

등근성게(*Strongylocentrotus nudus*) Estrogen Receptor-Related Receptor(ERR)의 초기 발생시 유전자 발현 패턴과 전사 활성

맹세정 · 김미순 · 손영창[†]
강릉원주대학교 해양분자생명공학전공

Gene Expression Pattern during Early Embryogenesis and Transcriptional Activities of Estrogen Receptor-Related Receptor(ERR) in Sea Urchin, *Strongylocentrotus nudus*

Sejung Maeng, Misoon Kim and Young Chang Sohn[†]

Dept. of Marine Molecular Biotechnology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

ABSTRACT : The estrogen receptor-related receptors (ERRs) are a group of nuclear receptor superfamily of transcription factors. ERRs and estrogen receptors (ERs) have overlapping affinities for coactivators and DNA binding sites, but differ markedly in ligand binding and activation. The three mammalian ERR genes have been implicated in diverse physiological processes ranging from placental development to maintenance of bone density, whereas the molecular diversity, function, and regulation of ERRs in non-mammalian species are not well understood. In the present study, to investigate the involvement of ERR in transcription and embryogenesis in marine invertebrates, a cDNA encoding ERR (SnERR) was cloned from the gonad in *Strongylocentrotus nudus*, by polymerase chain reaction (PCR). The amino acid sequence of SnERR showed high homology with that of *S. purpuratus* (91%). A phylogenetic tree clearly showed that SnERR is a member of the ERR family and clustered in echinodermata group as supported by a high bootstrap value. We examined gene expression of SnERR during embryonic development of *S. nudus* using real-time PCR. During the embryonic development, the mRNA of ERR was significantly high levels in early development stages (4~64 cell) and larval stages. The SnERR slightly activated transcription through the classical estrogen response elements (EREs) in the presence of genistein. In addition, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α known as a coactivator of ERR enhanced the snERR-mediated transactivation, suggesting that the PGC-1 α is a coactivator of SnERR.

Key words : Estrogen receptor-related receptor, ERR, Sea urchin, Embryogenesis.

요약 : 구조적으로 estrogen 수용체(estrogen receptor, ER)와 유사한 estrogen receptor-related receptor(ERR)는 포유동물에서 배발생 후기에 외배엽 형성과 관련되어 있다고 알려진 고아핵수용체(orphan nuclear receptor)이다. ERR은 ER과 DNA binding domain의 보존성은 유사하지만, ligand 결합 및 전사 활성은 다르다. 포유동물의 ERR에 관한 연구에 비하여 해양 무척추동물의 ERR에 대한 기능 연구는 매우 부족하다. 본 연구에서는 우리나라 동해안에 주로 서식하는 등근성게(*Strongylocentrotus nudus*) ERR의 초기 발생시 유전자 발현 변화와 전사 활성 기능을 조사하기 위해 먼저 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 cDNA를 동정하였다. 등근성게 ERR은 *S. purpuratus*와 91%의 높은 상동성을 보였으며, 계통수 분석을 통해 무척추동물 ERR의 clade에 포함되는 것을 알았다. 등근성게 배발생 시기에 ERR 유전자 발현을 알아보기 위하여 real-time PCR을 실시한 결과, 4~64세포기와 유생기에 mRNA level이 높은 경향을 나타내었다. 또한 호르몬 및 co-regulator에 의한 등근성게 ERR의 전사 활성을 조사한 결과, 호르몬에 의한 특이성은 확인되지 않았지만, peroxisome proliferator activated receptor(PPAR) γ coactivator 1 α (PGC-1 α)가 등근성게 ERR의 coactivator임을 입증할 수 있었다.

이 연구 결과는 향후 새로운 ligand 발굴과 coregulator와의 상호작용 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

[†] 교신저자: 강원도 강릉시 강릉대학로 120번지 강릉원주대학교 해양 분자생명공학전공. (우) 210-702, (전) 033-640-2348, E-mail: ycsohn@gwnu.ac.kr

서 론

Estrogen receptor-related receptor(ER)은 고아핵수용체로서 핵수용체 superfamily에 속한다(Giguere et al., 1988). 포유동물에서는 세 종류의 subtypes 즉, ER α , ER β 및 ER γ 가 동정되었다(Chen et al., 1999; Giguere et al., 1988; Heard et al., 2000; Hong et al., 1999). ERRs과 estrogen receptors(ERs)은 coactivators 결합능력 및 DNA binding site 친화성은 유사하지만, ligand 결합과 전사 활성화에 있어서는 다르게 나타난다(Giguere, 2002; Vanacker et al., 1999a; Vanacker et al., 1999b). ERRs은 ER의 ligand인 estradiol과 결합하지 않고, diethylstilbestrol(DES)와 같은 합성 ligand에 반응하거나 알려지지 않은 ligand에 의하여 활성화 된다고 보고되었다(Vanacker et al., 1999b). 현재까지 높은 친화성을 가진 ERR의 natural ligand는 밝혀지지 않았지만, ER의 ligand 중 4-hydroxytamoxifen과 DES는 ERR의 전사 활성을 조절한다고 알려져 있다(Coward et al., 2001; Tremblay et al., 2001a; Tremblay et al., 2001b).

ERR은 배발생 동안에 외배엽 형성시기에 발현되며, 태반의 초기 발달에도 관여한다고 알려졌다(Luo et al., 1997; Mitsunaga et al., 2004; Pettersson et al., 1996; Tarrant et al., 2006). 또 성체에서는 신장과 심장, 정소, 시상하부, 해마, 소뇌, 전립선을 포함하는 몇몇의 조직에서 낮은 수준으로 발현된다고 밝혀졌다(Giguere et al., 1988, Pettersson et al., 1996, Tarrant et al., 2006). 한편, ERR의 구조, 기능 및 특징에 대한 연구는 주로 육상 포유동물에서 이루어졌으며, 해양생물에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

최근 성게류 *Strongylocentrotus purpuratus*의 초기 배발생기에 다양한 그룹의 전사인자, 핵수용체 등 주요 유전자의 발현 패턴이 보고되었다(Howard-Ashby et al., 2006a; Howard-Ashby et al., 2006b). 또한 등근 성게(*S. nudus*)의 ER β like 1 mRNA가 산란기인 8월에 발현량이 현저히 증가하였으며, 유생기에 높은 발현을 보였다(Jung & Sohn, 2007; Jung et al., 2007). 성게는 수정과 초기 배발생과정이 발생생물학적으로 잘 알려져 있기 때문에 발생 시스템을 연구하는데 있어서 매우 유용하게 이용되어지며, 분자 생리학적 연구도 활발히 진행 중이다(NIH Sea Urchin Genome Project; Hood et al., 2001). 본 연구에서는 우리나라 동해안에 주로 서식하는 등근성게의 고아핵수용체 ERR을 동정하여 ERR 유전자

발현 변화를 배발생기 별로 조사하고, ERR의 전사 활성 기능을 검토하였다.

재료 및 방법

1. RNA 추출 및 cDNA 합성

ERR 유전자를 동정하기 위해 2004년 산란시기의 등근성게를 강원도 강릉시 연안에서 채집하였으며, 생식소를 적출하여 mRNA를 추출할 때까지 액체 질소에 급속동결 후 -80°C 에 보관하였다. 이후 Quickprep™ Micro RNA purification kit(Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 mRNA를 추출하였으며, 추출한 mRNA를 SMART RACE cDNA synthesis kit(Clontech Lab, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

또한 ERR 유전자의 배발생 동안의 발현을 조사하기 위해 2007년 8월경 산란시기 등근성게를 강원도 양양군 기사문리 연안에서 채집하였으며, Jung & Sohn(2007)의 방법에 따라 RNA 추출과 cDNA를 합성하였다.

2. Polymerase Chain Reaction(PCR) 분석 및 유전자 동정

ERR을 동정하기 위해 등근성게와 상동성이 높을 것으로 예상되는 *S. purpuratus*의 염기서열을 바탕으로, 제한효소 인식 염기가 첨가된 ERR의 primer(Table 1)를 제작하였다. 성게 배 발생 stage 중 64 cell stage의 cDNA를 template로 하여, $2\times$ GC buffer $5\ \mu\text{l}$, dNTP $0.8\ \mu\text{l}$, 제작된 각 primer $0.5\ \mu\text{l}$, LA Taq DNA polymerase(TaKaRa Bio, Shiga, Japan)를 사용하여 총량 $10\ \mu\text{l}$ 로 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. Predenaturing step을 94°C 에서 5분, denaturing step에서 30초, annealing step 55°C 에서 40초, extension step에서 72°C 에서 1분 10초, postextension step에서 72°C 에서 7분으로 총 30 cycle을 실행한 후 DNA 밴드를 agarose gel에서 확인하였다.

3. Plasmid 및 분자계통수 분석

SnERR open reading frame(ORF) 예상 크기의 PCR product를 1% agarose gel purification(Bioneer, Deajeon, Korea)을 이용하여 추출한 후, pcDNA3 HA-NLS vector(Zavacki et al., 1997)에 삽입하고 *Escherichia coli* XL1-blue competent

cell에 transformation하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA에 EcoR I, EcoRV 제한효소 처리하여 삽입된 insert를 확인하고, T7과 SP6 primer를 이용하여 sequence 분석을 의뢰하였다. 그리고 분석한 염기서열을 바탕으로 CLUSTAL W로 비교 분석한 후, neighbor-joining 방법을 사용한 PHYLIP software를 통하여 분자 계통수를 제작하였다. 또한, 리포터 유전자의 전사 활성 실험은 positive control로 포유동물 세포 발현 벡터에 삽입되어 있는 *Halocynthia roretzi* ERR(hrERR), mouse ERR(mERR)(Park et al., 2009), masu salmon estrogen receptor α (msER α)(Maeng et al., 2005)를 사용하였다.

4. Reporter Gene Assay

인간 신장 세포인 293T 세포(5×10^4 cell/well)에 둥근성계의 ERR 발현용 plasmid와 estrogen-response elements(ERE)-Luc(Maeng et al., 2005), ERR response elements(ERRE)-Luc(Park et al., 2009)와 β -galactosidase 발현용 plasmid (100 ng)를 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 1.5 μ l 사용하여 형질 도입시키고, 3시간 후에 10% charcoal-stripped FBS와 1% 항생제를 포함하는 배지로 교환하였다. 24시간 동안 37°C, CO₂ 5% incubator에 배양 후 estradiol-17 β , genistein을 각 농도별로 처리하였으며, hormone 처리 12시간 이내에 cell culture lysis reagent 5X (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 세포를 용해시키고, 실험군 간의 형질 도입률을 보정하기 위하여 β -galactosidase assay(200 mM sodium phosphate buffer pH 7.3, 2 mM MgCl₂, 100 mM β -mercaptoethanol(98%), 1.33 mg/ml O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG))와 전사 활성을 조사하기 위하여 luciferase assay buffer(1M KH₂PO₄ pH 7.8, 0.5 M MgCl₂,

0.1 M ATP, 10mM luciferin) 및 luminometer(Berthold Co., Wildbad, Germany)를 사용하여 측정하였다.

5. Western Blot

단백질 발현은 Western blot을 실시하여 확인하였다. Sample을 stacking gel(30% acrylamide, 1.0 M Tris(pH 6.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED)와 12% running gel(30% acrylamide, 1.5 M Tris(pH 8.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED)에 100 V로 1시간, 130 V 1시간 loading하였으며, PVDF membrane에 40 V로 1시간 transfer시켰다. Transfer된 membrane은 2.5% skim milk가 포함된 TBS-T buffer(1 M Tris-Cl(pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20)를 사용하여 preincubation하였다. pcDNA3 (HA-NLS)-SnERR을 검출할 수 있는 monoclonal anti HA (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1차 항체로 사용하였고(4°C, overnight), goat anti-mouse IgG-HRP(Santa Cruz, California, USA)를 2차 항체로 사용하였다(room temperature, 1 hr 30 min). 각각의 항체처리 후 TBS-T를 사용하여 10분간 3회씩 실온에서 membrane을 세척하였다. 항체 처리를 마친 membrane은 ECL™ Western Blotting Analysis System Kit(Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, UK)를 사용하여 발색시키고 X-ray film에 현상하였다.

6. Real-time PCR 분석

초기 배 발생 시기에 따른 ERR의 유전자 발현 변화는 real-time PCR 방법으로 확인하였다. 사용한 올리고 프라이머들은 Primer Express v3.0 software(Applied Biosystems, Boston, MA, USA), 둥근 성계의 ERR 및 *S. purpuratus* ubiquitin 염기서열을 이용하여 제작하였다(Table 1). 실험결과로부터 얻

Table 1. Oligonucleotides used for sequence determination and PCR, to obtain cDNAs encoding ERR and quantitative real-time PCR (QPCR) for ERR and ubiquitin

| Primer name | Direction | Sequence |
|-----------------|-----------|---|
| SnERR(EcoR I)-F | Sense | 5'-CGCGAATTCATGGCTTCATCAGACGAAGGTGAC-3' |
| SnERR(EcoR V)-R | Antisense | 5'-CGCGATATCTTAATCGCACCTGGATTCCAGC-3' |
| SnERR-Q-F | Sense | 5'-ATGAAGAGCAGGCAGCAAGAA-3' |
| SnERR-Q-R | Antisense | 5'-GGAGGGTGGAGAGGAGATGG-3' |
| SnUbiquitin | Sense | 5'-TCATCTCGTTCTCAGGATTCGT-3' |
| SnUbiquitin | Antisense | 5'-CGAAGATGAGACGCTGCTGAT-3' |

Note. underlines, restriction enzyme recognition sites.

어진 자료 값 사이의 유의성 검정은 SPSS 통계 패키지(V.12)에 의한 ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다($p < 0.05$).

결 과

1. *S. nudus* ERR 동정 및 분자계통수 분석

*S. nudus*에서 cloning된 ERR cDNA는 1,251 bp로 개시 코돈과 종결 코돈을 포함하여 416개의 아미노산을 암호화한다(Fig. 1). 동근성계의 ERR(SnERR)은 *S. purpuratus*의 ERR 아미노산 서열과 비교하였을 때 91%의 상동성을 보였으며, 사람과는 33.2%의 상동성을 나타내었다. 또한 Western blot으로 확인한 결과 SnERR 발현 벡터를 형질도입한 293T 세포의 용해물에서 HA-NLS 영역(3 KDa)을 포함한 약 49 KDa의 SnERR 단백질을 확인하였다(Fig. 2). 본 연구를 통해 얻어진 SnERR의 아미노산 서열을 neighbor-joining 방법으로 분석하여 분자계통수를 작성하였다(Fig. 3). 계통 분석 결과 ERR들은 $-\alpha$, $-\beta$ 및 $-\gamma$ 의 세 질로 크게 분리되었다. 또한 ERR- α , $-\beta$ 및 $-\gamma$ 는 각각 포유류 및 경골어류로 분리되었다. SnERR은 같은 성계류에 속하는 *S. purpuratus*의 ERR과 가장 가까운 유연관계를 나타내었다.

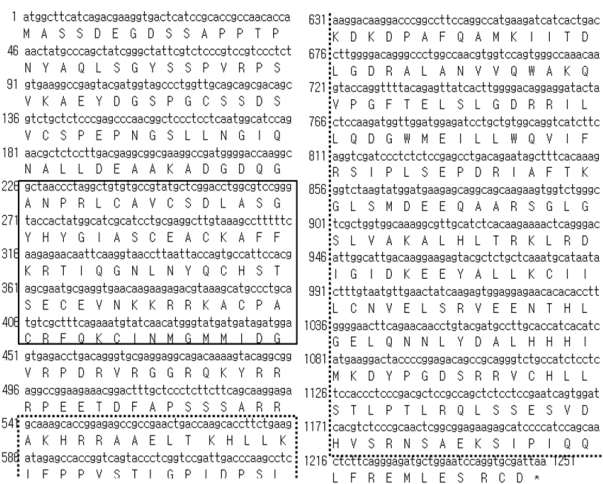


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *S. nudus* ERR (SnERR). A solid line and a dotted line boxes indicate DBD (DNA binding domain) and LBD (ligand binding domain), respectively. The nucleotide sequence has been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank DNA databases under Accession No. GU074520.

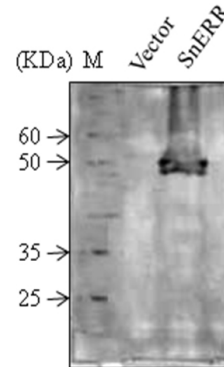


Fig. 2. Western blot analysis of SnERR expression in 293T cells. 293T cells were transfected pcDNA3 (HA-NLS) SnERR (1 μ g) or empty vector (1 μ g) as indicated. The whole cell lysates were then subjected to western blotting with anti-HA primary antibody (1:5,000) as described in Materials and Methods.

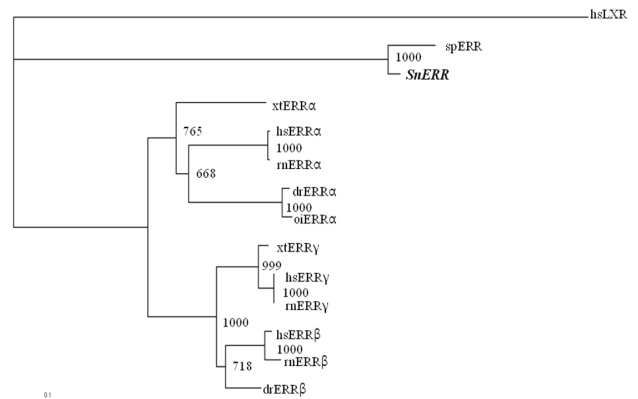


Fig. 3. A phylogenetic tree for SnERR proteins constructed by the neighbor-joining method. A phylogenetic tree was constructed with *Danio rerio* (dr), *Home sapiens* (hs), *Oryzias latipes* (oi), *Rattus norvegicus* (m), *Xenopus tropicalis* (xt) and *Strongylocentrotus purpuratus* (sp), *Strongylocentrotus nudus* (Sn) by Neighbor-Joining method using clustalX 1.83. 1000 bootstrap replicates were performed. Bootstrap values are indicated. The outgroup was *Homo sapiens* live X receptor (hsLXR).

2. 배발생 동안의 ERR mRNA 발현 변화

발생배들에서 ERR의 mRNA 발현은 초기 발생단계인 4 cell에서 64 cell까지 발현이 증가하였으며, 이후 감소하였다가 초기 유생기에 다시 발현율이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이것은 *S. purpuratus*의 발생배에서 고아핵수

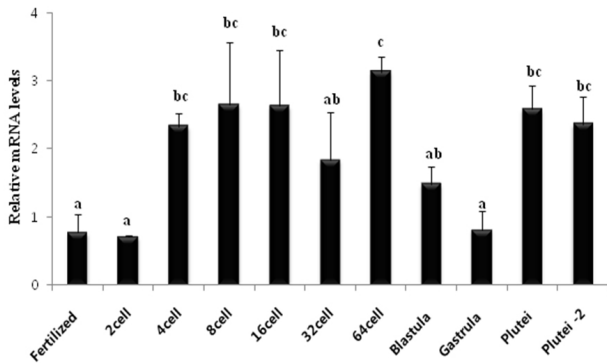


Fig. 4. Expression levels of SnERR mRNA in the *S. nudus* embryos. QPCR experiments were undertaken to measure expression of ERR during stages of embryo development. The relative SnERR mRNA levels were normalized by ubiquitin values. Data were represented by the mean \pm S.E.M. of four independent samples. Significant differences ($p < 0.05$) in each series are denoted.

용체인 ERR의 발현 패턴을 조사한 결과와 일치하였다(Howard-Ashby et al., 2006a; Howard-Ashby et al., 2006b).

3. 호르몬 및 Co-Regulator에 의한 성체 ERR의 전사 조절

등근성체의 ERR(SnERR) 전사 활성을 293T 세포에서 조사하였다. SnERR은 ERE-Luc reporter의 전사를 약 1.5배 활성화시켰다(Fig. 5A). Estradiol-17 β 에 의한 SnERR의 전사 활성은 ERE-Luc reporter에서 변화가 관찰되지 않았지만, ERRE-Luc reporter에서는 호르몬 비의존적으로 전사가 억제되었다(Fig 5A, B). Genistein을 처리한 ERE-Luc reporter에서는 SnERR의 전사 활성이 약하게 나타났다(Fig. 5C). 한편, ERRE-Luc에서는 genistein 처리에 의한 전사 활성은 나타나지 않았다(Fig. 5D). Co-regulator들과의 상호작용을 조사한 실험에서는 peroxisome proliferator activated receptor-(PPAR) γ coactivator 1 α (PGC-1 α)와 snERR을 cotransfection시켰을 때, ERE-Luc reporter에서 약 2배의 전사 활성을 보였다. 한편, ERRE-Luc reporter에서는 PGC-1 α 에 의한 전사 활성을 확인할 수 없었으며, 전사 억제자로 알려진 small heterodimer partner(SHP)에 의한 SnERR의 전사 활성 변화도 관찰되지 않았다(Fig. 6).

고찰

핵수용체 superfamily 중 고아핵수용체로 분류되는 ERRs

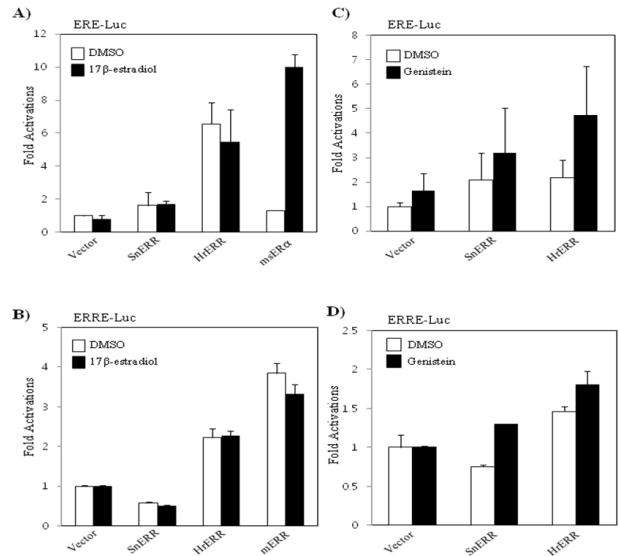


Fig. 5. SnERR activates ERE and ERRE gene promoter in the presence of hormones. 293T cells were transfected with luciferase reporter plasmids (200 ng), LacZ expression vector (100 ng) and pcDNA3 (HA-NLS) SnERR (100 ng), pcDNA3 HrERR(100ng), pcDNA3 mERR (100 ng) or empty vector (100 ng) as indicated. Cells were incubated after transfection in the absence (white boxes) or presence (black boxes) of 17 β -estradiol 10⁻⁶ M (A and B) or genistein 10⁻⁶ M (C and D). All cells were lysed and the luciferase activity was measured, normalized against β -galactosidase activity. The results are expressed three independent experiments performed in duplicate.

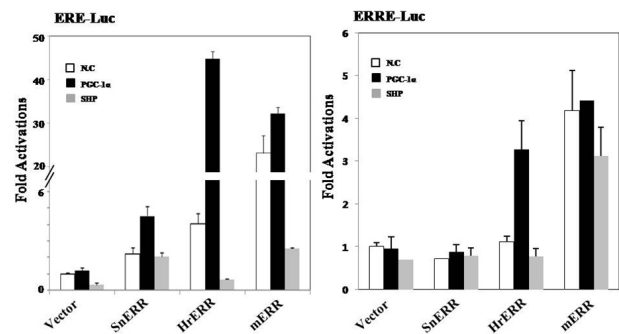


Fig. 6. Effect of SnERR transcription activity by PGC-1 α and SHP. 293T cells were transfected with 100 ng of the indicated Luc reporter, pcDNA3 (HA-NLS) SnERR (100 ng) or empty vector (100 ng), LacZ expression vector (100 ng) with/without PGC-1 α (100 ng) or SHP (100 ng). All cells were lysed and the luciferase activity was measured, normalized against β -galactosidase activity. The results are expressed three independent experiments performed in duplicate.

는 포유류에서 $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$ 가 동정되었으며, 많은 기능들이 연구되어지고 있다(Ao et al., 2008; Bonnelye et al., 1997; Giguere et al., 1988). ERR은 ER(estrogen receptor)과 구조가 유사하고 같은 표적 유전자에 반응하며, ERRE (ERR-response element)뿐만 아니라 ERE(estrogen response element)에 결합한다(Maeng et al., 2005; Liu et al., 2003). 최근 zebrafish와 medaka 등 여러 종의 어류에서 ERRs 동정 및 기능들이 연구되어지고 있다(Bardet et al., 2005; Vanacker et al., 1999a; Zhang et al., 2008). 본 연구에서는 동해안에 서식하는 등근성계의 ERR을 동정하고, 이것이 *S. purpuratus*의 ERR과 약 91%의 상동성을 나타내며, 분자계통수에서도 가장 가까운 유연관계를 확인하였다. SnERR은 핵수용체의 고유한 영역으로 알려져 있는 DNA binding domain(DBD)는 잘 보존되어 있지만 ligand binding domain(LBD)은 포유류 및 여러 어종의 ERR과는 상이한 것을 알 수 있었다(Fig. 1)(Bardet et al., 2004; Horard et al., 2004; Tarrant et al., 2006). 따라서, ERE 및 ERRE reporter와의 전사 활성 실험 및 coregulators와의 실험 결과가 기존에 보고된 척추동물 ERRs의 결과와는 다른 결과가 나타났다고 추정된다. 향후, SnERR에 대한 새로운 ligand의 발굴 및 LBD 영역의 기능들이 연구되어야 할 것이라 사료된다.

해양 무척추동물 ERR에 대한 연구에서 대표적으로 *Halocynthia roretzi* ERR(hrERR)은 mammalian cell 내에서 ERRE와 ERE에 결합하여 전사 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한, 포유류 coregulator들과의 상호작용과 ERR의 agonist로 알려진 genistein에 의해 hrERR의 전사 활성이 dose-dependent하게 높아진다는 보고가 있다(Park et al., 2009). 하지만 본 연구에서 동정된 SnERR은 ERE site와의 상호작용은 확인되었지만 ERRE site와의 전사 활성은 확인할 수 없었다. 또한 coregulator들과의 상호작용도 관찰되었지만 전사 활성은 매우 낮았다. ER의 ligand인 estradiol-17 β 와 ERR의 agonist인 genistein 처리에서도 control과 비교하였을 때 낮은 수준의 전사 활성을 나타내거나 활성이 거의 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 SnERR LBD가 다른 종과의 차이를 보이는 것에 그 원인이 있다고 추정된다. 이전 연구에 의하면, 제브라피쉬 *Danio rerio*의 핵수용체인 retinoid X receptor β 는 helix-7 부분의 아미노산 결실로 인해 기존의 특이적인 호르몬으로 알려진 9-cis retinoic acid와 결합하지 않는다고 보고된 바 있기 때문이다(He et al., 2009; Jones et al., 1995).

SnERR의 도메인 및 아미노산을 면밀히 분석하여 ERRE site와 결합하는 부위 및 coregulator들과 상호작용하는 부분을 찾고, 호르몬 반응성 domain인 LBD에 관한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

*S. purpuratus*의 ERR mRNA 발현은 초기 난할시기에 급격히 감소하여 포배기와 낭배기에 증가하였다(Howard-Ashby et al., 2006a). 또한, 측성해초목 명게과에 속하는 *Herdmania curvata*에서 다양한 핵수용체 유전자들은 64세포기부터 mRNA 발현이 시작되는 것으로 밝혀졌는데, ERR의 mRNA 역시 미수정란에서는 나타나지 않다가 64세포기부터 발현이 시작되었다(Devine et al., 2002). 또한, 포유동물에서는 ERR이 발생 후기 외배엽 형성에 관여한다는 보고가 있다(Luo et al., 1997). *S. nudus*의 ERR 역시 외배엽 형성이 일어나는 발생 후기에 높게 증가하였으므로 외배엽 형성에 관여할 것으로 추정된다. 향후 *in situ* hybridization 실험을 통하여 배발생 시기별 ERR mRNA의 세포내 국재성을 아울러 조사하여야 할 것으로 판단된다.

이상의 내용을 요약하면, 등근성계의 ERR은 척추동물 및 명게류의 ortholog보다 근연종인 *S. purpuratus* ERR과 높은 상동성을 나타내었다. Reporter assay를 통해 ERE에서 전사 활성을 나타내는 것을 알 수 있었으나, 이전 연구들과 다르게 ERRE에서는 전사 활성이 낮게 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 SnERR LBD의 아미노산 보존성이 낮으며, 향후 새로운 ligand의 발굴과 coregulators와의 상호작용 연구에 활용가치가 높다고 판단된다.

감사의 글

저자 맹세정은 한국학술과학재단 2단계 BK21 핵심사업 팀의 수혜대학원생임을 밝히며 이에 사의를 표합니다.

인용문헌

- Ao A, Wang H, Kamarajugadda S, Lu J (2008) Involvement of estrogen-related receptors in transcriptional response to hypoxia and growth of solid tumors. Proc Natl Acad Sci USA 3;105:7821-7826.
- Bardet PL, Obrecht-Pflumio S, Thisse C, Laudet V, Thisse B, Vanacker JM (2004) Cloning and developmental

- expression of five estrogen-receptor related genes in the zebrafish. *Dev Genes Evol* 214:240-249.
- Bardet PL, Schubert M, Horard B, Holland LZ, Laudet V, Holland ND, Vanacker JM (2005) Expression of estrogen-receptor related receptors in amphioxus and zebrafish: implications for the evolution of posterior brain segmentation at the invertebrate-to-vertebrate transition. *Evol Dev* 7:223-233.
- Bonnelye E, Vanacker JM, Spruyt N, Alric S, Fournier B, Desbiens X, Laudet V (1997) Expression of the estrogen-related receptor 1 (ERR-1) orphan receptor during mouse development. *Mech Dev* 65:71-85.
- Chen F, Zhang Q, McDonald T, Davidoff M, Bailey W, Bai C, Liu Q, Caskey C (1999) Identification of two hERR2-related novel nuclear receptors utilizing bioinformatics and inverse PCR. *Gene* 228:101-109.
- Coward P, Lee D, Hull MV, Lehmann JM (2001) 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8880-8884.
- Devine C, Hinman VF, Dengnan BM (2002) Evolution and developmental expression of nuclear receptor genes in the ascidian *Herdmania*. *Dev Biol* 46:687-692.
- Giguere V, Yang N, Segui P, Evans R (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331:91-94.
- Giguere V (2002) To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab* 13:220-225.
- He C, Wang C, Li B, Xie F, Chen Y, Zuo Z (2009) Tissue-specific and embryonic expression of the retinoid X receptors in *Sebastiscus marmoratus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 154:221-228.
- Heard DJ, Norby P, Holloway J, Vissing H (2000) Human ERR γ , a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Mol Endocrinol* 14:382-392.
- Hong H, Yang L, Stallcup MR (1999) Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan receptor ERR3. *J Biol Chem* 274:22618-22626.
- Hood L, Davidson EH, Cameron RA, Ettensohn C, Wray G (2001) The Sea Urchin Genome Project-Introduction. <http://sugp.caltech.edu/intro/> (March 10, 2003).
- Horard B, Castet A, Bardet PL, Laudet V, Cavailles V, Vanacker JM (2004) Dimerization is required for transactivation by estrogen-receptor-related (ERR) orphan receptors: evidence from amphioxus ERR. *J Mol Endocrinol* 33:493-509.
- Howard-Ashby M, Materna SC, Brown CT, Tu Q, Oliveri P, Cameron RA, Davidson EH (2006a) Gene families encoding transcription factors expressed in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300:90-107.
- Howard-Ashby M, Materna SC, Brown CT, Tu Q, Oliveri P, Cameron RA, Davidson EH (2006b) High regulatory gene use in sea urchin embryogenesis: Implications for bilaterian development and evolution. *Dev Biol* 300:27-34.
- Jones BB, Ohno CK, Allenby G, Boffa MB, Levin AA, Grippo JF, Petkovich M (1995) New retinoid X receptor subtypes in zebra fish (*Danio rerio*) differentially modulate transcription and do not bind 9-*cis* retinoic acid. *Mol Cell Biol* 15:5226-5234.
- Jung Y, Sohn YC (2007) Gene expression of Smad3 and estrogen receptor-related receptor β like 1 in sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Dev Reprod* 11:43-47.
- Jung Y, Maeng S, Sohn YC (2007) Effects of estradiol-17 β and nonylphenol on mRNA expression of estrogen receptor-related receptor β like 1 and early embryogenesis in sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Dev Reprod* 11:179-185.
- Liu D, Zhang Z, Gladwell W, Teng CT (2003) Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinology* 144:4894-4904.
- Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguere V (1997) Placental abnormalities in mouse

- embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 388:778-782.
- Maeng S, Jung Y, Choi E, Jeon JK, Kim S, Gen K, Sohn YC (2005) Expression of gonadotropin subunit genes following 4-nonylphenol exposure in masu salmon: Effects on transcript levels and promoter activities via estrogen receptor alpha. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 142:383-390.
- Mitsunaga K, Araki K, Mizusaki J, Morohashi KI, Haruna K, Nakagata N, Giguere V, Yamamura KI, Abe K (2004) Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR-results in reduction of germ cell number in mouse embryos. *Mech Dev* 121:237-246.
- Park W, Kim GJ, Choi HS, Vanacker JM, Sohn YC (2009) Conserved properties of a urochordate estrogen receptor-related receptor (ERR) with mammalian ERR alpha. *Biochim Biophys Acta* 1789:125-134.
- Pettersson K, Svensson K, Mattsson R, Carlsson B, Ohlsson R, Berkenstam A (1996) Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 54:211-223.
- Tarrant AM, Greytak SR, Callard GV, Hahn ME (2006) Estrogen receptor-related receptors in the killifish *Fundulus heteroclitus*: diversity, expression, and estrogen responsiveness. *J Mol Endocrinol* 37:105-120.
- Tremblay G, Bergeron D, Giguere V (2001a) 4-hydroxytamoxifen is an isoform-specific inhibitor of orphan estrogen-receptor-related (ERR) nuclear receptors β and γ . *Endocrinology* 142:4572-4575.
- Tremblay G, Kunath T, Bergeron D, Lapointe L, Champigny C, Bader JA, Rossant J, Giguere V (2001b) Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR β . *Genes Dev* 15:833-835.
- Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V (1999a) Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) α , but not by ER β . *EMBO J* 18:4270-4279.
- Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V (1999b) Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha). *Mol Endocrinol* 13:764-773.
- Zavacki AM, Lehmann JM, Seol W, Willson TM, Kliewer SA, Moore DD (1997) Activation of the orphan receptor RIP14 by retinoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7909-7914.
- Zhang ZB, Hu JY, Sai SX, Zhao YB, Huang C, Tian XJ (2008) Gene cloning, sequence analysis and tissue expression of estrogen-related receptor alpha (Erralpha) in Japanese medaka and its transcriptional responses after differential EDCs exposure. *Huan Jing Ke Xue* 29:3153-3158.

(received 16 October 2009, received in revised form 13 November 2009, accepted 14 November 2009)