

인슐린유사성장인자 신호전달이 참굴(*Crassostrea gigas*)의 비만도에 미치는 영향

박수진 · 최윤희[†]
부경대학교(학생) · [†]부경대학교(교수)

Effects of the Insulin-like Growth Factor Signaling on Condition Index in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*)

Su-Jin PARK · Youn Hee CHOI[†]
Pukyong National University(student) · [†]Pukyong National University(professor)

Abstract

Study on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) which plays a role in regulating proliferation, differentiation, growth, and survival in vertebrates, has been reported mainly in fish and a correlation between IGF-1 activity and growth has been described in some bivalves. In Korea, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* is an important species, and its growth and reproduction were dependent on the condition index (CI) and tissue weight rate (TWR). Therefore, we investigated effects of the expression of IGF-1 signal in mantle edge, gill, labial palp and digestive gland of *C. gigas* during about 1 year, using immunoblot analysis to assess the relationship between IGF-1 receptor (IGF-1R) activity and CI. The activation of the IGF-1 signaling pathway, including the IGF-1R β -subunit, could be detected high in May when CI and TWR were high. IGF-1R was activated and regulated the downstream IGF-1 signaling in tissues of *C. gigas*. However, the level of each factors of IGF family expression was depended on tissues and month. These results suggest that the increased activation of IGF-1 signal could be related to the condition index of *C. gigas*.

Key words : Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Condition index, Insulin-like growth factor signaling

I. 서론

연체동물의 계절적 대사 활동은 환경조건, 먹이의 종류와 양, 성장 및 산란 등과 같은 복잡한 상호작용에 의해 영향을 받는다. 일반적으로 해양 무척추동물들에서 섭취된 먹이는 글리코겐, 지질 및 단백질의 형태로 에너지가 저장되며 특히, 산란기보다 산란기 이전에 에너지 저장률이 높은 것으로 알려져 있다(Gabbott, 1976). 참굴의

성장과 비만도 역시 양성장의 수온, 염분 및 먹이생물과 같은 환경요인을 비롯하여 생물학적인 요인에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있으며(Lim et al., 1975), 성숙과 함께 체내에 저장된 에너지를 5~8월까지의 산란기에 소비한 후, 다시 에너지를 저장하는 것으로 알려져 있다(Ruiz et al, 1992; Delaporte et al, 2006). 굴은 산란기 동안 연체부 중량의 최대 50%까지 생식소가 차지하기 때문에, 산란기 직후에는 육질부가 매우 감소지

[†] Corresponding author : 051-629-5915, unichoi@pknu.ac.kr

* 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2019년)에 의하여 연구되었음..

만, 다시 체내에 글리코젠을 축적하기 시작한다. 체내 글리코젠 함량이 높은 10월 이후부터 이듬해 3월 전까지 굴은 식품으로서 판매 소비가 가장 높다(Helm and Bourne., 2004).

Insulin-like growth factor (IGF) system은 IGF, IGF-binding protein (IGF-BP), IGF-receptor (IGF-R)로 이루어져 있다. 이들은 어류에서 성장, 세포증식, 분화 및 번식을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Leibush et al., 1996), 무척추동물에서도 연체부 및 패각의 성장 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Gricourt et al. 2003).

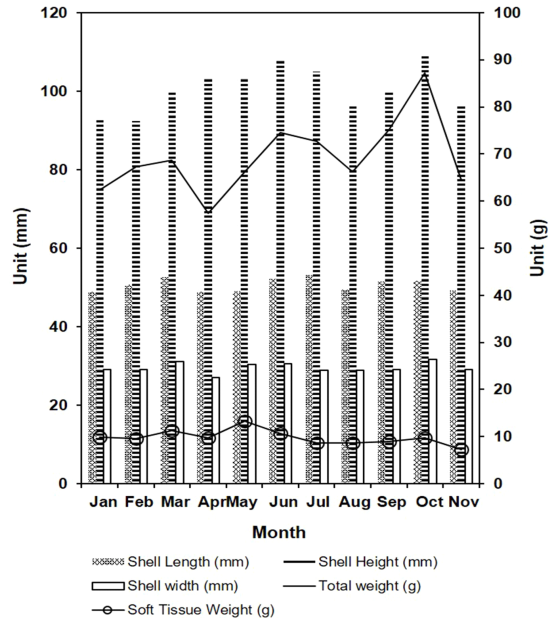
참굴의 IGF에 관한 연구는 배발생에 따른 IGF-1의 변화(Park and Choi, 2019), 겨울철 굴의 성장과 IGF-1과의 관계(Choi et al., 2018), IGF-1/AKT pathway 조절에 따른 패각근 성장(Kim and Choi, 2019)을 통하여 개체의 성장에 따른 IGF system의 발현에 관한 연구가 주를 이루고 있다. 한편, 조개류의 성숙과 관련된 연구는 홍합, *Mytilus galloprovincialis* (Canesi et al., 1999), 진주조개, *Pinctada fucata* (Shi et al., 2013), 가리비, *Patinopecten yessoensis* (Feng et al., 2014) 등 매우 다양하게 진행되고 있으나, 참굴이 성장과 성숙기 이후 산란기를 거치는 동안 비만도가 급속히 감소하는 경향에 대하여 IGF-1 signaling과의 비교·분석에 관한 연구는 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구는 매월 참굴의 비만도를 측정하여 최대값과 최소값을 가지는 시기에 조직별 IGF-1 signal의 경로를 조사하여 참굴의 비만도와 IGF-1 signaling과의 관계를 비교하고자 하였다.

II. 연구 방법

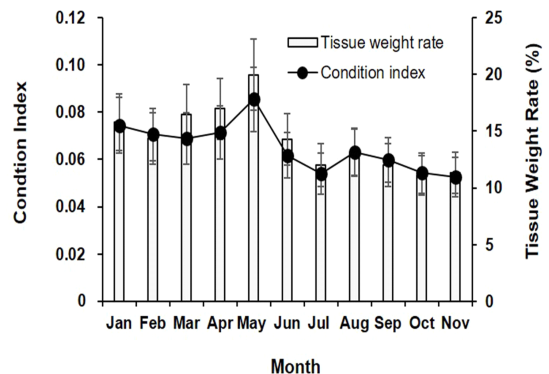
1. 채집 및 성장도 분석

본 실험에 이용된 참굴은 통영 자란만(34°51' 32.34" N, 128°12' 23.44" E)에서 연승 수하식 양성 중인 2배체를 11개월 동안 무작위로 매월



[Fig. 1] Measurements of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* used in the experiments.

40개체씩 채집하여 측정하였다. 채집된 참굴은 각장(shell length, SL), 각고(shell height, SH) 및 각폭(shell width, SW)을 vernier calipers를 사용하여 측정하였고, 전중(total weight, TW) 및 연체부 중량(soft tissue weight, STW)은 electronic balance를 이용해 측정하여([Fig. 1]), 비만도(condition



[Fig. 2] Condition index and tissue weight rate of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* used in the experiments.

index, CI)와 연체부 중량의 비(tissue weight rate, TWR)를 구하였다([Fig. 2]). 비만도와 연체부 중량의 비는 Choi and Chang (2003)의 계산식을 이용하여 다음과 같이 값을 구했다.

$$CI = STW(g)/(SL(mm) \times SH(mm) \times SW(mm)) \times 1,000$$

$$TWR = (STW(g)/TW(g)) \times 100$$

2. Western blot 분석

비만도에 따라 최고값을 나타내는 5월과 최저값을 나타내는 10월에 참굴의 외투막, 아가미, 순관, 소화낭에서 단백질 발현을 확인하기 위해 immunoblot assay를 실시하였다. 조직 1 mg에 RIPA buffer (50 mM Tris, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate) 1 mL에 넣고 균질화한 다음, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Thermo, #23225)를 사용하여 microplate reader (EZ Read 400, Biochrom, UK)에서 562 nm로 측정하였다. 단백질 농도를 50 µg으로 동일하게 정량한 다음, 8~15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 옮겼다. PVDF membrane은 tris buffered saline with Tween-20 (TBST)에 용해된 10% bovine serum albumin (BSA)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology 제품으로 IGF-1(sc-74116), IGF-1 receptor (IGF-1R; sc-462), tyrosine-phosphorylation (PY99, sc-7020), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) p85 (sc-1637), growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2; sc-8034), RAS(sc-31), anti-mitogen-activated protein kinase (MEK, sc-6250), extracellular signal-regulated kinase (ERK; sc-27120), phospho-ERK(sc-7383), β-actin(sc-47778)을 사용하였다. 이후 2차 antibody를 2시간 동안 반응시켰다. 현상을 위해 Western blotting kit (Advansta, K-12045)로 반응시키고 형광 젤 이미지 분석장치(Azure

biosystems, CA, USA)로 현상한 후 Densitometry는 Gene Tools version 4.03 (SYNGENE, Cambridge, UK)을 이용하여 확인하였다.

3. 통계 분석

실험 분석결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. 유의차 검정은 IBM SPSS Statistics version 25 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA)를 사용하였으며, Duncan test 사후분석을 통해 95% 신뢰수준에서 실험구간의 유의차를 확인하였다.

Ⅲ. 연구 결과 및 고찰

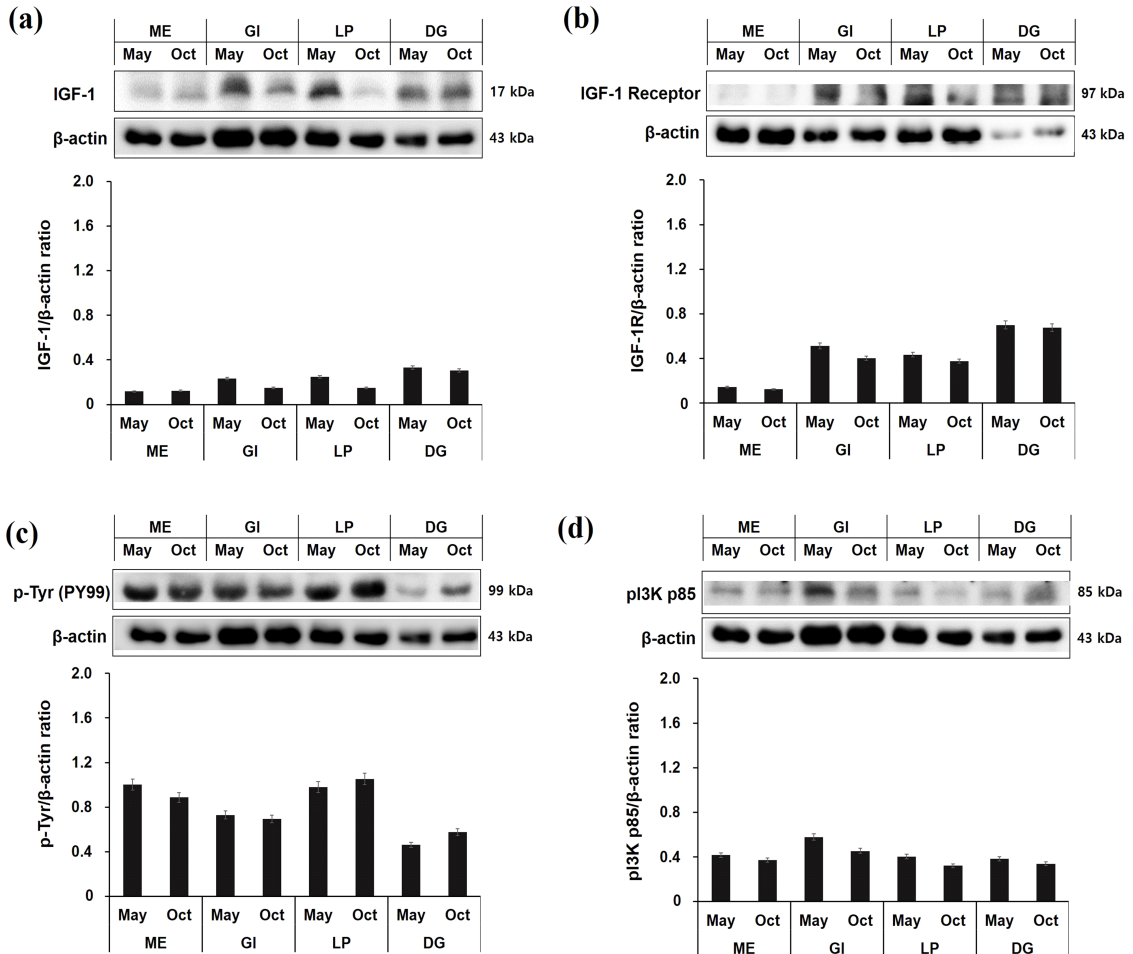
1. 참굴의 비만도

비만도를 측정하기 위해 매달 각장, 각고, 각폭 및 연체부 중량을 측정하여 월별 비만도(CI)와 연체부 중량의 비(TWR)를 확인한 결과, CI는 참굴의 폐각 무게를 합한 전체 중량보다는 연체부 중량에 영향을 받는 것으로 조사되었으며, 연중 0.053(±0.008)~0.085(±0.014)로 측정되었고, 성숙기인 5월에 유의하게 높았으며, 10월과 11월에 가장 낮은 값을 나타내었다(P<0.05)([Fig. 2]). TWR도 연중 11.09(±1.75)~19.96(±3.16)%로 나타났으며, CI와 동일하게 5월에 가장 높은 값을, 10월에 가장 낮은 값을 나타내었다(P<0.05)([Fig. 2]). 본 연구결과는 우리나라의 참굴 산란기에 대하여 경남 남해안에서 양성한 참굴의 산란기가 시작되는 5월에 가장 높은 비만도를 보인 것과 일치하였다(Min et al., 2004). TWR 또한 봄철에 연체부 중량이 성장하고, 산란기를 거치면서 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며, 일부 후기 산란기를 앞두고 다시 증가하는 경향을 보였다. 이러한 경향은 굴의 지리적 분포에 따라 다른 것으로 보고되고 있으며(Kim et al., 2012), 측정되는 굴의 비만도는 수확한 굴의 질적 가치를 판단하는 매우 유용한 지표로 사용되고 있다(Lim et al., 2014).

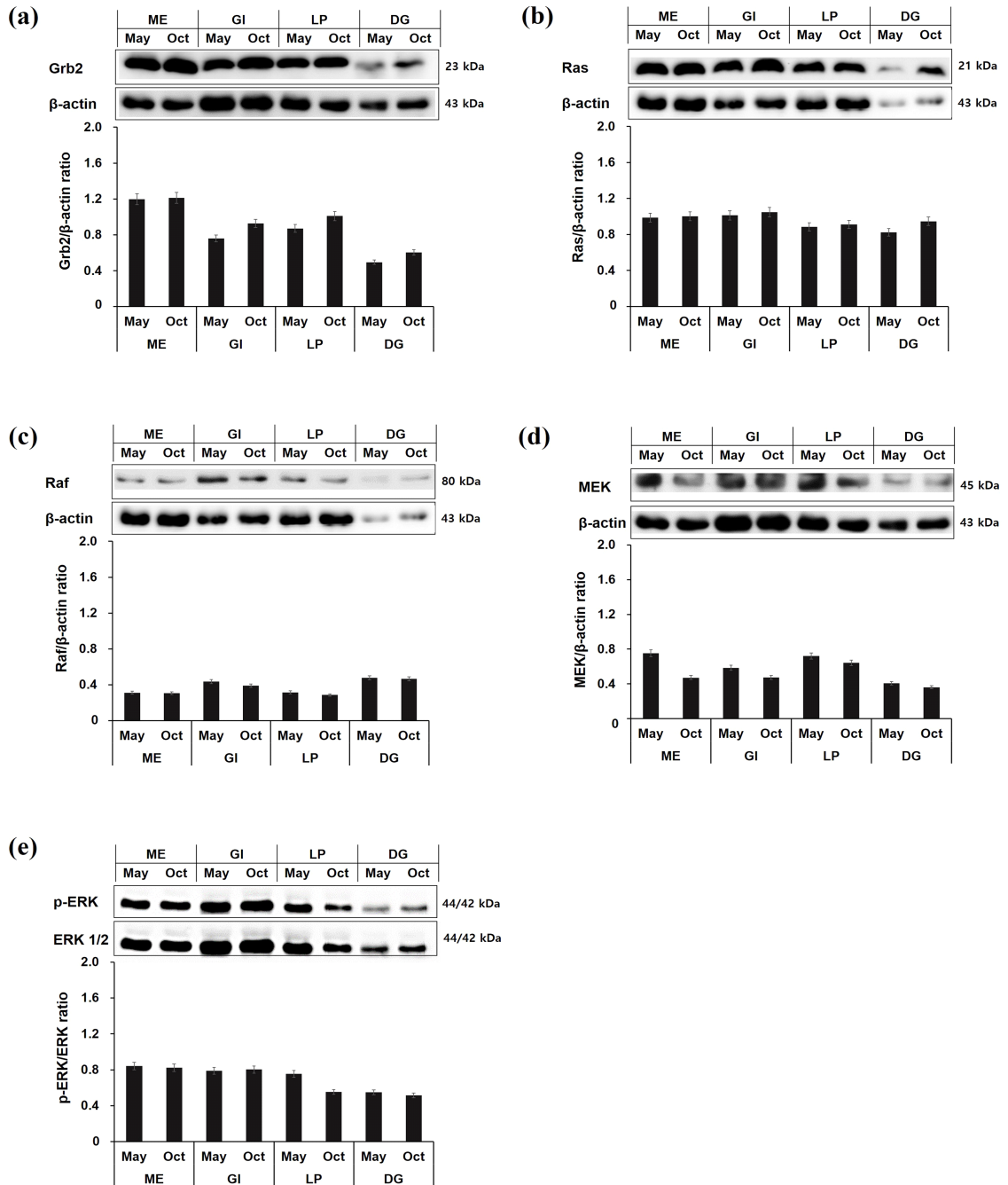
2. IGF 시스템의 발현

생물체의 정상적인 성장과 발달을 위해서는 IGF-1의 발현은 중요하며, IGF-1은 세포 외부에서 세포 표면 막에 IGF-1 receptor (IGF-1R)와 결합하여 활성화된다(Duan, 1997). 이때, IGF-1R의 β -subunit의 tyrosine kinase domain에서 자가인산화가 일어나게 되며, 표적단백질과 결합하여 tyrosine kinase를 활성화시킨다(Hernández-Sánchez et al, 1995). 이후 활성화된 IGF-1R에 결합하는

대표적인 단백질인 insulin-receptor substrate (IRS)가 인산화되고, 인산화된 IRS에 phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)의 p85 regulatory subunit이 결합한다. PI3K는 인산화되어 그 하위인자를 활성화 시킴으로써 세포의 증식과 분화를 촉진시킨다 (Ande and Mishra.,2009; Rajalingam et al., 2005). 본 연구 결과, 참굴의 조직별로 IGF-1을 비롯한 IGF-1R signal의 발현량은 차이가 나타났으나, 먹이섭식에 가장 먼저 관여하는 아가미에서



[Fig. 3] Expression of (a) IGF-1, (b) IGF-1R, (c) phospho-tyrosine (PY99) and (d) PI3Kp85 in mantle edge, gill, labial palp and digestive gland of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell lysate was resolved using SDS-PAGE, and analyzed by western blotting. Me, mantle edge; GI, gill; LP, labial palp; DG, digestive gland.



[Fig. 4] Expression of (a) growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), (b) Ras, (c) Raf, (d) anti-mitogen-activated protein kinase (MEK) and (e) phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) in mantle edge, gill, labial palp and digestive gland of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell lysate was resolved using SDS-PAGE, and analyzed by western blotting. Me, mantle edge; GI, gill; LP, labial palp; DG, digestive gland.

IGF-1의 발현이 높았으며([Fig. 3a]), 이후 IGF-1 signal의 경로는 실험에 사용된 모든 조직에서 뚜렷하게 나타났다. 우선, IGF-1, IGF-1R은 비만도가 가장 높았던 5월에서 비만도가 가장 낮았던 10월에 비해 발현량이 높았다([Fig. 3b]). 또한, 참굴의 외투막, 아가미에서 비만도가 높은 5월에 p-Try의 발현이 높게 나타나는 것을 확인하였으며([Fig. 3c]), PI3Kp85의 활성화도 원활하게 이루어졌다([Fig. 3d]).

한편, mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로는 세포의 성장, 분화 등에 대한 생리적 반응을 조절한다(Garrington and Johnson., 1999). 성장인자인 IGF-1에 대한 MAPK의 신호전달은 Ras-Raf-MEK에 의해 ERK가 인산화되어 세포의 생존과 증식, 분열 및 분화를 조절하며, ERK의 인산화를 증가시키고 세포증식에 영향을 미친다(Zhang and Liu., 2002). IGF-1 signal 중 이들의 하위 신호전달 경로에는 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 Grb2와 Ras-Raf-MEK-ERK 경로를 확인하였다. Ras를 활성화 시켜주는 Grb2는 외투막, 아가미, 순판, 소화맹낭에서 5월보다 10월에 높은 발현을 보였으나 유의차는 나타나지 않았으며([Fig. 4a; P<0.05]), Ras와 Raf도 비슷한 경향으로 발현되는 것을 확인하였다([Fig. 4b, c]). 또한, MEK와 pERK의 발현은 모든 조직에서 비만도와 연체부 중량비가 가장 높은 5월이 낮은 10월에 비해 활성화가 높은 것을 확인하였다([Fig. 4d, e]). 이러한 결과는 참굴의 비만도에 Ras가 Raf-MEK-ERK 경로에 관여하여 참굴의 성장에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

IV. 결론

참굴의 외투막, 아가미, 순판, 소화맹낭의 각 조직에서 IGF-1R의 활성화는 Ras/Raf/ MAPK 경로를 활성화시켜 성장에 작용하여 최종적으로 비만에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그러나, 향후

transcription factor의 발현을 통하여 핵 내 유전자의 활성을 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

References

- Ade SR and Mishra S(2009). Prohibitin interacts with phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PIP3) and modulates insulin signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 1023~1028. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.101>.
- Canesi L, Ciacci C, Betti M, Malatesta M, Gazzanelli G and Gallo G(1999). Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) through tyrosine kinase mediated signal transduction. *General and comparative endocrinology*, 116(2), 241~248. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7366>.
- Choi YH, Chang YJ(2003). Gametogenic cycle of the transplanted-cultured pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* (Bivalvia: Pteriidae) in Korea. *Aquaculture* 220:781~790. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00304-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00304-6).
- Choi YH, Kim EY and Nam TJ(2018). Involvement of insulin-like growth factor in intraspecific variation in growth of Pacific oyster *Crassostrea gigas* during winter. *Fisheries science*, 84(6), 1017~1024. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1232-3>.
- Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S and Samain JF(2006). Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*, 254(1-4), 571~582. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.006>.
- Duan C(1997). The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *American Zoologist*, 37(6), 491~503. <https://doi.org/10.1093/icb/37.6.491>.
- Feng L, Li X, Yu Q, Ning X, Dou J, Zou J, Zhang L, Wang S, Hu X and Bao Z(2014). A scallop IGF binding protein gene: molecular characterization and association of variants with growth traits. *PLoS One*, 9(2), e89039.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089039>.
- Gabbott PA(1976). Energy metabolism. Marine mussels, 293~355.
- Garrington TP and Johnson GL(1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Current opinion in cell biology, 11(2), 211~218.
[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80028-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80028-3).
- Gricourt L, Bonnet G, Boujard D, Mathieu M and Kellner K(2003). Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. General and comparative endocrinology, 134(1), 44~56.
[https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00217-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00217-X).
- Helm MM and Bourne N(2015). Hatchery culture of bivalves: A practical manual. AquaInfo Appendix to Magazine No. 3. AquaInfo Co., Ltd, Seoul, Korea. 171 pp.
- Hernández-Sánchez C, Blakesley V, Kalebic T, Helman L and LeRoith D(1995). The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis. Journal of Biological Chemistry, 270(49), 29176~29181.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29176>.
- Kim EY and Choi YH(2019). Regulation of adductor muscle growth by the IGF-1/AKT pathway in the triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Fisheries and Aquatic Sciences, 22(1), 1~10.
<https://doi.org/10.1186/s41240-019-0134-3>.
- Kim SY, Choi EH, Han HS and Lim HJ(2012). Ecophysiological characteristics changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, after spawning season in off-bottom culture. Korean Journal of Malacology, 28(3), 215~223.
<http://dx.doi.org/10.9710/kjm.2012.28.3.215>.
- Leibush B, Parrizas M, Navarro I, Lappova Y, Maestro MA, Encinas M, Plisetskaya EM and Gutiérrez J(1996). Insulin and insulin-like growth factor-I receptors in fish brain. Regulatory peptides, 61(2), 155~161.
[https://doi.org/10.1016/0167-0115\(95\)00154-9](https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00154-9).
- Lim DB, Cho CH and Kwon WS(1975). On the oceanographic conditions of oyster farming area near Chungmu. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8(2), 61~67.
- Lim HJ, Lim MS, Lee WY, Choi EH, Yoon JH, Park SY, Lee SM and Kim SK(2014). Condition index and hemocyte apoptosis as a health indicator for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* cultured in the western coastal waters of Korea. Journal of Malacology, 30(3), 189~196.
<http://dx.doi.org/10.9710/kjm.2014.30.3.189>.
- Min KS, Kim BS, Kim TI, Hur YB and Cung E Y(2004). Reproduction cycle and induced sexual maturation of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Korean Journal of Malacology, 20(1), 75~84.
- Park SJ and Choi YH(2019). Activity of Insulin-like Growth Factor System During the Embryogenesis of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). The Korea Society for fisheries and Marine Science Education. 31(5), 1424~1431.
- Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V, Churin Y, Hekman M, Sievers C, Rapp UR and Rudel T(2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf - MEK - ERK activation and epithelial cell migration. Nature cell biology, 7(8), 837~843.
<https://doi.org/10.1038/ncb1283>.
- Ruiz C, Abad M, Sedano F, Garcia-Martin LO and Lopez JS(1992). Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 155(2), 249~262.
- Shi Y, Guan Y and He M(2013). Molecular identification of insulin-related peptide receptor and its potential role in regulating development in *Pinctada fucata*. Aquaculture, 408, 118~127.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.038>.
- Zhang W and Liu HT(2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell research, 12(1), 9~18.
<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>.

-
- Received : 16 February, 2021
 - Revised : 12 March, 2021
 - Accepted : 19 March, 2021