

코끼리조개 (*Panopea japonica*) 의 Metallothionein 유전자를 활용한 분자계통학적 연구

송대권, 황희주, 정종민, 상민규, 박지은, 정준양, 강세원¹, 남명모², 이종대³, 박홍석⁴, 조용훈⁵, 이준상⁶, 박소영⁷, 이용석

순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과, ¹한국생명공학연구원 생물자원센터, ²국립수산과학원 중앙내수면연구소, ³순천향대학교 자연과학대학 환경보건학과, ⁴㈜지앤시바이오, ⁵전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부, ⁶순천향대학교 기초과학연구소, ⁷국립낙동강생물자원관 다양성연구팀

Molecular Phylogenetics Analysis of geoduck (*Panopea japonica*) apply Metallothionein gene

Dae Kwon Song, Hee-Ju Hwang, Jong Min Chung, Jie Eun Park, Min Kyu Sang, Jun Yang Jeong, Se Won Kang¹, Myung-Mo Nam², Jong Dae Lee³, Hong seog Park⁴, Yong Hun Jo⁵, Jun Sang Lee⁶, So Young Park⁷ and Yong Seok Lee

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

¹Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongeup, Jeonbuk 56212, Korea

²National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

³Department of Environmental Health Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungcheongnam-do, Korea

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

⁵Department of Applied Biology, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture (IEFA), College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

⁶Institute for Basic Sciences, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 31538, Korea

⁷Biodiversity Research team, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, Gyeongbuk, 37242, Korea

ABSTRACT

Metallothionein (MT) plays an important role in protecting cells from harmful substances. MT is a protein with less than seven kDa with large amounts of cysteine residues, which have been studied as a phylogenetic biomarker with unique patterns not only in vertebrates but also in Mollusca. *Panopea japonica* is a giant clam that lives on the coast of the East Sea in Korea. Nevertheless, little research has been done on the genetic resources of *P. japonica*, and the amount of genetic information registered in the NCBI is very limited. In this study, a metallothionein sequence consisting of 74 amino acids with 222 bp nucleotide was obtained from the transcriptome data by using the GS FLX 454 platform. *In Silico* analysis of PjMT gene was conducted with ClustalX and MEGAX programs. With the previously reported Mollusca MT data, we verified the PjMT sequence as a potential candidate for molecular marker, and also confirmed that PjMT was clustered in Myoida order.

Key words : Metallothionein, *Panopea japonica*, geoduck, Phylogenetic analysis

Received: June 22, 2020; Revised: June 27, 2020; Accepted: June 29, 2020

Corresponding author: Yong Seok Lee

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

Corresponding author: So Young Park

Tel: +82 (54) 530-0832, e-mail: cindysory@nnibr.re.kr
1225-3480/24761

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.

서론

본 연구의 대상 종인 코끼리조개 (*Panopea japonica* A. Adams, 1850) 는 연체동물문 (Mollusca) 이매패강 (Bivalvia) 죽합목 (Adapedonta) 족사부착쇄조개과 (Hiatellidae) 코끼리조개속 (*Panopea*) 에 속하는 대형조개로 경북 죽변에서 강원 연안에 이르는 비교적 수온이 낮은 동해 중·북부와 캄차카, 사할린, 일본 북해도 등에서 서식한다 (Lee *et al.*, 1998;

Straus *et al.*, 2008). 이동성이 거의 없고 수심이 깊은 지역에 잠입 서식하는 생태적 특징 때문에 발견이 어려웠으나 (국립생물자원관; <https://species.nibr.go.kr/index.do>), 1986년 경부터 분사식 고압 펌프를 사용한 채취가 시작되면서 수산 식량 자원으로의 가치가 재평가되기 시작하였다 (Lee and Rho, 1997). 우럭조개와의 형태적 유사성으로 인한 종의 정확한 분류와 최근 이식공유의 대상으로 논의되고 있는 DSI (Digital Sequence Information) 에의 선제적 대응을 위해 유전학적 연구가 매우 시급하다.

말의 신장 피질에서 처음 발견된 Metallothionein (MT) 유전자는 (Margoshes and Vallee, 1957), 1974년 Olafson과 Thompson에 의해 수생 생물에서 카드뮴 결합 단백질로 처음으로 밝혀졌다 (Olafson and Thompson, 1974). MT는 60개의 아미노산에서 20개의 시스테인 잔기를 갖는 7 kDa미만의 저분자 단백질로 (Capasso *et al.*, 2003), 다량의 시스테인 (Cysteine) 함량과 방향족 잔기의 부재 및 시스테인 (Cysteiny) 잔기의 일정한 배열을 갖고 있는 것이 특징적이다. MT는 금속과 결합한 이후에 기능적 구조를 획득하여 금속 이온의 성질과 결합된 금속의 양에 따라 구조가 변화하는데 (Riek *et al.*, 1999; Ziller and Fraissinet-Tachet, 2018), MT 구조를 구성하고 있는 thionein이 금속과 화학적인 결합을 일으키도록 유도하고 2가 양이온과 결합하여 (Jenny *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018) 유해물질로부터 세포를 보호하는 역할을 하며 특히 카드뮴, 아연, 수은 및 구리를 착화 시켜 중금속의 항상성과 해독에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Dziegiel, 2004; Sauge-Merle *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2019). 이에 MT는 중금속에 의하여 유도되는 특이적인 단백질로서 생화학적 지표 관련 연구가 많이 진행되었다 (Baek *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016).

1999년 연체동물을 대상으로 한 특이적인 패턴이 (CxCx (3) -CTGx (3) -CxCx (3) -CxCK) *Mytilus*를 대상으로 한 연구에서 확인되면서 표현형적 특징에 기초한 분류 가이드라인이 제공되었고 (Binz and Kagi, 1999), 분자 계통학적 연구가 활발히 진행되기 시작하였다. 특히, 지난 2018년 본 연구진의 연체동물문 MT 유전자 계통분류 연구를 통해 180개의 연체동물의 MT 서열과 재정리된 58개의 대표 서열의 데이터베이스가 구축되면서 (<http://bioinfo.sch.ac.kr/metallothionein/>) (Chung *et al.*, 2018) MT 유전자 활용 계통분류에 기여하고 있다.

현재, NCBI에는 18S, 28S ribosomal RNA 유전자와 미토콘드리아 COI 유전자 등 8건이 등록되어 있을 뿐 그 외 다른 유전자원에 대한 연구는 전무하다. 이에 본 연구를 통해 코끼리조개의 MT 서열을 확인하고 연체동물문 내의 유연관계를 확인하여 대상 종의 분자생물학적 기초 자료를 확보하

고자 하였다.

재료 및 방법

1. cDNA library 구축 및 염기서열 분석

확보된 코끼리조개 (*P. japonica*) 암·수 개체의 gonad에서 Trizol reagent를 사용하여 total RNA를 추출한 후, Agilent사의 bioanalyzer 2100 expert Eukaryote Total RNA Nano Chip을 사용하여 quality를 확인하였다. mRNA purification kit을 사용하여 mRNA만 정제한 뒤에 cDNA를 합성하고 cDNA library를 구축하였다. 제작된 cDNA library는 Agilent사의 bioanalyzer 2111 expert High Sensitivity DNA Assay를 사용하여 quality를 확인하였으며, GS FLX 454 platform을 사용하여 염기서열 분석을 실시하였다.

2. Transcriptome data의 생물정보학적 분석 및 Metallothionein 서열의 확보

Roche Newbler SFF tools (version 2.0.01.14) 를 사용하여 MID barcode에 따라 standard flowgram format (SFF) files로 분리하여 adaptor sequence를 제거하고, GS assembler (version 2.5.3) 로 assembly를 진행하여 scaffold된 contig를 확보하였다 (Fu and Peterson, 2012). 확보된 contig 서열들을 PANM DB (ver. 3.0) (Kang *et al.*, 2019) 를 이용한 annotation 결과에서 MT 서열을 포함하고 있는 contig를 추출하고, EMBOSS package중 하나인 sixpack program을 사용하여 MT로 예측되는 아미노산 서열들을 확인하였다 (Madeira *et al.*, 2019). 확인된 서열들에 대한 재검증을 위해 NCBI nr database와 PANM database에서 BLAST를 수행하여, Mollusca MT 패턴인 (CxCx (3) -CTGx (3) -CxCx (3) -CxCK)과의 일치 여부를 비교하는 것으로 서열을 재검증 하였다.

3. Multiple alignment 및 phylogenogram 분석

Chung *et al.*, 2018 에 의하여 재정리된 연체동물의 MT 서열 database (<http://bioinfo.sch.ac.kr/metallothionein/>) 에서 코끼리조개 근연종의 MT서열을 확보한 후 multi FASTA format으로 amino acid 서열을 정리하였다. 정리된 mFASTA 서열은 MEGAX (Kumar *et al.*, 2018; Russo and Selvatti, 2018) 와 ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) 를 사용하여 multiple alignment를 수행한 후 Maximum Likelihood Estimation 방법 (Wilks, 1938) 으로 (bootstrap values = 500) molecular phylogenetic analysis를 수행하여 dendrogram 결과를 얻었다.

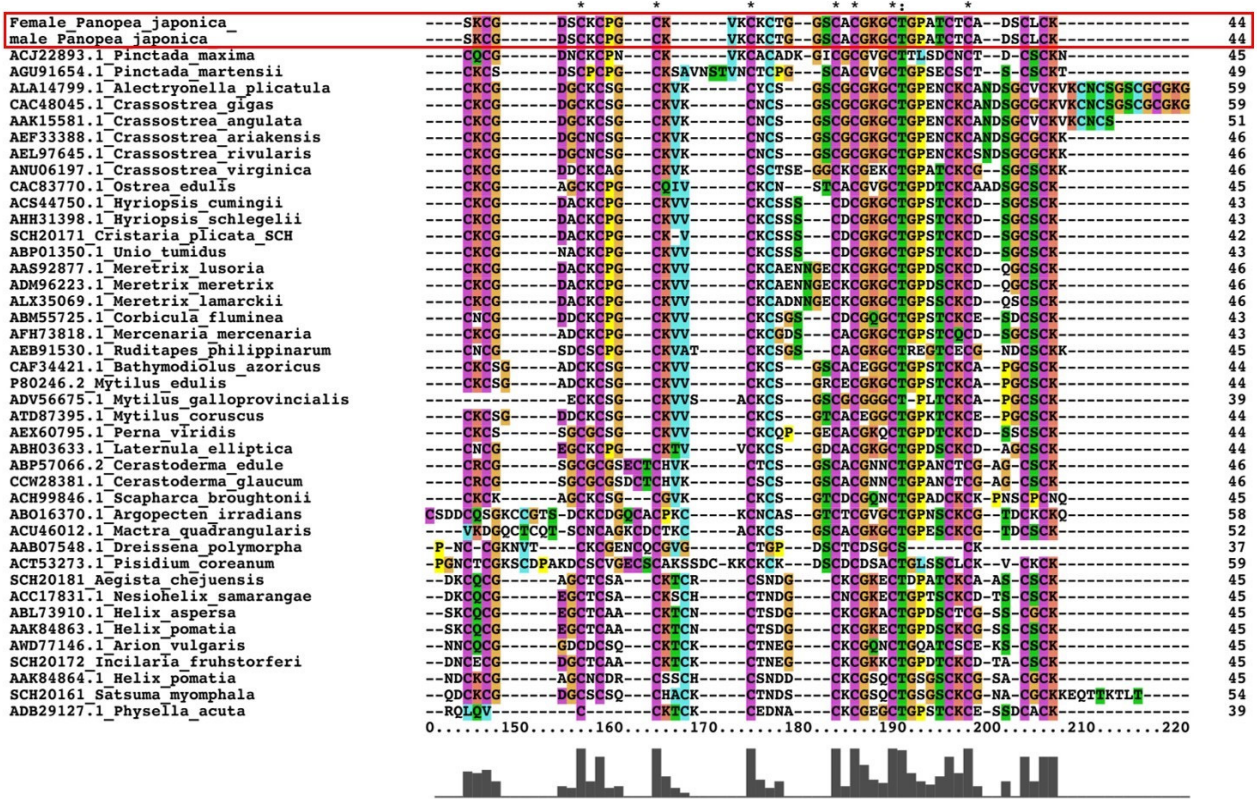


Fig. 5. Multiple sequence alignment of 49 reference MT protein sequence included *P. japonica*.

15개의 Group으로 분류되는 것을 확인하였다. 크게는 Gastropoda Class에 속하는 5개의 order와, Bivalvia Class에 속하는 10개의 Order로 확인되었다. 본 연구의 대상종인 코끼리조개 (*P. japonica*) 는 Bivalvia Class의 Group G에 속하고 있었으며, 대형 해수 패류인 *Pinctada maxima*, *Pinctada martensii*, *Argopecten irradians* 와 높은 유연관계를 나타내고 있었다 (Fig. 6). 이는 환경이나 특징으로 인하여 발생할 수 있는 분류학적인 차이를 MT 서열을 이용하여 확인할 수 있음을 시사한다고 할 수 있다 (Lozupone and Knight, 2005).

본 연구 결과를 통해 확보된 코끼리조개의 MT 서열은 바이오 경제 시대의 핵심인 유용생물자원의 하나로 국가 생물산업에 활용할 수 있을 것으로 기대되며, 분자계통분류학적 자료의 하나로 연체동물문의 MT 서열 활용 분자계통분류의 신뢰도를 높여, 관련 연구가 활발해지는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

중금속과 같은 세포 외 유해물질에 의해 발현이 유도되는 것

으로 알려진 metallothionein 유전자는 분자계통분류학적 마커로 활용되고 있다. 본 연구의 대상 종인 코끼리조개 (*P. japonica*) 는 고급수산물로 국내외에서 소비가 이루어지는 종으로, 유사 종과의 종 분류와 생물주권 확립을 위한 관련 자료 확보가 절실한 종이다. 222 bp 74개의 아미노산으로 구성되어 있는 코끼리조개 metallothionein 유전자는, 연체동물의 특징적인 MT 패턴인 CxCx (3) -CTGx (3) -CxCx (3) -CxCxCK 와 일치하였다. 선행연구 되어진 Mollusca 49종의 MT 서열과 함께 구축한 data set을 multiple alignment 후, Maximum Likelihood Estimation 방법으로 dendrogram을 작성한 결과, 15개의 Order로 나누어지는 Group을 확인하였고 그 유연관계를 파악할 수 있었다. 본 연구의 결과는 MT 유전자 활용 분자계통분류 연구의 신뢰도를 증대시키고 종 분별의 주요 마커로서의 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 환경부의 재원으로 교육부 (한국연구재단, NRF-2017R1D1A3B06034971) 및 순천향대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

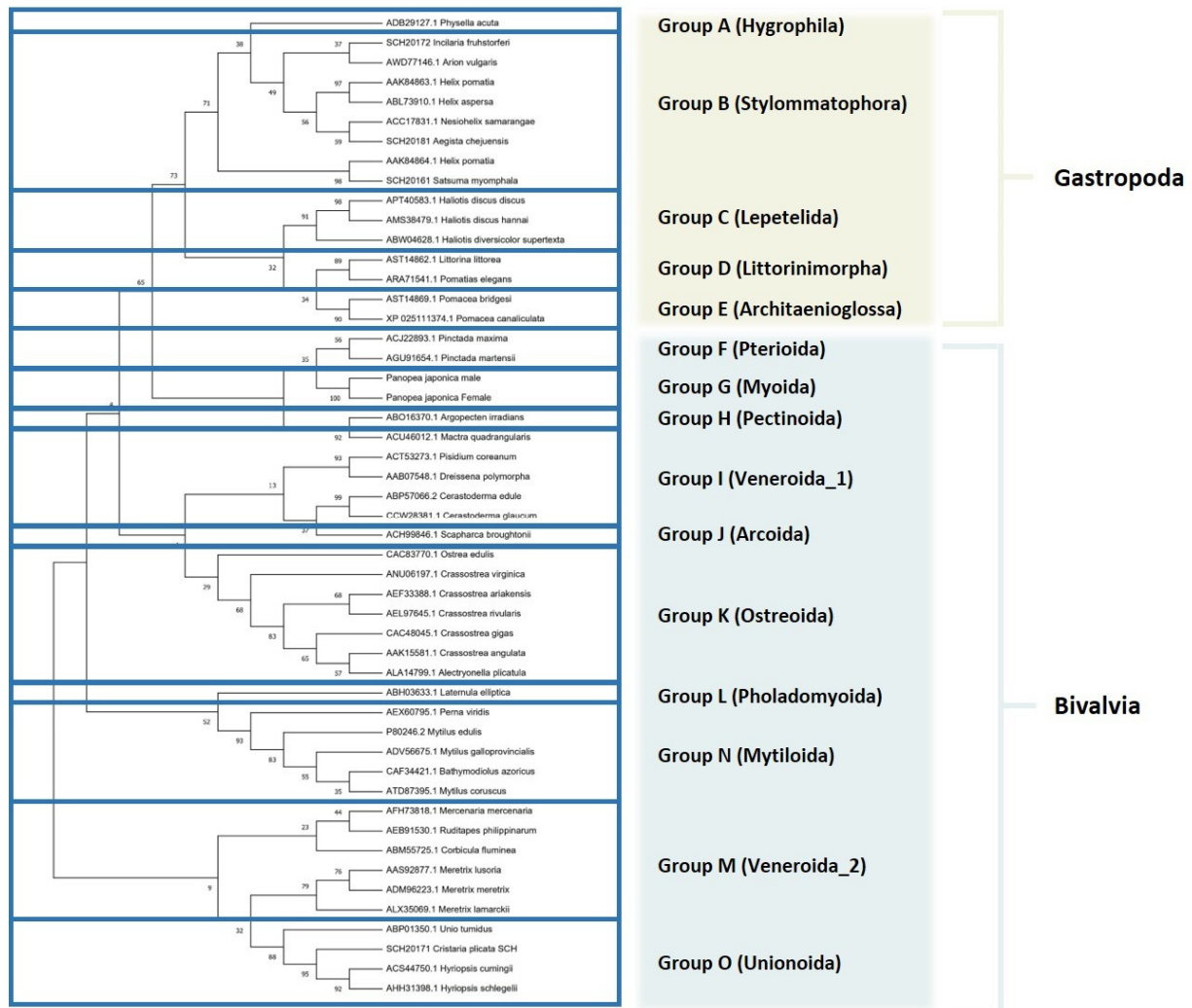


Fig. 6. Molecular phylogenetic analysis for hierarchical relationship between classification. The evolutionary history was deduced by using the Maximum Likelihood method and JTT matrix-based mode (Jones *et al.*, 1992). The bootstrap consensus tree deduced from 500 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxonomy analyzed (Felsenstein, 1985). Tree branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of cloned trees in which the related taxonomy clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown to tree branches (Felsenstein, 1985). Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Joining and NJ method based on a simple model of sequence data algorithm to a matrix of pairwise distances estimated exercising the JTT model, and then selecting the topology with excellent log likelihood value. This analysis involved 50 amino acid sequences. There were a total of 287 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

REFERENCE

Baek, M.-K., Lee, J.-S., Kang, S.W., Lee, J.-B., Kang, H.-J., Jo, Y.H., Noh, M.-Y., Han, Y.s., Choi, S.-H., Chae, S.-H., Park, H.-S., Lee, J.-S., and Lee, Y.S. (2009) Phylogenetic Analysis based on Metallothionein Gene Sequence of an Indigenous Species *Pisidium (Neopisidium) coreanum* in Korea.

The Korean Journal of Malacology, **25**: 153-160.
 Binz, P.-A., and Kagi, J.H.R. (1999) Metallothionein: Molecular evolution and classification. In: Klaassen CD (ed) Metallothionein IV. Birkhauser Basel: 7-13.
 Capasso, C., Carginale, V., Scudiero, R., Crescenzi, O., Spadaccini, R., Temussi, P.A., and Parisi, E. (2003) Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature. *J. Mol.*

- Evol.* 57 Suppl., 1: S250-257.
- Chung, J.M., Hwang, H.J., Sang, M.K., Min, H.R., Park, J.E., Cho, H.C., Kang, S.W., Park, S.Y., Kim, W.J., Jung, K.Y., Choi, C.Y., Han, Y.S., Lee, J.S., and Lee, Y.S. (2018) Reanalysis of molluscan metallothionein genes registered in NCBI. *The Korean Journal of Malacology*, **34**: 157-167.
- Dziegiel, P. (2004) Expression of Metallothioneins in Tumor Cells. *Pol. J. Pathol.*, **55**: 3-12.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.
- Fu, Y.B., and Peterson, G.W. (2012) Developing genomic resources in two *Linum* species via 454 pyrosequencing and genomic reduction. *Mol. Ecol. Resour.*, **12**: 492-500.
- Gu, B., Liang, W., Yang, T., Hu, Z., and Shen, H. (2019) Metallothionein, hemocyte status and superoxide dismutase/aspartate aminotransferase activity are sensitive biomarkers of cadmium stress in *Onchidium reevesii*. *Aquatic Toxicology*, **215**: 105-284.
- Jenny, M.J., Payton, S.L., Baltzegar, D.A., and Lozier, J.D. (2016) Phylogenetic Analysis of Molluscan Metallothioneins: Evolutionary Insight from *Crassostrea virginica*. *Journal of Molecular Evolution*, **83**: 110-125.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.*, **8**: 275-282.
- 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.
- 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., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, T., and Higgins, D. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- Lee, C.S., Baik, K.K., and Hong, K.E. (1998) Ecological Studies on the Habitat of Geoduck Clam, *Panopea japonica*. *Journal of Aquaculture*, **11**: 105-111.
- Lee, C.S., and Rho, S. (1997) Studies on the Artificial Seeding Production of Geoduck Clam, *Panopea japonica* II Development of Egg and Larvae. *Journal of Aquaculture*, **10**: 25-32.
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 8228-8235.
- Madeira, F., Park, Y.m., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., and Lopez, R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, **47**: W636-W641.
- Margoshes, M., and Vallee, B.L. (1957) A Cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, **79**: 4813-4814.
- Olafson, R.W., and Thompson, J.A.J. (1974) Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Marine Biology*, **28**: 83-86.
- Park, J.E., Cho, H., Hwang, H.-J., Chung, J., Sang, M., Min, H., Kang, S.W., Park, S., Patnaik, B.B., Kim, W., Han, Y., Lee, J., and Lee, Y.S. (2018) Molecular Phylogenetics of Korean endemic land snail, *Aegista chejuensis* inferred from Metallothionein gene sequence. *The Korean Journal of Malacology*, **34**: 59-65.
- Riek, R., Prêchur, B., Wang, Y., Mackay, E.A., Wider, G., Güntert, P., Liu, A., Kägi, J.H., and Wüthrich, K. (1999) NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J. Mol. Biol.*, **291**: 417-428.
- Russo, C., and Selvatti, A.P. (2018) Bootstrap and Rogue Identification Tests for Phylogenetic Analyses. *Molecular biology and evolution*, **35**: 2327-2333.
- Sauge-Merle, S., Lecomte-Pradines, C., Carrier, P., Cuiñé, S., and Dubow, M. (2012) Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure. *Chemosphere*, **88**: 918-924.
- Straus, K., Crosson, L., and Vadopalas, B. (2008) Effects of Geoduck Aquaculture on the Environment: A Synthesis of Current Knowledge. pp. 47.
- Wang, C., Sheng, J., Hong, Y., Peng, K., Wang, J., Wu, D., Shi, J., and Hu, B. (2016) Molecular characterization and expression of metallothionein from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**: 1327-1335.
- Wilks, S.S. (1938) The Large-Sample Distribution of the Likelihood Ratio for Testing Composite Hypotheses. *Ann. Math. Statist.*, **9**: 60-62.
- Ziller, A., and Fraissinet-Tachet, L. (2018) Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics*, **10**: 1549-1559.