

유시자웅동체 어류(Red seabream, *Pagrus major*)의 성분화 과정에 관여하는 내분비기작에 대한 연구

임 봉 수

제주대학교 해양과환경연구소

서론

척추동물은 발생초기에 성적 미분화로, 발생단계에서 자웅의 분화방향을 정하는 '성결정'이 일어난다. 성결정은 성적으로 미분화된 생식소원기에서 이루어지며, 그 기구는 수정시 성염색체 조합에 의한 유전적 결정과 발생환경이나 사회환경 등의 외적인 요인에 의해 결정되는 경우로 크게 나누어지고, 그 내용도 다양하다. 성결정이 되면 이어서 생식소원기의 '성분화'가 시작한다. 성분화 과정에서, 생식소에 체세포와 생식세포는 같은 성의 방향으로 형태적, 기능적으로 분화해, 난소체세포(granular cell)가 구축된 여포 안에서는 난형성 과정이, 정소체세포(sertoli cell)가 구축된 정세관안에서는 정자형성 과정이 일어난다. 이 난형성과 정자형성이 자웅성을 지닌 동물에서, 생식소의 성결정 기구는 다양하지만, 성분화의 기구는 어느 정도 공통성을 지니고 있음이 예상된다.

척추동물에서는 성의 결정은, 유전적 성결정기구가 일반적이다 그중에서도 XX/XY형이 대부분으로, 포유류와 많은 어류에서도 이 양식으로 성결정이 이루어진다. 이와 같은 척추동물에서는 Y염색체상에 수컷을 결정하는 성결정유전자가 존재한다고 생각되어져왔다. 성결정유전자는 처음으로 사람과 mouse에서 성결정유전자 SRY가 발견되었고(Sinclar et al., 1990; Gubbay et al., 1999), 척추동물에서는 두 번째로 송사리에서 성결정유전자가 발견되어, Y염색체에 있는 DM domain을 가진 유전자인 것에 유래하여 DMY(DM-related gene on the Y-chromosome)로 명명되었다(Matsuda et al, 2002)

하지만, 어류에서는 성염색체가 명확하지 않은 종들이 많으며, 유전적으로 결정된 성이라 하더라도 부화 직후는 외부환경에 대한 감수성이 높고, 성적 미분화시기에 성호르몬 등을 처리하면 성전환을 일으킨다. 또한 성이 결정된 성체에서도 성전환을 일으키는 종도 있다. 이와 같이 성에 대해서 높은 가역성을 지닌 어류는, 성결정/분화의 연구에 좋은 생물모델이라 할 수 있다 어류의 성결정과 생식소의 성분화에 관한 연구는, 특히 성호르몬의 역할에 대하여 활발히 이루어져 왔다. 부화 직후 치어에게 androgen이나 estrogen을 처리함으로써, 유전적인 암컷과 수컷을 각각 기능적인 수컷과 암컷으로 성전환을 유도할 수 있어 정상적인 생식소의 성분화과정에도 내인성 성호르몬이 중요한 역할을 담당하고 있을 가능성을 시사하고 있다. 그러나 실제 성분화시에 생식소에서 스테로이드호르몬이 분비되어, 이것이 성분화에 기능적으로 작용하는 제어 기구에 대해서 분자생물학적인 기법을 이용해 성분화기의 생식소에서 스테로이드호르몬 분비에 관한 연구가 이루어지고 있다. 그 결과 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* (Kobayashi et al., 1998), 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Kitano et al., 1999)와 틸라피아, *Oreochromis niloticus* (Nakamura et al., 1999)에서 방향성 효소(aromatase)의 mRNA가 성분화 개시 이전의 유전적 암컷 생식소에서 특이적으로 발현하였다. 또한, 자웅이체의 무지개 송어, *O. mykiss*에서는 성분화시기에 뇌하수체에서 FSH가 발현하였고(Saga et al., 1993), *Pejerrey*, *Odontesthes bonariensis* (Miranda et al., 2001)에서는 성분화시기에 FSH와 LH가 면역조직화학적으로 뇌하수체에서 검출되었다. 이는 시상하부-뇌하수체-생식소계의 호르몬이 성숙뿐만 아니라, 성분화에도 중요한 역할을 담당할 가능성을 시사하고 있는데 성분화시기에 있어 이들 시상하부-뇌하수체-생식소계의 호르몬유전자 변동에 관한 상세한 연구가 이루어져 있지 않다.

참돔(*Pagrus major*)의 성 특성은 치어시에 비기능성 자웅동체시기를 갖는 유시자웅동체형 어류이다. 또한 참돔의 생식관련인자들인 GnRH, GtH subunit 및 steroidogenic enzymes 등의 유전자가 동정되어 있어 어류의 성분화에 관여하는 내분비기구를 연구하는데 적합한 실험어류이다. 따라서 본 연구에서는 참돔을 이용해 어류 생식소의 성분화 유도 기구를 분자생물학적인 연구기법을 이용해 구명하였다

1. 생식소의 성분화 과정

참돔의 생식소 및 생식세포의 성분화 과정, 특히 생식소의 난소강으로 분화과정, 유시자웅동체가 되는

과정 및 정소로의 분화과정을 구명하기 위해 생식소, 생식세포 및 steroid-producing cell의 발달과정을 광학현미경과 전자현미경을 이용해 조직학적으로 관찰하였다.

미분화기 : 부화 직후, primordial germ cell(PGC)가 소화관의 바깥쪽으로 2, 3개가 분포하였다. 부화 후 10~20일에는 PGC가 복막후부에서 복막 벽을 따라 1열로 나란히 존재하고 발생과 더불어 조금씩 두부 쪽으로 이동하였다. 부화후 20~50일에는, 생식원세포(gonocyte)와 체세포로 이루어진 생식원기가 체강의 복막에 매달려 있는 게 관찰되었다. 이 시기에, 이 난소강의 연변부에 생식세포와 체세포로 구성된 cyst와 같은 구조가 관찰되고, 그 주변에서 부정형의 핵, 발달된 관상 크레스터를 가진 대형 미토콘드리아 및 잘 발달된 활면소포체 등 전자현미경적인 특징을 지닌 steroid producing cell이 관찰되었다. 성분화시기 이전에 관찰된 steroid-producing cell이 성 스테로이드 호르몬 분비를 통해서 성분화, 특히 난소로의 분화에 관여하고 있다고 생각된다.

난소강분화기 : 부화후 81일이 되면, 생식소의 양끝에서 체세포가 복강 쪽으로 증식해 나아가, 이것들이 융합함으로써 난소강(ovarian cavity)을 형성한다. 부화후 150일에는 일부 생식원세포(gonocyte)들이 감수분열에 들어간 주변인기의 난모세포가 출현하여 생식소가 난소로 분화되었다고 판단되었다

자용동체기 : 부화후 187일이 되면, 생식소의 등쪽에서 말단부에 걸쳐, 난모세포를 가진 난소부분과는 달리 생식원세포들만이 차지하는 부분이 관찰되었다 그리고 부화후 519일이 되면, 그 부분에서 정자형성이 이루어져 정소역으로 분화하였다(유시자용동체). 이시기에 정소역과 난소역의 비율이 다양한 개체를 출현하고 일부 개체에서는 난소역의 난모세포 퇴화가 일어났다.

성결정기 : 부화후 611일이 되면, 정소역이 퇴화하고 난모세포만으로 이루어진 난소와 난소역이 퇴화되어 완전한 정소로 분화한 개체들이 관찰되었다. 그리고 부화후 711일에는 자용의 비율이 약 1:1이 되었다.

2. 미분화기에서 난소강 분화기의 개체에 있어 스테로이드 호르몬의 역할

어류의 난소와 정소 분화에는, 각각 estrogen과 androgen이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그래서 estradiol-17 β (E₂)의 합성에 중요한 aromatase (P450arom) 유전자와 어류의 androgen인 11-ketotestosterone (11-KT)의 합성에 관여하는 11 β -hydroxylase (P450c11) 유전자의 발현동태에 대해 검토하였다. 또한 성분화시기의 시상하부-뇌하수체-생식소계의 호르몬 유전자 발현 동태를 알아보기 위해, 시상하부에서는 seabream type GnRH (sbGnRH), 뇌하수체에서는 FSH β subunit, LH β subunit mRNA의 발현동태를 Real-time Quantitative RT-PCR법으로 조사하였고, 혈중 steroid hormone의 농도를 알아보기 위해, ELISA법과 RIA법으로 조사하였다.

그 결과, P450arom mRNA의 발현은 난소강의 형성시기에 증가하여, 이전 무지개송어(Kobayashi et al., 1998), 넙치(Kitano et al., 1999), 틸라피아(Nakamura et al., 1999) 등에서 보고된 내용과 유사하였고, 난소의 분화, 특히 난소강의 분화에 P450arom가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. P450c11 mRNA 발현이 난소강의 형성에 따라 증가하였다. 이것으로, 참돔 생식선에서의 E₂와 11-KT의 생성이, 난소강의 형성에 관여할 가능성이 높음을 시사한다. 이 기간 중 혈중 E₂량은 증가하지 않았으나, 이는 참돔 산란기의 혈중 E₂량이 1.5ng/ml로 아주 낮다는 점을 고려할 때, 국소적으로 작용해 혈중에 반영될 필요가 없다고 생각되어진다.

그리고 어류의 성 성숙에 중요한 역할을 담당하고 있는 GnRH과 GtH subunit 유전자의 발현을 측정된 결과, 난소강 형성이 시작되는 부화후 75일경에 FSH β mRNA이 높게 발현되어 FSH 유전자가 난소강 형성에 어떠한 역할을 맡고 있을 가능성이 있어 GtH receptor의 관여를 포함한 자세한 연구가 필요하다고 생각되어진다.

3. 자용동체에서 자용으로 분화에 관여하는 스테로이드 호르몬의 역할

자용동체에서 자용 분화에 관여하는 내분비기구를 탐색할 목적으로, 이 시기에 각종 호르몬 유전자의 발현동태를 조사하였다. 정소 분화가 진행되고 있는 개체에서는 P450arom mRNA의 발현이 저하되고, 반면에 P450c11 mRNA의 발현량은 현저히 높아져, 정소 분화에는 11-KT가 중요한 역할을 하고 있다고 본다. 이와 같은 상태가 연속되어지면, 난소강의 퇴행과 정소역의 발달이 촉진되어 그 결과로서 정

소 분화가 완료되는 것으로 생각되어진다. 또 난소 분화가 진행되고 있는 개체에서는 P450arom 유전자의 발현에는 변화가 보이지 않으나, P450c11 유전자 발현은 매우 낮았고 혈중 11-KT량도 난소 분화한 개체에서 현저히 감소하였다. 이상의 결과들을 종합해 보면, 자성 분화에는 P450arom 유전자에 의한 E₂생산이 활성화하는 것이 아니라, P450c11 유전자가 발현하지 않음으로 인해 암컷으로의 분화가 촉진되는 것으로 생각되어진다.

sbGnRH 유전자와 FSH β 유전자의 발현이 수컷으로 분화한 개체에서 증가하는 경향이 있어, 이들 유전자가 11-KT생산을 통해 정소의 분화에 어떤 역할을 담당하고 있는 것으로 생각한다. 정제한 참돔의 FSH는 정소에서는 11-KT의 합성을 촉진하지만, 난소에서는 E₂ 합성을 촉진하지 않는다. 따라서 양성생식소에 FSH가 작용한다면, E₂가 아니라 11-KT가 정제될 가능성이 있다고 생각되어지며, 따라서 양성생식소에서 음성 분화에는 FSH가 작용하여 양성생식선에서 11-KT 분비가 증가한다고 사료되나, 앞으로 이 부분에 대해서는 좀 더 상세한 연구가 필요하다.

이 연구의 결과, 참돔 미분화생식소에서 난소강으로의 분화에는 P450arom 유전자의 발현과 함께 E₂의 합성이 중요하고, 양성생식소를 가지는 자웅동체에 우성 분화는 GnRH, FSH 및 11-KT 분비 증가에 의해 유도되고, 자성 분화에는 11-KT의 분비 비활성에 기인하는 것으로 사료된다.

또한, 이러한 연구는 유용어종의 새로운 성제어법과 번식제어법의 개발에 도움이 될 뿐만 아니라, 내분비 교란 화학물질 등이 번식의 연속성에 미치는 연구에도 공헌할 것으로 기대된다

참고문헌

- Sinclair AH, Sinclair, Jamie W. Foster, James A. Spencer, David C. Page, Mark Palmer, Peter N. Goodfellow, Jennifer A. Marshall Graves (1999). Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials Nature, 346, 240-244.
- Gubbay J, érôme Collignon, Peter Koopman, Blanche Capel, Androulla Economou, Andrea Munsterberg, Nigel Vivian, Peter Goodfellow, Robin Lovell-Badge (1999) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes Nature, 346, 245-250
- Masaru Matsuda, Yoshitaka Nagahama, Ai Shinomiya, Tadashi Sato, Chuka Matsuda, Tohru Kobayashi, Craig E Morrey, Naoki Shibata, Shuchi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Hirohi Hori, Satoshi Hamaguchi & Mitsuru Sakaizumi (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish Nature, 417, 559-563.
- Kobayashi, T, Nakamura, M., Kajiura-Kobayashi, H, Young, G., and Nagahama, Y. (1998). Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3 β -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Cell Tissue Res., 292(3), 573-577.
- Kitano T., Takamune K., Kobayashi T, Nagahama Y., and Abe S.I. (1999) Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Mol. Endocrinol., 23(2), 167-176.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Yoshiura, Y. and Nagahama, Y. (1999). Role of endogenous steroid hormones on gonadal sex differentiation in fish. In: Program and abstracts of 6th International symposium on reproductive physiology of fish, Institute of marine research and Univ. Bergen, Bergen, 4-9 June. PP.247-249.
- Saga, T., Oota, Y., Nozaki, M., and Swanson, P.(1993) Salmonid pituitary gonadotrophs. III Chronological appearance of GTH I and other adenohypophysial hormones in the pituitary of the developing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*). Gen. Comp. Endocrinol., 92(2), 233-41
- Miranda, L.A., Strüssmann, C.A., and Somoza, G.M. (2001) Immunocytochemical identification of GtH1 and GtH2 cells during the temperature-sensitive period for sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Gen. Comp. Endocrinol., 124(1), 45-52.