

Metallothionein 유전자를 활용한 제주배꼽털달팽이 (*Aegista quelpartensis*) 의 분자계통학적 연구

정준양, 황희주, 정종민, 상민규, 박지은, 송대권, 박소영¹, 이종대², 박홍석³, 조용훈⁴, 이준상⁵, 강세원⁶, 이용석

Phylogenetic analysis of *Aegista quelpartensis* Using Metallothionein Gene

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

Jun Yang Jeong, Hee-Ju Hwang, Jong Min Chung, Min Kyu Sang, Jie Eun Park, Dae Kwon Song, So Young Park¹, Jong dae Lee², Hong seog Park³, Yong Hun Jo⁴, Jun Sang Lee⁵, Se Won Kang⁶ and Yong Seok Lee

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

¹Biodiversity Research team, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, Gyeongbuk, 37242, Korea

²Department of Environmental Health Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungcheongnam-do, Korea

³Research Institute, GnC BIO Co., LTD., 621-6 Banseok-dong, Yuseong-gu, Daejeon, 34069, Korea

⁴Department of Applied Biology, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture (IEFA), College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

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

⁶Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongseup, Jeonbuk 56212, Korea

ABSTRACT

Metallothionein (MT) is a metal-binding protein with a small molecular weight that can be induced by factors such as metal ions and chemicals, and is widely present in various organisms. The high cysteine content of MT contributes to the regulation of intracellular metal concentration, detoxification of heavy metals, and it may be induced due to the environment exposed to heavy metals or oxidation stress. MT has been consistently studied as a taxonomic biomarker for various species, including mollusks. *Aegista quelpartensis*, a native species of Korea, has habitat in Jeju and Jindo island. DNAseq and transcriptome information is registered with NCBI's SRA, but no molecular phylogenetic studies have been conducted. RNA sequencing was performed using Illumina Hiseq 2500 to find the genetic information of *A. quelpartensis*. The unigene obtained through the *de novo* assembly was annotated according to the PANM database using the BLAST program, and the MT sequence consisting of 288 bp coding region and 96 amino acid residues was extracted. The bioinformatic analysis verified that *A. quelpartensis* was grouped in the Stylommatophora clad using the ClustalX and MEGA7 programs. This study confirmed the phylogenetic location of *A. quelpartensis* and the MT gene is sufficient gene that can be used in phylogenetic studies on Mollusca.

Key words : Metallothionein, *Aegista quelpartensis*, Phylogenetic dendrogram

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
1225-3480/24762

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

Metallothionein (MT) 은 금속 이온, 이온화 방사선, 화학 물질, 호르몬, 면역 자극 및 기타 요인에 의해 유도될 수 있는, 다양한 유기체에 널리 존재하는 저 분자량 금속 결합 단백질로 (Y Kojima and Kagi, 1978) 말 신장에서 최초로 발견 및 분리된 것으로 알려져 있다 (Margoshes and Vallee, 1957).

MT의 분자질량은 6.20 kDa으로 분자량이 작은 단백질임에도 불구하고 아미노산 서열에 시스테인 잔기의 비율이 약 30%로 높으며 방향족 잔기와 히스티딘 잔기가 없다 (Arseniev *et al.*, 1988). 체내에 금속이 침입하면 MT의 시스테인 잔기의 황 (S) 이 금속과 반응해 2개의 도메인을 형성하며 금속 티오레이트 (metal-thiolate) 클러스터를 구성 함으로서 강력한 금속 결합능력을 갖게 되는데 (Meloni *et al.*, 2006), 이러한 능력을 통해 MT는 세포내 금속 농도 조절, 자유 라디칼 제거, 중금속의 해독 등 미량의 금속원소의 항상성 조절 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Dvorak *et al.*, 2019). 이러한 특성으로 인해 MT는 중금속에 노출되는 환경에서 쉽게 유도되며 (Y Kojima *et al.*, 1978), 산화스트레스로 인해 유도될 수도 있다 (Andrews, 2000).

MT에서 확인할 수 있는 특징적인 시스테인 서열은 총 15개의 family로 구분되며, 이러한 MT서열의 특징은 계통발생 관계를 나타낼 수 있는 지표 단백질로서 활용 활용되고 있다 (Binz and Kagi, 1999; Ragusa *et al.*, 2017). 연체동물의 MT서열 패턴은 C-X-C-X (3) C-T-G-X (3) C-X-C-X- (3) -C-X-C-K로 나타나며, 이를 분자 계통학적으로 사용한 다수의 선행연구 사례가 발표된 바 있다 (Lee *et al.*, 2008; Baršytė Lovejoy, 2012; Chung *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2018).

동아시아에 서식하고 있는 배꼽달팽이속 (*Aegista*) 은 75 종, 112아종이 보고되어 있다 (Hirano *et al.*, 2014). 배꼽달팽이속 (*Aegista*) 과 *Plectotropis* 이속은 주로 한국과 일본, 중국에 분포하고 있으나 *Neoegista* 이속과 *Coelorus* 이속은 일본의 고유종으로 알려져 있다 (Minato, 1985). 국내에서는 대표적으로 제주도에서 확인되는 배꼽달팽이속 (*Aegista*) 의 제주배꼽달팽이 (*Aegista chejuensis*) 와 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) , 참배꼽달팽이 (*A. chosenica*) 가 알려져 있다 (Min *et al.*, 2004).

이번 연구에 사용된 제주배꼽털달팽이 (*Aegista queupartensis*) 는 한국의 고유종으로 중소형의 육산패류이다 (Min *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2016). 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 의 성체는 각고 9 mm, 각경 약 19 mm 이며 나뭇은 6.5층으로 납작하다. 패각은 옅은 황갈색을 띠며 체층 주연부에 에리한 각이 있고 그 첨단에는 각피가 변한 가시형태의 돌기가 많이 나 있다. 패각 전면에는 수많은 작은 각모 형태의 돌기가 있다. 제공은 크고 깊으며 각구는 사각형에 가까운 난형이다 (Min *et al.*, 2004). 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 에 대한 연구는 외부 형태학적 분석 (Lee and Kwon, 1993) 과 세포학적 연구 (Kwon and Lee, 1991), 유전체 및 전사체의 비교분석 연구 (Kang *et al.*, 2016) 는 수행되어진 바 있으나 분자계통학적 연구는 수행되어진 바 없다.

제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 는 모식산지가 제주

도와 진도 등 좁은 지역에 한정적으로 발견되고 있으며 지속적인 환경의 변화 및 파괴로 인해 개체수가 감소하여 국립생물자원관에서 발표한 국내 적색목록 (Lee and Son, 2012) 에서 관심대상 (LC) 종으로 지정되어 있어 해당종을 보존하기 위한 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

2020년 6월 기준 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 에 등록되어 있는 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 의 유전정보는 본 연구진에 의해 NGS로 분석된 유전체서열 1건 (SRX1850248) 과 transcriptome 1건 (SRX1340310) 이 등록되어 있을 뿐 관련 연구가 매우 부족한 것을 확인할 수 있다. 때문에 본 연구는 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 전사체에서 확보된 MT 서열을 이용하여 대상종의 분자계통학적 유연관계의 확인과 MT 유전자의 단백질 서열을 이용한 분자생물학적 기초 data 를 수립하고자 수행되었다.

MATERIALS AND METHODS

1. Materials

본 연구에서 사용된 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 는 중소형의 육산 복족류로 분류학적 위치는 연체동물문 복족강, 병안목, 달팽이상과, 달팽이과, 배꼽달팽이속에 속하며, 제주도와 경남지방에 분포하고 있는 한국 고유종으로 본 연구에 사용된 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 는 2014년 8월 26일 제주시에서 채집되었다.

2. Methods

1) cDNA library 구축과 염기서열 분석

채집 후 -80°C deep-freezer에서 냉동보관 시킨 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 의 내장낭을 추출한 뒤 Trizol (Thermo Fisher Scientific, USA) 기반 RNA extraction 방법으로 total RNA의 농도와 quality를 확인하였다. 추출된 RNA를 mRNA로 정제한 뒤 TruSeq® Stranded mRNA Library Prep KIT (Illumina, USA) 를 이용하여 cDNA를 합성하고 cDNA library를 구축하였다. 그 후 fragment를 추출한 뒤 Next Generation Sequencer 하나인 Illumine Hiseq 2500을 이용해 전사체 분석을 실시하였다.

2) Transcriptome data의 생물정보학적 분석 및 Metallothionein 서열 확보

제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 의 Transcriptome raw data에 포함된 adapter sequence와 low quality sequence를 제거하기 위해 Cutadapt (Martin, 2011) 와 Sickle (Joshi and Fass, 2011) 을 사용하였다. 그 결과로서

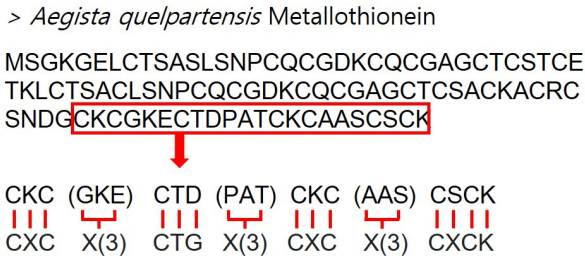


Fig. 2. It has specific structural motif for Mollusca MT sequence pattern such as Cys-Cys, Cys-X-Cys or CYS-X-Y-Cys.

확보된 clean reads를 Trinity program (ver. 2.0.6) 을 사용하여 *De novo* assembly (Haas *et al.*, 2013) 를 진행한 뒤, clustering 하기 위해 TGICL (TIGR Gene Indices Clustering tolls. Ver. 2.1) 를 이용하여 전자체 분석에 사용할 수 있는 unigene 서열들을 얻었다. 얻어낸 unigene 서열들을 PANM DB (ver. 2.0) (Kang *et al.*, 2016) 에 BLAST 프로그램 이용하여 annotation 한 결과, MT 서열을 포함하는 unigene 을 확보하였다. EMBOSS package의 sixpack program을 이용해 6-frame으로 예측 가능한 모든 아미노산 서열들을 추출하였다 (Olson, 2002). 추출된 서열들의 재검증을 위해 NCBI non-redundant database 에서 BLAST 분석을 다시 수행하였다. 이후 family 로 나누어진 15개의 MT 패턴 중 Mollusca 와 일치도가 높은 패턴을 확인 및 비교하여 서열을 선정하였다 (Braun *et al.*, 2001).

3) Multiple alignment 및 phylogenogram 분석

Chung 등에 의해 선행 연구되었던 58개의 full length standard MT (Chung *et al.*, 2018) 아미노산 서열에서 대상종인 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 와 서열 유사도가 높은 MT서열을 찾아낸 뒤 FASTA 형식으로 아미노산 서열을 얻어냈다. 이후 대상 종 및 확보된 MT서열들의 multi-FASTA file을 MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) 의 ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) 엔진을 활용하여 multiple alignment를 수행한 후, molecular phylogenetic analysis (Maximum likelihood) 를 통해 작성된 phylogenetic dendrogram을 얻었다.

4) 2D 구조를 이용한 3D structure 구조 예측 및 단백질 구조 비교 분석

근연종인 *A. queupartensis* 와 *A. chejuensis*의 2차 구조 예측을 위해, 확보된 아미노산 서열을 PSIPRED (LJ McGuffin *et al.*, 2000) 를 사용하여 2D 구조를 예측하고 I-TASSER server (Zhang, 2008) 를 이용하여 3D-Structure를

prediction 하였다. 그 후 대조군으로서 RCSB PDB (Protein Data Bank) 에 등록된 연체동물 중 실험에 사용된 동일 종의 MT서열을 비교 분석하였다.

RESULT AND DISCUSSION

제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 의 MT 유전자 coding 영역은 총 288 bp로 96개의 아미노산으로 구성 되어 있다 (Fig.1). Coding region의 GC함유량은 61.8%로 총 178 bp 였으며, 시스테인 잔기는 26개 (27.08%), 리신 잔기는 9개 (9.37%) 인 것으로 확인되었다. 또한 히스티딘과 방향족 아미노산인 페닐알라닌과 티로신이 포함되지 않아 선행된 연구에서 밝혀진 MT의 특성과 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

MT family의 특징적인 아미노산 서열을 이용하여 생물의 분류학적 위치를 이러한 분석방법은 넓은 생물범위군에서 사용될 수 있다. 국내에서는 고유종인 산골조개의 분자계통 분류학적 연구가 진행된 바 있으며 해외에서도 Metallothionein을 이용해 뱀목 (squamate) 에 속하는 10종을 대상으로 계통분석을 진행한 연구사례가 있다 (Trinchella *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2009).

Mollusca MT 유전자에서 나타나는 특이적 패턴 서열 C-X-C-X- (3) -C-T-G-X- (3) -C-X-C-X- (3) -C-X-C-K와 이번 연구 대상종인 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 에서 나타나는 MT서열을 비교분석 한 결과, 113번 염기서열의 G가 D로 나타난 부분을 제외한 다른 염기 서열들은 Mollusca MT 서열의 특이적 패턴과 일치하는 것을 확인 가능하였다 (Fig. 2).

이번 연구를 통해 연구진들은 MT서열이 분자계통분류학적으로 유용한 단백질 정보로서 작용하는지 재차 확인하고자 하였다. 이를 위해 선행된 연구의 58개의 MT (Chung *et al.*, 2018) 중에서 서열 유사도가 높은 41종의 MT서열과 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) MT 서열로 구성된 data set에 선행 연구된 data를 임의적으로 추가하였다.

생성한 data set로 ClustalX를 실행하여 선행 연구된 41종의 MT서열과 대상종인 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 사이의 MT서열 유사도를 분석하였다. 또한 동일한 data set로 MEGA7 program을 사용하여 multiple sequence alignment를 실시하였다.

이 과정을 통해 도출된 아미노산 서열을 확인한 결과 연구 대상종인 제주배꼽털달팽이 (*A. queupartensis*) 와 그 근연종인 제주배꼽털달팽이 (*A. chejuensis*) 사이에서 다른 종과는 다르게 114번의 염기서열이 G가 아닌 D로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 앞에서 확인한 MT서열의 특이적 패턴에서 다르게 나타나는 서열이 동일하다는 점과 함께 *Aegista* 속에

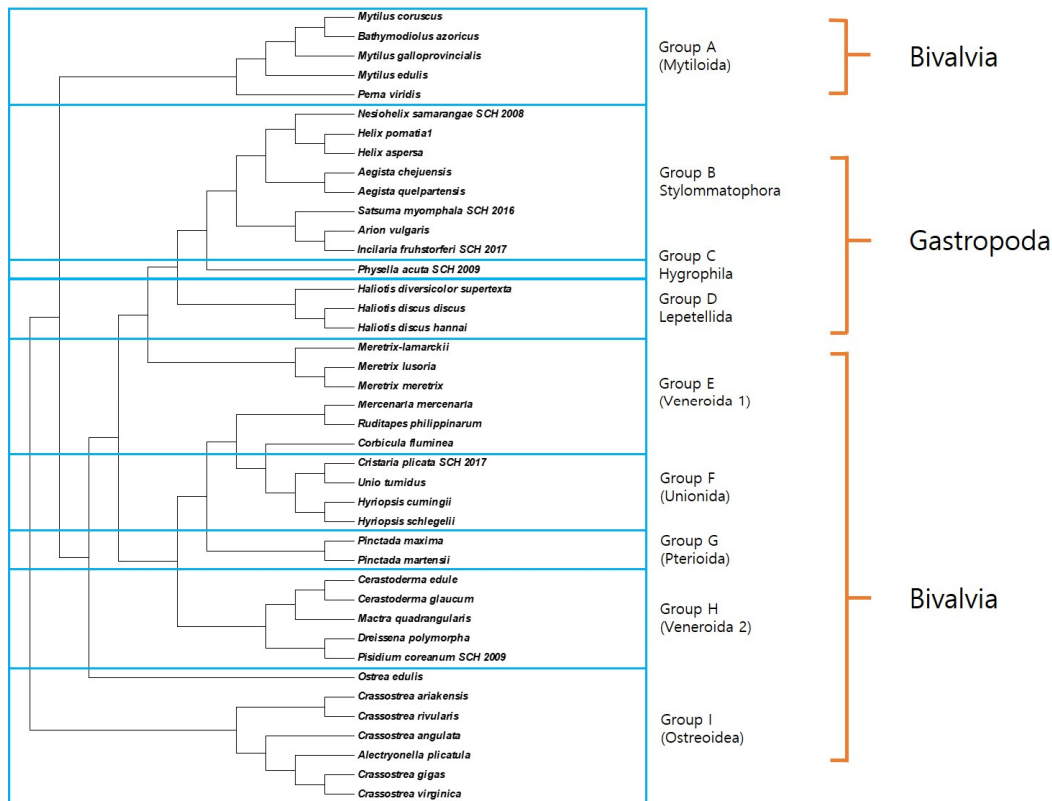


Fig. 4. Molecular phylogenetic analysis on evolutionary relationship by likelihood method. (Group A : Mytiloidea, Group B : Stylommatophora, Group C : Hygrophila, Group D : Lepetellida, Group E : Veneroidea1, Group F : Unionida, Group G : Pterioidea, Group H : Veneroidea2, Group I : Ostreoidea) (A) Group A : Mytiloidea, Group E : Veneroidea1, Group F : Unionida, Group G : Pterioidea, Group H : Veneroidea2, Group I : Ostreoidea are appear to belong to the same class as Bivalvia (B) Group B : Stylommatophora, Group C : Hygrophila, Group D : Lepetellida are appear to belong to the same class as Gastropoda.

서 나타나는 특징적인 서열 또는 지리적으로 격리된 환경에서 세대교체가 일어나면서 나타난 특이적 서열 (Huang *et al.*, 2014) 로 추측되며, 현재는 이를 확인하기 위한 정보량이 부족하여 이후 추가적인 연구 및 data의 축적이 필요할 것으로 사료된다 (Lozupone and Knight, 2005; Ragusa *et al.*, 2017).

Maximum-likelihood 방법을 이용해 phylogenetic tree를 도식화한 결과, 9개의 Group으로 분류되었으며, 연구 대상 종인 제주배꼽털달팽이 (*A. quelpartensis*) 는 *A. chejuensis*, *Nesiohelix samarangae*, *Helix pomatia*, *Arion vulgaris* 등 과 동일하게 병안목 (Stylommatophora) 으로 grouping 되는 것을 확인하였다. 추가적으로 실시했던 *Nesiohelix samarangae* SCH 2008, *Physa acuta* SCH 2009, *Pisidium coreanum* SCH 2009, *Satsuma myomphala* SCH 2016, *Cristaria plicata* SCH 2017, *Aegista chejuensis* SCH 2018 6개의 data 는 형태학적 분류체계와

일치하는 것으로 나타났다 (fig. 4).

같은 Group E의 veneroidea에서 민물과 바닷물이 섞이는 기수역에 서식하는 *Corbicula fluminea*와 해양에서 서식하는 *Meretrix meretrix*, *M. lusoria*, *M. lamarckii* 의 유연관계가 상대적으로 떨어진 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 선행된 연구사례 (Lozupone *et al.*, 2005; Ragusa *et al.*, 2017) 와 함께 MT서열을 이용한 phylogenetic dendrogram 이 동일한 목 (Order) 에서 환경적인 격리, 또는 차이에 의해 나타나는 종 간 차이를 투영할 수 있음을 나타낸다.

제주배꼽털달팽이 (*A. quelpartensis*) 와 근연종인 제주배꼽달팽이 (*A. chejuensis*) 의 이미노산 서열을 PSIPRED 프로그램을 이용하여 2D구조를 비교한 결과 두 종 모두 α -helix와 β -sheet 구조가 발견되지 않았다 (Fig. 5). 또한 I-TSSAER를 이용한3D 구조의 예측결과에서도 α -helix와 β -sheet구조가 없는 coil구조로 예측되었다 (Fig. 6).

RCSB PDB (Protein Data Bank) 에 등록되어 있는 연체

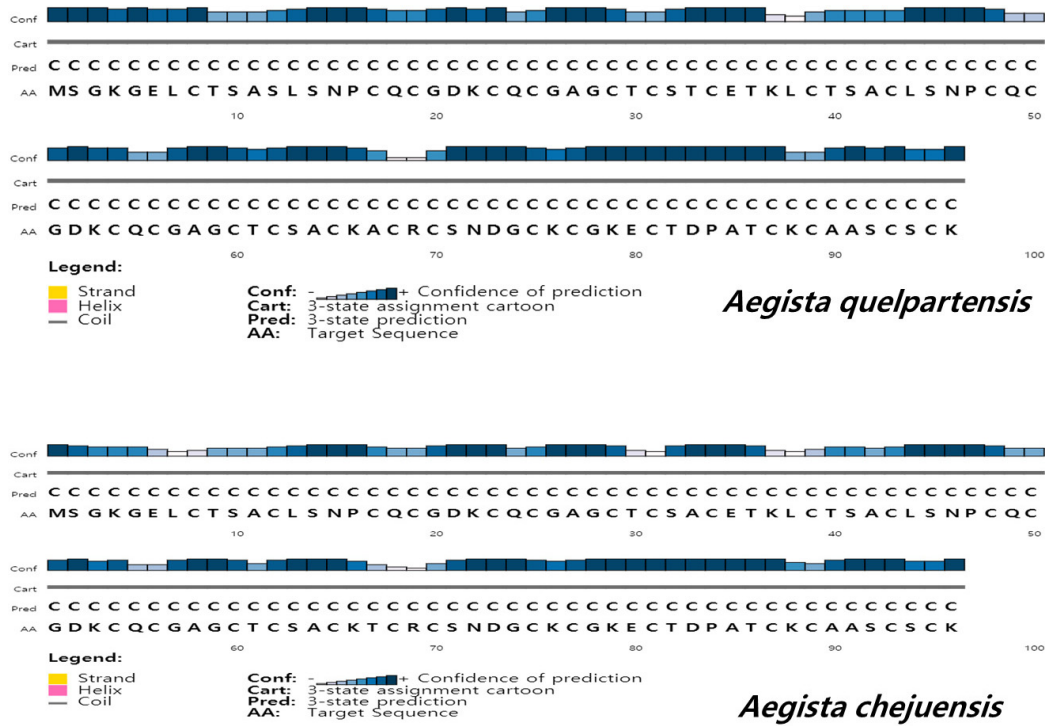


Fig. 5. 2D protein structures predicted by PSIPRED based on the amino acid sequences of *A.queupartensis* and *A.chejuensis*.

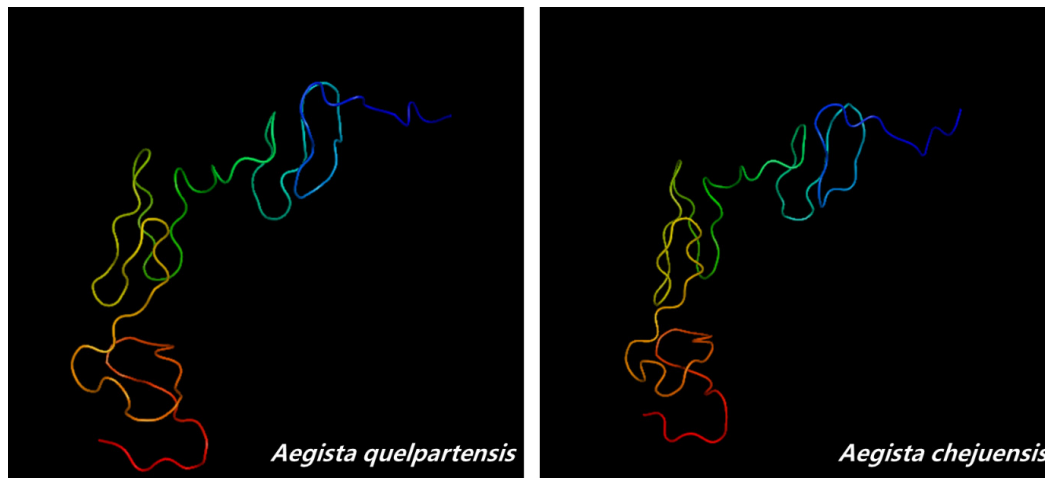


Fig. 6. 3D structure of *A. chejuensis* and *A. queupartensis* predicted by I-TASSER.

동물 MT의 3D structure를 검색해본 결과 *Littorina littorea*, *Helix pomatia* 두 종의 각각 2종류의 MT가 등록되어 있었다. 그 중 본 연구에서 활용되었던 *H. pomatia*의 서열을 확인한 결과 시작서열을 제외한 전체서열이 동일함을 확인하였다. 이 후 본 연구에서 예측한 *H. pomatia*의 3차 구조와 비교한 결과 PDB에 등록되었던 결과는 예측결과와는 상이

하게 19-23번 아미노산이 β -sheet를 이루는 것을 확인하였다. 이에 *A. queupartensis*와 근연종인 *A. chejuensis*, 그리고 본 실험에 사용된 *H. pomatia*를 포함하여 PDB에서 얻어낸 MT서열과 추가적인 multiple alignment를 실행한 결과 β -sheet를 이루는 서열의 마지막 아미노산이 serine으로 나타나는 *H. pomatia*와 다르게 *A. queupartensis*와 *A.*

- (Pulmonata: Bradybaenidae) in Japan. *Journal of Molluscan Studies*, **80**: 177-183.
- Huang, C.W., Lee, Y.C., Lin, S.M., and Wu, W.L. (2014) Taxonomic revision of *Aegista subchinensis* (Mollendorff, 1884) (Stylommatophora, Bradybaenidae) and a description of a new species of *Aegista* from eastern Taiwan based on multilocus phylogeny and comparative morphology. *Zookeys*, 31-55.
- Joshi, N., and Fass, J. (2011) Sickle: a sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. (<http://github.com/najoshi/sickle>).
- 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., Patnaik, B.B., Hwang, H.J., Park, S.Y., Wang, T.H., Park, E.B., Chung, J.M., Song, D.K., Patnaik, H.H., Lee, J.B., Kim, C., Kim, S., Park, H.S., Lee, J.S., Han, Y.S., and Lee, Y.S. (2016) De novo Transcriptome Generation and Annotation for Two Korean Endemic Land Snails, *Aegista chejuensis* and *Aegista quepartensis*, Using Illumina Paired-End Sequencing Technology. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**: 379.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, **33**: 1870-1874.
- Kwon, O.-k., and Lee, J.-S. (1991) Cytological Study of *Aegista quepartensis* (Bradybaenidae) in Korea. *The Korean Journal of the Environment*, **30**: 77-80.
- 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.
- Lee, J.-S., and Kwon, O.-k. (1993) Morphological Analyses of 15 Species of Bradybaenidae in Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **9**(2): 44-56.
- Lee, J.-S., Min, B.-J., Kang, S.W., Lee, J.B., Baek, M.K., Hwang, S.Y., Kim, S.H., Kho, W.-G., Choi, S.-H., Chae, S.-H., Park, H.-S., Han, Y.S., Lee, J.-S., Jeong, K.-H., and Lee, Y.S. (2008) Molecular Phylogenetic Study of *Nesiohelix samarangae* Based on Metallothionein Gene. *The Korean Journal of Malacology*, **24**(1): 73-80.
- Lee, J.S., and Son, M.H. (2012) Red Data Book of Endangered Mollusks in Korea pp. 1-207.
- LJ McGuffin, K Bryson, and Jones, D. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**(4): 404-405.
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 8228-8235.
- Margoshes, M., and Vallee, B.L. (1957) A Cadmium protein from equine kidney cortex. *Communications to the Editor*, **79**: 4813-4814
- Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal.*, **1**: 10-12.
- Meloni, G., Zovo, K., Kazantseva, J., Palumaa, P., and Vasak, M. (2006) Organization and assembly of metal-thiolate clusters in epithelium-specific metallothionein-4. *J. Biol. Chem.*, **281**: 14588-14595.
- Min, D.K., Lee J, S., Koh, D., and Je, J. (2004) Mollusks in Korea. Min Molluscan Research Institute : p.363
- Minato, H. (1985) Four species of subgenus coelorus pilsbry from Western Japan. *Chiribotan*, **16**: 56-61.
- Olson, S. (2002) Emboss opens up sequence analysis. *Briefings in Bioinformatics*, **3**(1): 87-91
- Park, J.E., Cho, H.C., Hwang, H.J., Chung, J.M., Sang, M.K., Min, H.R., Kang, S.W., Park, S.Y., Patnaik, B.B., Kim, W.J., Han, Y.S., Lee, J.S., 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.
- Ragusa, M.A., Nicosia, A., Costa, S., Cuttitta, A., and Gianguzza, F. (2017) Metallothionein Gene Family in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus*: Gene Structure, Differential Expression and Phylogenetic Analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(4): 1-26.
- Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Parisi, E., and Scudiero, R. (2008) Molecular cloning and sequencing of metallothionein in squamates: new insights into the evolution of the metallothionein genes in vertebrates. *Gene*, **423**: 48-56.
- Y Kojima, and Kagi, J. (1978) Metallothionein. *Trends in Biochemical Sciences*, **3**(2): 90-93.
- Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**(40): 1-8.