

양서류의 GnRH 와 그 수용체에 대한 분자생물학적 연구

권혁방

전남대학교 자연과학대학 생명과학부, 호르몬연구센터

포유동물의 시상하부에서 뇌하수체를 자극하여 생식선자극호르몬의 분비를 촉진하는 10 개의 아미노산으로 구성된 생식선자극호르몬-분비호르몬 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 이 발견된 이래 이에 대한 연구가 경쟁적으로 이루어져 왔다. 이는 GnRH가 시상하부-뇌하수체-생식소로 이어지는 신경내분비축의 최상위 호르몬으로 동물의 생식조절에 결정적인 역할을 하기 때문이며 또한 산업적으로 혹은 임상학적으로 매우 이용가치가 높기 때문이다. 따라서 포유동물에서 GnRH 라는 호르몬은 생식 조절의 key 가 되는 호르몬이라고 알려져 왔다.

한편 많은 비교내분비학자들에 의해 여러 동물에서 GnRH들이 속속 분리되고 이들의 아미노산 서열이 밝혀짐에 따라 GnRH의 종류가 다양하며 여러 변이형의 GnRH 들이 존재한다는 것을 알게 되었다. 그 중에도 닭에서 두 번째 발견된 chicken GnRH-II (cGnRH-II)는 기존의 시상하부에 존재하는 mammalian GnRH (mGnRH) 와는 아미노산 서열이 매우 다를 뿐 아니라 중뇌와 후뇌의 일부에 주로 분포한다는 것을 알게되었다. 흥미롭게도 이 cGnRH-II 는 닭에서 뿐 아니라 어류, 포유동물, 양서류, 심지어는 사람에도 존재한다는 것이 최근에 알려지게 되었다. 또한 일부 어류에서는 전뇌의 앞쪽에서 salmon GnRH (sGnRH) 라고 하는 또 다른 종류의 GnRH 가 존재한다는 것이 알려졌다. 이러한 새로운 형의 GnRH 들의 출현은 이들의 역할에 대한 끊임없는 의문을 제기하게 되었다. 즉 한 종류의 동물에서 최소 둘 내지 세가지의 다른 형태의 GnRH 가 존재하는데 이들 변이형 GnRH들의 역할은 과연 무엇이며 진화학적으로 어떤 유연 관계가 있을까 하는 의문이다. 흥미롭게도 대부분의 양서류에서는 포유동물과 같이 mGnRH 와 cGnRH-II 의 두가지 type의 GnRH를 가지고 있다. 분자생물학의 발달은 GnRH 유전자를 cloning하는 연구를 촉진시켜 많은 학자들에 의해 사람을 비롯한 포유동물 및 조류, 어류등에서 GnRH 의 cDNA들이 추출되고 이들의 특성이 분석되었다. GnRH cDNA의 분석은 기존의 방법(생화학, 면역학적 방법) 으로 구분이 애매했던 여러 변이형의 GnRH들을 확인하는데 긴요하게 이용된 것은 물론 prepro GnRH의 아미노산 서열을 알게됨에 따라 이 서열분석을 통하여 여러 GnRH 들의 계통분석이 가능하게 되었다. 기존에 알려진 GnRH 들의 cDNA를 분석해본 결과 이들 유전자들을 3 종류로 구분할 수 있었으며 (GnRH 1, GnRH 2, GnRH 3) 어느 시기에 진화적으로 분리가 되었는지 짐작할 수 있게 되었다.

본 연구실에서도 북방산 개구리의 뇌에서 GnRH cDNA를 추출하고 cloning 하여본 결과 기존의 mGnRH ([Arg⁸] GnRH) 와는 다른 변이형 GnRH를 발견하였으며 ([Trp⁸] GnRH), 또한 황소개구리의 뇌에서 mGnRH type과 cGnRH-II type의 cDNA를 추출하고 이들을 cloning 하는데 성공하였다. 이들 cDNA로부터 얻은 정보를 사용하여 계통분석을 해본 결과 이들 GnRH들은 각각 GnRH 1 과 GnRH 2 group에 속한다는 것을 알았다. 지금까지 알려진 모든 GnRH들을

계통학적으로 3 종류의 군으로 나누는 것이 가능하게 됨에 따라 많은 학자들이 3 가지 type의 GnRH에 상응하는 세가지 type의 receptor가 존재한다는 것을 가정하였으며 이를 찾기 위하여 많은 노력을 경주하여왔다. 이 새로운 receptor의 발견은 이들의 기능을 알아내는데 결정적인 역할을 할 것으로 기대되기 때문이다. 본 연구진들은 개구리를 대상으로 이 새로운 type의 GnRH receptor를 찾는데 도전하였으며 기존의 생리, 생화학적 접근을 피하고 직접 이들의 cDNA를 cloning 하는 분자생물학적 접근을 시도하였다. 그 결과 황소개구리(bullfrog)에서 기존에 알려진 type 1에 해당하는 receptor와 전혀 새로운 type인 두가지의 receptor를 cloning하는데 성공하고 이들을 bullfrog GnRH Receptor-1 (bfGnRHR-1), bfGnRHR-2, 그리고 bfGnRHR-3라고 명명하였다. 이들 상호간에는 아미노산의 homology가 50% 이하이었으며 bfGnRHR-1만이 유일하게 뇌하수체에 존재하는 것으로 보아 이것이 고전적 의미의 생식과 관련된 수용체로 생각되었다. 이에 대해 bfGnRHR-2와 -3는 뇌에서만 나타났다. 이들의 ligand에 대한 선택성을 조사하기 위하여 세포에 transfection시킨 후 여러 GnRH들로 자극을 준 후 세포내 IP3를 측정 한 결과 bfGnRHR-1은 비교적 mGnRH에 잘 반응하고 bfGnRHR-2는 cGnRH-II에, bfGnRHR-3는 salmon GnRH에 가장 잘 반응한다는 것을 알았다.

이들 수용체의 존재를 다시 한번 확인하기 위하여 북방산개구리에서 receptor들을 cloning하고 이들의 본체를 조사한 결과 상기 3가지의 type이 이 개구리에서도 존재하는 것을 확인할 수 있었으며 이를 dyGnRHR-1, dyGnRHR-2, 및 dyGnRHR-3로 명명하였다. 같은 type의 receptor cDNA 들은 96% 이상의 homology를 가졌으며 역시 type 1 receptor만 뇌하수체에서 발현되는 것을 발견하였다. 이들 수용체들의 발현장소는 황소개구리의 그것과 거의 유사하다는 것을 또한 발견하였다. 그러나 흥미롭게도 이들 receptor의 ligand selectivity가 황소개구리의 그것과 일부 다르다는 사실을 알았다. 이는 같은 형의 수용체라도 종에 따라 ligand를 인식하는 양상이 다를 수 있다는 것으로 해석되었다.

또 한가지 흥미로운 사실은 bfGnRHR-3 cDNA의 발현에 항상 alternative splicing에 의해 splice variant가 존재한다는 것이다. 흥미롭게도 이 몇 개의 splice variant 들은 계절에 따라 그 발현정도가 크게 변하며 이들의 발현은 wild type의 생리적 작용을 억제하는 것으로 나타났다. 우선 GnRHR-3의 유전자를 분석해본 결과 그 유전자의 일부에 splicing donor와 splicing acceptor site가 이중으로 존재하여 특정 RNA가 전사가 될 때 어떤 donor와 acceptor site를 사용하느냐에 따라 wild type과 몇 개의 splice variant가 생긴다는 것을 알았다. 이들 cDNA의 expression을 조사해본 결과 상대적으로 번식기에 wild type이 강하게 나타나고 그 이외의 시기에는 variant type들이 강하게 발현되는 것을 관찰하였다. 이들 variant cDNA를 wild type과 함께 세포에 transfection시킨 후 여러 GnRH들의 자극에 반응성을 조사해본 결과 일부 variant들은 wild type의 생리적 반응을 유의하게 억제하는 것을 알았다. 또한 이들 variant들이 과연 세포막으로 이동하여 wild type처럼 세포막에 존재하는 지를 조사해본 결과 일부의 variant들은 세포질에, 일부는 세포막에 존재한다는 것을 알았다. 단지 세포막까지 도달하는 variant만이 wild type의 생리적 반응성을 억제한다는 것을 또한 확인하였다. 이러한 모든 결과들은 alternative splicing이 GnRH 유전자의 발현조절 기전으로 작용한다는 것을 분명히 말해주고 있다.

위의 사실들은 일부 동물들의 뇌와 뇌하수체에는 분명히 3 가지의 서로 다른 종류의 GnRH 가 존재하는 것은 물론이고 그에 상응할지도 모르는 3 가지의 수용체가 존재한다는 것을 처음으로 분명히 보여주고 있다. 이러한 수용체들의 확인은 기존의 생식과 관련된 GnRH 즉 GnRH 1 (mGnRH) 이외에 뇌에서 매우 중요한 역할을 할지도 모르는 두가지의 다른 GnRH 2 와 GnRH 3 군에 속하는 GnRH들의 존재를 또한 확인해주고 있다. 특히 GnRH 2 (cGnRH-II) 가 진화적으로 거의 보존이 된 것으로 보아 동물의 생존에 필수적인 매우 중요한 역할을 수행할 가능성이 매우 커졌다고 보겠다. 이미 하등동물에서만 있을 것으로 생각되었던 이 GnRH 2 가 포유동물은 물론 사람에도 있다는 것이 확인되고 또한 GnRH 3 까지도 존재할 가능성이 커진 이상 우리가 발견한 세가지 type의 receptor 가 사람에 존재할 가능성이 더욱 커졌다. 포유 동물이나 사람에서 type 2 나 type 3 에 해당하는 GnRH 의 receptor를 발견하게 되면 GnRH 의 작용에 대한 전혀 새로운 개념이 나오게 될 전망이다.