홍바리(*Epinephelus fasciatus*) FSH β 와 LH β subunit의 분리 및 동정

박용주 · 강형철 · 이치훈 · 송영보¹ · 백혜자² · 김형배³ · Kiyoshi Soyano⁴ · 이영돈*

제주대학교 해양과환경연구소, ¹제주대학교 생물학과, ²부경대학교 자원생물학과,
³강원도립대학 해양생명과학과, ⁴나가사키대학 동중국해환경자원연구소

Isolation and Identification of FSH β and LH β Subunits in the Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus*

Yong-Ju Park, Hyeong-Cheol Kang, Chi-Hoon Lee, Young-Bo Song¹, Hea-Ja Baek²,

Hyung-Bae Kim³, Kiyoshi Soyano⁴ and Young-Don Lee*

Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-968, Korea

¹Department of Biology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

³Department of Marine Bio-Resources, Gangwon Provincial University, Gangnung 210-804, Korea

⁴Institute for East China Sea Research, Nagasaki University, Nagasaki 851-2213, Japan

We cloned and sequenced the cDNA encoding the FSH β and LH β subunits from the pituitary of the blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*, which regulate vitellogenesis and maturation in vertebrates, to achieve stable and healthy gametes. The full-length cDNAs of FSH β and LH β were 571 bp and 617 bp, encoding 120 amino acid (aa) and 147 aa proteins, respectively. The deduced amino acid sequences of FSH β and LH β were highly homologous (68-97%) to those of other Perciformes; *E. bruneus*, *Dicentrarchus labrax*, *Thunnus thynnus*, and *Pseudolabrus sieboldi*. Phylogenetic analysis showed that the deduced FSH β and LH β amino acid sequences were categorized as a distinct subunit in the GTH β family, and are closely related to the teleostei FSH β and LH β , respectively. FSH β and LH β mRNA exhibited high abundance in the pituitary gland and low in other brain areas, but were not present in peripheral tissues, as determined by RT-PCR.

Key words: Blacktip grouper, Pituitary, Gonadotropin, FSH β , LH β

서 론

최근 바리과 어류의 번식생리 정보는 연안 생물자원의 감소와 소비자 수요의 증가로 바리과 어류의 양식기술 개발에 있어 이슈가 되고 있다. 바리과 어류는 자성선속의 성 특성과 종 특이적 산란행동으로 사육수조 내에서 건강한 수정란을 안정적으로 확보하기가 어렵다. 바리과 어류의 양식 산업 활성화를 위해서는 안정적이고 건강한 수정란 확보가 중요하다. 이치럼 양식 대상어류로부터 건강한 수정란 생산을 위한 기초 연구로서 번식내분비에 관여하는 유전자의 탐색 및 그 발현 특성에 관한 연구들이 진행되고 있으며, 특히 난모세포의 발달과 성숙에 관여하며 어류의 뇌하수체에서 분비하는 여포자극호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)과 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)에 관한 연구들도 그 중 하나이다. 이 호르몬들은 각각 α 와 β subunit로 구성되며, α subunit은 종 내에서 구조적으로 동일한 반면, β subunit은 호르몬 간의 면

역학적 및 생물학적으로 서로 다른 특성을 가진다(Pierce and Parsons, 1981). Trinh et al. (1986)은 경골어류 중 연어과 어류인 Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)에서 FSH와 LH의 α subunit과 β subunit을 최초로 분리되었고, 이후 다양한 어류들에서 이들 유전자들의 α 와 β subunit에 대해 연구되고 있다(Sekine et al., 1989; Lin et al., 1992; Trofimova and Belikov, 1994; Jackson et al., 1999; Kajimura et al., 2001; Hellqvist et al., 2004; Banerjee and Khan, 2008). 그리고 농어, 틸라피아, 금붕어와 같은 대부분의 경골어류에서는 주기적인 생식활성에 따라 뇌하수체에서의 FSH와 LH 분비의 정도와 시기가 종 특이적으로 다르게 나타난다(Nozaki et al., 1990a,b; Swanson et al., 1991; Yaron et al., 2001; Sohn et al., 2001; Martyniuk et al., 2009). FSH는 난모세포에서 에스트로겐(17 β -estradiol, E2)의 생성 및 vitellogenin (VTG) 합성 등의 성 스테로이드를 조절함으로써 초기 배우자 형성 및 생식소 성장에 관여하고, LH는 난모세포의 최종성숙 및 배란유도에 관여한다(Prat et al., 1996; Mateos et al., 2002; Ando et al., 2004; Kobayashi et al., 2006; Ko et al., 2007).

*Corresponding author: leemri@jejunu.ac.kr

홍바리(*Epinephelus fasciatus*)는 농어목(Perciformes) 바리과(Serranidae)에 속하는 어종으로 홍해에서부터 남아프리카 연안에 이르는 해역, 그리고 일본의 북부 연안에서부터 호주 연안의 이르기까지 폭넓은 해역에 서식하고 있다(Randall and Heemstra, 1991). 특히 우리나라 근해에 서식하는 바리과 중에서 홍바리는 희귀성이 높아 상업적으로도 매우 중요한 고급어종으로 분류되지만, 최근까지도 홍바리의 번식생리에 대한 이해 부족으로 어미 관리, 우량 수정란 생산 및 상업적 대량종묘 생산은 어려운 실정이다.

이 연구는 홍바리의 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 중추신경조직들과 주변조직들에서 그 발현 정도를 확인하였다.

재료 및 방법

실험어

제주대학교 해양환경연구소의 순환여과시스템에서 사육 중인 홍바리 성어(약 450 g)로부터 뇌하수체를 적출하여 FSH β 와 LH β cDNA의 분리 및 동정에 사용하였으며, 각각 유전자의 조직별 발현은 홍바리를 2-phenoxyethanol을 이용하여 마취 한 후, 뇌의 중추신경조직인 후엽(telecephalon), 시엽(optic tectum), 시상하부(hypothalamus), 뇌하수체(pituitary)와 주변 조직인 간(liver), 신장(kidney), 생식소(gonad) 등을 적출하여 조사하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

홍바리의 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 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Japan)을 이용하여 역전사 시켜 합성하였다. 합성 반응은 Oligo dT primer 1 μ L, PrimeScript™ RT enzyme mix 1 μ L 그리고 5 $\times$ PrimeScript™ Buffer 4 μ L를 첨가하였고 nuclease-free 증류수를 이용하여 총 부피가 20 μ L이 되도록 조절하였다. 37°C에서 15분간 역전사 반응을 실시하였으며, 이후 85°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 NationalCenter for BiotechnologyInformation (NCBI)의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록되어 이미 밝혀진 자바리(*E. bruneus*, Accession number, FSH β : EF583919, LH β : EF583920)와 Honeycomb grouper (*E. merra*, Accession number, FSH β : AB525770, LH β : AB525771)의 유전자 정보를 참고로 제작하였으며, FSH β 의 증폭용 primer는 FSH β Fprimer(5'-TGGT(A/T)GTCATGGCAGCAGTG-3')와 FSH β Rprimer(5'-A(G/T)ACAGCTGGGT(A/G)TGTCTCC-3')를 사용하였다. LH β 의 증폭용 primer는 LH β Fprimer(5'-TCAACCAGAC(A/C)GTGTCTCTG-3')와 LH β Rprimer(5'-CTCGAAGGTGCAGTCAGA(C/T)G-3')를 사용하였다. 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°C에서 2분간 열변성 후 94°C 45초, 55°C 45초, 72°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°C에서 12시간 동안 배양된 clone 중 3개를 선택하여 LB broth (Sigma) 액체배지에서 37°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 amplification 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: FSH β 5'R (5'-AAAGCGCCCGCAGTACGTGTTT-3')와 FSH β 3'R (5'-TGC-CATCTGACCAGCATCAGCAT-3') 그리고 LH β 5'R (5'-AGCGCCCCA-CAGTGACAGCTCAAA-3')와 LH β 3'R (5'-ACCCGGTGGAAA-CAACCATCTGC-3'). 5'과 3' cDNA 단편의 PCR 반응은 아래와 같이 3 step PCR 프로그램에 의해 수행되었다: (1) 94°C 30초, 72°C 3분을 5회 반복; (2) 94°C 30초, 70°C 30초, 72°C 3분을 5회 반복; (3) 94°C 30초, 68°C 30초, 72°C 3분을 25회 반복 최종 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel에 전기영동을 실시하여 각 cDNA 단편의 크기를 확인 및 정제과정을 거쳐 pGEM-T easy vector (Promega)에 ligation 및 cloning 하였고 염기서열 분석은 위에 서술한 내용과 동일하게 진행하였다.

구조적 및 계통발생학적 분석

홍바리 뇌하수체로부터 분리된 FSH β 와 LH β cDNA의 핵산 서열은 Open Reading Frame (ORF) Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)를 이용하여 핵산과 결합하는 peptide의 특징과 그 아미노산 서열을 확인하였다. Signal peptide의 구조적인 분석은 SignalP 4.0 server를 이용하여 조사하였다(Nielsen et al., 1997; Dyrlov et al., 2004). 추정되는 N-linked glycosylation site는 NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)에 의해 분석하였다. Multiple alignment와 Phylogenetic analysis에 사용된 모든 어종의 FSH β 와 LH β subunit에 대한 모든 정보는 NCBI의 Genbank로부터 얻었다. 조사된 어류들에 대한 분류를 살펴보면, 경골어류(Teleostei)에서는 뱀장어목(Anguilliformes), 색줄멸목(Atheriniformes), 잉어목(Cypriniformes), 농어목(Cypriniformes), 가자미목(Pleuronectiformes), 연어목(Salmoniformes), 메기목(Siluriformes), 그리고 연골어류(Chondrostei)에서는 철갑상어목(Acipenseriformes) 등이 있다. 중간 계통유연관계 분석은 Phylip 프로그램을 활용한 neighbor-joining 기법을 이용하였으며 조사된 다양한 종의 FSH β 와 LH β 아미노산 서열들에 대한 Multiple alignment는 ClustalW 프로그램을 이용하여 분석하였다. BOOTSTRAP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1,000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1,000 세트의 결과물은 CONSENSE 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다. Out group은 sea lamprey의 GTH β -like protein (GenBank Accession No. AY730276)를 이용하였다(Sower et al., 2006).

RT-PCR

홍바리의 후엽, 시엽, 시상하부, 뇌하수체, 간, 신장, 생식소에서 FSH β 와 LH β mRNA의 발현조사는 genomic DNA에 의한 total RNA의 오염을 사전에 차단하기 위하여 RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 처리한 후 흡광도 비율이 1.7-2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료만을 선택하여 cDNA를 합성하였다. Cloning에 의해 결정된 홍바리 뇌하수체 FSH β 와 LH β subunit의 염기서열과 control 유전자로서 분리된 홍바리 18s rRNA의 염기서열로부터 RT-PCR용 primer는 아래와 같이 합성하였다: rtFSH β F (5'-CATCTGACCAGCATCAG-CAT-3')와 rtFSH β R (5'-TGGATATGTCTCCAGGAAAGC-3'), rtLH β F (5'-AGGTCGGCAGAGTGATGTTTC-3')와 rtLH β R (5'-CTCGAAGGTGCAGTCAGATG-3') 그리고 rt18sF (5'-GATCAATTGGAGGGCAAGTC-3')와 rt18sR (5'-CCTCCGACTTTCGTTCTTGA-3'). RT-PCR반응은 1 μ L의 cDNA (50 ng total RNA)를 주형으로 Go Taq Green Master mix (Promega)와 primer 세트를 혼합하여 최종 반응량이 25 μ L가 되도록 조절하여 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 열변성

후 94 $^{\circ}$ C 45초, 60 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 1분을 총 32회 반복하여 각 유전자의 cDNA를 증폭하였으며, 증폭된 cDNA 산물은 1% agarose gel을 이용해서 100 V에서 35분간 전기영동을 실시하여 그 발현을 확인하였다.

결 과

홍바리 FSH β 와 LH β cDNA 분리 및 동정

홍바리 뇌하수체로부터 증폭한 FSH β 와 LH β cDNA를 cloning하여 전염기서열을 분석한 결과, FSH β 와 LH β cDNA 길이는 각각 571 bp와 617 bp이었다. FSH β cDNA의 ORF 길이는 360 bp이었으며, 5' untranslated region (UTR)과 3' UTR의 길이는 각각 102 bp와 106 bp이었다. LH β cDNA의 ORF 길이는 441 bp이었으며, 5' UTR과 3' UTR의 길이는 각각 30 bp와 143 bp이었다(Fig. 1). 홍바리 FSH β subunit 단백질 구조는 SignalP V3.0 프로그램(Nielsen et al., 1997; Dyrlov et al., 2004)을 사용하여 확인해 본 결과, 21 amino acid (aa)의 신호 펩티드(signal peptide)와 99 aa의 성숙 펩티드(mature peptide)가 구성되어 총 120 aa에 코드(code) 되었고, 홍바리 LH β subunit은 각각 32 aa의 신호 펩티드와 115 aa의 성숙 펩티드가 합쳐진 총 147 aa에 코드 되어 단백질을 구성하였다. 대부분의 진핵생물의 mRNA등에서 관찰되는 것처럼, 홍바리 FSH β 와 LH β 의 polyadenylation signal (AATAAA)은 polyadenylation site (poly A tail)의 시작 위치로부터 각각 14와 20 bp 상류 쪽에 위치하였다.

홍바리의 FSH β 와 LH β 아미노산 서열은 이미 NCBI에 등록된 다른 어종들의 FSH β 와 LH β 아미노산 서열들과 비교하였다(Fig. 2). 그 결과 홍바리를 포함한 조사된 모든 종들의 아미노산 서열에서 각각 12개의 cysteine이 동일한 위치에 나열되고 있음을 확인하였다. 조사된 다른 어종의 FSH β 아미노산 서열과는 다르게 홍바리 FSH β 는 자바리 FSH β 과 함께 N-linked glycosylation site가 존재하지 않았으나, 홍바리 LH β 에서는 자바리(*E. bruneus*) LH β 를 포함한 조사된 모든 어종들의 LH β 아미노산 서열 중의 N-linked glycosylation site의 위치와 동일하게 존재하였다. 각각의 어류들과의 FSH β 와 LH β 아미노산 서열의 상동성을 비교해 본 결과, 홍바리 FSH β 는 같은 농어목 어류인 자바리와 97% 그리고 참다랑어(*Thunnus thynnus*)와 77%의 높은 상동성을 보였고, 반면 철갑상어목 어류인 철갑상어(*Acipenser* spp.)와 32%의 낮은 상동성을 나타내었다. 홍바리 LH β 의 경우는 농어목 어류인 자바리와 97% 그리고 유럽산 농어(*Dicentrarchus labrax*)와 91%의 가장 높은 상동성을 보였고, 반면 철갑상어목 어류인 철갑상어와 45-49%의 낮은 상동성을 나타내었다. 분류체계에서 그 외 다양한 어종들 간의 FSH β 와 LH β 아미노산 서열들의 상동성 비교는 Table 1에 자세히 나타내었다. 중간 계통유연관계에 관한 분석에서도 홍바리 FSH β 와 LH β 는 동일한 농어목의 어류들과 가장 가까운 유

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding the blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* FSH β (A) and LH β (B) subunits. The nucleotide numbers are shown on the right-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. The first amino acid of the putative mature subunit is numbered +1. Amino acids that comprise the predicted signal sequence are underlined with minus numbers. The stop codon indicated by an asterisk. Possible polyadenylation signal (AATAAA) is marked by a black box. GenBank accession numbers: blacktip grouper FSH β , JF520407; blacktip grouper LH β , JF520408.

Fig. 2. Alignments of amino acid sequences of the FSH β and LH β subunits of blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* and other actinopterygian species using Clustal W multiple sequence alignment program (Thompson et al., 1994). Twelve conserved cysteines are shaded. The putative N-linked glycosylation sites are boxed. Aa, *Anguilla anguilla* (European eel); Ob, *Odontesthes bonariensis* (Pejerrey); Ci, *Ctenopharyngodon idella* (Grass carp); Ef, *Epinephelus fasciatus* (Blacktip grouper); Eb, *Epinephelus bruneus* (Longtooth grouper); Tt, *Thunnus thynnus* (Northern bluefin tuna); Po, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder); Om, *Oncorhynchus mykiss* (Rainbow trout); Cg, *Clarias gariepinus* (North African catfish); As, *Acipenser sinensis* (Chinese sturgeon).

Table 1. The homologies of amino acid sequences of blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* FSH β and LH β subunits in comparison with those of FSH β and LH β subunits from other fish

	Species	FSH (%)	LH β (%)	Source
<i>Teleostei</i>				
Anguilliformes	<i>Anguilla anguilla</i>	40	52	FSH β : AY169722, LH β : X61039
	<i>Anguilla japonica</i>	40	52	FSH β : AB016169, LH β : AY082379
Atheriniformes	<i>Odontesthes bonariensis</i>	66	77	FSH β : AY319832, LH β : AY319833
Cypriniformes	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	42	52	FSH β : EF552359, LH β : EF565171
	<i>Danio rerio</i>	40	53	FSH β : AY714131, LH β : AY714132
Perciformes	<i>Epinephelus fasciatus</i>			FSH β : JF520407, LH β : JF520408
	<i>Epinephelus bruneus</i>	97	97	FSH β : EF583919, LH β : EF583920
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	74	91	FSH β : AF543314, LH β : AF543315
	<i>Thunnus thynnus</i>	77	90	FSH β : EF208026, LH β : EF205591
	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	68	87	FSH β : AB300390, LH β : AB300391
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	71	75	FSH β : AF268693, LH β : AF268694
Pleuronectiformes	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	65	78	FSH β : AJ417768, LH β : AJ417769
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	35	55	FSH β : AB050835, LH β : AB050836
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus keta</i>	35	56	FSH β : M27153, LH β : M27154
	<i>Clarias gariepinus</i>	42	54	FSH β : AF324541, LH β : X97761
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	41	55	FSH β : AF112191, LH β : AF112192
<i>Chondrostei</i>				
Acipenseriformes	<i>Acipenser sinensis</i>	32	49	FSH β : EU523732, LH β : EU523733
	<i>Acipenser baeri</i>	32	45	FSH β : AJ251658, LH β : AJ251656

연관계를 보였다(Fig. 3).

조직별 FSH β 및 LH β mRNA 발현

홍바리의 후엽, 시엽, 시상하부, 뇌하수체, 간, 신장 및 생식소 조직 등에서 FSH β 및 LH β mRNA의 발현은 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. FSH β 와 LH β mRNA는 주로 뇌하수체에서 강하게 발현하였으나, 반면에 중추신경조직 중의 후엽에서는 LH β mRNA가 약하게나마 발현하였고 그 이외의 조직들에서는 거의 발현되지 않았다. 또한 RT-PCR 반응과정에 genomic DNA에 의한 PCR 증폭 오류는 RT-PCR 반응 시 역전사 효소를 넣지 않은 negative control에서 FSH β 및 LH β mRNA의 발현을 통해 검정하였다. 그 결과 genomic DNA 증폭이 전혀 없었음을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

이 연구는 홍바리(blacktip grouper, *E. fasciatus*)의 뇌하수체로부터 FSH β 와 LH β 단백질에 암호화하고 있는 것으로 추정되는 완전한 cDNA를 cloning하고 그 염기서열을 규명하였다. FSH β cDNA는 총 571 bp 핵산을 가지며 21개의 signal peptide와 99개의 mature peptide로 코드화 되었다. LH β

cDNA는 총 617 bp 핵산을 가지며 32개의 signal peptide와 115개의 mature peptide로 코드 되었다. 홍바리 FSH β 와 LH β 의 아미노산 서열은 자바리를 포함한 다른 경골어류들의 각각 유전자의 아미노산 서열들과 계통발생학적으로 비교해 본 결과, 홍바리 FSH β 는 농어목 및 가자미목 어류들의 FSH β 와 65-97%로 높은 상동성을 보였고, 반면 뱀장어목, 잉어목, 연어목 및 철갑상어목 등의 FSH β 와는 약 32-66%로 그 상동성이 비교적 낮았다. 또한 홍바리 LH β 는 농어목 및 가자미목 어류들의 LH β 와 비교해서 75-97%로 높았고, 반면 그 이외 다른 어종들의 LH β 와는 약 45-77%로 그 상동성이 상대적으로 낮았다. FSH β 계열과 LH β 계열의 비교어종들 간에는 상동성(약 22-33%)이 매우 낮게 나타났다. 이 연구에서 동정된 홍바리의 FSH β 및 LH β subunit는 발생학적으로 서로 다른 진화적 특성을 가지고 있다고 추정되며, 홍바리 뇌하수체 생식선자극호르몬(gonadotropin, GTH) subunit은 각각의 FSH와 LH β subunit 유전자 계열에 속하고 있음을 알 수 있었다.

홍바리 뇌의 후엽, 시엽, 시상하부, 뇌하수체 등의 중추신경조직들과 간, 신장, 생식소 등의 주변조직들을 대상으로 한 RT-PCR 기법으로 FSH β 와 LH β mRNA의 조직별 발현 양상을 조사 비교한 결과, 뇌하수체에서 강하게 발현하였다. Yaron et al. (2001)은 어류가 외부의 물리적 환경, 영양, 스트레스 등

Fig. 3. Phylogenetic analysis of teleost FSH β and LH β subunits based on amino acid sequence. The *Petromyzon marinus* GTH β -like protein as 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.

에 의한 자극들을 감각기관을 통해 수용하여 다양한 형태의 체내신호로 전환하는데 그 중에서도 생식활성을 조절하는 GTH의 분비는 뇌하수체의 전엽기부(proximal pars distalis, PPD)와 중엽(pars intermedia, PI)에 집중적으로 위치하는 것을 확인하였다. 대서양 연어(Atlantic salmon, *Salmo salar*), 은연어(coho salmon, *O. kisutch*) 및 무지개송어(rainbow trout, *O. mykiss*) 등의 연어과 어류들은 초기 배우자 형성과 VTG 합성 이후의 최종 성숙시기에 이르러 FSH와 LH의 분비가 모두 증가하였다. 금붕어의 경우, testosterone, estradiol-17 β 및 11-ketotestosterone 등의 성 스테로이드 호르몬에 대한 FSH β mRNA의 발현은 유생 및 미성숙 개체에서 음성 피드백(negative feedback) 변동을 하였지만, 성숙 개체에서는 양성 피드백(positive feedback) 변동을 나타내었다. 반면에 LH β mRNA의 발현은 성스테로이드 호르몬 활성화와 그 관련성이 없었다(Kobayashi et al., 2000; Huggard-Nelson et al., 2002). 홍

바리 뇌하수체에서의 FSH β 와 LH β mRNA 발현은 생식세포의 발달, 최종성숙 및 산란 등에 깊게 관여한다고 여겨진다.

홍바리의 뇌하수체뿐만 아니라 뇌의 후엽에서도 LH β mRNA가 미약하게나마 그 발현이 관찰되는데, 이러한 결과는 틸라피아의 경우와 마찬가지로 어류 뇌에서의 GTH는 대부분 당단백질 형태(GTH-like glycoprotein)로 존재하며 RT-PCR 방법에 의한 FSH와 LH mRNA의 발현은 아주 적은 양으로서 관찰되기 때문이다(Nozaki et al., 1990a,b; Yaron et al., 2001). 경골어류의 FSH와 LH mRNA의 발현은 주로 생식선 자극호르몬 방출호르몬(GnRH)과 함께 시상하부의 신경세포(neuronal perikarya)와 인근의 용기부(pars tuberalis), 신경섬유(fiber processes) 그리고 뇌하수체의 전엽(anterior pituitary adenohypophysis)에서 확인되었다. 또한 그 발현이 GnRH의 직접적 작용으로 유도되거나, 성 스테로이드 호르몬의 간접적 피드백(feedback)에 의해 조절됨으로써 시상하부-뇌하수체-생

Fig. 4. The tissue specificity of blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* FSH β and LH β mRNA expression analyzed by RT-PCR. 100 ng of total RNA each from telecephalon (T), optic tectum (O), hypothalamus (H), pituitary (P), liver (L), kidney (K) and gonad (G, ovary) 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. N, negative control; M, marker of 100 bp DNA ladder.

식소의 축(axis)을 형성하는 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). 홍바리의 뇌에 존재하는 신경세포와 신경섬유도 GTH의 분비와 관련 있는 것으로 사료된다.

최근 한국, 일본, 대만을 비롯한 아시아 여러 국가에서 다양한 바리과 어종들을 대상으로 종묘생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 특히 동북아시아에서 그 희귀성이 높은 홍바리의 번식생리 특성 및 산란 행동에 대한 연구가 서서히 주목받고 있다. 이 연구는 홍바리 중추신경조직 유래의 생식선 자극 호르몬에 대하여 분자생물학적 방법으로 접근함으로써 바리과 어류의 특징인 자성선숙형의 성숙 및 산란 특성을 파악하기 위한 기초 자료로서 활용하고, 사육수조 내에서 안정적이고 건강한 수정란을 확보를 위해 FSH β 와 LH β cDNA의 동정 및 그 특정 부위의 발현 확인이 이루어졌다. 앞으로 홍바리의 어미확보, 건강한 수정란 생산 그리고 안정적인 종묘생산을 하기 위

해 GTH에 대한 생리적인 특성 연구 및 그 유전자 이용이 필요한 실정이므로 이 연구 결과가 유용하게 활용되리라고 기대한다.

사 사

이 연구는농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 109197-3, 홍바리(*Epinephelus fasciatus*) 양식산업 최적화 기술개발)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

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.
- Banerjee A and Khan IA. 2008. Molecular cloning of FSH and LH β subunit and their regulation by estrogen in Atlantic croaker. *Gen Comp Endocrinol* 155, 827-837.
- Dyrlov BJ, Nielsen H, Heijne VG and Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: Signal P 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795.
- Hellqvist A, Bornestaf C, Borg B and Schmitz M. 2004. Cloning and sequencing of the 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.
- Hostetter G, Gallo RV and Brownfield MS. 1981. Presence of immunoreactive luteinizing hormone in the rat forebrain. *Neuroendocrinology* 33, 241-245.
- Huggard-Nelson DL, Nathwani PS, Kermouni A and Habibi HR. 2002. Molecular characterization of LH-beta and FSH-beta subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 188, 171-193.
- Jackson K, Goldberg D, Ofir M, Abraham M and Degani G. 1999. Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic beta subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. *J Mol Endocrinol* 23, 177-187.
- Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M and Aida K. 2001. cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-I beta and-II beta) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 122, 117-129.
- Ko H, Park W, Kim DJ, Kobayashi M and Sohn YC. 2007. Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. *J Mol Endocrinol* 38, 99-111.
- Kobayashi MA, Sohn YC, Yoshiura YA and Aida KA. 2000. Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fish Sci* 66, 223-231.
- Kobayashi M, Morita T, Ikeguchi K, Yoshizaki G, Suzuki T

- and Watabe S. 2006. In vivo biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silkworm larvae. *Aquaculture* 256, 433-442.
- Lin YW, Rupnow BA, Price DA, Greenberg RM and Wallace RA. 1992. *Fundulus heteroclitus* gonadotropins. 3. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GTH) I and II β subunits using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Endocrinol* 85, 127-139.
- Martyniuk CJ, Kroll KJ, Porak WF, Steward C, Grier HJ and Denslow ND. 2009. Seasonal relationship between gonadotropin, growth hormone, and estrogen receptor mRNA expression in the pituitary gland of largemouth bass. *Gen Comp Endocrinol* 163, 306-317.
- Mateos J, Mananos E, Carrillo M and Zanuy S. 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comp Biochem Physiol* 132B, 75-86.
- Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A and Yaron Z. 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp Biochem Physiol* 119C, 325-338.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S and Heijne VG. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Dickhoff WW, Nakai Y, Suzuki K and Kawauchi H. 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* irideus). *Gen Comp Endocrinol* 77, 358-367.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y, Suzuki K and Kawauchi H. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *Gen Comp Endocrinol* 77, 348-357.
- Parhar IS, Soga T, Ogawa S and Sakuma Y. 2003. FSH and LH- β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. *Gen Comp Endocrinol* 132, 369-378.
- Pierce JG and Parsons TF. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50, 464-495.
- Prat F, Sumpter JP and Tyler CR. 1996. Validation of radioimmunoassay for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 54, 1375-1382.
- Randall JE and Heemstra PC. 1991. *Epinephelus fasciatus*. Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae), with descriptions of five new species. Indo-Pacific fishes No. 20. Bernice Pauahi Bishop Museum, Honolulu.
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L and White WF. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173, 1036-1038.
- Sekine S, Saito A, Itoh H, Kawauchi H and Itoh S. 1989. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8645-8649.
- Sohn YC, Kobayashi M and Aida K. 2001. Regulation of gonadotropin b subunit gene expression by testosterone and gonadotropin-releasing hormones in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol* B 129, 419-426.
- Sower SA, Moriyama S, Kasahara M, Takahashi A, Nozaki M, Uchida K, Dahlstrom JM and Kawauchi H. 2006. Identification of sea lamprey GTHb-like cDNA and its evolutionary implications. *Gen Comp Endocrinol* 148, 22-32.
- Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H and Dickhoff WW. 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod* 44, 29-38.
- Trinh KY, Wang NC, Hew CL and Crim LW. 1986. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit. *Eur J Biochem* 159, 619-624.
- Trofimova IN and Belikov SI. 1994. Cloning and sequencing the cDNA for the β subunit of *Baikal omul* gonadotropin. *Mol Biol (Moscow)* 28, 1052-1056.
- Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Levavi-Sivan B and Elizur A. 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. *Comp Biochem Physiol* 129B, 489-502.
- Yu JYL, Namiki H and Gorbman A. 1979. Rat gonadotropin release stimulated *in vitro* by GnRH-depleted rat brain extracts. *Neuroendocrinology* 29, 54-65.

2011년 5월 12일 접수

2011년 8월 10일 수정

2012년 2월 2일 수리