

동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 의 expressed sequence tags (ESTs) 로부터 분리한 2종류의 Serpin 유전자 분석

박소영², 정지은³, 황희주¹, 왕태훈¹, 박은비¹, 김용민⁴, 이준상⁵, 한연수⁶, 양승하², 이용석¹

¹순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과, ²순천향대학교 의과대학 병리학교실, ³동아대학교 생명자원과학대학 응용생물공학과, ⁴국립공원관리공단 태안해안국립공원사무소, ⁵강원대학교 환경연구소, ⁶전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부

Identification and *in silico* analysis of two types of serpin genes from expressed sequence tags (ESTs) of the Oriental land snail, *Nesiohelix samarangae*

So Young Park², Ji eun Jeong³, Hee Ju Hwang¹, Tae Hun Wang¹, Eun Bi Park¹, Yong Min Kim⁴, Jun-Sang Lee⁵, Yeon Soo Han⁶, Seung-Ha Yang² and Yong Seok Lee¹

¹Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-600, Korea

²Department of Pathology, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan, Chungnam 330-930, Korea

³Department of Applied Biology College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

⁴Korea National Park Service, Taeanhaean National Park Office

⁵Institute of Environmental Research, Kangwon National University, Korea

⁶Division of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Korea

ABSTRACT

Serpins are a group of proteins involved in the regulation of serine and other type of proteases, and have been identified in many kinds of organisms from invertebrates to vertebrates. Serpins are known to regulate the proteolytic cascades of the innate immune pathways in addition to their roles in blood coagulation, angiogenesis, fibrinolysis, inflammation and tumor suppression. In this study, we have isolated two partial serpin gene fragments from expressed sequence tags (ESTs) of *Nesiohelix samarangae*. Dotplot analysis indicates that they are of two different types, Ns-serpin type 1 and Ns-serpin type 2. Ns-serpin type 1 has 819 bp coding region (272 amino acids), whereas Ns-serpin type 2 has 555 bp coding region (185 amino acids). Molecular phylogenetic analysis shows that the identified serpins have high similarities to their counterparts in the California sea slug, *Aplysia californica*. Yet, the precise biological and immunological roles of these Ns-serpins remain to be further investigated using RNA interference and other molecular techniques.

Key words: *Nesiohelix samarangae*, EST, laminarin, serpin

Introduction

Serpin은 다양한 기능을 갖는 protease inhibitor superfamily로서 처음 그 기능이 규명된 serine proteases inhibitors에서 그 이름이 유래되었으며 serine protease의 활성을 억제하여 immune pathway의 negative regulator로 선천성 면역에 필수적인 역할을 한다고 알려져 있다 (Wei, Yang *et al.* 2012). 포유동물에서 serpin은 혈액응고와 염증, 보체활성화 뿐만 아니라 호르몬 전달, corticosteroid

Received: June 14 2014; Revised: June 20 2014; Accepted: June 27 2014

Co-corresponding author : Seung-ha yang & Yong Seok Lee

Tel: +82-41-570-2423 e-mail: ysh1450@sch.ac.kr

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

1225-3480/24525

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.

binding, 혈압 조절 등의 생리학적 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 절지동물에서는 선천성 면역, 형태발생과 성장과 연관되어 있다고 알려져 있다 (Silverman, Bird *et al.* 2001, Tirloni, Seixas *et al.* 2014). 대부분의 serpin이 serine proteases를 억제하지만 caspases와 cathepsins과 같은 일부의 serpin은 cysteine proteases를 억제하며 호르몬 전달과 혈압조절에도 영향을 미친다고 알려져 있다 (Silverman, Bird *et al.* 2001). SerpinB3의 경우 apoptotisis의 조절과 면역에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데 최근 체내에서 serpinB3의 발현 변화는 면역항상성과 자기 내성에 영향을 주어 자가면역의 disorder를 유발한다는 보고도 있었다 (Gatto, Iaccarino *et al.* 2013).

선천성 면역에 관련된 연구는 주로 mouse의 비만세포 등 척추동물을 대상으로 진행되어 왔으나 (Supajatura, Ushio *et al.* 2002), 최근의 연구는 후천성 면역계가 없는 투구게 (horseshoe crab), 민물게 (freshwater crayfish), 멍게 (ascidians), 초파리 (*Drosophila melanogaster*), 쉬파리 (*Salcophaga peregrine*), 누에나방 (*Bombyx mori*), 담배막 각시나방 (*Manduca sexta*), 참검정풍뎠이 (*Holotrichia diomphalia*) 및 동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 와 같은 무척추동물을 대상으로 활발히 진행되고 있다 (Jeong and Lee 2013, Sadaaki Iwanaga and Lee 2005).

본 연구는 동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 를 이용하여 immune elicitor 인 laminarin을 처리한 실험군 및 그렇지 않은 대조군으로 나누어 각각의 cDNA 라이브러리를 제작한 후 random sequencing을 실시하고 분석하여 두 가지 군으로부터 얻어진 서열을 비교 발현유전체학적으로 분석하여 laminarin 처리 전 후 발현의 변화를 보인 serpin 유전자를 선정한 후 유전자의 염기서열 및 아미노산 염기서열을 규명하고, EST 내에 몇 가지 type의 serpin이 존재하는지 규명하여 선천성 면역 관련 연구의 기초를 마련하고자 하였다.

Material and Methods

1. Sampling

본 연구에 사용되어진 동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 는 충청남도 태안군 근흥면 가의도에서 채집하였으며 mRNA를 추출하기 위해 72시간 이전부터 먹이를 주지 않은 채 단기간 사육하여 실험에 사용하였다.

2. cDNA library construction

순수하게 정제 되어진 수용성의 laminarin 100 μ l / ml 를 3시간 처리한 실험군과 아무것도 처리하지 않은 대조군 각각에 대해 cDNA library를 구축하였다. 각각의 동양달팽이를 해부 현미경하에서 소화관을 제거한 뒤 RNeasy Mini Kit

(Qiagen, Cat.No. 74104) 를 사용하여 total mRNA를 정제한 후 oligo dT와 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성한 후 Stratagene cDNA Library Construction Kit 사용하여 cDNA library를 구축하였다. LD-PCR 법과 primer extension 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. 염기서열분석

E. coli strain BM25.8을 이용하여 lamda linear form의 TriplEx2를 circular form 의 pTriplEx2로 전환한 후 LB agar plate (cabenicilline) 에 plating 한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. NucleoGen Plasmid Purification Kit를 사용하여 Plasmid를 정제한 후에 Sequencing을 위해 자동염기서열분석기 (AB-3730XL, Applied biosystems) 를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

4. 생물정보학을 활용한 전사체 비교분석

구축되어진 각각의 cDNA library를 random sequencing하여 생성되어진 chromatopherogram 파일은 phred score 20 이상의 조건으로 base calling 한 후 pTriplEX2 서열 및 cross_match를 활용한 vector masking 및 EMBOSS 패키지의 trimest 프로그램을 활용한 poly-A tail 제거 작업을 수행하였다. 이러한 작업을 통해 확보된 clean mFASTA 형태의 서열은 nr 데이터베이스 및 동양달팽이 전용데이터베이스 (<http://www.edunabi.com/~nsdb>) 에 설치되어져 있는 BLAST 프로그램을 이용하여 annotation 작업을 실시하였으며 laminarin 처리 후 증감이 있는 유전자 후보군 리스트를 확보하였다.

5. Serpin 아미노산 서열의 추출

Laminarin 처리 후 증감이 관찰 되어진 유전자 후보군에서 serine peptidase inhibitor, clade B (Serpin 3) 유전자로 annotation 되어진 서열은 cap3 프로그램을 통하여 assembly 하여 contig를 작성하였으며 Genscan 프로그램을 사용하여 아미노산 서열을 추출하였다.

6. Multiple alignment 및 phylogenogram 작성

동양달팽이의 serpin 유전자를 in silico 스크리닝하기 위하여 NCBI 에서 mouse 의 serpin 유전자 274 type (isoform 포함) 전체를 다운로드 받은 후 query 서열로 하여 동양달팽이 전용 데이터베이스 (<http://www.edunabi.com/~nsdb>) 에 설치되어져 있는 laminarin 처리 전후의 EST DB에

```

>NS_Serpin Type1
1      GCC AAC GAC GTC GAA CTG CAC ACA GCC TAC GCT CTG TTC GTC AAC 45
  1      A  N  D  V  E  L  H  T  A  Y  A  L  F  V  N  15
46     CCC AAC ATC CCC ATT GAG CAG CAG TTT GTC TCC GAT GCC AGA ACC 90
 16     P  N  I  P  I  E  Q  Q  F  V  S  D  A  R  T  30
91     TAC TAC CAG GCC AAG AGT TCC AAC TTT GAT CTG GCG GCG GTG GGA 135
 31     Y  Y  Q  A  K  S  S  N  F  D  L  A  A  V  G  45
136    GGG CCC GAG AAG GAG ATC AAT GAT TAC GTG GAG AAC AAG ACA CAG 180
 46     G  P  E  K  E  I  N  D  Y  V  E  N  K  T  Q  60
181    GGA ATC ATC CAG AAT CTG CTT CCT AAA GGA AGC GTG GAT GCC TCC 225
 61     G  I  Q  N  L  V  P  P  K  G  S  V  D  A  S  75
226    ACA GTG GCA GTT CTC GTC AAC ACC ATC TTC TTC AAC GGA ACC TGG 270
 76     T  V  A  V  L  V  N  T  I  F  F  N  G  T  W  90
271    CAG ACT CCG TTC CAG CCC AGG CAC ACA CAG ACA AAG GAC TTC CAC 315
 91     Q  T  P  F  P  R  H  T  Q  T  K  G  D  F  H  105
316    AAA CTG GAC GGG ACC AAG TCT CAG GTG AAC ATG ATG TAT GAT GAA 360
 106    K  L  D  G  T  K  S  Q  V  N  M  M  Y  D  E  120
361    AGG TAC GTG AAC ATC AAG AGA AGT GTC CTC GGG GTT GAC GTG GCC 405
 121    R  Y  V  N  I  K  R  S  V  L  G  V  D  V  A  135
406    GAG CTG CCC TTC GAG GGA GAC CGT TTC GCT CTC TAC ATC GCC CTG 450
 136    E  L  P  F  E  G  D  R  F  A  L  Y  I  A  L  150
451    CCC AAC AAG GTT GAC GGA ATT AAA GAT CTT GAG AGC GCT CTA GTA 495
 151    P  N  K  V  D  G  A  I  K  D  L  E  S  A  L  V  165
496    GTC CCC GGA AAT GTG GAT CAG CTG TTC CAA GGA CTA ACC CCA CGC 540
 166    V  P  G  N  V  D  Q  L  F  Q  G  L  T  P  R  180
541    CGT GCC AGG GGA ATC AGC AGT GCC TCC AAG GTG GTC ATC TCT GAT 585
 181    R  A  R  G  I  S  S  A  S  K  V  V  I  S  D  195
586    GTC CTG CAC AAA GCT GTC ATT GAC GTC ACC GAG ACA GGG ACA GTG 630
 196    V  L  H  K  A  V  I  D  V  T  E  T  G  T  V  210
631    GCA GCC GCA GCC ACG GCG GTC ATC GTT GGA ATT ACC GCA GTC TTA 675
 211    A  A  A  A  T  A  V  I  V  G  I  T  A  V  T  225
676    GAG CCG CCA ACA GAA ACC TTT AAT GCT GAC CAT TCG TTT GTG TTC 720
 226    E  P  P  T  E  T  F  N  A  D  H  S  F  V  F  240
721    TTC CTT AGA AAG CAG ACG AAC CAC ATT TTG TTC GAG GGA AAA 765
 241    F  L  R  D  K  Q  T  N  H  I  L  F  E  G  K  255
766    TTC TCT GGC TAT TAA 780
 256    F  S  G  Y  *  260
  
```

Fig. 1. The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Ns-serpin type 1.

tBLASTn 프로그램을 활용하여 스크리닝 하였다. 추출되어진 동양달팽이의 serpin 서열을 클러스터링 및 어셈블리 하여 type 별로 분류한 후 BLAST 프로그램 및 NCBI nr 데이터 베이스를 활용하여 연체동물 문에 속하는 생물 및 기타생물들의 관련 참고서열을 추출하였으며, homology가 가장 높은 아미노산 서열을 선택하여 관련 참고서열로 활용하였다 (Braun, Pedretti *et al.* 2001). 추출된 참고서열들을 MEGA6 프로그램의 clustalW 모듈을 이용하여 multiple sequence alignment 를 수행하였다 (Edgar 2004, Edgar 2004). 그 후 Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model method를 통해 phylogenogram을 도식화하였다 (Jones, Taylor *et al.* 1992, Tamura, Peterson *et al.* 2011).

7. 2D 구조를 이용한 단백질 구조 비교분석

단백질의 2차 구조 분석을 위해 genscan 프로그램을 이용하여 확보되어진 아미노산 서열을 Psipred 프로그램을 활용하

여 2D 구조를 예측하였으며, 3D-jigsaw 프로그램을 활용하여 단백질 3차 구조를 modeling 하였다.

Results and Discussion

Serpin은 inflammation, blood coagulation, fibronolysis와 complement activation에 관여하는 serine proteinase의 중요한 조절자로, proteinase의 active site와 상호작용하는 exposed reactive site loop를 가지고 있어 매우 안정적인 serpin-proteinase 복합체를 형성할 수 있다 (Kanost 1999). 형성된 복합체는 catalytic cycle의 achy-intermediate 단계를 멈추어 target 단백질의 활성 장에 유발한다 (Ruby HP Law, Qingwei *et al.* 2006). 척추 동물에서는 침투한 pathogens의 proteinase를 억제하여 면역반응에 serpin이 잠재적 역할을 하며, 절지동물에서는 항기생충 방어기작과 혈액 응고 및 prophenoloxidase 활성화 기작을 조절한다고 알려져 있다 (Miura, Kawabata *et al.* 1995, Armstrong 2001). serpin은 나비목을 포함한 절지동물

>NS_Serpin Type2

47	ATT	CCA	GGA	GCT	CTA	ACT	TTG	CAG	TCT	TTG	AGA	AGT	TAA	TTC	ACT	91
16	I	P	G	A	L	T	L	Q	S	L	R	S	*	F	T	30
92	TGA	GTG	ACC	ACG	CTA	ACC	GTC	GTA	AAA	TTA	AGA	GGC	TGT	ATC	AGA	136
31	*	V	T	T	L	T	V	V	K	L	R	G	C	I	R	45
137	AAA	TAG	CAT	CAG	AAC	NAC	CTG	GAT	CTT	TCA	TCT	ACT	CTC	CAT	ACA	181
46	K	*	H	Q	N	N	L	D	D	S	S	T	L	H	T	60
182	GTT	CTG	GGA	CTG	ACA	TCC	CTT	CCA	GGC	AAC	TCT	GCT	CAC	CAG	GCC	226
61	V	L	G	L	T	S	L	P	G	N	S	A	H	Q	A	75
227	TAC	CAT	GAC	CTC	ATT	GTT	CAG	CTT	AAC	ACA	ACC	CAC	AAT	GTA	AAA	271
76	Y	H	D	L	I	V	Q	L	N	T	T	H	N	V	K	90
272	ATT	AAC	ACA	GCG	AAT	GGC	ATC	TTT	GTG	AAC	CCC	GAT	GCT	GTG	CTA	316
91	I	N	T	A	N	G	I	F	V	N	P	D	A	V	L	105
317	AAA	GAG	CAG	TTT	GTG	CAA	GAT	GTC	ACC	ACA	GAA	TAT	TTT	GCC	AGA	361
106	K	E	Q	F	V	Q	D	V	T	E	Y	F	A	R	120	
362	AGT	TCC	AAC	TTT	GAC	CTG	GCT	GCA	GTG	GGT	GGT	CCT	GAA	AAG	GCA	406
121	S	S	N	F	D	L	A	A	V	G	G	P	E	K	A	135
407	ATC	AAC	GAT	TTT	GTC	AAC	GCC	ACA	ACT	GAG	GGC	ATG	ATA	AGC	AAT	451
136	I	N	D	F	N	A	T	T	E	T	M	I	S	N	150	
452	CTT	GTT	CCT	AGA	GGA	TCC	ATA	ACT	GAC	TTG	ACT	GTG	GTG	GTT	TTA	496
151	L	V	P	R	G	S	I	T	D	L	T	V	V	V	L	165
497	GTC	AAC	ACA	GTC	TAC	TTC	AAA	GGA	AAC	TGG	GCA	ATG	AAA	TTC	TCA	541
166	V	N	T	V	Y	F	K	G	N	W	A	M	K	F	S	180
542	GAG	TAC	TCT	ACT	AGA	AAA	CAA	GAC	TTT	CAC	CAG	CTG	GGG	GGA	GCC	586
181	E	Y	S	T	R	K	Q	D	F	H	Q	L	G	G	A	195
587	ACA	TCT	AAG	GTG	GAC	ATG	ATG	TAC	AGC	GAG	AGA	TAT	GTC	AAT	ATC	631
196	T	S	K	V	D	M	M	Y	S	E	R	Y	V	N	I	210
632	AAG	AGA	AAC	GTG	CAG	GGA	GTT	GAT	GTT	GCC	GAG	TTG	CCT	TTT	GAA	676
211	K	R	N	V	Q	G	V	D	V	A	E	L	P	F	E	225
677	GAC	GAA	CGG	TTC	TCT	CTC	TAC	ATC	GCC	CTG	CCG	CAG	ATG	ACT	GAT	721
226	D	E	R	F	S	L	Y	I	A	L	P	Q	M	T	D	240
722	GGA	ATT	ACT	GCC	CTT	GAA	AAC	CTC	CTA	GTC	AGC	CCA	GGT	TAT	ACA	766
241	G	I	T	A	L	E	N	L	L	V	S	P	G	Y	T	255
767	GAT	CAG	CTG	TTT	GAA	GGA	CTG	ACC	AGT	GTC	CAT	GTC	AAA	CTC	AGC	811
256	D	Q	L	F	E	G	L	T	S	V	H	V	K	L	S	270
812	ATT	CCA	AGA	TTT	AGG	ATC	GAG	ACC	TTG	CTT	GTA	CTG	ACC	TCT	GCT	856
271	I	P	R	F	R	I	E	T	L	L	V	L	T	S	A	285
857	CTC	AGA	CAA	CTA	GGC	ATT	GTG	AAA	TCT	TTT	GAC	AAA	AGC	TCT	GCC	901
286	L	R	Q	L	G	I	V	K	S	F	D	K	S	S	A	300
902	AAT	---	907													
301	N	X	301													

Fig. 2. The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Ns-serpin type 2

물의 hemolymph에서 분리되었으며 가재와 참게에서도 발견되었다 (Kanost 1999). 바지락을 포함한 다양한 연체동물에서도 serpin이 선천성 면역에 연관되어 있음이 밝혀졌다 (Wei, Yang *et al.* 2012, Jeffroy, Brulle *et al.* 2013, Maldonado-Aguayo, Nunez-Acuna *et al.* 2013).

EST 서열에서 *in silico* 스크리닝을 통해 추출되어진 serpin 유전자는 총 3개의 클론 (Ns-T-2-3a_D01, Ns-C-1-3a_D11 및 Ns-C-2-1a_I15) 이었다. 클러스터링 및 어셈블리 결과 Ns-C-1-3a_D11 와 Ns-C-2-1a_I15 두 개의 클론은 어셈블리가 되었으며 나머지 한 클론인 Ns-T-2-3a_D01 은 어셈블리가 되지 않았다. 그 결과 본 연구에서 사용되어진 EST 서열에서 serpin 유전자는 2가지 type 으로 추정되었다.

Serpin type 1 (Ns-C-1-3a_D11 와 Ns-C-2-1a_I15 의 contig 서열) 의 경우 유전자의 서열 중 코딩 영역은 총 819

bp였으며, 272개의 아미노산으로 이루어져 있었으며 염기서열의 GC 함량은 52%였다. Met (ATG) 으로 시작하지 않는 아미노산 조성을 가지고 있는 partial 서열이었으며, Valine (V) 잔기가 27개로 가장 많았고, Leucine (L) 잔기가 22개, Alanine (A) 잔기 21개 순 이었다 (Fig. 1).

Serpin type 2 (Ns-T-2-3a_D01) 의 경우 유전자의 서열 중 코딩영역이 555 bp 이었으며, 185개의 아미노산으로 이루어져 있었으며, 염기서열의 GC 함량은 46% 였다. Val (V) 잔기가 20개로 가장 많았고, Asp (N) 잔기가 15개, Leu (L) 잔기가 14개, Ala (A) 잔기 14개 순 이었다 (Fig. 2).

Ns-serpin type 1과 type 2의 dotplot 분석 결과 Ns-serpin type 1과 Ns-serpin type 2는 일부 유사한 서열을 가지고 있으나 서로 다른 서열임이 확인되었다 (Fig. 3). 또한 BLAST 결과를 바탕으로 유사도가 높은 참고서열과 동양달팽이의 serpin 아미노산 서열을 MEGA6 프로그램의

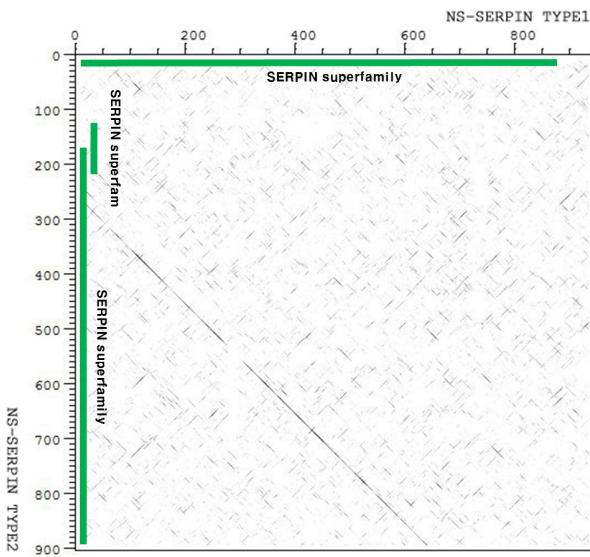


Fig. 3. The dotplot analysis between Ns-serpin type 1 and Ns-serpin type 2.

clustalW 엔진을 이용하여 multiple sequence alignment 를 수행한 후 Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model method를 통해 phylogenogram을 도식화한 결과 Fig. 4에서 보여지는 바와 같이 Ns-serpin type 1 및 type 2의 아미노산 서열을 포함하여 17개의 생물종에서 보존되어진 부분이 여러군데에서 발견되었다. Fig. 5의 phylogenogram에서 척삭동물의 포유강 9종, 조류강 1종, 양서류 1종과 해초강 1종, 절지동물의 거미강 1종과 곤충강 1종이 같은 군으로 묶였으며, 연체동물문의 경우 동양달팽이의 두 가지 type 을 포함한 복족강 4종이 같은 군으로 묶이는 것을 확인하였다 (Table 1).

그 후 단백질의 2차 구조 분석을 위해서 Genscan 프로그램을 이용하여 확보되어진 아미노산 서열을 Psipred 프로그램을

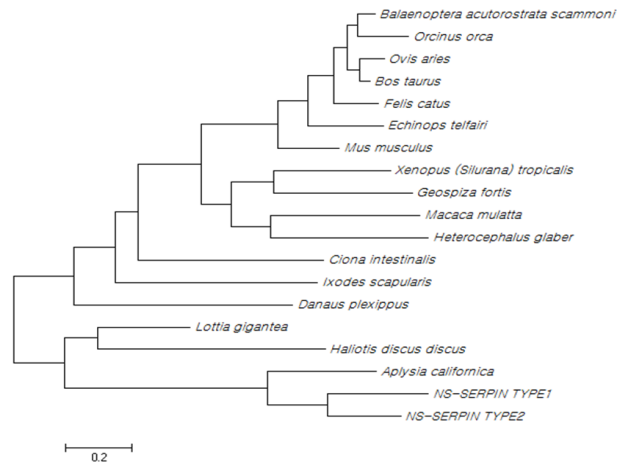


Fig. 5. Molecular phylogenetic analysis of Ns-serpin type 1 and Ns-serpin type 2. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTTmatrix-based model (Jones, Taylor *et al.* 1992). The tree with the highest log likelihood (-4098.6490) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 19 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 134 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura, Stecher *et al.* 2013).

활용하여 2D 구조를 예측한 결과 type 1 serpin (A)의 경우 α -Helix 구조는 서열상에서 5개 영역으로 예측되었고 β -pleated sheet 구조는 서열상에서 16개 영역으로 예측되었으나, type 2 serpin (B)의 경우에는 4개의 α -Helix 구조와 9개 영역의 β -pleated sheet 구조를 서열상에서 가지는 것으로 예측되어 구분되었다 (Fig. 6). 예측된 2차 구조를 바탕으로

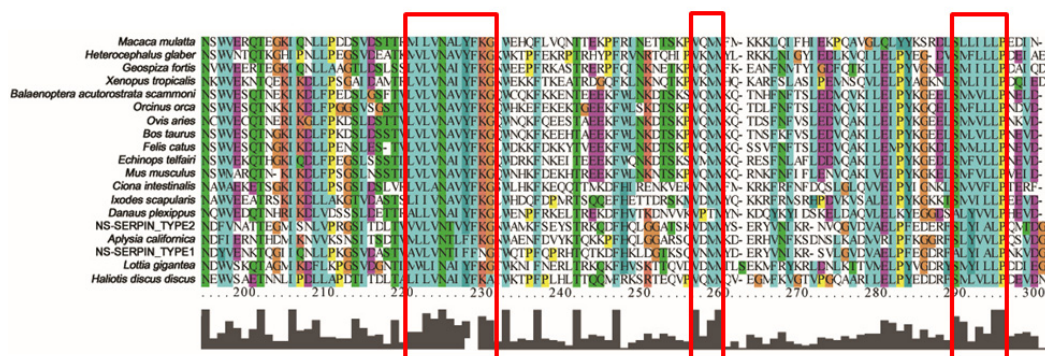


Fig. 4. The multiple alignment of two Ns-serpins with known serpin sequences.

Table 1. List of species used in molecular phylogenetic analysis

Species	Accession No.	Species	Accession No.
<i>Aplysia californica</i>	XP_005103480.1	<i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i>	XP_007192077.1
<i>Lottia gigantea</i>	ESO86044.1	<i>Macaca mulatta</i>	XP_002801013.1
<i>Haliotis discus discus</i>	ADQ43245.1	<i>Geospiza fortis</i>	XP_005425906.1
<i>Ciona intestinalis</i>	XP_002119928.1	<i>Orcinus orca</i>	XP_004268261.1
<i>Ixodes scapularis</i>	EEC07268.1	<i>Ovis aries</i>	XP_004020624.1
<i>Echinops telfairi</i>	XP_004703185.1	<i>Danaus plexippus</i>	EHJ63957.1
<i>Felis catus</i>	XP_003995291.1	<i>Heterocephalus glaber</i>	XP_004858527.1
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	AAI57632.1	<i>Bos taurus</i>	XP_002697900.3
<i>Mus musculus</i>	CAE51415.1		

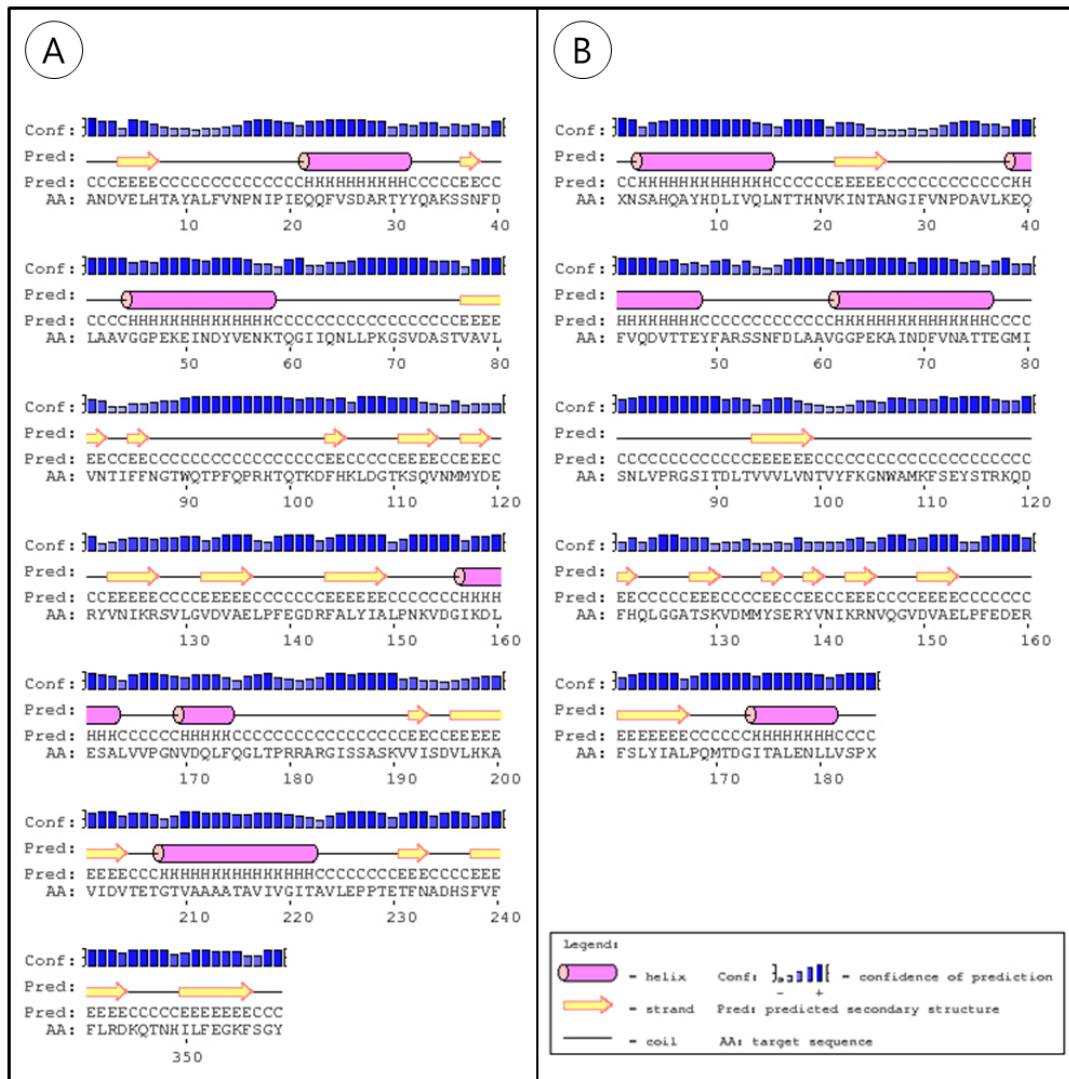


Fig. 6. 2D structure prediction of Ns-serpin type 1 and Ns-serpin type 2 by Genscan program.

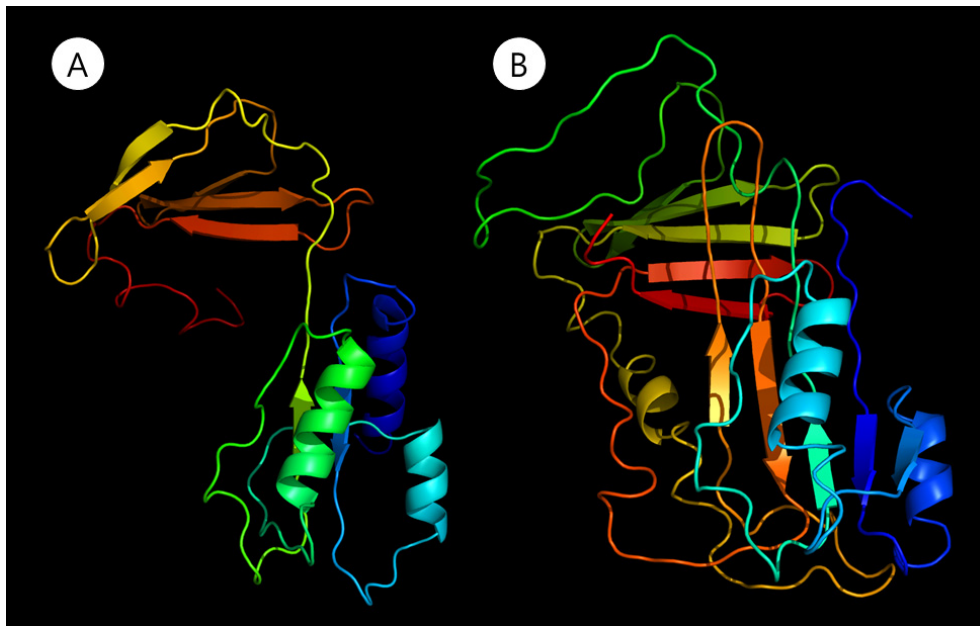


Fig. 7. A predicted 3D structure of Ns-serpin type 1 (A) and Ns-serpin type 2 (B) by 3D-jigsaw program.

3D-jigsaw 프로그램을 활용하여 단백질 3차 구조를 modeling 한 결과에서도 2가지 type의 serpin이 상이한 3차 구조를 가지는 것으로 예측되었다 (Fig. 7).

Laminaran으로도 알려져 있는 laminarin은 숙주 내에는 없는 병원성 미생물들의 표면에만 존재하는 특정 구조인 Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) 의 일종으로 면역유발물질이며 갈조류의 저장 polysaccharide로 광합성을 통해 생성되기도 한다 (Maeda and Nishizawa 1968, Jeong and Lee 2013).

현재까지 다양한 연체동물에서 선천성 면역과 관련된 유전자의 동정에 대한 연구가 보고되고 있다. 진주조개 (*Pinctada fucata*) 의 경우 bacteria 감염 시 반응하는 면역 관련 유전자인 tandem-repeat galectin (Wang, Jian *et al.* 2011) 과 선천성 면역 조절인자로 작용하는 Macrophage migration inhibitory factor (MIF) 의 cDNA 클론이 동정되었으며 (Cui, Zhang *et al.* 2011), 홍콩굴 (*Crassostrea hongkongensis*) 에서는 스트레스에 반응하는 superoxide dismutase에 대한 보고가 있었다 (Yu, He *et al.* 2011). 또한 가리비과의 *Argopecten irradians*에서는 pattern recognition receptors로 알려진 fibrinogen-related proteins (FREPs) 가 보고되기도 하였다 (Zhang, Wang *et al.* 2009). Coyne에 의하면, 연체동물의 granulocyte가 척추동물의 monocyte나 macrophage등과 구조와 기능이 유사한 것으로 밝혀졌으며 hemocyte는 pathogen associated molecular patterns를 인식한다는 것이 밝혀졌다 (Coyne 2011, Jeong and Lee 2013). 이처럼 선천성 면역 반응을 얻

구하는데 있어 후천성 면역체계가 없는 무척추동물을 이용하는 것은 선천성 면역 반응을 이해하는데 유용한 것으로 보인다. 현재 많이 활용되고 있는 곤충뿐만 아니라 연체동물과 같은 무척추동물 및 포유류, 조류 및 양서류의 척삭동물의 선천성 면역에 중요한 기능을 갖는 효소로 척추동물과 무척추동물의 선천성 면역 사이의 관계 연구에 유용한 대상이 될 것으로 여겨진다.

본 연구에서 밝혀진 동양달팽이의 2가지 type의 serpin은 laminarin 처리 전에는 type 1에 해당하는 2개의 클론이 처리 후에는 type 2에 해당하는 클론이 1개 발견되어 서로 type 이 달랐다. 이러한 관점에서 향후 유전자침묵 (gene silencing) 기술인 RNA interference 방법을 이용하여 Ns-serpin 1, 2를 knock-down 한 후 동양달팽이에 다양한 미생물 (그람음성균, 그람양성균, 곰팡이) 을 감염하여 mortality를 조사함으로써 Ns-serpin type 1과 Ns-serpin type 2의 구체적인 면역학적 기능을 구명할 수 있을 것으로 사료된다.

Summary

동양달팽이의 EST 에서 serpin 유전자는 2가지 type이 추정되었다. Ns-serpin type 1 (partial) 서열의 코딩 영역은 총 819 bp 이었으며, 272개의 아미노산으로 이루어져 있었으며, Ns-serpin type 2 (partial) 의 코딩영역은 총 555 bp, 185 개의 아미노산으로 이루어져 있었다. Laminarin 처리 전에는 Ns-serpin type 1이 2개 발현되었으며 처리 후에는

Ns-serpin type 2가 1개 발현되고 있었다. BLAST 결과를 바탕으로 유사도가 높은 17개의 참고 서열과 동양달팽이의 Ns-serpin type 1, 2의 아미노산 서열을 MEGA6 프로그램의 clustalW 엔진을 이용하여 multiple sequence alignment 를 수행한 결과, 척삭동물의 포유강 9종, 조류강 1종, 양서류강 1종과 척삭동물인 해초강, 절지동물의 거미강 1종과 곤충강 1종이 같은 군으로 묶였으며, 연체동물문의 경우 동양달팽이의 두 가지 type 을 포함한 복족강 4종이 같은 군으로 묶이는 것을 확인하였다. Psipred 프로그램을 활용하여 예측한 2D 구조도 multiple align 및 phylogenogram 결과와 연관이 있음을 확인할 수 있었다. EST를 통해 밝힌 동양달팽이의 두 가지 type의 Ns-serpin 서열은 *Aplysia californica* 등의 근연종들의 서열과 유사하였다. 본 연구에서는 무척추동물에서의 선천성 면역과 연관이 있는 것으로 잘 알려진 두 종류의 serpin 유전자 서열을 동양달팽이 EST 결과에서 발굴하였으며, 동양달팽이에서도 여러 가지 type의 serpin 이 존재 할 수 있음을 입증하였다.

REFERENCES

- Armstrong, P. B. (2001) "The contribution of proteinase inhibitors to immune defense." *Trends Immunol.*, **22**(1): 47-52.
- Braun, R. C., K. T. Pedretti, T. L. Casavant, T. E. Scheetz, C. L. Birkett and C. A. Roberts (2001) "Parallelization of local BLAST service on workstation clusters." *Future Generation Computer Systems*, **17**: 745-754.
- Coyne, V. (2011) "The importance of ATP in the immune system of molluscs." *Invertebrate Survival Journal*, **8**: 48-55.
- Cui, S., D. Zhang, S. Jiang, H. Pu, Y. Hu, H. Guo, M. Chen, T. Su and C. Zhu (2011) "A macrophage migration inhibitory factor like oxidoreductase from pearl oyster *Pinctada fucata* involved in innate immune responses." *Fish Shellfish Immunol.*, **31**(2): 173-181.
- 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.
- Gatto, M., L. Iaccarino, A. Ghirardello, N. Bassi, P. Pontisso, L. Punzi, Y. Shoenfeld and A. Doria (2013) "Serpins, immunity and autoimmunity: old molecules, new functions." *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **45**(2): 267-280.
- Jeffroy, F., F. Brulle and C. Paillard (2013) "Differential expression of genes involved in immunity and biomineralization during Brown Ring Disease development and shell repair in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*." *J. Invertebr Pathol.*, **113**(2): 129-136.
- Jeong, J. E. and Y. S. Lee (2013) "Identification, sequence characterization and expression analysis of the arginine kinase gene in response to laminarin challenge from the Oriental land snail, *Nesiohelix samarangae*." *Korean Journal of Malacology*, **29**(3): 171-179.
- Jones, D. T., W. R. Taylor and J. M. Thornton (1992) "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." *Comput Appl. Biosci.*, **8**(3): 275-282.
- Kanost, M. R. (1999) "Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity." *Developmental and Comparative Immunology*, **23**: 291-301.
- Maeda, M. and K. Nishizawa (1968) "Fine structure of laminaran of *Eisenia bicyclis*." *J. Biochem.*, **63**(2): 199-206.
- Maldonado-Aguayo, W., G. Nunez-Acuna, V. Valenzuela-Munoz, J. Chavez-Mardones and C. Gallardo-Escarate (2013) "Molecular characterization of two kazal-type serine proteinase inhibitor genes in the surf clam *Mesodesma donacium* exposed to *Vibrio anguillarum*." *Fish Shellfish Immunol.*, **34**(6): 1448-1454.
- Miura, Y., S. Kawabata, Y. Wakamiya, T. Nakamura and S. Iwanaga (1995) "A limulus intracellular coagulation inhibitor type 2. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization." *J. Biol. Chem.*, **270**(2): 558-565.
- Ruby HP Law, Z. Qingwei and M. sheena (2006) "An overview of the serpin superfamily." *Genome Biology*, **7**.
- Sadaaki Iwanaga and B. L. Lee (2005) "Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**(2): 128-150
- Silverman, G. A., P. I. Bird, R. W. Carrell, F. C. Church, P. B. Coughlin, P. G. Gettins, J. A. Irving, D. A. Lomas, C. J. Luke, R. W. Moyer, P. A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G. S. Salvesen, J. Travis and J. C. Whisstock (2001) "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature." *J. Biol. Chem.*, **276**(36): 33293-33296.
- Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra and H. Ogawa (2002) "Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity." *J. Clin. Invest.*, **109**(10): 1351-1359.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011) "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." *Mol. Biol. Evol.*, **28**(10): 2731-2739.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski and S. Kumar (2013) "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." *Mol. Biol. Evol.*, **30**(12): 2725-2729.

- Tirloni, L., A. Seixas, A. Mulenga, S. Vaz Ida, Jr. and C. Termignoni (2014) "A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *Exp. Parasitol.*, **137**: 25-34.
- Wang, Z., J. Jian, Y. Lu, B. Wang and Z. Wu (2011) "A tandem-repeat galectin involved in innate immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata*." *Mar. Genomics*, **4**(3): 229-236.
- Wei, X., J. Yang, J. Yang, X. Liu, M. Liu, D. Yang, J. Xu and X. Hu (2012) "A four-domain Kunitz-type proteinase inhibitor from *Solen grandis* is implicated in immune response." *Fish Shellfish Immunol.*, **33**(6): 1276-1284.
- Yu, Z., X. He, D. Fu and Y. Zhang (2011) "Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*." *Fish Shellfish Immunol.*, **31**(4): 533-539.
- Zhang, H., L. Wang, L. Song, X. Song, B. Wang, C. Mu and Y. Zhang (2009) "A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor." *Fish Shellfish Immunol.*, **26**(1): 56-64.