

염주알다슬기 (*Koreanomelania nodifila*) 의 Arginine Kinase 유전자를 이용한 분자계통학적 분석

이혁¹, 상민규^{2,3}, 송대권^{2,3}, 박지은^{2,3}, 정준양^{1,2}, 홍찬의^{1,2}, 김용태^{1,2}, 신현준^{1,2}, 장이선¹, 황희주⁴, 강세원⁵, 박소영⁶, 박흥석⁷, 이준상², 한연수⁸, 이용석^{1,2,3}

¹순천향대학교 자연과학대학 생명과학과, ²순천향대학교 한국자생동물자원활용 융복합연구소, ³순천향대학교 생명자원 바이오빅데이터 분석 및 활용 연구지원센터, ⁴순천향대학교 순천향의생명연구원, ⁵한국생명공학연구원 생물자원센터, ⁶국립낙동강생물자원관 다양성연구팀, ⁷(주)지앤시바이오, ⁸전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부

Molecular Phylogenetic Analysis of *Koreanomelania nodifila* using Arginine Kinase gene

Hyeok Lee¹, Min kyu Sang^{2,3}, Dae kwon Song^{2,3}, Jie Eun Park^{2,3}, Jun Yang Jeong^{1,2}, Chan Eui Hong^{1,2}, Yong Tae Kim^{1,2}, Hyun Jun Sin^{1,2}, Yi Seon Jang¹, Hee-Ju Hwang⁴, Se Won Kang⁵, So Young Park⁶, Hong Seog Park⁷, Jun Sang Lee², Yeon soo Han⁸ and Yong Seok Lee^{1,2,3}

¹Department of Biology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 31538, Korea,

²Korea Native Animal Resources Utilization Convergence Research Institute (KNAR), Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, Korea,

³Research Support Center for Bio-Bigdata Analysis and Utilization of Biological Resources, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, Korea,

⁴Soonchunhyang Institute of Medi-bio Science, Soonchunhyang University, Cheonan 31151, Korea.

⁵Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongeup, Jeonbuk 56212, Korea,

⁶Biodiversity Research Team, Animal & Plant Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, Gyeongbuk, 37242, Korea,

⁷Research Institute, GnC BIO Co., LTD., 621-6 Banseok-dong, Yuseong-gu, Daejeon, 34069, Korea,

⁸Department of Applied Biology, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture (IEFA), College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

ABSTRACT

Arginine kinases (AK) are known to be widely distributed in various invertebrates. It has an essential role in cellular energy metabolism. It regulates energy regulation and homeostasis in response to external stress. AK gene is used as a marker in invertebrate phylogenetic analysis. In this study, we verified whether AK can be used in molecular phylogenetic analysis. We sequenced *Koreanomelania nodifila* cDNA library using Illumina Hiseq 2000. The AK gene of *K. nodifila* was sequenced using the BLASTx program and PANM DB (v5.1). AK gene was used as a marker to molecular phylogenetic using the MEGA 11 maximum likelihood method. To analyze the 2D structure of the AK gene, the 2D structure was predicted using PSIPRED (v4.0). As a result, the AK gene ORF of *K. nodifila* is a total of 352 amino acids and AK gene is considered to be highly useful for molecular phylogenetic analysis of Mollusca.

Keyword: *Koreanomelania nodifila*, Arginine Kinase, phylogenetic tree

INTRODUCTION

Received: December 16, 2023; Revised: December 26, 2023;

Accepted: December 31, 2023

Corresponding author: Yong Seok Lee

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

1225-3480/24857

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.

Arginine kinase (AK) 는 절지동물, 연체동물, 자포동물, 해면동물 및 원생동물에 이르기까지 다양한 생물에서 널리 분포하고 있는 것으로 알려져 있다 (Uda *et al.*, 2008). AK는 무척추동물에서 세포 에너지 대사에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (Huang *et al.*, 2020), 연체동물에서는 염분 스트레스 및 pH 스트레스에 반응하여 에너지 조절 및 항

상성 조절 역할을 하는 것으로 판단한 선행된 연구가 있었다 (Huang *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

무척추동물 AK 유전자는 계통분류에 활용 할 수 있음을 확인한 선행연구들이 있었는데 (Mahon and Neigel, 2008; Dole *et al.*, 2010), 계통분류에 활용되는 Cytochrome oxidase I (CO I) 의 분류결과와 유사한 결과를 보여주었으며, AK 유전자가 속 수준 이상의 계통 분류에 더 다양한 정보를 제공해주는 것으로 나타났다 (Mahon and Neigel, 2008). 연체동물의 AK 유전자는 인트론 위치가 보존되어 있으며 (Uda *et al.*, 2006), Class 수준에서 유전자의 위치가 공유되고 다슬기과를 포함한 연체동물 계통분류에서 뚜렷한 계통 분 지도를 보여주는 선행연구를 확인한 바 있다 (Jarilla *et al.*, 2014). 또한 AK 유전자를 활용하여 다슬기과를 포함한 복족강 등의 연체동물 계통학적 분석을 선행연구한 논문들이 있다 (Suzuki *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2004). 특히 한국 멸종위기II급에 속하는 기수갈고둥 (*Clithon retropictus*) 과 대추키고둥 (*Ellobium chinense*) 그리고 한국 고유종인 두타산입술대고둥아재비 (*Mirus junensis*) 를 대상으로도 AK 의 계통분류학적 연구가 수행되어진 바 있다 (Hong *et al.*, 2021 ; Park *et al.*, 2020 ; Min *et al.*, 2018).

CO I 이 좁은 범위의 계통발생학적 깊이 내에서 더 다양한 정보를 제공해주는 반면, AK는 광범위한 범위에서 다형성을 보여주는 연구 결과를 확인한 바 있다 (Mahon and Neigel, 2008). 연체동물에 계통발생의 기초 연구가 될 수 있는 marker로서 AK가 그 역할을 할 수 있는지에 대해 검증을 하고자 본 연구가 수행되었다.

MATERIALS AND METHODS

1. Sample Collection

염주알다슬기 (*Koreanomelania nodifila*) 는 복족강 (Gastropoda), 다슬기과 (Pleuroceridae) 에 속하는 한반도 고유종으로 국내 중북부 하천에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Ministry of Environment., 2023). *K. nodifila*는 수변부 정리, 제방조성, 집중 강우 (Ministry of Environment., 2023) 와 구분별한 남획 등으로 인해 (Jin-Young *et al.*, 2022) 개체수가 감소하고 있으며, 이에 대응하여 2012년 환경부에서 멸종위기 야생생물 2급으로 지정하였으며 (Jin-Young *et al.*, 2022), 또한 국가생물적색목록에 위기 (EN) 등급으로 등재되었다 (Bae and Park, 2020; Jin-Young *et al.*, 2022).

본 실험에 사용한 샘플은 원주지방환경청의 허가를 받아 (허가번호 2014-22) 채집을 진행하였다. 2014년 7월 강원도 영월군에서 채집하였으며, whole body를 사용하여 전사체 분석

에 이용하였다.

2. cDNA library 구축과 염기서열 분석

*K. nodifila*의 total RNA를 추출하기 위해 grinding한 샘플 300 mg을 취하여 Trizol reagent 3ml (Thermo Fisher Scientific, USA) 를 사용하여 total RNA 추출을 진행하였다. 추출된 total RNA를 Spectrophotometry와 2100 expert _RNA nano chip을 이용하여 RNA quality 및 농도를 확인하였다. Absolutely mRNA Purification Kit (Stratagene, CA, USA) 를 사용하여 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. cDNA Library Construction Kit (Stratagene, CA, USA) 를 이용하여 cDNA Library를 구축하였다. 구축된 cDNA library를 Illumina Hiseq 2000 Sequencer을 활용하여 전사체 분석을 진행하였다.

3. De novo assembly를 통한 Unigenes 확보

Illumina Hiseq 2000에서 생산된 raw reads에서 clean reads를 확보하기 위해 Cutadapt (v1.11) (Martin, 2011) 및 Sickle (v1.33) (Joshi, 2011) 프로그램을 활용하여 adapter sequence와 low quality sequence를 제거하였다. 확보한 clean reads를 Trinity (v2.0.4) (Grabherr *et al.*, 2011) 프로그램을 통하여 De novo assembly (Grabherr *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2017) 를 진행하여 contigs를 생성하였다. TransDecoder (Haas and Papanicolaou, 2016) 를 활용하여 생성한 contigs로부터 Open Reading Frame (ORF) 을 추출했다. 추출한 ORF를 TGICL (TIGR Gene Indices Clustering tools. Ver 2.1) (Pertea *et al.*, 2003) 프로그램을 이용하여 clustering 하여 Unigenes을 확보하였다.

4. K. nodifila의 Arginine Kinase 서열 확보

K. nodifila 의 Unigenes을 BLASTx program과 PANM DB (ver. 5.1) (Song *et al.*, 2023) 를 사용하여 annotation 하였다. 그 결과 AK로 annotation 된 Unigenes 중 AK의 full-length 서열을 확보하기 위하여 NCBI의 nr (non-redundant) 데이터베이스에서 BLAST하여 서열을 확인 하였다. 확인한 AK full-length 서열을 EMBOSS package sixpack (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_sixpack/) (Rice *et al.*, 2000; Madeira *et al.*, 2019) 을 이용하여 *K. nodifila*의 AK 아미노산 서열을 확보하였다.

5. BLAST를 통한 비교 연체동물서열 확보 및 MEGA 프로그램을 이용한 Phylogenetic 분석

NCBI에 “Arginine kinase”로 검색한 결과 중 “Gastropoda”, “Bivalvia”, “Cephalopoda”에 해당되는 각각

Table. 1. List of species and number of NCBI accession number of AK gene used for phylogenetic analysis

Species	Class	Accession No.
<i>Sepia pharaonis</i>	Cephalopoda	AKS26488.1
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>		BAA95610.1
<i>Sepiella maindroni</i>		AEK26855.1
<i>Amphioctopus fangsiao</i>		AEK65120.1
<i>Octopus vulgaris</i>		BAA95609.1
<i>Nautilus pompilius</i>		BAA95594.1
<i>Pomacea canaliculata</i>	Gastropoda	AYH91743.1
<i>Koreanomelania nodifila</i>		-
<i>Semisulcospira libertina</i>		AGN95434.1
<i>Clithon retropictus</i>		SCH
<i>Cellana grata</i>		BAB41096.1
<i>Ellobium chinense</i>		SCH
<i>Biomphalaria glabrata</i>		ADH59421.1
<i>Mirus junensis</i>		SCH 2018
<i>Aplysia californica</i>		XP 005099408.1
<i>Aplysia kurodai</i>		BAB41095.1
<i>Satsuma myomphala</i>		SCH
<i>Nesiohelix samarangae</i>		AHC02701.1
<i>Conus ebraeus</i>		ASF90538.1
<i>Conus frigidus</i>		ARU12142.1
<i>Conus araneosus</i>		AQM52449.1
<i>Conus litteratus</i>		ARS01451.1
<i>Conus lividus</i>		ATG85037.1
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>		AJW60778.1
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>		Bivalvia
<i>Sinohyriopsis schlegelii</i>	AEO94538.1	
<i>Anadara broughtonii</i>	BAD11949.1	
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC24881.1	
<i>Azumapecten farreri</i>	AEX08673.1	
<i>Corbicula japonica</i>	BAB91357.1	

것으로 나타났다 (Kim and Lee, 2018). AK 유전자를 활용한 본 연구의 분석결과 또한 두 종의 유연관계가 가까운 것으로 확인되었다. 이는 *K. nodifila* 가 속한 family Pleuroceridae 와 *S. libertina* 가 속한 family인 Semisulcospiridae 가 공통 조상으로부터 분지되었으며 (Neiber and Glaubrecht, 2019), AK 유전자가 고도로 보존 되는 효소라는 점에서 (Ellington, 2001), AK 유전자를 이용한 계통분석 결과는 두 종의 유연관계가 밀접한 관계임을 나타낸 것으로 사료된다.

계통분석을 통해 다른 family임에도 근연관계가 가깝게 나온 *K. nodifila* 와 *S. libertina* 2종의 AK 아미노산 서열을 비교 분석하기 위해 전사된 단백질의 2D 구조를 비교하여 보았다. *K. nodifila* 와 *S. libertina* 2종 모두 α -helix는 15개,

β -sheet는 11개로 동일하게 예측되었다. 또한 Coil 개수도 27개로 동일하게 예측이 되었다. (Fig. 3.). 예측된 단백질 구조에서는 α -helix, β -sheet, Coil 개수는 동일하게 예측되었지만, 일부에서 예측된 구조의 차이를 보였다. 복측강 내에서 지리적으로 다른 환경에 적응된 종 간에 일관된 대립유전자 빈도차이를 보여주는 선행 연구가 있으며, 두 종이 서식지 환경 차이로 인한 대립유전자의 변이가 단백질의 구조에 미세한 영향을 주었을 것으로 판단된다 (Kempainen *et al.*, 2011).

CONCLUSIONS

염주알다슬기 (*K. nodifila*) 의 Arginine kinase 유전자는

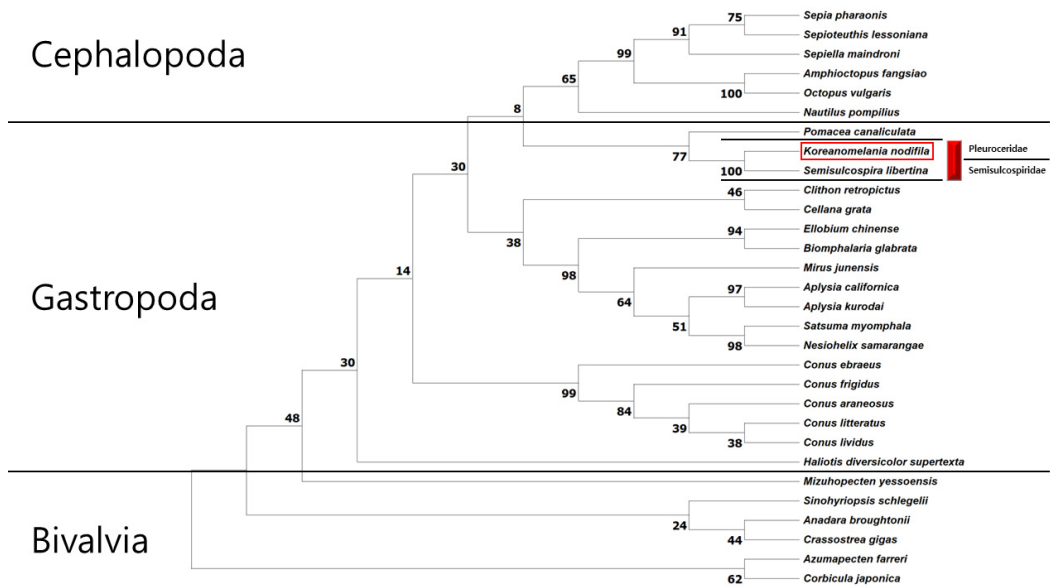


Fig. 2. Result of phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. To analyze 30 species of AK gene sequences, the AK gene was utilized as a marker and conducted within MEGA 11. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and JTT matrix-based model. The tree with the highest log likelihood (-9488,56) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. This analysis involved 30 amino acid sequences. There were a total of 640 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11.

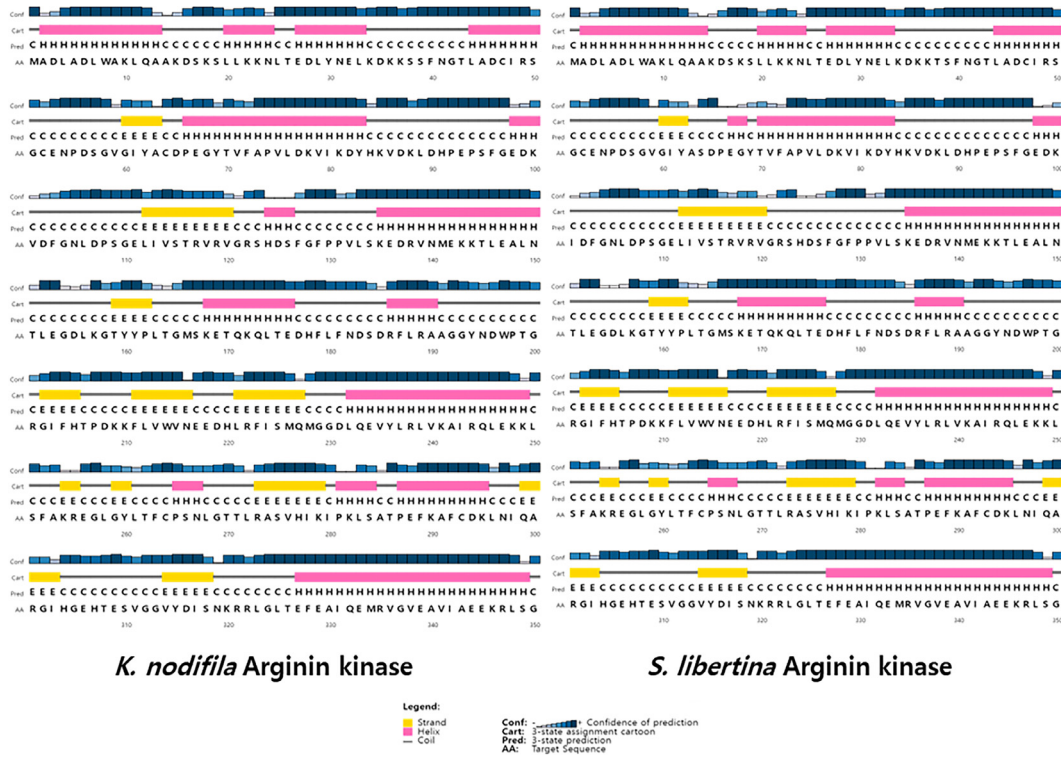


Fig. 3. The predicted 2D structure of arginine kinases by PSIPRED 4.0 Comparative analysis between *K. nodifila* and *S. libertina*. These 2 species has close Evolutionary distance.

1,056 bp, 아미노산 352개로 이루어져 있으며, GC contents 58.6%를 가진다. NCBI에 등록된 두족류 (Cephalopoda), 복족류 (Gastropoda), 이매패류 (Bivalvia) 의 AK full-length 유전자 서열과 본 연구진이 선행연구를 통해 발표된 *M. junenis*, *E. chinense*, *C. retropictus* 및 *S. myomphala*의 서열을 포함한 29종의 AK 유전자 서열을 참고서열로 하여 phylogenetic analysis를 진행하였다. 그 결과 30종의 생물이 Cephalopoda, Gastropoda, Bivalvia 각각의 Class끼리 분류되는 것을 확인하였고, *K. nodifila*와 *S. libertina* 사이의 밀접한 관련이 있음을 확인하였는데 이는 선행된 연구 결과와 유사한 것을 확인하였다 (Strong and Köhler, 2009; Kim and Lee, 2018; Neiber and Glaubrecht, 2019). 또한 AK 유전자의 2D 구조를 예측하여 *K. nodifila* 와 *S. libertina* 2종의 예측된 단백질 구조가 유사하지만 일부분에서 구조적 차이가 있다는 것을 확인하였다. 이러한 분석 결과들을 통해 AK 유전자가 무척추동물 계통분류에 유용하게 활용될 수 있는 유전자 marker임을 확인하였다.

ACKNOWLEDGEMENT

본 논문은 교육부에서 지원하는 지역대학 우수과학자 (한국연구재단, NRF-2017R1D1A3B06034971), 중점연구소 (NRF-2021R1A6A1A03039503) 및 국가연구시설장비진흥센터 (2022R1A6C101B794), 순천향대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행하였습니다.

REFERENCES

- Bae, M.-J., and Park, Y.-S. (2020) Key Determinants of Freshwater Gastropod Diversity and Distribution: The Implications for Conservation and Management. *Water*, **12**: 1908.
- Buchan, D.W.A., and Jones, D.T. (2019) The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.*, **47**: W402-w407.
- Dole, S.A., Jordal, B.H., and Cognato, A.I. (2010) Polyphyly of Xylosandrus Reitter inferred from nuclear and mitochondrial genes (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**: 773-782.
- Ellington, W.R. (2001) Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu Rev Physiol.*, **63**: 289-325.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., and Regev, A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, **29**: 644-652.
- Haas, B., and Papanicolaou, A. (2016) TransDecoder (find coding regions within transcripts). Google Scholar.
- Hong, C.E., M.K.S., Dae Kown Song, Jie Eun Park, Yong Tae Kim, H.J.S., L.Z., H.J.H., S.Y.P., S.W.K., Lee, J.S., Jung, K.Y., and Lee, a.Y.S. (2021) 기수갈고둥 (*Clithon retropictus*) 의 Arginine kinase 유전자를 이용한 분자계통학적 연구. *The Korean Journal of Malacology*, **37**: 125-132.
- Huang, Y., Wu, D., Li, Y., Chen, Q., and Zhao, Y. (2020) Characterization and expression of arginine kinase 2 from *Macrobrachium nipponense* in response to salinity stress. *Dev Comp Immunol.*, **113**: 103804.
- Jarilla, B.R., Uda, K., Suzuki, T., Acosta, L.P., Urabe, M., and Agatsuma, T. (2014) Characterization of arginine kinase from the caenogastropod *Semisulcospira libertina*, an intermediate host of *Paragonimus westermani*. *Journal of Molluscan Studies*, **80**: 444-451.
- Jin-Young, K., Ye ji, K., Ah Reum, K., In-Seong, Y., Hwang, K., and Dongsoo, K. (2022) Physical Habitat Characteristics of the Endangered Macroinvertebrate *Koreoleptoxis nodifila* (Martens, 1886) (Mollusca, Gastropoda) in South Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment*, **55**: 145-155.
- Joshi, N.A., and Fass, J.N. (2011) Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files.
- Kang, S.W., Patnaik, B.B., Hwang, H.J., Park, S.Y., Chung, J.M., Song, D.K., Patnaik, H.H., Lee, J.B., Kim, C., Kim, S., Park, H.S., Park, S.H., Park, Y.S., Han, Y.S., Lee, J.S., and Lee, Y.S. (2017) Sequencing and *De novo* assembly of visceral mass transcriptome of the critically endangered land snail *Satsuma myomphala*: Annotation and SSR discovery. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, **21**: 77-89.
- Kempainen, P., Lindskog, T., Butlin, R., and Johannesson, K. (2011) Intron sequences of arginine kinase in an intertidal snail suggest an ecotype-specific selective sweep and a gene duplication. *Heredity (Edinb)*, **106**: 808-816.
- Kim, W.-J., Kim, D.-H., Lee, J.-S., Bang, I.-C., Lee, W.-O., and Jung, H.-T. (2010) Systematic Relationships of Korean Freshwater Snails of *Semisulcospira*, *Koreanomelania*, and *Koreoleptoxis* (Cerithioidae; Pleuroceridae) revealed by Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Sequences. *The Korean Journal of Malacology*, **26**.
- Kim, Y.K., and Lee, S.M. (2018) The complete mitochondrial genome of freshwater snail, *Semisulcospira coreana* (Pleuroceridae: Semisulcospiridae). *Mitochondrial DNA B Resour*, **3**: 259-260.
- 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.

- 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 Res.*, **47**: W636-W641.
- Mahon, B.C., and Neigel, J.E. (2008) Utility of arginine kinase for resolution of phylogenetic relationships among Brachyuran genera and families. *Mol Phylogenet Evol.*, **48**: 718-727.
- Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011 17: 3.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**: 404-405.
- Min, H.R., Hwang, H.J., Chung, J.M., Sang, M.K., Cho, H.C., Park, J.E., Jung, K.Y., Park, H.S., Han, Y.S., and Lee, Y.S. (2018) Molecular Phylogenetic studies of *Mirus junensis* using Arginine kinase gene sequence. *The Korean Journal of Malacology*, **34**: 107-114.
- Ministry of Environment. (2023) 한 눈에 보는 멸종위기 야생생물 2022년 개정 pp.
- Neiber, M.T., and Glaubrecht, M. (2019) Unparalleled disjunction or unexpected relationships? Molecular phylogeny and biogeography of Melanopsidae (Caenogastropoda: Cerithioidea), with the description of a new family and a new genus from the ancient continent Zealandia. *Cladistics*, **35**: 401-425.
- Park, J.E., Sang, M.K., Hwang, H.-J., Song, D.K., Jeong, J.Y., Park, S.Y., Kang, S.W., Park, H.s., Han, Y.s., Lee, J.S., and Lee, Y.S. (2020) Arginine Kinase 를 이용한 대추귀고둥 (*Ellobium chinense*) 의 분자계통학적 분석. *The Korean Journal of Malacology*, **36**: 133-141.
- 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*, **19**: 651-652.
- Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*, **16**: 276-277.
- Sang, M.K., Hee-Ju Hwang, Jong Min Chung, Jie Eun Park, Dae Kwon Song, Jun Yang Jeong, So Young Park, Hong seog Park, Yong Hun Jo, Jong dae Lee, Jun Sang Lee, and Kang, Y.S.L.a.S.W. (2020) 멸종위기야생동물 II급 *Satsuma myomphala* (거제외줄달팽이) 의 arginine kinase 유전자를 이용한 계통학적 분석. *The Korean Journal of Malacology*, **36**: 97-104.
- Song, D.K., Min Kyu Sang, Jie Eun Park, Jeong, J.Y., C.-E.H., Y., Kim, T., H.J.S., Z.L., H.L., H.H.P., B.B., Patnaik, Y.H.J., S.Y.P., S.W.K., and Lee, a.Y.S. (2023) An update of PANM database- version 5.1 for filtering the contaminating fungal gene sequences from molluscan transcriptome data. *The Korean Journal of Malacology*, **39**: 1-4.
- Strong, E.E., and Köhler, F. (2009) Morphological and molecular analysis of 'Melania' jacqueti Dautzenberg and Fischer, 1906: from anonymous orphan to critical basal offshoot of the Semisulcospiridae (Gastropoda: Cerithioidea). *Zoologica Scripta*, **38**: 483-502.
- Suzuki, T., Fukuta, H., Nagato, H., and Umekawa, M. (2000) Arginine kinase from Nautilus pompilius, a living fossil. Site-directed mutagenesis studies on the role of amino acid residues in the Guanidino specificity region. *J. Biol. Chem.*, **275**: 23884-23890.
- Takeuchi, M., Mizuta, C., Uda, K., Fujimoto, N., Okamoto, M., and Suzuki, T. (2004) Unique evolution of Bivalvia arginine kinases. *Cell Mol Life Sci.*, **61**: 110-117.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.*, **38**: 3022-3027.
- Uda, K., Fujimoto, N., Akiyama, Y., Mizuta, K., Tanaka, K., Ellington, W.R., and Suzuki, T. (2006) Evolution of the arginine kinase gene family. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, **1**: 209-218.
- Uda, K., Yamamoto, K., Iwasaki, N., Iwai, M., Fujikura, K., Ellington, W.R., and Suzuki, T. (2008) Two-domain arginine kinase from the deep-sea clam *Calyptogena kaikoi*-evidence of two active domains. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol. Biol.*, **151**: 176-182.
- Yang, Z., Huang, X., Liao, H., Zhang, Z., Sun, F., Kou, S., and Bao, Z. (2020) Structure and functional analysis reveal an important regulated role of arginine kinase in *Patinopecten yessoensis* under low pH stress. *Aquat Toxicol.*, **222**: 105452.

