

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “뱀장어 신경내분비 동기화에 따른 전사체 반응”과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2022.02.

연구책임자 : 허 성 표

보고서 초록

과제고유 번호		해당단계 연구기간	2021.06.01- 2021.12.31	단계 구분	
연구사업명	중사업명				
	세부사업명				
연구과제명	대과제명				
	세부과제명				
연구책임자	허 성 표	해당단계 참여연구원수	총 : 1 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구비	정부: 천원 기업: 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 1 명 내부: 명 외부: 명	총 연구비	정부: 천원 기업: 천원 계 : 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 제주특성연구센터		참여기업명		
국제공동연구 위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<input type="checkbox"/> 연구내용 1. 연구내용 1-1. RNA-seq을 이용한 뱀장어 신경내분비 전사체 정보 확보 <input type="checkbox"/> ○ 신경내분비 동기화 전사체 cloning - RNA-seq을 이용한 신경내분비 동기화 핵심 전사체(6종; Per1, Per2, Per3, Cry2, Cry3, Cry4 mRNA), Melatonin 합성 효소 유전자(2종, aanat1, 2 mRNA) sequence 확보 - 유전자 클로닝을 통한 전사체 sequence 검증, 아미노산 서열 분석 완료 <input type="checkbox"/> 연구내용 2. 뱀장어 뇌심부 및 광수용기관 환경 반응 전사체 발현 <input type="checkbox"/> ○ 일주기에 따른 망막 및 뇌심부 생체시계 유전자 발현 특성 분석 - 망막과 뇌심부에서 생체시계 전사체가 빛에 의해 circadian oscillator가 작동되는 것을 확인 - 망막에서는 각각의 전사체가 빛에 의해 동기화 되었지만 뇌심부에서는 전사체의 발현이 유의적인 변화를 나타내지 않음 - 망막제거 수술 후 뇌심부에서 생체시계 전사체 발현이 빛에 의해서 동기화 되는 것을 확인 <input type="checkbox"/> 연구내용 3. 뱀장어 신경내분비 동기화 개시 전사체 발현 특성 연구 <input type="checkbox"/> ○ 광주기변화에 따른 신경내분비 리듬 동기화 발현 특성 분석 - 장주기(15L9D)에서 단주기(9L15D)로 변화는 신경내분비를 동기화 하는 중요한 환경요인으로써 작용을 하는 것으로 사료됨 - 달빛에 변화에 따라 멜라토닌 분비가 급속도로 증가하고 산란에 영향을 미치는 BPG 축 활성화에 직접적으로 영향을 미치는 것을 확인					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	뱀장어, 뱀장어 산란회유, 뱀장어 성성숙, 전사체 발현, 신경내분비, 야행성			
	영 어	Eel, eel migration, eel reproduction, transcript, neuro-endocrine, nocturnal			

요 약 문

I. 제 목

뱀장어 신경내분비 동기화에 따른 전사체 반응

II. 연구개발의 목표

- 뱀장어 환경요인별 신경내분비 주요 전사체 탐색
- 뱀장어 산란회유 개시 관련 신경내분비 전사체 발현

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 뱀장어 성성숙 단계별 신경내분비 주요 전사체 탐색
 - RNA-seq을 이용한 신경내분비 전사체 탐색
 - 성성숙 정도에 따른 뇌심부 및 광수용기관 전사체 DEG 분석
- 야행성 뱀장어 산란회유 개시 관련 신경내분비 전사체 발현
 - 광주기, 수온별 신경내분비 기전 분석을 위한 전사체 발현 특성 분석
 - 산란회유 개시 관련 주요 뇌심부 및 광수용 조직의 전사체 발현 특성 분석

IV. 연구개발결과

1-1. RNA-seq을 이용한 뱀장어 신경내분비 전사체 정보 확보

- 신경내분비 동기화 전사체 cloning
 - RNA-seq을 이용한 신경내분비 동기화 핵심 전사체(6종: Per1, Per2, Per3, Cry2, Cry3, Cry4 mRNA), Melatonin 합성 효소 유전자(2종, aanat1, 2 mRNA) sequence 확보
 - 유전자 클로닝을 통한 전사체 sequence 검증, 아미노산 서열 분석 완료

2-1. 뱀장어 뇌심부 및 광수용기관 환경 반응 전사체 발현

- 일주기에 따른 망막 및 뇌심부 생체시계 유전자 발현 특성 분석
 - LD(12L:12D), DD, LL 조건에서의 생체시계 유전자의 발현을 조사하였으며 망막과 뇌심부에서 생체시계 전사체가 빛에 의해 circadian oscillator가 작동되는 것을 확인
 - 망막에서는 각각의 전사체가 빛에 의해 동기화되었지만 뇌심부에서는 전사체의 발현이 유의적인 변화를 나타내지 않음
 - 망막제거 수술 후 뇌심부에서 생체시계 전사체 발현이 빛에 의해서 동기화 되는 것을 확인

3-1. 뱀장어 신경내분비 동기화 개시 전사체 발현 특성 연구

- 광주기변화에 따른 신경내분비 리듬 동기화 발현 특성 분석
 - 장주기(15L9D)에서 단주기(9L15D)로 변화는 신경내분비를 동기화하는 중요한 환경요인으로써 작용을 하는 것으로 사료됨
 - 달빛에 변화에 따라 멜라토닌 분비가 급속도로 증가하고 산란에 영향을 미치는 BPG 축 활성화에 직접적으로 영향을 미치는 것을 확인
- * 뱀장어 신경내분비 동기화는 빛에 의해서 영향을 받고 일반적인 경골어류나 포유류와 달리 망막이 신경내분비를 동기화하는 주요 기능을 하는 것으로 사료됨

V. 결과의 활용 가능성 및 파급효과

- 뱀장어의 산란생태를 내분비학적으로 해석 가능
- 야행성 어류의 행동 양상별 신경내분비학적 생체리듬 기전 규명
- 환경인자 제어를 통한 뱀장어 완전 양식 가능성 제시
- 안정적이고 친환경적인 성숙 유도를 통한 양질의 수정란 생산 가능
- 양식 불가 어종 대상 적정 환경요인 탐색을 통한 양식 가능성 제시

S U M M A R Y

I. Title

Transcriptome responses of synchronization in eel neuroendocrine system

II. R&D Goals

1. Exploration of major neuroendocrine transcripts of eels influenced by environmental factors
2. Identifying neuroendocrine transcripts related to the initiation of spawning migration of eels

III. Content and scope of R&D

1. Exploration of major neuroendocrine transcripts for each stage of sexual maturation of eels
 - Searching for neuroendocrine transcripts using RNA-sequencing
 - DEG analysis of the deep brain and photoreceptor organ transcriptome according to the degree of sexual maturity
2. Expression of neuroendocrine transcripts related to initiation of spawning migration in nocturnal eels
 - Analysis of the effect of photoperiod and water temperature on transcriptomic expression characteristics of neuroendocrine mechanisms
 - Analysis of transcriptomic expression characteristics of major tissues of deep brain and photoreceptive organs related to the initiation of spawning migratory

A) Goal 1: Acquiring neuroendocrine transcriptomic information of eels using RNA-sequencing

- Neuroendocrine synchronization and cloning of transcriptome
- Obtaining sequences for core transcripts of neuroendocrine synchronization (6 types; Per1, Per2, Per3, Cry2, Cry3, Cry4 mRNA) and Melatonin synthase gene (2 types, *aanat1*, 2 mRNA) using RNA-sequencing
- Verification of completed transcript sequence and amino acid sequence analysis through gene cloning

B) Goal 2: Expression of transcriptome related to the environmental responses of eels in deep brain and photoreceptor organs

- Analysis of gene expression characteristics of retina and biological clock in deep brain according to the circadian cycle
- The expression of circadian clock genes in LD (12L:12D), DD, and LL conditions was investigated, and it was confirmed that the circadian oscillator was activated by light in the

retina and deep brain.

- In the retina, each transcript was synchronized by light, but the expression of the transcript did not show a significant change in the deep brain
- It was confirmed that the expression of biological clock transcripts in the deep brain after retinal removal surgery is synchronized by light

C) Goal 3: A study on the expression characteristics of initiation transcript of the eel neuroendocrine synchronization

○ Analysis of neuroendocrine rhythm synchronization expression characteristics according to the changes of photoperiod

- The change from long cycle (15L9D) to short cycle (9L15D) is thought to act as an important environmental factor that synchronizes neuroendocrine

- It was confirmed that melatonin secretion was rapidly increased due to the changes of moonlight and directly affected by the activity of the BPG axis, which affects scattering.

* Neuroendocrine synchronization of eels is affected by light, and unlike common bony fish and mammals, it is thought that the retina plays a major role in synchronizing neuroendocrine secretion.

V. Expected outcomes

1. It is possible to interpret the spawning ecology of eels endocrinologically
2. Identification of neuroendocrine biorhythm mechanisms for each behavioral pattern of nocturnal fish
3. Suggest the possibility of entire eel farming through controlling of environmental factors
4. High-quality fertilized eggs can be produced by inducing stable and eco-friendly maturation
5. Propose the possibility of aquaculture for fish species that cannot be farmed by exploring appropriate environmental factors

KEYWORDS : 뱀장어, 뱀장어 산란회유, 뱀장어 성성숙, 전사체 발현, 신경내분비, 야행성, Eel, eel migration, eel reproduction, transcript, neuro-endocrine, nocturnal

목 차

제 1 장 서론	1
1절. 연구의 목적 및 필요성	1
2절. 연구의 목표	2
제 2 장 국내외 연구개발 현황	5
1절. 국내외 연구개발 현황	5
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	8
1절. 뱀장어 성성숙 단계별 신경내분비 주요 전사체 탐색	8
2절. 뱀장어 뇌심부 및 광수용기관 환경반응 전사체 발현	20
3절. 뱀장어 신경내분비 동기와 개시 전사체 발현 특성 연구	32
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	38
1절. 목표대비 달성도	38
2절. 연구내용 및 달성실적	39
3절. 연구성과의 의의	40
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	41
1절. 기대효과	41
2절. 연구개발의 활용방안	41
제 6 장 참고문헌	42

제 1 장 서 론

1절. 연구의 목적 및 필요성

1. 목적

현재까지 명확하지 않은 뱀장어의 특이적인 산란생태(산란회유)에 따른 신경내분비 전달 기전의 변화를 조사한다. 또한 이러한 신경내분비 전달기전이 외부적인 환경변화를 감지하고 신경내분비를 동기화시키기는 기전을 조사한다. 이러한 연구 결과들은 종묘생산이나 멸종위기종 뱀장어의 자원량 회복을 위한 인위적 성성숙 유도 기술에 활용할 수 있을 것이다.

2. 필요성

가. 기술적 측면

(1) 뱀장어 종 특이적 산란 특성 및 생태 규명을 위한 창의적인 연구 방법 필요하고 더욱이 야행성어류의 신경생리학적 측면에서 어떠한 환경정보를 이용해 신경내분비를 제어하는지는 명확하게 밝혀지지 않았다.

(2) 일본 수산종합연구센터 양식연구소는 2010년에 뱀장어의 완전 양식에 성공했다고 발표했다. 또한 한국의 국립수산과학원은 이러한 문제점을 해결하기 위해 2005년부터 뱀장어 종묘생산 연구를 시작하여, 2016년 일본에 이어 세계 2번째로 완전양식에 성공하였고 대량생산을 위한 연구 및 독자적인 수정란 생산기술 개발연구를 지속해서 수행 중이다.

(3) 하지만 한국과 일본에서 모두 대량생산에는 성공하지 못하였다. 이러한 이유 중 가장 먼저 거론되는 부분이 뱀장어의 암컷 성성숙을 위해 연어뇌하수체 추출물을 이용해 난소 성숙을 유도하고 있다.

(4) 연어뇌하수체추출물 주사법 이외에 다른 성성숙을 유도 기술이 현재까지 개발되지 못하고 있어 뱀장어 gonadotropin hormone(GTH) 재조합 단백질 생산을 통해 해결

하고자 연구를 수행하고 있으나 현재까지도 뚜렷한 해법을 밝혀내지 못하고 있다.

나. 경제·산업적 측면

(1) 양식 불가대상 어종 및 새로운 양식대상 어종의 산업화 기술 개발이 필요하다. 2020년 국립수산물과학원 자료에 따르면 뱀장어 종묘생산 기술 개발 성공시 연간 4조원 대의 실뱀장어 시장을 우점할 수 있을 것으로 예상하고 있다. 또한 2000년 후반대부터 자연에서만 채포되는 실뱀장어 자원이 매년 급감하고 있어 기술개발이 시급한 실정이다.

다. 사회·문화적 측면

(1) 전 세계적으로 뱀장어 종류는 18종이 분포하며, 바다 수심 300미터 내외에서 산란하고 6개월 이후에 실뱀장어 형태로 변태 이후 담수지역인 강으로 거슬러 올라와 성장하는 매우 특이한 생태특성을 지니고 있어서, 인공종묘생산이 매우 어려운 어종으로 알려져 있다.

(2) 제14차 국제 야생동식물 멸종 위기종 거래에 관한 조약(CITES)」에 따라 2013년부터 유럽산 실뱀장어 자연산 종묘의 국가 간 거래가 금지되므로, 극동산 실뱀장어 종묘를 확보하려는 동아시아 4개국 (한국, 일본, 중국 및 대만)의 종묘 전쟁이 불가피하다.

2절. 연구의 목표

1. 어류의 신경내분비

어류의 신경내분비는 다른 척추동물들과 마찬가지로 외부의 환경신호나 물리적자극을 수신하고 처리하는 뇌 시상하부에 있는 시색전야의 신경세포체에 의해 제어된다. 시상하부의 시색전야는 다양한 신경 호르몬을 합성하는 신경세포체가 분포되어 있다. 신경세포체에서 분비되는 뇌하수체 자극 호르몬들은 뇌하수체를 통해 번식, 성장, 면역, 소화등의 내분비계를 조절한다.

2. 신경내분비 동기화

신경내분비계는 환경정보와 물리적자극에 의해서 동기화된다. 대부분의 어류의 경우 계절적인 변화(광주기, 수온)에 의해 생체리듬을 변화시키는 계절적리듬, 낮과 밤의 변화

를 인식하는 일주기리듬을 통해 신경내분비를 동기화하고 생리적인 요구에 따라 번식, 성장등의 내분비를 재활성화시킨다. 이러한 신경내분비의 활성화는 외부적인 환경변화와 같은 입력신호가 없다면 체내 시간을 측정하는 interval timer는 동기화되지 않으며, 신경내분비의 분비신호는 시기를 벗어나게 된다. 이러한 신경내분비의 정상적인 작동은 반드시 외부적인 환경적인 지시에 따른 동기화가 핵심이다.

3. 뱀장어의 산란생태

동북아시아 지역에 서식하는 뱀장어는 태평양 서마리아나 해구 남서쪽부근에서 산란하는 것으로 알려져 있다. 부화한 뱀장어는 랩토세팔리우스 단계에서 실뱀장어로 약 10개월의 변태과정을 거치는 동안 쿠로시오해류를 타고 동북아시아 지역의 담수지역(강, 하천)으로 유입된다. 담수지역에 정착한 뱀장어는 다시 실뱀장어(glass eel)에서 체색이 황갈색의 뱀장어로 성장해간다(yellow eel). 담수에서 성장한 뱀장어들은 Puberty단계(사춘기)를 지나고 5~17년간 일생의 대부분을 보낸다. 성성숙 연령이 지난 후 해수지역으로 이동에 성공한 개체들은(silver eel) 산란을 위해 다시 태평양 서마리아나 해구까지 이동한다. 산란에 참가한 뱀장어 들은 산란장에서 일생을 마감한다. 뱀장어의 산란과 생태 연구는 최근까지 활발히 진행되고 있지만 아직도 풀어야 할 내용들이 많다. 동이 시기는 동북아시아(temperature zone)에서 여름에서 가을로 전환되는 시점으로 일장이 짧아지고 수온이 낮아지는 등 급격한 환경변화가 동반되는 시기이다. 이러한 이유에서 환경적인 변화는 뱀장어에서 번식을 포함한 산란회유(catadromous migration)와 밀접하게 관련이 있을 것으로 사료된다. 현재까지 뱀장어의 산란회유과정 중의 성성숙과 관련하여 깊은 수심, 유영행동, 염분농도의 변화, 수온의 변화등을 집중적으로 조사하였으나, 산란과 관련한 뚜렷한 증거는 아직 찾지 못하였다.

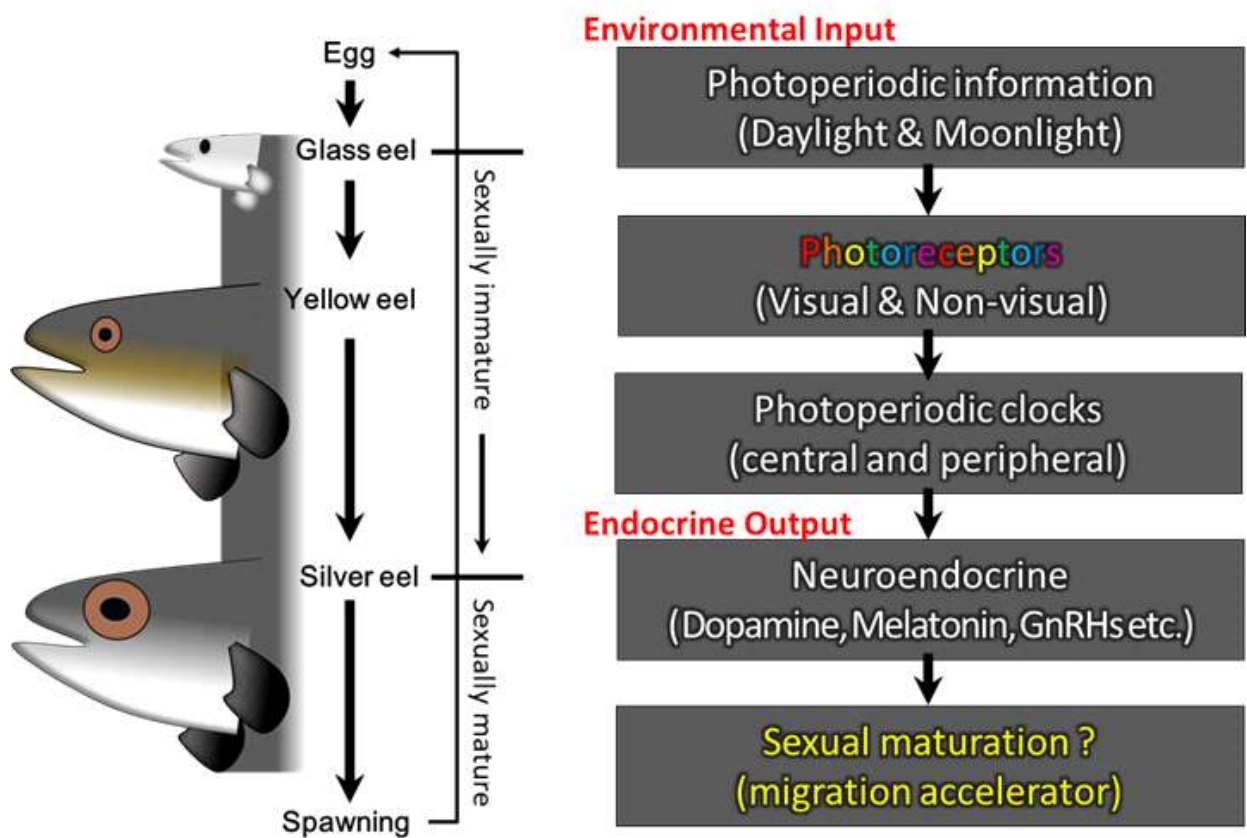


그림 1. 이 연구의 최종목표 및 목표 해결을 위한 연구 개발내용 및 범위 모식도: 뱀장어의 일생은 서식 지역에 따라 총 세 단계의 형태적인 변화과정을 거친다. Glass eel(실뱀장어, 소상 시기의 치어 단계), yellow eel(황뱀장어, 담수에 서식하는 동안의 성적 미성숙 단계), Silver eel(은뱀장어, 산란을 위해 해수로 이동하는 성 성숙 단계). 이러한 뱀장어의 생태학적 변화에 동반하여 작용하는 신경내분비학적(번식학적, 신경생리학적) 관점에 관한 연구가 극히 제한적이다. 기존의 다른 척추동물 및 경골어류와 비교하여 종 특이적 기전 때문으로 추측하고 있다. 더욱이 뱀장어는 야행성 어종으로 신경내분비학적 측면에서 주행성 경골어류와는 분명히 다른 기전에 의해 작용할것이라고 추측할 뿐이다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 이 연구에서는 기존의 뇌-뇌하수체-생식선 축의 내분비학적 관점에서 벗어나 좀 더 상위 기전에서 작용하는 신경내분비를 동기화시키는 환경요인을 탐색하고 기전연구를 통해 구체적이고 새로운 루트의 성성숙 활성화 기전에 관해 연구하고자 함.

제 2 장 국내외 연구개발 현황

1절. 국내외 연구개발 현황

전 세계적으로 뱀장어 종류는 18종이 분포하며, 바다 수심 300미터 내외에서 산란하고 6개월 이후에 실뱀장어 형태로 강으로 올라와서 성장하는 매우 특이한 생태 특성을 지니고 있어서, 인공종묘생산이 매우 어려운 어종으로 알려져 있다.

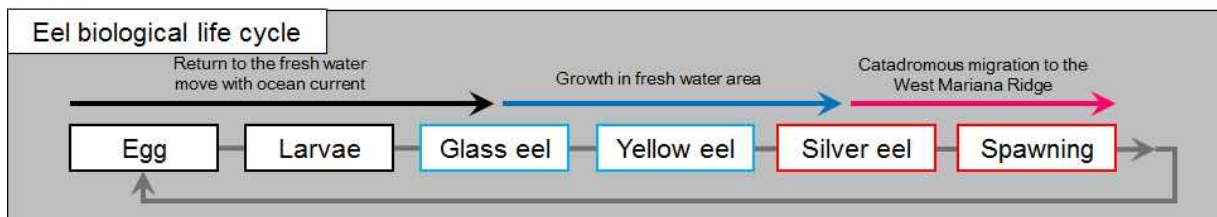


그림 2. 현재까지 알려진 뱀장어, *Anguilla japonica*의 life cycle 모식도.

따라서, 전 세계적으로 뱀장어 양식에 사용되는 실뱀장어는 전적으로 자연산을 채집하여 사용하고 있으며, 범지구적인 뱀장어 자원 감소에 따라 종묘 공급 불안정 및 가격 급등은 더욱 심해질 것으로 예상된다.

특히, 「제14차 국제 야생동식물 멸종 위기 종 거래에 관한 조약(CITES)」에 따라 2013년부터 유럽산 실뱀장어 자연산 종묘의 국가 간 거래가 금지되므로, 극동산 실뱀장어 종묘를 확보하려는 동아시아 4개국 (한국, 일본, 중국 및 대만)의 종묘 전쟁이 불가피할 것으로 보인다.

국립수산과학원은 이러한 문제점을 해결하기 위해 2005년부터 뱀장어 종묘생산 연구를 시작하여, 2016년 일본에 이어 완전양식에 성공하였고 대량생산을 위해 지속적으로 연구 중이다.

일본 수산종합연구센터 양식연구소는 2010년에 뱀장어의 완전 양식에 성공했다고 발표했다. 인공 수정을 한 수정란에서 성숙어까지 인공적으로 성장시킨 것은 처음이라고 한다. 실용화해서 대량생산할 수 있게 되면, 뱀장어의 안정 공급으로 이어질 것이다.

뱀장어 완전양식 기술개발 추진현황

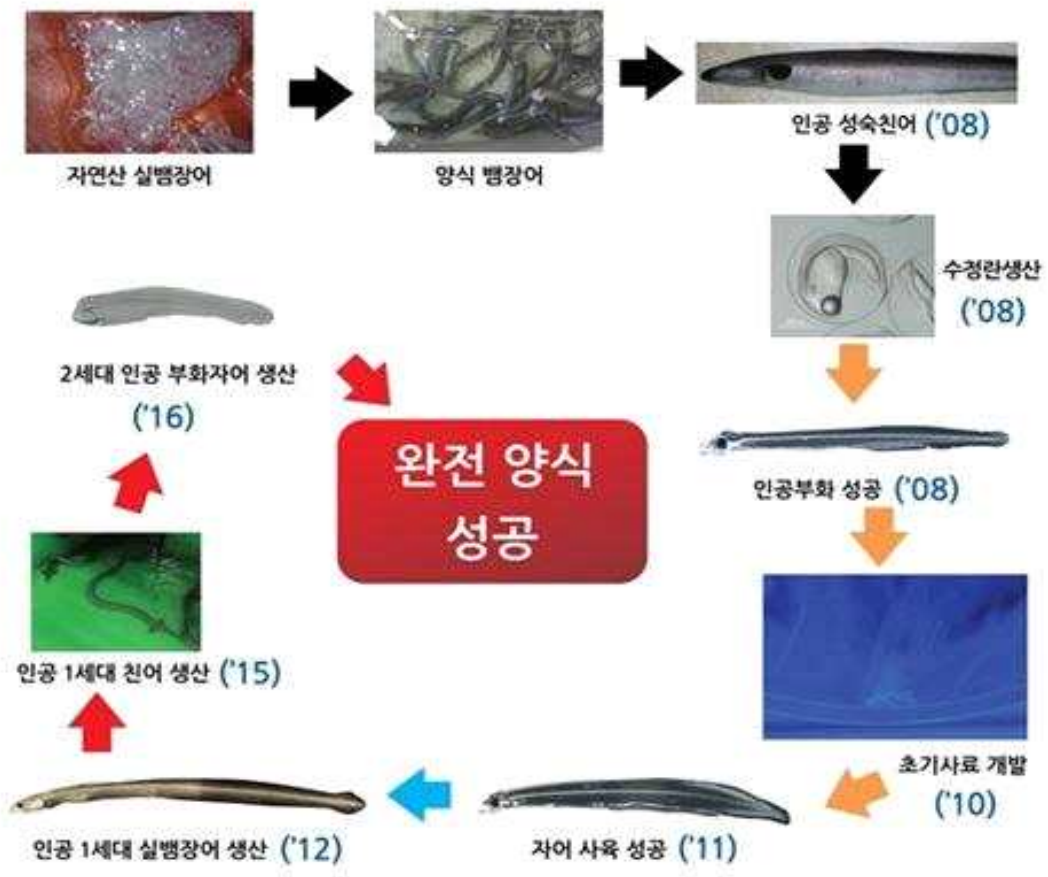


그림 3. 국립수산과학원 뱀장어 완전양식 기술개발 추진 현황 보도자료(출처: 해양수산부)

図2-2-4 ウナギの種苗生産技術開発の現状



(独)水産総合研究センターでは、平成14(2002)年に卵から人工シラスウナギまでの飼育に成功(緑色の実線)。また平成22(2010)年には、人工親魚から得た卵をふ化させて「完全養殖」に成功しました(青色の実線)。さらに、完全養殖ウナギの仔魚からシラスウナギへの飼育期間の短縮に成功しました(赤色の実線)。

今後の取組

- 良質卵の安定大量生産技術の開発(親魚の成熟誘起法等)。
- 量産のための飼育システムの開発(ふ化仔魚の適正な環境、餌飼料の開発等)。

그림 3. 일본 뱀장어 완전양식 성공 보도자료. 일본 수산청 자료 인용 (www.ifa.maff.go.jp)

제 3장. 연구개발 내용 및 결과

1절. 뱀장어 성성숙 단계별 신경내분비 주요 전사체 탐색

1. 연구방법

가. 실험어

실험어는 제주특별자치도 제주시 구좌읍 하도리 하천에서 채집된 개체 그리고 제주시 동문시장 소재(삼원장어수산), 전라북도 광주 광산구 소재(한울수산)에서 구입한 개체를 이용하였다. 확보된 뱀장어는 담수 원형수조(유효수량=1톤, 수온=20℃±1℃, 광주기=12L:12D)에서 최소 1주일 간 순치 사육 후 실험에 이용하였다.

뱀장어 망막 및 전뇌 transcripome 분석은 자연에서 채집된 뱀장어(체중: 233~726g, 체장: 55.3 ~ 80.7cm)를 사육수조(유효수량 500L, 수온= 20 ± 1℃, 광주기= 12L:12D)에서 1달간 순치 사육 후 실험에 이용하였다. 실험어의 sampling은 주간(ZT6)과 야간(ZT18)에 Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222, Sigma-Aldrich, St., USA)를 이용하여 마취 후 각 시간대별 암수 각각 6미씩 총 12미를 sampling 하였다. Total RNA는 TriPure Isolation reagent (Roche Diagnostics)를 이용하여 분리하였고, Genomic DNA contamination를 피하기 위해 Deoxyribonuclease (Wako, Tokyo, Japan)을 이용하여 처리하였다. 추출한 total RNA는 2100 bioanalyzer RNA 6000 NANO chip을 이용하여 정량 및 정성분석 하였다.

뱀장어 성성숙 유도는 수컷과 암컷을 선별하여 담수 수조에 최소 1주간 순치 사육 후 실험에 이용하였다. 뱀장어 수컷은 Human chorionic gonadotropin (HCG, 10IU/g-1)을 1주일 간격으로 총 8회 복강 주사하였다. 뱀장어 암컷은 연어뇌하수체추출물(salmon pituitary extract; SPE, 20 mg/kg-1)를 1주일 간격으로 총 8회 복강 주사하였다 (그림 1). 성성숙 유도시 사육 수조 조건은 12L:12D 주기의 광주기 (점등

= 0700h, 소등 = 1900h) 그리고 사육 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였고 완전순환여과 시스템(유효수량 1톤)을 이용하여 사육하였다.

나. Total RNA 추출 및 cDNA합성

Total RNA는 RNA-iso (TaKaRa-Bio, Otsu, Japan)를 이용하여 분리하였다. 분리된 total RNA는 전기영동과 spectrometer를 이용하여 정량 정성분석하였다. Genomic DNA contamination를 피하기 위해 DNase I (Promega, Madison, WI)를 처리하였다. cDNA 합성은 1000ng의 total RNA를 주형으로 Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche-diagnostics, Indianapolis, IN)를 이용해 합성하였다.

다. 염기서열 분석

Sequencing을 통해 얻은 각각의 염기서열은 BLASTN (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD), 그리고 amino acid sequences는 translator program (ORF Finder, NCBI, <http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)을 이용하여 분석하였다. 그리고 각각의 유전자의 phylogenetic tree 분석은 MEGA v.5 software에서 pairwise sequence comparisons (pairwise deletion of gaps)를 이용하여 Neighbor–Joining method에 의해 1,000회 bootstrap trial를 시행하였다. 그 결과를 CONSENSE program of PHYLIP를 제작하여 분석하였다 (그림 2).

라. 전사 전장 전사체 서열분석(Whole Transcriptome Sequencing)

전사 전장 전사체 서열분석을 위하여, total RNA의 1 μg 은 TruSeq® Stranded Total RNA Sample Preparation Guide (Illumina) 의 “RiboZero Delete and Fragment RNA procedures”으로 ribosomal RNA를 제거하기 위하여 사용되었고, ribosomal RNA가 제거된 total RNA 500 ng은 Illumina TruSeq™ RNA sample preparation kit를 사용하여 cDNA 합성에 사용되었다. 간단하게 그 방법은 다음과 같다. Random primer와 역전사 효소 (Super-Script II, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 준비된 total RNA을 주형가닥으로 하여 cDNA를

합성하였으며, 이 합성된 cDNA는 바로 kit에 공급된 시약을 이용하여 이중가닥의 DNA으로 전환되었고, 이 cDNA는 library 준비를 위하여 사용되었다. 라이브러리 구성을 위하여 합성된 이중가닥 cDNA는 Illumina TruSeq™ RNA sample preparation kit를 이용하여 그 제조사 추천 방법에 따라 준비하였다. 라이브러리의 유효성 검사는 DropSense96 (Trinean) 또는 Ribogreen (Invitrogen)으로 정량을 측정하였으며, 또한 그 라이브러리의 QC는 Agilent 2100 Bioanalyzer으로 확인하였다. 전장 전사체 서열분석은 Illumina NextSeq500 플랫폼을 사용하여 2×150 base pairs로 샘플에 대하여 적어도 50M reads의 생성으로 실행하였다.

마. De Novo Transcriptome Assembly

전장 전사체 서열 분석에 의하여 생성된 raw sequencing data의 예비 품질은 FastQC v.0.11.3 application (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)을 통하여 허용 품질의 read를 측정하여 수행되었다. 어댑터의 제거를 위하여, Cutadapt Python package (Chen et al., 2014)을 사용하였고, 어셈블리는 이들 cleaned reads를 가지고 Trinity 프로그램 (Grabherr et al., 2011)을 사용하여 실행되었다. 다음에, 그 어셈블리는 transrate software (Smith-Unna et al., 2015)로 de novo transcriptome assembly 품질 측정을 수행하였다. Gene prediction은 진핵생물에서의 유전자 예측 프로그램인 AUGUSTUS software (Stanke and Morgenstern, 2005)로 ORF 서열에 대한 검정을 실시한 후에, Blastx와 Blastn 알고리즘 (Altschul et al., 1990)을 사용하여 기존에 보고된 rhodopsin family 유전자 서열들과 대조하여 뱀장어조직의 rhodopsin family 유전자를 얻었으며, 그 확인을 위하여 NCBI nonredundant (nr) database을 사용하여 그 어셈블리 서열을 확인하였다.

라. 유전자 Cloning

뱀장어의 AANAT1, 2, Per1, 2, 3와 Cry1, 2, 3 염기서열 분석을 위해 뇌와 망막의 cDNA cloning을 수행하였다. 각 유전자의 단편은 RT-PCR을 이용해 증폭되었다. RT-PCR은 94°C, 45초의 denaturation, 58°C, 45초의 annealing, 72°C, 1분의

extension의 36 cycle의 조건에서 수행되었다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 각 산물의 크기를 확인하였고 gel purification kit (Roche)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 pGEM-T Easy Vector (Promega)를 이용하여 ligation, JM109 Competent Cell (Takara Bio)를 이용하여 transformation을 수행하였다. 1mg ampicillin, 0.8mg X-gal을 함유한 LB plate에 도말하여 배양하였다. LB plate의 백색 colony를 5ml의 LB broth(1ml LB broth/100ng ampicillin)에 배양한 후, plasmid extract kit (Roche)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다.

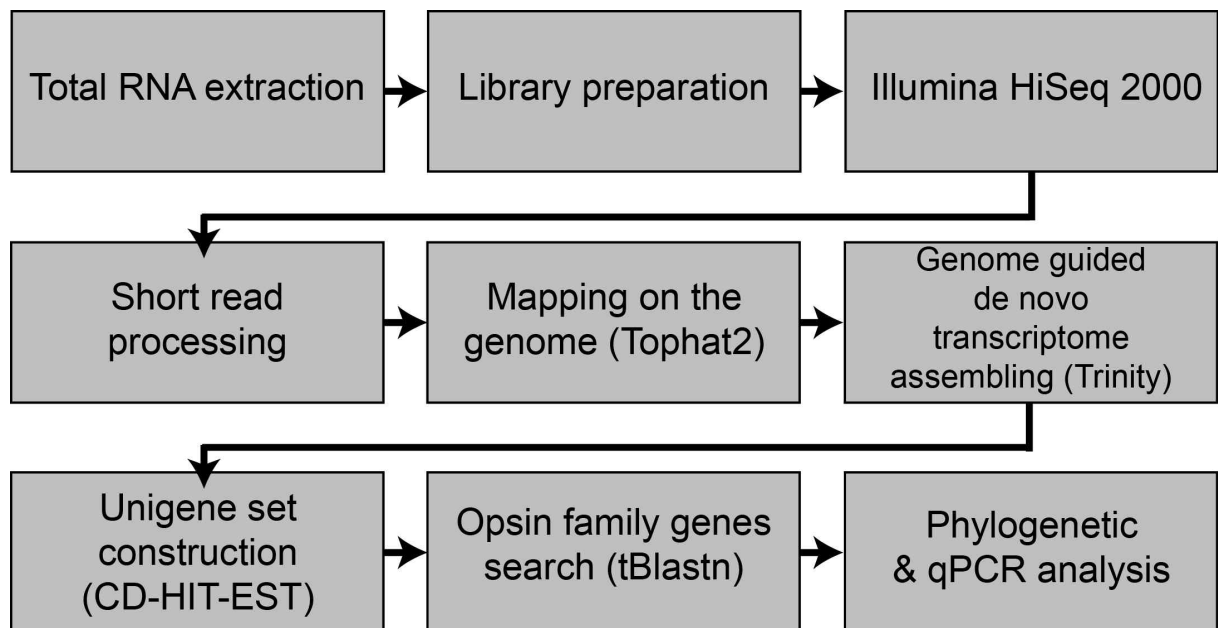


그림 5. RNA-seq 및 DEG 실험 flowchart

2. 연구결과

(1) 신경내분비 동기화 전사체 cloning

RNA-seq를 통해 얻은 전사체 정보 중 시계유전자와 관련된 유전자는 총 8개가 조사되었다. 이번 연구에서 확인된 뱀장어 망막과 뇌에서의 mRNA는 *aanat1*(Aralkylamine N-Acetyltransferase), *Per1*(period), *Cry2*(cryptochrome), 3, 4가 확인되었다(그림 6~ 13). 뱀장어 시계유전자 탐색은 전장 전사체 염기서열 분석 및 cDNA cloning법을 이용하여 조사하였다. 뱀장어의

aralkylamine N-acetyltransferase (AANAT)의 cDNA는 망막과 전뇌에서 추출하였다. 뱀장어 망막 AANAT1과 뇌 AANAT2의 염기서열을 분석하였다. AANAT1, AANAT2의 염기는 각각 615bp, 489bp이었다. AANAT1, AANAT2 유전자의 amino acid는 204aa, 163aa이었다.

뱀장어 AANAT의 amino acid 서열 상동성을 다른 동물군 비교 분석한 결과, AANAT1의 상동성은 어류에서 81~94%, 양서류(Xenopust laevis)와 조류(Columba livia)는 각각 84%와 85%로 비교적 높은 상동성을 나타냈으나 포유류(Mus musculus, Ovis aries)는 70~71%로 비교적 낮은 상동성을 나타냈다. AANAT2의 amino acid 서열 상동성은 어류에서 80~89%, 로 비교적 높은 상동성을 보였고 양서류(Xenopust laevis)에서 69%, 조류(Columba livia)는 72%, 포유류(Mus musculus, Ovis aries)에서 67~68%로 비교적 낮은 상동성을 나타냈다.

뱀장어의 Period (Per)의 cDNA는 뇌에서 샘플하였다. 뱀장어 뇌 Per 3종의 염기서열을 분석하였다. Per1, Per2, Per3의 염기는 각각 3173 bp, 3657 bp, 1248 bp이었다. Per1, Per2, Per3 유전자의 amino acid는 1057 aa, 1218 aa, 416 aa이었다.

뱀장어 Per의 amino acid 서열 상동성을 다른 동물군 비교 분석한 결과, Per1의 상동성은 어류에서 59~71%, 양서류(Xenopust laevis)에서 57%, 포유류(Mus musculus, Rottus norvericus, Homo sapiens)에서 59~61%로 모든 동물군에서 낮은 상동성을 보였다. Per2의 amino acid 서열 상동성은 어류에서 61~73%로 다른 동물군에 비해 비교적으로 높은 상동성을 보였으나 양서류(Xenopust laevis)에서 47%, 포유류(Rottus norvericus, Mus musculus, Homo sapiens)에서 49~51%로 비교적 낮은 상동성을 보였다. Per3의 amino acid 서열 상동성은 어류에서 60~64%, 포유류(Mus musculus, Rottus norvericus, Homo sapiens)에서 53~55%로 모든 동물군에서 낮은 상동성을 나타냈다.

뱀장어의 Cryptochrome (Cry)의 cDNA는 뇌에서 샘플하였다. 뱀장어 뇌 Cry 3종

의 염기서열을 분석하였다. Cry2, Cry3, Cry4의 염기는 각각 1857 bp, 951 bp, 1002 bp이었다. Cry2, Cry3, Cry4 유전자의 amino acid는 618 aa, 317 aa, 333 aa이었다.

뱀장어 Cry의 amino acid 서열 상동성을 다른 동물군 비교 분석한 결과, Cry2의 상동성은 어류에서 82~91%, 양서류(Xenopus laevis)에서 79%, 조류(Gallus gallus)에서 80%, 포유류(Mus musculus, Homo sapiens)에서 81~82%로 모든 동물군에서 높은 상동성을 보였다. Cry3의 amino acid 서열 상동성은 Zebrafish (Danio rerio)에서 84%로 비교적 높은 상동성을 보였다. 또한 다른 동물군(Gallus gallus, Mus musculus, Homo sapiens)의 Cry1의 amino acid 서열과 73%로 비교적 높은 상동성을 나타냈다. Cry4의 amino acid 서열 상동성은 Zebrafish (Danio rerio)에서 72%로 비교적 높은 상동성을 보였으나 양서류(Xenopus laevis)에서 65%, 조류(Gallus gallus)에서 65%로 비교적 낮은 상동성을 나타냈다.

표 1. AANAT1 아미노산 염기서열

AANAT1	MSVVSALPFLKPLHMRAPISPGRRHTLPASEFRSLSPEDAISVFEIEREAFISVSGEC	60
	PLHLDEVHRHFLTLCPELSLWFEEGRLVAFIIGSLWDQDKLNMDALTLHKPHGTTVHIHV	120
	LAVHRTFRQQGKGSILMWRYLQYLRCLPYVRRRAVLMCEDFLVPPFYQKSGFKVLGSPDITV	180
	GPLTFIEMQYPVRGHAFMRRNSGC	204

표 2. AANAT2 아미노산 염기서열

AANAT2	RSCRARSHFLLGTSRLQAAGGSPVAMAQQAISSPFLRPFFLKTPVSVASPGRRHTLPA	60
	SEFRNLTPQDAISVFEIEREAFISVSGECPLTLEEVLGFLGQCPELSLWFEEGQLVAFI	120
	IGSGWDKERLAQEAMTRHVADTTTVHIHVLSVHRHCRQQGKGS	163

표 3. Per1 아미노산 염기서열

Per1	MMSDDNSDSAPSNDTRGGVGGAEIEEEEARQGAGSPGLSGDSSSSDTNRKRGAAPGGVSKA	60
	RSASRGPQDDTDAHSSGNDSEGERDSEGRLEGREASRGRQSTCSSQFSSSHNGKDSAMILET	120
	TESNKSSNSHSPSPSSSVAYSLLSASSEQDHPSTSGCSSEQSARLQTQKELMKALKELK	180
	IRVPAERRGKGRSSTLASLQYALNCVKQVRANQEYYHQWSVEESHDCSLDLSTFTIEELD	240

NITSEYTLKNTDTFSVAISFVSGKVVIYISPOASSLLRCKPERLQGALFSELLAPQDVSTF	300
YSSTAPSRLPLWAACSGSVTSPRDRAQEKS MFCRISGGREQEGVVRYPFRLTPYQLTLR	360
DSDVSDAQPCCLLIAERVHSGYEAPRIPADKRIFTTSHTPSCLFQEVDERAVPLLGYPQ	420
DLVGTPLVLLYLHPEDRPLMVAIHKKILQFAGQPFEHSPLRLCARSGEYLTIDTSWSSFVN	480
PWSRKVAFIVGRHKVRTSPLNEDVFTAPPGGEGRSLVPEISQLCEQIHRLLVQPVHSSSS	540
QGYCSLGSNGSHELPAASAASSSDSAAAAEDPAPPHKPMTFQQICKDVHMKVTSQQVVID	600
SRNRSPPRKHASAGVVKAVQCLDVGKLISEGKVDKI PPKAELPPPPERRESAPAYSQQ	660
INCLDSIIRYLESCNVPNTVKKRCGSSSGTSSSTSDDDKQKEAAGSTNVTLDAAGQKAG	720
PQGPAPALSPLALHSHKADSVVSVTSQCSFSSTIVHVGDKKPPESDIVMEETPPTPTPAPL	780
TPAATPTAVAPPPAPPSPAGAEREGRGGAGRLGLTKEVLLAHTQQEEQNFLCRFRDLN	840
QLPVFDPSSAPYPPSATPFAKGVRSRDYPAVGSSGRRRGRGAKRLKHQEGLAVRRGGV	900
SGTAGGLGANANGEGRGLAFPPPHLLPLGPQTSSSSWPASVVSQASLPVPYPPVLPY	960
PLYPPLAPPNGLPNMQPTPRYP IQAPQLPPPLVPPMMAFVLPNYMFPQLNPAMSQLNPAV	1020
IQLNPAISQLNPAISQLNPAISQLNPAISQLNPAISQL	1057

표 4. Per2 아미노산 염기서열

Per2 MSDDSDSKPYLYSALEGRDEGAVACSSMSQLHRMGYGEGRGRGGAELGLASEGSDSSSQ	60
GPDPSPHS DRKRARSLHEEDVEMKSSGSSSGTESHSHNESHGND SHGNESHGNE SLGSSN	120
GNSKDSALLVSSGSKNSNSHSPSPSSSNAFLLSASSEQDNPSTSGCSSEESAKAKTQ	180
KELLKTLKELKHLHPSEKRQKGNKSS TLSALKYALRCVKQVEANE EYYQLLMINDSQPSG	240
LDVSSYTI E EIDSITSEYTLKNTDIFAVAVSLITGKIVYISDQASCILNCKQSNFKNAKF	300
VEFLTPQDVSVFYSF TTPYRLPSWSMCTGAESSPDCMQEKSFFCRISGGRERGDPQYY	360
PFRMTPYRMKVQDTEHAEDQFCLLLAERVHSGYEAPRIPTDKRIFTTHTTPGCIFQDVD	420
ERAIPLLGFLPQDLIGTPI LLHLHPNDRPIMLAIHRKILQYAGQPFDHSSIRFCARNGEY	480
VTIDTSWSSFVNPWSRKVSFIIGRHKVRMGV NEDVFAAPPSTE VKTMDSDIQEITEQIH	540
RLLLQPVHNNGSSCYGSMGNEHLM SVASSSDSNGGRPRPEEEEE SRKAKPRTFQEVCKGV	600
HMQKNQYQQGAAAFPPKTEPKRMPSTESQQKSPVVRPKDSAVHLSGKENVVS MEDLVGVQ	660
HMQKNQYQQGAAAFPPKTEPKRMPSTESQQKSPVVRPKDSAVHLSGKENVVS MEDLVGVQ	720
EELTYKDETVYSYQQISCLDSVIRYLESCSVPI TVKRKCQSSNTASTNSDEDKQNAVDN	780
AMQVSEEPALLEAQPLPPVKVHKKPPGAAV GSSLAPLALPSKAESVMSITSQCSYSSTI	840
VHVGDKKQPPESEI IEDVSGAGEMGEGPAVAPPSSAVSLPSQEREAYKKLGLTKHVLA AH	900
TQKEEQVFLSRFRDLRGMLSLQADCSVHLDRQRGQPATDAAAAAQGRKQKAGGRAESAN	960
RRGGRNKKTKSKRVKKHESDSTVSHRKQSL LPPRQGLNQT SWSPSDTSQSTTLPMAYPA	1020
VMPAYPMQMPGAGPANARVNPSLPPGFGESQCGQDPR LMPPTPYSTPLVTPMVALVLP	1080
NYMFPQMGGAPHQPFYPDQTSFPPQAAFNGPAPFSATPAFQVQPQFASQNPFFAQLRFQA	1140
QFPFYGMPAEAPKSPAPEPREAVSRSTPQSLGANGQAS PPLFQSRCSSPLQLNLLQLEE	1200
TPRSAEKMDSSAPPGGSQNGVMDKGSAA GPAKSGQEQQV GAPPSPWAVYSPIFSHQ	1260
PAACPANTHLSHSAVRQQ	1278

표 5. Per3 아미노산 염기서열

Per3	MRPDLQTSRDSVWPADQLAGQMPSGGAFIEGEEEDGEGDEAMECSSLVPGGGGGGPEQPLA	60
	AFGPGVKGTVGGSEEVGRSDVGVASRHDGTDSPSNHRSQSTTGLDKRSELHADPASNQTE	120
	SSGSEHPEQERAQSHREIMRAMREMKRRLPSDRKGHRKARTVEALHYALRCVKVQVQASSE	180
	YHKVLLGSWKEEQGEVCPTVCTLEELESVTSEHTLKNTGMFAVVFSLTSGRVLYVSEQAP	240
	SILGLRGSFLRAARFVELLCPQDVNVFYAHTAQPHLPPWTLGPDRAKADLYDCTWVKSFFC	300
	RLRGGKDGEGEARYSPFRLTPYLLKVRGGEEDQPCCALAAERVHSGYEAPRIPLKRV	360
	FTTTHSPGCVFMEVDDRAVPLLGYLPQDLIGSSVLACLHPEDRPLMLALHHKILKYAGQR	420
	PFEYRSLRLRCQNGDYV	437

표 6. Cry2 아미노산 염기서열

Cry2	MAPNSIHWFRKGLRLHDNPALREAVRGAGTVRCVYFLDPWFAGSSNLGVNRWRFLQLCLE	60
	DLASLRKLNLSRLFVVRGQPANVFPRLFKEWKISRLTFEYDSEPFGERDAAIKKLAMEA	120
	GVEVCVKTSHSTLYDLDRVIELNNGQPPLTYKRFQTLISRMDPPEPPVDPLCASFMGRCVT	180
	PVADDHGDYKGVPSLEELGFDTEGLPSAVWPGGETEALTRIERHLERKAWVANFERPRMN	240
	ANSLLASPTGLSPYLRFGLSCRLFYKLTLDLYKKVKNSSPPLSLYGQLLWREFFYTAA	300
	TNNPRFDKMEGNPICVQIPWDRNPEALAKWAEGCSGFPWIDAIMTQLRQEGWIHHLARHA	360
	VACFLTRGDLWISWEEGMKVFEELLLDADWSVNAGSWMWLSCSSFFQFFHCYCPVGFGR	420
	RTDPNGDYIRRYLPVLRGFPAKYIYDPWNAPEVQKAAKCVIGVQYPRPMVQHAEASRLN	480
	IERMROIYQQLSCYRGLGLLATVPSNPGGNEGAAAMGACAAEGPHEGATAAGYQLSVTPQ	540
	IDWSTGVHPYPPKESQSSSSTQQQGFTGGSSLVCYRQESQQTLTAPQGLSSILSTVKRH	600
	SEDAPPSVSSKVQRQNSN	618

표 7. Cry3 아미노산 염기서열

Cry3	MVVNSIHWFRKGLRLHDNPALQEALNGADTVRCVYILDWPFAGSANVGVNRWRFLLESLE	60
Cry3	DLDTSLRKLNSRLFVIRGQPADVFPRLFKEWNI TRLTFEYDSEPYGKERDGAIIKMAQEF	120
Cry3	GVETRVKNSHTLYNLDRIIELNNSPPLTFKRFQALVSRLELPKKPLPPVTRQQMDGCPA	180
Cry3	HIADNHDERYGVPSLEELGFKTHGLSPA VWKGETEAMDRLNKHLDRKAWVANFERPRIG	240
Cry3	ASSLMASPTGLSPYLRFGLSCRVFYKLYRELYQQVRRHGSPPLSLFGQLLWREFFYAAA	300
Cry3	TDNPNFDRMAGNPICVQ	317

표 8. Cry4 아미노산 염기서열

Cry4	MTHRTIHLFRKGLRLHDNP SLVAALESSAAVYPVFVLDRAFLEGAMRMGPLRWRFLQLSL	60
Cry4	RDLQDGLAALGSRLHVLQGRHEAVLRRLVRRWGV TQLTLDAEVEPFYAQLDDGLRALCQE	120

Cry4	LGVLVRSVAHTLYDVRRIKANGGEPPLTYKKFLQVLSVLGEPDKPAREITLQDFQKCK	180
Cry4	TPVDDGNDEQYRIPSLLEDLGIEVDLEVLWPGGESEGLKRLEKHFESQGWIANSKPRITP	240
Cry4	NSLLPSTTGLSPYFSLGCLSVRSFYKLSNIYAQSKNHSPPVSLQGQLLWREFFYTVAS	300
Cry4	ATPNFTKMAGNPICLQIGWYEDQAALKWRTAQT	334

The structure of AANAT proteins

AANAT1a	-----MSVVSALPFLKPLHMRAPISPGRQRRHTLPASEFRSLSPEDAI SVFEIEREAFI	54
AANAT2	MAQQAIS SPFLRPFFLKTPVSV A--SPGRQRRHTLPASEFRNLTPQDAI SVFEIEREAFI	58
	PKA/14-3-3	C/c-1
AANAT1a	SVSGECPLHLDEVRHFLTLCPELS LGWFEEGR LVAFI IGS LWDQDKLNMDAL TLHKPHGT	114
AANAT2	SVSGECPLTLEEV LGFLGQCPELS LGWFEEGQLVAFI IGS GWDKERLAQEAMTRHVADTT	118
	D/c-1	D/c-2
AANAT1a	TVHIHVLAVHRTFRQQGKGSILMWRYLQYLRCLP YVRRVLMCEDFLVPPFYQKSGFKVLG	174
AANAT2	TVHIHVL SVHRHCRQQGKGFILLWRYLQYLRCLPRLRRALLVCEEFLLVPPFYLKAGFKEKG	178
	Motif A	Motif B
AANAT1a	PSDI TVGPLT FIEMQY PVRGHA FMRRNSGC	204
AANAT2	PSAISVGSF AFMEMEY LLGGLA YARRNSGC	208
	PKA/14-3-3	

Sequence alignment of *Anguilla japonica* AANAT1a and AANAT2.

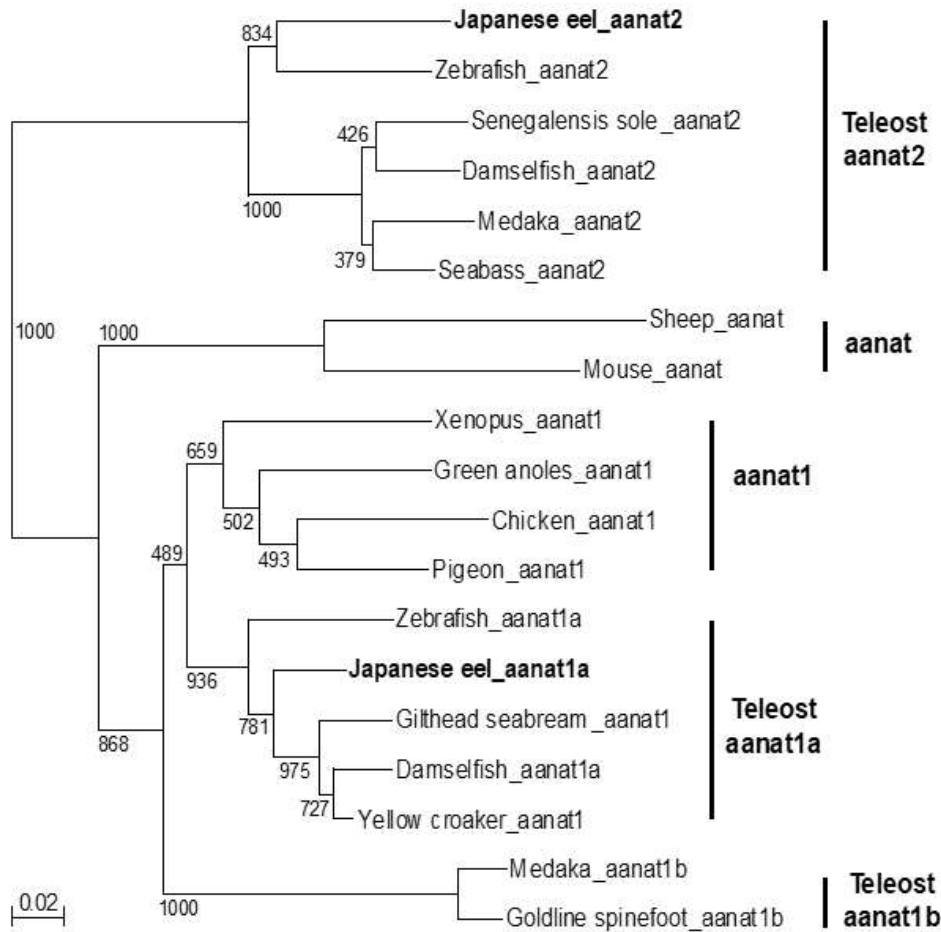


그림 6. 뱀장어 aanat amino acid의 계통분류학적 분석

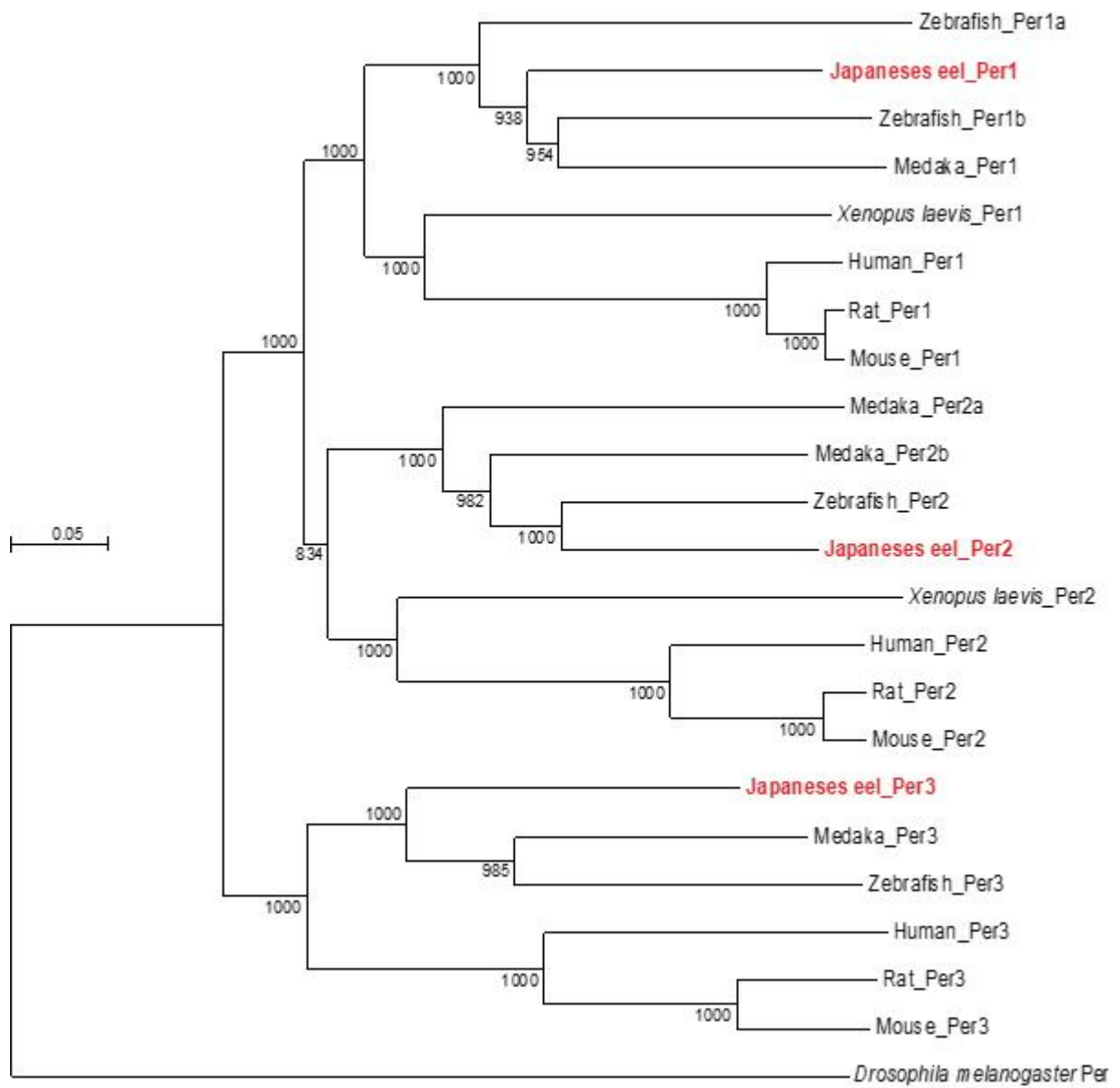


그림 7. 뱀장어 Period amino acid의 계통분류학적 분석

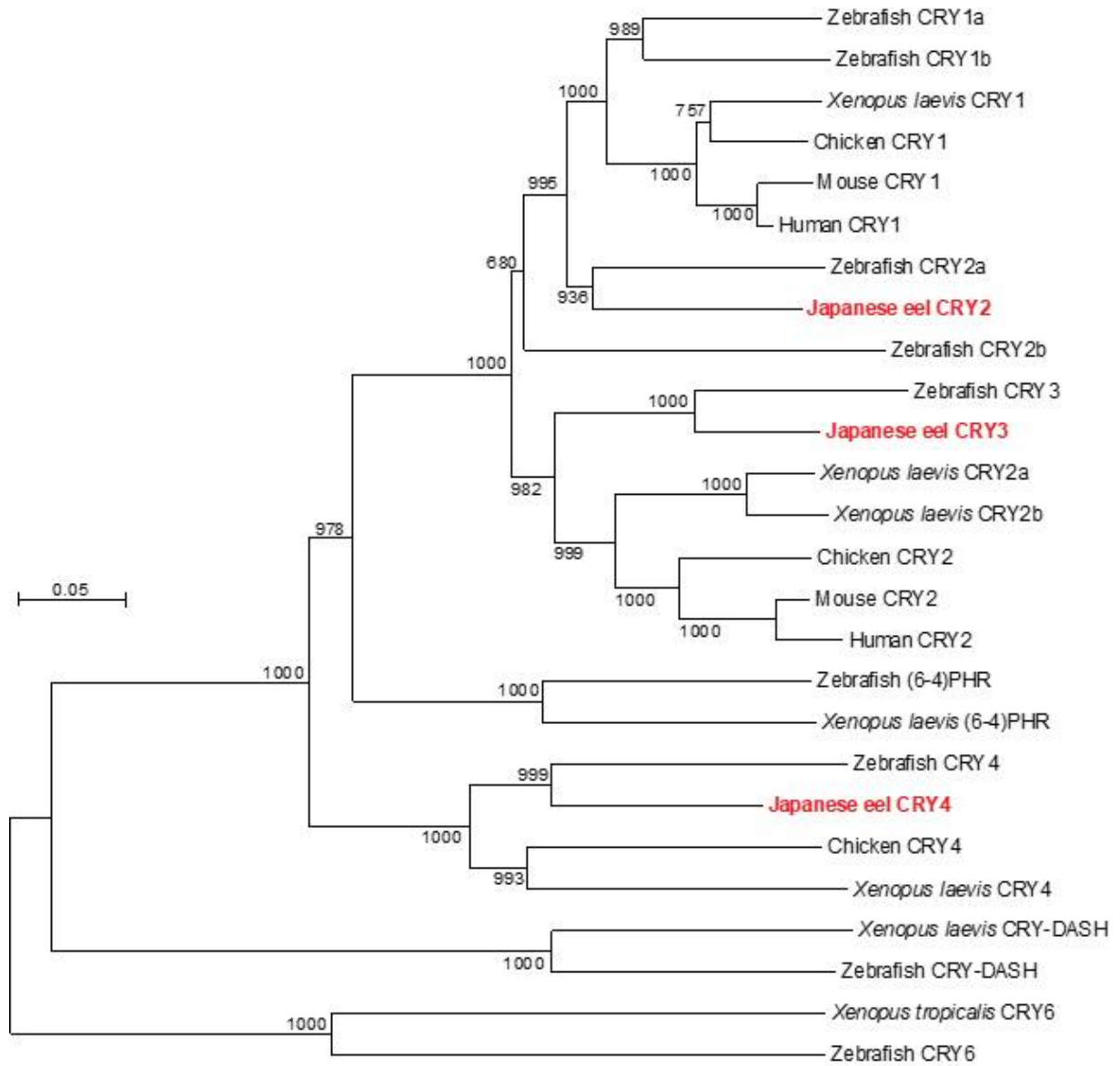


그림 8. 뱀장어 Cryptochrome amino acid의 계통분류학적 분석

2절. 뱀장어 뇌심부 및 광수용기관 환경 반응 전사체 발현

1. 연구방법

가. 실험어

실험에 사용된 뱀장어는 전라남도 소재의 민물장어 양식장에서 사육 중이던 개체 중 최소 체중이 280g에서 최대 체중 450g이 되는 개체를 구입하여 실험에 사용하였다 (n=234). 구입한 뱀장어는 담수 수조에 최소 1주간 순치 사육 후 실험에 이용하였다. 순치 시 사육수조 조건은 실내 완전순환여과시스템(유효수량 1 ton)에서 수온 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, LED(KRGB3, SS Light, Co., Seoul, South Korea)를 이용하여 12L:12D 조건 (점등 = 07:00 h, 소등 = 19:00 h, 600 lx, PPF_D = $10.0 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, $\lambda_p = 545 \text{ nm}$)에서 진행하였다.

나. 실험 디자인

실험어는 1주간 순치 후 총 세 그룹으로 나누어 실험하였다.

- (1) 12L12D 조건(ZT0: 점등 = 7:00 h, 소등 = 19:00 h)
- (2) LL 조건(24시간 점등)
- (3) DD 조건(24시간 소등)

실험에 사용된 광요인은 LED를 사용하였다. 사육 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 실험어는 3일 후에 각 그룹별 ZT 혹은 CT 2, 6, 10, 14, 18, 22 총 여섯 번, 8미씩 샘플링하였다. 실험어는 0.01%의 2-phenoxyethnal (Sigma-aldrich)를 이용하여 5~10분간 사육수를 이용하여 마취하였다. 샘플은 뇌, 망막을 어체로부터 적출하여 분석에 사용할 때까지 -80°C 에서 보관하였다.

다. Total RNA 및 cDNA 합성

Total RNA는 RNA-iso (TaKaRa-Bio, Otsu, Japan)를 이용하여 분리하였다. 분리된 total RNA는 전기영동과 spectrometer를 이용하여 정량·정성 분석하였다. Genomic DNA contamination를 피하기 위해 DNase I (Promega, Madison, WI,

USA)를 처리하였다. cDNA 합성은 1000ng의 total RNA를 주형으로 Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche-diagnostics, Indianapolis, IN)를 이용해 합성하였다.

라. Real-time qPCR

각 유전자의 발현은 정량적 qPCR 방법을 이용하여 분석하였다. 분석은 BioRad CFX96™ Real Time System (BioRad, Hercules, CA)와 SYBR Green premix II (Takara-Bio)을 이용하였다. Primer sequence는 Primer-BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)를 이용해 약 100-200bp 정도가 되도록 설계하였다. PCR 반응은 50% SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa-Bio), 10⁻⁶M의 primer, 그리고 20ng의 cDNA를 이용하여 반응하여 denaturation (45s, 94°C), annealing (45s, 58°C), 그리고 extension (1 min, 72°C)에서 40 cycle 증폭하였다. 각 유전자의 발현은 standard DNA와의 정량적 분석 및 EF1-alpha normalization 등을 통해 분석하였다.

2. 연구결과

(1) 일주기에 따른 망막 및 뇌심부 생체시계 유전자 발현 특성 분석

뱀장어에서 LD (12h light:12h darkness), LL (constant light), DD (constant darkness) 조건에서 circadian rhythms를 조사하였다. 뇌에서 AANAT2 mRNA 발현은 LD, LL, DD 조건에서 모두 일주기 리듬 변화를 보이지 않았으며 망막에서 AANAT1 mRNA 발현은 LD와 LL 조건에서 ZT14에서 정점을 보이며 일주기 리듬 변화를 나타냈다. 하지만 DD 조건에서는 명확한 일주기 리듬 변화를 보이지 않았다.

Per1 mRNA 발현은 뇌에서 LL과 DD 조건에서 상반되는 일주기 리듬 변화를 보였으며 LD 조건에서는 일주기 리듬 변화를 보이지 않았다. 망막에서 Per1 mRNA 발현은 LL 조건에서 일주기 리듬 변화를 보이지 않았지만 LD와 DD 조건에서 ZT22에 정점을 보였고 비슷한 양상의 일주기 리듬 변화를 관찰할 수 있었다.

Per2 mRNA 발현은 뇌에서 DD 조건에서 일주기 변화 리듬을 보였으나 LD와 LL 조건에서는 리듬을 보이지 않았다. 망막에서 Per2 mRNA 발현은 LD와 DD 조건에서

각각 ZT6과 ZT2에 정점으로 비슷한 리듬 양상을 보였으나 LL 조건에서는 일주기 리듬 변화를 관찰할 수 없었다.

Per3 mRNA 발현은 뇌에서 LL과 DD 조건에서 일주기 변화 리듬을 보였으나 LD 조건에서는 일주기 리듬 변화를 보이지 않았다. 망막에서 Per3 mRNA 발현은 LD 조건에서 일주기 리듬 변화를 보였으나 LL과 DD 조건에서 리듬 변화를 보이지 않았다.

Cry2 mRNA 발현은 뇌에서 LD 조건에서 리듬 변화를 보였으나 LL과 DD 조건에서 일주기 리듬 변화를 보이지 않았다. 망막에서 Cry2 mRNA 발현은 LD와 LL 조건에서 일주기 리듬 변화를 보였으나 DD 조건에서 리듬 변화를 보이지 않았다.

Cry3 mRNA 발현은 LD와 DD 조건에서 리듬 변화를 보이지 않았으나 LL 조건에서 일주기 리듬 변화를 보였다. 망막에서 Cry3 mRNA 발현은 LD, LL, DD 모든 조건에서 일주기 리듬 변화를 보였고 LD와 DD 조건에서 ZT22에 정점이었다. 그리고 LD와 DD 조건에서 비슷한 일주기 리듬 양상을 관찰할 수 있었다.

Cry4 mRNA 발현은 LD와 LL 조건에서 일주기 리듬 변화를 보이지 않았으나 DD 조건에서 일주기 리듬 변화를 보였다. 망막에서 Cry4 mRNA 발현은 LD, LL, DD 모든 조건에서 ZT14에서 정점으로 일주기 리듬 변화를 보였고 LD와 DD 조건에서 비슷한 일주기 리듬 양상을 관찰할 수 있었다. 망막에서 per1, per2, cry3, cry4 mRNA 발현 리듬이 LD와 DD 조건에서 비슷한 패턴을 보였다.

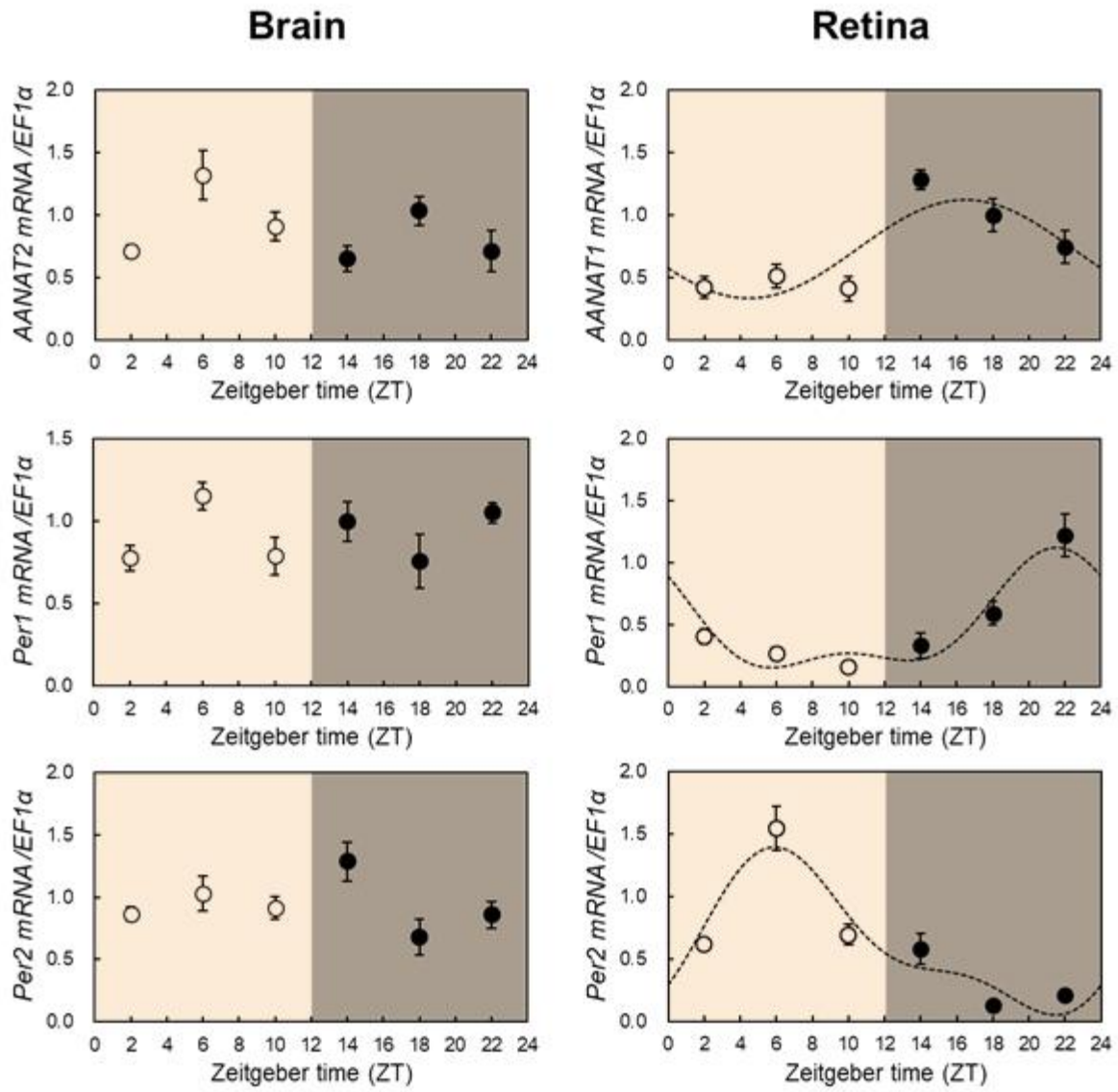


그림 9. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자(AANAT1, 2, Per1, 2 mRNA)의 일주기 발현리듬

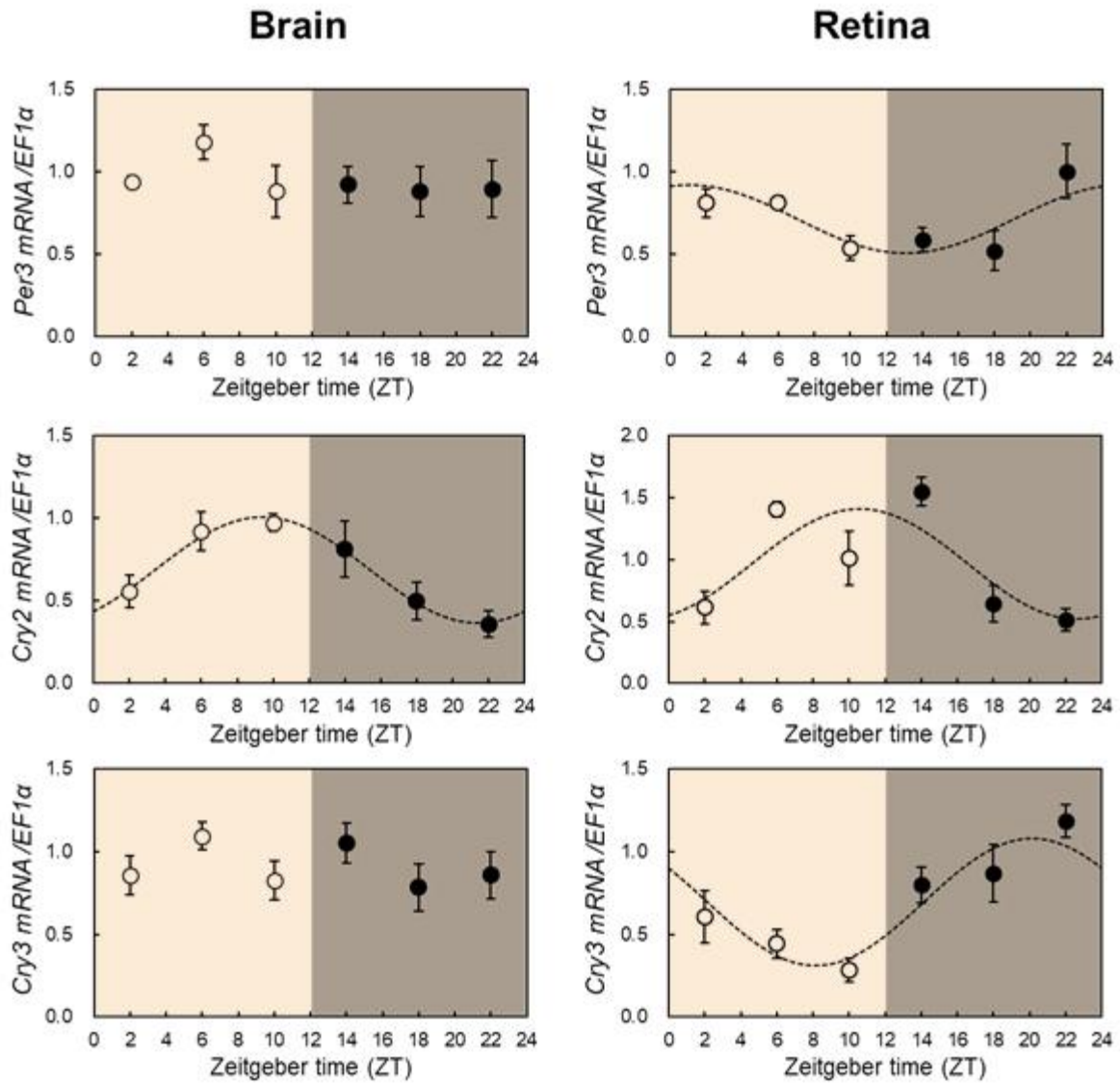


그림 10. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Per3, Cry2, 3 mRNA) 일주기 발현리듬

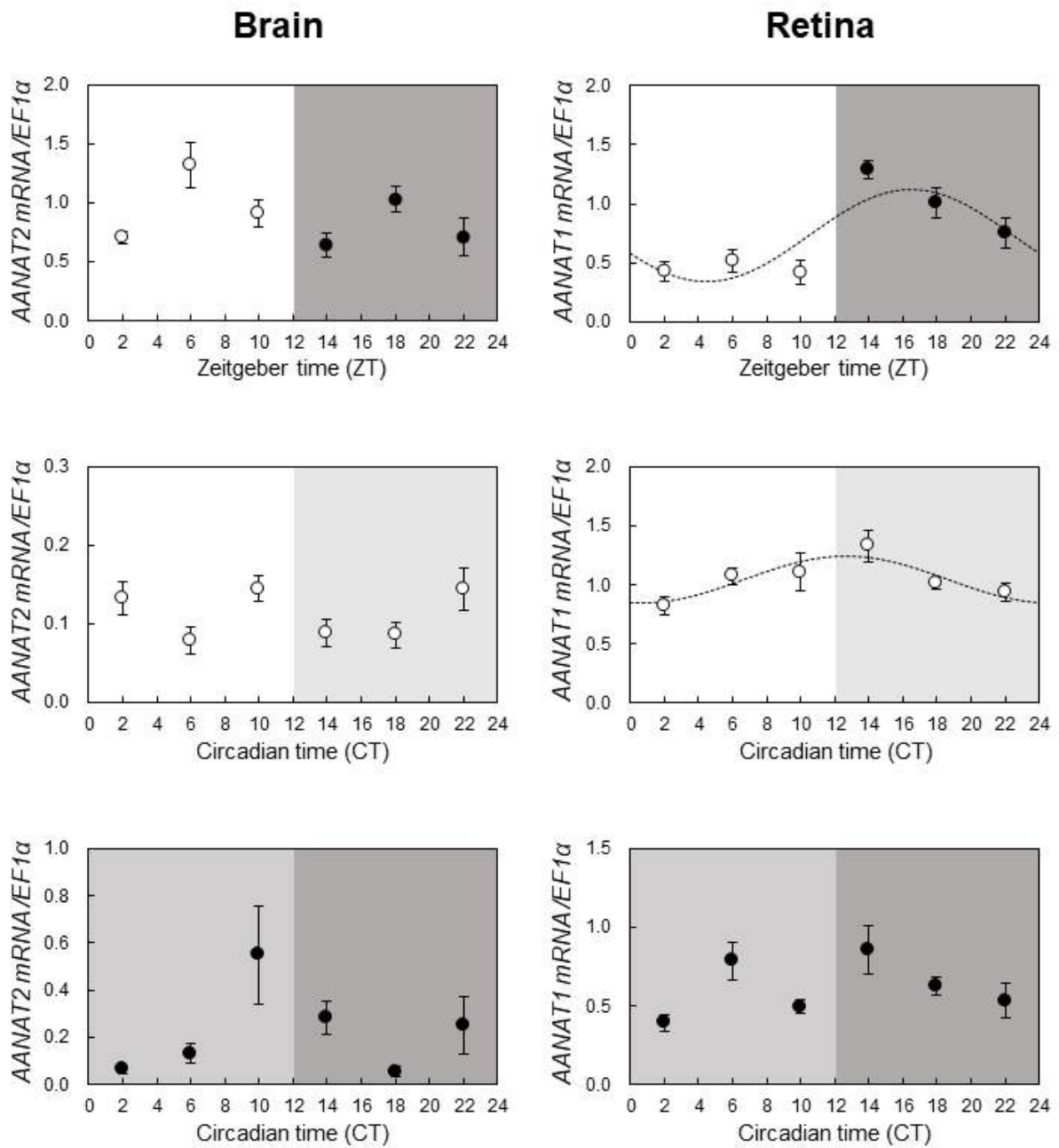


그림 11. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(AANAT1, 2 mRNA) 서캐디언 리듬

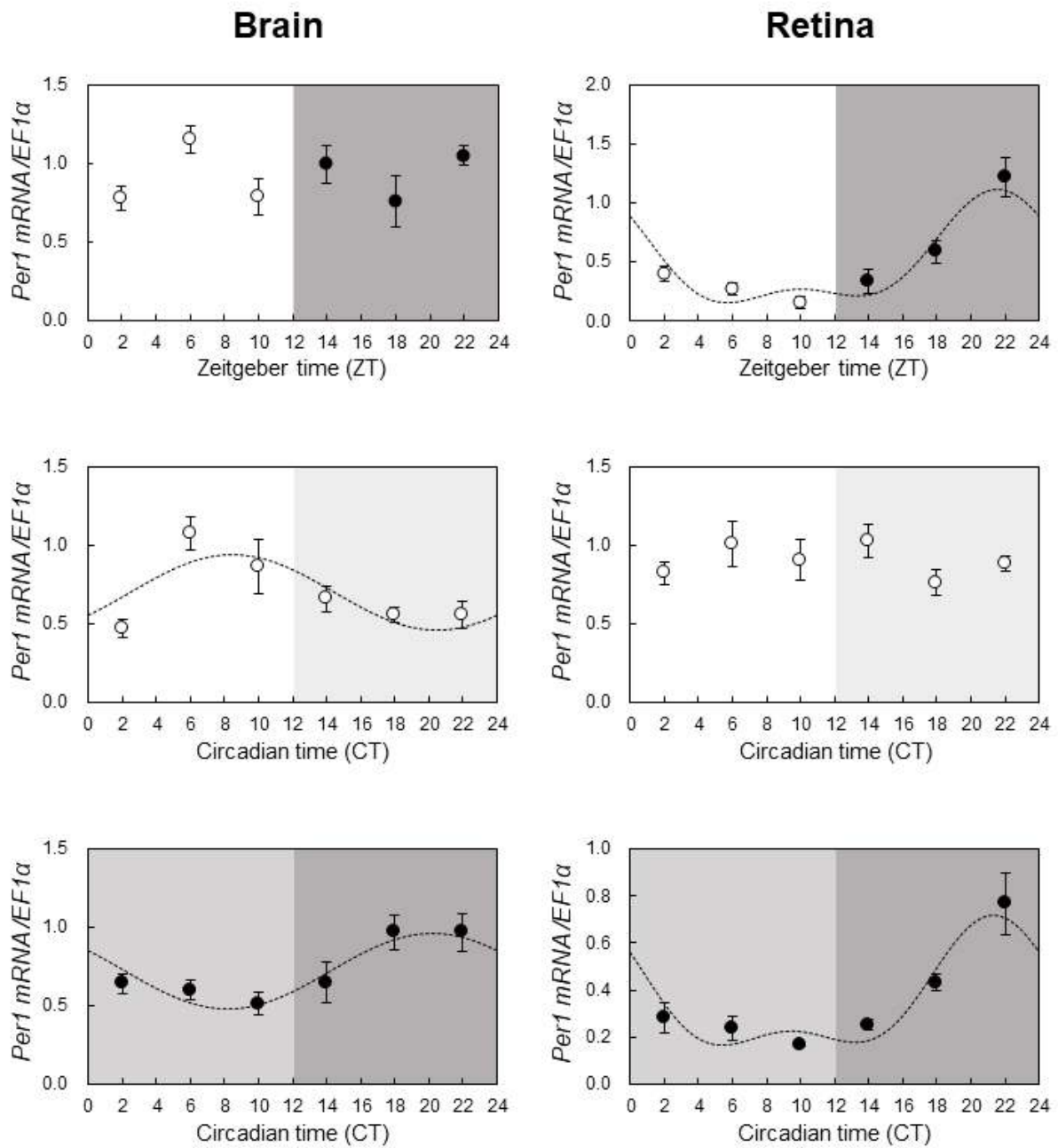


그림 12. 그림 12. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Per1 mRNA) 서캐디언 리듬

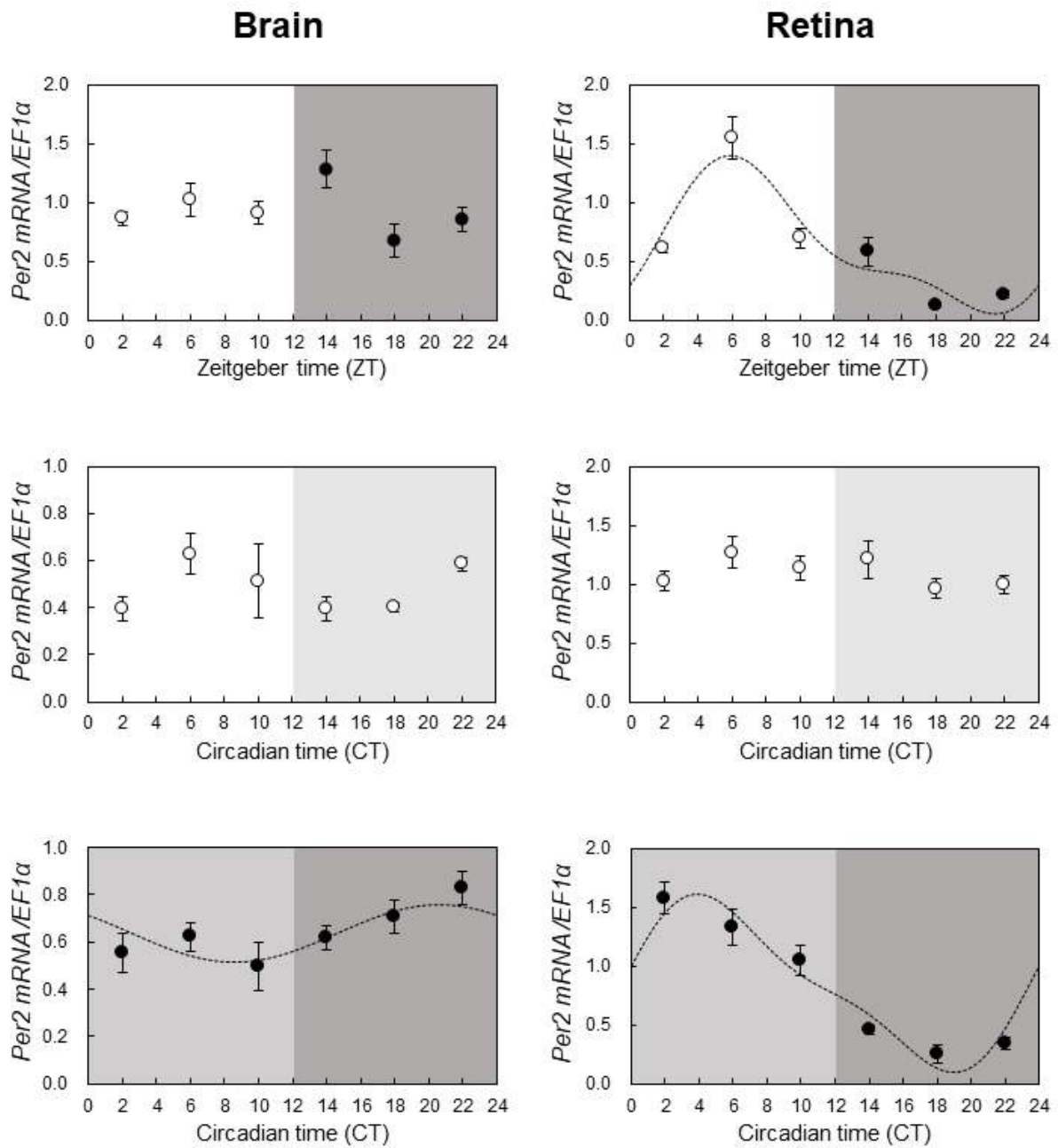


그림 13. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Per2 mRNA) 서캐디언 리듬

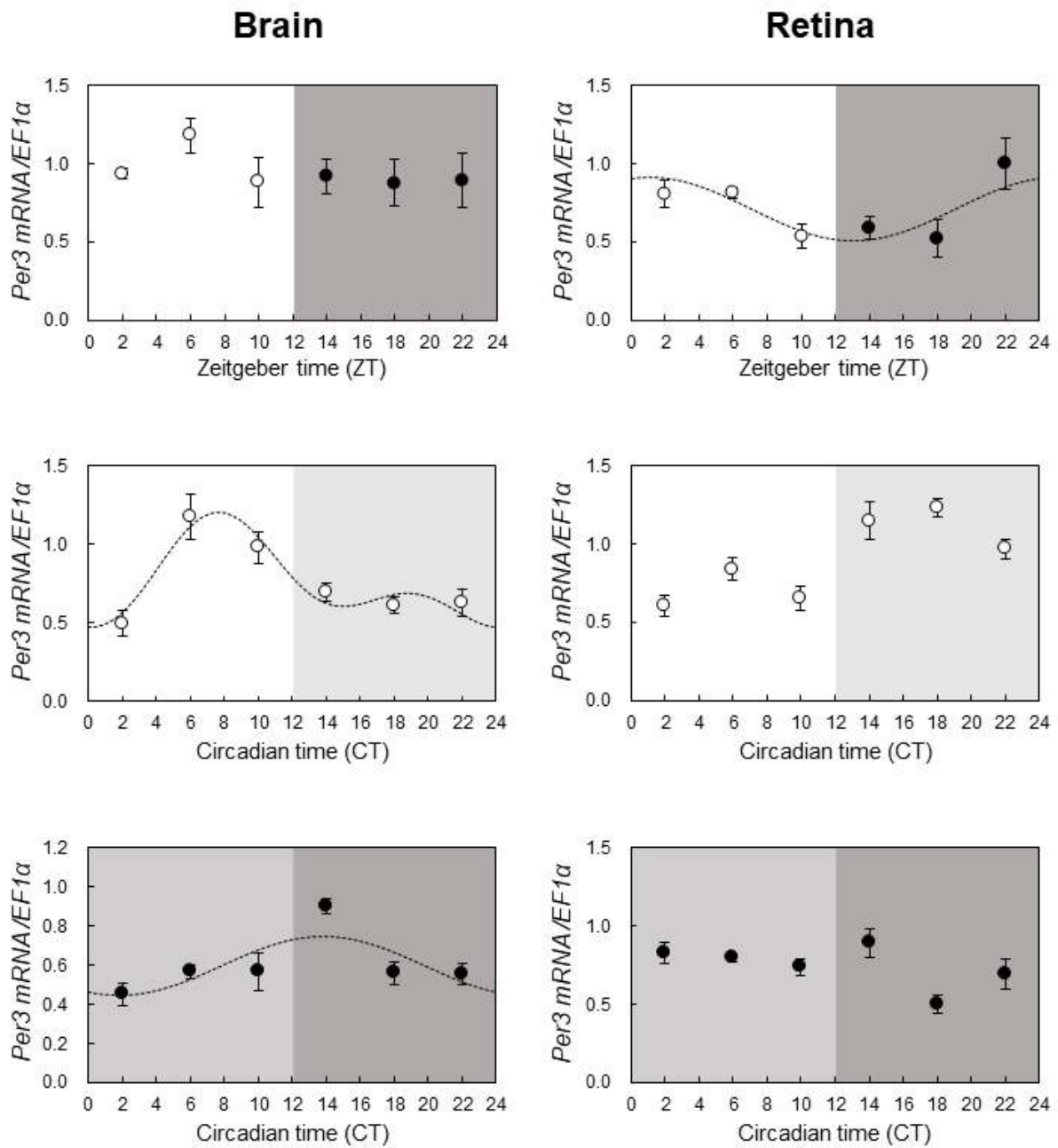


그림 14. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Per3 mRNA) 서캐디언 리듬

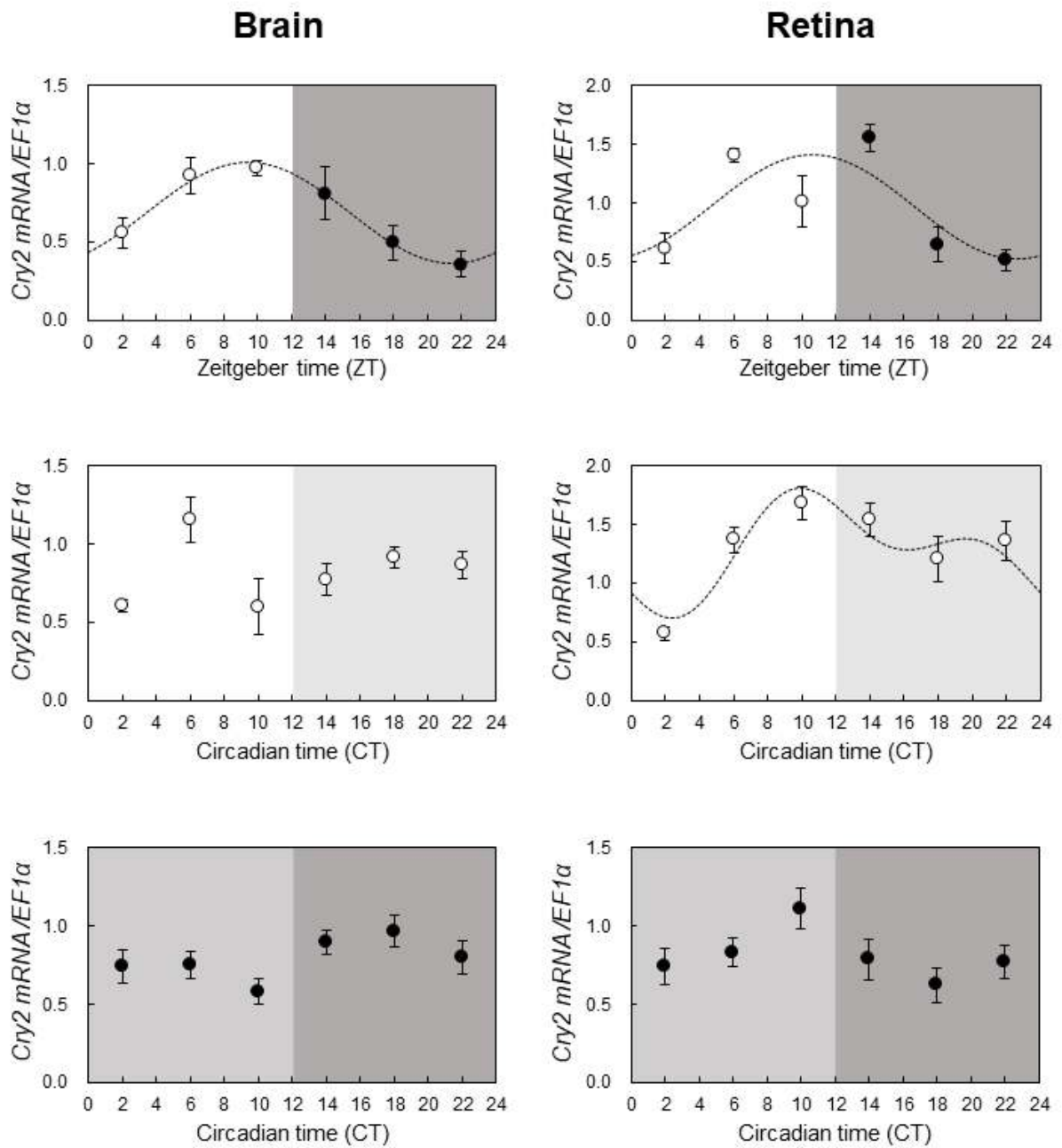


그림 15. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Cry2 mRNA) 서캐디언 리듬

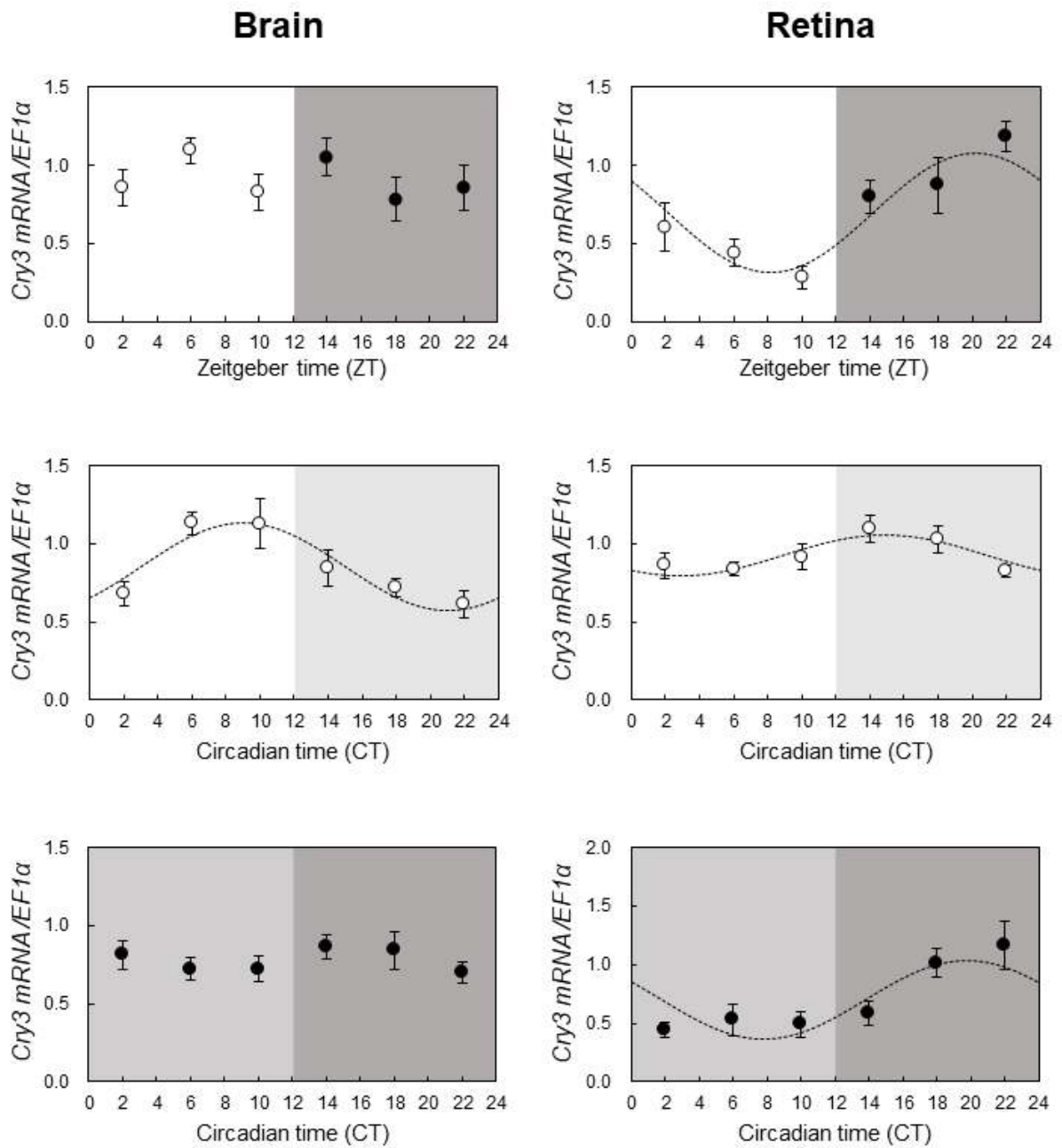


그림 16. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Cry3 mRNA) 서캐디언 리듬

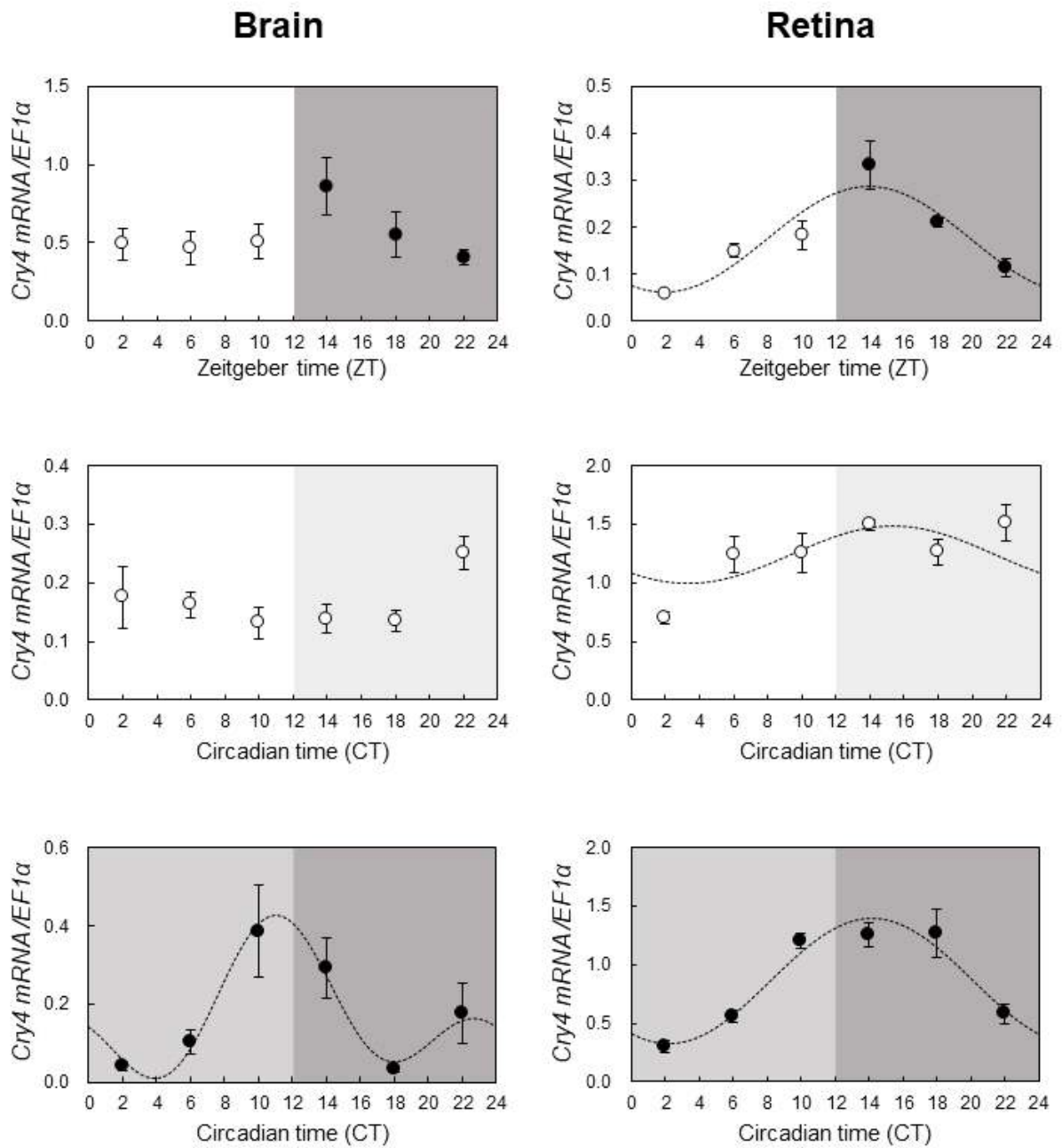


그림 17. 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Cry4 mRNA) 서캐디언 리듬

3절. 뱀장어 신경내분비 동기화 개시 전사체 발현 특성 연구

1. 연구방법

가. 광주기변화

실험어는 1주간 순치 후 총 두 그룹으로 나누어 실험하였다.

(1) Long photoperiod (LP): 15L9D 조건(ZT0: 점등 = 6:00 h, 소등 = 21:00 h)

(2) Short photoperiod (SP): 9L15D 조건(ZT0: 점등 = 6:00 h, 소등 = 15:00 h)

실험에 사용된 광요인은 LED를 사용하였다. 사육 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 실험어는 3일 후에 각 그룹별 ZT2, 6, 10, 14, 18, 22 총 여섯 번, 6미씩 샘플링하였다. 실험어는 0.01%의 2-phenoxyethnal (Sigma-aldrich)를 이용하여 5~10분간 사육수를 이용하여 마취하였다. 샘플은 뇌, 망막을 어체로부터 적출하여 분석에 사용할 때까지 -80°C 에서 보관하였다.

나. 달주기 변화

실험어는 1주간 순치 후 총 두 그룹으로 나누어 실험하였다.

(1) New moon (NM): 그믐달 삭(일출 = 7:11 h, 일몰 = 17:28 h)

(2) Full moon (FM): 보름달(일출 = 6:58 h, 일몰 = 17:37 h)

실험은 실험어가 자연 광조건에 노출되도록 야외에 설치된 사육수조를 사용하였다. 사육 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 실험어는 3일 후에 각 그룹별 12, 16, 20, 24, 04 h 총 다섯 번, 5미씩 샘플링하였다. 실험어는 0.01%의 2-phenoxyethnal (Sigma-aldrich)를 이용하여 5~10분간 사육수를 이용하여 마취하였다. 샘플은 뇌, 망막을 어체로부터 적출하여 분석에 사용할 때까지 -80°C 에서 보관하였다.

다. Total RNA 및 cDNA 합성

Total RNA는 RNA-iso (TaKaRa-Bio, Otsu, Japan)를 이용하여 분리하였다. 분리된 total RNA는 전기영동과 spectrometer를 이용하여 정량·정성 분석하였다.

Genomic DNA contamination를 피하기 위해 DNase I (Promega, Madison, WI, USA)를 처리하였다. cDNA 합성은 1000ng의 total RNA를 주형으로 Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche-diagnostics, Indianapolis, IN)를 이용해 합성하였다.

라. Real-time qPCR

각 유전자의 발현은 정량적 qPCR 방법을 이용하여 분석하였다. 분석은 BioRad CFX96™ Real Time System (BioRad, Hercules, CA)와 SYBR Green premix II (Takara-Bio)을 이용하였다. Primer sequence는 Primer-BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)를 이용해 약 100-200bp 정도가 되도록 설계하였다. PCR 반응은 50% SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa-Bio), 10⁻⁶M의 primer, 그리고 20ng의 cDNA를 이용하여 반응하여 denaturation (45s, 94°C), annealing (45s, 58°C), 그리고 extension (1 min, 72°C)에서 40 cycle 증폭하였다. 각 유전자의 발현은 standard DNA와의 정량적 분석 및 EF1-alpha normalization 등을 통해 분석하였다.

표 10. Real-time qPCR 분석을 위한 primer set 정보

Gene (Accession No.)	Primer	Sequence
AANAT1	Forward	5-ACGCGTGCCTACTCTTGTG-3
	Reverse	5-GCGCTTCTAGTCACCAAAGG-3
AANAT2	Forward	5-CTATCAGCTCCCCCTTCCTC-3
	Reverse	5-TCCCTCTCGATCTCGAACAC-3
Per1	Forward	5-GCAGAAGGAGCTGATGAAGG-3
	Reverse	5-TGATGTTGTCCAGCTCTTCG-3
Per2	Forward	5-CAAGGCGAAAACCTCAGAAGG-3
	Reverse	5-GTCGATCTCCTCGATGGTGT-3
Per3	Forward	5-CACGCTGATCCTGCCAGTAA-3
	Reverse	5-CTGGTCAGGGAGAACCAC-3
Cry2	Forward	5-CCCCTCACCTACAAGCGTTT-3
	Reverse	5-TGGCGTTCATTCTGGGTCTC-3
Cry3	Forward	5-GGGTCAGCCAGCAGATGTAT-3
	Reverse	5-TCCAGGTTGTAGAGCGTGTG-3
Cry4	Forward	5-ATTCCAAGCCTGGAGGATCT-3
	Reverse	5-CGGTAACAGGGAGTTTGGAA-3

2. 연구결과

(1) 광주기변화에 따른 신경내분비 리듬 동기화 발현 특성 분석

뱀장어에서 LP (long photoperiod), SP (short photoperiod) 조건에서 clock-controlled gene과 clock gene의 circadian rhythm을 조사하였다. 뇌에서 AANAT2 mRNA 발현은 ZT6에서 peak로 SP 조건에서만 리듬을 보였다. 망막에서 AANAT1 mRNA 발현 리듬이 SP에서 ZT14와 ZT18에서 peak를 보이며 LD 조건과 유사한 리듬을 보였다. Per1 mRNA 발현은 뇌에서 LP 조건에서 리듬을 보였으나 모든 구간에서 SP 조건의 mRNA 발현 레벨이 유의한 차이를 보이지 않았다. 망막에서는 Per1 mRNA 발현 리듬이 LP와 SP 조건 모두 나타났지만 LP 조건에서 리듬이 지연되는 양상을 보였고 SP 조건 리듬은 LD 조건과 유사한 리듬을 보였다. Per2 mRNA 발현은 뇌에서 SP 조건에서 DD 조건과 유사한 리듬을 보였으며 LP 조건에서는 리듬을 보이지 않았다. Per2 mRNA 발현은 망막에서 LP와 SP 조건에서 모두 LD와 DD 조건과 유사하게 리듬을 보였으나 LP 조건에서 ZT14에서 peak를 보이며 약간 다른 양상의 리듬을 보였다. Per3 mRNA 발현은 뇌에서 LP 조건보다 SP 조건에서 모든 구간에 높은 레벨을 보이며 DD 조건과 유사한 리듬을 보였다. 망막에서는 Per3 mRNA 발현이 SP 조건에서만 리듬을 보였다.

Cry2 mRNA 발현은 뇌에서 LP 조건은 리듬을 보이지 않았고 SP 조건에서는 리듬을 보였지만 ZT6과 ZT22에서만 유의한 차이를 보였다. 망막에서는 LP와 SP 조건에서 리듬을 보였지만 ZT10에서 유의한 차이를 보이며 다른 양상의 리듬을 보였다. Cry3 mRNA 발현은 뇌에서 SP 조건에 리듬을 보였지만 LP 조건과 ZT2를 제외하고 모든 구간에서 유의한 차이를 보이지 않았으며 반면에 망막에서는 SP 조건에 ZT22에 peak를 보이며 LD 조건과 유사한 리듬을 보였으며 LP 조건에서 리듬이 지연되는 양상을 보였다. Cry4 mRNA 발현은 뇌에서 LP, SP 조건 모두 리듬을 보이지 않았지만 망막에서 SP 조건에 ZT14에 peak를 보이며 리듬을 나타냈다. 망막에서 per1, per2, cry3, cry4 mRNA 발현 리듬이 Short photoperiod와 12L12D 조건에서 비슷한 패턴을 보였다.

(2) 달주기에 따른 망막 및 뇌심부 시계유전자 전사체 발현 분비 변화

뱀장어에서 NM (new moon)과 FM (full moon) 조건에서 clock-controlled gene과 clock gene의 circadian rhythm을 조사하였다. 뇌에서 AANAT2 mRNA 발현은 FM에서 리듬을 보였고 NM에서는 24h에서 FM과 유의차를 보이며 리듬을 보이지 않았다. AANAT1 mRNA 발현은 망막에서 NM에 리듬을 보였고 FM에서는 24h에 NM과 유의차를 보이며 리듬을 보이지 않았다.

Per1 mRNA 발현은 뇌에서 NM과 FM 모두 리듬을 보였고 망막에서 04h에서 peak로 NM과 FM에서 리듬을 보였다. Per2 mRNA 발현은 FM에서 리듬을 보이지 않았지만 뇌에서 12h에 유의한 차이를 보이며 NM에 리듬을 나타냈다. 망막에서 Per2 mRNA 발현은 12h에 가장 높은 레벨, 24h에 가장 낮은 레벨로 NM과 FM 모두 LD와 DD 조건과 비슷한 리듬을 보였다. Per3 mRNA 발현은 뇌에서 리듬이 없었지만 망막에서 NM과 FM이 상반되는 리듬을 보였다.

Cry2 mRNA 발현은 뇌에서 NM과 FM이 상반되는 리듬을 보였다. 망막에서 Cry2 mRNA 발현은 NM과 FM에서 서로 유사한 리듬을 보였다. Cry3 mRNA 발현은 뇌에서 NM과 FM 모두 리듬을 보이지 않았지만 망막에서는 04h에 가장 높은 레벨을 보이며 NM과 FM에서 리듬을 보였다. 이 리듬은 LD와 DD 조건에서 리듬과 유사한 양상을 보였다. Cry4 mRNA 발현은 뇌에서 리듬을 보이지 않았지만 망막에서 NM에 20h에 가장 높은 레벨을 보이며 LD와 DD 조건과 유사한 리듬을 보였다. 망막에서 per1, per2, cry3, cry4 mRNA 발현 리듬이 New moon, Short photoperiod와 12L12D 조건에서 비슷한 패턴을 보였다.

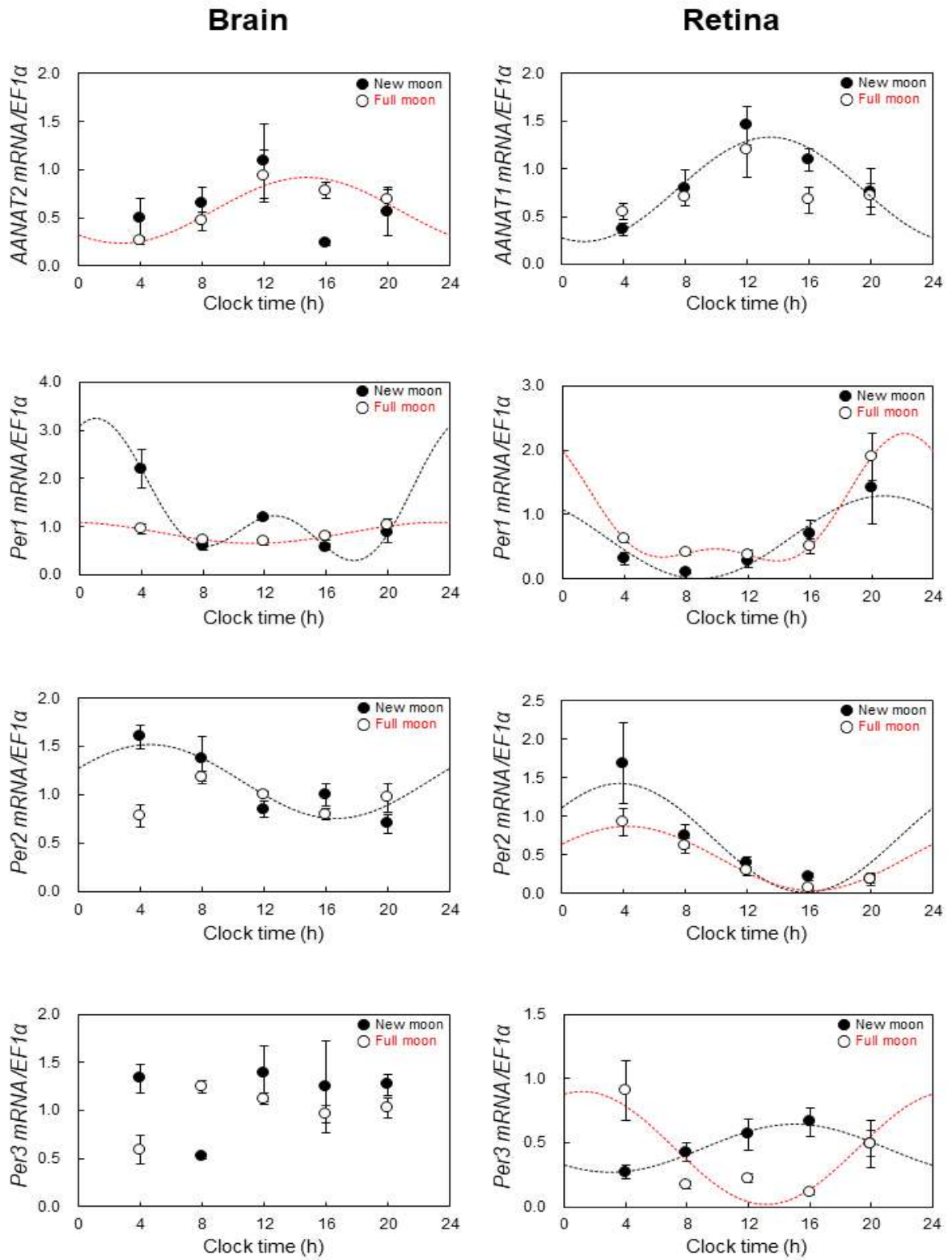


그림 18. 그믐과 보름달에서의 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(aanat, Per mRNA) 발현 변화

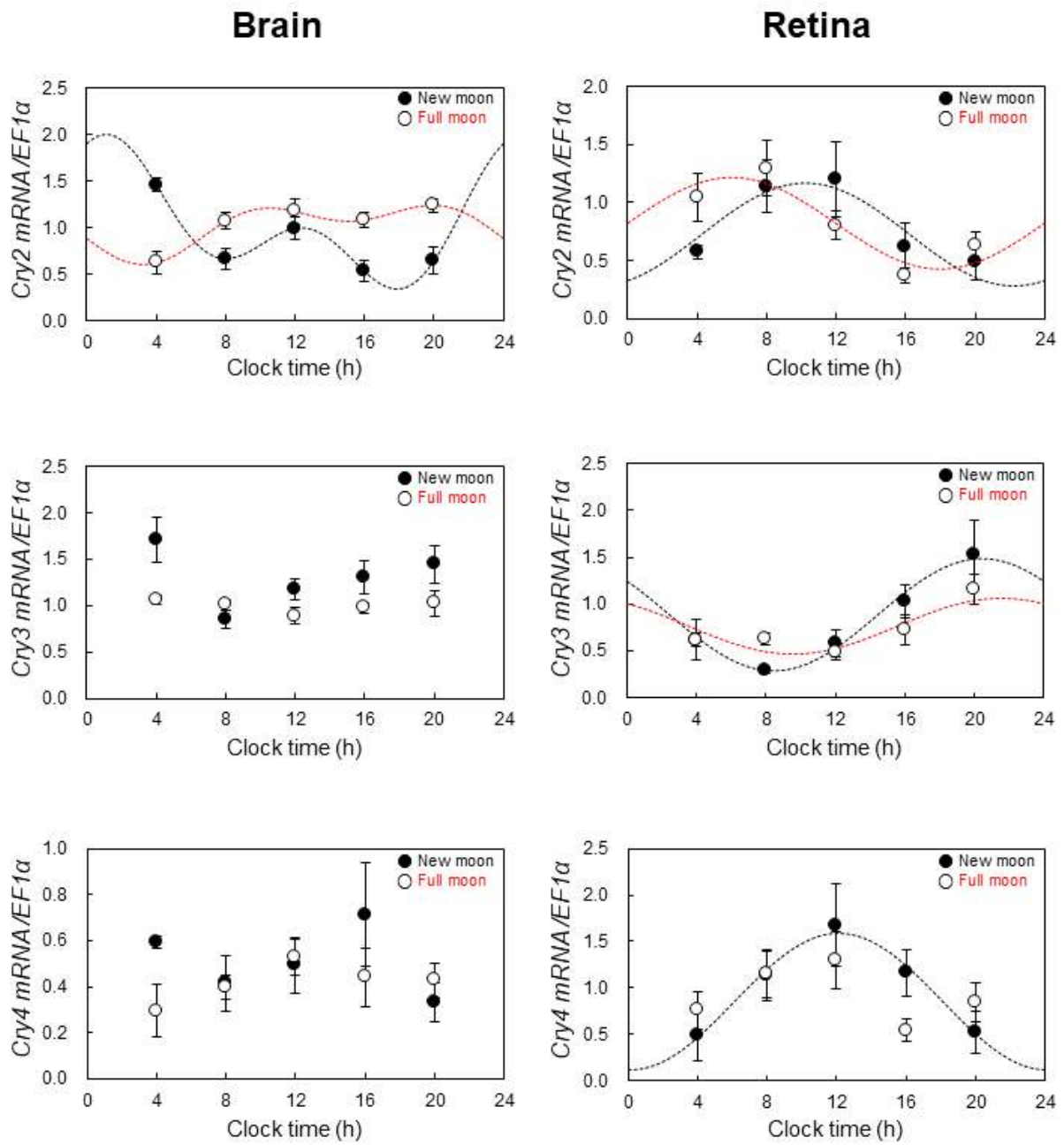


그림 19. 그믐과 보름달에서의 뱀장어 망막 및 뇌심부 시계유전자의(Cry mRNA) 발현 변화

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절. 목표 대비 달성도

목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				계획대비 연구실적 달성율(B) (%)
	성과목표	연구내용	가중 치 (A)	달성실적	
2021.06 .01~202 1.12.31	뱀장어 신경내분 비 동기화에 따 른 전사체 반응	1-1. RNA-seq을 이용한 뱀 장어 신경내분비 전사체 정보 확보	1.0	100	100
		1-2. 뱀장어 뇌심부 및 광 수용기관 환경 반응 전사 체 발현		100	
		1-3. 뱀장어 신경내분비 동 기화 개시 전사체 발현 특 성		100	
	계	1.0	50		

2절. 연구내용 및 달성실적

1. 성과목표 1

연구내용 1-1. RNA-seq을 이용한 뱀장어 신경내분비 전사체 정보 확보

○ 신경내분비 동기화 전사체 cloning

- RNA-seq을 이용한 신경내분비 동기화 핵심 전사체(6종; Per1, Per2, Per3, Cry2, Cry3, Cry4 mRNA), Melatonin 합성 효소 유전자(2종, aanat1, 2 mRNA) sequence 확보

- 유전자 클로닝을 통한 전사체 sequence 검증, 아미노산 서열 분석 완료

2. 성과목표2

연구내용 2-1. 뱀장어 뇌심부 및 광수용기관 환경 반응 전사체 발현

○ 일주기에 따른 망막 및 뇌심부 생체시계 유전자 발현 특성 분석

- LD(12L:12D), DD, LL 조건에서의 생체시계 유전자의 발현을 조사하였으며 망막과 뇌심부에서 생체시계 전사체가 빛에 의해 circadian oscillator가 작동되는 것을 확인

- 망막에서는 각각의 전사체가 빛에 의해 동기화 되었지만 뇌심부에서는 전사체의 발현이 유의적인 변화를 나타내지 않음

- 망막제거 수술 후 뇌심부에서 생체시계 전사체 발현이 빛에 의해서 동기화 되는 것을 확인

3. 성과목표 3

연구내용 3-1. 뱀장어 신경내분비 동기화 개시 전사체 발현 특성 연구

○ 광주기변화에 따른 신경내분비 리듬 동기화 발현 특성 분석

- 장주기(15L9D)에서 단주기(9L15D)로 변화는 신경내분비를 동기화 하는 중요한 환경요인으로써 작용을 하는 것으로 사료됨

- 달빛에 변화에 따라 멜라토닌 분비가 급속도로 증가하고 산란에 영향을 미치는 BPG 축 활성화에 직접적으로 영향을 미치는 것을 확인

* 뱀장어 신경내분비 동기화는 빛에 의해서 영향을 받고 일반적인 경골어류나 포유류와 달리 망막이 신경내분비를 동기화하는 주요 기능을 하는 것으로 사료됨

3절. 연구성과의 의의

○ 연구개발 결과에 대한 종합요약

- 기존 뱀장어 성성숙 기전에 대한 이해도 향상에 기여
- 주행성 어류의 번식리듬에 대한 과학적 가설 입증 및 창의적 연구 시도
- 환경적 요인(광)을 이용한 뱀장어 성장 및 번식 제어 기전 연구에 대한 과학적 입증과 산업적 응용 가능성 제시

○ 연구개발 결과의 우수성 및 독창성

- 멸종위기종 분류로 자원량이 급격히 감소한 뱀장어의 대량 양식 기술 개발을 위한 기반연구로 가설의 과학적 입증 및 기존 연구로 풀지 못했던 뱀장어 내분비 연구의 한계를 생체리듬 기전규명을 통해 새로운 기전 연구이며 이번 연구에서도 뱀장어 산란생태와 관련 새로운 기전을 규명하였다.
- 양식산업기술 극대화 및 생산비용 절감에 대한 문제점에 대해서 효율적이고 안정적인 기술개발이 더디게 진행되고 있다. 이를 극복하기 위해 체계적이고 창의적인 연구를 기획하고 수행하였다. 이 과제의 경우처럼 내분비활성에 영향을 미치는 전사체 연구를 통해 뱀장어에서 핵심인자들을 발굴하며 양식산업에서 활용 가능한 연구 결과들을 제시하였다고 사료됨

제 5장 연구개발결과의 활용계획

1절. 기대효과

1. 지구환경변화 이에 따른 해양생물들의 생존과 종 보존을 위한 자체 생태생리학적 적응과정에 관한 대형연구 발굴 주제로 활용
2. 현재까지 명확하지 않은 뱀장어의 특이적인 산란생태(산란회유)에 따른 신경내분비 전달기전의 변화를 조사한다. 또한 이를 활용하여 뱀장어 인위적 성숙 유도에 활용할 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

2절. 연구개발의 활용방안

1. 뱀장어의 산란생태를 내분비학적으로 해석 가능
2. 야행성 어류의 행동 양상별 신경내분비학적 생체리듬 기전 규명
3. 환경인자 제어를 통한 뱀장어 완전양식 가능성 제시
4. 안정적이고 친환경적인 성숙 유도를 통한 양질의 수정란 생산 가능
5. 양식 불가 어종 대상 적정 환경요인 탐색을 통한 양식 가능성 제시

제 6장 참고문헌

1. C. Chen, S. S. Khaleel, H. Huang, and C. H. Wu, Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code for Biology and Medicine* 2014, 9:8.
2. D. L. Stenkamp, The Rod photoreceptor lineage of teleost fish. *Prog Retin Eye Res* 2011, 30(6):395-404.
3. M. G. Grabherr et al., Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 2011, 29(7):644-52.
4. R. D. Smith_Unna, C. Bournnell, R. Patro, J. M. Hibberd, S. Kelly, TransRate: reference free quality assessment of de-novo transcriptome assemblies. *bioRxiv* 2015, doi:<http://dx.doi.org/10.1101/021626>
5. M. Stanke, and B. Morgenstern, AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33(Web Server issue):W465-7.
6. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3):403-410.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.