TSPE16070-019-3

저온 무척추 동물의 지질, 단백질 상호작용의 저온적응 기작 규명

Investigation on the cold-adaptation mechanism of lipid-protein interaction in cold-inhabiting Invertebrates

KOPRI
극지연구소

부 경 대 학 교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴”과제의 위탁연구 “저온 무척추 동물의 지질, 단백질 상호작용의 저온적응 기작 규명”과제의 최종보고서(보고서 제목: “최종보고서 부경대학교 김현우”)로 제출합니다.

KOPRI
극지연구소

2017. 1. 23.

총괄연구책임자 : 박 현

위탁연구기관명 : 부 경 대 학 교

위탁연구책임자 : 김 현 우

위탁참여연구원 : 이 명 기

“ : 이 지 현

“ : 이 수 린

보고서 초록

과제관리번호	PE16070	해당단계 연구기간	2016.01.01.- 2016.12.31	단계 구분	3 / 3
연구사업명	중 사 업 명	극지연구소 연구·운영비지원 사업			
	세부사업명	주요사업(기관목적사업)			
연구과제명	중 과 제 명	기관고유사업			
	세부(단위)과제명	저온 무척추 동물의 지질, 단백질 상호작용의 저온적응 기작 규명			
연구책임자	박 현	해당단계 참여연구원수	총 : 4 명 내부 : 4 명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부: 40,000 천원 기업: 천원 계: 40,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	부경대학교 자원생물학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 : 부경대학교		연구책임자 : 김 현 우		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	30

1. 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 및 구조적 특성 연구
- 스테로이드 호르몬 수용체 유전자 확보
- 발달단계 및 성별에 따른 세 개의 스테로이드 호르몬 수용체의 발현연구

2. 스테로이드 호르몬이 생식 및 성숙에 미치는 영향 연구
- 호르몬에 따른 스테로이드 호르몬 수용체의 발현변화 분석
- 발달단계에 따른 생식 및 성숙관련 호르몬 수용체 전사체 분석

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	스테로이드 호르몬 수용체, 지질관련 유전자, 스테로이드 호르몬, 생식, 저온적응
	영 어	*Tigriopus kingsejongensis*, EcR, RXR, ERR, Sesquiterpenoid hormones

KOPRI 극지연구소

요 약 문

Ⅰ. 제 목

저온 무척추 동물의 지질, 단백질 상호작용의 저온적응 기작 규명

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

저온 무척추 동물의 지질 대사에 관련된 유전자 및 대사 산물을 분자생물학, 비교내분비 및 구조분석학적 방법을 통해 단기적(항상성), 장기적(진화) 영향을 파악하고, 생식과의 상관관계를 분석하여 이를 산업화 할 수 있는 기초 자료로 제공하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 및 구조적 특성 연구
2. 스테로이드 호르몬이 생식 및 성숙에 미치는 영향 연구

KOPRI 극지연구소

Ⅳ. 연구개발결과

1. 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 및 구조적 특성 연구
- 스테로이드 호르몬 수용체 유전자 확보
- 발달단계 및 성별에 따른 세 개의 스테로이드 호르몬 수용체의 발현연구

2. 스테로이드 호르몬이 생식 및 성숙에 미치는 영향 연구
- 호르몬에 따른 스테로이드 호르몬 수용체의 발현변화 분석
- 발달단계에 따른 생식 및 성숙 관련 호르몬 수용체 전사체 분석

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

극지에서 서식하는 무척추동물의 저온환경에 대한 적응기작과 생식에 관한 생리학적 메커니즘을 이해하고, 이에 관한 특이적 유전자 및 단백질의 특성을 발굴하는 등 극지생물 산업화에 기초 자료로 활용 될 수 있을 것이다.

S U M M A R Y

Ⅰ. Title

Investigation on the cold-adaptation mechanism of lipid-protein interaction in cold-inhabiting invertebrates

Ⅱ. Purpose and Necessitu of R&D

The major goal of the study is to provide physiological understanding about short-term (homeostasis) or long-term (evolution) effects of genes and metabolite involved in lipid metabolism of cold-inhabiting invertebrates and to analysis correlation with reproduction through molecular biology, comparative endocrine and structural analysis method and contribute knowledge to industrial applications.

Ⅲ. Contents and Extent of R&D

1. Expression and structural characterization of steroid hormone receptor
2. Effects of steroid hormone on reproduction and maturation

Ⅳ. R&D Results

1. Expression and structural characterization of steroid hormone receptor
- Isolation of steroid hormone receptor gene
- Expression of three steroid hormone receptors in developmental stage and sex

2. Effects of steroid hormone on reproduction and maturation
- Changes in the expression of steroid hormone receptors by reproductive hormones
- Analysis of reproductive and maturation related hormone receptor transcriptome by developmental stage

Ⅴ. Application Plans of R&D Results

- Understand reproductive process and strategy in cold-inhabiting invertebrate
- Understand physiological mechanism of antarctic organisms
- Provide basic information for various industrial applications

KOPRI 극지연구소

C O N T E N T S

Abstract 1

Summary (Korean) 2

Summary (English) 3

Contents (English) 4

Contents (Korean) 5

Chapter 1 Introduction 7

Sector 1 Purpose of the research 7

Sector 2 Necessity of the research 7

Chapter 2 Status of the Technology 11

Chapter 3 Contents and the Results 12

Sector 1 Expression and structural characterization of steroid hormone receptor 12

Sector 2 Effects of steroid hormone on reproduction and maturation 22

Chapter 4 Attainment and External contribution 27

Chapter 5 Application Plans of Results 28

Chapter 6 Information of global science technology 29

Chapter 7 References 30

KOPRI 극지연구소

목　　차

보고서초록 ···································· 1

요약문 ···································· 2

영문요약문 ···································· 3

영문목차 ···································· 4

목차 ···································· 5

제 1 장 서론 ···································· 7

제 1 절 연구개발의 목적 ···································· 7

제 2 절 연구개발의 필요성 ···································· 7

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ···································· 11

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ···································· 12

제 1 절 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 및 구조적 특성 연구 ···················· 12

제 2 절 스테로이드 호르몬이 생식 및 성숙에 미치는 영향 연구 ···················· 22

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 ···································· 27

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ···································· 28

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ···································· 29

제 7 장 참고문헌 ···································· 30

KOPRI 극지연구소

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

극지의 저온 무척추동물의 지질 대사에 관련된 유전자 및 대사산물을 분자생물학, 비교 내분비학 및 구조분석학적 방법을 이용하여 환경에 대한 단기적(항상성) 혹은 장기적(진화) 영향을 파악하고, 특히 생식과의 상관관계를 분석하여 이를 산업화 할 수 있는 기초 자료로 제공하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

생물이 주어진 환경에 적응하여 살아가기 위한 반응으로는 단기적인 반응과 장기적인 반응으로 나눌 수 있는데, 단기적인 반응으로는 환경의 변화에 유도되는 유전자 및 단백질 그리고 그 밖의 다양한 대사산물 (metabolites)이 변화를 일으키며 장기적인 반응으로는 유전자 암호의 변화 및 후성유전학적 변이 (epigenetical change)를 일으켜 진화의 방향을 이끈다. 극지에 서식하면서 저온에 적응한 생물들의 생물반응은 다양한 저분자 대사산물 (metabolites)과 고분자 화합물인 지방, 탄수화물, 단백질, 핵산의 형태로 나타난다. 고분자 화합물 중 지질은 소수성으로 특히 온도에 따라 다른 생화학적 특성을 가지며 이로 인해 다양한 생물 반응을 유도 할 것으로 예상된다.

스테로이드를 기본으로 하는 지용성 호르몬은 생식, 발달 및 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 무척추 동물 중 절지동물과 연체동물은 서로 다른 생식 steroid hormone을 가진다. 갑각류를 포함하는 절지동물은 ecdysone을 기본으로 하는 steroid hormone을 가지며 연체동물은 estrogen을 기본으로 하는 호르몬 체계를 가진다. 다음의 그림과 같이 ecdysone과 estrogen의 구조의 차이로 인한 receptor의 종류가 다를 뿐만 아니라 신호전달의 내용도 다르다 (그림. 1 과 2). 또한 절지동물 중에서 곤충과 갑각류의 호르몬 체계를 비교해보면, 갑각류에서는 juvenile hormone (JH) epoxidase가 결핍되어 있기 때문에 insect juvenile hormone III (JH III)를 생산할 수 없다. 따라서 곤충과 갑각류는 변태 (metamorphosis), 배우자형성 (gametogenesis), 난황형성 과정 (vitellogenesis) 및 ecdysteroid secretion 등과 같은 성장과 생식 발달에 영향을 미치는 호르몬 체계가 다르다 (그림. 3).

특히 극지와 같은 환경에서 지용성인 스테로이드계 성호르몬의 대사는 특이적으로 진화되었을 것으로 생각된다. 아래의 그림과 같이 다양한 steroid response or binding protein들을 분석하여 극지의 저온 무척추동물의 저온 환경에서의 진화 과정을 이해하고 생식과 관련된 생리학적 특성을 이해하고자 한다.

KOPRI
극지연구소

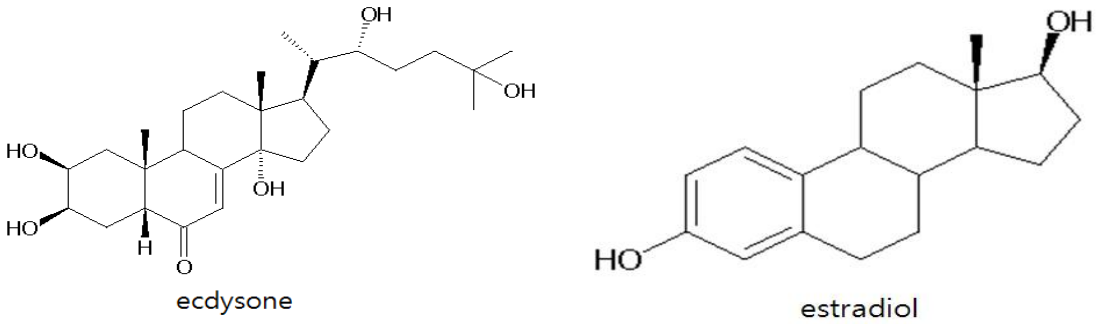


그림. 1. Steroid hormone인 ecdysone과 estradiol의 구조

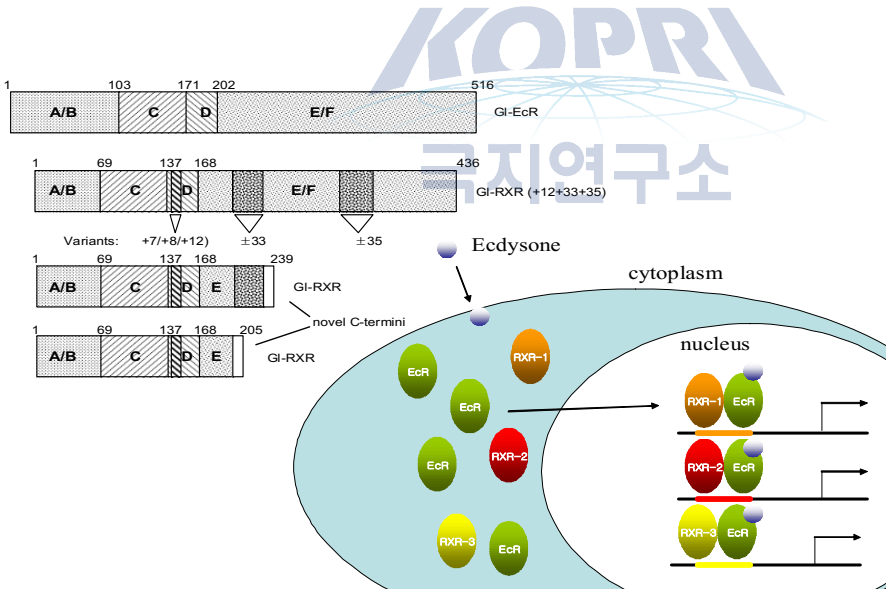


그림. 2. Steroid hormone 과 nuclear receptor의 신호

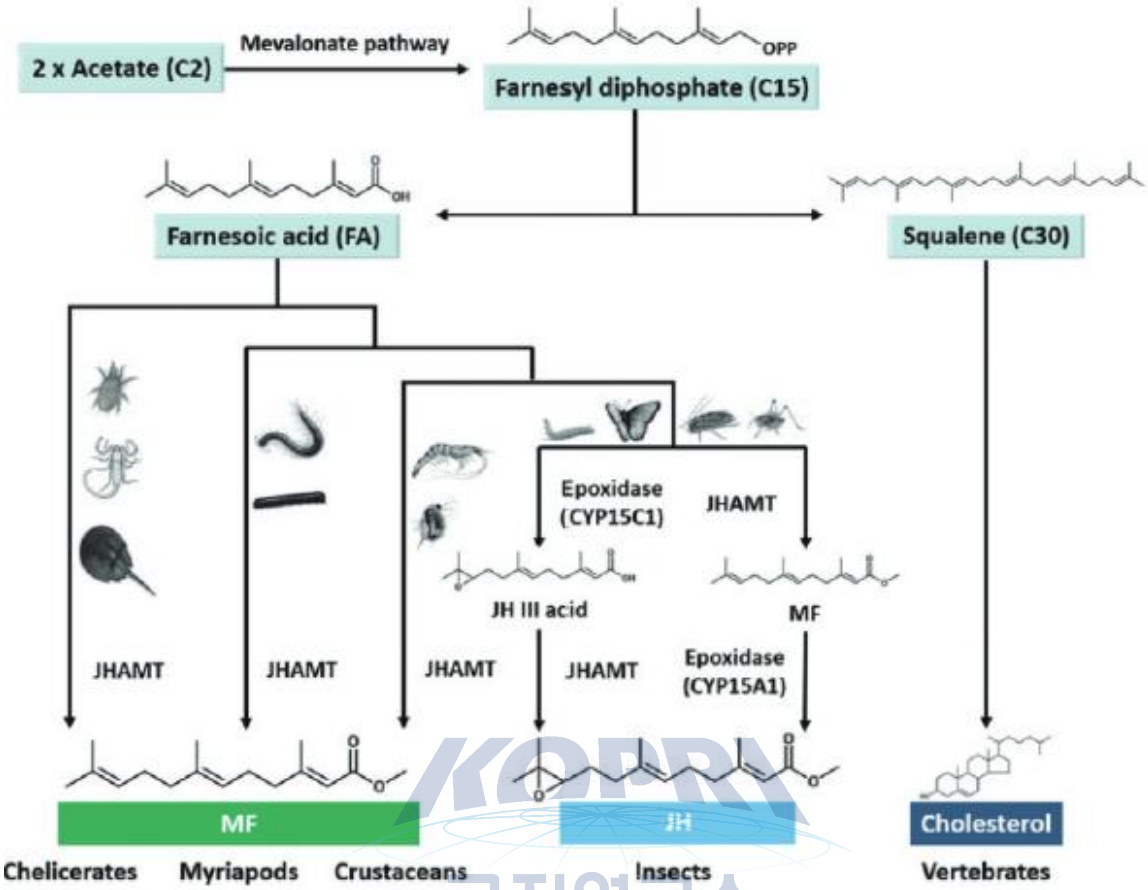


그림. 3. Schematic diagram showing biosynthetic pathways of sesquiterpenoid hormones in arthropods

제 2 장 국내외 기술개발 현황

극지에 서식하는 갑각류 연구는 오래 전부터 진행되어 왔으나 주로 생활사, 서식지에 따른 생태학적 연구 및 분류학적 연구가 대부분이며 이들의 생식이나 내분비계와 같은 생리학적 메커니즘을 밝혀내는 연구는 많이 이루어져 있지 않은 실정이다. 이는 갑각류의 생리학적 메커니즘을 연구하기에는 기술적인 한계가 있었기 때문이다. 하지만 현재 국내・외 NGS (next-generation sequencing) 기술이 도입되면서 갑각류를 대상으로 대량의 전사체들이 분석되고 있으며, NMR (nuclear magnetic resonance)이나 MS (mass spectrometry)를 이용하여 생체 내 단백질 기능에 의해 나타나는 대사물을 분석하고 대사 경로를 파악하는 대사체학이 발달되어 대상생물의 생리학적 연구가 예전보다 용이해졌다.

그러나 연구의 초점은 대부분 상업적으로 많이 이용되는 종 또는 환경오염을 평가하기 위한 지표종에 국한되어 있으며 (예를 들어*Tigriopus japonicus*), 극지 저온 무척추동물의 생식, 성장, 탈피 그리고 내분비계에 관한 기초연구와 기능적 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 이 연구에서는 남극에서 서식하는 무척추 동물인 *Tigriopus kingsejongensis*의 전사체 분석을 통해 지질대사 관련 유전자 및 스테로이드 호르몬 수용체 유전자를 확보하여 극지에서 서식하는 갑각류의 생식 및 생리학적 특이성을 규명하고자 한다. 또한 다른 환경에 서식하는 갑각류와의 비교분석을 통해 갑각류의 생식 및 생리학적 메커니즘에 대해 폭 넓은 이해를 도울 것으로 사료된다.

KOPRI 극지연구소

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 및 구조적 특성 연구

1. 스테로이드 호르몬 수용체 유전자 확보

가. 연구내용

NGS (next generation sequencing)를 통해 확보한 3개의 스테로이드 호르몬 수용체 유전자인 Tik-EcR의 Full ORF 서열을 확인하였다. 또한 amino acid sequences를 다른 절지동물의 스테로이드 호르몬 수용체 amino acid sequences와 비교하였고, protein database를 이용해 이들의 domain을 분석 하였다.

나. 결과

KOPRI 극지연구소

*Tigriopus kingsejongensis*의 RNAseq 결과, 이 중 갑각류와 곤충의 스테로이드 호르몬 수송과 관련된 수용체 유전자인 Retinoid X receptor (RXR), estrogen-related receptor (ERR), ecdysone receptor (EcR)의 sequences를 확보하였다. 그 중 Full open reading frame (ORF)을 확보하지 못했던 Tik-EcR의 full ORF를 확보하여, 다른 절지동물의 sequences와 함께 multiple amino acid sequences alignment를 수행하여 sequences를 비교 분석 하였고, 각 domain들을 예측하여 분석하였다.

Tik-EcR은 1,674 bp의 cDNA가 557 amino acids를 암호화하고 있으며 (그림. 4), *Tigriopus japonicus*의 EcR과 가장 높은 sequence identity (78%)를 보였다.

Nuclear receptor superfamily members는 대게 5개의 domain으로 구성되어 있는데 isoform-specific region인 A/B domain; DNA binding domain (DBD, C domain); Ligand binding domain (LBD, E domain); hinge domain (D domain); C-terminal 부근의 F domain이 존재한다. 확보한 Tik-EcR의 full ORF 서열을 다른 절지동물의 EcR 서열과 비교 분석 한 결과, *T. kingsejongensis*에서도 C domain에서 DNA binding에 필수적인 8개 cysteine residues가 존재하며, DNA 인식을 조절하는 것으로 알려진 P-box와 D-box가 잘 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 결합된 ligand의 존재에 따라 활성화되는 activation function 2 (AF-2) region이 존재하며 잘 보존된 E domain을 확인 할 수 있었다. (그림. 5 와 6)

확보한 세 개의 스테로이드 호르몬 수용체 유전자와 이전 연구에서 확인된 절지동물의

스테로이드 수용체 유전자를 이용하여 계통유연관계를 비교분석 하였다.(그림. 7)

절지동물의 생식에서 EcR과 RXR/USP는 heterodimer를 형성하여 작용한다. 계통수(phylogenetic tree)를 보면 EcR과 RXR/USP는 ERR과 분리되어 하나의 clade를 이루며 진화되었음을 의미한다. EcR과 RXR/USP는 *T. kingsejongensis*가 속한 요각류와 십각류로 나뉘어 진화 되었다고 볼 수 있으며, 십각류의 EcR은 요각류보다 곤충과 가까운 유연관계를 가진다고 볼 수 있다. 척추동물의 3개의 ERR (ERRα, ERRβ, ERRɣ)을 가지며, 무척추동물의 경우 하나의 ERR만 나타난다고 알려졌으나, 2014년 *T. japonicus*의 nuclear receptor superfamily를 연구한 결과에 따르면 paralog관계의 2개의 ERR이 있는 것으로 나타났다. Paralog의 ERRs은 염기서열은 유사하나 생리학적 기능을 다르게 가질 것으로 예상된다. 또한 전체적으로 계통수를 보았을 때, 척추 분화 이전에 ERR이 먼저 분리 되어 진화된 것으로 여겨지며 따라서 무척추동물에서도 ERR이 생리적인 기능을 가지고 있을 것으로 예상된다.

KOPRI
극지연구소

```
   1 ATGTCTAGTAGTGCTCCACAAGTCACTCTCCTTCAGGCCAGGAGTCAAGTGAAGACCTACACCACCATGACTGGCGGGCCGCCATTCAAC
      M  S  S  S  A  P  Q  V  T  L  L  Q  A  R  S  Q  V  K  T  Y  T  T  M  T  G  G  P  P  F  N
  91  GGGGGAATCTCGACCATCATGGTGAACTCACCCCCGGGCCCGGGCTTATCGCCACCCTCGCCGCCCAATTTCTTTGGGCTCCAGCCCTCG
      G  G  I  S  T  I  M  V  N  S  P  P  G  P  G  L  S  P  P  S  P  P  N  F  F  G  L  Q  P  S
 181  CCACCCTCGAGTGTGCTCTCGCCCCCCATGCCCAACCAGCCCATATATGTGGACACGTCCTCGCCATCGTCCCATTTCCAGGCGTCCAGC
      P  P  S  S  V  L  S  P  P  M  P  N  Q  P  I  Y  V  D  T  S  S  P  S  S  H  F  Q  A  S  S
 271  CCCCAAATCACAGAAATTAAGACCGAGCCCCCCTCCTCCTTCAGCCCGCCAGTCAACGGCTACGGGCACGCCCCCCAGCGGCATAACAGC
      P  Q  I  T  E  I  K  T  E  P  P  S  S  F  S  P  P  V  N  G  Y  G  H  A  P  Q  R  H  N  S
 361  AGCAACTCCTCAGTGTCAAGTCCCAGTAGTCAGCCAGGCGGGTTCTTCGTGAAGAGCGAGTCCAACCCACCCCTGACGCCCAATCAGGCT
      S  N  S  S  V  S  S  P  S  S  Q  P  G  G  F  F  V  K  S  E  S  N  P  P  L  T  P  N  Q  A
 451  GTGCAAGAGTATGCGCGGCTACAGGAGAACGAGCGAAAGAAGAAGGGCCCCGTCCCAAGGCCCCAAGAGGAGCTGTGCACTGTGTGCGGT
      V  Q  E  Y  A  R  L  Q  E  N  E  R  K  K  K  G  P  V  P  R  P  Q  E  E  L  C  T  V  C  G
 541  GACCGGGCCTCCGGCTACCACTACAATGCCTTAGCCTGCGAGGGCTGTAAGGGCTTCTTTCGACGCTCCATCACCAAGAACTCCTCCTAC
      D  R  A  S  G  Y  H  Y  N  A  L  A  C  E  G  C  K  G  F  F  R  R  S  I  T  K  N  S  S  Y
 631  TCGTGCAAGTACGGGGACGGCTGTGAAATTGACATGTACATGAGGCGCAAGTGTCAGGCCTGCCGCCTCAAGAAGTGCTACACCGTGGGG
      S  C  K  Y  G  D  G  C  E  I  D  M  Y  M  R  R  K  C  Q  A  C  R  L  K  K  C  Y  T  V  G
 721  ATGCGGGCCGAGTGTGTTGTCCCGGAGAGCCAATGTCAGAAGAAGCGGGCCATCAAGCAAGCTCAAAAAGCCGCCCAGAACGGTGATGCC
      M  R  A  E  C  V  V  P  E  S  Q  C  Q  K  K  R  A  I  K  Q  A  Q  K  A  A  Q  N  G  D  A
 811  AGCTCCACCACACTTATGGCCAATAACAGCAGTCTTAGCGGGGGCATGGGAGGCCGTGGGACCCCTTTGGCCATCGGTGGCCCGGGCCTC
      S  S  T  T  L  M  A  N  N  S  S  L  S  G  G  M  G  G  R  G  T  P  L  A  I  G  G  P  G  L
 901  TCGAGCAATCACAACAGCATTCCCTCAGCGCTCGCCCCGCGACACCTCAAGCCCGAGGAGGAGGAACTCATCAACCGCATCGTGTACTAC
      S  S  N  H  N  S  I  P  S  A  L  A  P  R  H  L  K  P  E  E  E  E  L  I  N  R  I  V  Y  Y
 991  CAGGATGAGTTCGAGAATCCCACCGCCGAGGACCTGAACCGCGTCTACCACGTGCCCCTCCATCCCGTCAACAACGACGCGACCGGCAAC
      Q  D  E  F  E  N  P  T  A  E  D  L  N  R  V  Y  H  V  P  L  H  P  V  N  N  D  A  T  G  N
1081  GAGAGCGAGTCGGATCGGTTGTTCCAACACATGACCGAGATGACCATCCTCACGGTCCAGCTCATTGTGGAGTTCACCAAGCACCTGCCC
      E  S  E  S  D  R  L  F  Q  H  M  T  E  M  T  I  L  T  V  Q  L  I  V  E  F  T  K  H  L  P
1171  GGCTTCCCCACCCTGTGTCGGGAGGACCAAGTCAGCTTACTGAAGGGCTGCTCCAGTGAAGTGATGATGTTGCGAGGCGCCCGTCGCTAC
      G  F  P  T  L  C  R  E  D  Q  V  S  L  L  K  G  C  S  S  E  V  M  M  L  R  G  A  R  R  Y
1261  GACCCGCAGCGAGACAGTATTATCTATGCCACCAACTACCCGTTCTCAAAGGACAACTACGTGAAGGCGGGCCTGGGCAATGACGCCCTC
      D  P  Q  R  D  S  I  I  Y  A  T  N  Y  P  F  S  K  D  N  Y  V  K  A  G  L  G  N  D  A  L
1351  TTCCGTTTCTGCCGGAACATGTGCAAGATGAAGGTGGACAATGCCGAGTATGCCCTCATTACTGCCATTGTCATATTCAGTGAGAGGCAC
      F  R  F  C  R  N  M  C  K  M  K  V  D  N  A  E  Y  A  L  I  T  A  I  V  I  F  S  E  R  H
1441  AACGTGAAAGAGCCCAAGCGAGTGGAGAAGATCCAGGAGATCTATGTCGAGGCCCTCCAGTCCTACGTGATGGCCAAGCAGAAGAAGGAG
      N  V  K  E  P  K  R  V  E  K  I  Q  E  I  Y  V  E  A  L  Q  S  Y  V  M  A  K  Q  K  K  E
1531  CCCATGGTGGCCTTCGCCAAGCTCCTGTCTGTCCTCACGGAACTGCGGTCCTTGGGCAATAACAATGCCAAGACCTGTTTCAACCTGAGG
      P  M  V  A  F  A  K  L  L  S  V  L  T  E  L  R  S  L  G  N  N  N  A  K  T  C  F  N  L  R
1621  ATGATCAACAGAAAGCTGCCGGCCTTCCTGGCAGAGATCTGGGACATCAAATGA 1674
      M  I  N  R  K  L  P  A  F  L  A  E  I  W  D  I  K  *
```

그림. 4. Tik-EcR full ORF (1,674 bp, 557 amino acids)

그림. 5. Multiple deduced amino acid alignment of Tik-EcR with other arthropoda EcRs. The aligned EcR include Cas-EcR from *Callinectes sapidus* (AET06179), Ucp-EcR from *Uca pugilator* (AIE88267), Amt-EcR from *Amphiascus tenuiremis* (AEH43772), Tij-EcR from *Tigriopus japonicus* (ADD82902). There was a high degree of sequence identity in the DNA binding (C domain) and ligand binding (E domain) domains. Cysteine residues (asterisks) and P-box and D-box motif were conserved. The core sequence of the AF-2 ligand-dependent activation function is boxed.

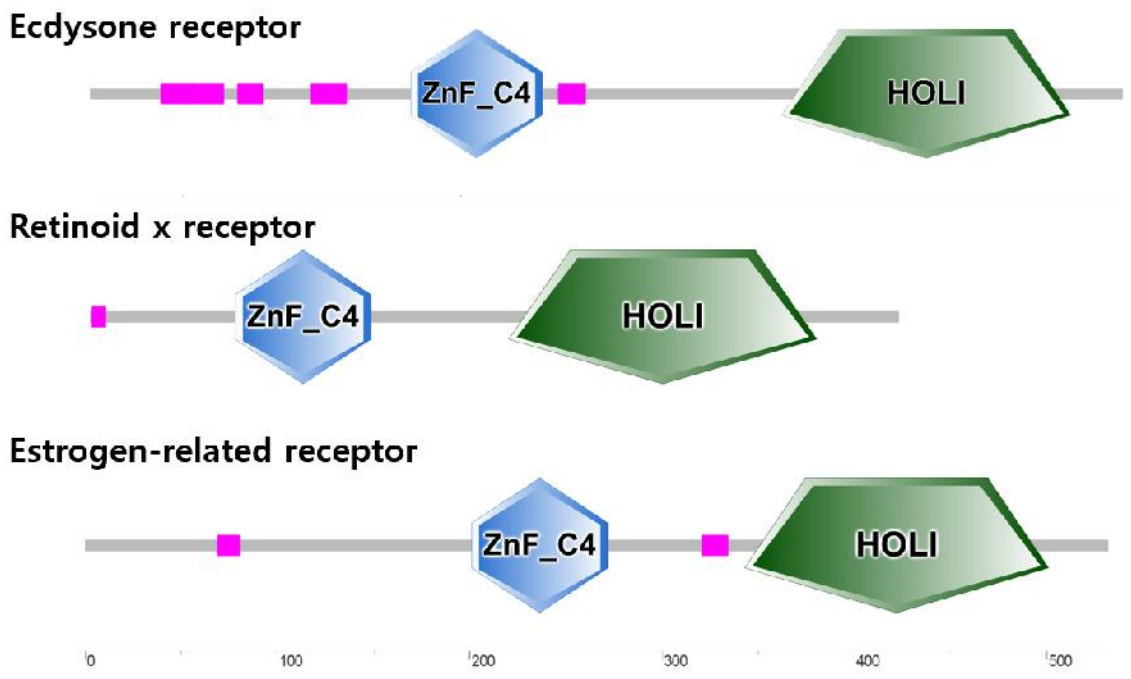


그림. 6. 세 개의 스테로이드 호르몬의 domain 구조 분석. ZnF C4(DNA binding domain; C domain),HOLILigand binding domain; LBD, E domain)

KOPRI
극지연구소

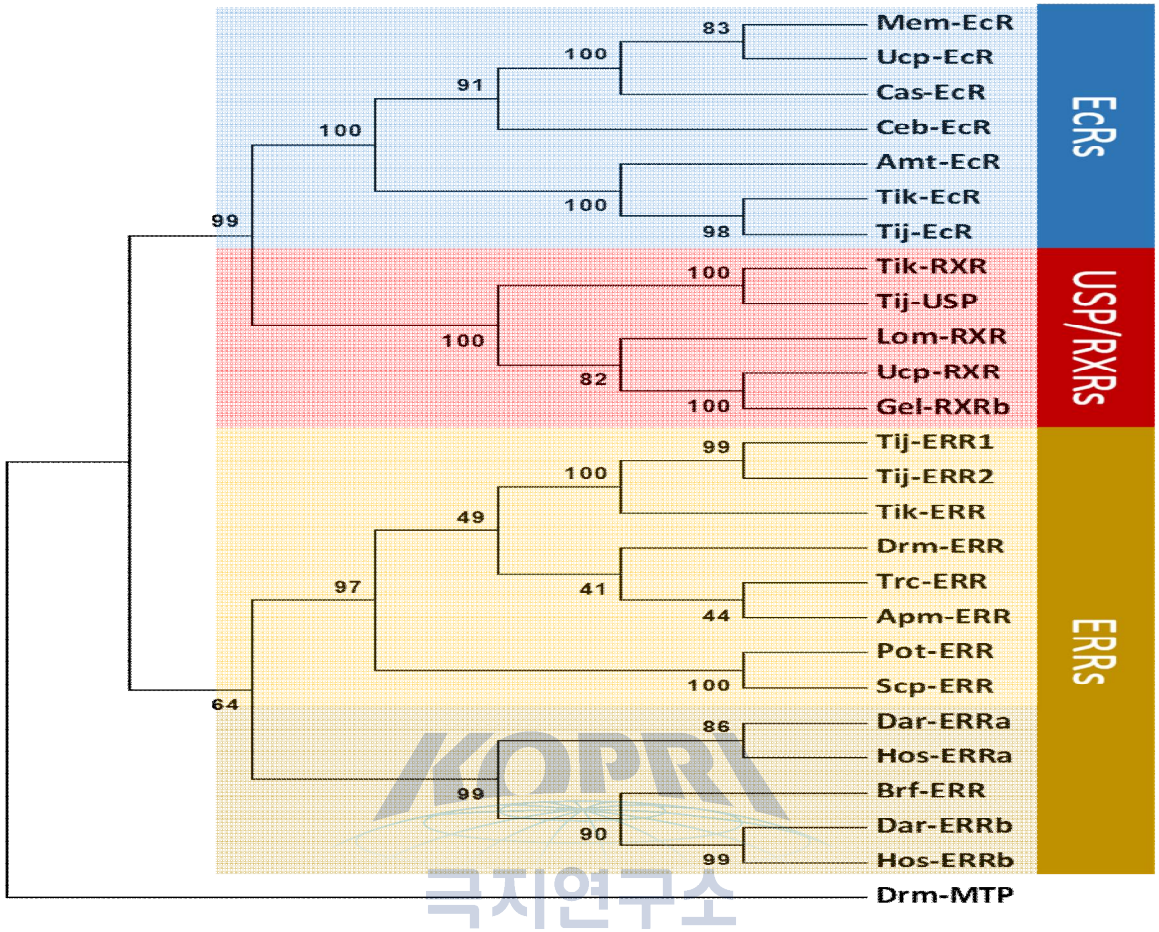


그림. 7. Phylogenetic tree of steroid hormone receptors. The phylogenetic trees were constructed by the minimum evolution method with 1,000 bootstrap replications using MEGA6 software. Mem-EcR from *Metopograpsus messor* (AGS11963), Ucp-EcR from *Uca pugilator* (AIE88267), Cas-EcR from *Callinectes sapidus* (AET06179), Ceb-EcR from *Cerapachys biroi* (EZA46741), Amt-EcR from *Amphiascus tenuiremis* (AEH43772), Tij-EcR from *Tigriopus japonicus* (ADD82902) Gel-RXR from *Gecarcinus lateralis* (DQ067281), Ucp-RXR from *Uca pugilator* (AAC32789), Lom-RXR from *Locusta migratoria* (AAQ55293), Tij-RXR from *Tigriopus japonicus* (AID52845) Tij-ERR1 from *Tigriopus japonicus* (AID52852), Tij-ERR2 from *T. japonicus* (AID52853), Trc-ERR from Tribolium castaneum (EFA07462), Pot-ERR from *Portunus trituberculatus* (AIS76179), Scp-ERR from *Scylla paramamosain* (ADB43256) and Apm-ERR from *Apis mellifera* (NP_001155988), Dar-ERRa from *Danio rerio* (AY556395), Hos-ERRa from *Homo sapiens* (NM_004451), Brf-ERR from *Branchiostoma floridae* (AY738655), Dar-ERRb from *Danio rerio* (AY556396), Hos-ERRb from *Homo sapiens* (NM_004452)

2. 발달단계 및 성별에 따른 세 개의 스테로이드 호르몬 수용체의 발현연구

가. 연구내용

*T. kingsejongensis*를 성숙 정도와 성별에 따라 immature female (Fi), mature female (Fm), ovigerous female (Fo), mature male (Mm) 그룹으로 나누어 (그림. 8) qRT-PCR을 이용해 발달 단계 및 성별에 따른 스테로이드 호르몬 수용체의 발현량 차이가 있는지 알아보았다.

나. 결과

스테로이드 호르몬이 생식, 발달 및 성장에 중요한 역할을 하므로 *T. kingsejongensis*의 발달 단계 및 성별에 따라 스테로이드 호르몬 수용체의 발현량 차이를 알아보았다.

qRT-PCR을 수행한 결과 Tik-EcR과 Tik-RXR와는 달리 Tik-ERR의 발현량은 전반적으로 매우 낮았다 (그림. 9A). Tik-EcR의 발현량은 immature female (Fi)에서 높은 발현량을 보이나, 이는 mature female (Fm)과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 mature female (Fm)과 mature male (Mm)에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ($P<0.05$).

*Tigriopus*속은 성체가 되기까지 총 11번의 탈피(6 nauplius stages, 5 copepodid stages)를 한다. 따라서 immature시기에 이들의 EcR 발현량은 높은 수준으로 나타난다. 또한 절지동물중 하나인 곤충에서 연구된 바에 따르면 성체인 female이 vitellogenesis를 시작하면 EcR이 감소되고, oocyte가 성숙하면 다시 EcR이 증가한다고 한다. 이와 마찬가지로 *T. kingsejongensis* 역시 immature 시기에서 Tik-EcR이 높게 나타나나 mature 시기로 성장하면 Tik-EcR이 감소하였다가, ovigerous 시기일 때 Tik-EcR이 다시 증가하는 경향을 보이고 있다 (그림 10). 그러나 통계적으로 유의한 차이가 없는데, 이는 실험 개체수가 적어 편차가 크게 나타났기 때문인 것으로 여겨진다. Female과 male의 차이 역시 다른 절지동물에서도 보이는데, 이는 성장과 탈피 조절, 형태학적 구조에 따른 차이라고 볼 수 있다.

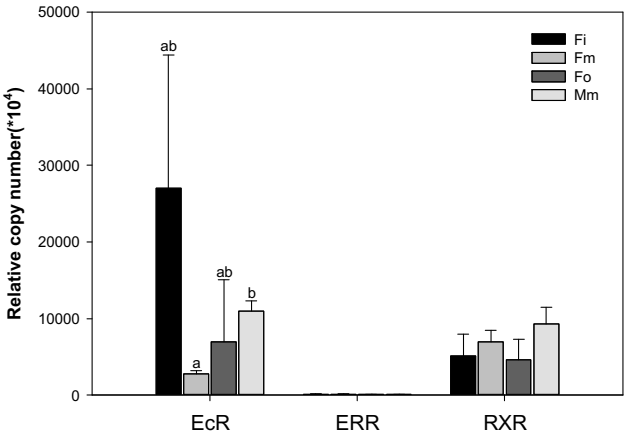
반면, Tik-ERR의 발현량은 mature female (Fm)이 아닌 ovigerous female (Fo)과 mature male (Mm)에서 유의한 차이를 보였다 (그림. 9B).

두 스테로이드 호르몬 수용체와는 달리 Tik-RXR은 발달단계 및 성별에 따라 유의적인 발현량 차이를 보이지 않았다. 곤충의 연구에 따르면, EcR과 RXR은 immature 시기와 mature 시기에서 역상관관계를 가지는 것으로 나타났는데, *T. kingsejongensis* 역시 그러한 경향을 보인다 (그림 10).

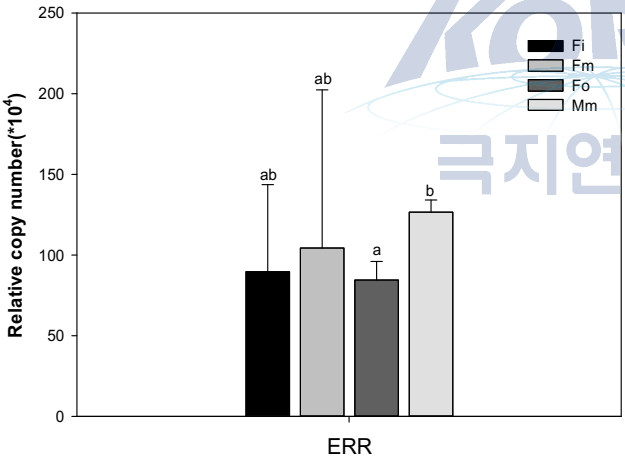
KOPRI 극지연구소

그림. 8. 성숙 정도와 성별에 따른 *T. kingsejongensis*

A)



B)



KOPRI 극지연구소

그림. 9. Relative copy numbers of thee steroid hormone receptors from *T. kingsejongensis*. The relative copy numbers were normalized by the number of 18S rRNA. Student's t-test was used to determine significant effects. Bar with dissimilar letters are significantly different ($P < 0.05$).

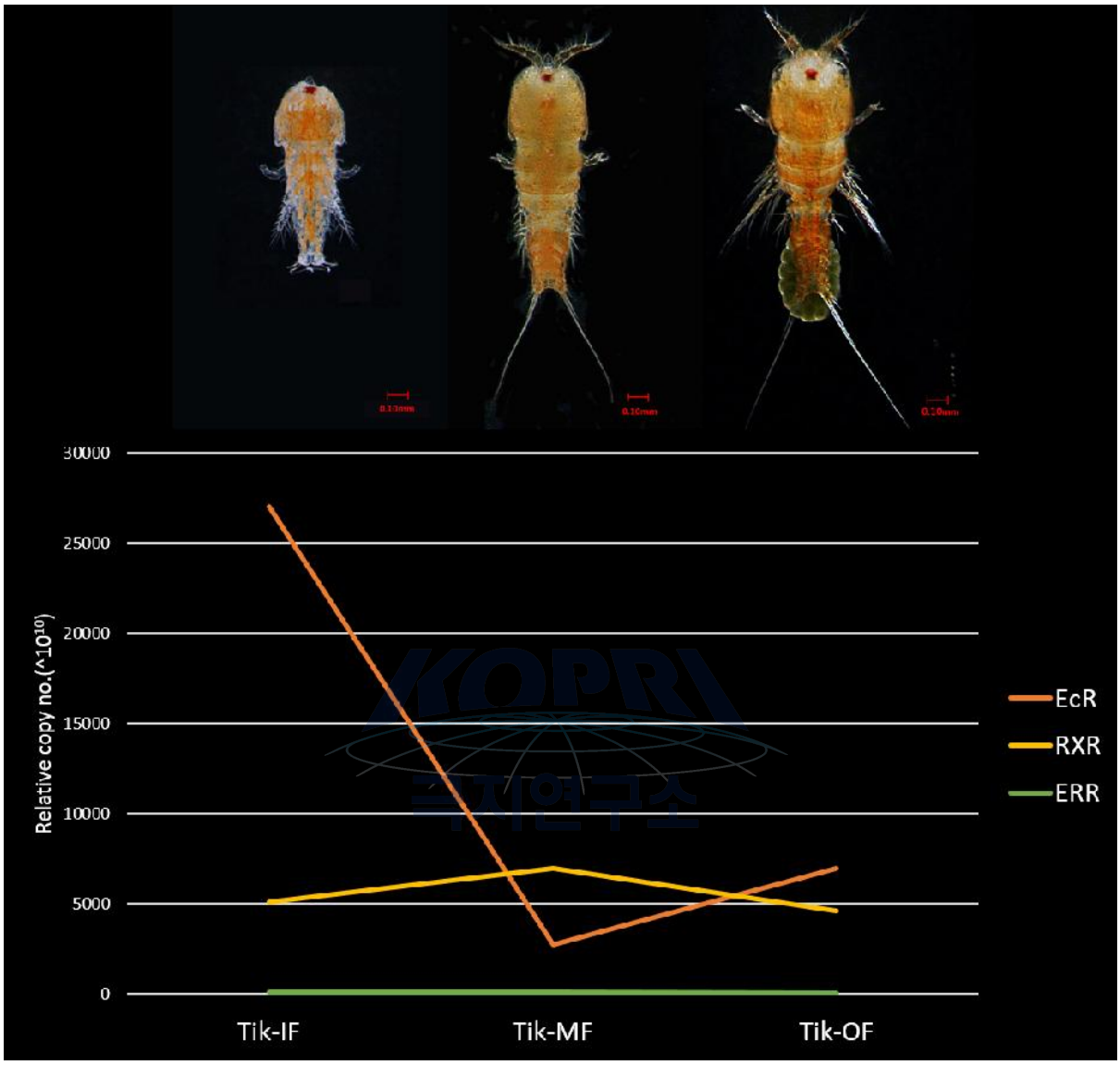


그림. 10. *T. kingsejongensis*의 암컷의 발달단계별 3개의 스테로이드 호르몬의 발현량

제 2 절 스테로이드 호르몬이 생식 및 성숙에 미치는 영향 연구

1. 생식 관련 호르몬에 따른 스테로이드 호르몬 수용체 변화 해석

가. 연구내용

생식 및 탈피를 조절하는 것으로 알려진 세 종류의 호르몬인 20-Hydroxyecdysone (20E), Methyl farnesoate (MF), Farnesoic acid (FA)를 처리했을 때, 이들이 *T. kingsejongensis*의 스테로이드 호르몬 수용체에 어떠한 영향을 미치는지 qRT-PCR을 통해 분석하였다.

나. 결과

스테로이드를 기본으로 하는 지용성 호르몬은 변태 (metamorphosis), 배우자형성 (gametogenesis), 난황형성 과정(vitellogenesis) 및 ecdysteroid secretion 등과 같은 성장과 발달에 영향을 미친다. 따라서 극지의 저온에서 서식하는 *T. kingsejongensis*는 스테로이드계 성호르몬의 대사가 특이적으로 진화되어 있을 것으로 생각되어 호르몬에 따른 스테로이드 호르몬 수용체의 변화를 알아보고자 다음과 같은 실험을 실시하였다. Mature female (Fm)을 1000ng의 20-Hydroxyecdysone (20E), Methyl farnesoate (MF), Farnesoic acid (FA)에 각각 12시간과 72시간 동안 노출 시킨 후 발현량 변화를 분석하였다.

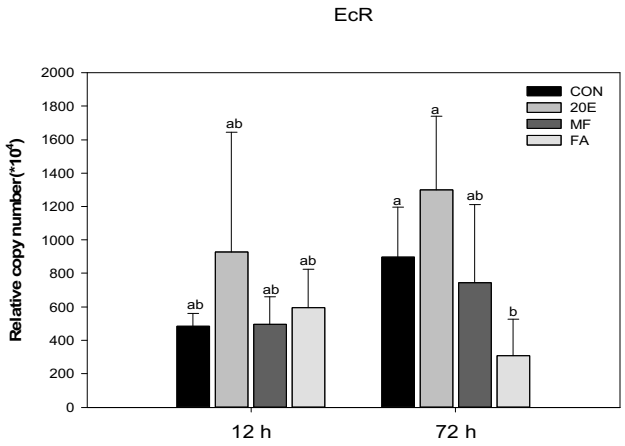
qRT-PCR을 이용해 분석한 결과, Tik-EcR은 20E을 12시간, 72시간처리 하였을 때 증가하였으나, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 FA를 72시간 처리하였을 때, 발현량이 통계적으로 유의하게 감소하였다 (그림. 11A).

이전에 갑각류에서 연구된 바에 따르면 생식의 조절은 FA에서 파생된 MF에 의해 조절된다고 하였으나, 이 연구 결과에서는 MF를 처리하였을 때 control에 비해 세 개 호르몬 수용체의 발현량이 증가하는 경향을 보였으나 이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 발달 단계별 스테로이드 호르몬 수용체 분석 결과를 보면 mature 시기에서 Tik-EcR이 감소하였다가, ovigerous 시기일 때 Tik-EcR 이 다시 증가하는 경향을 보이고 있다. 이와 비교해 보았을 때 FA를 처리한 경우 ovigerous 시기로 성숙이 진행 되어 Tik-EcR이 증가하였다고 볼 수 있다. 이는 2차 년도의 지질관련 유전자와 생식의 상관관계 분석을 위해 FA를 처리하였을 경우 Vg 유전자 발현량이 증가하여 female의 성숙을 유도시킨다는 결과와 일치한다고 볼 수 있다. 따라서 갑각류의 생식 조절은 MF보다 FA에 의해 조절된다고 볼 수 있다.

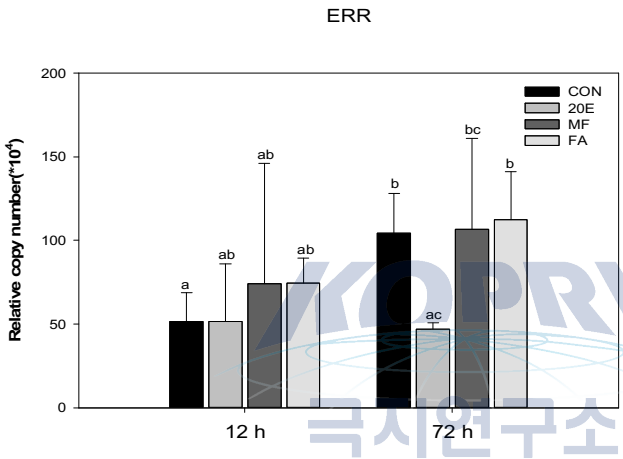
Tik-ERR의 경우 20E를 72시간 처리하였을 때 (그림. 11B), 발현량이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 이와 달리 Tik-RXR은 12시간 FA를 처리하였을 때 통계적으로 유의하게 증가하였으나, 72시간에는 전체적으로 유의한 차이가 없었다 (그림. 11C). 개체의 성숙이 유도 될 때, Tik-EcR과 Tik-RXR의 발현량이 12시간과 72시간에서 역상관관계를 가지는 것으로 보인다.

KOPRI
극지연구소

A)



B)



C)

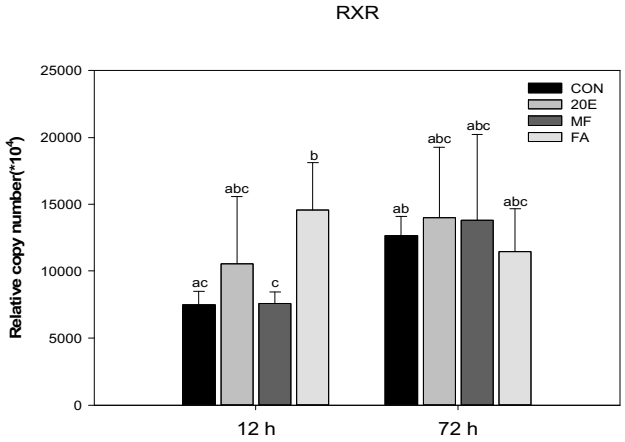


그림. 11. Effects of three hormones on the transcription of three receptor genes. The relative copy numbers were normalized by the number of 18S rRNA. Student's t-test was used to determine significant effects. Bar with dissimilar letters are significantly different ($P < 0.05$).

2. 발달단계에 따른 생식 및 성숙 관련 호르몬 수용체 전사체 분석

가. 연구내용

*T. kingsejongensis*를 성장 단계에 따라 nauplius, copepodite, adult로 나누어 RNAseq을 통해 각 단계별 3개의 스테로이드 호르몬 수용체의 전사체 변화에 대해 분석하였다.

나. 결과

*T. kingsejongensis*를 성장 단계에 따라 Illumina Miseq platform을 이용하여 RNAseq을 수행한 결과 약 36,000개의 contigs를 확보하였다. 이 중 24개의 스테로이드 호르몬 수송에 관련된 수용체를 얻었다.

EcR은 nauplius보다 adult에서 expression value가 감소하였다. 이는 본 연구에서 성숙 정도와 성별에 따라 qRT-PCR을 이용해 분석한 것과 일치한다. RXR의 경우 이와 반대로 nauplius보다 adult에서 높은 expression value를 보였다. ERR의 경우, nauplius에서 copepodite가 되면 감소하며 adult가되면 증가하는 경향을 보인다 (그림. 12). 이 외에도 ecdysteroid receptor - b, hormone receptor-like in 96, nuclear receptor nhr-48은 nauplius시기에는 expression value가 낮으나 adult가 되면서 expression value이 증가하는 것으로 보아 생식에 관련되어 있다고 볼 수 있다. 이와 반대로 hormone receptor-like 97b, nuclear hormone receptor ftz-는 nauplius시기에는 expression value가 비교적 높으나 adult가 되면서 expression value이 감소하는 것으로 보아 이는 성장과 관련되었다고 볼 수 있다 (표. 1).

KOPRI 극지연구소

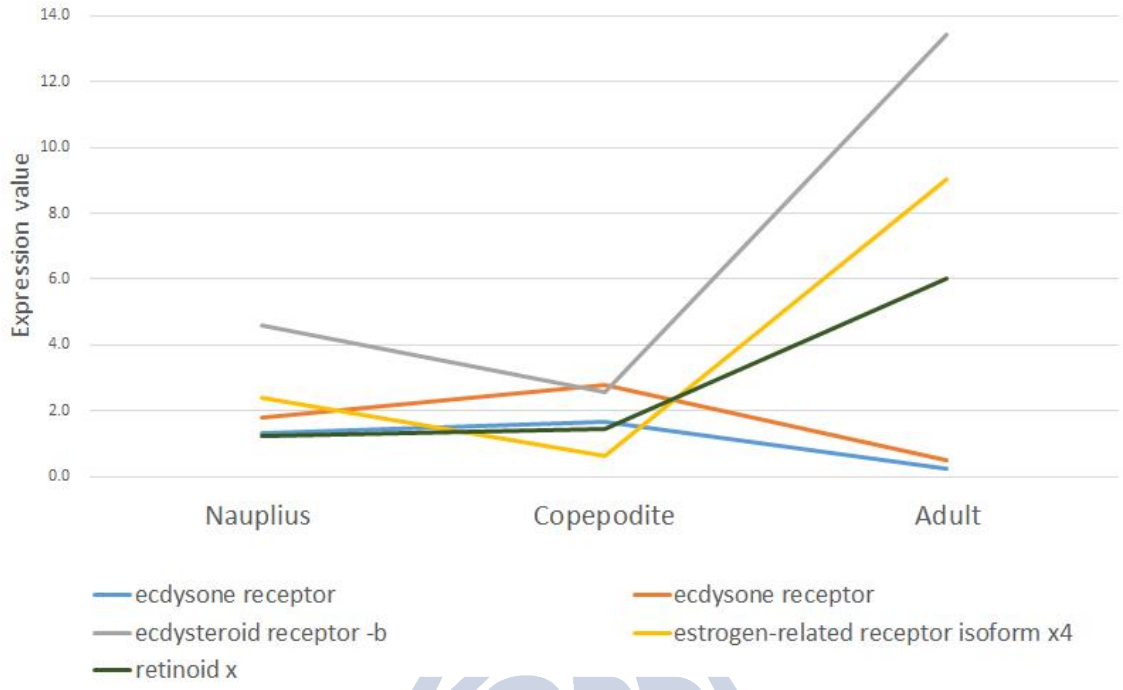


그림. 12. 발달단계별 세 개의 스테로이드 호르몬 수용체의 Expression value

KOPRI
극지연구소

	Expression values		
Sequence Description	Nauplius	Copepodite	Adult
ecdysone receptor	1.335	1.683	0.240
ecdysone receptor	1.780	2.805	0.480
ecdysteroid receptor -b	4.588	2.566	13.426
estrogen-related receptor isoform x4	2.379	0.625	9.024
hormone receptor-like 97b	3.270	4.686	13.035
hormone receptor-like 97b	39.176	18.862	15.888
hormone receptor-like in 96	0.977	1.232	7.449
nuclear hormone receptor ftz-	6.425	8.251	1.123
nuclear receptor	9.192	5.696	47.161
nuclear receptor	2.321	2.743	12.228
nuclear receptor nhr-48	0.939	0.592	1.204
retinoid x	1.234	1.458	6.032
retinoid x	15.346	54.783	27.231

표. 1. 발달단계별 스테로이드 호르몬 수용체의 Expression value

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
1.스테로이드 호르몬과 수용체의 상호 작용 연구	1-1	스테로이드 호르몬 수용체의 발현 및 구조적 특성 연구	- 스테로이드 호르몬 수용체 유전자 확보 - 발달단계 및 성별에 따른 세 개의 스테로이드 호르몬 수용체의 발현연구	100%
	1-2	스테로이드 호르몬이 생식 및 성숙에 미치는 영향 연구	- 호르몬에 따른 스테로이드 호르몬 수용체의 발현변화 분석 - 발달단계에 따른 생식 및 성숙 관련 전사체 분석	100%

KOPRI 극지연구소

제 2 절 대외기여도

국내·외 sequencing 기술의 발달로 인해 갑각류의 생식 관련 유전자들이나 호르몬이 많이 분리되어 있지만 이들의 생식, 성장 및 탈피 그리고 내분비계에 대한 생리학적 연구가 많이 되어 있지 않으며 특히 극지에 서식하는 저온 무척추동물에 대한 연구와 이해가 부족한 실정이다. 따라서 '저온 무척추 동물의 지질, 단백질 상호작용의 저온적응 기작 규명' 연구를 통해 다음과 같은 기여도를 보일 것으로 예상된다.

① 저온 무척추 생물의 생식에 관한 이해
② 다른 갑각류와의 비교분석을 통한 저온 무척추 생물의 특이성 규명
③ 극지 생물 연구에 의한 연구자의 확보와 양성을 위한 기초토대를 제공
④ 향후 활용가치의 중요성이 부각되고 있는 극지 생물생산의 기초자료 제공

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

극지의 해양 생태계는 남극순환류에 의해 주변의 바다와 물리적으로 격리되어 그들만의 독자적인 진화를 해왔으며, 낮은 수온 및 부족한 먹이로 인해 다른 바다의 해양생물과는 구분되는 독특한 생리학적 메커니즘을 가지고 진화를 해왔을 것으로 보인다. 예를 들어 극지에 서식하는 갑각류의 경우 열대에 서식하는 갑각류에 비해 상대적으로 짧은 생식주기를 가지고 있으며, 대부분이 단회성 산란을 한다. 이와 같이 극지 서식종의 생리학적 메커니즘을 이해하기 위해 '저온 무척추 동물의 지질, 단백질 상호작용의 저온적응 기작 규명' 연구를 진행하였다. 이 연구에서는 남극에 서식하는 저온 무척추 동물인 *T. kingsejongensis*의 전사체 분석(transcriptomic analysis)을 통해 성장 및 생식에 중요한 역할을 하는 스테로이드 호르몬 수용체 유전자들을 확보하였다. NGS를 통해 확보한 Tik-RXR, Tik-ERR, Tik-EcR의 구조적 특성을 분석하고 수온 변화와 스테로이드 호르몬에 따른 지질대사 관련 유전자의 발현량을 비교 분석하여 생식에 어떠한 영향을 미치는지 예측하였다. 이번 연구를 통해 도출된 다양한 결과들은 극지 및 저온환경에 서식하는 갑각류의 지질 대사 및 생식 특성을 이해하는 데 주요한 기초자료를 제공할 것으로 예상되며, 또한 *T. kingsejongensis*의 특이적인 생리학적 메커니즘을 이해하여 극지 및 저온환경에 서식하는 무척추 생물의 산업화에 대한 주요 기초 자료로 제공 될 것이다.

KOPRI
극지연구소

1. 학술적 파급효과
   - 저온 무척추 생물의 저온 적응 기작 분석을 통한 진화적 방향을 이해
   - 저온 무척추 생물의 지방 대사 및 생식 특성에 관한 이해
   - 극지 생물 연구에 의한 연구자의 확보와 양성을 위한 기초토대를 제공

2. 경제적 파급효과
   - 저온 적응에 대한 특이적 유전자 및 단백질 특성 발굴
   - 저온 무척추 생물의 산업화에 대한 생식생리학적 기초 자료 제공
   - 기후변화에 따른 생물의 변화를 예측하고 대비할 수 있는 기초자료 확보
   - 극지생물 연구를 통해 극지 연구의 선점확보 및 국제적인 입지의 강화

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

*T. kingsejongensis*는 2014년 남극에서 발견된 신종으로, 남극 King George Island의 세종기지 근처 maxwell bay 에서 채집되었다. 온도변화와 생식 호르몬에 의한 반응은 상업종이 많은 십각류에서 많이 연구되어 있지만, 본 연구의 실험대상종인 *T. kingsejongensis*를 포함한 요각류에서는 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구가 요각류의 성장 및 생식 특성을 알아내는 중요한 기초 연구가 될 것이다.

위탁연구개발과정에서 확보한 세 개의 스테로이드 호르몬 수용체 (Ecdysone receptor)의 연구는 2012년 기준 절지동물에서 약 70종에서 연구가 되었으며, 그 중 갑각류는 9종이 연구되었다. 2010년에 곤충과 갑각류의에서 sesquiterpenoid 호르몬(farnesoic acid, methyl farnesoate)의 합성과 관련된 효소의 진화와 기능적 차이에 대해 연구하였으며, 2012년 로브스터의 생식에서 sesquiterpenoid 호르몬인 farnesoic acid와 methyl farnesoate와 RXR과의 관계에 대해서 연구했으며, 2015년 *Diploptera punctata*에서 생식에서의 RXR/USP와 EcR의 조절에 관해 연구하였다.

세 개의 스테로이드 호르몬 수용체의 특성과 생식 및 성장과의 상관관계를 연구하기 위해서는 RNAi 기법과 같은 유전자 발현을 조절할 수 있는 전략이 개발되어야 한다. 2011년에 곤충 *Bombyx mori* embryos를 대상으로 injector를 이용해 siRNA를 주입해서 효율적으로 유전자 억제할 수 있는 timimg과 농도 등이 연구되었고, 또한 가장 효과적인 방법이라고 알려진 double-stranded RNA (dsRNA)를 *Aedes aegypti*에서 직접 injection 하지 않고 sucrose를 이용한 oral delivery를 통해 성공적으로 유전자를 억제한 연구도 보고되었다. 이러한 기법들을 이용해 대상유전자를 억제하여 연구하는 것이 십각류와 곤충에서는 성공적이었지만, 크기가 아주 작은 요각류에서는 아직 이러한 기술이 적용되기 어려운 부분이었다. 하지만 2014년에 *L. salmonis* larvae를 대상으로 한 dsRNA soaking 실험이 성공적이었으므로, 이 연구에서 사용된 기법이 본 실험대상종에도 적용 될 수 있는지에 대한 추후 연구가 필요하다고 본다.

KOPRI 극지연구소

제 7 장 참고문헌

Aranda, Ana, and Angel Pascual. "Nuclear hormone receptors and gene expression." Physiological reviews 81.3 (2001): 1269-1304.

Henrich, Vincent C. "The ecdysteroid receptor." Insect endocrinology (2012): 177-218.

Hui, Jerome HL, et al. "Evolution and functional divergence of enzymes involved in sesquiterpenoid hormone biosynthesis in crustaceans and insects." Peptides 31.3 (2010): 451-455.

Hult, Ekaterina F., et al. "RXR/USP and EcR are critical for the regulation of reproduction and the control of JH biosynthesis in Diploptera punctata." Journal of insect physiology 80 (2015): 48-60.

Hwang, Dae-Sik, et al. "Cloning and expression of ecdysone receptor (EcR) from the intertidal copepod, Tigriopus japonicus." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 151.3 (2010): 303-312.

Hwang, Dae-Sik, et al. "Genome-wide identification of nuclear receptor (NR) superfamily genes in the copepod Tigriopus japonicus." BMC genomics 15.1 (2014): 993.

Marcial, Helen S., Atsushi Hagiwara, and Terry W. Snell. "Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod Tigriopus japonicus." Environmental toxicology and chemistry 22.12 (2003): 3025-3030.

Puthumana, Jayesh, et al. "Ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP) genes from the cyclopoid copepod Paracyclopina nana: Identification and expression in response to water accommodated fractions (WAFs)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 192 (2017): 7-15.

Qu, Zhe, et al. "How did arthropod sesquiterpenoids and ecdysteroids arise? Comparison of hormonal pathway genes in noninsect arthropod genomes." Genome biology and evolution 7.7 (2015): 1951-1959.

KOBRI 극지연구소

Tiu, Shirley Hiu-Kwan, et al. "Farnesoic acid and methyl farnesoate production during lobster reproduction: possible functional correlation with retinoid X receptor expression." General and comparative endocrinology 175.2 (2012): 259-269.

KOPRI
극지연구소

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

KOPRI 극지연구소