

# 무당개구리 (*Bombina orientalis*) 배아에서 제초제 Molinate에 의한 발생 위해성 평가 및 Biomarker 유전자 발굴

강한승, 계명찬, 김문규  
(한양대학교 자연과학대학 생명과학과)

## ABSTRACT

Molinate is a thiocarbamate herbicide used primarily in rice production. Chondrogenesis is a multistep process that is essential for endochondral bone formation. The transcription factor Sox9 has an essential role during the sequential steps of chondrocyte differentiation. *Bombina orientalis* is one of the most common amphibians in the world and comprises a large proportion of their total number. We examined the embryotoxic and survival effects of molinate at various concentrations in *B. orientalis* embryos. The survival rates of embryos at 312h post fertilization treated with molinate was decreased with concentration dependent manner. Also, developmental malformations appeared by molinate in *B. orientalis* embryos. The expression levels of Sox9 mRNA was examined by RT-PCR. In our result showed that Sox9 expression was found to be increased in malformed tadpole compared to normal tadpole. These results suggested that molinate was detrimental for survival and development of *B. orientalis* embryo.

## I. 서론

내분비계 장애물질이란 '내분비 기능에 변화를 일으켜, 생체 또는 그 자손의 건강에 위해한 영향을 나타내는 외인성 물질'이라 정의된다. 내분비계 장애물질은 종류에 따라 교란시키는 호르몬의 종류 및 교란 방법이 서로 다르다고 알려져 있으며, 생물의 내분비계를 교란하여 발생과정의 이상, 성 행동 및 신경과 면역계의 이상 발생을 야기한다는 보고들이 급증하고 있다 (Colborn *et al.* 1996; Cadbury 1997). 내분비계 장애물질은 세계야생동물보호기금(World Wildlife Fund; WWF)의 목록에는 67종이 일본 후생성에서는 142종의 물질이 내분비계 장애물질로 분류되고 있으며, 많은 종류의 농약이 포함되어 있다.

양서류는 먹이연쇄의 중위 포식자로 먹이연쇄를 통해 내분비계 장애물질의 생체 내 축적이 예상되는 표적생물로서, 내분비계 장애물질의 순환 및 생체 축적회로의 중간자로 중요한 위치를 갖는다. 무당개구리 (*Bombina orientalis*)는 저지대에서 고지대의 계류에 이르기까지 전역에 많이 분포하며 3월부터 7월까지 논이나 물가의 웅덩이에서 산란을 한다. 이 시기는 작물의 재배를 위한 농약의 사용이 많은 시기로서 무당개구리 (*B. orientalis*)를 비롯한 양서류의 서식지 및 산란장소가 논이나 물가의 웅덩이이기 때문에 이들 농약이 배 발생에 영향을 미치리라 생각된다.

Molinate는 내분비계 장애물질로 분류되어진 thiocarbamate계 제초제로 벼농사에 주로 이용한다. Molinate는 사람 및 흰쥐에 노출시 위장장애, 정자형성 장애, 태아의 기형 및 사산율이 증가한다는 보고가 있다 (Stevens and Sumner 1991).

Sox9 유전자는 골격 형성과정에서 조절자 역할을 하며, 연골세포의 분화에 필수적이다. 사람에게서 Sox9 유전자의 이상은 치사골격기형증후군인 campomelic dysplasia를 유발하며 (Forster *et al.* 1994) 생쥐에서 Sox9 유전자의 과발현은 연골세포의 증식과 분화과정에 이상을 초래하여 기형을 유발 한다는 보고가 있다 (Akiyama *et al.* 2002).

내분비계 장애물질이 발생 및 생식에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 중요하다. 생식과정은 종의 유지를 통한 생태계의 기능과 안정성 유지에 필수적인 생명활동으로 다양한 오염물질 및 독성물질에 매우 민감하다. 따라서 내분비계 장애물질에 의한 발생 및 생식 위해성 평가는 매우 중요한 연구 주제이다. 본 연구에서는 내분비계 장애물질인 농약의 위해성 평가에 한국 토착 양서류인 무당개구리 (*B. orientalis*)를 모델생물로 이용하였으며, molinate가 배아의 발생에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 또한 척추골 기형 발생시 Sox9 유전자의 발현 양상을 통하여 biomarker 유전자로의 사용이 가능한지를 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

강원도 홍천 지역에서 채집한 무당개구리 (*B. orientalis*)의 암컷과 수컷에 hCG 750 및 500 IU를 주사하여 과배란 및 정자의 성숙을 유도한 후, 인공수정을 통하여 수정란을 얻었다. 수정란은 alachlor (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M)을 처리한 배양액에 넣어 2주간 배양하여 관찰하였다.

Sox9 유전자의 발현은 정상 및 척추골 기형 올챙이에서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 reverse transcriptase 효소를 이용하여 42°C에서 1 시간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 taq polymerase와 sox9 primer를 이용하여 annealing temperature 50°C에서 35 cycle 수행하였다. PCR 산물은 agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

Molinate를 수정란에 처리한 후, 생존율을 관찰한 결과 처리농도가 높아질수록 생존율은 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 molinate에 노출된 배아에서는 몸통 휨, 꼬리 휨, 꼬리형성장애 등의 기형이 관찰되었다.

정상인 올챙이와 몸통이 휘어진 기형 올챙이에서의 Sox9 유전자의 발현 양상을 관찰한 결과 몸통이 휘어진 기형 올챙이에서 Sox9 유전자의 발현이 높게 나타났다.

이러한 결과로서 molinate는 배아의 발생에 유해하게 작용하여 생존율을 감소시키며, 기형을 유발하는 것을 알 수 있었다. 또한 Sox9 유전자는 내분비계 장애물질에 대한 biomarker로서 이용이 가능하리라 생각된다.

### IV. 결론

Molinate는 벼농사에 많이 사용하는 농약으로서 이들 농약의 사용시 적절한 농도의 사용이 이루어져야하며, 본 연구결과는 이들 농약의 사용에 있어서 위해한 농도의 기준으로 사용할 수 있으리라 생각된다. 또한 환경오염에 대한 위해성 평가에 Sox9 유전자를 biomarker로, 한국 토착 양서류인 무당개구리 (*B. orientalis*)를 모델 생물로 이용이 가능하리라 생각된다.

### 참고문헌

- Akiyama H, MC Chaboissier, JF Martin, A Schedl and B de Crombrughe. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16: 2813-2828.
- Cadbury D. 1997. *The feminization of nature; our future at risk*, Penguin Books Ltd.
- Colborn T, D Dumanoski and JP Myers. 1996. *Our stolen future*. The Spieler Agency.
- Forster JW, MN Dominguez-Steglich, S Guioli, G Kwok, PA Weller, M Stevanovic, J Weissenbach, S Mansour, ID Young and PN Goodfellow. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 372: 525-530.
- Stevens JT and DD Sumner. 1991. Herbicides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. 4-7.