

## 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 배발생시 Cathepsin L 유전자의 발현부위

권준영 · Charles R Tyler\* · 권혁추 · 장영진\*\*  
선문대학교 · \*University of Exeter · \*\*부경대학교

### 서론

초기 발생과정중 필요한 영양분을 전적으로 난황물질(yolk materials)에 의존하는 난생(oviparous) 어류에 있어, 난황단백질(yolk protein)의 분해과정은 수정(fertilization)이후부터 입이 열려 외부로부터 먹이를 섭취(first feeding)하는 단계에 이르기까지 발생배(embryo)의 생존 및 성장에 결정적 영향을 미칠 수 있다. Cathepsin L은 cysteine계열에 속하는 단백질 분해효소의 하나로, 포유류에서는 항원의 처리(antigen processing) 및 insuline의 생성 등에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 최근에는 어류 및 양서류 등과 같은 난생 척추동물의 난황단백질 분해과정에도 관련되어 있는 것으로 추정되고 있다(Yoshizaki and Yonezawa 1998; Carnevali et al. 2001; Kwon et al. 2001) .

현재까지 어류 배발생중 cathepsin L 유전자 발현의 조사는 극히 일부 어종에만 국한되어 이루어졌으며, 특히 유전자 발현부위의 조사는 zebrafish 한 종에 대해서만 실시되었다(Vogel and Gerster 1997). 따라서 본 연구에서는 어류의 난황단백분해 메카니즘을 설명하기 위한 기초자료를 얻고자, 무지개송어 배발생 과정중 cathepsin L 유전자의 발현부위를 조사하였다.

### 재료 및 방법

무지개송어의 수정난을 수온 8-10°C의 조건하에 부화직후까지 배양하면서 각 발생 단계별로 채집한 후, semi quantitative RT-PCR 및 Wholemount In Situ Hybridization technique을 이용하여 cathepsin L 유전자의 발현량 변화 및 발현부위를 조사하였다. RT-PCR을 위한 primers와 In Situ Hybridization을 위한 antisense 및 sense probes은 선행된 연구(Kwon et al. 2001)에서 cloning한 cathepsin L 유전자의 염기서열에 기초하여 제작하였다. RT-PCR 결과는 Image analysis system (ChemImager, Alpha Innotech Co.)을 이용하여 수치화하였고, control gene으로 사

용한  $\beta$ -actin 유전자의 발현량에 대한 cathepsin L 유전자의 상대적 발현량을 구하여 각 발생단계별 발현량 변화를 비교하였다. In Situ Hybridization에 사용한 antisense 및 sense probes은 DIG oligonucleotide labeling kit (Roche Biochemicals)를 이용하여 표지하였다. 분석할 난과 발생배는 4% paraformaldehyde로 고정시킨후 전처리 (proteinase K treatment, acetylation etc.)하여 DIG labeling된 probes과 Hybridization시키고, 이어 anti-digoxigenin-AP와 항원항체반응을 시켰다. 반응이 끝나면 NBT/BCIP로 염색하여 Hybridization signals을 시각화하고 입체현미경하에서 검정하였다.

## 결과 및 요약

무지개송어  $\beta$ -actin mRNA에 대한 cathepsin L mRNA의 상대적 발현비율은 수정 직후부터 수정후 2일째까지 가장 높았으며, 수정후 9일째부터는 50%이상 감소하여 수정후 30일째까지 유사한 수준을 유지하다가, 수정 37일후부터 더욱 감소하였다. 이는 cathepsin L이 초기 난할 및 기관형성시 중요한 역할을 한다는 사실을 시사한다. Wholemout In Situ Hybridization에 의한 발현부위의 조사에서는, cathepsin L 유전자가 수정초기(3일경)에 동물극(animal pole)쪽에 국한되어 발현되어 지는 것이 관찰되었다. 발생이 진행되어 Embryonic shield가 형성된 이후(7일경)에는 난황낭상피(yolk sac membrane)가 난황덩어리를 덮어내려오고 이 시기이후부터 배(embryo)부분과 난황낭상피 부분에 강한 그리고 지속적인 cathepsin L 유전자 발현이 관찰되었다. 난황낭상피 부분에서의 지속적인 발현은 cathepsin L이 이 어종에서 난황단백질의 분해에 관여하고 있음을 시사한다.

## 참고문헌

- Carnevali, O., Mosconi G., Cardinali M., Meiri, I. and Polzonetti-Magni, A. 2001. Molecular components related to egg viability in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Molecular Reproduction and Development* 58: 330-335.
- Kwon J.Y., Prat F., Randall, C. and Tyler, C.R. 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction* 65: 1701-1709.
- Vogel A.M. and Gerster, T. 1997. Expression of a zebrafish cathepsin L gene in anterior mesendoderm and hatching gland. *Development Genes and Evolution* 206: 477-479.
- Yoshizaki, N. and Yonezawa, S. 1998. Cysteine proteinase plays a key role for the initiation of yolk digestion during development of *Xenopus laevis*. *Development Growth & Differentiation* 40: 659-667.