

굴 (*Crassostrea gigas*) 수정란 초기발생 단계의 전사체 분석

조상만

군산대학교 해양생명응용과학부

Comparative transcriptome analysis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the early development stage embryo

Sang-Man Cho

School of Applied Marine Biosciences, Kunsan National University, 558 Daehak-ro, Gunsan 54150, Republic of Korea.

ABSTRACT

In order to understand the gene expression of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during the early development stage of fertilized egg, transcriptome analysis was carried out to identify the embryogenesis-related genes from mRNA of each stage of embryo such as pre-fertilization-, fertilization membrane-, and polar body release-stage, respectively. Specifically expressed genes identified MYC, CDC25B, CCNB1, CLN3, DMC1, ADCY2, ADCY6, FBXO5 in prefertilization-stage, GRR1, CLB3_3, FBXO43 in fertilization membrane-stage, and BUB1B in polar body release-stage, respectively. A quantitative analysis of gene expression identified 6 candidates for embryogenesis regulation genes including PPP1CB, AUR, CDC25A, SLK, NCAPD2 and Hsp70 in the early stage of embryo development. These genes should be useful markers for further studies for gene regulation of polyploidy embryo development.

Key Words: Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Transcriptome analysis, Gametogenesis, Meiosis

서 론

굴 (*Crassostrea gigas*) 은 중요한 양식 대상품종으로 2017년 양식생산량은 약 31만 5천 톤으로 국내 천해양식어업 생산량의 13.6%, 패류 양식생산량의 80% 이상을 차지하고 있다 (Korea, 2017). 양식장 노화 및 기후변화 등에 따른 유생의 채묘 부진과 비만도 저하 등 국내 양식생산성은 지속적으로 감소하고 있지만, 인공종묘 생산기술의 발달과 전통적 양식 순기를 벗어난 연중수하 및 연중수확 등의 달라진 기술적 접근을 통해 총 생산량은 과년과 유사한 수준을 유지하지만, 양식 경영상 위험신호는 지속적으로 감지되고 있다.

최근 비만저하로 인한 굴 어가 하락 등으로 육질부 비만에 대한 관심이 높아지고 있고, 여름철 개체굴 수출 소비가 증가함에 따라 삼배체 종패에 대한 수요가 증가하고 있다. 삼배체는 생식세포 형성과정에 감수분열 동안 상동염색체가 짝을 짓기 못하기 때문에 염색체 3쌍의 분리는 부정확하게 되거나 중지되어 불임이 된다 (Beaumont and Fairbrother, 1991). 불임개체는 성숙에 소요되는 에너지를 성장에 이용할 수 있을 뿐만 아니라 배우체생성을 억제함으로써 고수온기에도 상품성을 지닌 개체를 생산 가능하게 함으로(Lutz, 2008), 향후 삼배체 종패의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 예상된다.

패류의 3배체 생산기술은 가리비류 및 담치류 등에도 응용되었지만, 대부분의 기술 개발은 굴을 대상으로 개발되어 상업적으로 이용하고 있다. 굴 삼배체는 1985년 미국 태평양연안 어업인들이 연중 식용 가능한 굴과 여름철 대량폐사 등에 강한 굴 생산에 대한 요구에 의해 개발되었다 (Helm, 2004). 초기에는 발암성 화학물질 cytochalasin B 처리를 통해 삼배체를 유도하였고, 이후 온도 및 압력 등의 물리적 자극 등에 의한 유도 연구가 진행되었으며 (Stanley *et al.*, 1981; Chaiton and Allen Jr, 1985; Allen Jr and Downing, 1986), 근래

Received: June 03, 2019; Revised: June 20, 2019; Accepted: June 28, 2019

Corresponding author: Sang-Man Cho

Tel: +82 (63) 469-1839, e-mail: gigas@kunsan.ac.kr
1225-3480/24730

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

에는 4배체 수컷과 이배체 암컷의 교배에 의해 생산하고 있다 (Guo and Allen Jr, 1994; Nell, 2002). 그러나 삼배체 종패 생산기술은 국제특허에 의해 보호받고 있고, 사배체 모패는 매우 높은 단가에 거래되고 있어 산업화에 큰 걸림돌이 되고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해서는 특허회피기술 개발이 요구되고 있고, 초기 수정란 발생과정에 유전자발현을 제어하는 것도 하나의 방법이 될 수 있을 것이다. 굴의 생식세포에 관한 전사체 연구는 삼배체의 부분불임 메커니즘 연구 (Dheilly *et al.*, 2011) 등에 활용된 바 있으나, 이배체의 초기 수정란 발생 단계별 유전자발현 분석은 진행된 바가 없다.

이 연구에서 굴 삼배체 종패생산을 위한 기술개발을 위한 기초연구로서 수정란 발생단계에 따른 세포분열 관련 유전자를 발굴하고 이들 유전자에 대한 이해를 바탕으로 관련 기술개발에 기여할 수 있는 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 모패, 인공수정 및 발생 시료 확보

실험에 사용된 이배체 모패는 경남 통영의 S 종묘 배양장에서 구입하여, 개각후 생식소 성숙상태를 관찰한 다음, 절개법에 의해 암수배우체를 확보하여 인공 수정시켰다. 인공수정후 20 L 수조에 여과해수를 15 L 를 넣고 가볍게 포기하면서 난 발생 과정을 현미경하에서 모니터링하며 각 발생단계별로 채집하여 유전자발현 비교 분석을 실시하였다.

2. cDNA 라이브러리 구축 및 시퀀싱

cDNA 라이브러리 구축을 위한 샘플링은 수정전 (0-Cg), 수정막형성기 (1-Cg), 수정돌기형성기 (2-Cg) 및 극체방출후 (3-Cg) 단계에서의 채집을 하였고, 유전자 발현을 확인하기 위한 total RNA는 Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 을 이용하여 제조사 상법에 따라 분리하였다. Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) 를 사용하여 고품질 mRNA-seq 라이브러리를 구축하였다. 구축된 라이브러리는 Illumina NextSeq 500 Sequencing System을 사용하여 염기서열을 분석하였다.

3. short read 전처리, Assembly, Annotation 및 Differential Expressed Genes 분석

염기서열 분석이 완료된 short reads의 전처리과정을 위해 raw sequencing data의 예비 품질은 FastQC v.0.11.3 application (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 을 통하여 허용 품질의 read를 측정하여 수행되었다. 각 reads들의 어댑터 제거를 위하여, Cutadapt

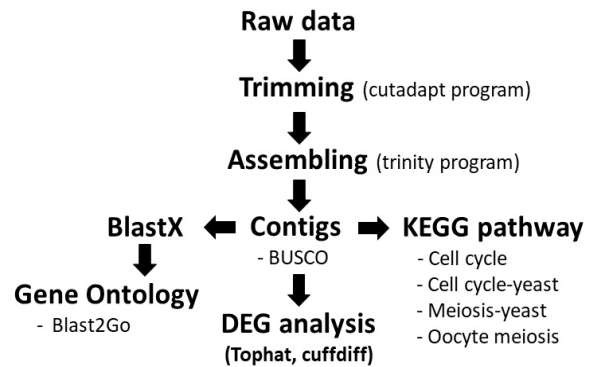


Fig. 1. Diagram of analysis concept for gene expression of the Pacific oyster embryo in the early development stage.

Python package (Martin, 2011) 을 사용하였고, 어셈블리는 이들 cleaned reads를 이용하여, Trinity software (Haas *et al.*, 2013) 를 사용하여 de novo assembling을 실행한 다음에, 그 어셈블리는 BUSCO 분석을 통해 품질을 측정하였다. Trinity 프로그램에 의하여 생성된 transcript 서열들은 BLAST2GO 유전자 온톨로지 (Gene Ontology) 분석을 이용하여 (Conesa *et al.*, 2005), Biological Process (BP), Cellular Component (CC), Molecular Function (MF) 의 3가지 functional category로 분류하였다. 발현 네트워크상 유전자군의 대사과정 변화는 다양한 유전체 정보 및 관련 대사과정을 종합적으로 제시하는 데이터베이스인 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) 를 이용하여 KEGG pathway를 획득하였다 (Huang *et al.*, 2008) (Fig. 1). RNA transcript 발생단계별 유전자의 발현차이는 TopHat software (Trapnell *et al.*, 2012) 를 이용하여 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped) 으로 도출하였다. 마지막으로 이를 위한 분석에서, reference sequence는 각 샘플에서 얻어진 transcript들을 모두 합친 후에 CD-HIT-EST program (<http://weizhongli-lab.Org/cd-hit/>) 를 이용하여 생성된 전사체 서열을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. RNA-seq 결과

굴 (*C. gigas*) 의 초기 수정란 발생 단계별 굴의 mRNA-seq 결과, 평균 9.786 Gb의 RNA-seq raw data를 생산하였으며, 이들 read들로부터 raw data 서열의 평균 약 97.825% (9.573 Gb) 에 해당하는 read sequence들을 얻었고, 이로부터 trinity assembling software를 통하여 각각

Table 1. Summary statistics of transcriptome sequencing for the embryo of *Crassostrea gigas*

	Items	0-Cg	1-Cg	2-Cg	3-Cg	all-trinity/ CD_hit-est
Raw data	Number of paired-end reads	64,044,150	65,637,324	63,621,012	65,930,034	-
	Q30 bases (%)	83.1	84.8	84.5	84.8	-
	Quality Score	32.425	32.775	32.725	32.775	-
	Number of bases (bp)	9,670,666,650	9,911,235,924	9,606,772,812	9,955,435,134	-
Raw sequences after trimming (with cutadapt)	Number of paired-end reads/ (%)	64,044,150 (100%)	65,637,324 (100%)	63,621,012 (100%)	65,930,034 (100%)	-
	Number of bases (bp)/ (%)	9,467,408,321 (97.9%)	9,699,670,929 (97.9%)	9,437,119,918 (98.2%)	9,690,282,215 (97.3%)	-
De novo assembly (with Trinity)	Number of assembled contigs	186,843	99,270	100,846	94,372	300,920
	Number of bases (bp)	118,403,479	80,406,830	78,744,859	81,392,425	179,598,719
	Smallest contig (bp)	201	201	201	201	201
	Largest contig (bp)	24,649	17,733	16,326	20,502	24,649
	Average length (bp)	633.71	809.98	780.84	862.46	596.83
	Median length (bp)	358	387	386	402	338
	N50 (bp)	922	1,545	1,442	1,686	826
KEGG	Hitted contigs	10,579	9,993	9,838	10,314	-
BlastX	Hitted contigs	-	-	-	-	33,058
GO analysis (with Blast2Go)	Mapped sequences	-	-	-	-	23,770
	Annotated sequences	-	-	-	-	19,625
DEG analysis (with Tophat)	Mapping rate (%)	65.5	65.8	62.35	64.05	-

0-Cg 186,843개, 1-Cg 99,270개, 2-Cg 100,846개, 그리고 3-Cg 94,372개의 201bp 이상의 transcriptome assembly contig 서열들을 확보하였다. 각각의 굴 시료로부터 확보한 raw sequencing data의 quality 체크 및 trimming 작업을 진행한 후 분석에 대한 요약한 내용은 Table 1과 같다. 또한 본 연구에서 전사체 서열을 얻기 위하여 trinity program을 사용하였으며, 이로부터 얻어진 전사체의 품질과 완성도를 확인하기 위하여, BUSCO benchmarking은 (Simão *et al.*, 2015) CyVerse Discovery Environment에서 수행하였고 (Goff *et al.*, 2011), 결과는 Table 2에 나타내었다. 이 결과로부터 이 연구의 전사체에서 88.8-95.8%의 intact BUSCO archetypes (869-937개 유전자) 를 발견하였으며, 이들 중에서 28.4-32.5%는 여러 사본에서 발견되었고, 또한 각 샘플에 대하여 BUSCO archetypes의 3.5-10.8%는 fragment들로 존재하고, 마지막으로 각 샘플에 대하여 BUSCO archetypes의 0.7-1.4% 정도는 완전하게 missing된 것으로 나타났으며,

이들 결과로 볼 때 이 연구에서의 얻어진 de novo assembling contigs 들은 유효한 것으로 판단되었다.

2. 굴 초기발생 단계별 전사체 비교분석

Assembly를 통해 확보된 굴 유전자의 대표적인 전사체의 (representative transcripts) 수는 시료로부터 각각 186,843개 (0-Cg), 99,270개 (1-Cg), 100,846개 (2-Cg), 그리고 94,372개 (3-Cg) 의 transcriptome assembly contigs 서열들을 얻었으며, 이들 서열들로부터 reference sequences 를 확보하기 위하여 CD-HIT-EST program을 이용하여 총 300,920 contig 서열을 얻었다 (Table 1). 이들 서열을 이용하여 각 시료에 대한 DEG (Differentially Expressed Gene) 분석을 실시한 결과 각 시료에 대하여 유효한 결과를 보인 총 42,015개 서열을 얻었으며, 이들 서열의 gene annotation을 위해 NCBI BLASTX (filter기준: e-value ≤ 1e-3, Best hits) 를 이용하여 gene annotation을 수행하였다. 전체

Table 2. Summary of the transcriptome derived using de novo assembling of Trinity program

Categories	Metazoa											
	0_Cg		1_Cg		2_Cg		3_Cg					
Complete Single-copy BUSCOs	587	60.0%	869	659	67.4%	937	624	63.8%	918/	614	62.8%	932/
Complete Duplicated BUSCOs	282	28.8%	(88.8%)	278	28.4%	(95.8%)	294	30.1%	93.9%	318	32.5%	95.3%
Fragmented BUSCOs	102	10.4%		34	3.5%		46	4.7%		38	3.9%	
Missing BUSCOs	7	0.8%		7	0.7%		14	1.4%		8	0.8%	
Total BUSCO groups searched	978	100 %		978	100 %		978	100 %		978	100%	

42,015 contig 서열들의 대표적인 전사체 (representative transcripts) 중에 33,058 (78.68 %) contig 서열들이 Blast nr database의 서열과 일치하는 것을 확인하였다.

굴의 전사체의 GO분석 결과는 BlastX에 얻어진 서열 33,058 contig 서열들 중에 23,770 contig 서열 (71.90%) 과 19,625 contig (59.37%) 서열들이 mapping과 annotation 되었으며 (Table 1), KEGG pathway 분석 결과는 KEGG database에서 hit된 contig 서열들 수와 관련 KEGG pathway에 포함된 contig 서열들의 수는 Table 1과 Fig. 2에 표시되어 있다. 굴의 전사체의 유전자 기능을 유전자 온톨로지 분석에 의하여 예측한 바, Biological Process (BP) 의 경우 cellular process (19.68%), metabolic process (17.12%), single-organism process (13.64%), biological regulation (8.97%), regulation of biological process (8.27%) 의 순으로 유전자 분포가 되었으며, Cellular Components (CC) 는 membrane (19.10%), cell (17.51%), cell part (17.36%), membrane part (15.38%), organelle (10.82%) 의 순으로 나타났고, Molecular Function (MF) 은 binding (46.34%), catalytic activity (34.10%), transporter activity (4.92%), molecular transducer activity (3.73%), signal transducer activity (3.43%) 의 순으로 분포되는 것으로 확인되었다.

3. 굴 초기발생 단계별 유의 유전자 기능분석

굴의 삼배체는 감수분열 1기 또는 2기를 억제시켜 유도하지만 (Allen Jr and Tiews, 1987; Beaumont, 1991), 감수분열 2기가 삼배체 유도율이나 유생 생존율이 높다 (Hand *et al.*, 1999). 한편 감수분열 1기에 유도된 삼배체는 2기에 유도된 삼배체에 비해 성장은 빠르지만 (Stanley *et al.*, 1984), 이수체 (Aneuploids) 발생률과 폐사율이 높은 것으로 알려지고 있다 (Stanley *et al.*, 1984). 초기에는 Cytochalasin B, 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), 및 Caffeine을 이용한

화학적 방법과 열처리 및 압력처리와 같은 물리적 처리를 이용하였지만, 최근에는 4배체 암컷과 이배체 수컷의 교배를 통해 생산하고 있다 (Nell, 2002). 하지만 삼배체 생산기술은 미국과 프랑스 특허의 보호를 받고 있어, 이를 회피할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

삼배체 또는 사배체 유도는 초기 난발생 과정에 극체 방출과 연관되므로 이식에 대한 집중적인 연구가 필요하다. 따라서 이 연구에서는 초기발생단계에서 특이적으로 발현되는 유전자를 찾기 위해 DEG 분석 결과, 12개의 유전자가 유의성 있게 발현 차이를 보였으며, 이 중 8개의 유전자 (MYC, CDC25B, CCNB1, CLN3, DMC1, ADCY2, ADCY6, FBXO5) 는 수정란 단계, 3개의 유전자 (GRR1, CLB3_4, FBXO43) 는 수정막 생성단계 그리고 1개의 유전자 (BUB1B) 는 극체방출 단계에서만 특이적으로 발현되는 양상을 보였다.

수정란단계에서 발현된 8개의 유전자중 MYC 유전자는 전사인자를 암호화하는 조절인자 유전자로 암원인 유전자 (proto-oncogene) 로 알려져 있지만, 히스톤 아세틸화를 조절함으로써 전체적인 염색질 구조를 조절하는 것으로도 알려져 있다 (Cotterman *et al.*, 2008). 한편 hopoxia에 노출된 굴 (David *et al.*, 2005) 및 우럭 (*Mya arenaria*) 의 종양성 혈구 (neoplastic hemocyte) 에서도 발현이 증가하는 것으로 알려지고 있어 (Siah *et al.*, 2012; Aguilera, 2017), MYC 유전자는 질병의 발병과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려지고 있다 (Siah *et al.*, 2011). CDC 유전자는 G1, S, G2, M기로 구성된 세포주기중 G2기로부터 유사분열기로 진행하는데 관여하는 중요한 효소로 알려져 있다. Cdc25는 Cdc2의 Tyr15 잔기를 탈인산화 (dephosphorylation) 하여 Cdc2를 활성화한다. 즉 후기 G2기에서 Cdc25의 활성화는 증가하고 Wee1의 활성화는 억제되어 Cdc2가 탈인산화된 상태로 활성화됨으로써 세포주기는 유사분열기로 진행하게 되는 것이다. 이 중 세포주기 조절에 관여하는 Cdc25는 세포주기의 진행을 촉진하며, 세포주기 및 분열을 조절하는 등의 중요한 역할을 하는 것으로

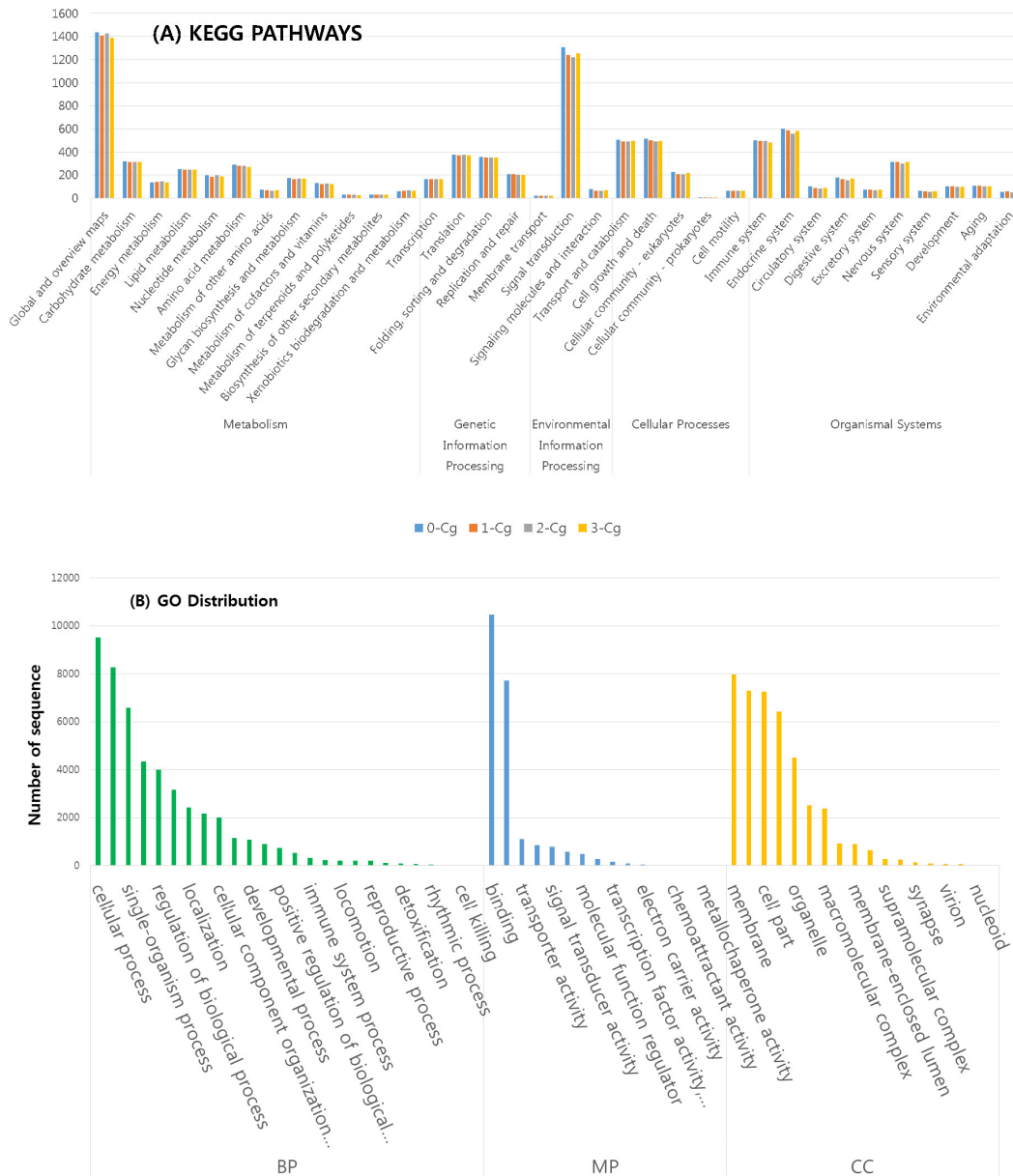


Fig. 2. Classification of transcriptomes in KEGG pathway (A) and Gene ontology (B) during the early developmental stage of the fertilized eggs of the Pacific Oyster.

밝혀져 있다. 이와 같은 Cdc25군에는 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C가 있으며, 세포주기 중 각각 다른 phase에서 cell cycle oscillator 역할을 한다. 이중 Cdc25A는 G1기에서 checkpoint로 작용하며, Cdc25B와 Cdc25C는 G2/M 기의 checkpoint로서 작용한다 (Nurse, 1990). 한편 Cdc20유전자는 방추체 조립, 염색체 분리 및 1차 극체 방출에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다 (Yang *et al.*, 2014). Cyclin 유전자는 난의 성숙에 관여하는 중요한 cell cycle component

로 다양한 형태의 isotype이 존재하고 (Cyclin B1, B2, B3), G2/M 전이 과정에서 다양하게 번역되고 (Gui and Homer, 2013), Cyclin B1은 세포주기에서 Cdc2의 활성화와 함께 G2 단계에서 M 단계로 넘어가는데 중요한 역할을 하며, 유사 분열과 관련된 조절 단백질로 유전자 생성물은 p34 (cdc2) 와 결합하여 성숙촉진인자를 (MPF, maturation-promoting factor) 형성한다. MPF는 이형이량체로 Cyclin-dependent protein kinase 1 (Cdk1) 와 Cyclin regulatory subunit으로

구성된다 (Morgan, 1995). DMC1 (Meiotic recombination protein DMC1/LIM15 homolog) 유전자는 DNA 이중 가닥 절단 부위에서 조립하고 감수 분열에서 중심적인 역할을 하며, 감수분열에서 유전적 재조합은 성 복제 중에 배우자 (gametes) 를 형성하기 위해 발생해야 하는 염색체의 환원분리를 촉진한다 (Habu *et al.*, 1996). 굴의 성분화 과정의 감수분열중 정자형성 과정의 감수분열에 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Dheilly *et al.*, 2012). 한편 가리비 (*Nodipecten subnodosus*) 에서도 정소와 난소의 감수분열1 단계에서 발현되는 것으로 보고되고 있다 (An *et al.*, 2014). FBXO5 (F-box only protein 5) 유전자는 인산화 의존성 ubiquitination에서 기능하는 SCFs (SKP1-cullin-F-box) 라고 불리는 유비퀴틴 단백질 리가아제 복합체의 4개 소단위 중 하나를 구성하며, Cdc20과 상호 작용하고 세포분열 후기의 진행에 필요한 후기진행 복합체를 억제하는 유사 분열 조절제인 *Xenopus* early mitotic inhibitor-1 (Emi1) 과 유사한 것으로 알려지고 있다 (Lehman *et al.*, 2006).

수정막 생성단계에서의 3개 후보유전자 중 E3 ubiquitin-protein ligase 복합체의 기질인식 요소인 GRR1 (SCF, SKP1-CUL1-F-box protein) 유전자는 표적 단백질의 ubiquitination과 proteasomal 분해를 조절하고, 인산화된 CLN1, CLN2 및 GIC2의 ubiquitination을 인식하고 관장한다. GRR1은 포도당에 의해 유도되는 유전자 발현에 대한 포도당 신호 변환에 중요한 역할을 수행하며 특히 포도당 억제 경로의 가장 먼저 반응하는 요소에 해당하고, 이 유전자의 변이는 포도당 억제기능의 다면발현적 상실을 초래하는 것으로 알려지고 있다 (Flick and Johnston, 1991). 따라서 Grr1은 단백질의 유비퀴틴화에 의한 분해를 통해 포도당관련 유전자의 발현과 세포주기를 조절하는 것으로 판단된다 (Li and Johnston, 1997). F-Box Protein 43은 (FBXO43) Endogenous Meiotic Inhibitor 2로 제 2 감수 분열 중기에서 세포분열 후기 촉진복합체를 억제함으로써 세포증식 억제를 매개하는 것으로 알려지고 있다 (Zhang *et al.*, 2013). 이 유전자의 변이는 수컷의 미성숙과 기형정자증을 (Teratozoospermia) 유발하는 것으로 알려지고 있다 (Ma *et al.*, 2019).

마지막으로 극체방출단계에서 특이적으로 발현된 BUB1B (Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase) 유전자는 Mad1, Mad2, Bub1, Bub3, Mad3/Bub1b, and Mps1 등이 포함된 Spindle assembly checkpoint (SAC) 단백질의 일원이다. SAC는 세포분열과정에 염색체 분열이 완벽하게 끝날 때까지 분열을 지연시켜 게놈의 안전성을 유지한다 (Lara-Gonzalez *et al.*, 2012). Cdc20와 다른 Mad2 and Bub3 등의 SAC 단백질은 세포분열 체크포인트 복합체의 중요 구성요소로, BUB1B는 Cdc20과 직접 반응하여 자기 활성

을 억제하여 anaphase-promoting complex/cyclosome을 활성화시키고, 염색체의 분열이 완성되기까지 세포분열 후기의 시작을 억제시킨다. 또한 유사분열에서 BUB1B는 SAC의 활성화, 유지 및 침묵화 및 염색체-방추사 부착 등에 관여하고, 유사분열 시기를 조절하는 기능을 하는 것으로 알려지고 있으며, 이 유전자의 결여는 유사분열 시간이 줄어들게 되며, 이 유전자의 이상발현 또는 변이는 이수성 돌연변이를 유발하게 되는 것으로 알려지고 있다 (Fu *et al.*, 2016).

4. 굴 배우자생성 조절 제어 유전자 후보군

2배체 배우자생성 단계별 유전자발현 분석을 통한 3배체 및 4배체 굴 인공종묘생산을 위한 안전하고 효율성 높은 후보군 및 그 분자 메커니즘에 대한 이해를 위해 P값이 0.05보다 작게 나온 유전자중, KEGG pathway analysis에서 Cell cycle category에 포함된 Cell cycle, Meiosis, Oocyte meiosis category내 결과물과, GO analysis 중 Biological Process 에 해당하며 “meiosis & meiotic” 키워드의 결과물을 초기 수정란 발생 단계별 FPKM값으로 분석하여 총 15개 유전자 후보군을 (9개의 down-regulation 유전자와 6개의 up-regulation 유전자) 도출하였다 (Table 3). 또한 GO 및 KEGG분석결과를 포함한 전체 전사체의 초기 수정란 발생 단계에 대하여 특이적 발현양상을 분석한 결과, 수정막 시기에는 942개, 수정돌기 시기에는 1,723개, 수정막과 수정돌기 시기에만 401개의 유전자가 특이적으로 발현되었다.

분자생물학적 배수체 유도가 용이한 6개의 down-regulation 유전자들, PPP1CB (serine threonine-phosphatase PP1-beta catalytic subunit), AURKA (aurora kinase A, serine/threonine-protein kinase 6), CDC25A (M-phase inducer phosphatase 1), SLK (STE20-like serine threonine-kinase). NCAFD2 (Condensin complex subunit 1) 와 Hsp70 (heat shock 70) 단백질은 해당 유전자들의 배우자생성과 성장 등과의 연관성을 알아보기 위해 추가적인 연구를 통해 메커니즘 구명에 따른 배수체 유도 등의 연구가 필요할 것으로 보인다.

Potein phosphatase 유전자인 PPP1CB는 세포 분열의 필수유전자로, 글리코겐 대사, 근육 수축 및 단백질 합성과 같은 다양한 세포 과정 조절에 관여하며 (Barker *et al.*, 1994), 이 유전자가 결여되면 G2/M기의 세포가 증가하는 것으로 알려지고 있다. PP1에는 50여개의 서브유닛이 존재하고 다양한 단백질과 반응하여 여러 가지 세포기능을 담당하지만, 아직 완전하게 밝혀지지는 않았다. actin cytoskeleton과 상호작용함으로써 PP1의 조절자로 추정되는 PPP1R9A에 대한 RNAi처리를 한 경우 G2/M기에 억류되는 것으로 보고되고 있다 (Mukherji *et al.*, 2006). AURKA는 중심체에 위치한다

Table 3. Summary of expressed major genes at the early development embryo of Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Gene	FPKM Value				GO	KEGG
	0-Cg	1-Cg	2-Cg	3-Cg		
DNA replication licensing factor MCM6	17.994	0	0	0	P:DNA replication initiation; P:cell cycle; C:nucleoplasm	Cell_cycle; Cell_cycle-yeast; Meiosis-yeast
Structural maintenance of chromosomes 4-like	9.629	0	0	0	C:nucleus; P:chromosome organization; C:chromosome	Cell_cycle-yeast
Gamma-tubulin complex component	14.091	0	0	0	P:meiotic nuclear division; C:spindlepolebody	#N/A
Cyclin-O (CLN3)	26.844	0.221	0	0.435	C:nucleus; P:cellular process	#N/A
Condensin complex subunit 3-like	11.989	0.073	0	0.492	P:mitotic chromosome condensation; C:condensincomplex	Cell_cycle-yeast
Gamma-tubulin complex component 3	23.532	0.828	0	0	C:spindle pole; P:meiotic nuclear division; P:mitotic spindle assembly	#N/A
DNA excision repair ERCC-1	6.872	0.133	0.263	0	P:meiotic mismatch repair; P:mitoticrecombination	#N/A
DNA replication licensing factor mcm4	120.911	5.203	6.660	4.491	P:DNA replication initiation; C:nucleus	Cell_cycle; Cell_cycle-yeast; Meiosis-yeast
NA (Unknown)	2400.720	108.713	142.644	74.150	#N/A	solute carrier family facilitated glucose transporter member 1-like
Serine threonine-phosphatase PP1-beta catalytic subunit	0	4.959	4.175	4.257	F:protein kinase binding	Meiosis-yeast; Oocyte meiosis
Aurora kinase A	0	0.859	1.300	1.482	P:mitotic spindle organization; C:spindlemicrotubule	#N/A
M-phase inducer phosphatase 1	0	0.334	3.698	43.122	F:protein tyrosine phosphatase activity	Cell_cycle; Oocyte meiosis
STE20-like serine threonine- kinase	0	0.441	0.762	0.751	P:cytoplasmic microtubule organization	Oocyte meiosis
Condensin complex subunit 1	0	0	4.259	70.364	C:nucleus; P:mitotic chromosome condensation	#N/A
Heat shock 70	0	0	1.482	0	C:meiotic spindle; P: G2/M transition of mitotic cell cycle	#N/A

mitotic serine/threonine kinase family 중 하나로 체세포의 방추체 형성과 중심체 성숙에 관여하며, 중심체의 CDC25B를 활성화 시켜 cyclin B1을 중심체로 끌어들이다. 난모세포에서 AURKA는 난핵포 단계의 난모세포의 미소세관 조직화 중심에 (Microtubule organizing center, MTOC) 집

적되어 있고, 난핵포붕괴 직전에 MTOCs 전반에 걸쳐 위치하지만, 체세포에서는 중심체와 미소세관의 마이너스 종단에 위치하다가 활성화되면 중기1 (M1) MTOCs에 주로 위치한다. AURKA의 과발현은 비정상적인 M1 방추체를 형성하지만, RNAi에 의한 발현 억제된 경우에는 감수분열과 방추체 형성

굴(*Crassostrea gigas*) 수정란 초기발생 단계의 전사체 분석

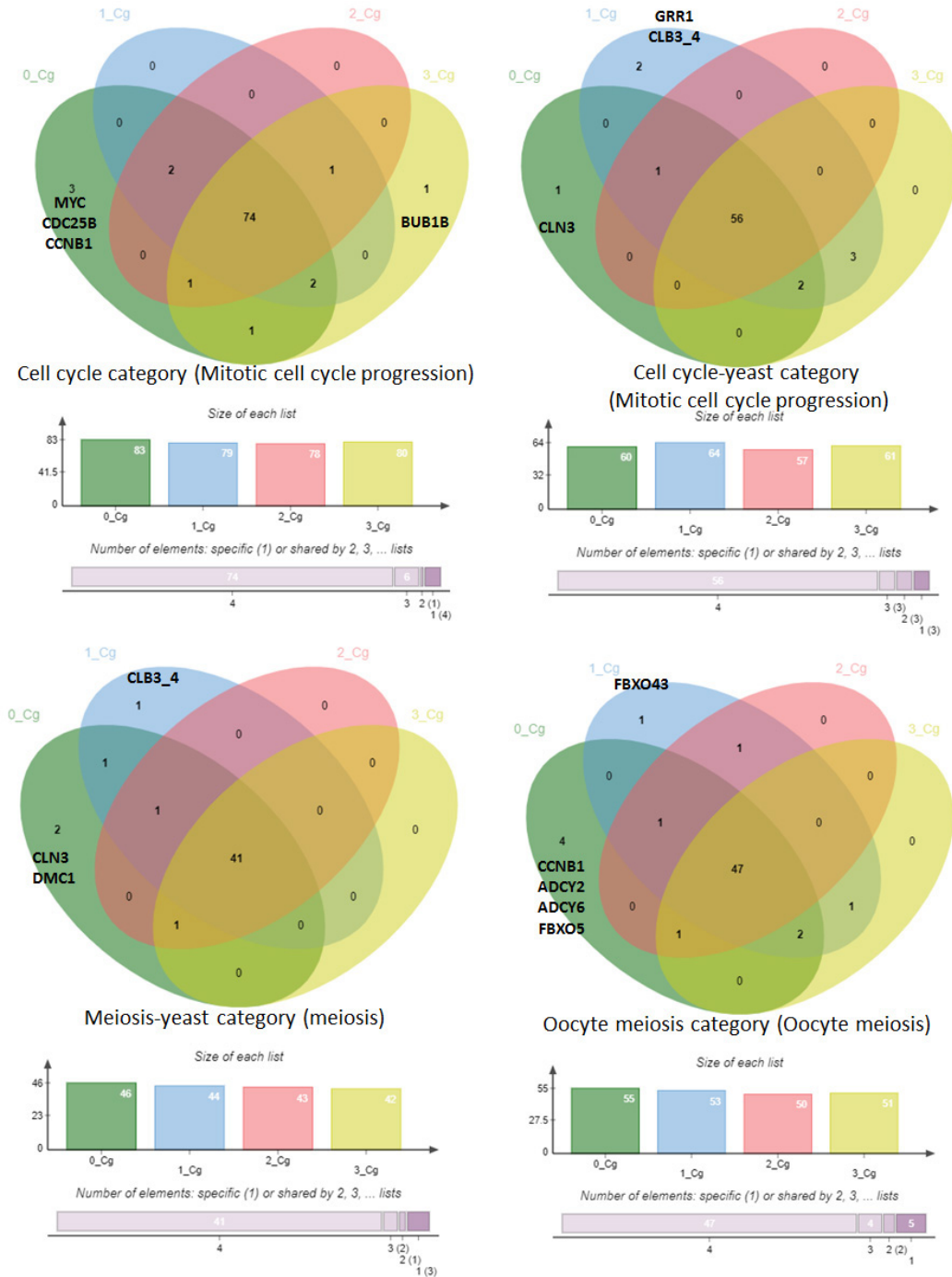


Fig. 3. KEGG pathway analysis of Gametogenesis related transcriptome in the Pacific Oyster.

의 재개를 방해하는 것으로 알려지고 있다 (Saskova *et al.*, 2008). CDC25A는 세포주기 G1에서 S기로의 진행에 필요하며, 후기의 세포주기에서도 중요한 역할을 한다. 또한, DNA 손상에 따라 특이적으로 분해되어 세포주기를 정지시켜, CDK의 억제에서 p53 및 p21의 유도를 보완하는 DNA 손상 체크

포인트로 작용한다 (Galaktionov *et al.*, 1995). SLK는 효모 STE20와 관련된 serine/threonine protein kinase로 세포질, 핵, 미세소관 및 중심체에 위치하여 섬유아세포에서는 세포골격 리모델링을 조절하고 SLK가 부족할 경우 다양한 세포 유형에서 방사상 미세소관의 결손이 발생된다 (Dan *et al.*,

2001). NCAPD2는 chromosome-associated protein D2 (CAP-D2) 또는 non-SMC condensin I complex subunit D2 (NCAPD2), XCAP-D2 homolog로 알려져 있으며, 염색체 응축과 관련된 단백질복합체의 한 구성요소이다. 세포분열 간의 염색질을 응축시키는데 필요하며, type I topoisomerases의 존재하에서 이완된 DNA를 강력한 슈퍼코일을 만들고, type II topoisomerases의 존재 하에서 nicked DNA를 강한 꼬임형태로 전환시킨다 (Martin *et al.*, 2016). Heat shock proteins (HSPs)는 신생 폴리펩타이드의 접힘을 도와주고, 단백질의 불안정한 배치를 유지하고, 변성을 방지하는 기능을 한다. Hsp70은 스트레스 관련 단백질로 알려지고 있으나, 스트레스가 없는 상황에서도 꾸준히 풍부하게 발현되며, 단백질 접힘, 이송 및 집합 단백질 형성 등에 세포생존에 중요한 역할을 담당한다 (Ellis and Van der Vies, 1991; Gething and Sambrook, 1992). 부분적으로 접힌 단백질과 상호작용하여 응집을 방지하고, 폴딩경로를 재구성한다. 또, HSP70단백질은 유사분열 과정에서 전중기와 중기 사이에 중심체에 상당히 축적되고, 양극 방추 조립에 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Tavaria *et al.*, 1996).

굴 삼배체 유도 화학약품인 Cytochalasin B은 F-actin filament의 빠른 성장말단 (barbed)에 결합하여 중합을 억제시키고, 나아가 단백질을 캡핑하여 필라멘트 망 구축을 억제함으로써 세포분열 과정을 억제시킨다 (Haidle and Myers, 2004). 그 외 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP)는 단백질 키나아제 억제제이며 (Rime *et al.*, 1989), 단백질 인산화의 폭발을 억제함으로써 난핵포 붕괴 (Germinal vesicle breakdown, GVBD)를 저지하는 것으로 알려지고 있지만, 처리농도나 종에 따라 차이가 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 GVBD 이후 PB1이전에 처리할 경우 6-DMAP는 단백질 인산화 수준을 감소시키고, 염색질의 탈응축과 핵막의 교정을 유발하는 것으로 알려지고 있다 (Rime *et al.*, 1989).

이 연구에서는 굴 수정란의 초기발생과정에 관여하는 유전자들의 발현에 대해 연구하였지만, 보다 명확한 제어 대상 유전자를 검색하기 위해서는 화학 처리제가 유생의 감수분열 단계에 기여하는 기능에 대한 구명이 필요할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 굴의 초기 수정란 발생 단계별 유전자 발현양상을 파악하기 위해 수정전, 수정막, 수정돌기 생성 및 극체방출 단계에서 total RNA를 추출하여 NGS mRNA 시퀀싱을 진행하였다. Transcriptome sequencing을 수행한 결과, 전체 약 39 Gb의 RNA-seq raw data를 얻었으며, 이들 data로부터 각 샘플에 대하여 de novo assembling에 의하여

94,372-186,843 contig들을 확보하였다. 굴의 전사체 GO 분석 및 KEGG pathway 분석 결과, 수정전, 수정막 및 극체방출 단계에서 12개의 유전자가 유의성 있게 발현 차이를 보였으며, 이 중 8개의 유전자 (MYC, CDC25B, CCNB1, CLN3, DMC1, ADCY2, ADCY6, FBXO5)는 수정전 단계, 3개의 유전자 (GRR1, CLB3_4, FBXO43)는 수정막 생성단계, 1개의 유전자 (BUB1B)는 극체방출 단계에서만 특이적으로 발현되는 양상을 보였다. 또한, 배우자생성 단계별 DEG에 의한 FPKM값을 분석하여 PPP1CB, AURKA, CDC25A, SLK. NCAPD2와 Hsp70 단백질 등 총 6개의 굴 초기 수정란 발생 조절 제어 유전자 후보군을 도출하였다. 이러한 연구 결과는 향후 분자생물학적 기법을 활용한 안전하고 효율적인 굴 배우체 생산을 위한 reference로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2017년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (갯벌참굴 생산성 향상 및 오염저감을 위한 다단양식기술 개발).

REFERENCES

- Aguilera, F. (2017) Neoplasia in mollusks: what does it tell us about cancer in humans?-a review. *Journal of Genetic Disorders*, **1**: 07-16.
- Allen Jr, S., and Tiews, K. (1987) Genetic manipulations: critical review of methods and performances for shellfish. *In*: Tiews K (ed) Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking eng. Berlin (Germany, F.R.) Heenemann Verlagsgesellschaft Bordeaux (France).
- Allen Jr, S.K., and Downing, S.L. (1986) Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **102**: 197-208.
- An, L.-h., Zheng, B.-h., Liu, R.-z., Fan, Q., Wang, Q.-k., and Luo, Y.-f. (2014) Transcriptomic response to estrogen exposure in the male Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Marine pollution bulletin*, **89**: 59-66.
- Barker, H.M., Brewis, N.D., Street, A.J., Spurr, N.K., and Cohen, P.T. (1994) Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta*, **13**: 212-218.
- Beaumont, A. (1991) Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *Journal of Shellfish Research*, **10**: 1-18.

- Beaumont, A.R., and Fairbrother, J.E. (1991) Ploidy manipulation in molluscan shellfish : a review. *Journal of Shellfish Research*, **10**: 1-18.
- Chaiton, J.A., and Allen Jr, S.K. (1985) Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, **48**: 35-43.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., and Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, **21**: 3674-3676.
- Cotterman, R., Jin, V.X., Krig, S.R., Lemen, J.M., Wey, A., Farnham, P.J., and Knoepfler, P.S. (2008) N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer research*, **68**: 9654-9662.
- Dan, I., Watanabe, N.M., and Kusumi, A. (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends in cell biology*, **11**: 220-230.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., and Moraga, D. (2005) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *The FEBS Journal*, **272**: 5635-5652.
- Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., and Favrel, P. (2011) Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC genomics*, **12**: 468.
- Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M.-P., Riviere, G., Boudry, P., and Favrel, P. (2012) Gametogenesis in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Microarrays-Based Analysis Identifies Sex and Stage Specific Genes. *PLOS ONE*, **7**: e36353.
- Ellis, R.J., and Van der Vies, S.M. (1991) Molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, **60**: 321-347.
- Flick, J.S., and Johnston, M. (1991) GRR1 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Molecular and Cellular Biology*, **11**: 5101-5112.
- Fu, X., Chen, G., Cai, Z.-D., Wang, C., Liu, Z.-Z., Lin, Z.-Y., Wu, Y.-D., Liang, Y.-X., Han, Z.-D., Liu, J.-C., and Zhong, W.-D. (2016) Overexpression of BUB1B contributes to progression of prostate cancer and predicts poor outcome in patients with prostate cancer. *OncoTargets and therapy*, **9**: 2211-2220.
- Galaktionov, K., Jessus, C., and Beach, D. (1995) Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes & Development*, **9**: 1046-1058.
- Gething, M.-J., and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature*, **355**: 33.
- Goff, S.A., Vaughn, M., McKay, S., Lyons, E., Stapleton, A.E., Gessler, D., Matasci, N., Wang, L., Hanlon, M., and Lenards, A. (2011) The iPlant collaborative: cyberinfrastructure for plant biology. *Frontiers in plant science*, **2**: 34.
- Gui, L., and Homer, H. (2013) Hec1-dependent cyclin B2 stabilization regulates the G2-M transition and early prometaphase in mouse oocytes. *Developmental Cell*, **25**: 43-54.
- Guo, X., and Allen Jr, S.K. (1994) Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 42-50.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., and Regev, A. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, **8**: 1494.
- Habu, T., Taki, T., West, A., Nishimune, Y., and Morita, T. (1996) The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res*, **24**: 470-477.
- Haidle, A.M., and Myers, A.G. (2004) An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: Synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**: 12048-12053.
- Hand, R., Nell, J., Reid, D., Smith, I., and Maguire, G. (1999) Studies on triploid oysters in Australia: effect of initial size on growth of diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). *Aquaculture research*, **30**: 34-42.
- Helm, M.M. (2004) Hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Rome, 177 pp.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2008) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, **37**: 1-13.
- Korea, S. (2017) Fishery production survey. *In*: KOSTAT (ed). KOSIS, Daejeon.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012) The spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, **22**: 006.
- Lehman, N.L., Verschuren, E.W., Hsu, J.Y., Cherry, A.M., and Jackson, P.K. (2006) Overexpression of the anaphase promoting complex/cyclosome inhibitor Emi1 leads to tetraploidy and genomic instability of p53-deficient cells. *Cell Cycle*, **5**: 1569-1573.
- Li, F.N., and Johnston, M. (1997) Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *The EMBO journal*, **16**: 5629-5638.
- Lutz, C.G. (2008) Practical genetics for aquaculture. Fishing News Books, Blackwell Science Ltd., Oxford,

256pp.

- Ma, Y., Xie, N., Xie, D., Sun, L., Li, S., Li, P., Li, Y., Li, J., Dong, Z., and Xie, X. (2019) A novel homozygous FBXO43 mutation associated with male infertility and teratozoospermia in a consanguineous Chinese family. *Fertility and Sterility*, **111**: 909-917.e901.
- Martin, C.-A., Murray, J.E., Carroll, P., Leitch, A., Mackenzie, K.J., Halachev, M., Fetit, A.E., Keith, C., Bicknell, L.S., and Fluteau, A. (2016) Mutations in genes encoding condensin complex proteins cause microcephaly through decatenation failure at mitosis. *Genes & Development*, **30**: 2158-2172.
- Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, **17**: 10-12.
- Morgan, D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**: 131-134.
- Mukherji, M., Bell, R., Supekova, L., Wang, Y., Orth, A.P., Batalov, S., Miraglia, L., Huesken, D., Lange, J., and Martin, C. (2006) Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**: 14819-14824.
- Nell, J.A. (2002) Farming triploid oysters. *Aquaculture*, **210**: 69-88.
- Nurse, P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, **344**: 503.
- Rime, H., Neant, I., Guerrier, P., and Ozon, R. (1989) 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Developmental biology*, **133**: 169-179.
- Saskova, A., Solc, P., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R.M., and Motlik, J. (2008) Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle*, **7**: 2368-2376.
- Siah, A., McKenna, P., Danger, J.-M., Johnson, G.R., and Berthe, F.C.J. (2011) Induction of transposase and polyprotein RNA levels in disseminated neoplastic hemocytes of soft-shell clams: *Mya arenaria*. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**: 151-154.
- Siah, A., McKenna, P., Danger, J.M., Johnson, G., and Berthe, F.C.J. (2012) Expression of RAS-like family members, c-jun and c-myc mRNA levels in neoplastic hemocytes of soft-shell clams *Mya arenaria* using microsphere-based 8-plex branched DNA assay. *Results in Immunology*, **2**: 83-87.
- Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V., and Zdobnov, E.M. (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, **31**: 3210-3212.
- Stanley, J.G., Allen, S.K., and Hidu, H. (1981) Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, **23**: 1-10.
- Stanley, J.G., Hidu, H., and Allen Jr, S.K. (1984) Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, **37**: 147-155.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R.L. (1996) A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones*, **1**: 23-28.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, **7**: 562.
- Yang, W.L., Li, J., An, P., and Lei, A.M. (2014) CDC20 downregulation impairs spindle morphology and causes reduced first polar body emission during bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, **81**: 535-544.
- Zhang, S., Li, J., Lea, R., Amaya, E., and Dorey, K. (2013) A Functional Genome-Wide In Vivo Screen Identifies New Regulators of Signalling Pathways during Early *Xenopus* Embryogenesis. *PLOS ONE*, **8**: e79469.

