

멸종위기야생동물 I급 나팔고둥 (*Charonia sauliae*) 의 *Aquaporin* 유전자를 활용한 분자계통 분류학적 연구

정종민¹, 황희주¹, 상민규¹, 박지은¹, 송대권¹, 정준양¹, 조용훈³, 한연수³, 박홍석⁴, 이준상⁵, 신이현⁵,
박소영², 이용석¹

¹순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과, ²국립낙동강생물자원관 다양성연구팀, ³전남대학교
농업생명과학대학 응용생물학과, ⁴(주)지앤시바이오, ⁵순천향대학교 기초과학연구소

Phylogenetic analysis of *Charonia sauliae* inferred from *Aquaporin* gene

Jong Min Chung¹, Hee-Ju Hwang¹, Min Kyu Sang¹, Jie Eun Park¹, Dae Kwon Song¹,
Jun Yang Jeong¹, Yong Hun Jo³, Yeon Soo Han³, Hong seog Park⁴,
Jun Sang Lee⁵, E hyun Shin⁵, So Young Park² and Yong Seok Lee¹

¹Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 31538, Korea

²Biodiversity Research team, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, Gyeongbuk, 37242, Korea

³Department of Applied Biology, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture (IEFA), College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

⁴Research Institute, GnC BIO Co., LTD., 621-6 Banseok-dong, Yuseong-gu, Daejeon, 34069, Korea

⁵Institute for Basic Sciences, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 31538, Korea

ABSTRACT

Charonia sauliae, the largest sea snail is designated as the class I endangered species of red list data in Korea, because of habitat destruction and environmental pollution. For the conservation and restoration of this species, identification of genetic resources through transcriptomic and genomic studies, and investigation of ecological information are needed. In this study, we identified aquaporin (AQP) which plays an essential role in the water channel, by local-blast analysis with the nucleotide database of *C. sauliae* generated by Illumina Hi-Seq 2000 next-generation sequencing platform. AQP of *C. sauliae* contained 897 bp of nucleotides encoding 299 amino acid residues. The domain analysis of AQP showed one aquaporin-like domain including six transmembrane domains, eight amino acid residues which are related to the amphipathic channel, and two Asn-Pro-Ala signature motifs (NPA boxes). 3-Dimensional analysis indicated that it included six alpha-helix structures, which formed the transmembrane channel. To understand the evolutionary-relationship of AQP, conducted the multiple alignments and phylogenetic analysis, resulting in that AQP contained highly conserved NPA boxes and transmembrane domain. AQP of *C. sauliae* was localized in the same branch with *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae). In the future, our results provide valuable information for the functional characterization of marine invertebrate aquaporin.

Keyword: *Charonia sauliae*, *Aquaporin*, Phylogenetics

Received: March 20, 2020; Revised: March 25, 2020;

Accepted: March 27, 2020

Corresponding author: Yong Seok Lee

Tel: +82 (41) 530-3040, e-mail: yslee@sch.ac.kr

Co-corresponding author: So Young Park

Tel: +82 (54) 530-0832, e-mail: cindysory@nnibr.re.kr

1225-3480/24756

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

무척추동물은 지구에서 가장 많은 종이 포함되어 있을 뿐 아니라, 열대에서 극지, 육상에서 해양까지 다양하게 분포하며 그중 절지동물과 연체동물이 가장 많은 부분을 차지하는 문이다. 우리나라에는 2,500 종 이상의 해산 연체동물과 200종의 육상 연체동물이 있을 것이라고 판단되는데, 아직까지 많은 생물종에 대한 동정도 끝나지 않은 상태이며, 특히 연체동물의 경우에는 유전체 및 전사체에 대한 연구가 많이 진행되지 않은

상황이다 (이 와 민, 2002; Bang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2019).

국내에 서식하는 복족류 중, 가장 대형인 나팔고둥 (*Charonia sauliae*) 은 남해 일부와 제주도 해역에 출현하는 제한된 분포 지역을 보이고, 출현 빈도도 낮아 현재 환경부의 멸종위기야생생물 1급으로 지정되어 있다. 나팔고둥은 양식생물에 해를 끼치는 불가사리를 포식하여 개체 수를 조절하는 유일한 천적으로 알려져 있다. 그러나 현재까지 나팔고둥에 대한 분포와 생태 등의 기초적인 연구는 이루어지지 않았고, 일부 종묘생산에 관련된 연구만이 이루어진 실정이다 (강 외, 2009; 국립생물자원관, 2012).

Aquaporin (*AQP*) 은 존스홉킨스 대학교 Peter Agre 에 의해 처음으로 밝혀진 세포막 단백질로 세포내 또는 세포간 물의 흐름을 조절하는 채널 단백질이며, 그 결과는 2003년 노벨 화학상을 수상하게 하였다 (Agre, 2006). 그 이후 많은 연구를 통해 인간에서 최소 13개 family가 발견되었으며, 이 외에도 효모, 박테리아, 동물과 식물에서 *AQP* family가 확인되었다. 적응은 다양한 서식지에서 생명체가 생존하는데 매우 중요하게 작용하는데 세포막을 가로지르는 물과 다른 분자들의 통과를 용이하게 하는 *AQP* 단백질은 복족류가 다양한 서식지에서 물의 균형을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이와 관련하여 유전자 연구를 포함한 분자생물학적 연구들이 많이 진행되고 있다. 또한 복족류의 *AQP* 서열과 NCBI 참고서열을 이용한 계통분석연구도 수행되었다 (Colgana *et al.*, 2018).

현재까지 NCBI taxonomy browser 에 등록이 되어있는 나팔고둥의 유전정보는 Nucleotide 서열이 7개, Protein 서열이 40개 그리고 국립해양생물관에 의해 밝혀져 있는 미토콘드리아 유전체 서열 및, 37개 유전자 서열 정도인데 등록되어 있는 유전자 서열은 모두 미토콘드리아 유전자들 이었다. 이렇듯 나팔고둥의 유전자 관련 연구는 거의 되어있지 않아 유전자원이 매우 부족한 상황이다. 본 연구진은 나팔고둥의 유전자원의 구축 및 종 복원 사업의 기반을 만들기 위해 차세대 시퀀싱 (NGS) 기술인 Illumina HiSeq 2000 를 사용하여 유전체 분석을 실시한 바 있다 (SRR11069700). 이러한 데이터들은 추후 나팔고둥 특이 유전자 기능 연구 및 나팔고둥이 절멸 되었을 때 종 복원을 위한 데이터로 소중한 활용될 수 있을 것이라 생각한다. 본 연구에서는 나팔고둥의 SRA 데이터에서 *AQP* 유전자를 생물정보학적 방법으로 분석하여 *AQP* 유전자의 정확한 서열을 확보하고 계통분류학적 분석을 하여 그 기능을 연구하기 위한 기초데이터 확보에 그 목표가 있다.

MATERIALS & METHODS

나팔고둥 (*Charonia sauliae*) 은 총알고둥목 (Littorinimorpha), 수염고둥과 (Ranellidae) 에 속하는 복족류로 영산강유역환경청에 허가를 받은 후 제주도에 채집하였다. 채집 후 mRNA 추출을 위해 내장낭 조직을 적출하였다.

1. cDNA library 구축

mRNA 추출을 위하여 나팔고둥의 내장낭 조직을 냉동상태에서 분쇄한 다음 Trizol reagent (Invitrogen, 15596026) 매뉴얼에 따라 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 NanoDrop-2000 spectrophotometer와 Agilent 2100 BioAnalyzer RNA nano chip을 사용하여 quality control 을 수행하였다. cDNA library는 SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States) 을 사용하여 illumina sequencing 용으로 제작하였으며, QPCR NGS Library Quantification Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States) 와 Agilent 2100 BioAnalyzer DNA 7500 chip 으로 library quality control을 진행하였다. 약 200 bp 사이즈로 만들어진 cDNA library는 clustering 과정을 거친 후 차세대 염기서열분석기 (Next Generation Sequencing) Illumina HiSeq 2000 장비를 사용하여 서열분석을 하였다.

2. 나팔고둥의 *aquaporin* (*AQP*) 서열 확보

나팔고둥의 Transcriptome 분석 및 *AQP* 서열 확보를 위해 차세대염기서열분석기를 이용하여 만들어진 raw read 를 1차적으로 Cutadapt (v1.11) 프로그램으로 adapt sequence 를 제거하였고, Sickle (v1.33) 프로그램으로 low quality sequence를 제거하여 clean reads를 확보하였다 (Martin; NA and JN, 2011). Clean reads 를 가지고 중복되는 부분들을 assembly 해주는 Trinity (v2.0.4) 프로그램으로 contig 를 생성하였다 (Haas *et al.*, 2013). 생성된 contigs 로부터 Transdecoder 프로그램을 이용하여 ORF 서열들을 뽑은 후, TGICL (TIGR Gene Indices Clustering tools) (v2.1) 프로그램으로 클러스터링한 후 unigene 을 만들었다. (Pertea *et al.*, 2003). 생성된 unigene 서열들은 PANM DB version 3 에서 BLAST 프로그램을 통하여 annotation 을 진행하였고, 이 결과 중 나팔고둥의 *AQP* 로 추정되는 서열들을 골라 sixpack 프로그램 (EMBOSS package) 으로 가능한 아미노산 서열들을 추출하였다 (Rice *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2019). *AQP* 의 특징을 나타내는 것으로 알려진 First NPA box 와 Second NPA box 서열이 나팔고둥의 *AQP* 서열에도 존재하는지 알아보기 위하여 다중서열정렬 분석을 수행하였다.

3. 나팔고둥의 aquaporin 기능 및 3D 단백질 분석

NCBI 에 등록된 데이터들을 이용하여 BLAST 를 통해 유사한 서열에서 conserved domain 을 확인하였고, transmembrane helices 를 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 를 통하여 예측하였다. 또한 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) 소프트웨어를 사용하여 단백질 3D 구조를 그림으로 나타냈다 (Kelley *et al.*, 2015).

4. Multiple alignment 및 phylogenetic tree 분석

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 의 nr (Non-redundant) 데이터베이스에서 BLAST 를 실행시켜 다른 근연종의 aquaporin 서열과 나팔고둥의 aquaporin 서열을 FASTA 파일 방식을 바꾼 후 ClustalX2 (v2.1) 프로그램을 이용하여 multiple alignment 를 진행하였다 (Larkin *et al.*, 2007). 또한 MEGA X 프로그램을 이용하여 Maximum Likelihood 방법을 통해 phylogenetic dendrogram 을 도식화 하였으며, 이를 바탕으로 나팔고둥의 AQP 서열을 다른 연체동물들의 AQP 서열과 비교분석하여 근연종과의 유연관계 및 계통분류학적 위치를 확인하였다 (Kumar *et al.*, 2018).

RESULT & DISCUSSION

생물자원은 인간에게 있어 필수적인 가치를 지니고 있으나 맹목적인 자원 채취와 인위적 생태계 교란으로 인해 급격한 감소가 야기되고 있다. 이에 생물다양성을 보전하고자 2010년 생물다양성협약 제 10차 당사국 총회에서 나고야 의정서가 채택되었고 “유전자원에 대한 접근 및 이익 공유” 에 의해 생물자원관을 중심으로 관련 연구가 지속적으로 수행되고 있다. 특히 2014년 이후에는 차세대염기서열분석기술의 비약적 발전을 바탕으로 멸종위기생물의 유전자원 보전을 위한 유전체 및 전사체 확보가 시작되었다 (국립생물자원관, 2012).

Aquaporin (AQP) 는 플라스마막과 세포간 유체 이동을 통한 삼수압 물 수송 촉진 인산화 작용, 유비퀴티네이션, 소변 농도 조절, 체액 분비, 세포 이동 및 신경 신호 전달과 같은 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Li and Wang, 2017, Verkman, 2017). 삼수압 조절 등 생체내에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐에 따라 임신, 성장 또는 여러가지 스트레스가 주어졌을 때 등의 환경에서 유전자 발현 변화 등 많은 연구가 수행되었다 (Park *et al.*, 2000; 조 외, 2008; Jang *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2011; Abir-Awan *et al.*, 2019).

체내 수분 결핍의 경우 AQP-1 의 발현이 낮게 나타나며, 수분 과다 시에는 AQP-1 이 높게 발현되는 것으로 나타나고 있으며, AQP-2 가 부족할 경우, vasopressin receptor 2 gene-

vasopressin (V2R-VP) 신호가 억제되어 요붕증이나 야뇨증이 일어난다고 알려져 있다. 또한 울혈성 심부전, 임신 시에는 증가하는 경향이 있고, 비만인 경우에는 AQP-7 이 글리세롤 전달 및 조직과 장기의 매개자 역할을 해 에너지 및 물질대사에 작용한다고 한다. AQP-4 는 물질 이동, 신경 흥분 등의 역할을 하면서 약물수송에도 도움을 주는 것으로 알려져 있어 AQP 대상 치료제 개발에 활용할 수 있을 것으로 사료된다 (김 외, 2001; Jin *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017; Lu, 2017; Silva and Soveral, 2017)

1. 나팔고둥의 aquaporin (AQP) 서열 확보

나팔고둥의 AQP 유전자 서열은 총 897 bp이며 299 개의 아미노산으로 구성되어 있었다. Coding region 의 GC 함량은 53.67% 이고, 단백질 서열은 Glycine 이 32개 (10.7%), Alanine 이 30개 (10.03%), Valine 이 30개 (10.03%) 를 포함하고 있었다 (Fig. 1). 나팔고둥의 AQP 서열과 인간 AQP-4 서열을 비교하였을 때, First NPA box 와 Second NPA box 부분이 75% 일치하는 것을 확인할 수 있었다 (Table. 1). 태아 뇌의 cDNA 라이브러리에 복제된 인간 AQP-4 의 경우 rat의 AQP-4 와 94% 일치하는 암호화된 301개의 아미노산을 가지고 있음이 확인되고 있어 AQP 서열이 분자계통학적으로 의미가 있다고 판단하였다 (Li *et al.*, 2017). NCBI nr 데이터베이스에 BLAST를 통해 확인된 나팔고둥의 AQP 서열과, NCBI Entrez 데이터베이스에서 "Gastropoda aquaporin" 으로 검색 후 검증을 통해 최종적으로 16종의 AQP 서열을 선별하였다.

2. 나팔고둥의 aquaporin 기능 및 3D 단백질 분석

AQP 의 3차원적 구조는 다양한 AQP 클래스 및 여러 종들에 있어서 시퀀스 유사성의 유의한 차이에도 불구하고 크게 보존되는 양상을 보였다. AQP 는 30kDa 단량체로 구성된 4차 구조 단백질로 각각 독립된 채널 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 6개의 transmembrane helices (정상적으로는 막에 대해 약 30° 기울어져 있음) 가 있고, 항상 세포질 내에 위치하는 소수성 단자 amino 와 carboxyl 그룹이 있는 것으로 알려져 있다. AQP 는 아스파라긴-프로라인-알라닌 (Asn-Pro-Ala, NPA) 시퀀스가 매우 잘 보존된 3개의 세포외 루프와 2개의 세포내 루프를 가지고 있다 (Li *et al.*, 2017). BLAST를 통해 MIP (Major Intrinsic Protein) superfamily가 conserved domain임을 확인할 수 있었다. MIP superfamily 의 구성원들은 세포 밖으로, 그리고 세포들 사이에서 물, 작은 중성 분자, 이온을 선택적으로 운반하는 막 채널로서의 기능을 하는 것으로 밝혀져 있다. 나팔고둥의 AQP 아미노산 서열에서 MIP Superfamily 2개의 영역을 검색한 결과 특이적인 영역이 2부

Molecular phylogenetics of *Charonia sauliae* inferred from *aquaporin* gene

273		ATG GAA GGG ATG TAC ATC TAC ACT GCT AAC AAA GTG	317
90		M E G M Y I Y T A N K V	104
318	GAA GCT ATT CGG AAA GGC GAT CAT GGT AAC GGT GGA GAA AAA TCG	362	
105	E A I R K G D H G N G G E K S	119	
363	TAC AAG ATC ATC GAT GTC AAG GAG CTG AAA TGC CTG GCG TTC TGG	407	
120	Y K I I D V K E L K C L A F W	134	
408	CGT GCG GTT TTT GCG GAG TTT TTG GCC CAA GTT CTC TTC GTG TTC	452	
135	R A V F A E F L A Q V L F V F	149	
453	CTG GGG GGA TGC TCG GTT ATG TTT ACA AGT GGC AGT GCT CAG ATT	497	
150	L G G C S V M F T S G S A Q I	164	
498	ATT CAG ATC GCC CTG GGG TTT GGA CTG TCC ATC ATG GCG CTG ATT	542	
165	I Q I A L G F G L S I M A L I	179	
543	CAA ATG ATC GGG CAC GTG AGC GGC GGC CAT ATT AAC CCT GCC GTT	587	
180	Q M I G H V S G G H I N P A V	194	
588	ACC ATA GCA ATG GCT GTG ACC TTA AAC ATC TCC ATA GCG CGT GCT	632	
195	T I A M A V T L N I S I A R A	209	
633	GTC CTC TAC GTC GTC GCT CAG GTC GTT GGT GGC ATC ACT GGT GGT	677	
210	V L Y V V A Q V V G G I T G G	224	
678	TTC ATT TTG AAA GGG GTG ACC CCA GAT TCA TTA CAC TCC AAC CTG	722	
225	F I L K G V T P D S L H S N L	239	
723	GCA GTG ACG GCC ATC AAC ACG AAC CTG ACG GTG GGT CAG GGC CTG	767	
240	A V T A I N T N L T V G Q G L	254	
768	GGG GTG GAG ATC ATT CTC ACC TTC GTC CTG GTG TTC GTC ATC TTC	812	
255	G V E I I L T F V L V F V I F	269	
813	GGC ACA ACT GAC GCC AAC CGC CCC TCC TTC GGC AGC CCC GCC CTC	857	
270	G T T D A N R P S F G S P A L	284	
858	CTC ATT GGC CTC ACT GTG ACA CTG CTG CAT TGT GCT GGG GTG AAT	902	
285	L I G L T V T L L H C A G V N	299	
903	TTC ACG GGA GCC AGC ATG AAC CCT TCT CGA ACC ATG GGC TCT GCT	947	
300	F T G A S M N P S R T M G S A	314	
948	GTG GCC TCG GAC AGT TAC GTG GAC ATC TGG GTG TAC TGG GTG GGA	992	
315	V A S D S Y V D I W V Y W V G	329	
993	CCC ATC GTG GGA GGT ATT GCA GCA GCC CTC GCC TAC ACA CTG CTT	1037	
330	P I V G G I A A A L A Y T L L	344	
1038	TTC AGC CCG TAC AGA GGA ATG CTC TCT ATG GAT GAT GCT GTG CAG	1082	
345	F S P Y R G M L S M D D A V Q	359	
1083	AAA ATG CTT CAA GAC GAG AAT TTC GTG GCC ATA CCA CGT GAC TAC	1127	
360	K M L Q D E N F V A I P R D Y	374	
1128	TTC AAG GAC ACA GGA AAG AAC CCC AAG GAC ATC ACA GCC ACC TCC	1172	
375	F K D T G K N P K D I T A T S	389	
1173	AAT CTC TGA	1217	
390	N L *	404	

Fig. 1. Major intrinsic protein (MIP) superfamily. (A) Red letter: Characteristic part of MIP Protein 1, (B) Yellow letter: Characteristic part of MIP Protein 2.

Table 1. Comparison of *aquaporin* sequence between Human *aquaporin-4* and gastropoda *aquaporin*

	First NPA box			Second NPA box		
NP_001304313 (Human Aquaporin-4)	HISGG-HI	NPA	VTVAMVC	NYTGASM	NPA	RS-GPAV
SCH_Cs_Uni_22788	HVSGG-HI	NPA	VTIAMAV	NFTGASM	NPS	RTMGSAV
AHL29026.1	HISGG-HV	NPA	VTIAALF	PYTGASL	NPA	RSFGPAL
AHL29028.1	HISGG-HV	NPA	VTIAALF	PYTRASL	NPA	RSFGPAL
XP_005111061.2	HVSGG-HI	NPA	VSIAMAV	QYTGSSM	NPS	RSLGSAV
AOS89753.1	HVSGG-HI	NPA	VSIAMAV	NYTGSSM	NPS	RSLGSAV
RUS77374.1	HVSGG-HI	NPA	VTIAMAV	QYTGSSM	NPS	RSLGSAV
XP_009050122.1	HVSGG-HV	NPA	VTVAMTV	SFTGASM	NPA	RSLGSAV
AYH91719.1	HVSGG-HI	NPA	VTIAMAV	KFTGCGI	NPS	RSLGSAV
AJF12150.1	HISGG-HF	NPA	VSLGLLA	TLTGSSM	NPA	RSLGSAV
XP_011446842.1	HISGG-HF	NPA	VSLGLLA	TLTGSSM	NPA	RSLGSAV
XP_022345267.1	HISGG-HF	NPA	VSLGLLA	SLTGSSM	NPA	RSLGSSV
XP_021364227.1	HVSGG-HF	NPA	VSVGMAV	HFTGASM	NPS	RSLGSAI
XP_014767491.1	HISGG-HI	NPA	VTIAMAI	HLTGSSI	NPA	RSLGSAA
AUJ87723.1	RINGPPQM	NPA	ITLAMLC	NCHCLSA	CLP	ICQLNVS
AUJ87719.1	RINGPPHM	NPA	ITLAMLC	SEQQE--	---	-----
AUJ87726.1	RINGPPQM	NPA	ITLAMLC	-----	---	-----
XP_013086008.1	TVSGG-HV	NPA	ISLGFLI	QISGGCM	NPI	RSLGPAV

분이 도출되었다 (Fig. 1). Figure 1에서 빨간색으로 표기된 부분은 *AQP*의 전형적인 2개의 NPA Box 영역을 보여주고 있다. 또한 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)를 통하여 6개의 transmembrane helix 영역을 확인할 수 있었다(Fig. 2.) 나팔고둥을 포함한 17개의 복족류 단백질 서열을 비교 해 본 결과, 평균 260 개의 아미노산으로 구성되어 있었으며, 서열이 매우 유사함을 확인할 수 있었다. 3D 구조 분석결과 3D 구조 분석결과 6개의 alpha-helix 구조와 1개의 beta-strand 구조로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한 Phyre2 프로그램을 이용하여 인간의 *AQP-4* 서열 (NP_001304313.1) 과 나팔고둥의 *AQP* 서열의 단백질 3차 구조를 비교하였을 때 그 구조가 매우 유사함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 인간 *AQP-4*는 체내에 수은이 많이 축적될 경우 발현되는 것으로 알려져 있어, 아미노산 서열 및 3차구조가 유사한 나팔고둥의 *AQP* 또한 수은함량과 연관되어

있을 것이라 추정 할 수 있으나 현재까지 나팔고둥을 포함한 어떠한 연체동물에서도 관련 연구가 진행된 바 없어 후속 연구를 통해 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

2. Multiple alignment 및 phylogenogram 분석

나팔고둥 *AQP* 서열 포함 17종의 *AQP* 아미노산 서열 데이터 세트의 ClustalX2 분석결과 연체동물문 특이적패턴 유사도를 확인하였으며 (Fig. 4), MEGA X 프로그램을 이용한 Maximum Likelihood phylogenogram 분석 결과 크게 3 개의 group, 11개 목으로 분류됨을 확인할 수 있었다. 나팔고둥은 최근 생태계 교란종으로 지정된 왕우렁이 (*Pomacea canaliculata*)가 속한 사과우렁이과 (Ampullariidae)와 같은 그룹으로 묶였으며 (방 와 조, 2008), 군소류의 Aplysiidae의 *Aplysia californica*, Plakobranchidae의 *Elysia choloretica*로 각각 나뉘었고, 바다달팽이 종류인 Lottiidae의

Molecular phylogenetics of *Charonia sauliae* inferred from *aquaporin* gene

273		ATG GAA GGG ATG TAC ATC TAC ACT GCT AAC AAA GTG	317
90		M E G M Y I Y T A N K V	104
318	GAA GCT ATT CGG AAA GGC GAT CAT GGT AAC GGT GGA GAA AAA TCG	362	
105	E A I R K G D H G N G G E K S	119	
363	TAC AAG ATC ATC GAT GTC AAG GAG CTG AAA TGC	407	
120	Y K I I D V K E L K C	134	
408	CTG GCG TTC TGG	452	
135	L A F W	149	
408	CGT GCG GTT TTT GCG GAG TTT TTG GCC CAA GTT CTC TTC GTG TTC	452	
135	R A V F A E F L A Q V L F V F	149	
453	CTG GGG GGA TGC	497	
150	L G G C S V M F T S G S A	164	
498	ATT CAG ATC GCC CTG GGG TTT GGA CTG TCC ATC ATG GCG CTG ATT	542	
165	I Q I A L G F G L S I M A L I	179	
543	CAA ATG ATC GGG CAC GTG	587	
180	Q M I G H V S G G H I N P A V	194	
588	ACC ATA GCA ATG GCT GTG ACC TTA AAC ATC	632	
195	T I A M A V T L N I	209	
633	TCC ATA GCG CGT GCT	632	
195	S I A R A	209	
633	GTC CTC TAC GTC GTC GCT CAG GTC GTT GGT GGC ATC ACT GGT GGT	677	
210	V L Y V V A Q V V G G I T G G	224	
678	TTC ATT TTG	722	
225	F I L K G V T P D S L H S N L	239	
723	GCA GTG ACG GCC ATC AAC ACG	767	
240	A V T A I N T	254	
768	AAC CTG ACG GTG GGT CAG GGC CTG	767	
240	N L T V G Q G L	254	
768	GGG GTG GAG ATC ATT CTC ACC TTC GTC CTG GTG TTC GTC ATC TTC	812	
255	G V E I I L T F V L V F V I F	269	
813	GGC ACA ACT GAC GCC AAC CGC CCC TCC TTC GGC	857	
270	G T T D A N R P S F G	284	
858	AGC CCC GCC CTC	857	
270	S P A L	284	
858	CTC ATT GGC CTC ACT GTG ACA CTG CTG CAT TGT GCT GGG GTG AAT	902	
285	L I G L T V T L L H C A G V N	299	
903	TTC ACG GGA GCC	947	
300	F T G A S M N P S R T M G S A	314	
948	GTG GCC TCG GAC AGT TAC GTG GAC	992	
315	V A S D S Y V D	329	
948	ATC TGG GTG TAC TGG GTG GGA	992	
315	I W V Y W V G	329	
993	CCC ATC GTG GGA GGT ATT GCA GCA GCC CTC GCC TAC ACA CTG CTT	1037	
330	P I V G G I A A A L A Y T L L	344	
1038	TTC AGC CCG TAC AGA GGA ATG CTC TCT ATG GAT GAT GCT GTG CAG	1082	
345	F S P Y R G M L S M D D A V Q	359	
1083	AAA ATG CTT CAA GAC GAG AAT TTC GTG GCC ATA CCA CGT GAC TAC	1127	
360	K M L Q D E N F V A I P R D Y	374	
1128	TTC AAG GAC ACA GGA AAG AAC CCC AAG GAC ATC ACA GCC ACC TCC	1172	
375	F K D T G K N P K D I T A T S	389	
1173	AAT CTC TGA	1217	
390	N L *	404	

Fig. 2. Nucleotide and deduced the AQP amino acid sequence of *C. sauliae*. (A) red box = prediction of transmembrane helices in proteins (B) "*" indicate termination codon.

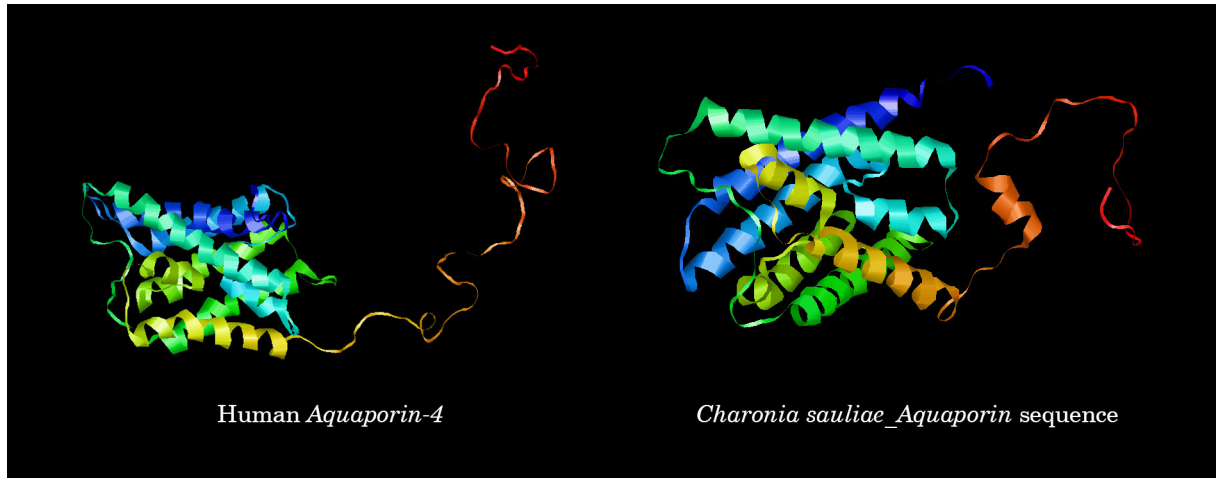


Fig. 3. The predicted three dimensional structure of aquaporin sequence by Phyre2 with Human *Aquaporin-4* and *Charonia sauliae Aquaporin*.

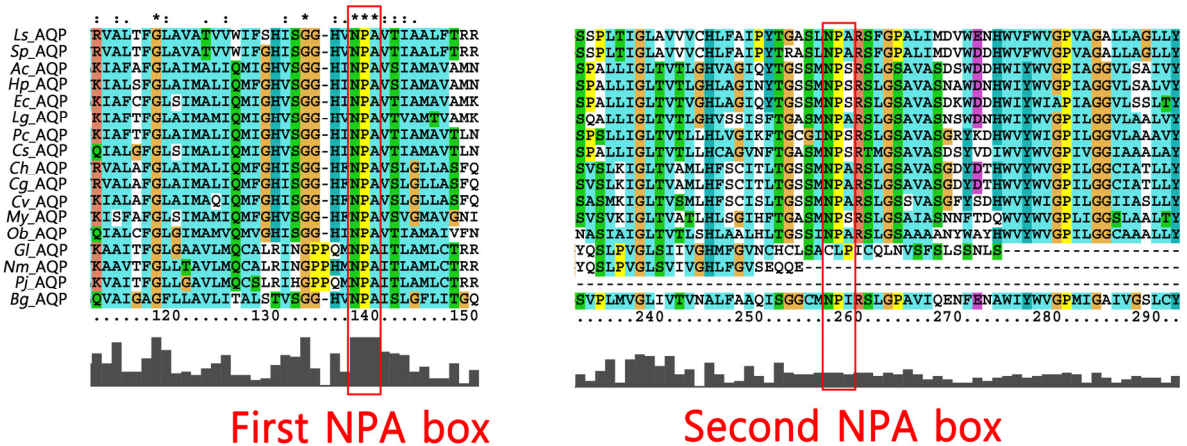


Fig. 4. Multiple sequence alignment result of *C. sauliae* and 16 AQP protein reference sequences. There are First NPA box and second NPA box. The analysis was performed by clustalX2 using representative amino acid sequences from *Octopus bimaculoides* (XP_014767491.1), *Aplysia californica* (XP_005111061.2), *Helix pomatia* (AOS89753.1), *Elysia chlorotica* (RUS77374.1), *Pomacea canaliculata* (AYH91719.1), *Charonia sauliae* (SCH_Cs_Uni_22788), *Lottia gigantea* (XP_009050122.1), *Biomphalaria glabrata* (XP_013086008.1), *Lymnaea stagnalis* (AHL29026.1), *Stagnicola palustris* (AHL29028.1), *Pleuropoma jana* (AUJ87726.1), *Georissa laseroni* (AUJ87723.1), *Nerita melanotragus* (AUJ87719.1), *Mizuhopecten yessoensis* (XP_021364227.1), *Crassosrea virginica* (XP_022345267.1), *Crassosrea hongkongensis* (AJF12150.1), *Crassosrea gigas* (XP_011446842.1)

Lottia gigantea, Planorbidae의 *Biomphalaria glabrata*, 물달팽이 Lymnaeidae의 *Lymnaea stagnalis*, *Stagnicola palustris* 로 grouping 됨을 확인하였다. 그리고 Helicinidae 과의 *Pleuropoma jana*, *Georissa laseroni*, *Nerita melanotragus* 으로 나뉘었고, Helicidae 의 식용달팽이로 많이 알려지고, 에스카르그로도 알려진 *Helix pomatia*, 로 계통적으로 분류되는 것을 확인할 수 있었다. Pectinidae (가리비과) 의 큰가리비인 *Mizuhopecten yessoensis*, Ostreidae (굴과) 인 *Crassostrea hongkongensis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*

는 Bivalvia 그룹에 속하고, Octopodidae 인 *Octopus bimaculoides* 가 Cephalopoda 그룹에 속하는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 일부 몇 종의 AQP 서열은 First NPA box 와 Second NPA box 에 일치되지 않았는데, 이는 아미노산 alanine 과 serine 사이의 mistranslation 때문일 것으로 추측 될 뿐 분자생물학적 분석이 더 필요할 것으로 생각된다 (Guo et al., 2017). 향후 더 많은 연체동물들의 AQP 서열이 발굴, 축적된다면 계통분류학적 체계적인 연구가 더 원활하게 진행될 수 있을 것이라 판단된다. 또한 계통분류학적 관계 구명 뿐 아

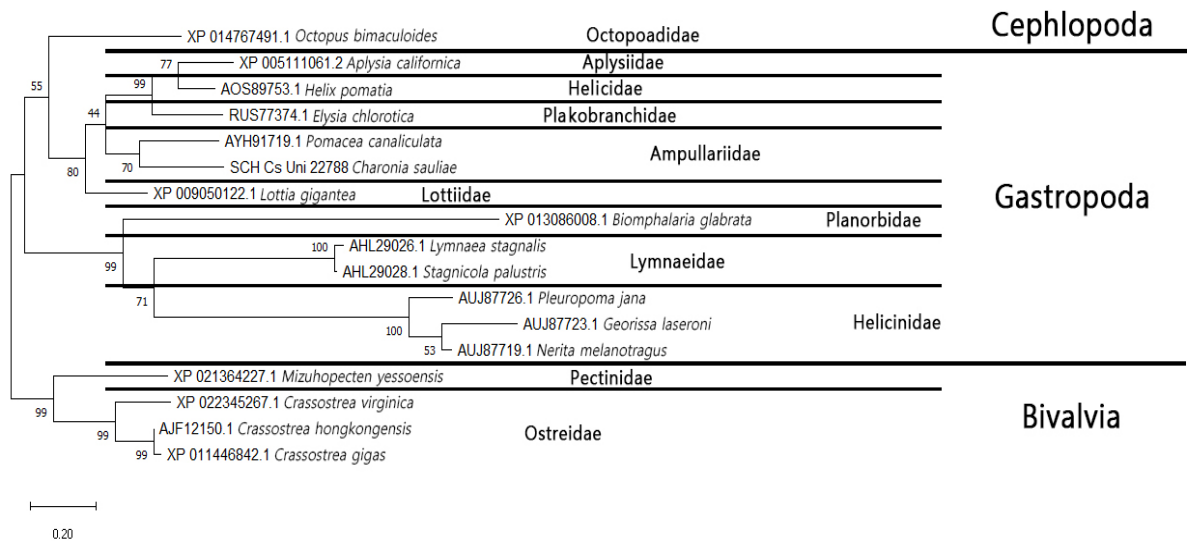


Fig. 5. The result of phylogenetic analysis on evolutionary relationships. It was divided into big three groups (Cephlopoda, Gastropoda, Bivalvia). In Gastropoda, there are 7 families (Aplysiidae, Helicidae, Plakobranchidae, Ampullariidae, Lottiidae, Planorbidae, Lymnaeidae, Helicinidae). In Bivalvia, there are 2 families (Pectinidae, Ostreidae).

나라 다양한 부분에 있어서 *AQP* 에 관한 자료와 연구가 축적되고 있어서, 여러가지 다양한 연구가 수행 될 수 있는 기반이 곧 갖춰질 것이라 판단된다.

되었습니다.

요 약

나팔고둥은 멸종위기 1급인 동물로 현재까지 양식 및 종묘 생산 관련 연구 이외에는 연구가 잘 되어있지 않아 유전자원 확보가 필요한 상황이다. 본 연구에서는 나팔고둥의 전사체 연구 결과를 활용하여 aquaporin (*AQP*) 서열을 추출하였다. 나팔고둥 (*Charonia sauliae*) *AQP* 유전자는 897 bp의 염기서열로 구성되어 있으며, 299 개의 아미노산으로 이루어져 있었다. 인간 *AQP-4* 아미노산서열 및 단백질 3차구조가 매우 유사하며, conserved domain 확인 결과 6개의 transmembrane helix 영역을 포함하고 있었다. BLAST 결과를 토대로 모은 16 종 *AQP* 서열과 비교한 결과 나팔고둥의 *AQP* 서열은 Ampullariidae 에 속하는 *Pomacea canaliculata* 와 같은 그룹으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다. 나팔고둥의 *AQP* 서열은 다른 연체동물들의 *AQP* 서열과 마찬가지로 계통분류적 연구에 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

사 사

이 논문은 교육부 (한국연구재단, NRF-2017R1D1A3B06034971) 과 2019학년도 순천향대학교 교수 연구년제의 지원으로 수행

REFERENCES

- Abir-Awan, M., Kitchen, P., Salman, M.M., Conner, M.T., Conner, A.C., and Bill, R.M. (2019) Inhibitors of Mammalian Aquaporin Water Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(1589): 1-22.
- Agre, P. (2006) The Aquaporin Water Channels. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **3**: 5-15.
- Bang, I.S., Han, Y.S., Lee, J.-S., and Lee, Y.S. (2010) Current Status of Genome Research in Phylum Mollusks. *The Korean Journal of Malacology*, **26**: 317-326.
- Colgana, D.J., and Santosa, R.P. (2018) A phylogenetic classification of gastropod aquaporins. *Marine Genomics*, **38**: 59-65.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., and Regev, A. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.*, **8**: 1494-1512.
- Jang, H.-Y., Lee, J.-E., Jang, Y.-S., and Ahn, S.-J. (2011) Conflicting Physiological Characteristics and Aquaporin (JcPIP2) Expression of *Jatropha curcas* L.) as a Bio-energy Crop under Salt and

- Drought Stresses. *Korean Journal of Crop Science*, **56**: 183-191.
- Jin, J.-E., Kang, S.-H., Kim, B.-H., Lim, D.-J., Lee, C.-H., Oh, D.-H., Jung, M.-S., and Kim, H.-G. (2006) The Study of Distribution and Expression of Water Channel Proteins (Aquaporins) in the Rat Eustachian Tube. *Korean Journal of Otolaryngology*, **49**: 598-603.
- Kang, S.W., Park, S.Y., Hwang, H.J., Chung, J.M., Sang, M.K., Min, H.R., Park, J.E., Cho, H.C., Patnaik, B.B., and Lee, Y.S. (2019) PANM DB ver 3.0 : An update of the bioinformatics database for annotation of large datasets from sequencing of species under Protostomia clade. *The Korean Journal of Malacology*, **35**: 73-75.
- Kang, S.W., Park, S.Y., Patnaik, B.B., Hwang, H.J., Chung, J.M., Song, D.K., Park, Y.-S., Lee, J.S., Han, Y.S., Park, H.S., and Lee, Y.S. (2016) The Protostome database (PANM-DB): Version 2.0 release with updated sequences. *The Korean Journal of Malacology*, **32**: 185-188.
- Kang, S.W., Park, S.Y., Patnaik, B.B., Hwang, H.J., Kim, C., Kim, S., Lee, J.S., Han, Y.S., and Lee, Y.S. (2015) Construction of PANM Database (Protostome DB) for rapid annotation of NGS data in Mollusks. *The Korean Journal of Malacology*, **31**: 243-247.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, **10**(6): 845-858.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.*, **35**: 1547-1549.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- Li, C., and Wang, W. (2017) Molecular Biology of Aquaporins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **969**: 1-34.
- Lu, H.A.J. (2017) Diabetes Insipidus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **969**: 213-225.
- Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Technical Notes*, **171**: 10-12.
- Min Guo., Yeeting E. Chong., Ryan Shapiro., Kirk Beebe., Xiang-Lei Yang., and Paul Schimmel (2010) Paradox of mistranslation of serine for alanine caused by AlaRS recognition dilemma. *Nature*, **462**: 808-812.
- NA, J., and JN, F. (2011) Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)[Software].
- Oh, D.-S., Lu, H., and Han, K.-H. (2011) Identification and Characterization of the Aquaporin Gene AQP4 in a Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *The Korean Journal of Microbiology*, **47**(4): 295-301.
- Park, N.C., Young Soo Park, Oh, G.S., and Jung, J.S. (2000) Molecular Identification and Distribution of Aquaporins in Human and Rat Testes. *Korean Journal of Fertility and Sterility*, **27**: 133-144.
- Pertea, G., Huang, X., Liang, F., Antonescu, V., Sultana, R., Karamycheva, S., Lee, Y., White, J., Cheung, F., Parvizi, B., Tsai, J., and Quackenbush, J. (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics application note*, **19**: 651-652.
- Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *The European Molecular Biology Open Software Suite*, **16**(6): 276-277.
- Silva, I.V.d., and Soveral, G. (2017) Aquaporins in Obesity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **969**: 227-238.
- Verkman, A.S. (2017) Aquaporins at a glance. *Journal of Cell Science*, **124**: 2107-2112.
- 강경호, 황성일, 김재민, 임상민, Brozozowska, R., 선승천, LiangLiang, Z., 박용민, 김현중, 김창봉, 이재영, 허은경 와 노평우. (2009) 나팔고둥의 대량 인공종묘생산 기법 개발 연구보고서. 188pp. 수산연구개발사업
- 국립생물자원관 (2012) 한국의 멸종위기 야생동·식물 적색자료 집 (연체동물) 107pp. 국립생물자원관.
- 김수완, 이종은, 염충호, 나명윤, 김남호 와 최기철. (2001) 신장에서 Aquaporin 수분 통로의 생리적 및 병태생리적 기능. *대한신장학회지*, **20**(5): 785-801.
- 방상원 와 조미경. (2008) 친환경농법용 외래 왕우렁이의 생태위해성 및 위해성 관리의 필요성. *Korean Journal of Environment Biology*, **26**(3): 129-137.
- 이준상 와 민덕기. (2002) 한국산 연체동물 목록. *Korean Journal of Malacology*, **18**(2): 93-217.
- 조혜정, 이창배 와 안규윤. (2008) 임신 흰쥐 신장에서 Aquaporin-1, 2, 3 단백질발현의 변화. *The Korean Journal of Anatomy*, **41**(4): 289-296.

