Korean J. Malacol. 24(1): 73-80, 2008

동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*)의 metallothionein 유전자를 기초로 한 분자계통 분류학적 연구

이준서, 민병준[1], 강세원, 이재봉, 백문기, 황승영, 김소희, 고원규
최상행[2], 채성화[3], 박홍석[2], 한연수[4], 이준상[5], 정계헌[6], 이용석

인제대학교 의과대학 기생충학교실 및 백인제임상의학연구소 말라리아연구부,
[1]가천의과학대학교 이길여암당뇨연구소, [2]한국생명공학연구원 유전체연구센터, [3]㈜지앤시바이오
부설연구소, [4]전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부, [5]강원대학교 자연과학대학 생명과학부,
[6]순천향대학교 자연과학대학 생명과학과

Molecular Phylogenetic Study of *Nesiohelix samarangae* Based on Metallothionein Gene.

Jun-Seo Lee, Byung-Jun Min[1], Se Won Kang, Jae Bong Lee, Moon Ki Baek, Seung Young Hwang, So Hee Kim, Weon-Gyu Kho, Sang-Haeng Choi[2], Sung-Hwa Chae[3], Hong-Seog Park[2], Yeon Soo Han[4], Jun-Sang Lee[5], Kye-Heon Jeong[6] and Yong Seok Lee

Department of Parasitology, Inje University College of Medicine and Department of Malariology, PICR, Busan 614-735, Korea
[1]Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University of Medicine and Science, Inchon 406-840, Korea
[2]Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea
[3]Research Institute of GnC BIO Co., LTD. 626-3 Guam-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-801, Korea
[4]Department of Agricultural Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[5]Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
[6]Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan Chungnam 336-600, Korea.

ABSTRACT

Numerous morphological studies on *N. samarangae* have been well conducted over the last ten years. In this context, we have attemtped to do molecular phylogenetic analysis by using metallothionein (MT) gene from *N. samarangae*. To this end, we cloned the full length cDNA of MT from cDNA library of *N. samarangae*. The complete cDNA sequences were obtained from the expressed sequence tag (EST) sequencing project of *N. samarangae*. The coding region of 195 bp gives an amino acid sequence of 65 residues including methionine. There are 5' (61 bp) and 3' (48 bp) untranslated region at both ends of the Ns-MT cDNA sequence. The com-

bined results from BLAST analyses, multiple sequence alignment and molecular phylogenetic study of Ns-MT cDNA indicate that *N. samarangae* has similarity to land snails such as *Helix pomatia*, Helix aspersa and *Arianta arbustorum*.

Key words: Metallothionein, *Nesiohelix samarangae*, Phylogenetics

서 론

Metallothionein (MT) 단백질은 박테리아에서 고등 동물에 이르기까지 폭 넓게 분포하며 약 60여 개의 아미노산 (MW 67 kDa)으로 구성된 분자량이 매우 작은 단백질로서 금속과 결합하는 성질을 가진 단백질이다. MT는 약 22~33%의 시스테인 (Cys) 잔기로 이루어져 있으며, 8개의 리신 (Lys) 잔기를 가지고, 방향족 아미노산 혹은 히스티딘 (His) 이 존재하지 않는 특징을 가지는 것으로 밝혀져 있다 (Danielson *et al.*, 1982; Dunn *et al.*, 1987; Kagi and Kojima, 1987; Naganuma, 1997). 또한 MT는 생물학적으로 필수 금속에 속하는 아연 (Zn), 구리 (Cu) 등에 대한 세포 내의 가장 풍부한 수용체로 존재하며 조직과 세포수준에서 이러한 금속들의 흡수 및 항상성 기전에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (Ohta *et al.*, 1993). MT는 분자진화적인 측면에서도 매우 중요한 단백질로 다뤄지고 있는데, 현재까지 알려진 바에 의하면 15개의 family로 구분되어 있으며 연체동물의 경우 *Mytilus*의 MT가 표본으로 되어 있으며 C-x-C-x (3) -C-T-G-x (3) -C-x-C-x (3) -C-x-C-K 에 상응하는 특정지역의 서열을 가지는 것으로 알려져 있다 (Cherian *et al.*, 2003; Singh and Hanson, 2006).

본 연구에서 실험재료로 선정한 동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*)는 국내에서는 가장 큰 육상 달팽이로 미세구조 및 기관별 형태학적 연구 및 소화관에서 분비 되어지는 cellulose에 대한 연구 등이 활발하게 진행되었지만 국내 고유종이라 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 데이터베이스의 taxonomy browser에도 등록이 되어 있지 않았으며, 유전자 연구 또한 전무한 상태이다. 이러한 개체 특이성과 연구 가능성이 있음에도 불구하고 현재 동양달팽이에 대한 연구 중에 유전자를 이용한 계통분류에 대해서는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 EST에서 유래한 염기서열로 한국산 동양달팽이 MT의 분자 계통분류학적인 유연관계를 파악하고자 하였다. 또한 본 실험에서 계통분류에 사용하게 될 MT 서열은 동양달팽이의 EST에서 유래한 서열로 그 서열의 길이가 짧아 full length를 쉽게 얻을 수 있었으며 그 기능 연구에 앞서 동양달팽이의 MT의 계통분류학적인 위치를 파악하는데 이 연구의 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

재 료

본 연구에서 실험재료로 선정한 동양달팽이 (*N. samarangae*)는 복족강 (Gastropoda), 직복족아강 (Orthogastropoda), 유폐상목 (Pulmonata) 진유폐 목 (Eupulmonata), 달팽이과 (Bradybaenidae)에 속하며 *Nesiohelix* 속에 속하는 분류학적 위치를 가지며 (Min *et al.*, 2004), 국내 육산패류 중 가장 대형종에 속한다. 본 실험에 사용되어진 재료는 2007년 7월 충청남도 태안군 가의도에서 채집하여 3일간 금식 후 사용하였으며, 크기는 각고 32 mm, 각경 39 mm 였다.

방 법

cDNA library 구축

동양달팽이를 해부하여 소화관 부분을 제거하였다. 소화관이 제거된 각각의 동양달팽이를 Stratagene

Received January 8, 2008; Revised February 26, 2008;
Accepted April 30, 2008
Corresponding author: Lee, Yong Seok
Tel: +82 (51) 890-6462 e-mail: yslee@inje.ac.kr
1225-3480/23219

Absolutely mRNA Purification Kit (Stratagene, CA, USA)를 사용하여 total mRNA를 순수하게 정제하였다. 정제된 mRNA를 oligo dT와 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성한 후 cDNA Library Construction Kit (Stratagene, CA, USA)을 사용하여 cDNA library를 구축한 후 Gigapack Gold III (Stratagene, CA, USA) packaging system을 사용하여 packaging하였다.

염기서열 분석

Packaging한 primary library는 mass excision 한 후 LB agar plate (with kanamycin)에 plating 하여 37℃에서 하루를 배양하였다. 수집된 균체로부터 plasmid DNA의 분리정제는 alkaline lysis 방법을 이용한 multiscreen 96-well Filter Plates mini-preparation방법으로 수행한 후에 Sequencing을 위해 자동염기서열분석기 (AB-3730XL, Applied biosystems) 를 사용하여 염기서열 결정하였다.

Metallothionein 서열의 확보

동양달팽이 EST 데이터베이스 (http://biob.sch.ac.kr/~nsdb)에서 metallothionein으로 동정된 크로마토그램 파일 6개를 phred (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) score 20 조건으로 base calling 한 후 cap3 소프트웨어를 통하여 assembly하여 contig file을 얻었다. 얻어진 contig 서열은 다시 Emboss Package의 sixpack 소프트웨어를 통하여 6 frame으로 가능한 모든 아미노산 서열을 추출하였다.

BLAST search를 통한 서열의 annotation 확인 작업

EST를 통하여 얻은 contig file의 annotation을 확인하기 위하여 6 frame으로 추출한 모든 서열을 연체동물전용 BLAST 서버 (http://blast.inje.ac.kr/~mollusks) 의 아미노산 데이터베이스에 blastp를 통해 분석하였다. 분석 결과 e-value 값이 가장 높은 아미노산 서열을 선택한 후 15개의 family로 나누어진 논문의 equation과 맞추어 보았다.

BLAST search를 통한 관련서열의 확보 후 multiple align 및 phylodendrogram 제작

다른 생물들의 MT 서열과 다중정렬 된 MT 서열을 비교분석하고 참고서열을 추출하기 위해 연체동물전용 BLAST (http://blast.inje.ac.kr/~mollusks) 서버를 이용하여 blastp를 통해 연체동물문에 속하는 생물들에서 알려진 관련서열을 추출 한 후 multi-Fasta format으로 변환하여 clustalx 프로그램을 이용하여 multiple sequence align하였으며 (Kohli and Bachhawat, 2003), MEGA4를 이용 Neighbor-Joining method를 통해 phylodendrogram을 도식화하였다 (Saitou and Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2007).

2D 구조를 이용한 단백질 구조 비교 분석

각 생물의 MT 단백질의 2D 구조의 분석을 위하여 추출된 참고서열의 아미노산서열을 대상으로 psipred (Jones, 1999) 소프트웨어 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)를 사용하여 2D 구조를 예측 한 후 72종의 참고서열과 비교분석 하였다.

결과 및 고찰

동양달팽이의 MT유전자 서열 중 코딩영역은 총 198 bp로 구성되어 있었으며 코딩영역을 기준으로 하여 아미노산 서열은 66개로 이루어져 있었다 (Fig. 1.). 염기서열의 G · C함량은 총 117으로 전체 함량의 59.1%였으며, 리신 (Lys) 잔기는 7개가 발견되었다. 그 결과 이미 알려진 시스테인 (Cys) 잔기가 약 1/3에 조금 미치지 못하였으며, 8개의 리신 잔기의 숫자는 불일치하였고, 한 개의 히스티딘 (His)은 발견되었으나, 방향족 아미노산은 발견되지 않아 이미 알려진 MT의 특성과 매우 일치함을 알 수 있었다. 여기에서 연체동물과 다른 생물들간의 MT 서열의 전반적인 차이를 살펴보면 트립토판 (Trp), 트레오닌 (Thr)은 거의 발견되지 않았고, 히스티딘 (His)과 루신 (Leu)의 경우 대부분의 경우 발견되지 않았으며, 발견된다 하더라도 극히 일부분인 반면 시스테인 (Cys) 의 경우 대부분이 30% 이상 함유하는 것을 볼 수 있었다.

```
2    ACA AGG CCA ATT TTA CGC TCG TCC TAG ATT TTC TAG ATT TCT CAA   46
1     T   R   P   I   L   R   S   S   *   I   F   *   I   S   Q   15

47   GTC GTA CAT TCC ACC ATG AGC GGA AAA GGA GAA CTG TGC ACC TCA   91
16    V   V   H   S   T   M   S   G   K   G   E   L   C   T   S   30

92   GCC TGC AAG AGC AAC CCC TGC CAG TGC GGG GAC AAG TGC CAG TGT  136
31    A   C   K   S   N   P   C   Q   C   G   D   K   C   Q   C   45

137  GGG GAG GGC TGC ACG TGT TCT GCC TGC AAG AGC TGT CAT TGT ACC  181
46    G   E   G   C   T   C   S   A   C   K   S   C   H   C   T   60

182  AAC GAT GGC TGC AAT TGC GGT AAG GAG TGC ACG GGC CCG ACC AGC  226
61    N   D   G   C   N   C   G   K   E   C   T   G   P   T   S   75

227  TGC AAG TGT GAC ACC TCG TGC AGC TGC AAG TAG CGG GGA CAC AAG  271
76    C   K   C   D   T   S   C   S   C   K   *   R   G   H   K   90

272  CTC ACT GTT GAT TTA GCT CCC TGC AAG CAT CAT GTT
91    L   T   V   D   L   A   P   C   K   H   H   V
```

Fig. 1. The metallothionein nucleotide sequence and deduced amino acid sequence. (under line = coding sequence). (Genbank accession number : EU437399)

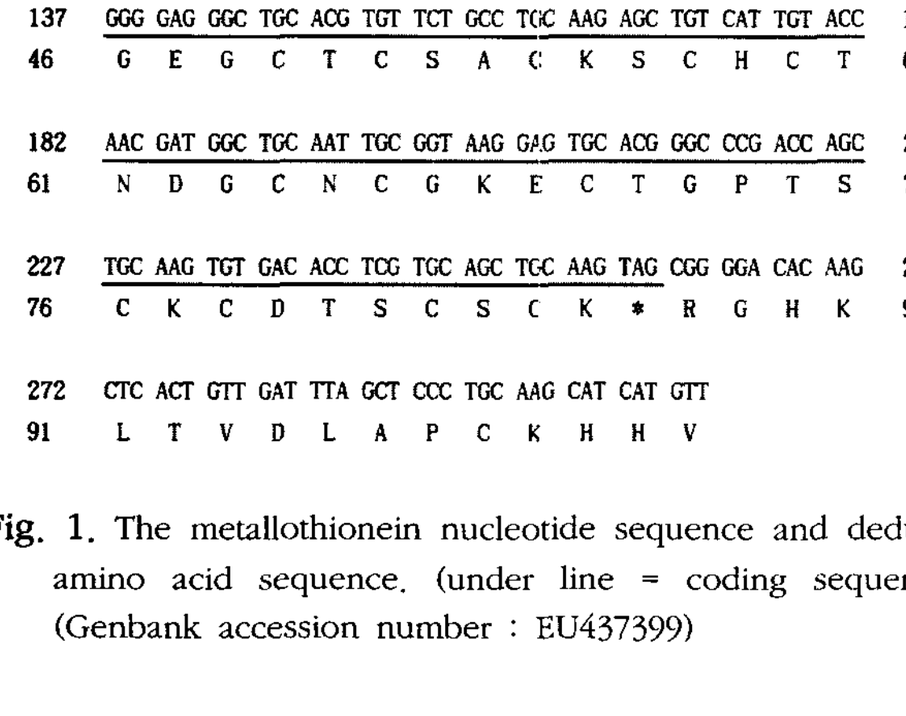

Fig. 2. The comparison data of MT sequence between molluscs and *N. samarangae*.

이와 같은 일반적인 특징은 분자량이 작고, 금속 함유율이 높으며, Cystein 잔기의 함유량은 높으며 방향족 아미노산 잔기는 적은 특징적인 아미노산 조성, 독특한 Cystein 아미노산의 분포 (Cys-X-Cys) 등이 있다.

15개의 MT Family는 진화학적인 관계를 나타내며 C-말단 아미노산 서열 패턴에 따라 분류되므로 각각의 family에 따르는 계통발생학적 tree를 구성 할 수 있다 (Nordberg and Kojima, 1979). 상위 내용에 근거하여 이미 알려진 연체동물의 MT 서열의 공식인 C-x-C-x (3) -C-T-G-x (3) -C-x-C-x (3) -C-x-C-K 과 비교 분석한 결과 동양달팽이의 MT 유전자 서열이 연체동물의 MT서열과 비교하였을 경우 같은 famaly에 속하는 매우 근접한 아미노산 서열이라는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2.)

BLAST 결과를 토대로 선정되어진 72개의 비교서열 중 아미노산 레벨에서 가장 높은 스코어로 align 되는 서열은 *Helix pomatia*의 CD-MT서열 이었으며, clustalx를 통해 수행되어진 multiple align 결과를 토대로 MEGA4 소프트웨어를 이용하여 Neighbor-Joining method 방법에 따라 phylodendrogram을 그려본 결과 주로 *H. pomatia* (brown garden snail), *H. aspersa* (garden snail), *Arianta arbustorum* (copse snail), *Megathura crenulata* (keyhole limpet) 등의 생물들과 같은 군으로 묶이는 것을 관찰 할 수 있었다. 같은 군에 속한 이 생물들은 모두 복족류에 속하며 *M. crenulata*를 제외하고는 모두 육상달팽이임을 알 수 있었다(Fig. 3. and Fig.4.).

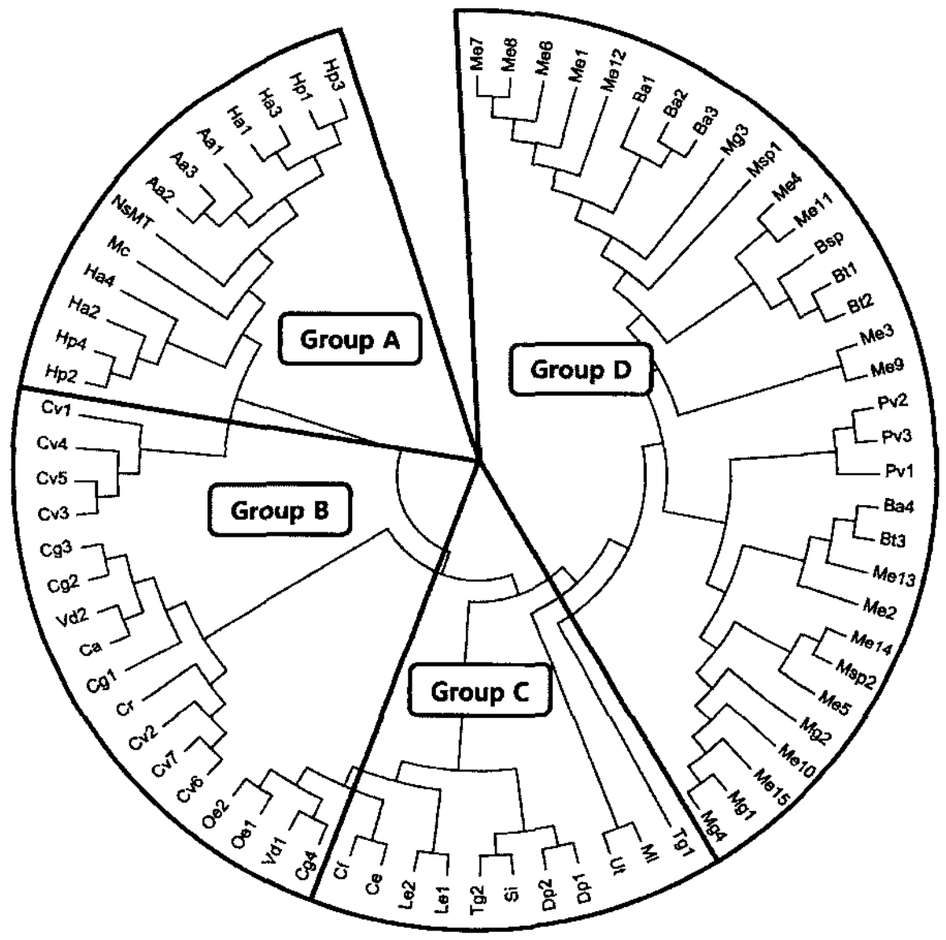

Fig. 3. The result of phylodenrogram analysis on evolutionary relationships of 73 taxa (branch length = 5.82986159).

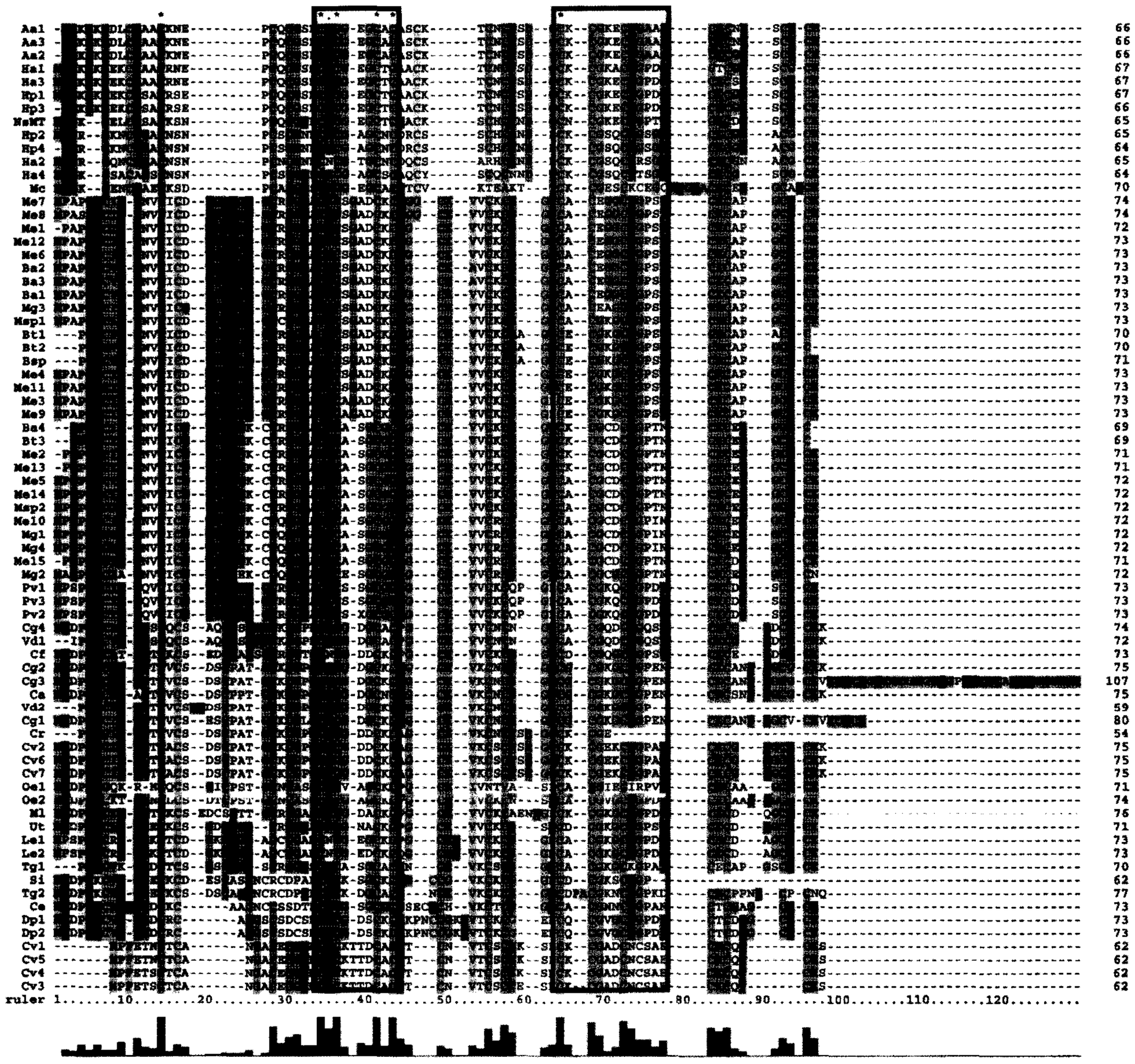

Fig. 4. Multiple sequence alignment results of *N. samarangae* and 72 reference sequences.

Abbreviation: *Arianta arbustorum* (Aa); *Bathymodiolus azoricus* (Ba); *Bathymodiolus* sp. *FD-2002* (Bsp); *Bathymodiolus thermophilus* (Bt); *Cerastoderma edule* (Ce); *Corbicula fluminea* (Cf); *Crassostrea ariakensis* (Ca); *Crassostrea gigas* (Cg); *Crassostrea rhizophorae* (Cr); *Crassostrea virginica* (Cv); *Dreissena polymorpha* (Dp); *Helix aspersa* (Ha); *Helix pomatia* (Hp); *Laternula elliptica* (Le); *Megathura crenulata* (Mc); *Meretrix lusoria* (Ml); *Mytilus edulis* (Me); *Mytilus galloprovincialis* (Mg); *Mytilus* sp. *KL-2006* (Msp); *Ostrea edulis* (Oe); *Perna viridis* (Pv); *Scapharca inaequivalvis* (Si); *Tegillarca granosa* (Tg); *Unio tumidus* (Ut); *Venerupis (Ruditapes) decussatus* (Vd); *Venerupis* (*Ruditapes*) *philippinarum* (Vp)

또한 Neighbor-Joining method를 통해 진화학적 분석을 실시하였다 (Saitou *et al.*, 1987). 진화학적 근연도는 Poisson correction method (Zuckerkandl and Pauling, 1965)를 사용하였으며, 모든 위치의 gap과 missing 데이터는 제거하였다. 그러한 자리는 최종 데이터 세트에서 32곳이 존재하였으며 이러한 결과는 MEGA4 프로그램의 phylogenetic 분석을 통해 수행되었다 (Tamura *et al.*, 2007).

동양달팽이의 MT 및 참고서열의 아미노산 2D 분석 결과 β-pleated sheet 구조만 1-3개 가지고 있는 생

물군이 60% 이상이였으며, 이 이외에도 β-pleated sheet구조를 4-5개를 가지고 있는 생물에 Cg1, Cv3, Me7, Cg3이 있었다. 그리고 α-helix만을 가지는 생물에는 Ha4, Hp2, Hp4가 있었으며, α-helix와 β-pleated sheet구조를 동시에 가지는 생물을 확인할 수 있었다. 이 경우, 하나의 α-helix에 β-pleated sheet구조의 수에 따라 2개의 strand를 가지는 생물에는 Mc, 3개의 strand를 가지는 생물에는 Ce, Cf 그리고 4개의 strand를 가지는 생물에는 Cv1, Cv4, Cv5이 존재하였다. 동일한 연체동물이라 하더라도 다양한 종류의 구조를 가지고 있음을 확인 할 수 있었으며, Mega4를 이용하여 도식화한 dendrogram과 2D구조를 통하여 각각의 strand와 helix에 따르는 염기서열을 비교 분석한 결과 사이의 밀접한 관계를 볼 수 있었다. Dendrogram 결과를 살펴보면, 가장 단적인 예로 group A에서 동양달팽이의 MT와 가장 근접한 근연관계를 가지는 Aa1, Aa2, Aa3, Ha1, Ha3, Hp1, Hp3의 경우 동일한 1개의 β-pleated sheet를 가지는 TCNC의 동일 서열을 확인할 수 있었다. 또한 Group B에서는 두 가지 형태로 접근해볼 수 있는데 한 가지는 α-helix와 β-pleated sheet를 동시에 가지고 있으면서 동일한 서열인 CTTCNNTCSC, KSE, KCQT을 가지고 있는 Cv1, Cv4, Cv5이며, 다른 한가지 유형은 strand로만 이루어진 서열이다. 하지만 strand로만 이루어진 형태도 또 다시 각각의 strand의 유사성에 근거하여 CVC, VKCN와 TCAC, VKCS와 동일한 서열을 가지는 두 가지와 약간의 차이를 보이는 다른 한가지를 기준으로 모두 세가지 형태로 묶여지는 것을 볼 수 있다. Dendrogram group C에서는 특징적으로 다른 group들과는 상반된 각각의 독특한 구조를 나타내 보이고 있으며, dendrogram에서도 볼 수 있듯이 Cf, Ce, Le, Tg, Si, Dp, Ml 등 가장 다양하게 나타나는 group으로 보여진다. 마지막 group D에서는 홍합류와 지중해담치, 진주담치로 구성되어 있으며, CIC, VCIC, VCKC, VVC 등으로 뚜렷한 상관관계를 확인할 수 있었다.

이와 같이 본 실험을 통하여 도출해낸 결과를 통하여 연체동물문 사이에서의 동양달팽이의 MT를 이용하여 유전자를 이용한 계통분류학적은 분류 과정을 통하여 서로 다른 생물군들의 상관관계를 확인 할 수 있었다. 하지만 아직 본 연구에도 많은 과제가 남아 있다고 생각 되어진다. MT sequences의 수는 지속적으로 증가하기 때문에 이러한 세부적인 분류가 불완전하다. 또한 MT sequence에 대한 분류가 이뤄지는 동안 MT의 아미노산의 구성과 수 그리고 시스테인 (Cys) 에 의한 재분류를 함에 있어서 높은 가변성을 지닌다는 문제점을 가지고 있다. 게다가, 그 MT gene sequence는 지금도 종종 MT의 기능적 특징과 관련하여 잠재적인 구성원소를 함유하고 있지만, 분류에 신중하게 고려되지 못하고 있으며, 그 구성분자들은 MT의 기능적인 특성과 관련이 있지만 완벽하게 분류에 적용하기에는 많은 부작용을 배제할 수는 없다고 판단된다. 하지만, 다양한 MT family의 계통 발생학적 관계는 최근에 MT sequence와 단백질에 의한 접근 방식과 상이한 방법에 의하여 확립되어지고 있다.

본 연구에 의한 결과로서 subfamily, subgroup과 관련된 계통발생학적으로 다양하게 분류체계를 이끌어내고 있으며, 분류가 상당히 복잡한 척추동물에 대해서도 family에 대한 진화학적 계통을 이끌어내고 있다 (Binz and Kagi, 1999). 따라서 본 실험을 통하여 계통분류학적인 관계와 sequence의 유사성에 따르는 분류방법을 사용함으로서 family와 subfamily, subgroup, 그리고 알져지지 않은 유전자와 대립 유전자들 사이의 MT superfamily에 대한 진화학적 분류 대한 결과를 확인할 수 있었다 (Fowler *et al.*, 1987; Binz *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 1999). 또한 최근 연구를 살펴본다면 Dorosophila, Sophophora (subgenus of Drosophila), Mammalian, Amphibian, Avian, Fish, 등 생물들에 관계하여 MT를 이용한 phylodendrogram 분석을 통한 연구가 진행되고 있음을 확인할 수 있다 (Takezaki *et al.*, 1995; Valls *et al.*, 2001; Carpene *et al.*, 2007).

본 연구를 통하여 동양달팽이의 MT 서열은 근연종들의 서열과 매우 일치함을 알 수 있었다. 또한 MT 서열이 분류에 사용 될 수 있음을 다시 한번 알게 해주었으며 CD-MT 일 가능성을 보여주었다. 하지만 이러한 기능에 대한 연구는 cadmium 노출실험을 통해

RT-PCR 및 Real time-PCR 분석 등을 통해 증명해야 할 과제라고 생각되었다.

요 약

동양달팽이의 metallothionein 유전자는 염기서열 195개로 이루어져 있으며 65개의 아미노산으로 이루어져 있었다. 연체동물의 metallothionein 서열의 공식인 C-x-C-x (3) -C-T-G-x (3) -C-x-C-x (3) -C-x-C-K에 맞춰본 결과 알려진 공식과 일치하는 것을 확인할 수 있었으며 아미노산의 조성도 시스테인 (Cys) 이 30% 이상 함유하는 사실을 확인 할 수 있었다. BLAST 결과를 토대로 선정된 72개의 참고 서열 중 아미노산 레벨에서 가장 높은 스코어로 align 되는 서열은 *Helix pomatia*의 CD-MT 서열 이었다. Clustalx 를 통해 multiple align 한 후 Neighbor-Joining method 방법에 따라 phylodendrogram을 그려본 결과 *Helix pomatia, Helix aspersa, Arianta arbustorum, Megathura crenulata* 등과 같은 복족류 육산패들과 같은 그룹으로 묶여지는 것을 확인 할 수 있었다. Psipred 소프트웨어를 통해 2D 구조를 비교 분석 한 결과도 multiplealignment 및 phylodendrogram와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 EST를 통해 밝혀진 동양달팽이의 MT서열은 근연종들과 매우 일치함을 알 수 있었으며 MT 서열이 분류에 사용 될 수 있음을 확인시켜 주었다.

감사의 글

EST 라이브러리 제작 및 서열분석에 애써 주신 ㈜지앤시바이오 임직원 여러분께도 감사를 드리는 바입니다.

REFERENCES

Binz, P.A., and Kagi, J.H.R. (1999) Metallothionein: Molecular evolution and classification pp. 696. MAIK Nauka/ Interperiodica distributed exclusively by Springer Science+Business Media LLC. Basel-Berlin-Boston

Carpene, E., Andreani, G., and Isani, G. (2007) Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21: 35-39.

Cherian, M.G., Jayasurya, A., and Bay, B.H. (2003) Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation research* 533: 201-209.

Danielson, K.G., Ohi, S., and Huang, P.C. (1982) Immunochemical localization of metallothionein in rat liver and kidney. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 30: 1033-1039.

Dunn, M.A., Blalock, T.L., and Cousins, R.J. (1987) Metallothionein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 185: 107-119.

Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.

Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y., and Webb, M. (1987) Nomenclature of metallothionein. *Experientia Supplementum* 52: 19-22.

Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*

292: 195-202.

Kagi, J.H., and Kojima, Y. (1987) Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Supplementum* 52: 25-61.

Kohli, D.K., and Bachhawat, A.K. (2003) CLOURE: Clustal Output Reformatter, a program for reformatting ClustalX/ClustalW outputs for SNP analysis and molecular systematics. *Nucleic Acids Research* 31: 3501-3502.

Kojima, Y., Binz, P.A., and Kagi, J.H.R. (1999) Nomenclature of metallothionein: Proposal for a revision pp. MAIK Nauka/Interperiodica distributed exclusively by Springer Science+ Business Media LLC. Basel-Berlin-Boston

Min, D.K., Lee, J.S., and Go, D.B. (2004) Mollusks in Korea (Min Molluscan Research Institute) pp. 566. Hangeul Graphics. Seoul

Naganuma, A. (1997) Metallothionein. *Nippon Rinsho (Japanese journal of clinical medicine)* 55: 1091-1095.

Nordberg, M., and Kojima, Y. (1979) Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. *Metallothionein* 41: 121.

Ohta, H., Seki, Y., and Imamiya, S. (1993) Possible role of metallothionein on the gastrointestinal absorption and distribution of cadmium. The Kitasato Archives of *Experimental Medicine* 65: 137-145.

Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Singh, V.K., and Hanson, J. (2006) Assessment of metallothionein and antibodies to metallothionein in normal and autistic children having exposure to vaccine-derived thimerosal. *Pediatric allergy and immunology* 17: 291-296.

Takezaki, N., Rzhetsky, A., and Nei, M. (1995) Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution* 12: 823-833.

Tamura, K.D., J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Valls, M., Bofill, R., Gonzalez-Duarte, R., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M., and Atrian, S. (2001) A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The in vivo and in vitro metal binding features of Homarus americanus recombinant MT. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 32835-32843.

Zuckerkandl, E., and Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins pp. 97-166. Academic Press. New York