

누에 유충에서 생산한 열목어 유전자재조합 FSH 및 LH의 생물학적 활성

고혜연·박우동·김미애·*김대중·*이철호·*이채성·**Kobayashi M·손영창
강릉대학교·*국립수산업과학원·**Int'l Christ. Univ.(Japan)

서론

경골어류의 뇌하수체에서는 당단백질성 호르몬류가 생산되는데, 두 종류의 생식선자극호르몬 (GTHs; FSH와 LH)과 갑상선자극호르몬(TSH)이 이와 같은 당단백질 그룹에 속한다. 이 호르몬들은 공통적인 α 쇠와 호르몬 특이적인 β 쇠를 가진다 (Swanson and Dittman, 1997). 연어과 어종들에서는 FSH가 난황형성과 정자형성의 역할을 담당하며, LH는 배우자의 최종 성숙을 조절한다고 알려져 있다 (Swanson and Dittman, 1997).

본 연구그룹은 냉수성 고유어종인 열목어의 멸종을 방지하고 번식시키기 위한 유전공학적 연구 방법을 검토하기 위하여 GTH α , FSH β , LH β 쇠를 cloning하여 염기서열을 결정하였으며, 이들 유전자를 활용하여 진핵세포에서 유전공학적으로 생산할 수 있는 방법을 모색하였다 (Choi et al., 2005). 본 연구에서는 후속연구로서 단백질생산의 효율을 극대화하기 위하여 누에유충을 생산공장화하고, GTH의 당수식을 향상시키기 위한 NCS(N-linked carbohydrate sequence) 영역을 β 와 α 쇠 사이에 삽입시킨 유전자재조합 FSH 및 LH를 생산하여, 생산된 호르몬의 생물학적 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

열목어의 생식선자극호르몬 cDNA (Choi et al., 2005)로부터 재조합 유전자를 제작하였다. 재조합한 DNA constructs는 순수한 재조합단백질의 정제효율을 높이기 위하여 NH₂- 및 COOH-말단에 His-tag이 첨가되었으며, 당수식부위를 2군데 가진 NCS영역이 부가되었다. 삽입할 cDNA를 pYNG transfer vector에 cloning하여 baculovirus genomic DNA와 함께 *Bombyx mori* 곤충세포에 형질도입한 후 재조합 virus를 Kobayashi et al. (2006)의 방법으로 스크리닝하고 누에유충에 감염시켰다. 접종후 5-7일 사이에 hemolymph를 회수하고 원심분리 (100,000 g)하여 상등액은 분리정제전까지 -80℃에 보관하였다. Ni-NTA Agarose (Qiagen, Germany)를 이용하여 His-Tag 융합단백질을 분리하였으며, anti-GTH α 쇠 및 anti-His-Tag 항체를 이용한 Western blot방법으로 단백질의 존재를 확인하였으며, NH₂-말단의 아미노산 잔기를 분석하였다. 또한, 단백질내 당의 부가정도를 조사하기 위하여 N-glycosidase F (PNGase F)를 사용하여 분자량의 변화를 조사하였다.

FSH 및 LH 재조합단백질의 생리활성은 연어과 어류의 FSH 및 LH 수용체 발현 벡터 (Oba et al., 1999)를 형질도입한 Cos-7세포에서 cAMP-반응형 luciferase reporter assay와 세포질내 cAMP assay를 실시하여 조사하였다. 또한, 생체내에서 재조합단백질의 기능을 알기 위하여 미성숙 및 성숙 무지개송어의 복강에 10 μ g/100g 체중의 농도로 주사하여 1-6일 후 생식소의 변화 및 혈중 성스테로이드호르몬 농도를 조사하였다. 재조합단백질의 정액생산 및 배란유도 효과는 성숙한 금붕어 수컷 및 성숙 낚자루 암컷을 이용한 Kobayashi et al. (2006)의 방법으로 조사하였다.

결과 및 요약

열목어의 FSH 및 LH 유전자재조합 단백질은 분자량 약 35-40 kDa의 단백질임이 확인되었으며 de-N-glycosylation 반응 후 분자량의 현저한 감소가 관찰되어 당이 부가된 형태의 호르몬이라고 판단되었다.

FSH 및 LH 수용체 cDNA를 이용한 *in vitro* assay결과, 세포내 cAMP 농도가 증가하는 결과를 얻을 수 있었으므로, 각각의 수용체에 유전자재조합 FSH 및 LH호르몬이 특이적으로 결합한다고 판단된다.

열목어와 같은 연어과어류인 미성숙 무지개송어의 복강에 유전자재조합 FSH를 1회 주사한 시험군에서 대조군 및 LH주사군에 비하여 난모세포가 현저히 발달되고 난황형성기의 중기에 도달한 난모세포가 다수 관찰되었으며, 주사 1일 후에 혈액내 estradiol-17 β 가 증가되었다. 또한, 성숙한 무지개송어에 호르몬을 주사한 결과 FSH 및 LH주사군에서 최종성숙유기호르몬(DHP)이 증가된 개체가 확인되었다. 금붕어의 정액생산은 FSH 및 LH주사군에서, 낚자루의 배란은 FSH주사군에서 관찰되었다.

이상의 결과를 종합적으로 판단하면, 누에유충에서 생산한 유전자재조합 열목어 FSH와 LH는 종묘생산이 어려운 어류의 성숙유도에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

- Choi E., H. Ko, J. Shin, M.-A. Kim, Y.C. Sohn. 2005. Expression of gonadotropin genes in Manchurian trout *Brachymystax lenok* and production of recombinant gonadotropins. *Fisheries Sci.*, 71, 1193-1200.
- Kobayashi M., T. Morita, K. Ikeguchi, G. Yoshizaki, T. Suzuki, S. Watabe. 2006. Production of Biologically Active Recombinant Goldfish Gonadotropins by Baculovirus in Silkworm Larvae. *Aquacul.*, in press.
- Oba Y., T. Hirai, Y. Yoshiura, M. Yoshikuni, H. Kawauchi, Y. Nagahama. 1999. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265, 366-371.
- Swanson P., A. Dittman. 1997. Pituitary gonadotropin and their receptors in fish. In: Kawashima S., Kikuyama S. (Eds.), *Advance in Comparative Endocrinology XIII International Congress of Comparative Endocrinology*, Yokohama, Japan, pp. 841-846.