

자리돔(*Chromis notata*)의 FSH β 와 LH β 의 subunit의 분리 및 동정

이치훈 · 박용주 · 송기수 · 이영돈*

제주대학교 해양과학연구소

Isolation and Identification of FSH β and LH β Subunits in the *Chromis notata*

Chi-Hoon Lee, Yong-Ju Park, Gi-Soo Song and Young-Don Lee*

Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 695-965, Korea

We cloned and sequenced the FSH β and LH β subunits from the pituitary of the *Chromis notata*. The partial-length cDNAs of FSH β and LH β were 346 bp and 275 bp, encoding 114 amino acid (aa) and 91 aa, respectively. The deduced amino acid sequences of FSH β and LH β were highly homologous (75-93%) to those of other Perciformes; *Channa maculata*, *European seabass*, *Tilapia mossambicus* and *Dicentrarchus labrax*. Phylogenetic analysis showed that the deduced FSH β amino acid sequences is closely related to the rainbow trout and tilapia, and LH β amino acid sequences were are closely related to the Mozambique tilapia and *C. maculata*. The FSH β was present in brain, pituitary, liver, gonad but LH β mRNA exhibited high abundance in the pituitary gland, as determined by RT-PCR.

Key words : *Chromis notata*, Pituitary, Gonadotropin, FSH β , LH β

서론

제주도 연안에 서식하는 자리돔류는 정착성 어류로서 제주 고유의 특산 어종이다. 특히 자리돔(*C. notata*)는 제주도 전 연안에서 가장 많

이 포획되는 어종으로 물회, 구이 및 젓갈 등의 해산요리로서 오랫동안 제주 도민뿐만 아니라 관광객들에게 여름 별미의 요리로 각광을 받아 왔다. 그러나 기후변화 등의 영향으로 울릉도 등 동해뿐만 아니라 남해, 서해 등으로 어장이 빠르게 북상함으로써 예전과 같은 많은 어획량을

확보하기 힘든 실정이다.

현재까지 자리돔에 관한 연구는 주로 외부형태(Kim and Kim, 1996, 1997), 생식주기 및 정자 구조에 관한 연구 보고가 대부분이고, 일부 종의 난발생 및 자어 형태발달(Kim et al., 2001)와 한국 자리돔류의 계통유연관계에 관한 연구(Koh and Park, 2007) 등이 보고되었지만, 자리돔의 생리활성 인자에 관한 연구는 드문 실정이다. 어류의 번식생리 정보는 환경변화에 따른 연안자원의 모니터링에 중요한 자료가 되며, 최근 생리활성 리듬의 제어에 관여하는 환경요인(수온, 광주기, 먹이, 조석, 해류 등)을 탐색하여, 환경요인과 생리활성 인자의 변동에 대해 내분비학적, 분자생물학적 기법을 활용한 연구들이 진행되고 있다. 난모세포 발달에 관여하는 FSH는 에스트로겐(17β -estradiol, E2)의 생성 및 vitellogenin (VTG) 합성 등 성 스테로이드를 조절함으로써 초기 배우자 형성 및 생식소 성장에 관여하고, LH는 난모세포의 최종성숙 및 배란유도에 관여한다(Mateos et al., 2002; Ando et al., 2004; Kobayashi et al., 2006; Ko et al., 2007). 이 호르몬들은 각각 α 와 β 의 2가지 subunit로 구성되며, α -subunit은 종 내에서 구조적으로 동일한 반면, β -subunit은 호르몬 간의면역학적 및 생물학적으로 서로 다른 특성을 나타낸다(Pierce and Parsons, 1981).

이 연구는 자리돔의 생식소 발달과 성숙에 관여하는 FSH와 LH의 활성을 조사하기 위해 FSH와 LH의 β subunit cDNA cloning을 실시하여 유전인자를 동정하였다. 또한 각각 유전자의 특정 전사부위를 조사하기 위해 뇌의 중추신경 조직들과 주변조직들에서 그 발현 정도를 확인

하였다.

재료 및 방법

실험어

제주대학교 해양과학연구소의 사육 중인 자리돔 성어로부터 뇌하수체를 적출하여 FSH β 와 LH β cDNA의 분리 및 동정에 사용하였으며, 각각 유전자의 조직별 발현은 실험어를 MS-222로 마취 한 후, 뇌와 뇌하수체(pituitary)와 주변조직인 간(liver)과 생식소(gonad) 등을 적출하여 조사하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

실험어의 각 부위에서 적출한 50-100 mg의 조직들은 1.5 mL tube에 넣어서 300-500 μ L의 TRI Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 첨가하여 사용한 시약의 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 NanoVue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 농도를 측정하였고, 흡광도 비율(A260/A280 nm)이 1.7-2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA를 선택하여 실험에 사용하였다. cDNA 제조는 각 조직에서 추출한 total RNA 1 μ g을 주형으로 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Takara, Japan)을 이용하여 역전사 시켜 합성하였다. 합성 반응은 Oligo dT primer 1 μ L, PrimeScriptTM RT enzyme mix 1 μ L 그리고 5 \times PrimeScriptTM Buffer 4 μ L를 첨가하였고 nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 20 μ L이 되도록 조절하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 역전사 반응을 실시하였으며, 이후 85 $^{\circ}$ C에서

5초간 가열하여 합성을 중단하였다. 합성된 cDNA는 각 유전자의 cloning 및 mRNA 발현 분석에 사용되었다.

FSH β 와 LH β cDNA 증폭 및 cloning

생식선자극호르몬 유전자 FSH β 와 LH β subunit의 부분염기서열 분리를 위한 degenerated primer는 NCBI의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록되어 이미 밝혀진 *Pseudolabrus sieboldi* (Accession number, FSH β : AB300390, LH β :AB300391), *Channa maculata* (Accession number, FSH β : AY447038, LH β : AY447037)와 *Odontesthes bonariensis* (Accession number, FSH β : AY319832, LH β : AY319833)의 유전자 정보를 참고로 제작하였다. PCR 반응은 1 μ L의 cDNA를 주형으로 Go Taq Green Master Mix (Promega, USA)와 primer 세트 그리고 nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 25 μ L이 되도록 조절하여 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 열변성 후 94 $^{\circ}$ C 45초, 55 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 1분을 35회 반복하여 cDNA를 증폭하였으며, 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel를 이용한 전기영동으로 확인하여 정제하였다. 정제된 각각의 증폭 유전자 산물은 pGEM-T easy vector (Promega)에 ligation하여 plasmid DNA를 만든

후, JM109 competent cell (Takara, Japan)에 형질 전환하였다. LB agar (Sigma, USA) 고체배지를 이용해 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양된 clone 중 3개를 선택하여 LB broth (Sigma) 액체배지에서 37 $^{\circ}$ C에서 10시간 동안 cell을 대량으로 배양하였다. 그 후 cell로부터 plasmid DNA를 정제하여 유전체 분석기관(Genotech, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다. 각 유전자의 전염기서열은 SMART RACE cDNA amplication kit (Clontech, USA)를 이용하여 분리하였으며, 5'과 3' cDNA 단편을 위한 종 특이적 primer는 확인된 부분염기서열 정보를 이용하여 합성하였다. 제작된 FSH β 와 LH β subunit의 5'과 3' cDNA 단편 증폭용 primer set는 다음과 같다 (Table 1).

계통발생학적 유연관계 분석

자리돔 FSH β 와 LH β 유전자의 중간 계통유연관계 분석은 Phylip 프로그램을 활용한 neighbor-joining 기법에 의해 조사되었다. 각 종들의 아미노산 서열 Multiple alignment는 ClustalW 프로그램을 이용하여 분석하였다. BOOTSTRIP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1000 세트는 PRODIST 프로그램에 의해 distance matrices를 계

Table 1. Nucleotide sequences of the FSH, LH and 18s rRNA primers used in the cloning and RT-PCR

Primer	Sequence (from 5' to 3')	Remark
FSH-F	TGGTWTGCATGGCAGCAGTG	Forward degenerated primer for FSH cDNA fragment
FSH-R	AKACAGCTGGGTRTGTCTCC	Reverse degenerated primer for FSH cDNA fragment
LH-F	TCAACCAGACMGTGTCTCTG	Forward degenerated primer for LH cDNA fragment
LH-R	CTCGAAGGTGCAGTCAGAYG	Reverse degenerated primer for LH cDNA fragment
18s rRNA-F	AAACGGCTACCACATCCAAG	Reverse degenerated primer for 18s rRNA cDNA fragment
18s rRNA-R	CCTCCGACTTTCGTTCTTGA	Reverse degenerated primer for 18s rRNA cDNA fragment

산하였다. 계산된 distance matrices는 neighbor 프로그램의 tree 작성 input 데이터로 활용되었고, CONSENSE 프로그램을 이용하여 consense tree를 작성하였다. Out group은 쥐의 FSH β subunit를 이용하였다.

RT-PCR

자리돔의 뇌, 뇌하수체, 난소 조직에서 FSH β 와 LH β mRNA 유전자의 발현조사는 RNA추출 과정에서 발생하는 genomic DNA 오염을 방지하여 보다 정확한 mRNA 측정값을 얻기 위해, 추출된 total RNA에 RQ1 RNase-Free DNase (Promega)을 처리한 후 cDNA 합성을 실시하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 분리된 염기서열을 참고로 제작하였으며, control 유전자(housekeeping gene)로는 18s rRNA를 사용하였다. RT-PCR 반응은 1 μ l의 cDNA를 주형으로 Go taq Green Master mix (Promega, USA)와 primer 세트를 혼합하여 최종 반응량이 25 μ l가 되도록 조절하였다. PCR 반응은 95°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 90초씩 총 32회 반복하여 각 유전자의 cDNA를 증폭하였으며, 증폭된 cDNA산물은 1% agar gel을 이용해서 100 V에서 35분간 전기영동을 실시하여 발현을 확인하였다.

결과 및 고찰

자리돔 뇌하수체로부터 증폭한 FSH β 와 LH β cDNA를 클로닝하여 부분염기서열을 분석한 결과, FSH β 와 LH β cDNA 길이는 각각 346 bp와 275 bp이었으며, 각 유전자의 nucleotide에 coding된 아미노산은 각각 114개, 91개로 확인되었다(Fig.

1). 자리돔 FSH β 와 LH β 의 아미노산 서열을 다른 종에서 보고된 아미노산 서열과 비교 분석한 결과, FSH β 의 경우 *Channa maculata*와 78%, *European seabass*와 75%의 상동성을 나타냈으며, 또한 LH β 의 경우 Mozambique tilapia(*Oreochromis mossambicus*)와 93%, *European seabass (Dicentrarchus labrax)*와 90%의 상동성을 보였다(Fig. 2). 종간 계통유연관계를 분석한 결과, 자리돔의 FSH β 은 rainbow trout와 tilapia에 가까운 유연관계를 보였고, LH β 는 Mozambique tilapia와 *C. maculata* 가까운 유연관계를 보였다 (Fig. 3). 자리돔의 뇌, 뇌하수체, 간, 난소 조직과 혈액에서 FSH β 및 LH β mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, FSH β 은 조사된 모든 조직에서 유사한 발현이 관찰되었으나, LH β mRNA 발현은 뇌하수체에서만 강하게 발현되었으며, 뇌, 생식소, 혈액에서 희미하게 발현이 관찰되었다 (Fig. 4). 또한 RT-PCR 반응과정 중에 genomic DNA에 의한 PCR 증폭오류를 확인하기 위해, RT-PCR 반응시 역전사 효소를 넣지 않은 RT(-)의 cDNA에서는 FSH β 및 LH β mRNA 모두 발현되지 않아 genomic DNA 증폭의 없음이 확인되었다 (Fig. 4).

어류의 번식내분비계는 뇌-뇌하수체-생식소 축 (brain-pituitary-gonad; B-P-G axis)으로 이루어져 있으며, 각각의 기관들은 서로 상보적인 기능에 의하여 조절되어진다. 어류의 번식내분비계 활동은 빛과 수온 등 외부환경요인에 의하여 개시되어진다(Goos, 1993). 어류의 외부자극 신호는 감각기관을 통해 수용된 후, 다양한 내분비 신호로 전환되며 이중 번식활성을 조절하는 GTH는 뇌하수체에 집중적으로 분포하고 있다

A

```

3 GTAGTCATGGCAGCAGTGCTGGCGCTGGCGGGGGCGGGGAAGAGCTGCAGCTTCGGCTGT
  V V M A A V L A L A G A G K S C S F G C
63 CGTCCAACAAACATCAGCATCCAGTGGAGAGCTGTGGCACCACCGAGTTAGTGTACACC
  R P T N I S I P V E S C G T T E L V Y T
123 ACCATATGTGAAGGACAGTGTACCACGAGGATCCCATCTACATCGACTACGATGACTCG
  T I C E G Q C Y H E D P I Y I D Y D D S
183 GCTGAACAGCAGATCTGTAACGGCGACTGGTCCTACGAGGTGAAATATATCAGCGGATGT
  A E Q Q I C N G D W S Y E V K Y I S G C
243 CCGATCGGCGTACGTATCCTGTGGCCAAAACCTGCGAGTGCAGCGTGTAAATGCAGGA
  P I G V T Y P V A K N C E C A A C N A G
303 AATACAGACTGCGGGCGATTCCTGGAGACACACCCAGCTGTAT 346
  N T D C G R F P G D T P S C
  
```

B

```

3 AACCAGACCGTGTCTCTGGAGAAGGAGGGATGTCTCGGTGTCACCCGGTGGAAACCACC
  N Q T V S L E K E G C P R C H P V E T T
63 ATCTGCAGCGGACACTGTATCACCAAGGACCCCGTGCAGAAAGATCCCCTTCAGCAATGTG
  I C S G H C I T K D P V R K I P F S N V
123 TACCAACATGTGTGCACCTACCAGGACCAGTACTACAAGACGTTTGAGCTTCCTGACTGC
  Y Q H V C T Y Q D Q Y Y K T F E L P D C
183 CCCCAGGCGTGGATCCCATCGTACACTACCCGGYGGCCACGAGCTGCCACTGCGGGCGGA
  P P G V D P I V T Y P V A T S C H C G G
243 TGTGCCATGGACACATCTGACTGCACCTTCGAG 275
  C A M D T S D C T F E
  
```

Fig. 1. The partial nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding the *Chromis notata* FSH β (A) and LH β (B) subunits. The nucleotide numbers are shown on the left-hand side of sequence, and the amino acid residue number below the amino acid sequence. Amino acids are given as single capital letters below the cDNA sequences.

FSH-C. <i>notata</i>	---VVMAAVLALAGAGKSCSFGCRPTNISIPVESC GTTELVTITICEGQCYHEDPIYIDY	57
FSH-C. <i>maculata</i>	MQLVVIAAVLALTGAGQGCSFGCHPPNISIPVDSG GITEYIYTTICAGQCYHEDPIYIGH	60
FSH-E. <i>seabass</i>	MQLVVMVAVLALARAGQGCSFGCHPTNISIQVESC GLTEVIYTTICEGQCYHEDLVYLSH	60
	:.***: **:.*****:*****:*** ** :***** ***** :*:.:	
FSH-C. <i>notata</i>	DDSAEQQICNGDWSYEVKYSISGCPIGVTPVVAR NCECAACNAGNTDCGRFPGDTPSC---	114
FSH-C. <i>maculata</i>	HDWTEQKICNGDWSYEVKHHHGCPVAVTYPVAR NCECTACNAGNTYCGRFPGLPSCMTL	120
FSH-E. <i>seabass</i>	YERPEQRICNGDWSYEVKHIKGPVGVTPVAR NCECTTCNTENTDCGRFPGDIPLSLF	120
	: _*:.*****:***:*****:*****:***: ** ***** **	
LH-C. <i>notata</i>	-----NQTVSLEKEGCPRCHPVET	19
LH-M. <i>tilapia</i>	----ISRMLLALMLSLFVGAST--FILSPAAAFQL PQCQLINQTVSLEKEGCPKCHPVET	54
LH-E. <i>seabass</i>	MAVQASRVMFPLVLSLFLGATSSIWPLATAEAFQL PQCQLINQTVSLEKEGCPKCHPVET	60
	***** *****	
LH-C. <i>Notata</i>	TICSGHCITKDPVRKIPFSNVYQHVCTYQDQYYR TFFELPDCPPGVDPIVTYPVATSCHCG	79
LH-M. <i>tilapia</i>	TICSGHCITKDPVIKIPFSNVYQHVCTYRDLYYR TFFELPDCPPGVDPIVTYPVALSCHCG	114
LH-E. <i>seabass</i>	TICSGHCITKDPVIKIPFSNVYQHVCTYRNSHYR TFFELPDCPPGVDPTVTYPVAQSCHCG	120
	***** *****: : ***** ***** *****	
LH-C. <i>notata</i>	GCAMTSDCTFE-----	91
LH-M. <i>tilapia</i>	RCAMTSDCTFESMQPDFCMNDIPFY	141
LH-E. <i>seabass</i>	RCAMTSDCTFESLQPNFCMNDIPFY	147

Fig. 2. Alignments of amino acid sequences of the FSH β and LH β subunits of *Chromis notata* and other actinopterygian species using Clustal W multiple sequence alignment program (Thompson et al., 1994).

(Yaron et al., 2001). 경골어류의 FSH와 LH mRNA의 발현은 주로 GnRH와 함께 시상하부의 신경세포와 인근의 용기부, 신경섬유 그리고 뇌하수체의 전엽에서 확인되며, GnRH의 직접적 작용으로 유도되거나, 성 스테로이드 호르몬의 간접적 피드백에 의해 조절됨으로써 B-P-G 축을 형성 체내의 내분비 시스템의 균형유지 및 항상성을 조절 하는 중심적인 역할을 한다(Hostetter et al., 1981; Melamed et al., 1998; Parhar et al.,

2003; Schally et al., 1971; Yu et al., 1979). 하지만 최근 KiSS1과 그의 수용체인 G protein-coupled receptor 54 (GPR54)의 발견으로 새로운 번식내분비계의 축이 구성되어지고 있다. 자리돔의 FSH β 와 LH β mRNA은 뇌하수체에서 강하게 발현되었으며, 자리돔의 뇌에 존재하는 신경세포와 신경섬유도 FSH β 와 LH β 의 분비에 관여하는 것으로 생각된다. 이 연구 결과는 자리돔의 번식생리생태 연구에 있어 GTH의 생리적인 특성

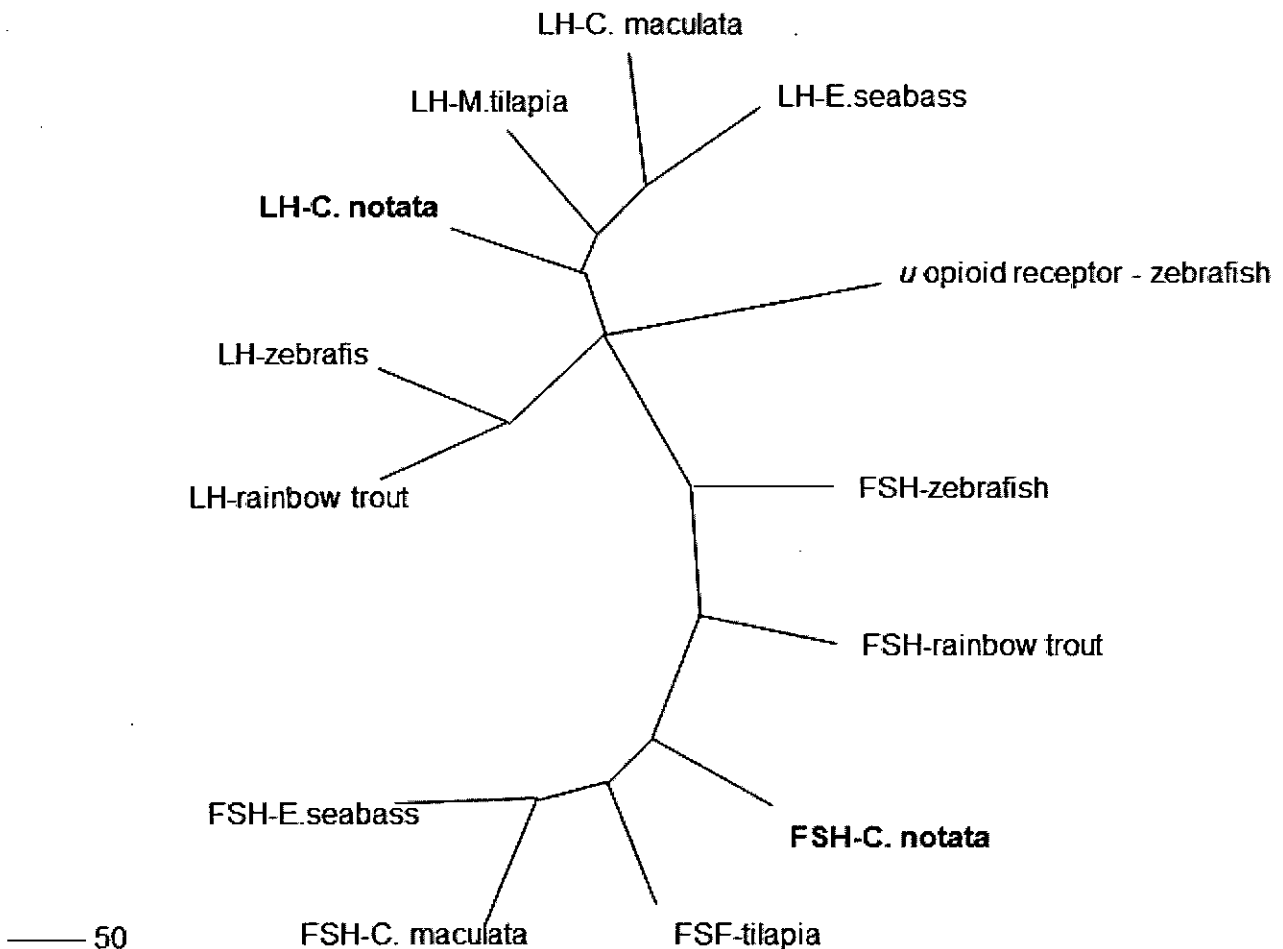


Fig. 3. Phylogenetic analysis of teleost FSH β and LH β subunits based on amino acid sequence. The *Petromyzon marinus* GTH β -like protein was used as an outgroup to root the tree. Analysis was performed using the neighbor-joining method. The values at nodes are bootstrap values estimated by 1000 replications.

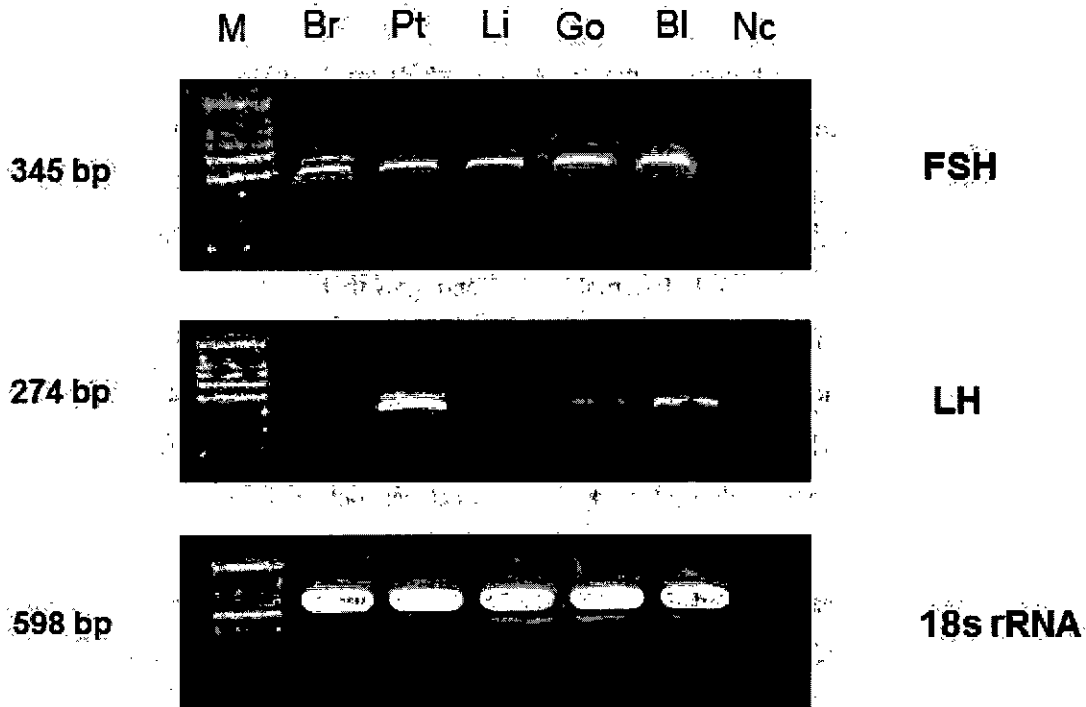


Fig. 4. The tissue specificity of *Chromis notata* FSH β and LH β mRNA expression analyzed by RT-PCR. 100 ng of total RNA each from brain (Br), pituitary (Pt), liver (Li), gonad (Go, ovary) and blood (Bl) was subjected to RT-PCR for FSH β (32 cycles) and also 18s rRNA (28 cycles) which served as a reference of the loading amount of total RNA for each tissue. PCR products of cDNAs were revealed by 1% agarose gel electrophoresis. Nc, negative control; M, marker of 100 bp DNA ladder.

연구 및 유전자 이용에 있어 유용한 결과를 제시할 것으로 기대되나, 앞으로 자리돔의 GnRH, KiSS, GPR54 등 상관관계를 조사하여 외부자극 신호에 의한 번식 내분비 변화에 대한 추가 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

Ando H, Swanson P, Kitani T, Koide N, Okada H, Ueda H and Urano A. 2004. Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17 β on gonadotropin subunit

gene expression and release in masu pituitary cells in vitro. Gen Comp Endocrinol 137, 109-121.

Goos HJT, Facchinetti F, Henderson IW, Pierantoni R, Polzonetti-Magni AM. 1993. Pubertal development: big questions, small answers. Cell Comm Repord 11-20.

Hostetter G, Gallo RV and Brownfield MS. 1981. Presence of immunoreactive luteinizing hormone in the rat forebrain. Neuroendocrinology 33, 241-245.

Kim JK., Kim, YU. and Park, JW. 2001. Male

*aromatase*의 amplicon이 확인되었으며, 이러한 결과들은 넙치 *aromatase* 유전자의 암컷 특이적 발현특징을 본 실험방법으로도 훌륭히 판별할 수 있음을 의미한다. 정소 cDNA 및 genomic DNA에서의 *Vasa* 결과는 모든 시료에서 예상 T_m 값과 함께 specific한 산물을 확인할 수 있었으며 cDNA 및 genomic DNA의 T_m 값이 다름을 보여주었다. 이는 본 실험방법을 통하여 적출된 조직 내의 생식선 포함여부를 효과적으로 판단할 수 있을 뿐 아니라, *aromatase*의 값을 normalization 시킬 때 기존의 housekeeping gene보다 더욱 정밀한 정보를 제공할 수 있을 것임을 추론케 하였다.

3. 개발된 암수판별 marker를 이용한 넙치 종묘의 암수판별

1) 넙치 시료 Sampling

넙치 성 판별 기술개발을 위한 시료는 각각 다른 도내 양식장으로부터 사육중인 치어 30미씩 확보하여 생식선 전체를 포함하여 주변 부위의 조직 약 100~200 mg을 채취하여 분석하였다. 시료는 전장을 측정하여 크기별로 3개 그룹으로 구분하였다. 각 실험구별 평균전장은 Exp-L 9.9 cm, Exp-M 8.1 cm, Exp-S 7.0 cm였다. Real-Time RT-PCR을 이용한 primer quality 측정에는 약 800 g 크기의 생식소 형태로 암수판별이 가능한 개체들을 사용하였다.

2) Total RNA의 분리, cDNA 합성, Real-Time RT-PCR

본 연구를 통하여 개발된 넙치 성판별기법을

사용하여 도내 양식어가의 넙치 성어 및 치어에 대한 성판별 실증실험을 수행하였다. Total RNA 분리, cDNA 합성, Real-Time PCR은 앞서 설명한 방식으로 Vasa-Real F1과 Vasa-Real R1 primer set, 그리고 FArom F1과 FArom R1 primer set을 사용하여 수행하였다. 생식소의 육안 검사를 통하여 성 판별이 명확하게 가능한 넙치 성어의 생식소 total RNA로부터 cDNA를 합성하고, 개발된 마커를 활용하여 성판별 실험을 진행, 그 결과를 비교하였다.

결 과

1. 조직학적 관찰을 통한 넙치의 암수판별

1) 미분화 상태

넙치에서 미분화된 상태의 생식선은 복강의 아래 양쪽으로 길게 뻗어나온 상태로 연승되어 있었다. 이 상태에서 암수간의 조직학적 특징은 관찰할 수 없었다. 다만 추후에 난소로 발달할 것으로 예상되는 개체에서는 난소강의 안쪽에 해당하는 부위에 세포들의 cyst가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

2) 정소로의 분화

전개체에서 성분화가 종료된 상태로 정소로 분화된 개체에서는 생식세포의 분화는 관찰되지 않았으며, 생식선 중간에 공포상이 관찰되어 전형적인 정소의 조직 특성이 관찰되었다. 또한 생식선의 크기도 암컷과 비교하여 상대적으로 작았다 (Fig. 7).

조직학적 관찰을 통한 생식선의 암수판별에

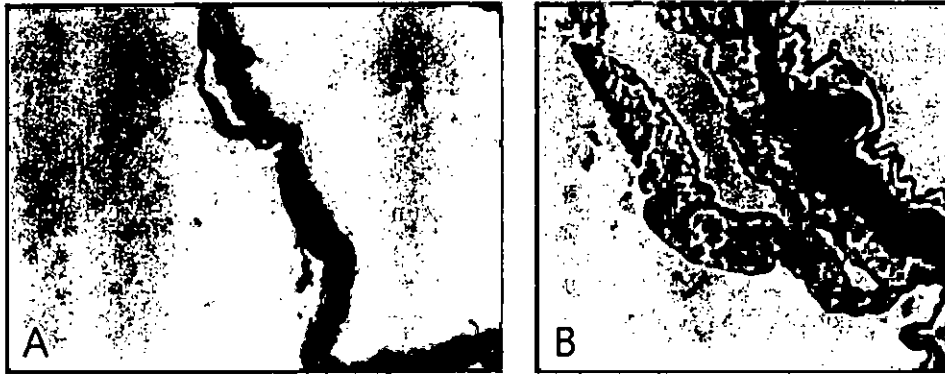


Fig. 6. 미분화상태의 넓치 생식선 조직사진. A. 복강막에 연속된 상태의 생식선 원기, B. 생식선원기의 확대사진



Fig. 7. 정소로 분화된 개체들의 생식선 조직상. A. 수컷으로 분화된 개체, B. 수컷으로 분화된 개체, C. 수컷으로 분화된 개체, D. 수컷으로 분화된 개체.

있어서는 2가지 관점에 유의하여야 한다. 우선 생식선의 생식세포의 발달상태를 바탕으로 판별하는 것이 가장 일반적이지만, 성적으로 미성숙상태에서는 생식세포가 분화되지 않기 때문에 판단하기 어려운 점이 있다. 다음으론 체세

포의 발달 양상으로도 암수의 판별이 가능하다. 다시말해 정소에서는 초기 분화단계에서는 생식세포의 발달이 둔화되고 생식선에 공포상이 관찰이 되며, 난소에서는 난소강이 형성되어 형태적으로 암수의 구분이 가능하다.



Fig. 8. 암컷으로 분화된 개체들의 생식선 조직상. A. 암컷으로 분화된 개체, B. 암컷으로 분화된 개체, C. 암컷으로 분화된 개체, D. 확대상. 감수분열중인 생식선, E. 수컷으로 분화된 개체, F. 암컷으로 분화된 개체. 주변인기 난모세포까지 분화한 정소.

3) 난소로의 분화

암컷으로 분화된 개체들에서는 대부분 난소강의 형성이 완료되었으며 난소소협이 발달, 생식세포의 체세포분열이 많이 진행되고 있었으며, 일부 개체에서는 감수분열이 이루어져 주변 인기 난모세포까지 분화된 개체들도 관찰되었다(Fig. 8).

2. 개발된 암수판별 marker를 이용한 넙치 종묘의 암수판별

검사결과, 생식소 육안검사를 통해 수컷으로 판명된 12 개체에서는 *aromatase*의 발현이 전혀 검출되지 않았고, 암컷으로 판명된 18개체에서는 매우 강하게 발현됨이 확인 되어 기능적 생식소의 육안검사 결과와 본 연구를 통해 개발된 마커를 활용한 유전자검사 결과가 동일하게

나타났다(Table 3, Fig. 9). 본 결과는 개발한 primer marker가 성 판별에 있어 매우 효과적이고 정확한 것임을 나타낸다고 할 수 있다. 또한 세 곳의 양식장에서 각각 넙치 치어 30미 썩을 구입하여 각 개체의 전장을 측정하고 앞의 방식대로 성판별 실험을 실시, 분석하였다. 실험결과, 각 시료들에 대한 암컷 특이적 *aromatase* 유전자의 발현양상을 거의 non or all 하게 판단할 수 있었고, 기존의 housekeeping gene인 *Efl-a*를 사용할 때 문제가 되었던 normalization의 오류를 없앨 수 있었다(Table 4). 또한, genomic DNA의 오염여부 역시 최종 결과분석을 통하여 다시 한 번 확인할 수 있어 성판별 기법의 많은 부분이 개선되었고, 보다 정확한 넙치 치어의 성판별을 가능케 한 것으로 평가된다.

Table 3. 넙치 정소 및 난소 성판별의 육안검사 및 유전자 분석 결과 비교

시료번호	생식소 형태검사	유전자 검사	일치여부	시료번호	생식소 형태검사	유전자 검사	일치여부
1	♀	♀	일치	16	♀	♀	일치
2	♀	♀	일치	17	♀	♀	일치
3	♂	♂	일치	18	♀	♀	일치
4	♀	♀	일치	19	♂	♂	일치
5	♂	♂	일치	20	♀	♀	일치
6	♂	♂	일치	21	♂	♂	일치
7	♀	♀	일치	22	♀	♀	일치
8	♀	♀	일치	23	♀	♀	일치
9	♂	♂	일치	24	♂	♂	일치
10	♂	♂	일치	25	♀	♀	일치
11	♀	♀	일치	26	♀	♀	일치
12	♂	♂	일치	27	♀	♀	일치
13	♀	♀	일치	28	♀	♀	일치
14	♀	♀	일치	29	♂	♂	일치
15	♂	♂	일치	30	♂	♂	일치

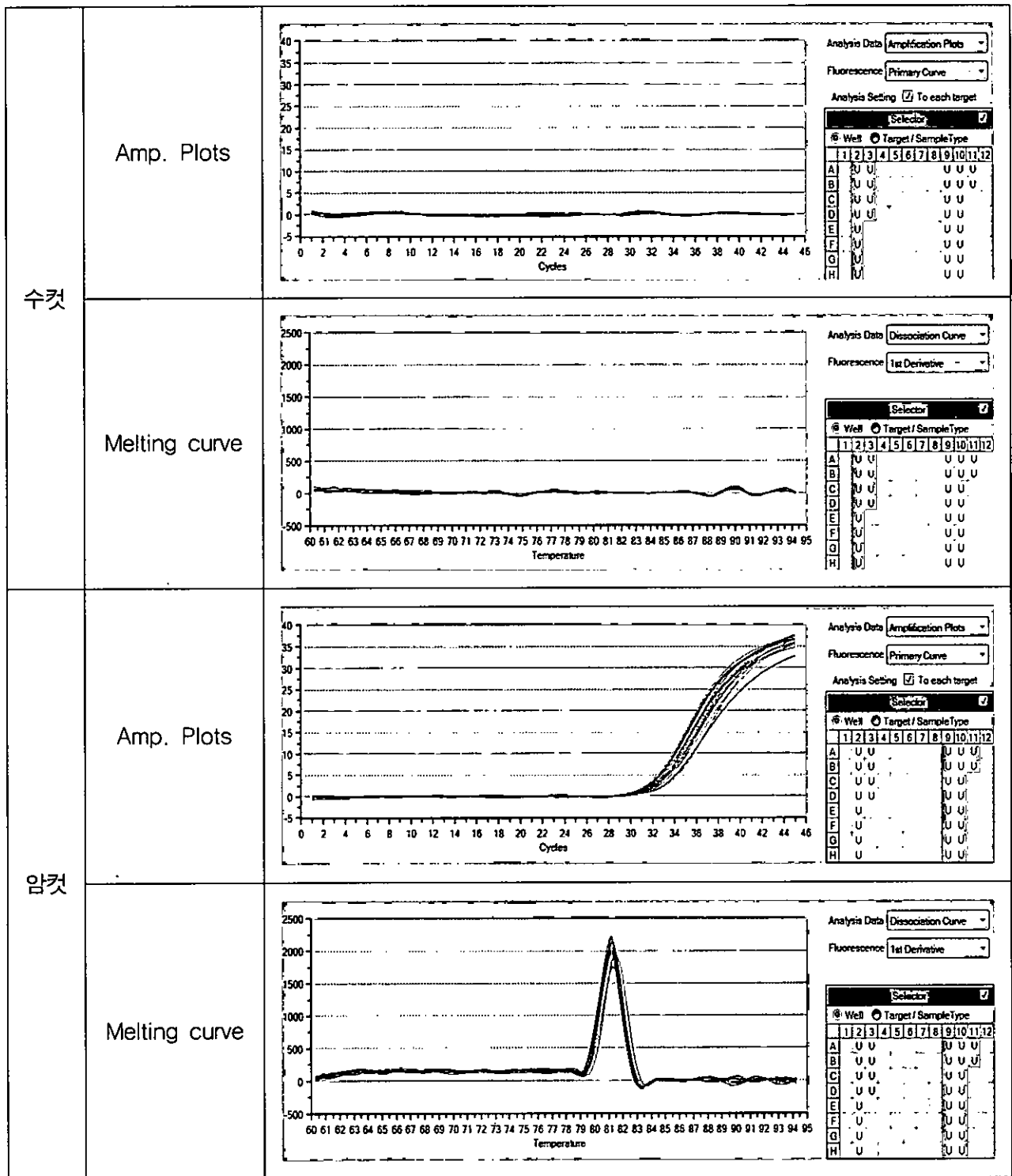


Fig. 9. 넙치 정소 및 난소 조직에 대한 유전학적 성판별 결과. 발현량 (Amp. Plots)은 각 개체의 생식소에서 *aromatase* 유전자의 조직 내 발현정도를 나타내며, 발현산물의 정확성(Melting Curve)은 발현값이 정확한 target (*aromatase*) amplicon에 의한 것인지에 대한 quality를 보여 준다.

Table 4. 넙치 치어 각 시료별 전장 및 유전자분석을 통하여 확인된 성별

Site 1			Site 2			Site 3		
시료번호	전장(cm)	성별	시료번호	전장(cm)	성별	시료번호	전장(cm)	성별
1	9.7	♀	1	7.4	♂	1	6.8	♂
2	9.0	♀	2	8.3	♀	2	6.8	♂
3	9.8	♀	3	8.5	♀	3	6.9	♂
4	10.2	♀	4	8.0	♂	4	7.4	♂
5	10.8	♀	5	8.8	♀	5	6.6	♂
6	10.0	♂	6	7.9	♂	6	7.6	♂
7	10.6	♀	7	8.1	♂	7	7.0	♂
8	10.0	♀	8	8.4	♂	8	7.5	♀
9	9.5	♀	9	7.6	♂	9	6.7	♂
10	10.2	♂	10	7.8	♀	10	7.0	♀
11	10.6	♂	11	8.4	♂	11	6.5	♂
12	10.7	♂	12	8.3	♂	12	6.9	♂
13	10.2	♂	13	7.8	♂	13	7.4	♂
14	9.8	♂	14	7.8	♂	14	6.8	♂
15	9.6	♂	15	7.8	♂	15	6.8	♂
16	9.8	♂	16	8.2	♂	16	6.9	♂
17	9.3	♂	17	8.2	♂	17	6.8	♂
18	10.0	♂	18	8.3	♂	18	6.9	♀
19	10.5	♂	19	8.5	♂	19	6.9	♂
20	10.5	♂	20	8.2	♂	20	7.4	♂
21	9.8	♂	21	7.6	♀	21	7.2	♀
22	9.5	♂	22	8.3	♂	22	7.4	♂
23	10.2	♂	23	8.3	♀	23	6.8	♂
24	10.3	♂	24	8.8	♂	24	6.4	♂
25	10.3	♀	25	8.4	♂	25	6.5	♂
26	9.2	♀	26	7.4	♂	26	7.0	♀
27	9.0	♂	27	8.4	♀	27	6.8	♀
28	8.8	♂	28	7.8	♀	28	7.2	♂
29	9.5	♀	29	8.2	♂	29	6.9	♀
30	9.0	♂	30	8.3	♂	30	7.0	♂

고 찰

본 연구를 통하여 분리, 확인된 넙치 *Vasa*와 *aromatase*의 cDNA 및 genomic DNA 서열을 바탕으로 성판별 Real-Time PCR에 사용되는 primer set의 specificity를 높이고 진단기술의 정확성을

더욱 높일 수 있었다. 한 개체의 모든 체세포는 동일한 유전자를 가지고 있으나 성장시기, 생리 주기 및 조직별로 발현되는 유전자의 종류에는 차이가 있으며, 넙치의 기능적 성분화는 생식소에서 작용하는 핵심 유전자들에 의해 유도된다. 따라서, 분자생물학적 유전자 분석 기법을 적용

하기 위한 생식소 조직만의 정확한 적출이 요구되지만 넙치 치어에서부터 생식선 조직만을 적출해 내기는 거의 불가능하다. 본 연구의 핵심은 다른 조직으로 오염된 생식선 조직에서 분리된 RNA라 할지라도 온전히 생식선에서만 발현되는 특이적인 유전자를 찾아내고 성판별의 목적 유전자로 활용할 수 있다는 것이다. 본 연구에서 사용한 primer는 넙치 생식선에서만 발현하는 *Vasa*와 *aromatase* 유전자를 목적 유전자로 하기에, 조직 적출 과정에서 다른 조직과 섞인다 하더라도 생식선에만 제한된 유전자 발현 현상을 검출할 수 있다. 넙치 *Vasa* 유전자는 발생 초기 생식선 분화가 시작되는 시기에서부터 성체시기에 이르기까지 생식선 또는 생식소에서 꾸준히 발현되는 유전자이다. 또한, 넙치 *aromatase* 유전자는 치어시기에 암컷으로의 성분화가 유도될 때부터 성숙한 난소상태의 시기에 이르기까지 높게 발현되는 유전자이다. 결국, 생식선에서의 *aromatase* 유전자 발현정도를 확인함으로써 성판별이 가능하며, *Vasa* 유전자로 normalization 함으로 실험의 오류를 배제시킬 수 있는 것이다. 한편, 넙치 *Vasa*와 *aromatase* 유전자의 발현 값 모두는 genomic DNA의 오염과 매우 밀접한 관계에 있다. 모든 체세포에는 한 개체가 지닐 수 있는 유전정보 전체가 포함되어 있으며, 모든 체세포는 동일한 양의 genomic DNA를 가지고 있다. 따라서, 비록 넙치 *Vasa*와 *aromatase* 유전자가 성분화시기 및 생식선 조직에 특이적으로 발현된다 하더라도 분리된 RNA에 genomic DNA가 조금이라도 섞여있다면 그 분석결과는 신뢰할 수 없는 것이 된다. 일반적 방법에서 오염된 genomic DNA를

제거하는 과정을 거치지만, 그럼에도 불구하고 genomic DNA를 완벽하게 제거하기란 쉽지 않은 과정이며, genomic DNA를 제거하는 과정에서 부차적인 오염으로 RNA의 quality가 떨어질 수 있다. 본 연구를 통하여 넙치 *Vasa*와 *aromatase* genomic DNA의 nucleotide sequence를 분리, 보고하였고, 성판별 진단실험과정에서 쉽게 검출할 수 있는 방법을 개발하여 진단 결과의 정확성 및 분석의 효율을 높일 수 있었다. 본 기술에서 사용하는 primer set은 RNA로부터 합성된 cDNA에 존재할 수 있는 genomic DNA오염 여부를 melting curve 분석을 통하여 쉽게 가려낼 수 있도록 제작되었다. 이러한 연구결과들을 토대로 더욱 정확하고 편리한 넙치 치어 성판별 기술을 개발한 것이 큰 의의라 하겠다.

다른 척추동물과 마찬가지로 어류에서도 암수 성의 발현은 유전적 요소에서 기원하지만 어류에서는 성결정의 유전적 작용은 매우 불안정해서 예를 들어 환경요인의 작용 등에 의해 비교적 쉽게 성분화에 영향을 끼치는 걸로 생각된다. 이러한 근거로서 현재 지구상에는 약 3만 여종의 어류가 있지만 이중 성염색체 (sex chromosome)가 확인되는 어종은 겨우 50여종에 불과하다. 또한 어류에서는 고등척추동물과 달리 성을 결정하는 유전자(DMRT)가 송사리와 틸라피아의 일부 어종에서만 확인이 되었다 (Yamamoto, 1969; Nagahama et al., 1993).

이제까지 조사된 어종은 얼마 되지 않지만, 어류에서는 XX-XY계가 가장 보편적인 성결정 기작이라고 여겨진다. 그러나 ZW-ZZ계라고 추정되는 어종도 적지 않다. 예를 들어 틸라피아 종류에는 어떤 종에서는 XX-XY계의 다른 종에

서는 ZW-ZZ계(Z염색체는 Y염색체와 같고 여겨져서 YW-YY로 표현하기도 한다)의 성염색체상에 위치한 결정인자에 의해 제어된다. ZW-ZZ계의 성결정기작은 swordtail의 일종인 *Xiphophorus alvarezi*에서도 알려져 있고, 틸라피아류에서는 *Oreochromis niloticus*에서는 XX-XY, *O. aureus*에서는 ZW-ZZ이기 때문에, 전자의 XX(♀)과 후자의 ZZ(♂)과 교잡하면 이론적으로는 100% XZ(♂)이 된다. 이처럼 틸라피아류의 중간교잡에 의해 성장이 빠른 수컷만을 생산하는 기법은 이미 실용화되어 있다(Piffere et al., 1994, Nakamura and Nagahama, 1989).

포유류에서는 여러 가지 이유에서 태생기에 생식선이 형성되지 않은 경우, 성체는 외관적으로 반듯이 암컷이 된다. 이는 배발생 과정중인 성적으로 미분화생식선은 생식선조직을 정소로 분화를 유도하는 인자(성분화유도물질)의 작용이 없는 한, 아마도 난소 결정인자의 작용하에서 자율적으로 난소로 분화하는 성질을 갖는 것으로 생각된다. 이와 같은 정소유도인자는 Y염색체상의 결정유전자의 작용에 의해 발현되지만, Y염색체가 있으면 수컷으로 없으면 암컷이 된다.

자웅동체의 어종중에서 자성선숙형이 압도적으로 많으며, 유지자웅동체형 등에서 볼 수 있는 생식선의 변화도 성적 미성숙생식선에서 난소로, 그 다음 정소로 변한다. 물론 어류에는 웅성선숙형의 자웅동체현상을 보이는 어종도 다수 존재한다. 하지만 웅성선숙형 자웅동체에 있어서도 성적 미분화생식선은 먼저 난소로 분화하려는 경향을 보여 어류에서도 자성의 우월성(primacy of femaleness)이 보편적인 현상으로

받아들여진다(Yamazaki, 1983).

어류의 표현적 성의 분화 출발점은 생식선의 성분화이다. 생식선의 성분화는 보통 유전적으로 결정된 과정에 따라 진행되지만, 환경적 요인과 인위적인 조작등에 의해서 유전적 결정과는 다른 방향으로 진행되기도 한다(Fitzpatrick et al., 1993). 그러나 얼마 전까지만 하더라도 이와 같은 환경요인의 효과를 실험적으로 입증한 예는 의외로 적었다. 이는 환경의 효과가 한 개의 요인에 의한 것이 아니라, 그 성질을 정량화하기 어려운 여러 개의 요인에 의한 것이고, 이 요인들을 정확하게 실험조건으로 잡아내기 힘들었기 때문이다.

넙치의 성은 통상적으로 유전적으로 결정되어 XX개체는 암컷으로, XY개체는 수컷으로 분화한다. 하지만 유전적 암컷(XX)개체에 androgen (17 α -methyltestosterone)투여 하게 되면 생리적 수컷으로, 유전적 수컷(XY)개체에 estrogen (estradiol-17 β ; E₂) 투여를 실시하면 생리적 암컷으로 분화하는 것으로 알려졌다(Nakamura et al., 1989b). 또한 유전적 암컷(XX개체)라 하더라도 고수온 사육을 하거나 저수온에서 사육을 하면 생리적 수컷으로 성분화가 이루어지며, 이와 같이 넙치에서 유전적 암컷에서 수컷으로의 성전환과정에서 estrogen량의 감소 현상의 원인은 아직 구체적으로 밝혀진 것은 없으나, 고수온에 의해 estrogen의 생성에 중요한 효소인 aromatase 발현이 억제되어 E₂의 감소가 주요한 요인으로 작용하는 것으로 사료되고 있다(Lim, 2004, Kitano, 1999).

최근 제주지역에서는 여름철 고수온기에 생산된 하계 종묘를 입식한 넙치 양성양식어가에

서 눈에 띄는 성장둔화로 불만이 고조되고 있다. 이는 종묘 본래의 유전적 형질의 문제가 아니라 넙치의 암수간에 나타나는 차이로, 성분화 시기에 고수온 사육으로 인해 성장이 더딘 수컷으로 분화가 촉진되어 일어나는 현상이다.

또한 같은 가자미과 어류인 노랑가자미의 경우, 인공 사육시 암컷의 출현율이 약 10%로 매우 낮다. 노랑가자미의 성도 수온의 영향을 받아 전장 4cm까지 14°C이하에서 사육하면 암수비가 1:1이 된다고 보고되었다. 또한 수조의 명도에 따라서도 성비가 변화됨이 보고되었다. 따라서 가자미과 어류에서는 수온과 더불어 다른 환경적인 요인이 성분화에 영향을 미칠 가능성이 높다.

상업적으로 중요한 어종인 넙치는 암컷이 수컷보다 성장이 빠른 특징이 있기 때문에, 암컷만 생산하는 것이 양식에 있어 유리하다. 하지만 기본적으로 유전적으로 전암컷이라 하더라도 성분화시기의 사육수온에 따라서는 수컷이 높은 비율로 출현하기 때문에 종묘단계에서 적정 수온관리를 통해 암컷으로 분화를 유도하는 것이 매우 중요하다. 하지만 아직까지 넙치의 자성화 유도에 적절한 수온이나 수온관리 시기에 대한 연구보고는 이루어지지 않고 있는 것이 현실이다.

국내 넙치양식산업의 생산면에서는 사육기술이나 생산량에서는 상당히 높은 수준까지 올라와 있지만 양식현장을 자세히 들여다보면 아직도 개선해야할 점들이 많이 있으며 수온이나 수조의 명도 등과 같은 환경적 요인이 성분화, 특히 자성화에 미치는 영향에 대해서는 거의 연구가 진행되지 않은 상태이며 넙치의 자성화

종묘생산을 위한 가이드라인도 없어 제주산 양식넙치의 국제경쟁력 약화의 한 요인으로 작용하고 있다.

생식선의 성 판별은 상업적인 양식에서는 매우 중요하며, 생식생태 등을 연구하는데도 필수 불가결해서 쉽고 정확한 판정법의 확립이 필요하다. 예를 들어 뱀장어나 넙치 등에서는 암컷이 체성장이 더 나으며 반대로 툴라피아에서는 수컷의 체성장이 더 빠르다(Miura et al., 2003a, b; Lockman et al., 2003). 또한 암수간의 체색에 있어서도 연어나 참돔의 경우 암컷에 대한 기호성이 더 높으며, 생식소를 식용하는 송어와 은어에서는 알을 가지고 있는 암컷에 대한 산업적 가치가 높다(Van den et al., 1982). 종묘단계에서 산업적 가치가 있는 성만을 선별하여 사육하는 것이 양식에 있어서 매우 중요하지만 어류의 성을, 특히나 치어단계에서 육안적으로 구별하기란 불가능하다.

어류는 일반적으로 자웅이체이지만, 체색(놀래기, 붉돔, 남자루 등)이나 형태(연어, 해마 등)로 암수를 구별할 수 있는 어류는 적고, 식용으로 익숙한 정강이, 정어리, 고등어, 넙치, 복어류 등에서는 외견만으로는 구별할 수 없다(Nakamura et al., 1989a). 연어, 쥐치, 쏨뱅이 등과 같이 자웅이 함께 산란하는 어종에서는 상대방의 성별을 알리기 위해 외관상의 차이를 보이는 경우도 있다(Nakamura et al., 1996). 암컷이 몸에 기생하는 일부 아귀류를 제외하고 어류의 자웅은 몸의 크기로 구별되지 않지만, 암수간에 성장속도가 다르거나, 최대체장이 다른 경우가 있다. 예를 들어 아귀와 넙치는 암컷이 최소 성숙 체장이 크다.

또 산란기의 성숙개체의 경우에는 비뇨생식공 근처의 복부를 앞쪽에서 꼬리쪽을 향해 압박하면 정액 또는 난이 배란되어 정확한 성을 판별할 수 있다. 그러나 미숙한 개체나 번식기 이외의 성어에서는 이 방법을 적용할 수 없다. 발달도중의 생식선은 외과적으로 체벽의 작은 구멍을 내서 생식선의 외형이나 색깔의 정도로 판단하는 개복법이 있지만, 가장 확실한 방법은 생식선의 조직표본을 관찰하여 난소와 정소를 식별하는 것이다. 또 어중에 따라서는 가는 실리콘 튜브를 생식공안으로 삽입하여 조직을 주사기로 흡입채집하는 방법이 사용되기도 한다. 놀래기류와 철갑상어류의 성판별에는 이렇게 채취한 조직을 포르말린에 고정 후, acetocarmine액과 슬라이드글래스 위에 놓고 커버글래스로 눌러서 바로 현미경 관찰을 한다(Squash method). 대서양연어(*Salmo salar*)에서는 초음파도형법(ultrasonography)에 의해서 간접적으로 생식선의 형태를 조사하여 성을 판별하기도 하고, 오오츠크송어 *Micropterus salmoides*에서는 개조된 otoscope(耳鏡)를 생식공으로 삽입해서 생식선을 직접 관찰하기도 하지만, 내시경을 이용 등을 포함해 기술적인 문제점이 많다.

성숙도중 또는 성숙어의 성은 성호르몬의존 2차성징에 근거해서 판별할 수 있지만, 이것이 가능한 경우는 그다지 많지 않다. 외형형태에 암수간의 차이가 있는 어종에서는 이것을 성판별의 지표로 사용하기도 한다. 틸라피아류에서는 비뇨생식공부분이 암컷은 2개, 수컷은 3개로 되어 있어, 비뇨생식돌기부분을 식용색소 Azorubin 수용액에 담그면 식별이 용이하다. 이처럼 비뇨생식돌기나 비뇨생식공의 형태적 차이도 성판

별의 지표가 된다.

성에 상대적으로 특이적인 생리활성물질의 생화학적 검출도 성판별에 사용된다. 난황단백질의 전구체로서 간에서 합성되어 혈액을 통해 난모세포로 운반되는 vitellogenin은 외인성 난황형성기, 다시말해 성숙도중의 암컷의 혈장중에는 높은 농도로 존재하지만, 수컷이나 미성숙 암컷의 혈장내에서는 소량밖에 존재하지 않기 때문에 생식주기의 특정한 시기에는 성판별에 이용된다. 은연어 *Oncorhynchus kisutch*에서는 산란전 8개월이전에 암컷의 피부점액에서도 vitellogenin이 검출되어 성숙전 연어류의 성을 판별할 수도 있다. 이외에도 어류의 특유 androgen인 11-ketotestosterone의 혈중량이 성판별의 지표가 되기도 한다(Schulz et al., 2001). 하지만 이와 같은 암컷 특유의 단백질이나 혈중 호르몬량의 측정을 통한 방법은 생식선이 어느 정도 성숙한 이후에나 가능하기 때문에, 조기 성판별이 어려운 문제점이 있어 현실적으로는 성어가 된 이후 외견상의 특징 및 생식선의 형태로 구별하는 수밖에 없었다(Miura et al., 1999).

양식의 생산 효율성을 위해서는 육종학적 방법이 매우 중요하며, 넘치는 암수에 따라 성장차가 현저하여 암컷의 성장이 좋다. 또한 수컷의 성장 정체는 양식효율을 저해할 뿐만 아니라 넘치의 대형어 생산에 장애가 된다. 기존의 염색체 조작이나 호르몬 투여에 의한 성제어 기술은 기술적인 측면에서 평가될 수 있는 부분도 있지만 법적 규제나 식품안정성 등 사회적인 문제를 가지고 있다(Pankhurst, 1998). 따라서 이번 사육수온과 같은 친환경적인 방법을 이용한 넘치 양식용 종묘생산 기술개발로 이와

같은 문제를 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 넙치의 경우 단일 품목으로 우리나라 수산물 생산의 8%를 차지할 정도로 비중인 생물자원임에도 불구하고 아직까지 양식산업화로 가기 위한 기초적인 연구가 거의 되지 않은 상태이다. 이번 연구를 통해서 넙치 성장과 성분화에 관련된 환경요인과의 상관관계에 대한 기초 연구와 현장 실용화 기술을 개발을 통해 양식어가의 실질적 기술 지원 및 소득 증대가 기대된다. 2012년 기준 제주도내 어류양식 생산량은 24,989톤으로 전국 생산량(76,308톤)의 32.7%에 이르는 것으로 전국 1위이다. 생산금액도 2,754 억원으로 국내 전체 생산량의 37.5%를 점유했다. 이중 넙치의 생산량은 24,575톤으로 전체의 98%를 차지하고 있다. 지역내 양식장을 대상으로 한 사전 암수판별실험 결과, 암수의 비율이 약 7:3 정도였다. 따라서 단순히 자성화 유도만을 통해서 지금보다 약 30% 이상의 생산성 향상을 가정하더라도 약 3,580 여억원으로 약 826 억원의 추가 생산액 증대가 가능하며, 이는 단순한 생산액 증대뿐만 아니라, 생산원가의 절감으로 이어져 추후 넙치의 가공산업 및 해외수출에도 큰 도움을 줄 것으로 예상된다.

요 약

일부 파충류와 양서류, 그리고 어류의 성 결정은 환경적인 요인에 의해 크게 영향을 받는다고 알려져 있다.

Aromatase는 estrogen 생성에 있어 핵심적인 효소로 작용하여 암컷으로의 분화를 유도함으로써, 성 분화의 방향을 확인하는데 있어 좋은

marker이다.

척추동물의 aromatase cytochrome P450 (P450arom)은 androgen을 estrogen으로 전환시키는 단백질이다. 따라서, aromatase는 일부 어류에 있어 난소로의 분화가 유도될 때 특이적으로 발현된다. 넙치는 상업적으로 중요한 어류인데, 암컷이 수컷보다 빨리 자라며 그 성 결정이 수온에 민감하게 반응하는 어종이다. 넙치의 난소에서 P450arom 유전자를 cloning하고 정량 RT-PCR을 수행하는 방법으로 넙치의 초기 성 분화를 확인할 수 있는 바이오마커를 개발하였다. 분리된 넙치 aromatase 유전자는 다른 경골어류의 aromatase가 암호화하고 있는 아미노산 서열과 매우 유사했다.

생식소의 일부분을 본 연구에서 개발한 marker를 사용하여 성 판별을 수행하였고, 나머지 부분을 조직학적 방법으로 그 성을 구분하였다. 그 결과, 본 연구를 통해 개발된 방법은 조직학적 방법의 결과와 모두 일치함을 확인하였고, 성 판별 marker로서 유용함을 확인시켜 주었다. 넙치 치어에서 생식소의 조직학적 분석결과는 aromatase의 발현에 의해 구분한 성과 일치하여 그 발현양상이 성 특이적임을 확인시켜 주었다. 또한, 본 연구결과의 현장적용을 위한 실험의 일환으로, 도내 양식장에서 사육중인 넙치 치어에 적용해 본 결과, 입식 초기의 넙치의 암수 구분이 가능하였다. 본 연구는 넙치의 성을 판별하는데 유용하게 활용될 수 있을 것이며, 넙치의 성 결정 기작을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 지원을 받아 수행된 Golden seed 프로젝트사업 중 중국수출용 황금넙치 대량생산 시스템개발임(2013004-04-01-SB310).

참 고 문 헌

- Fitzpatrick MS, Pereira CB, Schreck CB. 1993. In vitro steroid secretion during early development of mono-sex rainbow trout: sex differences, onset of pituitary control, and effects of dietary steroid treatment. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91 : 119~215.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Abe, SI. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.*, 23(2) : 167~176.
- Lim, B.S., 2004. A study on endocrinological mechanisms during sex differentiation in Red seabream, *Pagrus major*. Ph.D. Dissertation, Dept. of Applied Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo.
- Lockman PM, Rohr DH, Davie P, Young G. 2003. The physiology of silvering in Anguillid eels: Androgens and control of metamorphosis from the yellow to silver stage. In *Eel Biology*, Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K. eds., Springer Tokyo, pp.331~349.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Sakai, N., and Tanaka, M., 1993. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish Physiol. Biochemem.*, 11 : 3~14.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M. R., Todo, T. and Yamauchi, K., 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264 : 230~234.
- Miura T, Miura C, Yamauchi K. 2003a. Spermatogenesis in the Japanese eel. In *Eel Biology*, Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K. eds., Springer Tokyo, pp. 319~330.
- Miura, T., Ohta, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2003b. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinol.*, 144 : 5004~5510.
- Nakamura, M. and Nagahama, Y. 1989. Differentiation and development of Leydig cells, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 211~219.
- Nakamura, M., Hourigan, T. F., Yamauchi, K., Nagahama, Y., Grau, G. E., 1989a. Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse (*Thalassomaduperrey*). *Env.*

- Biol. Fish. 24 : 117~136.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., Nagahama, Y., 1989b. Gonadal sex differentiation in teleost fish. J. Exp. Zool., 281 : 362~372.
- Nakamura, M., Specker, J.L. and Nagahama, Y. 1996. Innervation of steroid-producing cells in the ovary of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Zool. Sci., 13 : 603~608.
- Pankhurst, N. W., 1998. Reproduction. In: Black, K. D. and Pikering, A. D. (eds.), Biology of Farmed Fish. CRC Press, Boca Raton, FL, 1~26.
- Piferrer, F., Baker, I. J., and Donaldson, E. M., 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. J. Exp. Zool. 270 : 255~262.
- Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos and H.J., Bogerd, J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. Comp. Biochem. Physiol. B. 129 : 407~417.
- Van den Hurk, R., Lambert, J.G.D., Peute, J. 1982. Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry(*Salmo gairdneri*) before and after the onset of gonadal sex differentiation. Reprod. Nutr. Develop., 22 : 413~425.
- Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation. In "Fish Physiology"(W.S.Hoar and D.J.Randall, eds.), Academic Press, N.Y., 3, 117~175.
- Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture, 33 : 329~354.