

Strongylocentrotus nudus 성계에서 빈산소에 의한 배 발생률 및 수정률에 관한 연구

이건섭¹, 황진익¹, 정영재², 김동균³, 모상현⁴, 이택건^{1*}

¹한국해양연구원

²신경대학교 생명공학과

³신라대학교 생물학과

⁴바이오에프디엔씨 항노화연구소

*e-mail: tklee@kordi.re.kr

Study of Fertilization and Developmental Rates by Hypoxia condition in *Strongylocentrotus nudus*

Gunsup Lee¹, Jinik Hwang¹, Youngjae Chung², Donggiun Kim³, Sang Hyun
Moh⁴, Taek-Kyun Lee^{1*}

¹South Sea Environment Research Department, Korea Ocean Research and
Development Institute

²Department of Life Science and Biotechnology, Shin Gyeong University

³Department of Biological Science, Silla University

⁴Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

요 약

본 연구는 빈산소에 의한 동근 성계 (*Strongylocentrotus nudus*) 수정란의 수정률 및 발생률에 관한 연구이다. 대조군 (normoxia)과 실험군 (hypoxia) 으로 나누어 수정률과 발생률의 변화를 관찰 하였으며 또한 gonad 세포의 유전자 발현의 차이를 봄으로써 스트레스 관련 유전자와 항산화 관련 유전자의 변화를 확인 할 수 있었다. 결과적으로 수정률에서는 큰 차이를 확인 할 수 없었던데 반해 발생률에 있어서 빈산소의 경우 전혀 발생이 진행되지 않는 것을 확인 할 수 있었으며 또한 빈산소에 노출된 gonad 세포의 경우도 스트레스 또는 항산화 유전자가 많이 발현 되는 것을 관찰 할 수 있었다. 앞의 실험을 토대로 빈산소 환경에서 유전자 발현량의 차이를 더욱더 수행함으로써 빈산소 상태에 따른 죽음의 바다의 증가 얼마나 위험한 것인지 더욱더 관찰 할 수 있을 것이다.

1. 서론

Hypoxia (oxygen depletion)는 DO (dissolved oxygen) 수치가 2.8 mg O₂/L이하로 줄어든 해양 환경에서의 현상을 말한다. 산소가 고갈돼 생물이 살아가기 힘든 환경인 hypoxia zone은 1960년대 이래로 지속적으로 증가하고 있으며 전체면적은 245,000 square kilometer에 이른다 (Diaz and Rosenberg 2008). Raquel Vaquer-sunyer과 Carlos M. Duarte는 2008년 논문에서 Hypoxia zone이 해마다 5.54% 이상 증가한다는 것을 보고하였으며 대부분의 hypoxia zone이 근해에서 이루어지고 해변 생태계를 심각하게 변화 시키고 있다고 보고하고 있다. 또한 이 논문에서는 어류, 극피동물, 갑각류, 연체동물,

자포동물 등에서 여러 실험 논문을 토대로 hypoxia 상태에서의 평균 50%가 죽는 lethal time으로 116시간이 소요 되는 것을 보고 하였으며 극심한 생태계 파괴의 주요 요인으로 생각된다 (Vaquer-Sunyer and Duarte 2008).

본 과제에서는 빈산소에 의한 발생학적인 단계에서의 배 발생률 및 gonad 세포에서의 HSP70의 유전자 와 glutathione reductase 발현양상을 확인함으로써 산소가 고갈된 빈산소 해역이 얼마나 많은 생태계를 위협하는지 확인해 보았다.

빈 산소에 의한 생물 반응 연구는 대부분 연구 대상 생물이 포유류에 한정되어 있다. 성계에 대한 빈 산소 상태에서의 연구는 거의 이루어져 있지 않으며 따라서 성계 배 발생에서부터 gonad 세포에 대

한 연구 더 나아가 빈 산소에 의한 유전자발현 차이에 대한 연구는 충분히 가치가 있을 것으로 판단된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 성게배양

실험에 사용한 둥근성게 (*Strongylocentrotus nudus*) 성체는 산란기에 경남 거제 연안에서 직접 채집하여 한국해양연구원 남해연구소 양식동의 수조에서 다시마를 먹이로 하여 배양하였다.

2.2. 정자 및 알 추출 방법

산란기에 있는 성게 수컷에 1 N KCl 용액으로 자극을 주어 정자를 추출했다. 성게를 수조에서 꺼낸 후 입을 위로하고 입 주위의 막을 주사기로 찢어 KCl 용액을 주입하고 기다려 항문 주위 생식공에서 나오는 우유빛의 정자를 파스퇴르 피펫으로 조심스럽게 뽑아 사용했다. 정자의 추출과 마찬가지로 성게 암컷에 1 N KCl을 주입하고 해수가 담긴 비커에 거꾸로 올려놓고 생식공에서 방출하는 주황색 알을 모았다. 약 30분 동안 알을 모은 후 알 사이의 점액질 제거를 위해 알을 세척하여 사용하였다.

2.3. 수정률 실험

빈산소에 정자를 노출시킨 후 알을 주입하여 정자와 알이 만나 수정이 이루어지도록 20분정도 기다린 후 포르말린 용액을 주입하여 수정을 중단시킨 후 수정률을 측정했다. 수정률은 알의 바깥쪽에 수정막이 형성되어 있는지 여부를 관찰하여 수정란과 미수정란으로 구분하였다.

2.4. 초기 배 발생 실험

추출한 알에 정자 원액을 처리하여 체외 수정시킨 후 사용하였다. 약 10분 후 일부의 수정률을 측정하여 95% 이상의 알이 수정에 성공했을 때 빈 산소노출용 수정란으로 사용했으며 수정란은 200 cell/ml 정도의 적정밀도로 희석하였다. 수정이 시작되면 발생이 계속 진행되므로 빈 산소에 노출시켜 발생률을 측정했다. 발생률은 플루테우스 유생으로 발생이 진행된 정상유생과 비정상 유생으로 구분했으며 비정상 유생은 발생이 멈추거나 지연되어 포배기 혹은 낭배기까지 발생된

경우 등을 모두 포함하였다.

2.5 Western blot

산란기의 성게 성체를 빈 산소에 72시간 동안 노출시킨 후 성게 생식소 (gonad cell)를 채집 하였다. 성게의 생식소는 노출 후 성게 성체를 반으로 잘라 spatula를 사용해서 분리하였다. 분리 한 생식소는 protein extract solution (Intron)을 사용해서 단백질을 추출 하였다. 추출한 단백질은 nano drop를 사용해서 정량하였다. 추출한 단백질은 SDS-PAGE에 전기영동 한 후 stacking gel을 제거했다. 이후 3 M paper와 SDS-PAGE gel을 cassette에 조립한 후 transfer 한다. transfer가 끝나면 TBS로 3 M paper를 15분간 2회 세척한 후 5% skip milk에 30분 동안 담가둔다. 이후 TBS로 다시 2회간 세척하고 primary antibody (heat shock protein 70)와 secondary antibody (mouse-IgG)에 1시간 동안 담가둔다. 3 M paper의 단백질은 형광물질 ECL solution을 사용하여 flim으로 확인 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 빈 산소에 의한 성게에서의 수정률 비교

용존산소농도 2 ppm 이하의 해수에 20분 동안 노출된 정자를 이용하여 난자에 첨가한 후 수정률을 비교하였다. 빈 산소를 처리하지 않은 즉 일반 해수를 처리한 그룹을 대조군으로 하여 5번 반복 실험하였으며 빈산소를 처리한 실험군 또한 5번 반복 실험을 통하여 결과를 확인하였다 (표 1). 대조군의 경우 평균적으로 97.85%의 높은 수정률을 확인하였으며 실험군에서 또한 95.68%의 비교적 높은 수정률을 확인할 수 있었다. 따라서 빈 산소에 의해 수정률의 변화는 크게 확인 할 수 없었다.

[표 1] 빈 산소에 의한 대조군과 실험군의 수정률 확인 비교

	대조군 1	대조군 2	대조군 3	대조군 4	대조군 5	TOTAL
수정	162/164	154/157	181/187	176/178	147/151	
미수정	2/164	3/157	6/187	2/178	4/151	
평균	98.78	97.45	96.79	98.88	97.35	97.85
	실험군 1	실험군 2	실험군 3	실험군 4	실험군 5	TOTAL
수정	164/168	157/164	154/163	136/144	149/155	
미수정	4/168	7/164	9/163	8/144	6/155	
평균	97.62	95.73	94.48	94.44	96.13	95.68

3.2 빈 산소에 의한 성계에서의 발생률의 비교

추출한 알에 성계 정자를 이용하여 체외 수정을 실시하였으며 일반 해수에서 처리한 대조군과 빈 산소를 처리한 실험군으로 나누어 실험을 수행하였다. 각 100개 이상의 난자를 이용하여 실험을 수행하였으며 3반복을 수행하였다. 수정 후 15 hr 경과 후 배발생 단계에서 blastula 단계에 도달한 그룹을 이용하여 각각의 발생량을 확인한 결과에서는 수정된 모든 개체에서 모두 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 수정 후 48 시간 경과 후 prism 단계에서의 배 발생률에서는 큰 차이를 확인할 수 있었다. 대조군 3반복 모두에서 수정이 된 수정란의 경우는 모두 배 발생이 완료된 것을 확인할 수 있었으며 상대적으로 빈 산소 처리 그룹에서는 모두 prism 상태로 발생이 되지 않는 것을 확인할 수 있었다 (표 2). 현미경을 통한 관찰에서도 위와 같은 사실을 확인할 수 있었다 (그림 1).

결론적으로 초기 배 발생 단계에서는 빈 산소에 의해 성계에서 거의 영향이 없는 것에 반해 후기 배 발생 단계에서는 극과 극의 영향력이 미치는 것을 확인할 수 있었다.

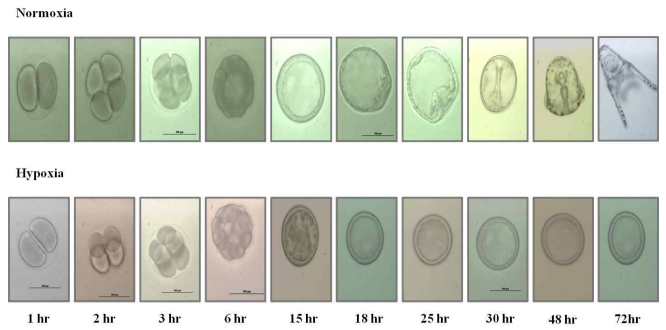
[표 2] 빈 산소에 의한 대조군과 실험군의 발생률 비교

A. Blastula 단계에서의 발생률 비교 (수정 후 15 hr)			
	대조군 1	대조군 2	대조군 3
BLASTULA	100/100	161/161	167/167
BLASTULA (X)	0	0	0
평균	100.00	100.00	100.00

실험군			
	실험군 1	실험군 2	실험군 3
BLASTULA	124/124	196/196	147/147
BLASTULA (X)	0	0	0
평균	100.00	100.00	100.00

B. Prism 단계에서의 발생률 비교 (수정 후 48 hr)			
	대조군 1	대조군 2	대조군 3
prism	108/108	121/121	136/136
prism (X)	0/108	0/121	0/136
평균	100.00	100.00	100.00

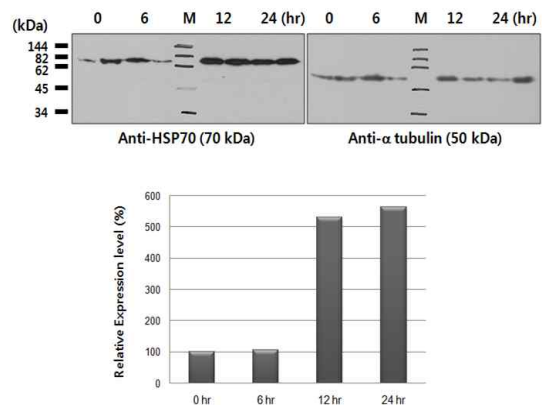
실험군			
	실험군 1	실험군 2	실험군 3
prism	0/162	0/178	0/121
prism (X)	162/162	178/178	121/121
평균	0.00	0.00	0.00



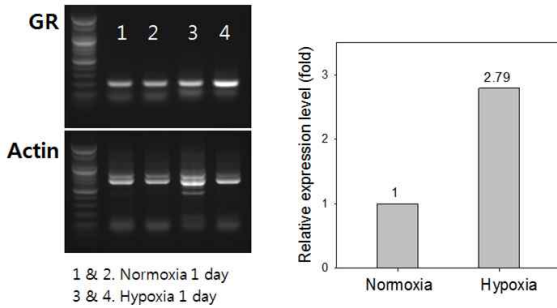
[그림 1] 빈산소 상태에서의 성계 배발생 단계의 확인

3.3 빈산소에 노출된 성계 gonad에서 HSP70 단백질 발현과 glutathione reductase 양의 변화 분석

빈 산소에 노출 될 경우 가장 빈번한 유전자의 발현량 차이를 보일 것으로 예상되어지는 HSP70 유전자와 항산화 효소인 glutathione reductase 발현 차이를 확인해 보았다. HSP70의 경우 빈산소를 처리하였을 때 0 시간과 비교하여 12시간째에 약 5.32배가 증가하는 현상을 확인 하였으며 24시간째에도 5.64배가 증가하는 현상을 western blot analysis와 상대적인 발현량 비교로 확인할 수 있었다. 일반적으로 HSP70의 경우 스트레스가 증가 할 시에 증가하는 단백질로 알려져 있으며 따라서 빈산소가 성계 수정란에 상당히 많은 스트레스를 주는 것으로 확인 하였다. 또한 항산화 효소 중의 하나인 glutathione reductase의 경우도 빈산소의 경우 RT-PCR의 결과에서 약 2.79배 증가하는 현상을 상대적인 발현으로 확인하였다.



[그림 2] Western 분석에 의한 HSP70 유전자의 발현량의 비교



[그림 3] PCR에 의한 Glutathione reductase 유전자의 발현량의 비교

4. 결론

빈산소 환경에 의한 등근성계에서의 배 발생률의 변화를 확인한 결과 발생이 유도 되지 않은 것을 확인하였으며 또한 스트레스 관련 유전자 또는 항산화 관련 유전자의 증가를 통해 빈산소가 등근성계에 확실한 독성이 있음을 확인 할 수 있었다.

5. 사사

본 연구는 국토해양부 과제 (PM56700(PJT200461))의 지원을 받아 이루어졌습니다.

6. 참고문헌

[1] Diaz RJ, Rosenberg R (2008) Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321 (5891):926-929. doi:321/5891/926 [pii] 10.1126/science.1156401

[2] Li H, Zuo S, He Z, Yang Y, Pasha Z, Wang Y, Xu M (2010) Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299 (6):H1772-1781. doi:ajpheart.00557.2010 [pii] 10.1152/ajpheart.00557.2010

[3] Morales J, Mulner-Lorillon O, Cosson B, Morin E, Belle R, Bradham CA, Beane WS, Cormier P (2006) Translational control genes in the sea urchin genome. *Developmental biology* 300 (1):293-307

[4] Saito K, Kondo E, Matsushita M (2011) MicroRNA 130 family regulates the hypoxia

response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic acids research* 39 (14):6086-6099

[5] Siikavuopio SI, Dale T, Mortensen A, Foss A (2007) Effects of hypoxia on feed intake and gonad growth in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 266 (1-4):112-116

[6] Vaquer-Sunyer R, Duarte CM (2008) Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (40):15452