

BSPE98979-10752-3

어류의 근육성장형질 관련 기능유전자마커의
적용기술 개발

Application of functional molecular marker for skeletal
muscle growth trait in marine fish

2015. 3

한국해양과학기술원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “어류의 근육성장형질 관련 기능유전자마커의 적용기술 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2015. 3.

총괄연구책임자 : 장 요 순

참 여 연 구 원 : 오 승 용, 김 민 석,

김 성, 이 은 경

윤 진 영, 최 해 영,

박 서 윤

보고서 초록

과제고유 번호	PE99979	해당단계 연구기간	2013.05.01. ~ 2014. 04. 30.	단계 구분	
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	어류의 근육성장형질 관련 기능유전자마커의 적용기술 개발			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명				
연구책임자	장요순	해당단계 참여연구원수	총 : 8 명 내부: 5 명 외부: 3 명	해당단계 연구비	정부: 85,000,000원 기업: 원 계 : 85,000,000원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 8 명 내부: 5 명 외부: 3 명	총 연구비	정부: 85,000,000원 기업: 원 계 : 85,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	동해연구소		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	32페이지
<ul style="list-style-type: none"> - 불락의 근육성장 관련 유전자를 동일한 조건에서 사육된 연령별 및 크기별 시료를 이용하여 탐색하였음 - 불락의 성장 그룹간에 발현량 차이를 나타낸 creatin kinase muscle type 1(CKM1) 유전자의 변이를 분석하여 불락 근육성장의 up regulated 유전자마커를 개발하였음 - CKM1 유전자의 ORF 영역 및 전사조절 영역 내에 있는 유전자 변이와 대립유전자별 발현양상을 분석하였음 - CKM1 유전자 ORF 영역 및 전사 조절영역의 변이를 이용하여 근육 생산량이 많은 불락 개체 선발시 적용할 수 있는 방법을 작성하였음 - CKM1 ORF 376번 염기가 G이고, CKM1 전사조절 영역(450 bp 크기)이 제한효소 <i>PvuII</i>로 절단되지 않는 적용을 동시에 만족하는 개체를 선발하면 근육생산량이 많을 것으로 예상되는 불락을 확보할 수 있음 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	불락, 근육, 기능유전자, 차등발현유전자, 유전자마커			
	영 어	Dark-banded Rockfish, Skeletal muscle, Functional gene, Differentially expressed genes, Molecular marker			

요 약 문

I. 제 목

어류의 근육성장형질 관련 기능유전자마커의 적용기술 개발

II. 연구개발의 필요성 및 목적

생물자원의 중요성이 점차 커짐에 따라 축적되는 생물자원의 숫자가 기하급수적으로 증가하였고, 유용 생명자원 선발시 유전자정보를 이용하는 선발법 연구가 소규모로 진행되고 있으나, 유용 유전자원 선발에 활용할 분자마커는 절대적으로 부족한 상황이다. 또한, 유전자마커는 육상생물의 육종연구 분야에서 적용을 시도하고 있으나, 현재 활용되는 대부분의 분자마커는 목적하는 유전자와 근접한 비유전자 영역의 염기서열 차이에서 유래한 연관 마커에 불과하다. 어류 양식산업계에도 어류육종가들은 해양어류 자원을 확보하고 우량품종의 개발 및 산업화를 위하여 분자유종법을 적용하고 있으나 분자마커를 적용하기 위한 어류 종이 극히 제한적이며, 적용 가능한 분자마커 역시 거의 없는 실정이다. 현재, 생물의 분자유종시 이용하는 분자마커는 육종의 목표형질을 유도하는 유전자에 근접한 영역(연관된)의 DNA 염기서열의 차이에 의한 것으로 대부분이 연관마커이므로 선발오류를 가지고 있다. 이와 같은 선발오류를 줄이기 위하여 연관마커가 아닌 형질을 유도하는 유전자 자체에 기반한 기능유전자 마커(functional molecular marker) 개발이 필요하다.

본 연구를 통하여 어류의 근육성장에 관여하는 유용유전자를 확보하고 유전자마커를 개발하여 근육생산량이 높은 불락 선발시 적용가능한 매뉴얼을 작성하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 불락의 근육성장 관련 유전자마커 개발
 - 근육성장 관련 유전자 확보 및 유전자마커 개발
2. 불락의 근육성장 관련 기능유전자마커 적용기술 개발
 - 근육성장 관련 유전자마커 적용기술 개발
 - 근육 생산량이 많은 불락 선발을 위한 적용매뉴얼 작성

Ⅳ. 연구개발결과

1. 불락의 근육성장 관련 유전자마커 개발
 - 불락의 근육성장 관련 유전자를 동일한 조건에서 사육된 연령별 및 크기별 시료를 이용하여 탐색하였다. 성장 그룹간에 발현량 차이를 나타낸 creatin kinase muscle type 1(CKM1) 유전자의 변이를 분석하여 불락 근육성장의 up regulated 유전자마커를 개발하였다.
2. 불락의 근육성장 관련 기능유전자마커 적용기술 개발
 - CKM1 유전자의 ORF 영역 및 전사조절 영역 내에 있는 유전자 변이와 대립유전자별 발현양상을 분석하였다. CKM1 유전자 ORF 영역 및 전사 조절영역의 변이를 이용하여 근육 생산량이 많은 불락 개체 선발시 적용할 수 있는 방법을 작성하였다. CKM1 ORF 376번 염기가 G이고, CKM1 전사조절 영역(450 bp 크기)이 제한효소 *PvuII*로 절단되지 않는 적용을 동시에 만족하는 개체를 선발하면 근육생산량이 많을 것으로 예상되는 불락을 확보할 수 있다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구사업 수행으로 확보한 볼락의 근육생산량 증가 기능을 가진 유전자의 활용 연구를 주요 양식대상 어종으로 넓혀 진행하고자 한다. 또한, 근육생산성 관련 유용유전자를 추가로 확보하고 근육성장의 저해 기능을 가진 유전자를 분석하여 유전자마커를 이용한 어류의 선발시 정확도가 높은 유전자마커를 개발할 계획이다.

S U M M A R Y & KEYWORDS

I. Title

- Application of functional molecular marker for skeletal muscle growth trait in marine fish

II. The aim of the project

The number of biological resources increased exponentially. The study to ensure useful biological resources is performed using the genetic information. However, molecular markers can be selected with a useful genetic resources lacks absolute. Genetic markers in breeding research is an attempt to apply to the field of terrestrial organisms, but most of the linkage markers. Fish there is little genetic markers that can be used in molecular breeding. Currently, the molecular markers used during molecular breeding of organisms have selected Since most errors associated markers. The developing non-marker gene associated functional molecular marker is required to reduce this selection error.

The aim of this study is to develop and apply written manual of genetic markers associated with muscle growth in fish.

III. Scope of the study

1. The development of genetic markers related to skeletal muscle growth of dark-banded rockfish
 - Obtaining of skeletal muscle growth-related genes and development of genetic markers

2. Application of functional molecular marker for skeletal muscle growth trait in dark-banded rockfish
 - Applied technology development of skeletal muscle growth gene markers
 - Making of applied manual

IV. Results

1. The development of genetic markers related to skeletal muscle growth of dark-banded rockfish
 - A skeletal muscle growth-related genes of dark-banded rockfish were searched using the age and size samples kept in the same conditions. Expression level of the difference shown creatin kinase muscle type 1 (CKM1) analyzing the variation of the gene which was to develop a skeletal muscle growth marker of the up regulation

2. Application of functional molecular marker for skeletal muscle growth trait in dark-banded rockfish
 - Analyzed the gene mutation and allele-specific expression patterns in the ORF region and the transcription regulatory regions of the gene CKM1. CKM1 genes using

the transcriptional regulatory region variation of the ORF region, and created a applied manual. The CKM1 ORF nt376 is G, CKM1 promoter region (450 bp) is is selected that is not digested with restriction enzyme *PvuII*.

V. The future plan

It plans to obtain additional useful genes associated with an increased production of fish skeletal muscle. It will also explore the useful gene that inhibits skeletal muscle growth. It related to the productivity of the fish and would like to develop a highly accurate genetic markers.

KEYWORDS : 볼락, 근육, 기능유전자, 차등발현유전자, 유전자마커

Dark-banded Rockfish, Skeletal muscle, Functional gene,
Differentially expressed genes, Molecular marker

목 차

그림목차	9
제 1장 서 론	10
제 1절 연구 필요성	11
제 2절 연구 목표	12
제 3절 연구내용 및 범위	12
제 2장 국내외 기술개발 현황	13
제 1절 국내 기술개발 현황	14
제 2절 국외 기술개발 현황	14
제 3장 연구개발 수행내용 및 결과	16
제 1절 유용 해양어류 유전자원 정보 탐색	17
제 2절 해양어류자원의 기능유전체 정보 이용기술 개발 탐색	23
제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	28

제 1절 연구개발 목표 달성도	29
제 2절 대외기여도	29
제 5장 연구개발결과의 활용계획	30
제 6장 참고문헌	31

그림 목차

- 그림 1. 볼락 연령별 및 크기별 근육조직의 차등발현유전자 탐색
- 그림 2. 볼락 근육조직 차등발현유전자의 발현양상 분석
- 그림 3. 볼락 creatin kinase muscle type 1 (CKM1) 유전자의 발현양상 분석
- 그림 4. 볼락 parvalbumin (PVALB) 유전자의 발현양상 분석
- 그림 5. 볼락 CKM1 유전자의 mRNA 염기서열 정보
- 그림 6. 볼락 CKM1 유전자의 조직특이적 발현 패턴
- 그림 7. 볼락 CKM1 유전자의 genomic organization
- 그림 8. 볼락 CKM1 유전자 조절영역의 유전자 변이 및 대립유전자별 발현량
- 그림 9. 볼락의 근육성장 관련 유전자마커의 적용 방법

제 1장 서론

제1절 연구 필요성

생명공학 관련 기술의 발달로 다양한 생물의 유전체 정보가 대량으로 생산되고 있으며, 유전자의 기능과 응용가능성을 규명하기 위한 기술이 개발 되고 있다. 최근에는 NGS(next generation technology) 기술 개발로 유전체 연구의 패러다임이 기술이나 시간, 비용 측면에서 급격히 변화하였고, 빠른 속도로 축적되는 유전체 정보는 유전체 재분석, 유전자 발현 연구, allele variation, association mapping 등에 적용될 수 있는 새로운 연구 플랫폼을 제공하게 되었다. 초고속 저비용의 DNA 염기서열 분석 기술로 유전자의 기능과 생명현상을 규명하기 위한 연구 및 생물정보 활용 기술을 기반으로 한 ‘오믹스’ 수준의 연구인프라가 구축되었다. 또한, 유전체학 및 생물정보학 관련 연구가 급속하게 증가함에 따라 유전체 빅데이터를 활용하기 위한 맞춤형 데이터베이스 구축 연구의 필요성 역시 증가하였다. 그러나 다양한 생물의 대량 유전체 정보를 이용하여 개별 유전자의 기능과 유전자의 상호 네트워크 정보를 규명하기 위한 유전체 정보 활용기술 및 연구사례는 매우 적고, 데이터베이스 구축 연구또한 적은 실정이다.

생물자원의 중요성이 점차 커짐에 따라 축적되는 생물자원의 숫자가 기하급수적으로 증가하였고, 유용 생명자원 선별시 유전자정보를 이용하는 선별법 연구가 소규모로 진행되고 있으나, 유용 유전자원 선별에 활용할 분자마커는 절대적으로 부족한 상황이다. 또한, 유전자마커는 육상생물의 육종연구 분야에서 적용을 시도하고 있으나, 현재 활용되는 대부분의 분자마커는 목적하는 유전자와 근접한 비유전자 영역의 염기서열 차이에서 유래한 연관 마커에 불과하다. 어류 양식산업계에도 어류육종가들은 해양어류 자원을 확보하고 우량품종의 개발 및 산업화를 위하여 분자유종법을 적용하고 있으나 분자마커를 적용하기 위한 어류 종이 극히 제한적이며, 적용 가능한 분자마커 역시 거의 없는 실정이다. 현재, 생물의 분자유종시 이용하는 분자마커는 육종의 목표형질을 유도하는 유전자에 근접한 영역(연관된)의 DNA 염기서열의 차이에 의한 것으로 대부분이 연관마커이므로 선별오류를 가지고 있다. 이와 같은 선별오류를 줄이기 위하여 연관마커가 아닌 형질을 유도하는 유전자 자체에 기반한 기능유전자 마커(functional molecular marker) 개발이 필요하다.

제2절 연구 목표

어류의 생산성을 향상하기 위하여 근육의 성장과 관련된 유전자를 확보하고 유전자마커를 개발하여 적용할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다. 어류의 근육성장과 관련된 유전자마커 개발을 위하여 볼락(*Sebastes innermis*)을 대상생물로 선정하여 근육의 발달 및 분화와 관련된 전사개시 유전자를 분석하고, 근육성장 관련 후보유전자의 발현양상을 비교하고자 하였다. 볼락의 근육성장과 관련된 유전자마커를 확보하여 적용기술을 탐색한 후 기능유전자마커를 적용하기 위한 매뉴얼을 작성하는 것을 목표로 하였다.

제3절 연구내용 및 범위

구 분	목 표	내 용 및 범 위
1차년도	○ 볼락의 근육성장 관련 유전자마커 적용기술 개발	
	● 볼락의 근육성장 관련 유전자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 볼락 근육발달 및 근육분화 전사개시인자 정보 분석 - 볼락 근육성장 관련 후보유전자 발현양상 분석 - 볼락 근육성장 관련 유전자마커 개발 및 해양어류에 적용기술 개발
	● 볼락의 근육성장 관련 기능유전자마커 적용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 기능유전체 분석방법을 적용한 eQTL (expression QTL) 분석 - 근육성장 형질 관련 ‘trait-targeted’ 유전자 마커 추가 확보 - 볼락의 근육성장형질 기능유전자마커의 적용 매뉴얼 작성

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

국내에서는 어류의 근육성장 관련 유전자마커 개발 연구가 진행된 바 없고, 해양생물의 유전체 분석연구가 해양생명공학사업(2004년~2013년)으로 「해양극한생물 분자유전체연구단」에서 추진하였다. 이 연구사업은 해양극한생물을 대상으로 유전자 및 단백질 수준에서 생명기능과 현상을 해석하고 유용유전자 및 단백질을 발굴하여 활용하기 위한 기술을 개발하고자 하였다. 국립수산물과학원에서는 「양식생물 및 수산생물의 육종(분자유종 포함) 연구」가 넙치, 전복, 돌돔, 명게를 대상으로 2004년부터 2013년까지 10년간 진행되었다. 이 연구사업을 통하여 넙치 유전체를 완전해독하고 유전자 지도를 작성하였으나, 유전자 정보 활용연구 및 유전자마커를 적용기술 개발 연구는 수행하지 않았다.

어류의 기능유전체 연구는 제주대학교에서 까막전복과 돌돔을 대상으로 수행하였으며, 한국해양과학기술원에서는 강도다리와 볼락을 대상으로 근육성장과 관련된 기능유전체를 분석한 후, 기능유전자 정보를 이용하여 어류의 생산성을 향상시키는 유전자마커를 개발하고 적용하기 위한 연구를 진행한 바 있다.

제2절 국외 기술개발 현황

유전자마커를 탐색하고 적용하기 위한 연구 프로젝트를 미국, 영국, 중국에서 대학교와 연구소가 협력하여 진행하고 있다. 중국수산물과학연구원에서는 수생동물을 대상으로 genetic linkage map을 작성하고, 중요한 형질관련 molecular marker를 탐색하여 적용하기 위한 연구를 수행하고 있다. 미국의 Northwest Fisheries Science Center에서는 genetic marker를 이용하여 fishery stock을 관리하고 있다. 미국 농무성(USDA)에서는 메기, 연어, 무지개송어 및 제브라피쉬의 genome database를 구축하고 genetic map을 작성하고 있으며 무지개송어 EST contig를 분석하고 있다. 또한, MAS (marker-assisted selection) 기법을 도입하여 어류 및 패류 육종집단을 선발하기 위한 QTL mapping을 시도하고 있다.

어류의 근육성장 관련 유전자를 탐색하여 근육성장 조절기작을 규명하기 위한 연구 인프라를 구축하고 있다. 영국의 FMRG (fish muscle research group)은 기후환경 변화에 따른 어류 근육조직의 발달과 성장에 관한 연구를 분자유전학적 기법을 적용하여 수행하고 있다. 또한, 대서양 연어에서 근육성장 관련 molecular biomarker를 탐색하여 근육성장 조절기작을 밝히고, 경골어류의 근육성장 관련 기능유전체를 탐색하는 연구를 수행하여 근절(myotome) 발달 조절유전자의 기능을 규명하고자 하였다. 로드아일랜드대학에서는 근육성장을 지연시키는 myostatin의 저해에 관한 연구를 진행하였으며, 연어, 도다리, 참치를 대상으로 연구를 진행하여 물고기의 근육성장 조절기작을 규명하는 것이 목표이다.

해양생물을 대상으로 캐나다, 미국, 영국, 노르웨이 등에서 이루어지는 유전체 연구는 해양생물의 분포와 이동 및 집단 유전을 이해하려는 목적 혹은 침입종의 방지와 어류자원의 특성 분석에 필요한 유전자마커를 제공하기 위한 방향으로 진행되고 있다. 프랑스, 오스트레일리아, 노르웨이 등에서는 양식대상종의 신진대사를 이해하여 생산량을 증대시키고 형질을 개선하기 위하여 수산생물종의 유전체 연구를 수행하고 있다.

일본은 국·도립연구소와 대학 등 51개 연구그룹이 연합하여 참돔과 비단잉어, 전복 및 참굴을 대상으로 육종연구를 수행하고 있다. 유럽연합은 EU공동체 프로그램에 따라 넙치, 터봇 및 대서양 대구의 육종연구를 수행하고 있고, 어류 및 패류의 스트레스 및 질병저항성 마커선별을 위하여 유전적으로 접근하여 기능유전체를 분석하고(AQUAFIRST 프로그램), 유전체 정보를 연결하여 양식어류종의 유전형질을 개선(BRIDGE-MAP 프로그램)하기 위한 연구를 진행하고 있다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 볼락의 근육성장 관련 유전자 탐색

1. 연구 재료 및 방법

가. 어류시료 확보

동일한 조건으로 사육된 볼락 연령별(5개월령 및 16개월령) 시료는 체중을 기준으로 L(large) 그룹과 S(small) 그룹으로 각각 나누었다. 유전자 분석시료는 볼락의 혈액, 근육조직, 신장, 아가미, 지느러미, 간 조직을 이용하였다.

나. Total RNA 분리 및 정제

볼락 근육조직, 신장, 아가미, 지느러미, 간 조직 및 혈액 100mg을 액체질소를 이용하여 파쇄하였다. TRIzol[®] Reagent(Invitrogen, USA) 1ml을 첨가하여 상온에서 5분간 방치하면서 완전히 섞어 준 다음, chloroform을 0.2ml 넣는다. 상온에 3분간 두었다가 원심분리(12,000xg, 4°C, 15분) 하였다. 상층액에 isopropyl alcohol을 첨가하여 상온에 10분간 두었다가 원심분리(12,000xg, 4°C, 10분)하여 RNA pellet만 취했다. 75% 에탄올로 세정 후에 RNA pellet을 건조시킨 후, 멸균수에 녹여 실험에 이용하였다.

다. 차등발현유전자 탐색

볼락 연령별 및 크기별 시료의 근육조직으로부터 분리·정제한 total RNA 3 μ g을 Reverse Transcription System(Promega, USA)을 이용하여 한 가닥 cDNA를 합성하였다. Total RNA 3 μ g, 5x reaction buffer 4 μ l, dNTP mix(각 2mM) 5 μ l, 10 μ M dT-ACPI(5'-CGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3', Seegene, Korea) 2 μ l, RNasin[®] RNase Inhibitor 0.5 μ l, M-MLVRTase(200U/ μ l) 1 μ l를 첨가하여 42°C에서 1시간 30분 동안 반응시켜 GeneFishingTM PCR을 수행하기 위한 한 가닥 cDNA를 합성하였다. 합성된 한 가닥 cDNA는 5배의 희석하여 실험이 -20°C에 보관하였다.

GeneFishing™ DEG Kits(Seegene, Korea)을 사용하여, ACP-based PCR 방법 (Kim 등, 2004)에 따라 발현량 차이를 나타내는 유전자를 screening하였다. 두 가닥 cDNA는 PCR의 첫 번째 단계에서 합성하였으며, 희석된 한가닥 cDNA 50ng, dT-ACP2(10 μ M) 1 μ l, 10 μ M arbitrary ACP 1 μ l, 2x Master Mix 10 μ l를 혼합하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 3분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응시켰다. 두 가닥 cDNA의 합성이 끝난 다음 두 번째 단계의 PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 40초, 65 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 40초의 조건으로 40회 반응하였다. 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동한 후, 발현량 차이를 나타낸 cDNA 단편을 회수하여 염기서열을 확인하였다.

2. 연구결과

가. 볼락 연령별 및 크기별 시료

동일한 조건에서 사육된 5개월령 및 16개월령 볼락은 체중을 기준으로 각각 large 그룹과 small 그룹으로 나누어 분석에 이용하였다. 연령별 그룹시료는 각각 30개체를 확보하였으며, small 그룹 5개월령 small 그룹의 평균체중은 1.74g, large 그룹의 평균체중은 2.50g 이었다. 볼락 16개월령의 small 그룹 평균체중은 6.59g, large 그룹의 평균체중은 15.00g 으로 그룹간에 체중이 약 2배 차이가 되도록 시료를 확보하였다.

나. 볼락 성장에 따른 차등발현유전자 탐색 및 발현양상 분석

볼락의 근육성장 관련 유전자를 확보하기 위하여 ACP-based PCR 방법을 이용하여 차등발현유전자(Differentially Expressed Gene, DEG)를 스크리닝하였다. 볼락의 연령별 및 크기별 근육조직에서 발현량 차이를 나타낸 6개의 cDNA 단편을 확보하였다(그림 1). 발현량 차이를 나타낸 cDNA 단편의 크기는 약 300 bp ~ 900 bp이었으며, 모두 재증폭이 가능하였다.

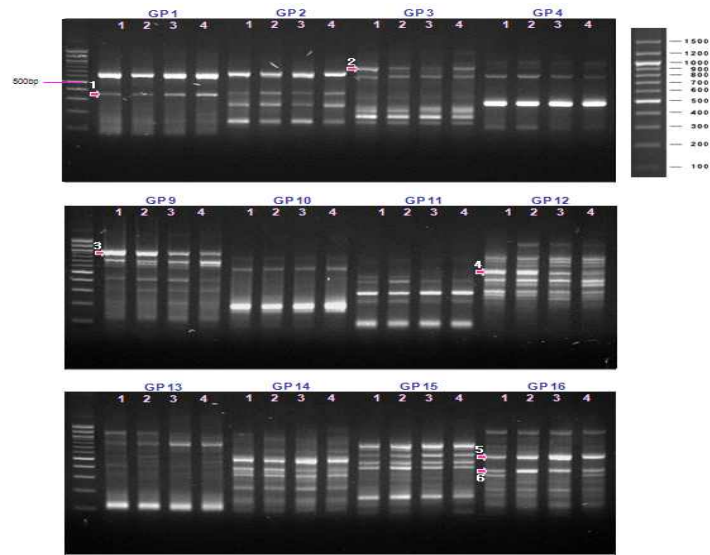


그림 1. 볼락 연령별 및 크기별 근육조직의 차등발현유전자 탐색

발현량 차이를 나타낸 cDNA 단편의 염기서열 정보를 이용하여 16개월령 근육조직을 이용하여 small 그룹과 large 그룹간의 발현양상을 비교분석하였다(그림 2). 차등발현유전자의 유전자 발현 절대량 비교 분석은 Real-Time Quantitative PCR 방법을 이용하였고, β -actin을 사용하여 cDNA를 normalization 하였다. 6개의 DEG의 발현량을 비교분석한 결과, CKM1(Creatin kinase muscle type)에 해당하는 DEG는 small 그룹과 large 그룹간에 4.15배의 발현량 차이를 나타내었다. Creatin kinasesms 에너지 대사에 관여하는 주된 효소로 알려져 있으며 CKM1은 근육조직에서 발현되는 형태이다.

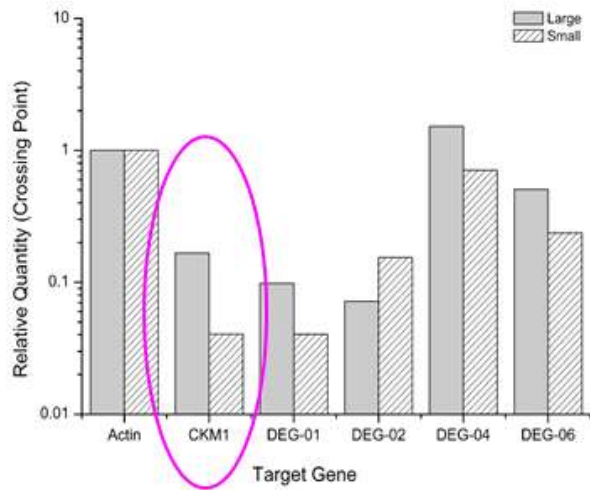
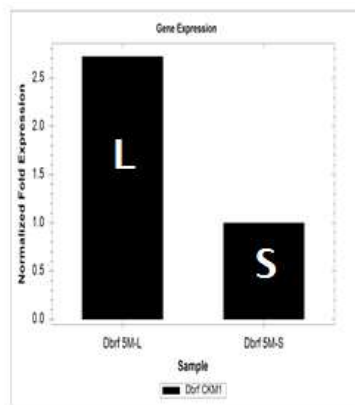


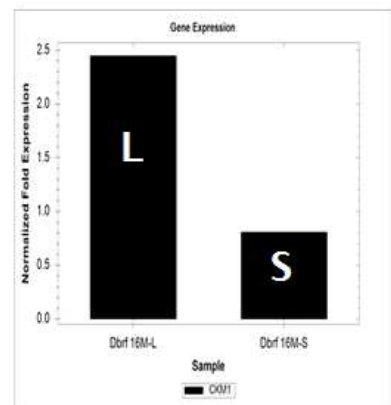
그림 2. 볼락 근육조직 차등발현유전자의 발현양상 분석

CKM1 유전자를 이용하여 볼락의 근육성장 관련 유전자마커를 개발하기 위하여 성장 초기인 5개월령과 성장의 폭발기라고 할 수 있는 16개월령의 근육조직에서 발현양을 재 확인하였다(그림 3). 볼락 근육조직에서 CKM1 유전자의 발현량은 5개월령 및 16개월령 모두 large 그룹에서 발현량이 많았다. 볼락 5개월령에서는 L그룹(large)의 발현량이 S그룹 (large)의 약 2.72배, 16개월령에서는 L그룹(large)의 발현량이 S그룹(large)의 약 3.02배 많았으므로 CKM1 유전자를 볼락의 근육성장 up regulated gene으로 선정하고 유전자마커 개발을 시도하였다.

연령	연령	그룹	성상치표	실험치표	
				n=30	n=8
5개월령	Large L1	배양	4.0-4.1 _{se}	4.2-4.7 _{se}	
		평균	3.5 ± 0.39 _{se}	4.3 ± 0.35 _{se}	
	Small S1	배양	2.55-2.94 _{se}	2.65-2.94 _{se}	
		평균	2.43 ± 0.25 _{se}	2.79 ± 0.2 _{se}	
	Large L2	배양	3.3-4.2 _{se}	3.3-3.9 _{se}	
		평균	3.8 ± 0.28 _{se}	3.8 ± 0.26 _{se}	
Small S2	배양	3.32-2.80 _{se}	3.35-3.44 _{se}		
	평균	3.24 ± 0.17 _{se}	3.23 ± 0.09 _{se}		
16개월령	Large L1	배양	8.0-9.9 _{se}	8.5-9.9 _{se}	
		평균	8.7 ± 0.81 _{se}	9.3 ± 0.84 _{se}	
	Small S1	배양	11.24-21.84 _{se}	11.43-21.84 _{se}	
		평균	11.00 ± 2.28 _{se}	11.87 ± 1.73 _{se}	
	Large L2	배양	4.9-7.9 _{se}	7.0-7.7 _{se}	
		평균	7.5 ± 0.27 _{se}	7.3 ± 0.25 _{se}	
Small S2	배양	7.80-11.73 _{se}	10.01-10.73 _{se}		
	평균	10.06 ± 1.24 _{se}	10.38 ± 0.29 _{se}		
Large L3	배양	3.8-7.3 _{se}	5.8-8.8 _{se}		
	평균	6.7 ± 0.75 _{se}	6.4 ± 0.28 _{se}		
Small S3	배양	4.40-9.09 _{se}	4.98-5.94 _{se}		
	평균	6.59 ± 1.22 _{se}	5.22 ± 0.70 _{se}		



5개월령 볼락



16개월령 볼락

그림 3. 볼락 creatin kinase muscle type 1 (CKM1) 유전자의 발현양상 분석

볼락의 차등발현유전자 탐색 결과로부터 확보한 근육성장 저해작용에 관여할 것으로 추정되는 parvalbumin (PVALB) 유전자의 발현양상을 분석하였다(그림 4). Parvalbumin은 근육조직에 있는 calcium-binding albumin protein으로 볼락의 근육성장 관련 down regulated 마커를 확보하기 위하여 연령별 및 크기별 시료의 근육조직에서 PVALB 유전자의 발현량을 조사한 결과, 5개월령 및 16개월령 각 그룹간 발현량 차이가 유의적이지 않았으므로 PVALB 유전자를 볼락의 근육성장 저해 지표유전자로 이용할 수 없었다.

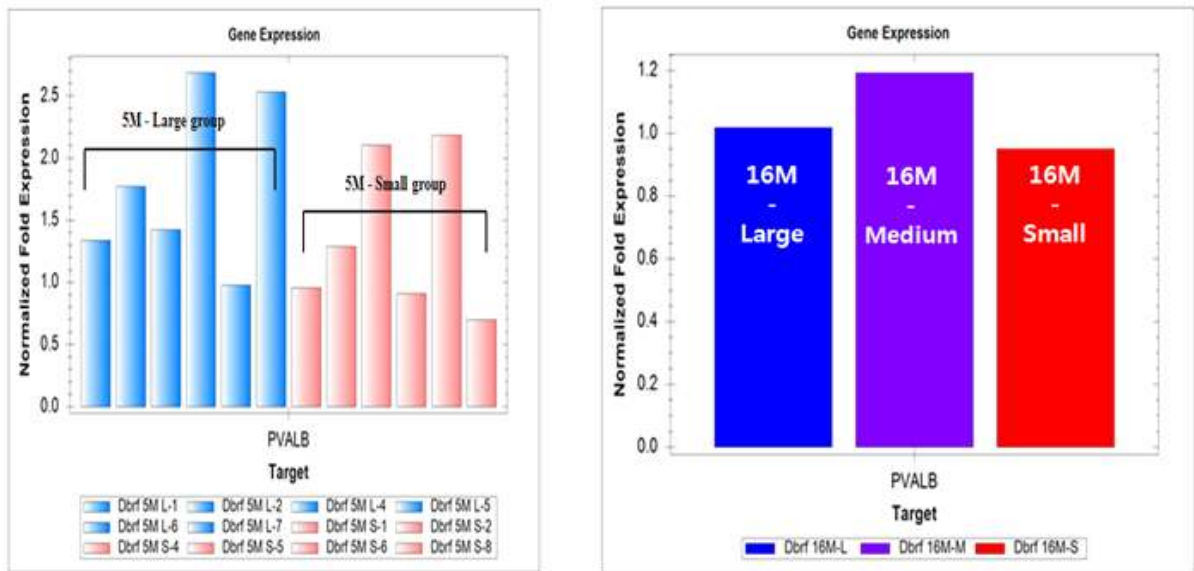


그림 4. 볼락 parvalbumin (PVALB) 유전자의 발현양상 분석

다. 볼락 CKM1 유전자의 mRNA 클로닝

CKM1 유전자를 볼락 근육성장 관련 유전자마커 개발에 이용하기 위하여 mRNA 염기서열 정보를 확보하여 분석하였다(그림 5). 볼락 CKM1 유전자의 mRNA 크기는 1,146 bp이었고, 1개의 ORF (open reading frame)를 가지며 382개의 아미노산을 암호화하였다.


```

1 atgcttctggaaacaccccaacaaactcaagctcaactcaaaagttagggatgagttc
M P F G N T H N N F K L N V E V E D E F
61 ccgacctgagccagcaacaacacataagccaaaggtctgacaaaggatgtatggc
P D L S Q H N N H M A K V L T K E M Y G
121 aagattagggacagcaaacccccagtggtacaacgtggacgatgtcatccagactggc
K I R D R Q T P S G V T V D D V I Q T G
181 gttgcaaacccccgtcaacccctcaatgacccgttggotggotggotggatgagggag
V D N P G H P F I M T V G C V A G D E E
241 tccatgaggtcttcaagaaactgctggaccccgtaactctgacccgtcatggtggatac
S V E V F K E L L D P V I S D R H G S V
301 aagcccactgacaagcaaaagccgacactgactogagaacctgaaaggtggtgagtagc
K P T D K H K T D L N F E N L K G G D D
361 ctggaccccaactcagttctgtccagccgtgtccgtactggccgtagcaatcaagggatc
L D P N Y V L S S R V R T G R S I E G F
421 accctcccccccaacaacagccgtggcagccagcagcattaggaaagctgctccgtggag
T L P P H N S R Q E R R A I E K L S V E
481 gctctgacactcctggtggtgagttcaagggaaagtaactaccctcagagttatgact
A L T I L D G E F K G K Y V P L K S M T
541 gatgcccagcagggcagcgtgactgctgacactcctggttgaacagcccgctcaccoc
D A E Q E Q L I A D H F L F D K P V S P
601 ctgctgacctgtgctggaatggccgtgactggcctgatgccagggcactctggcaaat
L L T C A G M A R D N P D A R G I W H N
661 gagaacaagacctcctggtctgggtcaatgagggagatcaactgctgtcatctcctg
E N K T F L V N V N E E D H L R V I S M
721 cagccgggtggcaactgagggaggtctcaaacgcttctgcttggcctgaaagcagtt
Q Q G G N M R E V F K R F C V G L K T I
781 gagyaacactcaagaagcaacaacaggtcactgtgaaagcagcactcagggctcactc
E E T F K K H N H G F M W N E H L G F I
841 ctgacctgcccctcaaacctgggcaactggactgctggtggtgtccatgtcaagctccc
L T C P S N L G T G L R O G V H V E L P
901 aagctcagcaacacagccaaagttgatgagatcctcaaacaggtgctgctgcaagaggt
K L S T H A K F D E I L T R L R L Q K R
961 ggcacaggtggtggaactgctccgtgggtggtgtgttgacatctcaacgcoyac
G T G G V D T A S V G G V F D I S N A D
1021 cgtctggctcctcaagggtagcaggtccagctgggtggtgaggtgctcaactgag
R L G S S E V E Q V Q L V V D G V K L M
1081 gttgagatggaagagctggagagggagagccatgacagcagtagctccctgcccag
V E H E K K L E K G E A I D S H I P A Q
1141 aagtag
K *

```

그림 5. 볼락 CKM1 유전자의 mRNA 염기서열 정보

3. 결론 및 토의

볼락의 근육성장 관련 유전자를 동일한 조건에서 사육된 연령별 및 크기별 시료를 이용하여 탐색한 결과로부터 성장 정도에 따라 발현량 차이를 나타낸 유전자 단편을 확보하였다. 발현량 차이를 나타낸 유전자는 creatin kinase muscle type 1(CKM1)이었으며, 볼락의 근육성장에 있어 up regulation 기능을 가진 것으로 판단된다. 어류의 근육성장 저해작용 관련 후보유전자로 선정된 parvalbumin (PVALB) 유전자를 down regulated 유전자마커 개발에 활용하기 위하여 발현양상을 비교분석하였으나 볼락의 성장그룹 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

제2절 볼락의 근육성장 관련 유전자마커 적용기술 개발

1. 연구 재료 및 방법

가. Real-time quantitative PCR 분석

Total RNA 2 μ g을 이용하여 한 가닥 cDNA를 20 μ l 합성하였다. PCR에 사용할 target 유전자의 primer는 poly(A)+ 부근이 증폭되고, 증폭할 단편의 크기가 70-200bp이며, T_M 값이 58-60 $^{\circ}$ C가 되도록 설계하였다. Pre-PCR로 primer 및 cDNA 상태를 확인한 후, cDNA 5ng, primer(forward+reverse, 10pM) 0.8 μ l, SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems, USA) 10 μ l를 첨가하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 조정하여 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30분, 72 $^{\circ}$ C에서 30초의 조건으로 40회 반응시켰다. 정량분석을 위하여 동일 유전자에 대해 3회 반복실험을 수행하고자 하며, real-time PCR 분석은 CFX Connect Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)을 사용하였다.

나. PCR 산물의 염기서열 결정 및 분석

유전자 증폭산물을 PCR Purification Kit (Dyne Bio Inc., Korea)을 사용하여 정제한 후 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 결정반응을 실시하였다. 반응이 끝난 산물은 알코올 정제 후, ABI 3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였으며, Chromas v2.30 및 BioEdit v 5.0.6 softwear를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

다. Genomic DNA 분리 및 정제

볼락의 지느러미 조직을 크기가 0.5cm x 0.5cm (가로 x 세로) 되도록 자른 후 lysis buffer[10mM Tris-HCl pH7.5, 125mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS, 5M Urea, 0.1mg/ml proteinase K]를 첨가하여 혈구세포를 용해한 후, binding buffer와 isopropanol을 사용하여 genomic DNA를 분리하였고, Accuprep[®] Genomic DNA Extraction

Kit(Bioneer Co., Korea)의 column을 이용하여 정제하였다. 분리·정제한 genomic DNA는 전기영동으로 확인한 후, NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)를 사용하여 농도를 측정하고 -80℃에 보관하였다.

라. CKM1 유전자 증폭 및 PCR-RFLP 분석

볼락 CKM1 유전자의 ORF 영역 증폭에는 Pallas CKM-874F (5'-ATGCCTTTTCGGAAACACCCA-3')와 Pallas CKM-2833R (5'-CTACTTCTGGGCAGGGATCA-3') 프라이머를 사용하였다. 조절영역을 증폭하고 변이를 탐색하기 위하여 Pallas CKM-PIF (5'-GTCAAATGGGAACCTCAGC-3'), Pallas CKM-P2F (5'-GACCAACTGGTGCTATGTTTG-3'), Pallas CKM-P3F (5'-ATATTACACAAATGCACG-3'), Pallas CKM-P4F (5'-GACTCCAGTGAAGAGCAAAG-3'), Pallas CKM-P5F (5'-GCATGTTGTGATTTGGTGC-3') 프라이머를 사용하였다.

증폭반응은 genomic DNA 50ng, PCR buffer[10mM Tris-HCl(pH9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂], dNTPs 200μM, 각각의 primer 20pM 및 *Taq* DNA polymerase(Bioneer Co, Korea) 0.5U을 첨가하고 최종 25μl가 되도록 멸균수를 첨가하였으며, 94℃에서 5분간 미리 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 35회 반응시켰다(PTC-200, MJ Research, USA). 증폭산물은 1.0% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

RFLP(restriction endonuclease length polymorphism) 분석은 PCR 증폭산물 3μl에 제한효소 3U을 첨가하여 전체량을 10μl로 조정한 후, 37℃에서 3시간 반응시켰다. 각 제한효소에 의해 절단된 PCR 증폭산물은 2.5% metaphor agarose gel 전기영동으로 유전자형을 분석하였다.

2. 연구결과

가. CKM1 유전자의 조직특이적인 발현양상 분석

볼락 근육성장 관련 up regulated 마커를 개발하고 적용하기 위하여 CKM1 유전자가 발현되는 조직을 파악하고자 하였다(그림 6). CKM1 유전자는 혈액, 신장, 아가미 및

지느러미에서 발현되었으며, 간 조직에서는 발현되지 않았다.

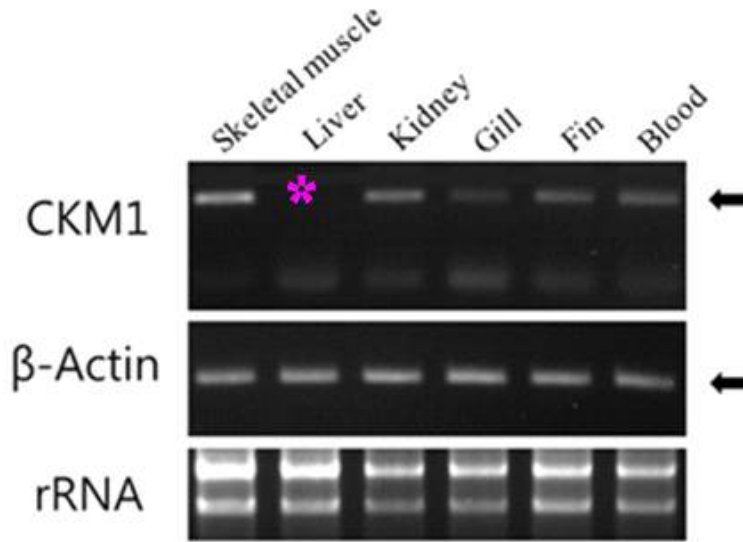


그림 6. 볼락 CKM1 유전자의 조직특이적 발현 패턴

나. 볼락 CKM1 유전자의 구조 분석 및 조절영역 내 변이 탐색

볼락 CKM1 유전자의 조절영역을 확보하기 위하여 CKM1 전체유전자를 클로닝하였다(그림 7). 볼락 CKM1 유전자 크기는 3,906 bp 이었고, 7개의 exon과 6개의 intron으로 구성되어 있었다. CKM1 유전자의 조절영역에는 근육분화 관련 enhancer 알려진 E-box가 존재하였다.

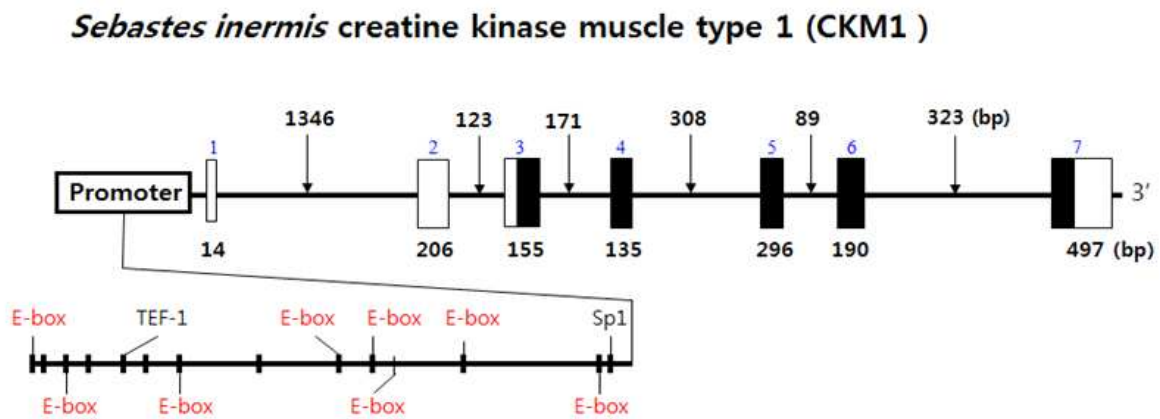


그림 7. 볼락 CKM1 유전자의 genomic organization

볼락 CKM1 유전자의 조절영역 내에 존재하는 유전자 변이를 제한효소를 사용하여 탐색한 결과, CKM1 유전자 조절영역 947 bp 내에 제한효소 *Pvu*II에 의해 3가지 형태의 대립유전자가 존재함을 확인하였다. 조절영역 -831번의 염기 G가 A로 치환되어 생긴 염기변이로 제한효소 *Pvu*II 인식부위가 변화되어 절단되지 않았고, 조절영역의 E-box 내에 염기변이가 존재함으로써 enhancer 수의 변화를 초래하였다. 전사 조절영역 내의 *Pvu*II 변이에 따른 대립유전자간에는 발현량 차이가 있음을 확인하였다(그림 8).

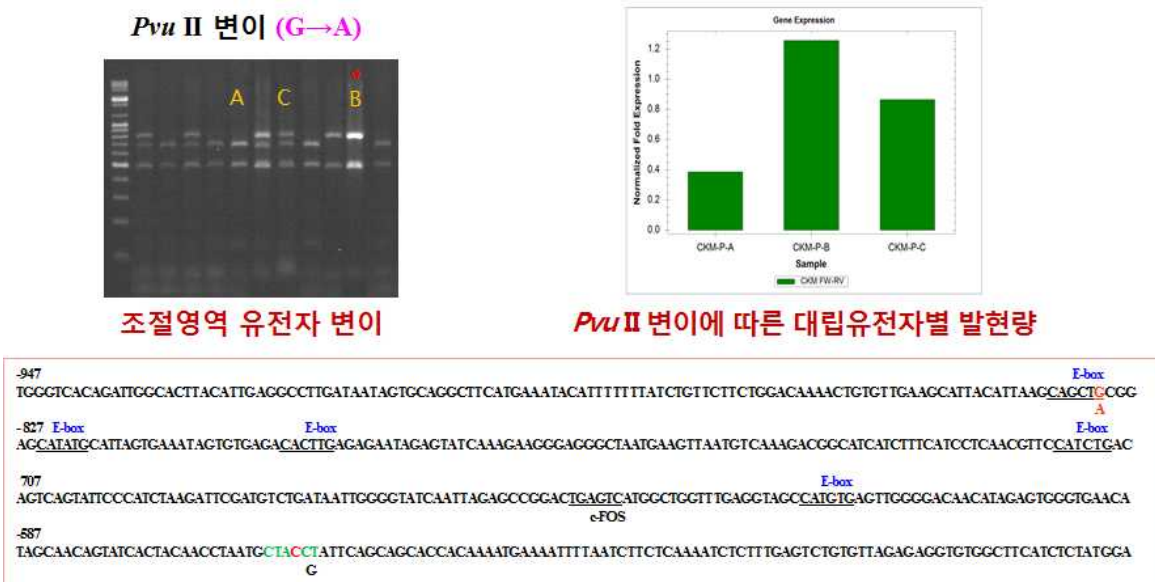


그림 8. 볼락 CKM1 유전자 조절영역의 유전자 변이 및 대립유전자별 발현량

다. 볼락의 근육성장 관련 유전자마커 개발 및 적용

볼락 CKM1 유전자의 ORF 영역 및 전사조절 영역 내의 변이를 이용하여 어류 선발시 활용이 가능한 근육성장 관련 유전자마커를 확보한 후 적용하였다. 근육 생산량이 많을 것으로 추정되는 볼락 개체의 선발은 CKM1 ORF 영역의 376번 염기가 G이고 CKM1 전사조절 영역 단편이 제한효소 *Pvu*II로 절단되지 않는 개체를 확보하는 방법으로 진행하면 된다(그림 9).

볼락 Genomic DNA 추출



적용 1과 2를 동시에 만족하는 개체 선발 및 이용

그림 9. 볼락의 근육성장 관련 유전자마커의 적용 방법

3. 결론 및 토의

볼락의 근육성장 관련 up regulation 기능의 유전자(creatin kinase muscle type 1, CKM1)를 확보하여 유전자 변이를 탐색하였다. CKM1 유전자의 ORF 영역 및 전사조절 영역 내에 있는 유전자 변이로 인한 대립유전자별 발현양상을 분석하였다. CKM1 유전자 ORF 영역 및 전사 조절영역의 변이를 이용하여 근육 생산량이 많은 볼락 개체 선발시 적용할 수 있는 방법을 작성하였다. CKM1 ORF 376번 염기가 G이고, CKM1 전사조절 영역(450 bp 크기)이 제한효소 *Pvu*II로 절단되지 않는 적용을 동시에 만족하는 개체를 선발하여 이용하면 된다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

제1절 연구개발 목표 달성도

연구목표 및 달성도 평가	달성도 (%)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 불락의 근육성장 관련 유전자 마커 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 불락의 근육성장 관련 유전자 CKM1을 확보하여 유전자마커를 개발하였음 	100
<ul style="list-style-type: none"> ○ 불락의 근육성장 관련 기능유전자마커 적용기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 근육성장 관련 유전자마커를 사용하여 근육생산량이 많은 불락의 조기선발에 이용할 수 있는 적용매뉴얼을 작성하였음 	100

제2절 대외 기여도

- 주요 연구성과의 우수성

불락류의 근육 성장과 관련된 유전자의 정보를 분석하였고, 근육 성장을 돕는 기능을 하는 유전자를 확보하였다. 근육성장에 있어 up regulation 기능을 갖는 유전자로부터 불락의 사육 초기에 활용하면 양식생산성의 증대가 가능한 적용매뉴얼을 작성하였다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

불락의 근육성장 관련 유전자마커 개발 기술 및 적용기술은 대량으로 생산되고 있는 생물의 유전체 정보를 산업적으로 활용할 수 있는 유용한 기술이다.

본 연구사업을 수행하여 확보한 근육생산량 증가와 관련된 유전자마커를 활용하는 연구를 불락을 비롯하여 주요 양식어종을 대상으로 진행할 계획이다. 또한, 근육생산성을 향상시키는 것과 연관된 유용유전자를 추가로 확보하고 근육성장을 저해하는 것으로 알려진 유전자를 탐색하여 어류 양식현장에서 적용할 수 있는 정확도 높은 유전자마커를 개발하고자 한다. 어류의 생산성을 향상시킬 수 있는 경제형질 관련 유전자마커를 다수로 개발하고, 어류 양식산업 현장에서 적용할 수 있는 매뉴얼을 작성하는 연구에 활용할 계획이다.

제 6 장 참고문헌

- Arif, S.H. 2009. A Ca²⁺-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *BioEssays*, 31: 410-421.
- Arif, S.H., M. Jabeen and A. Hasnain. 2007. Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumins: the major fish-food allergens. *J. Food Biochem.*, 31: 121-137.
- Benzonana, G., L. Kohler and E.A. Stein. 1974. Regulatory proteins of crayfish tail muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 368: 247-258.
- Berchtold, M.W., P. Epstein, A.L. Beaudet, M.E. Payne, C.W. Heizmann and A.R. Means. 1987. Structural organization and chromosomal assignment of the parvalbumin gene. *J. Biol. Chem.*, 262: 8696-8701.
- Brownridge, P., L. Vieira de Mello, M. Peters, L. McLean, A. Claydon, A.R. Cossins, P.D. Whitfield and I.S. Young. 2009. Regional variation in parvalbumin isoform expression correlates with muscle performance in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Exp. Biol.*, 212: 184-193.
- Chauvigne, F., C. Cauty, C. Ralliere and P.Y. Rescan. 2005. Muscle fiber differentiation in fish embryos as shown by in situ hybridisation of a large repertoire of muscle specific transcripts. *Dev. Dyn.*, 233: 659-666.
- Chen, Y., Q. Zhang, J. Qi, Z. Wang, X. Wang, Y. Sun, Q. Zhong, S. Li and C. Li. 2010. Cloning and stage-specific expression of CK-M1 gene during metamorphosis of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *China. J. Ocean. Limnol.*, 28: 558-564.
- Focant, B., F. Melot, S. Collin, A. Chikou, P. Vandewalle and F. Huriaux. 1999. Muscle parvalbumin isoforms of *Clarias gariepinus*, *Heterobranchus longifilis* and *Chrysichthys auratus*: isolation, characterisation and expression during development. *J. Fish Biol.*, 54: 832-851.
- Focant, B., P. Vandewalle and F. Huriaux. 2003. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms during the development of a flatfish, the common sole *Solea solea*: comparison with the turbot *Scophthalmus maximus*. *Comp. Biochem.*

- Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 135: 493-502.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177: 99-115.
- Kim, Y. J., C. I. Kwak, Y. Y. Gu, I. T. Hwang and J. Y. Chun. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Bio Techniques* 36: 424-426, 428, 430.
- Menard C., Brousseau R. and Mouton C. 1992. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer(AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 74(2-3): 163-168.
- Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A. S. and Schotz, M. C. 1980. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annu Rev Biochem* 49: 667-693.
- Oku, H., Ogata, H. Y. and Liang, X. F. 2002. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 131: 775-785.
- Poompuang, S. and D. Panprommin. 2010. Expression of four muscle proteins at different growth stages of Gunther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. *Aquaculture Research*, 41: e144-e154.

뒷 면

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.