

등근성게(*Strongylocentrotus nudus*)의 Smad3와 Estrogen Receptor-related Receptor β like 1 유전자 발현

정 유 정 · 손 영 창[†]

강릉대학교 대학원 해양생명공학과

Gene Expression of Smad3 and Estrogen Receptor-related Receptor β like 1 in Sea Urchin, *Strongylocentrotus nudus*

Yujung Jung and Young Chang Sohn[†]

Department of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University Graduate School, Gangneung 210-702, Korea

ABSTRACT : Smad proteins mediate transforming growth factor(TGF)- β signaling and play a pivotal role in embryonic development. 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 the involvement of Smad3 and ERR β like 1 in reproductive activities and embryogenesis in marine invertebrate, we examined gene expression of Smad3 and ERR β like 1 in *Strongylocentrotus nudus* during their seasonal changes and embryonic development using real-time polymerase chain reaction. The Smad3 mRNA levels in gonad showed an increasing pattern from February to June 2004 but decreased at August(spawning season) followed by an elevation of the levels at October and December 2004. The mRNA levels of the ERR β like 1 significantly elevated during the spawning season. During embryonic development, Smad3 mRNA levels at 8~16 cell stages were significantly higher than those of other stages, whereas the mRNA of the ERR β like 1 was significantly high levels at late development stages, i.e., blastular, gastrula and plutei stages. These results suggest that the Smad3 could be involved at least in part in the early cleavage stages and the ERR β like 1 may play an important role in the spawning season and late developmental stage in the sea urchin.

Key words : Smad3, Estrogen Receptor-related Receptor β like 1, ERR β like 1, Sea urchin, Embryogenesis, Seasonal change.

요 약 : Transforming growth factor- β (TGF- β) 신호의 매개자 역할을 하는 Smad 계열 단백질은 발생과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Estrogen receptor(ER)와 구조적으로 유사한 estrogen receptor-related receptor(ERR)은 포유동물에서 후기 배발생기에 외배엽 형성과 관련이 되어 있는 고아핵수용체이다. 본 연구에서는 해양무척추동물의 초기발생과정과 계절번식기 동안에 Smad3와 ERR의 유전자 발현이 발생과정과 성숙에 어떠한 연관성을 갖고 있는지 알아보기 위하여, 동해안 연안에 주로 서식하는 극피동물문 등근성게과 등근성게(*Strongylocentrotus nudus*)를 재료로 하여 계절별 및 배발생 과정중에 Smad3와 ERR β like 1의 mRNA 농도를 real-time PCR 방법으로 조사하였다. Smad3 mRNA는 샘플링을 시작한 2004년 2월의 생식소와 비교하면 4월부터 그 농도가 증가하기 시작하여 6월까지 증가하였으며, 산란기인 8월에 감소하였다가 10월부터 12월까지 높은 수준을 유지하였다. ERR β like 1 mRNA는 6월까지 낮은 수준이었으나, 산란기인 8월에 급증한 후 다시 감소하였다. 수정란부터 초기 유생기까지 발생과정을 분석한 결과, Smad3 mRNA는 8세포기 및 16세포기에 높은 발현이 관측되었다. 한편, ERR β like 1 mRNA는 포배기, 낭배기, 초기 유생기에 현저하게 높은 발현 패턴을 보였다. 이상의 결과로부터 등근성게의 산란기 및 발생배의 발생후기에 ERR β like 1이 중요한 역할을 담당할 것으로 추정되며, 초기 난할 시기에는 Smad3의 관련성이 시사되었다.

저자 정유정은 한국학술진흥재단 2단계 BK21 핵심사업팀의 수혜대학원생임을 밝히며 이에 사의를 표합니다.

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

서 론

다양한 전사 인자들은 배발생 동안에 세포의 극성을 결정하는 조절 네트워크의 결정인자로서 알려져 있으며(Howard-

Ashby *et al.*, 2006a), 그 중에서 TGF- β 신호는 초기 발생시기에 세포의 운명을 결정하고 분화하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(reviewed by Kingsley, 1994). TGF- β superfamily 구성원들의 신호는 Smad family에 의하여 전달되며, 신호를 받은 세포 내에서 유전자의 발현이 활성화되기도 하고 억제되기도 한다(Heldin *et al.*, 1997). Smad family는 다양한 중에서 보존되어 있으며, 포유동물의 발생에 있어서 중요한 역할을 한다(Kobayashi *et al.*, 1999). 특히, Smad family의 구성원 중 하나인 Smad3는 포유동물에서 중배엽 형성과 패턴화를 조절하며(Ray-Dunn *et al.*, 2004), 결핍될 경우 초기 배아 발생시기에 사멸되거나, 면역계통과 심장 혈관 시스템에 이상을 가져오게 된다(Itoh *et al.*, 2000).

Estrogen receptor-related receptor(ERR)은 고아 핵수용체로서 핵수용체 superfamily에 속한다(Giguere *et al.*, 1988). ERR은 ER(estrogen receptor)과 구조가 유사하고 같은 표적 유전자에 반응하며, ERRE(ERR-response element)뿐만 아니라 ERE(estrogen response element)에 결합한다. ERR은 배발생 동안에 외배엽 형성시기에 발현되며, 초기 태반 발달에도 관여한다고 알려졌다(Luo *et al.*, 1997; Mitsunaga *et al.*, 2004; Pettersson *et al.*, 1996). 또, 성체에서는 신장과 심장, 정소, 시상하부, 해마, 소뇌, 전립선을 포함하는 몇몇의 조직에서 낮은 수준으로 발현이 된다고 밝혀졌다(Giguere *et al.*, 1988, Pettersson *et al.*, 1996). ERR의 구조, 기능 및 특징에 대한 연구는 주로 육상 포유동물에서 이루어졌으며, 해양생물에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

최근 무척추동물 중 하나인 보라성게(*Strongylocentrotus purpuratus*)의 초기 배발생기 동안에 다양한 카테고리의 전사인자, 핵수용체, Smads 등 주요 유전자의 발현 패턴이 보고되었다(Howard-Ashby *et al.*, 2006a; Howard-Ashby *et al.*, 2006b). 성게는 수정과 초기 배발생 과정이 발생 생물학적으로 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 광범위하게 보고되어 있다(NIH Sea Urchin Genome Project; Hood *et al.*, 2001). 성장과 발생을 조절하는 유전자들의 작용을 이해하기 위해서는 성장과 발생 시기에 따른 유전자 발현을 이해하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 동해안에 서식하는 등근성게(*S. nudus*)를 이용하여 Smad3와 ERR β like 1 mRNA를 계절에 따른 발현 변화 및 배발생 동안의 발현 변화를 조사하여, Smad3와 ERR β like 1 유전자 발현과 등근성게의 성숙 및 초기 세포분화와의 관련성을 연구하였다.

재료 및 방법

1. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

등근성게는 2004년 2월부터 12월까지 2개월 간격으로 강원도 강릉시 주문진읍 사천 연안에서 채취하였으며, 생식소를 적출하여 액체 질소에 급속동결하여 -80°C 에 보관하였다. 채취한 생식소는 RNeasy MINI kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA를 $1\ \mu\text{g}$ 정량한 후 QuantiTect Reverse Transcription kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지시서에 따라 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다.

또한, 2006년 8월경 산란시기에 접어든 등근성게를 주문진읍 사천 연안에서 채취하였으며, 1mM KCl을 $1\ \text{mL}$ 미만으로 주사하여 산란을 유도한 후 난들을 수정시켰다. 수정($80\sim 90\%$ 의 수정률)시킨 알들은 수정막을 확인한 뒤 약 16°C 의 멸균된 해수로 세척하여 정액을 제거하였다. 수정된 난들을 16°C 의 항온배양기에서 72시간 동안 배양하면서, 각 발생 시기별로 수집하여 해수를 제거한 뒤 액체질소에 급속동결하여 -80°C 에 보관하였다. RNeasy MINI kit(QIAGEN)를 이용하여 샘플의 total RNA를 추출한 후, $1\ \mu\text{g}$ 정량하고 QuantiTect Reverse Transcription kit(QIAGEN)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

2. Polymerase Chain Reaction(PCR) 분석 및 Real-time PCR 분석

계절별 및 배발생 변화에 따른 Smad3와 ERR β like 1 유전자 발현 변화는 real-time PCR 방법으로 확인하였다. Real-time PCR에 사용한 올리고프라이머들은 보라성게의 염기서열을 바탕으로 Primer Express v3.0 software(Applied Biosystems, Boston, MA, USA)을 이용하여 Smad3, ERR β like 1, Ubiquitin을 제작하였다(Table 1). 성게 생식소와 발생배들의 total RNA로부터 합성한 cDNA($0.3\ \mu\text{g}$), Power SYBR Green 1 PCR Master Mix(Applied Biosystems) 및 표적유전자의 올리고프라이머 세트와 함께 총량 $20\ \mu\text{l}$ 로 real-time PCR(ABI 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems)을 수행해 주었다. PCR 프로토콜은 50°C 에서 2분, 95°C 에서 10분 반응 후, two-step PCR 방법으로 extension step을 95°C 에서 15초, 60°C 에서 1분으로 총 40cycle을 수행하였다. PCR 산물의 일부는 TA cloning 방법으로 TOPO vector(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 삽입하여 염기 서열을 분석하였다.

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

Target	Direction	Accession number	Sequence(5'-3')
Smad3	F	AB267397	CGAGAACAGCCAAACCAAATG
Smad3	R	AB267397	AGCCCCTTCCTGTGAGACACT
ERRβ like 1	F	XM789882	ACAAGACTACGATGATCCAAATGC
ERRβ like 1	R	XM789882	CGTCGGCTAGCTTGTCCAA
Ubiquitin	F	M61772	TCATCTCGTTCTCAGGATTCGT
Ubiquitin	R	M61772	CGAAGATGAGACGCTGCTGAT

F=forward; R=reverse.

3. 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. 계절 변화에 따른 Smad3 와 ERRβ like 1 mRNA 발현 변화

각각의 PCR 산물을 분석한 결과, 보라성계와 상동성이 높은 Smad3와 ERRβ like 1의 염기서열이 확인되었다(protein homology 94~97%; data not shown). Smad3 mRNA level은 2월의 생식소 샘플과 비교하였을 때 4월부터 그 농도가 증가하기 시작하여 6월에는 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 그리고 산란기인 8월에 다시 2월의 수준으로 감소하였다가 다시 10월부터 12월까지 비교적 높은 수준으로 유지되었다(Fig. 1). ERRβ like 1 mRNA level은 6월까지 낮

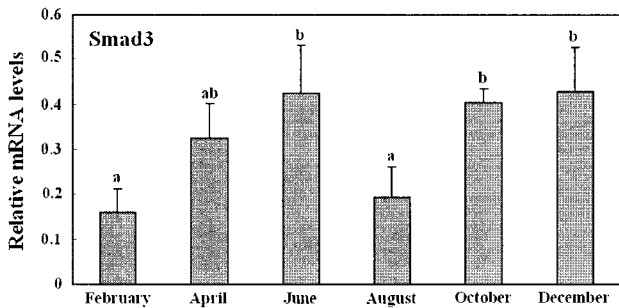


Fig. 1. Seasonal changes in Smad3 mRNA expression in *Strongylocentrotus nudus* gonads. Real-time polymerase chain reaction(PCR) experiments were undertaken to measure expression of Smad3 during seasonal change. The relative Smad3 mRNA levels were normalized by ubiquitin values. Data were represented by the mean±S.E.M. of four independent samples. Significant differences($P<0.05$) in each series are denoted.

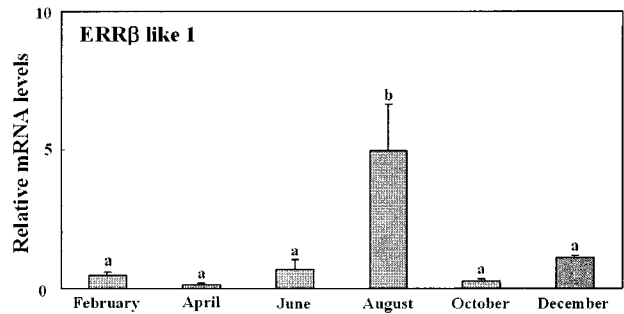


Fig. 2. Seasonal changes in estrogen receptor-related receptor β like 1(ERRβ like 1) mRNA expression in *Strongylocentrotus nudus* gonads. Real-time PCR experiments were undertaken to measure expression of ERRβ like 1 during seasonal change. The relative ERRβ like 1 mRNA levels were normalized by ubiquitin values. Data were represented by the mean±S.E.M. of four independent samples. Significant differences($P<0.05$) in each series are denoted.

은 수준이었으나, 산란기인 8월에 유의적으로 증가한 후, 10월부터 다시 감소하였다(Fig. 2).

2. 배발생 동안의 Smad3 와 ERRβ like 1 mRNA 발현 변화

수정 직후부터 초기 유생기까지 각각의 유전자 발현을 조사한 결과, Smad3 mRNA는 8세포기 및 16세포기에 유의적으로 높게 발현되었다. 그리고 32세포기부터 감소하기 시작하여 64세포기 이후부터 낮은 수준으로 유지되었다(Fig. 3). 한편, ERRβ like 1 mRNA는 수정 직후부터 64세포기까지 낮은 수준이었으나, 포배기를 시작으로 낭배기, 초기 유생기까지 유의적으로 현저하게 높은 발현 패턴을 보였다(Fig. 4).

고 찰

강원 연안 해역에 서식하는 등근성계의 생식소 증량지수

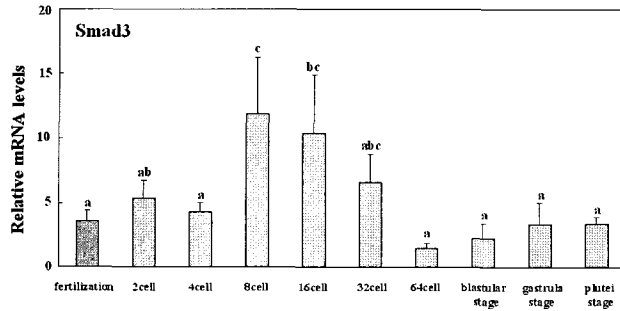


Fig. 3. Expression levels of Smad3 mRNA in *Strongylocentrotus nudus* embryos. Real-time PCR experiments were undertaken to measure expression of Smad3 during embryonic development stages. The relative Smad3 mRNA levels were normalized by ubiquitin values. Data were represented by the mean±S.E.M. of four or five independent samples. Significant differences ($P < 0.05$) in each series are denoted.

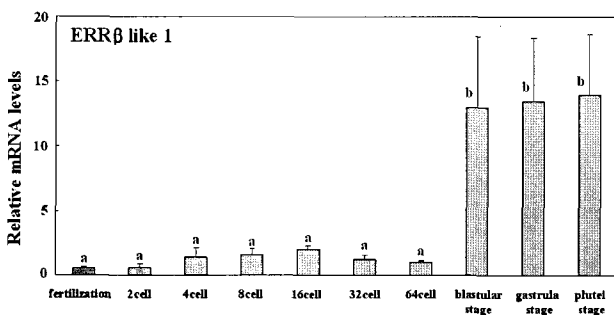


Fig. 4. Expression levels of estrogen receptor-related receptor β like 1 (ERR β like 1) mRNA in *Strongylocentrotus nudus* embryos. Real-time PCR experiments were undertaken to measure expression of ERR β like 1 during embryonic development stages. The relative ERR β like 1 mRNA levels were normalized by ubiquitin values. Data were represented by the mean±S.E.M. of four or five independent samples. Significant differences ($P < 0.05$) in each series are denoted.

는 7월부터 증가하여 9월에 감소하며, 산란기 역시 8월 전후로 알려져 있다(손, 1999). 포유동물에서는 성성숙에 관여하는 여성호르몬은 ER과 결합하여 특정유전자의 발현을 조절하며 특히, 난성숙, 난관 및 유선의 성장 및 발달과 같은 생리 기능을 조절하며, 뇌하수체를 자극하여 배란을 유도한다(Savouret *et al.*, 1991; Slater *et al.*, 1991). 그리고 ERR의 발현은 포유동물의 조직에서 여성호르몬의 자극에 의해 활성화 될 수 있다고 보고된 바 있다(Liu *et al.*, 2003). 현재까지도 성계의 ER은 발견되지 못하였으며, 이에 대한 보고는 없다. 따라서 8월에 산란이 유발되는 시기에는, 등근성계 생식

소의 여성호르몬성 물질에 의해 ERR β like 1 mRNA 발현이 증가될 수 있을 것이라고 추정된다. Smad3의 mRNA 발현은 생식소가 급격히 발달하는 6월에 증가하고 산란기에 감소하는 결과로 판단하여 생식세포의 증식에 중요한 인자로서 추정되지만, 향후 성계 생식세포의 증식에 미치는 직접적인 인자로서의 기능에 관한 연구가 따라야 할 것으로 생각된다.

최근 보라성계의 배발생 과정 중의 Smad3 유전자 발현 변화를 조사한 연구 결과에서는 발생시간별 mRNA 발현은 초기 난할기부터 32세포기까지 높은 수준이었으나, 64세포기에 급격히 감소하였다(Howard-Ashby *et al.*, 2006a). 그리고 포배기가 시작된 시점과 낭배기 중간 시점에는 다시 증가하는 경향을 보였다. 본 연구에서도 Smad3는 수정란에서 8세포기 및 16세포기로 난할되는 4시간 동안 Smad3의 mRNA 발현이 급격히 증가하였으며, 64세포기에는 감소하는 결과를 나타내었다. 이상의 결과는 보라성계에서 밝혀진 초기 난할시기의 Smad3 유전자 발현과 부합되는 것으로 판단된다. 최근 보라성계의 배발생동안 축 형성과 조직 분화에 있어서 중요한 역할을 하는 Nodal signal이 보고된 바 있다(Yaguchi *et al.*, 2006). 또한, Smad 전사인자들이 Nodal 수용체의 downstream의 표적 유전자들이며, 보라성계 배발생 후기에 신경분화를 위해 Smad3가 억제된다고 밝혀졌다(Yaguchi *et al.*, 2006). 등근성계의 Smad3 mRNA가 배발생 후기에 감소하는 결과는, 신경분화를 위한 Nodal signal의 영향으로 생각된다.

보라성계에서의 ERR mRNA 발현은 초기 난할시기에 급격히 감소하여 포배기와 낭배기에 증가를 보였다(Howard-Ashby *et al.*, 2006a). 그리고 멧게류의 일종인 *Herdmania curvata*에서 다양한 핵수용체 유전자들은 64세포기부터 mRNA 발현이 시작되는 것으로 밝혀졌는데, ERR의 mRNA 역시 미수정란에서는 나타나지 않다가 64세포기부터 발현이 시작되었다(Devine *et al.*, 2002). 또, 포유동물에서 ERR이 발생 후기 외배엽 형성에 관여한다는 보고가 있다(Luo *et al.*, 1997). 중간에 약간의 차이는 있지만, 등근성계의 ERR β like 1 역시 외배엽 형성이 일어나는 발생 후기에 높게 증가하였으므로 외배엽 형성에 관여할 것으로 추정된다. 향후 *in situ* hybridization 실험을 통하여 배발생 시기별 Smad3와 ERR β like 1 mRNA의 세포내 국재성을 아울러 조사하여야 할 것으로 판단된다.

이상의 내용을 요약하면, 등근성계에서는 ERR β like 1이 여성호르몬성 물질에 반응하여 산란을 유도하는 역할을 할 가능성이 시사되었으며, 초기 난할시기에 Smad3, 발생 후기에는 ERR β like 1의 유전자 발현이 발생과정에서 중요한 인자로 추정된다.

인용문헌

- Devine C, Hinman VF, Dengnan BM (2002) Evolution and developmental expression of nuclear receptor genes in the ascidian *Herdmania*. *Dev Biol* 46:687-692.
- Giguere V (2002) To ERR in the estrogen pathway. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13:220-225.
- Giguere V, Yang N, Segui P, Evans R (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331:91-94.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
- Hood L, Davidson EH, Cameron RA, Etensohn C, Wray G (2001) The Sea Urchin Genome Project-Introduction. <http://sugp.caltech.edu/intro/> (March 10, 2003).
- Howard-Ashby M, Materna SC, Brown CT, Tu Q, Oliveri P, Cameron RA, Davidson EH (2006a) Gene families encoding transcription factors expressed in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300: 90-107.
- Howard-Ashby M, Materna SC, Brown CT, Tu Q, Oliveri P, Cameron RA, Davidson EH (2006b) High regulatory gene use in sea urchin embryogenesis: Implications for bilaterian development and evolution. *Dev Biol* 300: 27-34.
- Itoh S, Itoh F, Goumas MJ, Dijke PT (2000) Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267:6954-6967.
- Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146.
- Kobayashi A, Sasakura Y, Ogasawara M, Makabe KW (1999) A maternal RNA encoding smad1/5 is segregated to animal blastomeres during ascidian development. *Dev Growth Differ* 41:419-427.
- 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.
- 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.
- 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- β 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.
- Ray-Dunn N, Vincent SD, Oxburgh L, Robertson EJ, Birkhoff EK (2004) Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo. *Development* 131:1711-1728.
- Savouret JF, Fridlanski F, Atger M, Misrahi M, Berger R, Milgrom E (1991) Origin of the high constitutive level of progesterone receptor in T47-D breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 75:157-62.
- Slater EP, Redeuilh G, Beato M (1991) Hormonal regulation of vitellogenin genes: an estrogen-responsive element in the *Xenopus A2* gene and a multihormonal regulatory region in the chicken *II* gene. *Mol Endocrinol* 5:386-96.
- Yaguchi S, Yaguchi J, Burke RD (2006) Specification of ectoderm restricts the size of the animal plate and patterns neurogenesis in sea urchin embryos. *Development* 133:2337-2346.
- Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL, Kuehn MR (1993) Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361:543-547.
- 손용수 (1999) 동해안 성게 3종, 북쪽말뚝성게, 둥근성게와 말뚝성게의 생태적 특성. 국립수산진흥연구원보고 57:55-66.