

조피볼락(*Sebastes schlegeli*)의 Retinol-Binding Protein의 유전자 발현에 미치는 4-Nonylphenol의 영향

조형구 · 정지현¹ · 이재용 · 김명희 · 한창희[†]
동의대학교 분자생물학과, ¹한국해양연구원

Effect of 4-Nonylphenol on the Gene Expression of Retinol-Binding Protein in the Rockfish, *Sebastes schlegeli*

Hyung-Koo Cho, Jee-Hyun Jung¹, Je-Yong Lee, Myung-Hee Kim and Chang-Hee Han[†]

Major of Molecular Biology, Division of Life Science, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

¹South Sea Institute, KORDI, Geoje, 656-830, Korea

ABSTRACT : Retinol-binding protein(RBP) plays an important role in the specific transport of retinol to target cells through the blood stream in higher vertebrates. In order to clarify the effects of 4-nonylphenol(4-NP) on RBP mRNA expression in the rockfish, *Sebastes schlegeli* which is common in coastal waters of Korea and commercially important species, the cDNA library was constructed from the liver, and a partial fragment of the RBP gene was cloned. The deduced amino acid sequence from the RBP mRNA showed a high homology to the amino acid sequence from *Sparus aurata*(80%), *Oncorhynchus mykiss*(72%) or *Anguilla anguilla*(78%). Effects of 4-NP on RBP and vitellogenin(VTG) mRNA expression level in rockfish were examined by the northern blot analysis. In female and male rockfish injected with 4-NP(10 mg/kg BW, lower dose), there was no changes in the levels of VTG mRNA expression in the liver. The RBP mRNA levels, however, decreased at 48 hours after the injection in male. In the rockfish injected with 4-NP(25 mg/kg BW, higher dose), the level of VTG mRNA expression increased after 24 hours, regardless of sex. The level of RBP mRNA expression decreased at 48 hours after the injection in both sexes. These data indicate that estrogenic mimics such as 4-NP exhibit a contrasting effect on RBP and VTG gene expression in rockfish.

Key words : 4-nonylphenol, Retinol-binding protein, Vitellogenin, Rockfish, *Sebastes schlegeli*.

요약 : 레티놀 결합 단백질(retinol-binding protein, RBP)은 고등 척추동물에서 혈류를 통해 특이적으로 레티놀을 표적세포에 운반해 주는 중요한 역할을 한다. 우리나라의 연안에 서식하고 있으며 산업적으로 중요한 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)을 대상으로 4-nonylphenol(NP)가 RBP mRNA 발현에 미치는 영향을 구명하기 위해 간으로부터 cDNA library를 제작하고 RBP 단편의 염기서열을 분석하였다. 분석된 RBP mRNA 서열로부터 아미노산 서열을 추정하여 다른 종의 RBP 아미노산 서열과 비교한 결과 *Sparus aurata*와는 80%, 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)와는 72%, 유럽 뱀장어(*Anguilla anguilla*)와는 78%의 높은 상동성을 보였다. 조피볼락에서 4-NP에 대한 RBP와 VTG mRNAs 발현에 미치는 영향을 northern blot 분석 방법에 의해 조사하였다. 4-NP를 10 mg/kg BW로 주사한 실험구에서는 암수 모두 VTG mRNA 발현에 영향을 주지 않았으나, RBP mRNA 발현은 수컷에서 48시간 후에 감소하였다. 4-NP를 25 mg/kg BW으로 주사한 실험구에서는 24시간 후에 암수 모두 VTG mRNA 발현이 증가하였으며, RBP mRNA 발현은 48시간 후에 암수 모두 감소하였다. 이들 결과로부터 조피볼락에서는 4-NP 등의 에스트로겐 유사물질이 RBP와 VTG 유전자 발현에 상반되는 효과를 유도함을 알 수 있었다.

서론

산업이 발달하면서 사람들이 만들어낸 수많은 화학물질들

은 사용 후 대부분 수계 환경으로 유입되어 강, 호수 그리고 해양에 서식하는 생물에 직·간접적으로 많은 영향을 주고 있다. 연안으로 유출되고 있는 물질들 중에서 alkylphenol-ethoxylates는 비이온성 계면활성제로서 가정용 및 산업용 세제, 라텍스 페인트, 유화제 등의 주요 성분으로서 산업적으로 대단히 많이 사용되고 있으며(Li *et al.*, 2004), 이는 약 60%가 수중환경에 유출되며 하수처리과정을 통해 nonylphe-

* 본 연구는 2004년도 동의대학교 학술연구비 지원에 의해서 이루어졌음.

[†] 교신저자: 부산시 부산진구 가야동 임광로 995번지, 동의대학교 자연과학대학 분자생물학과. (우) 614-714, (전) 051-890-1524, (팩) 051-890-1521, E-mail: chhan@deu.ac.kr

nol(NP)과 octylphenol로 분해되어 안정된 대사물질로서 하구 또는 연안 등에 퇴적된다고 알려져 있다(Jobling *et al.*, 1996). 최근 국내 연안에 서식하는 어류 생체 조직 내에 축적되어 있는 NP의 농도를 조사한 결과 $9.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 검출되었다고 보고하였으며(국립환경연구원, 2001), 공단지역이 밀집된 시화호 주변의 하천 수에서는 최대 $41 \mu\text{g}/\text{L}$ 나 검출되고 있을 뿐만 아니라 서해에서 채취한 퇴적물에서도 육상과 인접한 지역에서는 최고 $41.5 \mu\text{g}/\text{kg-dry weight}$ 로 검출되었다고 보고하고 있다(해양수산부, 2002).

NP는 어류 체내에 들어와 estrogen receptor와 결합하여 estrogen과 유사한 작용을 하여 내분비계에 교란을 일으키는 외인성 내분비계 장애물질로 보고되어 있으며(Arukwe *et al.*, 1997), 수컷의 어류에서도 난황단백전구체(Vitellogenin, VTG)의 생합성을 유도한다는 보고들이 많이 있다(Jobling and Sumpter, 1993; Jobling *et al.*, 1996; 정, 2006). VTG는 일반적으로 난생 척추동물 암컷의 간에서 합성되어지는 일종의 glycolipophosphoprotein이라고 널리 알려져 있다 (Wallace, 1985; Mommsen and Walsh, 1988). 일반적으로 VTG의 합성은 estrogen, 특히 어류에서는 estradiol- 17β (E_2)에 의해 간세포에서 유도되며, 생합성된 VTG는 혈중으로 분비되어 혈류를 따라 수송되어 난 내로 흡수된 후 vitellin과 phosvitins로 분해되어 배 발생이 진행되는 동안에 형태 형성에 중요한 영양물질로 이용된다(Wallace, 1985; Wahli, 1988; Byrne *et al.*, 1989a; Byrne *et al.*, 1989b).

수컷에서는 estrogen이나 NP와 같은 외인성 유사 estrogen 물질에 의해 VTG가 유도되면 정소의 발달을 저하시킨다는 보고가 있으며(Jobling *et al.*, 1996), 과잉으로 유도되면 신장장애를 일으켜 죽는다는 보고도 있다(Nimrod and Benson, 1996). 최근에는 해산 어류, *Sparus aurata*에 E_2 를 처리하여 VTG의 합성을 유도하면 VTG 발현의 증가함에 따라 trans-thyretin(TTR)의 발현과 retinol-binding protein(RBP)의 발현이 떨어진다는 보고도 있다(Funkenstein *et al.*, 2000; Funkenstein *et al.*, 2001).

RBP는 vitamin A인 retinol과 결합하여 표적조직으로 수송하는 중요한 단백질로서 간에서 합성되며 간에서 retinol과 결합한 후 다시 TTR과 결합하여 혈류를 통해 표적조직으로 retinol을 수송한다. 표적조직의 세포로 수송된 retinol은 retinal과 retinoic acid로 전환되어 시각, 배의 발생 및 패턴 형성 등에 관여한다고 알려져 있다(Goodman, 1984; Blomhoff *et al.*, 1990; Bellovino *et al.*, 2003). RBP는 retinol과 결합할 수 있는 하나의 site를 가지며, 결합된 retinol-RBP 복합체는 다시 TTR과 상호 작용하여 1:1의 몰비로 서로 결합

하는데, 이와 같은 retinol-RBP-TTR 복합체는 비교적 작은 retinol-RBP 복합체가 사구체에서 여과되는 것을 막아주는 등 안정성을 증가시켜 준다고 알려져 있다(Funkenstein *et al.*, 1999; Funkenstein *et al.*, 2000).

펄프공장에서 배출되는 alkylphenol류 화합물들이 수컷의 VTG 발현 유도뿐만 아니라 동물의 형태 형성이나 발생에도 영향을 준다는 보고들이 있었으나(Howell *et al.*, 1980; Mun-Kittrick *et al.*, 1991), 지금까지 그 원인이나 기작에 대한 연구는 아직 없었다. 본 연구에서는 유사 estrogen 역할을 하는 내분비계 장애물질로 알려진 alkylphenol류 화합물들이 어류의 RBP의 발현을 저하시킴으로써 개체 발생에 영향을 줄 수 있는 것은 아닌지를 밝히기 위하여 유사 estrogen으로 알려진 4-NP를 조피볼락(*Sebastes schlegelii*)에 투여하여 RBP의 mRNA의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험어와 조직

본 실험에 사용된 조피볼락은 개인 양식장에서 사육중인 미성숙한 것을 입수하여 2개의 양식 수조에서 2주일간 순치 후 사용하였고, 사육조건은 자연광에서 여과 해수를 지속적으로 순환 공급하였다. 실험기간 동안 수온의 변화는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 였으며, 사료는 전혀 공급하지 않았다. 실험용 NP로 4-NP(Aldrich, USA)를 사용하였으며, DMSO(dimethylsulfoxide; Sigma, USA)에 희석하여 어체중(kg)당 10 mg, 25 mg을 암수 구별없이 실험구 별로 30마리씩 복강에 주사하였다.

4-NP를 주사 후 24시간과 48시간 후에 각 실험구로부터 15마리씩 포획하여 암수를 확인하고 간을 절취하여 바로 액체질소에서 냉동한 후 RNA를 추출할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

2. RBP cDNA Cloning

4-NP 처리된 어류로부터 절취한 간 조직에 guanidine thiocyanate(GTC) 액을 첨가 후 마쇄하여 total RNA를 추출하였고(Sambrook *et al.*, 1989), 33,000 rpm에서 16시간 동안 초원심분리기로 RNA층을 분리한 후, mRNA purification kit(Pharmacia)를 사용하여 poly(A)⁺ mRNA를 분리하였다.

cDNA library는 Marathon cDNA Amplification Kit(Clontech)를 사용하여 제작하였다. 정제된 Poly(A)⁺ RNA는 변형된 lock-docking oligo(dT) primer와 AMV 역전사 효소를 이용하여 first strand를 합성하였고, second strand는 *E. coli*

DNA polymerase I, RNase H, *E. coli* DNA ligase가 포함된 cocktail을 이용하여 합성하였다. ds cDNA는 Marathon cDNA adaptor와 T₄ DNA polymerase를 이용하여 blunt 말단을 만들고, PCR로 adaptor-ligated double strand cDNA(ds cDNA) library를 증폭시켰다.

Adaptor-ligated ds cDNA library는 Table 1에 나타낸 adaptor primer와 RBP gene specific primer(GSP)를 이용하여 3'-RACE PCR을 하였다. GSP는 이미 밝혀진 다른 종의 RBP sequence를 비교하여 보존되는 아미노산 서열을 기본으로 설계하였다. PCR 증폭은 Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400(USA)을 사용하여 94°C에서 5초, 55°C에서 30초, 68°C에서 2분, 32cycle 조건에서 증폭하였다.

3'-Race PCR로 증폭된 DNA는 전기영동으로 확인한 후 gel purification kit (NucleoGen)를 이용하여 gel로부터 추출한 뒤, TOPO TA cloning kit(Invitrogen)을 사용하여 pCR2.1-TOPO vector와 salt solution을 첨가하여 37°C에서 5~10분간 ligation시켰다.

Ligation된 DNA(약 0.5~1.0 µg)와 competent cell(DH5 α, 약 100 µL)을 혼합하여 얼음에서 30분간 방치한 다음 42°C에서 45초간 heat shock 처리하였다. Heat shock 후 얼음에 2분간 두고, SOC 500 µL 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 정지 배양한 후 50 µg/mL의 ampicillin과 0.1 µM IPTG, 40 µg/mL의 X-Gal이 포함된 LB agar 배지에 도말하여 37°C에서 18시간 배양함으로써 흰색 colony의 형질전환 균주를 선별하였다. 형질전환된 흰색 colony를 선택하여 50 µg/mL의 ampicillin이 첨가된 LB 배지 5 mL에서 16시간 배양하였다. 배양된 plasmid DNA는 AccuPrep™ Plasmid extraction kit (Bioneer)를 이용하여 추출하였고, 추출된 plasmid는 EcoRI으로 처리 후 agarose gel 전기영동으로 vector에 삽입여부와 DNA의 크기를 확인하였다.

3. 전기영동 및 염기서열분석

DNA의 분리 및 확인은 Southern(1979)의 방법에 따라 agarose gel 전기영동으로 하였다.

Table 1. Primer sequences for PCR

Primer	서 열
Adaptor primer	5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
RBP forward I	5'-AGAGTCATCATCCTGAACAACTGGGA-3'
forward II	5'-TTCAGCACTCTGCAGGAGTAGTGGAT-3'
RBP reverse I	5'-ACCCTGCCAAGTTCAGGATGAG-3'
reverse II	5'-GGCGTAGTTGACATAGTCGGTGT-3'

염기서열은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Perkin-Elmer)을 사용하여 분석하였다. 염기와 아미노산 서열분석은 GENETYX 6.0 software program을 사용하였다.

4. Northern Blotting 분석

VTG와 RBP mRNA의 발현을 조사하기 위하여 ISOGEN mRNA purification kit(Wako, Japan)를 이용하여 각 개체의 간 시료로부터 total RNA를 추출하였다. RNA는 0.9% formaldehyde agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, Hybond N⁺(Amersham, UK)에 전이시켰다. 전이된 RNA는 hybridization solution(5×SSC, 50% formamide, 5×Denhalt's solution, 0.1% SDS, 10% blocking reagent)에서 3시간 동안 42°C에서 pre-hybridization시켰다.

RBP mRNA의 특이적 반응을 위한 probe는 조피블락 서열 중 RBP 312 bp의 특이적 DNA 단편을 정하여 추출하여 사용하였고, VTG mRNA의 특이적 반응을 위한 probe와 β-actin의 probe는 Jung *et al.*(2006)에 의해 보고된 단편을 정하여 Random primer DNA labeling kit(Takara)를 사용하여 제작하였다. 제작된 probe는 사용 전까지 -20°C에 보관하였다. Hybridization은 50% formamide, 5×SSC, 5×Denhalt's solution, 0.1% SDS, 10% blocking reagent 그리고 방사선으로 표지된 probe가 들어있는 용액에서 16시간 동안 42°C에서 시켰다.

Hybridize된 막은 1×SSC와 0.5% SDS가 함유된 용액과 2×SSC와 0.5% SDS가 함유된 용액에서 15분간 세정한 후, IP(image plate)에 12시간동안 노출시킨 후에 BAS 2000 Bio-Image Analyzer(Fujix, Japan)로 측정하였다.

5. 통계처리

자료의 통계처리는 SPSS통계 프로그램에 의해 하였다. 각 실험군의 데이터는 평균±SE로 나타내었으며, 일원분류 분산분석과 Duncan's 다중비교에 의해 유의성을 조사하였다.

결 과

1. 조피블락 RBP cDNA Cloning

조피블락 간에서 mRNA를 추출하여 역전사 효소를 이용해 만들어진 adaptor-ligated double-strand cDNA library로부터 NCBI data bank의 자료를 이용하여 만들어진 RBP에 대한 GSP I을 사용하여 PCR로 증폭하여 약 200 bp의 DNA 단편을 회수하여 cloning한 후 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열로부터 RBP GSP II를 제작하고, 이 primer와

TCGAGCGGCGCGCGGCGAGGTGTGAGCTCTCCCACTTTGTTTTTCAGAATGCTGCGGTAC	60
S S G R P G R C E L S H F V F R M L R Y	
GTTGTGGCCCTGTCTCCTGGCTTTGGCTGGGCGCAGGACTGGCAGGTGGCCAAATC	120
V V A L C L L A L A W A Q D C Q V A N I	
CAGGTCATGCAGAACTTGCACAAGACAAGTATGCCGGGTATGGTACGCCGTAGCAAAG	180
Q V M Q N F D K T K Y A G V W Y A V A K	
AAGGACCCAGAGGTTTGTTCITTAATGACAACGTCGTGGCCAAAGTTTACTATCGTAGAG	240
K D P E G L F L I D N V V A K F T I V E	
GAGGCAAAATGACGGCAACAGCTAAGGCGAGGTTATCATCTCAACAATGGGAAATG	300
D G K M T A T A K G R V I I L N N W E M	
TGGCGGCACATGTTGGCCACCTTCGAGGAAAGTGTGACCGTGCCAAGTTCCAGGACGAGG	360
C A D M L A T F E E T A D P A K F R T R	
TACTGGGAGCTGCCGCTTACCTGCAGACTGGAAACGATGAACACTGGGTTATTGACACC	420
Y W G A A A Y L Q T G N D E H W V I D T	
GACTATGTCAACTAGCC	
D Y V N Y A	

Fig. 1. Nucleotide sequence of partial RBP cDNA and deduced amino acid sequence of a rockfish, *S. schlegeli*. Nucleotide residues are numbered on the right. Species-specific primer alignments represent as underlined bold letters.

adaptor primer를 이용하여 PCR로 증폭하여 얻은 단편을 회수하였다. 이 DNA 단편을 같은 방법으로 다시 염기서열을 분석하여 RBP의 단편에 대한 염기서열을 Fig. 1에 나타내었다. 분석된 염기서열은 416 bp이었으며, 추정되는 아미노산서열을 genbank database에서 다른 어류 종들의 RBP 유전자와 유사성을 비교하여 Fig. 2에 나타내었다. BLAST program을 이용하여 상동성을 비교 검토한 결과, 조피볼락의 RBP는 *Sparus aurata*와 80%, 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 72%, 그리고 유럽 뱀장어(*Anguilla anguilla*)와 78%의 높은 상동성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 cloning한 유전자는 각각 조피볼락의 RBP의 cDNA임이 확인할 수 있었다.

2. Northern Blot

지금까지 밝혀진 다른 난생어류의 RBP mRNA의 공통적인 염기서열과 본 연구에서 밝힌 조피볼락의 RBP mRNA 서열을 토대로 하여 northern blot용 probe를 Fig. 1에 표시한 종 특이 primer서열을 설정하여 제작하였다. VTG 유전자의 발현상태를 확인하기 위한 VTG probe와 대조 유전자로 사용한 β -actin probe의 서열은 Fig. 3에 나타내었다.

4-NP를 투여한 각 실험구에서 VTG와 RBP mRNA의 발현을 조사하기 위해 northern blot을 실시하여 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 4-NP를 10 mg/kg을 주사한 암컷에서 VTG mRNA 발현은 주사 후 24시간까지는 거의 나타나지 않아 변화가 거의 없었고, 48시간 후에는 4개체 중 한 개체에서

VTG	
ACGGTGAATCAGACAGGAGTTGAGCAGACCCAGGAACGCGTGAACGAAGAAGCCATCA	60
GCTACGCTCATTGCTGGGTTCTGCCTGGAAAGAGCTGCCGTGATGCCTCTGAGTGTACA	120
TGAAGCTTGAATGTGTGAAGCTGGAGAAGCAGGTGATCCTCCAGGGCATGAGTCCAAGT	180
GCTACTCTGTTGAGCCGCTGCTGCGCTGCCTGCCCGGCTGCTGCCATTGAGG	240
β -actin	
GCTGACCTGAAGTACCCATCGAGCAAGGTTATGTTACCAACTGGGATGACATGGAGAA	60
GATGTGGCATGACACCTTCTAGAACGAGCTGAGAGTTGCCCTGAGGAGCACCGCTGCT	120
GCTCAGACAGGGCCCGCTGAACCCCAAAGCAACAGGGAAGATGACCGAGATCATGTT	180
CGAGACCTTCAACACCCCGGCTGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCGTGATGC	240
CTCTGGTGTACCACTGGTATGTGATGGACTCCGGTGTGGTGTGACCCACACAGTGCC	300
CATCTATGAAGGCTATGCTCTGCCCAAGCCATCCTGCGTCTGACTGGCGGCGCTGA	360
CCTCAGACACTCCTCATGAAGATCCTGACAGGGCGTGGCTACTCCTTCACTACCACAGC	420
TGAGAGGGAATCGTGCCTGACATCAAGGAGAAGGTGTGCTACGCCCGGCTGGACTTGA	480
CGCAGAGATGGGCATG	500

Fig. 3. cDNA sequence used for northern blot hybridization analysis of a rockfish VTG(AY166591) and β -actin (AY166590) mRNAs.

SA	1	-----MTR	47
OM	1	-----MTR	44
AA	1	-----MTR	28
SS	1	SSGRPRGRCELSHFVFR	60
SA	48	LDV	107
OM	45	LDV	104
AA	29	LDV	88
SS	61	LDV	120
SA	106	LDV	167
OM	105	LDV	164
AA	89	LDV	148
SS	121	LDV	146
SA	166	LDV	195
OM	165	LDV	192
AA	149	LDV	176
SS	146	LDV	146

Fig. 2. Alignment of the putative amino acid sequence of a rockfish RBP with other teleosts RBPs. SA: *Sparus aurata*(GB:AAF79021), OM: *Oncorhynchus mykiss*(GB: AAL14872), AA: *Anguilla anguilla*(AAQ10892), SS: rockfish(*Sebastes schlegeli*). Sequence gaps are represented as dashes.

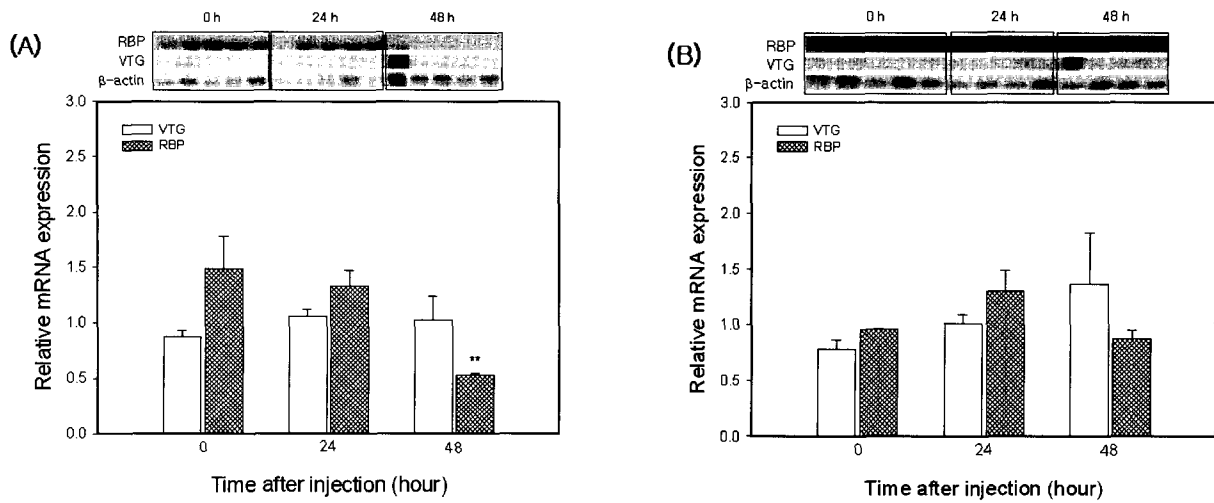


Fig. 4. VTG and RBP mRNAs expression in female(A) and male(B) rockfish *S. schlegeli* injected with NP(10 mg/kg BW), based on Northern blot analysis(upper) of total RNA of the liver from individual fish. Relative VTG and RBP mRNA levels were normalized with β -actin(** $p < 0.01$).

VTG 발현이 보였지만 전체적으로 유의한 변화는 보이지 않았다. RBP의 mRNA 발현에서는 24시간까지는 발현의 변화가 보이지 않았으나 48시간 후에는 유의하게 감소하는 현상을 보였다. 수컷에서도 VTG의 발현은 암컷과 유사한 결과를 보였으며, RBP에서는 48시간 후에 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의한 변화는 없었다.

4-NP 25 mg/kg을 주사했을 때에는 Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 암컷에서는 주사한지 24시간 후부터 대부분의 개체들이 VTG mRNA 발현이 나타나기 시작하여 유의한 변화를 볼 수 있었으며, 48시간 후에도 mRNA 발현이 지속되었다. RBP mRNA 발현은 24시간 후까지는 변화가 없었으나 48시

간 후에 유의하게 감소하는 현상을 볼 수 있었다. 수컷에서도 VTG mRNA 발현은 24시간 후부터 대부분의 개체들에서 나타나 유의한 변화를 볼 수 있었으며, 48시간 후에도 mRNA 발현이 지속되었다. RBP mRNA 발현은 24시간 후까지는 변화가 거의 없었으나 48시간 후에 유의하게 감소하는 현상을 볼 수 있었다.

고찰

본 연구에서는 내분비계 장애물질로 알려진 4-NP에 대한 VTG와 RBP 발현에 대한 상관관계를 밝혀 RBP를 내분비계

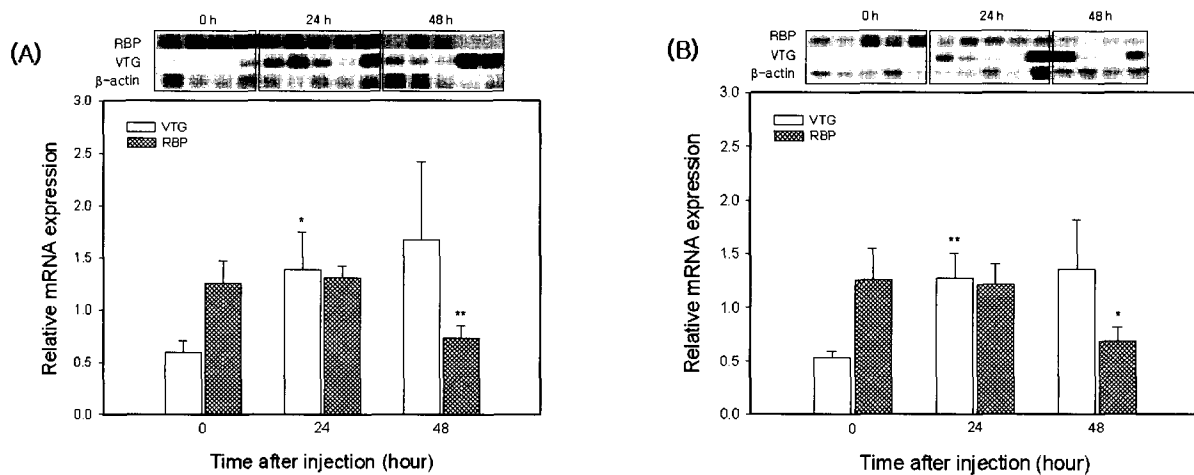


Fig. 5. VTG and RBP mRNAs expression in female(A) and male(B) rockfish *S. schlegeli* injected with NP(25 mg/kg BW), based on Northern blot analysis(upper) of total RNA of the liver from individual fish. Relative VTG and RBP mRNA levels were normalized with β -actin mRNA(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

장애물질에 대한 biomarker로 사용하기 위하여 조피볼락에 대상으로 cDNA library를 구축하고 RBP의 부분적인 염기 서열을 밝혔다. 조피볼락 RBP의 아미노산 서열을 다른 어류들과 비교 분석한 결과, 조피볼락의 RBP는 *Sparus aurata*와 80%(GB:AAF79021), 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 72%(GB:AAL14872), 그리고 유럽 뱀장어(*Anguilla anguilla*)와 78%(AAQ10892)의 매우 높은 상동성을 나타내었다. 일반적으로 어류는 포유류와 닭의 RBP와 동일하게 하나의 retinol 결합부위를 가지고 있다는 점과 높은 tryptophan의 함량 등이 유사한 점으로 알려져 있으나, 아미노산 성분에 있어서는 미량의 phenylalanine과 valine 함량, 다량의 isoleucine 등이 차이점으로 보고되고 있다(Berni *et al.*, 1992). 이는 어류에서 합성된 RBP가 다른 종과 비교하여 구조적 차이를 나타내고 있음을 보여주는 결과이며 따라서 내분비 장애물질 등에 노출된 어류의 RBP에 대한 구조적 생리적 기능에 대하여 보다 체계적인 연구가 필요하다고 할 수 있다.

Jung *et al.*(2006)에 의해 밝힌 조피볼락 VTG 염기서열(AT166591)과 β -actin(AY1665790)로부터 제작된 probe와 본 연구에서 밝힌 RBP의 서열로부터 제작된 RBP probe를 이용하여 4-NP에 대한 조피볼락의 VTG와 RBP의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 4-NP을 10 mg/kg 투여한 실험구에서는 암컷, 수컷 모두에서 VTG mRNA 발현을 검출할 수 없었으나, RBP mRNA는 암컷에서 48시간 후에 유의한 감소 현상을 볼 수 있었다. 그리고 4-NP을 25 mg/kg 투여한 실험구에서는 VTG mRNA 발현은 암수 모두 24시간째부터 증가하였고, RBP mRNA는 48시간 후에 유의하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 4-NP가 VTG mRNA의 발현을 유도하는 효과를 보였지만 그와 반대로 RBP의 mRNA 발현을 일시적으로 저해하는 효과를 갖고 있다고 할 수 있다.

NP는 다양한 어종에서 유전자와 단백질 수준에서의 VTG 발현을 비정상적으로 유도한다고 보고하고 있다(Jung *et al.*, 2006; Giesy *et al.*, 2000, Arukwe *et al.*, 1997). 일반적으로 어류의 VTG는 생물체내의 혈중 E₂의 증가로 인해 유도되는 것으로 알려져 있어, 해양환경으로부터 흡수된 NP와 E₂ 수용체 간의 결합률에 대한 *in vitro* 연구들이 선행되어 왔다(White *et al.*, 1994; Tremblay *et al.*, 1998; Villeneuve *et al.*, 1998). 무지개 송어의 간세포를 배양하며 NP의 VTG의 유전자 발현 유도를 조사한 결과, E₂와 비교하여 10⁴~10⁵배정도 VTG mRNA의 발현 유도율은 낮았으나, NP가 VTG의 수용체와 직접 결합하여 발현을 유도하는 효과를 가지고

있다고 보고하고 있다(Jobling and Sumpster, 1993; Kloas *et al.*, 1999; Smeets *et al.*, 1999). 이와는 대조적으로 다른 *in vivo* 실험의 결과들에서는 NP가 혈중 VTG를 유도함과 동시에 혈중 E₂의 농도도 상승시키므로 간접적인 작용으로 VTG가 유도된다고 보고하였거나(Giesy *et al.*, 2000, Arukwe *et al.*, 1997), NP 노출로 혈중 VTG가 증가한 대서양 연어의 경우 혈중 E₂의 농도가 오히려 24~43% 정도 감소되었다고 보고하고 있는 등, 지금까지 NP에 대한 작용기작에 대한 영향은 명확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 본 연구의 결과에서는 미성숙한 실험어를 사용하여 혈중 성 호르몬의 영향을 조사할 수 없었으나, Jung *et al.*(2006)의 NP 노출농도가 유사한 점등을 고려해 볼 때 유도된 VTG는 노출된 NP의 직접적인 작용에 의해 유도된 것으로 추측된다.

어류의 RBP는 다양한 조직에서 검출되었고 특히, 간조직에서는 높은 발현이 보고되었으나, 뇌, 생식소, 장 등 다른 조직에서는 발현이 매우 낮게 일어난다고 알려져 있다(Funkenstein, 2001). 무지개 송어에 E₂를 투여한 후 혈중 VTG와 간조직 내 RBP 발현을 조사한 결과 혈중 VTG는 유의하게 증가된 반면, RBP는 감소하는 경향을 보였다(Sammar *et al.*, 2001). 또한 수탉에 에스트로젠을 투여하였을 때 혈중 VTG 수준과 간에서 VTG mRNA의 발현이 증가하지만 혈중 RBP의 증가는 보이지 않았으며, 간에서 RBP mRNA의 발현을 저하시키는 효과를 나타냈다고 밝히고 있다(Vieira *et al.*, 1995a, b). 그러나 개구리 *Xenopus sp.*에서는 estrogen 투여에 의해 간 RBP 유전자 발현이 증가하였으며(McKearin *et al.*, 1987), 쥐에서는 신장에서 RBP 유전자 발현의 증가는 나타났으나 간 조직에서는 아무런 변화가 없었다고 보고하고 있어(Whitman *et al.*, 1990), RBP의 발현과 estrogen의 영향을 보다 명확히 밝히기 위해서는, 척추동물의 중간, 조직 간의 RBP mRNA 발현에 대한 비교 연구가 필요한 것으로 생각된다.

앞으로 본 연구에서의 RBP와 VTG mRNA 발현과 E₂의 수용체의 유전자 발현을 함께 연구한다면 보다 정확한 유사 에스트로젠 효과를 밝힐 수 있을 것이라 생각되어진다. 또한 본 실험에서 구축된 library를 이용하여 *In vivo*에서 다양한 물질에 노출되었을 때 수용체 유전자의 서열 등을 이용하여 유전자 발현 양상을 함께 연구한다면 보다 명확한 자성 호르몬적인 효과를 연구하는 데 중요한 기초적 자료가 될 것이다.

인용문헌

Arukwe A, Knudsen FR, Goksoyr (1997) A Fish zona ra-

- diata(eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 105(4): 418-422.
- Bellovino D, Apreda M, Gragnoli S, Massimi M, Gaetani S (2003) Vitamin A transport: *in vitro* models for the study of RBP secretion. *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 24(6):411-420.
- Berni R, Stopini M, Zapponi MC (1992) The piscine plasma retinol-binding protein: purification, partial amino sequence and interaction with mammalian transthyretin of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) retinol-binding protein. *Eur J Biochem* 204:99-106.
- Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR (1990) Transport and storage of vitamin A. *Science* 250:399-404.
- Byrne BM, De Jong, H, Fouchier RAM, Williams DL, Gruber M (1989a) Rudimentary phosvitin domain in a minor chicken vitellogenin gene. *Biochemistry* 28:572-2577.
- Byrne BM, Gruber M, Ab G (1989b) The evolution of egg yolk proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 53:33-69.
- Funkenstein B, Perrot V, Brown CL (1999) Cloning of putative piscine(*Sparus aurata*) transthyretin: developmental expression and tissue distribution. *Mol Cell Endocrinol* 157:67-73.
- Funkenstein B, Bowman CJ, Denslow ND, Cardinali M, Carnevali O (2000) Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. *Mol Cell Endocrinol* 167: 33-41.
- Funkenstein B (2001) Developmental expression, tissue distribution and hormonal regulation of fish(*Sparus aurata*) serumretinol-binding protein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*:613-622.
- Giesy JP, Pierens, SL, Snder EM, Miles-Richardson SM, Kramer VJ, Synder SA, Nichols KM, Villeneuve DL (2000) Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows(*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 19:368-1377.
- Goodman DS (1984) Plasma retinol-binding protein. In: Sporn MB, Roberts, AB Goodman DS.(Eds.), *Retinoids*. vol. 2. Academic Press, New York, pp 42-88.
- Howell WM, Black DA, Bortone SA (1980) Abnormal expression of secondary sex characteristics in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia* 4: 676-681.
- Jobling S, Sumpter JP (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: and *in vitro* study using rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15:194-202.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Mattiessen P, Sumpter JP (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15:194-202.
- Jung JH, Shim WJ, Addison RF, Baek JM, Han CH (2006) Protein and gene expression of VTG in response to 4-nonylphenol in rockfish(*Sebastes schlegelii*). *Comp Biochem Physiol Part C* 143:162-170.
- Kloas W, Lutz I, Einspanier R (1999) Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci Total Environ* 225:59-68.
- Li Z, Li D, Oh JR, Je JG (2004) Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Shihwa Lake, Korea. *Chemosphere* 56:611-618.
- McKearin DM, Barton MC, Keller MJ, Shapiro DJ (1987) Estrogen induces transcription of the *Xenopus laevis* serum retinol-binding protein gene. *J Biol Chem* 262: 4939-4942.
- Mommsen TP, Walsh PJ (1988) Vitellogenesis and oocyte assembly. *Fish Physiology XIA*: 347-406.
- Munkittrick KR, Portt CR, Van Der Kraak GJ, Smith IR, Rokosh DA (1991) Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MHO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1371-1380.
- Nimrod AC, Benson WH (1996) Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol* 26: 335-364.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual," 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sammar M, Babin PJ, Durliat M, Meiri I, Zchori I, Elizur A, Lubzens E (2001) Retinol binding protein in rainbow trout: molecular properties and mRNA expression in tissues. *Gen Com Endocriol* 123:51-61.
- Smeets JMW, van Holsteijn I, Giesy JP, Seinen W van den Berg M (1999) Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol Sci* 50:206-213.
- Southern E (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Method in Enzymol* 68-153.
- Tremblay L, van der Kraak G (1998) Use of a series of homologous *in vitro* and *in vivo* assays to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 43:149-162.
- Vieira AV, Kuchler K, Schneider WJ (1995a) Retinol in avian oogenesis: Molecular properties of the carrier protein. *DNA Cell Biol* 14:403-410.
- Vieira AV, Sanders EJ, Schneider WJ (1995b) Transport of serum transthyretin into chicken oocytes: A receptor-mediated mechanism. *J Biol Chem* 270:2952-2956.
- Villeneuve DL, Blankenship AL, Giesy JP (1998) Interactions between environmental xenobiotics and estrogen receptor-mediated responses. In: Denison, M. S., Helferich, W. G. (Eds.), *Toxicant Receptor Interactions*. Taylor & Francis, Philadelphia, PA, USA, pp 69-99.
- Wahli W (1988) Evolution an expression of vitellogenin genes. *Trends Genet* 4:227-232.
- Wallace RA. (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. *Development Biology* 1:127-177.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker, MG (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135:175-182.
- Whitman MM, Harnish DC, Soprano KJ, Soprano DR (1990) Retinol-binding protein mRNA is induced by estrogen in the kidney but not in the liver. *J Lipid Res* 31:1483-1490.
- 국립환경연구원 (2001) 내분비계 장애물질 잔류실태조사.
- 해양수산부 (2002) 전국연안의 지속성 유기오염물질 오염실태 조사보고서.