

붉바리의 성결정 유전자(DMRT1과 FOXL2)의 부분염기서열 cloning

박용주¹ · 이치훈² · 이영돈^{1*}

¹제주대학교 해양과학연구소 · ²주식회사 씨알

Partial sequence identification of sex determination gene (DMRT1 and FOXL2) in the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*

Yong-Ju Park¹, Chi-Hoon Lee² and Young-Don Lee^{1*}

¹Marine Science Institute, Jeju National University · ²CR Co., Ltd.

The transcription factors, DMRT1 and FOXL2, play a role in fish sex differentiation of the bipotential precursor into the male and female pathway, respectively. In order to provide the molecular background for understanding hormonal regulation in sexual determination and differentiation in the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*, one of commercially important epinephelines, and is often used to study protogynous sex change. First, we amplified the partial sequence of two genes (DMRT1 and FOXL2) from the gonad of red-spotted grouper. Also, we surveyed the tissue-specific and sex-specific expression pattern of each genes by RT-PCR. DMRT1 and FOXL2 cDNA fragments consist of 489 and 836 base pairs (bp) and encodes a protein of 162 and 278 amino acids, respectively. RT-PCR revealed that DMRT1 mRNA was expressed higher level in the testis. FOXL2 was expressed extensively in the neural and peripheral tissues with its highest level in the ovary, indicating a potential role for FOXL2 in the brain-pituitary-gonad axis.

Key words : red spotted grouper, sex determination, DMRT1, FOXL2

서 론

어류의 성결정은 성염색체의 조합과 비율에 의해 결정되는 유전적 성결정과 성적미분화 시기에 환경적 요인에 의해 유도되는 환경적 성결정으로 대별된다(Devlin and Nagahama, 2008). 포유류의 성결정은 Y염색체 상에 있는 sex-determining region Y(SRY) 유전자에 의해 결정된다고 밝혀진 이후, 포유류 이외의 동물에서 SRY의 상동 유전자 존재에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Sinclair et al., 1990; Brennan et al., 1998). 특히, Doublesex and mab-3 related transcription factor 1(DMRT1)은 XY형의 성전환 유형과 관련 있는 DM-domain (DNA-binding motif)을 포함하는 단백질 중 하나로 수컷의 정소에서만 특이적으로 발현되며(Raymond et al., 1998; Zhu et al., 2000), forkhead-box protein L2 (FOXL2)는 암컷의 난소에서만 특이적으로 발현되며 난소 발달 및 분화에 중요한 역할을 수행한다(Wang et al., 2004, 2007; Nakamoto et al., 2007; Liu et al., 2007).

어류의 성은 자웅이체와 자웅동체로 구분되며, 어류의 정소 및 난소 분화에 따른 DMRT1와 FOXL2 유전자와 관련된 연구는 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*, 송사리, *Oryzias latipes*, 틸라피아, *Oreochromis niloticus*, 넙치, *Paralichthys olivaceus* 등 자웅이체 어류를 중심으로 이루어져 왔다(Guan et al., 2000; Marchand et al., 2000; Kobayashi et al., 2004; Jo et al., 2007). 붉바리, *Epinephelus akaara*는 바리과(Serranidae)에 속하는 어류로 암컷으로 성 분화 후 수컷으로

로 전환하는 자성전속형 자웅동체어류로(Kayano et al., 1994), 붉바리의 성 결정 유전자에 관한 연구는 미미한 수준이다.

따라서, 이 연구는 자성전속형 자웅동체어인 붉바리를 대상으로 성 결정 유전자인 DMRT1와 FOXL2 유전자를 cloning하여 붉바리 성 분화의 분자기작에 관한 기초 자료를 제공하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

웅성 유전자인 DMRT1과 자성 유전자인 FOXL2 cDNA fragment를 붉바리의 생식소로부터 분리하기 위해 제주대학교 해양과학연구소에서 사육 중인 4년생 붉바리를 0.01% 2-phenoxyethanol (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan)에 마취한 후, 정소 및 난소를 각각 적출하였다.

생식소 조직에서의 Total RNA 추출은 TRI reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)로 조직을 균질화하여 TRI reagent 100 μ l당 chloroform 20 μ l를 첨가한 후, 4°C, 12,000 g에서 15분간 원심분리를 실시하였고, 원심분리 후 RNA를 포함하는 상층액을 새 튜브로 옮겨서 동량의 Iso-propanol를 첨가하여 원심분리를 통해 침전된 RNA를 확보하였다. 이 RNA는 75% 에탄올로 세척한 후, 적당량의 RNase-free 증류수에 용해하여 Total RNA 용액이 만들어졌다. 추출된 Total RNA는 NanoVue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)에 의해 그 농도가 측정되었으며, A260/A280

nm의 값이 1.7~21 범위 내의 RNA 샘플만을 선택하여 cDNA 합성에 사용하였다. 특히, RT-PCR 또는 real-time PCR 방법을 이용하여 시료의 유전자 발현량 조사를 위해서는 추출된 total RNA 내에 genomic DNA의 contamination 방지를 위해 RQ1 RNase-Free DNase (Promega)을 별도로 처리한 후, cDNA 합성에 사용하였다.

cDNA의 합성은 각 조직에서 추출한 total RNA 0.5 µg을 주형으로 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Japan)을 이용하여 합성하였으며, Oligo dT Primer 0.5 µl, Rnandom 6mers 0.5 µl, PrimeScript™ RT Enzyme mix 0.5 µl 그리고 5×PrimeScript™ Buffer 2 µl를 첨가하여 최종 volume을 10 µl가 되도록 ddH₂O를 첨가하였다. 37°C에서 15분간 역전사 반응을 시킨 뒤, 85°C에서 5초간 반응하여 합성을 중지하였다. 합성된 각 cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 의한 과증폭 방지를 위해 Nuclease-free 증류수 40 µl를 첨가하여 최종부피를 50 µl가 되게 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 성 결정 유전자의 탐색 및 분리

양성 유전자인 DMRT1과 자성 유전자인 FOXL2

cDNA 분리를 위하여 미국국립생물공학정보센터(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 orange-spotted grouper, *E. coioides* (accession number, EF017802), honeycomb grouper, *E. merra* (accession number, EU555179), european seabass, *Dicentrarchus labrax* (accession number, AM993095) 그리고 black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* (accession number, AY323953)로부터 유전자 염기서열 정보를 참고하였고, 상동성이 높은 부분을 선택하여 붉바리의 DMRT1 cDNA 탐색용 primer를 디자인 및 제작하여 사용하였다. 붉바리 Sox9 cDNA는 이미 NCBI에 등록된 염기서열(accession number, AY676309)을 바탕으로 primer를 제작하여 사용하였다(Table 1).

제작된 각 유전자들의 primer set와 PCR에 의해 증폭된 유전자 산물을 정제한 후, pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 삽입(subcloning)한 후, JM109 competent cell에 유전자 형질전환(transformation)을 거쳐서 대량으로 복제(cloning)하였다. 대량 배양된 양성 cell colony로부터 plasmid DNA를 분리하였고, 복제된 DNA의 염기서열(sequencing)은 Genotech (Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 각 유전자의 부분염기서열 결과는 NCBI의 BLAST 검색을 이용하여 확인

Table 1. Primer sets used for partial cloning of DMRT1 and FOXL2 in the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*

Primers	Sequence
Degenerate primers	
DMRT1-F	5'-CTTCTGCAACTGGAGGGACT-3'
DMRT1-R	5'-GTGGCTGCTGGGTAGTAGGA-3'
FOXL2-F	5'-ATGATCCACGACACCAACAC-3'
FOXL2-R	5'-TCGTGTTCCAGTAAGAGCA-3'

하였다.

염시서열이 확인된 붉바리의 응성과 자성 유전자에 대한 중간 계통유연관계에 대한 Multiple alignment는 ClustalW의 Phylip 프로그램을 이용하였고, 각 어종들의 아미노산서열을 비교하였다. BOOTSTRIP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 100회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 100 set는 PRODIST 프로그램에 의해 distance matrices를 계산하였다. 계산된 distance matrices는 NEIGHBOR 프로그램의 tree 작성 input 데이터로 이용하였고, CONSENSE 프로그램을 이용하여 consense tree를 작성하였다. Out group으로는 rat의 μ (mu) opioid receptor (accession number, L13069)가 사용되었으며, 각 유전자의 multiple alignment에 이용된 종과 유전자는 NCBI의 BLAST 검색을 이용하였다(Table 2).

3. 성 결정 유전자의 조직별 발현변화

각 성결정 유전자들의 기관별 발현양상을 조사하기 위해서 붉바리의 뇌, 아가미, 심장, 간, 정소 그리고 난소 등의 기관별 조직을 적출하였고, 모든 샘플 조직은 분석 전까지 -80°C에 보관하였다. Total RNA 추출, RNase-Free DNase 처리 그리고 cDNA의 합성에 관한 실험 진행과정은 위에 언급된 방법과 동일하게 시행하였다.

각 조직들에서 추출된 시료(cDNA), GoTaq Green Master mix (Promega, USA)와 primer set를 혼합하여 94°C에서 45초, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분 씩 총 35cycle을 증폭하는 RT-PCR법을 시행하였고, 얻어진 PCR 산물은 1% agarose gel 위에서 35분간 전기영동(100 V)을 실시하여

Table 2. Gene information of used for multiple alignment

Gene group	Species (gene name)	Accession number
DMRT1	Medaka (DMRT1)	AF319994
	Nile tilapia (DMRT1)	AF203489
	Zebrafish (DMRT1)	AF439562
	Wrasse (DMRT1)	AY177711
	Olive flounder (DMRT1)	EU490514
	Orange-spotted grouper (DMRT1)	EF017802
	Honeycomb grouper (DMRT1a)	EU555179
	Honeycomb grouper (DMRT1b)	EU555178
	European seabass (DMRT1L)	AM993095
	European seabass (DMRT1S)	AM993096
FOXL2	Zebrafish (FOXL2)	BC116585
	Rainbow trout (FOXL2)	NM_001124485
	Nile tilapia (FOXL2)	AY554172
	Olive flounder (FOXL2)	AB303854
	Medaka (FOXL2)	AB252055
	Pejerrey (FOXL2)	EU864151

유전자의 발현을 확인하였다. Control 유전자로는 housekeeping gene의 일종인 18s rRNA를 이용하였다.

결과 및 고찰

붉바리의 생식소를 대상으로 음성 유전자인 DMRT1과 자성 유전자인 FOXL2 cDNA를 분리하여 부분염기서열을 분석한 결과 DMRT1은 총 489 bp길이의 부분염기서열과 162개의 아미노산 단백질이 encode 되어있으며, Foxl2는 총 836 bp길이의 부분염기서열 278개의 아미노산 단백질 encode 되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1, 2). 붉바리에서 확인된 자성 및 음성 유전자의 아미노산 서열을 다른 어종의 동일한 유전자들과 그 상동성을 비교해 본 결과,

DMRT1의 아미노산은 medaka, zebrafish, olive flounder 그리고 nile tilapia 등과는 약 62~83%의 다소 낮은 상동성을 보였으나, european seabass, honeycomb grouper 그리고 orange-spotted grouper 등과는 약 90~98%의 높은 상동성을 나타내었다. FOXL2의 아미노산의 경우에는 보고된 어종 중에 zebrafish에서만 다소 낮은 약 84%의 상동성을 보였지만, rainbow trout, nile tilapia, medaka, pejerrey 그리고 olive flounder 등과는 약 93~97%의 높은 상동성을 나타냈다(Fig. 2). 발생계통학적인 측면에서 붉바리의 DMRT1와 FOXL2 유전자는 다른 어종의 유전들과 consensus tree를 이용해 비교해 본 결과, 각각 유전자의 subgroup에 속해 있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 생후 4년생의 붉바리에서 채취한 뇌, 아가미, 심장, 간, 난소 그리고 정소 등의 기관별 조직샘플들에서 발현되는 성분화 유전자들을

```

2   TTCTGCAACTGGAGGGACTGCCAGTGTCCCAAATGTAAACTGATAGCTGAGAGACAGAGA
   F C N W R D C Q C P K C K L I A E R Q R
62  GTCATGGCGGCCAGGTTGCCTTGAGACGGCAGCAGGCTCAGGAAGAGGAGCCTGGGGATT
   V M A A Q V A L R R Q Q A Q E E E L G I
122 TGTAGTCCGTGGCTCTGCCTGGCCCTGAGGTGATGGTGAAGAATGAAGCTGGAGCAGAC
   C S P V A L P G P E V M V K N E A G A D
182 TGCTTGTTCACCTGTGGAGAGACGATGCCCGACGCCACCAGCACCTCCACTTCTTCCTTT
   C L F T V E R R S P T P T S T S T S S F
242 GCTGTCACAGGGAGTCGCTCGGCATTGTCCCCAGCCCGTCGGCCGGTGCCCGGGCTCAT
   A V T G S R S A L S P S P S A G A R A H
302 AATGACACACAGTCGGACCTGCTGCTGGAACTTCCTATTACAACCTTCTACCAGCCGTCT
   N D T Q S D L L L E T S Y Y N F Y Q P S
362 CGTTACCCACCTACTATGGCAATCTGTACAACCTACCAGCAGTACCAGATGCCTCATGGT
   R Y P T Y Y G N L Y N Y Q Q Y Q M P H G
422 GATGGCCGCATTTCAAACCACAACATGCCCTCTCAGTACCGTGTGCATTCTACTACCCA
   D G R I S N H N M P S Q Y R V H S Y Y P
482 GCAGCCAC 489
   A A
    
```

Fig 1. The nucleotide and deduced amino acid sequence of DMRT1 gene in the red spotted grouper, *Epinephelus. akaara*. It was 489 base paris long and encoding 162 amino acids.

```

1  ATGATCCACGACACCAACACGACCAAGGAGAAAGAGCGACCCAAAGAGGAGCCGGTCCAG
   M I H D T N T T K E K E R P K E E P V Q
61  GAGAAAGTCCCGGAGAAGCCGGACCCGTCAGAAACCACCGTACTCCTATGTCGCTCTC
   E K V P E K P D P S Q K P P Y S Y V A L
121 ATCGCCATGGCCATCCGGGAGAGCTCCGAGAAGCGCCTCACTCTGTCCGGTATTTACCAG
   I A M A I R E S S E K R L T L S G I Y Q
181 TATATCATCAGCAAGTTCCCTTCTATGAGAAAAATAAGAAAGGTTGGCAGAACAGTATC
   Y I I S K F P F Y E K N K K G W Q N S I
241 AGACACAACCTGAGTCTCAACGAATGCTTCATTAAGGTTCCGCGGGAGGGCGGGGGAG
   R H N L S L N E C F I K V P R E G G G E
301 AGGAAGGGGAATTACTGGACACTCGACCCAGCCTGCGAGGACATGTTTGAGAAGGGAAAC
   R K G N Y W T L D P A C E D M F E K G N
361 TACAGGAGGGCGCCGAGGATGAAGCGGCCGTTTACACCTCCACCGACGCACTTCCAGCCG
   Y R R R R R M K R P F R P P P T H F Q P
421 GGGAAAGTCCTTGTTCCGAGGAGACGGCTATGGCTACCTGTCCACCCAAGTACCTGCAG
   G K S L F G G D G Y G Y L S P P K Y L Q
481 TCTAGCTTCATGAACAACCTCGTGGTTCGCTAGGCCAGCCGCCACTCCGATGTCTTACAGG
   S S F M N N S W S L G Q P P T P M S Y T
541 TCCTGTCAGATGGCCAGCGGCAACGTGAGTCCAGTGAACATGAAGGGGCTGTCAGCCCCG
   S C Q M A S G N V S P V N M K G L S A P
601 TCATCTTATAACCCCTACTCCCGGGTGCAGAGCATGGCGCTCCCAGCATGGTGAACCTCT
   S S Y N P Y S R V Q S M A L P S M V N S
661 TACAACGGCATGAGTCACCATCACCCCGCGCACCTCACCATAGCCAGCAGCTGAGC
   Y N G M S H H H P A H P H H S O Q L S
721 CCGGCCACCGCGGCACCCCGCGGTCTCCAGCAGCAACGGAGCGGGCCTTCAGTTCGCC
   P A T A A P P P V S S S N G A G L Q F A
781 TGCTCCCGCCAGCCCGCGGAGCTCTCGATGATGCACTGCTCTTACTGGGAACACGA 836
   C S R Q P A E L S M M H C S Y W E H
    
```

Fig 2. The nucleotide and deduced amino acid sequence of FOXL2 gene in the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. It was 836 base pairs long and encoding 278 amino acids.

RT-PCR법을 이용하여 확인해 본 결과, 음성 유전자인 DMRT1 mRNA는 기관별 조직 중에서 난소와 정소의 조직에서만 강하게 발현되었고, 자성 유전자인 FOXL2 mRNA의 발현은 뇌, 아가미 및 정소에서 다소 약하게 나타났지만, 난소에서 매우 강하게 발현되었다(Fig. 4).

DMRT1과 FOXL2 등 성 결정 관련 유전자에 대한 연구는 포유류(Smith et al., 1999; Pask et al., 2003), 조류(Nanda et al., 1999), 파충류(Kettlewell et al., 2000), 어류(Brunner et al., 2001; Alam et al., 2008) 등 많은 동물에서 수

행되고 있다. 어류를 포함한 대부분의 척추동물의 생식소 분화에 있어 DMRT1은 정자형성 과정, FOXL2는 난자형성 과정에 중요한 역할을 수행한다. 붉바리의 조직별 FOXL2 mRNA 발현 결과 결과 정소보다 뇌, 아가미, 난소 조직에서 강하게 발현되었고, 이와 같은 결과는 Nile tilapia(Wang et al., 2004), Southern catfish(Liu et al., 2007), *E. merra*(Alam et al., 2008)의 결과와 유사하였다. Alam 등(2008)은 *E. merra*의 성 전환 과정에 있어 FOXL2와 DMRT1의 발현 양상 특징은 초기 성전환 단계부터 성 전환이

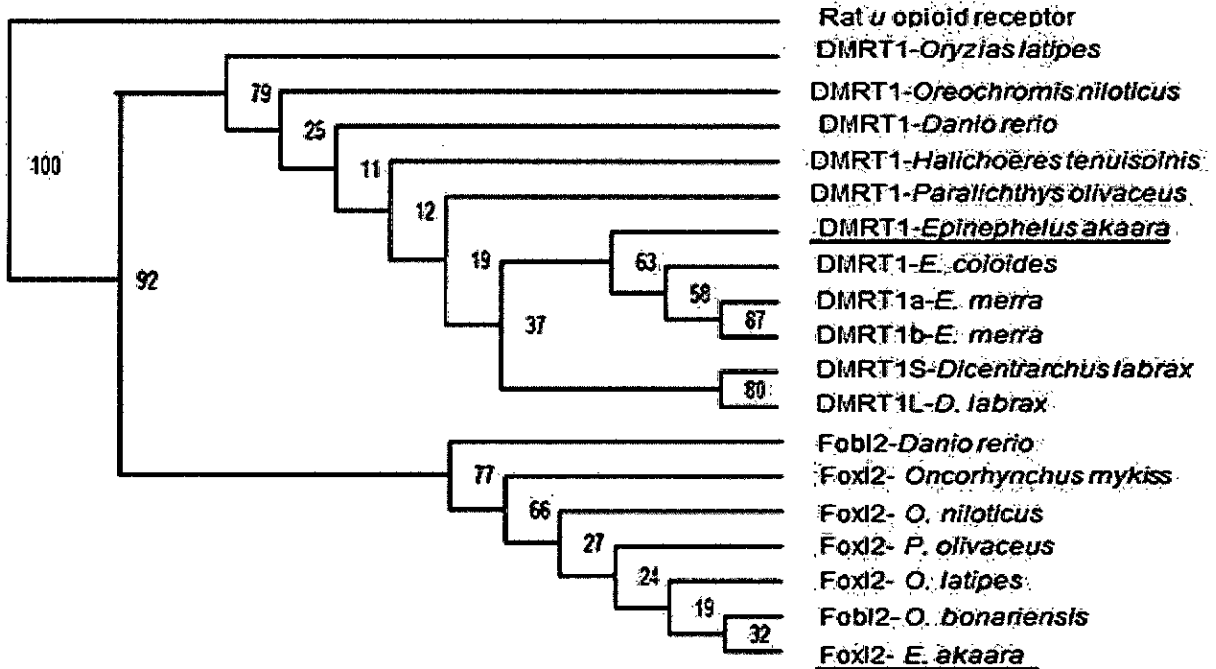


Fig 3. Phylogenetic analysis of the relationship among the known the DMRT1 and FOXL2 sequences from teleosts. The rat *u* opioid receptor was used as an outgroup to root the tree. Analysis was performed with multiple alignments from the amino acid sequences by using the ClustalW program. The bootstrap values (100 replicates) and distance are represented by internal edge labels and bar.

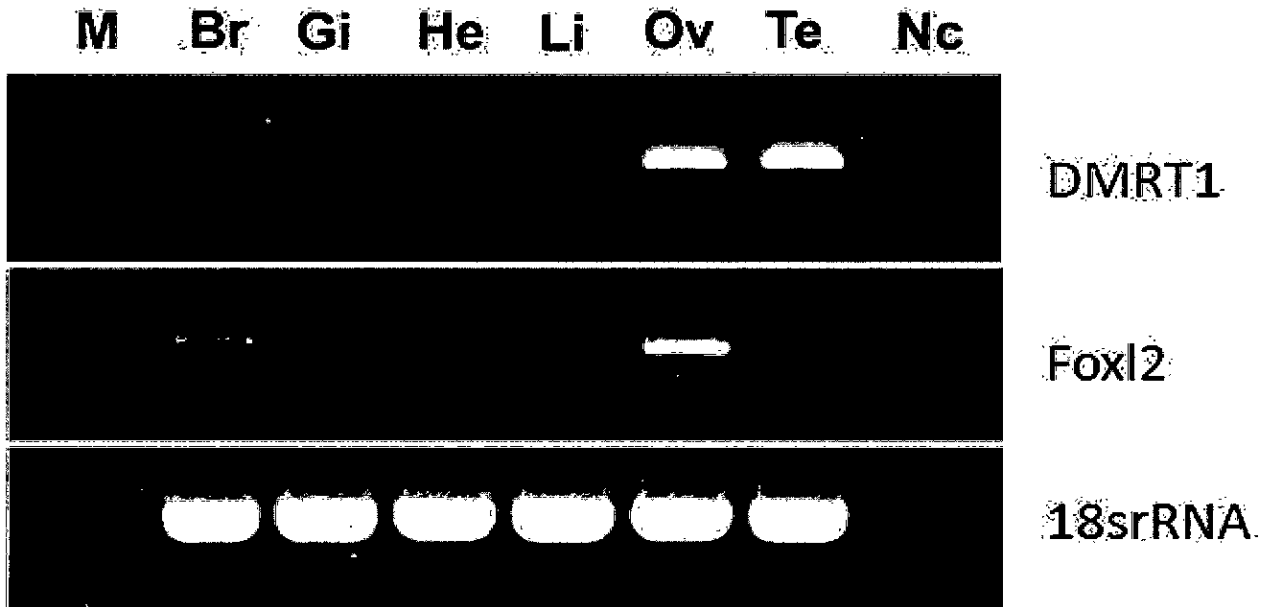


Fig 4. The expression pattern of sex differentiation genes in different organs of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara* by RT-PCR. The lanes are labeled as follow; Br, brain; Gi, gill; He, heart; Li, liver; Ov, ovary; Te, testis; Nc, negative control, respectively. M is a 100 bp DNA ladder marker.

완료될 때 까지 FOXL2 발현은 점진적으로 감소하면서 난모세포의 퇴행을 촉진시키는 반면, DMRT1는 점진적으로 증가하면서 정자형성과정을 촉진시켜 성 전환을 유도한다고 판단하였다. 자성선속형 자웅동체어인 붉바리의 경우도 성전환 과정에 있어 *E. merra*의 유사하게 FOXL2와 DMRT1가 작용할 것으로 생각되나 성 결정 유전자인 FOXL2와 DMRT1의 발현 기작이 아직 불분명하기 때문에 이를 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 Golden Seed 프로젝트 사업의 지원을 받아 수행되었습니다(213004044CG600).

참고 문헌

Alam, M.A., Y. Kobayashi, R. Horiguchi, T. Hirai and M. Nakamura. 2008. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers Dmrt1 and Foxl2 during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. Gen. Comp. Endocrinol., 157: 75-85.

Brennan, J.J., J. Karl, K. Nordqvist, C. Schmahl, K.U. Tilmann and B. Capel. 1998. SRY and the testis: molecular pathways of organogenesis. J Exp Zool., 281: 494-500.

Brunner, B., U. Hornung, Z. Shan, I. Nanda, M. Kondo, E. Zend-Ajusch, T. Haaf, H.H. Ropers, A. Shima, M. Schmid, V.M. Kalscheuer. and M. Scharl. 2001. Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1. Genomics, 77: 8-17.

Devlin, R.H. and Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208: 191-364.

Guan, G., T. Kobayashi and Y. Nagahama. 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biochem Biophys Res Commun., 272, 662-666.

Jo, P.G., K.W. An, N.N. Kim, Y.K. Choi, S.H. Cho, B.H. Min, H.K. Lim and C.Y. Choi. 2007. Induced expression of doublesex-and mab-3-related transcription factor-1 (DMRT1) mRNA by testosterone in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* ovary. J Aquaculture, 20: 199-202.

Kayano, Y., and T. Oda. 1994. Growth and spawning of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*, under artificial rearing condition. Suisan Zoshoku (Japan).

Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata

- and Y. Nagahama. 2004. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dynam.*, 231: 518-526.
- Kettlewell, J.R., C.S. Raymond and D. Zarkower. 2000. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, 26: 174-178.
- Liu, Z., F. Wu, B. Jiao, X. Zhang, C. Hu, B. Huang, L. Zhou, X. Huang, Z. Wang, Y. Zhang, Y. Nagahama, C.H.K. Cheng and D. Wang. 2007. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *J Endocrinol.*, 194: 223-241.
- Marchand, O., M. Govoroun, H. D'Cotta, O. McMeel, J. Lareyre, A. Bernot, V. Laudet and Y. Guiguen. 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta* 1493: 180-187.
- Nakamoto, M., M. Matsuda, D.S. Wang, Y. Nagahama and N. Shibata. 2007. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 344: 353-361.
- Nanda, I., Z. Shan, M. Scharfl, D.W. Burt, M. Koehler, H. Nothwang, F. Grutzner, I.R. Paton, D. Windsor, I. Dunn, W. Engel, P. Staeheli, S. Mizuno, T. Haaf and M. Schmid. 1999. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet.*, 21: 258-259.
- Pask, A.J., R.R. Behringer and M.B. Renfree. 2003. Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis—from marsupials to mice. *Cytogenet Genome Res.*, 101: 229-236.
- Raymond, C.S., C.E. Shamu, M.M. Shen, K.J. Seifert, B. Hirsch, J. Hodgkin and D. Zarkower. 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 391: 691-695.
- Sinclair, A.H., P. Berta, M.S. Palmer, J.R. Hawkins, B.L. Griffiths, M.J. Smith, J.W. Foster, A.M. Frischauf, R. Lovell-Badge and P.N. Goodfellow. 1990. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-244.
- Smith, C.A., P.J. McClive, P.S. Western, K.J. Reed and A.H. Sinclair. 1999. Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 402: 601-602.
- Wang, D.S., T. Kobayashi, L. Zhou and Y. Nagahama. 2004. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 320: 83-89.
- Wang, D.S., T. Kobayashi, L.Y. Zhou, B. Paul-Prasanth, S. Ijiri, F. Sakai, K. Okubo, K.I. Morohashi and Y. Nagahama. 2007. *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription in a

female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. *Mol Endocrinol.*, 21: 712-725.

Zhu, L., J. Wilken, N.B. Philips, U. Narendra, G. Chan, S.M. Stratton, S.B. Kent and M.A. Weiss. 2000. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. *Genes Dev.*, 14: 1750-1764.