

한국 고유종 *Pisidium (Neopisidium) coreanum* (산골조개) 의 metallothionein 유전자를 기초로 한 분자계통 분류학적 연구

백문기, 이준서, 강세원, 이재봉, ¹강현정, ²조용훈, ²노미영, ²한연수, ³최상행, ⁴채성화, ³박홍석, ⁵이준상, 이용석

인제대학교 의과대학 기생충학교실, ¹국립수산과학원 자원연구과, ²전남대학교 농과대학 식물생명공학부, ³한국생명공학연구원 바이오화학에너지센터, ⁴㈜지앤시바이오, ⁵강원대학교 자연과학대학 생명과학부

Phylogenetic Analysis based on Metallothionein Gene Sequence of an Indigenous Species *Pisidium (Neopisidium) coreanum* in Korea

Moon Ki Baek, Jun-Seo Lee, Se Won Kang, Jae Bong Lee, ¹Hyun Jung Kang ²Yong-Hun Jo, Mi-Young Noh, ²Yeon Soo Han, ³Sang-Haeng Choi, ⁴Sung-Hwa Chae, ³Hong-Seog Park, ⁵Jun-Sang Lee and Yong Seok Lee

Department of Parasitology, Inje University College of Medicine, Busan 614-735, Korea

¹Fisheries Resource Research Department, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

²Department of Agricultural Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Industrial Biotechnology & Bbioenergy Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

⁴Research Institute of GnC BIO Co., LTD., Daejeon 305-150, Korea

⁵Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT

Pisidium (Neopisidium) coreanum is a freshwater snail and lives in spring water near mountain areas. Interestingly, this snail has been traditionally regarded as medicinal food, and thus has been used as folk remedies for healing broken bones. Recently, alpha classification on *Pisidium (Neopisidium) coreanum* through redescription has been conducted. However, not much attention has been made in beta classification. In this study, we performed the beta classification based on metallothionein (MT) genes found from various organisms. To this end, the complete cDNA sequences were obtained from the Expressed Sequence Tag (EST) sequencing project of *Pisidium (Neopisidium) coreanum*. The coding region (315 bp) encoded an amino acid sequence of 105 residues. The combined results from BLAST analyses, multiple sequence alignment and molecular phylogenetic study of Pc-MT gene indicate that *Pisidium (Neopisidium) coreanum* has similarity to freshwater bivalve such as *Dreissena polymorpha* (zebra mussel), *Unio tumidus* (swollen river mussel) and *Crassostrea ariakensis* (suminoe oyster).

Key words: metallothionein, *Pisidium coreanum*, phylogenetics.

서 론

Received Jun 25, 2009; Revised Aug 02, 2009; Accepted Aug 10, 2009

Corresponding author: Yong Seok Lee

Tel: +82 (51) 890-6462 e-mail: yslee@inje.ac.kr

1225-3480/25210

산골조개, *Pisidium (Neopisidium) coreanum* Kwon, 1990는 백합목 (Veneroida), 산골과 (Sphaeriidae) 의 소형 담수패류로 박(1992)과 Park and Kwon(1993) 등에 의하여 분류 및 발생학적 연구가 이루어진 바 있다. 한때 본 종은

Pisidium (Neopisidium) coreanum Kwon & Park, 1993 으로 표기하였으나, Lee and Lee (2008) 는 본 종의 분류학적 기재문의 문제점을 제기하고 이를 보완한 재기재문을 통하여 현재의 *Pisidium (Neopisidium) coreanum* Kwon, 1990 학명으로 표기하게 되었다. 산골조개는 한국 특산종으로, 예로부터 뼈가 부러지거나 금이 갔을 때 민간요법 (약용) 으로 사용되어 왔을 정도로 다양한 연구개발 가능성을 지니고 있으며 (정 *et al.*, 2000), 협소한 지역의 산간 용천수에 발견되는 서식지 특이성을 지녀, 이를 활용한 종의 유전적 고립과 관련된 진화 연구에 사용될 수 있는 많은 학문적 가치를 지니고 있음에도 이에 대한 관련 연구는 매우 미비한 실정이다. 한편 국외에서는 *Pisidium aminicum* 을 대상으로한 독성실험 (Heinonen *et al.*, 2002) 이 수행되었으며, *P. coreanum* 이 이전고환극구흡충 (*Echinostoma cinetorchis*) 의 제 2 중간숙주로의 가능성 연구가 국내 연구진에 의해 진행된 바 있다 (Park *et al.*, 2006). 또한 Lee and Foighil (2002) 는 *Pisidium* 의 상위카테고리의 단위인 Spheridium 에 속하는 생물을 대상으로 6-Phosphogluconate dehydrogenase (PGD) 유전자를 이용한 베타분류 연구가 수행한 바 있다. 하지만 *P. (N.) coreanum* 에 대한 베타분류에 관한 연구는 수행 되어진 바 없다.

따라서 본 연구는 Metallothionein (MT) 를 이용한 *P. (N.) coreanum* 의 분자계통학적 베타 분류를 하는데 목적을 두고 있다. MT는 약 22-33 % 의 시스테인 (Cys) 잔기로 이루어져 있으며, 8개의 리신 (Lys) 잔기를 가지며, 히스티딘 (His) 혹은 방향족 아미노산이 존재하지 않는 특징을 가지고 있으며, 저분자량 (3500-14000 Da) 단백질로서 생리학적 (Zn, Cu, Se), 생체이물 (Cd, Hg, Ag) 의 중금속들을 묶어 주는 역할을 한다 (Margoshes and Vallee, 1957). MT는 척추동물을 비롯한 여러 무척추동물에서도 발견되며 (Roesijadi and Klerks, 1989; Bebianno and Langston, 1991; Berger *et al.*, 1995), 효모, 식물 등에도 유사한 기능을 수행하는 리간드 (ligand) 가 보고된 바 있다 (Grill *et al.*, 1985; Hayashi *et al.*, 1986; Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999). 최근에는 중금속에 의해 특이적으로 유도되는 MT 단백질을 생화학적 지표로 사용하기 위한 매우 중요한 단백질로서 다루어지고 있다. 분자진화적인 측면에서 MT 는 현재 15개의 family로 분류되어 있으며, 연체동물로는 *Mytilus* 의 MT (C-x-C-x (3) -C-T-G-x (3) -C-x-C-x (3) -C-x-C-K) 를 표본으로 한 특이 서열패턴이 연구되어 있다 (Binz and Kagi, 1999; Cherian *et al.*, 2003; Singh and Hanson, 2006). 본 연구는 기존의 EST (expressed sequence tag) 분석을 통하여 얻어진 *P. (N.) coreanum* MT 서열을 이용한 계통분류학적 분류를 통하여 동일 종간의

유연관계를 알아보고, *P. (N.) coreanum* 의 분자 계통학적 분류 위치를 파악하는데 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

1. 재료

산골조개 (*P. (N.) coreanum*) 의 폐각은 난삼각형으로 표면은 성장특이 뚜렷하며 연한 광택이 나는 황색의 얇은 각피에 덮여있다. 표면에는 미세한 성장맥이 촘촘하게 나타나며, 서식처의 퇴적물이 폐각 표면에 부착하여 부분적으로 흑갈색을 나타내기도 한다. 각정은 각장의 약 3/5에 이르는 뒤쪽에 위치하며 높게 돌출하지 않는다. 주로 산간의 용천수 주변에 서식한다 (Lee *et al.*, 2004). 본 연구를 위한 재료는 경상남도 산청군 삼장면 유평리 (약 해발 600 m 지점) 에서 간이 뜰채를 사용하여 채집하였다.

2. 방법

1) cDNA library 구축

P. (N.) coreanum 의 내장낭 전체조직으로부터 MRC gene Tri reagent를 사용하여 total RNA를 정제한 후, Stratagene Absolutely mRNA Purification Kit (Stratagene, CA, USA) 를 이용하여 mRNA만 정제 하였다. cDNA Library Construction Kit (Stratagene, CA, USA) 을 사용하여 정제된 mRNA를 주형으로 하여 oligo dT 와 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하고, 정제 과정이나 합성 과정에서 생길 수 있는 partial cDNA를 제거 하기 위해서 Sepharose CL-2B gel filtration medium 을 이용하여 size fractionation 단계를 거쳐 long length의 cDNA만을 획득하였다. 이 cDNA들을 분석하기 위해서 pBK-CMV vector에 cDNA를 ligation하여 cloning할 수 있도록 library를 구축하였다. cDNA library의 효율적인 보관을 위하여 Gigapack Gold III (Stratagene, CA, USA) packaging system을 사용하여 packaging하였다.

2) 염기서열분석

상기와 같이 준비된 random plasmid DNA를 이용하여 염기서열 분석을 시행하였다. 정제한 plasmid DNA를 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) 에 적용하여 AmpliTaq DNA polymerase로 PCR 반응을 실시한 후 에 탄을 침전법을 이용하여 PCR product를 정제하여 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) 로 염기서열을 결정하였다.

3) Metallothionein 서열의 확보

2	AAA CTG GAA AGC AAA TTG GAT GAA TAT ATT GTC AAA CAC TGT GTT	46
1	K L E S K L D E Y I V K H C V	15
47	GAT CCA CTA ATT GAA ATT TTA TAA AAA ATG TCT GAT TCT TGC AAT	91
16	D P L I E I L * K M S D S C N	30
92	TGT GTT GAA GCC GGA AGT TGT ACT TGC GGA GAC AGC TGC AAC GGT	136
31	C V E A G S C T C G D S C N G	45
137	TGT AAA GAC TGT AAG TGT GGC AGT CAG TGC AAG TGT GCC AAG GGT	181
46	C K D C K C G S Q C K C A K G	60
182	TGT GCC TGT AAA GCC AGC TGC CAA TGT GAA CCT GGA AAC TGT ACT	226
61	C A C K A S C Q C E P G N C T	75
227	TGT GGA AAG AGC TGC GAT CCT GCT AAA GAC TGT AGC TGT GTC GGT	271
76	C G K S C D P A K D C S C V G	90
272	GAA TGT AGC TGC GCC AAG AGC AGC GAC TGT AAA AAA TGC AAA TGC	316
91	E C S C A K S S D C K K C K C	105
317	AAG GAT TCC TGC GAT TGT GAC AGC GCA TGC ACT GGT CTA AGC TCG	361
106	K D S C D C D S A C T G L S S	120
362	TGC TTG TGC AAA GTG TGC AAA TGC AAG TGA TTG AAC ACA GTC ACC	406
121	C L C K V C K C K * L N T V T	135
407	TGG ATA AAA TCA CGT GCA ACA AGA TTT CGT GCA GCG TGC TGA AAT	451
136	W I K S R A T R F R A A C * N	150
452	ATT TGT TTG TTC GCT GAA GAT CTT CTG ATT AAA GAG GTG ATT CCG	496
151	I C L F A E D L L I K E V I P	165
497	GAA CTT GCA TCA ATC TTC ATT ATA GCA TTT TTT CAT GAC AAA CAT	541
166	E L A S I F I I A F F H D K H	180
542	TGA CTG TAT AAA TAT TTT GCC ATT GGT TTG TAT ATT ACT AAA AAA	586
181	* L Y K Y F A I G L Y I T K K	195
587	ACA TTT ATA TAC AGT CAG GTG ACC AAG AAT TTT TTT TTC TCA AAA	631
196	T F I Y S Q V T K N F F F S K	210
632	CAC GTT TGT ATA CAA CAA ATA AAC AAT AAA CTT CAG AAA	670
211	H V C I Q Q I N N K L Q K	223

Fig. 1. The metallothionein nucleotide sequence and deduced amino acid sequence. (under line = coding sequence). (Genbank accession number : GQ268325)

기존의 구축되어진 *P. (N.) coreanum* 데이터베이스를 query로 하여 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 분석 결과 MT으로 동정되어진 크로마토그램파일 6개를 score 20 조건으로 phred 프로그램을 사용하여 base calling 한 후, cap3 소프트웨어를 통하여 assembly 함으로써 contig file을 추출하였다. 여기서 얻어진 contig 서열들을

E-moss package의 sixpack 소프트웨어를 사용하여 가능한 모든 아미노산 서열을 추출하였다 (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998).

4) BLAST search를 통한 서열의 annotation 확인

EST 분석을 통하여 얻어진 모든 아미노산 서열을 연체동물

전용 BLAST 서버의 아미노산 데이터베이스를 query로 하여 blastp의 option (e-value, 1e-5) 을 사용하여 annotation을 실시하였다. 분석결과 e-value 값이 가장 높은 아미노산 서열을 선택하여 기준에 알려진 15가지 pattern equation 중에 연체동물에 해당하는 공식과 비교하여 보았다 (Braun *et al.*, 2001).

5) BLAST search를 통한 관련 서열의 확보 후 multiple align 및 phylogenogram

연체동물 전용 BLAST 서버의 아미노산 데이터 베이스를 활용하여 연체동물 문에 속하는 생물들에서 관련 참고서열을 추출하였다. 추출되어진 참고서열들을 Multi-Fasta format으로 변환한 후 ClustalX 프로그램을 이용하여 다중서열 분석하였으며 Mega4를 이용하여 Neighbor-Joining method를 통해 phylogenogram을 도식화 함으로서 *P. (N.) coreanum*의 MT서열과 다른 종들간의 MT서열과 비교분석하였다 (Jeanmougin *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 2007).

6) 2D 구조를 이용한 단백질 구조 비교 분석

*P. (N.) coreanum*의 MT를 비롯한 각 생물에 해당하는 80종의 참고서열들을 대상으로 Psipred 소프트웨어를 사용하여 2D 구조를 예측한 후 각각의 구조에 대한 α -Helix, β -pleated sheet를 비교분석함으로써 종들 간의 유사성을 분석하였다 (McGuffin *et al.*, 2000).

결과 및 고찰

*P. (N.) coreanum*의 MT 유전자 서열 중에서 코딩 영역은 총 315 bp 로 아미노산 105개로 이루어져 있었으며 염기서열의 G·C 함량은 48.8% 였다. 아미노산 조성을 대상으로 앞서 언급한 MT의 특징과 비교하여 본 결과 리신 (Lys) 잔기가 15개로 밝혀져 일반적으로 알려진 리신잔기의 숫자인 8개와 상이하였으나, 히스티딘 (His) 과 방향족 아미노산이 발견되지 않았으며, 시스테인 (Cys) 잔기 함유율이 29.5% (31개) 인 점 등은 일반적인 MT의 특징을 반영하고 있었다 (Fig. 1).

MT family의 이러한 독특한 아미노산 서열을 이용하여 분류학적 그룹을 찾을 수 있으며, phylogenetic 분류가 가능하다 (Binz and Kagi, 1999). 최근 이러한 기법을 이용하여 비늘이 있는 파충류 10종에 대해 유의적인 데이터를 얻은 사례도 있다 (Trinchella *et al.*, 2008). 그러므로 일반적이고 구성이 다른 서열에 대한 패턴을 이용하여 각각의 family에 따르는 계통발생학적 tree를 구성 할 수 있다 (Nordberg and Kojima, 1979).

위 내용을 근거로 하여 이미 알려진 연체동물의 MT 서열의 공식인 C-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K 와 *P.*

(*N.*) *coreanum*의 MT 유전자 서열을 비교 분석한 결과 *P. (N.) coreanum*의 MT 유전자 서열은 연체동물 MT 서열에 매우 근접한 아미노산 서열이라는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

BLAST 결과를 토대로 선정한 80개의 참고 서열과 *P. (N.) coreanum*의 MT 아미노산 서열을 ClustalX를 이용하여 multiple align 한 결과 Dp-MT 서열이 가장 높은 아미노산 레벨 점수를 보였으며, 그 밖에 Ut, Car, Pv1, Le, Cg1, Pv2, Cg3등의 순서로 높은 점수를 보여 주었다 (Fig. 3, 4).

ClustalX를 통해 수행되어진 multiple align 결과를 토대로 Neighbor-Joining method를 통해 진화학적 분석을 실시하였다 (Saitou and Nei, 1987). 진화학적 근연도는 Poisson correction method (Zuckerandl and Pauling, 1965) 를 사용하였으며, 모든 위치의 gap 과 missing 데이터는 제거하였다. 서열상 그러한 위치는 최종 데이터 셋에서 28 곳 이었으며, 이러한 결과는 Mega4 프로그램의 phylogenetic 분석을 통해 수행되었다 (Tamura *et al.*, 2007). Phylogenogram을 그려본 결과 주로 *Dreissena polymorpha* (Dp), *Crassostrea gigas* (Cg4), *Crassostrea virginica* (Cv7) 등 주로 이매패류에 속하는 생물들과 같은 군으로 묶이는 것을 관찰 할 수 있었다.

*P. (N.) coreanum*의 MT 및 참고서열의 아미노산 2D 분석 결과 1개의 strand를 가지는 생물군이 8종 (10%), 2개의 strand를 가지는 생물군이 31종 (38.7%), 3개의 strand를 가지는 생물군이 30종 (37.5%), 4개의 strand를 가지는 생물에는 Cgm, Me1, Me10, Tg1 이렇게 총 4종이 있고 5개의 strand를 가지는 생물은 Cv2로 1종이 있었다. 그리고 helix 구조만 가지는 생물에는 Ha4, Hp2, Hp5가 있었으며, strand와 helix를 동시에 가지는 생물을 확인 할 수 있었는데 Cg4는 2개의 strand와 1개의 helix를 가지고 있었으며, Cg6는 5개의 strand와 1개의 helix를 가졌으며, Mc는 1개의 strand와 1개의 helix를 가졌다. 이처럼 2D구조를 통하여 각각의 strand와 helix에 따르는 염기서열을 비교 분석한 결과 동일한 연체동물일지라 하더라도 다양한 종류의 구조를 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

또한, Mega4를 이용하여 도식화한 Dendrogram과 2D구조 결과 사이의 밀접한 관계를 볼 수 있었는데 Dendrogram 결과를 살펴보면, Group A에서는 두 가지 형태로 접근해 볼 수 있는데 각각 1개의 strand를 가진 생물과 1개의 helix를 가진 생물로 나누어 볼 수 있었으며, Group B에서 *P. (N.) coreanum*의 MT와 가장 근접한 근연관계를 가지는 Dp, Cg4, Cv7의 경우 2개의 동일한 strand 개수를 가지는 EE의 동일 서열로 시작되어 지는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 Group C에서는 홍합류와 진주 담치, 지중해 담치로 구성되어

1 MSDSCNCVEAGSCTCGDSCNGCKDKCGSQCKCAKGCACKASCQCEPGNCTC 52
 52 GKSCDPAKDCSCVGECSCAKSSDCKKCKCKDCDCDSACTGLSSCLCKVKCKCK 105

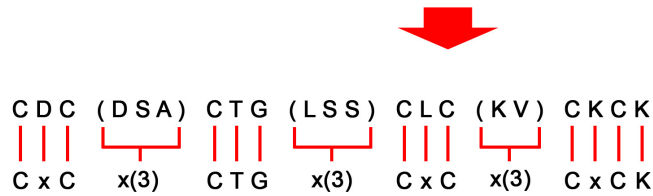


Fig. 2. The comparison data of MT sequence between molluscs and *Pisidium (Neopisidium) coreanum*.

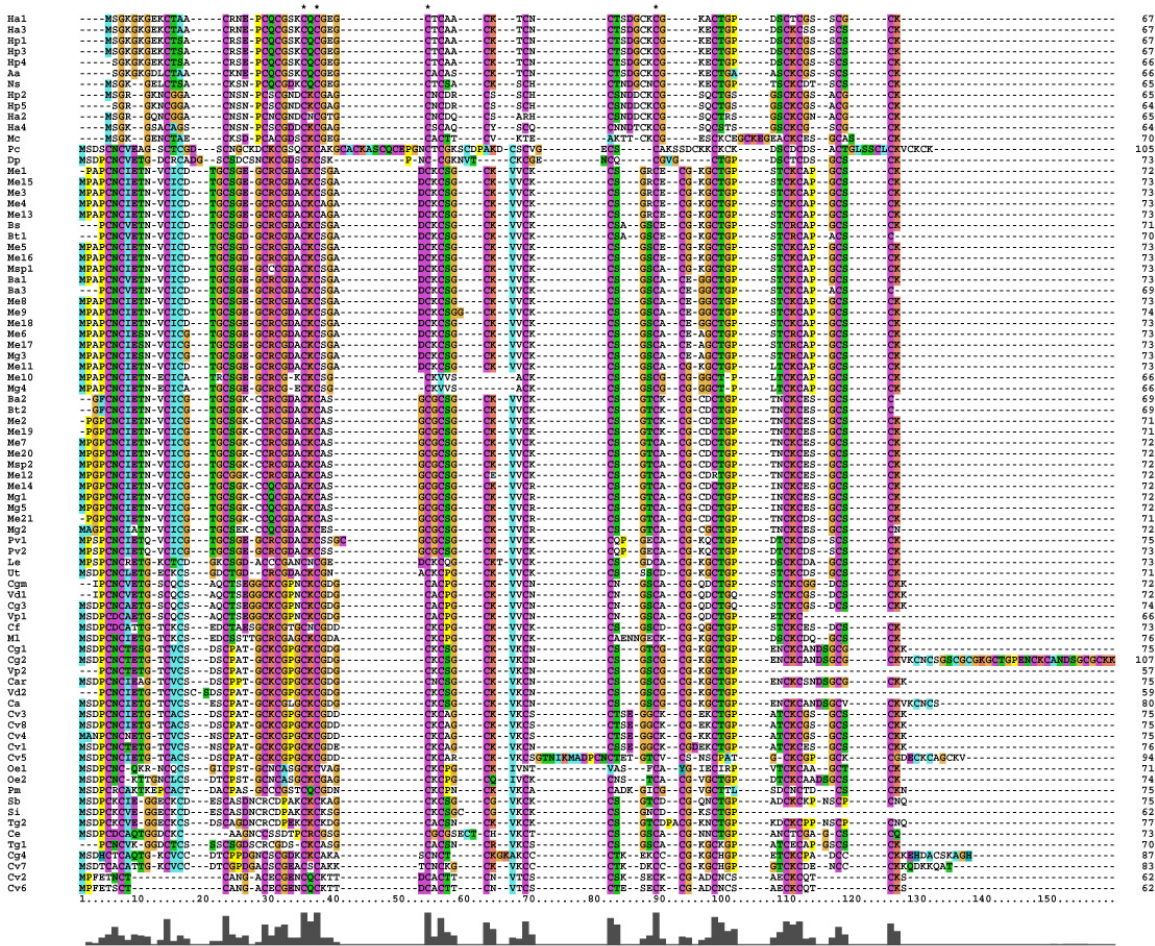


Fig. 3. Multiple sequence alignment results of *Pisidium (Neopisidium) coreanum* and 80 reference sequences. Abbreviations: *Pisidium coreanum* (Pc), *Arianta arbustorum* (Aa), *Bathymodiolus azoricus* (Ba1-Ba3), *Bathymodiolus* sp. FD-2002 (Bs), *Bathymodiolus thermophilus* (Bt1-Bt2), *Cerastoderma edule* (Ce), *Cerastoderma glaucum* (Cgm), *Corbicula fluminea* (Cf), *Crassostrea angulata* (Ca), *Crassostrea ariakensis* (Car), *Crassostrea gigas* (Cg1-Cg4), *Crassostrea virginica* (Cv1-Cv8), *Dreissena polymorpha* (Dp), *Helix aspersa* (Ha1-Ha4), *Helix pomatia* (Hp1-Hp5), *Laternula elliptica* (Le), *Megathura crenulata* (Mc), *Meretrix lusoria* (Mi), *Mytilus edulis* (Me1-Me21), *Mytilus galloprovincialis* (Mg1-Mg5), *Mytilus* sp. KL-2006 (Msp1-Msp2), *Nesiohelix samarangae* (Ns), *Ostrea edulis* (Oe1-Oe2), *Perna viridis* (Pv1-Pv2), *Pinctada maxima* (Pm), *Scapharca broughtonii* (Sb), *Scapharca inaequalvalvis* (Si), *Tegillarca granosa* (Tg1-Tg2), *Unio timidus* (Ut), *Venerupis decussatus* (Vd1-Vd2), *Venerupis philippinarum* (Vp1-Vp2).

학적 자료의 축적으로 이어져 중간 또는 종 내의 특징을 설명하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

*Pisidium (Neopisidium) coreanum*의 metallothionein 유전자는 염기서열 315개로 이루어져있으며 105개의 아미노산으로 이루어져 있었다. 연체동물의 metallothionein 서열의 공식[C-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K]에 맞춘 결과 알려진 공식과 상당히 일치하는 것을 확인할 수 있었으며 아미노산의 조성도 시스테인 (Cys) 이 약 1/3 정도 함유하는 사실을 확인 할 수 있었다. BLAST 결과를 토대로 선정 되어진 80개의 참고 서열 중 아미노산 레벨에서 가장 높은 스코어로 align 되는 서열들은 담수패인 *Dreissena polymorpha* (zebra mussel), *Unio tumidus* (swollen river mussel) and *Crassostrea ariakensis* (suminoe oyster) 등으로 나타났다. ClustalX 를 통해 multiple align 한 후 Neighbor-Joining 방법에 따라 phylogenogram을 그려본 결과 *Pisidium (Neopisidium)coreanum*의 MT는 *Dreissena polymorpha* (Dp), *Crassostrea gigas* (Cg4), *Crassostrea virginica* (Cv7) 등의 생물들과 같은 군으로 묶이는 것을 관찰 할 수 있었다. Psipred 소프트웨어를 통해 2D 구조를 비교 분석 한 결과도 multiple align 및 phylogenogram 결과와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 EST를 통해 밝혀진 *Pisidium (Neopisidium) coreanum*의 MT 서열은 근연종 들의 서열과 일치함을 알 수 있었으며 이러한 결과에 기인하여 MT 서열은 분류에 사용 될 수 있다고 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant 2007-04269 from the Ministry of Education, Science and Technology.

REFERENCES

- Bebiano, M., and Langston, W. (1991) Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Marine Biology* **108**: 91-96.
- Berger, B., Dallinger, R., and Thomaser, A. (1995) Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**: 781-791.
- Binz, P.A., and Kagi, J.H.R. (1999) Metallothionein: Molecular Evolution and Classification. *Metallothionein IV*
- Braun, R., Pedretti, K., Casavant, T., Scheetz, T., Birkett, C. and Roberts, C. (2001) Parallelization of local BLAST service on workstation clusters. *Future Generation Computer Systems*, **17**: 745-754.
- Cherian, M., Jayasurya, A. and Bay, B. (2003) Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **533**: 201-209.
- Ewing, B. and Green, P. (1998) Base-calling of Automated Sequencer Traces using Phred. II. Error Probabilities. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. and Green, P. (1998) Base-calling of Automated Sequencer Traces using Phred. I. Accuracy Assessment. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 175-185.
- Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y. and Webb, M. (1987) Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl*, **52**: 19-22.
- Grill, E., Winnacker, E. and Zenk, M. (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, **230**: 674-676.
- Hayashi, Y., Nakagawa, C.W. and Murasugi, A. (1986) Unique properties of Cd-binding peptides induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Environmental Health Perspectives*, **65**: 13-19.
- Heinonen, J., Honkanen, J., Kukkonen, J.V. and Holopainen, I.J. (2002) Bisphenol A accumulation in the freshwater clam *Pisidium amnicum* at low temperatures. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, **43**: 50-55.
- Jeanmougin, F., Thompson, J., Gouy, M., Higgins, D. and Gibson, T. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**: 403-405.
- Lee J.S., Mcn B.J., Kang S.W., Lee J.B., Baik 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. *Korean Journal of Malacology*, **24**(1): 73-80.
- Lee, T. and Foighil, D. (2002) 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD) allele phylogeny is incongruent with a recent origin of polyploidization in some North American Sphaeriidae (Mollusca, Bivalvia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**: 112-124.
- Lee, Y.S. and Lee, J.S. (2008) Re-description *Pisidium (Neopisidium) coreanum* (Veneroidea: Sphaeriidae) from Korea. *Korean Journal of Malacology*, **24**(2): 93-96.
- Lee, Y.S., Jo, Y.H., Kim, D.S., Kim, D.W., Kim, M.Y., Choi, S.H., Yon, J.O., Byun, I.S., Kang, B.R., Jeong, K.H. and Park, H.S. (2004) Construction of BLAST server for mollusks. *Korean Journal of Malacology*, **20**: 165-169.
- Margoshes, M. and Vallee, B. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, **79**: 4813-4814.

- McGuffin, L., Bryson, K. and Jones, D. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**: 404-405.
- Nordberg, M. and Kojima, Y. (1979) Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. *Metallothionein*. Birkhauser, Basel, **41**(16): 41-116.
- Park, J. and O.K. Kwon (1993) Studies on the development and the spawning season of *Pisidium (Neopisidium) coreanum* (Bivalvia: Sphaeriidae). *Korean Journal of Malacology*, **9**: 33-38.
- Park, Y.K., Soh, C.T., Park, G.M., Hwang, M.K. and Chung, P.R. (2006) Host specificity of *Pisidium coreanum* (Bivalvia: Sphaeriidae) to larval infection with a human intestinal fluke *Echinostoma cinetorchis* (Trematoda: Echinostomatidae) in Korea. *Journal of Parasitology*, **92**: 1118-1120.
- Roesijadi, G. and Klerks, P. (1989) Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *Journal of Experimental Zoology*, **251**: 1-12.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406-425.
- Sanita di Toppi, L. and Gabbrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, **41**: 105-130.
- Singh, V. and Hanson, J. (2006) Assessment of metallothionein and antibodies to metallothionein in normal and autistic children having exposure to vaccine-derived thimerosal. *Pediatric Allergy & Immunology*, **17**: 291-296.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.
- 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.
- Zuckerandl, E. and Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins pp. 97-166. Academic Press. New York
- 박제철 (1992) 한국산 산골과 2종 (삼각산골조개, 산골조개) 의 분류학적 연구. 49 p. 강원대학교 석사논문.
- 정평림, 박갑만, 정영현, 용태순, 임경일. 소진탁 (2000) 한국의 약용패류. *Korean Journal of Malacology*, **16**: 55-60.