

## 황놀래기 에스트로겐 수용체 cDNAs 분리 및 염기서열 분석

오대주<sup>1</sup>, 정형복<sup>2</sup>, 현경만<sup>2</sup>, 박지권<sup>3</sup>, 김세재<sup>2,3</sup>

(재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소<sup>1</sup>

제주대학교 생명과학과<sup>2</sup>

제주대학교 생명과학지역기술혁신센터<sup>3</sup>

### 요 약

본 연구는 자성선속어인 놀래기류의 생식에서 에스트로겐 수용체 (ER)의 기능을 규명하기 위한 기초연구로 수행되었다. 우선 제주연안에 서식하는 황놀래기 (*Pseudolabrus sieboldi*) 에서 ER cDNAs를 클로닝하였다. 황놀래기의 ER cDNA의 ORF 길이는 ER $\alpha$ 가 1581 염기쌍 (bp) 이며 ER $\beta$ 가 2037 bp 이었으며, 각각에 해당하는 단백질의 아미노산 개수는 ER $\alpha$ 가 526의 아미노산이며 ER $\beta$ 가 679의 아미노산이었다. 여러 종의 cDNA 염기서열을 비교 분석한 결과, 조사된 모든 종에서 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 의 C 도메인은 76개의 아미노산으로 구성되어 있었으며, ER $\alpha$ 의 E 도메인은 조사된 모든 종들이 194개의 아미노산을 가지고 있었다. ER $\beta$ 의 E 도메인은 194-196 개의 아미노산으로 구성되어 있었고, ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 내의 다른 도메인들의 아미노산 수는 일정치 않음을 알 수 있었다. 황놀래기의 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 를 구성하는 도메인들 간의 상동성을 조사한 결과, A/B 도메인에서 F 도메인까지의 아미노산은 각각 7%, 89%, 18%, 58% 그리고 17%의 상동성을 갖는 것으로 나타났다. 황놀래기 ER에 대한 multiple alignment 결과에서 황놀래기의 ER은 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*)의 ER과 가장 유사함 (ER $\alpha$  88%, ER $\beta$  84%)을 보였다. 본 연구에서 수행된 황놀래기 ER의 cDNA 염기서열 분석 결과는 어류의 생식특성 및 성 발달적 특이성에 관한 연구의 기초 자료로 활용될 것으로 기대된다.

### 서 론

에스트로겐은 척추동물의 다양한 생식활성에 작용하는 대표적인 여성호르몬이다. 특히, 난생의 척추동물에서 난황형성과정 (vitellogenesis)과 같은 난자의 발달은 에스

트로겐의 작용에 의해 나타나는 특별한 과정이다. 난모세포의 난황형성과정 동안에 estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)는 여포세포에서 합성되고 간을 자극하여 vitellogenin (Vtg)으로 불리는 특별한 단백질을 만들어낸다. 어류에서 Vtg는 간에서 난소로 이동하여 난모세포의 발달

에 영향을 주게 된다. 뇌에서의 E<sub>2</sub>는 중요한 생리적 요소로서 생식 기능을 위한 신경분화, 신경내분비조절에 영향을 주게 된다 (Beyer, 1999). Estrogen의 작용은 estrogen receptor (ERs)에 의해 매개되며 성적 발달과정에 매우 중요하게 작용한다 (Cavaco 등 1998). 지금까지 포유류에서는 두개의 에스트로젠 수용체 (ER $\alpha$  와 ER $\beta$ )가 분리되었다 (Xu 등 2003; Lewandowski 등 2002). ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 는 서로 다른 두 개의 유전자에서 만들어지며, 이 수용체들은 종종 특별한 세포나 조직에서 발견된다 (Choi 와 Habibi, 2003; Enmark 와 Gustafsson, 1999). 경골어류에서는 유전적으로 ER $\alpha$  및 ER $\beta$ 와는 다른 3번째 에스트로젠 수용체가 분리되었는데, 이 세 번째 ER은 ER $\beta$ 2 (Tchoudakova 등 1999; Menuet 등 2002; Ma 등 2000) 또는 ER $\nu$  (Hawkins 등 2000)라 부른다. ER은 리간드 의존성 전사인자로서 핵 수용체에 속한다. 리간드로서의 에스트로젠은 수용체의 특이적인 도메인에 결합한다. 리간드-에스트로젠 수용체 복합체는 estrogen responsive element (ERE)라 불리는 특이적인 프로모터에 결합하는 높은 친화도를 갖는다 (Yamamoto, 1985). 에스트로젠 수용체는 6개의 도메인 (A~F)으로 구성되어있는데 (Krust 등 1986), N-말단 부분에 있는 A/B 도메인은 hormone-independent transactivation function (AF1)을 가지며 (Evans, 1988), C 도메인은 ER isoform들 중에서 가장 잘 보존된 부분으로 두 개의 zinc finger motif를 갖는다 (Green 등 1986). C-말단에 위치한 E 도메인은 호르몬과 결합하며 hormone-dependent transactivation function (AF2)를 가지며 (Tora 등 1989; Berry 등 1990; Danielian 등 1992),

hormone-dependent dimerization이 가능하다 (Fawell 등 1990a; 1990b).

제주 연안에 서식하는 황놀래기(*Pseudolabrus sieboldi*)는 자웅동체성 어류로서 생식과 성분화 및 생식소 발달등의 연구를 수행하기에 매우 적합한 해양척추동물이다. 본 연구는 어류의 성분화 및 생식소 발달의 분자적 기전을 이해하는데 기초자료를 제공하기 위하여 제주 연안에 서식하는 어류인 황놀래기에서 두 종류의 ER cDNA를 cloning하고 그 염기서열을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

두 종류의 ER cDNA를 클로닝하기 위하여 성숙한 암컷 황놀래기 (*Pseudolabrus sieboldi*)를 제주연안에서 채집하였고, 얼음에서 마취 후 난소를 분리하여 RNA 추출에 사용하였다.

### 2. RNA 분리

Total RNA는 TRI-reagent (Molecular Research Center, INC., Cincinnati, Ohio, USA)를 사용하여 분리하였다. 1 ml의 TRI-reagent에서 50-100 mg의 조직을 균질화한 후, 0.2 ml의 chloroform 을 첨가하여 상온에서 15분간 반응하고 4 °C에서 12,000 g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전시키고, 80%의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. RNA의 양을 확인하기 위

해 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 RNA만 cDNA 합성에 이용하였다.

### 3. cDNA 합성

cDNA는 1 µg의 total RNA를 사용하여 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA)로 합성하였다. 반응은 70 °C에서 5분, 25 °C에서 5분 그리고 42 °C에서 60분간 진행되었다. 반응이 끝난 후, 70 °C에서 15분간 가열하여 cDNA의 합성을 중단시키고 80 µl의 nuclease-free water를 첨가하여 최종부피를 100 µl로 희석하였다.

### 4. ER cDNAs의 cloning

황놀래기 ERα와 ERβ의 전체 cDNA를 클로닝하기 위하여 다른 놀래기종인 *Halichoeres tenuispinis*의 염기서열을 참고로 디자인한 ERα P1, ERα P2, ERα P3, ERβ P1, primer 세트 (Table 1)를 이용하여 황놀래기의 ERα와 ERβ의 부분서열을 증폭하였다. 증폭산물

을 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고, 추출 및 정제후 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 클로닝 하였으며, insert가 확인된 클론의 plasmid DNA를 분리하여 염기서열을 결정하였다 (Bionex, seoul, Korea). 결정된 염기서열 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 BLAST 검색을 이용하여 확인하였다. ERα의 전체서열은 ERα P1, ERα P2 그리고 ERα P3 primer로 증폭된 부분 서열들을 조합하여 결정되었고, ERβ의 전체서열은 SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 RACE 방법으로 결정하였다. RACE 방법을 수행하는데 필요한 유전자 특이적인 primer 세트는 클로닝된 부분 서열을 참고로 제작되었다 (Table 2). RACE 방법으로 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인 후 정제하였고, 정제된 cDNA는 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 클로닝한 후 염기서열을 결정하였다 (Bionex, seoul, Korea).

Table 1. Primer sets used for partial cloning of ER isotypes in *Pseudolabrus sieboldi*.

Name		Primer sequence
ERα P1	Forward	5'-TACTACTCTGCTGCTCTGGACACA-3'
	Reverse	5'-TCAGCTGAAGAAAACCTGGAAG-3'
ERα P2	Forward	5'-ATAGGGAGCTGGTCCACATGAT-3'
	Reverse	5'-CATGAAGGAGAGTAGTGCAGAGG-3'
ERα P3	Forward	5'-ATGTATCCCGAAGAGAGCOGA-3'
	Reverse	5'-TTCTGTGCTCCCGGTCTCTTA-3'
ERβ P1	Forward	5'-CCATACACGGACAATAACCAAGAG-3'
	Reverse	5'-CTTCTGCTCCTCCATGAGGTAGAT-3'

**Table 2. Primer sets used for RACE of ER  $\beta$  in *P. sieboldi*.**

	Name	Primer sequence
ER $\beta$ GSP	3' RACE primer	5'-TGGCCATGGACCTCTGAGCTTCTAC-3'
	5' RACE primer	5'-CCTCTGAGCTCATGGTGGCTGCATT-3'
ER $\beta$ NGSP1	3' RACE primer	5'-GCATCAACGGCAGCAGCTCCATCAT-3'
	5' RACE primer	5'-CGGCAGGCTTGGCAGCTTTTACGTC-3'
ER $\beta$ NGSP2	3' RACE primer	5'-AAACCAGCTCCACGCCCGTCTACAG-3'
	5' RACE primer	5'-ATGCTGGTGGCAGGGTCATCATGG -3'

### 5. 염기서열 분석

ERs의 cDNA 염기서열은 BLASTN과 BLASTX(National Center for Biotechnology Information, NIH, USA)를 이용하여 분석하였다. Alignment는 CLUSTALW (Thompson 등 1994)를 사용하였고, bootstrap 분석은 PHYLIP의 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 100번 반복으로 수행하였다. PHYLIP의 CONSENSE 프로그램은 정밀한 consensus tree를 그리기 위해 이용되었다. 다음은 multiple sequence alignment에 이용된 어류들과 유전자들의 목록이다. (1) ER $\alpha$ : black porgy (bpER $\alpha$ ; Huang *et al.*, 2002), channel catfish (ccER $\alpha$ ; Xia, 1999), eelpout (epER $\alpha$ ; accession number, AY223902), gilthead seabream (gsER $\alpha$ ; Munoz-Cueto *et al.*, 1999), goldfish (gfER $\alpha$ ; accession number, AY055725), olive flounder (jfER $\alpha$ ; accession number, AB070629), mouse (mER $\alpha$ ; accession number, M38651), Nile tilapia (tER $\alpha$ ; Chang *et al.*, 1999), North African catfish (acER $\alpha$ ; accession number, X84743), rat (rER $\alpha$ ; accession number, NM012689), rainbow trout (rtER $\alpha$ ; Pakdel *et al.*, 2000), red sea bream (rsER $\alpha$ ; Touhata *et al.*,

1999), zebrafish (zfER $\alpha$ ; accession number, AB037185), Jeju wrasse (jwER $\alpha$ ; accession number, AY305026). (2) ER $\beta$ : black porgy (bpER $\beta$ ; accession number, AY074779), common carp (cER $\beta$ ; accession number, AB083064), gilthead seabream (gsER $\beta$ ; accession number, AF136980), goldfish (gfER $\beta$ 2; Ma *et al.*, 2000), olive flounder (jfER $\beta$ ; accession number, AB070630), rainbow trout (rtER $\beta$ ; accession number, AJ289883), zebrafish (zfER $\beta$ 2; accession number, AJ414567), Atlantic croaker (acER $\beta$ ; Hawkins *et al.*, 2000), channel catfish (ccER $\beta$ ; Xia *et al.*, 2000), spiny dogfish (dfER $\beta$ ; accession number, AF147746), goldfish (gfER $\beta$ ; Tchoudakova *et al.*, 1999), Japanese eel (jeER $\beta$ ; Todo *et al.*, 1996), medaka (jmER $\beta$ ; accession number, AB070901), Nile tilapia (tER $\beta$ ; Chang *et al.*, 1999), zebrafish (zfER $\beta$ ; accession number, AF349413), mouse (mER $\beta$  Tremblay *et al.*, 1997), rat (rER $\beta$ ; accession number, AJ002602), human (hER $\beta$ ; accession number, AB006590), and human PR (hPR; accession number, NM\_000926), Jeju wrasse (jwER $\beta$ ; accession number, AY305027).

## 결과 및 고찰

두 개의 ER cDNA가 성숙한 암컷 황놀래기의 난소에서 클로닝 되었다. 각 ER isotype의 open reading frame (ORF)의 길이는 각각 1581 bp (536 aa)와 2037 bp (679 aa)인 것으로 확인됐다 (fig. 1과 2). Multisequence analysis 결과는 ER이 모든 핵 수용체들 사이에서 공통적으로 나타나는 특징들을 보여주었다: 두 개의 zinc finger motif 내부에 존재하는 8개의 cystein 잔기 (Schwabe *et al.*, 1990); C 도메인에 존재하며 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$  모두에서 완벽히 보존되어 있는 D-box (EGCKA)와 P-Box (PATNQ); E 도메인에 위치한 ligand-dependent transactivation function (AF2; Danielian 등 1992). 황놀래기의 ER 아미노산 서열은 놀래기 (*H. tenuispinis*)와 매우 높은 상동성을 나타냈다 (ER $\alpha$  88%, ER $\beta$  84%; Table 3과 4). 특히, C 도메인은 100%의 상동성을 보이는 것으로 확인되었다. C 도메인은 ER family 중에서 가장 잘 보존된 부분으로서 두 개의 zinc finger motifs를 포함하며 (Schwabe 등 1993), DNA의 표적 부위를 인지하고 결합하는데 필요한 구조로 알려져 있다. 황놀래기 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 의 아미노산 서열을 기초로 수행된 phylogenetic analysis의 결과에서 consensus tree는 두 개의 주요한 클러스터를 보였으며, 그 중 하나의 클러스터는 ER $\alpha$  isotype들로 이루어진 cluster이며 다른 하나는 ER $\beta$  subtype들로 이루어진 클러스터로 나타났다 (fig. 4). Table 3과 4의 결과에서도 나타났듯이 황놀래기의 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 는 본 연구에서 조사된 다양한 종들 중 놀래기 (*H. tenuispinis*)의 ER $\alpha$ , ER $\beta$ 와 각각 가장

유사한 것으로 나타났다. ER 단백질의 크기는 여러 종들에서 다양하게 나타났다. ER $\alpha$ 의 A/B 도메인과 ER $\beta$ 의 F 도메인은 변이가 가장 심하였는데, ER $\alpha$ 의 A/B 도메인은 종에 따라 92-189개의 아미노산으로 이루어졌고, ER $\beta$ 의 F 도메인은 종에 따라 25-129개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 이러한 도메인들의 길이의 특이성은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나, Montano 등 (1995)은 도메인의 길이의 차이가 전사인자나 다른 보조 인자들과의 상호작용에 잠재적인 영향을 미칠 것으로 제안하였다. 이것은 수용체 기능의 진화적 차이점이 A/B 도메인과 F 도메인에서 크게 나타나는 것으로 보인다.

본 연구에서 클로닝 된 두 종류의 cDNA sequence 분석을 통해 황놀래기의 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 를 확인하였고 그 구조적 특성을 확인하였다. 수많은 연구자들이 어류의 생식과 성적 특성에 관한 연구를 수행하고 있으나, 아직까지도 정확한 분자적 기전을 이해하기에는 부족함이 있으며 관련된 유전자의 정확한 특성에 관한 연구는 그 기전을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 보인다. 본 연구에서는 어류의 성 호르몬 작용에 관여하는 ER 유전자의 여러 가지 구조적 특징만을 확인하였다. 그러므로, 어류 생식과 성분화 및 성전환에 대한 분자적 기전을 이해하기 위해서는 각 조직별, 시기별 유전자 발현양상과 그 기능에 대한 비교 연구 뿐만 아니라 다른 단백질들과의 상호 작용 및 다양한 생리적 작용에 관여하는 여러 호르몬 등 내부 및 외부 인자들에 대한 연구들이 수행되어야 할 것이다.

ATGTATCCCGAAGAGAGCCGAGGAGCCAGAGTCTGTACCATGGCTGCTGCACGGGAGGAA	60
MYPEESR GARVCTMAAAREE	20
GGAGAGGTTTGCACAGTAAACGAGGCACCACGACGGAGCTGGAAGTGTAAACAGC	120
GEVLHSGTKTRHHHDGAGSVNS	40
TCAGAGGGTCCACGCCGCTACAGGTCCAGCGTCTCGTCCAGTCAGCAGAGCATTTCC	180
SEGSTP VYR SSVSSSQQSIS	60
AGAGAGGAGCACTGTGGCACCAGTGACGAGTCTTACAGCATGGGGAGTCAGGGGCCGA	240
REEHC GTSDESYSN G E S G A G	80
GCTGCAGCCGGCTGCTTTGAGATGGCAAAGAGATGCGTTACTGTGCGGTGTGCACTGAC	300
AAAGCFEMAKEMRY <b>AVSD</b>	100
TATGCTCTGGTACCCTATGGGTGTGGTCTGTGAGGGCTGCAAGCCCTCTTTAAG	360
YASGYHYGVNS <b>ESKAFPK</b>	120
AGGAGCATCCAGGTCACAATGACTATATGTGCGCTGCAACCAATCAGTGCACGATCGAC	420
RSIQSHNDY <b>PAFQ</b> <b>ITID</b>	140
AGGAATCGCAGGAAGTGTCCAGGCTGTGCGCTCAGGAAGTGTTCAGGAAGTGGCATG	480
RNRREKS <b>QA</b> <b>RRLRKYEVGM</b>	160
ATGAAGGAGGTGTGCGTAAGGACAGGGGGCGTGTTTTGGCGCGTGACAAAGGCGCACT	540
MKGGRV R K D R G R V L R R D K R R T	180
GGTACAAGTGATAAGGATAAGGCTCTAAGGACCGGGAGCACAGAACAGTGCACCTCAG	600
G T S D K D K G S K D R E H R T V P P Q	200
GGCAGGAGGAAACCGCAGCAGTGTGGAGGAGGAAAAACACAGTGCATCAGCATGCTCT	660
G R R K H G S S V G G G K S P V I S M P	220
CCTGATCAGGTGCTCTCTGCTCCAGGTCAGAACCTCCCATCTTGTGCTCCCGTCAG	720
P D Q V L L L L Q G A E P P I L C S R Q	240
AACTGAGCAGACCTACGCGAGGTACCATGATGACCTGCTCACCAGCATGGCCGAT	780
K L S R P Y A E V T M M T L L T S M A D	260
<u>AGGGAGCTGGTCCACATGATCGCTGGGCCAAGAAGCTTCCAGGTTTCTGCAGCTGACC</u>	840
<u>RELVHMIAWAKKLPGLQLT</u>	280
<u>CTCCATGACAGGTCAGCTGCTGGAGAGCTCTGCTTGGAGTTCIGATGATTGGTCTC</u>	900
<u>LHDQVQLLES SWLEVLMI GL</u>	300
<u>ATCTGGAGTCCATCCACTGCCCTGGGAAACTCATCTTTGCTCAGGACCTCATACTGGAC</u>	960
<u>IWRSIHCPGKLI FAQDLID</u>	320
<u>CGAAGTGAAGGTGACTCGTGGAGGCATGGCAGAGATCTTCGACATGCTTTTGTCCACC</u>	1020
<u>RSEGD C V E G M A E I F D M L L S T</u>	340
<u>GCTTCCCGCTTCCGATGCTTAAACTCAAACTGAGGAGTTCGTCTGTCTCAAGCGATC</u>	1080
<u>ASRFRMLK L K P E E F V C L K A I</u>	360
<u>ATCCTGCTCAACTCTGGTCCCTTTTCTTCTGCACCGCACAAATGGAGCCGCTCCACGAC</u>	1140
<u>ILLNSGAFS FCTGTMEPLHD</u>	380
<u>AGCGCGCCGTGCAGAATATGCTCGACATTATCACAGCCTCTCATCCATCAGCTCAGC</u>	1200
<u>SAAVQNM L D I I T D A L I H H I S</u>	400
<u>CAATCAGGTTGCTCGGTTACACGAAATCAAGGCGACAGGCCAGCTGCTCTCTCTGCTC</u>	1260
<u>Q S G C S V H Q Q S R R Q A Q L L L L</u>	420
<u>TCCACATCAGGCACATGAGCACAAAGGCATGGAGCACCTCTACAGCATGAAGTGTAAAG</u>	1320
<u>SHIRHMSNKGM E H L Y S M K C K</u>	440
<u>AACAAGGTTCTCTGTACGACCTGCTACTCGAGATGCTGGACGCTCACCGCCCTCCACCGC</u>	1380
<u>NKVP L Y D L L L E H L D A H R L H R</u>	460
<u>CCGGACAGACCTGCAGAGTCTGCTCCAGACTGACGGAGGCCCGCATAATCACCAC</u>	1440
<u>PDRPAESWSQT D G E P A Y I T N</u>	480
<u>ACAAACCAACAACAGCAGCAGCAGCAGCTCCACCTCAGCTGGGCCAGAGTCAAGCTC</u>	1500
<u>TNTNNSSSSSSSST S A G P R V S L</u>	500
<u>GAGAGCCCAACAAAACCCCATAGGTCAGGGGGTCTGCAATGAGGGTCCCGCCCT</u>	1560
<u>ESP N K T P I G Q G V L Q Y G G S R P</u>	520
<u>GACTGCACTCACATCTATGA</u>	1581
<u>D C T H I L *</u>	526

Figure 1. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of ERα of *P. sieboldi*. 1581 bp encodes a protein of 526 amino acids. The conserved C-domain is marked by gray box, and E-domain regions are represented by underlines. The eight cysteine residues in the zincfinger motifs are boxed. Bold and italicized in the C-domain are P- and D-box. The AF2 region is italicized in E-domain. Termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for ERα were submitted to the GenBank with accession number DQ298133.

ATGGCTCTTCCCGGGCTGGACTCCGACTCTTTACCGCTGCTTCAGCTCCAGGAGGTG	60
M A S S P G L D S D S L P L L Q L Q E V	20
GACTCCAGCAAAGTCTCCGAGAGGCCCGCTCCCAAGTCTCTGCCCAGCTGTACACC	120
D S S K V S E R P G S P S L L P A V Y T	40
CCTCCTGGAGCATGGACAGCCACCGTCTACATCCCTGCCATACACGGACAATAAC	180
P P R S M D S H T V Y I P S P Y T D N N	60
CAAGAGTACAACCATGGCCATGGACCTCTGAGCTTCTACAGCCCGTCTGTGCTGAGCTAC	240
Q E Y N H G H G P L S F Y S P S V L S Y	80
GCCCAGCGTGGCCACAGACAGCCCGTCACTCTGTGCGCCCCCTTAGTCCGTCAGCC	300
A R P S A T D S P S S L C A P L S P S A	100
TTCTGGCCCCACAGTCAACCCAACTGCGCTACTGACCTGCGCTGTCCACAGCT	360
F W P P H S H P N L P S L T L R C P Q P	120
CTTGGCTACAATGAACCGGCTTACATGCACDCTGGCTGGAGGCCAACAACACAGCATC	420
L G Y W E P G L H A P W L E A K Q H S I	140
AACGGCAGCATGCCATCATCAGCTGTAAACAAGCCCTGGGAAGAGATCAGAAGAAGGA	480
N G S S S I I S C N K P P G K R S E E G	160
CTGGATGGTGTGAACCCCTCGTGTGTCTGTGTCAGTGGGAAGCTGCCATCGACTTC	540
L D G V N H P S L C S S A V G K A A M H F	180
TTCCCGCTGTTCACBACTACGCTTCCGGGTACCACTACGGCGTGTGGTCTGCGAGGC	600
<u>A V H D Y A S G Y H Y G V W S E G</u>	200
<u>Y T A A G C T T T T C A G A G A G T A T C C A T G G A C A A T G A C T A C A T G T G T G C C A C A</u>	660
<u>Q T A A G C T T T T C A G A G A G T A T C C A T G G A C A A T G A C T A C A T G T G T G C C A C A</u>	720
AATCAATCACTATCGACAGAACCGCGTAAAGCTGCCAGCTTCCCGCTCGCTGATAA	240
<u>N Q T I D K N R R K S Q A R L R K</u>	260
TGCTACGAGTGGGCATGTAAGATGTGGTGTAAAGCGGACGCTGCAGCTATCGAGGA	780
C Y E V G M M K C G V R R E R C S Y R G	280
ACCCGACAGCCCGCTGGTGGACCCAGCTCGGATGCCAGGACAGGGGTTTGGTCAGG	840
T R R R G G P Q P R D P T G R G L V R	280
GTGGGCTTGGTCTCGAGCTCAACGGCATCTCCAACCTGGAGGGCCCTCGCCCGGT	900
V G L G S R A Q R H L Q P G G A P R P G	300
CACCCCTCCCTCAGATGAACCATGTACACAATGCAGCCACCATGAGCTCAGAGGAAT	960
H P P P S D E P C T Q C S H H E L R G I	320
CATCTCAOBCATCGAAGCAGAGCCAGCGAGATCTACTCATGGAGGAACTGAAGAA	1020
H L T H H G S R A T G D L P H G G T E E	340
GCCTTTACGAGGCGAGCATGATGATGCCCTCACCACCTGGCAGACAAGGAATGGTT	1080
A F T E A S M M M S L T N L A D K E L V	360
<u>CTCATGATCAGCTGGCTAAAGAGATCCCTGGCTTGTAGAGCTGAGTCTCTACTGATCAG</u>	1140
<u>L M I S W A K K I P G E V E L S L T D Q</u>	380
<u>ATTCCTCTCGAATGCTGCTGGTGGAAATCTGATGTGGGCTGATGTGGAGGCTCT</u>	1200
<u>I C H L K C C W L E I L N L G L W H W S</u>	400
<u>GTGATCATCTGGAAAATAAICTCTCTCCAGACTTCAAACCTCAACAGGGAGGAGGC</u>	1260
<u>V D H P G K L I P S P D P K L N R E E G</u>	420
<u>CAGTGTGGAGGGCATCGAGATCTTCSACATGCTGCTGGCCGCACTCTCGGTT</u>	1320
<u>Q C V E G I M E I P D M L A A T S R F</u>	440
<u>CGTGAAGCTGACAGGAGGAGTACGCTGCTTCAAGGCCATGATCTCTCTCAAC</u>	1380
<u>R E L K L Q R E E V V C L K A M I L</u>	460
<u>TCACATCTGTACAGTTCCTCCAGACAGAGGAGCTGGAGAGCAGGAAACAGCTG</u>	1440
<u>S N C T C T S S P Q T D E R L E S R N K L</u>	480
<u>CTCGCTCTCGGCTCGGATCGATGCTCTTGTCTGGCCATTTCCAACTGGGCTTG</u>	1500
<u>L R L D S V I D A L V W A I S X G I</u>	500
<u>TGACCCAGCAGACTTGGCCCTGGACACTTCAACTGCTGCTCTCCACATCCGC</u>	1560
<u>S T C Q Q T L R L G H L L M L L S H I R</u>	520
<u>CAGCTCAGTAAAGGCATGGACATCTGTCCACATGAAGAGGAAGAAGCTGGTGTG</u>	1620
<u>H V S M K G M D H I S T M K R R K N V L</u>	540
<u>GTGTACGACTCTCTAGAGATGCTAGACGCCAACACTTCAGGCAGCAGCAGCAGC</u>	1680
<u>V Y D L L L L E H L D A N T S G S S S S</u>	560
<u>AGCCATATCTGCTTCAACAGCTGGACAGCTACTCAGACCAGCAGTCCCCAA</u>	1740
<u>S Q S S S S P S S D T Y S D Q Q Q P P Q</u>	580
<u>CATCACTCAGCTGAGCCAGCTCAGACCAGACACAGCCAGCAGCAGCAGCTGCT</u>	1800
<u>H Q S H L Q P T S D Q T T A D H D N V P</u>	600
<u>GCACAGGGCTCTGTAAGCCAGATCTTGGACGAACAGCTGCATGCTCTGCCCTCAA</u>	1860
<u>A Q G S A E G Q I L D E Q L H A L P L Q</u>	620
<u>TCATCTCTCGTTTCACAGTCAGATGGTGGCTGCCACATGGACAGAAATGATTACATC</u>	1920
<u>S S P P F H S Q M V G C H M D R N D Y I</u>	640
<u>CATCAGCAGCTGTCAATGGATACAGAGGATGCAAGTCCATCAGTGGGACCAACGCAC</u>	1980
<u>H Q Q H W S M D T E D A G P S V G P T H</u>	660
<u>TACATATCCCTGATCGAGGCTCATGGACACTGCTTGGAGGTGACTGGACTGTAA</u>	2037
<u>Y I I P D R G V M D T A L E V T G L *</u>	678

Figure 2. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of ER $\beta$  of *P. sieboldi*. 2037 bp encodes a protein of 678 amino acids. The conserved C-domain is marked by gray box, and E-domain regions are represented by underlines. The eight cysteine residues in the zincfinger motifs are boxed. Bold and italicized in the C-domain are P- and D-box. The AF2 region is italicized in E-domain. Termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for ER $\beta$  were submitted to the GenBank with accession number DQ298134.

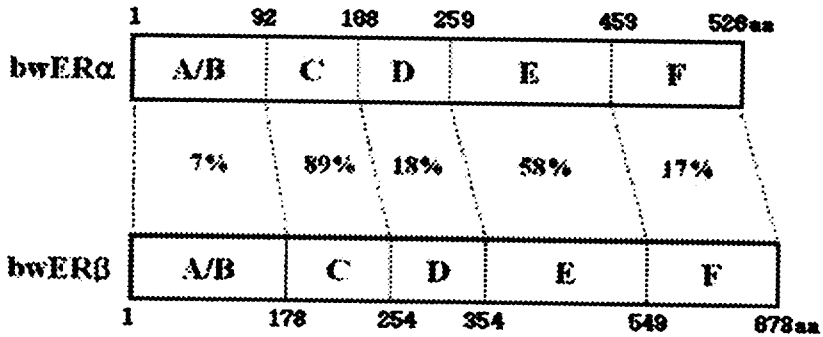


Figure 3. Comparison of the functional domains between bwERA and bwERβ. The functional A to F domains are presented schematically with the numbers of amino acid residues indicated. The percentage of amino acid identity between each domains of bwERA and bwERβ is depicted.

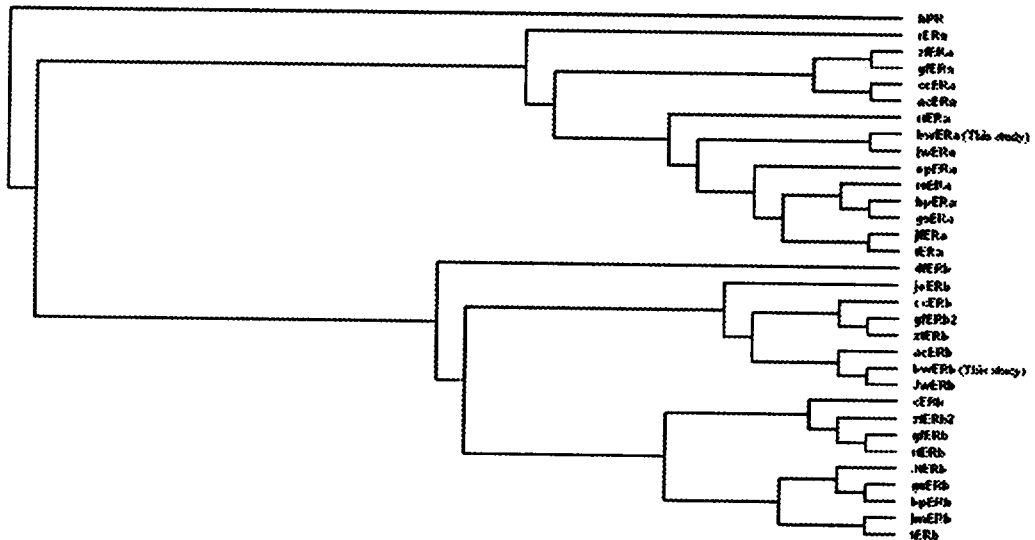


Figure 4. Phylogenetic analysis of the relationships between bwER isotypes with other species' ER isotypes. A consensus tree obtains with combined values both ER subtypes. A consensus tree is based on the values obtained by bootstrap resampling. Human progesterone receptor was used as outgroup. bwERA, bambooleaf wrasse ER α; bpERA, black porgy ERα; ccERA, channel catfish ERα; epERA, eelpout ERα; gsERA, gilthead seabream ERα; gfERA, goldfish ERα; jfERA, olive flounder ERα; mERA, mouse ERα; tERA, Nile tilapia ERα; acERA, North African catfish ERα; rERA, rat ER α; rtERA, rainbow trout ERα; rsERA, red sea bream ERα; jwERA, Jeju wrasse ERα; zfERA, zebrafish ERα; hERA, human ERα; bwERβ, bambooleaf wrasse ERβ; gfERβ, goldfish ERβ; acERβ, Atlantic croaker ERβ; ccERβ, channel catfish ERβ; gfERβ, goldfish ERβ; tERβ, Nile tilapia ERβ; bpERβ, black porgy ERβ; cERβ, common carp ERβ; gsERβ, gilthead seabream ERβ; jfERβ, olive flounder ERβ; rtERβ, rainbow trout ERβ; zfERβ2, zebrafish ERβ2; dfERβ, spiny dogfish ERβ; jmERβ, medaka ERβ; zfER β, zebrafish ERβ; jwERβ, Jeju wrasse.



Table 3. Comparison of amino acid identities between *P. sieboldi* ER $\alpha$  and other species' ER $\alpha$ s.

Species /domain	Overall	A/B	C	D	E	F
bwER $\alpha$	100(526)	100(92)	100(76)	100(91)	100(194)	100(73)
bpER $\alpha$	78(583)	51(142)	98(76)	82(94)	93(194)	45(77)
ccER $\alpha$	69(581)	23(148)	94(76)	45(95)	84(194)	22(68)
epER $\alpha$	78(570)	49(140)	98(76)	79(92)	93(194)	62(66)
gsER $\alpha$	75(579)	50(140)	98(76)	83(94)	96(194)	39(75)
gfER $\alpha$	60(564)	20(152)	94(76)	57(93)	81(194)	16(49)
jfER $\alpha$	77(578)	47(138)	98(76)	73(91)	92(194)	63(79)
mER $\alpha$	48(599)	7(186)	96(76)	23(92)	67(194)	19(51)
tER $\alpha$	74(585)	45(136)	96(76)	68(94)	91(194)	49(85)
acER $\alpha$	56(566)	29(189)	96(76)	42(93)	82(194)	41(12)
rER $\alpha$	48(600)	9(187)	96(76)	23(92)	67(194)	19(51)
rtER $\alpha$	68(577)	37(145)	94(76)	65(97)	88(194)	32(65)
rsER $\alpha$	80(581)	53(142)	97(76)	84(92)	95(194)	57(75)
jwER $\alpha$	88(574)	67(141)	100(76)	95(91)	97(194)	70(72)
zfER $\alpha$	61(569)	18(149)	96(76)	53(93)	83(194)	19(57)
hER $\alpha$	47(595)	7(182)	96(76)	27(92)	67(194)	19(51)

Overall amino acid identities are indicated in percentages. The total number of amino acids are indicated in parentheses.

Table 4. Comparison of amino acid identities between *P. sieboldi* ER $\beta$  and other species' ER $\beta$ s.

Species /domain	Overall	A/B	C	D	E	F
bwER $\beta$	100(678)	100(178)	100(76)	100(100)	100(195)	100(129)
gfER $\beta$ 2	55(610)	36(168)	97(76)	32(96)	83(196)	9(75)
acER $\beta$	78(673)	74(179)	98(76)	56(99)	96(195)	58(124)
ccER $\beta$	54(575)	30(157)	68(76)	10(73)	79(195)	23(52)
gtER $\beta$	52(568)	28(167)	92(76)	12(86)	78(196)	4(43)
tER $\beta$	53(557)	33(152)	93(76)	23(82)	76(195)	19(52)
bpER $\beta$	53(553)	30(153)	90(76)	22(76)	77(195)	11(53)
cER $\beta$	55(550)	31(158)	92(76)	12(86)	79(195)	20(44)
gsER $\beta$	53(559)	30(153)	90(76)	20(82)	78(195)	9(53)
jfER $\beta$	53(565)	35(159)	92(76)	10(82)	78(195)	11(53)
rtER $\beta$	52(568)	25(175)	93(76)	20(87)	78(195)	17(35)
zfER $\beta$ 2	55(553)	27(156)	93(76)	27(87)	78(195)	23(39)
dfER $\beta$	51(542)	22(166)	89(76)	29(91)	68(194)	20(25)
jmER $\beta$	54(562)	30(154)	93(76)	28(82)	76(195)	14(55)
zfER $\beta$	59(592)	41(162)	92(76)	30(99)	98(195)	70(123)
jwER $\beta$	84(671)	84(178)	98(76)	55(99)	84(195)	17(63)

Overall amino acid identities are indicated in percentages. The total number of amino acids are indicated in parentheses.

참 고 문 헌

- Berry, M., D. Metzger and P. Chambon. 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9: 2811-2818.
- Beyer, C. 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat. Embryol. (Berl.)* 199: 379-390.
- Blazquez, M. and F. Piferrer. 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 219: 83-94.
- Callard, G. V., Z. Petro and K. J. Ryan. 1978. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system, *Endocrinol.* 103 6: 2283-2290.
- Cavaco, J. E. B., C. Vilroix, V. L. Trudeau, R. W. Schulz and H. J. T. Goos. 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Am. J. Physiol.* 44: 1793-1802.
- Chang, X. T. Kobayashi, T. Todo, T. Ikeuchi, M. Yoshiura, H. Kaijura-Kobayashi, C. Morry and Y. Nagahama. 1999. Molecular cloning of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zool. science* 16: 653-658.
- Chiang, E. F., Y. L. Yan, S. K. Tong, P. H. Hsiao, Y. Guiguen, J. Postlethwait and B. C. Chung. 2001. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. *J. Exp. Zool.* 290: 709-714.
- Choi, C. Y. and H. R. Habibi. 2003. Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 204: 169-177.
- Conley, A. and M. Hinshelwood. 2001. Mammalian aromatases, *Reproduc.* 121 (5) 685-695.
- Danielian, P. S., R. White, J. A. Lees and M. G. Parker. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11: 1025-1033.
- Evans, R. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240: 889-895.
- Fawell S. E., J. A. Lees, R. White and M. G. Parker. 1990a. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell.* 60: 953-962.
- Fawell S. E., R. White, S. Hoare. M. Sydenham, M. Page and M. G. Parker. 1990b. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by

- impaired receptor dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6883-6887.
- Gelinas, D., G. A. Pitoc, and G. V. Callard. 1998. Isolation of a goldfish brain Cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. Mol. Cell. Endocrinol. 138: 81-93.
- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos and P. Chambon. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. Nature. 320: 134-139.
- Hawkins, M. B., J. W. Thornton, J. K. Skipper, A. Dotte and P. Thomas. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Biochem. 20: 10751-10756.
- Huang, Y., W. Yueh, J. Huang, J. Du, L. Sun, Y. Nagahama and C. Chang. 2002. Cloning and expression of estrogen receptors in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*): implications of sex change mechanism. Mar. Biotechnol. 4: 236-246.
- Krust, A., S. Green, P. Argos, V. Kumar, P. Walter, J. M. Bornert and P. Chambon. 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. EMBO J. 5: 891-897.
- Lewandowski, S., K. Kalita and L. Kaczmarek. 2002. Estrogen receptor beta: potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. FEBS Lett. 524: 1-5.
- Ma, C. H., K. W. Dong and K. L. Yu. 2000. cDNA cloning and of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). Biochim. Biophys. Acta. 1490: 145-152.
- Menuet, A., E. Pellegrini, I. Anglade, O. Blaise, V. Laudet, O. Kah and F. Pakdel. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. Biol. Reprod. 66: 1881-1892.
- Montano, M. M., V. Müller, A. Trobaugh and B. S. Katzenellenbogen. 1995. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. Mol. Endocrinol. 9: 814-825.
- Munoz-Cueto J. A., E. Burzawa-Gerard, O. Kah, Y. Valotaire and F. Pakdel. 1999. Cloning and sequencing of the gilthead sea bream estrogen receptor cDNA. DNA Seq. 10: 75-84.
- Pakdel, F., R. Metivier, G. Flouriot and Y. Valotaire. 2000. Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. Endocrinol. 141: 571-580.
- Schwabe, J. W., D. Neuhaus and D. Rhodes. 1990. Solution structure of the

- DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature*. 348: 458-461.
- Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T., Rhodes, D., 1993. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*. 75: 567-578.
- Tchoudakova A., S. Pathak and G. V. Callard. 1999. Molecular cloning of an estrogen receptor beta subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 388-400.
- Tchoudakova, A. and G. V. Callard. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinol.* 139: 2179-2189.
- Tchoudakova, A., M. Kishida, E. Wood, G. V. Callard. 2001. Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78: 427-439.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Todo, T., S. Adachi and K. Yamneuchi. 1996. Molecular cloning and characterization of Japanese eel estrogen receptor cDNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 119: 37-45.
- Tora, L., J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer and P. Chambon. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 59: 477-487.
- Touhata, K., M. Kinoshita, Y. Tokuda, H. Toyohara, M. Sakaguchi, Y. Yokoyama and S. Yamashita. 1999. Sequence and expression of a cDNA encoding the red sea bream androgen receptor. *Biochem. Biophys. Acta.* 1449: 199-202.
- Xia, Z., W. L. Gale, X. Chang, D. Langenau, R. Patino, A. G. Maule and L. D. Densmore. 1999. Cloning, in vitro expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1133: 360-368.
- Xia, Z., W. L. Gale, X. Chang, D. Langenau, R. Patino, A. G. Maule and L. D. Densmore. 2000. Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of channel catfish estrogen receptor  $\beta$ . *Gen. Comp. Endocrinol.* 118: 139-149.
- Xu, L., Q. Pan-Hammarstrom, A. Forsti, K. Hemminki, L. Hammarstrom, D. Labuda, J. A. Gustafsson and K. Dahlman-Wright. 2003. Human estrogen receptor beta 548 is not a common variant in three distinct populations. *Endocrinol.* 144: 3541-3546.
- Yamamoto, K. R. 1985. Origins of conserved gene regulations. *Annu. Rev. Genet.* 19: 209 - 252.