

석사학위논문

내인성 호르몬을 이용한 자바리

Epinephelus bruneus 치어의

응성화 유도



제주대학교 대학원

해양생명과학과

허성표

2008년 2월

내인성 호르몬을 이용한 자바리

Epinephelus bruneus 치어의

응성화 유도

지도교수 이 영 돈

허 성 표

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2008년 2월

허성표의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장

이 경 준



위 원

이 기 완



위 원

이 영 돈



제주대학교 대학원

2008년 2월

Masculinization of Juvenile Longtooth Grouper
***Epinephelus bruneus* Controlled by**
Endogenous Hormone

Sung-Pyo Hur

(Supervised by Professor Young-Don Lee)



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE**

**MARINE LIFE SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

February 2008

목 차

List of figures	iii
List of tables	iv
ABSTRACT	v

총론	1
----------	---

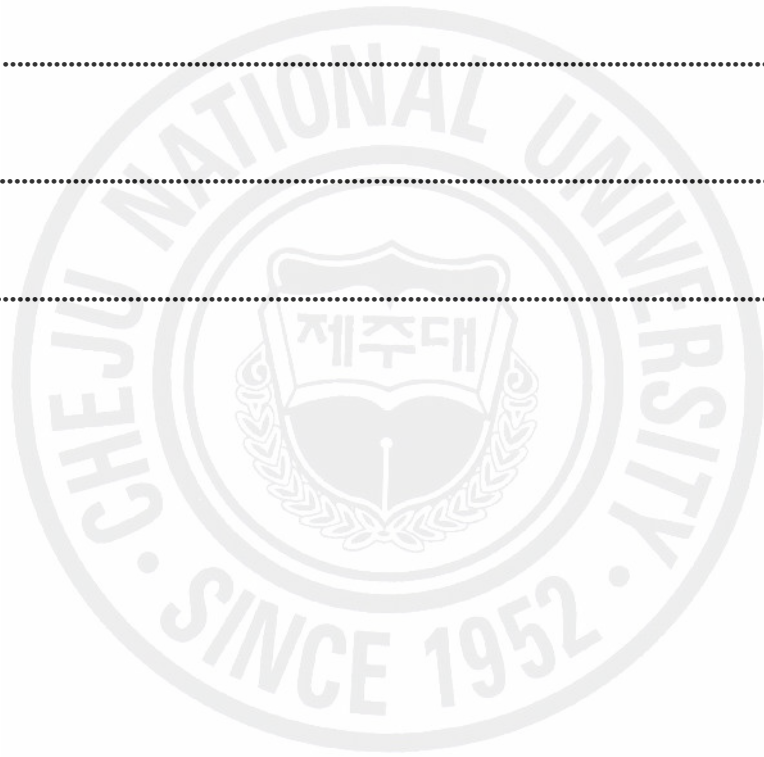
제 1장 내인성 호르몬 투여를 통한 자바리 치어 응성화 유도과정의 생식선 변화

1. 서론	4
2. 재료 및 방법	6
가. 실험어	6
나. 호르몬 처리	6
다. 생식선의 광학현미경 관찰	6
3. 결과	9
가. 호르몬 처리에 의한 생식선 변화	9

제 2장 내인성 호르몬 투여를 통한 자바리 치어 응성화 유도과정의 내분비 활성 변화

1. 서론	14
2. 재료 및 방법	16
가. 혈중 스테로이드 호르몬(11-KT, E ₂)의 변화	16

나. Total RNA 추출	17
다. cDNA 합성	17
라. Real time RT-PCR를 이용한 GtH sbunits(FSH β , LH β) 발현량 측정 ..	17
마. 통계처리	18
3. 결과	20
가. 혈중 스테로이드 호르몬(11-KT, E ₂)의 변화	20
나. GtH Subunits (FSH β , LH β) mRNA 발현량의 변화	23
종합 고찰	26
요약	30
참고문헌	32

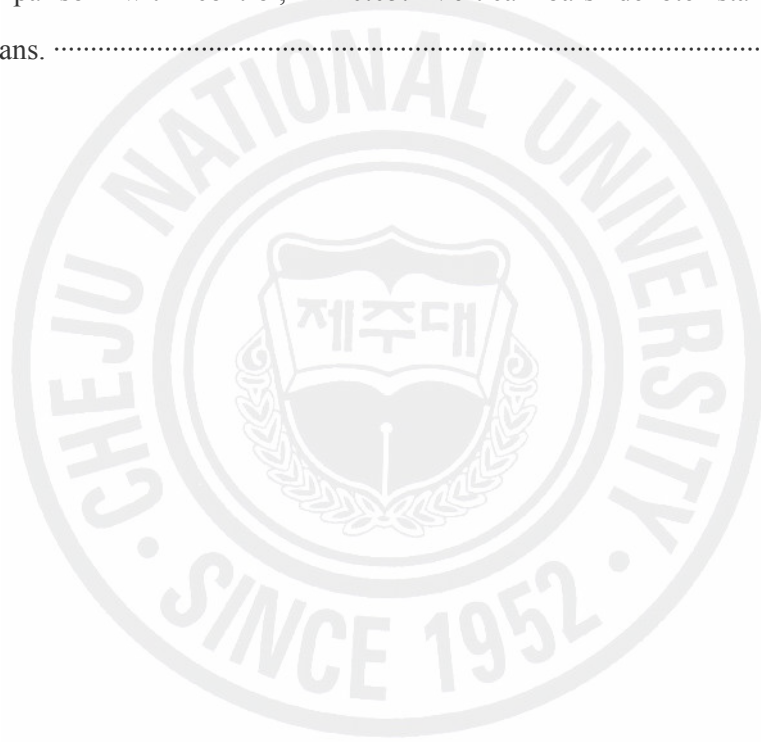


List of figures

- Fig. 1. Fig. 1. Serial view image of hormone injection. A: Anesthetized and measured Body weight & Body length, B: Preparation of hormone, C: Implanted intramuscularly, D: Disinfect. 7
- Fig. 2. Fig. 2. Changes of gonadal development in juvenile longtooth grouper, *E. bruneus* 7 weeks after treatment with aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). A: Initial control, B: Control, C: 5 mg MT/BW·kg, D: 3 mg AI/BW·kg, E and F 5 mg AI/BW·kg. AO, atretic oocyte; ED, efferent duct; OG, oogonia; PO, perinucleolus oocyte; ST, spermatid; SZ, spermatozoa. Scale bar= A~E, 50 μ m; F, 100 μ m. 10
- Fig. 3. Changes of gonadal development in juvenile longtooth grouper, *E. bruneus* 21 weeks after treatment with aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). A: Control, B: 5 mg MT/BW·kg, C: 3 mg AI/BW·kg and D: 5 mg AI/BW·kg. AO, atretic oocyte; OG, oogonia; PO, perinucleolus oocyte; SC, spermatocyte. Scale bar=50 μ m. 11
- Fig. 4. Changes in plasma levels of estradiol-17 β (E₂) in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means. 21
- Fig. 5. Changes in plasma levels of 11-ketotestosterone (11-KT) in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). N. D., not detect. Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means. 22

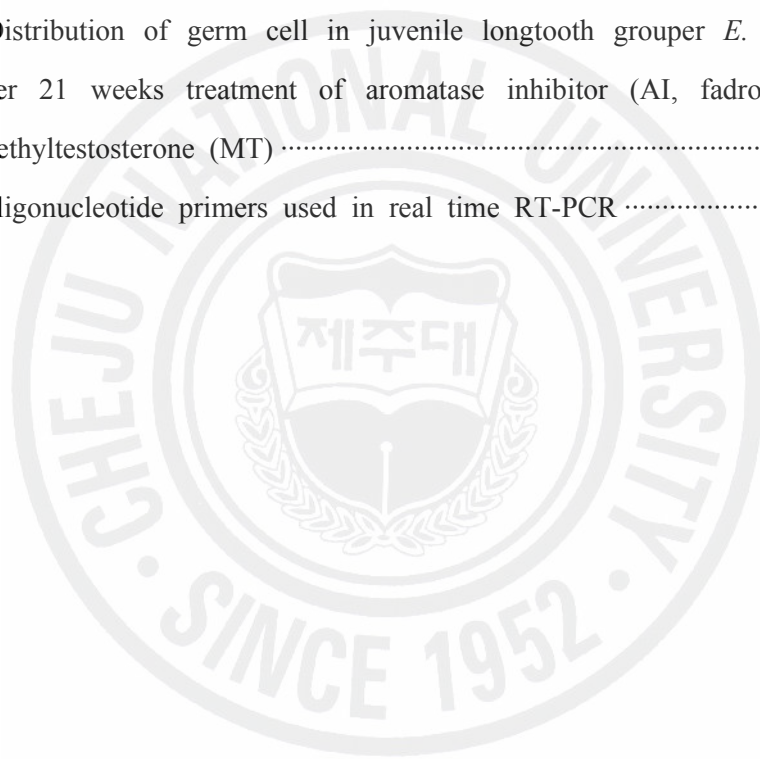
Fig. 6. Expression of FSH β mRNA in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means. 25

Fig. 7. Expression of LH β mRNA in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means. 26



List of tables

Table 1. Experimental design for the hormone treatment and sampling of juvenile longtooth grouper <i>E. bruneus</i>	9
Table 2. Distribution of germ cell in juvenile longtooth grouper <i>E. bruneus</i> after 7 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT)	12
Table 3. Distribution of germ cell in juvenile longtooth grouper <i>E. bruneus</i> gonad after 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT)	13
Table 4. Oligonucleotide primers used in real time RT-PCR	20



ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the effects of endogenous and exogenous hormones for the induction of sex reversal in juvenile longtooth grouper *Epinephelus bruneus*. This study was investigated endocrine mechanism during sex change by radioimmuno -assay, real-time RT-PCR and histological observation.

Experimental fish were juvenile longtooth groupers (body weight, 113 ± 17 g, body length 16.2 ± 1.2 cm). The fish were injected with a non-steroidal aromatase inhibitor (AI, Fadrozole) in a dose of 3 and 5 mg/kg·BW and 17α -methyltestosterone (MT) in a dose of 5 mg/kg·BW. The fish were sampled at 7th and 21st week after the injection.

1. Changes of gonad by endogenous hormone treatment during masculinization

Immature ovaries with oogonia and a few perinucleolus oocytes were observed in the gonad of the control groups at the beginning of the experiment. The control groups 7 weeks after the injection exhibited a similar trend as the initial control. A few atretic oocytes and oogonia were found in the gonad of MT 5 mg treatment group. Gonad of AI 3 mg treatment group mostly contained oogonia, and a few perinucleolus oocytes. Gonad of AI 5 mg treatment group were observed to induce sex change. The gonad was observed to have various stages of spermatogenic germ cell and mostly spermatozoa with no ovarian germ cells. Gonad of control group 21 weeks after the injection contained mostly perinucleolus oocytes. Gonad of MT 5mg treatment group contained oogonia, atretic oocytes and was observed to have spermatogenesis from spermatogonia to spermatocyte. Gonad of AI 3 mg treatment group were observed to contain a few perinucleolus oocytes, atretic oocytes and observed spermatogenesis from spermatogonia to spermatocyte. Goand of AI 5 mg

treatment group were observed to contain a few perinucleolus oocytes and atretic oocytes, and it was observed that spermatogenesis was occurring from spermatogonia to spermatocytes more than that in the other treatment groups. In conclusion, the findings in this study support the hypothesis that the induction of sex change from female to male in juvenile longtooth grouper could be controlled by aromatase inhibitor.

2. Changes of endocrine mechanism during masculinization

Serum levels of E₂ showed no significant differences from initial to the end of the experiment except for the control group (P>0.05). In contrast, 11-KT was significantly increased in AI 5 mg treatment groups at 7th and 21st weeks after the injection (P<0.05).

Real-time RT-PCR analysis showed that FSH β mRNA in initial group and whole group after 7 weeks were not significantly different (P>0.05). In contrast, only AI 5 mg injected groups after 21 weeks significantly increased expression of FSH β mRNA (P<0.05). mRNA levels of LH β were not significantly different in this experimental period (P>0.05). These results suggest that FSH β mRNA and 11-KT may trigger masculinization in juvenile longtooth grouper.

총 론

어류는 자웅이체형(gonochorism)과 자웅동체형(hermaphroditism)으로 나뉜다. 자웅이체형은 초기 성분화시기에 따라 분화형과 미분화형으로, 자웅동체형은 성전환 방향 양상에 따라, 암컷으로 먼저 성분화 되어 기능적으로 성숙 후 일부 개체가 수컷으로 성전환 되는 자성선숙형(protogynous), 반대로 수컷으로 먼저 성분화 되어 수컷으로의 기능을 하다가 일부 개체가 암컷으로 성이 전환되는 용성선숙형(protandrous) 그리고 암수의 성이 같이 분화하여 기능하는 동시자웅선숙형(synchronous)으로 나뉜다(Yamamoto, 1969). 이와 같이 다양한 어류 성특성에 대해 어류 번식특성 및 성전환을 중심으로 한 연구가 진행되고 있다(Yamazaki, 1983). 어류의 성전환 연구는 광범위한 성다양성으로 인해 다른 척추동물군의 성 특성을 이해하는데 기초자료가 되며, 산업적으로는 성장이 빠르거나 기호성이 높은 체색등과 같이 이용가치가 높은 한 쪽 성만을 생산하여 양식어종의 생산성 향상에 이용하고 있다.

자바리, *Epinephelus bruneus*는 바리과(Serranidae)에 속하는 종으로서 제주도를 포함한 우리나라 남해, 일본 중부이남, 중국, 필리핀 등 온대 및 아열대권 해역의 암초지역에 서식한다(Kim et al., 2005). 자바리를 포함한 바리과 어류들은 한국뿐만 아니라 일본, 중국 그리고 동남아시아 지역에서도 기호성이 높은 고급어종으로 수요가 급증하고 있다. 최근 국제식량농업기구(FAO)는 남획 등으로 인하여 자원량이 급격하게 감소하는 어종으로 자바리를 비롯한 다수의 바리과 어류를 포함시키고 있다. 바리과 어류의 자원회복을 위한 연구는 일본, 중국, 대만, 필리핀, 한국 등을 중심으로 친어관리와 성성숙 및 성전환 유도를 통해 인위적인 종묘생산이 이루어지고 있다(Chen et al., 1977; Sugama and Ikenoue, 1999; Song et al., 2005).

바리과에 속하는 어류들의 성특성은 모든 개체가 먼저 암컷으로 성분화하여 암컷으로의 기능을 한 후 연령이나 성장에 따라 일부 개체가 수컷으로 성전환을

하는 자성선속형 자웅동체어이다. 자연에서 바리과 어류의 성전환은 붉바리, *E. akaara*의 경우 전장 24 cm 이상(Kayano, 1996), Honeycomb grouper, *E. merra*는 전장 20 cm 이상(Bhandari et al., 2003), Dusky grouper, *E. marginatus*는 전장 79~90 cm에서 일어난다(Chauvet, 1988). 바리과 어류의 응성화 유도에 관한 연구는 자웅동체어의 번식특성을 이해하고 산업적으로는 정자확보를 위해 일부 진행되고 있다. 하지만 암컷에서 수컷으로 성전환이 일어나는 정확한 기작은 아직까지 알려지지 않았다. 이전까지 바리과 어류의 인위적인 응성화 유도는 외인성 androgen인 17 α -methyltestosterone (MT)를 이용되었지만(Kuo et al., 1988; Yeung et al., 1993; Lee et al., 1995; Yeh et al., 2003), 외인성 androgen인 MT 처리에 의한 응성화 유도는 어체의 생리적 부작용을 야기한다고 지적하고 있어(Fishelson, 1975; Josefa et al., 1994; Monica et al., 2005), 최근 생체내 estrogen 생성을 억제하는 내인성 호르몬인 Fadrozole과 같은 aromatase inhibitor (AI)를 이용한 응성화유도가 연구되고 있다(Afonso et al., 1999; Bhandari et al., 2004a, b; Li et al., 2006). AI 처리를 통한 응성화 유도는 어체내의 성 스테로이드 호르몬 생성을 조절하여 자연상태와 유사하게 응성화를 유도하는 방법이다. 하지만 자웅동체어 치어에서 성 스테로이드 호르몬처리가 기능적인 성전환 유도는 기능적 자웅동체현상을 보이는 어종의 성변화에도 성 스테로이드 호르몬이 작용하고 있을 가능성이 있으나 인접성(자성선속, 응성선속) 자웅동체 어류에서 성 스테로이드 호르몬처리에 의한 성전환 유도가 성공한 예는 그리 많지 않다.

어류의 번식활성은 뇌-뇌하수체-생식선축(Brain-Pituitary-Gonad axis, B-P-G)의 상호작용에 의해 조절된다(Pankhurst, 1998). 성전환과 관련된 내분비기작은 정소와 난소의 형태적 분화와 기능화를 유도하는 발달인자로서 성 스테로이드가 중요하고, 그 원인 제공은 GtH의 변화에 있다. 최근 성전환이 일어나는 시기에 B-P-G계 역할의 중요성에 대해 많은 관심이 모여지고 있으나, 구체적인 연구는 아직까지 매우 미흡한 실정이고 성전환과정중의 생식내분비축(B-P-G) 활성이 미숙한 치어 시기의 번식내분비 활성화에 대한 연구 또한 매우 미흡하다.

이 연구는 자바리 치어에서 응성화 유도를 위해 내인성 호르몬인 AI와 외인성 호르몬인 MT를 투여하여 자바리 치어에서 응성화 유도과정을 조직학적으로 관찰하였으며, 성전환 과정중의 혈중 성 스테로이드 호르몬의 변화와 뇌하수체에서

GtH subunits mRNA의 발현양상을 조사하였다.



제 1장 내인성 호르몬 투여를 통한 자바리 치어 응성화 유도 과정의 생식선 변화

1. 서 론

자웅이체어는 한번 결정된 성은 전환되지 않지만 자웅동체어는 한번 결정된 성이 연령, 성장, 사회적 구조, 성 스테로이드 호르몬, 환경교란물질등과 같은 외적인 자극에 의해서도 성전환이 일어난다(Yamamoto, 1969). 일반적으로 자성선숙형 자웅동체어의 응성화 유도는 외인성 androgen인 17 α -methyltestosterone (MT) 처리가 이용되어져 왔다(Yamazaki, 1983; Kitano et al., 2000; Song et al., 2005). 최근 MT처리에 의한 응성화 유도는 자연적인 성전환에 비해 생식선의 크기가 작고 또한 대량, 장시간 처리는 방정을 억제하거나 어체의 기형이나 사망률 상승등이 지적되고 있어(Fishelson, 1975; Josefa et al., 1994; Monica et al., 2005), 내인성 호르몬인 aromatase inhibitor 투여를 통한 응성화 유도가 시도되고 있다(Bhandari et al., 2004a, b; Li et al., 2006).

다른 척추동물과 같이 어류에서 estradiol-17 β (E₂)는 testosterone에 결합한 cytochrome P450 aromatase (P450arom)에 의해서 합성되고, 성분화 시기에 난소 분화와 난소발달에 중요한 역할을 한다(Young et al., 1983; Desvages and Pieau, 1992; Nagahama et al., 1993). P450arom 효소 저해방법에는 Fadrozole과 같은 non-steroidal aromatase inhibitor나 ATD와 같은 steroidal aromatase inhibitor를 이용하여 E₂ 합성을 억제하여 응성화를 유도하는 경우가 있다.

이전 포유류(Steel et al., 1987; Schieweck et al., 1988)와 파충류(Lance and Bogart, 1992)에서 in vivo와 in vitro 실험들은 fadrozole 투여로 estrogen 합성 억제가 되었다. 또한 어류에서는 fadrozole 투여를 통해 Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, 넙치, *Paralichthys olivaceus*와 틸라피아, *Oreochromis niloticus*로 응성화가

유도되었고(Piferrer et al., 1994; Kitano et al., 2000; Kwon et al., 2000), 자성선속형 자웅동체어는 소형 바리과 어류인 honeycomb grouper, *E. merra*와 붉바리, *E. akkara*에서 응성화를 유도할 수 있었다(Bhandari et al., 2004b; Li et al., 2006). 하지만 이러한 바리과 어류의 응성화 유도는 체성장이 어느 정도 이루어진 개체에 서만 성공적으로 이루어졌을 뿐 치어상태의 개체를 이용한 실험은 이루어지지 않았다.

이 연구는 자바리 치어를 대상으로 응성화를 유도하기 위해 내인성 호르몬인 aromatase inhibitor와 외인성 호르몬인 MT를 이용하여 자바리 치어로 응성화 과정중의 생식선의 변화를 조직학적으로 조사하였다.



2. 재료 및 방법

가. 실험어

실험어(체중 113 ± 17 g, 체장 16.2 ± 1.2 cm)는 2007년 1월 30일부터 5월 28일까지 총 21주간 실험구별로 20미씩 사육하였다. 실험어 사육관리는 270 L 원형수조를 이용하여 완전순환여과식으로 사육하였으며, 수온의 범위는 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였고 사료공급은 1일 2회 실시하였다.

나. 호르몬 처리

사용한 호르몬은 내인성 호르몬인 aromatase inhibitor (AI, Fadrozole, Novatis Co., SWI)와 외인성 호르몬인 17 α -methyltestosterone (MT, Sigma Co., USA)를 사용하였으며 처리농도는 각각 MT 5 mg/kg·BW와 AI 3, 5 mg/kg·BW로 실험 시작시와 7주 후 총 2회 주사하였다(Fig. 1). 호르몬 처리는 AI와 MT를 에틸알코올에 용해시켜 coconut oil과 1:5 비율로 혼합 후 어체 등 근육에 주사하였고, 대조구는 coconut oil만을 주사하였다. Sampling은 실험시작시와 7주 그리고 21주에 실험구별 3미씩 무작위로 채집하여 사용하였다(Table 1).

다. 생식선의 광학현미경 관찰

호르몬 처리전에 따른, 생식선의 변화는 생식선을 적출하여 Bouin's solution에 24시간 고정하였다. 고정된 조직은 paraffin 절편법에 의해 5~6 μm 의 조직절편을 제작한 후 Hansen's haematoxylin과 eosin으로 비교염색 하여 광학현미경하에서 검정하였다.

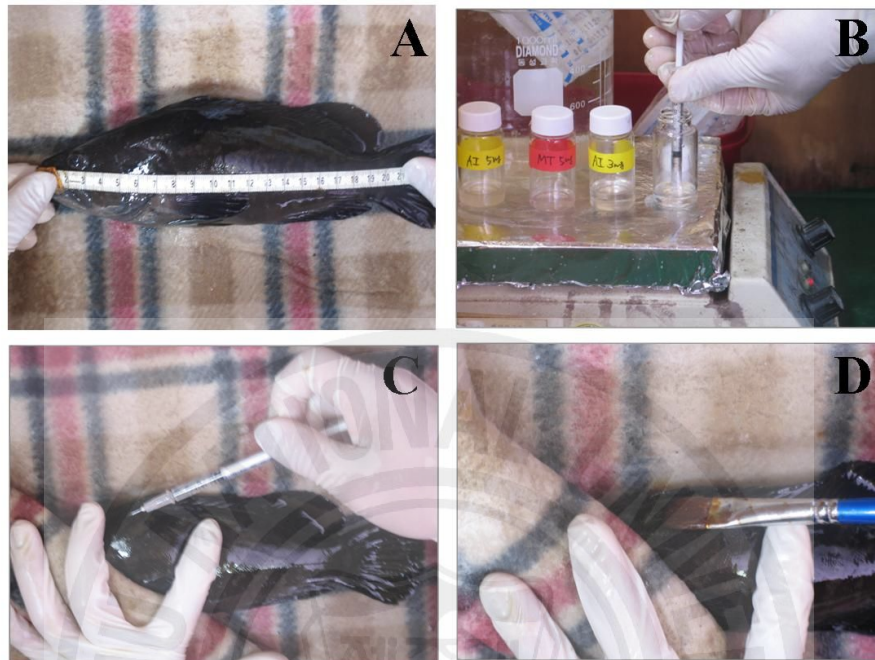
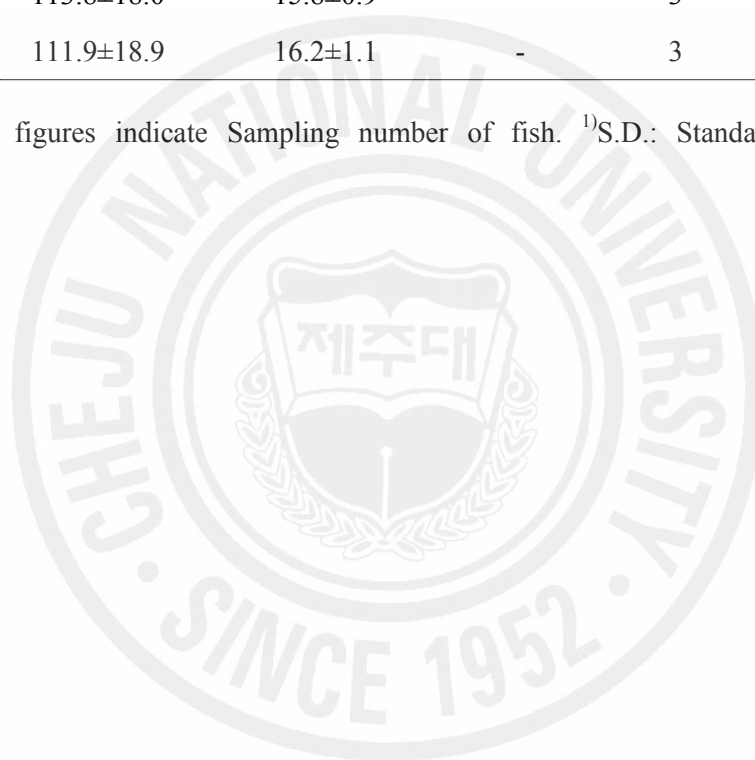


Fig. 1. Serial view image of hormone injection. A: Anesthetized and measured Body weight & Body length. B: Preparation of hormone, C: Injected intramuscularly, D: Disinfect.

Table 1. Experimental design for the hormone treatment and sampling of juvenile longtooth grouper *E. bruneus*

Treatment (kg:BW)	Body Weight (g) Mean ± S.D. ¹⁾	Body Length (g) Mean ± S.D. ¹⁾	Week		
			1	7	21
Control	114.3±19.0	16.1±1.5	3	3	3
MT 5	115.5±16.5	16.6±1.0	-	3	3
AI 3	113.8±18.0	15.8±0.9	-	3	3
AI 5	111.9±18.9	16.2±1.1	-	3	3

*Numerical figures indicate Sampling number of fish. ¹⁾S.D.: Standard deviation of means.



3. 결 과

가. 호르몬 처리에 의한 생식선 변화

실험 시작시 생식선은 대부분 난원세포와 일부 주변인기 난모세포(27.5~37.5 μm)들로 구성되었다(Fig. 2A).

7주 후 대조구 생식선은 대부분 실험시작시보다 발달된 주변인기의 난모세포(50.0~75.0 μm)들로 구성되었다(Fig. 2B). MT 3 mg 처리구 생식선은 대부분 난원세포(12.5~15.0 μm)들로 구성되었으며 일부 세포질과 핵이 붕괴된 퇴행 난모세포도 관찰되었다(Fig. 2C). AI 3 mg 처리구 생식선은 난원세포가 분포하였으며 일부 퇴행 난모세포와 대조구 보다 작은 주변인기(25.0~42.5 μm) 난모세포가 분포하였다(Fig. 2D). AI 5 mg 처리구 생식선은 난모세포가 관찰되지 않고 대부분 난원세포가 차지하였으나 한 개체에서는 정원세포부터 정자까지의 정자형성이 이루어졌고, 생식선 기부에는 수정관이 형성되어 수정관내에 정자들이 분포하였다(Fig. 2E, Table 2).

21주 후 대조구 생식선은 일부 난원세포와 주변인기 난모세포(55.0~75.0 μm)들로 구성되었다(Fig. 3A). MT 처리구 생식선은 난원세포와 퇴행 난모세포들로 구성되었으며 일부 정원세포부터 정모세포(7.5~10.0 μm)까지의 정자형성과정 관찰되었다(Fig. 3B). AI 3 mg 처리구 생식선은 대부분 난원세포와 일부 퇴행 난모세포들로 구성 되었으며, 일부 정원세포부터 정모세포(5.0~7.5 μm)까지의 정자형성이 관찰되었다(Fig. 3C). AI 5 mg 처리구 생식선은 난원세포와 주변인기 난모세포(35.0~60.0 μm), 퇴행 난모세포로 구성되었으며 정모세포(5.0~7.5 μm)까지의 정자형성과정 관찰되었다(Fig. 3D, Table 3).

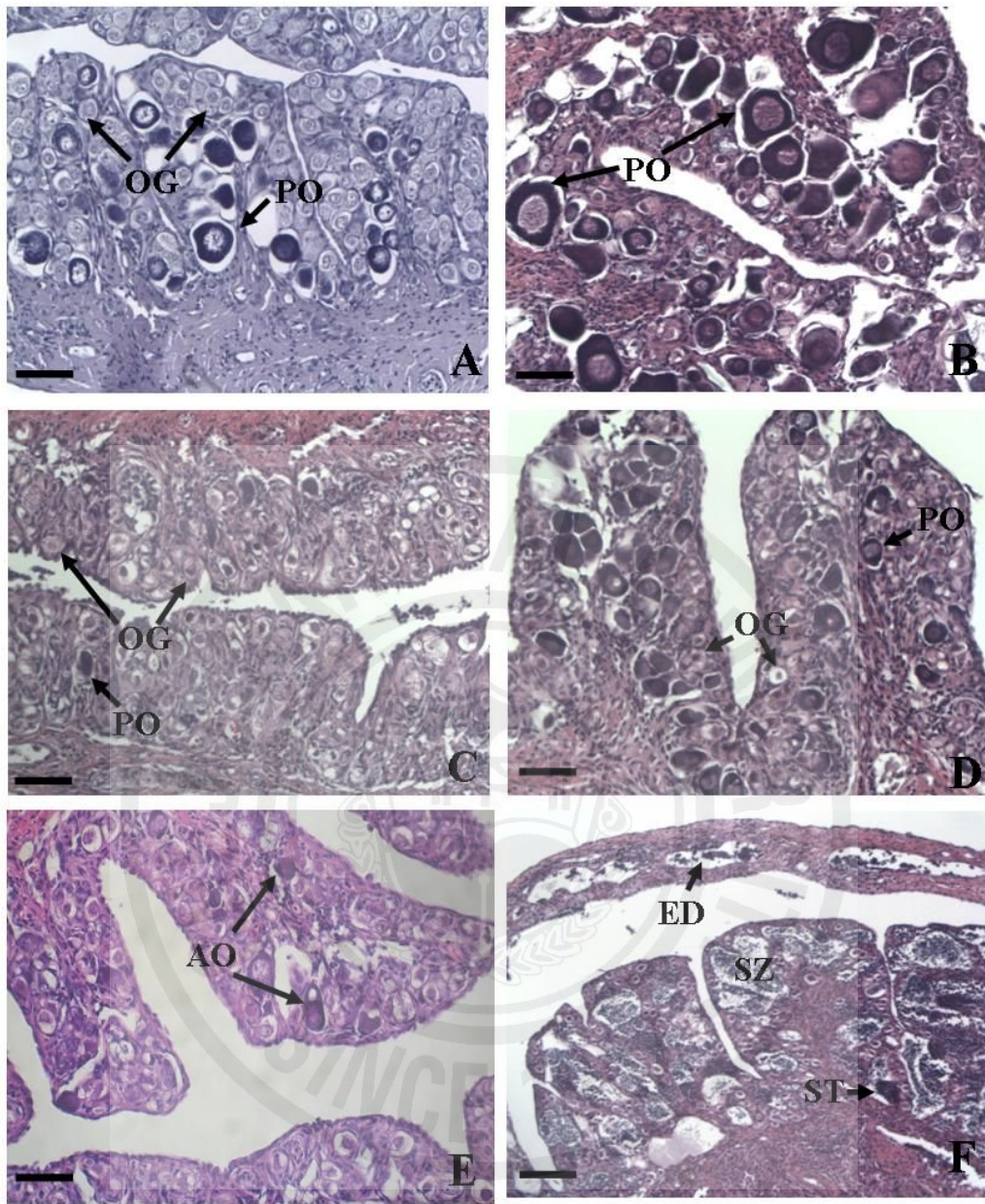


Fig. 2. Changes of gonadal development in juvenile longtooth grouper, *E. bruneus* 7 weeks after treatment with aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). A: Initial control, B: Control, C: 5 mg MT/BW·kg, D: 3 mg AI/BW·kg, E and F 5 mg AI/BW·kg. AO, atretic oocyte; ED, efferent duct; OG, oogonia; PO, perinucleolus oocyte; ST, spermatid; SZ, spermatozoa. Scale bar= A~E, 50 μ m; F, 100 μ m.

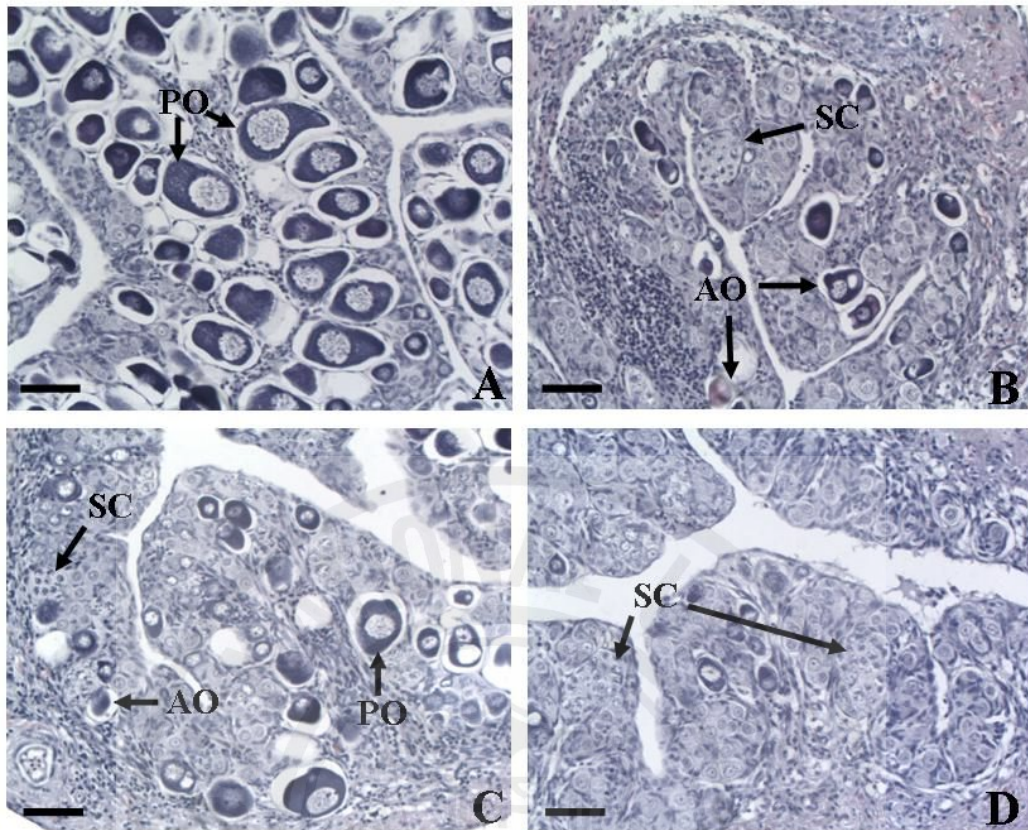


Fig. 3. Changes of gonadal development in juvenile longtooth grouper, *E. bruneus* 21 weeks after treatment with aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17α -methyltestosterone (MT). A: Control, B: 5 mg MT/BW·kg, C: 3 mg AI/BW·kg and D: 5 mg AI/BW·kg. AO, atretic oocyte; OG, oogonia; PO, perinucleolus oocyte; SC, spermatocyte. Scale bar=50 μ m.

Table 2. Distribution of germ cell in juvenile longtooth grouper *E. bruneus* after 7 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT)

Treatment (mg/kg · BW)	BW (g)	BL (cm)	Germ cell phases							Remarks
			OG	PO	AO	SG	SC	ST	SZ	
Control	137	17.3	++	+++	-	-	-	-	-	Oogenesis
	138	17.7	++	+++	-	-	-	-	-	Oogenesis
	143	16.8	++	+++	-	-	-	-	-	Oogenesis
MT 5	163	18.5	+++	-	-	-	-	-	-	
	154	17.7	+++	-	-	-	-	-	-	
	144	18.2	+++	+	-	-	-	-	-	
AI 3	126	17.3	+++	+	-	-	-	-	-	
	163	18.7	+++	-	-	-	-	-	-	
	143	17.6	++	++	-	-	-	-	-	
AI 5	116	16.9	++	++	+	-	-	-	-	Degenerated oocytes
	191	18.9	-	-	-	+	+	+	+++	Induced complete sex reversal.
	154	18.0	++	++	+	-	-	-	-	Degenerated oocytes

Abbreviations: BW, body weight; BL, body length; OG, oogonia; PO, peri-nucleolus oocyte; AO, atretic oocyte; SG, spermatogonia; SC, spermatocyte; ST, spermatid; SZ, Spermatozoa; -, none; +, a few; ++, intermediate; +++, abundant

Table 3. Distribution of germ cell in juvenile longtooth grouper *E. bruneus* gonad after 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT)

Treatment (mg/kg · BW)	BW (g)	BL (cm)	Germ cell phases							Remarks
			OG	PO	AO	SG	SC	ST	SZ	
Control	299	24.5	+	+++	-	-	-	-	-	Oogenesis
	227	23.0	+	+++	-	-	-	-	-	Oogenesis
	274	27.5	+	+++	-	-	-	-	-	Oogenesis
MT 5	312	28.0	+++	++	+	+	+	-	-	Spermatogenesis
	265	22.5	-	-	-	-	-	-	-	no germ cell
	277	28.0	+	++	+	+	+	-	-	Spermatogenesis
AI 3	232	22.5	+	++	+	+	+	-	-	Spermatogenesis
	242	22.0	+	++	+	+	-	-	-	Spermatogenesis
	216	22.5	+	+	+	+	+	-	-	Spermatogenesis
AI 5	242	24.0	+	+	+	+	+	-	-	Spermatogenesis
	194	22.0	++	+	+	+	++	-	-	Spermatogenesis
	210	23.0	+	+	+	+	+	-	-	Spermatogenesis

Abbreviations: BW, body weight; BL, body length; OG, oogonia; PO, peri-nucleolus oocyte, AO, atretic oocytes; SG, spermatogonia; SC, spermatocyte; ST, spermatid; SZ, Spermatozoa; -, none; +, a few; ++, intermediate; +++, abundant.

제 2 장 내인성 호르몬 투여를 통한 자바리 치어 응성화 유도과정의 내분비 활성 변화

1. 서 론

어류의 생식은 다른 척추동물과 마찬가지로 뇌-뇌하수체-생식선축(B-P-G axis)으로 이루어진 생식내분비계에 의해 지배된다. 생식선 자극호르몬 방출호르몬(gonadotropin releasing hormone; GnRH)은 뇌하수체 전엽에 작용하여 여포자극호르몬(follicle-stimulating hormone; FSH)과 황체형성호르몬(luteinizing hormone; LH)으로 불리는 생식선자극호르몬(gonadotropin hormone; GtH)의 합성·분비를 조절한다. 뇌하수체에서 분비된 두 종류의 GtH는 내분비계를 통해 생식선에 작용하여 성 스테로이드 호르몬의 분비를 조절하며 배우자 형성과정에 관여한다(Pankhurst, 1998).

GtH의 구조는 척추동물에서 처음으로 보고되었으며(Pierce and Parsons, 1981), 어류에서 GtH는 Kawauchi et al.(1989)에 의해 연어에서 처음으로 보고된 후 다른 많은 어류에서 GtH에 구조와 기능에 대한 연구가 많이 보고되었다(Querat et al., 1990; Swanson et al., 1991; Weil et al., 1995; Gomez et al., 1999; Gen et al., 2000; Dickey and Swanson, 2000).

두 종류의 GtH는 역할과 기능에 있어서 어종, 성숙시기와 정도에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 FSH는 puberty와 배우자형성과정을 조절하고, LH는 주로 생식선의 성숙과 산란을 조절하며(Swanson et al., 1991; Schulz et al., 2001), 최근 FSH와 LH에 대한 보다 상세한 생리적 기작 연구가 활발히 진행되고 있다 (Yoshiura et al., 1999; Kajimura et al., 2001; Degani et al., 2003; Hellqvist et al., 2004).

어류를 포함한 모든 척추동물에서 estradiol-17 β (E₂)는 암컷에 있어 특이적인

성스테로이드 호르몬으로 난소 발달 및 난형성에 관여하며, 암컷의 성장 상태를 유지하기도 한다(Fostier et al., 1983). 어류에 있어 성스테로이드 호르몬에 대한 생식선의 반응은 종과 실험조건에 따라 다양하지만, 대표적인 천연 androgen인 11-ketotestosterone (11-KT)은 수컷에서 정소발달 및 정자형성에 관여한다고 알려졌다(Fostier et al., 1987; Borg, 1994).

최근 자웅동체 어류의 성전환 과정중의 성 스테로이드 호르몬 변화에 대한 연구가 일부 진행되어지고 있지만 (Nakamura, 1989; Johnson et al., 1998; Bhandari et al., 2003, 2004a,b), 아직 정확한 기작에 대해서는 밝혀지지 않았다. 특히 자성선속형 자웅동체어류의 성전환에 대한 연구들은 대부분 생식세포의 발달양상 (Johnson et al., 1998; Lee et al., 2002)을 중심으로 이루어져 왔으며 최근에 들어 내분비 활성변화에 대한 연구가 일부 진행되고 있다(Bhandari et al., 2003; Alam et al., 2006; Li et al., 2006). 이와 같이 생식내분비 조절에 있어서 중추적인 역할을 하는 B-P-G축은 어종에 따라 종류와 기능에 있어서 차이가 있을 뿐만 아니라 성전환 과정중의 활성변화, 특히 바리과 어류와 같이 자성선속형 자웅동체어의 성전환 과정중의 활성변화는 정확하게 밝혀져 있지 않은 상태이다.

이 연구는 자바리 치어의 웅성화 과정중 생식내분비 활성 변화를 살펴보기 위해 내인성 호르몬과 외인성 호르몬을 이용하여 성전환을 유도하였을 때의 GtH subunits (FSH β , LH β) mRNA와 성 스테로이드 호르몬의 변화를 분자생물학적 방법을 이용하여 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 혈중 스테로이드 호르몬의 변화

혈중 성 스테로이드 호르몬의 변화(11-KT, E₂)는 미부 동맥에서 혈액을 채혈하여 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장만을 분리한 후 분석할 때까지 -20℃에서 냉동 보관하였다. 스테로이드 호르몬 추출은 각 분석 대상 호르몬 당 혈장 200 µl를 채취한 다음 2 ml의 deathlyether를 첨가하여 혼합한 후 5~10분간 정제시킨 뒤 -70℃의 냉동고에서 15분간 결빙 시킨 후 상층의 유기 용매층(free steroids)만을 시험관에 옮겼다. 이 과정을 2회 반복하여 유기용매층은 진공원심분리기(VC-96N, TAITEC, Japan)를 이용하여 증발시켰다. 건조된 스테로이드 추출물은 800 µl의 0.1% gel-PBS (pH 7.5)에 다시 용해하였다.

방사면역측정법(RIA, radioimmunoassay) 분석은 Aida et al, (1984)의 방법에 따라 분석하였다. 실험에 사용된 항체는 모두 Alexis Fostier 박사 (Research Unit for Fish Physiology, France)로부터 구입하였다. 또한 방사표지된 [2,4,6,7-³H]-E₂와 [2,4,6,7-³H]-T은 Amersham Life Science (UK)로부터 구입하였다. 각 100 µl의 standard (0.015~3.84 ng/ml), 100 µl의 방사표지된 스테로이드를 첨가 후 희석 항체를 200 µl씩 넣고 교반시켜 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 항원 항체의 결합형과 유리형을 분리하기 위하여 DCC (dextran coated charcoal) 250 µl씩 첨가하여 4℃에서 15분간 방치한 후 원심분리 (4℃, 2000 g, 15분) 한 뒤, 결합형 상등액을 취하여 여기에 3 ml의 scintillation cocktail (optiphase, WALLAC)을 넣고 액체섬광계측기(TR-CARB-2100TR, PACKARD, USA)로 측정하였다. E₂와 11-KT의 최소 검출량은 각각 12.73 pg/ml와 7.66 pg/ml이다. E₂와 11-KT 측정내 계수는 각각 6.02%와 6.5%이고 측정간 계수는 9.20%와 9.66%였다.

나. Total RNA 분리

뇌하수체는 머리 부분을 절개하여 꺼낸 후, 바로 액화질소로 동결하여 분석할 때 까지 -70°C 에서 보관하였다.

각각의 조직에서 total RNA추출은 RNAiso (Takara, Japan)을 이용하였다. 뇌하수체를 1 ml의 RNAiso를 이용하여 균질화 시킨 후 0.5 ml의 chloroform을 첨가하여 상온에서 5분간 반응하고 4°C 에서 12,000 g로 15분간 원심분리하였다. 최상층의 RNA층만을 추출하여 isopropanol과 4 μl 의 Ethachinmate (Nippon gene, Jap)를 첨가하여 RNA를 침전시킨 후 DEPC DW 처리된 ethanol을 이용하여 건조시켜 DEPC DW에 용해하였다. 분리된 RNA는 260 nm과 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

다. cDNA 합성

cDNA 합성은 각 조직에서 추출한 total RNA 1.2 μg 을 주형으로 역전사 하였다. 역전사에는 Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, UK)를 이용하였다. Primer는 mRNA만 cDNA로 역전사 시키기 위하여 oligo (dT) primer (15 mer; Promega, USA)를 0.5 μg 첨가한 후 혼합하였고 DEPC DW 첨가하여 최종부피를 33 μg 로 만든 후 37°C 에서 60분간 역전사 하였다.

라. Real time RT-PCR를 이용한 GtH sbunits(FSH β , LH β) 발현량 측정

Qualitative Real-time RT-PCR를 위한 primer는 genome DNA의 증폭을 방지하기 위하여 exon과 intron의 경계를 포함하여 설계하였다.

Real-time RT-PCR은 Taqman probe 방법을 이용하였으며, 자바리의 GtH subunits cDNA의 염기배열에 특이적인 Primer와 Taqman probe를 설계하였다(Table 4). 절대 정량을 위해 합성된 cDNA는 pGEM-T easy vector (Promega, Medison, WI, USA)에 삽입하여 JM109 competent cell에 형질전환 시킨 후, 양성 colony로부터 plasmid DNA (pDNA)를 추출하였고, 추출된 pDNA는 spectrometer를 이용하여 정량화 한 후 copy 수를 측정하였다. pDNA는 5배씩 같은 비율로 희석하여 8 단계의 standard로 sample을 정량화 하였다. 정량분석 반응은 희석된 cDNA 1 μl 를 주형으로 IQ supermix (Bio-Rad, USA) 12.5 μl 와 Forward, Reverse primer 그리고

Taqman probe를 각 각 1 μ l, DEPC DW를 최종부피가 25 μ l로 만든 후 실험에 사용하였다. 실시간 정량분석은 Chromo 4TM Four-Color Real Time System (Bio-Rad, USA)을 이용하였다. 이때 열순환 반응은 50 $^{\circ}$ C와 90 $^{\circ}$ C 각각 2분간 최초 변성 반응 후에 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분의 순환 반응을 45회 반복하였다. 각 sample 별로 2반복 실험의 평균값을 이용하였다.

마. 통계처리

각 실험의 측정 값의 유의차 유무는 SPSS-통계패키지(version 12.0)에 의한 one way ANOVA를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균 간의 유의성을 검정하였다.



Table 4. Oligonucleotide primers used in real time RT-PCR

Gene	Oligonucleotide primers	Product length
FSH- β	Forward primer 5'-CTGCCACTCCGACTGTCATC-3'	101
	Taqman probe 5'-ACCAGCATCAGCATCCCTGTGGAGA-3'	
	Reverse primer 5'-GGTAACACTGTCCTTCACATATGG-3'	
LH- β	Forward primer 5'-TTTGAGCTTCCTGACTGTCCTC-3'	115
	Taqman probe 5'-ACCCGACTGTCACCTACCCTGTGGC-3'	
	Reverse primer 5'-GGCTCTCGAAGGTGCAGTC-3'	



3. 결 과

가. 혈중 스테로이드 호르몬의 변화

실험 시작시 혈중 E₂ 농도는 453.7 ± 113 pg/ml 였다. 7주후 혈중 E₂ 농도는 대조구(380.3 ± 77.5 pg/ml), MT 5 mg 처리구(309.7 ± 56.0 pg/ml), AI 3 mg 처리구(424.3 ± 43.0 pg/ml)와 AI 5 mg 처리구(371.0 ± 19.0 pg/ml)였으며 모든 처리구 간의 차이는 없었다(P>0.05). 21주후 혈중 E₂ 농도는 AI 5 mg 처리구(376.2 ± 36.8 pg/ml)에서 대조구(214.2 ± 25.5 pg/ml), MT 5 mg 처리구(280.4 ± 33.6 pg/ml), AI 3 mg 처리구(288.3 ± 24.0 pg/ml)에 비해 높았다(Fig. 4, P<0.05).

7주후 혈중 11-KT의 농도는 AI 5 mg 처리구(556.2 ± 157.1 pg/ml)에서 7주후 대조구 352.0 pg/ml에 비해 높았으며(P<0.05), MT 5 mg 처리구와 AI 3 mg 처리구에서 검출되지 않았다. 21주후 11-KT의 농도는 AI 5 mg 처리구(308.4 ± 184.7 pg/ml)를 제외한 나머지 처리구에서 검출되지 않았다(Fig. 5).

Estradiol-17 β

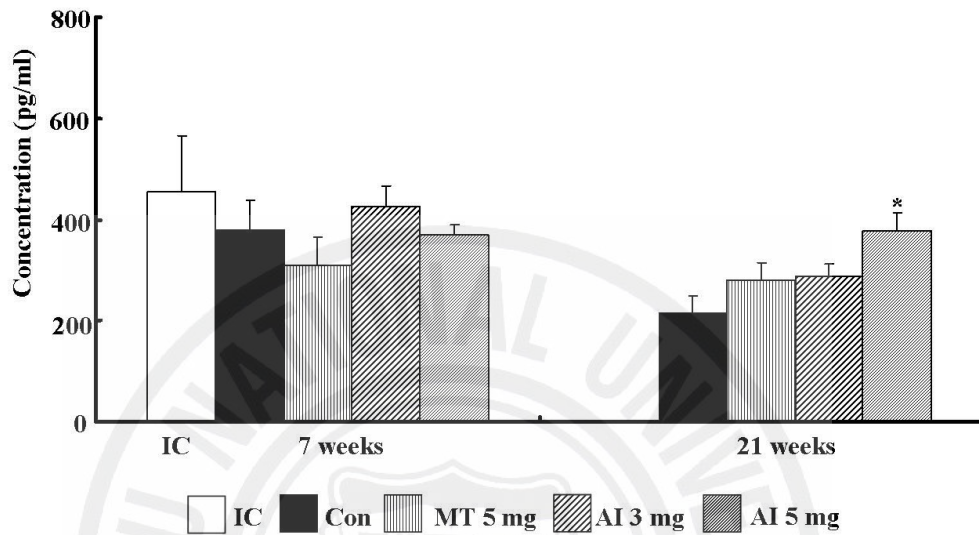


Fig. 4. Changes in plasma levels of estradiol-17 β (E₂) in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means.

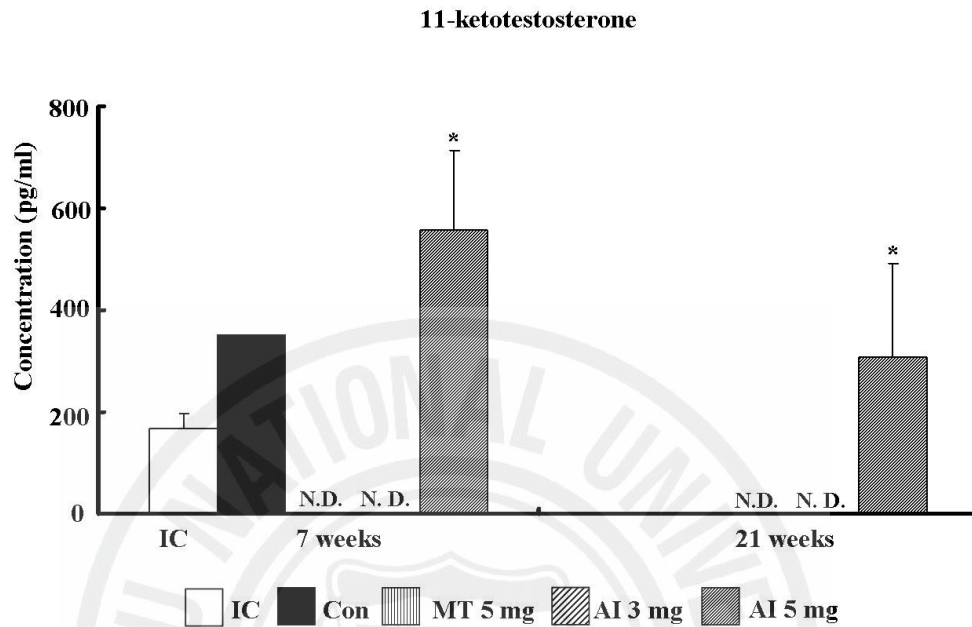
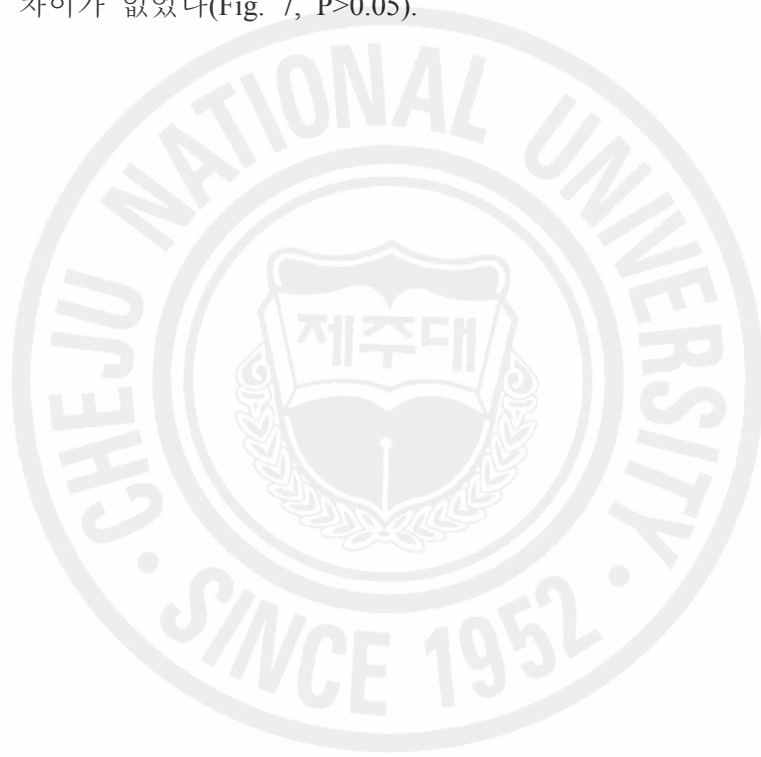


Fig. 5. Changes in plasma levels of 11-ketotestosterone (11-KT) in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). N. D., not detect. Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means.

나. GtH subunits (FSH β , LH β)의 mRNA 발현량 변화

FSH β mRNA 발현량은 7주 후 대조구에서 MT 5 mg 처리구, AI 3 mg 처리구, AI 5 mg 처리구보다 높은 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다($P < 0.05$). 21주 후 FSH β mRNA 발현량은 대조구, MT 5 mg 처리구와 AI 3 mg 처리구간의 차이는 없었지만($P > 0.05$), AI 5 mg 처리구에서는 대조구와 나머지 처리구에 비해 높았다(Fig. 6, $P < 0.05$).

LH β mRNA 발현량은 7주 후 대조구에서 MT 5 mg 처리구, AI 3 mg 처리구와 AI 5 mg 처리구에 비해 높았다($P < 0.05$). 21주 후 LH β mRNA 발현량은 대조구와 처리구간의 차이가 없었다(Fig. 7, $P > 0.05$).



FSH β mRNA

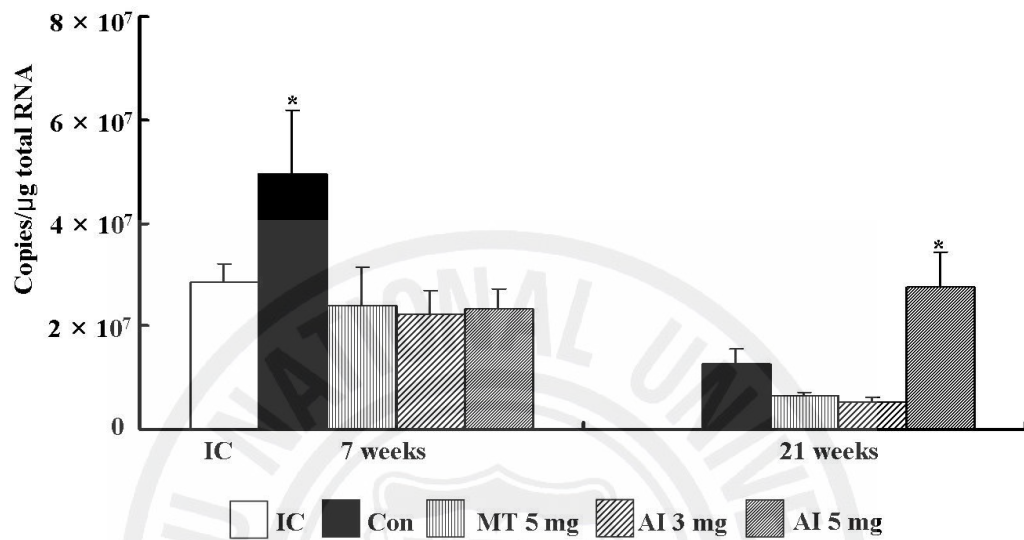


Fig. 6. Expression of FSH β mRNA in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means.

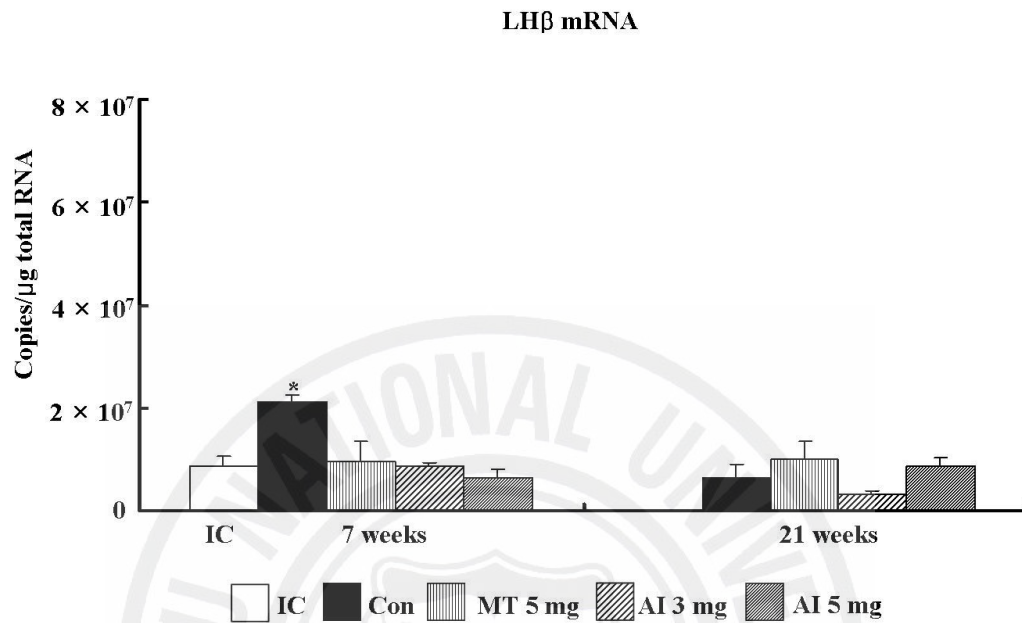


Fig. 7. Expression of LH β mRNA in the longtooth grouper *E. bruneus* after 7 & 21 weeks treatment of aromatase inhibitor (AI, fadrozole) and 17 α -methyltestosterone (MT). Asterisk on columns indicate significant differences comparison with control, *P<0.05. Vertical bars denote standard errors of means.

총 합 고 찰

자바리 치어의 조기 응성화 유도 실험은 MT 처리구와 AI 3 mg 처리구 생식선의 변화가 7주후 먼저 난모세포 발달이 억제되기 시작하고 21주후 난모세포가 퇴화하면서 정원세포와 정모세포가 분열 증식하였다. AI 5 mg 처리구에서는 7주째 한 개체에서 완전한 응성화 유도가 이루어졌으며, 다른 개체에서도 난모세포가 퇴화되고 21주후 다른 처리구의 생식선에 비해 상대적으로 정모세포의 비율이 많이 관찰되었다.

P450arom은 E₂를 합성하는 중요한 효소이고 E₂는 난소 분화와 난소발달에 중요한 역할을 한다(Desvages and Pieau, 1992; Nakamura et al., 1989, 1998; Nagahama et al., 1993). 이러한 결과들은 모두 AI 처리에 의해 다양한 어류에서 성전환이 가능하다는 것을 의미한다. 내인성 호르몬인 AI처리에 의한 응성화 유도는 자웅이체 어류인 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Kitano et al., 2000), 틸라피아, *O. niloticus* (Kwon et al., 2000, 2006; Afonso et al., 1999, 2001)등에서 성분화 시기에 처리하여 응성화를 유도할 수 있었다. 자성선숙형 자웅동체 어류인 바리과 어류에서 AI처리를 통한 응성화 유도는 honeycomb grouper, *E. merra*에서 6주 만에 응성화를 유도하였으며(Bhandari et al., 2004a), 붉바리, *E. akkara*는 4주 만에 일부 개체에서 응성화를 유도하였다(Li et al., 2006). 자웅동체어의 생식선내 생식원세포들은 외적인 자극에 의해 암수 어느 쪽이든 분화할 수 있는 능력을 가진다(Devlin and Nagahama, 2002). AI 처리에 의한 응성화 과정중 생식선의 변화는 honeycomb grouper, *E. merra* (Bhandari et al., 2004a, b)와 붉바리, *E. akkara* (Li et al., 2006)에서 응성화 초기에 난모세포들이 퇴화하기 시작하면서 정원세포들이 증식하고 응성화 후기에는 정원세포들이 정자형성을 개시하였다. 이상의 내용들을 종합해 보면 자바리 치어에서도 내인성 호르몬인 AI 처리에 의해 난모세포들이 먼저 퇴화하고 그 후 정자 형성이 개시되는 것으로 사료되며, 고농도의 AI 처리에 의해 자바리 치어에서도 완전한 수컷으로의 성전환 유도가 가능한 것으로

사료된다.

이 연구에서 대조구의 E₂ 농도는 실험 개시 시부터 7주후까지 낮은 경향을 보였으나 21주후 AI 5 mg 처리구에서는 나머지 처리구에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다(P<0.05). 반면에 AI 5 mg 처리구에서의 11-KT의 농도는 다른 처리구에 비해 유의적으로 높았으며(P<0.05) 나머지 처리구에서는 검출되지 않았다.

일반적으로 E₂는 난소분화와 난소발달에 관여하는 암컷 특이적인 성 스테로이드 호르몬이다(Forstier et al., 1983). 자성선속형 자웅동체어의 응성화 과정중의 E₂의 농도는 honeycomb grouper, *E. merra*의 경우 AI 처리에 의한 응성화 과정중에 혈중 E₂ 농도는 낮아지면서 주변인기의 난모세포들은 퇴화하고, 정원세포들이 증식을 시작하였다(Bhandari et al., 2003). Saddleback warasse, *Thalassoma duperrey*는 수컷으로 성전환을 시작하면서 E₂의 농도가 떨어진다고 보고하였다. 이 결과들을 종합해 보면 자성선속형 자웅동체어의 성전환 과정중에 E₂의 농도가 낮아지면서 정원세포들이 분열 증식을 시작하고 난모세포들이 퇴화하였다. 이와 같이 E₂는 암컷에서 난소분화와 발달에 관여하는 암컷 특이적인 성 스테로이드 호르몬이다. 하지만 뱀장어, *Anguilla japonica*의 초기 생식선발달에서 E₂가 정원세포의 분열 증식을 유도하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 보고되고 있어(Miura et al., 1999, 2003), 자성호르몬으로서 E₂의 정확한 생리적 역할에 대해서 많은 연구가 요구된다.

11-KT는 정자형성과 정소발달에 관여는 수컷 특유의 성 스테로이드 호르몬이다(Nagahama et al., 1993; Miura and Miura, 2001). 또한 바리과어류의 응성화 과정에 있어서도 정원세포 증식등 정자형성과정에서 중요한 역할을 한다(Hunter and Donaldson, 1983; 1993; Bhandari et al., 2003, 2004a; Li et al., 2006). 하지만 일부 연구들에서는 응성화 과정중에 혈중 11-KT의 농도가 아주 낮거나 또는 검출되지 않았다(Yeung et al., 1987; Kroon et al., 2003). 자웅동체어뿐만 아니라 어류의 치어시기에 성 스테로이드의 활성화 등에 대해서는 많은 연구가 요구된다.

이 연구에서 응성화 유도가 제일 많이 이루어진 AI 5 mg 처리구에서 FSH β mRNA의 발현은 성전환 초기에는 낮게 발현되다가 정자형성과정에서 이루어지는 성전환 후기에는 높게 발현되는 경향을 보였다. 반면 LH β mRNA는 실험 시작 시부터 종료 시까지 대조구와 모든 처리구에서 낮게 발현되어 성전환 과정중에

생리적 영향은 없는 것으로 생각되어진다.

어류의 정자형성과정중 두 종류의 GtH subunits (FSH β , LH β) 작용은 정소에서 androgen 생성에 부분적으로 작용하지만 어류마다 작용하는 생리적 영향과 시기가 다양하다(Schulz & Miura, 2002). 연어과 어류의 경우 혈중 FSH 농도는 정모세포발달과정에서 높은 값을 가지는 반면 LH는 초기 정모세포발달과정에서 검출되지 않다가 최종 방정시기에만 증가한다(Weil et al., 1995; Breton et al., 1998; Gomez et al., 1999). 수컷 무지개 송어 뇌하수체의 FSH, LH함량과 혈중 LH농도는 방정시기에 높아지는 반면 혈중 FSH농도는 후기 정자형성과정부터 방정직전까지 가장 높은 값을 가진다(Gomez et al., 1999). 또한 성숙한 수컷 striped bass의 FSH- β 는 초기 정자형성과정에서 발현되었지만 LH- β 는 후기 정자형성에 발현된다(Hassin et al., 1998). 성숙한 수컷 Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* 뇌하수체에서 GtH subunits를 northern blot 분석 방법으로 실험한 결과 common α 와 FSH β , LH β 는 모두 높게 발현되었으나 치어에서 common α 와 LH β 는 낮게 발현되었고 FSH β 는 전혀 발현되지 않았다(Weltzien et al., 2003). 바리과 어류 greasy grouper, *E. coioides*의 혈중 GtHs subunit 농도는 ELISA 방법을 통해 확인한 결과 혈중 FSH β 와 LH β 가 난소 발달 초기에는 높았지만 난모세포가 발달하기 시작하면서 두 종류의 GtH (FSH β , LH β)가 모두 감소하였다(Li et al., 2005). 이러한 결과들은 모두 성성숙에 미치는 GtHs에 관한 연구들이고 아직까지 바리과 어류의 성전환과정과 어린 치어를 대상으로 호르몬처리에 의한 성전환 과정중 GtHs 변화나 그 생리적 작용들에 대한 연구는 거의 드물다. 이번 실험에서 자바리 치어에서 FSH β mRNA는 난모세포가 퇴화하기 시작하고 정원세포가 출현하는 성전환 초기에는 낮았다가 정원세포들이 정모세포로 분열 증식이 활발해 지는 성전환 후기에 증가하는 것으로 보아 정자형성과정의 개시에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

결론적으로, 자바리 치어에서 외인성 androgen 호르몬인 MT 5 mg과 내인성 호르몬인 AI 3, 5 mg 처리를 통해 난소의 퇴화와 정소로의 분화를 유도하였고 AI 5 mg 처리구 중 한 개체에서는 완전한 수컷으로의 성전환을 유도하였다. 자바리 치어에서 옹성화 과정중 내분비 활성 변화는 먼저 11-KT의 증가가 생식선내 난모세포의 퇴화를 유도하고 정자형성개시와 분열증식에는 FSH β 와 11-KT가 작용

하여 응성화 유도가 이루어진 것으로 생각되어진다. 하지만 치어시기의 초기 생식선발달에 영향을 미치는 성스테로이드 호르몬과 GH의 작용 등 치어를 대상으로 한 번식내분비 기작연구에 관해서는 많은 연구가 진행되어야 한다.



요 약

이 연구는 자바리 치어에서 응성화 유도를 위해 내인성 호르몬을 투여하여 자바리 치어에서 응성화 유도과정을 조직학적으로 연구하였으며, 성전환 과정중의 혈중 스테로이드 호르몬의 변화와 뇌하수체에서 GtH subunits mRNA의 발현양상을 조사하였다.

실험어는 자바리 치어(체중 113 ± 17 g, 체장 16.2 ± 1.2 cm)를 이용하였고, 호르몬처리는 AI 3, 5 mg/kg·BW과 MT 5 mg/kg·BW을 실험 시작시와 7주째 어체 등근육에 주사하였다. Sampling은 실험시작시와 7주 그리고 21주에 실험구별 3미씩 무작위로 채집하여 사용하였다.

1. 내인성 호르몬 투여를 통한 자바리 치어 응성화 유도 과정의 생식선 변화

실험 시작시 생식선은 대부분 난원세포로 구성되었고 일부 주변인기 난모세포들이 분포하였다. 7주 후 대조구 생식선은 대부분 실험시작시보다 발달된 주변인기 난모세포가 분포하였다. MT 3 mg 처리구 생식선은 대부분 난원세포가 분포하였으며 일부 퇴행 난모세포도 분포하였다. AI 3 mg 처리구 생식선은 난원세포가 분포하였으며 일부 퇴행 난모세포와 주변인기 난모세포가 분포하였다. AI 5 mg 처리구의 생식선은 대부분 난원세포가 차지하였고 한 개체에서는 정자형성이 완료된 완전한 수컷으로 성전환이 일어났다.

21주 후 대조구 생식선은 일부 난원세포와 주변인기 난모세포로 구성되어있다. MT 처리구 생식선은 난원세포와 퇴행 난모세포가 분포하였으며 일부 정원세포부터 정모세포까지의 정자형성과정의 진행되었다. AI 3 mg 처리구 생식선은 대부분 난원세포와 일부 퇴행 난모세포들이 분포하였으며 일부 정원세포부터 정모세포까지의 정자형성과정의 이루어졌다. AI 5 mg 처리구 생식선은 난원세포와 주변인기 난모세포, 퇴행 난모세포로 구성되어있으며, 정원세포부터 정모세포까지의 정자형성과정의 일어났다.

이 결과 내인성 호르몬인 AI처리를 통해서 자바리 치어에서도 음성화가 유도되었다.

2. 내인성 호르몬투여를 통한 자바리 치어 음성화 유도 과정중의 내분비 활성 변화

혈중 E₂ 농도 변화는 실험 시작 시부터 종료 시까지 낮은 경향을 보였지만 (P>0.05), 혈중 11-KT의 농도 변화는 7주와 21주후의 AI 5 mg 처리구에서 다른 실험구에 비해 높게 나타났다(P<0.05).

FSH β mRNA 발현량의 변화는 7주후 대조구에서 높은 경향을 보였고 모든 실험구간에 차이는 없었으나(P>0.05). 반면에 21주후의 FSH β mRNA 발현은 AI 5 mg 처리구에서 높았다(P<0.05). LH β mRNA 발현은 실험시작 시부터 실험종료 시까지 모든 실험구간의 차이가 없었다(P>0.05).

이 결과 11-KT와 FSH β mRNA가 자바리 치어의 음성화 과정중에 중요한 작용을 하는 것으로 판단된다.

참고문헌

- Afonso, L. O. B., Iwama, G. K., Smith, J., Donaldson, E. M., 1999. Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on plasma sex steroid secretion and oocyte maturation in female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during vitellogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 231-241.
- Afonso L. O .B., Wassermann, G. J., Terezinha de Oliveira R., 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J. Exp. Zool.* 290, 177-181.
- Aida, K., Kato, T. and Awaji, M., 1984. Effects of castration on the smoltification of precocious male masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50, 565~571.
- Alam, M. A., Bhandari, R. K., Kobayashi, Y., Nakamura, S, Soyano, K. Nakamura, M., 2006. Changes in androgen-producing cell size and circulating 11-ketotestosterone level during female-male sex change of honeycomb grouper *Epinephelus merra*. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 206-214.
- Bhandari, R. K., Komuro, H., Nakamura, S., Higa, M., Nakamura, M., 2003. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Zool. Sci.* 20(11), 1399-1404.
- Bhandari, R. K., Higa M, Nakamura S. and Nakamura, M., 2004a. Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Mol. Reprod Dev.* 67, 303-307.
- Bhandari, R. K., Komuro, H., Higa M. and Nakamura, M., 2004b. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zool. Sci.* 21, 305-310.

- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Bioch. Physiol.* 3, 219-245.
- Breton, B. Govoroun, M. and Mikolajczyk, T., 1998. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH α stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 38-50.
- Chauvet, C., 1988 Study of the growth of the grouper *Epinephelus guaza* (Linnaeus, 1758) from the Tunician coasts. *Aquatic Living Resources.* 1, 277-288.
- Chen, F. Y., M. Chow, T. M. Chao and R. Lim, 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) in Singapore. *Singapore J. Pri. Ind.* 5, 1-21.
- Degani, G. I., Tzchori, S. Yom-Din., Goldberg, D. and Jackson, K., 2003. Growth differences and growth hormone expression in male and female European eels (*Anguilla anguilla* (L.)), *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 88-93.
- Duncan, D. B., 1955. Multiple-range test and multiple F test. *Biometrics.* 11, 1-42.
- Desvages, G., Pieau, C., 1992. Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41, 851-853.
- Devlin, R. H. and Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture.* 208, 191-364.
- Dickey, J. T., and Swanson, P., 2000. Effects of salmon gonadotropin releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 436-449.
- Fishelson, L., 1975. Ecology and physiology of sex reversal in *Anthias squamipinnis* (Peters), (Teleostei: Anthiidae). In "Intersexuality in the animal kingdom" (R. Reinboth, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y., pp 284-449.
- Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B., Zohar, Y., 1983. The gonadal steroids. In: Hoar WS, Randall DJ. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 9a. Acade

- mic Press, New York. pp, 277-372.
- Fostier, A., Le, Gac, F., Loir, M., 1987. Steroids in male reproduction. In: Idler D. R., Crim, L. W., Walsh, J. M. (Eds.), Proceedings of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Memorial University, St John's, Canada. pp, 239-245.
- Gen, K., Okuzawa, K., Senthilkumaran, B., Tanaka, H., Moriyama, S., Kagawa, H., 2000. Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red sea bream (*Pagrus major*) during sexual maturation. Biol. Reprod. 63(1), 308-319.
- Gomez, J. M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P., Y., Breton, B., Le, Gac, F., 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol. 113, 413-428.
- Hassin, s., Gothilf, Y., Blaise, O., Zohar, Y., 1998. Gonadotropin-I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimised ribonuclease protection assay. Biol. Reprod. 58, 233-240.
- Hellqvist, A., Bornestaf, D., Borg, B. and Schmitz, M., 2004. Cloning and sequencing of FSH- β and LH- β -subunit in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and effects of photoperiod and temperature on LH- β and FSH- β mRNA expression, Gen. Comp. Endocrinol. 135, 167-174.
- Hunter, G. A., and Donaldson, E. M., 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In Hoar, W. S., Randall, D. J. and Donaldson, E. M., (eds.) Fish Physiol. V. 9B. Academic Press, London. pp. 223-291.
- Josefa, D. T., Luis, M. B. G. and Antonio R. C, Jr., 1994. Induction of sex inversion in juvenile grouper, *Epinephelus suillus*, (valenciennes) by injections of 17 α -methyltestosterone. J. Ichthyol. 40(4), 413-420.
- Johnson, A. K., Thomas, P., Wilson, Jr. R. R., 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous

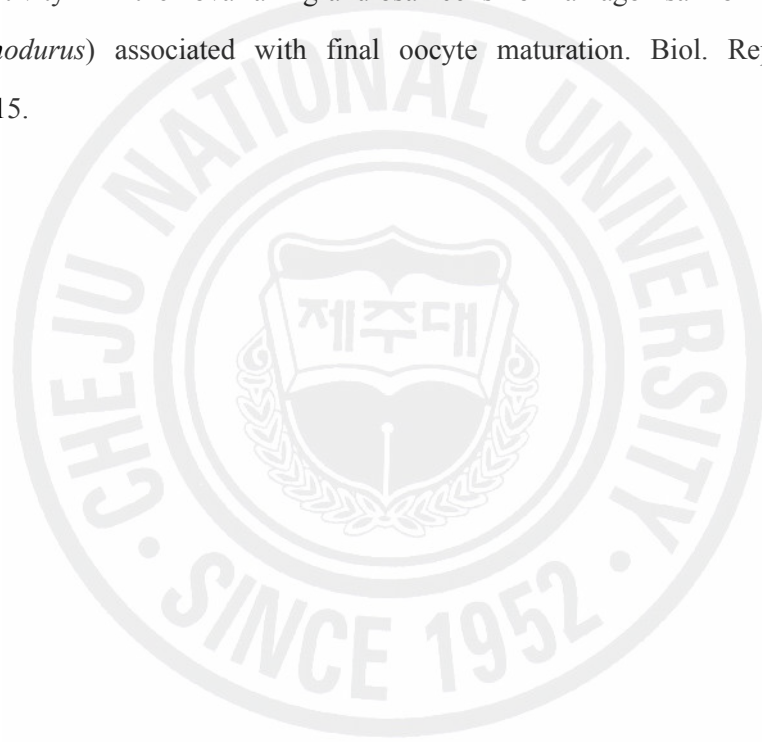
- nous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *J. Fish Biol.* 52, 502-518.
- Kajimura, S., Yoshiura, S., Suzuki, M. and Aida, K., 2001. cDNA cloning of two gonadotropin β subunits (GTH-I β and -II β) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 117-129.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, S., 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 29 C38.
- Kayano, Y., 1996. Yearly change in egg production of the red spotted grouper, *Epinephelus akkara* in a rearing tank. *Saibai. Giken.* 25, 47-52.
- Kroon, F. J., Munday, P. L. and Pankhurst, N. W., 2003. Steroid hormone levels and bi-directional sex change in *Gobiodon histrio*. *J. Fish Biol.* 62, 153-167.
- Kim, I. S., Y. Choi, C. L. Lee, Y. J. Lee, B. J. Kim and J. H. Kim., 2005. Illustrated book of Koreans fishes. Kyo-hak Publishing Co. Ltd. Seoul, Korea. pp. 615.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., Abe, S. I., 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 56, 1-5.
- Kuo, C. M., Ting, Y. Y., Yeh, S. L., 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture.* 74, 113-126.
- Kwon, J. Y., Haghpanah, V. Kogson-Hurtado, L. M., McAndrew, B. J. and Penman, D. J., 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J. Exp. Zool.* 287, 46-53.
- Kwon, J. Y., David, J. P. and Kwon, H. C., 2006. The Timing of aromatase action for sex differentiation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev. Reprod.* 10(3), 197-202.
- Lance, V. A. and Bogart, M. H., 1992. Disruption of ovarian development in

- alligator embryos treated with aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86, 59-71.
- Lee, S. T. L., Kime, D. E., Chao, T. M., Lim, H. S., Chou, R., Lam, T. J., Tan, C. H., 1995. In vitro metabolism of testosterone by gonads of the grouper (*Epinephelus tauvina*) before and after sex inversion with 17 α -methyl-testosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 41-49.
- Li, C. J., Li, Z., Yang, W., Hong, Y. H., Gui, J. F., 2005. Molecular and expression characteriaztion of three gonadotropin subunits common α , FSH β and LH β in groupers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 233, 33-46.
- Li, G. L., Liu, X. C., Zhang, Y., Lin, H. R., 2006. Gonadal development, aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akkara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor, fadrozole. *Aqua-culture Research.* 37, 484-491.
- 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., Ohta, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2003. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinol.* 144, 5004-5510.
- Monica, B., Simon, C. C., Deborah, L. M., Celine, H. B., Hewitt, L. M. and Van, Der, Kraak, G., 2005. Morphological abnormalities during early-life development of the estuarine mummichog, *Fundulus heteroclitus*, as an indicator of androgenic and anti-androgenic endocrine disruption. *Aquatic Toxicolol.* 71, 357-369.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Sakai, N., and Tanaka, M., 1993. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish*

- Physiol. Biochem. 11, 3-14.
- Nakamura, M., Hourigan, T. F., Yamauchi, K., Nagahama, Y., Grau, G. E., 1989. Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse (*Thalassoma duperrey*). *Env. Biol. Fish.* 24, 117-136.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., Nagahama, Y., 1989. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281, 362-372.
- Pankhurst, N. W., 1998. Reproduction. In: Black, K. D. and Piking, A. D. (eds.), *Biology of Farmed Fish*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 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.
- Pierce, J. G., and Parson, T. F., 1981. Glycoprotein hormone: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 465-495.
- Querat, B., Moumni, M., Justisz, M., Fontaine, Y. A., Counis, R., 1990. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for the putative β subunit of the type-II gonadotropin from the European eel. *J. Mol. Endocrinol.* 4, 257-264.
- Reinboth, R., 1987. Sex-inversion of the hermaphroditic protogynous teleost. *J. fish biol.* 30, 605-616.
- 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.
- Schieweck, K., Bhatnagar, A. S. and Matter, A., 1988. CGS 16949A, a new non-steroidal aromatase inhibitor: Effects on hormone-dependent and independent tumors in vivo. *Cancer Res.* 48, 834-838.
- Song, Y. B., Baek, H. J., Lee, K. J., Soyano, K. and Lee, Y. D., 2005. Induced sex reversal of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by 17 α

- methyltestosterone. *J. Aquaculture*. 18(3), 167-172.
- Steele, R. E., Mellor, L. B., Sawyer, W. K., Wasvary, J. M., Browne, L. J., 1987. In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition by the nonsteroidal aromatase inhibitor CGS16949A. *Steroids*. 50, 147-161.
- Sugama, K. and H. Ikenoue., 1999. Research and development: The seed production technique of humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. JICA. pp. 53.
- Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W. W., 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GtH I and GtH II. *Biol. Reprod.* 44, 29-38.
- Weil, C., Bougoussa-Houadec, M., Gallais, C., Itoh, S., Sekine, S., Valotaire, Y., 1995. Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100, 327-333.
- Weltzien, F. A., Norberg, B., Helvik, J. V., Andersen, O., Swanson, P. and Anderson, E., 2003. Identification and localization of eight distinct hormone-producing cell types in the pituitary of male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*), *Comp. Biochem. Physiol. A.* 134, 315-327.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (eds.), *Fish Physiology Vol 3*. Academic press, New York. pp 117-175.
- Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, 33, 329-354.
- Yeh, S. L., Kuo, C. M., Ting, Y. Y. and Chang, C. F., 2003. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*. 218, 729-739.
- Yeung, W. S., Chen, H., Chan, S. T. H., 1987. A radioimmunoassay study of the plasma levels of sex steroid profiles in the freshwater, sex-reversing teleost

- fish, *Monopterus albus* (Zuiew). Gen. Comp. Endocrinol. 66, 353-363.
- Yeung, W. S., Chen, H., Chan, S. T. H., 1993. In vitro effect of oLH and LHRH -analog on sex reversal and sex steroid profiles in the female *Monopterus albus*. Gen. Comp. Endocrinol. 90, 23-30.
- Yoshiura, Y., Suetake, H. and Aida, K., 1999. Duality of gonadotropin in a primitive teleost Japanese eel (*Anguilla japonica*), Gen. Comp. Endocrinol. 114, 121-131.
- Young, G., Kagawa, H., Nagahama, Y., 1983. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation. Biol. Reprod. 29, 310-315.



감사의 글

이 논문은 많은 분들의 관심과 조언 그리고 노력으로 저에게 주신 석사과정중의 마지막선물이라고 생각하며 모든 분들에게 감사의 말을 전하고자 합니다.

20대 청년기를 대부분 이곳 제주대학교 해양과환경연구소 발생생물학 실험실에서 보내면서 인생에 있어서 많은 것을 느끼게 해주신 이영돈 교수님께 감사드립니다. 논문을 완성하는 과정에서 세심한 지적과 많은 충고를 해주신 이경준 교수님 그리고 오만과 편견을 버리라고 항상 당부하시는 이기완 교수님께 감사를 드립니다. 때론 따끔한 충고와 다른 한편으론 따뜻한 애정과 조언으로 희망을 심어주셨던 최광식 교수님, 열정이라는 단어를 다시 한 번 되새겨 주신 김기영 교수님께도 다시 한 번 감사를 드립니다.

이 논문을 쓰는 과정에서 많은 관심과 실험을 함에 있어 아낌없는 지원을 해주신 자연과학대학 생명과학과 김세재 교수님과 정형복 선생님 그리고 현경만 후배님을 비롯한 분자생물학 실험실원들에게도 고마움을 전합니다.

해양과 환경연구소의 기자재와 시설물들을 아낌없이 지원해 주신 행정실 직원분들: 강태연 선생님, 고성대 선생님, 김봉길 선생님, 김태웅 선생님, 김선희 선생님과 강민희에게 진심으로 감사드립니다. 실험실에 들어오면서부터 “우리“라는 말을 잊지 않게 해주시는 김병호 선배님을 비롯한 해성희 선배님들(김병호, 나오수, 오성립, 김성준, 서종표, 이치훈, 김봉원, 김한준, 박창범, 최정권, 고희진, 고범호, 진영석, 강지웅, 김삼연, 한성민) 덕분에 졸업하게 되었습니다, 감사합니다“.

해양생명과학과의 든든한 선배님들(최영웅 선배님, 양현성 선배님, 임세진 선배님, 문동오 선배님)과 실험실에서 열심히 학업에 열중하고 있는 후배님들에게도 감사드리며, 수산생명의학과 선배님들과 후배님들에게도 고마움을 전합니다. 실험어 사육부터 실험이 진행되는 동안 자기일 처럼 신경써주신 탐라수산에 현구연 사장님, 차성인 선배님, 김철영 후배님을 비롯한 직원분들께도 감사드립니다. 비록 같은 대학 같은 실험실은 아니지만 항상 많은 관심을 가져주신 김형배 교수님, 백혜자 교수님 그리고 부경대학교 발생생식내분비실험실의 동기사랑을 외

치던 황인준 실장님, 사랑스런 이수정, 조도형 후배님을 비롯한 나머지 실험실 학우 분들께도 고마움을 전합니다.

실험을 계획하면서부터 이 논문이 나오기까지 2년 동안 퇴근도 안하시고 동고동락 하면서 수많은 충고와 세심한 배려 그리고 지금 이 감사의 글을 쓰기 바로 전까지 저를 긴장의 끈을 놓을 수 없게 만드시는 임봉수 박사님. 안 보이는 곳에서 항상 후배들을 챙겨주시고 후배들을 향한 넓디넓은 배려심을 가지고 계시지만 하늘 쳐다볼 시간 없다고 항상 땅만 쳐다보고 걸어 다니시는 송영보 박사님. 365일중 364일을 연구소에 남아서 후배들의 충고와 잘못을 지적해주는 해양연구소의 경비?이자 살아있는 든든한 기둥 이치훈 선배님, 내유의강 문순주 박사님, 많은 연세에도 불구하고 만학의 진리와 정도를 몸소 실천하시는 김성훈 선배님, 많은 생각과 고민들을 신사적으로 해결할 수 있게 만들어주신 허상우 선배님, “정말 수고했다” 이말 한마디로 모든 고민과 노력을 가슴으로 느낄 수 있고 이해할 수 있을 거라 믿어 의심치 않는 류용운 후배님, 열정하나만으로 최선을 다하고 담배의 진한 맛을 아는 강형철 후배님, 엉뚱하지만 가슴속에 따뜻함을 가지고 있는 이태진 후배님, 적응력과 눈치가 보통이 넘는 항상 밝은 우리 실험실 막내 김수용 후배님, 그리고 비록 지금은 같이 없지만 각 자 자기의 희망을 찾아 열심히 일하고 있는 후배님들(이권우, 김태호, 김재형, 강승민, 김강, 장민우, 고현주, 김대현, 이희중)에게도 감사의 말을 전합니다. 언제나 젖은 발과 손으로 모든 것을 말하는 발생생물학 실험실 식구들에게 같이 지새웠던 밤들만큼이나 깊은 애정과 관심 다시 한 번 정말 감사드립니다.

마지막으로 아낌없는 격려와 희망이라는 빛을 볼 수 있게 해주신 친척분들과 98학번 동기들 그리고 여러 갑장 친구들 “고맙다” 끝으로 그 동안 너무 많이 소홀했지만 항상 존경하고 사랑스런 말이 필요 없는 절대적인 존재...

“아버지, 어머니 고맙습니다! 사랑하는 순자, 성균아 고맙다” ...