	
		Male	Female	Male	Female
FGH1	1	0/5	0/5	- ¹	-
FGH2	10	0/5	0/5	-	-
FGH3	100	0/5	0/5	-	-
FGH4	1000	0/5	0/5	-	-
Control	0	0/5	0/5	-	-

¹No abnormality was detected

Table 12. Changes of body weights in SD rats administered orally with FGH

Sex	Days after treatment	Groups	FGH1	FGH2	FGH3	FGH4	Control
F	0	Mean	112.1	119.4	120.0	121.8	119.9
		S. D.	±0.14	±0.47	±0.39	±0.44	±0.52
		N	5	5	5	5	5
	7	Mean	158.7	160.1	158.1	155.2	161.1
		S. D.	±0.58	±1.03	±0.68	±0.52	±0.99
		N	5	5	5	5	5
M	0	Mean	139.2	141.1	143.4	143.7	142.7
		S. D.	±0.21	±0.52	±0.79	±0.29	±1.05
		N	5	5	5	5	5
	7	Mean	188.3	190.3	198.8	189.8	195.4
		S. D.	±0.78	±0.87	±1.72	±1.38	±0.97
		N	5	5	5	5	5

M : Male, F : Female, N : No. of animals examined

Values represent mean ± S.D. for 5 rats

Table 13. Gross findings of necropsy in SD rats administered orally with FGH

Group	Dose (mg/kg)	Male		Female	
		NO ¹	NGF ²	NO	NGF
FGH1	1	5	5	5	5
FGH2	10	5	5	5	5
FGH3	100	5	5	5	5
FGH4	1000	5	5	5	5
Control	0	5	5	5	5

¹No. of observations, ²NGF : No gross findings

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도

목표달성도

- 주요양식어류 6종(붉바리, 참복, 능성어, 넙치, 돌돔, 감성돔)으로부터 성장호르몬 cDNA 유전자 분리하였음.
- 주요양식어류 5종(자주복, 능성어, 붉바리, 돌돔, 자바리)으로부터 Insulin-like growth factor (IGF-1)의 분리하였음.
- Zebrafish로부터 내병성관련 transferrin과 thioredoxin (natural killer cell enhancement factor) cDNA 유전자를 분리하였으며 주요양식어류 5종(능성어, 조피볼락, 돌돔, 붉바리, 자주복)의 transferrin internal sequence 단편을 얻음..
- 벡터개발을 위한 promotor로서 넙치, 참복, 돌돔, 붉바리, 자바리, 능성어의 6종으로부터 β -actin 유전자와 zebrafish의 thioredoxin promotor 분리하였음.
- 계획서 상에 총 10개의 유용유전자를 분리하는 것으로 했으나 5개의 transferrin internal sequence 단편을 포함하면 총 25개의 유전자를 분리하였음.
- 연구 대상어류의 재조합 성장호르몬 단백질 생산하였음.
- 재조합 단백질의 성장효과를 검증하였음.
- 모델어류를 이용하여 이식백터의 발현양상을 조사하였음.
- 연구대상어류의 세포 계대배양법을 확립하였음.
- 재조합성장호르몬의 식품으로서의 안전성을 검증하였음.

기여도

성장과 내병성관련 유전자를 분리, 확보함에 따라서 이들 유전자를 이용한 어류의 육종뿐만 아니라 양식어류를 대상으로 한 BT산업에 다양하게 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 학문적 활용

분리된 유전자를 이용한 어류의 성장 관련 연구의 활성화

어류의 내병성 관련 연구의 활성화

관련 연구에 관심이 있는 연구자와 공동연구를 통해서 활용도를 높일 예정임

○ 산업적 활용계획

현재 결과 활용을 위한 다각도의 연구가 진행되고 있어서 재조합 성장호르몬의 산업적 이용에 대한 가부간의 결론이 날 것으로 생각되며 이 경우 특히 어류의 건사료 개발에 있어서 큰 전기가 될 것으로 생각됨.

○ 교육·홍보 활용

이 연구결과 다수의 유전자 분리와 염기서열을 확보를 하였으나 이를 활용하기 전에 보고할 경우 다른 사람에 의해서 쉽게 이용될 수 있기 때문에 공식적으로 결과를 공표하는 하기는 어려운 실정임. 따라서 5개의 특허출원을 계획(넙치, 돌돔, 붉바리, 자바리, 능성어 액틴프로모터 유전자)하고 있으나 이를 위해서는 약간의 보강연구가 있어야하여 진행 중에 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

재조합 성장호르몬과 형질전환 동식물의 식품으로서의 안전성에 관한 연구는 실시되고 있다고 생각되어지나 공식적으로 발표되는 경우는 거의 없다. 그런데 이 연구를 진행하는 동안 드물게 형질전환 어류의 식품으로서의 안전성에 관한 연구가 쿠바에서 실시되어 발표된 논문을 입수하여 그 개략적인 내용을 소개하면 아래와 같다.

Safety Evaluation of Transgenic Tilapia with Accelerated Growth

속성장 형질전환 틸라피아의 안전성 평가

요약

최근에는 해양생물공학의 눈부신 발전으로 인하여 성장호르몬 유전자 전이 방법을 사용하여 경제적으로 중요한 새로운 물고기의 계통을 만들 수 있게 되었다. 이들 형질전환 물고기 계통은 현저한 성장 개선을 보이며 양식산업의 생산성을 높여주는 좋은 방안으로 대두되고 있다. 최근에 성장개선 형질전환 틸라피아 계통을 만들었으나 실제 양식장에서 이들 어류들을 키우기 전에 정부당국으로 식품안전성과 환경적인 영향에 대한 평가를 요구하였다. 따라서 형질전환 틸라피아를 양식장에 방출했을 경우의 환경에 미치는 영향을 평가하기 위하여 형질전환 틸라피아가 야생의 틸라피아와 그들의 행태에 어떠한 차이가 있는지를 비교하는 실험을 실시하였다. 동등성의 원칙에 따라서 식품으로서 형질전환 틸라피아의 소비시 안전성을 평가하였다. 행동학 연구는 형질전환 틸라피아는 야생형 대조군에 비해서 낮은 식욕을 보였으며 사육 중인 비형질전환 대조군 어류와 비교해서 우점하는 행동을 나타내었다. 식품 안전성 평가에서 형질전환 틸라피아의 성장호르몬이 사람을 제외한 영장류에 급이되었을 경우 생물학적인 기능은 관찰되지 않았다. 더군다나, 건강한 지원자를 대상으로 형질전환 틸라피아를 섭취하게 하였을 경우에도 어떠한 영향도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 양식장에서 형질전환 틸라피아를 키울 경우에 환경적인 영향이 없으며 사람이 형질전환 틸라피아의 성장호르몬을 소비할 경우에도 안전성에는 문제가 되지 않는다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 형질전환 틸라피아의 양식과 소비를 지지하는 쪽으로 결론이 났다.

지난 수년동안 세계적인 어획량은 지속적인 연간 최대 생산 수준인 약 1억 톤에 도달하였으며(Beddington 1995). 이는 양식을 통하여 수산물 생산의 증대를 꾀해야 한다는 것을 의미하고 있다. 현대의 생물공학 기술은 수산동물의 주요한 형질을 조절할 수 있는 가능성을 제시하고 있다(de la Fuente 1998). 예를 들면, 성장호르몬 유전자를 도입하면 양식을 위한 새로운 어류 계통을 개발할 수 있다는 것이다(Hew and Gong 1992; Maclean and Rahman 1994; de la Fuente et al. 1995, 1996; de la Fuente 1998). 틸라피아는 세계 각국에서 경제적으로 매우 중요한 종으로 쿠바에서는 담수어류 생산고의 70% 이상을 차지하고 있다. 이 어류는 시장에서 거래되는 크기인 무게 250g까지 자라는데 약 6개월이 소요되며(Tave 1993) 효과적인 선발 육종 프로그램을 위한 변이계수와 유전율을 나타내었다(Oldorf et al. 1989; Sańchez et al. 1994; Martı́nez et al. 1996). 따라서, 성장촉진을 위한 이들 어류들의 유전자 조작은 대단히 중요하다. 형질전환 *O. hornorum* 잡종 틸라피아는 인간의 cytomegalovirus (CMV)의 촉진유전자를 틸라피아의 성장 호르몬 cDNA 그리고 SV40 바이러스의 폴리아데닐 장소에 연결하여 만들어진 벡터를 사용하여 만들어졌다(Martı́nez et al. 1996). 세포 당 하나의 도입유전자를 가지는 형질전환된 P1 수컷이 형질전환 어류의 계통을 확립하는데 사용되었다. 이 도입 유전자는 F1, F2, F3 그리고 F4 세대까지 멘델유전양식으로 자손에게 전달되었으며 이는 숙주 계놈으로 도입유전자가 안정적으로 도입되었다는 것을 의미한다(de la Fuente et al. 1996; Guilleń et al. 1996; Martı́nez et al. 1996). 틸라피아 성장호르몬의 발현은 F1과 F2 세대의 형질전환 어류의 생식소, 간, 뇌, 그리고 근육세포에서 약하게 관찰되었다(Martı́nez et al. 1996; Hernáńdez et al. 1997). 틸라피아 성장호르몬의 다면 발현이 표현형에 미치는 영향을 조사하기 위하여 F1과 F2 세대 형질전환 어류의 성장률을 대조구 자매종과 비교, 분석하였다. 처음 실험에서 4개월 된 F1 형질전환 어류 18마리와 대조구 자매종 20마리를 대상으로 비슷한 성장 조건에서 5개월 간의 성장을 조사한 결과 평균체중에서 82%의 성장 촉진을 관찰할 수 있었다($P = 0.001$) (Martı́nez et al. 1996). 두번째 실험에서 14마리의 4개월과 7개월 된 F2 형질전환 틸라피아를 대상으로 성장을 본 결과 11마리의 대조구 자매종에 비해서 각각 37%와 55%의 성장 촉진을 보이는 것으로 나타났다 ($P = 0.01$ and $P = 0.009$, respectively) (Guilleń et al. 1996). 마지막으로 고밀도 사육조건에서 동형 F2세대와 야생 틸라피아를 교잡시켜서 만든 F3세대 형질전환 어류는 대조구에 비해서 22,5% 정도의 성장 촉진을 보였다(Cabezas et al. 1997). 이러한 실험 결과는 형질전환 물고기를

통한 어류의 육종이 어류에게 악영향을 미치지 않는다는 것과 이를 이용한 양식 프로그램으로 사용되어 질 수 있다는 것을 보여준다. 그러나 이러한 새로운 어류 계통을 양식 프로그램에 도입 할 경우, 틸라피아에 도입되는 성장호르몬이 환경적인 측면과 식품안전성 측면에서 어떠한 영향을 줄 것인지를 잘 설명해 줄 수 있는 보다 조심스러운 평가가 있어야 한다. 국가 양식 프로그램으로 형질전환 틸라피아 도입을 하기 위하여 틸라피아의 성장호르몬이 분리된 포유류와 그들의 세포에서 생물학적인 반응을 일으키는지를 알아보기 위해서 다음의 몇가지 실험을 진행하였고 결과적으로 속성장 형질전환 틸라피아의 인간 소비가 인간에게 무해하며 문제가 없는 것으로 나타났다.

결과

Behavior of Transgenic Tilapia

형질전환 틸라피아의 행동학

형질전환 틸라피아를 대상으로 식욕정도, 우점정도, 그리고 50% 해수에 노출시켰을 경우 혈장내 나트륨 이온 수준의 변화를 분석하였다. 그 결과 형질전환 어류는 비형질전환 사육어류에 비해서 높은 식욕을 보였으나 그들의 야생형 대조구 어류에 비해서는 낮은 식욕을 나타내었다. 야생형의 공격적인 행동을 고려할 때 야생형과 형질전환 그리고 비형질전환 어류 사이에는 먹이에 대한 경쟁이 있을 것으로 판단되었다. 약간의 어류들은 먹이가 떨어지는 곳에서 머물면서 먹이 확보 시에 이를 위한 강한 우점 행동을 보였다. 야생형 틸라피아가 형질전환과 비형질전환 자매 틸라피아보다 강한 우점정도를 보였다. 그리고 형질전환과 비형질전환 틸라피아를 비교할 경우, 이들은 야생종에 비해서 우점 경쟁이 다소 덜 하였지만 형질전환 어류의 자어가 비형질전환어류의 자어에 비해서 식탐이 활발했다. 비록 실험구 당 3마리를 대상으로 실험을 실시하였지만 50%의 해수에 노출시킨 형질전환 틸라피아의 혈장 나트륨이온의 수준은 현저히 변하지 않았으나($P = 0.1$; t test) 야생종과 비형질전환 어류에서는 차이를 나타내었다($P = 0.03$; t test).

Evaluation of Effect of Recombinant tiGH on Mammals

재조합 틸라피아 성장호르몬이 포유동물에 미치는 영향 평가

포유동물에 미치는 어류의 성장호르몬의 생물학적인 영향 평가에 관한 자료는 거의 없는 실정이다(Farmer et al. 1977; Skibeli et al. 1990). 이 실험에서는 시험관과 동물실험을 통해서 재조합 티라피아 성장호르몬이 포유동물의 조직과 동물에 미치는 영향을 조사하였다.

시험관내에서 토끼의 연골에 미치는 티라피아 성장호르몬의 영향

티라피아 성장호르몬을 각각 of 1, 10, 그리고 20 µg/ml 농도로 처리하였을 경우 토끼의 연골에서 방사능 표지된 인산염의 농도가 증가되지는 않았다. 그리고 다른 연구자에 의한 실험의 결과에서는 재조합 티라피아 성장호르몬을 1 µg/ml의 농도로 처리한 결과 티라피아의 연골의 신장부위에서 인산염의 증가가 관찰되었다는 보고가 있다(Guille'n et al. 1998a). 양성 대조구로 사용한 소의 인슐린과 인간의 성장호르몬을 1, 10 그리고 20 µg/ml 농도로 처리하였을 경우 인산염의 증가가 관찰되었다.

In Vivo Activity of tiGH Administered to Nonhuman Primates

사람이 아닌 영장류에서 티라피아 성장호르몬을 섭취할 경우 나타나는 영향

동등성의 기준에 따라서(Jonas 1996; Guille'n et al. 1998b), 티라피아 재조합 성장호르몬을 사람을 제외한 영장류를 대상으로 단기간 섭취를 시킨 후 그들의 혈액과 혈청의 성분 분석과 체성장 요소에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 실험을 설계하고 실시하였다. 실험에 쓰인 짧은 꼬리 원숭이의 사육과 사료공급에 관한 사항은 엄격히 관리하였다. 섭취량과 일반적인 행동을 포함하는 일일 임상기록이 각 개체를 대상으로 작성되었다.

Clinical findings.

임상조건

일일 임상기록에 따르면 재조합 티라피아 성장호르몬은 동물의 행동패턴이나

자발적인 섭이욕구에 영향을 미치지 않았다. 약물독성이나 대사이상 시 어류의 체중에 영향을 미치는 점을 고려할 때 처리한 성장호르몬이 어류의 체중의 증감에 영향을 줄 수 있기 때문에 실험 전 2주일 동안 매일 체중을 측정하였으며 실험 기간 동안에도 매일 측정을 하였다.

실험시작 시에 어린 긴꼬리 원숭이의 2개 그룹에서 체중의 차이를 나타내었기 때문에 각 그룹의 실험 전 그리고 실험 기간동안의 체중을 서로 비교하였다.

틸라피아 성장호르몬 처리는 이들의 체중에 통계학적으로 유의한 변화를 가져오지 않았으며 실험 기간동안 틸라피아 성장호르몬을 처리한 긴꼬리 원숭이에서 통계적으로 유의한 심박수의 증가가 관찰되었다. 그러나 이러한 심박수 증가 현상은 대조구에서도 같은 시기에 관찰되었으며 이는 아마도 이 원숭이의 생리적인 현상인 것으로 유추하고 있다(Richter et al. 1984; Olfert et al. 1993). 그리고 심박수의 증가는 호흡률, 체온 또는 혈액성상과의 관련은 없는 것으로 나타났다. 호흡률은 실험 기간동안 틸라피아 호르몬 처리구와 대조구에서 비슷하게 나타났다. 체온의 편차는 실험기간동안의 틸라피아 성장호르몬의 직간접적인 영향일 수 있으나 실험구와 대조구에서 유의한 차이는 보이지 않았다.

Serum and blood profiles.

혈청과혈액성상

일반적으로 성장호르몬은 단백질과 탄수화물 대사에 커다란 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 틸라피아 성장호르몬이 혈청 내 포도당, 총 단백질 그리고 creatinine의 변화가 영향을 미치는지를 조사하였다. 혈청 내 포도당, 단백질, creatinine의량은 실험 종료 시 각 그룹 간에서 유의한 차이를 보이지 않았을 뿐만 아니라 각 그룹에서 실험 전 후 사이에서도 어떠한 차이를 보이지 않았다. 이와 비슷하게 헤모글로빈량, 적혈구수, 총 백혈구수 그리고 전체 세포부피(packed cell volume, PCV)에서도 차이를 보이지 않았다.

Somatometric findings.

신체측정

틸라피아 성장호르몬의 지방 제거 효과를 알아 보기 위하여 적응 시부터 사망할 때 까지 견갑골(interscapular) 과 왼쪽 옆구리의 피부 주름을 측정하였다. 실험 결과 실험 전과 후 그리고 실험 기간 중 그룹간의 유의한 차이를 관찰 할 수 없었기 때문에 현 시점에서는 30일 동안의 틸라피아 성장호르몬을 먹인 긴꼬리 원숭이에게서 영양적인 그리고 대사적인 영향이 없는 것으로 결론지었다. 신체 성장의 지표로서 머리에서 꼬리까지의 길이를 사용한다. 그러나 틸라피아 성장호르몬에 의한 성장의 영향을 보기에는 섭이 기간과 평가 기간이 짧다고 생각된다. 그럼에도 불구하고 이들 요인들에서 차이점은 발견되지 않았다. 편평골의 확장(flat bone-enlargement)을 보기 위해서 두개골의 둘레와 직경을 측정하였으나 유의한 차이는 나타내지 않았다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 틸라피아 성장호르몬은 신체의 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

Morphological findings.

형태에 미치는 영향

부검 시에는 장기적출과 장기 등록 후 철저한 현장 조사를 실시하였다. 부검 시 현미경을 이용한 검사에서 모든 기관, 조직, 그리고 공간은 대조구와 실험구에서 비슷한 무게를 보였으며 정상적이었다. 그리고 성장호르몬이 작용하는 기관으로 생각되는 허, 간, 근육, 심장, 신장 등을 포함한 장소에서의 현미경적인 변화는 관찰되지 않았다. 더군다나 장간막과 신장주위 지방이나 복부피하지방은 실험구에서 줄어들지 않고 정상적이었으며 보통의 색과 모양을 나타내었다. 그리고 특정 조직의 호르몬에 대한 반응과 일반적이거나 특정 부위에서의 독성작용을 확인하기 위하여 병리조직학적인 조사를 하였다. 그 결과 전반적으로 틸라피아 성장호르몬 처리는 실험동물에 해를 미치지 않는 것으로 나타났으며 어떤 조직과 기관에서도 형태적인 변화는 관찰되지 않았다.

Evaluation of Consumption of Transgenic Tilapia by Human Healthy Volunteers 자원봉사자를 대상으로 형질전환 틸라피아 소비에 의한 건강 평가

지금까지 도입 성장호르몬 유전자를 가진 어류를 인간이 소비함으로써 미칠 수 있는 잠재적인 위해에 관한 조사는 시도된 바 없기 때문에 건강한 자원봉사자를 대상으로 무작위적이고 대상자가 식품을 구분할 수 없는 조건에서 실험을 실시하였다. 그 결과 형질전환 어류가 나은 맛을 보이는 것으로 나타났으며 실험 대상 그룹 사이에 실험 시작 전 후에 조사한 임상적인 그리고 생화학적 조사항목에서 차이를 보이지 않았다.

DISCUSSION

큐바에서 속성장 형질전환 틸라피아를 생산하여 실험실 밖에서 형질전환 어류를 사육하기 위하여 이들 어류의 생태적인 영향을 평가하였다. 이를 위해서 위원회에서 관련 문제를 토의하였다(de la Fuente et al. 1996). 위원회에서는 큐바에서 관찰된 조건 하에서 비의도적 또는 의도적인 형질전환 틸라피아의 방출이 자연 개체군에 미미한 영향 또는 영향이 없을 것으로 결론 지었다. 왜냐하면 큐바에서는 자연 틸라피아 개체군이 없으며 이들은 모두 도입종이기 때문이다. 그럼에도 불구하고 위원회는 미국 농무성의 농업생명공학 자문위원회에서 제시한 유전자 변형 어류나 수산동물의 연구의 안전 수행에 관한 이행지침 즉 “Performance Standards for Safely Conducting Research with Genetically Modified Fish and Shellfish” (documents No. 95-01 and 95-02)과 수산생물 생물공학과 환경에 관한 안전성 문제를 다루고 있는 실무진(de la Fuente et al. 1996; Guille'n et al. 1998b)의 지침을 따르도록 권고하고 있다. 이 실험에서는 이들의 지침서를 따랐다(de la Fuente et al. 1996). 형질전환 어류의 비의도적인 자연 방출의 영향을 평가하기 위해서 이들의 행동에 관한 연구도 실시하였다. 그 결과 먹이 섭이 욕구와 우점성은 형질전환 어류보다 야생형에서 높게 나타났다. 그러나 사육된 비형질전환 자매종과 비교할 경우 형질전환 어류의 종묘들에서 높은 활력을 관찰되었다. 비슷한 결과는 성장호르몬을 주사한 무지개송어의 치어들에서도 관찰되었다(Johnsson and Bjo'rnsson, 1994). 이들 발견은 외부의 틸라피아 성장호르몬 발현이

이들 요인들에 영향을 암시하고 있다. 비형질전환 어류나 야생형 틸라피아에 비해서 형질전환 틸라피아에서 나온 삼투조절 능력이 관찰되었다. 이 결과는 성장호르몬이 틸라피아의 삼투조절에 관련이 있으며 비형질전환 어류에 비해서 해수에 적응 시 유리함을 제공하게 된다. 그러나 이들이 해수에서 살수 있더라도 틸라피아는 번식할 수는 없으며 수정능력도 심각하게 훼손된다. 비록 형질전환 틸라피아가 성장 증진을 보이더라도 부모의 많은 형질들은 유지 된다. 여기서 형질전환 틸라피아에서 동형세대 동물에서 볼 수 있는 어떠한 비정상적인 것들도 관찰되지 않았고 더군다나 형질전환 어류와 야생형 어류의 먹이 섭취욕구나 우점도를 비교해볼 때 자연생태계에 우연히 방출이 되더라도 형질전환어류 집단의 생존 가능성은 낮다고 본다. 질병내성과 같은 다른 요인들에 관한 조사에서도 형질전환 어류와 야생형 틸라피아 사이에 다른 점을 볼 수 없었다. Hallerman과 Kapuscinski (1992)가 제시한 몇가지 우려에 관해서 조사 분석한 결과 최소한 큐바의 경우 이들 형질전환 틸라피아를 양식하고 이들이 자연 생태계에 방출되더라도 커다란 생태학적인 문제는 없을 것으로 결론 지었다.

Evaluation of Safety of Consuming tiGH-Transgenic Tilapia

형질전환틸라피아의 소비에 관한 식품으로서의 안전성 평가

새로운 식품으로서 거래되거나 식품으로 가공되는 경우에 식품안전성 평가는 반드시 이루어져야 한다. 이들 평가의 성격은 식품의 특성이나 관련 우려를 반영하게 된다. 1990년 생명공학과 식품안전성에 관한 토의가 세계 보건기구와 유엔 FAO의 주관으로 실시되었다(Jonas 1996; Guille'n et al. 1998b). 결론은 전통적인 방식에 의한 식품보다도 새로운 생명공학 기술의 사용해 만든 식품이 식품의 안전성 면에서 같아야 한다는 것으로 현대의 생명공학기술로 만들어진 식품의 안전성 문제를 평가 할 경우 소위 “실질적 동등성(substantial equivalence)”의 개념을 개발하게 되었다(Jonas 1996; Guille'n et al. 1998b). 대부분의 형질전환 어류는 전통적인 식품으로 사용하는 동물에 비해서 아주 잘 정의된 차이와 별도로 실질적인 동등성이 존재하는 생물 집단으로 나누고 있는 경향이 있다. 이들 차이들은 형질전환 틸라피아의 경우 틸라피아 성장호르몬 유전자의 도입의 결과일 것이다. 그래서 실험은 실질적인 동등성 원칙에 따라서 재조합 틸라피아 성장호르몬이 포유류의 기관과 영장류에 미치는 영향을 보기 위

해서 계획되었다.

이전의 연구에서 성장호르몬은 인슐린과 비슷한 성장인자1을 거치면서 간접적으로 근육조직에서 황의 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Duan and Hirano 1990; Cheng and Chen 1995). 반면에 다른 연구들(Ash 1977; Shepherd et al. 1997; Guille'n et al. 1998a)에서는 성장호르몬이 연골의 황화를 직접적으로 촉진한다고 발표된 바 있다. 이를 확인하기 위해서 이 연구에서는 포유류의 성장호르몬 수용체가 틸라피아 성장호르몬과 친화력을 가지는지를 Cheng and Chen (1995)의 방법을 이용하여 조사하였다. 그 결과 틸라피아 성장호르몬은 토끼의 성장호르몬 수용체와 아주 낮은 그리고 미미한 친화력을 나타내는 반면 사람의 성장호르몬과 토끼의 성장호르몬 수용체 사이에는 호르몬의 농도에 비례하여 아주 강한 결합력이 관찰되었다. 토끼를 이용한 실험의 결과는 다소 문제의 소지를 가지고 있다. Farmer et al. (1977)은 틸라피아 성장호르몬이 토끼의 수용체와 낮았지만 의미있는 활력을 보인다고 하였으며 Skibeli et al. (1990)은 경골어류의 성장호르몬이 다른 어류나 양서류 또는 포유류와 반응을 하지 않는다고 보고한 바 있다.

긴꼬리원숭이에게 재조합 틸라피아 성장호르몬을 주사하고 30일간 조사를 하였다. 이 연구에서 사용한 혈청관련 인자는 포유류의 성장호르몬이 특정 조직이나 주요 세포의 대사경로에서의 영향을 보여주는 지시인자로서 잘 알려져 있는 것이다. 이들 인자들은 포유류의 성장호르몬에 단기간 처리하였을 경우 변화를 보인다. 그런데 틸라피아 성장호르몬을 처리한 후 혈액 내 포도당, 총단백질, 그리고 creatinine 수준에 어떤 영향을 미치지 않았다는 것은 이 성장호르몬이 영양류에 있어서 작용하지 않는다는 것을 제시한다. 이러한 결론은 성장호르몬을 처리한 후 조사한 혈액관련 검사항목에서도 나타났다. 이 연구에서 선택된 조사항목은 포유류의 성장호르몬에 의한 초기 반응(Hartman and Thorner 1990; Thorner et al. 1995)으로 잘 알려진 기름지느러미에 있어서의 지방분해, 근육에서의 단백질합성, 그리고 항인슐린 작용을 포함하고 있다. 포유류 성장호르몬을 가지고 설치류를 대상으로 한 실험에서 이들 현상들이 성장호르몬에 의한 직접적인 반응인지 또는 IGF-I을 통한 간접적인 반응인지를 조사하였으며 성장호르몬이 적혈구와 임파구 생성을 촉진하는지 그리고 비장과 신장의 무게 증가에 관여하는지(Gluckman et al. 1991)를 알아보았다. 또한 호르몬이 체액의 유지에 관여하여 혈장의 양을 증가시키고 따라서 체중증가와 연관이 있는지(Ho and Kelly, 1991)도 조사하였다. 그러나 이 실험에서 틸라피아의 성장호르몬이 혈액세포수, 헤모글로빈의 양.

PCV에서 어떠한 영향을 주지 않았고 부검 시 기관의 무게에도 어떠한 영향이 없는 것으로 나타났다. 그 뿐만 아니라 병리조직학적인 검사에서도 티라피아 성장호르몬을 처리한 긴꼬리 원숭이에서 어떠한 변이도 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 포유류의 성장호르몬을 대상으로 한 조사와는 다른 결과로써 예상하지 못한 결과였다. 포유류에 있어서 성장호르몬은 탄수화물, 지방, 그리고 단백질 대사에 관여함으로써 체성장의 주요 조절 호르몬으로 작용하기 때문이다. 성장호르몬은 특정 세포수용체를 통하여 직접적으로 작용(Wallis 1988)하거나 IGF-1을 거쳐서 간접적으로 작용한다는 보고(Berelowitz et al. 1981; Daughaday and Rotwein 1989; Humbel 1990; Celmmmons 1992; Pell and Bates 1992)가 있다. IGF-I은 시상하부의 조절 기작에 작용하거나 뇌하수체에서의 성장호르몬 분비에 직접적인 길항역할에 의하여 성장호르몬의 분비에 잠정적으로 음성적인 길항작용을 하는 것으로 알려져 있다(Berelowitz et al. 1981; Guille'n et al. 1998c). 출생 후 초기의 성장에 미치는 성장호르몬의 촉진 역할자로서의 IGF-I의 기능은 성장호르몬 수용체의 결합에 기인하는 레논타입(Laron-type) 난쟁이를 대상으로 하여 재조합 IGF-I을 처리함으로써 밝혀졌다(Laron et al. 1992). 성장호르몬과 IGF-I은 비록 이들이 증식을 촉진하는 성장판의 서로 다른 세포에 작용하는 것으로 생각되지만 포유류에서 긴 뼈의 성장 촉진에 있어서 상승효과를 나타낸다(Green et al. 1985; Lindhal et al. 1986; Wroblewski et al. 1987). 더군다나 최근의 연구에서 어류와 포유류 사이에 성장호르몬의 생리적인 면과 조절 측면에서 계통유전학적으로 놀라운 보존성을 발견하였다(Shu et al. 1993; Cheng and Chen 1995). 그러나 서로 다른 종간에 성장호르몬 수용체의 현저한 이형현상과 성장호르몬과 수용체 간의 상호 작용, 이량체의 형성 그리고 신호전달에 있어서 세밀하고 정교한 조절 기작은 성장호르몬 조절 회로에 종 특이적인 장벽으로 작용할 수 있다(Herington 1994)는 보고도 있다. 결과적으로 우리는 티라피아 성장호르몬을 분비하는 티라피아를 조리하거나 어육을 가공하여 소비하는 점을 생각해야 한다. 비록 중성 pH에서도 시험관 내에서 성장호르몬의 단백질의 분해현상이 일어난다는 사실 (Wroblewski et al. 1991)은 인간의 위장에 존재하는 강산에 의한 분해현상을 예상할 수 있으며 이런 점은 형질전환 티라피아의 인간소비에 관련한 안전성에 도움을 줄 것으로 생각된다. 실제로 인간과 관련된 연구 결과는 형질전환 티라피아의 어육 소비가 인간에게 어떤 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며 이는 형질전환 어류의 인간 소비와 관련된 첫번째 연구 결과이다. 더군다나 이 실험은 큐바에서 형질전환 티라피아의 시판을 위한 최종 단계를 위해 실시하였으며 이 결과

는 이와 관련한 문제에 있어서 과학적인 접근 뿐만 아니라 형질전환 어류 생산 기술에 대한 대중의 신뢰도 확보에 기여를 할 것이다. 이 연구에서 얻은 결론은 이 실험 여건에서 틸라피아 성장호르몬은 포유류의 기관이나 비인간 영장류에 어떠한 영향도 미치지 않았으며 형질전환 틸라피아 어육의 인간 소비는 어떠한 위해성을 나타내지 않았다.

결론

형질전환 틸라피아의 식품으로서의 안전성에 관련한 이 연구 결과 형질전환 틸라피아의 경우 비형질전환 틸라피아와 비교할 경우 최소한 큐바에서의 조건에서는 환경에 영향을 주지 않으면서 단지 성장증진 효과를 보인다는 것이다. 이 결과는 이들 형질전환 어류의 양식과 소비를 허용해도 문제가 없다는 것을 의미한다. 비록 각국은 그들 만의 사정이 있겠지만 형질전환 어류의 양식이 행해질 것으로 생각되며 이는 양식생산에 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다.

제 7 장 참고문헌

Agellon, L.B., C.J. Emery, J.M. Jones, S.L. Davies, A.D. Dingle, and T.T. Chen, 1988. Promotion of rapid growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by a recombinant fish growth hormone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45 : 146-151.

Agellon, L.B. and T.T. Chen. 1986. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 5 : 463-471.

Agellon, L. B., S. L. Davies, T. T. Chen and D. A. Powers, 1988b. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 5136-5140.

Alderdice, D.F. 1988. Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. pp. 163-251. (in) *Fish Physiology* (eds.) Hoar, W.S. and D.J. Randall. Vol. 11, Part A, Academic press, New York.

Almuly R., B. Cavari, H. Ferstman, O. Kolodny and B. Funkenstein, 2000. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: identification of minisatellite polymorphism in intron I. *Genome*, 43 : 836-845.

Amemiya, Y., Y. Sogabe, M. Nozaki, A. Takahashi and H. Kawauchi. 1999. Somatolactin in the white sturgeon and African lungfish and its evolutionary significance. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114 : 181-190.

An, C.M. 1995. Effects of water temperature on the reproductive cycle of the spring-spawning bitterling, *Rhodeus uyekii* (Pisces : Cyprinidae). Korean J. Ichthyol. 7(1) : 43-55.

Anathy, V., T. Venugopal, R. Koteeswaran, T. J. Pandian and S. Mathavan, 2001. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). J. Biosci., 26 : 315-324.

Ascacio-Martinez, J.A. and H.A. Barrera-Saldana. 1994. Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone. Gene, 143, 299-300.

Astola, A., C. Pendon, M. Ortiz and M. M. Valdivia. 1996. Cloning and expression of somatolactin, a pituitary hormone related to growth hormone and prolactin from gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 104 : 330-336.

Ayson, F. G., E. G. de Jesus, Y. Amemiya, S. Moriyama, T. Hirano and H.

Ayson, F. G., E. G. de Jesus, Y. Amemiya, S. Moriyama, T. Hirano and H. Kawauchi, 2000. Isolation, cDNA cloning, and growth promoting activity of rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol., 117(2) : 251-259.

Barta, A., R.I. Richards, J.D. Baxter and N.L. Eberhardt. 1981. Primary structure and evolution of rat growth hormone gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78 : 4867-4871.

Ben-Atia, I., M. Fine, A. Tandler, B. Funkenstein, S. Maurice and B. Cavari. 1999. Preparation of recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113 : 155-164.

Bjornsson, B.T. 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiol. Biochem.*, 17, 9-24.

Bilton, H.T., D.F. Alderdice and J.T. Schnute, 1982. Influence of time and size at release of juvenile coho salmon on returns at maturity. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 39 : 426-447.

Boeuf, G. and P. Payan. 2001. How should salinity influence fish growth? *Com. Biochem. Physiol.*, 130C : 411-423

Carlacci, L., K. C. Chou and G. M. Maggiora, 1991. A heuristic approach to predicting the tertiary structure of bovine somatotropin. *Biochemistry*, 30 : 4389-4398.

Calduch-Giner, J. A., C. Pendon, M. M. Valdivia and J. Perez-Sanchez. 1998. Recombinant somatolactin as a stable and bioactive protein in a cell culture bioassay: development and validation of a sensitive and reproducible radioimmunoassay. *J. Endocrinol.* 156, 441-447.

Carthy, C. M., D. J. Granville, K. A. Watson, D. R. Anderson, J. E. Wilson, D. Yang, D. W. C. Hunt and B. M. McManus (1998) Activation and Specific Cleavage of Substrates after Coxsackievirus B3-Induced Cytopathic Effect in HeLa Cells. *J. Virol.* 72 : 7669-7675

Cavari, B., B. Funkenstein, T.T. Chen, L.I. Gonzalez-Villasenor and M. Scharl, 1993. Effect growth hormone on the growth rate of the gilthead seabream (*Sparus aurata*), and use of different constructs for the production of transgenic fish. *Aquaculture*, 111 : 189-197.

Cavari, B., T. Noso and H. Kawauchi. 1995. Isolation and characterization of somatolactin from pituitary glands of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 137 : 171-178.

Chang, Y.J., B.H. Min., H.J. Chang and J.W. Hur., 2002. Comparison of blood physiology in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) reared in converted freshwater from seawater and seawater from freshwater. *J. Korean Fish. Soc.*, 35(6) : 595-600.

Chang, Y.J. and J.W. Hur. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. *J. Korean Fish. Soc.*, 32 : 310-316.

Chang, Y.J., Y.C. Lee and B.K. Lee. 1996. Comparison of growth and survival rates of juvenile grey mullets (*Mugil cephalus*) in different salinities. *Journal of Aquaculture*. 9(4) : 311-320.

Chao, S.C., F.M. Pan and W.C. Chang. 1989. Purification of carp growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1007 : 233-236.

Chen, T. T., A. Marsh, M. Shambloot, K. M. Chan, Y. L. Tang, C. M. Cheng and B. Y. Yang, 1994. Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth

factor genes. *Fish Physiology* 8, p. 179-209 W. S. Hoar, et al. eds., Academic Press, New York.

Chen, T. T., A. Marsh, M. Shambloot, K. M. Chan, Y. L. Tang, C. M. Cheng and B. -Y. Yang. 1994. *Fish physiology*. pp. 179-209, Vol. 13, Academic Press. New York.

Cheng, K. W., Y. H. Chan, Y. D. Chen, K. L. Yu and K. M. Chan. 1997. Sequence of a cDNA clone encoding a novel somatolactin in goldfish, *Carassius auratus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 282-287.

Chiou, C. S., H. T. Chen and W. C. Chang, 1990. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1087 : 91-94.

Chourrout, D., R. Guyomard, L.M. Houdebine. 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture* 51: 143-150.

Chun, J.H and S. Rho. 1991 . Salinity tolerance of eggs and juveniles of Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et schlegel). *Journal of Aquaculture*, 4(2) : 73-84.

Cioni, C., D. De Merich., E. Cataldi and S. Cataudella. 1991. Fine structure of chloride cells in freshwater- and seawater-adapted *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish Biol.*, 39 : 197-209.

Company, R., J. A. Calduch-Giner, M. Mingarro and J. Perez-Sanchez. 2000. cDNA cloning and sequence of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin. *Comp.*

Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 127 : 183-192.

Cook, H., A.F. Cook and R.E. Peter, 1983. Ultrastructura limmunocyto chemistry of growth hormone cell in the goldfish pituitary gland. Gen. Comp. Endocrinol., 50 : 348 - 353.

Danzmann, R.G., G.J. Van Der Kraak, T.T. Chen and D.A. Powers, 1990. Metabolic effects of bovine growth hormone and genetically engineered rainbow trout growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at a high temperature. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47 : 1292-1301.

Delvin, R.H., T.Y. Yesaki, C.A. Blagl and E.M. Donaldson. 1994. Extraordinary salmon growth. Nature. 371 : 209-210.

Dickhoff, W. W., B. R. Beckman, D. A. Larsen, C. Duan and S. Moriyama, 1997. The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification. Fish Physiol. Biochem., 17 : 231-236.

Doliana, R., M. Bortolussi and L. Colombo, 1992. Cloning and sequencing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) growth hormone cDNA using polymerase chain reaction and degenerate oligonucleotides. DNA Seq., 3 : 185-189.

Du, S.J., Z. Gong, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, D.R. Idler and C.L. Hew. 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. Bio/technology, 10 : 176-181.

Duncan, D.B., 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11 : 1-42.

Engelking, H.M. and J.C. Leong. 1989. The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *Virus Res.*, 13 : 213-230.

Foss, A., T.H. Evensen., I.A.K. Imsland and V. Oiestand. 2001. Effects of reduced salinities on growth, food conversion efficiency and osmoregulatory status in the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology*, 56 : 416-426.

Funkenstein, B., T. T. Chen, D. A. Powers and B. Cavari, 1991. Cloning and sequencing of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene*, 103 : 243-247.

Donaldson, H.M. Dye, L. Souza, T. Berg, J. Wypych and K. Langley, 1985. Recombinant chicken and bovine growth hormones accelerate growth in aquacultured juvenile Pacific salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Bio/technology*, 3 : 643-646.

Gaumet, F., G. Boeuf., A. Severe., A. Le Roux and N. MayerGostan. 1995. Effects of salinity on the ionic balance and growth of turbot. *Journal of Fish Biology*, 47 : 865-876.

Go, H.B. 1993. Salinity tolerance of eggs and juveniles of tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel). Master Thesis of Cheju National University.

Gonzalez-Villasenor, L.I., P.J. Zhang, T.T. Chen and D.A. Powers. 1988. Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. *Gene*, 65 : 239-246.

Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Barbosa, and F.H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.

Natl. Sci. USA 77 : 7380-7384.

Gray, E. S. and K. M. Kelley, 1991. Growth regulation in the gobiid teleost, *Gillichthys mirabilis*: roles of growth hormone, hepatic growth hormone receptors and insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.*, 131 : 57-66.

Guggino, W.B., 1980. Salt balance in embryos of *Fundulus heteroclitus* and *F. bermudae* adapted to seawater. *Am. J. Physiol.*, 238: 42-49. Gill, J.A., J.P. Sumpter, E.M.

Hadley, M. 1996. *Endocrinology*, 4th ed., Prentice Hall, New Jersey, pp. 89-91.

Hammer, R.E., V.G. Pursel, C.E. Rexroad Jr., R.J. Wall, D.J. Bolt, K.M. Ebert, R.D. Palmiter, and R.L. Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep, and pigs by microinjection. *Nature* 315 : 680-683.

Han, H.K., D.Y. Kang., S.B. Hur and S.W. Kim. 2001. Effects of temperature and salinity on early development, survival and growth rate in seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Journal of Aquaculture*, 14(1) : 17-27.

Harvey, S. and K.L. Hull. 1997. Growth hormone A paracrine growth factor? *Endocrine*, 7 : 267-279.

Heo, G.J., B.S. Chang, H.S. Jeh, H.K. Lee and Y.T. Ji, 1996. A study of efficacy and toxicity of recombinant bovine somatotropin (BST) in cultured fish. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, 20(3) : 219-229.

Higgs, D.A., E.M. Donaldson and H.M. Dye, 1975. A preliminary investigation of the effects of bovine growth hormone on growth and muscle composition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 27 : 240-253.

Higgs, D.A., E.M. Donaldson and H.M. Dye, 1976. Influence of bovine growth hormone and L-thyroxine on growth, muscle composition and histological structure of gonads, thyroid, pancreas and pituitary of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 33 : 1585-1603.

Higgs, D.A., E.M., Donaldson and J.R. McBride, 1978. Evaluation of the potential for using a chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary extract versus bovine growth hormone to enhance the growth of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Zool.*, 56 : 1226-1231.

Higgs, D.A., U.H.M. Fagerlund and J.R. McBride, 1977. Influence of combination of bovine growth hormone, 17-methyltestosterone and L-thyroxine on growth of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Zool.*, 55 : 1048-1056.

Hur, J.W. and Y.J. Chang. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by gradual change in salinity of rearing water. *Journal of Aquaculture*, 12(4) : 283-292.

Hwang, P.P. 1987. Tolerance and ultrastructural response of branchial chloride cells on salinity change in euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Mar. Biol.*, 94 : 643-649.

Hwang, P.P. and R. Hirano, 1985. Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cell in early stages of teleost development. *F. Exp. Zool.*, 236 : 115-126.

Ishioka, H., R. Kosugi, K. Ouchi, A. Hara, T. Nagamatsu, S. Mihara and H. Ogai, 1992. Effects of recombinant red sea bream growth hormone on growth of young red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(12) : 2335-2340.

Iraqi, F., Z. Gong, C. L. Hew and L. Crim. 1993. Isolation and characterization of somatolactin genes from two cold water marine teleosts, lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2 : 96-103.

Jang, S.I., H.W. Kang and H.K. Han, 1996. Embryonic, Larval and Juvenile Stages in yellow puffer, *Takifugu obscurus*. *Journal of Aquaculture*, 9(1) : 11-18.

Jeh, H.S., C.H. Kim, H.K. Lee and K. Han. 1998. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. *Journal of Biotechnol.*, 60 : 183-193.

Jo, J.Y., R.O. Smitherman and D. Tave, 1995. Effect of Six levels of dietary 17 α -Methyltestosterone on sex reversal and growth of *Oreochromis aureus* (Steindachner) and *O. niloticus* (Linnaeus). *Journal of Aquaculture*, 8(2) : 77-83.

Johansen, B., O. C. Johnsen and S. Valla, 1989. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 77 : 317-324.

Kang, Y. D. and Y. J. Jang, 1996. 감성돔, *Acanthopagrus schlegel* 치어의 성장과 생존에 미치는 외인성 3,5,3' - triiodo-L-thyronine(T3)의 효과. *Journal of Aquaculture*, 9(3) : 215 - 222.

Kakizawa, S., T. Kaneko, S. Hasegawa and T. Hirano. 1993. Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by low environmental calcium. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105 : 194-209.

Kakizawa, S., T. Kaneko, S. Hasegawa and T. Hirano. 1995. Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 199 : 1043-1051.

Kaneko, T. and T. Hirano. 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 184, 31-45.

Kaneko, T. 1996. Cell biology of somatolactin. *Int. Rev. Cytol.* 169 : 1-24.

Kang, G.Y., C.B. Song and J. Lee. 2003. Cloning of growth hormone complementary DNA from red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) and its expression in *E. coli*. *J.*

Aquacult., 16 : 110-117.

Kariya, Y., N. Sato, L. Kawazoe, S. Kimura, N. Miyazaki, M. Nonaka and H. Kawauchi. 1989. Isolation and characterization of growth hormone from a marine fish, tuna (*Thunnus albacares*). Agric. Biol. Chem., 53 : 1679-1687.

Kato, Y., N. Shimokawa, T. Kato, T. Hirai, K. Yoshihama, H. Kawai, M. Hattori, T. Ezashi, Y. Shimogori and K. Wakabayash. 1990. Porcine growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in bacterial and mammalian cells, Biochim. Biophys. Acta., 104 : 290-293.

Kawauchi, H., S. Moriyama and T. Hirano, 1992. Oral administration of recombinant salmon growth hormone to rainbow trout. Oceanis, 18 : 109-120.

Kawauchi. 1999. Isolation and cDNA cloning of somatolactin in rabbitfish (*Siganus guttatus*). Gen. Comp. Endocrinol. 115 : 292-300.

Kefford, B.J. and D. Nugegoda. 2005. No evidence a critical salinity threshold for growth and reproduction in the freshwater snail *Physa acuta*. Environmental pollution. 134 : 377-383.

Kim, M.J., S.C. Chung, C.B. Song. 2004. Effect of salinity on growth and survival of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Korean J. Ichthyol., 16(1) : 100-106.

Kim, Y., S.B. Hur, and H. S. Choi. 1993. Control of spawning periods of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in indoor culture. Bull. Nat. Fish. Res. Dev.

Agency. 48 : 71-79.

Kim, Y. and S. B. Hur. 1991. Spawning inducement of flounder, *Paralichthys olivaceus* by the control of water temperature and photoperiod. J. Aquacult., 4 : 85-95.

Kim, Y.U. 1970. On the characteristics of eggs and larva of *Mylio macrocephalus* (Basilewsky). Bull. Korean Fish. Soc. 3(4) : 233-250.

Komourdjian, M.P., R.L. Saunders and J.C. Fenwick, 1976. The effect of porcine somatotropin on growth and survival in seawater of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. Can. J. Zool., 54 : 531-535.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685.

Lamb, I.C., D.M. Galehouse and D.N. Foster. 1988. Chicken growth hormone cDNA sequence. Nucleic Acids Res., 16, 9339.

Leatherland, J.F. and R.N. Nuti, 1981. Effects of bovine growth hormone on plasma FFA concentration and liver, muscle and carcass lipid content in rainbow trout. J. Fish. Biol., 19 : 487-498.

Lee, Y.C., Y.J. Chang and B.K. Lee. 1997. Osmoregulation capability of juvenile grey mullets (*Mugil cephalus*) with the different salinities. J. Korean Fish. Soc., 30(2) : 216-224.

Lee, J.Y., W.K. Kim and Y.J. Chang. 1997. Influence of water temperature and salinity on eggs development of flatfish, *Limanda Herzensteini*. Journal of Aquaculture, 10(3) : 357-362.

Lee, J.J and S. Rho. 1987. Studies on the seedling production of the black porgy, *Mylio macrocephalus* (Basilewsky). Bull. Mar. Resour. Res. Inst. Cheju Nat. Univ. 11: 1-20.

Lee, T.Y. and I. Hanyu, 1984. Reproductive cycle of small filefish, *Rufarius ercodes*. Bull. Korean Fish. Soc., 17: 427-435.

Lesniak, M.A. and J. Roth. 1976. Regulation of receptor concentration by homologous hormone. Effect of human growth hormone on its receptor in IM-9 lymphocytes. J. Biol. Chem. 251 : 3720-3729.

Li, C.H., W-K. Liu, and J.S. Dixon. 1966. Human pituitary growth hormone. XII The amino acid sequence of growth hormone. J. Amer. Chem. Soc. 88 : 2050-2051.

Lorens, J., A.H. Nerland, R. Male, I. Lossius, W. Telle and G. Totland. 1989. The nucleotide sequence of Atlantic salmon growth hormone cDNA. Nucleic Acids Res., 17 : 2352.

Maclean, N. and S. Talwar. 1984. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. J. Embryol. Exp. Morphol. 82: 187.

Mahmoud, S. S., M. M. Moloney and H. R. Habibi, 1996. Cloning and sequencing of the goldfish growth hormone cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 101 : 139-144.

Market, J.R., D.A. Higgs and H.M. Dye, 1977. Influence of bovine growth hormone on growth rate, appetite and food conversion of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed two diets of different composition. *Can. J. Zool.*, 55 : 74-83.

May, D., C. M. Todd and M. Rand-Weaver. 1997. cDNA cloning of eel (*Anguilla anguilla*) somatolactin. *Gene* 188, 63-67.

Miller, W. L. and N. L. Eberhardt, 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrinol. Rev.*, 4 : 97-130.

Miller, W.L., J.A. Martial and J.D. Baxter, 1980. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.*, 255(16) : 7521-7524.

Momota, H., R. Kosugi, H. Hiramatsu, H. Ohgai, A. Hara and H. Ishioka, 1988. Nucleotide sequence of cDNA encoding the pre-growth hormone of red sea bream (*Pagrus major*). *Nucleic Acids Res.*, 16 : 3107.

Moriyama, S., F. G. Ayson and H. Kawauchi, 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64 : 1553-1562.

Momota, H., R. Kosugi, H. Hiramatsu, H. Ohgai, A. Hara and H. Ishioka. 1988.

Munro, H. N. and A. Fleck, 1966. Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. *Analyst* 91 : 78-88.

Nam, Y. K., J. K. Noh, Y. S. Cho, K. N. Cho, C. G. Kim and D. S. Kim, 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research*, 10 : 353-362.

Niall, H. D., M. L. Hogan, R. Sauer, I. Y. Rosenblum and F. C. Greenwood, 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68 : 866-869.

Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne. 1997a. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.*, 10 : 1-6.

Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne. 1997b. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural Sys.* 8 : 581-599.

Olivereau, M and M. Rand-Weaver. 1994. Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stages of the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93 : 28-35.

Olivereau, M and M. Rand-Weaver. 1994. Immunoreactive somatolactin cells in the

pituitary of young, migrating, spawning and spent chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Fish Physiol. Biochem. 13 : 141-151.

Ono, M., Y. Takayama, M. Rand-Weaver, S. Sakata, T. Yasunaga, T. Noso and H. Kawauchi. 1990. cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 4330-4334.

Paduel A., N. Chapnik-Cohen, A. Gertler and A. Elizur, 1999. Preparation and characterization of recombinant dolphin fish (*Coryphaena hippurus*) growth hormone. Protein Expr. Purif., 16(3) : 417-23.

Palmiter, R.D., R.D. Brinster, R.E. Hammer, M.E. Trumbauer, M.G. Rosenfeld, N.E. Birnberg, and R.M. Evans. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature, 300 : 611-615.

Partridge, G.J and G.I. Jenkins. 2002. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). Aquaculture, 210 : 219-230.

Peduel, A. D., A. Elizur and W. Knibb, 1994. Cloning and sequencing of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*, Coryphaenidae) growth hormone-encoding cDNA. DNA Seq., 5(2) : 121-123.

Peel, C.J., P.J. Eppard and D.L. Hard. 1989. Evaluation of sometribove (methionyl bovine somatotropin) in toxicology and clinical trials in Europe and the United States. In Biotechnology in growth regulation (edited by R.B. Heap, C.G. Prosser and G.E. Lamming). pp. 107-116. International symposium held at AFRC Institute of Animal

Physiology and Genetic Research, Babraham, Cambridge, United Kingdom.

Pendon, C and J. P. Martinez-Barbera, 1994. Cloning of a somatolactin-encoding cDNA from sole (*Solea senegalensis*). *Gene* 147 : 227-30.

Pendon, C., J. P. Martinez-Barbera, M. Ortiz and M. M. Valdivia. 1996. Bacterial production and purification of the fish pituitary hormone somatolactin. *Protein Expr. Purif.* 7, 389-394.

Planas, J. V., P. Swanson, M. Rand-Weaver and W. W. Dickhoff. 1992. Somatolactin stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87 : 1-5.

Powers, D.A. 1989. Fish as model systems. *Science*, 246, 352-358.

Primrose, S.B. 1991. *Molecular biotechnology*. 2nd edition pp. 196. Blackwell Sci. Pub.

Rand-Weaver, M. and H. Kawauchi, 1993. Growth hormone, prolactin and somatolactin: a structural overview. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 12 : p. 39-56. Hochachka, P. W. and T. P. Mommsen eds., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

Rand-Weaver, M., P. Swanson, H. Kawauchi and W. W. Dickhoff. 1992. Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of

coho salmon. J. Endocrinol. 133 : 393-403.

Rand-Weaver, M., T. Noso, K. Muramoto and H. Kawauchi. 1991. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. Biochemistry 30 : 1509-1515.

Rentier-Delrue, F., D. Swennen, L. Mercier, M. Lion, O. Benrubi and J.A. Martial. 1989. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: expression and secretion of tGH-II by Escherichia coli. DNA, 8 : 109-117.

Rho, S., P.Y. Kim, Y.D. Lee, K.S. Choi and C.B. Song. 1999. Effect of recombinant bovine somatotropin on growth of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Aquaculture, 12 (2) : 79-89.

Rohn, W.M. and D.A. Weigent. 1995. Cloning and nucleotide sequencing of rat lymphocyte growth hormone cDNA. Neuroimmunomodulation, 2 : 108-114.

Roskam, W.G. and F. Rougeon. 1979. Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. Nucleic Acids Res., 7 : 305-320.

Sakamoto, T., B. S. Shepherd, S. S. Madsen, R. S. Nishioka, K. Siharath, N. H. Richman III, H. A. Bern and E. G. Grau, 1997. Osmoregulatory Actions of Growth Hormone and Prolactin in an Advanced Teleost. Gen. Comp. Endocrinol., 106 : 95-101.

Santome, J.A., J.M. Dellacha, A.C. Paladini, C. Pena, M.J. Biscoglio, S.T. Daurat, E.

Poskus and C.E. Wolfenstein. 1973. Primary structure of bovine growth hormone. Eur. J. Biochem., 37 : 164-170.

Sato, N., K. Watanabe, K. Murata, M. Sakaguchi, Y. Kariya, S. Kimura, M. Nonaka and A. Kimura, 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. Biochim. Biophys. Acta., 949 : 35-42.

Santome, J.A., J.M. Dellacha and A.C. Paladini, 1973. Primary structure of bovine growth hormone. Eur. J. Biochem., 37 : 164-170.

Schaefer. B. C., 1995. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. Anal. Biochem., 227 : 255-273.

Schneider J. F., S. H. Myster, P. B. Hackett and A. Faras, 1992. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for northern pike (*Esox lucius*) growth hormone. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1 : 106-112.

Schulte, N.E., P.M. Down, E.M. Donaldson and L.M. Souza, 1989. Experimental administration of recombinant bovine growth hormone to juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by injection or by immersion. Aquaculture, 76 : 145-156.

Seeburg, P. H., 1982. The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. DNA, 1 : 239-249.

Seeburg, P.H., J. Shine, J.A. Martial, J.D. Baxter and H.M. Goodman, 1977. Nucleotide

sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature*, 270 : 486-494.

Seeburg, P. H., S. Sias, J. P. Adelman, H. A. de Boer, J. Hayflick, P. Jhurani, D. V. Goeddel and H. L. Heyneker, 1983. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA*, 2 : 37-45.

Sekine, S., T. Mizukami, T. Nishi, Y. Kuwana, A. Saito, M. Sato, S. Itoh and H. Kawauchi, 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82 : 4306-4310.

Sekine, S., T. Mizukami, A. Saito, H. Kawauchi and S. Itoh. 1989. Isolation and characterization of a novel growth hormone cDNA from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1009, 117-120.

Singley, J.A. and W. Chavin. 1971. Cortisol levels of normal goldfish, *Carrassuis auratus* L., and response to osmotic change. *Am. Zool.*, 11 : 653pp.

Somers, W., M. Ultsch, A. M. D. Vos and A. A. Kossiakoff, 1994. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature*, 372 : 478-481.

Song, C.B. 1998. Study on seed production of the red grouper, *Epinephelus akaara*, and its feed organism. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, pp 106.

Steiny, S., D. King and R. Nishioka, 1984. Partial primary structure of coho salmon

growth hormone(sGH). Abstracts 7th international Congress of Endocrinology, July 1 - 7, Quebec City, Canada. Excerpta Medica. International Congress Series, 652 : 1261.

Suzuki, Y., M. Kobayashi and K. Aida, 1988a. Transport of physiologically active salmon gonadotropin into the circulation in goldfish, following oral administration of salmon pituitary extract. J. Comp. Pysiol., 157B : 753-758.

Suzuki, Y., M. Kobayashi and O. Nakamura, 1988b. Induced ovulation of the goldfish by oral administration of salmon pituitary extract. Aquaculture, 74(1/2) : 37-384.

Swanson, C. 1996. Early development of milkfish: effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth. Journal of Fish Biology, 48 : 405-421.

Tanaka, M., Y. Toma, T. Ohkubo, S. Sudo and K. Nakashima, 1995. Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone-encoding gene and its promoter region. Gene, 165 : 321-322.

Takayama, Y., M. Ono, M. Rand-weaver and H. Kawauchi. 1991. Greater conservation of somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family, than of growth hormone in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 83 : 366-374.

Tang, Y and T. T. Chen. 1993. A study on the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth hormone gene family: structure of growth hormone and prolactin in genes and somatolactin cDNA, their evolutionary implications and expression in pituitary gland. Thesis, University of Maryland, Department of Microbiology, College Park, Maryland,

USA.

Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22 : 4673-4680.

Toften, H., A.M. Arnesen and M. obling. 2003. Feed intake, growth and ionoregulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in relation to dietary addition of a feeding stimulant and time of seawater transfer. *Aquaculture*, 217 : 647-662.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350-4354.

Tsai, H. J., K. L. Lin and T. T. Chen, 1993. Molecular cloning and expression of yellowfin porgy (*Acanthopagrus latus* houuttuyn) growth hormone cDNA. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 104 : 803-810.

Tsung, K., J. H. Yim, W. Marti, R. M. Buller and J. A. Norton Gene expression and cytopathic effect of vaccinia virus inactivated by psoralen and long-wave UV light. *J. Virol.* 70 : 165-171.

Vega-Rubin, S. D. C., P. G. Vega-Rubin, J. A. C. G. Vega-Rubin, F. M. Vega-Rubin and J. P. S. Vega-Rubin. 2003. Expression and characterization of European sea bass

(*Dicentrarchus labrax*) somatolactin: assessment of in vivo metabolic effects. Mar. Biotechnol. 5 : 92-101.

Venkatesh, B. and S. Brenner, 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes. Gene, 187 : 211-215.

Vlaming, V. L., 1975. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost, *Notemigonus ryssoleucas*. Biol. Bull., 148 : 402-415.

Wagner, G.F., R.C. Fager and J.C. Brown, 1985. Further characterization of growth hormone from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Gen. Comp. Endocrinol., 60: 27-34.

Wallis, M. 1989. Species specificity and structure-function relationships of growth hormones. In "Biotechnology in growth regulation" edited by R.B. Heap, C.G. Prosser and G.E. Lamming. pp. 3-14. International symposium held at AFRC Institute of Animal Physiology and Genetic Research, Babraham, Cambridge, United Kingdom.

Wallis, M., 1973. The primary structure of bovine growth hormone. FEBS Lett., 35 : 11 - 14.

Weatherley, A.H. and H.S. Gill, 1982. Influence of bovine growth hormone on the growth dynamics of mosaic muscle in relation to somatic growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish. Biol., 20 : 165 - 172.

Wilder, I. B. and J. G. Stanley (1983) RNA-DNA ratio as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in streams contaminated by carbaryl. *J. Fish Biol.* 22 : 165-172.

Watahiki, M., M. Tanaka, N. Masuda, M. Yamakawa, Y. Yoneda and K. Nakashima, 1988. cDNA cloning and primary structure of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) pregrowth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70 : 401-406.

Watahiki, M., M. Yamamoto, M. Yamakawa, M. Tanaka and K. Nakashima. 1989. Conserved and unique amino acid residues in the domains of the growth hormones. *J. Biol. Chem.*, 264 : 312-316.

Yamano, Y., K. Oyabayashi, M. Okuno, M. Yato, N. Kioka, E. Manabe, H. Hashi, H. Sakai, T. Komano, K. Utsumi and A. Iritani. 1988. Cloning and sequencing of cDNA that encodes goat growth hormone. *FEBS Lett.*, 228 : 301-304.

Yang, B. Y., M. Arab and T. T. Chen. 1997. Cloning and characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatolactin cDNA and its expression in pituitary and nonpituitary tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106 : 271-280.

Yeo, I.-K. and Y. Mugiya (1997) Effects of extracellular calcium concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105 : 294-301.

Yowe, D. L. and R. J. Epping, 1995. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. *Gene*, 162 : 255-259.

Yowe, D.L. and R.J. Epping. 1995. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. *Gene*, 162 : 255-259.

Zacharia., C and V.S. Kakati. 2004. Optimal salinity and temperature for early developmental stages of *Penaeus merguensis* De man. *Aquaculture*, 232 : 373-382.

Zhu, Z., G. Li, L. He and S.Z. Chen. 1985. Novel gene transfer into the goldfish (*Crassius auratus* L. 1758). *Angew Ichthyol.* 1 : 31-34.

Zhu, Y and P. Thomas. 1995. Red drum somatolactin: Development of a homologous radioimmunoassay and plasma levels after exposure to stressors or various backgrounds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99 : 275-288.

Zhu, Y., Y. Yoshiura, K. Kikuchi, K. Aida and P. Thomas. 1999. Cloning and phylogenetic relationship of red drum somatolactin cDNA and effects of light on pituitary somatolactin mRNA expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113 : 69-79.

伏見 徹 ・ 向井 良昭 ・ 高山 蕙介外 4人. 1980. 種苗生産事業. 潢水試事報. 5-9

平野 禮次郎. 1969. クロダイ雌魚飼育. 日水誌. 35, 567-569.

妹尾 秀實. 1912. クロダイ發生. 日動物學雜誌. 24(282). 195-197.

慶徳 尚壽 ・ 田中 實 ・ 山田 正編 ・ 水吳浩外 3人. 1982. クイ類種苗生産. 廣島縣栽培協. 13-21.

水戸 敏. 1979. 魚卵稚仔の形質と系統, 6. 魚卵. 海洋學科. 11(2), 126-130.