

4-nonylphenol에 노출된 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus s.l.*의 생활사, 형태와 유전자 발현

방현우 · 이원철¹ · 이승한¹ · 박인실*

(전남대학교 해양기술학부, ¹한양대학교 생명과학과)

Life Cycle, Morphology and Gene Expression of Harpacticoid Copepod, *Tigriopus japonicus s.l.* Exposed to 4-nonylphenol. Bang, Hyun Woo, Wonchoel Lee¹, Seunghan Lee¹ and Inn-Sil Kwak* (Division of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea; ¹Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

The eco-toxicological effects of endocrine disrupter, 4-nonylphenol (4NP) were observed and detected on the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus s.l.* obtained and cultured from our coast. There were no significant differences survival rate, sex ratio, and fecundity on *T. japonicus s.l.* at as low as 30 µg L⁻¹ of 4NP exposure. Whereas, 4NP induced developmental delay, decreasing biomass and body size of nauplius and copepodite. Also, Differentially Expressed Gene (DEG) was conducted to detecting gene expression for potential biomarkers response to 4NP. As a result, full life-cycle research on morphology and gene expression of *T. japonicus s.l.* suggested potential bioindicators or biomarkers for environmental monitoring and assessments.

Key words : 4-nonylphenol, copepod, *Tigriopus japonicus s.l.*, developmental delay, gene expression

서 론

현재 여러 종류의 무척추동물들이 독성 시험 생물로써 이용되고 있으며 요각류 역시 다양한 형태로 시험에 사용되고 있다. Hutchinson *et al.* (1994)이 저서성 요각류 *Tisbe battagliai*를 이용한 세 가지 중금속에 대한 독성 실험을 통해 유생과 성체 모두 물고기 *Cyprinodon variegatus* 유생보다 훨씬 높은 민감도를 보임을 보고한 것을 시작으로, 최근에는 다양한 연구에서 요각류를 독성 시험 생물로서 이용하고 있다(Bechmann, 1994; Baldwin *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 2001; Barata *et al.*, 2002; Hutchinson, 2002; Breitholtz and Wollenberger, 2003; Breitholtz *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003; Marcial *et al.*,

2003; Wollenberger *et al.*, 2003; Chandler *et al.*, 2004; Kwak *et al.*, 2005; Wollenberger, 2005).

특히 ISO (International Organization for Standard, 1997)와 ASTM (American Society for Testing and Materials, 2004)에서 해양 오염 물질 독성평가 표준시험 방법에 요각류를 시험 생물로 제시하고 있다. 이 외에도 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development, 2005)에서 화학물질 시험에 관한 지침 초안에 요각류의 성장과 생산력을 이용하는 방법을 제시하였다. 독성평가 표준시험 방법에 요각류를 이용하는 이유는 생태계 내에서 식물플랑크톤과 어류 사이의 중요한 위치를 차지하고, 배양이 쉽고 연구실 내 이동이 쉬우며, 상호포식(cannibalism)이 없고, 보통 2주 정도의 짧은 생활사를 보이기 때문이다. 또한 유성생식을 하고, 비교적 저배율

* Corresponding author: Tel: 061) 659-3193, Fax: 061) 659-3199, E-mail: iskwak@chonnam.ac.kr

에서도 성 확인이 가능하며, 유생의 단계별 구분이 쉽고, 실험 시 독성물질이 소량만 필요하며, 대체적으로 독성에 민감하게 반응하고, 표준시험 방법이 있으며, 장기/단기 독성실험이 모두 가능하기 때문이다(DeFur *et al.*, 1999; Kusk and Wollenberger, 2007).

대부분의 수서 생태계 오염에 의한 생물의 건강성을 판단하기 위해 이루어진 연구들은 생리, 분자 생물학적인 방향으로 진행되고 있다. 그러나 현재까지 생태계 내에서 환경오염이 무척추동물의 형태학적 변화를 야기할 수 있다는 보고는 거의 되어있지 않다(Kwak and Lee, 2007). 다만 중금속과 농약에 노출된 수서 무척추동물, 갈따구 유충의 구기와 두부에서 기형을 유도한다는 보고(Hamilton and Saether, 1971)와, 내분비계 교란물질이 장수갈따구의 구강기형을 유도한다는 몇 편의 보고(Kwak and Lee, 2005; 2007)가 있을 뿐이다. 형태학적 변이를 이용한 생태계 평가는 비교적 신속하고 간편하며 저렴한 방법이다. 최근 곤쟁이(*Americamysis bahia*)를 이용한 내분비계 교란물질 시험법에서 형태학적 방법을 도입하려는 시도(Verslycke *et al.*, 2007)와 갈따구를 이용한 시도(Kwak and Lee, 2005; 2007) 등이 이루어지고 있으나, 이는 대부분 대형 무척추동물을 이용한 연구이며, 요각류와 같은 중형 저서생물의 형태적 변이를 통한 환경오염 지표 연구는 보고된 바 없다. 언급한 바와 같이 요각류는 독성시험 생물로 다양한 장점을 갖고 있기 때문에 현재까지 알려진 요각류를 이용한 내분비계 교란물질에 대한 연구와 형태학적 연구를 병행한다면 보다 빠르고 민감하게 환경 변화를 확인할 수 있는 기준을 제시해 줄 수 있을 것이다.

본 연구의 목적은 독성시험 생물로서 많은 장점을 가지고 있는 저서성 요각류 중 우리나라 연안에서 쉽게 발견할 수 있는 *Tigriopus japonicus s.l.*를 이용하여 내분비계 교란물질인 4-nonylphenol에 대한 생존, 성장, 생식 등의 반응과, 형태학적인 오염 판단의 기준이 될 수 있는 외형 변화, 그리고 DEG (Differentially Expressed Gene)를 이용한 단백질 발현의 변화를 확인하여, 향후 보다 빠르고 민감하게 환경 변화를 감지할 수 있는 환경 위해성 평가 연구 표준시험 생물로서 적용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 생물인 저서성 요각류의 특징

저서성 요각류 *Tigriopus* 속은 광염성을 지닐 뿐 아니

라, 전 세계적으로 분포하고, 연안의 조수 웅덩이에서 쉽게 채집할 수 있으며, 생활사가 짧고, 현장에서 다량 채집이 가능하며, 실험실 내 배양이 용이하고, 수온과 pH에 대해 매우 넓은 내성 한계를 갖는 것으로 잘 알려져 있다(Ito, 1970; Koga, 1970; Hagiwara *et al.*, 1995; Forget-Leray *et al.*, 1998; Marcial *et al.*, 2003). *Tigriopus japonicus*는 6단계의 nauplius 유생 단계와 6단계의 copepodite 유생 단계의 생활주기를 가지며, 마지막 6번째 copepodite 단계가 성체다. 수컷과 암컷의 구분은 제1촉각과 5번째 유영지의 차이로 구분할 수 있다(Ito, 1970).

2. 채집 및 배양 조건

*Tigriopus japonicus s.l.*는 전라남도 여수시 만성리 해수욕장 부근 조수 웅덩이에서 소형 핸드넷(망목 크기 63 mm)으로 채집한 후 배양하였다. 배양액으로 사용한 해수는 1차 증류수와 인공 해수염(Crystal Sea Marine Mix, Crystal Sea®)을 이용하여 농도 25 psu로 제조하였다. 실험 기간 중 수온 20°C, DO 80% 이상, pH 8±0.3, light/dark=16/8 조건에서 항온기(Sanyo incubator MIR-553) 내에서 배양하였다. 먹이로는 Tetramin(Tetra-Werke, Melle, Germany)을 미세하게 처리한 후 현탁액 상태로 공급하였다. 이러한 배양 조건은 ISO의 표준시험 방법을 참고하였다(ISO, 1997).

3. 실험 독성 물질

독성 실험 물질로 에스트로젠 성 화합물인 4-nonylphenol(4NP; Sigma-Aldrich, cas no. 104-40-5)을 사용하였으며, Carrier solvent로 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하였다. 최종 농도가 최대 0.01% (v/v) 이하가 되도록 했으며, 독성 물질은 대조군과 solvent 대조군을 포함하여 0.1, 1, 10, 30, 100 µg L⁻¹ 농도로 실험하였다.

4. 독성 노출 및 외형 관찰

모든 노출실험은 배양 조건과 같은 환경에서 실시하였으며, 시험 용기로는 60×15 cm petri-dish (Arambra)와 6-well, 24-well cell culture plate (SPL)를 이용하였다. 독성실험은 ISO의 표준시험 방법을 참조하여 각각 유생과 성체를 대상으로 실시하였다(ISO, 1997). 유생은 부화 후 12시간 이내의 nauplius 유생 1단계를, 성체는 포란한 암컷 성체를 이용하였다. 노출 대상 개체는 한 농도 당 최소 5개체씩 6회 이상 반복실험을 실시하였으며, 생존율, 성장률, 포란, 부화 등을 24시간 간격으로 확인하였다. 실

험 기간 중 독성 물질의 반감기를 고려하여 3일 간격으로 사육수를 교체해 주었다.

치사의 결정은 개체를 5분 동안 관찰하여 아무런 움직임이 없는 경우 사망한 것으로 판단한 후 24시간 이후에 사망을 확정하여 생존율을 결정하였으며, copepodite 유생이 되는 시기를 매일 관찰하여 copepodite 출현일을 결정하였다. 수컷 출현일은 성체 수컷이 관찰되는 시기를 통해 판단하였으며, 성체가 된 개체를 대상으로 각각 성비, 포란일, 포란율 등을 확인하였다.

실험 후 모든 개체는 70% 에탄올로 고정하여 보관하였으며, 해부 현미경 (Olympus SZX12), 광학 현미경 (Olympus BX-51) 등을 사용하여 체장, 체적, 각 부속지의 외형 변화 등을 측정 관찰하였다. 각 개체의 길이와 폭은 해부 현미경과 광학 현미경에 부착된 카메라를 이용하여 이미지 분석 프로그램 (MetaMorph 6.0)에서 계산하였으며, 생체량 (biomass) 측정은 Feller and Warwick의 Volumetric method (Higgins and Thiel, 1988)를 이용하였다.

5. 유전자 발현

유전자 발현 양상을 확인하기 위해 DEG (Differentially Expressed Genes) 방법을 이용하였다. 각 대조군과 실험군 별로 500개체 이상의 *T. japonicus*를 96시간 동안 노출시킨 후 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 GeneFishing™ DEG Kits (Seegene, Korea)를 이용하여 유전자 발현 차이를 확인하였다. DEG란 비교대상 시료 간에 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자를 비교적 쉽게 비교 확인 할 수 있는 방법이다. DEG는 primer내에 regulator부위를 갖는 ACP (annealing control primer)라는 특수한 primer를 이용함으로써 specificity가 높아 false positive가 없으며, 재연성이 뛰어나다. 또한 특별한 기술을 필요로 하지 않아 간편하게 확인이 가능하며, 비교적 빠르게 결과를 확인할 수 있고, PAGE가 필요 없이 agarose gel만으로 충분히 확인 가능하다는 장점이 있다. DEG를 통해 발현 차이가 확인된 유전자는 NCBI blast의 blastx search를 통해 확인하였다.

6. 통계 분석

각각의 독성 물질에 대한 시험종의 생존율, 성장률, 포란율 등을 분석하기 위해 SPSS 프로그램 (ver. 12.0)을 이용하였다. 기본적으로 모든 통계 분석은 t-test를 기본으로 하였으나, 성비는 X²검정을 통하여 분석하였으며, 모든 분석은 유의수준 $p < 0.05$ 에서 검정하였다.

Table 1. Survival rates and developments of *Tigriopus japonicus* s.l. exposed to different concentrations of 4-nonylphenol.

	n		NS (%)	CS (%)	CE (day)	ME (day)
Control	145	Mean	96.55	97.86	5.20	10.33
		SD	9.36	6.07	0.65	0.49
Solvent C	120	Mean	96.67	100.00	5.11	11.05
		SD	7.61	0.00	0.63	3.05
0.10	30	Mean	96.67	100.00	6.31*	12.61*
		SD	8.16	0.00	0.71	0.50
1.00	30	Mean	80.00	100.00	6.42*	12.50*
		SD	25.30	0.00	0.58	0.52
10.00	30	Mean	87.50	96.43	7.54*	13.00*
		SD	9.98	8.16	1.23	0.91
30.00	30	Mean	90.00	92.59	7.22*	12.46*
		SD	10.95	10.33	1.01	0.52
100.00	30	Mean	43.33*	84.62	6.80*	14.90*
		SD	49.67	23.09	1.64	3.72

n: number of individuals

NS: nauplius survival rate

CS: copepodite survival rate

CE: copepodite emergence day; periods from birth to copepodite stage

ME: adult male emergence day; periods from birth to adult male

SD: standard deviation

*: asterisks denote a significant difference from control by t-test ($p < 0.05$)

결 과

1. 노출농도 별 생존율과 발생 소요기간

4NP 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 을 제외한 모든 농도에서 대조군과 실험군의 생존율 차이는 나타나지 않았으나 모든 독성 처리 농도에서 유생의 성장이 대조군에 비해 느린 것으로 나타났으며, 농도가 높아질수록 성장이 둔화되는 경향을 보였다 (Table 1). 대조군 nauplius 유생의 생존율(NS)은 $96.55 \pm 9.36\%$, copepodite 유생(CS)은 $97.86 \pm 6.07\%$ 로 나타났다 (Table 1). Nauplius 유생은 5일째부터 최대 8일째에 copepodite 유생으로 성장하여, 평균 5.20 ± 0.65 일이 소요되었다. 개체 발생 후 10일째 되는 날부터 성체 수컷이 관찰되기 시작했으며, 모든 성체 수컷은 11일 이내에 성체가 되어 평균 수컷 성체 출현일은 10.33 ± 0.49 일로 나타났다. Carrier solvent인 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 대한 nauplius 유생의 생존율은 $96.67 \pm 7.61\%$, copepodite 유생 생존율은 100.00%, copepodite 출현일은 5.11 ± 0.63 일, 성체 출현일은 11.05 ± 3.05 일로 모든 실험에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 30

$\mu\text{g L}^{-1}$ 이하의 농도에서는 nauplius 유생의 생존율이 80.00~96.67%로 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 43.3±49.67%의 낮은 생존율을 보였다(Table 1). 시간에 따른 생존율을 살펴보면 발생 후 6일 이전까지 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 이하 농도에서는 90% 이상의 비교적 높은 생존율을 보였으나 7일째부터 1, 10, $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 90% 이하로 생존율이 떨어졌고, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 실험 시작 직후부터 50% 이하의 매우 낮은 생존율을 보였다.

Copepodite 유생은 모든 농도에서 약 85% 이상의 비교적 높은 생존율을 보였다. Copepodite 출현일(CE)을 관찰한 결과 농도가 높아짐에 따라 성장이 둔화되는 경향을 보이는 것으로 나타났다(Table 1). 저농도인 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서의 copepodite 유생 출현일은 평균 6.31 ± 0.71 일로 대조군에 비해 약 1.1일 늦은 것으로 관찰되었으며, 농도가 높아짐에 따라 성장 지연 효과는 크게 나타나, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 평균 7.54 ± 1.23 일로 대조군보다 약 2.3일 지연되었다. 성체 수컷의 출현 시기(ME)를 살펴본 결과 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 저농도에서 평균 12.61 ± 0.50 일로 대조군보다 약 2.3일 성장 지연 효과를 보였으며, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 평균 14.90 ± 3.72 일로 매우 느린 성장을 보여주었다(Table 1).

2. 노출농도별 성비 (sex ratio: SR), 포란율 (brooding success rate: BR) 및 최초 포란일 (first brooding day: FB)

성비(SR)의 경우 전체적으로는 농도가 증가할수록 수컷의 출현이 증가하는 경향을 보이나 모든 농도에서 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 2). 대조군 성체에서는 수컷이 61.48%를 차지하였으며, 4NP 처리군의 농도별 성체 수컷 비율은 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 와 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 암컷이 대조군보다 상대적으로 많이 출현하는 것으로 나타났다고, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 와 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 수컷이 많이 나타났다.

포란율(BR)은 농도에 따른 차이는 보이지 않았으나, 독성 농도가 증가함에 따라 최초 포란일(FB)이 지연되는 경향이 뚜렷하게 나타났다(Table 2). 대조군 암컷의 포란율은 $98.08 \pm 5.0\%$, 최초 포란일(FB)은 평균 13.64 ± 0.67 일로 나타났다. 4NP 처리군의 암컷 성체는 포란에 모두 성공하였으며, 최초 포란일(FB)은 농도가 증가함에 따라 지연되는 경향이 뚜렷하게 나타났다. $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 평균 15.91 ± 0.70 일로 대조군보다 약 2.3일 느렸으며, 농도가 높아짐에 따라 최초 포란일(FB)은 지연되어, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서의 포란은 평균 18.70 ± 0.58 일로 대조군보다 약 5.1일 느린 것으로 나타났다.

Table 2. Sex ratio, brooding success rates and brooding days of *Tigriopus japonicus s.l.* exposed to different concentrations of 4-nonylphenol.

	n		SR (M%)	BR (%)	FB (day)
Control	140	Mean	61.48	98.08	13.64
		SD	-	10.00	0.67
Solvent C	30	Mean	63.33	100.00	14.27
		SD	-	0.00	1.90
0.10	29	Mean	62.07	100.00	15.91*
		SD	-	0.00	0.70
1.00	24	Mean	50.00	100.00	17.00*
		SD	-	0.00	1.54
10.00	26	Mean	66.67	100.00	17.56*
		SD	-	0.00	2.70
30.00	27	Mean	52.00	100.00	16.50*
		SD	-	0.00	1.45
100.00	13	Mean	72.73	100.00	18.70*
		SD	-	0.00	0.58

n: number of individuals

SR: sex ratio; percentage of male in population

BR: brooding success rate

FB: first brooding day; periods from birth to female borne egg sac

SD: standard deviation

*: asterisks denote a significant difference from control by t-test ($p < 0.05$)

†: crosses denote a significant difference from control by X²-test ($p < 0.05$)

3. 독성물질 노출에 따른 크기 변화

4NP의 농도가 높아짐에 따라 개체의 길이(length)와 폭(width), 생체량(biomass)이 작아지는 것으로 확인되었다(Table 3). 대조군은 암컷이 수컷보다 체장, 폭, 생체량이 더 큰 것으로 나타났다(Table 3). 성체 암컷의 체장은 $1034.25 \pm 61.89 \mu\text{m}$, 폭은 $355.38 \pm 13.06 \mu\text{m}$, 생체량은 $5.90 \pm 0.45 \mu\text{g C}$ 로 나타났다. 성체 수컷의 체장, 폭, 생체량은 각각 $858.19 \pm 36.90 \mu\text{m}$, $322.49 \pm 11.47 \mu\text{m}$, $4.04 \pm 0.38 \mu\text{g C}$ 로 측정되어, 암컷이 수컷에 비해 체장은 1.21, 폭은 1.10 생체량은 1.46배가 더 큰 것으로 나타났다.

4NP에 노출된 암컷의 체장, 폭, 생체량은 4NP $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 대조군과 차이를 보이지 않았으나, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서 유의한 차이를 보였다. 암컷 개체의 체장은 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 보여, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $946.43 \pm 38.65 \mu\text{m}$ 로 대조군에 비해 매우 짧게 나타났다($p < 0.05$). 수컷의 체장은 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서만 차이를 보였으나, 개체의 폭과 생체량은 저농도에서부터 고농도까지 모든 농도에서 차이를 보였다. 수컷 체장은 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 까지는 체장이 길어지다 다시 짧아졌

Table 3. Morphological characters of *Tigriopus japonicus s.l.* in relation to different concentrations of 4-nonylphenol.

	Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$)	n	Female			n	Male		
			Length (μm)	Width (μm)	Biomass (μgC)		Length (μm)	Width (μm)	Biomass (μgC)
Control	Mean	10	1034.25	355.38	5.90	10	858.19	322.49	4.04
	SD		61.89	13.06	0.45		36.90	11.47	0.38
0.1	Mean	10	1011.85	336.25	5.23	10	781.81*	297.33*	3.13*
	SD		84.46	22.36	1.03		41.06	12.28	0.35
1	Mean	10	1011.38	346.44	5.55	10	847.78	290.48*	3.24*
	SD		48.03	26.50	1.09		24.27	10.76	0.30
4NP	10	8	1005.29	326.60*	4.86*	10	869.69	284.03*	3.17*
	SD		9.97	19.96	0.58		21.38	10.44	0.18
30	Mean	7	997.15	330.21	4.96*	1	857.59	276.35*	2.96*
	SD		39.01	27.54	0.92		-	-	-
100	Mean	3	946.43*	309.85*	4.11*	6	799.29*	261.36*	2.48*
	SD		38.65	3.04	0.21		42.36	18.33	0.39

*: asterisks denote a significant difference from control ($p < 0.05$)

Table 4. DEGs sequence analysis using NCBI blast search.

GP No.	Size (bp)	Sequence homology search
GP 1	477	No significant similarity found
GP 2	478	No significant similarity found
GP 2	253	No significant similarity found
GP 4	437	No significant similarity found
GP 5	452	- CAA60129 trypsin [<i>Litopenaeus vannamei</i>] Length=266, Score=127 bits (320), Expect=2e-28, Identities=77/141 (54%), Positives=90/141 (63%), Gaps=8/141 (5%)
		- CAH61460 trypsin [<i>Lepeophtheirus salmonis</i>] Length=249, Score=120 bits (300), Expect=3e-26, Identities=73/134 (54%), Positives=89/134 (66%), Gaps=3/134 (2%)
GP 7	971	- BAD91181 putative mitochondrial adenylate transporter [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>] Length=388, Score=313 bits (802), Expect=9e-84, Identities=156/221 (70%), Positives=175/221 (79%), Gaps=2/221 (0%)
		- AAA75627 rhodesiense ADP/ATP carrier [<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>] Length=307, Score=312 bits (799), Expect=2e-83, Identities=166/253 (65%), Positives=203/253 (80%), Gaps=3/253 (1%)
GP 15	413	- NP001003596 dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit [<i>Danio rerio</i>] Length=250, Score=212 bits (539), Expect=6e-54, Identities=104/125 (83%), Positives=113/125 (90%), Gaps=0/125 (0%)
		- NP001089465 hypothetical protein LOC734516 [<i>Xenopus laevis</i>] Length=247, Score=210 bits (535), Expect=2e-53, Identities=102/125 (81%), Positives=114/125 (91%), Gaps=0/125 (0%)
GP 15	385	No significant similarity found

다.

노출된 개체의 암·수컷 모두에서 폭은 농도 증가에 따라 감소되었다. 암컷의 생체량은 저농도에서는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서는 대조군의 70~85%로 감소하는 것으로 나타났다. 4NP 노출 수컷 생체량은 2.5~3.2 μgC 범위로 대조군의 60~80%

로 감소되어 유의한 차이를 보였다.

4. 유전자 발현

총 20개 ACP™ primer를 이용하여 DEG 실험을 한 결과 20여 개의 유전자 변화를 확인하였다(Fig. 1). 발견

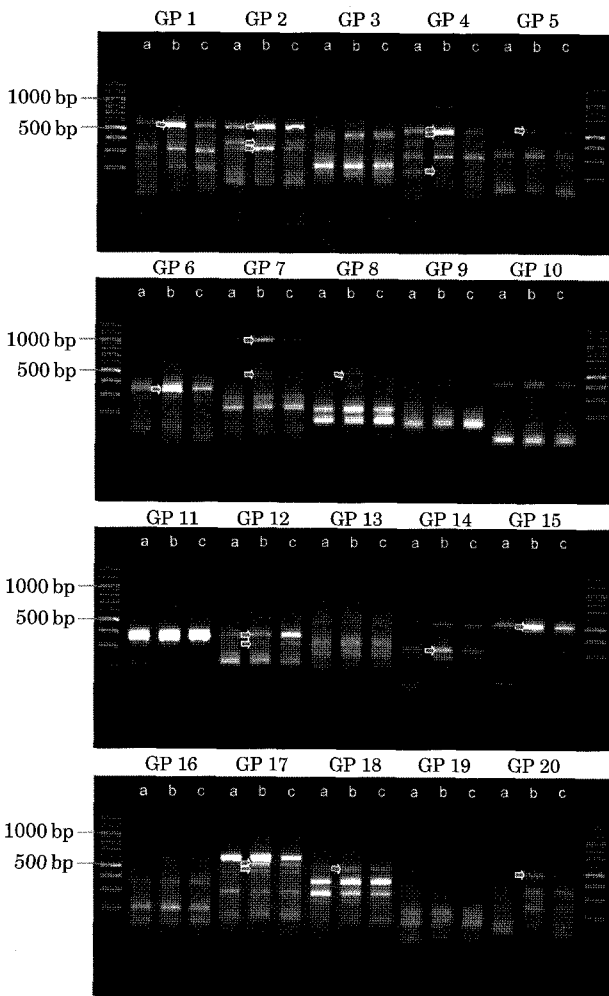


Fig. 1. Differentially expressed genes from *Tigriopus japonicus s.l.* exposed to 4-nonylphenol. (a) control, (b) 4NP 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, (c) 4NP 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

된 유전자 모두 4NP 처리시 발현이 증가되는 것으로 나타났다. 대부분의 유전자는 4NP 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 많이 발현하였고, 농도가 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 로 높아지면 발현량이 감소되었다. 이 중 변화가 뚜렷한 8개 유전자를 blast search를 통하여 검색하여 3개의 유전자를 확인하였으며, 나머지는 미확인 유전자로 판명되었다(Table 4). 확인된 유전자는 GP5, GP7, GP15에서 각각 trypsin, mitochondrial carrier protein, dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1 catalytic subunit으로 나타났다.

고 찰

미국, 유럽, 일본 등의 선진국에서는 하천이나 연안의

내분비계 교란물질을 확인하는 연구가 예전부터 이루어져 왔다. Nonylphenol의 경우 영국 하천에서 최대 180 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이 검출되기도 하였으며(Blackburn and Waldoock, 1995), 기수역에서는 최대 5.2~5.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이 검출되었다(Blackburn *et al.*, 1999). 스위스에서도 최대 7.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Ahel *et al.*, 1996), 독일, 프랑스에서는 최대 약 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 가 검출되었으며(Bolz *et al.*, 2001, Isobe *et al.*, 2001), 스페인에서는 무려 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 nonylphenol이 검출되기도 하였다(Sole *et al.*, 2000). 미국은 기수역에서 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Ferguson *et al.*, 2001), 일본의 경우에는 하천에서 약 1.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fenet *et al.*, 2003), 그리고 우리나라에서는 1999년 조사에서 최대 5.9 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2004년에 최대 1.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ 가 검출되었다(국립환경과학원, 2005).

17 β -estradiol, bisphenol A, 4-nonylphenol, p-t-octylphenol에 대한 요각류 *Tigriopus japonicus*의 연구(Marcial *et al.*, 2003)와, nonylphenol, 17 β -estradiol, benzo(a)pyrene, atrazine, DEHP에 대한 *Eurytemora affinis*의 연구(Forget-Leray *et al.*, 2005)에서도 생존율은 대조군과 차이가 나타나지 않았으며, *T. japonicus*가 4NP 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서는 대조군보다 생존율이 떨어졌으나, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이하에서는 대조군과 생존율의 차이를 보이지 않았다(Kwak *et al.*, 2005). 요각류 *Tisbe battagliai*는 nonylphenol 31 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출되었을 때 생존율, 성비, 포란율, 부화율 등에 영향을 주지 못하는 것으로 나타났으며(Bechmann, 1999), 천연/합성 에스트로겐 역시 *T. battagliai* 생활사에 영향을 미치지 않는다고 하였고(Hutchinson *et al.*, 1999a, b), 성장 단계, 노출 시간별(14일, 21일) 독성 처리에 대한 반응 실험에 실험군 간 차이가 없다고 하였다(Kovatch *et al.*, 1999). 그러나 *T. battagliai*에서는 nonylphenol 농도가 62 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상이 되면 생존율이 급속하게 떨어지고, 125 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서는 모두 치사하며(Bechmann, 1999), *T. japonicus*의 4NP에 의한 LC50이 510 $\mu\text{g L}^{-1}$ 로 보고하였다(Marcial *et al.*, 2003). 따라서 저서성 요각류는 고농도의 내분비계 교란물질에 노출되었을 때 생존율이 떨어지는 경향을 보여주었으나, 일반적인 하천 및 연안, 오염 지역의 일반적인 농도에서는 생존율이 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

4NP 처리 실험군은 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 nauplius가 약 40%의 낮은 생존율을 보였으나 나머지 농도에서는 대조군과 생존율 차이는 보이지 않았으며, copepodite 단계에서는 모든 농도에서 대조군과 차이를 보이지 않았다. 그러나 *T. japonicus* nauplius 유생과 copepodite 유생의 성장 속도는 모든 농도에서 대조군보다 성장이 지연되는 것으로 나타났으며, 이 결과는 Marcial *et al.* (2003)의 연구와

Chandler *et al.* (2004)의 결과와도 일치하였다. 살충제 Fipronil이 *A. tenuiremisi*의 성장속도를 지연시키며, 저농도에서 수컷의 생식 능력을 떨어뜨린다는 보고가 있었으며(Chandler *et al.*, 2004), *Eurytemora affinis*는 내분비계 교란물질에 의해 nauplius 유생의 성장이 느려진다는 보고를 하였다(Forget-Leray *et al.*, 2005). 그러나 몇몇 연구에서는 내분비계 교란물질이 개체의 성숙, 포란, 부화 시간에는 영향을 미치지 않는다는 보고도 된 경우도 있다(Bejarano and Chandler, 2003).

Cary *et al.* (2004)은 *A. tenuiremisi*가 저농도의 steroid에 노출 시 수컷의 vitellogenin이 유발되며, 생식능력이 저하됨을 보고하였고, Chandler *et al.* (2004)은 저농도의 내분비계 교란물질이 수컷의 생식 능력을 떨어뜨린다고 하였다. 반면에 *T. japonicus*와 담수 저서성 요각류 *Bryocamptus zschokkei*는 내분비계 교란물질에 의해 포란율, 부화율 등 생식능력의 저하현상을 찾아볼 수 없었다(Brown *et al.*, 2003; Marcial *et al.*, 2003).

유전자 발현 양상의 변화를 살펴보기 위해 사용된 GeneFishing™ PCR GP5에서 발현 양상이 다르게 나타난 유전자는 기생성 요각류 *Litopenaeus vannamei*의 트립신(trypsin)과 유사한 것으로 나타났다(Genbank accession no.=CAA60129). 일부 연구에서 트립신이 외부 독성에 의한 세포막 변형을 억제시켜준다는 연구가 보고된 바 있다(Frimmer *et al.*, 1977). 두 번째로 유전자 발현 양상이 다르게 나타난 GP7의 유전자는 북미지역에 서식하는 1년생 식물인 *Mesembryanthemum crystallinum*의 putative mitochondrial adenylate transporter (Genbank accession no.=BAD91181), 혹은 수면병을 유발하는 편모충류 *Trypanosoma brucei rhodesiense*의 ADP/ATP carrier (Genbank accession no.=AAA75627)인 것으로 나타났다. 이 유전자 역시 대조군에서 약하게 발현하다가 독성에 노출되면 발현량이 많아지는 것으로 관찰되었다. 세포가 내분비계 교란물질에 노출되면 세포 내 에스트로젠 수용체는 이를 에스트로젠으로 인식하여 결합/반응하게 된다(Thomas and Dong, 2006). 마지막으로 3번째, GP15에 나타난 유전자로 발생학 모델생물인 제브라피쉬 *Danio rerio*의 dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1 catalytic subunit (DPM1; Genbank accession no.=NP001003596)으로 나타났다. DPM1은 여러 가지 당접합체(glycoconjugate) 생합성에 만노오스(mannose)를 제공하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Kornfeld and Kornfeld, 1985).

이번 연구에서는 내분비계 교란물질이 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus s.l.* 개체의 생존에는 영향을 미치지

못하나 성장을 지연시키고, 기형을 유도하며, 유전자 발현에도 영향을 미친다는 결과를 도출하였다. 추후에 자세한 외형 관찰을 바탕으로 한 형태학적 연구와, 유전자 발현 변화를 통한 분자생물학적 연구를 계속적으로 진행한다면 간편하고 신속하게 생태계 평가를 할 수 있는 실질적인 생체 지표 개발이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

우리나라 연안의 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus s.l.*를 대상으로 내분비계 교란물질인 4-nonylphenol에 대한 생태독성 반응을 연구한 결과, 4NP는 30 µg L⁻¹ 이하에서는 농도에 관계없이 생존율에는 영향을 주지 않았으며, 포란율, 부화율 등 생식 능력의 저하 현상 역시 찾아 볼 수 없었다. 그러나 노출된 *T. japonicus s.l.* nauplius 유생과 copepodite 유생은 모든 농도에서 대조군보다 성장이 지연되는 것으로 나타났으며, 처리 농도가 높아질수록 개체의 크기와 생체량이 줄어드는 것으로 나타났다. 또한 DEG를 이용한 유전자 발현의 차이를 확인하여 biomarker로서 가능성을 지닌 유전자를 확인해 볼 수 있었다. 추후 형태학적 연구와 분자생물학적인 연구를 계속 진행하여 생태계 평가를 할 수 있는 실질적인 생체 지표 개발을 할 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project)으로 지원받은 과제입니다.

인 용 문 헌

- 국립환경과학원. 2005. 제6차년도 내분비계장애물질 조사 연구사업 결과보고. 환경부. http://www.nier.go.kr/library/search/data_detail.php?av_sys=2001&av_indate=20050921124721
- Ahel, M., C. Schaffner and W. Giger. 1996. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. 3. occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* **30**: 37-46.
- Andersen, H.R., L. Wollenberger, B. Halling-Sørensen and K.O. Kusk. 2001. Development of copepod nauplii to

- copepodites-A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2821-2829.
- ASTM. 2004. Standard guide for conducting renewal microplate-based life-cycle toxicity tests with a marine meiobenthic copepod. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, ASTM Standard No E2317-E2324.
- Baldwin, W.S., D.L. Milam and G.A. LeBlac. 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environment estrogen distylstilbestrol. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 945-952.
- Barata, C., D.J. Baird, M. Medina, A. Albalat and A.M.V.M. Soares. 2002. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **230**: 183-194.
- Bechmann, R.K. 1994. Use of life-tables and LC50 tests to evaluate chronic and acute toxicity effects of copper on the marine copepod *Tisbe furcata* (Baird). *Environ. Toxicol. Chem.* **13**: 1509-1517.
- Bechmann, R.K. 1999. Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *Sci. Total Environ.* **233**: 33-46.
- Bejarano, A.C. and G.T. Chandler. 2003. Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 3009-3016.
- Blackburn, M.A. and M.J. Waldock. 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research* **29**: 1623-1629.
- Blackburn, M.A., S.J. Kirby and M.J. Waldock. 1999. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* **38**: 109-118.
- Bolz, U., H. Hagenmaier and W. Körner. 2001. Phenolic xenonestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. *Environ. Poll.* **115**: 291-301.
- Breitholtz, M. and L. Wollenberger. 2003. Effects of three PBDEs on development, reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic. Toxicol.* **64**: 85-96.
- Breitholtz, M., L. Wollenberger and L. Dinan. 2003. Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic. Toxicol.* **63**: 103-118.
- Brown, R.J., S.D. Rundle, T.H. Hutchinson, T.D. Williams and M.B. Jones. 2003. A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquatic. Toxicol.* **63**: 1-11.
- Cary, T.L., G.T. Chandler, D.C. Volz, S.S. Walse and L. Ferry. 2004. Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 522-528.
- Chandler, G.T., T.L. Cary, D.C. Volz, S.S. Spencer, J.L. Ferry and K. Losterhaus. 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 117-124.
- DeFur, P.L., M. Crane, C. Ingersoll and L. Tattersfield. 1999. Endocrine disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment. Pensacola, Fla.: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Fenet, H., E. Gomez, A. Pillon, D. Rosain, J.C. Nicolas, C. Casellas and P. Balaguer. 2003. Estrogenic Activity in water and sediments of a french river: Contribution of Alkylphenols. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **44**: 1-6.
- Ferguson, P.L., C.R. Iden and B.J. Brownwell. 2001. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 2428-2435.
- Forget-Leray, J., J.F. Pavillon, M.R. Menasria, G. Bocquené. 1998. Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos and malathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **40**: 239-244.
- Forget-Leray, J., I. Landriau, C. Minier and F. Leboulenger. 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **60**: 288-294.
- Frimmer, M., E. Petzinger, U. Rufeger and L.B. Veil. 1977. Trypsin protection of hepatocytes against phalloidin. *N. Schmied. Arch. Pharmacol.* **300**: 163-171.
- Hagiwara, A.C., S. Lee and D.J. Shiraishi. 1995. Some reproductive characteristics of the broods of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* cultured in different salinities. *Fish. Sci.* **61**: 618-622.
- Hamilton, A.L. and O.A. Saether. 1971. The occurrence of characteristic deformities in the chironomid larvae of several Canadian lakes. *Can. Ent.* **103**: 363-368.
- Higgins, R.P. and H. Thiel. 1988. Introduction to the study of meiofauna. Smithsonian Institution Press.
- Hutchinson, T.H., T.D. Williams and G.J. Eales. 1994. Toxi-

- city of cadmium, hexavalent chromium and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe battagliai*). *Mar. Environ. Res.* **38**: 275-290.
- Hutchinson, T.H., N.A. Pounds, M. Hampel and T.D. Williams. 1999a. Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*). *Sci. Total Environ.* **233**: 167-179.
- Hutchinson, T.H., N.A. Pounds, M. Hampel and T.D. Williams. 1999b. Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 2914-2920.
- Hutchinson, T.H. 2002. Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicol. Lett.* **131**: 75-81.
- Isobe, T., H. Nishiyama, A. Nakashima and H. Takada. 2001. Distribution and behaviour of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary 109 distributions. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 1041-1049.
- ISO. 1997. Water quality-determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Draft International Standard ISO/DIS 14669. Genève, Switzerland.
- Ito, T. 1970. The biology of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* Mori. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.* **17**: 474-500.
- Koga, F. 1970. On the life history of *Tigriopus japonicus* Mori (Copepoda). *J. Oceanogr. Soc. Japan.* **26**: 11-21.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631-664.
- Kovatch, C.E., G.T. Chandler and B.C. Coull. 1999. Utility of a full life-cycle copepod bioassay approach for assessment of sediment-associated contaminant mixtures. *Mar. Pollut. Bull.* **38**: 692-701.
- Kusk, K.O. and L. Wollenberger. 2007. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology.* **16**: 183-195.
- Kwak, I.S., M.O. Park and W. Lee. 2005. The survival rate and the rate of attached egg sac for female *Tigriopus japonicus* exposure to 4-nonylphenol. *Korean J. Environ. Biol.* **23**: 129-134.
- Kwak, I.S. and W. Lee. 2005. The Mentum deformity of *C. plumosus* following exposure to endocrine disruption chemicals. *Korean J. Limnol.* **38**: 11-17.
- Kwak, I.S. and W. Lee. 2007. The Mentum deformity of *C. plumosus* following exposure to Bisphenol A and 4-nonylphenol. *Korean J. Environ. Biol.* **25**: 66-71.
- Marcial, H.S., A. Hagiwara, and T.W. Snell. 2003. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 3025-3030.
- OECD. 2005. OECD Draft Guidelines for testing of chemicals. Proposal for a new guideline. Harpacticoid copepod development and reproduction test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Sole, M., M.J. Lopez de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Lademgaard-Pedersen and D. Barcelo. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface water from the Catalonian area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* **34**: 5076-5083.
- Thomas, P. and J. Dong. 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **102**: 1-5.
- Verslycke, T., A. Ghekiere, S. Raimondo and C. Janssen. 2007. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology.* **16**: 205-219.
- Wollenberger, L., M. Breitholtz, K.O. Kusk and B.E. Bengtsson. 2003. Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Sci. Total Environ.* **305**: 53-64.
- Wollenberger, L. 2005. Toxicity tests with crustaceans for detecting sublethal effects of potential endocrine disrupting chemicals. Ph.D. thesis. Environment and Resources, Technical University of Denmark. p. 1-75. ISBN 87-89220-77-3.

(Manuscript received 17 January 2008,
Revision accepted 26 February 2008)