J. of Basic Sciences, Cheju Nat'l Univ.
19(1), 135~149, 2006

기초과학연구 제주대학교
19(1), 135~149, 2006

황놀래기 Aromatase cDNAs 분리 및 염기서열 분석

오대주[1], 정형복[2], 현경만[2], 박지권[3], 김세재[2,3]

(재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소[1]

제주대학교 생명과학과[2]

제주대학교 생명과학지역기술혁신센타[3]

요 약

제주연안에 서식하는 황놀래기에서 aromatase cDNAs (*CYP19a*와 *CYP19b*)를 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 방법으로 클로닝하였다. 황놀래기의 *CYP19a*와 *CYP19b* cDNA는 각각 1569와 1485 염기쌍으로 구성되어 있으며, 단백질의 아미노산 개수는 각각 522와 494개인 것으로 나타났다. 분리된 cDNA 염기서열을 다른 어류의 *CYP19a*와 *CYP19b*의 염기서열과 비교한 결과, 이미 보고된 다른 종들의 aromatase에서 공통적으로 나타나는 membrane-spanning region, I-helix region, Ozol's peptide region, aromatic region 그리고 heme-binding region을 가지고 있었고 서로 높은 상동성를 보여주었다. *CYP19a*와 *CYP19b*간의 상동성 분석 결과, 두 유전자는 63%의 상동성을 가지고 있었다. Aromatase의 아미노산에 대한 multiple alignment 결과, 황놀래기의*CYP19a*와 *CYP19b*는 조사된 어류들 중, 90%의 상동성을 보인 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*)의 *CYP19a*, *CYP19b*와 가장 유사함을 확인하였다. 본 연구에서 수행된 황놀래기의 aromatase cDNA sequence 분석 결과는 어류의 생식특성 및 성적 특이성에 관한 연구에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

서 론

Steroid 호르몬은 척추동물에서 매우 중요한 역할을 한다. 특히, estrogen은 성 분화및 생식에 있어서 중추적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Valle 외 2002). Aromatase는 척추동물에서 steroid hormone의 생리학적 역할을 이해하는데 매우 중요하다 (Zhang 등 2004). Steroidogenic 효소인 cytochrome P450 aromatase (CYP19)은 cytochrome P450 superfamily에 속한다. 안드로겐에서 에스트로겐으로의 전환은 aromatase와 ubiquitous flavoprotein인 NADPH-dependent cytochrome P450 reductase로 구성된 aromatase 복합체에 의해 일어난다 (Conley 등 2001; Gelinas 등 1998). Aromatase의 활성이 양서류 (Yu 등 1993), 파충류 (Jeyasurea와 Place, 1998) 그리고 조류 (Elbrecht와 Smith, 1992; Wartenberg 등 1992)에서 확인이 된 이후, 담수성 경골어류

와 해수성 경골어류의 뇌와 생식소에서 이 유전자의 cloning이 이루어져 왔다(Valle 외 2002). 어류에서는 두 종류의 aromatase 유전자가 확인되어지고 있으며, 각각은 *CYP19a* (ovary type)와 *CYP19b* (brain type)으로 불린다. 이 유전자들은 두 개의 다른 aromatase 단백질인 CYP19A1 또는 P450 aromatase A, CYP19A2 또는 P450 aromatase B를 생성한다고 알려져 있다 (Blazquez와 Piferrer, 2004; Chiang 등 2001a; Tchoudakova와 Callard, 1998; Tchoudakova 등 2001). 인간의 *CYP19* 유전자는 난소, 정소, 뇌, 태반 등 여러 조직에서 발현됨이 보고되었고 (Simpson 등 1997), 특히 어류에서는 생식소와 뇌에서 aromatase의 활성이 잘 알려져 있다 (Tchoudakova와 Callard, 1998; Kishida와 Callard, 2001; Kwon 외 2001). 이 유전자는 진화적으로 척추동물들 간에 공통적으로 나타나는 특성이 보존되어 있다 (Conley 등 2001; Callard 등 1978). Aromatase mRNA의 발현은 어류에서 난소 분화에 중요한 역할을 담당한다 (Guiguen 등 1999). 즉 자성선숙성 자웅동체 어류에서의 aromatase 활성의 억제는 완전한 성전환을 유도하는 데에 관여하고 (Kroon 등 2000), 웅성선숙성 자웅동주 어류에서의 생식선의 aromatase 활성 증가는 자연적 또는 인위적인 성전환시에 (Lee 등 2000; 2001), 웅성선숙성 자웅동주 어류에서의 aromatase 활성의 억제는 자연적인 성전환을 저해하는 데에 (Lee 등 2002) 관여한다고 알려져 있다. 예를 들면, 치어에 외래의 성스테로이드 호르몬을 처리하게 되면 유전적인 성과는 다른 기능적인 성전환을 일으킨다 (Yamamoto, 1969).

제주 연안에 서식하는 황놀래기 (*Pseudolabrus sieboldi*)는 자웅동체성 어류로서 생식과 성분화 및 생식소 발달 등의 연구를 수행하기에 매우 적합한 해양척추동물이다. 본 연구에서는 어류의 성분화 및 생식소발달의 분자적 기전을 이해하는데 기초 자료로 삼고자 제주 연안에 서식하는 어류인 황놀래기에서 *CYP19a*와 *CYP19b* cDNA를 클로닝하고 그 염기서열을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

두 종류의 *CYP19* cDNA를 클로닝하기 위하여 성숙한 암컷 황놀래기 (*Pseudolabrus sieboldi*)를 제주연안에서 채집하였고, 얼음에서 마취 후 뇌와 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 15분 간 반응하고 4 ℃에서 12,000 g로 15분 간 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 위해 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.7~1.9 범위내의 RNA만 cDNA 합성에 이용하였다.

3. cDNA 합성

cDNA는 1 ㎍의 total RNA를 사용하여 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA)로 합성하였다. 반응은 70 ℃에서 5분, 25 ℃에서 5분 그리고 42 ℃에서 60분간 진행되었다. 반응이 끝난 후, 72 ℃에서 15분간 가열하여 cDNA의 합성을 중단시키고 80 ㎕의 nuclease-free water를 첨가하여 최종부피를 100 ㎕되게 희석하였다.

4. CYP19 cDNAs의 cloning

황놀래기 *CYP19a*와 *CYP19b*의 전체 cDNA를 클로닝하기 위하여 다른 놀래기종인 *Halichoeres tenuispinis*의 염기서열을 참고로 디자인한 *CYP19a* P1과 *CYP19b* P1 primer 세트 (Table 1)를 이용하여 황놀래기의 ERα와 ERβ의 부분서열을 증폭하였다. 증폭산물을 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고, 추출 및 정제 후 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. *CYP19a*와 *CYP19b*의 전체서열은 SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 RACE 방법으로 결정하였다. RACE 방법을 수행하는데 필요한 유전자 특이적인 primer 세트는 클로닝 된 부분 서열을 참고로 제작되었다 (Table 2). RACE 방법으로 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인 후 추

Table 1. Primer sets used for partial cloning of *CYP19* subtypes in *P. sieboldi*

Name		Primer sequence
CYP19a P1	Forward	5′-ACTGTGGTAGTATTGCAGGGAGTG-3′
	Reverse	5′-ACACATACTGCCTCACGTTCTCTG-3′
CYP19b P1	Forward	5′-GTATCGTCTGAAGTCACCGTCTTTC-3′
	Reverse	5′-CCTAAGGACTGTGTTCATCTCCTC-3′

Table 2. Primer sets used for RACE of *CYP19* subtypes in *P. sieboldi*

Name		Primer sequence
CYP19a GSP	3′ RACE primer	5′-TCAGCTGTGCACCACGTCCTGAAG-3′
	5′ RACE primer	5′-AATGGCTGGGAGTAGCGACGAGGAG-3′
CYP19a NGSP1	3′ RACE primer	5′-CCTGCAGCAGACAGTGGAGGTTTG-3′
	5′ RACE primer	5′-GTGAAGTCCACCACAGGATGGAAGC-3′
CYP19a NGSP2	3′ RACE primer	5′-GAGGCACAAGACAGCAACCCAGGAG-3′
	5′ RACE primer	5′-CAGACAGCTCACCATGGCTCTGTGC-3′
CYP19b GSP1	3′ RACE primer	5′-GCCTCCAGAGGACAGTGGGAATCTG-3′
	5′ RACE primer	5′-CAGCCTTGGCGAGGACACACAGT-3′
CYP19b NGSP1	3′ RACE primer	5′-CCAAGAGCTGCAGGACGTGATGG-3′
	5′ RACE primer	5′-GCCGAAGGGCTGGAAGAAACGAC-3′
CYP19b NGSP2	3′ RACE primer	5′-GATCGCAGCTCCTGACACACTCTCC-3′
	5′ RACE primer	5′-CTTCCAGAGCTTTGCGCATGGTG-3′

출 및 정제하였고, 정제된 cDNA는 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 클로닝 한 후 염기서열을 결정하였다 (Bionex, seoul, Korea).

5. 염기서열 분석

*CYP19*s의 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) *CYP19a*: Nile tilapia *CYP19a* (nt*CYP19a*; accession number, AF472620), goldfish (gf*CYP19a*; accession number, AB009336), zebrafish (zf*CYP19a*; accession number, AF004521), gilthead seabream (gb*CYP19a*; accession number, AF399824), Japanese flounder (jf*CYP19a*; accession number, AB017182), red seabream (rb*CYP19a*; accession number, AB051290), medaka (m*CYP19a*; accession number, D82968). Jeju wrasse (jw*CYP19a*; accession number, AY489061) (2) *CYP19b*: Nile tilapia (nt*CYP19b*; accession number, AF306786), Mozampique tilapia (mt*CYP19b*; accession number, AF135850), goldfish (gf*CYP19b*; accession number, AB009335), zebrafish (zf*CYP19b*; accession number, AF226619), channel catfish (cc*CYP19b*; AF417239), Japanese medaka (jm*CYP19b*; accession number, AY319970), Jeju wrasse (jw*CYP19b*; accession number, AY489060).

결과 및 고찰

본 연구에서 사용된 황놀래기는 제주연안에서 쉽게 볼 수 있는 대표적인 어류이며, 척추동물의 생식, 성분화 그리고 생식소 발달등의 연구에 적합한 해양 척추동물이다. 본 연구에서는 황놀래기의 난소와 뇌에서 *CYP19a*와 *CYP19b* cDNA를 분리하여 클로닝하였고 염기서열 분석을 수행하였다. Aromatase는 안드로겐을 에스트로겐으로 전환하는 역할을 수행하며 (Conley 등 2001; Gelinas 등 1998), aromatase에 의해 형성된 에스트로겐은 핵수용체 일원의 하나인 에스트로겐 수용체에 의해 그 작용을 나타낸다 (Cavaco 등 1998). Aromatase는 그 타입에 따라 주로 발현되는 조직이 다르게 나타나는데, *CYP19a*는 난소 특이적으로 발현하며, *CYP19b*는 주로 뇌에서 발현된다 (Kwon 등 2001; Tchoudakova와 Callard, 1998). 따라서 *CYP19a*와 *CYP19b*의 기능은 그 타입에 따라 생리학적 기능에 차이가 존재하는 것으로 보인다.

난소와 뇌에서 분리된 *CYP19a*와 *CYP19b* cDNA의 염기서열 분석 결과, *CYP19* mRNA의 open reading frame (ORF)의 길이가 *CYP19a*의 경우 1569 bp이며, *CYP19b*의 경우는 1485 bp인 것으로 나타났다. 결정된 염기서열을 바탕으로 예상되는 아미노산의 수는 Figure 1과 2에서 보여주듯이 *CYP19a*

```
ATGGATCTGATCTCTGCTTGTGAACGGACCATGAGTCCTATAGGTTTGGATGCTGAGGTG      60
 M  D  L  I  S  A  C  E  R  T  M  S  P  I  G  L  D  A  E  V       20
AGAGACCTGGTCTACATGTCCCAGAATGCAACTGTGGTGGGATTGCTGGGAGTGTCAATG     120
 R  D  L  V  Y  M  S  Q  N  A  T  V  V  G  L  L  G  V  S  M       40
GCTACCAGGACCCTGGTTCCGCTTTTTTTGTGCTGCTTGCAGCATGGAACCACAAGGAC      180
 A  T  R  T  L  V  P  L  F  F  V  L  L  A  A  W  N  H  K  D       60
AAGAAGTCTGTACCAGGCCCGTCTTTCTGTCTGGGTTTGGGTCCACTTCTATCATATTTA     240
 K  K  S  V  P  G  P  S  F  C  L  G  L  G  P  L  L  S  Y  L       80
AGATTTATCTGGACTGGTATTGGTACAGCATCTAACTACTACAGCACCAAGTATGGAGAC     300
 R  F  I  W  T  G  I  G  T  A  S  N  Y  Y  S  T  K  Y  G  D      100
ATTGTCAGAGTCTGGATCAATGTTTGGATCTACGGAGAGGAGACGCTCATACTCAGCAGG     360
 I  V  R  V  W  I  N  V  W  I  Y  G  E  E  T  L  I  L  S  R      120
TCATCAGCTGTGCACCACGTCCTGAAGAGTGGCCACTACACTTCACGTTTTGGAAGCAAG     420
 S  S  A  V  H  H  V  L  K  S  G  H  Y  T  S  R  F  G  S  K      140
CAAGGCCTCAGCTGCATCGGCATGAATGAAAGAGGGATCATATTTAACAACAATGTACCT     480
 Q  G  L  S  C  I  G  M  N  E  R  G  I  I  F  N  N  N  V  P      160
CTGTGGAAAAAGATTCGCACCTACTTCACTAAAGCGCTGACAGGTCCGGGCCTGCAGCAG     540
 L  W  K  K  I  R  T  Y  F  T  K  A  L  T  G  P  G  L  Q  Q      180
ACAGTGGAGGTTTGTGTCTCATCCACTCAGAGTCACCTAGATGATCTGGACAGTTTGGAT     600
 T  V  E  V  C  V  S  S  T  Q  S  H  L  D  D  L  D  S  L  D      200
GATGTGGACGTGATCAGTTTGCTGCGTTGCACCGTGGTGGATATCTCCAACAGACTCTTT     660
 D  V  D  V  I  S  L  L  R  C  T  V  V  D  I  S  N  R  L  F      220
CTGGATGTTCCTGTGAATGAGAAAGAGCTGATGGTGAAGATTCAGAAGTATTTTGACACA     720
 L  D  V  P  V  N  E  K  E  L  M  V  K  I  Q  K  Y  F  D  T      240
TGGCAGACAGTGCTCATCAAACCAGACATTTACTTCAAGTTAGACTGGATTCACCAGAGG     780
 W  Q  T  V  L  I  K  P  D  I  Y  F  K  L  D  W  I  H  Q  R      260
CACAAGACAGCAACCCAGGAGCTGCAAGATGCCATAGAGAGCCTTGTGGAGCAGAAGAGG     840
 H  K  T  A  T  Q  E  L  Q  D  A  I  E  S  L  V  E  Q  K  R      280
AGAGAAGTGGAGCAGGCAGAGACTAGACAACATCAACTTCACAGCTGAGCTCATCTTT      900
 R  E  V  E  Q  A  E  R  L  D  N  I  N  F  T  A  E  L  I  F      300
GCACAGAGCCATGGTGAGCTGTCTGCAGAGAATGTGAGGCAGTGTGTGTTGGAGATGGTG     960
 A  Q  S  H  G  E  L  S  A  E  N  V  R  Q  C  V  L  E  M  V      320
ATCGCAGCACCTGACACTCTGTCCATCAGCCTTTTCTTCATGCTGCTGCTCCTCAAACAA    1020
 I  A  A  P  D  T  L  S  I  S  L  F  F  M  L  L  L  L  K  Q      340
CATCCTGATGTGGAGCTGCAGCTGCTGCAGGAGATGGACACTGTTGTTGGTGAAGGACAG    1080
 H  P  D  V  E  L  Q  L  L  Q  E  M  D  T  V  V  G  E  G  Q      360
CTTCAGAACGGAAACCTTCAGAAGTTGCCATTGTTGGAGAGCTTCATCAACGAATGCTTA    1140
 L  Q  N  G  N  L  Q  K  L  P  L  L  E  S  F  I  N  E  C  L      380
CGCTTCCATCCTGTGGTGGACTTCACCATGCGTCGCGCCTTGTCGGATGACATCATAGAA    1200
 R  F  H  P  V  V  D  F  T  M  R  R  A  L  S  D  D  I  I  E      400
GGCTACAGGGTACCTAAAGGAACAAACATCATACTGAACACCGGCCGCATGCACAGGACA    1260
 G  Y  R  V  P  K  G  T  N  I  I  L  N  T  G  R  M  H  R  T      420
GAGTTTTTCCTCAAACCCAATGACTTCAGCCTGGAAAATTTTGAAAAAAATGCTCCTCGT    1320
 E  F  F  L  K  P  N  D  F  S  L  E  N  F  E  K  N  A  P  R      440
CGCTACTTCCAGCCATTTGGCTCAGGTCCTCGTGCGTGTGTTGGAAAGCACATCGCCATG    1380
 R  Y  F  Q  P  F  G  S  G  P  R  A  C  V  G  K  H  I  A  M      460
GTGATGATGAAATCCATCCTGGTGACGCTGCTGTCCCGGTACTCAGTCTGCCCTCACGAA    1440
 V  M  M  K  S  I  L  V  T  L  L  S  R  Y  S  V  C  P  H  E      480
GGTCTGACCCTGGACGGCCTCCCGCAGACCAACAACCTGTCCCAGCAGCCTGTGGAGCAC    1500
 G  L  T  L  D  G  L  P  Q  T  N  N  L  S  Q  Q  P  V  E  H      500
CATCAGGAGAACGAGCCGCTCGGCATGAGGTTCTTACCGAGACAGAGAGGAAGCTGGGAA    1560
 H  Q  E  N  E  P  L  G  M  R  F  L  P  R  Q  R  G  S  W  E      520
ACTCTCTGA                                                        1569
 T  L  *                                                          522
```

Figure 1. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *CYP19a* of *P. sieboldi*. 1569 bp encodes a protein of 522 amino acids. Termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for *CYP19a* were submitted to the GenBank with accession number DQ298135.

```
ATGTTGGTGAATGTATCGTCTGAAGTCACCGTCTTCCTTCTCCTGCTGCTCCTGTTGCTG      60
 M  L  V  N  V  S  S  E  V  T  V  F  L  L  L  L  L  L  L  L      20
CTTTTCACGTGGAGCCAAACACATCGCTCACAGATACAAGGTCCCTCCTTCCTGGTAGGA     120
 L  F  T  W  S  Q  T  H  R  S  Q  I  Q  G  P  S  F  L  V  G      40
CTCGGTCCTCTTCTGACCTACAGCAGGTTTATCTGGACTGGGATAGGAACAGCCAGCAAC     180
 L  G  P  L  L  T  Y  S  R  F  I  W  T  G  I  G  T  A  S  N      60
TACTACAACAACAAATACGGCAGCATTGTGCGGGTATGGATTAACGGCGAGAGGACCCTC     240
 Y  Y  N  N  K  Y  G  S  I  V  R  V  W  I  N  G  E  R  T  L      80
ATCCTGAGCAGGTCTTCAGCTGTGTATCATGTTCTGAGGAGCACTAACTACACAGCCAGA     300
 I  L  S  R  S  S  A  V  Y  H  V  L  R  S  T  N  Y  T  A  R     100
TTCGGGAGCAGAACAGGGCTGGAGTGTATCGGGATGGAGGGGAAGGGGATCATTTTCAAC     360
 F  G  S  R  T  G  L  E  C  I  G  M  E  G  K  G  I  I  F  N     120
AGTGACGTCCAGCTCTGGAGGAAAGTGAGGACGTATTTCTCCAAAGCTCTGACAGGCCCT     420
 S  D  V  Q  L  W  R  K  V  R  T  Y  F  S  K  A  L  T  G  P     140
GGCCTCCAGAGGACAGTGGGAATCTGTGTGAGCTCCACTGCCAAACATCTGGACCGCCTA     480
 G  L  Q  R  T  V  G  I  C  V  S  S  T  A  K  H  L  D  R  L     160
CAAGAGATGACCGACCTTTCTGGACATGTGGACGCTCTAAATCTGCTGAGAGCCATCGTG     540
 Q  E  M  T  D  L  S  G  H  V  D  A  L  N  L  L  R  A  I  V     180
GTGGACATCTCCAACAGGCTTTTCCTCAGGGTGCCGCTTAATGAAAAAGACCTGCTGATG     600
 V  D  I  S  N  R  L  F  L  R  V  P  L  N  E  K  D  L  L  M     200
AAAATCCAAAGCTACTTTGAAACATGGCAGACAGTTCTAATAAAGCCTGATATATTCTTT     660
 K  I  Q  S  Y  F  E  T  W  Q  T  V  L  I  K  P  D  I  F  F     220
AAGATTGGGTGGCTCTACAACAAGCACAAGAAAGCAGCCCAAGAGCTGCAGGACGTGATG     720
 K  I  G  W  L  Y  N  K  H  K  K  A  A  Q  E  L  Q  D  V  M     240
GAGAGCCTGCTAGAGACGAAGAGGCAGATAATAAAGGAGACAGAGAAGCTAGACGATGAT     780
 E  S  L  L  E  T  K  R  Q  I  I  K  E  T  E  K  L  D  D  D     260
CTTGATTTTGCAACAGAGCTCATCTTTGCTCAGAGCCATGGAGAGCTCTCAGCTGATAAT     840
 L  D  F  A  T  E  L  I  F  A  Q  S  H  G  E  L  S  A  D  N     280
GTCAGACAGTGCTTGCTGGAGATGGTGATCGCAGCTCCTGACACACTCTCCATCAGCCTC     900
 V  R  Q  C  L  L  E  M  V  I  A  A  P  D  T  L  S  I  S  L     300
TTCTTCATGTTGCTGCTGCTGAAACAGAACCCGGATGTGGAGATGAGGATAGTAGAGGAG     960
 F  F  M  L  L  L  L  K  Q  N  P  D  V  E  M  R  I  V  E  E     320
ATGAACACAGGCTTAAGAGAAAAAGGTGATGGAAACTTGGATTACCAAAGCTTGAAAGTG    1020
 M  N  T  G  L  R  E  K  G  D  G  N  L  D  Y  Q  S  L  K  V     340
CTGGAGAGTTTCATAAATGAGTCTCTGCGGTTTCATCCTGTGGTTGATTTCACCATGCGC    1080
 L  E  S  F  I  N  E  S  L  R  F  H  P  V  V  D  F  T  M  R     360
AAAGCTCTGGAAGATGACAACATTGAAGGTGTTAAAATAGCAAAAGGAACCAACATCATT    1140
 K  A  L  E  D  D  N  I  E  G  V  K  I  A  K  G  T  N  I  I     380
CTGAACATCGGACTCATGCATAAAACTGAGTTCTTCCCAAAACCCAAAGAGTTCAGTTTG    1200
 L  N  I  G  L  M  H  K  T  E  F  F  P  K  P  K  E  F  S  L     400
ACAAACTTCGACAAAACAGTGCCCAGTCGTTTCTTCCAGCCCTTCGGCTGCGGGCCTCGC    1260
 T  N  F  D  K  T  V  P  S  R  F  F  Q  P  F  G  C  G  P  R     420
TCCTGCGTGGGCAAACACATCGCCATGGTGATGATGAAGGCCATCCTGGTGGCTCTGTTA    1320
 S  C  V  G  K  H  I  A  M  V  M  M  K  A  I  L  V  A  L  L     440
TCCCGTTACACTGTGTGTCCTCGCCAAGGCTGCACCCTCAACAGCATCCGGCAGACCAAC    1380
 S  R  Y  T  V  C  P  R  Q  G  C  T  L  N  S  I  R  Q  T  N     460
AATCTGTCGCAGCAACCTGTGGAGGACGAGCACAGCCTGGCCATGCGCTTTATCCCTCGA    1440
 N  L  S  Q  Q  P  V  E  D  E  H  S  L  A  M  R  F  I  P  R     480
GCAACACAACCTCCACTCAGTCACATATTTAGTCAGGAAATGTAG                   1485
 A  T  Q  P  P  L  S  H  I  F  S  Q  E  M  *                    494
```

Figure 2. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *CYP19b* of *P. sieboldi*. 1485 bp encodes a protein of 494 amino acids. Termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for *CYP19b* were submitted to the GenBank with accession number DQ298136.

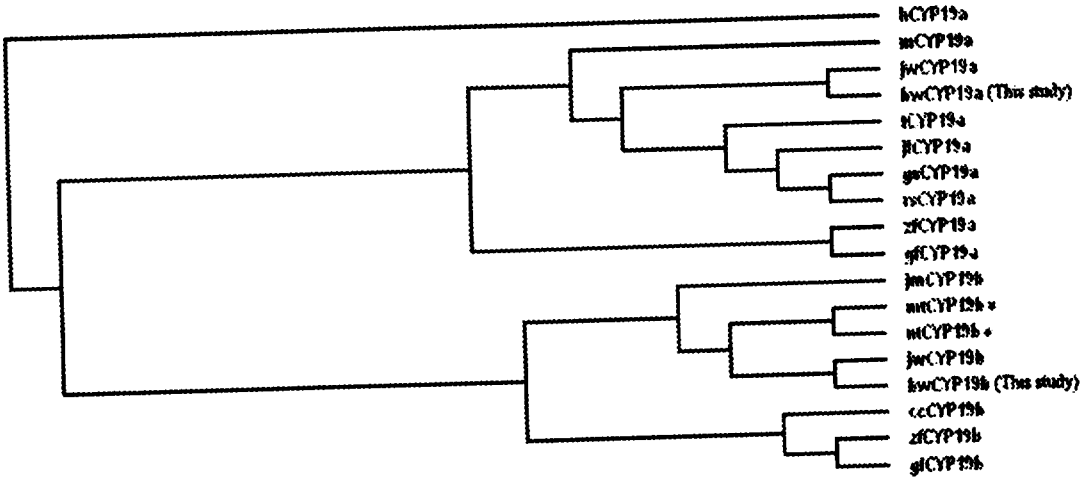


Figure 3. Phylogenetic analysis of the relationships between wrasse aromatase subtypes with other species' aromatase subtypes. A consensus tree obtains with combined values both aromatase subtypes. A consensus tree is based on the values obtained by boottrap resampling. Human *CYP19a* was used as outgroup. Partial sequences are noted as asterisk. t*CYP19a*, Nile tilapia *CYP19a*; gf*CYP19a*, goldfish *CYP19a*; zf*CYP19a*, zebrafish *CYP19a*; gs*CYP19a*, gilthead seabream *CYP19a*; jf*CYP19a*, Japanese flounder *CYP19a*; rb*CYP19a*, red seabream *CYP19a*; m*CYP19a*, medaka *CYP19a*; jw*CYP19a*, Jeju wrasse *CYP19a*; t*CYP19a*, tilapia *CYP19a*; h*CYP19a*, human *CYP19a*; nt*CYP19b*, Nile tilapia *CYP19b*; mt*CYP19b*, Mozampique tilapia *CYP19b*; gf*CYP19b*, goldfish *CYP19b*; zf*CYP19b*, zebrafish *CYP19b*; cc*CYP19b*, channel catfish *CYP19b*; jm*CYP19b*, Japanese medaka *CYP19b*; jw*CYP19b*, Jeju wrasse *CYP19b*.

가 522개이며 *CYP19b*가 494개인 것으로 나타났다. 황놀래기의 aromatase를 다른 종들의 aromatase과 비교 분석한 결과, 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*)의 aromatase와 가장 유사하게 나타났다 (*CYP19a* 90%, *CYP19b* 90%; Table 3). 다양한 종들의 *CYP19*간의 phylogeny 분석 결과 황놀래기의 *CYP19a*와 *CYP19b*는 서로 다른 두 개의 cluster를 구성하였고, 놀래기의 *CYP19a*, *CYP19b*와 가장 가까운 유연관계를 나타냈다 (Figure 3). 황놀래기의 *CYP19a*와 *CYP19b* 사이의 아미노산 상동성은 63%인 것으로 나타났다. 모든 aromatase sequence는 I-helix region과 heme-binding region 등과 같은 기능적으로 중요한 부위에서 높은 아미노산 상동성을 보인다고 보고 되어있다 (Chiang 등 2001; Graham-Lorence 등 1995). 본 연구에서의 결과 역시 *CYP19a*와 *CYP19b*의 염기서열은 구조적 또는 기능적인 membrane-spanning region, I-helix region, Ozol's peptide region, aromatic region 그리고 heme-binding region을 가지며 이들은 다른 어류들의 *CYP19*s 사이에 높은 아미노산 상동성을 보여주었다 (Figure 4와 5). 이와 같은

결과는 기본적으로 공통된 구조와 기능을 가진 *CYP19a*와 *CYP19b*가 진화의 과정을 거치는 동안 조직 특이적인 현재의 형태로 변화되었음을 암시한다(Kwon 외 2001). 그러나, aromatase의 조직 특이성이 한 개의 유전자에서 유래하는지 아니면 서로 다른 유전자에서 각기 발현되는지는 좀 더 연구해 볼 여지가 있다. 다른 척추 동물의 경우를 보면, aromatase는 포유류에서 한 개의 CYP19 유전자에 암호화되어 있으며, 조직특이적인 프로모터와 연관된 5'-untranslated exon의 선택적 splicing에 의해 조직특이적인 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다(Simpson 등 1997). 반면, 현재 goldfish, zebrafish, tilapia 그리고 rainbow trout에서 연구된 결과에 의하면 CYP19 전사체는 뇌와 난소에서의 발현이 서로 다른 유전자로부터 유래되는 것으로 보고하고 있다(Kishida와 Callard, 2001; Kwon 등 2001; Tchoudakova와 Callard, 1998; Valle 등 2002). 가장 흥미로운 것은 진화적으로 좀 더 초기단계 어류인 Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*)에서 CYP19 유전자는 한 개의 유전자로 존재한다는 것이며, 포유류에서 처럼 다양한 프로모터에 의해 조직특이적으로 발현한다는 것이다(Ijiri 등 2000).

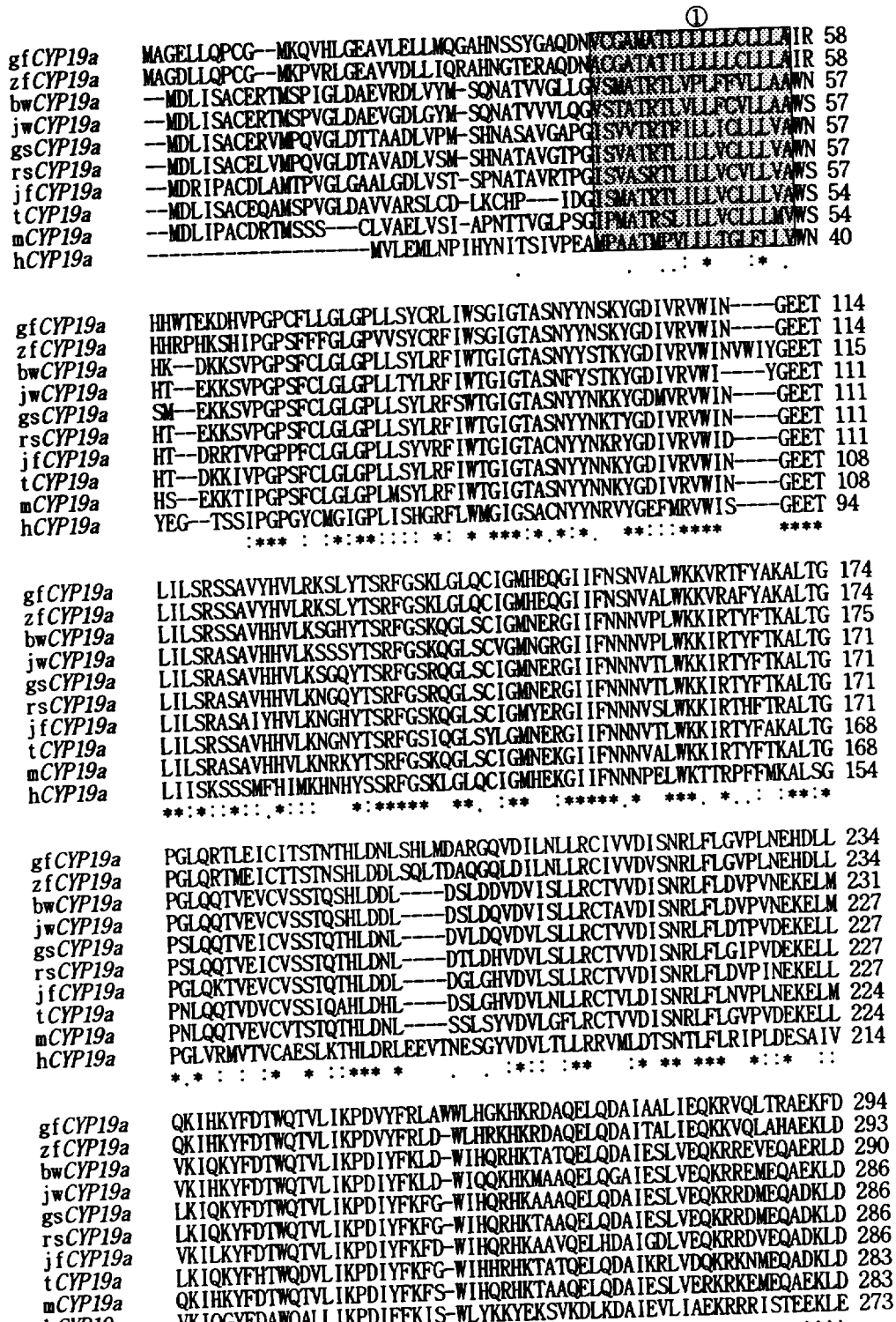
Table 3. Comparison of amino acid identities between *P. sieboldi* aromatase and other species'aromatase

CYP19a		*CYP19b*	
Species	Overall	Species	Overall
bw*CYP19a*	100 (522)	bw*CYP19b*	100 (494)
t*CYP19a*	79 (521)	jw*CYP19b*	90 (495)
gf*CYP19a*	63 (518)	nt*CYP19b**	81 (480)
zf*CYP19a*	64 (509)	mt*CYP19b**	81 (493)
gs*CYP19a*	84 (519)	gf*CYP19b*	64 (510)
jf*CYP19a*	82 (518)	zf*CYP19b*	64 (511)
rs*CYP19a*	85 (519)	cc*CYP19b*	65 (500)
jw*CYP19a*	90 (518)	jm*CYP19b*	80 (499)

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

Note : Partial sequences are noted as asterisk.

Note : bw*CYP19a*, bambooleaf wrasse *CYP19a*; t*CYP19a*, tilapia *CYP19a*; gf*CYP19a*, goldfish *CYP19a*; zf*CYP19a*, zebrafish *CYP19a*; gs*CYP19a*, gilthead seabream *CYP19a*; jf*CYP19a*, Japanese flounder *CYP19a*; rb*CYP19a*, red seabream *CYP19a*; jw*CYP19a*, Jeju wrasse *CYP19a*; bw*CYP19b* bambooleaf wrasse *CYP19b*; nt*CYP19b*, Nile tilapia *CYP19b*; mt*CYP19b*, Mozampique tilapia CYP19a; gf*CYP19b*, goldfish *CYP19b*; zf*CYP19b*, zebrafish *CYP19b*; cc*CYP19b*, channel catfish *CYP19b*; jm*CYP19b*, Japanese medaka *CYP19b*; jw*CYP19b*, Jeju wrasse *CYP19b*.


①
gfCYP19a
zfCYP19a
bwCYP19a
jwCYP19a
gsCYP19a
rsCYP19a
jfCYP19a
tCYP19a
mCYP19a
hCYP19a

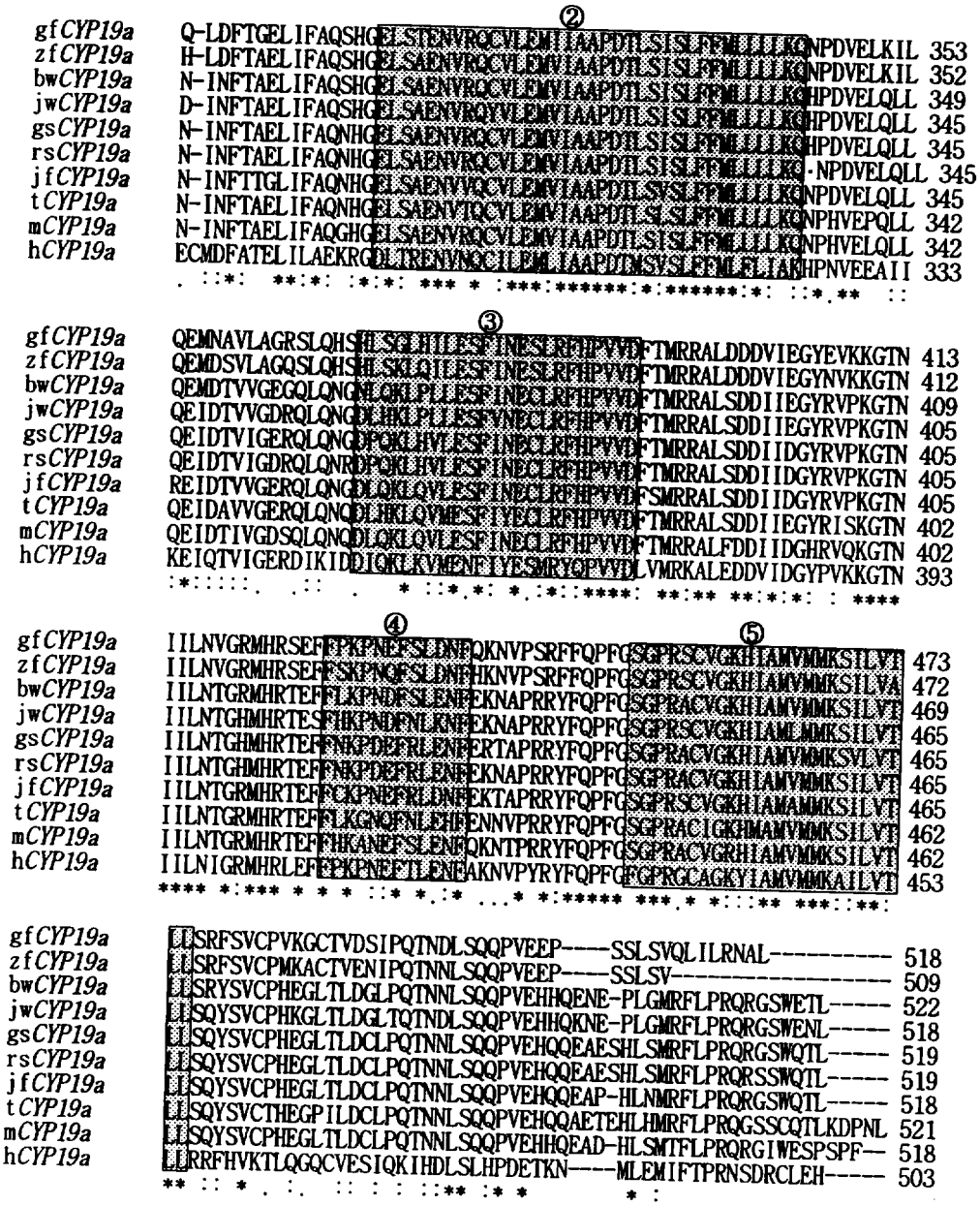
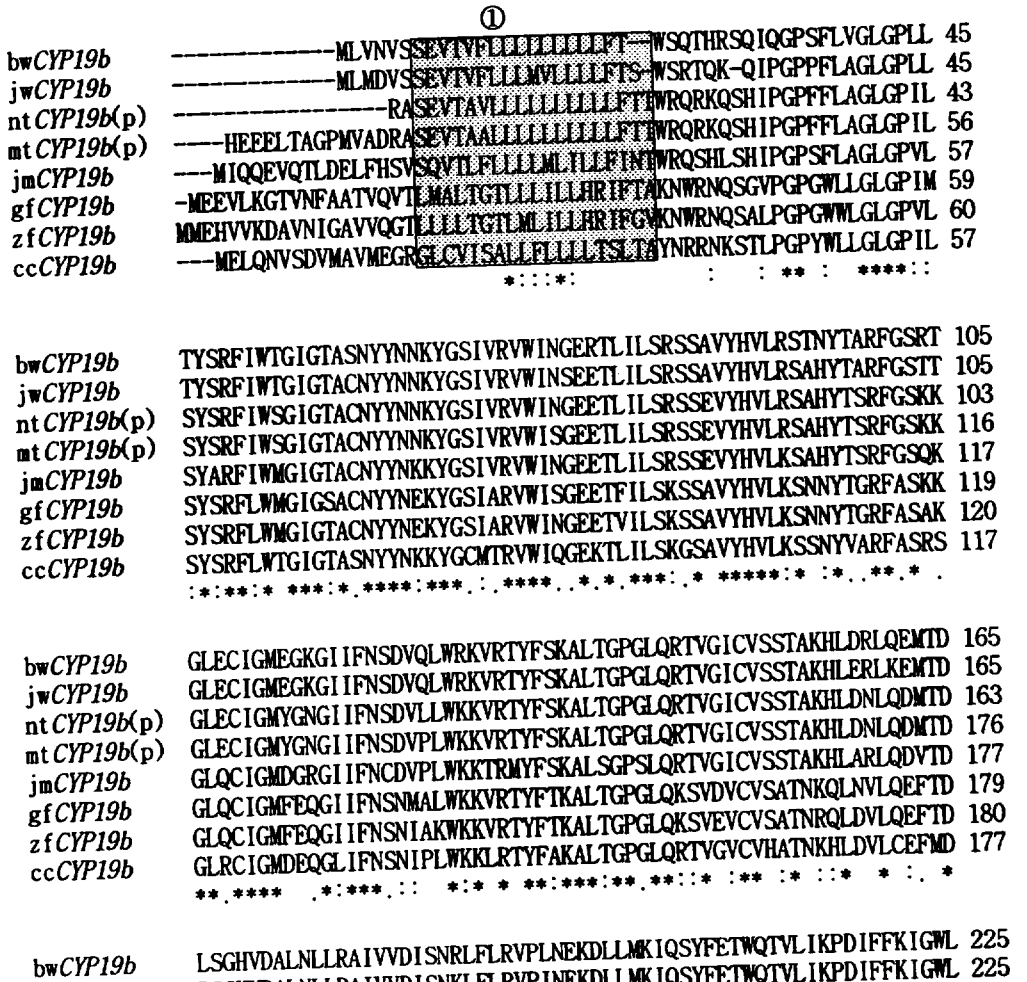


Figure 4. Alignment of amino acid sequences of *P. sieboldi CYP19a* with other species *CYP19a*. The identical, highly conserved, and less conserved amino acid residues were indicated by (*), (:), and (.), respectively. The sequence corresponding to putative structural region indicated by numbered gray box (①, the membrane-spanning region; ②, the I-helix region; ③, Ozol's peptide region; ④, the aromatic region; ⑤, the heme-binding region). gf*CYP19a*, goldfish *CYP19a*; zf*CYP19a*, zebrafish *CYP19a*; gs*CYP19a*, gilthead seabream *CYP19a*; jf*CYP19a*, Japanese flounder *CYP19a*; m*CYP19a*, medaka *CYP19a*; jw*CYP19a*, Jeju wrasse *CYP19a*; t*CYP19a*, tilapia *CYP19a*; h*CYP19a*, human *CYP19a*.


①
②
bwCYP19b
jwCYP19b
ntCYP19b(p)
mtCYP19b(p)
jmCYP19b
gfCYP19b
zfCYP19b
ccCYP19b

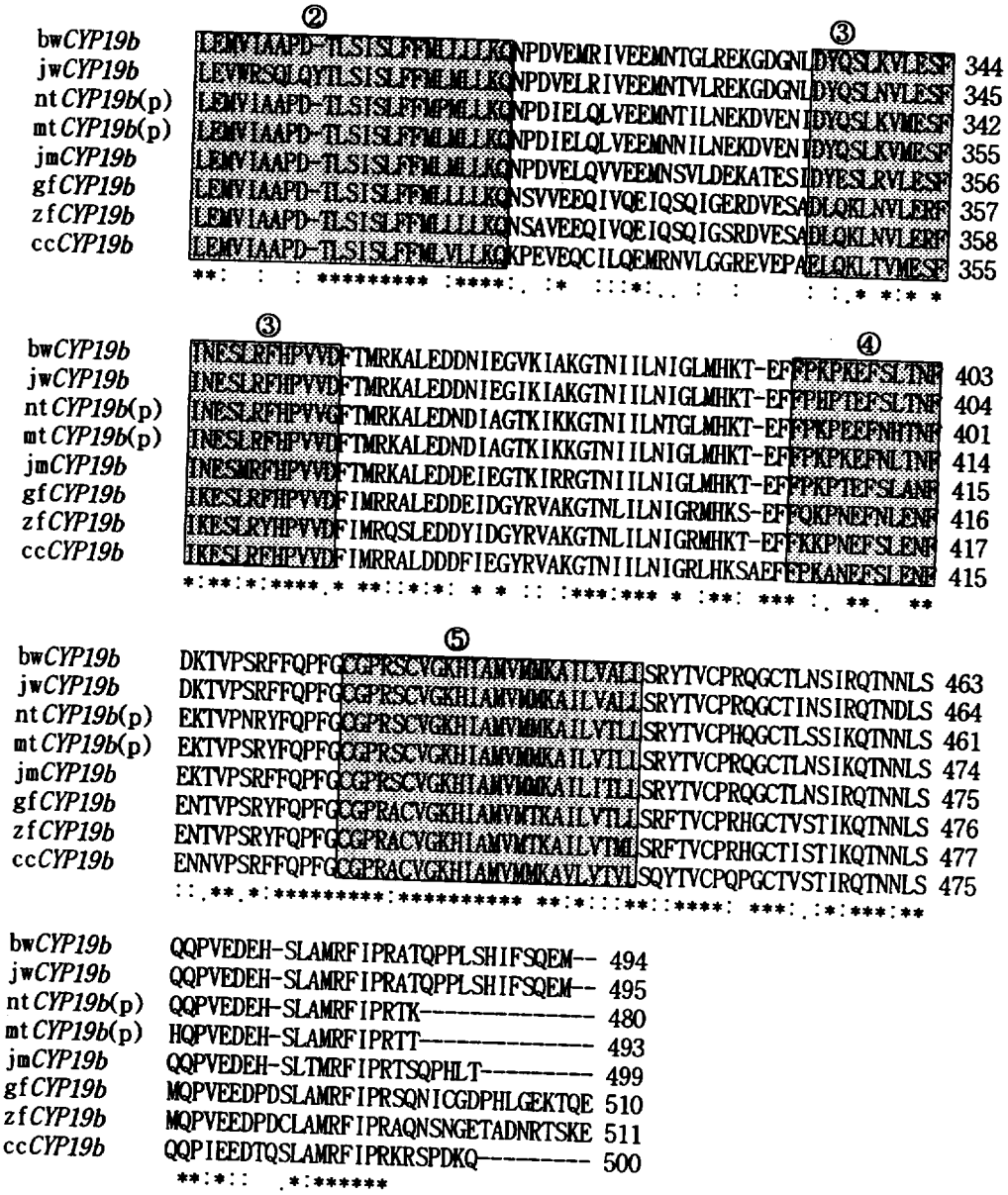


Figure 5. Alignment of amino acid sequences of *P. sieboldi CYP19b* with other species *CYP19b*. The identical, highly conserved, and less conserved amino acid residues were indicated by (*), (:), and (.), respectively. The sequence corresponding to putative structural region indicated by numbered gray box (①, the membrane-spanning region; ②, the I-helix region; ③, Ozol's peptide region; ④, the aromatic region; ⑤, the heme-binding region). Partial sequence is marked by (P). bw*CYP19b*, bambooleaf wrasse *CYP19b*; nt*CYP19b*, Nile tilapia *CYP19b*; mt*CYP19b*, Mozampique tilapia *CYP19b*; gf*CYP19b*, goldfish *CYP19b*; zf*CYP19b*, zebrafish *CYP19b*; cc*CYP19b*, channel catfish *CYP19b*; jm*CYP19b*, Japanese medaka *CYP19b*; jw*CYP19b*, Jeju wrasse *CYP19b*.

본 연구를 통해 황놀래기의 *CYP19a*와 *CYP19b*의 cDNA 염기서열을 분석한 결과, 뇌와 난소에서 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 두 가지 타입의 aromatase를 확인하였다. 본 연구의 결과는 척추동물에서 공통적으로 나타나는 특징들을 보여주고 있으며, 조사된 어류들 중에서 제주연안에 서식하는 놀래기와 가장 유사하였다. 따라서, 황놀래기의 aromatase는 구조적, 기능적으로 다른 어류들과 유사할 것으로 보인다.

수많은 연구자들이 어류의 생식과 성적 특성에 관한 연구를 수행하고 있으며 상당한 수준의 연구결과가 보고 되고는 있으나, 아직까지도 정확한 분자적 기전을 이해하기에는 부족함이 있으며 관련된 유전자의 정확한 특성에 관한 연구는 그 기전을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 보인다. 향후 연구는 어류 생식과 성분화 및 성전환에 대한 분자적 기전을 이해하기 위해서는 각 조직별, 시기별 유전자 발현양상과 그 기능에 대한 비교 연구 뿐만 아니라 다양한 생리적 작용에 관여하는 여러 호르몬 등 내부 및 외부 인자들에 대한 연구들이 수행되어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

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.

Chiang, E. F., Y. L. Yan, S. K. Tong, P. H. Hsiao, Y. Guiguen, J. Postlethwait and B. C. Chung. 2001a. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. J. Exp. Zool. 290: 709 - 714.

Chiang, E. F. L., Y.-L. Yan, Y. Guiguen, J. Postlethwait, and B. Chung. 2001b. Two cyp19 (P450 Aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain, Mol. Biol. Evol. 18: 542 - 550.

Conley, A. and M. Hinshelwood. 2001. Mammalian aromatases, Reproduc. 121 (5) 685 - 695.

Elbrecht A, R. and G. Smith. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. Science 255: 467-470.

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

Graham-Lorence, S., B. Amarneh, R. E. White, J. A. Peterson, and E. R. Simpson. 1995. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450, Protein Sci. 4: 1065-1080.

Guiguen, Y., J. F. Baroiller, M. J. Ricordel, K. Iseki, O. M. Mcmeel, S. A. Martin, and A. Fostier. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*), Mol. Reprod. Dev. 54 (2): 154-162.

Ijiri, S., C. Berard, J. M. Trant. 2000. Characterization of gonadal and extra-gonadal forms of the cDNA encoding the Atlantic stingray (Dasyatis sabina) cytochrome P450 aromatase (CYP19). Mol. Cell. Endocrinol. 164: 169 - 181.

Jeyasuria, P., W. M. Roosenburg, and A. R. Place. 1994. Role of P450 aromatase in sex determination of the diamondback terrapin, Malaclemys terrapin. J. Exp. Zool. 270: 95-111.

Kishida, M., and G. V. Callard. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (Danio rerio) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology 142(2): 740-750.

Kroon, F. J., and N. R. Liley. 2000. The role of steroid hormones in protogynous sex change in the Blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii* (Teleostei: Gobiidae), Gen. Comp. Endocrinol. 118 (2): 273-283.

Kwon, J. Y., B. J. Mcandrew, and D. J. Penman. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile Tilapia, Oreochromis niloticus. Mol. Reprod. Dev. 59: 359-370.

Lee, Y. H., F. Y. Lee, W. S. Yueh, P. Tacon, J. L. Du, C. N. Chang, S. R. Jeng, H. Tanaka, and C. F. Chang. 2000. Profiles of gonadal development, sex steroids, aromatase activity, and gonadotropin II in the controlled sex change of protandrous black porgy, Acanthopagrus schlegeli Bleeker, Gen. Comp. Endocrinol. 119 (1): 111-120.

Lee, Y. H., J. L. Du, W. S. Yueh, B. Y. Lin, J. D. Huang, C. Y. Lee, M. F. Lee, E. L. Lau, F. Y. Lee, C. Morrey, and Y. Nagahama, C.F. 2001. Chang, Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin, J. Exp. Zool. 290 (7): 715-726.

Lee, Y.H., W. S. Yueh, J. L. Du, L. T. Sun, C. F. Chang. 2002. Aromatase inhibitors block natural sex change and induce male function in the protandrous black porgy, Acanthopagrus schlegeli Bleeker: possible mechanism of natural sex change, Biol. Reprod. 66 (6): 1749-1754.

Simpson, E. R., M. D. Michael, V. R. Agarwal, M. M. Hinshelwood, S. E.

Bulun, and Y. Zhao. 1997. Expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promotor usage. FASEB J. 11(1): 29-36.

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.

Valle, L. D., A. Ramina, S. Vianello, P. Belvedere, and L. Colombo. 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). J. Ster. Mol. Bio. 82: 19-32.

Wartenberg, H., E. Lenz, and H. U. Schweikert. 1992. Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo. Andrologia 24: 1-6.

Yamamoto, T. 1969. Fish Physiology. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. Sex differentiation. Vol. III: New York: Academic Press. p 117-175

Yu, N. W., C. Y. Hsu, H. H. Ku, L. T. Chang, and H. W. Liu. 1993. Gonadal diggerentiation and secretion of estradiol and testosterone of varies of Rana catesbeiana tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. J. Exp. Zool. 265: 252-257.

Zhang, Y., W. Zhang, L. Zhang, T. Zhu, J. Tian, X. Li, and H. Lin. 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression. J. Steroid. Biochem. Mol. Bio. 92: 39-50