

석사학위논문

놀래기류에서 estrogen receptor,
aromatase cDNAs의 클로닝과
조수의 변화에 따른 발현



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제주대학교 대학원
생명과학과

오 대 주

2005년 12월

놀래기류에서 estrogen receptor, aromatase
cDNAs의 클로닝과 조수의 변화에 따른 발현

지도교수 : 김 세 재

오 대 주

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월

오대주의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 印

위 원 _____ 印

위 원 _____ 印

제주대학교 대학원

2005년 12월

Cloning of estrogen receptor, aromatase cDNAs
and their expressions during the tidal changes
in the protogynous wrasses

Dae-Ju Oh

(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science



DEPARTMENT OF LIFE SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

December, 2005

ABSTRACT

Estrogen actions, which regulate the reproductive activities in fishes, is mediated by estrogen receptors (ERs). Estrogen is converted from testosterone by aromatase. Three *ER* subtypes (*ER α* , *ER β* , *ER ν* or *ER β* 2) and two aromatase subtypes (*CYP19a* and *CYP19b*) are identified in fishes. This study was performed as basic research to clarify the role of *ERs* and *CYP19s* genes in reproductive activities of protogynous wrasses. First of all, *ER* subtypes (*ER α* and *ER β*) and aromatase subtypes (*CYP19a* and *CYP19b*) were cloned from *Pseudolabrus japonicus*. The ORF length of bambooleaf wrasse *ER α* , *ER β* , *CYP19a* and *CYP19b* were 1.6 Kb, 2 Kb, 1.6 Kb and 1.5 Kb, respectively. The cloned *ERs* and *CYP19s* exhibited several conserved features found among all nuclear receptors and *CYP19s*, respectively. And the sequences of cDNAs identified in bambooleaf wrasse were the most similar to respective gene of *Halichoeres tenuispinis*. Secondly, we investigated their expression in Okinawa three-spot wrasse, *Halichoeres trimaculatus* during the tidal changes. The expression levels of *ER α* , *ER β* , *CYP19a* and *CYP19b* in the ovary and brain tissues were compared using real-time PCR. In this study, we firstly identified that the three-spot wrasse spawns at high tide. In ovary, *ER α* and *CYP19a* was expressed at high level during high tide. Especially, the expression of *CYP19a* was more increased after high tide. But, the expression pattern of *ER β* was opposite to those of *ER α* . In brain, *ER α* expressed at high level during low to high tide through whole brain tissue (fore-, mid-, and hindbrain). *ER α* expression level was the highest in midbrain, while *ER β* was expressed at high level in forebrain

during low to high tide. *CYP19b* expression level was significantly high in midbrain during low to high tide. This result suggest that *ERs* and *CYP19s* are closely related to reproduction rhythm of wrasse.

Keyword : cloning, aromatase (*CYP19*), estrogen receptor (*ER*), real-time PCR, tidal change, wrasse

목 차

ABSTRACT	i
목 차	ii
LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험동물	
2. 조직학적 관찰과 난모세포의 난경 측정	
3. 혈장 내 E ₂ 농도 측정	
4. RNA 분리	
5. cDNA 합성	
6. <i>ER</i> 과 <i>CYP19</i> cDNA의 클로닝	
7. 염기서열 분석	
8. Real-time RT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석	
9. 통계분석	
III. 결 과	16
1. 황늘래기의 <i>ER</i> 과 <i>CYP19</i> cDNAs의 클로닝과 염기서열 분석	
1) <i>ERα</i> 와 <i>ERβ</i>	
2) <i>CYP19a</i> 와 <i>CYP19b</i>	
2. 삼점늘래기에서 조수의 변화에 따른 <i>ER</i> 과 <i>CYP19</i> subtypes의 유전자 발현	

1) 난소의 형태학적 변화	
2) 생식소와 뇌에서 <i>ERs</i> 과 <i>CYP19s</i> subtypes의 발현 양상	
IV. 고찰	45
1. 황놀래기의 <i>ER</i> 과 <i>CYP19</i> cDNAs의 클로닝	
2. 조수 변화에 따른 삼점놀래기의 생식리듬과 <i>ER</i> 과 <i>CYP19</i> mRNA의 발현	
V. 인용 문헌	50
VI. 요약	65
VII. 감사의 글	66

LIST OF TABLES

Table 1. Primer sets used for partial cloning of <i>ER</i> and <i>CYP19</i> subtypes in <i>Pseudolabrus japonicus</i>	8
Table 2. Primer sets used for RACE of <i>ER</i> and <i>CYP19</i> subtypes in <i>P. japonicus</i>	9
Table 3. Primer sets used for partial cloning of <i>ER</i> and <i>CYP19</i> subtypes in <i>Halichoeres trimaculatus</i>	13
Table 4. Primer sets used for quantitative real-time PCR.....	14
Table 5. Comparison of amino acid identities between <i>P. japonicus ERα</i> and other species' <i>ERα</i> s.....	21
Table 6. Comparison of amino acid identities between <i>P. japonicus ERβ</i> and other species' <i>ERβ</i> s.....	22
Table 7. Comparison of amino acid identities between <i>P. japonicus</i> aromatase and other species' aromatases.....	30

LIST OF FIGURES

Figure 1. Dorsal view of a brain of <i>H. trimaculatus</i>	4
Figure 2. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of <i>ERa</i> of <i>P. japonicus</i>	17
Figure 3. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of <i>ERβ</i> of <i>P. japonicus</i>	19
Figure 4. Comparison of the functional domains between wrasse <i>ERa</i> and <i>ERβ</i> of <i>P. japonicus</i>	23
Figure 5. Phylogenetic analysis of the relationship between wrasse <i>ER</i> subtypes with other species' <i>ER</i> subtypes.....	24
Figure 6. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of <i>CYP19a</i> of <i>P. japonicus</i>	26
Figure 7. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of <i>CYP19a</i> of <i>P. japonicus</i>	28
Figure 8. Alignment of amino acid sequences of <i>P. japonicus CYP19a</i> with other species <i>CYP19a</i>	31
Figure 9. Alignment of amino acid sequences of <i>P. japonicus CYP19b</i>	

with other species <i>CYP19b</i>	34
Figure 10. Phylogenetic analysis of the relationships between wrasse <i>CYP19s</i> subtypes with other species' <i>CYP19s</i> subtypes	36
Figure 11. Changes of gonadosomatic Index (GSI) during tidal changes of <i>H. trimaculatus</i>	38
Figure 12. Changes of plasma estradiol-17 β levels during tidal changes of <i>H. trimaculatus</i>	39
Figure 13. Histological observation of oocytes in ovary of <i>H. trimaculatus</i> at each tide	40
Figure 14. Changes of oocyte diameter of <i>H. trimaculatus</i> during tidal changes	41
Figure 15. Real-time PCR analysis of <i>ERs</i> and <i>CYP19a</i> mRNA expression in ovary of <i>H. trimaculatus</i> during tidal changes	43
Figure 16. Expression patterns of <i>ERs</i> and <i>CYP19b</i> mRNA in brain of <i>H. trimaculatus</i> during tidal changes	44

서 론

여성 호르몬인 estradiol-17 β (E_2)는 어류의 생식에서 vitellogenin (Vtg)의 합성과 생식행동과 관련된 뇌의 신경분화 및 신경내분비 조절에 관여한다고 알려져 있다 (Beyer, 1999). 이러한 에스트로겐의 작용은 에스트로겐 수용체 (ER)에 의해 매개되므로 ER은 E_2 와 마찬가지로 여성 성적 발달과정에 매우 중요하다 (Cavaco 등 1998). 포유류에서는 서로 다른 유전자에 의해 만들어지는 두 종류의 ER subtypes인 ER α 와 ER β 가 분리되었으며 (Xu 등 2003; Lewandowski 등 2002), 이들 수용체는 조직특이적인 발현 양상을 보인다 (Choi 와 Habibi, 2003; Enmark 와 Gustafsson, 1999). 경골어류에서는 ER α 와 ER β 외에 ER β 2 (Tchoudakova 등 1999; Menuet 등 2002; Ma 등 2000) 또는 ER ν (Hawkins 등 2000)라는 제 3의 ER subtype도 분리된 바 있다. ER은 ligand-dependent transcription factor로서 E_2 -ER 복합체는 estrogen responsive element (ERE)에 결합하여 유전자 발현을 조절한다 (Yamamoto, 1985). ER 단백질은 총 6개의 도메인 (A~F)으로 구성되어 있다 (Krust 등 1986). N-말단 부분에 위치한 A/B 도메인은 hormone-independent transactivation function (AF1)을 가지며 (Evans, 1988), C 도메인은 ER isoform들 중에서 가장 잘 보존된 부분으로 두 개의 zinc finger motif를 갖는다 (Green 등 1986). C-말단에 위치한 E 도메인은 호르몬과 결합하며 hormone-dependent transactivation function (AF2) (Tora 등 1989; Berry 등 1990; Danielian 등 1992)과 hormone-dependent dimerization 기능을 수행한다 (Fawell 등 1990a; 1990b).

Steroidogenic 효소인 cytochrome P450 aromatase (CYP19)는 cytochrome P450 superfamily에 속하며, aromatase와 ubiquitous flavoprotein인 NADPH-dependent cytochrome P450 reductase로 구성된 aromatase 복합체에 의해 안드로젠에서 에스트로젠으로의 전환을 촉매한다 (Conley 등 2001;

Gelinas 등 1998). 어류에서는 *CYP19a* (ovary type)와 *CYP19b* (brain type)으로 불리는 두 종류의 aromatase 유전자에 의해 CYP19A1 (P450 aromatase A)와 CYP19A2 (P450 aromatase B) 단백질이 생성된다 (Blazquez 와 PiferrER, 2004; Chiang 등 2001b; Tchoudakova 와 Callard, 1998; Tchoudakova 등 2001). Ovary type aromatase는 생식 주기 및 vitellogenesis와 관련되며 (Nagahama 등 1994), brain type aromatase은 생식 주기와 관련된다는 보고가 있다 (Gelinas 등 1998). 척추동물에서 진화적으로 보존된 aromatase는 생식소와 뇌에서 그 기능을 수행한다 (Conley 등 2001; Callard 등 1978). 포유동물의 뇌에서 aromatase의 발현은 에스트로겐의 local generation에 영향을 미치기 때문에 성적 분화와 행동에 중요하다는 보고도 있다 (Lephart, 1996; Negri-Cesi, 1996).

한편, 대부분의 경골어류는 동적인 생식 활성을 갖는다. 특히, 놀래기류는 일주기 생식 리듬을 가지고 있다 (Matsuyama 등 1998; 2002). 이러한 일주기 생식리듬은 낮과 밤의 일교차, 달의 주기, 조수의 변화 등과 같은 환경적 요소에 영향을 받는다. 이 중에 조수의 변화는 자연현상으로 달의 인력에 영향을 받는다. 달의 인력으로 해수면의 높이가 하루에 두 번씩 변하게 되며, 조수의 변화는 해양 생물과 생태계에 영향을 주게 된다. 많은 해양 생물들은 특이적인 생식 타이밍을 갖지만, 현장에서 생식 타이밍을 조작하기가 매우 어렵기 때문에 직접적으로 연구되지 못했다. 복어 (*Takifugu niphobles*)는 보름달이나 초승달 뜰 무렵 저녁에 해수가 상승하는 동안 산란하며, 알의 생존은 산란의 타이밍과 관련되므로 어류에서는 산란이 조수의 주기와 연관이 있다고 알려져 있다 (Yamahira, 1993; 2001).

본 연구는 자성선속어인 놀래기류의 생식에서 *ER*과 aromatase의 역할을 구명하기 위한 기초연구로 수행되었다. 우선, 제주연안에 서식하는 황놀래기에서 *ER*과 aromatase cDNA를 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 그리고 오키나와 삼점놀래기에서 조수의 변화에 따른 *ER*과 *CYP19*의 발현양상과 산란과의 관계를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

*ER*과 *CYP19* subtypes를 클로닝하기 위하여 성숙한 암컷 황놀래기 (*Pseudolabrus japonicus*)를 2004년 9월경 제주연안에서 채집하였고, 얼음에서 마취 후 뇌와 생식소를 분리하여 RNA 추출 전까지 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 산란기 동안 조수의 변화에 따른 유전자발현을 조사하기 위해 2005년 7월, 일본 세소코섬 연안에서 삼점놀래기 (*Halichoeres trimaculatus*)를 간조, 간조-만조, 만조 그리고 만조-간조 시기에 채집하였다. 2-phenoxyethanol (300 ppm)로 마취한 후, 혈액, 뇌와 생식소를 적출하였다. 뇌는 전뇌, 중뇌 그리고 후뇌로 나누었다 (Fig. 1). 혈액은 헤파린 처리된 주사기를 사용하여 채혈하여 혈장을 분리하였다. 적출된 난소는 무게를 재고 GSI (Gonadosomatic Index)값을 측정하였다: $\text{GSI}=(\text{gonad weight}/\text{body weight})\times 100$. 적출된 시료는 RNA를 추출하기 전까지 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

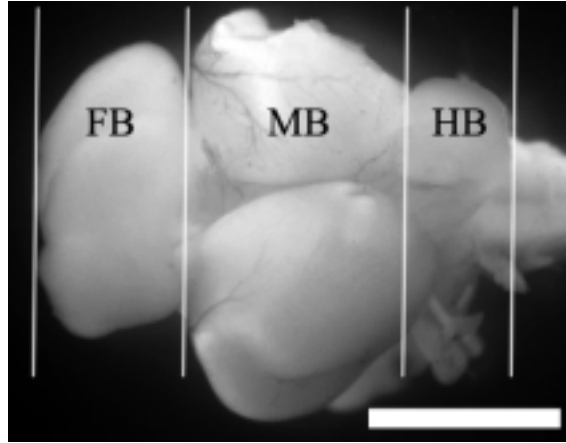


Figure 1. Dorsal view of a brain of *H. trimaculatus*. The brain of three-spot wrasse is divided into three parts: FB, forebrain; MB, midbrain; HB, hindbrain. Bar=3mm.

2. 조직학적 관찰과 난모세포의 난경 측정

조직학적 관찰을 위해 난소 조각을 Bouin 용액에 고정하여 에탄올로 탈수한 후 파라핀으로 포매하였다. 각 절편은 5 μm 두께로 절단하였고 Hematoxylin-Eosin으로 염색한 후 각 시기별 난모세포의 상태를 검경하였다. 난모세포의 성숙도는 측정하기 위해서 시기별로 관찰한 각 조직 절편 당 30개의 성숙한 난모세포를 무작위로 선택하여 성숙한 난모세포의 난경을 측정하였다. 각 난모세포의 직경은 수직을 이루는 두 방향으로 길이를 측정하고 그 평균값을 계산하여 생식소의 성숙도의 차이를 비교하였다.

3. 혈장 내 E₂ 농도 측정

혈장 내 E₂ 농도는 96-well microtiter plate (Falcon, USA)를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정하였다 (Takemura, 1993). 혈장 샘플은 1 ml의 메탄올로 1회, 1 ml의 증류수로 2회 추출하였고, 추출된 용액은 1.5 ml 튜브에 옮겨 원심분리하며 증발시켰다 (VEC-310, Japan). 그 후, 220 μl 의 50 mM borate buffer (pH 7.8, 0.5% BSA 포함)를 혼합하였다. 96-well plate는 100 μl (240 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 goat anti-rabbit IgG가 들어있는 50 mM carbonate buffer (pH 9.6)으로 코팅한 후 4 °C에서 overnight 보관하였다. 그 후, plate는 0.05 % Tween을 포함하는 10 mM phosphate buffer saline (PBS-T)로 plate washer (SLT, Austria)에서 3회 세척하였다. 분석은 40 μl 의 standard (12.8 to 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 plasma extract, 40 μl 의 HRP로 표지된 스테로이드 그리고 40 μl 의 스테로이드 호르몬을 첨가하여 4 °C에서 overnight동안 반응하였고, PBS-T로 3회 세척한 후, 각 well에 0.01 % o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma)를 포함하는 100 μl 의 100 mM citrate buffer (pH 4.5)와 0.04 % H₂O₂를 첨가하였다. 발색은 상온에서 20분간 진행하였고, 25 μl 의 4 N H₂SO₄를 각 well에

첨가하여 반응을 중단시켰다. 각 well의 흡광도는 microplate reader (BioRad, USA)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

4. RNA 분리

Total RNA는 TRI-reagent (Molecular Research Center, INC., Cincinnati, Ohio, USA)를 사용하여 분리하였다. 50~100 mg의 조직을 1 ml의 TRI-reagent에서 균질화한 후, 0.2 ml의 클로로포름을 첨가하여 상온에서 15분간 반응하고 4 °C에서 12,000 g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전시키고, 80 %의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 분리된 RNA는 260 nm 와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

5. cDNA 합성



cDNA는 1 μg 의 total RNA를 주형으로 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 합성하였다. Total RNA 1 μg 과 Oligo(dT) primer 1 μg 을 혼합하고 총 부피가 5 μl 가 되도록 증류수를 첨가하였다. cDNA 합성반응은 70 °C에서 5분간 반응시킨 후, 4 μl 의 5x Reaction buffer , 2 μl 의 25 mM MgCl₂ , 1 μl 의 10 mM dNTP Mix, 20 unit의 Ribonuclease inhibitor와 1 unit의 Revers transcriptase를 첨가하고, 총 부피가 20 μl 가 되도록 증류수를 첨가한 다음, 25 °C에서 5분 그리고 42 °C에서 60분간 반응시킨 후, 70 °C에서 15분간 가열하여 cDNA의 합성을 중단시켰다. 합성이 끝난 각 튜브에 80 μl 의 nuclease 가 없는 증류수를 첨가하여 최종부피를 100 μl 되게 희석하였다.

6. *ER*과 *CYP19* cDNA의 클로닝

ER α , *ER β* , *CYP19a* 그리고 *CYP19b*의 cDNA를 클로닝하기 위해서 놀래기 (*Halichoeres tenuispinis*)에서 보고된 염기서열을 참고로 *ER α* P1, *ER α* P2, *ER α* P3, *ER β* P1, *CYP19a* P1 그리고 *CYP19b* P1 primer 세트 (Table 1)를 디자인하여 이들 유전자 단편을 증폭하였다. 증폭산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 확인 후 정제하였고, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 클로닝 한 후 plasmid를 분리하여 염기서열을 결정하였다. 각 유전자의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST 검색을 이용하여 분석하였다 (Altschul 등 1990). *ER α* cDNA의 전체 염기서열은 *ER α* P1, *ER α* P2 그리고 *ER α* P3 primer로 증폭된 부분 서열들을 조합하여 결정하였다. *ER β* , *CYP19a* 그리고 *CYP19b*의 전체서열은 SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 결정하였다. 유전자 특이적인 primer 세트는 클로닝 된 부분 서열을 참고로 제작되었다 (Table 2). RACE 방법으로 증폭된 cDNA는 1 % agarose gel에 전기영동하여 확인 후 정제하였고, 정제된 cDNA는 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 클로닝 한 후 염기서열을 결정하였다.

Table 1. Primer sets used for partial cloning of *ER* and *CYP19* subtypes in *P. japonicus*.

Name	Primer sequence	Note
<i>ERa</i> P1	5'-TACTACTCTGCTGCTCTGGACACA-3'	forward primer for <i>ERa</i> cDNA fragment
	5'-TCAGCTGAAGAAAACCTGGAAG-3'	reverse primer for <i>ERa</i> cDNA fragment
<i>ERa</i> P2	5'-ATAGGGAGCTGGTCCACATGAT-3'	forward primer for <i>ERa</i> cDNA fragment
	5'-CATGAAGGAGAGTAGTGCAGAGG-3'	reverse primer for <i>ERa</i> cDNA fragment
<i>ERa</i> P3	5'-ATGTATCCCGAAGAGAGCCGA-3'	forward primer for <i>ERa</i> cDNA fragment
	5'-TTCTGTGCTCCCGGTCCTTA-3'	reverse primer for <i>ERa</i> cDNA fragment
<i>ERβ</i> P1	5'-CCATACACGGACAATAACCAAGAG-3'	forward primer for <i>ERβ</i> cDNA fragment
	5'-CTTCTGCTCCTCCATGAGGTAGAT-3'	reverse primer for <i>ERβ</i> cDNA fragment
<i>CYP19a</i> P1	5'-ACTGTGGTAGTATTGCAGGGAGTG-3'	forward primer for <i>CYP19a</i> cDNA fragment
	5'-ACACATACTGCCTCACGTTCTCTG-3'	reverse primer for <i>CYP19a</i> cDNA fragment
<i>CYP19b</i> P1	5'-GTATCGTCTGAAGTCACCGTCTTTC-3'	forward primer for <i>CYP19b</i> cDNA fragment
	5'-CCTAAGGACTGTGTTTCATCTCCTC-3'	reverse primer for <i>CYP19b</i> cDNA fragment

Table 2. Primer sets used for RACE of *ER* and *CYP19* subtypes in *P. japonicus*.

Name	Primer sequence	Note
<i>ERβ</i> GSP	5'-TGGCCATGGACCTCTGAGCTTCTAC-3'	gene specific primer for 5' RACE
	5'-CCTCTGAGCTCATGGTGGCTGCATT-3'	gene specific primer for 3' RACE
<i>ERβ</i> NGSP1	5'-GCATCAACGGCAGCAGCTCCATCAT-3'	nested primer for 5' RACE
	5'-CGGCAGGCTTGGCAGCTTTTACGTC-3'	nested primer for 3' RACE
<i>ERβ</i> NGSP2	5'-AAACCAGCTCCACGCCCGTCTACAG-3'	nested primer for 5' RACE
	5'-ATGCTGGTGAGCAGGGTCATCATGG -3'	nested primer for 3' RACE
<i>CYP19a</i> GSP	5'-TCAGCTGTGCACCACGTCCTGAAG-3'	gene specific primer for 5' RACE
	5'-AATGGCTGGGAGTAGCGACGAGGAG-3'	gene specific primer for 3' RACE
<i>CYP19a</i> NGSP1	5'-CCTGCAGCAGACAGTGGAGGTTTG-3'	nested primer for 5' RACE
	5'-GTGAAGTCCACCACAGGATGGAAGC-3'	nested primer for 3' RACE
<i>CYP19a</i> NGSP2	5'-GAGGCACAAGACAGCAACCCAGGAG-3'	nested primer for 5' RACE
	5'-CAGACAGCTCACCATGGCTCTGTGC-3'	nested primer for 3' RACE
<i>CYP19b</i> GSP1	5'-GCCTCCAGAGGACAGTGGGAATCTG-3'	gene specific primer for 5' RACE
	5'-CAGCCTTGGCGAGGACACACAGT-3'	gene specific primer for 3' RACE
<i>CYP19b</i> NGSP1	5'-CCAAGAGCTGCAGGACGTGATGG-3'	nested primer for 5' RACE
	5'-GCCGAAGGGCTGGAAGAAACGAC-3'	nested primer for 3' RACE
<i>CYP19b</i> NGSP2	5'-GATCGCAGCTCCTGACACACTCTCC-3'	nested primer for 5' RACE
	5'-CTTCCAGAGCTTTGCGCATGGTG-3'	nested primer for 3' RACE

7. 염기서열 분석

*ER*과 *CYP19* subtypes의 cDNA 염기서열은 BLASTN과 BLASTX (National Center for Biotechnology Information, NIH, USA)를 이용하여 분석하였다. 염기서열의 배열분석(alignment)은 CLUSTALW (Thompson 등 1994)를 사용하였고, bootstrap 분석은 PHYLIP의 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 100번 반복으로 수행하였고, consensus tree는 PHYLIP의 CONSENSE 프로그램을 이용하여 작성하였다. 각 유전자의 multiple sequence alignment에 이용된 종과 유전자는 다음과 같다. (1) *ER α* : black porgy (bp*ER α* ; Huang 등 2002), channel catfish (cc*ER α* ; Xia, 1999), eelpout (ep*ER α* ; accession number, AY223902), gilthead seabream (gs*ER α* ; Munoz-Cueto 등 1999), goldfish (gf*ER α* ; accession number, AY055725), olive flounder (jf*ER α* ; accession number, AB070629), mouse (m*ER α* ; accession number, M38651), Nile tilapia (t*ER α* ; Chang 등 1999), North African catfish (ac*ER α* ; accession number, X84743), rat (r*ER α* ; accession number, NM012689), rainbow trout (rt*ER α* ; Pakdel 등 2000), red sea bream (rs*ER α* ; Touhata 등 1999), zebrafish (zf*ER α* ; accession number, AB037185), Jeju wrasse (jw*ER α* ; accession number, AY305026). (2) *ER β* : black porgy (bp*ER β* ; accession number, AY074779), common carp (c*ER β* ; accession number, AB083064), gilthead seabream (gs*ER β* ; accession number, AF136980), goldfish (gf*ER β* ; Ma 등 2000), olive flounder (jf*ER β* ; accession number, AB070630), rainbow trout (rt*ER β* ; accession number, AJ289883), zebrafish (zf*ER β* ; accession number, AJ414567), Atlantic croaker (ac*ER β* ; Hawkins 등 2000), channel catfish (cc*ER β* ; Xia 등 2000), spiny dogfish (df*ER β* ; accession number, AF147746), goldfish (gf*ER β* ; Tchoudakova 등 1999), Japanese eel (je*ER β* ; Todo 등 1996), medaka (jm*ER β* ; accession number, AB070901), Nile tilapia (t*ER β* ; Chang 등

1999), zebrafish (*zfERβ*; accession number, AF349413), mouse (*mERβ*; Tremblay 등, 1997), rat (*rERβ*; accession number, AJ002602), human (*hERβ*; accession number, AB006590), and human PR (*hPR*; accession number, NM_000926), Jeju wrasse (*jwERβ*; accession number, AY305027). (3) *CYP19a*: Nile tilapia *CYP19a* (*ntCYP19a*; accession number, AF472620), goldfish (*gfCYP19a*; accession number, AB009336), zebrafish (*zfCYP19a*; accession number, AF004521), gilthead seabream (*gbCYP19a*; accession number, AF399824), Japanese flounder (*jfCYP19a*; accession number, AB017182), red seabream (*rbCYP19a*; accession number, AB051290), medaka (*mCYP19a*; accession number, D82968). Jeju wrasse (*jwCYP19a*; accession number, AY489061) (4) *CYP19b*: Nile tilapia (*ntCYP19b*; accession number, AF306786), Mozambique tilapia (*mtCYP19b*; accession number, AF135850), goldfish (*gfCYP19b*; accession number, AB009335), zebrafish (*zfCYP19b*; accession number, AF226619), channel catfish (*ccCYP19b*; AF417239), Japanese medaka (*jmCYP19b*; accession number, AY319970), Jeju wrasse (*jwCYP19b*; accession number, AY489060).

8. Real-time RT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석

삼점놀래기에서 *ERα*, *ERβ*, *CYP19a* 그리고 *CYP19b*의 유전자 발현을 real-time RT-PCR 방법으로 분석하기 위하여 우선 이들 유전자 단편을 PCR로 증폭하여 클로닝하였다. PCR은 놀래기의 각 유전자 서열을 기초로 디자인된 *ERα* P4, *ERβ* P2, *CYP19a* P2, and *CYP19b* P2 primer 세트 (Table 3)를 이용하여 수행하였다. 삼점놀래기의 각 유전자 단편의 염기서열은 NCBI의 BLAST 분석 (Altschul 등 1990)으로 확인하여 이들 염기서열로부터 PrimerExpress V 2.0 software (ABI)을 이용하여 각 유전자의 real-time PCR 분석에 사용된 primer를 준비하였다 (Table 4). 각 primer는 증폭산물의

길이가 100~200 bp 되도록, Tm 값은 57~60 °C로 되도록 고안하였다. *ER*과 *CYP19* 그리고 β -*actin*을 암호화한 서열을 포함한 plasmid는 10배씩 희석하여 standard curve를 작성하는 데 이용하였다. Real-time PCR 분석은 ABI Prism 7000 cycler (ABI)와 SYBR Green premix PCR kit (Takara, Tokyo, Japan)을 이용하여 수행하였다. 50 %의 SYBR Premix EX Taq, 0.2 μ M의 forward와 reverse primer 그리고 2 μ l의 cDNA 주형을 포함하는 각 PCR 반응액을 1분간 denaturation 시킨 후 95 °C에서 5초, 60 °C에서 1분간 annealing과 extension을 하였다. PCR 증폭의 특이성을 확실히 하기 위해 PCR 반응의 마지막 단계에 dissociation curve 분석을 수행하였다. 각 유전자의 발현 정도는 β -*actin*의 발현 수준과의 비율로 계산하였다.



Table 3. Primer sets used for partial cloning of *ER* and *CYP19* subtypes in *H. trimaculatus*.

Name	Primer sequence	Note
<i>ERα</i> P4	5'-TGCAGTGA CTATGCCTCTGG-3'	forward primer for <i>ERα</i> cDNA fragment
	5'-ATCAGAACCTCAAGCCAGGA-3'	reverse primer for <i>ERα</i> cDNA fragment
<i>ERβ</i> P2	5'-TCTACATCCCCTCGCCATAC-3'	forward primer for <i>ERβ</i> cDNA fragment
	5'-CTTTTACGCCGTTCTTGTC-3'	reverse primer for <i>ERβ</i> cDNA fragment
<i>CYP19a</i> P2	5'-AGGCAGTATGTGTTGGAGATGG-3'	forward primer for <i>CYP19a</i> cDNA fragment
	5'-ACCAGGATGGATTTCTCATCA-3'	reverse primer for <i>CYP19a</i> cDNA fragment
<i>CYP19b</i> P2	5'-GACATGTGGATGCCCTAAATCT-3'	forward primer for <i>CYP19b</i> cDNA fragment
	5'-AAAGGCTGGAAGAAGCGACT-3'	reverse primer for <i>CYP19b</i> cDNA fragment

Table 4. Primer sets used for quantitative real-time PCR.

Name	Forward primer	Note
β -actin RT	5'-TACCACCATGTACCCTGGCATC-3' 5'-TACGCTCAGGTGGAGCAATGA-3'	forward primer for β -actin cDNA fragment reverse primer for β -actin cDNA fragment
ER α RT	5'-TCGTCGCCTCAGGAAGTGTTA-3' 5'-TCGTACAAGTCCGCCTTTTGT-3'	forward primer for ER α cDNA fragment reverse primer for ER α cDNA fragment
ER β RT	5'-AGTCCAAACCCAACAGCATCAG-3' 5'-ACCACAGAAGAGCACAAACGAGG-3'	forward primer for ER β cDNA fragment reverse primer for ER β cDNA fragment
CYP19a RT	5'-TTCTGAACACAGGCCACATGC-3' 5'-AAACGGCTGGAAGTAACGACG-3'	forward primer for CYP19a cDNA fragment reverse primer for CYP19a cDNA fragment
CYP19b RT	5'-TGAAACATGGCAGACGGTTCT-3' 5'-ATCACGTCTTGCAGCTCTTGG-3'	forward primer for CYP19b cDNA fragment reverse primer for CYP19b cDNA fragment

9. 통계분석

모든 그래프의 오차는 표준오차로 계산하여 표현되었다. 조수의 변화 동안 *ER*과 *CYP19*의 발현 패턴, 혈장 내 E_2 농도 그리고 난경의 길이 간의 차이는 윈도우 프로그램인 SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA)를 사용하여 LSD-Duncan 테스트에 의해 one-way analysis of variance (ANOVA)로 결정하였다.



결 과

1. 황놀래기의 *ER*과 *CYP19* cDNAs의 클로닝과 염기서열 분석

1) *ER α* 와 *ER β*

황놀래기 난소의 cDNA를 주형으로 두 종류의 *ER* subtype cDNA를 PCR과 RACE 방법으로 클로닝 하였다. *ER α* mRNA의 ORF 길이는 1581 bp (526 아미노산)이며 *ER β* mRNA의 ORF 길이는 2037 bp (679 아미노산)이었다 (Fig. 2와 Fig. 3). 황놀래기의 *ER* subtype cDNA를 다른 종에서 보고된 *ER* subtypes과 아미노산 서열을 비교 분석한 결과, 황놀래기의 *ER* subtypes은 놀래기 (*H. tenuispinis*)의 *ER* subtypes와 가장 유사하였다 (*ER α* 88 %, *ER β* 84 %; Table 5와 6). 여러 종에서 비교된 *ER α* 의 아미노산 서열중에서 C 도메인내의 서열은 94~100 %, E 도메인의 서열은 68~98 % 유사하였다. 비교된 종간에서 *ER β* 의 C 와 E 도메인내의 아미노산 서열은 각각 68~98 %와 68~98 %의 유사성을 보였다. 조사된 모든 종에서 *ER α* 와 *ER β* 의 C 도메인은 모두 76개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 그리고 E 도메인의 경우는 *ER α* 에서는 모든 종이 동일하게 194개의 아미노산으로 이루어져 있었고, *ER β* 에서는 194~6개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 황놀래기 *ER α* 와 *ER β* 사이의 아미노산 서열을 서로 비교했을 때, A/B 도메인에서 F 도메인까지의 각각 7 %, 89 %, 18 %, 58 % 그리고 17 % 유사성을 나타내었다 (Fig. 4). 여러 종들의 *ER* subtypes 간의 계통유연관계를 분석한 결과, 본 연구에서 클로닝된 황놀래기 *ER α* 와 *ER β* 는 놀래기에서 보고된 *ER α* , *ER β* 와 가장 가까운 유연관계를 나타내었다 (Fig. 5).

ATGTATCCCGAAGAGAGCCGAGGAGCCAGAGTCTGTACCATGGCTGCTGCACGGGAGGAA 60
 M Y P E E S R G A R V C T M A A A R E E 20
 GGAGAGGTTCTGCACAGTAAAACGAGGCACCACCACGACGGAGCTGGAAGTGTAACAGC 120
 G E V L H S K T R H H H D G A G S V N S 40
 TCAGAGGGCTCCACGCCCGTCTACAGGTCCAGCGTCTCGTCCAGTCAGCAGAGCATTTC 180
 S E G S T P V Y R S S V S S S Q Q S I S 60
 AGAGAGGAGCACTGTGGCACCAGTGACGAGTCTTACAGCATGGGGGAGTCAGGGGCCGGA 240
 R E E H C G T S D E S Y S M G E S G A G 80
 GCTGCAGCCGGCTGCTTTGAGATGGCAAAGAGATGCGTTACTGTGCGGTGTGCAGTGAC 300
 A A A G C F E M A K E M R Y I A I V I S D 100
 TATGCCTCTGGGTACCACTATGGGGTGTGGTCTGTGAGGGCTGCAAGCCTTCTTTAAG 360
 Y I A S G Y H Y G I W S I E G I K A F F K 120
 AGGAGCATCCAGGGTCACAATGACTATATGTGCCCTGCAACCAATCAGTGCACGATCGAC 420
 R S I Q G H N D Y M I P A T W Q I T I D 140
 AGGAATCGCAGGAAGAGTTGCCAGGCTTGTGCGCTCAGGAAGTGTACGAAGTGGGCATG 480
 R N R R K S I Q A I R L R K C Y E I V G M 160
 ATGAAGGGAGGTGTGCGTAAGGACAGGGGGCGTGTTTTTCGGCGTGACAAAAGGCGCACT 540
 M K G G I V R K D R G R V L R R D K R R T 180
 GGTACAAGTGATAAGGATAAGGGCTCTAAGGACCGGGAGCACAGAACAGTGCCACCTCAG 600
 G T S D K D K G S K D R E H R T V P P Q 200
 GGCAGGAGGAAACACGGCAGCAGTGTGGAGGAGGAAAATCACCAGTGATCAGCATGCCT 660
 G R R K H G S S V G G G K S P V I S M P 220
 CCTGATCAGGTGCTCCTCCTGCTCCAGGGTGCAGAACCTCCCATCTTGTGCTCCCCTCAG 720
 P D Q V L L L L Q G A E P P I L C S R Q 240
 AAAGTGAAGGAGCCCTACGCCGAGGTACCATGATGACCTGCTCACCAGCATGGCCGAT 780
 K L S R P Y A E V T M M T L L T S M A D 260
 AGGGAGTGGTCCACATGATCGCTGGGCAAGAAGCTTCCAGGTTTCTGCAGCTGACC 840
 R E L V H M I A W A K K L P G F L Q L T 280
 CTCCATGACCAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCTCCTGGCTTGAGGTTCTGATGATTGGTCTC 900
 L H D Q V Q L L E S S W L E V L M I G L 300
 ATCTGGAGGTCCATCCACTGCCCTGGGAACTCATCTTTGCTCAGGACCTCATACTGGAC 960
 I W R S I H C P G K L I F A Q D L I L D 320
 CGAAGTGAAGGTGACTGCGTGGAGGGCATGGCAGAGATCTTCGACATGCTTTTGTCCACC 1020
 R S E G D C V E G M A E I F D M L L S T 340
 GCTTCCCCTTCCGCATGCTTAAACTCAAACCTGAGGAGTTCGTCTGTCTCAAAGCGATC 1080
 A S R F R M L K L K P E E F V C L K A I 360
 ATCCTGCTCAACTCTGGTGCCTTTTCTTCTGCACCGGCACAATGGAGCCGCTCCACGAC 1140
 I L L N S G A F S F C T G T M E P L H D 380
 AGCGCGCCGTGCAGAATATGCTCGACATTATCACAGACGCTCTCATCCATCAGATCAGC 1200
 S A A V Q N M L D I I T D A L I H H I S 400
 CAATCAGGTTGCTCGGTTACCAGCAATCAAGGCGACAGGCCAGCTGCTCCTCCTGCTC 1260
 Q S G C S V H Q Q S R R Q A Q L L L L L 420
 TCCCACATCAGGCACATGAGCAACAAAGGCATGGAGCACCTCTACAGCATGAAGTGTAAAG 1320
 S H I R H M S N K G M E H L Y S M K C K 440
 AACAGGTTCTCTGTACGACCTGCTACTCGAGATGCTGGACGCTCACCCTCCACCCTC 1380
 N K V P L Y D L L L E M L D A H R L H R 460
 CCGGACAGACCTGCAGAGTCCCTGGTCCCAGACTGACGGAGAGCCCGCATACATCACCAAC 1440
 P D R P A E S W S Q T D G E P A Y I T N 480
 ACAAACCAACAACAGCAGCAGCAGCTCCACCTCAGCTGGGGCCAGAGTCAGCCTC 1500

T N T N N S S S S S S T S A G P R V S L	500
GAGAGCCCCAACAAAACCCCATAGGTCAGGGGGTCCTGCAGTATGGAGGGTCCCGCCCT	1560
E S P N K T P I G Q G V L Q Y G G S R P	520
GACTGCACTCACATCCTATGA	1581
D C T H I L *	526

Figure 2. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *ERα* of *P. japonicus*. 1581 bp encodes a protein of 526 amino acids. The conserved C-domain is marked by gray box, and E-domain regions are represented by underlines. The eight cysteine residues in the zinc finger motifs are boxed. Bold and italicized in the C-domain are P- and D-box. The AF2 region is italicized in E-domain. termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for *ERα* were submitted to the GenBank with accession number DQ298133.



ATGGCCTCTCCCCGGGCTGGACTCCGACTCTTTACCGCTGCTTCAGCTCCAGGAGGTG 60
 M A S S P G L D S D S L P L L Q L Q E V 20
 GACTCCAGCAAAGTCTCCGAGAGGCCCGGCTCCCCAAGTCTCCTGCCCGCCGTGTACACC 120
 D S S K V S E R P G S P S L L P A V Y T 40
 CCTCCTCGGAGCATGGACAGCCACACCGTCTACATCCCCTCGCCATACACGGACAATAAC 180
 P P R S M D S H T V Y I P S P Y T D N N 60
 CAAGAGTACAACCATGGCCATGGACCTCTGAGCTTCTACAGCCCCTGTGTGCTGAGCTAC 240
 Q E Y N H G H G P L S F Y S P S V L S Y 80
 GCCCGACCGTGGCCACAGACAGCCCCTCATCTGTGCGCCCCCTTAGTCCGTGAGCC 300
 A R P S A T D S P S S L C A P L S P S A 100
 TTCTGGCCCCCACAGTCACCCCAACCTGCCCTCACTGACCCCTGCGTGTCCACAGCCT 360
 F W P P H S H P N L P S L T L R C P Q P 120
 CTTGGCTACAATGAACCCGGCTTACATGCACCCCTGGCTGGAGGCCAAACAACACAGCATC 420
 L G Y N E P G L H A P W L E A K Q H S I 140
 AACGGCAGCAGCTCCATCATCAGCTGTAACAAGCCGCTGGGAAGAGATCAGAAGAAGGA 480
 N G S S I I S C N K P P G K R S E E G 160
 CTGGATGGTGTGAACCCCTCGTTGTTCGTCTGCAAGTAGGAAAGCTGCCATGCACTTC 540
 L D G V N P S L C S S A V G K A A M H F 180
 TGCGCCGTGTGTACGACTACGCTTCCGGGTACCACTACGGCGTGTGGTCTCGCAGGGC 600
 I A I V I H I D I Y I A I S I G I Y I H I Y I G I V I W I S I I E I G 200
 TGTAAGCCTTTTTCAAGAGGAGTATCCATGGACACAATGACTACATCTGTCTGCCACA 660
 I K I A I F I F I K I R I S I I I H I G I H I N I D I Y I I I I P I A I T 220
 AATCAATGCACTATCGACAAGAACCCGGCGTAAAAGCTGCCAAGCCTGCCGCTCCGTAAA 720
 I W I Q I I T I I I D I K I N I R I R I K I S I I I O I A I I R I L I R I K 240
 TGCTACGAAGTGGGCATGATGAAATGTGGTGTAAAGGCGGAACGCTGCAGCTATCGAGGA 780
 I C I Y I E I V I G I M I M I K I C I G I V I R I R I E I R I C I S I Y I R I G 260
 ACCCGACACCCCGCTGGTGGACCCAGCCTCGGGATCCCACAGGCAGGGGTTTGGTCAGG 840
 T R H R R G G P Q P R D P T G R G L R 280
 GTGGGGCTGGTTCTCGAGCTCAACGGCATCTCCAACCTGGAGGGGCCCTCGCCCCGGT 900
 V G L G S R A Q R H L Q P G G A P R P G 300
 CACCCCTCCCTCAGATGAACCATGTACACAATGCAGCCACCATGAGCTCAGAGGAATT 960
 H P P P S D E P C T Q C S H H E L R G I 320
 CATCTACGCATCATGGAAGCAGAGCCACCGGAGATCTACCTCATGGAGGAACTGAAGAA 1020
 H L T H H G S R A T G D L P H G G T E E 340
 GCCTTACTGAGGCGAGCATGATGATGTCCCTACCAACCTGGCAGACAAGGAACTGGTT 1080
 A F T E A S M M M S L T N L A D K E L V 360
 CTCATGATCAGCTGGGCTAAAAAGATCCCTGGCTTTGTAGAGCTGAGTCTCACTGATCAG 1140
 L M I S W A K K I P G F V E L S L T D Q 380
 ATTCACCTCCTGAAGTGTCTGCTGGTTGGAAATCCTGATGTTGGCCCTGATGTGGAGGTCT 1200
 I H L L K C C W L E I L M L G L M W R S 400
 GTGGATCATCTGGAAAATAATCTTCTCTCCAGACTTCAAACCTCAACAGGGAGGAGGGC 1260
 V D H P G K L I F S P D F K L N R E E G 420
 CAGTGTGTGGAGGGCATCATGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCCGCCACCTCTCGGTTT 1320
 Q C V E G I M E I F D M L L A A T S R F 440
 CGTGAGCTGAAGCTGCAGAGGGAGGAGTACGTCTGTCTCAAGGCCATGATCCTCCTCAAC 1380
 R E L K L Q R E E Y V C L K A M I L L N 460
 TCCAATCTGTGTACGAGTTCCTCCCTCAGACAGACGAGGAGCTGGAGAGCAGGAACAAGCTG 1440
 S N L C T S S P Q T D E E L E S R N K L 480
 CTCCGTCTGCTGGACTCGGTGATCGATGCTCTTGTCTGGGCCATTTCCAAACTGGGCTTG 1500

```

L R L L D S V I D A L V W A I S K L G L      500
TCGACCCAGCAGCAGACTCTGCGCCTCGGACACCTCACCATGCTGCTCTCCCACATCCGC 1560
S T Q Q Q T L R L G H L T M L L S H I R      520
CACGTCAGTAACAAAGGCATGGACCATCTGTCCACCATGAAGAGGAAGAACGTGGTGCTG 1620
H V S N K G M D H L S T M K R K N V V L      540
GTGTACGACCTCCTCCTAGAGATGCTAGACGCCAACACTTCAGGCAGCAGCAGCAGCAGC 1680
V Y D L L L E M L D A N T S G S S S S S      560
AGCCAATCATCGTCCCTACCAAGCTCGGACACGTAICTAGACCAGCAGCAGTTCCCCCAA 1740
S Q S S S S P S S D T Y S D Q Q Q F P Q      580
CATCAGTCTCACCTGCAGCCGACCTCAGACCAGACCACAGCCGACCACGACAACGTGCCT 1800
H Q S H L Q P T S D Q T T A D H D N V P      600
GCACAGGGGTCTGCTGAAGGCCAGATCCTGGACGAACAGCTGCATGCTCTGCCCTCCAA 1860
A Q G S A E G Q I L D E Q L H A L P L Q      620
TCATCTCCTCCGTTTCACAGTCAGATGGTCCGCTGCCACATGGACAGAAATGATTACATC 1920
S S P P F H S Q M V G C H M D R N D Y I      640
CATCAGCAGCACTGGTCAATGGATACAGAGGATGCAGGTCCATCAGTGGGACCAACGCAC 1980
H Q Q H W S M D T E D A G P S V G P T H      660
TACATCATCCCTGATCGAGGCGTCATGGACACTGCTTTGGAGGTGACTGGACTGTAA    2037
Y I I P D R G V M D T A L E V T G L *      678

```

Figure 3. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *ERβ* of *P. japonicus*. 2037 bp encodes a protein of 678 amino acids. The conserved C-domain is marked by gray box, and E-domain regions are represented by underlines. The eight cysteine residues in the zinc finger motifs are boxed. Bold and italicized in the C-domain are P- and D-box. The AF2 region is italicized in E-domain. termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for *ERβ* were submitted to the GenBank with accession number DQ298134.

Table 5. Comparison of amino acid identities between *P. japonicus* ERa and other species' ERas. Overall amino acid identities are indicated in percentages. The total number of amino acids are indicate in brackets. Sequence reference and abbreviations were represented in material and methods section.

Species /domain	Overall	A/B	C	D	E	F
bwERa	100(526)	100(92)	100(76)	100(91)	100(194)	100(73)
bpERa	78(583)	51(142)	98(76)	82(94)	93(194)	45(77)
ccERa	69(581)	23(148)	94(76)	45(95)	84(194)	22(68)
epERa	78(570)	49(140)	98(76)	79(92)	93(194)	62(66)
gsERa	75(579)	50(140)	98(76)	83(94)	96(194)	39(75)
gfERa	60(564)	20(152)	94(76)	57(93)	81(194)	16(49)
jfERa	77(578)	47(138)	98(76)	73(91)	92(194)	63(79)
mERa	48(599)	7(186)	96(76)	23(92)	67(194)	19(51)
tERa	74(585)	45(136)	96(76)	68(94)	91(194)	49(85)
acERa	56(566)	29(189)	96(76)	42(93)	82(194)	41(12)
rERa	48(600)	9(187)	96(76)	23(92)	67(194)	19(51)
rtERa	68(577)	37(145)	94(76)	65(97)	88(194)	32(65)
rsERa	80(581)	53(142)	97(76)	84(92)	95(194)	57(75)
jwERa	88(574)	67(141)	100(76)	95(91)	97(194)	70(72)
zfERa	61(569)	18(149)	96(76)	53(93)	83(194)	19(57)
hERa	47(595)	7(182)	96(76)	27(92)	67(194)	19(51)

Table 6. Comparison of amino acid identities between *P. japonicus* *ERβ* and other species' *ERβ*s. Overall amino acid identities are indicated in percentages. The total number of amino acids are indicate in brackets. Sequence reference and abbreviations were represented in material and methods section.

Species /domain	Overall	A/B	C	D	E	F
bw <i>ERβ</i>	100(678)	100(178)	100(76)	100(100)	100(195)	100(129)
gf <i>ERβ</i> 2	55(610)	36(168)	97(76)	32(96)	83(196)	9(75)
ac <i>ERβ</i>	78(673)	74(179)	98(76)	56(99)	96(195)	58(124)
cc <i>ERβ</i>	54(575)	30(157)	68(76)	10(73)	79(195)	23(52)
gf <i>ERβ</i>	52(568)	28(167)	92(76)	12(86)	78(196)	4(43)
t <i>ERβ</i>	53(557)	33(152)	93(76)	23(82)	76(195)	19(52)
bp <i>ERβ</i>	53(553)	30(153)	90(76)	22(76)	77(195)	11(53)
c <i>ERβ</i>	55(550)	31(158)	92(76)	12(86)	79(195)	20(44)
gs <i>ERβ</i>	53(559)	30(153)	90(76)	20(82)	78(195)	9(53)
jf <i>ERβ</i>	53(565)	35(159)	92(76)	10(82)	78(195)	11(53)
rt <i>ERβ</i>	52(568)	25(175)	93(76)	20(87)	78(195)	17(35)
zf <i>ERβ</i> 2	55(553)	27(156)	93(76)	27(87)	78(195)	23(39)
df <i>ERβ</i>	51(542)	22(166)	89(76)	29(91)	68(194)	20(25)
jm <i>ERβ</i>	54(562)	30(154)	93(76)	28(82)	76(195)	14(55)
zf <i>ERβ</i>	59(592)	41(162)	92(76)	30(99)	98(195)	70(123)
jw <i>ERβ</i>	84(671)	84(178)	98(76)	55(99)	84(195)	17(63)

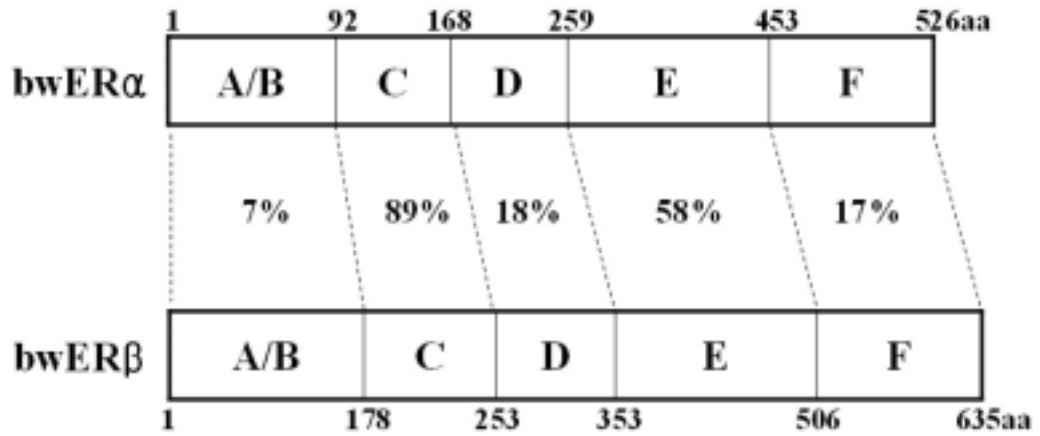


Figure 4. Comparison of the functional domains between wrasse *ER α* and *ER β* . The functional A to F domains are presented schematically with the numbers of amino acid residues indicated. The percentage of amino acid identity of depicted.

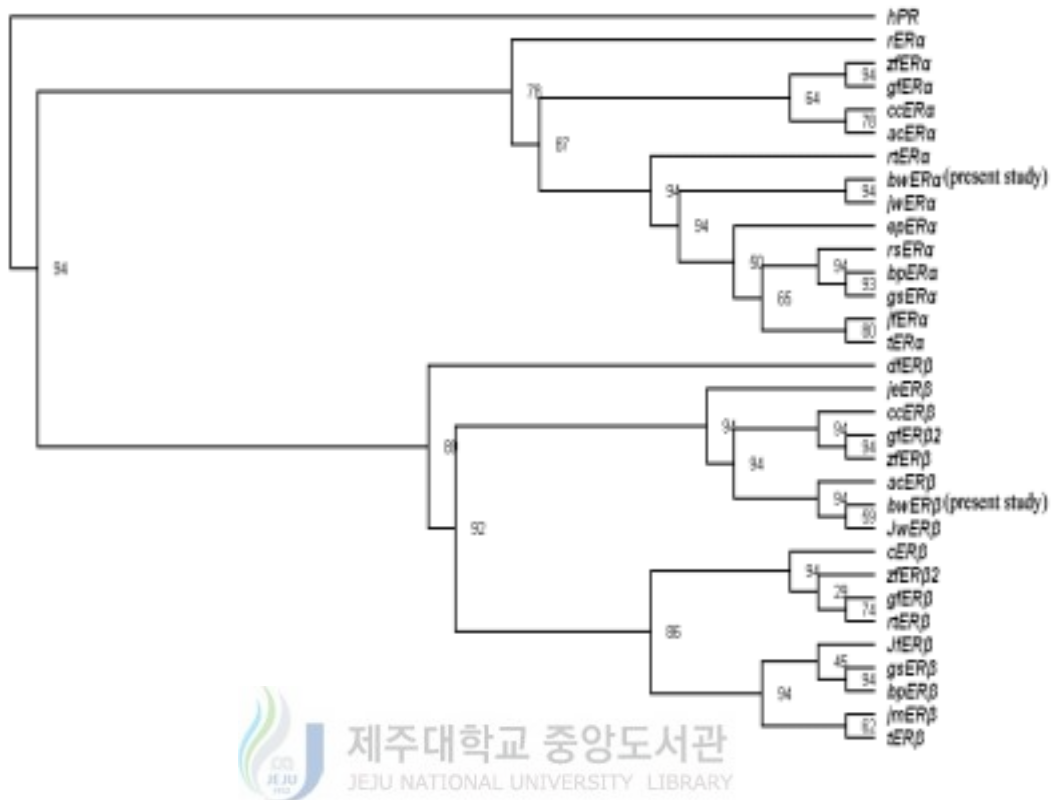


Figure 5. Phylogenetic analysis of the relationships between wrasse *ER* subtypes with other species' *ER* subtypes. A consensus tree obtains with combined values both *ER* subtypes. A consensus tree is based on the values obtained by bootstrap resampling. Bootstrap values (100 replicates) are shown on the consensus tree above the nodes. Human progesterone receptor was used as outgroup. Sequence reference and abbreviations were represented in material and methods section.

2) *CYP19a* and *CYP19b*

황놀래기의 난소와 뇌에서 분리된 total RNA를 사용하여 RACE 방법으로 *CYP19a*와 *CYP19b* cDNAs를 클로닝하였다. 암호화 부위의 염기서열 분석 결과, *CYP19a* mRNA의 ORF의 길이는 1569 bp (522 아미노산)이고, *CYP19b* mRNA ORF의 길이는 1485 bp (494 아미노산)이었다 (Fig. 6과 Fig. 7). 황놀래기의 *CYP19a* 와 *CYP19b*의 아미노산 서열을 다른 종에서 보고된 *CYP19s*과 비교한 결과, 황놀래기의 *CYP19s*은 놀래기 (*H. tenuispinis*)에서 보고된 *CYP19s*과 가장 유사하였다 (*CYP19a* 90 %, *CYP19b* 90 %; Table 7). 황놀래기의 *CYP19a*와 *CYP19b*의 아미노산 전체 서열을 서로 비교 분석한 결과, 63 % homology를 가지고 있었다. *CYP19s* 유전자의 보존된 영역으로 알려진 membrane-spanning region, I-helix region, Ozol's peptide region, aromatic region 그리고 heme-binding region의 아미노산 서열은 비교된 종간에 매우 높은 homology를 보여주었다 (Fig. 8과 9). 여러 종들의 *CYP19s* 간의 계통유연관계를 분석한 결과, 황놀래기 *CYP19s*는 놀래기의 *CYP19s*과 가장 가까운 유연관계를 나타내었다 (Fig. 10).

ATGGATCTGATCTCTGCTTGTGAACGGACCATGAGTCCTATAGGTTTGGATGCTGAGGTG	60
M D L I S A C E R T M S P I G L D A E V	20
AGAGACCTGGTCTACATGTCCCAGAATGCAACTGTGGTGGGATTGCTGGGAGTGTCAATG	120
R D L V Y M S Q N A T V V G L L G V S M	40
GCTACCAGGACCCTGGTTCGCTTTTTTTTTGTGCTGCTTGCAGCATGGAACCACAAGGAC	180
A T R T L V P L F F V L L A A W N H K D	60
AAGAAGTCTGTACCAGGCCCGTCTTTCTGTCTGGGTTTGGGTCCACTTCTATCATATTTA	240
K K S V P G P S F C L G L G P L L S Y L	80
AGATTTATCTGGACTGGTATTGGTACAGCATCTAACTACTACAGCACCAAGTATGGAGAC	300
R F I W T G I G T A S N Y Y S T K Y G D	100
ATTGTCAGAGTCTGGATCAATGTTTGGATCTACGGAGAGGAGACGCTCATACTCAGCAGG	360
I V R V W I N V W I Y G E E T L I L S R	120
TCATCAGCTGTGCACCACGTCTTGAAGAGTGGCCACTACACTTCACGTTTTTGAAGCAAG	420
S S A V H H V L K S G H Y T S R F G S K	140
CAAGGCCTCAGCTGCATCGGCATGAATGAAAGAGGGATCATATTTAACAACAATGTACCT	480
Q G L S C I G M N E R G I I F N N N V P	160
CTGTGGAAAAAGATTGCGACCTACTTCACTAAAGCGCTGACAGGTCCGGCCCTGCAGCAG	540
L W K K I R T Y F T K A L T G P G L Q Q	180
ACAGTGGAGGTTTGTGTCTCATCCACTCAGAGTCACTAGATGATCTGGACAGTTTGGAT	600
T V E V C V S S T Q S H L D D L D S L D	200
GATGTGGACGTGATCAGTTTGTGCTGCGTTGCACCSTGGTGGATATCTCCAACAGACTCTTT	660
D V D V I S L L R C T V V D I S N R L F	220
CTGGATGTTCTGTGAATGAGAAAGAGCTGATGGTGAAGATTGAGAAGTATTTTGACACA	720
L D V P V N E K E L M V K I Q K Y F D T	240
TGGCAGACAGTGTCTCATCAAACCAGACATTTACTTCAAGTTAGACTGGATTCAACAGAGG	780
W Q T V L I K P D I Y F K L D W I H Q R	260
CACAAGACAGCAACCCAGGAGCTGCAAGATGCCATAGAGAGCCTTGTGGAGCAGAAGAGG	840
H K T A T Q E L Q D A I E S L V E Q K R	280
AGAGAAGTGGAGCAGGCAGAGAGACTAGACAACATCAACTTCACAGCTGAGCTCATCTTT	900
R E V E Q A E R L D N I N F T A E L I F	300
GCACAGAGCCATGGTGTGAGCTGTCTGCAGAGAATGTGAGGCAGTGTGTGTTGGAGATGGT	960
A Q S H G E L S A E N V R Q C V L E M V	320
ATCGCAGCACCTGACACTCTGTCCATCAGCCTTTTCTTCATGCTGCTGCTCCTCAAACAA	1020
I A A P D T L S I S L F F M L L L L K Q	340
CATCCTGATGTGGAGCTGCAGCTGCTGCAGGAGATGGACACTGTTGTTGGTGAAGGACAG	1080
H P D V E L Q L L Q E M D T V V G E G Q	360
CTTCAGAACGGAAACCTTCAGAAGTTGCCATTGTTGGAGAGCTTCATCAACGAATGCTTA	1140
L Q N G N L Q K L P L L E S F I N E C L	380
CGCTCCATCCTGTGGTGGACTTCACCATGCGTTCGCGCCTTGTCCGATGACATCATAGAA	1200
R F H P V V D F T M R R A L S D D I I E	400
GGCTACAGGGTACCTAAAGGAACAAACATCATACTGAACACCCGGCCGCATGCACAGGACA	1260
G Y R V P K G T N I I L N T G R M H R T	420
GAGTTTTTCTCAAACCCAATGACTTCAGCCTGGAAAATTTTGAAAAAATGCTCCTCGT	1320
E F F L K P N D F S L E N F E K N A P R	440

CGCTACTTCCAGCCATTTGGCTCAGGTCCTCGTGCGTGTGTTGGAAAGCACATCGCCATG	1380
R Y F Q P F G S G P R A C V G K H I A M	460
GTGATGATGAAATCCATCCTGGTGACGCTGCTGTCCCAGTACTCAGTCTGCCCTCACGAA	1440
V M M K S I L V T L L S R Y S V C P H E	480
GGTCTGACCCTGGACGGCCTCCCGCAGACCAACAACCTGTCCCAGCAGCCTGTGGAGCAC	1500
G L T L D G L P Q T N N L S Q Q P V E H	500
CATCAGGAGAACGAGCCGCTCGGCATGAGGTTCTTACCGAGACAGAGAGGAAGCTGGGAA	1560
H Q E N E P L G M R F L P R Q R G S W E	520
ACTCTCTGA	1569
T L *	522

Figure 6. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *CYP19a* of *P. japonicus*. 1569 bp encodes a protein of 522 amino acids. termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for *CYP19a* were submitted to the GenBank with accession number DQ298135.



ATGTTGGTGAATGTATCGTCTGAAGTCACCGTCTTCTCTCTGCTGCTCCTGTTGCTG	60
M L V N V S S E V T V F L L L L L L L L	20
CTTTTCACGTGGAGCCAAACACATCGCTCACAGATACAAGGTCCCTTCTCTGTTAGGA	120
L F T W S Q T H R S Q I Q G P S F L V G	40
CTCGTCTCTTCTGACCTACAGCAGGTTTATCTGGACTGGGATAGGAACAGCCAGCAAC	180
L G P L L T Y S R F I W T G I G T A S N	60
TACTACAACAACAAATACGGCAGCATTGTGCGGGTATGGATTAACGGCGAGAGGACCCTC	240
Y Y N N K Y G S I V R V W I N G E R T L	80
ATCCTGAGCAGGTCTTCAGCTGTGTATCATGTTCTGAGGAGCACTAACTACACAGCCAGA	300
I L S R S S A V Y H V L R S T N Y T A R	100
TTCGGGAGCAGAACAGGGCTGGAGTGTATCGGGATGGAGGGGAAGGGGATCATTTTCAAC	360
F G S R T G L E C I G M E G K G I I F N	120
AGTGACGTCCAGCTCTGGAGAAAAGTGAGGACGTATTTCTCAAAGCTCTGACAGGCCCT	420
S D V Q L W R K V R T Y F S K A L T G P	140
GGCCTCCAGAGGACAGTGGGAATCTGTGTGAGCTCCACTGCCAAACATCTGGACCGCCTA	480
G L Q R T V G I C V S S T A K H L D R L	160
CAAGAGATGACCGACCTTTCTGGACATGTGGACGCTCTAAATCTGCTGAGAGCCATCGTG	540
Q E M T D L S G H V D A L N L L R A I V	180
GTGGACATCTCCAACAGGCTTTTCTCAGGGTGCCGCTTAATGAAAAAGACCTGCTGATG	600
V D I S N R L F L R V P L N E K D L L M	200
AAAATCCAAAGCTACTTTGAAACATGGCAGACAGTTCTAATAAAGCCTGATATATTCTTT	660
K I Q S Y F E T W Q T V L I K P D I F F	220
AAGATTGGGTGGCTCTACAACAAGCACAAGAAAGCAGCCCAAGAGCTGCAGGACGTGATG	720
K I G W L Y N K H K K A A Q E L Q D V M	240
GAGAGCTGCTAGAGACGAAGAGGCAGATAATAAAGGAGACAGAGAAGCTAGACGATGAT	780
E S L L E T K R Q I I K E T E K L D D D	260
CTTGATTTTGCAACAGAGCTCATCTTTGCTCAGAGCCATGGAGAGCTCTCAGCTGATAAT	840
L D F A T E L I F A Q S H G E L S A D N	280
GTCAGACAGTGCTTGCTGGAGATGGTGTATCGCAGCTCCTGACACACTCTCCATCAGCCTC	900
V R Q C L L E M V I A A P D T L S I S L	300
TTCTTCATGTTGCTGCTGCTGAAACAGAACCCGGATGTGGAGATGAGGATAGTAGAGGAG	960
F F M L L L L K Q N P D V E M R I V E E	320
ATGAACACAGGCTTAAGAGAAAAAGGTGATGGAACTTGGATTACCAAAGCTTGAAAGTG	1020
M N T G L R E K G D G N L D Y Q S L K V	340
CTGGAGAGTTTCATAAATGAGTCTCTGCGTTTTATCCTGTGGTTGATTTACCATGCGC	1080
L E S F I N E S L R F H P V V D F T M R	360
AAAGCTCTGGAAGATGACAACATTGAAGGTGTTAAAATAGCAAAGGAACCAACATCATT	1140
K A L E D D N I E G V K I A K G T N I I	380
CTGAACATCGGACTCATGCATAAACTGAGTTCTTCCAAAACCCAAAGAGTTTCAGTTTG	1200
L N I G L M H K T E F F P K P K E F S L	400
ACAACTTCGACAAAACAGTGCAGTCGTTTTCTCCAGCCCTTCGGCTGCGGGCCTCGC	1260
T N F D K T V P S R F F Q P F G C G P R	420
TCCTGCGTGGGCAAACACATCGCCATGGTGTATGATGAAGGCCATCCTGGTGGCTCTGTTA	1320
S C V G K H I A M V M M K A I L V A L L	440

TCCCGTTACACTGTGTGTCTCGCCAAGGCTGCACCCTCAACAGCATCCGGCAGACCAAC	1380
S R Y T V C P R Q G C T L N S I R Q T N	460
AATCTGTCGCAGCAACCTGTGGAGGACGAGCACAGCCTGGCCATGCGCTTTATCCCTCGA	1440
N L S Q Q P V E D E H S L A M R F I P R	480
GCAACACAACCTCCACTCAGTCACATATTTAGTCAGGAAATGTAG	1485
A T Q P P L S H I F S Q E M *	494

Figure 7. The ORF nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *CYP19b* of *P. japonicus*. 1485 bp encodes a protein of 494 amino acids. Termination codon is marked as asterisk. The nucleotide and amino acid sequence for *CYP19b* were submitted to the GenBank with accession number DQ298136.



Table 7. Comparison of amino acid identities between *P. japonicus* aromatase and other species' aromatase. Overall amino acid identities are indicated in percentages. The total number of amino acids are indicated in brackets. Sequence reference and abbreviations were represented in material and methods section.

<i>CYP19a</i>		<i>CYP19b</i>	
Species	Overall	Species	Overall
bw <i>CYP19a</i>	100 (522)	bw <i>CYP19b</i>	100 (494)
t <i>CYP19a</i>	79 (521)	jw <i>CYP19b</i>	90 (495)
gf <i>CYP19a</i>	63 (518)	nt <i>CYP19b</i> *	81 (480)
zf <i>CYP19a</i>	64 (509)	mt <i>CYP19b</i> *	81 (493)
gs <i>CYP19a</i>	84 (519)	gf <i>CYP19b</i>	64 (510)
jf <i>CYP19a</i>	82 (518)	zf <i>CYP19b</i>	64 (511)
rs <i>CYP19a</i>	85 (519)	cc <i>CYP19b</i>	65 (500)
jw <i>CYP19a</i>	90 (518)	jm <i>CYP19b</i>	80 (499)

Note: Partial sequences are noted as asterisk.

← (D) →

```

afCVP1Gz  MAGELLQPCG--MKQVHLGRAVLEFLIMOGAHNSSYGAQDNVCGAMATLIIIIILCLIIAIR 58
zfCVP1Gz  MAGDILQPCG--MKPVRLEGRAVVDLIIORAHNGSTERACDNACGATATIIIIILCLIIAIR 58
hwCVP1Gz  --MDLISACERTMSPTGLDAEVRDLVVM--SONATVVGLLGVSMATRTLVLPLFFVLLAAWN 57
fwCVP1Gz  --MDLISACERTMSPVGLDAEVDGLGYM--SONATVVVLQGVSTATRTLVLPLFCVLLAAWS 57
osCVP1Gz  --MDLISACERVMPQVGLDTTAADLVPM--SHNASAVGAPGISVVTRTFIIILCLIIVAWN 57
rcCVP1Gz  --MDLISACELVMPQVGLDTAVADLVSM--SHNATAVGTPTGISVATRTLIIILVCLIIVAWN 57
fcCVP1Gz  --MDRIPACTLAMTPVGLGAALGDLVST--SPNATAVRTPTGISVASRTLIIILVCVLLVAWS 57
tCVP1Gz  --MDLISACEQAMSPVGLDAVVARSLCD--LKCHP---IDGISMATRTLIIILVCLIIVAWS 54
mCVP1Gz  --MDLIPACTRTMSSS---CLVAELVST--APNTTVGLPSGIPMATRSLIIILVCLIIMVWS 54
hCVP1Gz  -----MVLMLNPIHYNI TSI VPEAMPAATMPVLLITGLFLVWN 40

```

```

afCVP1Gz  HHWTEKIDHVPQPCFLI GLGPLLSYCRLIWSGIGTASNYYNSKYGDI VRRWIN---GREET 114
zfCVP1Gz  HHIRPHKSHI PGPSPFPGLGPVVSYCRPT WSGIGTASNYYNSKYGDI VRRWIN---GREET 114
hwCVP1Gz  HK--DOKSVPGPSPCLGLGPLLSYLRPTWTGIGTASNYYSTKYGDI VRRWINVWIVGREET 115
fwCVP1Gz  HT--EOKSVPGPSPCLGLGPLLTYLRPTWTGIGTASNYYSTKYGDI VRRWI---VGREET 111
osCVP1Gz  SM--EOKSVPGPSPCLGLGPLLSYLRPSWTGIGTASNYYNKKYGDIMVRRWIN---GREET 111
rcCVP1Gz  HT--EOKSVPGPSPCLGLGPLLSYLRPTWTGIGTASNYYNKTVYDI VRRWIN---GREET 111
fcCVP1Gz  HT--DRRTVPGPPPCFLGLGPLLSYVRPTWTGIGTACNYYNKRKYGDI VRRWID---GREET 111
tCVP1Gz  HT--DOKIVPGPSPCLGLGPLLSYLRPTWTGIGTASNYYNKKYGDI VRRWIN---GREET 108
mCVP1Gz  HS--EOKTI PGPSPCLGLGPLMSVLRPTWTGIGTASNYYNKKYGDI VRRWIN---GREET 108
hCVP1Gz  YEG--TSSI PGPVYCMGIGPLISHGRLMGTIGSACNYYNRYVEGPMRVTIS---GREET 94
      : * * * * : * : * * * * : * : * * * * : * : * * * * : * : * * * * :

```

```

afCVP1Gz  LILSRSSAVYHVLKKSLYTSRFGSKLGLLOCTGMHEOGIIFNSNVALWKKVRTVYAKALTG 174
zfCVP1Gz  LILSRSSAVYHVLKKSLYTSRFGSKLGLLOCTGMHEOGIIFNSNVALWKKVRAFYAKALTG 174
hwCVP1Gz  LILSRSSAVH#VILKSGHYTSRFGSKOGLSCTGMNERGIIFNNNVPLWKKIRTVFTKALTG 175
fwCVP1Gz  LILSRASAVH#VILKSSSYTSRFGSKOGLSCTGMNERGIIFNNNVPLWKKIRTVFTKALTG 171
osCVP1Gz  LILSRASAVH#VILKSGOYTSRFGSKOGLSCTGMNERGIIFNNNVTLWKKIRTVFTKALTG 171
rcCVP1Gz  LILSRASAVH#VILKNGOYTSRFGSKOGLSCTGMNERGIIFNNNVTLWKKIRTVFTKALTG 171
fcCVP1Gz  LILSRASAVH#VILKNGHYTSRFGSKOGLSCTGMNERGIIFNNNVSLWKKIRTHFTRALTG 171
tCVP1Gz  LILSRSSAVH#VILKNGYTSRFGSIOGLSYLGMNERGIIFNNNVTLWKKIRTVYAKALTG 168
mCVP1Gz  LILSRASAVH#VILKNRKYTSRFGSKOGLSCTGMNERGIIFNNVALWKKIRTVFTKALTG 168
hCVP1Gz  LILSRSSMPHIMKHNVYSSRFGSKLGLLOCTGMHEOGIIFNNNPELWKTTRPFFMKALSG 154
      **:::***:***: *::***** **::**::***** * *** *:::***:

```

```

afCVP1Gz  PGLORTLEICTTSTNTHLDNLSHLMDARGOVDILNLLRCTVVDISNRLFLGVPLNEHDL 234
zfCVP1Gz  PGLORTMEICTTSTNSHLDLSQLTDAAGQLDILNLLRCTVVDISNRLFLGVPLNEHDL 234
hwCVP1Gz  PGLQOTVEVCVSSTOGSHLDDL----DSLDDVDVLSLLRCTVVDISNRLFLDVPVNEKELM 231
fwCVP1Gz  PGLQOTVEVCVSSTOGSHLDDL----DSLDDVDVLSLLRCTAVDISNRLFLDVPVNEKELM 227
osCVP1Gz  PSLQOTVEICVSSTOGSHLDNL----DVLDDVDVLSLLRCTVVDISNRLFLDTPVDEKELL 227
rcCVP1Gz  PSLQOTVEICVSSTOGSHLDNL----DTLDHVDVLSLLRCTVVDISNRLFLGTPVDEKELL 227
fcCVP1Gz  PGLQKTVEVCVSSTOGSHLDDL----DGLGHVDVLSLLRCTVVDISNRLFLDVPINEKELL 227
tCVP1Gz  PNLQOTVDCVSSIOGHLDHL----DSLGHVDVLSLLRCTVLDISNRLFLNVPINEKELM 224
mCVP1Gz  PNLQOTVEVCVSTOYTHLDNL----SSLVVDVGLFLRCTVVDISNRLFLGVVDEKELL 224
hCVP1Gz  PGLVRMVTVCARESLKTHLDRLBEVTNMSGYVDVLTLLRRVMIDTSNTLFLRIPLDPSAIV 214
      * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :

```

```

afCVP1Gz  OKTHKVPDWTQTVLTKPDVYFRLAWHLHGKHKRDAGELQDAI AALI EOKRVCLTRAEPD 294
zfCVP1Gz  OKTHKVPDWTQTVLTKPDVYFRLD-WLHRKHKRDAGELQDAI TALI EOKKVC LAHAEPKD 293
hwCVP1Gz  VKI OKYFDWTQTVLTKPDI VFYLD-WI HORHKRTATQELQDAI ESLVEOKRREVEQAARLD 290
fwCVP1Gz  VKI HKYFDWTQTVLTKPDI VFYLD-WI COXKMAAAGELQDAI ESLVEOKRREMEQAARKLD 286
osCVP1Gz  LKI OKYFDWTQTVLTKPDI VFYKFG-WI HORHKAAAAGELQDAI ESLVEOKRREMEQAARKLD 286

```

rcfVp1Ga LKTKVFDTWCTVLI KPDI YFKPG-WI HORHCTAAQELQDAT ESSLVEOKRRDMEQADKLD 286
zcfVp1Ga VKILKVFDTWCTVLI KPDI YFKFD-WI HORHKA AVQELHDAI GDLVEOKRRDVEQADKLD 286
bcfVp1Ga LKTKVFDTWCTVLI KPDI YFKPG-WI HORHCTA TQELQDAT KRLVDOKRKNMEQADKLD 283
mcfVp1Ga OKIHKVFDTWCTVLI KPDI YFKPS-WI HORHCTAAQELQDAT ESSLVEKRKRMEQAEKLD 283
hcfVp1Ga VKTQGYFDAWQALLI KPDI FFKIS-ML YKVEKSVKDLKDAI EVL IAEKRRRI STEEKLK 273
** ** :*** :*****:** : * : : : : : : * : * : : : : ** ** : :

←────────── (2) ─────────→

ofcVp1Ga Q- LDFTGELI FACSHGEL STENVROCVLEMI TAAPDTLST SI LFFMLIIII KQNPQVELKIL 353
zfcVp1Ga H- LDFTAELI FACSHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTLST SI LFFMLIIII KQNPQVELKIL 352
bwcVp1Ga N- INFTAELI FACSHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTLST SI LFFMLIIII KQNPQVELQLL 349
fwcVp1Ga D- INFTAELI FACSHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTLST SI LFFMLIIII KQNPQVELQLL 345
ocfVp1Ga N- INFTAELI FACNHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTLST SI LFFMLIIII KQNPQVELQLL 345
rcfVp1Ga N- INFTAELI FACNHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTLST SI LFFMLIIII KO · NPQVELQLL 345
zcfVp1Ga N- INFTTGLI FACNHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTL SVSLFFMLIIII KQNPQVELQLL 345
tcfVp1Ga N- INFTAELI FACNHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTL SI SI LFFMLIIII KQNPQVELQLL 342
mcfVp1Ga N- INFTAELI FACGHGEL SAENVROCVLEMVIAAPDTLST SI LFFMLIIII KQNPQVELQLL 342
hcfVp1Ga BCMDFATELI LAEKRGDL TRENVNOCIL EMLI TAAPDTMSVSLFFMLFLI AKHPNVEEAII 333
: : : : : ** : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *

←────────── (3) ─────────→

ofcVp1Ga QEMNAVLAGRSLQKSHI SELHI LESPT NESLRPHFPVVDFTMRRAL DDDVTI EGVEVKKGTN 413
zfcVp1Ga QEMDSVLAGCSLQKSHI SKLOI LESPT NESLRPHFPVVDFTMRRAL DDDVTI EGYNVKKGTN 412
bwcVp1Ga QEMDTVVGEGQLQNGNLQKLPLLESPT NECLRPHFPVVDFTMRRAL SDDI IEGYRVPKGTN 409
fwcVp1Ga QEIDTVVGDROLONGDLHKLPLLESPT NECLRPHFPVVDFTMRRAL SDDI IEGYRVPKGTN 405
ocfVp1Ga QEIDTVI GERQLONGDPOKLHVL E SPT NECLRPHFPVVDFTMRRAL SDDI I DGYRVPKGTN 405
rcfVp1Ga QEIDTVI GDROLQNRDPOKLHVL E SPT NECLRPHFPVVDFTMRRAL SDDI I DGYRVPKGTN 405
zcfVp1Ga REIDTVVGERQLONGDLQKLVLESPT NECLRPHFPVVDFTMRRAL SDDI I DGYRVPKGTN 405
tcfVp1Ga QEIDAVVGERQLQNGDLHKLVME SPT VECLRPHFPVVDFTMRRAL SDDI IEGYRISKGTN 402
mcfVp1Ga QEIDTVI VGDSQLQNGDLQKLVLESPT NECLRPHFPVVDFTMRRAL PDDI I DGHVRVQGTN 402
hcfVp1Ga KRITOTVI GERDI KIDDI QKLVME NPT VESMRVQPVVDL VMRKALED DVTI DGVVPVQGTN 393
* : : : : : , : : : : : * : : * : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *

←────────── (4) ─────────→

←────────── (5) ─────────→

ofcVp1Ga I ILNVGRMHRS EFPFKPN EPSL DNPKNVP SRF P Q P P G S G P R S C V G K H I A M V M M K S I L V T 473
zfcVp1Ga I ILNVGRMHRS EFP S K P N Q P S L D N P K N V P S R F P Q P P G S G P R S C V G K H I A M V M M K S I L V A 472
bwcVp1Ga I ILNTERMHRT EFP FL K P N D P S L E N F E K N A P R R Y P Q P P G S G P R A C V G K H I A M V M M K S I L V T 469
fwcVp1Ga I ILNTGMMHRT E S F P H K P N D P N L K N F E K N A P R R Y P Q P P G S G P R S C V G K H I A M L M M K S I L V T 465
ocfVp1Ga I ILNTGMMHRT E F P N K P D E F R L E N F E K N A P R R Y P Q P P G S G P R A C V G K H I A M V M M K S V L V T 465
rcfVp1Ga I ILNTGMMHRT E F P N K P D E F R L E N F E K N A P R R Y P Q P P G S G P R A C V G K H I A M V M M K S I L V T 465
zcfVp1Ga I ILNTERMHRT E F P C K P N E P R L D N P E K T A P R R Y P Q P P G S G P R S C V G K H I A M A M M K S I L V T 465
tcfVp1Ga I ILNTERMHRT E F P L K G N Q P N L E H P E N N V P R R Y P Q P P G S G P R A C I G H M A M V M M K S I L V T 462
mcfVp1Ga I ILNTERMHRT E F P H K A N E P S L E N P O K N T P R R Y P Q P P G S G P R A C V G R H I A M V M M K S I L V T 462
hcfVp1Ga I ILNIGRMHRL E F P P K P N E P T L E N F A K N V P R R Y P Q P P G P G P R G C A G K Y I A M V M M K A I L V T 453
**** * : *** * * * : : * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ofcVp1Ga LLSRFSVCPVKGCTVDSI POTNDL SCOPVEEP-----SSLSVQLILRNAL----- 518
zfcVp1Ga LLSRFSVCPMKACTVENI POTNNL SCOPVEEP-----SSLSV----- 509
bwcVp1Ga LLSRVSVCPEHGLTLDGLPOTNNL SCOPVEHCGENE-PLGMRFLPROGSSNETI----- 522
fwcVp1Ga LLSOVSVCPEHGLTLDGLTOTNDL SCOPVEHCGENE-PLGMRFLPROGSSNENL----- 518
ocfVp1Ga LLSOVSVCPEHGLTLDCLPOTNNL SCOPVEHCGEAEBSHLSMRFLPROGSSNCTI----- 519
rcfVp1Ga LLSOVSVCPEHGLTLDCLPOTNNL SCOPVEHCGEAEBSHLSMRFLPROGSSNCTI----- 519
zfcVp1Ga LLSOVSVCPEHGLTLDCLPOTNNL SCOPVEHCGEAP-HLNMFRFLPROGSSNCTI----- 518

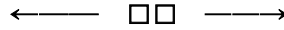
```

tCYP19a      LLSCVSVCTHGGPILLDCLPOTNNLSGCPVEHCOAETEHLMRFLPROGSSCOOTLKDPNL 521
mCYP19a      LLSCVSVCTPHEGLTLIDCLPOTNNLSGCPVEHCOEAD-HLSMTFLPRORGTWESPSPF-- 518
hCYP19a      LLRRFHWKTLGGCVSTOKIHDLSLHPDETGN----MLEMIFTPRNSDRCLEH----- 503
**  ::  *  ,  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

```

Figure 8. Alignment of amino acid sequences of *P. japonicus* *CYP19a* with other species *CYP19a*. The identical, highly conserved, and less conserved amino acid residues were indicated by (*), (:), and (.), respectively. The sequence corresponding to putative structural region indicated by numbers and overline with arrowheads (①, the membrane-spanning region; ②, the I-helix region; ③, Ozol's peptide region; ④, the aromatic region; ⑤, the heme-binding region). Sequence reference and abbreviations were represented in material and methods section.





```

hwCVP19b -----MLVNVSSSEVTVFLIIIIIIIIIIIFT--WSOTHRSTCGPSFLVGLGPII 45
hwCVP19b -----MLMDVSSSEVTVFLIIIVLIIIIIFTS--WSRTOK-QIPGPFPLAGLGPII 45
ntCVP19b(o) -----RASEVTAVLIIIIIIIIIIIFTTWORRKCOSHI PGPFPLAGLGPTI 43
ntCVP19b(o) ----HEEEI TAGPMVADRASEVTAALIIIIIIIIIIIFTTWORRKCOSHI PGPFPLAGLGPTI 56
hwCVP19b ----MIQGEVOTLDEL FMSVSOVTLFLIIIIIMLIIIFINTWRQSHLSHI PGPSFLAGLGPII 57
afCVP19b -MEEVLKGTVMFAATVOVTLMALTGTTTTLLIILHRI FTAKNWRNCSGVPGPWLLGLGPTM 59
zfCVP19b MMEHVVKDAVNTGAVVOGTLIIIIITGTTMLIIILHRI PGVKNWRNCSALPGPWLLGLGPII 60
ccCVP19b ----MELQNVSDVMAVMEGRGLCVISALLFLIIIIITSLTAYNRRNKSTLPGPYWLLGLGPTI 57
          *::*:          :  :  ** :  ****:

```

```

hwCVP19b TYSRPTWTGIGTASNYYNNKYGSI VRVWINGERTLII SRSSAVYHVLRSNYTARPGSRT 105
hwCVP19b TYSRPTWTGIGTACNYYNNKYGSI VRVWINGERTLII SRSSAVYHVLRSNYTARPGSRT 105
ntCVP19b(o) SYSRPTWWSGIGTACNYYNNKYGSI VRVWINGERTLII SRSSAVYHVLRSNYTARPGSRT 103
ntCVP19b(o) SYSRPTWWSGIGTACNYYNNKYGSI VRVWINGERTLII SRSSAVYHVLRSNYTARPGSRT 116
hwCVP19b SYARPTWWSGIGTACNYYNNKYGSI VRVWINGERTLII SRSSAVYHVLRSNYTARPGSRT 117
afCVP19b SYSRFLWWSGIGTACNYYNNKYGSI ARVWINGERTLII SKSSAVYHVLKSNMVTGRFASAK 119
zfCVP19b SYSRFLWWSGIGTACNYYNNKYGSI ARVWINGERTLII SKSSAVYHVLKSNMVTGRFASAK 120
ccCVP19b SYSRFLWTGIGTASNYYNNKYGSI VRVWINGERTLII SKSSAVYHVLKSNMVTGRFASAK 117
          :*:::* :  ***:*** :  ****: * , * , ***: *  *****: * , * , ** , * ,

```

```

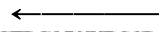
hwCVP19b GLEICTGMEGKGI IFNSDVQLWRKVRTYFYSKAL.TGPGLORTVGI CVSSSTAKHLDRLODMTD 165
hwCVP19b GLEICTGMEGKGI IFNSDVQLWRKVRTYFYSKAL.TGPGLORTVGI CVSSSTAKHLDRLODMTD 165
ntCVP19b(o) GLEICTGMYGNGI IFNSDVLLWKKVRTYFYSKAL.TGPGLORTVGI CVSSSTAKHLDRLODMTD 163
ntCVP19b(o) GLEICTGMYGNGI IFNSDVPLWKKVRTYFYSKAL.TGPGLORTVGI CVSSSTAKHLDRLODMTD 176
hwCVP19b GLOCTGMDGRTI IFNCDVPLWKKVRTYFYSKAL.SGPSLORTVGI CVSSSTAKHLDRLODMTD 177
afCVP19b GLOCTGMPDQGI IFNSNMLWKKVRTYFYSKAL.TGPGLOKSVDCVSATNRCOLDRLODMTD 179
zfCVP19b GLOCTGMPDQGI IFNSNMLWKKVRTYFYSKAL.TGPGLOKSVDCVSATNRCOLDRLODMTD 180
ccCVP19b GLRCTGMDQGLIFNSNMLWKKVRTYFYSKAL.TGPGLORTVGVCVHATNKHLDRLODMTD 177
          ** , **** : * : *** : :  * : * * : *** : ** : ** : ** : * : * : *

```

```

hwCVP19b LSGHVDALNLLRAIVVDI SNRI FLRVPLNEKDLIMKIQSYFETWOTVLI KPDI FFKIGWL 225
hwCVP19b PSGHVDALNLLRAIVVDI SNRI FLRVPLNEKDLIMKIQSYFETWOTVLI KPDI FFKIGWL 225
ntCVP19b(o) PSGHVDALNLLRAIVLDI SNRI FLRVPLNEKDLITKHNYFDTWOTVLI KPDI FFKIGWL 223
ntCVP19b(o) PSGHVDALNLLRAIVLDI SNRI FLRVPLNEKDLITKHNYFDTWOTVLI KPDI FFKIGWL 236
hwCVP19b SSGHVDALNLLRAIVVDI SNRI FLRVPLNEKDLI LOKIHNYFDTWOTVLI KPDI FFKIGWL 237
afCVP19b HSGHVDVLLNLLRCTVVDVSNRI FLRI PLNEKDLITKHNYFDTWOTVLI KPDI FFKIGWL 239
zfCVP19b ASGHVDVLLNLLRCTVVDVSNRI FLRI PLNEKDLITKHNYFDTWOTVLI KPDI FFKIGWL 240
ccCVP19b SSGHVDALNLLRCTVVDVSNRI FLRI PLNEKDLITKHNYFDTWOTVLI KPDI FFKIGWL 237
          ***** , ** : ** , ** : * : *** : ** : ***** : * : ** : ** : * : * : * :

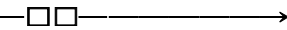
```



```

hwCVP19b YNKHKRAAACELODVMESLLETQROI I KETEKLDDDLDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 285
hwCVP19b YNKHKRAAACELODVMESLIVTKRKMIEKSEKLDDDLDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 285
ntCVP19b(o) YNKHKRAAACELODAMESLIEVKKRMIHEAEKLDDELDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 283
ntCVP19b(o) YNKHKRAAACELODAMESLIEVKKRMIHEAEKLDDELDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 296
hwCVP19b YNKHKRAAACELODAMESLIEVKKRMIHEAEKLDDDLDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 297
afCVP19b YKHYHLAAKELQDEMCKLVECKRQAINNMEKLD-ETDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 298
zfCVP19b YKHYHLAAKELQDEMCKLVECKRQAINNTEKLD-EMDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 299
ccCVP19b YKHYHLAAKELQDEMCKLVECKRQAINNMEKLD-ETDPATEL.IFACNHGEI.SADNVROCV 296
          * , * : * : *** : * , * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```



```

hwCVP19b LEMVIAAPD-TLSTSLFFMLIIIIKONPDEVMRI VEEMNTGLREKGDGNLDVQSLKVLSEF 344
hwCVP19b LEVWRSQLOVTLSTSLFFMLMLIIKONPDEVRLI VEEMNTGLREKGDGNLDVQSLKVLSEF 345

```

```

ntCYP19b(α) LEMVIAAPD-TLSTSLFFPMLLLKONPDI ELCQVEEMNTILNEKDVENTIDVQSLKVMESF 342
mtCYP19b(α) LEMVIAAPD-TLSTSLFFPMLMLLKONPDI ELCQVEEMNTILNEKDVENTIDVQSLKVMESF 355
*imCYP19b LEMVIAAPD-TLSTSLFFPMLMLLKONPDELOVVEEMNSVLDKATESTIDVESLRVLESF 356
afCYP19b LEMVIAAPD-TLSTSLFFPMLILLKONSVEEOTVOETQSQTcerDVESADLQKLNVLERF 357
zfCYP19b LEMVIAAPD-TLSTSLFFPMLILLKONSAREEOTVOETQSQTGSRDVESADLQKLNVLERF 358
ccCYP19b LEMVIAAPD-TLSTSLFFPMLVLLKOKPEVEOCCILOEMRNVLGGREVEPAELQKLTVMESF 355
** : : ***** :****. : * :*: : : : : : : : * : * *
□ □ → ← □ □
bwCYP19b INESLRPHFPVVDFTMRKALEDDNI EGVKIAKGTNI I LNI GLMHKT-EFFPKPKPEPSL TNF 403
*fwCYP19b INESLRPHFPVVDFTMRKALEDDNI EGT KIAKGTNI I LNI GLMHKT-EFFPHPTPEPSL TNF 404
ntCYP19b(α) INESLRPHFPVVGFTMRKALEDDNI AGTKI KKGSTNI I LNTGLMHKT-EFFPKPEEPNHTNF 401
mtCYP19b(α) INESLRPHFPVVDFTMRKALEDDNI AGTKI KKGSTNI I LNI GLMHKT-EFFPKPKPEPSL TNF 414
*imCYP19b INESMRPHFPVVDFTMRKALEDDDI EGTKIRRGTNI I LNI GLMHKT-EFFPKPTPEPSLANF 415
afCYP19b IKESLRPHFPVVDFTMRKALEDDDI DGVRVAKGTNI I LNI GRMHKS-EFFPKPNEPSLENF 416
zfCYP19b IKESLRPHFPVVDFTMRKALEDDYI DGVRVAKGTNI I LNI GRMHKT-EFFPKPNEPSLENF 417
ccCYP19b IKESLRPHFPVVDFTMRKALDDDFI DGVRVAKGTNI I LNI GRMHKSAREFFPKANEPSLENF 415
* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
← □ □ →
bwCYP19b DKTVPSRFFQPPGCGPRSCVGGHI AMVMMKATLVALL SRVTVCPROGCTLNST ROTMNL 463
*fwCYP19b DKTVPSRFFQPPGCGPRSCVGGHI AMVMMKATLVALL SRVTVCPROGCTLNST ROTMNL 464
ntCYP19b(α) EKTVPNRYFPQPPGCGPRSCVGGHI AMVMMKATLVTLI SRVTVCPROGCTLNST ROTMNL 461
mtCYP19b(α) EKTVPSRFFQPPGCGPRSCVGGHI AMVMMKATLVTLI SRVTVCPROGCTLNST ROTMNL 474
*imCYP19b EKTVPSRFFQPPGCGPRSCVGGHI AMVMMKATLITLI SRVTVCPROGCTLNST ROTMNL 475
afCYP19b ENTVPSRFFQPPGCGPRACVGGHI AMVMTKATLVTLI SRFTVCPRHGCTVSTI ROTMNL 476
zfCYP19b ENTVPSRFFQPPGCGPRACVGGHI AMVMTKATLVTLI SRFTVCPRHGCTI STI ROTMNL 477
ccCYP19b ENNVPSRFFQPPGCGPRACVGGHI AMVMMKAVLVTVLSQVTVCPROGCTVSTI ROTMNL 475
: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
제주대학교 중앙도서관
COPVEDEH-SLAMRFTPRATOPPLSHIFSOEM- 494
*fwCYP19b COPVEDEH-SLAMRFTPRATOPPLSHIFSOEM- 495
ntCYP19b(α) COPVEDEH-SLAMRFTPRTK----- 480
mtCYP19b(α) HQPVEDEH-SLAMRFTPRTT----- 493
*imCYP19b COPVEDEH-SLMRFTPRTSOPHLT----- 499
afCYP19b MQPVEEDPDCLAMRFTPRSONICGDPHILGKXTOE 510
zfCYP19b MQPVEEDPDCLAMRFTPRAGNSNGETAADNRYSKE 511
ccCYP19b CQPTEEDTQSLAMRFTPRKRSPOKQ----- 500
** : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

Figure 9. Alignment of amino acid sequences of *P. japonicus* *CYP19b* with other species *CYP19b*. The identical, highly conserved, and less conserved amino acid residues were indicated by (*), (:), and (.), respectively. The sequence corresponding to putative structural region indicated by numbers and overline with arrowheads (□□, the membrane-spanning region; □□, the I-helix region; □□, Ozol's peptide region; □□, the aromatic region; □□, the heme-binding region). Partial sequence is marked by (P). Sequence reference and abbreviations were represented in material and methods section.

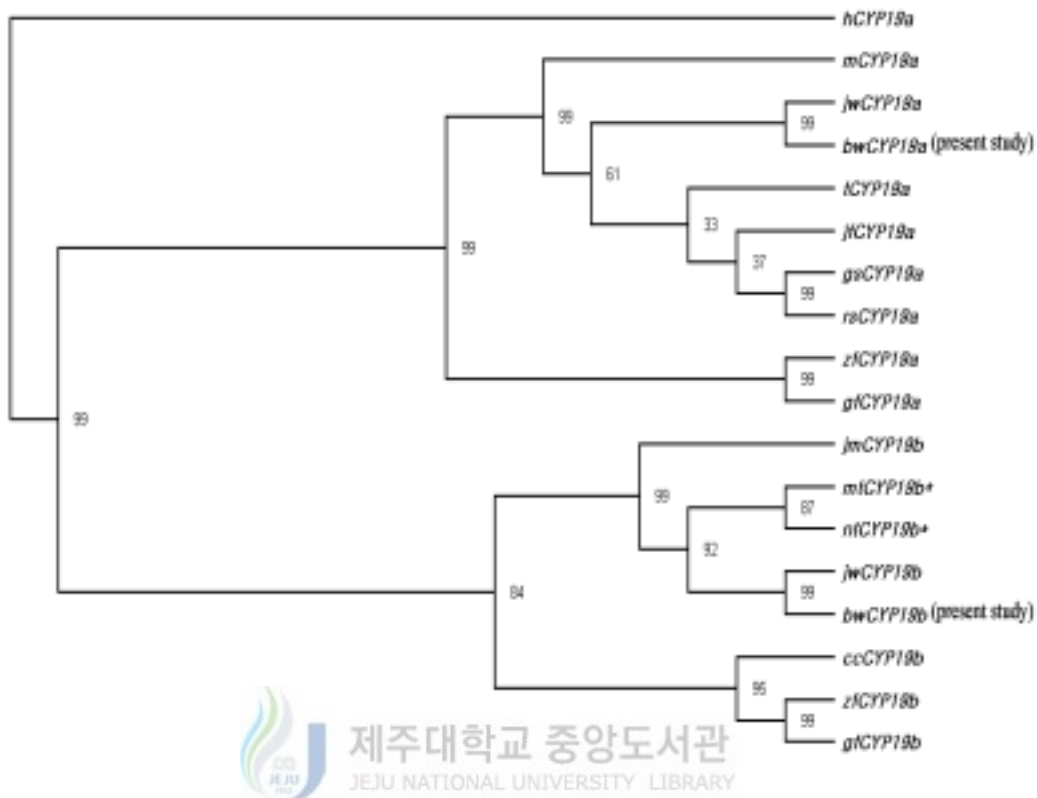


Figure 10. Phylogenetic analysis of the relationships between wrasse aromatase subtypes with other species' aromatase subtypes. A consensus tree obtains with combined values both aromatase subtypes. A consensus tree is based on the values obtained by bootstrap resampling. Bootstrap values (100 replicates) are shown on the consensus tree above the nodes. Human *CYP19a* was used as outgroup. Partial sequences are noted as asterisk. Sequence reference and abbreviations were represented in material and methods section.

2. 삼점놀래기에서 조수의 변화에 따른 *ER*과 *CYP19* subtypes의 유전자 발현

1) 난소의 형태학적 변화

조수의 변화에 따른 삼점놀래기 암컷의 gonadosomatic index (GSI) 값 변화 양상을 조사하였다 (Fig. 11). GSI 값은 만조 시기에 가장 높았고 만조 후에는 감소하여 모든 시기에서 비슷한 수준으로 유지되었다. 조수변화에 따른 혈장 내 E₂ 농도를 조사한 결과, 간조 시 가장 높았다가 간조-만조 시기에 급격히 감소하여 만조와 만조-간조 시기에는 비슷한 수준을 유지하였다. 조수변화에 따른 난소 조직을 형태학적으로 관찰한 결과, 조수변화에 따라 채집한 모든 개체들은 모두 성숙한 난모세포들을 가지고 있지만, 배란된 여포는 만조 시기에만 관찰되었다 (Fig. 13). 또한, 슬라이드상의 yolk stage의 난모세포만을 선택하여 난경의 크기를 비교한 결과, 간조-만조 시기의 난경이 가장 크게 나타났다 (Fig. 14). 그러나 만조 시기는 배란이 일어났기 때문에 만조 시기의 난경 크기는 이전 시기보다 감소하였다.

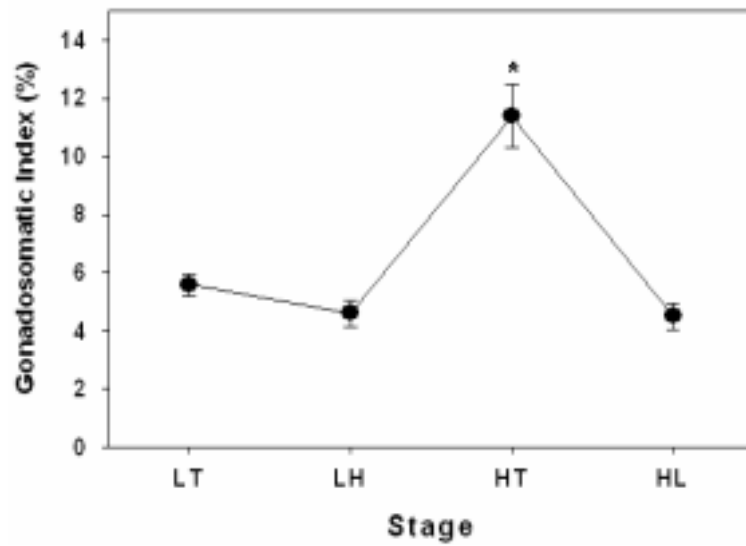


Figure 11. Changes of gonadosomatic index (GSI) during tidal changes of *H. trimaculatus*. GSI was significantly greater at high tide than other tides. LT: Low tide; LH: Low to high tide; HT: High tide; HL: High to low tide. Asterisk indicates significant difference from before and after current tide (LSD - Duncan for multiple comparison, $P < 0.05$).

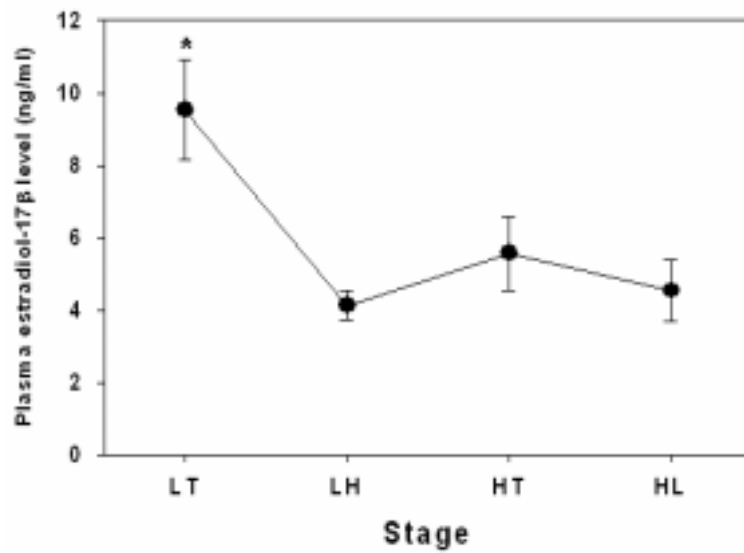


Figure 12. Changes of plasma estradiol-17 β levels during tidal changes of *H. trimaculatus*. Estradiol-17 β was significantly greater at low tide than other stages. LT: Low tide; LH: Low to high tide; HT: High tide; HL: High to low tide. Asterisk indicates significant difference from before and after current tide (LSD - Duncan for multiple comparison, $P < 0.05$).

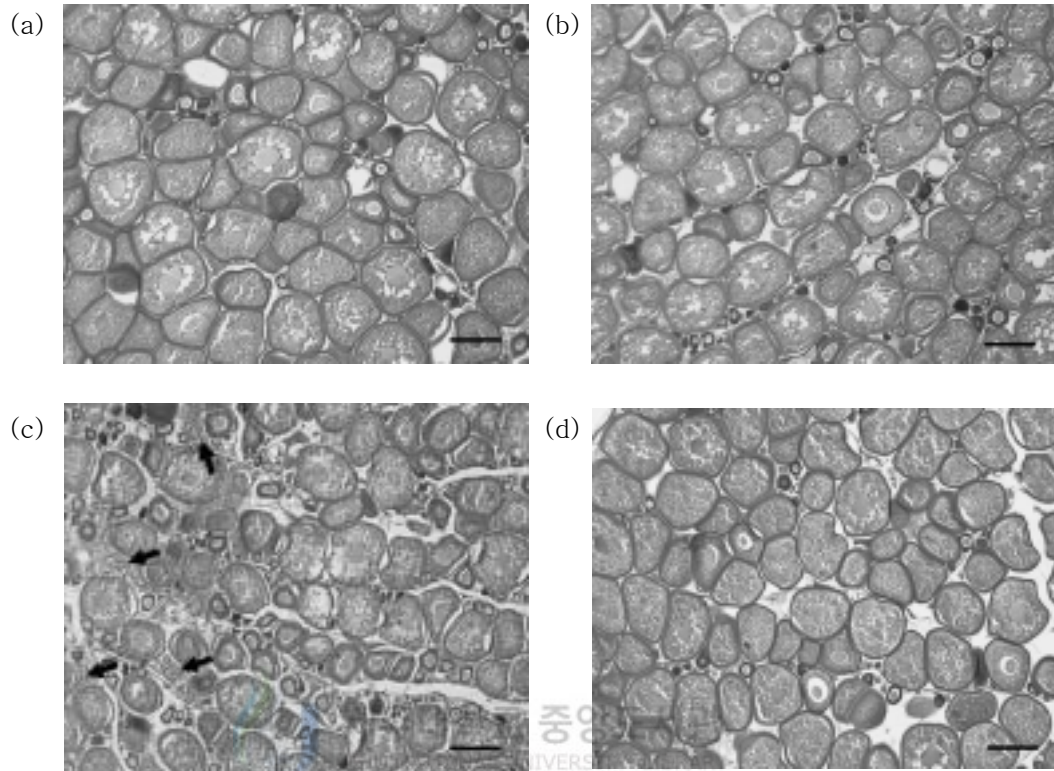


Figure 13. Histological observation of oocytes in ovary of *H. trimaculatus* at each tide. (a)–(d) show the condition of oocyte maturity at each tide. In all sections, maturing oocytes are observed, but the ovulated follicles (arrows) are observed in only high tide. (a): Low tide; (b): Low to high tide; (c): High tide; (d): High to low tide. Sections ($5\mu\text{m}$) were stained with hematoxylin–eosin. Bars = $200\mu\text{m}$.

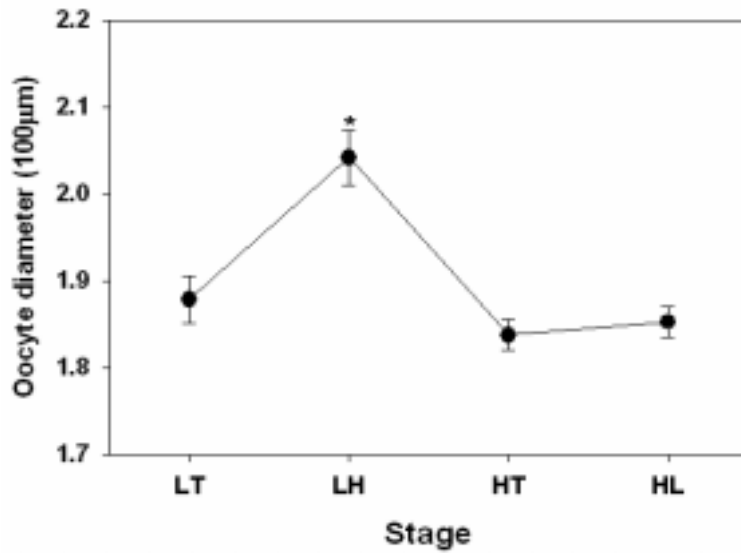


Figure 14. Changes of oocyte diameter of *H. trimaculatus* during tidal changes. Oocyte diameter was significantly greater at low to high tide than other stages. LT: Low tide; LH: Low to high tide; HT: High tide; HL: High to low tide. Asterisk indicates significant difference from before and after current tide (LSD - Duncan for multiple comparison, $P < 0.05$).

2) 생식소와 뇌에서 *ERs*과 *CYP19s* subtypes의 발현 양상

삼점놀래기의 난소와 뇌 조직에서 조수변화에 따른 *ER*과 *CYP19* 유전자의 발현 양상을 real-time PCR 방법으로 분석하였다. 각 유전자의 발현 양은 내부 대조군으로 사용된 β -actin 유전자의 발현 양과 비교하여 상대적 값으로 나타내었다. 난소 조직에서 *ER α* 는 다른 시기에 비해 만조 시기에 가장 높게 발현되었다. 그러나 조수변화에 따른 *ER β* 의 발현 양에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 15a). 그리고 난소조직에서 ovary type *CYP19a* 발현은 간조에서 시작하여 만조-간조 때까지 점차적으로 증가하였다 (Fig. 15b). 뇌 조직은 세 부분 (전뇌, 중뇌, 후뇌)으로 구분하여 조수변화에 따른 각 부분에서의 *ER* subtypes과 brain type *CYP19b*의 발현양상을 확인하였다 (Fig. 16). Fig. 16A에서 보는 것처럼 뇌의 각 부분에서 *ER α* 발현은 간조-만조 시기에 높았으며, 특히 중뇌에서가 가장 높게 발현되었다. 간조-만조 시기를 제외한 모든 시기에서 *ER α* 의 발현은 비슷한 수준을 나타내었다. 그러나 뇌조직에서 *ER β* 의 발현은 *ER α* 과는 다른 양상을 보여 주었다. *ER β* 는 전뇌에서 간조-만조 시기에 특이적으로 그 발현양이 증가하였지만, 중뇌와 후뇌에서는 이러한 특이적인 발현 양상은 보이지 않았으며, 간조-만조 시기를 제외한 다른 모든 시기에서 낮은 발현 양상을 유지하였다 (Fig 16b). 뇌 조직에서 *CYP19b*는 *ER α* 와 유사한 발현 양상으로 나타났다 (Fig. 16c). *ER α* 의 발현 양상과 비슷하게 *CYP19b*의 발현은 중뇌에서 간조-만조 시기에 특이적으로 증가하였다가 다시 감소하였다 (Fig. 16c).

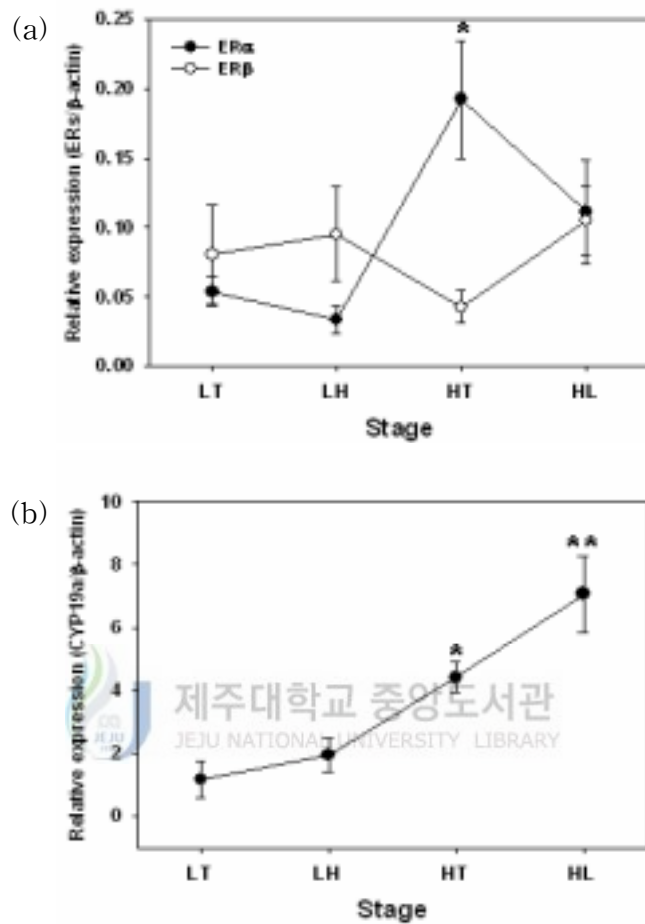


Figure 15. Real-time PCR analysis of *ERs* and *CYP19s* mRNA expressions in ovary of *H. trimaculatus* during tidal change. (a) Expression aspects of *ERs* mRNA. (b) Expression aspect of *CYP19a* mRNA. LT: Low tide; LH: Low to high tide; HT: High tide; HL: High to low tide. Asterisk and double asterisk indicates significant difference from before and after current tide (LSD - Duncan for multiple comparison, $P < 0.05$).

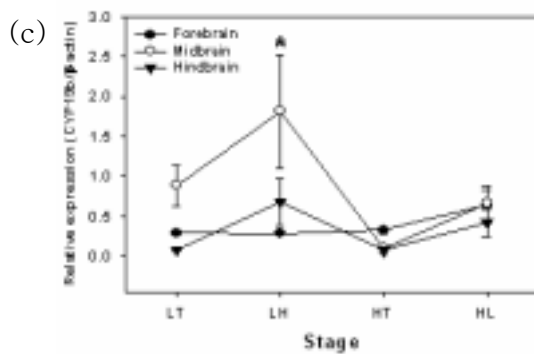
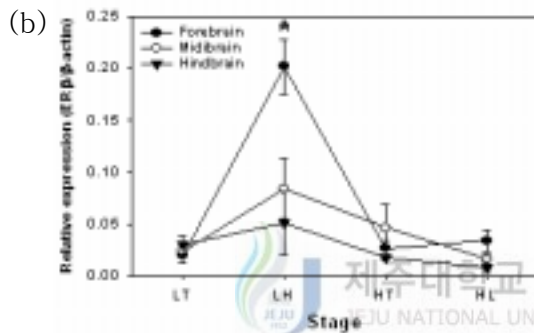
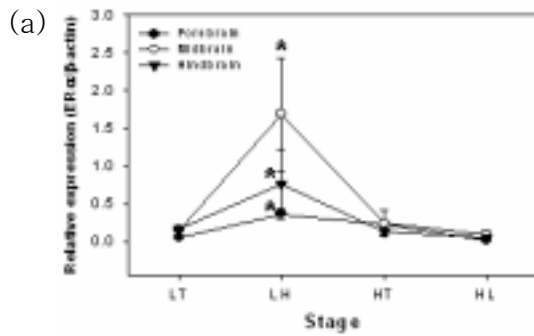


Figure 16. Expression patterns of *ERs* and *CYP19b* mRNA in three parts of brain of *H. trimaculatus* during tidal change. (a) *ERα* expression pattern. (b) Expression pattern of *ERβ* mRNA. (c) *CYP19b* mRNA expressions during tidal change. LT, Low tide; LH, Low to high tide; HT, High tide; HL, High to low tide. The β -actin transcripts were used as a control. Asterisk indicates significant difference (LSD - Duncan for multiple comparison, $P < 0.05$).

고 찰

1. 황놀래기의 *ER*과 *CYP19* cDNAs의 클로닝

여성 호르몬인 estrogen은 어류의 생식활성에 중요한 작용을 한다. 본 연구에서는 에스트로겐의 작용을 매개하는 에스트로겐 수용체 (*ER α* 와 *ER β*)와 에스트로겐 합성효소인 aromatase (*CYP19a*와 *CYP19b*) subtype cDNAs를 클로닝하여 이들의 염기서열을 분석하였다.

제주연안에 서식하는 황놀래기 난소조직에서 클로닝한 *ER α* 와 *ER β* cDNA의 암호화 부위는 각각 1581 bp (536 aa)와 2037 bp (679 aa) 크기를 가지고 있었다. Multisequence analysis 결과는 두 *ER* subtype 모두 핵 수용체에서 공통적으로 나타나는 보존된 특징을 보여 주었다. *ER α* 와 *ER β* 모두에서 두 zinc finger motif 내부에 8개의 cysteine 잔기가 보존되어 있고 (Schwabe 등 1990), C 도메인 내에 D-box (EGCKA)와 P-Box (PATNQ), E 도메인 내에 ligand-dependent transactivation function을 갖는 AF2 (Danielian 등 1992)가 정확하게 보존되어 있음을 확인할 수 있었다. 황놀래기 각 *ER* subtypes의 아미노산 서열은 놀래기 (*H. tenuispinis*)에서 보고된 *ER* subtypes과 아미노산 서열이 가장 유사하였다. 특히, C 도메인은 서로 100 %의 상동성을 나타내었다. Phylogenetic 분석으로 작성된 consensus tree는 두 개의 main cluster (*ER α* 와 *ER β* cluster)로 구성됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 클로닝된 황놀래기의 *ER α* 와 *ER β* 는 비교된 종들 중에 놀래기 (*H. tenuispinis*)의 *ER α* , *ER β* 와 각각 유연관계가 가장 가까웠다. *ER* 단백질의 크기는 종간에 다소 차이가 있었다. *ER α* 의 A/B 도메인과 *ER β* 의 F 도메인의 크기가 종간 변이가 가장 큰 것으로 나타났다. *ER α* 의 A/B 도메인은 종에 따라 92~189개의 아미노산으로 이루어졌고, *ER β* 의 F 도메인은 종에 따라 25~129개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 이러한 도메인 길이의 특이성은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나, Montano 등 (1995)은 도메인의

길이의 차이가 전사인자나 다른 보조 인자들과의 상호작용에 잠재적인 영향을 미칠 것으로 제안하였고, 이것은 수용체 기능의 진화적 차이점이 A/B 도메인과 F 도메인에서 크게 나타나는 것으로 사료된다.

황놀래기의 난소와 뇌에서 aromatase를 암호화하는 두 개의 cDNA를 클로닝하였다. *CYP19a*와 *CYP19b* mRNA는 각각 1569 bp (522 aa)와 1485 bp (494 aa)의 암호화 부위로 구성되어 있으며, *CYP19a*와 *CYP19b*의 전체 아미노산 서열을 서로 비교하면 63%의 상동성을 보였다. 본 연구에서 클로닝된 황놀래기의 *CYP19* subtypes의 아미노산 서열을 이용하여 이미 보고된 *CYP19* subtype들과 multiple sequence 분석한 결과, 황놀래기 aromatase subtypes는 모두 aromatase 유전자 가족에서 공통적으로 발견되는 membrane-spanning region, I-helix region, Ozol's peptide region, aromatic region 그리고 heme-binding region이 보존되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, phylogeny 분석으로 작성한 consensus tree에도 *CYP19a*와 *CYP19b*의 두 개의 cluster로 구분되었다.

이상의 결과들은 본 연구에서 클로닝된 cDNA가 각각 *ER α* , *ER β* , *CYP19a*와 *CYP19b* cDNA라는 것을 명백히 말해주며, 종간의 배열분석 및 phylogenetic 분석 등의 서열 분석의 결과는 각각의 cDNA가 기능을 갖는 ER 및 aromatase라는 것을 나타낸다. 특히, *ER* subtypes의 경우 특정 도메인의 종간 변이가 뚜렷하기 때문에 진화적인 상관관계가 존재할 가능성이 있으며, 그러한 차이에 의한 기능적인 차이 또한 존재할 수 있을 것으로 보인다.

2. 조수 변화에 따른 삼점놀래기의 생식리듬과 *ER*과 *CYP19* mRNA의 발현

본 연구는 *ER*과 *CYP19* cDNAs의 클로닝과 더불어 오키나와 산호초에 서식하는 삼점놀래기 (*H. trimaculatus*)에서 조류변화에 따른 산란 리듬과

*ER*과 *CYP19* subtypes mRNA 발현과의 상관관계를 조사하였다. 산란기의 삼점놀래기의 암컷에서 조수의 변화에 따라 GSI 값, 난경의 크기, 그리고 난모세포의 조직학적인 관찰 결과, 삼점놀래기의 암컷은 조수의 변화 중 만조 시기에 산란함을 확인하였다.

*ER*과 *CYP19* 유전자는 주로 생식과 연관된 조직에서 발현되기 때문에 본 연구에서는 산란기 암컷을 대상으로 난소와 뇌 조직에서 이 두 종류의 유전자의 발현 양상을 real-time PCR 방법으로 분석하였다. 어류에서 E_2 는 생식과 연관된 여러 가지 생리적 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 실제로 E_2 의 작용은 간에서 Vtg의 합성을 자극한다 (Wallace, 1985; Nagler 등 1987). 성숙한 암컷 black porgy에서 E_2 는 산란기 때 높은 수준으로 증가하며 (Chang과 Yueh, 1990), 산란기 때 난소의 *ER* 유전자는 비산란기 동안 양성생식소의 난소 조직에 비해 유의적으로 더 높은 수준으로 발현된다고 알려져 있다 (Lee 등 2001). E_2 작용으로 합성되어 분비되는 성장인자는 난소 성숙과정에 중요하다 (Richards, 1994; Dorrington 등 1993).

어류에서 E_2 는 gonadotropin의 조절 하에 여포에서 생성되며, 간세포에서의 Vtg 합성을 자극한다 (Nagahama, 1994). 먼저, E_2 는 수용체의 수를 증가시키고 그 후 Vtg의 합성을 유도한다 (Sherwood와 Hew, 1994). 이것은 E_2 가 혈류로 방출되기 전에 난소에서 *ER*의 생산을 위해 쓰인다는 것을 의미한다. 그 후 E_2 는 간으로 이동되어 Vtg 유전자의 전사를 유도하게 된다. 본 연구에서는 만조 시기에 *ER α* 와 *CYP19 α* mRNA가 높게 발현되었다. 따라서 이러한 *ER α* 과 *CYP19 α* 의 발현 양상은 이들 유전자가 배란 및 산란과 연관된 E_2 의 기능을 매개하는 것으로 추정할 수 있다. 난소에서 발현된 *CYP19 α* 가 E_2 를 합성하고, 합성된 E_2 가 배란과 미성숙 난모세포의 발달에 영향을 주는 과정은 *ER α* 에 의해 매개될 수 있다고 사료된다. 특히, 난소에서 *ER α* 와 *ER β* 가 상반되는 발현 양상을 보이는 것은 암컷 산란 시기동안 난소에서의 역할이 다르다는 것을 암시한다 (Socorro 등 2000). 매일 산란하는 종에서 성숙중인 난모세포는 항상 vitellogenesis 과정을 겪지만, 성숙한 난모세포는 germinal

vesicle breakdown (GVBD) 과정을 거치게 되며 그 후에 배란된다 (Matsuyama 등 1998; 2002). 그러므로 만조 때 배란된 후, 모든 성숙중인 난모세포는 vitellogenesis를 겪게 되는데, 특히, 간조 때 vitellogenesis가 활발히 일어나는 것으로 추정된다.

척추동물 뇌 조직에는 aromatase가 존재하며 이로 의해 합성된 E_2 는 다양한 생식 행동에 영향을 미친다. 어류에서 brain type aromatase (*CYP19b*)은 뇌조직에서 특이적으로 발현되며, 생식 시기를 지나면서 그 활성이 극적으로 변하기 때문에, aromatase가 성 스테로이드의 잠재적 조절 효과를 갖는다 (Pellegrini 등 2005). *ER* 역시 뇌에서 발현되며, 주로 preoptic area, mediobasal hypothalamus 그리고 ventral telencephalon과 같은 신경내분비 부위에서 발현된다 (Andreassen 등 2003; Anglade 등 1994; Hawkins 등 2000; Menuet 등 2002). 삼점놀래기의 뇌에서 *ER α* 와 *CYP19b* 발현은 비슷한 양상을 보였다. 이 유전자들은 배란 전 시기인 간조-만조 시기에 중뇌에서 특이적으로 높게 발현되었다. 그러나, *ER β* 는 이 시기에 전뇌에서 높게 발현되었다. 뇌는 환경적 신호와 페로몬의 신호를 신경내분비 신호로 받아들여 gonadotropin- II (GtH- II)의 분비를 조절한다 (Peter와 Yu, 1997). 배란 전 GtH- II 의 분비는 최종난모세포성숙과 배란을 강하게 유도하며, 이 GtH 활성은 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)에 의해 유도된다 (Peter와 Yu, 1997). Striped bass (*Morone saxatilis*)에서 GnRH promoter 부위의 ERE의 존재는 GnRH 합성이 에스트로겐에 의해 조절됨을 시사한다 (Chow 등 1998). 따라서 뇌에서의 mRNA 발현 결과로 볼 때, 에스트로겐이 GnRH와 GtH와 같은 생식과 연관된 여러 호르몬의 분비를 통한 최종난모세포성숙 또는 배란에 영향을 주는 것으로 여겨진다. 특히, 뇌에서의 *CYP19b*와 *ER α* 발현은 *CYP19b*가 *ER α* 와 직접적인 연관이 있다는 것을 보여준다. 게다가, 뇌에서의 *ER α* 와 *ER β* 의 발현은 난소에서와 마찬가지로 조수의 변화 동안 서로 다른 역할을 할 것으로 여겨진다.

본 연구에서 황놀래기에서 *ER*과 *CYP19* subtypes의 염기서열 결정, 조수

의 변화 동안 삼점놀래기의 산란 시점과 *ER α* , *ER β* , *CYP19a* 그리고 *CYP19b*의 발현 양상을 조사하였다. 이번 연구를 통해 삼점놀래기의 생식은 조수의 변화에 따른 리듬을 가진다는 것을 최초로 확인하였으며, *ER*과 aromatase 유전자는 조수의 변화에 따라 뇌와 난소에서 특정한 역할을 할 것으로 예측되었다. 삼점놀래기가 특정한 조수 시기에 산란하는 이유는 확실하지 않지만, Stacey (1984)와 Taylor (1984)의 연구에 비춰볼 때 알의 생존률을 최대로 하기 위해 특정한 시기에 산란하는 것으로 추론된다. 그리고, *ER α* 는 조수의 변화 동안 생식에 있어서 *ER β* 보다 내분비적 조절에 더 밀접한 연관이 있을 것으로 보인다. 앞으로 산란 리듬과 *ER*, *CYP19* subtypes의 상호연관성을 이해하기 위해서 페로몬과 같은 외부 인자에 대한 조사, 뇌 조직에서 E₂의 생성 억제를 통한 기능 연구, 그리고 생식과 성적 행동에 관련된 호르몬에 대한 분자생물학적 연구가 필요하다.



인용문헌

- Andreassen, T. K., K. Skjoedt, I. Anglade, O. Kah, and B. Korsgaard. 2003. Molecular cloning, characterisation, and tissue distribution of oestrogen receptor alpha in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 356 - 368.
- Anglade, I., F. Pakdel, T. Bailhache, F. Petit, G. Salbert, P. Jego, Y. Valotaire and O. Kah. 1994. Distribution of estrogen receptor immunoreactive cells in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neuroendocrinol.* 6: 573 - 583.
- Aschoff, J. 1981. Handbook of Behavioral Neurobiology 4. Biological Rhythms. Plenum Press, New York.
- Berry, M., D. Metzger and P. Chambon. 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9: 2811-2818.
- Beyer, C. 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat. Embryol.* (Berl.) 199: 379-390.
- Blazquez, M. and F. Piferrer. 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol. Cell.*

Endocrinol. 219: 83 - 94.

Callard, G. V., Z. Petro and K. J. Ryan. 1978. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system, *Endocrinol.* 103 6: 2283 - 2290.

Cavaco, J. E. B., C. Vilroxx, V. L. Trudeau, R. W. Schulz and H. J. T. Goos. 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Am. J. Physiol.* 44: 1793 - 1802.

Chang C. F. and W. S. Yueh. 1990. Annual cycle of gonadal histology and steroid profiles in the juvenile males and females of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Aquacul.* 91: 179 - 196.

Chang, X. T. Kobayashi, T. Todo, T. Ikeuchi, M. Yoshiura, H. Kaijura-Kobayashi, C. Morry and Y. Nagahama. 1999. Molecular cloning of estrogen receptors α and β in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zool. science* 16: 653-658.

Chiang, E. F., Y. L. Yan, S. K. Tong, P. H. Hsiao, Y. Guiguen, J. Postlethwait and B. C. Chung. 2001. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. *J. Exp. Zool.* 290: 709 - 714.

Choi, C. Y. and H. R. Habibi. 2003. Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 204: 169 - 177.

- Conley, A. and M. Chritenso, S. P. Ford, R. K. Geisert, and J. I. Mason. 1992. Steroidogenic enzyme expression in porcine conceptuses during and after elongation. *Endocrinol.* 131: 896-902
- Conley, A. and M. Hinshelwood. 2001. Mammalian aromatases, *Reproduc.* 121 (5) 685 - 695.
- Chow, M. M., K. E. Kight, Y. Gothilf, D. Alok, J. Stubblefield, and Y. Zohar. 1998. Multiple GnRHs present in a teleost species are encoded by separate genes: analysis of the sbGnRH and cGnRH-II genes from the striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Mol. Endocrinol.* 21: 277-289
- Danielian, P. S., R. White, J. A. Lees and M. G. Parker. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11: 1025-1033.
- Dorrington, J. H., J. J. Bendell. and S. A. Khan. 1993. Interactions between FSH, estradiol-17-beta and transforming growth factor-beta regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44: 441 - 449.
- Ekstrom, P. and H. Meissl. 1997. The pineal organ of teleost fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 7: 199 - 284.
- Enmark, E. and J. A. Gustafsson. 1999. Oestrogen receptors: an overview. *J. Intern. Med.* 246: 133 - 138.

- Enmark, E., Gustafsson, J.A., 1999. Oestrogen receptors: an overview. *J. Intern. Med.* 246: 133 - 138.
- Evans, R. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240: 889-895.
- Fawell S. E., J. A. Lees, R. White and M. G. Parker. 1990a. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell.* 60: 953-962.
- Fawell S. E., R. White, S. Hoare. M. Sydenham, M. Page and M. G. Parker. 1990. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6883-6887.
- Forlano, P. M., D. L. Deitcher, D. A. Myers and A. H. Bass. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: Aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J. Neurosci.* 21 22: 8943-8955
- Gelinas, D., G. A. Pitoc, and G. V. Callard. 1998. Isolation of a goldfish brain Cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 138: 81-93
- Gerkema, M. P., J. J. Videler, J. De Wiljes, H. Van Lavieren, H. Gerritsen and M. Karel. 2000. Photic entrainment of circadian activity patterns

in the tropical labrid fish *Halichoeres chrysus*. *Chronobiol. Int.* 17: 613 - 622.

Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos and P. Chambon. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature*. 320: 134-139.

Hawkins, M. B., J. W. Thornton, J. K. Skipper, A. Dotte and P. Thomas. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Biochem.* 20: 10751-10756.

Hawkins, M. B., J. W. Thornton, D. Crews, J. K. Skipper, A. Dotte and P. Thomas. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10751 - 10756

Huang, Y., W. Yueh, J. Huang, J. Du, L. Sun, Y. Nagahama and C. Chang. 2002. Cloning and expression of estrogen receptors in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*): Implications of sex change mechanism. *Mar. Biotechnol.* 4: 236-246.

Iigo, M., H. Kezuka, T. Suzuki, M. Tabata and K. Aida. 1994. Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 563 - 569.

Iigo, M. and M. Tabata. 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in

the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.* 60: 775 - 781.

Kim, S. J., K. Ogasawara, J. G. Park, A. Takemura and M. Nakamura. 2002. Sequence and expression of androgen receptor and estrogen receptor gene in the sex types of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127: 165-173.

Kobayashi, M., P. W. Sorensen and N. E. Stacey. 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiol Biochem.* 26: 71-84

Krust, A., S. Green, P. Argos, V. Kumar, P. Walter, J. M. Bornert and P. Chambon. 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5: 891-897.

Lee, Y. H., J. L. Du, W. S. Yueh, B. Y. Lin, J. D. Huang, C. Y. Lee, M. F. Lee, E. L. Lau, F. Y. Lee, C. Morray, Y. Nagahama, and C. F. Chang. 2001. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* : A review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *J. Exp. Zool.* 290: 715-726

Lenke, R. 1988. Hormonal control of sleep-appetitive behaviour and diurnal activity rhythms in the cleaner wrasse *Labroides dimidiatus* (Labridae, Teleostei). *Behav. Brain Res.* 27: 73 - 85.

- Lephart E. D. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450, *Brain Res. Rev.* 22: 1-26
- Lewandowski, S., K. Kalita and L. Kaczmarek. 2002. Estrogen receptor beta: potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett.* 524: 1 - 5.
- Ma, C. H., K. W. Dong and K. L. Yu. 2000. cDNA cloning and of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1490: 145-152.
- Matsuyama, M., S. Morita and M. Kashiwagi. 2002. Endocrine control of diurnal oocyte maturation in the Kyusen wrasse, *Halichoeres poecilopterus*. *Zool Sci.* 19: 1045-1053
- Matsuyama, M., S. Morita. T. Nasu and M. Kashiwagi. 1998. Daily spawning and development of sensitivity to gonadotropin and maturation-inducing steroid in the oocytes of the bambooleaf wrasse *Pseudolabrus japonicus*. *Env Biol Fish.* 52: 281-290
- Matsuyama, M., S. Morita and M. Kashiwagi. 2002. Endocrine control of diurnal oocyte maturation in the Kyusen wrasse, *Halichoeres poecilopterus*. *Zool Sci.* 19: 1045-1053
- Matsuyama, M., S. Morita, T. Nasu and M. Kashiwagi. 1998. Daily spawning and development of sensitivity to gonadotropin and maturation-inducing steroid in the oocytes of the bambooleaf wrasse

Pseudolabrus japonicus. *Env Biol Fish*. 52: 281-290

- Menuet, A., E. Pellegrini, I. Anglade, O. Blaise, V. Laudet, O. Kah and F. Pakdel. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66: 1881 - 1892.
- Menuet, A., E. Pellegrini, I. Anglade, O. Blaise, V. Laudet, O. Kah and F. Pakdel. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66: 1881 - 1892.
- Mommsen, T. P., and P. J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In *Fish Physiology* (W. S. Hoar and D. J. Randall, Eds.), Vol XIA, pp. 347 - 406. Academic Press, New York.
- Montano, M. M., V. Müller, A. Trobaugh and B. S. Katzenellenbogen. 1995. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol.* 9: 814 - 825.
- Munoz-Cueto J. A., E. Burzawa-Gerard, O. Kah, Y. Valotaire and F. Pakdel. 1999. Cloning and sequencing of the gilthead sea bream estrogen receptor cDNA. *DNA Seq.* 10: 75-84.
- Nagahama, Y. 1997. $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action.

Steroids. 62: 190-196

- Nagahama, Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita and M. Tanaka. 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. *Fish Physiology*. In: Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP, editors. *Mol. Endocrinol. Fish*. Vol. XIII: London: Academic Press. pp 393-439.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gamatogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-229
- Nagler, J. J., S. M. Ruby, D. R. Idler and Y. P. So. 1987. Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol injected immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian J. Zool.* 65: 2421 - 2425.
- Nancy M. Sherwood & Choy L. Hew. 1994. Structure and regulation of genes for estrogen receptors. *Fish Physiology*, vol. 8. pp. 332
- Negri-Cesi, P., A. Poletti and F. Celotti. 1996. Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 α -reductase and aromatase in brain differentiation and functions, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58: 455 - 466.
- Nishi, G. 1989. Locomotor activity rhythm in two wrasses, *Halichoeres tenuispinnis* and *Pteragogus flagellifera*, under various light conditions. *Jpn. J. Ichthyol.* 36, 350 - 356.

- Nishi, G. 1991. The relationship between locomotor activity rhythm and burying behavior in the wrasse, *Suezichthys gracilis*. *Jpn. J. Ichthyol.* 37: 402 - 409.
- Nishi, G. and H. Abe. 1990. Relationship between the habit of burying itself in sand and locomotor activity rhythm in the wrasse, *Halichoeres tenuispinnis*. *J. Fac. Marine Sci. Technol. Tokai Univ.* 31: 69 - 75.
- Nishi, G. 1990. Locomotor activity rhythm in four wrasse species under varying light conditions. *Jpn. J. Ichthyol.* 37: 170 - 181.
- Ohta, K. and M. Matsuyama. 2002. Steroidogenic pathways to 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the ovarian follicles of the bambooleaf wrasse *Pseudolabrus sieboldi*. *Fish Sci.* 68: 41-50
- Pakdel, F., R. Metivier, G. Flouriot and Y. Valotaire. 2000. Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. *Endocrinol.* 141: 571-580.
- Park, H. B. Jeong, D. J. Oh, K. M. Hyun and S. J. Kim. 2005. Molecular cloning of two estrogen receptors from the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. *Korean J. Genet.* 27: 97-105
- Pellegrini, E., A. Menuet, C. Lethimonier, F. Adrio, M. M. Gueguen, C.

- Tascon, I. Anglade, F. Pakdel and O. Kah. 2005. Relationship between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 60-66
- Peter, R. E. and K. L. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 7: 173-197.
- Richards, J. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev.* 15: 725 - 751.
- Sanchez-Vazquez, F. J., J. A. Madrid, S. Zamora, M. Iigo and M. Tabata. 1996. Demand-feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol. Behav.* 60: 665 - 674.
- Schwabe, J. W., D. Neuhaus and D. Rhodes. 1990. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature.* 348: 458 - 461.
- Socorro, S., D. M. Power, P-E. Olsson, and A. V. M. Canario. 2000. Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata* : cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *J. Endocrinol.* 166: 293-306.
- Specker, J L. and C. V. Sullivan. 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In "Perspectives in Comparative Endocrinology"(ed. Davey, K.G., R.E. Peter, S.S. Tobe). National Research Council of Canada, Ottawa, pp 304-315



- Stacey, N. E. 1984. Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In “fish reproduction, Strategies and Tactics”(ed. Potts, G.W. and R.J. Wootton). Academic Press, London. pp. 207-222
- Takemura, A. 1993. Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*. 115, 233-241.
- Taylor, M. H. 1984. Lunar synchronization of fish reproduction. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 484-493.
- Tchoudakova A., S. Pathak and G. V. Callard. 1999. Molecular cloning of an estrogen receptor beta subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 388-400.
- Tchoudakova, A. and G. V. Callard. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinol.* 139: 2179 - 2189.
- Tchoudakova, A. and G. V. Callard. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinol.* 139: 2179 - 2189.
- Tchoudakova, A., M. Kishida, E. Wood, G. V. Callard. 2001. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78: 427 - 439.

- Tchoudakova, A., S. Pathak, G. V. Callard. 1999. Molecular cloning of an estrogen receptor beta subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 388 - 400.
- Thomas P., Y. Zhu and M. Pace. 2002. Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids.* 67: 511-517
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Todo, T., S. Adachi and K. Yammeuchi. 1996. Molecular cloning and characterization of japanese eel estrogen receptor cDNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 119: 37-45.
- Tora, L., J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer and P. Chambon. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* 59: 477-487.
- Touhata, K., M. Kinoshita, Y. Tokuda, H. Toyohara, M. Sakaguchi, Y. Yokoyama and S. Yamashita. 1999. Sequence and expression of a cDNA encoding the red sea bream androgen receptor. *Biochem. Biophys. Acta.* 1449: 199-202.

- Tremblay, G. B., A. Tremblay, N. G. Copeland, D. J. Gillbert, N. A. Jenkins and F. Labrie. 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.* 11: 353-365.
- Tyler, C. R. and J. P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in teleost. Reviews in *Fish Biol. Fisheries.* 6: 287-318
- Wallace, R. A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In "Developmental Biology"(ed. Browder, L.W.). vol 1. New York: Plenum Press. pp.127 - 177
- Xia, Z., W. L. Gale, X. Chang, D. Langenau, R. Patino, A. G. Maule and L. D. Densmore. 1999. Cloning, in vitro expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 360-368.
- Xia, Z., W. L. Gale, X. Chang, D. Langenau, R. Patino, A. G. Maule and L. D. Densmore. 2000. Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of channel catfish estrogen receptor β . *Gen. Comp. Endocrinol.* 118: 139-149.
- Xu, L., Q. Pan-Hammarstrom, A. Forsti, K. Hemminki, L. Hammarstrom, D. Labuda, J. A. Gustafsson and K. Dahlman-Wright. 2003. Human estrogen receptor beta 548 is not a common variant in three distinct populations. *Endocrinol.* 144: 3541 - 3546.

- Yamahira, K. 2001. Experimental examination of interpopulation variation in reproductive timing of a fish. *Oecologia*. 128: 389-399.
- Yamahira, K. 1993. Combined effects of tidal and diurnal cycles on spawning of the puffer, *Takifugu niphobles* (Tetraodontidae). *Env. Biol. Fish* 40: 255-261.
- Yamahira, K. 1994. Combined effects of tidal and diurnal cycles on spawning of the puffer, *Takifugu niphobles* (Tetraodontidae). *Env. Biol. Fish* 40: 255-261
- Yamamoto, K. R. 1985. Origins of conserved gene regulations. *Annu. Rev. Genet.* 19: 209 - 252.



요 약

어류의 생식에 중요한 역할을 하는 estrogen의 작용은 estrogen receptors (ERs)에 의해 매개된다. Estrogen은 testosterone에서 aromatase에 의해 전환된다. 어류에서는 3종류의 ER subtypes ($ER\alpha$, $ER\beta$, $ER\gamma$ or $ER\beta 2$)과 두 종류의 aromatase subtypes ($CYP19a$ and $CYP19b$)이 존재한다고 알려져 있다. 본 연구는 자성선숙어인 놀래기류의 생식과정에서 ERs과 aromatases의 기능을 규명하기 위한 기초연구로 수행되었다. 우선 제주연안에 서식하는 황놀래기에서 ER과 CYP19 cDNAs를 RACE방법으로 클로닝하였다. 황놀래기의 $ER\alpha$, $ER\beta$, $CYP19a$ 그리고 $CYP19b$ 의 ORF 크기는 각각 약 1.6 Kb, 2 Kb, 1.6 Kb 그리고 1.5 Kb이었다. 이들 cDNA 염기서열을 분석한 결과, nuclear receptor와 aromatase에서 공통적으로 나타나는 특징들을 가지고 있었으며, 놀래기의 각 유전자와 가장 유사하였다. 또한 오키나와 연안에 서식하는 삼점놀래기에서 조수변화에 따른 $ER\alpha$, $ER\beta$, $CYP19a$ 그리고 $CYP19b$ 의 유전자 발현을 real-time PCR 방법으로 분석하였다. 본 연구에서 삼점놀래기가 만조 때 산란함을 최초로 확인하였다. 난소에서 $ER\alpha$ 와 $CYP19a$ 는 만조 시기에 높게 발현되었고, $CYP19a$ 는 만조 이후에 더 높은 발현양상을 보였다. $ER\beta$ 의 발현은 $ER\alpha$ 와 반대의 양상을 보였다. $ER\alpha$ 는 간조-만조 시기에 전뇌, 중뇌, 후뇌의 모든 부분에서 발현되었고, 특히 중뇌에서 가장 높게 발현되었다. 그러나 $ER\beta$ 는 간조-만조 시기에 전뇌에서 특이적으로 높게 발현되었다. $CYP19b$ 는 간조-만조 시기에 중뇌에서 특이적인 발현양상을 보였다. 본 연구 결과는 ERs과 CYP19s 유전자 발현이 놀래기류의 생식리듬에 밀접하게 연관되어 있음을 보여주었다.

감사의 글

처음 실험실 생활을 시작한게 엇그제 같은데 벌써 석사과정을 마치고 이렇게 논문을 쓰게 되었습니다. 아무것도 모르고 시작했던 실험실 생활에서부터 이렇게 졸업 논문을 완성하기까지 많은 도움을 주신 모든 분들께 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 우선 저를 낳아주시고, 공부를 할 수 있게 끝까지 밀어주시는 부모님, 본 논문을 쓸 수 있게 물심양면으로 너무도 큰 은혜를 베풀어 주신 김세재 교수님을 비롯하여, 마냥 어렵게만 느껴졌지만 종종 농담을 던지시며 편하게 대해 주셨던 오문유 교수님, 대학에서의 학문적 성취를 위해 많은 가르침을 주신 이용필 교수님, 오덕철 교수님, 김문홍 교수님, 김원택 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님, 이선령 교수님께 머리숙여 감사를 드립니다. 오키나와의 세소코 연구소에 있을적에 많은 도움을 주셨던 다케무라 선생님을 비롯하여 류큐대학 CEO 프로그램 관계자 여러분들께 감사하다는 말을 전하고 싶고, 약 두 달간 같이 지냈던 세소코 연구소의 학생들도 다시 만나고 싶습니다. 학부생 시절부터 오늘에 이르기까지 많은 도움을 주셨고 끊임없는 충고로 보다 나은 학문의 길을 걷게 해주신 여러 선배님들, 특히 저로 인해 많은 스트레스를 받으시면서도 많은 지도를 해주신 박지권 박사님, 나태혜져 가는 저를 질책하시며 앞으로 나아가야 할 방향을 제시해 주셨던 정용환 박사님, 어려움이 있을 때마다 큰 도움을 주시는 양인석 선배님, 신혼임에도 불구하고 열과 성을 다해 일하시는 모습이 본 받을만한 박수영 박사님, 학부시절 가장 오랜시간 함께 실험하며 많은 것을 가르쳐주신 한상현 박사님, 저를 마치 친동생처럼 챙겨주신 윤미누나, 학과조교를 담당하며 많이 힘드셨음에도 불구하고 저에게 많은 신경을 써 주신 정형복 선배님, 실험결과가 잘 안나와 속상해 하면서도 언제나 웃음을 잃지 않는 진영준 선배님, 이제 곧 아빠가 될 김재환 선배님, 자신의 연구 분야에 큰 꿈을 가지고 계신 정용욱 선배님, 멀리 미국에서 고생하시는 송지훈 선배님께 감사를 드립니다. 이 밖에

도 기술혁신센터에서 연구를 하고 계시는 정완석 박사님, 최수연 선생님, 윤
훈석 선배님, 고희철 선배님을 비롯한 많은 분들께도 감사를 드립니다. 같이
자취방 생활을하면서 함께 고생하였고 이제 석사과정에 들어와 연구에 매진
하게 될 성일이, 새로운 분야에서 잘 적응하며 열심히 연구하는 준호, 학과조
교생활을 시작하게 된 경만이, 한 학기 늦게 대학원에 진학한 동기 경식이,
항상 웃으며 즐겁게 지내는 미경이랑 주연이, 볼링 매니아 재웅이, 다른 대학
에서 대학원 생활을 하고 있는 효정이, 실수를 많이 해서 늘 고생하는 무한
이, 여학생임에도 불구하고 여느 남학생들 보다는 더 늦게까지 열심히 실험하
는 윤정이, 보기와 달리 영똥한 구석이 많은 은주랑 현재, 짧은 시간동안 많
은 실험을 배웠고 열심히 생활하는 혜선이, 1학년임에도 실험실 생활을 자청
한 혜진이 등 실험실 안과 밖에서 많은 도움이 되어준 후배들에게도 고맙다
는 말을 전합니다. 마지막으로, 항상 저를 응원해준 고마운 친구들, 성하, 효
진, 길홍, 종석, 정석, 후영, 희선, 세미, 정화, 은정, 승미, 상미와 그 밖의 많
은 친구들에게도 고맙다는 말을 전합니다. 마지막으로 석사 동기인 민철이,
지영이, 김홍림 선배님을 비롯하여 고영민 선생님, 정상배 선생님, 이동헌 박
사님, 송관필 선배님, 오순자 선배님, 현화자 선배님, 송국만 선배님께도 감사
의 마음을 전합니다.

본 논문이 나오기까지 많은 분들이 도와 주셨고, 응원해 주셨습니다. 여러
교수님들, 선배님들, 친구들, 후배들, 이 모든 분들께 늘 좋을 일만 있기를 기
원하며, 앞으로도 열심히하는 모습 보여드리도록 노력하겠습니다. 모든 분들
께 다시 한번 감사를 드립니다. 감사합니다.