

붉바리에서 cholecystokinin (CCK) 유전자의 부분염기서열 cloning

김병훈¹ · 허상우¹ · 이치훈² · 이영돈^{1*}

¹제주대학교 해양과학연구소 · ²주식회사 씨알

Partial sequence identification of cholecystokinin (CCK) gene in the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*

Byeong-Hoon Kim¹, Sang-Woo Hur¹, Chi-Hoon Lee² and Young-Don Lee^{1*}

¹Marine Science Institute, Jeju National University · ²CR Co., Ltd.

Cholecystokinin (CCK) is gastrointestinal hormone and secreted in the brain and the intestines. CCK play important role in the regulation of digestive enzyme secretion and intestinal peristalsis regulation. In this study, we identified of CCK partial sequence from the brain. CCK partial sequence composed total 360 base pairs fragments and 120 amino acids. The amino acid sequence homology of red spotted grouper CCK investigated with other teleost fish. Red spotted grouper CCK showed high homology with black rockcod *Notothenia coriiceps* CCK (95.8%). Among the fish species, Japanese eel, *Anguilla japonica* CCK was showed very low amino acid similarity (57.8%) with red spotted grouper. Further we need to know relationship of CCK activation with digestive system in red spotted grouper.

Key words : cholecystokinin, cloning, red spotted grouper

서론

붉바리(redspotted grouper, *Epinephelus akaara*)는 바리과(Serranidae)에 속하는 어류로서 한국에서는 자바리(longtooth grouper, *Epinephelus*

bruneus), 능성어(sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*)와 함께 매우 고급어종에 속하는 어류이다. 하지만 바리과 어류 양식은 안정적인 수정란 생산 및 종묘생산에 어려움을 겪고 있으며, 바리과 어류의 안정적인 양식을 위

한 연구가 이루어지고 있다(Bright et al., 2016; Glamuzina et al., 2000; Lee et al., 2008). 어류 양식 및 종묘생산에 있어서 부화자어의 소화생리작용은 매우 중요한 부분을 담당한다. 소화생리작용 및 소화관발달단계에 따라서 먹이섭이행동과 영양분 흡수작용이 결정되며, 이는 부화자어시기에서의 생존여부를 결정짓는 중요한 요인으로서 작용하게 된다. 하지만 어류의 소화생리작용과 소화관발달단계는 어종마다 다른 특징을 가지고 있으므로, 붐바리에 있어서 소화생리작용 및 소화관발달단계에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

소화호르몬인 Cholecystokinin (CCK)는 소화생리작용에 있어서 매우 중요한 호르몬 중 하나이다. 주로 뇌와 장에서 분비되는 CCK는 주로 먹이섭이를 조절하고, 췌장에서의 소화효소 분비조절, 담낭 수축 및 장 연동운동 등의 역할을 한다(Cummings and Overduin, 2007, Jhonsen, 1998; Liddle, 1995; Olsson et al., 1999). 또한 일부 어류에 있어서는 CCK가 식욕에도 영향을 미친다고 알려지고 있다(Feng et al., 2012; Webb et al., 2010). 또한 어류에 있어서 CCK의 발현이 주로 공복시기에 감소하는 것으로 알려지고 있다 (Babichuk and Volkoff, 2013; Ji et al., 2015; MacDonald and Volkoff, 2009). 이러한 CCK는 CCK수용체가 존재하며, 수용체의 활성에 따라 다양한 소화작용이 조절된다 (Furutani et al., 2013). 이 연구는 주요 소화효소분비 및 소화활동에 관여하는 CCK가 붐바리에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구의 일환으로서, 붐바리 CCK 유전자의 cloning을 수행하였다.

재료 및 방법

1. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA를 추출하기 위하여 붐바리 뇌 조직을 적출하여 실험에 사용하였다. 적출한 뇌 조직에 RiboEx™ Reagent (GeneAll) 500 μ l를 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 완전히 분쇄하였다. Chloroform 100 μ l을 첨가하여 혼합하여 원심분리 한 후, RNA가 포함된 상층액을 튜브로 옮겨 동일량의 iso-propanol을 첨가하여 12000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 침전시켰다. DEPC가 첨가된 75% 에탄올을 이용하여 RNA pellet을 수세한 후 에탄올을 제거하여 RNase-free 증류수로 RNA pellet을 용해시켜 total RNA를 얻었다. 이후 Total RNA 2.0 μ g을 주형으로 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA)를 이용하여 DNase 처리를 하였다. Total RNA와 증류수를 첨가하여 7.5 μ l 부피를 맞추고 RQ NRase-Free DNase 10×Reaction buffer 1 μ l, RQ RNase-Free DNase 1.5 μ l를 총 부피 10 μ l가 되도록 첨가하였다. 이후 37°C에서 30분간 반응 후 1 μ l의 Stop Solution을 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다. total RNA는 Nano Vue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 농도를 측정하였고, A260/A280nm의 비율이 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA만을 선택하여 실험에 사용하였다. cDNA는 DNase 처리된 total RNA 0.5 μ g을 주형으로 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. 합성이 끝난 후 각각의

cDNA에 40 μ l의 Nuclease-free 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μ l가 되게 희석하였다.

2. CCK cDNA 분석

뽕바리의 CCK cDNA를 분리하기 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 다른 어종들의 CCK cDNA 정보를 이용하여 degenerate primer를 제작하였다(Table 1). Degenerate primer를 PCR 기법을 통하여 유전자를 증폭시켰으며 증폭된 산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 통하여

확인하였다. PCR 산물이 포함된 agarose gel을 DNA purification system (Promega, Madison WI USA)을 이용하여 PCR 산물을 획득한 후, T-blunt vector (Solgent, Daejeon, Korea)에 삽입하여 competent cell에 형질전환 시켰다. 배양된 competent cell에서 Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였고, Genotech (Korea)에 의뢰 후 부분염기서열을 분석하였다. 부분염기서열은 NCBI의 BLAST 검색을 통하여 확인하였다.

Table 1. Sequence of primers used in the identification of CCK cDNA in *Epinephelus akaara*

Degenerate primers	Sequence
CCK F	5'-CTGTGTGTGTGTGTCGTGCT-3'
CCK R	5'-AGTCCATCCAGCCCATGTAG-3'

Table 2. Gene information of used for multiple alignment

Gene	Species	Accession number
	<i>Epinephelus akaara</i>	-
	<i>Notothenia coriiceps</i>	XP_010792967
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	ACF04738
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	BAE16613
	<i>Diplodus sargus</i>	AEU08492
	<i>Rachycentron canadum</i>	AGN03938
	<i>Haplochromis burtoni</i>	XP_005940924
	<i>Maylandia zebra</i>	XP_004574396
	<i>Stegastes partitus</i>	XP_008297983
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	O57312
	<i>Takifugu rubripes</i>	XP_003969006
	<i>Poecilia reticulata</i>	XP_008419687
	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004073921
	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	BAC44894
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001117816
	<i>Anguilla japonica</i>	BAD01500

3. 염기서열 분석

붉바리 CCK의 종간계통유연관계 분석은 PHYLIP 프로그램을 이용하여 분석하였다. 분석에 이용된 다른 어종들의 아미노산 서열 Multiple alignment는 Clustal Omega 프로그램을 이용하여 분석하였고, BOOTSTRIP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1000 set은 PRODIST 프로그램을 이용하여 distance matrices를 계산하였다. 계산된 distance matrices는 NEIGHBOR 프로그램의 tree 작성 input 데이터로 이용하였고, CONSENSE 프로그램을 이용하여 consense tree를 작성하였다. 각 유전자의 multiple alignment에 이용된 종과 유전자는 Table 2에 나타내었다.

결과 및 고찰

붉바리의 뇌 조직을 대상으로 CCK cDNA를 분리하여 부분염기서열을 분석한 결과 총 360 bp 길이의 부분염기서열과 120개의 아미노산

서열이 확인되었다(Fig. 1). 붉바리에서 확인된 CCK cDNA와 다른 어종들의 CCK cDNA를 비교하여 아미노산서열의 상동성을 분석한 결과 농어목 (Perciformes) 어류인 Black rockcod (*Notothenia coriiceps*)와 95.8% 가장 높은 상동성을 보였다(Table 3). 그리고 같은 농어목의 어류인 Red drum (*Sciaenops ocellatus*) 95%, 방어(Japanese amberjack, *Seriola quinqueradiata*)

Table 3. Partial amino acid identities of CCK between *Epinephelus akaara* and other fish

Species	CCK Homology(%)
<i>Epinephelus akaara</i>	-
<i>Notothenia coriiceps</i>	95.8
<i>Sciaenops ocellatus</i>	95.0
<i>Seriola quinqueradiata</i>	89.2
<i>Diplodus sargus</i>	87.5
<i>Rachycentron canadum</i>	87.5
<i>Haplochromis burtoni</i>	87.5
<i>Maylandia zebra</i>	86.8
<i>Stegastes partitus</i>	85.8
<i>Paralichthys olivaceus</i>	82.5
<i>Takifugu rubripes</i>	75.8
<i>Anguilla japonica</i>	57.8

```

1  CTGTGTGTGTGTGTC GTGCTGGCAGTCTTG TGTACGAGCTGTTTG GGGCTCCCTTCTCG TCCCAGCCCCTCGAC
   L C V C V V L A V L C T S C L G L P F S S Q P L D
76  GAGGGCCACCGCTCC ATGTCCGCTGCCTCT GAAGCTCTCCTCGAG GCTGACACCCACACC CTAGGAGAGCCCAC
   E G H R S M S A A S E A L L E A D T H T L G E P H
151 CTCCAACACAGCCGC TCTGGGCCCCAGCTG AAAGCTCTCCCTCTG GCTGAGGACGATGCA GACTCCCGAGCCAAC
   L Q H S R S A P Q L K A L P L A E D D A D S R A N
226 CTCAGCGAGCTGCTG GCAAGACTCATCTCC TCCAGGAAAGTTTCT GTGCGCAGAACTCC ACAGCAAACAGCAGA
   L S E L L A R L I S S R K G S V R R N S T A N S R
301 GTCAACGGACTGAGT GCCAACCACCGGATA GCAGACAGGGACTAC ATGGGCTGGATGGAC
   V N G L S A N H R I A D R D Y M G W M D
    
```

Fig. 1. The CCK partial nucleotide and deduced amino acid sequence obtained from the brain of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. It was 360 base pairs long and encoding 120 amino acids.

89.2%, White seabream (*Diplodus sargus*)과 Cobia (*Rachycentron canadum*), *Haplochromis burtoni*에서 87.5%의 상동성을 나타내었다. 가자미목(Pleuronectiformes)의 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)에서는 82.5%의 상동성을 보였으며, 복어목(Tetraodontiformes)의 자주복(Tiger puffer, *Takifugu rubripes*)에서는 75.8%의 상동성을 보였다. 하지만 뱀장어목 (Anguilliformes)의 뱀장어(Japanese eel, *Anguilla japonica*)에서는 57.8%로 가장 낮은 상동성을 보였다. 그리고 붉바리에서 확인된 CCK의 중간계통유연관계를 분석한 결과 Black rockcod와 가장 인접한 유연관계임을 확인하였다(Fig. 2).

어류에 있어서 이러한 CCK의 존재와 기능에 대한 연구는 일부 확인되고 있다(Murashita et al., 2006; Yuan et al., 2016)). 금붕어(gold fish, *Carassius auratus*)에서 인위적으로 CCK를 투여

하였을 때 먹이섭이활동 억제되는 결과를 나타냈다(Volkoff et al., 2003). 하지만 무지개송어(rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*)에서는 반대로 CCK의 투여가 먹이섭이활동을 증진시켰다(Gelineau and Boujard, 2001). 이러한 결과들은 어류에 있어서 CCK가 먹이섭이에 관여하지만 종특이적으로 서로 다른 작용을 하는 것으로 생각된다.

최근연구에서 붉바리와 같은 바리과 어류에 속하는 자바리에 있어서 CCK와 CCK 수용체의 존재가 확인되었다(Hur, 2011). 이 연구에서 자바리 자어시기에 따른 CCK mRNA의 발현양상을 조사한 결과, 부화자어의 개구가 이루어지는 부화 후 2 일째에 CCK mRNA의 발현이 처음으로 확인되었으며, 먹이생물을 처음으로 섭이한 부화 후 4 일째 발현이 감소되었다. 그러므로 소화관발달단계 및 CCK mRNA의 발현이

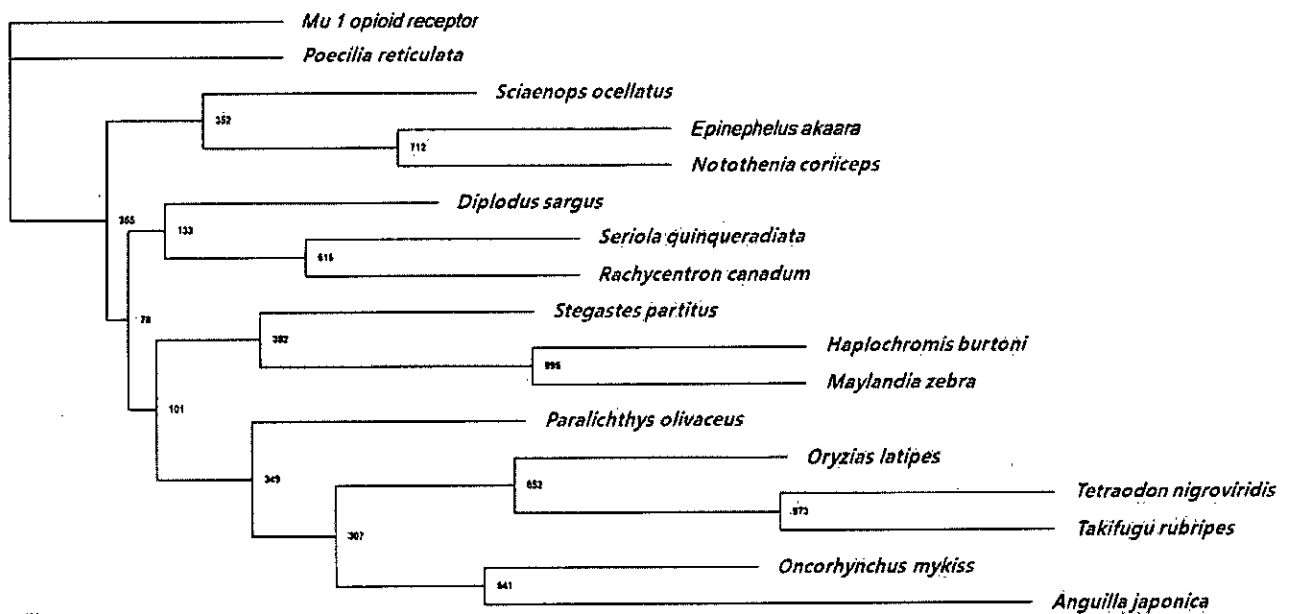


Fig. 2. Phylogenetic relationship of CCK cDNA between red spotted grouper, *Epinephelus akaara* and other fish species.

초기 먹이섭이에 관여하는 것으로 생각되며, 이러한 연구결과가 초기 바리과 종묘생산에 있어서 먹이생물급여시기를 결정하는데 있어서 중요한 역할을 할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구에서는 붉바리에 있어서 CCK 유전자의 부분염기서열을 확인하였다. 추후 이러한 CCK 유전자정보를 이용하여 붉바리 부화시기에 따른 CCK의 발현량 조사 및 먹이섭이와 CCK의 상관관계를 확인 할 수 있는 연구가 필요할 것이라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 Golden Seed 프로젝트 사업의 지원을 받아 수행되었습니다(213004044CG600).

참고 문헌

Babichuk, N.A and H.Volkoff. 2013. Changes in expression of appetite-regulating hormones in the cunner (*Tautoglabrus adspersus*) during short-term fasting and winter torpor. *Physiol. Behav.* 120: 54-63.

Bright, D., Reynolds, A., Nguyen, N.H., Knuckey, R., Knibb, W and A. Elizur. 2016. A study into parental assignment of the communal spawning protogynous hermaphrodite, giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). *Aquaculture*,

459: 19-25.

Cummings, D.E and J. Overduin. 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest.* 117: 13-23.

Feng, K., Zhang, G.R., Wei, K.J., B.X. Xiong. 2013. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogenetic expression of ghrelin and regulation of expression by fasting and refeeding in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J. Exp. Zool. Part A: Ecol. Genet. Physiol.* 319: 202-212.

Gelineau, A and T. Boujard. 2001. Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 58: 716-724.

Glamuzina B., Glavic N., Tutman P., V. Kozul and B. Skaramuca. 2000. Notes on first attempt at artificial spawning and rearing of early stages with gold blotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindacner, 1875). *Aquacult. Int.* 8: 551-555.

Furutani, T., Masumoto, T and H. Fukada. 2013. Molecular cloning and tissue distribution of cholecystokinin-1 receptor (CCK-1R) in yellowtail *Seriola quinqueradiata* and its response to feeding and in vitro CCK treatment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 186: 1-8.

Ji, W., Ping, H.C., Wei, K.J., Zhang, G.R., Shi, Z.C., Yang, R.B., Zou, G.R and W.M. Wang. 2015. Ghrelin, neuropeptide Y (NPY) and cholecystokinin (CCK) in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): cDNA cloning,

- tissue distribution and mRNA expression changes responding to fasting and refeeding. *Gen. Comp. Endocrinol.* 223: 108-119.
- Hur SW. 2011. Characterization of cholecystokinin and mucous-secreting goblet cell in longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*. Ph.D. Thesis, National University of the Juju, Korea.
- Johnsen, A.H. 1998. Phylogeny of the cholecystokinin/gastrin family. *Front. Neuroendocrinol.* 19: 73-99.
- Lee Y.D., Song Y.B., Lim B.S., S.R. Oh and B.H. Kim. 2008. Grouper aquaculture research in Jeju Island, Korea. *Bull. Mar. Environ. Res.* Liddle, R. A. 1995. Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors. *Am. J. Physiol.* 269: G319-G327.
- MacDonald, E and H. Volkoff. 2009. Cloning, distribution and effects of season and nutritional status on the expression of neuropeptide Y (NPY), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Horm. Behav.* 56: 58-65.
- Murashita, K., Fukada, H., Hosokawa, H., Masumoto, T., 2006. Cholecystokinin and peptide Y in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Molecular cloning, real-time quantitative RT-PCR, and response to feeding and fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 287-297.
- Olsson, C., Aldman, G., Larsson, A and S. Holmgren. 1999. Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 202: 161-170.
- Volkoff, H., Eykelbosh, A.J and R.E. Peter. 2003. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Res.* 972: 90-109.
- Webb Jr, K.A., Khan, I.A., Nunez, B.S., Rønnestad, I and G.J. Holt. 2010. Cholecystokinin: molecular cloning and immunohistochemical localization in the gastrointestinal tract of larval red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 166: 152-159.
- Yuan, X., Li, A., Liang, X.F., Huang, W., Song, Y., He, S., Cai, W and Y.X. Tao. 2016. Leptin expression in mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky): Regulation by postprandial and short-term fasting treatment. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 194: 8-18.