

## 제주 연안에 서식하는 놀래기류의 DM-domain 분리 및 motif 분석

정형복 · 박지권<sup>1</sup> · 현경만 · 이영돈<sup>2</sup> · 김세재\*

제주대학교 생명과학과, <sup>1</sup>제주대학교 지역기술혁신센터, <sup>2</sup>제주대학교 해양과환경연구소

### Isolation and Motif Analysis of DM-domains from Labridae Fishes in Jeju

Hyung-Bok Jeong, Ji-Gweon Park<sup>1</sup>, Kyung-Man Hyun,

Young-Don Lee<sup>2</sup> and Se-Jae Kim

Department of Life Science, Cheju National University, Jeju Special Self-Governing Province, 690-756, Korea

<sup>1</sup>Technology Innovation Center, Cheju National University, Jeju Special Self-Governing Province, 690-756, Korea

<sup>2</sup>Maine and Environmental Research Institute, Cheju National University, Jeju Special Self-Governing Province, 690-968, Korea

The sex differentiation of fishes occurs under the control of genetic and various environmental factors. DM-domain containing genes are novel zinc finger transcription factors and play key roles in sex determination. In this study, we amplified the DM-domain cDNA regions from four protogynous wrasses (*Halichoeres tenuispinnis*, *Pseudolabrus japonicus*, *Pteragogus flagellifera*, *Halichoeres poecilopterus*) using the degenerate primers from conserved DM-domain region of *DMRT* gene. DM-domain regions of each *DMRT* gene was 171 bp in size and encoded 57 amino acids. The DNA sequence analysis exhibited 100% homology within *H. tenuispinnis*, *P. japonicus*, and *P. flagellifera*, and 94% homology between *H. poecilopterus* and the others. Amino acid sequences showed 100% homology between four wrasses, and contained CCHC-HCCC Zinc-binding module. This study revealed that DM-domains of wrasses contained characteristic serine residue instead of asparagine which are common in other teleosts.

**Key words** : wrasse, *DMRT* (*Doublesex/Mab-3* Related Transcription factor), DM-domain, motif, zinc-binding module

## 서 론

어류의 성 분화 기작은 포유동물에서와 같이 유전적인 조절에 의해 이루어지지만, 환경적인 요인인 수온, 수심, 수류, 영양염류 등의 영향을 많이 받는다 (Nakamura *et al.*, 1998). 어류의 성은 자웅이체, 여러 형태의 자웅동체 (자성선숙어, 웅성선숙어, 자웅동체 등)로 구분되며, 그 성적 특징과 생식소 발생은 종마다 다양하다(Nakamura *et al.*, 1998). 일부 자웅동체 어류는 생애의 한 과정으로 성전환이 일어나는데, 그러한 형태에는 자성선숙어가 일반적이다 (Reinboth, 1970 ; Warner, 1978 ; Policansky, 1982 ; Chan, 1983 ; Sadovy and Shapiro, 1987). 자성선숙어인 놀래기류 (*Labridae*)는 자성, 1차 웅성, 자성에서 성 전환된 2차 웅성으로 구성된 집단으로 생활한다.

생물의 성 분화 기작이 다양하지만, 성 분화와 관련한 유전자의 구조 및 기능은 유사하다고 밝혀지고 있다. 성 분화에 중요한 기능을 담당하는 초파리의 *Doublesex* 유전자와 *Caenorhabditis elegans*의 *Mab-3* 유전자에 공통으로 존재하는 서열을 가짐으로 명명된 *DMRT* 유전자는 DM-domain라 불리는 zinc-finger DNA-binding motif를 가진 단백질을 암호화하며 (Raymond *et al.*, 1998 ; Erdman and Burtis, 1993), 포유류 (Raymond *et al.*, 1999), 조류 (Raymond *et al.*, 1999), 파충류 (Smith, C. A. *et al.*, 1999), 선충류 (Shen, M. M. and J. Hodgkin, 1988), 초파리 (Eedman, S. E. *et al.*, 1996) 등에서 보고되고 있다. *Doublesex*와 *Mab-3* 유전자는 각각의 성 결정 경로에서 성 특이적 감각 기관의 발생이나 (Burtis *et al.*, 1991) 난황 단백질의 전사조절과 같은 (Shen *et al.*, 1988) 하위 유전자에 작용한다. *Doublesex*의 수컷 특이적 isoform인 *DSX<sup>M</sup>*은 *C. elegans*의 *Mab-3*를 기능적으로 대체할 수 있다 (Raymond

*et al.*, 1998). *Drosophila*에서 *Doublesex*는 성 결정의 마지막 경로에서 작용하며, 이것은 상위 유전자인 *tra-2*를 포함한 복합체에 의해 이루어지는 선택적인 RNA-splicing 과정에 의해 조절된다 (Raymond *et al.*, 1999). 수컷과 암컷에서 작용하는 *Doublesex* isoform (*DSX<sup>m</sup>*, *DSX<sup>f</sup>*)들은 서로 다른 성으로의 분화를 억제하는 것으로 여겨지고 있는데, *DSX*의 표적 유전자로 잘 알려진 난황 단백질1 (YP1)은 암컷에서만 합성되어지며, *DSX<sup>f</sup>*에 의해 전사적으로 조절된다 (Raymond *et al.*, 1999).

DM-domain은 dimer로 표적 DNA의 pseudopalindrome 서열에 결합하며 (Yi and Zarkower, 1999), Zinc-binding site I (CCHC)과 Zinc binding site II (HCCC)가 두 개의 아연 원소를 중앙에 두고 교차결합하는 형태로 구성된 Zinc module을 갖는 것으로 밝혀졌다 (Zhu *et al.*, 2000). 어류의 성 결정 및 분화의 기작이 다양함에 비해, 그 분자적 기작에 대한 연구는 매우 미흡하며 DM-domain에 대한 연구는 유전자 분리 수준을 맴돌고 있다. 본 연구는 제주 연안에 서식하는 놀래기류에서 DM-domain을 분리하여 그 구조적 특성을 분석함으로써, 자성선숙성 어류의 성 결정, 혹은 전환 기작에 대한 분자생물학적 기초자료를 제공하기 위하여 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 채집 및 조직처리

실험에 사용한 놀래기(*Halichoeres tenuispinis*), 황놀래기 (*Pseudolabrus japonicus*), 어렁놀래기 (*Pteragogus flagellifera*), 용치놀래기 (*Halichoeres poecilopterus*)는 제주도 연안에서 채집도구를 이용하여 직접 채집하였다. 채집된 각 놀래기류는 해부하여 생식소를 적출하였

고, RNA 분리시까지 액체질소에 보관하였다.

## 2. RNA 분리 및 cDNA 합성

각 조직의 RNA는 RNAzol B (TEL-TEST, Friendswood, TX USA) 및 TRI REAGENT (MRC, Cincinnati, OH USA)를 사용하여 분리하였다. 조직 시료에 RNAzol 및 TRI REAGENT를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리시켰다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리시켜 RNA를 침전시키고 80%의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 분리된 RNA는 260 nm의 흡광도를 측정하여 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.7~2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다.

cDNA는 total RNA를 사용하여 AdvanTAge RT-for-PCR Kit (Clontech, Palo Alto, CA USA)로 합성하였다. 0.5 µg의 RNA를 DEPC 처리된 물로 녹여 총 부피를 6.25 µl 되게 희석하여 0.5 µl의 oligo (dT)를 넣고 70 °C에서 2분간 어닐링한 후, 2 µl의 5×reaction buffer, 0.5 µl의 dNTP mix (각 10 mM), 0.25 µl의 RNase inhibitor, 0.5 µl의 MMLV 역전사 효소를 더하여, 42 °C에서 1시간 동안 반응하였다. 반응 후, 94 °C에서 5분간 가열하여 cDNA 합성을 중지시키고, 40 µl의 DEPC 처리된 증류수로 최종부피를 50 µl 되게 희석하였다.

## 3. 놀래기류의 DM-domain 영역 클로닝

놀래기 (*H. tenuispins*), 황놀래기 (*P. japonicus*), 어랭놀래기 (*P. flagellifera*), 용치놀래기 (*H. poecilopterus*)의 DM-domain 영역을 클로닝하기 위해 놀래기 *DMRT* 유전자의 서열을 참고로 DM-domain 영역을 포함하는 프라이머를 제작하였다 (forward: 5'-ACCTCTGTGCCCATCAAAG -3', reverse:

5'-GCTTGCCAGAGTCACAGGA -3'). 제작된 프라이머와 각 놀래기류의 cDNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. 2 µl의 cDNA를 주형으로, 10 mM의 dNTP mix, 10×PCR buffer 2 µl, 각 10 pmole의 프라이머, 5 unit의 DNA 중합효소를 첨가하여 94 °C에서 45초, 55 °C에서 45초, 72 °C에서 90초 씩 30 cycle 동안 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 용출하여, pGEM-T easy vector에 삽입한 후, Inoue 방법으로 형질전환 시켰다. 형질전환된 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 분리하였고, ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

## 4. DNA Sequencing

DNA 염기서열은 플라스미드 DNA를 주형으로 ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ USA)를 사용하여 분석하였다. 10 µg의 플라스미드 DNA 32 µl에 2M NaOH를 첨가하여 10분간 상온에서 반응시키고, 3M Sodium acetate (pH 4.8) 7 µl, 100% 에탄올 120 µl를 첨가 후, -70 °C에 2시간 동안 보관하였다. 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고 침전물에 70% 에탄올을 첨가하여 10분간 원심분리하여 건조한 후, 10 µl의 3차 증류수에 녹였다. 얻어진 주형 DNA에 Cyanine-labelled primer (4-10pmol) 2 µl, annealing buffer 2 µl를 첨가하고 65 °C에서 5분, 37 °C에서 10분간 반응시킨 후, 상온에서 10분간 보관하였다. Extension buffer 1 µl와 DMSO 3 µl를 추가하고 6~8 units/2 µl의 T7 DNA 중합효소 2 µl를 넣은 후, 37 °C로 유지된 각 sequencing mix에 4.5 µl를 첨가하고 5분간 반응시켰다. 5 µl의 stop solution으로 반응을 정지시키고, 90 °C에서 3분간 변성시킨 후, 5.75% acrylamide-7 M urea-5 × TBE buffer를 사용

하여 만들어진 겔을 사용하여 1500 Volt에서 900 분 동안 전기영동하여 염기서열을 결정 하였다.

## 결 과

### 1. 놀래기류 DM-domain 영역의 클로닝 과 계통유연관계 비교

놀래기류 4종의 정소 cDNA를 주형으로 하여 놀래기 *DMRT* 유전자에 특이적인 프라이머로 증폭한 후, 클로닝하여 244 bp의 크기를 갖는 클론들을 분리하였다. Sequencing을 통해 얻어진 염기서열들을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 검색을 이용하여 확인한 결과, 놀래기류 4종에서 모두 DM-domain 영역이 존재함을 확인하였다. 타 종의 *DMRT* 유전자들과 비교한 결과, 놀래기류의 DM-domain 영역은 모두 171 bp의 크기를 갖는 것으로 나타났고, 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*), 황놀래기 (*Pseudolabrus japonicus*), 그리고 어랭놀래기 (*Pteragogus flagellifera*)의 nucleotide는 100%의 상동성을 나타냈으며, 용치

### 5. 염기서열 분석

Sequencing 결과로 얻어진 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST 검색을 이용하여 확인하였고, 타 종에서 보고된 *DMRT* 유전자의 ORF 영역과 비교하여 DM-domain 영역을 결정한 후, 아미노산 서열을 예측하였다(BCM Search Launcher). 다른 경골어류들에서 보고된 DM-domain들과의 alignment, 거리지수 및 계통수 작성은 DNASTAR의 MegAlign (Ver. 4.05) 프로그램을 사용하여 분석하였다. 놀래기류에서 분리된 DM-domain의 아미노산 서열은 PROSITE (release 20.15) 및 Pfam 데이터베이스 검색을 통하여 그 특징을 분석하였다

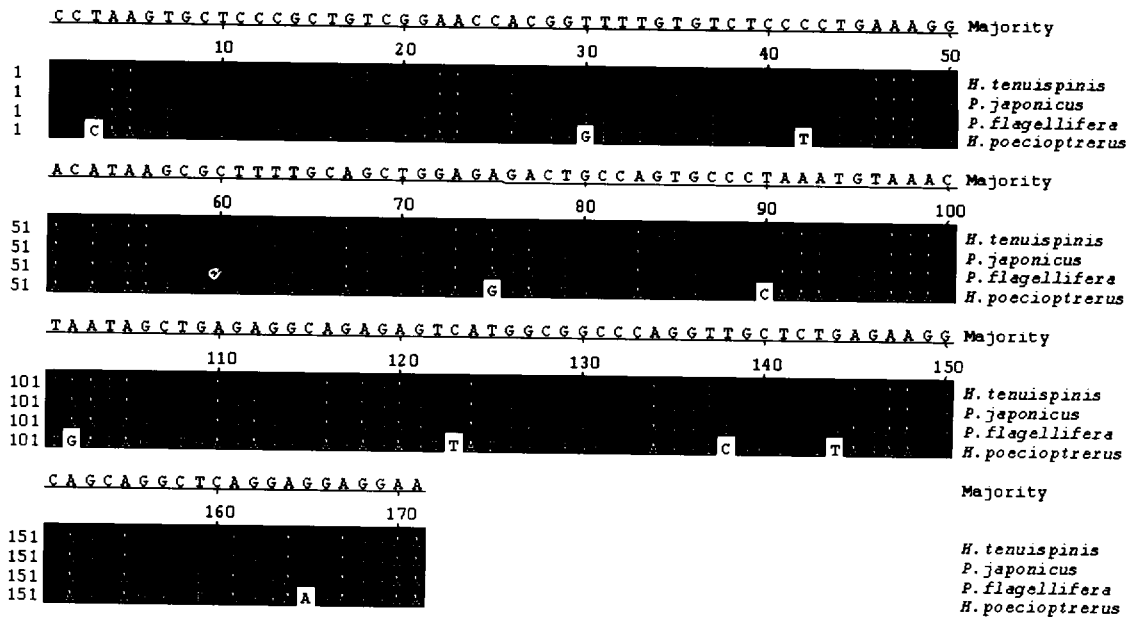


Fig. 1. Comparison of nucleotide sequence within DM-domain regions among Labridae. Nucleotide sequence of DM-domains within *H. tenuispinis*, *P. japonicus* and *P. flagellifera* showed 100% homology while, the nucleotide sequence of *H. poecioptrerus* showed 94% homology to the others.

Table 1. Amino acid sequence distance of DM-domains between several teleosts.

	1	2	3	4	5	6	7	
1		92.6	96.5	96.5	89.5	94.7	93	1 : Wrasses (This study)
2	4.0		96.3	92.6	88.9	90.7	96.3	2 : <i>E. coioides</i>
3	3.6	0.0		96.5	89.5	94.7	96.5	3 : <i>O. niloticus</i>
4	3.6	4.0	3.6		91.2	98.2	94.7	4 : <i>C. gariiepinus</i>
5	11.4	12.1	11.4	9.3		91.2	88.7	5 : <i>X. maculatus</i>
6	5.5	6.1	5.5	1.8	9.3		93.0	6 : <i>D. rerio</i>
7	7.4	3.8	3.6	5.5	12.3	7.4		7 : <i>M. albus</i>

\* X axis : Percent Identity, Y axis : Divergence

놀래기 (*Halichoeres poecilopterus*)와는 94%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 다른 여러 종들과의 nucleotide 비교 결과, 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*), 황놀래기 (*Pseudolabrus japonicus*), 그리고 어랭놀래기 (*Pteragogus flagellifera*)는 틸라피아와 갈색등근바리에서 85%의 가장 높은 상동성을 보였으며, 드렁허리 (84%), 플라티피쉬 (80%), 캣피쉬 (79%), 제브라피쉬 (77%)의 순의 상동성을 나타냈다. 용치놀래기 (*Halichoeres*

*poecilopterus*)는 갈색등근바리와 가장 높은 87%의 상동성을 보였으며, 틸라피아(86%), 드렁허리 (85%), 플라티피쉬 (80%), 캣피쉬 (78%), 제브라피쉬 (76%) 순의 상동성을 보였다. 놀래기류의 DM-domain 영역의 아미노산 서열은 종간의 차이가 없어 100%의 상동성을 갖는 것으로 나타났으며, 틸라피아와 캣피쉬 (96.5%), 제브라피쉬 (94.7%), 드렁허리 (93%), 갈색등근바리 (92.6%), 플라티피쉬 (89.5%) 순의 상동

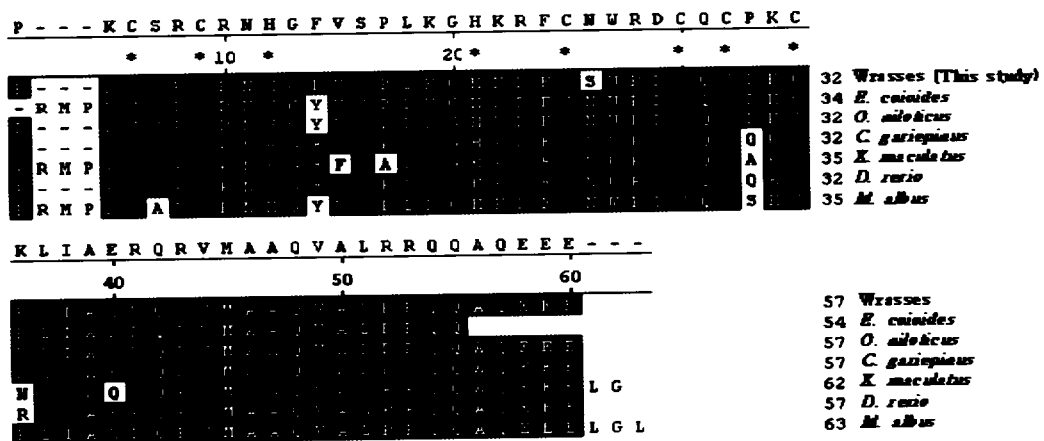


Fig. 2. Alignment result of DM-domain amino acids from wrasses with other several DM-domains. Major amino acids are in black box, zinc-binding sites are marked with dots. Amino acid sequences of *H. tenuispinis*, *P. japonicus*, *P. flagellifera* and *H. poecilopterus* are represented in common name ("Wrasses"). The GenBank accession numbers used in this study are as below. *E. coioides*: EF017802, *O. niloticus*: AF203489, *C. gariiepinus*: AF439561, *X. maculatus*: AF529187, *D. rerio*: AF439562, *M. albus*: AF421347

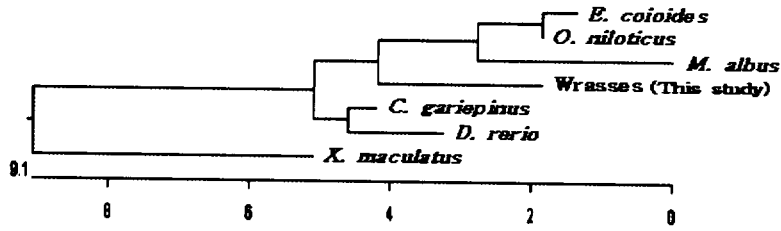


Fig. 3. Phylogenetic analysis of DM-domains between wrasses and other teleosts. Wrasses' DM-domain is relatively close to *O. niloticus*, while, *X. maculatus* diverged from others. Amino acid sequences were analysed by MegAlign, bootstrap value is represented in bar.

성을 나타냈다(Fig. 2, Table 1). 아미노산 서열에 대한 계통수를 분석한 결과, 놀래기의 DM-domain은 비교대상 종들 중, 갈색동근바리, 틸라피아, 드렁허리와 가까운 그룹으로 나뉘었다(Fig. 3).

## 2. 놀래기류 DM-domain의 motif 분석

놀래기류 DM-domain 영역의 아미노산 서열에 대한 Data base 분석 결과 (ScanSite Ver. 2.0), 1~46번 아미노산이 DM-domain의 Zinc-finger motif 형성에 중요한 기능을 가질 것으로 나타내었다(Fig. 4). 놀래기류 DM-domain 영역의 아미노산 서열에 대한 Zinc-Binding 구조를 확인하기 위하여 PROSITE Data base (release 20.15)를 검색한 결과, Cysteine과 Histidine이 Zinc 원자와 교차결합을 하는 CCHC-HCCC Zinc-binding module이 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 2, 5). 특히, N-말단 쪽의 Zinc-binding module과 C-말단 쪽의 Zinc-binding module이 연결되는 cysteine 잔기 사이에 위치하는 4개의 아미노산 서열이, 비교한 다른 종들에서는 모두 Asparagine-Tryptophan-Arginine-Aspartic acid의 순으로 나타났으나, 놀래기류에서는 Asparagine이 Serine으로 치환된 구조를 갖고 있었다(Fig. 2, 5). 그 외에도 Phosphoserine/threonine binding group (pST\_bind), Basophilic serine/threonine kinase

group (Baso\_ST\_kin), Proline-dependent serine/threonine kinase group (Pro\_ST\_kin) 그리고, Kinase binding site group (Kin\_bind)의 여러 putative motif site 들이 확인되었다 (Fig. 4).

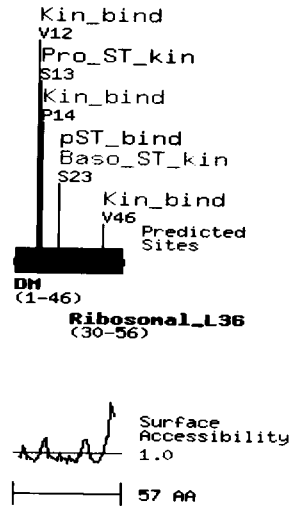


Fig. 4. Motif analysis of wrasse DM-domain amino acid sequence. Putative motifs of Phosphoserine/threonine binding group (pST\_bind), Basophilic serine/threonine kinase group (Baso\_ST\_kin), Proline-dependent serine/threonine kinase group (Pro\_ST\_kin), and Kinase binding site group (Kin\_bind) are found. Putative DM-domain and Ribosomal L36 domain were found with high scores. Amino acid sequence was analysed by ScanSite (Ver. 2.0).

Table 2. Pfam data base search result of wrasse DM-domain region. First 46 amino acids are very significant to DM-DNA binding domain.

Model	Sequence region		Score	Expectation Value	Description
	from	to			
DM	1	46	74.0	4.7e-19	DM DNA binding domain
Ribosomal L36	30	56	6.7	0.28	Ribosomal protein L36

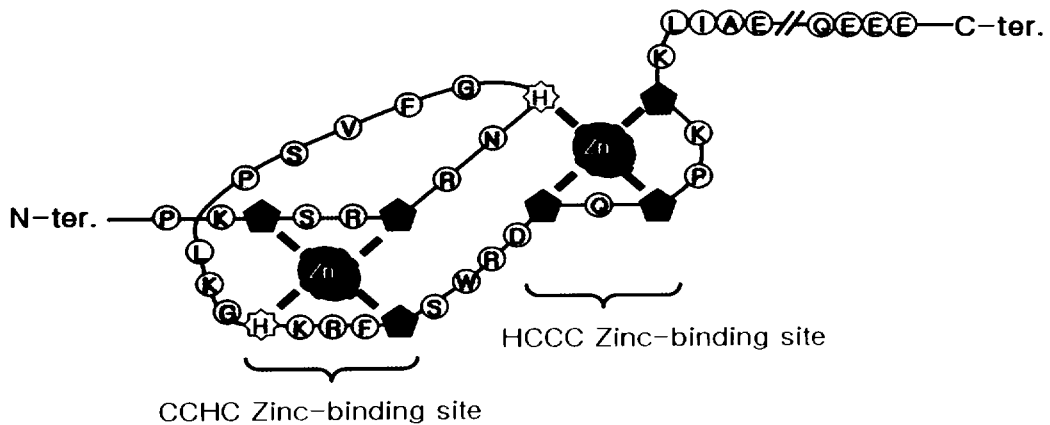


Fig. 5. Schematic representation of zinc module in wrasse DM-domain. CCHC and HCCC Zinc-binding sites are 'intertwined'. 'C' is conserved cysteine involved in zinc binding, 'H' is histidine, and Zn is zinc atom. Other all teleosts analysed in this study have histidine at 23rd residue, but substitution to serine occurred in wrasse DM-domain, thus considered as unique structure. Amino acid sequence of wrasse DM-domain was analysed by searching PROSITE Data base (release 20.15).

### 고찰

본 연구에서는 놀래기류 4종의 정소 cDNA를 주형으로 하여 놀래기 *DMRT* 유전자에 특이적인 프라이머로 증폭한 후, 클로닝하여 244 bp의 크기를 갖는 클론들을 분리하였고, DNA 및 아미노산 서열을 확인하였다. 놀래기류의 DM-domain은 171bp의 DNA 염기서열과 57개의 아미노산을 암호화하는 것으로 나타났다. 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*), 황놀래기 (*Pseudolabrus japonicus*), 그리고 어렁놀래기 (*Pteragogus flagellifera*)의 DNA 서열은 100%의 상동성을 나타냈으며, 용치놀래기

(*Halichoeres poecilopterus*)와는 94%의 상동성을 나타내었다. 다른 여러 종들과의 비교결과, 틸라피아와 갈색등근바리에서 가장 높은 상동성을 보였으며, 제브라피쉬와 가장 낮은 상동성을 나타냈다. 놀래기류 DM-domain 영역의 아미노산 서열은 종 간의 차이가 없어 100%의 상동성을 갖는 것으로 나타났으며, 틸라피아와 캣피쉬 (96.5%)가 가장 높은 상동성을 보였고, 플라티피쉬 (89.5%)와 가장 낮은 상동성을 나타냈다. 본 연구 결과에서 얻어진 높은 유사성은 *DMRT* 유전자가 경골어류에서 높은 수준의 보존성을 갖고 있다는 보고와 일치하는 것이며 (Guan *et al.*, 2000), 놀래기류가 DM-domain을

포함하고 있는 *DMRT* 유전자를 가지고 있어, 성 결정 및 성 분화에 작용할 것임을 추론케 한다 (Kondo *et al.*, 2002).

놀래기류의 DM-domain 영역은 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*), 황놀래기 (*Pseudolabrus japonicus*), 어랭놀래기 (*Pteragogus flagellifera*)가 분류학상 서로 다른 속 (genus)으로 구분됨에도 불구하고 DNA 염기서열에 있어 100%의 상동성을 보임으로 DM-domain이 여러 종에 걸쳐 보존적이라는 기존의 연구 결과들을 뒷받침하였으나, 용치놀래기 (*Halichoeres poecilopterus*)의 경우, 황놀래기 (*Pseudolabrus japonicus*), 어랭놀래기 (*Pteragogus flagellifera*)와는 물론, 같은 속인 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*)와도 차이를 보이는 94%의 상동성을 갖는 것이 특이하였다.

놀래기류 DM-domain의 아미노산 서열에 대한 분석 결과, 1~46번 아미노산이 Zinc-finger motif 형성에 중요한 기능을 가질 것으로 나타내었으며, Cysteine과 Histidine이 Zinc 원자와 교차결합을 하는 CCHC-HCCC Zinc-binding module이 존재하는 것으로 나타났다. 특히, 놀래기류에서 DM-domain의 Zinc-binding module이 연결되는 부위의 Asparagine잔기가 Serine으로 치환된 구조를 갖고 있어, 비교한 다른 종들과는 차이를 나타내었다. 이는, 놀래기류가 진화적으로 다른 경골어류들과는 특이적으로 진행되었을 것임을 암시하고 있으며, 어류의 성 결정 및 분화에 미치는 DM-domain의 역할을 고려해 볼 때, 전사조절에 있어 표적 DNA나 Domain-DNA 결합방식에 있어 독특한 기능을 나타낼 수 있음을 추론케 한다.

실험에 사용된 놀래기류가 자성선속성 자웅동체라는 사실을 고려할 때, 성전환이 일어나는 시기에 *DMRT* 유전자가 많이 발현될 것임을 예상할 수 있다. 따라서, 본 연구 결과를 토대로, 놀래기류의 *DMRT* 유전자들에 대한 분리와 함께,

성전환 과정의 단계별 발현양상을 분석함으로써 DM-domain의 작용 및 기능을 확인할 필요가 있다. 또한, DM-domain의 표적 DNA를 확인하고, 성 결정 또는, 성 전환에 미치는 영향에 대한 연구가 요구된다. DM-domain은 문 (Phyla) 수준에서 보존적이므로, 이러한 연구들은 놀래기의 성 분화 및 성 전환의 기작과, 자웅동체 어류의 성 제어에 대한 지식 뿐 아니라, 해양환경변화로 인해 빈번히 발생하는 생물의 성비 불균형과 그에 따른 해양생태교란을 연구하는 데에 중요한 자료를 제공할 수 있을 것이다.

## 요 약

생물의 성 결정 및 분화는 다양한 요인에 의해 조절되어질 수 있으나, 각 요인들에 의해 일어나는 분자적 기작은 척추동물에서 선충류에 이르기까지 매우 보존적인 것으로 여겨지고 있다. 그 중, DM-domain을 포함하는 유전자는 온도 등의 환경적 요인은 물론, 시각적 자극에 의한 사회적 요인에 이르기까지 다양한 영향을 받는 여러 생물에서 작용하는 것으로 보고되고 있다. 이와 관련하여, 본 연구는 제주도 연안에 서식하고 기능적 생식소의 전환이 일어나는 자성선속형 자웅동체 어류인 놀래기류에서 DM-domain을 분리하고 그 구조를 분석함으로써 성 결정, 혹은 성 분화연구에 있어 기초자료를 제공하고자 수행하였다. 놀래기류 4종의 정소에서 cDNA를 합성하고 DM-domain 영역을 증폭한 후 클로닝하였다. 얻어진 클론들은 모두 57개의 아미노산을 암호화하는 171 bp의 DNA 염기서열을 포함하였다. DNA 염기서열 분석결과, 놀래기 (*H. tenuispinnis*), 황놀래기 (*P. japonicus*), 어랭놀래기 (*P. flagellifera*)는 서로 100%의 상동성을 보였으나, 놀래기 (*H. tenuispinnis*)와 동속인 용치놀래기 (*H. poecilopterus*)는 이들과 94%의



상동성을 나타냈다. 반면, 아미노산 서열은 4종 모두 동일한 것으로 나타났으며, CCHC Zinc-binding site와 HCCC Zinc-binding site가 내부에서 교차결합을 이루는('intertwined') Zinc module을 갖는 것으로 나타났다.

## 인용문헌

- Burtis, K. C., and B. S. Baker. 1989. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*. 56: 997-1010.
- Burtis, K. C., K. T. Coschigano, B. S. Baker, C. P. Wensink. 1991. The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *EMBO J.* 10:2577-2582
- Chan, S. T. H. and W. S. B. Yeung, 1983. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In: *Fish Physiology*, vol.9B, and D. J. Randall, W. S. Hoar and E. M. Donaldson, eds., Academic Press, New York, pp. 129-141.
- Erdman, S. E., and K. C. Burtis., 1993. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc-finger related DNA-binding domain. *EMBO J.* 12: 527-535.
- Erdman, S. E., Chen, H.-J., and Burtis, K. C. (1996). Functional and genetic characterization of the oligomerization and DNA binding properties of the *Drosophila* Doublesex proteins. *Genetics*. 144, 1639-1652.
- Guan, G., T. Kobayashi., and Y. Nagahama., 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM(*Doublesex/Mab-3*)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 662-666
- Hodgkin, J., 1999. Sex, Cell Death, and the Genome of *C. elegans*. *Cell*. 98: 277-280.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., X.-T. Chang, and Y. Nagahama, 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281: 362-372.
- Nakamura, M., T. Hourigan, K. Yamauchi, Y. Nagahama, and E. G. Grau, 1989. Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. *Envir. Biol. Fish.* 24: 117-136.
- Policansky, R., 1982. Sex changes in plants and animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13: 471-495.
- Raymond, C. S., C. E. Shamu., M. M. Shen., K. J. Seifert., B. Hirsch., J. Hodgkin., and D. Zarkower., 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*. 391: 691-695.
- Raymond, C. S., J. R. Kettlewell., B. Hirsch., V. J. Bardwell., and D. Zarkower., 1999. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 215: 208-220.
- Raymond, C. S., Paker, E. D., Kettlewell, J. R., Brown, L. G., Page, D. C., Kusz, K., Jaruzelska, J., Reinberg, Y., Flejter, W. L., Bardwell, V., Hirsch, B., and Zarkower, D. (1999). A region of human chromosome 9p required for testis development contains two regions related to known sexual

- regulators. *Hum. Mol. Genet.* 8, 989-996.
- Reinboth, R., 1970. Intersexuality in fishes. *Mem. Soc. Endocrinol.* 18: 515-543.
- Sadovy, Y. and D. Y. Shapiro, 1987. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia* 1987: 136-156.
- Shen, M. M., and J. Hodgkin. 1988. *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell.* 54: 1019-1031.
- Smith, C. A., P. J. McClive., P. S. Western., K. J. Reed., and A. H. Sinclair., 1999. Conservation of a sex-determining gene. *Nature.* 402: 601-2.
- Warner, R. R., 1978. The evolution of hermaphroditism and unisexuality in aquatic and terrestrial vertebrates. In: *Contrasts in behavior*, E. S. Reese and F. Lighter, eds., Wiley Interscience, New York, pp. 77-101.
- Yi, W., and D. Zarkower., 1999. Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* *MAB-3* and *Drosophila melanogaster* *DSX* suggests conservation of sex determining mechanisms. *Development.* 126: 873-881.
- Yi, W., J. M. Ross., D. Zarkower., 2000. *mab-3* is a direct *tra-1* target gene regulating diverse aspects of *C. elegans* male sexual development and behavior. *Development.* 127: 4469-4480.
- Zhu, L., J. Wilken, N. B. Phillips, U. Narendra, G. Chan, S. M. Stratton, S. B. Kent, M. A. Weiss. 2000. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. *Genes Dev.* 14:1750-1764