Korean J. Malacol. 29(3): 171-179 2013
http://dx.doi.org/10.9710/kjm.2013.29.3.171

동양달팽이(*Nesiohelix samarangae*) 의 arginine kinase 유전자 분석 및 발현 패턴에 관한 연구

정지은, 이용석

순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과

Identification, sequence characterization and expression analysis of the arginine kinase gene in response to laminarin challenge from the Oriental land snail, *Nesiohelix samarangae*

Ji Eun Jeong and Yong Seok Lee

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-600, Korea

ABSTRACT

Arginine kinase (ArK) is known to play an important role in most invertebrates the level of ATP by phosphorylation of phosphagens in cell and immuninty in living organisms. ArK has been identified in many kinds of organisms ranging from invertebrate to vertebrate. However, no ArK gene has been cloned and investigated from *N. samarangae*. This leads us to identify ArK cDNA (NsArK) from the expressed sequence tag (EST) sequencing of *N. samarangae*. Sequence analysis indicated that the coding region of 1,065 bp contains 355 amino acid residues. Molecular phylogenetic analysis shows that NsArK had very high similarities with mollusca and arthropoda. In an attempt to investigate a potential role of NsArK in the digestive gland of *N. samarangae*, expression patterns were analyzed. RT-PCR analsysis shows that NsArK mRNA is induced in the rane of 1.2 fold at 6 hr by laminarin when compared with the control. The immunnologial and physiological role of NsArK remains to be further investigated in *N. samarangae*.

Key words: cloning, arginine kinase, *Nesiohelix samarangae*, laminarin

Introduction

선천성 면역 관련 연구는 주로 mouse 의 골수유래 비만세포 등 척추동물을 대상으로 진행되어 왔지만 (Supajatura *et al*., 2002), 최근에는 후천성 면역계가 없는 무척추동물을 대상으로 한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 특히 투구게 (horseshoe crab; *Limulus polyphemus*), 민물게 (freshwater crayfish), 멍게 (ascidians) 및 초파리 (*Drosophila melanogaster*), 쉬파리 (*Sarcophaga peregrine*), 누에나방 (*Bombyx mori*), 담배박각시나방 (*Manduca sexta*), 참검정풍뎅이 (*Holotrichia diomphalia*), 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*) 등의 곤충들이 대상이 되어왔다 (Iwanaga and Lee, 2005).

이러한 연구들은 차세대 게놈 해독 (NGS) 분석 장비의 발달과 더불어 유전체 정보를 기반으로 genomics, mRNA 및 small RNA등의 transcriptome, comparative transcriptomics, proteome, metabolome, functional genomics, methylome profiling 등의 기술이 발전하여 세포내의 모든 분자 화합물의 동정, 기능 분석, 상호작용 및 환경변화 대한 생물학적 반응 등의 다양한 연구가 가능하게 되었다 (Greenbaum *et al*., 2001; Hegde *et al*., 2003; Buermans *et al*., 2010; Perco *et al*., 2010; Chistoserdovai, 2010).

ArK는 transferase 종류의 하나로서 arginine phosphokinase, adenosine 5'-triphosphate, L-arginine N-phosphotransferase 그리고 omega-N-phosphotransferase 로도 불리우며 arginine 과 proline 대사에 중요한 역할을 하

Received: August 29, 2013; Accepted: September 28, 2013
Corresponding author : Yong Seok Lee
Tel: +82 (41) 530-3040 e-mail: yslee@sch.ac.kr
1225-3480/24484
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.

는 것으로 알려진 효소이다. 또한 glycocyamine kinase (GK), hypotaurocyamine kinase (HTK), lombricine kinase (LK), opheline kinase (OK), taurocyamine kinase (TK), thalessemine kinase (ThK), creatine kinase (CK) 등과 함께 다양한 무척추동물에서 발견 되어지는 8개의 Phosphagen kinases 중 하나로 세포 내 에너지 수송, 무기 인산 농도 조절, 양성자 buffering 등의 기능을 가지는 것으로 알려져 있다 (Jarilla and Agatsuma, 2010). 연체동물의 경우 선천성 면역 시스템과 관련된 chemotaxis, phagocytosis, phagolysosome의 형성 등 같은 과정들은 높은 에너지 레벨을 요구함으로 신진 대사와 면역 반응에 충분한 ATP가 공급되어 항상성이 유지되어야 하기 때문에 Ark유전자의 역할이 중요하다는 보고도 있었다 (Coyne, 2011).

본 연구에서는 무척추동물에서의 선천성 면역 연구의 모델로 연체동물인 동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 를 대상으로 면역유발 물질인 laminarin을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어서 각각의 cDNA 라이브러리를 만들고, EST (expressed sequence tag) 염기서열을 분석하여 두 군으로부터 얻어진 서열들을 비교 발현 유전체학적인 연구 (comparative transcriptomics) 방법을 통하여 분석하였다. 그 결과, 증가하거나 감소한 유전자들이 동정되었고, 그 중에서 laminarin을 처리하기 전에 비해 약 2배 정도 발현이 증가한 arginine kinase (ArK) 유전자를 본 연구의 대상으로 하여 유전자의 전체염기서열 및 아미노산 염기서열을 밝혔고, 아미노산의 서열을 토대로 하여 molecular phylodendrogram 을 작성하였으며 생물정보학 분석을 통해 단백질의 2차 및 3차 구조를 예측하였다. 그리고 laminarin 처리 후 시간별 발현량의 변화를 real time RT-PCR을 통해 확인하였고, 본 연구는 선천성면역 관련 연구의 기초자료로 활용하고자 수행되었다.

Material and methods

1. Sampling

실험에 사용된 동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 는 충남 태안군 근흥면 가의도리에서 채집되었고, 단기간 사육되었으며 mRNA 추출하기 72 시간 전부터 먹이를 주지 않았다. 유전자발현의 양상을 연구하기 위해 대조군으로서 아무것도 처리하지 않은 동양달팽이와 실험군으로서 순수하게 정제된 수용성의 PAMP (laminarin) 100 μl / ml을 3 시간 처리한 동양달팽이를 사용하여 cDNA library를 구축한 후 random sequencing 을 통해 분석하였다.

2. cDNA library construction

해부 현미경하에서 동양달팽이의 소화관 부분을 제거한 뒤, 아무것도 처리하지 않은 동양달팽이와 laminarin을 처리한 각각의 동양달팽이로부터 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74104) 를 사용하여 total mRNA를 순수하게 정제하였다. 정제된 mRNA를 oligo dT와 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성한 후 Stratagene cDNA Library Construction Kit 사용하여 cDNA library를 구축하였다. LD-PCR 법과 primer extention 법 두 가지를 사용하여 double-strand cDNA를 합성한 후 Lambda TriplEx2 vector에 ligation 시킨 후 Gigapack Gold Ⅲ (Stratagene, LaJolla, Calif.) packaging system을 사용하여 packaging 을 하였다.

3. 염기서열 분석

E. coli strain BM25.8을 이용하여 lambda TriplEx2 (linear form) 에서 pTriplEx2 (circular form) 으로 전환하였다. 그리고 LB agar plate (cabenicilline) 에 plating 하여 37℃ 에서 하루를 배양하였다. NucleoGen Plasmid Purification Kit를 사용하여 Plasmid를 정제한 후에 Sequencing을 위해 자동염기서열분석기 (AB-3730XL, Applied biosystems) 를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

4. Comparative transcriptomic study using bioinformatics

동양달팽이의 cDNA library를 구축한 후 random sequencing 을 통해 확보되어진 chromatogram 파일은 phred score 20 조건하에 base calling 을 수행하였으며 cross_match 프로그램을 통해 사용되어진 pTriplEx2 vector 서열을 masking 하였고 Emboss package (Rice *et al*., 2000) 의 trimmest 프로그램을 통해 poly-A tail 을 제거한 clean mFASTA 형태의 염기서열을 작성하였다 (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al*., 1998). 연체동물 전용 서열데이터베이스 (mollusks sequence database; http://bioinfo.sch.ac.kr/~mollusks) 및 NR 데이터베이스를 이용한 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 검색을 통한 annotation 을 실시하였다. 이 결과 laminarin 처리 전후 증감이 있는 후보 유전자군을 확보하였다.

5. Laminarin 처리 후 증가한 arginine kinase 서열의 확보

Laminarin 처리 전후 증감이 있는 후보 유전자군에서 arginine kinase로 동정된 서열 27개는 CAP3 소프트웨어 (Huang and Madan, 1999) 를 통하여 assembly 하여 contig file을 추출하였으며 GENSCAN 소프트웨어 (Burge and Karlin, 1997; Burge and Karlin, 1998) 를 사용하여 아미노산 서열을 추출하였다.

6. multiple align 및 phylodendrogram

염기서열 분석을 통하여 동정된 아미노산 서열을 연체동물 전용 BLAST 서버의 아미노산 데이터 베이스 (mollusks sequence database; http://bioinfo.sch.ac.kr/~mollusks)를 활용하여 연체동물 문에 속하는 생물들에서 관련 참고서열을 추출하였다. 데이터베이스를 query로 하고, blastp (E-value; 1e-5) 검색을 사용하여 annotation을 실시하였다. 연체동물 전용 BLAST 서버의 아미노산 데이터 베이스를 활용하여 분석결과 homology가 가장 높은 아미노산 서열을 선택하여 연체동물문 및 절지동물문에 속하는 생물들에서 관련 참고서열을 추출하였다 (Braun *et al*., 2001). 추출된 참고서열들을 MEGA5 프로그램의 clustalW 모듈을 이용하여 multiple sequence alignment 를 수행하였다 (Edgar, 2004; Edgar, 2004). 그 후 maximum parsimony method 및 maximum likelihood method를 통해 phylodendrogram을 도식화하였다 (Jones *et al*., 1992; Tamura *et al*., 2011).

7. 2D 구조를 이용한 단백질 구조 비교 분석

단백질의 2차 구조 분석을 위해 GENSCAN 프로그램을 이용하여 확보된 아미노산 서열을 Psipred 소프트웨어를 사용하여 2D 구조를 예측하였으며 (McGuffin *et al*., 2000), 3D-jigsaw 소프트웨어를 사용하여 단백질의 3차 구조를 comparative modeling 하였다.

8. Time dependent mRNA expression by RT-PCR

대조군으로서 아무것도 처리하지 않은 동양달팽이를 사용하였고, 순수하게 정제된 수용성의 laminarin 100 μg 을 3시간, 6시간, 9시간, 12시간 간격으로 처리한 실험군으로 나누어서 실험을 하였다. 달팽이들을 해부하여 digestive gland로부터 Trizol reagent를 사용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA는 RTase (Fermentas) 와 oligo dT를 사용하여 합성하였고, assembly된 contig서열로부터 primer를 design하여 사용하였다 (arginine kinase 유전자; Left primer 5'-CATTCGTTCAGGCAGTGAGA-3', Right primer 5'-GCCTCAACTGTCGTCCTTTC-3'). 양성 대조군으로 house keeping유전자인 actin을 사용하였고 (actin 유전자; Left primer 5'-AAGGTTACGCACTCCCACAC-3', Right primer 5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAACA-3'), iQ SYBR Green supermix와 CFX connect real time system (Bio-rad) 를 이용하여 실험하였다.

Results and discussion

Arginine kinase (Ark) 는 두 개의 기질 ATP 와 L-arginine로부터 화학적인 반응을 통해 ADP (Adenosine 5'-Diphosphate), Nomega-phospho-L-arginine의 생성을 촉진하는 효소로써 phosphagens의 인산화 작용에 의해 ATP (Adenosine 5'-Triphosphate) level을 유지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 척추동물에서는 phosphocreatine이, 무척추동물에서는 phosphoarginine이 가장 중요한 phosphagen의 역할을 한다. 이러한 유전자는 일부 연체동물 (Scallop, Pecten maximus) 의 근육에서 actin에 결합하는 것으로 보고가 되어 있으며 (Reddy *et al*., 1991; 1992) 염기서열이나 일부 서열들은 초파리, 참게, 랍스터, 새우, 전복 등에서도 보고가 되었으며, 특히 근육이 수축할 때 ATP 항상성을 유지하는 근육에 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다 (Newsholme *et al*., 1978; Lang *et al*., 1980; Dumas and Camonis, 1993; Suzuki and Furukohri, 1994). 최근에는 gram-negative soil bacterium인 *Myxococcus xanthus* 등을 포함한 몇 가지 종류의 bacteria에서 Ark로 추정되는 유전자가 동정되었으며, null mutation을 통해 Ark 유전자가 어떤 스트레스 반응과 development에 필수적인 역할을 하고 있음을 보고하였다 (Bragg *et al*., 2012).

동양달팽이의 cDNA library를 구축한 후 random sequencing 을 통해 분석된 서열들 중 laminarin 처리 후 증가한 유전자인 arginine kinase의 서열을 추출한 후 BLASTx 검색을 통해 유사 서열들을 확보하여 분석하였다. Arginine kinase (ArK) 유전자의 서열 중에서 코딩 영역은 총 1065 bp 이고, 355개의 아미노산으로 이루어져 있었으며 염기서열의 G·C 함량은 39.94% 였다. Methionine으로 시작하는 아미노산 조성을 가지고 있었으며, leucine (Leu) 잔기가 36개로 가장 많았고 그 다음으로 glycine (Gly) 잔기가 34개로 많았다 (Fig. 1).

다음으로 BLAST 결과를 토대로 유사도가 높은 51개의 참고 서열과 동양달팽이의 arginine kinase의 아미노산 서열을 MEGA5 프로그램의 clustalW 모듈을 이용하여 multiple sequence alignment 를 수행하였다. 그 후 maximum parsimony method 와 maximum likelihood method를 통해 phylodendrogram을 도식화 한 결과 최종적으로 선택된 25개의 생물 종에 대하여 문단위로는 연체동물문과 절지동물문으로 나뉘어 지는 것을 확인할 수 있었다. 연체동물문의 경우에는 복족강 (5종), 두족강 (5종), 이매패강 (4종) 등의 생물들이 같은 군으로 묶이었으며, 절지동물문의 경우 곤충강에 속하는 나비목 (2종), 벌목 (1종), 노린재목 (2종) 및 갑각강 (5종), 거미강 (1종) 에 속하는 생물들이 같은 군으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다 (Table 1, Fig. 2).

단백질의 2차 구조 분석을 위해 GENSCAN 프로그램을 이용하여 예측된 아미노산의 서열을 토대로 하여 Psipred 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 그림 3 에서와 같이 ą-Helix 구조는 서열상에서 12영역으로 예측되었으며 ß-pleated

```
>Arginine_kinase
1      ATG GCT GAT GAA GTA GAT AGT CTA TAC CAG CGG CTC AGA GAC GCC    45
1       M   A   D   E   V   D   S   L   Y   Q   R   L   R   D   A    15

46     ACT GAG TCG AAA TCT CTG CTG AGG AAA TAC CTG ACA CCT AAT TTA    90
16      T   E   S   K   S   L   L   R   K   Y   L   T   P   N   L    30

91     TAC ACC CAG CTG AAG GGT TTG ACA ACT AAG TTC GGG GGC ACC CTC   135
31      Y   T   Q   L   K   G   L   T   T   K   F   G   G   T   L    45

136    GCA GAT TGT ATA CGA TCA GGC AGT GAG AAC ACC GAC AGC GGT GTT   180
46      A   D   C   I   R   S   G   S   E   N   T   D   S   G   V    60

181    GGC GTC TAC GCC TCT GAC CCC GAT GCC TAC ACC ACC TTC GCC CCT   225
61      G   V   Y   A   S   D   P   D   A   Y   T   T   F   A   P    75

226    CTG TTG GAC GCC GTC ATC AAG GAC TAC CAC AAG GTC TCC GAG CTC   270
76      L   L   D   A   V   I   K   D   Y   H   K   V   S   E   L    90

271    AAC CAC CCC AAC CCA GAC TTC GGA GAT GTT GAA CAC CTG GAC TTT   315
91      N   H   P   N   P   D   F   G   D   V   E   H   L   D   F   105

316    GGG GAT CTC GAC CCA TCT GGC AAA ATG ATT GTC TCC ACT CGT GTC   360
106     G   D   L   D   P   S   G   K   M   I   V   S   T   R   V   120

361    CGC GTG GGA CGT AGT CAT GGT AAT TAT GGC TTC CCT CCA GTA CTG   405
121     R   V   G   R   S   H   G   N   Y   G   F   P   P   V   L   135

406    TCA AAG GAG GAT CGT GTG GAG ATG GAA AGG ACG ACA GTT GAG GCT   450
136     S   K   E   D   R   V   E   M   E   R   T   T   V   E   A   150

451    CTC CAG AAG CTA GAT GGA GAG TTG AAG GGA ACA TAT CAT CCA CTG   495
151     L   Q   K   L   D   G   E   L   K   G   T   Y   H   P   L   165

496    ACC GGT ATG AGC AAA GAA ACA CAG CAG CAA TTG ACA GAG AAT CAT   540
166     T   G   M   S   K   E   T   Q   Q   Q   L   T   E   N   H   180

541    TTC CTC TTC AAT GAC AGT GAC AGA TTC TTG AGA GCT GCT GGT GGC   585
181     F   L   F   N   D   S   D   R   F   L   R   A   A   G   G   195

586    TAC CGA GAC TGG CCC ACA GGC CGT GGC ATT TTC TTC AAT GAC AAC   630
196     Y   R   D   W   P   T   G   R   G   I   F   F   N   D   N   210

631    AAA ACC TTC TTG GTG TGG GTG AAT GAA GAG GAC CAT TTG AGG TTC   675
211     K   T   F   L   V   W   V   N   E   E   D   H   L   R   F   225

676    ATT TCT ATG CAG CAA GGT GGC AAC TTG AAG GAG GTC TAC GTC AGA   720
226     I   S   M   Q   Q   G   G   N   L   K   E   V   Y   V   R   240

721    CTT GTC AAG GCA ATC AGA GCT CTA GAG AAC AGT GGT CTG TCC TTT   765
241     L   V   K   A   I   R   A   L   E   N   S   G   L   S   F   255

766    GCC AAA CGA GAA GGT CTA GGC TAC CTG ACC TTC TGT CCT TCA AAC   810
256     A   K   R   E   G   L   G   Y   L   T   F   C   P   S   N   270

811    TTG GGA ACC ACC CTT CGT GCC TCA GTG CAT ATC AAG ATC CCC AAA   855
271     L   G   T   T   L   R   A   S   V   H   I   K   I   P   K   285

856    CTG GCT GCC ACA CCT GAC TTC AAG GCT TTC TGC GAC AAA TAC AAC   900
286     L   A   A   T   P   D   F   K   A   F   C   D   K   Y   N   300

901    ATC CAG GCC AGA GGT ATC CAT GGG GAG CAC ACA GAG TCC GTT GGA   945
301     I   Q   A   R   G   I   H   G   E   H   T   E   S   V   G   315

946    GGC GTG TAT GAC ATT TCC AAC AAG AGA AGA CTC GGT CTC ACG GAA   990
316     G   V   Y   D   I   S   N   K   R   R   L   G   L   T   E   330

991    ATT GAA GCT ATT CAG GAG ATG CGC AGA GGT GTC GAG GCT GTC ATT  1035
331     I   E   A   I   Q   E   M   R   R   G   V   E   A   V   I   345

1036   GCA GAG GAG AAG AAA TTG GGA GGA GGC AAC TAA    1068
346     A   E   E   K   K   L   G   G   G   N   *      356
```

Fig.1. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of arginine kinase. (The red under line represents primer sequences). (Genbank accession number : KF673777)

sheet 구조는 서열상에서 6영역에서 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 2차 구조 결과를 토대로 comparative modeling 방법을 이용한 3d-jigsaw 프로그램을 이용하여 단백질 3차 구조를 예측해 보았다 (Fig. 4).

척추동물의 선천성 면역반응에서 숙주 내에는 없고 침입하는 병원성 미생물들의 표면에만 존재하는 특정 구조를 Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) 이라 하는데, lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PGN), beta-1,3-glucan, laminarin, CpG, flagellin 등이 포함된다. Laminarin은 laminaran으로도 알려져 있으며, 갈조류의 저장 polysaccharide carbohydrate로 광합성을 통해 생성되기도 한다 (Maeda and Nishizawa, 1968). Laminarin 처리

Table 1. List of species that are used in molecular phylogenetic analysis

Species	Accession No.	Species	Accession No.
Aplysia californica	XP_005099408.1	*Azumapecten farreri*	AEX08673.1
Biomphalaria glabrata	ADH59421.1	*Scylla serrata*	ACV96855.1
Semisulcospira libertina	AGN95434.1	*Neohelice granulata*	AAF43438.1
Cellana grata	BAB41096.1	*Portunus trituberculatus*	ADO22718.1
Conus novaehollandiae	ADK73590.1	*Fenneropenaeus chinensis*	AAV83993.1
Sepioteuthis lessoniana	BAA95610.1	*Litopenaeus vannamei*	ABY57915.1
Sepiella maindroni	AEK26855.1	*Spodoptera exigua*	ACU68932.1
Nautilus pompilius	BAA95594.1	*Dermatophagoides farinae*	ABU97470.1
Amphioctopus fangsiao	AEK65120.1	*Papilio polytes*	BAM19148.1
Octopus vulgaris	BAA95609.1	*Anasa tristis*	AFK29278.1
Hyriopsis schlegelii	AEO94538.1	*Triatoma vitticeps*	ABJ88949.1
Crassostrea gigas	EKC24881.1	*Nasonia vitripennis*	XP_001607122.1
Scapharca broughtonii	BAD11949.1		

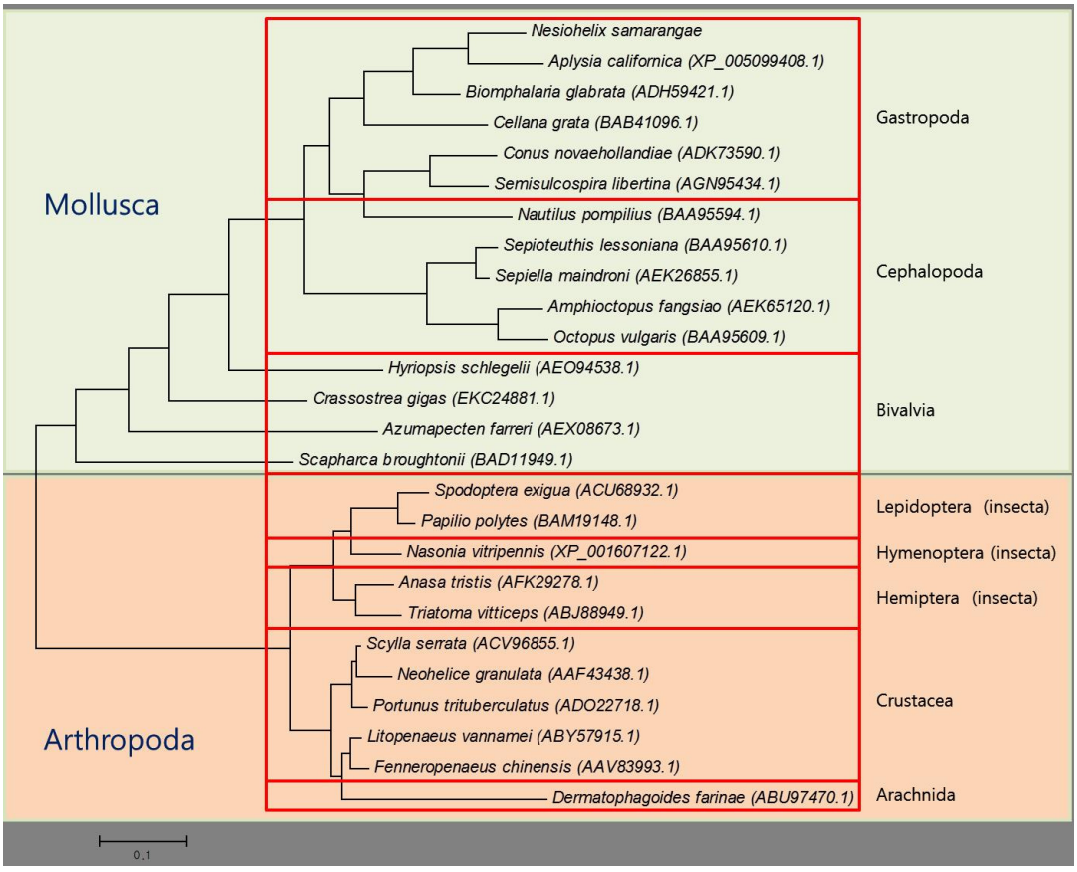

Fig. 2. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method.
The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model (Jones *et al*., 1992). The tree with the highest log likelihood (-6724.3286) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying the Maximum Parsimony method. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 26 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 332 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 (Tamura *et al*., 2011).

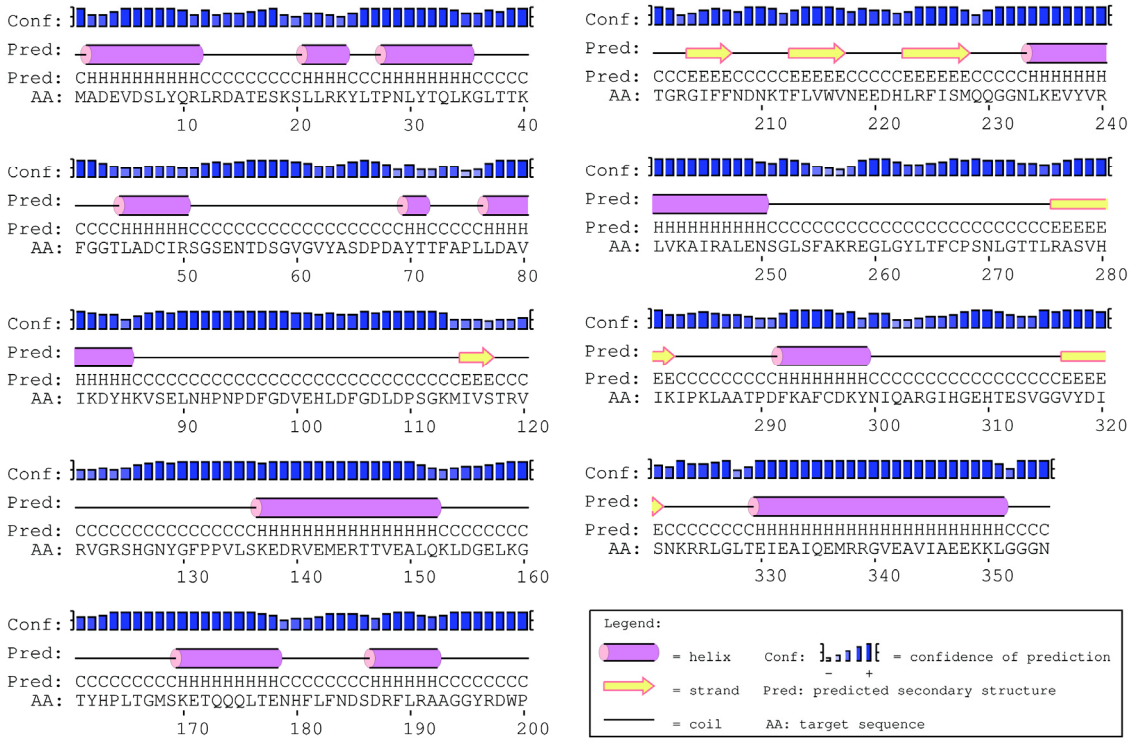

Fig. 3. Two dimensional structure prediction of arginine kinase by Psipred program.

Fig. 4. A predicted three dimensional structure of arginine kinase by 3d-jigsaw program

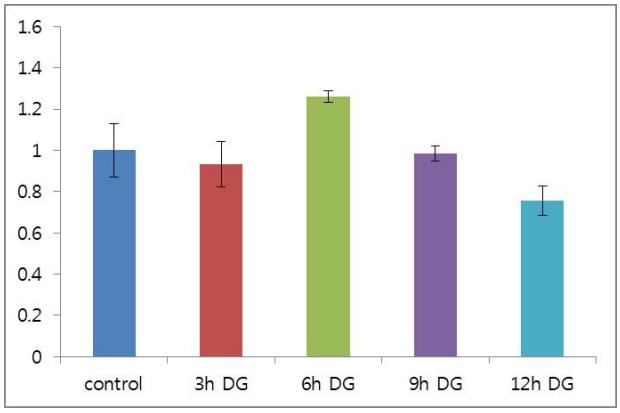

Fig. 5. Time dependent expression pattern of arginine kinase mRNA in digestive gland of *N. samarangae* after laminarin challenge. Actin was used as control. Abbreviations: DG (Digestive gland)

시간에 따른 arginine kinase의 발현양상을 확인하기 위해 동양달팽이에 순수하게 정제된 수용액의 laminarin을 처리한 후, real time RT-PCR방법을 이용하여 동양달팽이의 digestive gland 조직에서 확인하였다. 그 결과 control과 비교하였을 때 6시간에서 약 1.2배 정도 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 12시간이 지나면 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

전세계적으로 연체동물에서 선천성 면역과 관련된 유전자들의 동정에 관한 몇 가지 연구들이 보고 되었다. 진주담치/홍합 (*Mytilus edulis*) 의 경우, 척추동물이나 무척추동물에서 볼 수 있는 면역과 신경계 사이의 관계 연구에 유용한 대상이 되고 있으며 (Liu, 2008), 혈액에서 cysteine-rich antimicrobial peptides를 분리했다는 보고도 있다 (Charlet *et al*., 1996). 최근에 두 종류의 홍합, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* 에서 antimicrobial peptides가 다양하게 존재하며 절지동물에서 진화 과정을 거치는 동안 antimicrobial host defence의 구성요소 중 하나로 작용하는 것으로 밝혀졌으며, 1차 구조의 특징에 따라 defensins, mytilins, myticins, mytimycin 등의 4그룹으로 분류하기도 하였다 (Mitta *et al*., 2000). 또한, 진주조개, *Pinctada fucata* 에서 bacteria에 감염시 반응하는 면역관련 유전자인 tandem-repeat galectin (Wang *et al*., 2011) 과 innate immunity에서 핵심적인 조절인자로 작용하는 Macrophage migration inhibitory factor (MIF) 등의 cDNA 클론을 동정하고 분석하기도 하였다 (Cui *et al*., 2011). *Crassostrea hongkongensis* 에서 다양한 스트레스에 반응하는 metalloenzymes인 superoxide dismutase (SOD) 에 대한 보고도 있으며 (Yu *et al*., 2011), 가리비과에 속하는 bay scallop *Argopecten irradians*에서 pattern recognition receptors로 알려진 fibrinogen-related proteins (FREPs) 에 대한 연구 보고도 있었다 (Zhang *et al*., 2009).

또한, 심해에서 발견된 홍합, *Bathymodiolus azoricus*의 hemocytes에 *Bacillus subtilis* 와 *Vibrio parahaemolyticus*를 감염시켜 면역 시스템의 구성 요소에 대한 조사도 보고되었으며 (Bettencourt *et al*., 2009), *Achatina fulica*에서 innate immunity에 대한 연구로써 amoebocytes 로부터 유래된 Achatina amoebocyte lysate (AAL) 가 Gram-negative bacterial endotoxins 에 의해 활성화 되어 endotoxin-mediated coagulation 에 역할을 한다는 보고도 발표되어진 바 있다 (Biswas a nd Mandal, 1999).

이와 같이 후천성 면역체계가 없는 무척추동물을 대상으로 하는 연구는 선천성 면역 반응의 메커니즘을 이해하는데 매우 유용하며, 최근 연구에 의하면 연체동물의 granulocyte는 척추동물에서의 monocyte나 macrophage등의 세포와 구조와 기능이 유사하며 hemocyte 의 경우 PAMPs (pathogen associated molecular patterns) 를 인식하고 chemotaxis를 통해 이동을 한다고도 알려져 있다 (Coyne, 2011).

본 연구를 통해 연체동물인 동양달팽이에서 밝혀진 Ark는 곤충 뿐만 아니라 다른 무척추동물의 신진 대사에 중요한 기능을 가진 효소로써 구충제와 살충제의 target으로 제안되기도 하였으며 (Ilg and Werr, 2012), 무척추동물의 선천성 면역에 관여할 것으로 여겨진다.

Summary

동양달팽이의 arginine kinase 유전자는 염기서열 1065개로 이루어져있으며 355개의 아미노산으로 이루어져 있으며, BLAST 결과를 토대로 유사도가 높은 25개의 참고 서열과 동양달팽이의 arginine kinase의 아미노산 서열을 MEGA5 프로그램의 clustalW 모듈을 이용하여 multiple sequence alignment 를 수행한 결과, 연체동물문에 속하는 복족강 (5종), 두족강 (5종), 이매패강 (4종) 등에 속하는 생물들이 같은 군으로 묶였으며, 절지동물문 곤충강 에 속하는 나비목 (2종), 벌목 (1종), 노린재목 (2종) 등에 속하는 생물들이 같은 군으로 묶이고, 갑각강 (5종), 거미강 (1종) 에 속하는 생물들이 묶이는 것을 알 수 있었다. Psipred 소프트웨어를 통해 2D 구조를 비교 분석한 결과도 multiple align 및 phylodendrogram 결과와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 시간에 따른 arginine kinase의 발현양상을 확인한 결과 control에 비하여 6시간에서 약 1.2배 정도 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 12시간이 지나면 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. EST를 통해 밝혀진 *N. samarangae* 의 Ark 서열은 근연종들의 서열과 일치함을 알 수 있었으며, 본 연구 결과를 통

해 무척추동물에서의 선천성 면역 관련 유전자 연구에 동양달팽이가 좋은 모델이 될 수 있음을 제시하고 있다.

Acknowledgements

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0013818).

REFERENCES

Adams, R.J., Ewing, J., Dujovny, M., and Misra, M. (1998) Editorial commentary. *J. Stroke Cerebrovasc Dis.*, **7**: I-IV.

Bettencourt, R., Dando, P., Collins, P., Costa, V., Allam, B., and Serrao Santos, R. (2009) Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, **152**: 278-289.

Biswas, C., and Mandal, C. (1999) The role of amoebocytes in endotoxin-mediated coagulation in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. *Scand. J. Immunol.*, **49**: 131-138.

Bragg, J., Rajkovic, A., Anderson, C., Curtis, R., Van Houten, J., Begres, B., Naples, C., Snider, M., Fraga, D., and Singer, M. (2012) Identification and characterization of a putative arginine kinase homolog from *Myxococcus xanthus* required for fruiting body formation and cell differentiation. *J. Bacteriol.*, **194**: 2668-2676.

Braun, R.C., Pedretti, K.T., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Birkett, C.L., and Roberts, C.A. (2001) Parallelization of local BLAST service on workstation clusters. *Future Generation Computer Systems,* **17**: 745-754.

Buermans, H.P., Ariyurek, Y., van Ommen, G., den Dunnen, J.T., and t Hoen, P.A. (2010) New methods for next generation sequencing based microRNA expression profiling. *BMC Genomics*, **11**: 716.

Burge, C., and Karlin, S. (1997) Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.*, **268**: 78-94.

Burge, C.B., and Karlin, S. (1998) Finding the genes in genomic DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**: 346-354.

Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Bulet, P. (1996) Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.*, **271**: 21808-21813.

Chistoserdovai, L. (2010) Functional metagenomics: recent advances and future challenges. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **26**: 335-352.

Coyne, V. (2011) The importance of ATP in the immune system of molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, **8**: 48-55.

Cui, S., Zhang, D., Jiang, S., Pu, H., Hu, Y., Guo, H., Chen, M., Su, T., and Zhu, C. (2011) A macrophage migration inhibitory factor like oxidoreductase from pearl oyster *Pinctada fucata* involved in innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol*, **31**: 173-181.

Dumas, C., and Camonis, J. (1993) Cloning and sequence analysis of the cDNA for arginine kinase of lobster muscle. *J. Biol. Chem.*, **268**: 21599-21605.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, **5**: 113.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, **32**: 1792-1797.

Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*, **8**: 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, **8**: 175-185.

Greenbaum, D., Luscombe, N.M., Jansen, R., Qian, J., and Gerstein, M. (2001) Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. *Genome Res.*, **11**: 1463-1468.

Hegde, P.S., White, I.R., and Debouck, C. (2003) Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol*, **14**: 647-651.

Huang, X., and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, **9**: 868-877.

Ilg, T., and Werr, M. (2012) Arginine kinase of the sheep blowfly *Lucilia cuprina*: Gene identification and characterization of the native and recombinant enzyme. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* **102**: 115-123.

Iwanaga, S., and Lee, B.L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **38**: 128-150.

Jarilla, B.R., and Agatsuma, T. (2010) Phosphagen kinases of parasites: unexplored chemotherapeutic targets. *Korean J Parasitol,* **48**: 281-284.

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.

Lang, A.B., Wyss, C., and Eppenberger, H.M. (1980) Localization of arginine kinase in muscles fibres of *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **1**: 147-161.

Liu, D.W. (2008) Opioid peptides and innate immune response in mollusc. *Protein Pept. Lett.*, **15**: 683-686.

Maeda, M., and Nishizawa, K. (1968) Fine structure of laminaran of Eisenia bicyclis. *J. Biochem.,* **63**: 199-206.

McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**: 404-405.

Mitta, G., Vandenbulcke, F., and Roch, P. (2000) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS. Lett*., **486**: 185-190.

Newsholme, E.A., Beis, I., Leech, A.R., and Zammit, V.A. (1978) The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle. *Biochem. J*., **172**: 533-537.

Reddy, S.R., Roustan, C., and Benyamin, Y. (1991) Purification and properties of two molecular forms of arginine kinase from the adductor muscle of the scallop, *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol. B*., **99**: 387-394.

Reddy, S.R., Houmeida, A., Benyamin, Y., and Roustan, C. (1992) Interaction in vitro of scallop muscle arginine kinase with filamentous actin. *Eur. J. Biochem*., **206**: 251-257.

Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*., **16**: 276-277.

Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest*., **109**: 1351-1359.

Suzuki, T., and Furukohri, T. (1994) Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glycocyamine kinase and arginine kinase from invertebrates. *J. Mol. Biol*., **237**: 353-357.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*., **28**: 2731-2739.

Wang, Z., Jian, J., Lu, Y., Wang, B., and Wu, Z. (2011) A tandem-repeat galectin involved in innate immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Genomics*, **4**: 229-236.

Yu, Z., He, X., Fu, D., and Zhang, Y. (2011) Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish Shellfish Immunol*., **31**: 533-539.

Zhang, H., Wang, L., Song, L., Song, X., Wang, B., Mu, C., and Zhang, Y. (2009) A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor. *Fish Shellfish Immunol*., **26**: 56-64.