

Estradiol-17 β 와 Nonylphenol이 등근성게(*Strongylocentrotus nudus*) 초기 배발생과 Estrogen Receptor-related Receptor β Like 1 mRNA 발현에 미치는 영향

정유정 · 맹세정 · 손영창[†]
강릉대학교 대학원 해양생명공학과

Effects of Estradiol-17 β and Nonylphenol on mRNA Expression of Estrogen Receptor-related Receptor β Like 1 and Early Embryogenesis in Sea Urchin, *Strongylocentrotus nudus*

Yujung Jung, Sejoeng Maeng and Young Chang Sohn[†]

Dept. of Marine Bioscience and Technology, Gangneung National University Graduate School, Gangneung 210-702, Korea

ABSTRACT : The estrogens and estrogenic endocrine disrupting chemicals(EDCs) function through a steroid nuclear receptor-mediated process and subsequently regulate the transcription of mRNA for a number of target proteins. The estrogen receptor-related receptors(ERRs), which are structurally similar to estrogen receptors, are members of orphan nuclear receptor in the nuclear receptor superfamily and their functions are known to be involved in the formation of extra-embryonic ectoderm. To investigate effects of EDCs on early embryogenesis and ERR gene expression in marine invertebrates, we examined morphological changes and the mRNA expression of ERR β like 1 in sea urchin *Strongylocentrotus nudus* exposed to estradiol-17 β (E₂) or nonylphenol(NP). The E₂ and NP-exposed embryos showed a delayed development compared to control embryos. Furthermore, they showed abnormal embryonic developments at late stages, i.e., blastular, gastrula and plutei stages. The mRNA level of ERR β like 1 at the gastrula stage was significantly lower in E₂ and NP-exposed embryos than those of control group. These results suggest that NP and E₂ are potent chemicals causing abnormal embryonic development of *S. nudus* through at least in part down-regulated ERR β like 1.

Key words : Sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*, Embryogenesis, ERR β like 1, Estrogen, Nonylphenol.

요 약 : Estrogen과 estrogenic endocrine disrupting chemicals(EDCs)는 주로 스테로이드 수용체와 작용하여 다양한 표적 단백질 유전자의 전사를 조절한다. 구조적으로 estrogen 수용체와 유사한 estrogen 수용체형 수용체(estrogen receptor-related receptor, ERR)는 포유동물에서 배발생 후기에 외배엽 형성과 관련되어 있다고 알려진 고아핵수용체(orphan nuclear receptor)이다. 본 연구에서는 해양무척추동물인 등근성게(*Strongylocentrotus nudus*)의 발생배를 재료로 estradiol-17 β (E₂) 과 EDCs의 일종인 nonylphenol(NP)이 발생과정의 형태학적 변화와 ERR β like 1의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다. E₂와 NP가 처리된 발생배는 발생속도가 지연되었으며, 초기 유생기에 가까운 후기배의 비정상적인 발달형태가 관찰되었다. 수정란부터 초기 유생기까지 측정된 결과, 이들 화학물질에 의해 ERR β like 1 mRNA는 포배기에 급격히 감소하는 패턴을 보였다. 이상의 결과는 등근성게의 초기 배가 E₂와 NP에 의해 비정상적으로 발생되며, ERR β like 1의 감소가 이 비정상적 배발생과 관련되어 있음을 시사한다.

서 론

[†] Correspondence: Dept. of Marine Bioscience and Technology, Gangneung National University Graduate School, Gangneung 210-702, Korea, Tel/Fax: +82-33-640-2348, E-mail: ycsohn@kangnung.ac.kr

연체동물, 갑각류, 극피동물을 포함하는 다양한 해양 무척추 동물들의 발생 과정은 estrogen과 endocrine disrupting com-

pounds(EDCs)에 의해 많은 영향을 받고 있다고 알려져 있다 (Hutchinson, 2002; Segner et al., 2003; Roepke et al., 2005). 고등척추동물 및 어류에서는 EDCs가 체내의 호르몬들과 유사한 작용을 하기도 하지만, 주로 내분비 및 신경내분비 시스템의 일반적인 호르몬 활성을 억제시킬 수 있다. 그 예로서, 이런 화학물질들 중 몇 종은 estrogen과 같은 활성을 가지며, 생식소의 여성화를 유도시킬 수 있으며, 생식기능을 억제할 수 있다(Raloff, 1994; Jobling et al., 2003). 포유동물 및 경골어류에서는 estrogenic EDCs가 우선적으로 스테로이드 호르몬 수용체와 높은 친화성을 가지고 결합할 수 있으며, 그 결과로 인해 많은 종류의 단백질 유전자들의 mRNA 합성을 유도한다. 특히, nonylphenol(NP)과 같은 estrogenic EDCs는 estrogen receptors(ERs)에 결합하여 vitellogenin(VTG) 단백질과 eggshell 단백질의 합성을 유도한다고 알려져 있다 (White et al., 1994; Arukwe et al., 1997; Madsen et al., 1997; Yadetie et al., 1999; Maeng et al., 2005).

Estrogen 수용체형 수용체(estrogen receptor-related receptor, ERR)는 아직 native ligand가 밝혀지지 않은 orphan nuclear receptor로서 nuclear receptor superfamily에 속한다 (Giguere et al., 1988). ERR은 ER과 구조가 유사하며, ER 표적 유전자의 조절 영역 즉, ERRE(ERR-response element) 및 ERE(estrogen response element)에 결합하여 유전자의 전사를 조절한다. 한편, ERR은 배발생 동안에 외배엽 형성 시기에 발현되며, 초기 태반 발달에도 관여한다(Luo et al., 1997; Mitsunaga et al., 2004; Pettersson et al., 1996). ERR의 구조, 기능 및 특징에 대한 연구는 주로 육상 포유동물에서 이루어졌으며, 해양생물에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다(Jung & Sohn, 2007).

성체는 수정과 초기 배발생 과정이 발생생물학적으로 잘 알려져 있기 때문에 발생 시스템을 연구하는데 있어서 매우 유용하게 이용된다. 또한, 독성물질이 발생에 미치는 영향을 조사하는데 있어서 좋은 모델로 평가되어 왔으며, 또한 그에 따른 분자 생리학적 지식이 축적되어 있다(Cameron et al., 2000)

본 연구에서는 우리나라 동해안에 주로 서식하는 둥근성게(*Strongylocentrotus nudus*)를 재료로 하여 estrogen 및 이와 유사한 기능을 나타내는 EDCs 중 하나인 NP가 둥근성게의 초기 배발생 과정에 미치는 영향과 둥근성게의 ERR의 일종인 ERR β like 1 mRNA 발현과의 상관관계를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 성체 수정란 발생과정 관찰 및 호르몬 처리

2006년 8월 산란시기의 둥근성게(n=50)를 주문진읍 사천연안에서 채취하였으며, 1 mM KCl(0.5~1 mL)을 주사하여 산란 유도한 후 수정란을 확보하였다. KCl로 방정을 유도하여 채취한 정액으로 수정시킨 알들(80~90% 수정률)의 수정막을 현미경으로 확인한 다음, 약 16°C의 멸균 해수로 세척하여 정액을 제거하였다. 이 후 멸균해수(3 mL)가 수용된 6-well plate에 수정란을 약 100개체 전후로 무작위적으로 분주하고, 최대 10^{-6} M의 농도로 estradiol-17 β (E₂) 및 nonylphenol(NP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 처리하여 차광된 16°C의 incubator에서 72시간 동안 발생 과정을 관찰하였다. 각 발생 시기별로 발생배를 회수하여 액체질소에 급속 동결시킨 후 RNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다. 또한, 초기 난할 과정과 발생배들의 형태 변화를 입체현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고, 치사율(운동의 정지)을 조사하였다.

2. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

발생 시기별로 회수된 발생배들은 RNeasy MINI kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 1 μ g 정량한 후 QuantiTect Reverse Transcription kit(QIAGEN)를 사용하여 제조사의 지시서에 따라 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다.

3. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) 분석

호르몬 처리된 성체의 배발생 시기별 ERR β like 1 유전자의 발현 변화는 qPCR 방법으로 확인하였다. qPCR에 사용한 올리고 프라이머들은 *S. purpuratus*의 염기서열을 바탕으로 Primer Express v3.0 software(Applied Biosystems, Boston, MA, USA)을 이용하여 제작하였다(Table 1; Jung & Sohn, 2007). 이들 올리고 프라이머에 의해 생성된 PCR 산물로 염기서열을 확인하였으며, *S. purpuratus*의 ortholog로 확인되었다(Jung & Sohn, 2007). 둥근성게 발생배들의 total RNA로부터 합성한 cDNA(0.3 μ g), Power SYBR Green 1 PCR Master Mix(10 μ l)(Applied Biosystems) 및 표적유전자의 올리고 프라이머 세트와 함께 총량 20 μ l 로 PCR

Table 1. Oligo primers used in real-time polymerase chain reaction

Target	Direction	Accession number	Sequence(5'-3')
sn ERR β like 1	F	XM789882	ACAAGACTACGATGATCCAAATGC
sn ERR β like 1	R	XM789882	CGTCGGCTAGCTTGTCCAA
Ubiquitin	F	M61772	TCATCTCGTTCTCAGGATTTCGT
Ubiquitin	R	M61772	CGAAGATGAGACGCTGCTGAT

F=forward; R=reverse.

system(ABI 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems)을 이용하여 반응을 진행시켰다. PCR 프로토콜은 지시서에 따라, 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후, two-step PCR방법으로 실시하였다. 그리고 denaturing step(95°C, 15초), annealing 및 extension step(60°C, 1분)의 조건으로 총 40 cycle을 수행하였다.

4. 통계처리

실험결과로부터 얻어진 자료 값 사이의 유의성 검정은 SPSS 통계 패키지(V. 12)에 의한 ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다($P < 0.05$).

결 과

1. 호르몬에 의한 발생배들의 형태적 변화

호르몬이 처리되지 않은 대조군 둥근성게의 수정란들은 2세포기부터 정상적인 분열이 관찰되었고, 포배기(수정 후 약 10시간)를 지나 낭배기(수정 후 약 46시간)에 원장 함입이 일어났으며, 72시간째에 성게 초기 유생의 전형적인 외부 형태인 anterolateral(postoral) arm이 입 주위에 형성되었다(Fig. 1). 하지만, 호르몬이 첨가된 해수에서 발생이 진행된 수정란들은 난할 이후 발생 후기로 진행될수록 비정상적으로 발달하였다(Fig. 2). 고농도의 E₂(10⁻⁶ M)를 처리한 발생배들은 원장 함입 이전까지는 발생이 정상적으로 진행되었으나, 이후 초기 유생기까지 발생 속도가 현저히 지연되었고, postoral arm 형성이 이루어지지 않았다. 한편, E₂ 농도가 증가하고 발생 후기로 진행될수록 치사율이 증가되는 경향을 보였다(Table 2). 이와 같은 현상은 NP가 처리된 발생 개체에서도 관찰되었으며, 낮은 농도(10⁻¹² M)에서도 발생 속도가 지연되고, 초기 유생에서 postoral arm이 불완전하게 형성되

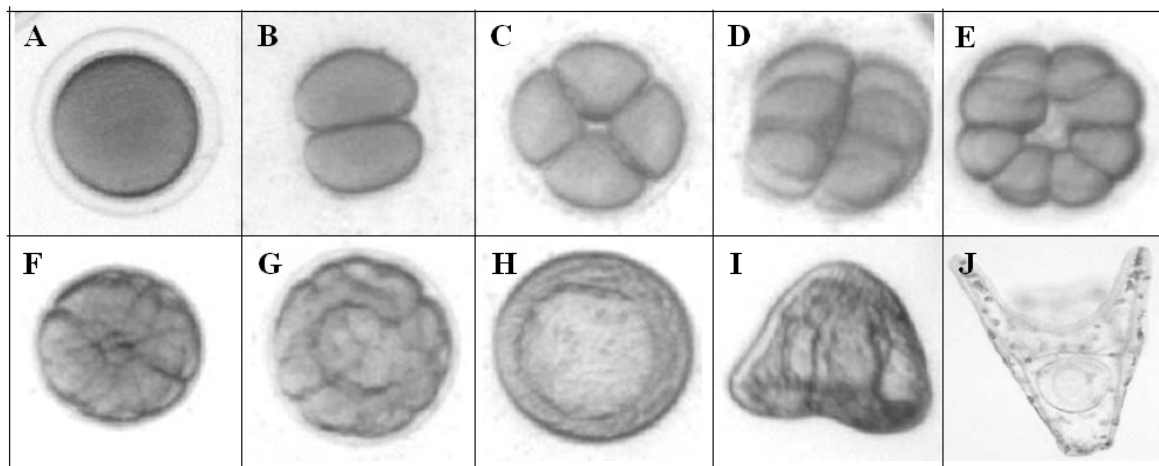


Fig. 1. Representative morphologic changes of developmental embryos in sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. A, Fertilized egg(0.5 h post-fertilization, hpf); B, The 2-cell stage(1hpf); C, The 4-cell stage(2hpf); D, The 8-cell stage(2.5hpf); E, The 16-cell stage(3hpf); F, The 32-cell stage(4hpf); G, The 64-cell stage(5hpf); H, The blastula stage(10hpf); I, The gastrula stage(46hpf); J, The plutei stage(72hpf).

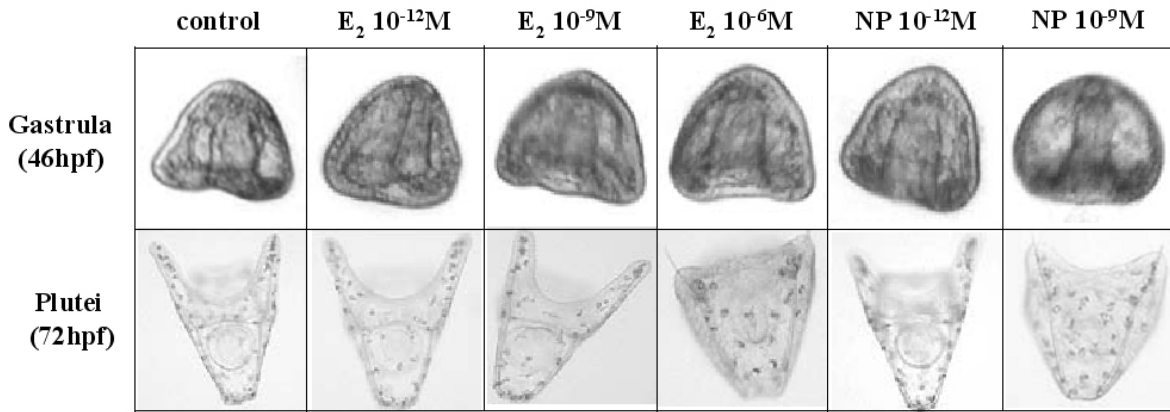


Fig. 2. Representative morphologic changes of *Strongylocentrotus nudus* embryos treated with the indicated doses of estradiol-17β (E₂) or nonylphenol(NP).

Table 2. Percentages of delayed development and embryonic lethality in sea urchin *Strongylocentrotus nudus* treated with estradiol-17β (E₂) or nonylphenol(NP)

	2cell stage	4cell stage	8cell stage	16cell stage	32cell stage	64cell stage	Blastular stage	Gastrula stage	Plutei stage
Control (individual)	-	-	-	-	-	-	-	10% ^{a)} (12/124)	20% ^{b)} (25/124)
E ₂ 10 ⁻¹² M (individual)	-	-	-	-	-	-	-	10% ^{a)} (10/ 95)	34% ^{b)} (32/ 95)
E ₂ 10 ⁻⁹ M (individual)	-	-	-	-	-	-	-	20% ^{a)} (20/101)	50% ^{b)} (50/101)
E ₂ 10 ⁻⁶ M (individual)	-	-	-	-	-	-	30% ^{a)} (27/89)	50% ^{b)} (62/ 89)	97% ^{b)} (86/ 89)
NP 10 ⁻¹² M (individual)	-	-	-	-	-	-	-	25% ^{a)} (27/108)	48% ^{b)} (52/108)
NP 10 ⁻⁹ M (individual)	-	-	-	-	-	-	30% ^{a)} (32/109)	50% ^{b)} (76/109)	95% ^{b)} (103/109)

Superscripts ^{a)} and ^{b)} indicate percentages of delayed development and embryonic lethality, respectively.

며, 치사율이 증가하였다.

2. 호르몬에 의한 ERRβ like 1 mRNA 발현 변화

호르몬이 첨가되지 않은 해수에서 발생이 진행된 대조군 성체의 수정란 발생과정에서 ERRβ like 1의 mRNA level 은 난할 이후 64세포기에 비해 포배기, 낭배기, 초기 유생기에 각각 2.6, 2.7, 2.5배 높았다($P < 0.05$) (Fig. 3).

호르몬을 처리한 실험군 수정란의 발생과정에서도 대조군 ERRβ like 1 mRNA 발현 패턴과 유의한 차이를 보이지 않

았으나($P > 0.05$)(Fig. 3), 포배기의 발생배 시기에는 E₂ 및 NP 처리군에서 감소하는 경향이 나타났다.

고 찰

본 연구에서는 해양무척추동물의 초기 발생과정과 ERR 유전자 발현에 미치는 EDCs의 영향을 규명하기 위하여, 등근성게(*S. nudus*)의 발생배를 재료로 E₂와 EDCs의 일종인 NP가 발생과정에 미치는 외부 형태학적 변화와 이들 화학물

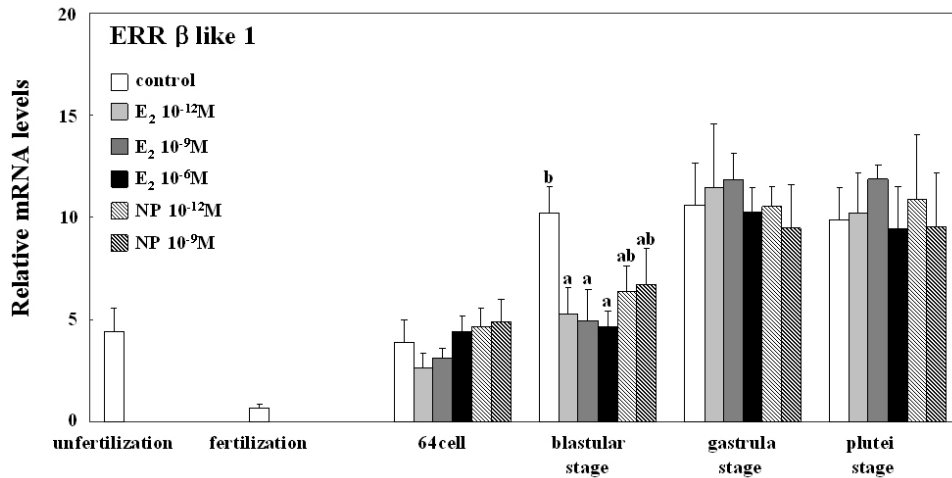


Fig. 3. Expression levels of ERR β like 1 mRNA in the indicated developmental stages of *Strongylocentrotus nudus* embryos treated with the indicated doses of estradiol-17 β (E₂) or nonylphenol (NP). The relative ERR β like 1 mRNA levels were normalized by ubiquitin values. Data were represented by the mean \pm S.E.M (n=3~6 in each group).

에 의한 반응이 전달되는 수용체 분자 ERR β like 1의 mRNA 발현과의 상관관계를 조사하였다. E₂와 NP가 처리된 성체의 발생배는 전체적으로 발생속도가 지연되었으며, 후기배의 비정상적인 발달 형태가 관찰되었으며, ERR β like 1 mRNA가 포배기에 감소하는 패턴을 보였다. 이상의 결과는 해양 무척추동물의 초기 배발생은 estrogen과 EDCs에 감수성이 높으며, ERR β like 1의 일시적인 감소가 부분적으로 이와 관련되어 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서, E₂와 NP로 처리된 등근성체의 발생배들은 성장 및 분화 등 일련의 발달 속도가 현저히 지연되고 치사율이 농도의존적으로 높아지며, 초기 유생기의 외부형태적 특징인 postoral arms의 형성이 정상적으로 이루어지지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 미국 연안에 주로 서식하는 성체 *S. purpuratus*의 유생에서 관찰된 바 있으며(Roepke et al., 2005), E₂와 EDCs로 인하여 형태학적 기형이 유발된 결과와 잘 부합된다. 또한, 성체의 발생배들은 다른 무척추동물보다 estrogens에 민감하며, 성체의 유생은 E₂에 의하여 apoptosis가 활발하게 일어난다(Sato et al., 2006). 따라서 등근성체의 초기 발생과정은 E₂와 NP에 의해 분화중인 세포와 조직의 발달에 영향을 줄 수 있음을 시사하며, 이와 같은 형태적인 변화와 치사율의 증가는 estrogen 및 EDCs의 생물학적 지표로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

Liu et al.(2003)은 포유동물을 대상으로 한 연구 결과에서

ERR의 발현은 estrogen의 자극에 의해 증가되고 기능이 활성화 될 수 있다고 보고하였으며, ERR이 포유동물의 초기 발생과정에서 외배엽 형성시기에 주로 발현된다고 하였다(Luo et al., 1997; Mitsunaga et al., 2004; Pettersson et al., 1996). 또한, 등근성체와 근연종인 *S. purpuratus*의 ERR mRNA 발현은 초기 난할시기에 감소하여 포배기와 낭배기에 증가를 보였다(Howard-Ashby et al., 2006). 이는 본 저자들에 의해 보고된 바와 같이 ERR의 상동체인 ERR β like 1의 mRNA 발현이 포배기 이후의 발생과정 중에 증가하는 것과 일치하였다(Jung & Sohn, 2007). 이와 같은 estrogenic EDCs의 영향과 ERR mRNA 발현 패턴은 성체 유생 발생 과정에 미치는 NP의 영향에 관한 메커니즘을 규명하는데 있어 중요한 자료가 될 수 있다. 실제로, 최근에 estrogenic EDCs가 성체 내에 존재하는 수용체들의 활성을 저하시켜 정상적인 배발생을 억제한다고 보고되었다(Sato et al., 2006). 본 연구에서도 NP 또는 E₂가 처리된 등근성체 유생의 ERR β like 1 mRNA 발현을 조사한 결과, 포배기 시기에 이들 호르몬에 의하여 감소하는 경향이 관찰되었으며, 이는 배발생 시기 중 외배엽 형성 시기에 ERR β like 1이 E₂와 NP의 영향으로 발현이 감소된 것으로 추정된다. 향후 ERR β like 1의 E₂ 및 NP 친화성, 직접적인 성체의 배발생 과정에 관련된 메커니즘의 규명이 필요할 것이라 생각된다.

감사의 글

본 논문은 산업자원부 지역인력양성 프로그램의 지원으로 이루어졌으며, 저자 정유정, 맹세정은 한국학술진흥재단 2단계 BK21 핵심사업팀의 수혜대학원생임을 밝히며, 이에 사의를 표합니다.

인용문헌

- Arukwe A, Knudsen FR, Goksoyr A (1997) Fish zona radiate (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogen. *Environ Health Perspect* 105:418-422.
- Cameron RA, Mahairas G, Rast JP, Martinez P, Biondi TR, Swartzell S, Wallace JC, Poustka AJ, Livingston BT, Wray GA, Etensohn CA, Lehrach H, Britten RJ, Davidson EH, Hood L (2000) A sea urchin genome project: sequence scan, virtual map, and additional resources. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:9514-9518.
- Giguere V, Yang N, Segui P, Evans R (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331:91-94.
- Howard-Ashby M, Materna SC, Brown CT, Tu Q, Oliveri P, Cameron RA, Davidson EH (2006) Gene families encoding transcription factors expressed in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300: 90-107.
- Hutchinson TH (2002) Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Toxicol Lett* 131:75-81.
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol* 65:205-220.
- Jung Y, Sohn YC (2007) Gene expression of Smads and estrogen-receptor-related receptor beta like 1 in sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Dev Reprod* 11:43-47.
- Liu D, Zhang Z, Gladwell W, Teng CT (2003) Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinology* 144:4894-4904.
- Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguere V (1997) Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR- β . *Nature* 388:778-782.
- Madsen SS, Mathiesen AB, Korsgaard B (1997) Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on smoltification and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem* 17:303-312.
- Maeng S, Jung Y, Choi E, Jeon JK, Kim S, Gen K, Sohn YC (2005) Expression of gonadotropin subunit genes following 4-nonylphenol exposure in masu salmon: Effects on transcript levels and promoter activities via estrogen receptor alpha. *Comp Biochem Physiol Part B* 142: 383-390.
- Mitsunaga K, Araki K, Mizusaki J, Morohashi KI, Haruna K, Nakagata N, Giguere V, Yamamura KI, Abe K (2004) Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR-beta results in reduction of germ cell number in mouse embryos. *Mech Dev* 121:237-246.
- Pettersson K, Svensson K, Mattsson R, Carlsson B, Ohlsson R, Berkenstam A (1996) Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 54:211-223.
- Raloff J (1994) The gender benders: are environmental 'hormones' emasculating wildlife?-includes related articles. *Sci News* 145:24-27.
- Roepke TA, Snyder MJ, Cherr GN (2005) Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations. *Aquat Toxicol* 71:155-173.
- Sato Y, Kaneko H, Negishi S, Yazaki I (2006) Larval arm resorption proceeds concomitantly with programmed cell death during metamorphosis of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Cell Tissue Res* 326:851-860.
- Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schafers C, Vandenberg GF, Watts M, Wen-

- zel A (2003) Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol Environ Safety* 54: 302-314.
- White R, Jobling S, Hoar SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) Environmentally persistent alkylphenolics compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135:175-182.
- Yadete F, Arukwe A, Goksoyr A, Male R (1999) Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon *in vivo* by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. *Sci Total Environ* 233:201-210.