

동자개 *Pseudobagrus fulvidraco*의 난황단백질과 난황단백전구체의 분리와 면역학적 특성

임상구, 강봉정¹, 한창희^{2,*}

국립수산과학원 남부내수면연구소, ¹오카야마대학 생물학과, ²동의대학교 생물학과

Purification and Immunochemical Characteristics of Yolk Protein and Vitellogenin in Korean bullhead *Pseudobagrus fulvidraco*

Sang-Koo Lim, Bong Jung, Kang¹ and Chang-Hee Han^{2,*}

Southern Regional Inland Fisheries Research Institute, NFRDI, Jinhae 645-805, Republic of Korea

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima, Okayama 700-8530, Japan

²Department of Molecular Biology, Donggeui University, Busan 614-714, Republic of Korea

Vitellogenin (Vg) is the precursor of vitellin (Vn), the major yolk protein of teleost fishes. In this study, Vg and Vn proteins of the Korean bullhead *Pseudobagrus fulvidraco* were isolated using gel-filtration chromatography (Sephadex-G 200 column) and anion-exchange chromatography (Mono Q HR 5/5 column), respectively. Purified Vn with an estimated molecular mass of 360 kDa by gel filtration chromatography was obtained from ovarian egg, and it was composited to one major subunit with an estimated molecular mass of 107 kDa by SDS-PAGE. In the result of western blotting, one major band was detected using antiserum against Vn (anti-Vn). These results suggested that Vn was composed of three subunits having the same molecular weight in *Pseudobagrus fulvidraco*. Vg was induced by estradiol-17 β (E₂) and purified from E₂ treated male serum. The molecular weight of whole Vg was estimated to be 450 kDa by gel filtration chromatography, and it is composed of three subunits with estimated molecular masses of 110 kDa, 125 kDa and 147 kDa as determined by SDS-PAGE. In the Ouchterlony's immunodiffusion test using anti-Vn and antiserum against female and male serum, purified Vg was detected in matured female and E₂ treated male serum but not in untreated male. These results can be used in detecting estrogenic contamination of the aquatic environment.

Keywords: *Pseudobagrus fulvidraco*, Vitellin, Vitellogenin, Yolk protein

서 론

난황단백전구체(vitellogenin, Vg)는 난생동물에 존재하는 phospholipoglycoprotein으로써 일반적으로 암컷 특이적으로 척추동물과 무척추동물에서 발견, 합성된다. 척추동물에 있어서 난황단백전구체는 에스트로젠(estrogen)의 통제 아래 간에서 합성되어 혈액내로 분비, 수송되어 난내의 난황단백질(Vitellin, Vn)로 축적 전, 후에 프로세싱되어 endocytosis receptor 매개체에 의해 난모세포 안으로 들어가서 몇 개의 subunits로 난내에 존재한다(Wallace, 1985; Byrne et al., 1989).

경골어류의 난황단백전구체 관련 연구는 그 첫 단계로써 난황단백질과 난황단백전구체를 분리하여 그 생리학적 특성을 밝히는 것으로부터 시작된다. 현재까지 많은 종의 어류에서 그들

의 생체 내에 존재하는 난황단백질과 난황단백전구체가 분리되었고, 그 특성과 구성 분자량을 밝힘으로써 프로세싱을 설명하였다(Sperker and Sullivan 1994; Matsubara et al., 2003). 경골어류의 난황단백질은 분자량이 250-600 kDa의 고분자로 존재하며, 지질이 풍부한 lipovitellin과 인산화된 phosvitin으로 구성되어 있다고 보고되어져 있다(Wallace 1985; Sperker and Sullivan 1994). 노란가자미 *Versper moseri*에서는 두 형태의 난황단백전구체가 분리되었고, 이 두 형태의 난황단백전구체는 각각 lipovitellin heavy chain과 lipovitellin light chain, phosvitin, β' compartment으로 프로세싱되어 난내로 축적되며 이들은 SDS-PAGE 하에서 몇개의 subunits로 나타난다고 보고되었다(Matsubara et al., 2003). 또한 두 형태의 난황단백전구체의 프로세싱은 그 역할에 따라 달리 일어나며, 난내에 존재하는 난황단백질의 비율도 다르다고 설명되어져 있다(Matsubara et al., 2003).

최근에는 몇몇 경골어류에서 난황단백전구체의 유전자 서열

*Corresponding author: chhan@deu.ac.kr

이 분석, 보고되어져 있고, 한 종에서도 다수의 Vg 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다. 경골어류는 Vg-A, Vg-B, Vg-C의 3 그룹으로 구분되는 3 타입의 Vg 유전자가 존재하며, 이들 유전자는 그들의 구성과 생리학적 특성에 의해 구분되어진다(Hiramatsu et al., 2002; Wang et al., 2005; Kang et al., 2007). Vg-A 에 속하는 유전자는 lipovitellin I (LVI), phosvitin (PV), lipovitellin II (LVII)로 구성되어 있고, Vg-B 그룹에는 LVI, PV, LVII 구성된 분자 또는 그 LVII영역에 상동성이 높은 GL/ICG motif (β' comparnent를 포함하는)가 결핍된 분자가 속한다. Vg-C에 속하는 유전자는 PV와 GL/ICG motif가 결핍된 LVI, LVII으로 구성되어져 있어 Vg-A, Vg-B에 속하는 난황단백전구체와 비교적 상동성이 떨어진다고 보고되어진다(Hiramatsu et al., 2002; Wang et al., 2005; Kang et al., 2007). 현재까지 다수의 난황단백전구체 유전자는, 문절망둑 *Acanthogobius flavimanus*, 잉어 *Cyprinus carpio*, mummichog *Fundulus heteroclitus*, 송사리 *Oryzias latipes*, 노랑가자미 *Verasper moseri*, 대구 *Melanogrammus aeglefinus*, fathead minnow *Pimephales promelas*에서 2개의 유전자가 보고 되었고, 참돔(*Pagrus major*), 모기고기(*Gambusia affinis*)에서 3개의 유전자의 전체서열이 보고 되었다(Ohkubo et al., 2004; Kang et al., 2007; LaFleur et al., 2005; Reith et al., 2001; Miracle et al., 2006; Sawaguchi et al., 2005, 2006). 또한 제브라피쉬 *Danio reio*에서는 7개의 난황단백전구체의 유전자가 존재한다고 보고 되어져 있다(Wang et al., 2005).

난황단백전구체 유전자는 암, 수컷에 모두 존재하지만, 수컷에는 내재성 에스트로젠이 존재하지 않아 난황단백전구체 단백질은 일반적으로 성숙 암컷에서만 합성되어진다. 그러나 외재성 에스트로젠에 노출되면 미성숙 암컷 뿐만 아니라 수컷에서도 난황단백전구체가 합성되어 혈중에 존재하게 된다(Mommsen and Walsh, 1988; Sole et al., 2003). 그러므로 난황단백전구체는, 수컷에서의 난황단백전구체의 존재 여부를 측정함으로써 내분비 장애물질에 의한 수생환경의 오염여부를 측정하는 바이오마커(biomarker)로서도 이용되고 있다(Sumpter and Jobling, 1995; Folmar et al., 1996; Jung et al., 2005).

전라남도 영산강 상류에 서식하는 동자개 *Pseudobagrus fulvidraco*는 5월부터 생식소 성숙이 시작되어 6-8월에 성숙 및 완숙기인 것으로 그 생식년주기가 보고 되어져 있으나(Lim And Han, 1997) 그 외의 생태학적 연구나, 생리학적 연구에 관한 보고는 아직 많이 부족하다. 본 연구에서는 난성숙에 관여하는 난황단백질과 그 전구물질인 난황단백전구체를 분리하고, 특성을 분석하여 동자개의 성숙 리듬과 조절 그리고 원활한 채란을 위한 기초연구자료로 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

난황단백질(Vn)과 난황단백전구체(Vg)의 분리

난황단백질(Vitellin, Vn)은 Hara and Hirai (1978)의 방법을

변형하여, 성숙한 암컷의 난에서 분리되었다. 난 내의 단백질은 0.75% saline 액으로 세척 후 절취된 난 2.5 g과 20 mM Tris-HCL (pH 8.0, 0.15N NaCl, 0.1% NaN₃, 0.01% EDTA) 완충액 5 mL을 넣어 glass homogenizer로 균질화시킨 후, 초원심분리(130,000 g, 4°C, 2 hr)을 이용하여 상층액은 분취하였다. 침전물은 상기 방법과 같이 균질화시킨 후 초원심분리를 이용하여 상층액을 다시 분리하였다. 이 상층액에 3배의 포화된 100% (NH₄)₂SO₄를 넣어 충분히 혼합한 후 10,000 g 에서 30분간 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 침전물은 20 mM Tris-HCL 완충액으로 용해, 투석 후 난황단백현탁액으로 사용하였다. 난황단백현탁액은 20 mM Tris-HCL 완충액으로 미리 평형화시킨 sephadex G-200 gel-chromatography column (ϕ 25×800 mm) 를 이용하여 25 min/tube의 속도로 용출하여 난황단백질을 분리하였다. 5 mL/tube로 용출된 fraction 은 흡광도 280 nm에서 농도를 측정하였고, 각 peak 분획은 전기영동으로 확인하였다.

난황단백전구체(Vitellogenin, Vg)는 체중 당 20 μ g/g 의 농도의 Estradiol-17 β (E₂)를 Silastic (Dow Corning)에 넣어 성숙한 수컷에 삽입하여 유도하였다. 유도된 난황단백전구체는 Wiley (1979) 방법을 응용하여 다음과 같이 분리 하였다. E₂ 삽입 후 6일 후에 전체혈로 채취한 혈청 2 mL에 20 mM EDTA와 0.4 mL의 MgCl₂를 첨가한 후 원심분리(5,000 g, 15 min)를 이용하여 단백질을 침전시켰다. 침전물은 1M NaCl에 용해하였고, 20 mM Tris-HCL 완충액으로 투석한 후, Momo Q HR 5/5 column (GE Healthcare Bio-Sciences)을 이용한 FPLC system으로 분리하였다.

난황단백질과 난황단백전구체의 총 분자량은 Sephadex G - 200 column에 의한 gel filtration법에 의해 MW-GF-1,000 Kit (Sigma)를 이용하여 측정하였으며, 표준 분자량은 thyroglobulin (669 kD), apoferritin (443 kD), β -amylase (200 kD), alcohol dehydrogenase (150 kD), bovine albumin (66 kD), carbonic anhydrase (29 kD)을 사용하였다.

전기영동

Native-polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE)는 Davis (1964)의 방법을 변형하여 7.5% 분리용 gel과 5% 농축용 gel을 사용하여 150 Volt의 일정한 전압으로 전기영동 하였다. 단백질은 염색액(0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)로 염색 후, 탈색액(10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 탈색하여 확인하였다. Sodium dodecyl sulfate-PAGE (SDS-PAGE)는 Laemmli (1970) 방법에 따라 7.5% 분리용 gel과 5% 농축용 gel을 사용하여 2 시간 동안 100 V의 일정한 전압으로 전기영동하였고, 분리된 단백질은 Native-PAGE와 동일한 방법으로 염색 및 탈색하거나, Western blotting을 위해 막에 전이시켰다. 분자량 측정을 위해 표준단백질은, albumin egg (45 kDa), albumin bovine (66.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), β -galactosidase (116.25 kDa), 그리고 myosin (205 kDa)을 사용하였다.

항체 제작

항체는 성 성숙한 성체의 암, 수 동자개의 혈청과 분리된 난황단백질을 이용하여 제작되었다. 혈청과 분리된 단백질은 각각 동량의 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 토끼(New Zealand white rabbits)에 주사되었고, 첫 주사 후 일주일 간격으로 동량의 Freund's incomplete adjuvant로 혼합한 항원을 4회 주사하여 면역시켰다. 면역된 토끼는 4회 항원주사 일주일 후, 경동맥을 절단하여 전체혈로 혈액을 채취하여 56°C에서 3시간 비등화시킨 후, 4°C에서 하룻밤 방치하여 원심분리기를(10,000 g, 30min) 이용하여 항혈청을 분리하였다. 항체는 Wilchek *et al.* (1984)의 방법을 변형하여 protein A sepharose 4B column (Sigma)를 이용하여 토끼 IgG를 분리하였고, 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

면역확산 및 면역 전기영동

면역확산은 Ouchterlony (1949)을 변형하여, 100 mM phosphate (pH 7.0) 완충액에 희석된 1% agarose gel을 사용하였고, 면역확산은 샘플을 첨가하여 4°C 에서 하룻밤을 방치한 후, 반응을 확인하였다.

면역전기영동은 Grabar and Williams (1953)의 방법에 따라 100 mM Tris 완충액(pH 8.6)을 사용하여 1% agarose 용액으로 영동용 gel을 제작하였다. 영동용 완충액은 200 mM (pH 8.6)을 사용하였으며, 전기영동은 gel의 폭 1 cm 당 8 V로서 1시간 30분 동안 행하였다.

Western blotting

SDS-PAGE로 분리된 단백질은 TBS (50 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3) 완충용액을 사용하여 100 mA의 일정한 전류로 6시간 동안 nitrocellulose 막 (Bio-Rad, Richmond, CA)으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 nitrocellulose 막의 일부는 ponceaus S 용액(0.2% ponceaus S, 3% trichloroacetic acid, 3% sulfosalicylic acid)으로 염색하여 전이 여부 확인하였고, 단백질이 전이된 나머지 nitrocellulose막은 TBS 완충용액으로 희석한 2% bovine serum albumin (BSA) 으로 2시간 동안 blocking하여 비특이적인 결합을 억제시켰다. Blocking된 nitrocellulose막은 TBS 용액으로 3회 세척 후, 1차 항체로서 TBS 용액에 200배 희석된 항-난황단백질 항체 (anti-Vn IgG)를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응 후 nitrocellulose 막은 TBS 용액으로 5-6회 세척되었고, 제2항체로 goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad)를 사용하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후, DAB (3, 3-diaminobenzaidine) 용액으로 염색하였다.

filtration chromatography)으로 분리된 단백질은 Fig. 1과 같이 두개의 분획(PI, PII)로 fraction No. 29 부근과 fraction No. 38 부근에서 나타났다. 분리된 각 분획의 단백질은 난황단백혈액과 함께 native- polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE)로 확인하였고, Fig. 2와 같이 두번째 분획(PII)에 해당하는 fraction (Fig. 2 d,e)에서 난내의 주요 단백질(Fig. 2 a)과 같은 위치의 band가 나타남으로써 같은 특성의 단백질임을 알 수 있었다(Fig 1, 2).

분리된 2개의 단백질 분획과 성성숙한 암컷 동자개의 혈청에 대한 항체(Fig. 3; aF)를 이용하여 성성숙 시기에 암컷에서 생성되는 난황단백전구체와의 면역학적 반응을 면역전기영동을 이용하여 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 PI 분획은 성성숙 암수 혈청에 대한 항체(aF, aM)에 대하여 아무런 침강선을 형성하지 않는 반면에, PII 분획은 성성숙암컷혈청에 대한 항체에서만 한 개의 침강선을 형성하였고 성성숙한 수컷혈청에 대한 항체(aM)에서는 침강선을 형성하지 않았다. 이 결과로부터 PII 분획 내

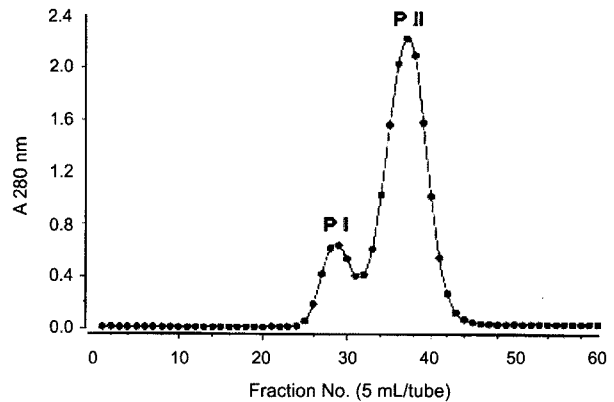


Fig. 1. Gel filtration profile of ovarian egg extract on the Sephadex G-200 column(φ25×800 mm). Each peak was indicated by PI and PII.

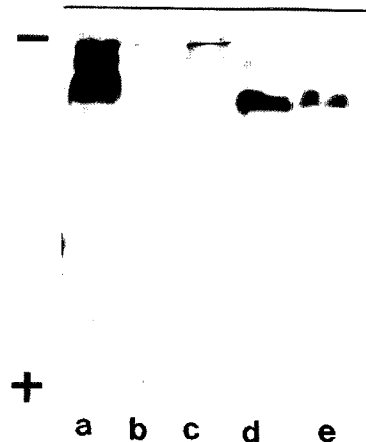


Fig. 2. Native-PAGE (7.5%) of ovarian egg extracts (a), fraction No. 29 (b), fraction No. 33 (c), fraction No. 35 (d), fraction No. 38 (e). Gel was stained with Coomassie brilliant blue R250.

결 과

난황단백질과 난황단백전구체의 분리와 특성

1) 난황단백질(Vitelin, Vn)

성숙 암컷 난소에서 추출된 난황단백혈액액을 이용하여 gel-

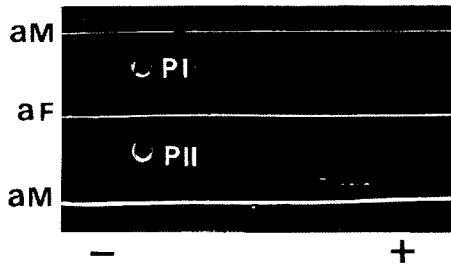


Fig. 3. Immunoelectrophoresis of elution peak fractions as PI and PII. Antisera were raised against matured female serum (aF) and matured male serum (aM).

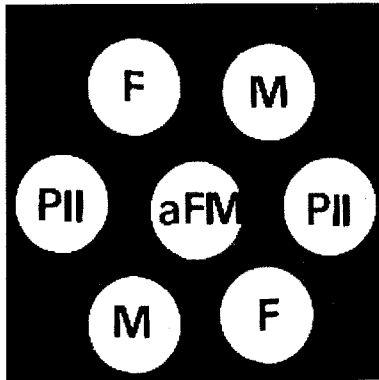


Fig. 4. Ouchterlony's immunodiffusion test of matured female serum (F), matured male serum (M) and eluted peakII fraction (PII). Anti-serum was raised against matured female serum absorbed with matured male serum (aFM).

에 난황단백질이 포함되어 있다는 것을 알 수 있다. 더욱 특이적인 면역반응을 위하여 수컷혈청으로 흡수시킨 성숙한 암혈청에 대한 항체(흡수항체, Fig. 4; aFM)를 이용하여 면역확산법으로 반응시킨 결과, Fig. 4와 같이 성숙한 암컷혈청과 PII 분획에 특이적으로 반응함을 알 수 있었다. 이로써 분리된 PII 분획 단백질은 암컷 특이적으로 존재하는 난황단백질을 알 수 있다(Fig. 3, 4).

이 난황단백질 분획(PII)을 분취한 후 농축하여 상기한 방법으로 재분리하여 정제한 결과, Fig. 5와 같이 단일 단백질 분획을 얻었으며, 이를 7.5% nativ-PAGE에서 단일 단백질임을 확인한 후(Fig. 5), 정제된 난황단백질을 면역전기영동을 이용하여 면역반응을 시킨 결과, Fig. 3과 같이 성숙 암컷 항혈청(aF)에만 반응됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 이렇게 정제, 확인된 난황단백질을 항원으로 사용하여 난황단백질에 특이적인 항체를 제작하였다(Fig. 5, 6).

정제된 난황단백질의 분자량과 subunit의 수를 SDS-PAGE에서 확인한 결과, Fig. 7과 같이 동자개의 난황단백질은 분자량 116 kDa과 97.4 kDa 사이에 1개의 band로 나타났다. 난황단백질에 대한 항체를 이용한 웨스턴블로팅(western blotting) 결과, SDS-PAGE에서와 같은 위치의 단백질이 반응됨으로써, 동자개 난황단백질은 한개의 폴리펩티드로 구성되어 있음을 알 수 있었고

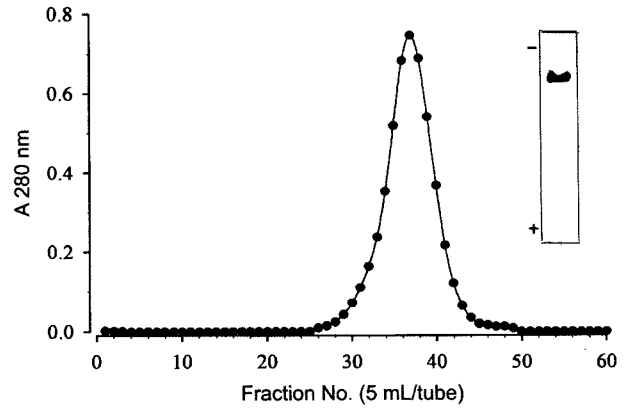


Fig. 5. Elution profile of peak II fraction further applied on the Sephadex G-200 column ($\phi 25 \times 800$ mm) and Native-PAGE (7.5%) of the peak fraction.

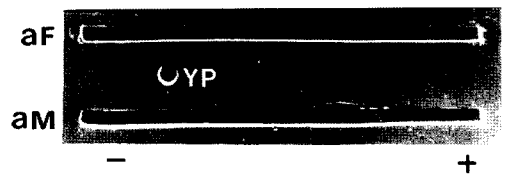


Fig. 6. Immunoelectrophoresis of purified yolk protein (YP). Antisera were raised against matured female serum (aF) and matured male serum (aM).

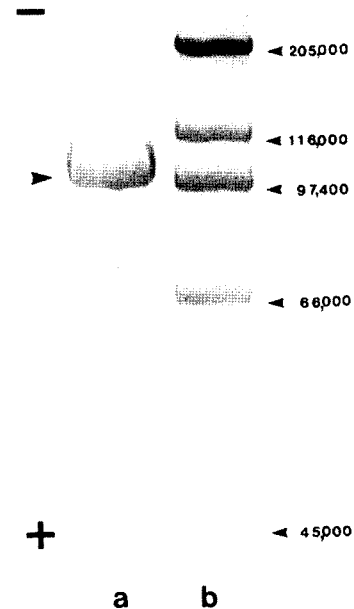


Fig. 7. SDS-PAGE (7%) analysis of purified yolk protein (a). The right lane (b) shows molecular mass markers (Da).

(Fig. 8), 폴리펩티드의 분자량은 107 kDa으로 계산되었다(Fig. 9). 그러나, Sephadex G-200를 이용하여 gel-filtration으로 난황단백질의 총 분자량을 측정된 결과, Fig. 17에 나타난 결과와 같이 분리된 총 난황단백질의 분자량은 360 kDa로 분석되었다(Fig. 7-9).

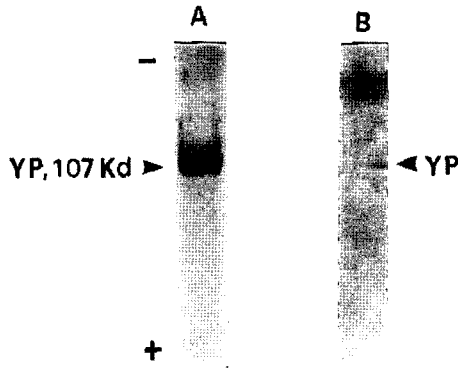


Fig. 8. SDS-PAGE (A) and corresponding western blotting (B) of purified yolk protein. Antiserum was raised against agninst yolk proteins.

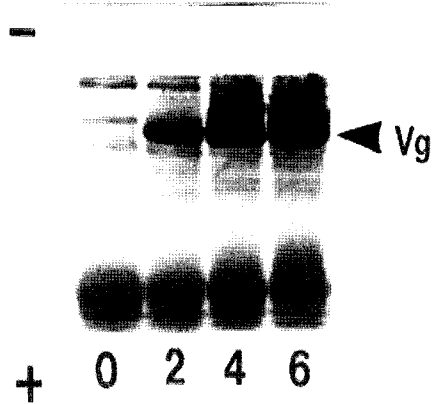


Fig. 10. Native-PAGE(7.5%) of E₂-treated male serum. Numbers were sampling day after estradiol-17 α administration.

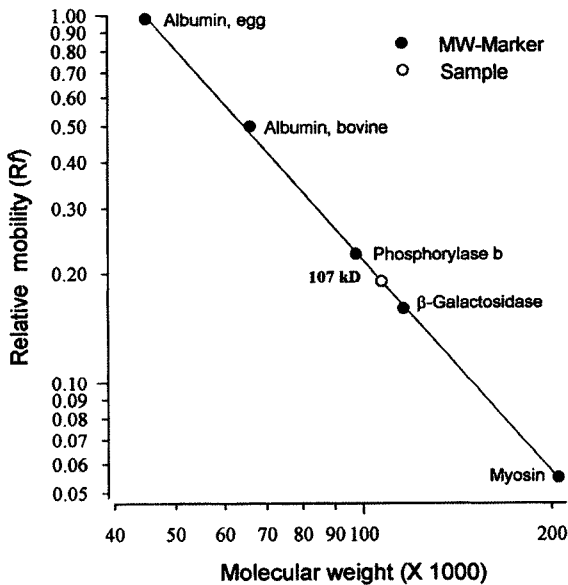


Fig. 9. Determination of molecular weight of purified yolk protein by SDS-PAGE (7%)

2) 난황단백전구체 (Vitellogenin, Vg)

난황단백전구체의 성숙 수컷에 Estradiol-17 β (E₂)를 삽입하여 합성을 유도하였고, 합성 여부는 E₂ 처리 후 48시간 간격으로 채혈한 혈청을 이용하여 전기영동으로 확인하였다(Fig. 10). 성숙 수컷에는 존재하지 않던 단백질 band (Fig. 10, 화살표)가 E₂ 처리 2일 후부터 합성되어 시간이 지남에 따라 혈청내에 현저히 증가하고 있음이 확인되었다. E₂ 처리에 의해 유도된 이 단백질이 암컷에 존재하는 난황단백전구체와 동일한 특성을 가지는지 확인하기 위해, 흡수항체(aFM)를 이용하여 성숙 암, 수 혈청과 E₂ 처리된 수컷 혈청과의 반응을 면역확산법으로 확인하였다. 그 결과(Fig. 11), 흡수항체에 대하여 미처리 수컷혈청(M)에서는 어떠한 반응도 보이지 않았지만, 암컷혈청(F)에서는 한개의 침강선이 형성되어 혈액내의 난황단백전구체와 반응하였음을 알 수 있었다. 더욱이, E₂ 처리된 수컷혈청(ME₂)에서도 암컷혈청과 같이 한개의 침강선이 형성되었고, 이 결과는 E₂ 처리에

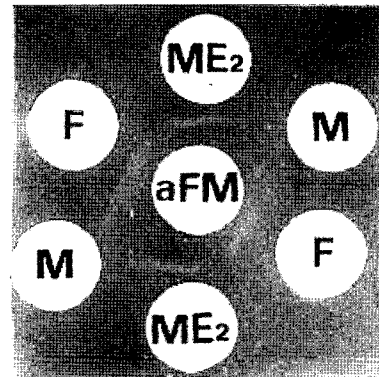


Fig. 11. Ouchterlony's immunodiffusion test of matured female serum(F), matured male serum(M), and E₂-treated male serum (ME₂). Antiserum was raised against matured female serum absorbed with matured male serum (aFM).

의해 난황단백전구체의 합성이 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 10, 11). 유도된 난황단백전구체는 상기의 방법으로 Mono Q HR5/5 column을 이용하여 분리하였고, 그 결과 fraction No. 15와 fraction No. 16에 해당하는 2개의 단백질 분획(PI, PII)으로 분리 용출되었다. 분리된 단백질의 면역학적 특성을 확인하기 위하여 각 분획(PI, PII)과 수컷 항혈청(anti-male serume; aM), 암컷 항혈청(anti-female serume; aF)을 이용하여 면역전기영동으로 반응을 확인하였다. Fig. 13에 나타난 결과와 같이, 암컷혈청(F)과 미처리 수컷혈청(M)은 각각 암컷 항혈청(aF), 수컷 항혈청(aM)과 강하게 반응되어 뚜렷한 침강선이 형성되었다. 뿐만 아니라, 미처리 수컷혈청(M)은 암컷 항혈청(aF)과도 반응되어 침강선을 형성함을 알 수 있었다. 이는 암컷과 수컷 혈청내에 공통으로 존재하는 혈청성분이 서로 반응한 것을 추정된다. 분리된 단백질 분획과의 반응에서는 PI 단백질 분획에서는 암컷 항혈청(aF)과 수컷 항혈청(aM)에 대하여 어떠한 반응도 관찰되지 않는 반면에, PII 단백질 분획에 대해서는 수컷 항혈청(aM)과는 반응하지 않았지만, 암컷 항혈청(aF)에 대하여 한개의 침강선이 형성되어 서로 반응함을 알 수 있었다. 이 결

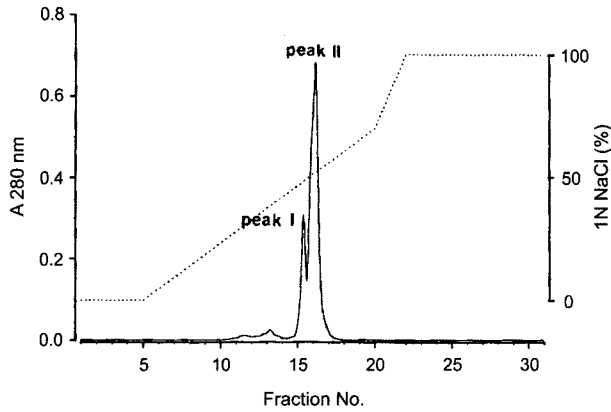


Fig. 12. Elution profile of E₂-treated male serum proteins on the Mono Q HR5/5 column.

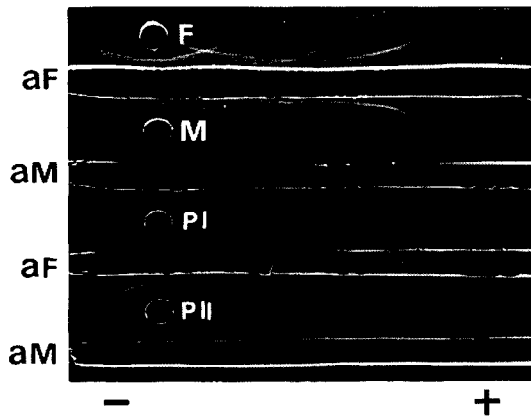


Fig. 13. Immunoelectrophoresis of matured female serum (F), matured male serum (M), and elution peak fraction (PI: peak I, PII: peak II). Antisera were used anti-matured female serum (aF) and anti-matured male serum (aM).

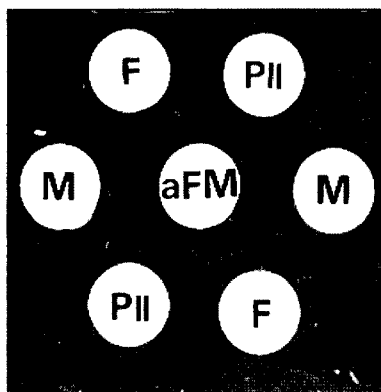


Fig. 14. Ouchterlony's immunodiffusion test of matured female serum (F), matured male serum (M), and purified vitellogenin (PII). aFM indicated antiserum against matured female serum absorbed with matured male serum.

과로부터 PII 분획 내에 난황단백전구체가 존재함을 알 수 있었고, 이는 흡수항체(aFM)를 이용한 면역확산 실험(Fig. 14)에서도 입증되었다. Fig. 14에 나타난 결과와 같이 흡수항체(aFM)

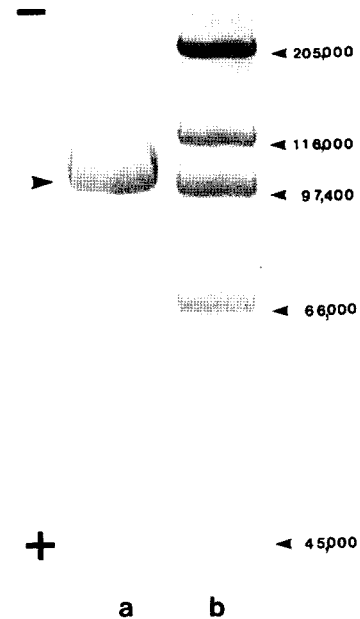


Fig. 15. SDS-PAGE (7%) of purified vitellogenin (a). The right lane (b) shows molecular mass markers (Da).

는 암컷 혈청(F)과 PII 단백질 분획과는 면역학적 반응을 보였지만, 수컷혈청(M)과는 반응되지 않았다. 이로써 수컷에 E₂ 처리로 인해 유도된 난황단백전구체가 PII 단백질 분획으로 분리되었음을 확인 할 수 있었다(Fig. 12-14). SDS-PAGE 결과로부터 분리된 난황단백전구체는 3개의 폴리펩티드로 구성되어 있음을 알 수 있었고(Fig. 15), 각 폴리펩티드의 분자량은 110 kDa, 125 kDa, 147 kDa 으로 추정되었다(Fig. 16). 난황단백전구체의 총 단백질 분자량은 Sephadex G-200를 이용하여 gel-filtration으로 분석한 결과(Fig. 17), 450 kDa으로 측정되었다(Fig. 15-17).

고 찰

본 연구에서는 동자개의 난황단백질(Vitellin, Vg)과 난황단백전구체(Vitellogenin, Vg)를 분리, 정제하였다. 동자개의 난황단백질은 성숙 암컷 난에서 gel-filtration을 이용하여 분리, 정제되었고, SDS-PAEG와 웨스턴 블로팅(western blotting) 결과로부터 난황단백질은 분자량이 107 kDa인 1개의 폴리펩티드로 구성된 것을 알 수 있었다. 그러나 난황단백질의 총 단백질 분자량은 360 kDa으로 측정되었다. 이는 동자개의 난황단백질은 같은 분자량의 폴리펩티드가 3개로 구성되어 있는 것으로 추정되어 진다. 난황단백전구체는 성숙 수컷에 Estradiol-17β (E₂)를 삽입하여 유도하였고 anion exchange chromatography로 분리되었다. 동자개의 난황단백질전구체(총 분자량 450 kDa)은 SDS-PAEG에서 3개의 폴리펩티드로 구성되어 있는 것을 알 수 있었다. 현재까지 보고된 경골어류의 난황단백전구체는 대부분 1

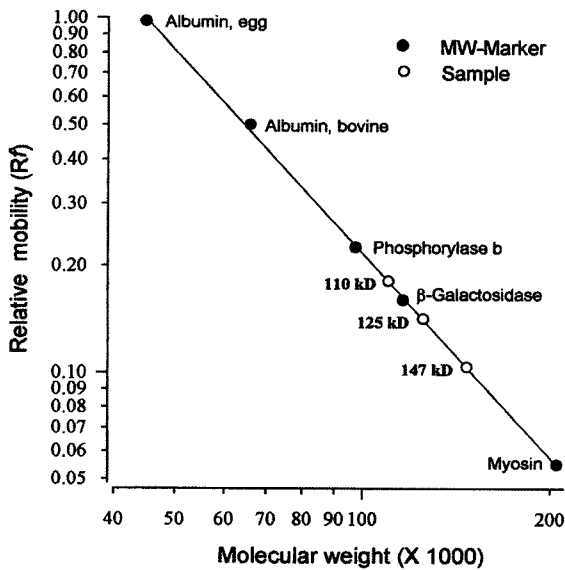


Fig. 16. Determination of molecular weight of purified vitellogenin by SDS-PAGE (7%).

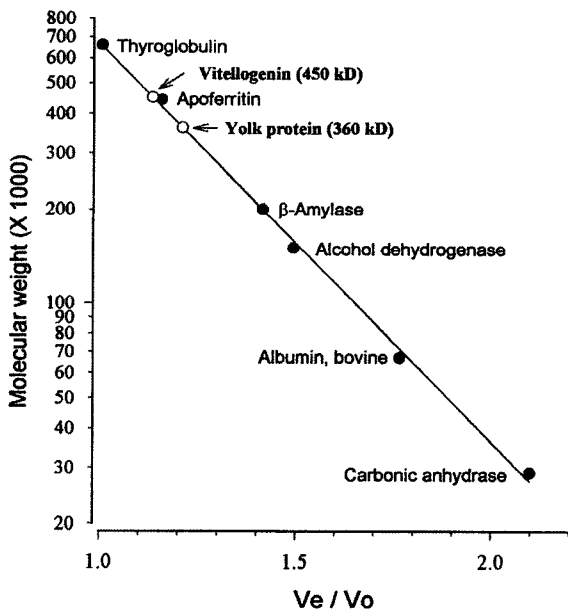


Fig. 17. Determination of molecular weight of yolk protein and vitellogenin by Sephadex G-200 column ($\phi 25 \times 800$ mm) gel chromatography.

개(monomers) 또는 2개(dimers)의 subunits로 구성되어 있지만 (Matsubara et al., 1999; Specker and Sullivan, 1994), 일부 종에서는 3-4개의 subunits로 구성되어 있다고 보고되었다 (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996). 동자개 역시 본 연구에서 3개의 subunits로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 16).

몇몇 경골어류에서는 난황단백전구체의 유전자가 분석되었고, 한 종에서 다수의 난황단백전구체의 유전자가 존재하는 것이 밝혀졌다(Hiramatsu et al., 2002; Wang et al., 2005; Kang et al., 2007). 잉어의 경우, E₂에 의해 성숙 수컷에서 2개의 난

황단백질전구체가 유도됨을 SDS-PAGE에서 확인하였고, 이들은 각각 다른 유전자를 암호화하는 것으로 밝혀졌다(Kang et al., 2007). 또한 화이트퍼치(white perch, *Morone americana*), 참돔(red seabream, *Pagrus major*), 모기고기(mosquitofish, *Gambusia affinis*)에서는 3개의 난황단백전구체 유전자가 밝혀졌다(Hiramatsu et al., 2002; Sawaguchi et al., 2005; Sawaguchi et al., 2006). 이들 유전자는 Vg-A, Vg-B, Vg-C 그룹으로 구분되며, 각각의 유전자는 lipovitellin I (LVI), phosvitin (PV), lipovitellin II (LVII) 프로세싱되어 난 내에 존재한다. 각 그룹의 유전자는 생리학적 특성에 따라 달리 사용되어진다고 추정되고 있고(Hiramatsu et al., 2002; Sawaguchi et al., 2006), 각 난황단백전구체는 난 내 축적되는 과정에서 프로세싱되어 PV와 LVII의 일부는(β' -component, C-terminal component)는 free amino acids로 변환되며, 난 내에는 대부분이 lipovitellin (LVI, LVII)이 난황단백질로 존재한다고 보고되어져있다 (Matsubara et al., 2003). 본 연구에서는 비록 유전자의 특성까지는 실험되지 않았지만, SDS-PAGE에서 확인한 결과, 동자개 역시 E₂ 처리한 수컷에서 3개의 subunit가 유도된 결과로부터 다수의 난황단백전구체 유전자의 존재를 배제할 수 없다. 더욱이 난 내에 존재하는 난황단백질은 107 kDa의 1개의 주요 단백질만이 SDS-PAGE에서 확인되었고(Fig. 7), 난황단백질에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블로팅 결과에서도 1개의 단백질이 반응되었다. 그러나 총 난황단백질의 분자량은 360 kDa로 측정된 것으로부터, 같은 면역학적 특성을 가지는 3개의 폴리펩티드가 존재하는 것으로 추정되었다. 이들 결과는 혈청내에 유도된 3개의 subunits는 각각의 다른 유전자를 암호화하는 난황단백전구체로 (Vg-A, Vg-B, Vg-C 그룹에 속하는) 추정되며, 이들 난황단백전구체가 각각 프로세싱되어, 비슷한 분자량의 LVI 영역만이 난 내에 존재되어 1개의 주요 난황단백질로 검출될 수 있는 가능성을 포함하고 있다. 본 연구 결과로부터 동자개에는 적어도 2개 이상의 난황단백전구체가 존재하는 것으로 생각되어진다.

난황단백전구체는 에스트로젠(estrogen)에 의해 유도되는 것으로부터, 경골어류의 수컷에 난황단백질전구체의 존재여부로부터 수생환경의 에스트로젠에 의한 오염 여부를 측정하는 바이오마커(biomarker)로 사용되어지고 있다. 최근까지 많은 종의 경골어류에서 바이오마커로서 난황단백전구체를 이용하여 에스트로젠의 오염 여부를 분석하였으며, 그들의 기초적인 연구는 난황단백전구체의 분리, 정제하여 항체형성으로 시작되었다(Sumpter and Jobling, 1995; Folmar et al., 1996; Tyler et al., 1996). 본 연구에서는 E₂에 의해 수컷에서 난황단백전구체를 유도하였고, 또한 성숙 암, 수컷의 혈청 및 난황단백질에 대한 항체를 이용하여 면역전기영동과 면역확산법으로 미처리 수컷 혈청에는 존재하지 않고, 난황단백질과 같은 면역학적 특성을 가지는 암컷이적인 난황단백전구체를 확인할 수 있었다. 이는 동자개의 난황단백질과 난황단백전구체의 생리학적 특성 뿐만 아니라, 본 연구를 기초로 하여, 본 종의 난황단백질에 대한 항체와 분리

된 난황단백전구체를 이용하여 수생환경의 오염여부를 측정하는 바이오마커로서의 사용도 기대되어 진다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 경상과제 지원에 의해 운영되었으며, 결과분석에 도움을 주신 동의대학교 생물학과 세포생물학 연구실 한창희 교수님께 감사 드립니다.

요 약

본 연구에서는 동자개, *Pseudobagrus fulvidraco*의 난황단백질(Vitellin, Vg)과 난황단백전구체(Vitellogenin, Vg)를 분리하였고, 그 특성을 분석하였다. 난황단백질은 성성숙한 난소 난으로부터 gel filtration chromatography (Sephadex - G200)을 이용하여 분리되었다. 동자개의 난황단백질은 SDS-PAGE에서 분자량이 107 kDa인 1개의 subunit로 구성되어 있었고, 총 난황단백질 분자량은 360 kDa으로 측정되었다. 난황단백전구체는 성숙한 수컷에 E₂를 삽입하여 유도하였고, anion exchange chromatography (Momo Q HR 5/5 column)을 이용하여 분리되었다. 분리된 난황단백전구체의 총 분자량은 450 kDa으로 계산되었고, 이는 SDS-PAGE 하에서 110 kDa, 125 kDa와 147 kDa로 3개의 subunit로 구성되어져 있었다.

참고문헌

- Byrne, B.M., Jong, H., Fouchier, R.A.M., Williams, D.L., Gruber, M., AB, G., 1989. Rudimentary phosvitin domain in a minor chicken vitellogenin gene. *Biochemistry*, 28, 2572-2577.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillelte Jr., L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, 104, 1096-1101.
- Hara, A. and H. Hirai, 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Bio. Physiol.*, 59B, 339-343.
- Hiramatsu, N., T. Matsubara, A. Hara, D.M. Donato, K. Hiramatsu, N.D. Denslow and C.V. Sullivan, 2002. Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.*, 26, 355-370.
- Jung, J.-H., J.-K. Jeon, W.-J. Shim, J.R. Oh, J.-Y. Lee, B.-K. Kim and C.-H. Han, 2005. Molecular cloning of vitellogenin cDNA in rockfish (*Sebastes schlegeli*) and effects of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) on its gene expression. *Mar. Pollut. Bull.*, 51, 794-800.
- Kang, B.J., J.-H. Jung, J.M. Lee, S.-G. Lim, H. Saito, M.H. Kim, Y.-J. Kim, M. Saigusa and C.-H. Han, 2007. Structural and expression analyses of two vitellogenin genes in the carp, *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 148, 445-453.
- LaFleur Jr., G.J., D. Raldua, M. Fabra, O. Carnevali, N. Denslow, R.A. Wallace and J. Cerda, 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, 73, 815-824.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lim, S.G. and C.H. Han, 1997. Annual reproductive cycle of the banded catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*(Richardson). *J. Korean Fish. Soc.*, 30(5), 823-833.
- Matsubara, T., M. Nagae, N. Ohkubo, T. Andoh, S. Sawaguchi, N. Hiramatsu, C.V. Sullivan and A. Hara, 2003. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 295-299.
- Miracle, A., G. Ankley and D. Lattier, 2006. Expression of two vitellogenin genes (vg1 and vg3) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 337-342.
- Mommsen, T.P. and P.J. Walsh, 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. (in) Hoar, W.S. and D.J. Randall, (eds.), *The Physiology of Developing Fish, Part A. Eggs and Larvae*, vol. XI. Academic press, NY, pp. 347-406.
- Ohkubo, N., T. Andoh, K. Mochida, S. Adachi, A. Hara and T. Matsubara, 2004. Deduced primary structure of two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 137, 19-28.
- Reith, M., Munholland, J., Kelly, J., Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2001. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.* 291, 58-67.
- Sawaguchi, S., H. Kagawa, N. Ohkubo, N. Hiramatsu, C.V. Sullivan and T. Matsubara, 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 719-736.
- Sawaguchi, S., Y. Koya, N. Yoshizaki, N. Ohkubo, T. Andoh, N. Hiramatsu, C.V. Sullivan, A. Hara, and T. Matsubara, 2005. Multiple vitellogenins (Vgs) in mosquitofish (*Gambusia affinis*): identification and characterization of three functional Vg genes and their circulating and yolk protein products. *Biol. Reprod.*, 72, 1045-1060.
- Sole, M., D. Raldua, F. Piferrer, D. Barcelo and C. Porte, 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 136, 145-156.
- Specker, J.L. and C.V. Sullivan, 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. (in) Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council Canada, Ottawa, pp. 304-315.

- Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, 103, 173-178.
- Tyler, C.R., B. van der Eerden, S. Jobling, G. Panter and J.P. Sumpter, 1996. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *J. Comp. Physiol. B*, 166, 418-426.
- Ultrabhand, P. and P. Bunlipatanon, 1996. Plasma vitellogenin of Grouper(*Epinephelus malabaricus*) : Isolation and properties. *Comparative Biochemistry and physiology. C*, 115(2), 101-110.
- Wallace, R.A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. (in) Browder, L.W. (ed.), *Developmental Biology*, vol. 1. Oogenesis. Plenum Press, NY, pp. 127-177.
- Wang, H., J. Tan, T.T., A. Emelyanov, V. Korzh and Z. Gong, 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*, 356, 91-100.
-
- 원고접수 : 2008년 10월 7일
심사완료 : 2008년 11월 1일
수정본 수리 : 2008년 11월 8일