

연어 뇌에서 N-Methyl-D-Aspartate 수용체 아단위 NR2A와 NR2B의 분포

진덕희* · 문일수*

강릉대학교 해양생명공학부
*동국대학교 의과대학 해부학교실

Distribution of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits NR2A and NR2B in Chum Salmon Brain

Deuk-Hee Jin[†] and Il-Soo Moon^{*}

Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea
^{*}Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract

We carried out immunoblot analyses to study expression and subcellular distribution of the N-methyl-D-aspartate receptor (NR) subunits in salmon (Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*). We prepared subcellular fractions such as brain homogenates, synaptosomes, and postsynaptic density (PSD) from salmon brains, and analyzed protein compositions by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In a Coomassie-stained 6% SDS-gel, about 20 distinct major protein bands could be identified in the PSD fraction. Immunoblot analyses using antibodies against rat NR subunit 2A and 2B antigens (NR2A and NR2B, respectively) showed weak but evident signals at the 180 kDa positions in the salmon PSD fractions. However, in contrast to rat NRs, the salmon NR2A and NR2B are not recognized by a phosphotyrosine-specific antibody suggesting that the salmon NRs are regulated differently from those of the rat by protein tyrosine kinases. Our results indicate that NR2A and NR2B subunits are expressed in the salmon PSD fraction but not regulated by tyrosine phosphorylation.

Key words – NR2A, NR2B, N-Methyl-D-Aspartate, Salmon brain

서 론

연어는 대양을 회유하여 고향으로 돌아오는 모천회귀성(homestream homing)을 가지며 산란과 함께 그 일생을 마치는 연어의 회유에 관한 연구는 오래되었지만, 생활사

의 대부분이 북태평양이라고 하는 광대한 해역에서 이루어지고 있어 이에 대한 연구는 매우 어렵다. 국제해양법조약이 실행되고 자국연안의 수산자원의 배양이 점점 중요시되고 있는 지금, 어류의 회유기전을 좀 더 깊이 연구하여 그 어종의 생태적 특성을 살린 자원관리방식을 모색하

[†]Corresponding author

는 것이 한층 바람직하다. 또한 그 회유행동이 어떠한 기전에 의하여 제어되고 있는가에 관해서는 아직 의문이 많이 남아있다. 망망대해에서 어떻게 모천을 찾아오는가, 치어의 어느 한 시기밖에 보내지 않은 모천을 몇 년간 어떻게 기억을 하는가 등이 연어의 회유에는 아직도 많은 의문이 남아 있다. 최근에는 연어의 부화방류사업에 의해 북태평양의 연어가 너무 많이 증가되어 어체의 소형화가 생기기 되고, 다른 생물이나 환경에 영향을 주기도 한다[17]. 그러나 최근 치어가 강에서 바다로 내려가는 강하회유와 친어가 산란을 위하여 하천으로 역상하는 모천회귀행동에 관여한다고 생각되는 호르몬에 대한 연구와 신경생물학적 근거하에 후각기능에 관련된 유전자들에 대한 연구가 활발히 진행되어 모천회귀하는 각각의 회유행동에 성장호르몬과 성호르몬이 관련되어 있으며, 또한 모천을 인식하는 몇 가지의 기전이 존재한다고 추측되고 있다[1,2,4,10,16].

최근, 보다 직접적인 증거로서 주변 후각신경세포(peripheral olfactory receptor cell)의 민감도의 변화가 연어의 후각기억을 형성하는데 기여하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, phenylethylalcohol(PEA)에 imprint된 연어는 PEA에 대한 주변 후각신경세포의 민감도가 imprint되지 않은 연어의 수용체 세포(receptor cell)에 비하여 증가하였으며, imprint된 연어가 PEA에 보다 더 행동적으로 친숙성(behavioral preference)을 갖는 것으로 밝혀졌다[10,12]. 이러한 결과들은 imprinted olfactory homesteam memory의 일부요소가 수용체 주변 신경세포에 존재함을 시사한다. 또한 후각계는 구조적으로 비교적 단순하기 때문에 기억형성의 일반적인 model system으로도 많은 연구가 되고 있는 분야이다[11,13-15]. 포유류의 경우 기억형성에 중요한 역할을 하는 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체는 glutamate 수용체의 일종으로서 NR1과 NR2의 아단위(subunit)로 구성되어 있으며, NR1은 하나의 유전자에 의하여 coding되나, NR2는 NR2A, 2B, 2C 및 NR2D의 각기 다른 유전자에 의하여 coding된다[3,6]. 포유류와는 발생계통학적으로 매우 거리가 먼 어류의 NMDA 수용체가 어떠한 아단위로 구성되어 있는지는 매우 흥미로운 관심사이며, 연어의 회귀성이 후각기억과 관련이 있다는 여러 가지 행동학적 증거에도 불구하고 homesteam memory의 기전에 대한 분자신경생물학적 이해는 아직 미비하다. 그러므로 본 연구에서는 연어의 모천회귀성의 근거로 생각되

는 후각기의 형성 기전을 이해하기 위하여, 연어의 중추신경계에 있어서 주된 흥분성 신경전달 물질인 glutamate의 수용체이며 기억형성에 중요한 역할을 할 것으로 추정되는 NMDA 수용체의 표현과 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

연어의 채집 및 뇌의 분리

본 연구에 사용한 연어(Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*)는 산란기인 10월 초순부터 11월 중순 사이에 국립수산진흥원 양양 내수면연구소 연어 포획장에서 채취하였으며, 채취한 연어의 평균 가랑이 체장은 65 cm이고 평균 체중은 3.0 kg이었다. 가능한한 뇌에 충격을 주지않으면서 뇌를 분리한 다음 액체질소로 고정시켜 시료로 사용하였다.

연어의 뇌로부터 연접후 치밀질(Postsynaptic density, PSD) 분획의 분리

포유류의 연접후 치밀질(Postsynaptic density, PSD) 분리방법을 응용하여 연어의 PSD를 분리하였다. 준비된 연어로부터 뇌를 분리하고, 용액 A(0.32 M sucrose, 1 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 0.1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/μl leupeptin)에서 균질화하였다(brain homogenate; BH). 이 균질액을 1,400x g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻고(상등액 1), 침전물은 용액 A로 재현탁, 균질화하여 710×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다(상등액 2). 상등액 1, 2를 합하여 13,800×g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻고, 이를 용액 B(0.32 M sucrose, 1 mM NaHCO₃)에 재현탁한 후, sucrose step gradient에 조심하여 올려놓고 82,500×g에서 2시간동안 초원심분리하였다. 1.0 M과 1.2 M sucrose층 사이에 형성된 연접체(synaptosome; SYN)를 Pasteur pipette으로 모아서 용액 B로 희석한 후, 동량의 1% Triton X-100 용액을 넣고 4℃에서 15분간 교반하였다. 이를 36,800×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물(PSD분획)을 40 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 현탁하고 소량씩 나누어 -80℃에 보관하였다.

수컷 쥐의 뇌 분리 및 PSD 분리

수컷 쥐(Sprague-Dawley, 250-300 g)로부터 뇌를 분리

하고 상기의 연어 뇌의 PSD와 같은 방법으로 PSD분획을 분리하여 소량씩 나누어 -80℃에 보관하였다.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SDS-polyacrylamide gel은 Laemmli방법[5]에 따라 6% gel을 사용하고, 80V에서 bromophenol blue 표시이 gel 끝에 도달할 때까지 전개한 다음 Coomassie 염색용액(Coomassie brilliant blue R-250 0.3 g, 2-propanol 200 ml, acetic acid 80 ml, H₂O 520ml)으로 2~3시간 염색하고, 탈염색(2-propanol 80 ml, acetic acid 80 ml, H₂O 640 ml)한 뒤 건조시켜(80℃, 2시간) 보관하였다.

Immunoblot 방법에 의한 항원 항체 반응

전기영동 후 전이완충용액(50 mM Tris-base, 380 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol)을 이용하여 400 mA에서 16~18시간 동안 nitrocellulose(NC) paper에 전이하였다. 전이가 끝나면 Ponceau S용액(0.1%(w/v) Ponceau S, 0.1% acetic acid)으로 1분간 염색하고, 1분간 탈염색(0.1% acetic acid)하여 단백질 띠를 확인하였다. NC paper를 TTBS용액(10 mM Tris-HCl, pH7.5, 200 mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02% NaN₃)으로 실온에서 각각 10분간 네 차례 수세하고, 같은 용액으로 2시간 더 반응하였다. 1차 항체를 넣고 2시간 동안 반응시킨 후, 먼저 20 ml의 50 mM NaCl로 10분간 수세하고, TTBS용액으로 10분간씩 네 차례 더 세척하였다. 2차 항체를 넣고 1~2시간 반응시킨 후, TTBS용액으로 10분간씩 두 번, TBS용액(10 mM Tris-HCl, pH7.5, 200 mM NaCl, 0.02% NaN₃)으로 두 번, alkaline phosphatase 완충용액(100 mM Tris-HCl, pH9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)으로 한 번씩 각각 세척하였다. X-phosphate(33 μ l/10ml) 및 Nitro blue tetrazolium chloride (NBT, 66 μ l/10ml)를 넣고 상온에서 발색시킨 후, 증류수로 세척하여 발색을 중지시켰다.

결과 및 고찰

연어의 뇌로부터 연접후 치밀질 분획의 분리 및 확인

쥐의 PSD 분획의 분리방법을 응용하여 연어의 뇌로부터 PSD 분획을 분리하였으며, 분획 과정에서 얻어진 연어의 BH 및 PSD 분획을 6% SDS-polyacrylamide gel로 전기

영동(SDS-PAGE)하여 Coomassie염색한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

PSD 단백질 분획은 Proteines-Kit(Biomerieux Vitek사)를 사용하여 정량하였으며, 정량한 각 시료를 6% polyacrylamide gel에서 40 μ g씩 전기영동하였을 때, 연어의 BH와 PSD 분획의 각각에서 약 20개의 잘 분리되어 있는 단백질 띠를 45kD에서 200kD 사이에서 확인할 수 있었다. 이외에도 전체적으로 도말되어 나타나는 작은 띠들이 존재함을 알 수 있었다.

N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A (NR2A) 항체를 이용한 PSD 분획의 면역 염색

글루타민산은 포유류 중추신경계에서 가장 중요한 흥분성 신경전달물질이며, 그 수용체의 일종인 NMDA 수용체는 Ca²⁺ 이온통로로서 연접가소성과 기억형성에 관여한다. 포유류인 쥐에 있어서는 NMDA 수용체 아단위인 NR2A와 NR2B가 기억형성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 모척회귀하는 어류인 연어에 있어서도

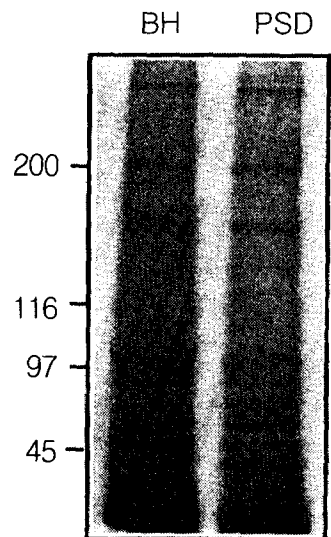


Fig. 1. Electrophoretic profiles of proteins in the salmon brain PSD fraction.

Forty micrograms of brain homogenate(BH) and postsynaptic density(PSD) fraction were electrophoresed and stained with Coomassie blue R-250. Molecular sizes are shown at left in kilodaltons.

NR2A가 존재하는가를 확인하였다. 연어와 쥐의 대뇌 및 소뇌의 BH, SYN, PSD 분획을 쥐의 NR2A 특이성 항체를 이용하여 면역염색한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 사용한 각각의 시료에서 NR2A 항체와 반응하는 몇개의 단백질을 확인할 수 있었으며, 특히 쥐의 경우에서 Moon등[7-9]에 의하여 보고된 NR2A 유전자의 위치인 분자량 약 180kD의 위치(Fig. 2, arrowhead)와 같은 위치에서 연어의 띠가 염색되었다(Fig. 2, SAL, arrow).

NMDA receptor subunit 2B (NR2B) 항체를 이용한 PSD 분획의 면역염색

포유류의 경우 NR2B는 연결의 발생과 연결가소성 및 기억형성에 중요한 역할을 한다. 연어에서도 NR2B가 연결에 존재하는가를 알아보기 위하여 BH, SYN, PSD 분획을 분리하여 쥐의 NMDA receptor 2B(NR2B) 특이성 항체를 이용하여 조사하였다(Fig. 3). NR2A와 마찬가지로 사용한 각각의 시료에서 NR2B 항체와 반응하는 몇개의 단백질띠를 확인할 수 있었으며 특히 Moon 등[9]에 의하여 보고된 쥐에 있어서의 NR2B 유전자의 위치인 분자량 약 180kD의 위치에서도 단백질띠가 염색되어 나타났다 (Fig.

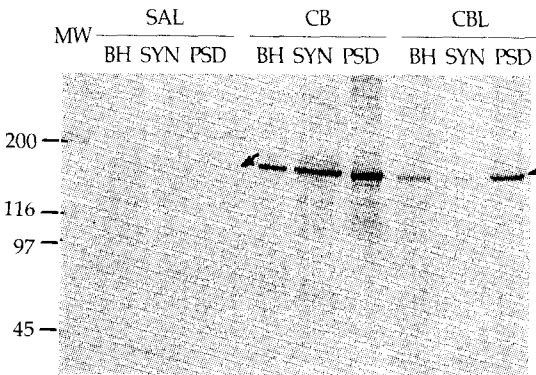


Fig. 2. Expression of NR2A in the salmon brain PSD fraction.

Forty micrograms of brain homogenate(BH), synaptosome (SYN), and postsynaptic density(PSD) fraction from salmon brain and rat brain were electrophoresed in a 6% SDS-gel, transferred to NC, and immunostained with an antibody against rat NR2A. Molecular sizes are shown at left in kilodaltons.

SAL, salmon; CB, adult rat cerebrum; CBL, adult rat cerebellum.

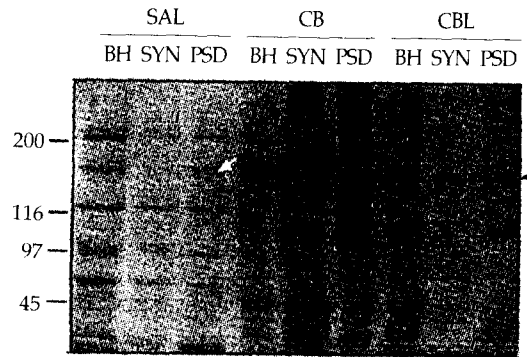


Fig. 3. Expression of NR2B in the salmon brain PSD fraction.

Forty micrograms of brain homogenate(BH), synaptosome (SYN), and postsynaptic density(PSD) fractions from salmon brain and rat brain were electrophoresed in a 6% SDS-gel, transferred to NC, and immunostained with an antibody against rat NR2B. Molecular sizes are shown at left in kilodaltons. SAL, salmon; CB, adult rat cerebrum; CBL, adult rat cerebellum.

3, SAL, arrow).

Phosphotyrosine 항체를 이용한 PSD 분획의 면역염색

포유류의 경우 protein tyrosine kinase(PTK)는 기억신호 전달경로에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 NR2A와 NR2B는 PTK에 의하여 인산화되는 것으로 알려져 있는데, 연어의 경우에도 PTK가 이와 유사한 역할을 하는지를 조사하였다. Phosphotyrosine 특이성 항체를 이용하여 연어와 쥐의 대뇌, 소뇌의 BH, SYN, PSD 분획을 면역염색한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 쥐의 대뇌, 소뇌의 경우 모든 시료에서 분자량 약 180kD의 위치에 phosphotyrosine 특이성 항체에 반응하는 단백질띠가 염색되어 나타났으며, 그 중에서도 대뇌에서는 가장 진하게 염색되었으나 연어의 경우 180 kDa 위치에서는 염색되는 단백질이 없었다. 그러나 180 kDa 보다 크거나 작은 위치(Fig. 4 SAL, arrows)에서 phosphotyrosine을 갖는 단백질이 검출되었다. 이와같은 결과는 쥐에서의 경우와 달리 연어의 NR은 PTK에 의하여 조절되지 않을 가능성을 시사한다.

그러나 사용한 항체가 쥐의 NMDA 수용체 아단위에

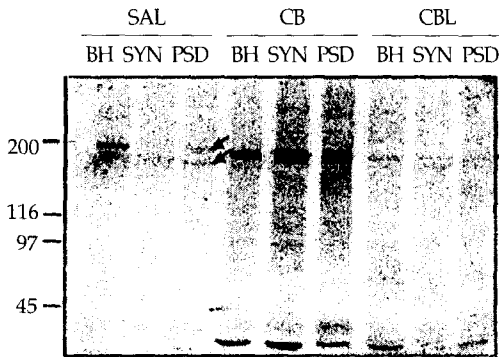


Fig. 4. Phosphotyrosine-containing proteins in PSD fractions from salmon brain and rat brain.

Forty micrograms of brain homogenate(BH), synaptosome (SYN), and postsynaptic density(PSD) fractions were electrophoresed in a 6% SDS-gel, transferred to NC, and immunostained with phosphotyrosine-specific antibody. Molecular sizes are shown at left in kilodaltons. SAL, salmon brain fraction; CB, adult rat cerebrum; CBL, adult rat cerebellum.

특이한 것이기 때문에 면역염색반응의 정도가 낮았다. 그러나 180 kDa 크기의 위치에 NR2A 및 NR2B 항체에 의하여 인식되는 단백질이 존재한다는 사실은 연어의 연접에도 이들의 단백질이 존재함을 강력히 시사하는 결과이다. 앞으로 연어 뇌로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고, NMDA 수용체 유전자의 염기서열로 만든 primer를 사용하여 PCR에서 증폭한 후 염기배열을 결정함으로써 연어에 있어서도 후각기능에 관여하는 NMDA 수용체 유전자가 존재함을 증명할 수 있다고 생각된다. 또한 연어 NMDA 수용체단백질들이 뇌의 발생과 후각기능과 관련된 연접조절에 어떤 역할을 하는지에 대한 구체적인 연구를 필요로 한다.

자신이 부화한 장소로 회귀하여 생을 마치는 성질을 갖는 연어의 모친회귀성은 과학적으로 매우 흥미로운 연구 대상이나 모친 기억 형성에 대한 이해는 아직 미비하다. 그러므로 연어의 후각기능 수용체 유전자에 대한 본 연구는 회귀율 향상의 방안을 마련할 과학적인 기초자료와 연어 치어 생산 방류시의 장소특이성 후각기억을 강화시키기 위한 방법의 개발에 있어서의 기초자료로서 제공되며, 나아가서는 연어 어민의 소득 증대에도 크게 기여할 수 있다고 판단된다.

요 약

본 연구는 연어 뇌 연접의 단백질구성에 대한 기초연구로서, 기억형성에 중요한 역할을 하는 NMDA 수용체의 분포와 PTK에 의한 인산화에 대하여 조사하였다. 본 실험에 사용한 연어 뇌의 PSD 분획에서는 Coomassie로 염색할 경우 20여개 분명한 단백질띠를 확인할 수 있었으며, 소량으로 존재하여 전체적으로 도말되어 보이는 펩타이드의 수는 알 수 없었다. 이들 중 180kD 크기의 단백질은 phosphotyrosine 특이성 항체에 상대적으로 잘 인식이 되었다. 또한 이 180 kDa의 단백질들은 쥐에 있어서의 NR2A 및 NR2B의 위치인 분자량 약 180kD의 위치와 동일한 것으로 보아 연어에 있어서도 후각기능에 관계하는 NR2A 및 NR2B가 존재함을 추정할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터의 연구비 지원에 의한 것이며, 시료채취에 도움을 주신 국립수산물진흥원 양양내수면연구소에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Amano, M., A. Urano and K. Aida. 1997. Distribution and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the teleost brain. *Zool. Sci.* **14**, 1-11.
2. Hasler, A. D. & A. T. Scholz. 1983. Olfactory Imprinting and Homing in Salmon(Springer, New York).
3. Ishii, T., K. Moriyoshi, H. Sugihara, K. Sakurada, H. Kadotani, M. Yokoi, C. Akazawa, R. Shigemoto, N. Mizuno, M. Masu and S. Nakanish. 1993. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 2836-2843.
4. Kaeriyama, M. 1998. Dynamics of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, populations released from Hokkaido, Japan. *North Pacific Anad. Fish. Comm. Bull.* **1**, 90-102.
5. Laemmli, M. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
6. Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M.

- Higuchi, H., Lomeli, N., Burnashev, B., Sakman and P. H. Seeburg. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**, 1217-1221.
7. Moon, I. S., D. H. Jin and B. H. Ko. 1995. Immunological Evidence for the Enrichment of N-methyl-D-aspartate Receptor Subunit 2A in the Rat Postsynaptic Density. *Mol. & Cells* **5**, 436-441.
8. Moon, I. S., D. H. Jin and B. H. Ko. 1995. Phosphorylation of N-methyl-D-aspartate Receptor Subunit 2B by Ca²⁺/calmodulin-dependent Protein Kinase II. *Mol. & Cells* **5**, 475-480.
9. Moon, I. S., M. L. Apperson and M. B. Kennedy. 1994. The major tyrosinephosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3954-3958.
10. Nevitt, G. A., A. H. Dittman, T. P. Quinn and W. J. Moody. 1994. Evidence for a peripheral olfactory memory in imprinted salmon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4288-4292.
11. Schmidt, K. F., M. Kruse and H. Hatt. 1994. Dopamine alters glutamate receptor desensitization in retinal horizontal cells of the perch (*Perca fluviatilis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8288-8291.
12. Scholz, A. T., C. K. Gross, J. C. Cooper, R. M. Horral, A. D. Hasler, R. L. Daly & R. J. Poff. 1978. *Trans. Am. Fish. Soc.* **107**, 439-443.
13. Seeburg, P. H. 1993. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends in Neuroscience* **16**, 359-365.
14. Squire, L. R., A. P. Shimamura and D. G. Amaral. 1989. In *Neural Models of Plasticity*, pp. 208-239. W. B. J. Byrne, Ed.
15. Tong, C. K., P. P. Pan and Y. C. Chang. 1992. Characterization of L-Glutamate and Kainate binding sites in the Brain of a freshwater fish, *Telapia mossambica*. *Neuroscience* **49**, 237-246.
16. Ueda, H. 1998. Correlations between homing, migration, and reproduction of chum salmon. *North Pacific Anad. Fish Comm. Bull.* **1**, 112-117.
17. 生田和正. 1997. サケはなぜ海に下ってまた帰ってくるのか, *化学と生物*, **35**, 650-655.