



Testosterone 처리에 의한 넙치, *Paralichthys olivaceus* 난소에서 doublesex-and mab-3-related transcription factor-1 (DMRT-1) mRNA의 발현 유도

조필규, 안광욱, 김나나, 최용기, 조성환, 민병화¹, 임한규¹, 최철영*
한국해양대학교 해양환경·생명과학부, ¹국립수산과학원 수산생명과학본부 양식관리팀

Induced Expression of Doublesex-and mab-3-related Transcription Factor-1 (DMRT-1) mRNA by Testosterone in the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* ovary

Pil Gue Jo, Kwang Wook An, Na Na Kim, Yong Ki Choi, Sung Hwoan Cho, Byung Hwa Min¹,
Han Kyu Lim¹ and Cheol Young Choi*

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea
¹Aquaculture Research Team, NFRDI, Busan 619-902, Korea

We isolated a 317 bp of partial cDNA for doublesex-and mab-3-related transcription factor-1 (DMRT-1) from the testis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* using RT-PCR. Based on the multiple sequence alignment, olive flounder DMRT-1 shared relatively high sequence homology (82 to 94%) with orthologues from other teleost species such as Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. DMRT-1 mRNA was predominantly expressed in the testis of olive flounder. In our investigation for the effect of testosterone treatment in vivo on induced expression of ovarian DMRT-1 transcript, mRNA levels of DMRT-1 in ovary were significantly up-regulated by testosterone treatments (0.3 or 3.0 µg testosterone/g body weight for 12 to 36 hours) as judged by RT-PCR analysis. In overall, transcriptional stimulation of DMRT-1 during treatments was more affected by doses of testosterone than treatment durations. This result strongly suggests that the regulation of DMRT-1 be tissue- and gender-specific in olive flounder, and also provides useful baseline knowledge on the testosterone-mediated regulation in the reproductive physiology of this species.

Keywords: Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Testosterone, DMRT-1, mRNA

서 론

어류의 성 분화는 유전적인 조절뿐만 아니라, 수온, 수심, 영양염류 등과 같은 환경적인 요인에도 영향을 받는다(Nakamura et al., 1998). 어류에서의 번식관련 조절은 생식선자극호르몬 방출호르몬(gonadotropin releasing hormone, GnRH), 생식선자극호르몬(gonadotropin, GTH), 생식소호르몬, 도파민 등 다른 기타 신경 전달물질을 포함한 많은 인자들의 상호작용에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 있으며(Melamed et al., 1998), 호르몬의 종류, 농도, 투여 방법, 유전적 계통, 최초 처리시간 및 처리기간 등에 의해 크게 좌우된다(Hunter and Donaldson, 1983). 일반적으로 GnRH와 GTH는 성숙한 개체에서의 성 성숙과 성 분화를 조절하고, 초기 생식소의 분화는 다양한 생리학적인 요

인에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있지만, 성 결정 및 성 분화를 지배하는 기작은 중에 따라 매우 다양하며 복잡하다(Melamed et al., 1998).

성 결정에 관련된다고 증명된 첫 번째 유전자는 sex-determining region Y (SRY)로 포유류의 배아가 수컷으로 전환되는 초기단계에서 어떠한 역할을 담당한다고 알려져 있다(Brennan et al., 1998). 최근, 어류에서 많은 성 결정 관련 유전자들이 보고되었으며(Devlin and Nagahama, 2002; Fernandino et al., 2003), 곤충과 선충류의 성 결정에 관련된 유전자들 사이의 상동성에 의해 확인된 DM-domain (DNA-binding motif)을 포함하는 단백질 중 하나인 doublesex- and mab-3-related transcription factor-1 (DMRT-1)은 수컷의 정소에서만 특이적으로 발현함이 확인된 바 있다(Raymond et al., 1998). DMRT-1은 XY형의 성 전환 유형과 관련 있는 DM domain을 암호화하는 단백질로서(Zhu et

*Corresponding author: choic@hhu.ac.kr

al., 2000), 다양한 성 결정 과정에 관여하며, upstream 부분에 SRY의 염기배열을 포함되어 있기 때문에 SRY 유전자 그룹이 수컷으로의 성 결정에 관여하고 있을 가능성이 있다.

최근 정소로의 성 분화에 따른 DMRT-1 유전자와 관련된 연구는 포유류(Smith et al., 1999), 조류(Raymond et al., 1999), 파충류(Kettlewell et al., 2000)를 포함한 척추동물을 중심으로 수행되어져 왔으며, 특히 어류에서는 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* (Marchand et al., 2000), 송사리, *Oryzias latipes* (Kobayashi et al., 2004) 및 틸라피아, *Oreochromis niloticus* (Guan et al., 2000) 등에서 이루어졌다.

본 연구에서 실험체료로 이용한 넙치를 대상으로 한 연구로는 수온 변화에 의한 성 전환(Baroiller et al., 1995; Kitano et al., 2001), 호르몬 처리에 의한 생리학적 성 전환(Bang et al., 1996)과 염색체 조작에 의한 성 전환 연구(Kim et al., 1994) 등이 보고되었지만, DM-domain과 관련된 유전자의 성 분화 연구는 미비하다.

본 연구에서는 우리나라를 비롯한 중국과 일본에서 중요 양식대상종인 넙치를 대상으로 정소와 난소에서 DMRT-1 유전자의 발현 비교와 생식소호르몬인 testosterone의 주입에 의한 난소에서의 DMRT-1 mRNA의 발현 유도를 분석함으로써 넙치의 성 분화의 분자기작에 관한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

넙치 산란기인 5월에 부산 기장군내의 개인 양식장에서 넙치(암·수 각각 20마리씩, 평균 전장 24.3±1.8 cm, 평균 체중 166±40.3 g)를 구입하여 실험실로 옮겨, 수온 17°C, 광주기 12L:12D로 유지하면서 24시간 동안 실험실 조건에 안정시킨 후, 실험에 사용하였다.

DMRT-1 partial cDNA 분리

실험에 사용한 넙치 DMRT-1은 이미 보고된 타종의 염기배열을 참고로 하여 degenerate primer (forward primer: 5'-TGC AAC TGG AGR GAC TGC C-3', reverse primer: 5'-TAG TAG GAR TGC ATS CGG TAC-3')를 이용하여 분리하였다. Total RNA는 TRIzol kit (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 넙치 수컷 정소에서 추출하였다. 역전사 반응은 1 µg의 total RNA를 이용하여 Moloney Murine Leukemia Virus에서 유래된 M-MLV Reverse Transcriptase (Bioneer, Korea)를 이용하여 제조사의 방법으로 실행하였다. PCR반응은 BS Taq Master Mix (Biosesang, Korea)를 이용하여 1 µg의 cDNA를 template로 사용하여 94°C에서 5분간 초기 열변성, 94°C에서 30초간 열변성, 53°C에서 30초간 primer 결합, 68°C에서 30초간 신장반응을 총 35회 실시하였고, 68°C에서 5분간 최종 신장반응을 실시하였다. 증폭 산물을, 1% agarose gel에 전기영동 하

여 정제한 후, pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)에 삽입시키고, DH5a에 형질전환 하였다. LaboPass Plasmid Purification Kit (Cosmo Co., Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 정제한 뒤, 정제된 plasmid DNA의 염기배열은 ABI DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 결정하였다.

DMRT-1 mRNA의 조직별 발현

산란기인 5월에 구입한 암수컷 넙치 각각 4마리로부터 채취한 생식소 및 뇌, 간, 신장, 근육 및 장에서 추출한 RNA를 이용하여 DMRT-1 mRNA의 발현 양상을 조사하였다. 이미 결정된 넙치 DMRT-1 cDNA의 염기배열(GenBank accession no. EU099998)을 기초로 종 특이적인 primer인 DMRT1 forward primer: 5'-TGC AAC TGG AGG GAC TGC C-3', DMRT1 reverse primer: 5'-TAG TAG GAA TGC ATG CGG TAC-3'와 내부표준 유전자(internal control)로 β-actin forward primer: 5'-TCG AGC ACG GTA TTG TGA CC-3', β-actin reverse primer: 5'-ACG GAA CCT CTC ATT GCC GA-3'를 설계하여 RT-PCR을 실시하였다. Total RNA는 TRIzol kit (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 넙치 수컷 정소에서 추출하였다. 역전사 반응은 1 µg의 total RNA를 이용하여 Moloney Murine Leukemia Virus에서 유래된 M-MLV Reverse Transcriptase (Bioneer, Korea)를 이용하여 제조사의 방법으로 실행하였다. PCR반응은 BS Taq Master Mix (Biosesang, Korea)를 이용하여 1 µg의 cDNA를 template로 사용하여 94°C에서 5분간 초기 열변성, 94°C에서 30초간 열변성, 53°C (DMRT-1), 57°C (β-actin)에서 30초간 primer 결합, 68°C에서 30초간 신장반응을 총 35회 (DMRT-1), 27회 (β-actin) 실시하였고, 68°C에서 5분간 최종 신장반응을 실시하였다. 증폭 산물을 1% agarose gel에 전기영동 후 Gelpro 3.1 (KBT, Korea)을 이용하여 내부표준 유전자(internal control)인 β-actin의 발현량에 대한 비율로 환산하여 DMRT-1 mRNA의 발현량을 정량하였다.

호르몬 처리

넙치를 0.5% 3-aminobenzoic acid ethyl ester로 마취한 후, testosterone (Sigma, USA)을 어체중(g)당 0.3과 3 µg이 되도록 복강 주사하였다. 이때 testosterone은 0.9% 생리식염수로 희석하여 이용하였고, 주사 용량은 어체중 100 g 당 100 µL가 되도록 조정하였다. 복강 주사 후 12, 24 및 36 시간째에 각각의 농도별로 4마리의 개체로부터 난소를 채취하였다. 대조구와 0.9% 생리식염수를 처리한 sham구 역시 동일한 시간대에 난소 조직을 채취하였다. 난소 조직은 semi-quantitative RT-PCR 분석을 위해 -80°C에 옮겨 냉동 보관한 후 실험에 사용하였다.

통계분석

각 실험결과로부터 얻어진 자료값 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계패키지(version 10.0)에 의한 One way ANOVA를 실

```

1  TGCAACTGGA GGGACTGCCT GTTCTCCGTG GACGGACGAT CCCCACACC GACCGGCAGC 60
61  GCCTCCGCTT CCTCTCTGGC TTTCACAGGG AGTCGCTCGG CATCATCCTC CAGCCCGTCG 120
121  GCCGGTGTTA GGGCTCATGC TGAGGGAGCG TCCGACCTCC TGATGGAAAC CTCCTATTAC 180
181  AACTTCTACC AGCCGTCATG CTACCCGACC TACTACAGCA ACCTCTACAA CTACCAGCAA 240
241  TACCAGCAGA TGTCTCACAG TGACAGCCGC CTGTCCAGCC ACAACATGTC CTCTCCGTAC 300
301  CGCATGCATT CCTACTA 317
    
```

Fig. 1. Partial cDNA sequence of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) DMRT-1 (GenBank accession no. EU099998).

시하여 최소유의차 검정(LSD)으로 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

넙치 정소에서 분리된 DMRT-1 cDNA 단편은 317 개의 염기로 구성되었으며(Fig. 1), DMRT-1 cDNA 단편을 GenBank의 BLAST를 이용하여 타종의 염기배열과 비교한 결과, Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, AJ506093)와 94%, 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*, AY323953)과 85%, 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*, AF209095)와 82%로 높은 상동성을 나타내었다.

암·수컷 넙치의 조직별 DMRT-1 mRNA의 발현은 수컷 정소에서만 특이적으로 발현하였다(Fig. 2). 이 결과는 산란기인 5월에 수컷 정소의 발달을 통하여 DMRT-1이 기능을 하여 발현한 것으로 보여지며, 이와 같은 결과는 생식소 분화 시기와 정자형성 과정에서 DMRT-1 발현이 관찰된 무지개 송어(Marchand et al., 2000), platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Veith et al., 2003)와 pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Fernandino et al., 2006)의 결과와 일치하였다. 이런 결과를 바탕으로 본 연구에서도 DMRT-1 mRNA가 수컷 넙치의 정소에서만 특이적으로 발현하는 점으로 보아, DMRT-1 유전자는 수컷 넙치의 산란기 동안 정소의 발달에 관여하여 정자형성과정에 작용한다고 추측된다.

웅성호르몬인 testosterone을 주입한 넙치 난소의 경우, DMRT-1 mRNA의 발현이 관찰되었다. 또한 testosterone 처리 농도에 따라 DMRT-1 mRNA 발현이 증가하는 경향을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 암컷 개구리, *Rana rugosa*에 testosterone을

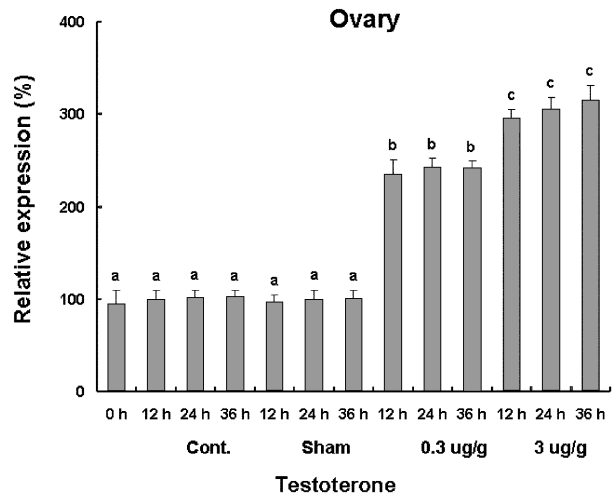


Fig. 3. Effects of testosterone treatment *in vivo* on mRNA expression of DMRT-1 in ovary. Olive flounder were injected with 0.3 and 3 μ g testosterone/g body weight and ovarian tissue was sampled out 12, 24 and 36 h post injection. Each histogram indicates mean \pm SD based on four replicate experiments (n=4). Histograms with same letter were not significantly different based on ANOVA at $P = 0.05$.

주입한 결과, 32일째에 DMRT-1 mRNA가 발현이 유도된 결과 (Shibata et al., 2002)와 일치하였으며, 수컷 정소에서 특이적으로 발현되는 유전자인 DMRT-1 mRNA가 웅성호르몬에 의해서 넙치 난소에서도 발현이 유도됨을 알 수 있다.

본 연구의 결과는 넙치를 포함한 어류의 성 전환 및 유도에 대한 기초자료를 제공할 것이다. 또한, 지금까지 어류에서 성 분화 유전자인 DMRT-1의 발현 기작은 아직 불명확하기 때문에 이를 규명하기 위한 조직학 및 생리학적인 연구가 더 필요할 것이다.

요 약

본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 정소로부터 DMRT-1 partial cDNA를 분리하였다. 넙치 DMRT-1은 317개의 염기로 구성되어 있으며, Atlantic halibut, 감성돔 및 무지개 송어와 각각 94%, 85%, 82%의 높은 상동성을 보였다. RT-PCR을 이용하여 DMRT-1 mRNA 발현은 난소보다 정소에서 높게 나타난 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 암컷 넙치에 웅성호르몬인 testosterone 처리시 처리 농도에 따라 난소에서 DMRT-1 mRNA

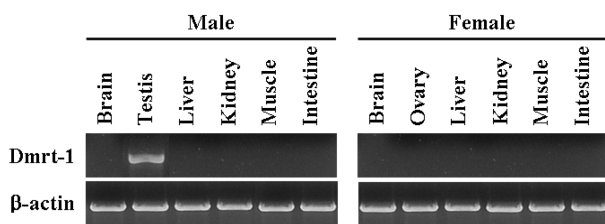


Fig. 2. Representative RT-PCR gels showing testis-specific expression of DMRT-1 mRNA in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). One microgram of total RNA was reverse transcribed and amplified using olive flounder DMRT-1 primer.

발현이 증가함을 볼 수 있었다. 따라서, DMRT-1은 수컷에서 특이적으로 발현되는 유전자임을 알 수 있으며, 본 연구의 결과는 넙치의 성 전환 및 유도에 대한 기초자료를 제공할 것이다.

참고문헌

- Bang, I.C., K.K. Kim and Y. Kim, 1996. Sex reversal of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by immersion in a solution of steroid hormones. *J. Aquaculture*, 9, 279–285.
- Baroiller, J.F., D. Chourrout, A. Fostier and B. Jalabert, 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratio of mouth-brooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.*, 273, 216–223.
- Brennan, J.J., J. Karl, K. Nordqvist, C. Schmahl, K.U. Tilmann and B. Capel, 1998. SRY and the testis: molecular pathways of organogenesis. *J. Exp. Zool.*, 281, 494–500.
- Devlin, R.H. and Y. Nagahama, 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191–364.
- Fernandino, J.L., L.G. Guilgur, P.H. Strobl-Mazzulla and G.M. Somoza, 2003. Molecular cloning of SOX9, DMRT-1 and SF-1 cDNA partial sequences in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 145–146.
- Fernandino, J.L., L.G. Guilgur and G.M. Somoza, 2006. Dmrt1 expression analysis during spermatogenesis in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol. Biochem.*, 1493, 180–187.
- Guan, G., T. Kobayashi, Y. Nagahama, 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272, 662–666.
- Hunter, G.A. and E.M. Donaldson, 1983. Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. *Aquaculture*, 33, 355–364.
- Kettlewell, J.R., C.S. Raymond and D. Zarkower, 2000. Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis*, 26, 174–178.
- Kim B.S., Y.B. Moon, C.H. Jeong, D.S. Kim and Y.D. Lee, 1994. Evaluation of fertility of artificial induced gynogenetic diploid male in *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquaculture*, 7, 151–158.
- Kitano, T., K. Takamune, Y. Nagahama and S.I. Abe, 2001. Role of P450 aromatase in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Environ. Sci.*, 1, 1–11.
- Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata and Y. Nagahama, 2004. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.*, 231, 518–526.
- Marchand, O., M. Govoroun, H. D’Cotta, O. McMeel, J. Lareyre, A. Bernot, V. Laudet and Y. Guiguen, 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1493, 180–187.
- Melamed, P., H. Rosenfeld, A. Elizur and Z. Yaron, 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119, 325–338.
- Nakamura, M., T. Kobayashi, X. Chang and Y. Nagahama, 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.*, 281, 362–372.
- Raymond, C.S., C.E. Shamu, M.M. Shen, K.J. Seifert, B. Hirsch, J. Hodgkin and D. Zarkower, 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 391, 691–695.
- Raymond, C.S., J.R. Kettlewell, B. Hirsch, V.J. Bardwell and D. Zarkower, 1999. Expression of Dmrt1 in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development. *Dev. Biol.*, 215, 208–220.
- Shibata, K., M. Takase and M. Nakamura, 2002. The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 127, 232–241.
- Smith, C.A., P.J. McClive, P.S. Western, K.J. Reed and A.H. Sinclair, 1999. Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 402, 601–602.
- Veith, A.M., A. Froschauer, C. Koorting, I. Nanda, R. Hanel, M. Schmid, M. Scharmid and J. Volff, 2003. Cloning of the dmrt1 gene of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not master sex-determining gene in the platyfish. *Gene.*, 317, 59–66.
- Zhu, L., J. Wilken, N.B. Phillips, U. Narendra, G. Chan, S.M. Stratton, S.B. Kent and M.A. Weiss, 2000. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of inter-twined zinc fingers. *Genes. Dev.*, 14, 1750–1764.

원고접수 : 2007년 6월 19일

수정본 수리 : 2007년 8월 23일