

밀어의 (*Rhinogobius brunneus*) 비텔로제닌 프로세싱과
에스트로젠에 의한 혈청단백질의 변화

계명찬

경기대학교 생물학과

Processing of Vitellogenin and Changes in Seral Proteins
by Estrogen in *Rhinogobius brunneus*

Myung Chan Gye

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

서론

난황형성 (vitellogenesis)은 난생동물의 번식에서 매우 중요한 과정으로 간에서 일어나는 난황전구물질 (vitellogenin, Vg)의 생성과 단백질 수준에서 Vg의 변형과 난자내에 축적 및 난황물질 (vitellin)로의 전환과정을 포함한다 (Mommmsen and Walsh, 1988). 최근 내분비장애물질 (endocrine disrupting compound, EDC)에 의해 다양한 척추동물의 수컷 체내에서 Vg 형성이 유도된다는 일련의 연구 결과들이 발표되면서 초유의 관심이 이 분야에 집중되고 있다 (계 & 한, 2000). 여성호르몬의 영향을 받은 수컷의 경우 간 또는 혈액내에서 여성호르몬 활성의 정도와 번식주기에 따라 Vg의 존재가 확인되며 EDC를 추적할 수 있는 생물학적 지표로 이용된다 (Sumpter, 1995). 국내에서도 여성호르몬과 유사한 EDC를 검색하고 그 위해성을 평가하기 위한 노력이 활발하지만 생태계 위해성 평가를 위해서는 국내에 서식하고 있는 종들을 대상으로한 연구 및 모델 동물 개발의 필요성이 매우 크다. 밀어 (*Rhinogobius brunneus*)는 망둑어과 밀망둑속의 담수어류로 한반도 전역에 서식한다. 해수, 기수, 담수 등 다양한 환경에 적응한 망둑어과 어류들은 매우 빠르게 진화가 진행중인 어류로 물고기의 환경적응의 연구에 매우 중요한 어류이다. 이러한 관점에서 담수산 소형 어종으로 그 분포가 전국적이며 실험실 사육이 용이하며 수서생태계의 포식자로서 EDC 축적의 가능성이 있는 밀어는 좋은 모델로 사료된다. 본 연구는 밀어의 생식에 대한 기초자료를 마련하고 EDC연구의 모델로 개발하고자 밀어 난자형성 과정동안 Vg의 프로세싱 및 수컷 밀어에서 estrogen에 의한 혈청단백질의 조성의 변화를 조사하였다.

수조에 사육하면서 estrogen에 의한 영향을 조사하였다.

Estrogen의 투여

체장 60mm 이상의 성장한 밀어 수컷에 ethanol에 희석한 17β-estradiol을 복강주사하였다. Estrogen 농도에 따른 변화를 조사하기 위해 체중 gram 당 0.1, 1, 10 ug을 주사하고 2일 후 혈액을 채취하여 분석하였다. Estrogen 주사 후 혈청단백질의 동태 확인을 위해 1 ug/g 체중 농도로 주사 후 14일간 혈액을 채취하여 단백질 분석에 공시하였다. 동절기와 하절기 사이에 estrogen에 의한 반응 정도의 차이를 조사하기 위해 하절기 (수온 20℃, 14시간 조명) 및 동절기 (8℃, 10시간 조명) 조건에서 estrogen을 투여 후의 변화를 조사하였다.

단백질 전기영동

채취한 혈액은 혈청으로 제조하여 7% acryamide gel에서 SDS-PAGE를 실시하고 (Laemmli, 1970), 영동 후 겔을 착염색하여 관찰하였다 (Merrill et al., 1981).

Vg 항체를 이용한 Western blotting

암컷의 혈청과 난소를 RIPA용액과 혼합, 마쇄한 후 원심분리한 상층액을 분석하였다. 앞서와 동일한 방법으로 SDS-PAGE를 수행한 후 PVDF memb. 상에 blot을 제작하였다. Vg 항체는 cirtain gel blot을 사용한 9종의 항체 검색 후 같은 농어과 어류인 stripped bass의 Vg에 대한 단일클론항체 IC8, 5F8 (from U. of Florida)를 사용하였다. 항원-항체반응 유도 후 세척하고 HRP부착 2차항체 부착하고 세척한 후 DAB로 발색하여 신호를 검출하였다.

재료 및 방법

밀어

실험에 사용한 개체는 1999년 하계에 경기도 수원시 광교천에서 채집하였다. 채집 즉시 실험실로 옮겨 채취한 후 꼬리지느러미 전단을 절단하여 혈액을 채취하였고 해부하여 난소를 채취하였다. 일부는 사육

결과 및 논의

암컷 혈청과 난자내 Vg의 생화학적 특징

IC8 항체를 사용하여 암컷의 혈청단백질 blot을 확인한 결과 혈청내 Vg는 분자량 190, 130 및 115 kDa (reduced form)이 확인되었다 (Fig. 1). 5F8항체

는 혈청에 존재하는 Vg를 검출하지 못했다. 따라서 혈액내에는 여러개의 항원이 존재하거나 동일한 Vg 항원이 분절된 형태로 존재하는 것으로 추측된다. 다양한 어류에서 진화적으로 보존된 복수의 Vg 유전자가 존재하며 (Wahli *et al.*, 1981; Bidwell & Carlson, 1995), polypeptide내에 유사한 염기서열을 갖지만 서로 다른 Vg 유전자 사이에는 발현에 양적인 차이를 보인다 (Wang & Williams, 1980; Wahli *et al.*, 1981). Vg 유전자는 전사조절부위에 estrogen responsive element (ERE)가 존재하며 estrogen에 의해 전사가 활성화된다 (Corthesy *et al.*, 1988). 따라서 혈청에서 검출된 복수의 항원은 서로 다른 Vg 단백질로 추측된다. 한편 IC8 항체를 사용하여 성숙기 난자 단백질 blot을 확인한 결과 분자량 70, 65 및 57 kDa (reduced form)이 확인되었다 (Fig. 1). 5F8항체를 사용하였을 때는 분자량 75 및 70 kDa (reduced form)이 확인되었다 (Fig. 1). 다양한 어류에서 Vg이 간에서 합성된 후 혈액으로 방출되는 단계 및 난자내로 흡수되어 난황으로 전환되는 과정에서 2회의 현격한 단백질 절단이 발생하며 난자내에 저장된 난황은 다시 더 작은 peptide 및 아미노산으로 분해되어 영양분으로 이용 및 난자의 부유특성의 조절에 관여한다 (Matsubara *et al.*, 1999). 따라서 본 실험 결과 혈청과 난자내 존재하는 Vg 단백질의 생화학적 특성(분자량)의 차이는 난자의 성숙과정에서 Vg 항원의 peptide cleavage에 기원한 것으로 추측된다.

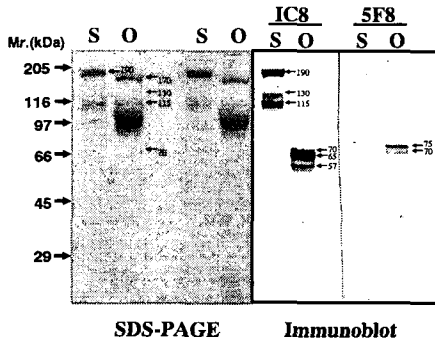


Fig. 1. SDS-PAGE and Western blot of serum and ovary extract.

17β-estrogen에 의한 수컷 혈청단백질의 변화

수컷 밀어에 17β-estradiol을 0.1, 1, 10 ug/g 체중으로 1회 주사한 후 48시간에 혈액에서 준비한 혈청내 단백질의 SDS-PAGE 상에서 분자량 190, 110, 70 kDa의 항원의 유도가 확인되었다. 특히 Vg로 추측되는 190 kDa의 항원이 저농도 (0.1 ug/g 체중)의 estrogen 주사에 의해 농도의존적으로 유도가 확인되었고 70 kDa 항원은 0.1 ug/g 체중 이상의 농도에서 거의 균일한 발현을 보였다 (Fig. 2).

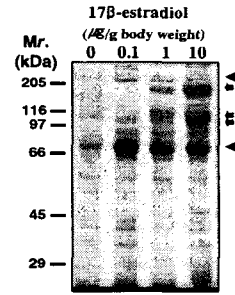


Fig. 2. SDS-PAGE of male sera following different concentration of estrogen injection.

수컷 밀어에 17β-estradiol (1ug/g 체중)을 1회 주사한 후 48시간에 Vg로 추정되는 190 kDa 단백질이 유도되어 1주간 지속되었으며 이후로 감소하였다 (Fig. 3).

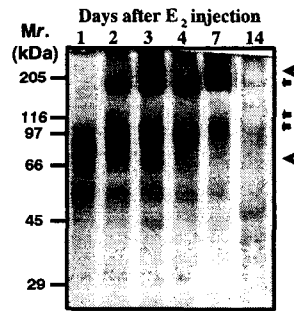


Fig. 3. SDS-PAGE of male sera following single injection of estrogen.

사육조건에 따른 차이

하계조건에서 사육한 수컷 밀어에 17β-estradiol을 1 ug/g 체중으로 1회 주사한 후 48시간에 혈액에서 준비한 혈청내 단백질의 SDS-PAGE 상에서 분자량 190 kDa의 항원의 유도가 확인되었다. 이러한 현상은 동계적용 밀어에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 유사한 현상이 잉어에서 관찰되었으며 동계반응의 감소는 estrogen 수용체 발현의 저하와 관련된 것으로 보고되었다(Hernandez *et al.*, 1992).

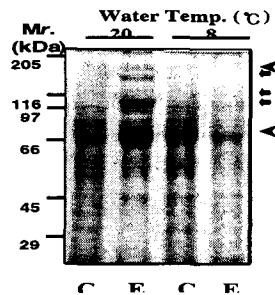


Fig. 4. SDS-PAGE of male sera following estrogen injection in different temperature.

Nonylphenol에 의한 수컷 혈청단백질의 변화

환경 estrogen의 일종인 nonylphenol을 1 ug/g 체중으로 주사한 후 48시간 후 혈청내 Vg으로 추측되는 190 kDa의 단백질의 출현을 관찰하였다 (Fig. 5). 그러나 이는 천연에스트로젠인 17β-estradiol과 비교하여 매우 미약한 수준으로 nonylphenol이 weak estrogenic한 효과를 가짐을 보여준다 (White et al., 1994). 이미 다양한 어류에서 nonylphenol에 의한 Vg의 유도현상이 보고되었다 (Sumpter, 1995). Estradiol 또는 EDC를 처리한 수컷의 간과 혈액에서 P450등 다양한 단백질이 유도되지만 혈액내에서 확인할 수 있는 가장 확인한 단백질은 Vg이다 (Kishida et al., 1992). 이들 중 대부분은 유전자 조절부위에 estrogen에 의한 조절부위를 갖는다. 본 연구에서는 estrogen에 의한 수컷 혈청 단백질의 양상의 변화를 확인하였으나 Vg항체를 이용하여 다양한 EDC를 대상으로 Vg 유도현상에 대한 명확한 증거가 제시될 수 있을 것이다.

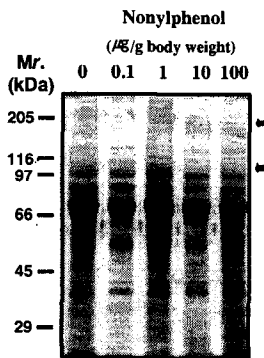


Fig. 5. SDS-PAGE of male sera following different concentration of nonylphenol injection.

요약

밀어 (*Rhinogobius brunneus*)의 난자형성과정에서 난황전구 단백질 (vitellogenin, Vg)의 변화 및 estrogen에 의한 혈청단백질의 유도에 관하여 조사하였다. 혈청내 Vg는 분자량 190, 130 및 115 kDa (reduced form)으로 난자의 성숙과정에서 peptide cleavage가 일어났다. 수컷 밀어에 17β-estradiol을 1회 주사한 후 48시간에 다량의 Vg로 추정되는 단백질이 유도되어 1주간 지속되었으며 이후로 감소하였다. 이러한 현상은 동계적용 밀어에서는 관찰되지 않았다. 환경 estrogen의 일종인 nonylphenol을 주사하여 Vg으로 추측되는 혈청단백을 유도하였다. 밀어는 환경에스트로젠에 의한 수컷에서 Vg유도에 적합한 실험어류로 사료된다.

참고문헌

계명찬, 한명수 (2000) 한국환경생물학회지 18: 291-298. Bidwell CA, Carlson DM (1995) J. Mol.

Evol. 41: 104-112.
 Hernandez I, Poblete A, Amthauer R, Pessot R, Krauskopf M (1992) Biochem Int 28: 559-567.
 Kishida M, Anderson TR, Specker JL (1992) Gen Comp Endocrinol 88: 29-39.
 Laemmli UK (1970) Nature 227: 680-685.
 Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T, Sullivan CV, Hara A (1999) Dev Biol 213: 18-32.
 Merrill CR, Goldman D, Sedman SA Ebert MH (1981) Science 211: 1437-1438.
 Mommsen TP, Walsh PJ (1988) In Fish Physiology (Hoar WS and DJ Randall, eds.). Vol XIA. Academic Press, New York. pp. 347-406.
 Sumpter JP, Jobling S (1995) Environ Health Perspect 103 Suppl 7: 173-178.
 Sumpter JP (1995) Toxicol Lett 82-83:737-742.
 Wahli W, Dawid IB, Ryffel GU, Weber R (1981) Science 212: 298-304.
 Wang SY, Williams DL (1980) Biochemistry 19: 1557-1563.
 White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) Endocrinology 135: 175-182.