석사학위논문

자바리 *Epinephelus bruneus* 뇌에서의 KiSS1/GPR54 mRNA 발현 기작에 관한 연구

제주대학교 대학원

해양생명과학과

강 형 철

2010년 7월

Regulation of KiSS1/GPR54 mRNA Expression in Brain of the Longtooth Grouper, *Epinephelus bruneus*

Hyeong-Cheol Kang

(supervised by professor Young-Don Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL

FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE

DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

2010. 7.

MARINE LIFE SCIENCE

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

Collection @ jeju

자바리 *Epinephelus bruneus* 뇌에서의 KiSS1/GPR54 mRNA 발현 기작에 관한 연구

지도교수 이 영 돈

강 형 철

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2010년 7월

강형철의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 여인규 (인)

위 원 김기영 (인)

위 원 이영돈 (인)

제주대학교 대학원

2010년 7월

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952

dCollection @ jeju

목 차

목차 ····· i

List of figure ····· iii

List of table ····· Ⅳ

ABSTRACT ····· Ⅴ

총론 ····· 1

제1장. 자바리 시상하부에서 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54 cDNA 분리 및 조직별 발현

Ⅰ. 서론 ····· 4

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 6

1) 실험어 ····· 6

2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성 ····· 6

3) KiSS1, KiSS2와 GPR54 cDNA 분리 ····· 7

4) 염기서열 분석 ····· 11

5) RT-PCR ····· 13

Ⅲ. 결과 ····· 15

1) 자바리 KiSS1, KiSS2와 GPR54 cDNA의 분리 및 상동성 비교 ····· 15

2) 자바리 KiSS1/GPR54 mRNA의 조직별 발현 ····· 24

Ⅳ. 고찰 ····· 26

제 2장. 광주기 조절과 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 발현 연구

Ⅰ. 서론 ····· 28

Collection @ jeju

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 30
1.광주기 조절과 HCG 투여에 따른 KiSS1/GPR54의 발현 ····· 30
1) 실험어 및 광주기 조절 ····· 30
2) HCG 투여 ····· 30
3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성 ····· 31
4) Real-time quantitative RT-PCR ····· 31
5) 통계처리 ····· 32
2. KiSS1의 빛 감수성 실험 ····· 36
1) 실험어 ····· 36
2) 빛 처리 및 샘플링 ····· 36
3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성 ····· 36
4) Real-time quantitative RT-PCR ····· 37
5) 통계처리 ····· 37
3. 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 mRNA 발현 조절 연구 ····· 39
1) 실험어 ····· 39
2) 멜라토닌 투여 및 샘플링 ····· 39
3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성 ····· 39
4) Real-time quantitative RT-PCR ····· 40
5) 통계처리 ····· 40
Ⅲ. 결 과 ····· 39
1. 광주기 조절과 HCG 투여에 따른 KiSS1/GPR54 mRNA의 발현 ····· 42
2. KiSS1의 빛 감수성 실험 ····· 45
3. 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 mRNA 발현 조절 연구 ····· 47
Ⅳ. 고 찰 ····· 49

요약 ····· 52

참고 문헌 ····· 54

dCollection @ jeju

List of figure

Fig. 1. Discrete brain area of the *E. bruneus* that used in the tissue specific expression by RT-PCR. ····· 8
Fig. 2. The KiSS1 nucleotide sequence and deduced amino acid sequence *of E. bruneus.* ····· 17
Fig. 3. The KiSS2 nucleotide sequence and deduced amino acid sequence *of E. bruneus.* ····· 18
Fig. 4. The GPR54 nucleotide sequence and deduced amino acid sequence *of E. bruneus.* ····· 19
Fig. 5. Phylogenetic relationship of KiSS1/KiSS2 between *E. bruneus* and other fishes. ····· 22
Fig. 6. Phylogenetic relationship of GPR54 between *E. bruneus* and other fishes. ····· 23
Fig. 7. Tissue specific expression of *E. bruneus* KiSS1/GPR54 mRNA in peripheral tissue (A) and nerves tissue (B). ··· 25
Fig. 8. Expression levels of KiSS1 (A) and GPR54 mRNA (B) in the hypothalamus of *E. bruneus* by photoperiod and HCG injection. ····· 43
Fig. 9. Expression levels of FSHβ (A) and LHβ mRNA (B) in the pituitary of *E. bruneus* by photoperiod and HCG injection. ····· 44
Fig. 10. KiSS1 mRNA expression of Dark photoperiod condition and Dark to Light photoperiod change condition in the hypothalamus of longtooth grouper. ····· 46
Fig. 11. Expression levels of KiSS1 (A) and GPR54 mRNA (B) in the hypothalamus of *E. bruneus* by melatonin treatments. ····· 48

Collection @ jeju

List of table

Table 1. Primer sets used for partial cloning of KiSS1, KiSS2 and GPR54 in *E. bruneus* ····· 9

Table 2. Primer sets used for isolation of KiSS1, KiSS2 and GPR54 in *E. bruneus* ····· 10

Table 3. Gene information of used multiple alignment ····· 12

Table 4. Primer sets used for RT-PCR of KiSS1, GPR54 and 18s rRNA in *E. bruneus* ····· 14

Table 5. Overall amino acid identities of KiSS1 and KiSS2 between *E. bruneus* and other fishes ····· 20

Table 6. Overall amino acid identities of GPR54 between *E. bruneus* and other fishes ····· 21

Table 7. Experimental fish size and identification of *E. bruneus* by photoperiod condition ····· 33

Table 8. Sampling design for the photoperiod experiment of *E. bruneus* ····· 34

Table 9. Primer sets used for Real-time quantitative RT-PCR of KiSS1, GPR54 and 18s rRNA in *E. bruneus* ····· 35

Table 10. Experimental design for the photo sensitive and sampling of *E. bruneus* ····· 38

Table 11. Experimental design for the melatonin treatment and sampling of *E. bruneus* ····· 41

Collection @ jeju

ABSTRCT

Kisspeptin is product of the KiSS1 gene and the endogenous agonist for the GPR54 receptor. Kisspeptin has been reported to facilitate sexual maturation and ovulation by directly stimulating GnRH neurons via the GPR54 in several mammalian species. The report suggests that KiSS1/GPR54 system is play a important role of the reproductive system. Longtooth grouper, *Epinephelus bruneus,* a marine protogynous hemaphrodite, which is sex change from female to male begins around the age of 5 years, and it takes too much time until sexual maturation. Therefore, it makes difficult to obtain stable fertilized eggs and to understand the mature characteristics in the female longtooth grouper. The purpose of this study is understand to primary expression mechanism of KiSS1/GPR54 system, for research that KiSS1, KiSS2 and GPR54 mRNA cloning, KiSS1/GPR54 mRNA distribution in several tissues and regulation of KiSS1 mRNA expression by photoperiod, melatonin and HCG injection in the longtooth grouper.

Ⅰ. Molecular cloning of KiSS1, KiSS2, GPR54 cDNAs and tissue specific expression in the longtooth grouper, *E. bruneus*

The full length sequence and open reading frame of KiSS1, KiSS2 and GPR54 were 516 bp (312 amino acids), 557 bp (125 amino aicds) and 1230 bp (378 amino acids) long, respectively. Each gene showed about 70% (KiSS1), 90% (KiSS2) and 95% (GPR54) homology in amino acid sequences comparing to each other among other teleosts. Phylogenetic analysis revealed that the longtooth grouper KiSS1 and KiSS2, GPR54 was grouped with european seabass and orange-spotted grouper. KiSS1

Collection @ jeju

and GPR54 mRNAs are common expression in the brain and particulary both gene expression in the hypothalamus.

These results suggest of the co-existence of two kisspeptin coding genes, KiSS1 and KiSS2. Also KiSS1/GPR54 system is suggestive of control of reproduction in the longtooth grouper.

Ⅱ. Regulation of KiSS1/GPR54 mRNA expression by photoperiod and melatonin in Longtooth grouper, *E. bruneus*.

1. KiSS1/GPR54 mRNA expression by photoperiod and HCG injection.

Experimental group were classified into two groups, long day length (LD 16:8, light on at 04:30) and short day length (LD 8:16, lights on at 08:30), respectively. Each experimental group was injected HCG The KiSS1/GPR54 mRNA expression was high in long day length group and HCG injection group. These results suggest that KiSS1/GPR54 mRNA is upregulated by long photoperiod and positive feedback control of GTH.

2. Sensitive expression of KiSS1 by light

Longtooth groper were acclimated in LD 12:12 condition for one week. After one week, the fish were sampled at am 01:00 (dark condition) and am 03:00 (photo exposure for 2 hrs). The KiSS1 mRNA level of photo exposure group siginificantly higher than dark condition group. This result suggest that KiSS1 have photo sensitive expression.

3. KiSS1/GPR54 mRNA expression by melatonin injection

Melatonin and vehicle daily injection for 2 weeks. The KiSS1 and

Collection @ jeju

GPR54 mRNA expression level of melatonin injection group was lower than vehicle injection group. This result indicates that KiSS1/GPR54 mRNA expression is inhibited by melatonin in the longtooth grouper.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

dCollection @ jeju

총 론

어류의 번식내분비계는 뇌-뇌하수체-생식소의 축(brain-pituitary-gonad; B-P-G axis)으로 이루어져 있으며, 각각의 기관들은 서로의 상보적인 기능에 의하여 조절되어진다. 어류의 번식내분비계 활동은 빛과 수온 등 외부환경요인에 의하여 개시되어지며(Goos, 1993), 이와 같은 환경요인들은 감각기관을 거쳐 뇌의 시상하부에서 통합되어진 후 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH, 생식소자극호르몬방출호르몬)의 방출을 유도한다(Kobayashi et al., 1997; Okuzawa and Kobayashi, 1999). GnRH는 뇌하수체로 전달되어 두 가지 종류의 Gonadotropin (GTH, 생식소자극호르몬), 즉 Follicle stimulating hormone (FSH, 여포자극호르몬)과 Luteinizing hormone (LH, 황체 형성 호르몬)의 방출을 자극하게 된다. 생식소에는 FSH와 LH의 특이적 수용체가 존재하며, 각각의 GTH는 정소와 난소로 전달되어 기능을 나타낸다. FSH의 경우 성숙초기에 암컷의 난황축적과 수컷의 정자형성에 관여하며, LH의 경우 성숙후기에 암컷에서 난의 최종배란을 유도한다. 생식소에서는 이와 같은 자극에 의해 스테로이드 호르몬이 분비되며 스테로이드 호르몬들은 다시 뇌와 뇌하수체로 전달되어 negative feedback과 positive feedback을 이루어 B-P-G axis를 조절하게 된다(Tena-Sempere and Huhtaniemi, 2003).

B-P-G axis에 의한 번식내분비의 조절은 지난 10년간 어류를 포함한 여러 척추동물의 번식생물학연구에 가장 핵심이 되는 내용이었으나 최근 KiSS1과 그의 수용체인 G protein-coupled receptor 54 (GPR54)의 발견으로 새로운 번식내분비계의 축이 구성되어지고 있다. KiSS1은 피부암의 일종인 malignant melanoma (악성 흑생종)의 전이 억제 유전자로 최초 발견된 후 유방암, 갑상샘유두암종 그리고 췌장암과 같은 악성종양의 특이적 전이 억제 유전자로 밝혀졌다(Lee et al., 1996). 악성종양의 전이억제 유전자로 밝혀진 KiSS1/GPR54의 번식내분비 관여여부는 쥐와 사람에서 GPR54의 변이로 인해 hypogonadotropic hypogonadism (저생식샘자극호르몬 생식샘

Collection @ jeju

저하증)이 발생하여 성 성숙의 저해와 puberty 이상발동이 나타남으로서 알려지게 되었다(de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). 이와 같은 발견 이후 KiSS1/GPR54와 B-P-G axis와의 번식내분비적 상관관계는 다양한 방면에서 많은 연구가 진행되고 있으며, 현재 KiSS1/GPR54의 기능과 발현기작에 관한 연구는 대부분 포유류를 중심으로 B-P-G axis에서 GnRH와 GTH (FSHβ, LHβ) 발현에 미치는 영향(Gottsch et al., 2004; Irwig et al., 2004; Matsui et al., 2004; Thompson et al., 2004; Shahab et al., 2005)과 스테로이드 호르몬에 의한 feedback 관계(Smith et al.,2005a; Smith et al.,2005b), 그리고 puberty의 발동(Funes et al., 2003; Navarro et al., 2004; Plant et al., 2006) 등에 관해 이루어지고 있다.

자바리, *Epinephelus bruneus*는 농어목(Perciforme) 바리과(Serranidae) 능성어속(*Epinephelus*)에 속하며 성체의 크기가 1 m가 넘는 대형어종으로, 아열대 해역의 암초지대에 서식하며 작은 어류와 두족류, 갑각류 등을 포식하며 생활한다(Kim et al., 2005). 한국을 포함한 일본, 중국 그리고 동남아시아에서 기호성이 높아 높은 가격에 거래가 이루어지고 있는 고부가가치 어종이지만 최근 남획과 환경변화에 따른 자원감소로 어획량이 줄고 있다. 국제식량농업기구(FAO)는 자원량이 급감하고 있는 어종으로 자바리를 포함한 붉바리 *E. akaara* 및 다수의 바리과 어종을 포함하였다(Annalie et al., 2000).

자바리는 부화 후 모든 개체가 암컷으로 성분화되어 성숙 후 일부 개체가 수컷으로 성전환을 하는 자성선숙형 자웅동체어(protogynous hermaphrodite)의 성 특성을 갖고 있으며, 성숙한 어미로 성장하는데 5년 이상이 소요되어 안정적 양식 산업화에 많은 어려움이 있다. 최근 자바리의 양식 산업화를 위하여 성 전환과 성 성숙유도 및 puberty 발달 특성에 관한 연구에서 성 전환 과정 중 스테로이드 호르몬 변화와 성 성숙과 Puberty 과정 중 GTH의 변화가 보고되었다(Oh, 2006; Hur, 2008; Ryu, 2008).

이 연구는 최근 생물의 B-P-G axis에 있어 gatekeeper 또는 new frontier 라고 불려지는 KiSS1/GPR54 system이 자바리의 번식내분비에 있어 발현개시요인과 다른 생식생리활성인자들과의 관계를 조사하기 위하여 유

Collection @ jeju

전자 cloning 및 광주기조절과 melatonin 투여에 따른 KiSS1, GPR54 그리고 GTH subunits mRNA의 변화 양상을 조사하였다.

dCollection @ jeju

제 1 장

자바리의 시상하부에서 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54 cDNA 분리 및 조직별 발현

서론

KiSS1의 단백질 산물인 kisspeptin은 RF-amide peptide 계열로써 암세포의 전이억제 기능을 하는것으로 보고되었다(Lee et al., 1996). 현재 포유류에서 kisspeptin은 cleavage product에 따라 kisspeptin-54, kisspeptin-14, kisspeptin-13, 그리고 kisspeptin-10이 나타나는 것으로 알려져 있다(Othaki et al., 2001; Bilban et al., 2004). KiSS1 유전자의 분리·동정에 관한 연구는 대부분 포유류에서 이루어졌으나 최근 zebrafish *Danio rerio,* medaka *Oryzias latipes*, european seabass *Dicentrarchus labrax* 그리고 goldfish *Carassius auratus*와 같이 어류에서도 분리·동정되어 이를 바탕으로 번식과 관련된 기초 연구들이 수행되었다(van Aerle et al., 2008; Kanda et al., 2008; Felip et al., 2009; Yang et al., 2010).

세포막수용체 계열인 G protein-coupled receptor에 관한 연구는 인간을 중심으로 활발히 이루어졌으며 현재 약 160여 종류의 G protein-coupled receptor가 밝혀져 있다. GPR54 역시 G protein-coupled receptor의 계열로써 kisspeptin의 receptor로 기능이 밝혀졌으며, 쥐에서는 GPR54 그리고 사람에서는 AXOR12로 각각 명명되어 보고되었다(Lee et al., 1999; Muir et al., 2001). GPR54의 경우 KiSS1과는 다르게 어류에서 많은 연구가 수행되고 있으며, cichlid fish *Haplochromis burtoni,* cobia *Rachycentron canadum*, flathead mullet *Mugil cephalus*, zebrafish *D. rerio*, fathed minnow *Pimephales promelas* 그리고 senegalese sole *Solea senegalensis* 등에서 분리·동정되어

Collection @ jeju

어류의 성 성숙과 puberty의 관계를 중심으로 다양한 연구가 수행되고 있다 (Parhar et al., 2004; Mohamed et al., 2007; Nocillado et al., 2007; van Aerle et al., 2007; Filby et al., 2008; Mechaly et al., 2009).

KiSS1/GPR54 system에 의한 번식생리조절 연구는 대부분 포유류를 중심으로 이루어졌으며, 그에 관한 기초 연구로써 각 기관별 발현 유무에 관한 연구가 이루어지고 있다. 포유류 KiSS1/GPR54의 경우 태반과 뇌, 뇌하수체와 같은 번식과 직접적으로 연관이 있는 조직에서 주로 발현이 된다(Muir et al., 2001; Colledge, 2004). 조직학적 관찰에 의해 뇌의 시상하부에 존재하는 GnRH neuron과 동일한 위치에서 분포가 확인되어 GnRH와 상호적 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(Irwig et al., 2004; Messager et al., 2005).

이 연구에서는 자바리에서의 KiSS1/GPR54 system을 조사하기 위해 KiSS1과 KiSS1-like gene으로 보고되고 있는 KiSS2 그리고 GPR54 cDNA의 분리·동정, 다른 종과의 상동성 및 계통유연관계를 조사하였으며, KiSS1 mRNA와 GPR54 mRNA의 조직별 발현 유무를 확인하였다.

Collection @ jeju

재료 및 방법

1. 실험어

자바리의 시상하부에서 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54 cDNA를 분리하기 위하여 자바리의 성 성숙시기인 7월에 제주대학교 해양과환경연구소에서 사육중인 5년생 자바리를 이용하였으며, 저온 마취후 뇌, 뇌하수체 그리고 기관별(망막, 뇌, 간, 신장, 소화관, 근육, 생식소) 각 조직을 적출하였다. 또한 뇌의 부위별 KiSS1/GPR54 mRNA 발현 확인을 위하여 뇌를 telencephalon (단뇌), optic tectum (시개), pineal gland (송과체), cerebellum (소뇌), hypothalamus (시상하부) 그리고 pituitary (뇌하수체)로 구분하여, 모든 조직은 분석 전까지 -80℃에 보관하였다(Fig. 1).

2. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

적출한 각 조직은 크기별로 300~500 ㎕의 TRI REAGENT (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 첨가 후 충분히 균질화 시켰으며, TRI REAGENT 100 ㎕당 chloroform 20 ㎕를 첨가하여 4℃, 12,000 g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 상층액을 새로운 튜브로 옮겼으며, 상층액에 동량의 iso-propanol을 첨가하여 원심분리 후 RNA를 침전시켰다. RNA 침전 후 상층액을 버리고 diethyl pyrocarbonate (DEPC)을 첨가한 75% 에탄올을 이용하여 세척하였으며, 실온에서 10분간 건조하여 RNase-free 증류수에 용해하여 이용하였다. 추출된 total RNA는 NanoVue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 사용하여 농도를 측정하였으며, A260/A280 nm의 비율이 1.7~2.1 범위내의 값을 갖는 RNA를 실험에 이용하였다.

cDNA는 각 조직에서 추출한 total RNA 0.5 ㎍을 주형으로 PrimeScript^{TM}RT reagent Kit (Takara, Japan)을 이용하여 합성하였다. Total RNA에 증류수를 더해 6.5 ㎕의 부피가 되게 맞춘 후, Oligo dT Primer 0.5 ㎕, Rnadom

Collection @ jeju

6mers 0.5 ㎕, PrimeScript™ RT Enzyme mix 0.5 ㎕ 그리고 5×PrimeScript™ Buffer 2 ㎕를 첨가하여 총 부피를 10 ㎕가 되게 하였다. 37℃에서 15분간 역전사 반응을 시킨 뒤 85℃에서 합성을 중단시켰으며, 합성이 끝난 각 cDNA는 각 polymerase chain reaction (PCR) 실험의 과증폭 방지를 위해 Nuclease-free 증류수 40 ㎕를 첨가하여 최종부피를 50 ㎕가 되게 희석하여 사용하였다.

3. KiSS1, KiSS2와 GPR54 cDNA 분리

KiSS1과 KiSS2 cDNA 분리를 위하여 orange-spotted grouper *E. coioides* (accession number, GQ258777), european seabass *D. labrax* (accession number, FJ008914) 그리고 japanese madaka *O. latipes* (accession number, NP_001116393)에서 보고된 염기서열을 참고로 degenerate primer를 제작하였다. GPR54 cDNA의 분리를 위하여 orange-spotted grouper *E. coioides* (accession number, GQ258778)와 cobia *R. canadum*, (accession number, DQ790001)에서 보고된 염기서열을 참고로 degenerate primer를 제작하였다(Table 1).

Degenerate primer와 PCR에 의해 증폭된 유전자 산물을 정제한 후, pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 삽입하여 JM109 competent cell에 형질전환 시켰다. LB agar plate에서 배양된 양성콜로니로부터 plasmid DNA를 분리하여 Genotech (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 각 유전자의 부분 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST 검색을 이용하여 확인하였다. 각각의 전 염기서열은 SMART RACE cDNA amplication kit (Clontech, USA)를 사용하여 분리하였으며, 종 특이적 primer 세트는 확인된 부분염기서열을 참고로 제작하였다 (Table 2).

Collection @ jeju

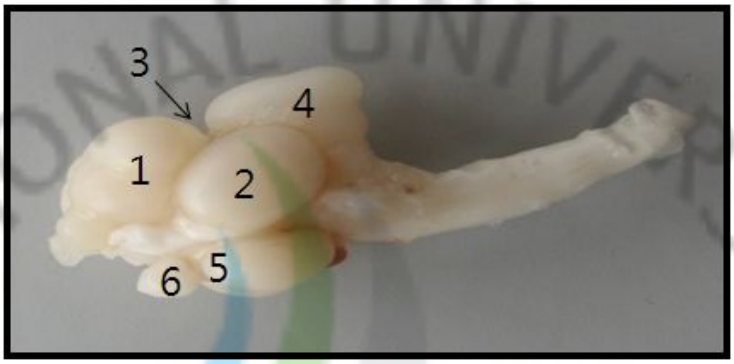


Fig. 1. Discrete brain area of the *E. bruneus* that used in the tissue specific expression by RT-PCR. 1, telencephalon; 2, optic tectum; 3, pineal gland; 4, cerebellum; 5, hypothalamus; 6, pituitary.

dCollection @ jeju

Table 1. Primer sets used for partial cloning of KiSS1, KiSS2 and GPR54 in *E. bruneus*

Name	Primer sequence	Note
KiSS1 F1	5'-CSACTCATTGTYGCTCTGAT-3'	forward primer for KiSS1 cDNA fragment
KiSS1 F2	5'-GGTTCTCAGGGGAACWGAYA-3'	
KiSS1 R1	5'-TCCRTAACGKAGACCAAAGGA-3'	reverse primer for KiSS1 cDNA fragment
KiSS1 R2	5'-AGGCCGAAGGARTTGAGATT-3'	
KiSS2 F1	5'-YGACTCTGCACAGAGGACAS-3'	forward primer for KiSS2 cDNA fragment
KiSS2 F2	5'-CTCTGCCGGRAYTYGACTCT-3'	
KiSS2 R1	5'-GWAGGCACCTCCAGTTCTCG-3'	reverse primer for KiSS2 cDNA fragment
KiSS2 R2	5'-CRAACGGGTTGAAGTTGAAT-3'	
GPR54 F1	5'-GCCACYGACATCATCTTCTT-3'	forward primer for GPR54 cDNA fragment
GPR54 F2	5'-YCTCCCTGGATGGATCTTYG-3'	
GPR54 R1	5'-CAGTTGGCCCAHGTCTTGAT-3'	reverse primer for GPR54 cDNA fragment
GPR54 R2	5'-CTBGAAGCCATGCTGCTRTC-3'	

※ H (A, T, C), Y (C, T), K (G, T), R (A, G), S (G, C), W (A, T)

Collection @ jeju

Table 2. Primer sets used for isolation of KiSS1, KiSS2 and GPR54 in *E. bruneus*

Name	Primer sequence	Note
KiSS1	5'-GATCCACCATCCTGACCTGGGAAAC-3'	gene specific primer for KiSS1 cDNA 5'
	5'-TGATGGCTGCTTTGTCAACAGAGGTC-3'	gene specific primer for KiSS1 cDNA 3'
	5'-TGCTGATGGTGGTATTGATGCATGG-3'	nest gene specific primer for KiSS1 cDNA 5'
	5'-GAGGTCTGCACCACTGGCAGTTTGA-3'	nest gene specific primer for KiSS1 cDNA 3'
KiSS2	5'-CTCGCGAGAAGAGAGAAAAGGGTGA-3	gene specific primer for KiSS2 cDNA 5'
	5'-GGAGAGTTTGTGGCGGAGGATACCA-3	gene specific primer for KiSS2 cDNA 3'
	5'-GGCTGCTTTCACGGCTCTCCTGTAA-3	nest gene specific primer for KiSS2 cDNA 5'
	5'-ATACCAGCCCGTGTTTGTCCCTGAG-3	nest gene specific primer for KiSS2 cDNA 3'
GPR54	5'-GCAGCAGGTAGGCAGCAATGAACTG-3'	gene specific primer for GPR54 cDNA 5'
	5'-ATCGCACCCCAAGAGTAGCCATGAT-3'	gene specific primer for KiSS1 cDNA 3'
	5'-AGGAGCCAATCCAAATGCAGATGCT-3'	nest gene specific primer for GPR54 cDNA 5'
	5'-CTGCATGTCCTACGCCAACTCTTCG-3'	nest gene specific primer for GPR54 cDNA 3'

Collection @ jeju

4. 염기서열 분석

KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54의 종간 계통유연관계 분석은 Phylip 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각 종들의 아미노산 서열 Multiple alignment는 ClustalW 프로그램을 이용하여 분석하였다. BOOTSTRIP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1000 set는 PRODIST 프로그램에 의해 distance matrices를 계산하였다. 계산된 distance matrices는 NEIGHBOR 프로그램의 tree 작성 input 데이터로 이용하였고, CONSENSE 프로그램을 이용하여 consense tree를 작성하였다. Out group은 zebra fish의 mu opioid receptor를 이용하였으며, 각 유전자의 multiple alignment에 이용된 종과 유전자는 NCBI의 BLAST 검색을 이용하였다(Table 3).

dCollection @ jeju

Table 3. Gene information of used for multiple alignment

Gene	Species	Shorten name	Aceession number
KiSS1	Longtooth grouper	lgKiSS1	GU984382
	Japanese medaka	mdKiSS1	NP_001116393
	Zebrafish	zfKiSS1	AB245404
	Goldfish	gfKiSS1	FJ236327
	European seabass	sbKiSS1	FJ008914
	Chub mackerel	cmKiSS1	GU731672
KiSS2	Longtooth grouper	lgKiSS1	GU984383
	Japanese medaka	mdKiSS1	NM_001142585
	Zebrafish	zfKiSS1	NM_001113489
	Goldfish	gfKiSS1	GQ141877
	European seabass	sbKiSS1	FJ008915
	Chub mackerel	cmKiSS1	GU731673
	Orange-spotted grouper	ogKiSS2	GQ258777
GPR54	Longtooth grouper	lgGPR54	-
	Orange-spotted grouper	ogGPR54	GQ258778
	Southern bluefin tuna	stGPR54	GQ150542
	Flathead mullet	fmGPR54	DQ683737
	Senegalese sole	ssGPR54	EU136710
	Cobia	coGPR54	DQ790001
	Nile tilapia	ntGPR54	AB162143
	Cichlid	ciGPR54	GQ860302
	Zebrafish	zfGPR54	EU047917
	Atlantic croaker	acGPR54	DQ347412
	Yellowtail amberjack	yaGPR54	GQ150543

Collection @ jeju

5. RT-PCR

RT-PCR에 사용된 primer는 분리된 염기서열을 참고로 제작하였으며, housekeeping gene으로는 18s rRNA를 사용하였다(Table 4). RT-PCR 반응은 2.5 ㎕의 cDNA를 주형으로 Go taq Green Master mix (Promega, USA)와 primer 세트를 혼합하여 95℃에서 45초, 55℃에서 45초, 72℃에서 90초 씩 35cycle을 증폭하였다.

dCollection @ jeju

Table 4. Primer sets used for RT-PCR of KiSS1, GPR54 and 18s rRNA in *E. bruneus*

Name	Primer sequence	Note	Product length
KiSS1 F	5'-CTCTGATGATGGCTGCTTTG-'	forward primer	230 bp
KiSS1 R	5'-TGGTCTGAGGGAAGATCACC-3'	reverse primer	
GPR54 F	5'-GCCACTGACATCATCTTCTT-3'	forward primer	802 bp
GPR54 R	5'-CTTGAAGCCATGCTGCTTTC-3'	reverse primer	
18s rRNA F	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'	forward primer	599 bp
18s rRNA R	5'-CCTCCGACTTTCGTTCTTGA-3'	reverse primer	

dCollection @ jeju

결 과

1. 자바리 KiSS1, KiSS2와 GPR54 cDNA의 분리 및 상동성 비교

자바리 시상하부 조직을 이용하여 제작한 cDNA를 주형으로, KiSS1과 GPR54 cDNA를 분리하여 염기서열을 분석한 결과 KiSS1과 KiSS2의 cDNA길이는 각각 516 bp와 557 bp 였으며, GPR54의 cDNA 길이는 1230 bp 였다. KiSS1의 open reading frame (ORF) 길이는 312 bp (104 aa)이었으며, 5′ UTR과 3′ UTR의 길이는 각각 19 bp와 185 bp였다. 그리고 KiSS1 구조의 기본을 이루는 kisspeptin-10 (YNLNSFGLRY, 193~202 aa)을 포함하였다(Fig. 2). KiSS2의 ORF 길이는 375 bp (125 aa)이었으며, 5′ UTR과 3′ UTR의 길이는 각각 15 bp와 167 bp였다. KiSS2 역시 KiSS2의 기본 구조를 이루는 kisspeptin-10 (FNFNPFGLRF, 81~90 aa)을 포함하였다(Fig. 3). GPR54의 ORF 길이는 1137 bp (379 aa)이었으며, 5′ UTR과 3′ UTR의 길이는 각각 78 bp와 15 bp였다 (Fig. 4).

자바리의 KiSS1, KiSS2와 GPR54의 cDNA를 다른 종에서 보고된 아미노산 서열과 비교 분석한 결과, KiSS1의 경우 농어과의 european seabass *D. labrax*와 78%, 고등어과의 chub mackerel *S. japonicus*와 72%의 높은 상동성을 나타냈다. KiSS2의 경우 바리과의 orange-spotted grouper *E. coioides*와 96%의 매우 높은 상동성을 나타냈으며, 농어과의 european seabass *D. labrax*와 81%, 고등어과의 chub mackerel *S. japonicus*와 72%의 상동성을 나타냈다 (Table 5).

GPR54의 경우 근연종인 바리과의 orange-spotted grouper, *E. coioides*와 99%, 날새기과인 cobia, *R. canadum*, 시클리드과의 nile tilapia,*O. niloticus*)와 96%, 고등어과의 southern bluefin tuna, *T. maccoyii*, 민어과의 atlantic croaker, *M. undulatus*와 95%, 참서대과의 senegalese sole, *S. senegalensis*, 숭어과의 flathead mullet, *M. cephalus*과 94%로 높은 상동성을 가지는 반면, 잉어과의 zebrafish, *D. rerio*와 85%, 금붕어과의 goldfish *C. auratus*와는

Collection @ jeju

83%로 비교적 낮은 상동성을 나타냈다(Table 6).

자바리의 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54의 종간 계통유연관계를 분석한 결과, 자바리 KiSS1의 경우 european seabass, chub mackerel와 가장 가까운 유연관계를 가졌으며, KiSS2와 GPR54의 경우 바리과인 orange-spotted grouper와 가장 가까운 유연관계를 보였다(Fig. 5, 6).

Collection @ jeju

Fig. 2. The KiSS1 nucleotide sequence and deduced amino acid sequence *of E. bruneus.* The KiSS1 cDNA was isolated by RACE. It was 516 base pairs long, contains 312 base pairs of ORF region encoding 104 amino acids, 19 base pairs of 5′ UTR and 185 base pairs of 3′ UTR regions. Underline indicated KiSS1 kisspeptin-10 region. Possible polyadenylation signal (AATAAA) is boxed.

Collection @ jeju

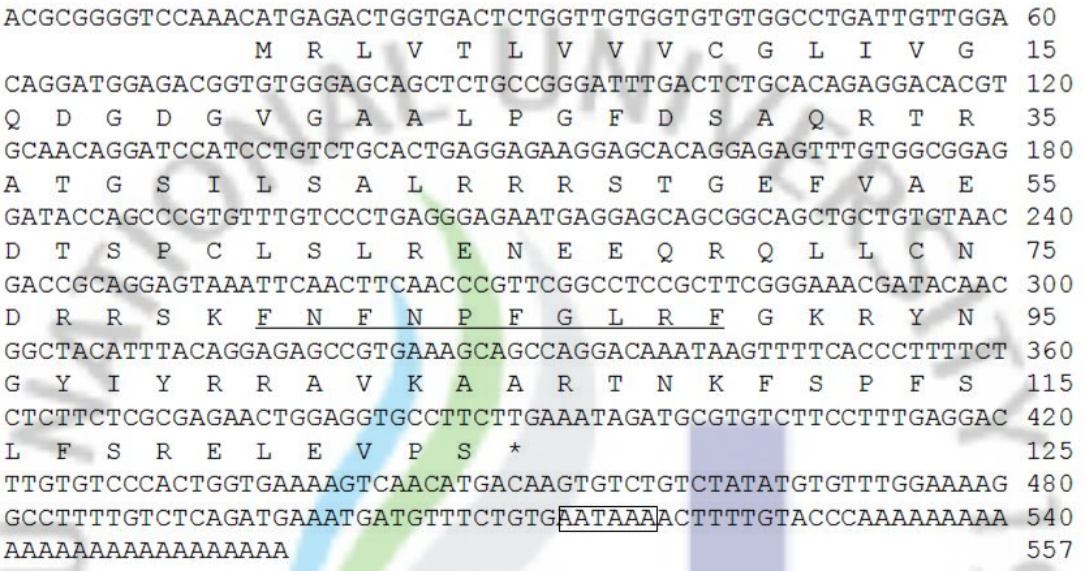


Fig. 3. The KiSS2 nucleotide sequence and deduced amino acid sequence *of E. bruneus.* The KiSS2 cDNA was isolated by RACE. It was 557 base pairs long, contains 375 base pairs of ORF region encoding 125 amino acids, 15 base pairs of 5′ UTR and 167 base pairs of 3′ UTR regions. Underline indicated KiSS2 kisspeptin-10 region. Possible polyadenylation signal (AATAAA) is boxed.

dCollection @ jeju

```
CGCGGGAATTGCCATCTCTTCTCGACTTCACTTTTTTCCCCCCATCTCCCCCACGCTCAA 60
ACCGCCCGTCCTGTCACGATGTACTCCTCCGAGGAACTCTGGAACTCCACCGAGCAGGTG 120
                  M  Y  S  S  E  E  L  W  N  S  T  E  Q  V   14
TGGATCAACGGCTCCAGGGCAAACTTCTCTCTAGGAAGACAAGGGGATGACGATGATGAA 180
W  I  N  G  S  R  A  N  F  S  L  G  R  Q  G  D  D  D  D  E   34
GAGGAAGGGGATCAGCACCCTTTCCTCACAGATGCCTGGCTGGTCCCTCTCTTCTTTTCC 240
E  E  G  D  Q  H  P  F  L  T  D  A  W  L  V  P  L  F  F  S   54
CTTATCATGTTAGTCGGACTGGTGGGCAACTCTCTGGTTATTTATGTGATTTCCAAGCAC 300
L  I  M  L  V  G  L  V  G  N  S  L  V  I  Y  V  I  S  K  H   74
AGGCAGATGAGGACGGCAACCAACTTTTACATAGCAAACCTGGCAGCCACTGACATCATC 360
R  Q  M  R  T  A  T  N  F  Y  I  A  N  L  A  A  T  D  I  I   94
TTCTTGGTGTGCTGCGTCCCCTTCACTGCCACCCTCTATCCTCTCCCTGGATGGATCTTT 420
F  L  V  C  C  V  P  F  T  A  T  L  Y  P  L  P  G  W  I  F   114
GGCAACTTCATGTGCAAATTTGTTGCGTTCCTACAGCAGGTGACAGTCCAAGCCACCTGT 480
G  N  F  M  C  K  F  V  A  F  L  Q  Q  V  T  V  Q  A  T  C   134
ATCACTCTGACAGCTATGAGTGGGGACCGCTGTTACGTCACTGTCTACCCTCTGAAATCT 540
I  T  L  T  A  M  S  G  D  R  C  Y  V  T  V  Y  P  L  K  S   154
CTCCGCCATCGCACCCCAAGAGTAGCCATGATTGTCAGCATCTGCATTTGGATTGGCTCC 600
L  R  H  R  T  P  R  V  A  M  I  V  S  I  C  I  W  I  G  S   174
TTCATCCTGTCCACCCCGATTTTAATGTACCAGCGTATAGAGGAGGGTTATTGGTACGGC 660
F  I  L  S  T  P  I  L  M  Y  Q  R  I  E  E  G  Y  W  Y  G   194
CCGAGGCAGTACTGCATGGAGAGATTTCCCTCAAAGACACATGAGAGGGCTTTCATCCTC 720
P  R  Q  Y  C  M  E  R  F  P  S  K  T  H  E  R  A  F  I  L   214
TACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCTGTCCTCACTATCTCATTCTGCTACACTCTG 780
Y  Q  F  I  A  A  Y  L  L  P  V  L  T  I  S  F  C  Y  T  L   234
ATGGTGAAGAGGGTGGGCCAGCCCACTGTGGAACCTGTAGATAACAACTATCAGGTTAAC 840
M  V  K  R  V  G  Q  P  T  V  E  P  V  D  N  N  Y  Q  V  N   254
CTCCTGTCTGAGAGAACTATCAGTATCAGAAGCAAAGTCTCCAAGATGGTTGTGGTAATT 900
L  L  S  E  R  T  I  S  I  R  S  K  V  S  K  M  V  V  V  I   274
GTCCTCCTCTTCGCCATCTGCTGGGGTCCCATTCAGATCTTTGTCCTCTTCCAGTCTTTC 960
V  L  L  F  A  I  C  W  G  P  I  Q  I  F  V  L  F  Q  S  F   294
TATCCAAACTACCAGGCCAACTACGCCACATACAAGATCAAGACATGGGCCAACTGCATG 1020
Y  P  N  Y  Q  A  N  Y  A  T  Y  K  I  K  T  W  A  N  C  M   314
TCCTACGCCAACTCTTCGGTCAACCCCATAGTTTACGGTTTCATGGGAGCCACCTTCCAA 1080
S  Y  A  N  S  S  V  N  P  I  V  Y  G  F  M  G  A  T  F  Q   334
AAGTCCTTTAGGAAAACCTTCCCGTTTCTGTTCAAGCATAAGGTCAGAGATAGCAGCATG 1140
K  S  F  R  K  T  F  P  F  L  F  K  H  K  V  R  D  S  S  M   354
GCTTCCAGGACTGCCAACGCTGAGATCAAGTTTGTTGCCGCAGAGGAAGGCAACAATAAT 1200
A  S  R  T  A  N  A  E  I  K  F  V  A  A  E  E  G  N  N  N   374
AATGCAATGAATTGAATAAAAAAAAAAAAA                               1230
N  A  M  N  *                                                378
```

Fig. 4. The GPR54 nucleotide sequence and deduced amino acid sequence *of E. bruneus.* The GPR54 cDNA was isolated by RACE. It was 1230 base pairs long, contains 1137 base pairs of ORF region encoding 379 amino acids, 78 base pairs of 5′ UTR and 15 base pairs of 3′ UTR regions.

Collection @ jeju

Table 5. Overall amino acid identities of KiSS1 and KiSS2 between *E. bruneus* and other fishes

Species	Overall amino acid identity(%)	
	KiSS1	KiSS2
E. coioides (Orange-spotted grouper)	-	96
D. labrax (European seabass)	78	81
S. japonicus (Chub mackerel)	72	72
O. latipes (Japanese medaka)	46	45
C. auratus (Goldfish)	33	36
D. rerio (Zebrafish)	30	32

Collection @ jeju

Table 6. Overall amino acid identities of GPR54 between *E. bruneus* and other fishes

Species	Overall amino acid identity (%)
	GPR54
E. coioides (Orange-spotted groupe)	99
R. canadum (Cobia)	96
O. niloticus (Nile tilapia)	96
T. maccoyii (Southern bluefin tuna)	95
M. undulatus (Atlantic croaker)	95
S. senegalensis (Senegalese sole)	94
M. cephalus (Flathead mullet)	94
D. rerio (Zebrafish)	85
C. auratus (Goldfish)	83

Collection @ jeju

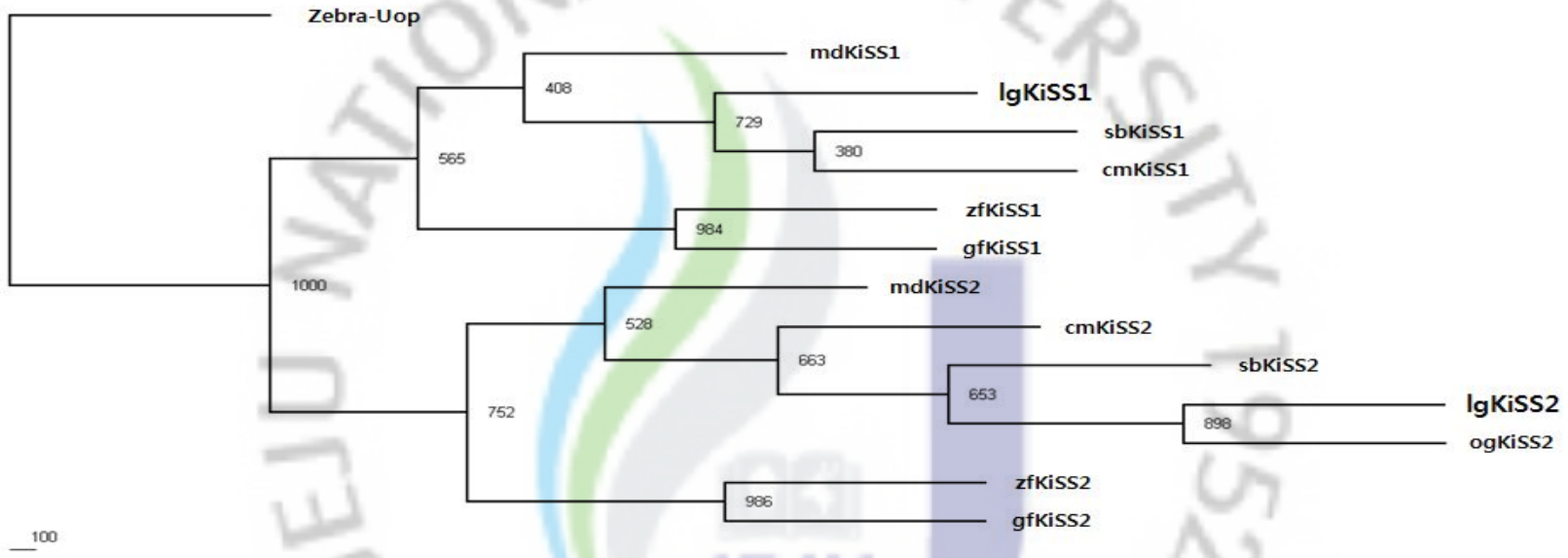


Fig. 5. Phylogenetic relationship of KiSS1/KiSS2 between *E. bruneus* and other fishes. Thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes. Zebrafish mu opioid receptor was used as out group. cm, chub mackerel; gf, goldfish; lg, longtooth grouper; md, madeka; og, orange-spotted grouper; sb, seabass; zf, zebrafish.

dCollection @ jeju

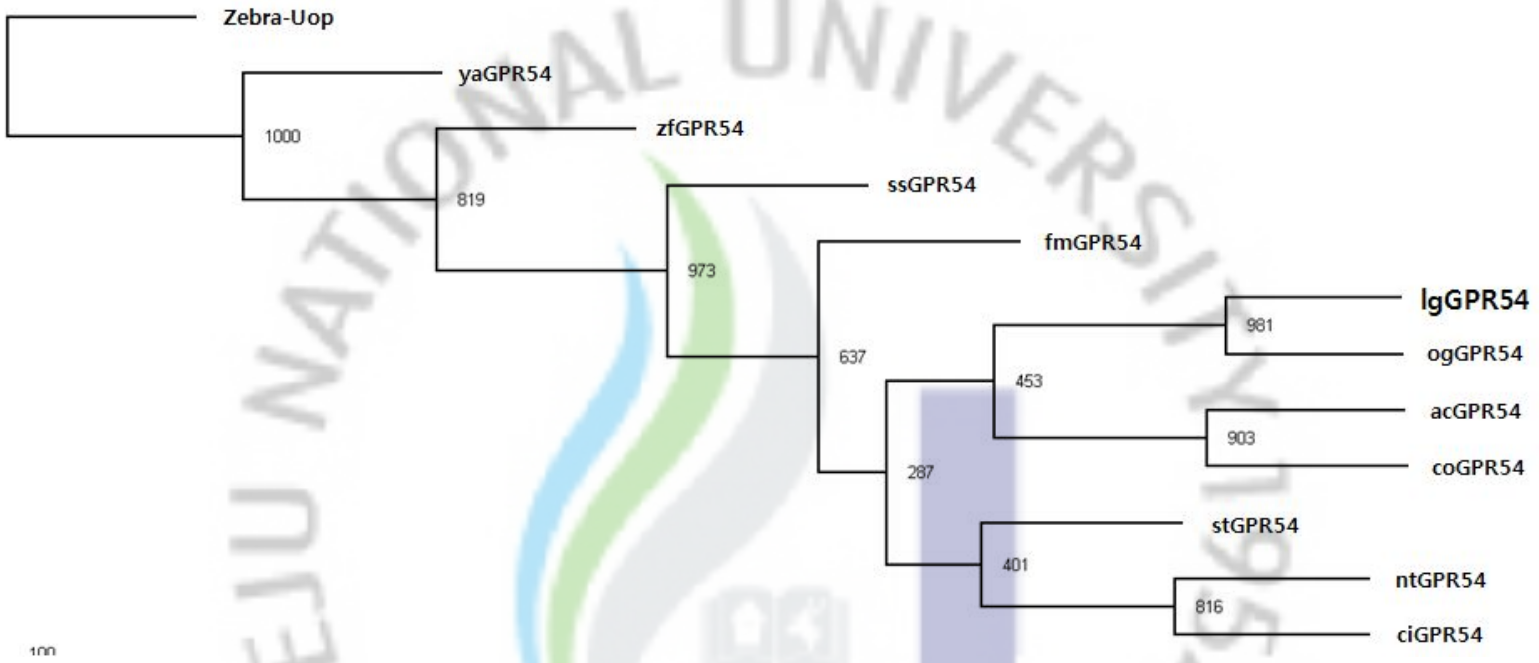


Fig. 6. Phylogenetic relationship of GPR54 between *E. bruneus* and other fishes. Thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes. Zebrafish mu opioid receptor was used as out group. ac, atlantic croaker; ci, cichlid fish; co, cobia; fm, flathead mullet; lg, longtooth grouper; nt, nile tilapia; og, orange-spotted grouper; ss, senegalese sole; st, southern bluefin tuna; ya, yellowtail amberjack; zf, zebrafish.

dCollection @ jeju

2. 자바리 KiSS1/GPR54 mRNA의 조직별 발현

자바리의 기관별 조직과 뇌의 각 부위에서 KiSS1 mRNA와 GPR54 mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과 기관별 조직중 KiSS1의 경우 뇌와 생식소에서 발현되었다. 뇌에서 강하게 발현하였으며 생식소에서는 매우 약하게 발현하였다. GPR54는 뇌에서만 발현이 나타났다(Fig. 7A).

뇌의 각 부위별 발현중 KiSS1의 경우, 시각을 담당하는 시개와 생식소자극호르몬방출호르몬(GnRH)의 생성장소인 시상하부에서 높은 발현이 나타났으며, 뇌하수체에서 매우 약하게 발현이 나타났다. GPR54는 시상하부에서 가장 강한 발현이 나타났으며, 단뇌, 시개 그리고 뇌하수체에서 발현이 관찰되었다(Fig. 7B).

dCollection @ jeju

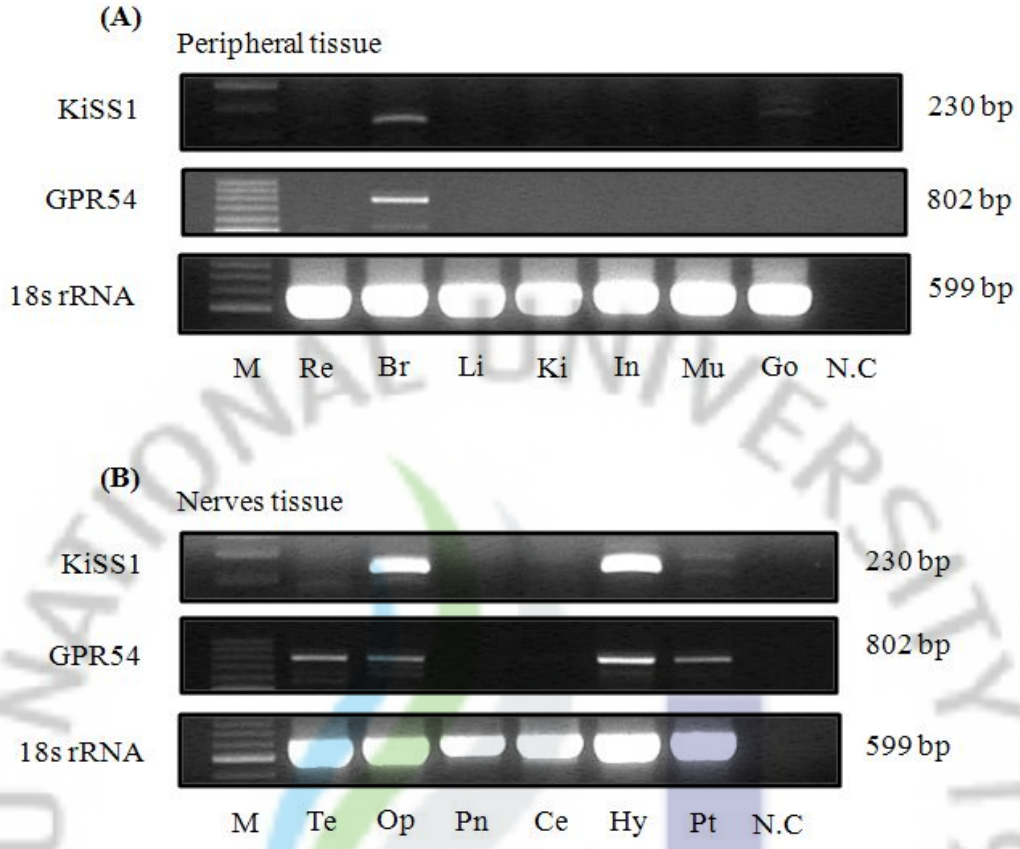


Fig. 7. Tissue specific expression of *E. bruneus* KiSS1/GPR54 mRNA in peripheral tissue (A) and nerves tissue (B). 18s rRNA were used as an internal control to verify the integrity of the RNAs. Negative control for PCR which were performed with sterile water as template. Br, brain; Ce, cerebellum; Go, gonad; Hy, hypothalamus; In, intestine; Ki, kidney; Li, liver; M, marker; Mu, muscle; N.C, negative control; Op, optic tectum; Pn, pineal gland; Pt, pituitary; Re, retina; Te, telencephalon.

Collection @ jeju

고 찰

최근 어류를 포함한 척추동물에서 번식내분비에 있어 KiSS1과 KiSS1 수용체인 GPR54의 기능에 관한 연구가 수행되고 있으며, 포유류에서는 존재하지 않는 KiSS1-like gene인 KiSS2가 medaka, zebrafish 그리고 seabass와 같은 경골어류를 중심으로 밝혀지고 있다(Kanda et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009). KiSS1의 경우 Y-Y form (YNLNSFGLRY), KiSS2의 경우 F-F form (FNFNPFGLRF)의 kisspeptin-10이 각각 존재하며, KiSS1의 kisspeptin-10은 번식내분비에서 GTH의 분비에 영향을 미친다(Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009).

이 연구에서 자바리 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54 유전자의 분리·동정 결과, KiSS1과 KiSS2 두 유전자가 공존하는 것으로 조사되었다. 자바리 KiSS1과 KiSS2간의 상동성은 매우 낮았으나, kisspeptin-10의 비교에서는 60%의 일치를 보여, 두 유전자의 기능적 유사성을 나타내었다. KiSS2의 경우 european seabass의 연구에서 KiSS1보다 더 강한 GTH발현 기능을 나타내어, non-mammalian type kisspeptin으로써 경골어류의 번식에 잠재적 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Felip et al., 2009). Kisspeptin의 수용체인 GPR54는 종간 상동성이 높아 척추동물의 유연관계에 있어 높은 보존성을 보여주었다(Parhar et al., 2004; van Aerle et al., 2008). 자바리의 GPR54 역시 ORF 영역이 1137 bp, 378 aa로 이루어져 있어 다른 해수어(>99%), 담수어(>93%)와 매우 높은 상동성을 나타내었다.

이 연구에서 KiSS1과 GPR54의 조직별 발현 결과 KiSS1의 경우 뇌에서의 강한 발현과 생식소에서의 약한 발현이 나타났으며, GPR54의 경우 뇌에서만 발현이 되었다. 뇌의 부위별로 나눈 중추신경에서의 발현에서는 KiSS1과 GPR54 모두 시상하부에서 공통적으로 강하게 발현하였다. 자바리의 KiSS1 조직별 발현은 medaka, seabass, zebrafish 그리고 goldfish와 유사하였다. seabass, medaka, zebrafish의 경우 자바리와 동일하게 뇌와 생식소에서만 발현되었으며, goldfish의 경우 뇌와 생식소외에 소화관, 신장, 간에서도 발현되었다(Kanda et al.,

Collection @ jeju

2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al.,2009; Yang et al.,2009). 이와 같은 결과는 kisspeptin이 뇌의 시상하부에 분포하고 있는 GnRH의 조절자로서 기능과, 생식소에서 분비되는 스테로이드 호르몬들이 뇌로 전달되어 kisspeptin의 positive feedback과 negative feedback의 형성과 관련이 있는 것으로 사료된다(Colledge, 2008; Colledge, 2009).

자바리의 KiSS1은 뇌의 부위중 시각과 관련된 시개에서도 발현되어 번식기능 외에 중추신경내에서 신경조절자·신경전달자로서의 기능도 수행할 것으로 생각된다. KiSS1의 생식소에서 발현은 여러 어종들에서도 보고되고 있으며, 설치류인 Rat에서 KiSS1은 성장기 여포의 난포막세포(theca cell)에서 관찰이 되어 난모세포의 성숙과 LH의 분비에 영향을 주어 배란을 조절하는 것으로 알려져 있다(Castellano et al., 2006). 자바리 GPR54는 뇌에서만 발현이 나타났으나, grey mullet과 fathead minnow의 경우 뇌와 생식소 두 조직에서 발현이 나타났다. Fathead minnow는 암컷과 수컷의 GPR54 비교 발현에서 수컷이 암컷에 비해 매우 높았으며, grey mulet은 성숙상태에 따른 GPR54 발현이 생식소에서 큰 차이가 있었다(Nocillado et al., 2007; Filby et al., 2008). 자바리의 경우 자성선숙형 자웅동체로, 실험에 사용된 개체는 암컷이었으며 성 성숙이 완전히 이루어지지 않은 상태였으므로 발현되지 않은 것으로 사료된다. 자바리 GPR54역시 KiSS1과 동일하게 시상하부에서 강한 발현이 관찰되어 KiSS1과 유사한 번식관련 기능을 수행하며, 성별· 성 성숙과 관계가 있는 것으로 생각된다.

이상의 연구결과에서, 자바리에서도 KiSS1과 KiSS2가 공존하며 KiSS1/GPR54는 뇌의 시상하부에 집중적으로 발현하여, 자바리의 번식내분비에서 KiSS1/GPR54가 GnRH와 GTH의 분비와 연관이 있을 것으로 생각되어진다.

향후 KiSS1/GPR54의 시상하부에서 명확한 발현유무를 조사하기 위하여 in situ hybridization 또는 immnohistochemistry 방법을 통한 조직학적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Collection @ jeju

제 2 장

광주기 조절과 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 발현 연구

서론

어류의 먹이활동, 산소소비, 체온조절 그리고 체색변화와 같은 생리작용은 다양한 환경요인에 의해 영향을 받으며, 그 중 낮과 밤의 교대에 의해 일어나는 빛의 변화는 수온과 함께 가장 중요한 환경요인으로 작용한다. 어류의 번식활동 역시 빛에 의해 조절되며, 각각의 종은 빛과 수온의 변화에 맞추어 특이적 생식주기를 갖는다(Mayer et al., 1997).

최근 KiSS1/GPR54 system이 빛에 의해 발현이 조절되며, 쥐와 햄스터와 같은 계절적 생식주기를 갖는 생물에서 광주기 조건을 달리 하였을 때 GTH, 스테로이드 호르몬의 변화와 동시에 KiSS1 mRNA의 발현이 변화하는 것으로 보고되고 있다(Revel et al., 2006; Revel et al., 2007). 일장이 증가하는 시기에 번식기를 갖는 Syrian hamster의 경우, 빛을 차단 하였을 때 번식행동의 저하와 시상하부의 arcuate nucleus (ARC)부위에서 KiSS1 mRNA의 발현이 감소하는 것으로 나타났다. Syrian hamster의 ARC는 멜라토닌 수용체가 존재하는 곳으로서, 이와 같은 결과는 KiSS1 neuron이 멜라토닌과 멜라토닌 수용체에 영향을 주어 나타난 것으로 보고되었다(Revel et al., 2006). 멜라토닌은 척추동물의 일주기 생리변화의 중요 조절자로서 일주기 변화에 따라 분비가 조절되며 트립토판(tryptophan)과 세로토닌(serotonin)을 거쳐 합성된 후 arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT)의 활성에 의해 세로토닌이 멜라토닌으로 합성된다(Axelrod et al., 1965; Klein et al., 1971; Voisin et al., 1984). 멜라토닌은 빛의 수용 및 전달기관인 망막과 송과체에서 발현되며, 포유류와 어류 모두 혈액에 의해 운반되어진다. 혈액중의 멜라토닌 함량은 밤에 증가하고 낮에 감소하며

Collection @ jeju

여름에 비해 겨울에 높게 발현되는 일주기와 년주기성을 나타낸다(Underwood, 1989; Arendt, 1997; Ekstrom et al., 1997). 멜라토닌의 일주기·년주기성은 어류에 있어 섭식, 성장, 삼투압 조절 그리고 번식에도 관여하는 것으로 보고되었다(Zhdanova et al., 2001; Pinillos et al., 2001; Herrero et al., 2005).

이 연구는 KiSS1/GPR54 system의 발현에 있어 중요 조절 환경인자로 생각되는 빛의 영향을 알아보고자, 광주기 조절 실험, 빛 감수성 실험, 멜라토닌 투여 실험을 실시하였으며, feedback 관계를 탐색하기 위해 광주기 조절 실험중 human chorionic gonadotropin (HCG) 투여에 따른 변화를 조사하였다.

Collection @ jeju

재료 및 방법

1. 광주기 조절과 HCG 투여에 따른 KiSS1/GPR54의 발현

1) 실험어 및 광주기 조절

실험어는 제주대학교 해양과환경연구소에서 사육중인 5년생 자바리를 2개의 FRP 원형수조 (ø 300×90 ㎝)에 각각 24마리(평균전장 23.3±2.3 ㎝, 평균체중 486.9±120.5 g)를 수용하였으며, 실험기간은 2010년 8월 16일부터 9월 6일까지 20일 이었다. 모든 실험어들은 개체별 식별을 위하여 등 근육에 micro chip을 삽입하여 실험 및 사육 관리시 micro chip reader ISO MAX Ⅳ (Data Mars SA, Swizerland)를 이용하여 확인하였다(Table 7). 각각의 수조는 차광막과 검정비닐을 덮어서 외부의 빛을 차광하였으며, 백열등(100 W)과 24시간 연속 타이머를 설치하여 16시간 명기 8시간 암기(LD 16:8)의 장주기와 8시간 명기 16시간 암기(LD 8:16)의 단주기의 광조건을 각각 처리하였다.

2) HCG 투여

각 수조에 수용된 24마리의 실험어는 대조구인 vehicle 투여구 12마리와 HCG 처리 실험구 12마리로 각각 구분하였다. HCG는 생리식염수에 용해하여 coconut butter (EA, Japan)와 1:9 비율로 혼합 후 50 IU/kg BW 농도로 근육주사를 하였으며, vehicle 투여의 경우 생리식염수와 coconut butter 혼합액을 주사하였다. HCG 및 vehicle 처리는 10일 간격으로 모두 2회 처리하였다.

샘플링은 시작시 6마리, 시작 후 10일과 20일에 각 실험구마다 HCG 투여 6마리와 vehicle 투여 6마리 총 12마리를 실시하였으며, KiSS1/GPR54 mRNA와 생식소자극호르몬(FSHβ/LHβ mRNA)의 측정을 위하여여 뇌의 시상하부와 뇌하수체를 적출하여 -80℃에 보관하였다(Table 8).

Collection @ jeju

3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

각각의 실험어는 뇌를 적출한 후 KiSS1과 GPR54가 집중적으로 발현하는 시상하부 부분만을 해부하여 total RNA 추출에 사용하였다. Total RNA 추출은 TRI REAGENT (MRC)를 사용하였다. 조직은 충분히 균질화 시킨 후 chloroform 60 ㎕를 첨가하여 4℃, 12,000 g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 상층액을 추출하여 동량의 iso-propanol을 첨가하여 RNA를 침전시킨 후 DEPC를 첨가한 75% 에탄올을 사용하여 세척하였다. 실온에서 10분간 건조하여 RNase-free 증류수에 용해하였으며, 추출된 total RNA는 농도 측정 후 genomic DNA의 contamination 방지를 위해 RQ1 RNase-Free DNase (Promega)를 처리하였다. cDNA는 DNase를 처리한 total RNA 0.5 ㎍을 주형으로 PrimeScript^{TM}RT reagent Kit (Takara)를 사용하여 합성하였다.

4. Real-time quantitative RT-PCR

Real-time quantitative RT-PCR은 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ kit (Takara)를 사용하였으며, 각 유전자의 염기서열을 참고로 특이적 primer를 제작하였다 (Table 9). 반응액은 3 ㎕의 cDNA를 주형으로, 12.5 ㎕의 SYBR Premix Ex Taq와 1.0 ㎕의 primer 세트 그리고 8.5 ㎕의 nuclease free 증류수를 혼합하여 총 25 ㎕의 volume으로 반응하였다. Real-time quantitative RT-PCR에 사용하기위한 standard의 제작은 PCR증폭(80~120 bp) 범위를 포함한 서열을 선택하여 circle plasmid DNA를 Spe I (Takare, Japan) 제한효소를 사용하여 linearized plasmid를 제작하여 사용하였다. Real-time quantitative RT-PCR의 수행은 CFX96^{TM} Real-Time System (BIO-RAD, USA)을 이용하여 95℃에서 30초간 initial denaturation 하였으며, 95℃에서 5초 denaturation, 60℃에서 30초 annealing과 elongation 하여 40cycle을 반응시켜 주었다. 각 샘플은 2반복 이상 측정하였으며, 18s rRNA를 이용하여 상대정량을 하였다.

Collection @ jeju

5. 통계처리

측정 값의 통계처리는 SPSS version 12.0을 이용하였으며, ANOVA-test를 실시하여 Duncans's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
제주대학교
JEJU 1952

dCollection @ jeju

Table 7. Experimental fish size and identification of *E. bruneus* by photoperiod condition

Photoperiod condition	ID No.	Body weight (g)	Experimental group
LD 16:8	216570	441	Vehicle injection
	215296	524	
	520632	502	
	216258	378	
	520474	557	
	520235	610	
	216101	517	
	216058	506	
	518667	520	
	519396	260	
	520356	338	
	517783	442	
	518572	441	HCG injection
	517898	524	
	518143	502	
	518705	378	
	519507	557	
	215439	610	
	130037	517	
	520124	506	
	215892	520	
	216120	260	
	517996	338	
	517993	442	
LD 8:16	518371	380	Vehicle injection
	519918	355	
	216286	290	
	214870	355	
	215423	430	
	520504	350	
	517861	673	
	215578	517	
	216217	860	
	214835	700	
	517896	510	
	520251	550	
	518525	582	HCG injection
	519725	400	
	518477	585	
	518078	424	
	214896	731	
	215645	695	
	216671	484	
	517441	518	
	215533	406	
	519136	439	
	216291	339	
	215780	427	

dCollection @ jeju

Table 8. Sampling design for the photoperiod experiment of *E. bruneus*

Photoperiod condition	No. of sampling fish				
	Initial	10 DAI[1)]		20 DAI	
		HCG	Vehicle	HCG	Vehicle
LD 16:8	6	6	6	6	6
LD 8:16		6	6	6	6

[1)]DAI : Day after initial

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
제주대학교
JEJU 1952

Collection @ jeju

Table 9. Primer sets used for Real-time quantitative RT-PCR of KiSS1, GPR54 and 18s rRNA in *E. bruneus*

Name	Primer sequence	Note	Product size
KiSS1	5'-TACCTGCTGACAGGGTCCAT-3'	forward primer	83 bp
	5'-TGGTCTGAGGGAAGATCACC-3'	reverse primer	
GPR54	5'-GCATGTCCTACGCCAACTCT-3'	forward primer	101 bp
	5'-GCTTGAACAGAAACGGGAAG-3'	reverse primer	
18s rRNA	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'	forward primer	103 bp
	5'-GGCCTCGAAAGAGTCCTGTA-3'	reverse primer	

dCollection @ jeju

2. KiSS1의 빛 감수성 실험

1) 실험어

실험어는 제주대학교 해양과환경연구소에서 사육중인 2년생 자바리 8마리(평균전장 18.8±1.1 ㎝, 평균체중 76.7±10.9 g)를 1개의 270 L 원형수조에 수용하여 완전순환여과식으로 사육하였으며, 수온의 범위는 20.2±1.1℃를 유지하였다.

2) 빛 노출 및 샘플링

실험수조는 차광막과 검정비닐을 덮어 외부의 빛을 차광하였으며, 백열등(100 W)과 24시간 연속 타이머를 설치하여 12시간 명기(07:00~19:00, 12hr light), 12시간 암기(19:00~07:00, 12hr dark)의 조건을 일주일간 처리하였다. LD 12:12 처리 일주일 후 01:00시에 조명이 없는 상태에서 4마리를 샘플링 하였으며, 나머지 4마리는 03:00시까지 2시간 빛에 노출시킨 후 샘플링 하였다. 샘플링 개체는 KiSS1 mRNA의 측정을 위해 뇌의 시상하부를 적출하여 -80℃에 보관하였다(Table 10).

3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

각각의 실험어는 뇌를 적출한 후 KiSS1과 GPR54가 집중적으로 발현하는 시상하부 부분만을 해부하여 total RNA 추출에 사용하였다. Total RNA 추출은 TRI REAGENT (MRC)을 사용하였으며, 조직은 충분히 균질화 시킨 후 chloroform 60 ㎕를 첨가하여 4℃, 12,000 g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 상층액을 추출하여 동량의 iso-propanol을 첨가하여 RNA를 침전시킨 후 DEPC를 첨가한 75% 에탄올을 사용하여 세척하였다. 실온에서 10분간 건조하여 RNase-free 증류수에 용해하였으며, 추출된 total RNA는 농도 측정 후 genomic DNA의 contamination 방지를 위해

Collection @ jeju

RQ1 RNase-Free DNase (Promega)을 처리하였다. cDNA는 Total RNA 0.5 ㎍을 주형으로 PrimeScript™RT reagent Kit (Takara)를 사용하여 합성하였다.

4) Real-time quantitative RT-PCR

Real-time quantitative RT-PCR은 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ kit (Takara)를 사용하였다. 반응액은 3 ㎕의 cDNA를 주형으로, 12.5 ㎕의 SYBR Premix Ex Taq와 1.0 ㎕의 primer 세트 그리고 8.5 ㎕의 nuclease free 증류수를 혼합하여 총 25 ㎕의 volume으로 반응하였다. Real-time quantitative RT-PCR에 사용하기위한 standard는 circle plasmid DNA를 Spe I (Takare) 제한효소를 사용하여 linearized plasmid를 제작하여 사용하였다. Real-time quantitative RT-PCR의 수행은 CFX96™ Real-Time System (BIO-RAD, USA)을 이용하였다.

5) 통계처리

각 실험구의 유의성 검정은 T-test ($P<0.05$)를 이용하였다.

Collection @ jeju

Table 10. Experimental design for the photo sensitive and sampling of *E. bruneus*

Light condition (sampling time)	Body weight (g) Means±SEM.[1)]	Body length (㎝) Means±SEM.	No. of sampling fish
Dark (am 01:00)	75.6±10.3	19.2±0.8	4
Light exposure (am 03:00)	77.8±12.6	18.4±1.3	4

[1)]SEM.: Standard error of means.

Collection @ jeju

3. 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 mRNA 발현 조절 연구

1) 실험어

제주대학교 해양과환경연구소에서 사육중인 2년생 자바리 20마리(평균전장 21.4±1.7 ㎝, 평균체중 118.5±28.7 g)를 해양과환경연구소 아열대해양생물관 실내 순환여과사육수조에 멜라토닌 투여구와 대조구인 vehicle 투여구로 나누어 각각 10마리씩 수용하였으며, 광주기 조건은 LD 13:11, 수온의 범위는 20.7±1.3℃를 유지하였다.

2) 멜라토닌 투여 및 샘플링

멜라토닌(Sigma, USA) 투여는 5 ㎎/㎏ BW의 농도로 2주간, 매일 소등하기 2시간 전 실시하였다. 멜라토닌의 처리는 에틸알콜에 용해시켜 주사용 생리식염수와 1:9 비율로 혼합 후 복강에 주사하였고, 대조구인 vehicle 주사의 경우 에틸알콜과 생리식염수 혼합액만을 복강 주사하였다. 샘플링은 실험시작 1주 후 그리고 2주 후에 실험구별 5마리씩 무작위로 채집하였으며, KiSS1/GPR54 mRNA의 측정을 위해 뇌의 시상하부를 적출하여 -80℃에 보관하였다(Table 11).

3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

각각의 실험어는 뇌를 적출한 후 KiSS1과 GPR54가 집중적으로 발현하는 시상하부 부분만을 해부하여 total RNA 추출에 사용하였다. Total RNA 추출은 TRI REAGENT (MRC)을 사용하였으며, 조직은 충분히 균질화 시킨 후 chloroform 60 ㎕를 첨가하여 4℃, 12,000 g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 상층액을 추출하여 동량의 iso-propanol을 첨가하여 RNA를 침전시킨 후 DEPC를 첨가한 75% 에탄올을 사용하여 세척하였다. 실온에서 10분간 건조하여 RNase-free 증류수에 용해하였으며, 추출된 total RNA는 농도 측정 후 genomic DNA의 contamination 방지를 위해

dCollection @ jeju

RQ1 RNase-Free DNase (Promega)을 처리하였다. cDNA는 Total RNA 0.5 ㎍을 주형으로 PrimeScript™RT reagent Kit (Takara)를 사용하여 합성하였다.

4) Real-time quantitative RT-PCR

Real-time quantitative RT-PCR은 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ kit (Takara)를 사용하였다. 반응액은 3 ㎕의 cDNA를 주형으로, 12.5 ㎕의 SYBR Premix Ex Taq와 1.0 ㎕의 primer 세트 그리고 8.5 ㎕의 nuclease free 증류수를 혼합하여 총 25 ㎕의 volume으로 반응하였다. Real-time quantitative RT-PCR에 사용하기위한 standard는 circle plasmid DNA를 Spe I (Takare) 제한효소를 사용하여 linearized plasmid를 제작하여 사용하였다. Real-time quantitative RT-PCR의 수행은 CFX96™ Real-Time System (BIO-RAD, USA)을 이용하였다.

5) 통계처리

각 실험구의 유의성 검정은 T-test ($P<0.05$)를 이용하였다.

Collection @ jeju

Table 11. Experimental design for the melatonin treatment and sampling of *E. bruneus*

Treatment	Body weight (g) Means±SEM.[1)]	Body length (㎝) Means±SEM.	No. of sampling fish	
			Weeks	
			1 week	2 week
Melatonin	122±36.6	21.9±1.9	5	5
Vehicle	115±16.9	20.9±1.3	5	5

[1)]SEM.: Standard error of means.

dCollection @ jeju

결과

1. 광주기 조절과 HCG 투여에 따른 KiSS1/GPR54 mRNA의 발현

광주기 조절과 HCG 투여에 의한 시상하부에서 KiSS1/GPR54 mRNA의 발현을 확인하였다.

KiSS1 mRNA의 발현량은, 10일째에 LD 16:8 실험구에서 LD 8:16 실험구에 비해 높은 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 20일째에, 10일째와 유사한 경향을 보였으나 모든 실험구는 유의적인 차이 없이 발현량이 낮았다. GPR54 mRNA의 발현량은, 10일째에 LD 16:8 실험구에서 LD 8:16 실험구에 비해 유의적으로 높았으며($P<0.05$), 20일째에 모든 실험구에서 유의적인 차이 없이 발현량이 낮았다.

KiSS1/GPR54 mRNA 모두 10일째 LD 16:8 실험구의 HCG 투여구에서가 vehicle 투여구에 비해 발현량이 가장 높았으며, GPR54 mRNA의 경우 유의적 차이를 나타내며 높았다($P<0.05$, Fig. 8).

FSHβ mRNA는 10일째에 LD 16:8 실험구에서 LD 8:16 실험구에 비해 높았으며, 20일째에 모든 실험구에서 낮게 발현하였다. LHβ mRNA는 10일째에 모든 실험구에서 발현이 낮았으며, 20일째에 LD 16:8 실험구의 HCG투여군에서 발현량이 유의적으로 높았다($P<0.05$, Fig. 9).

dCollection @ jeju

(A)

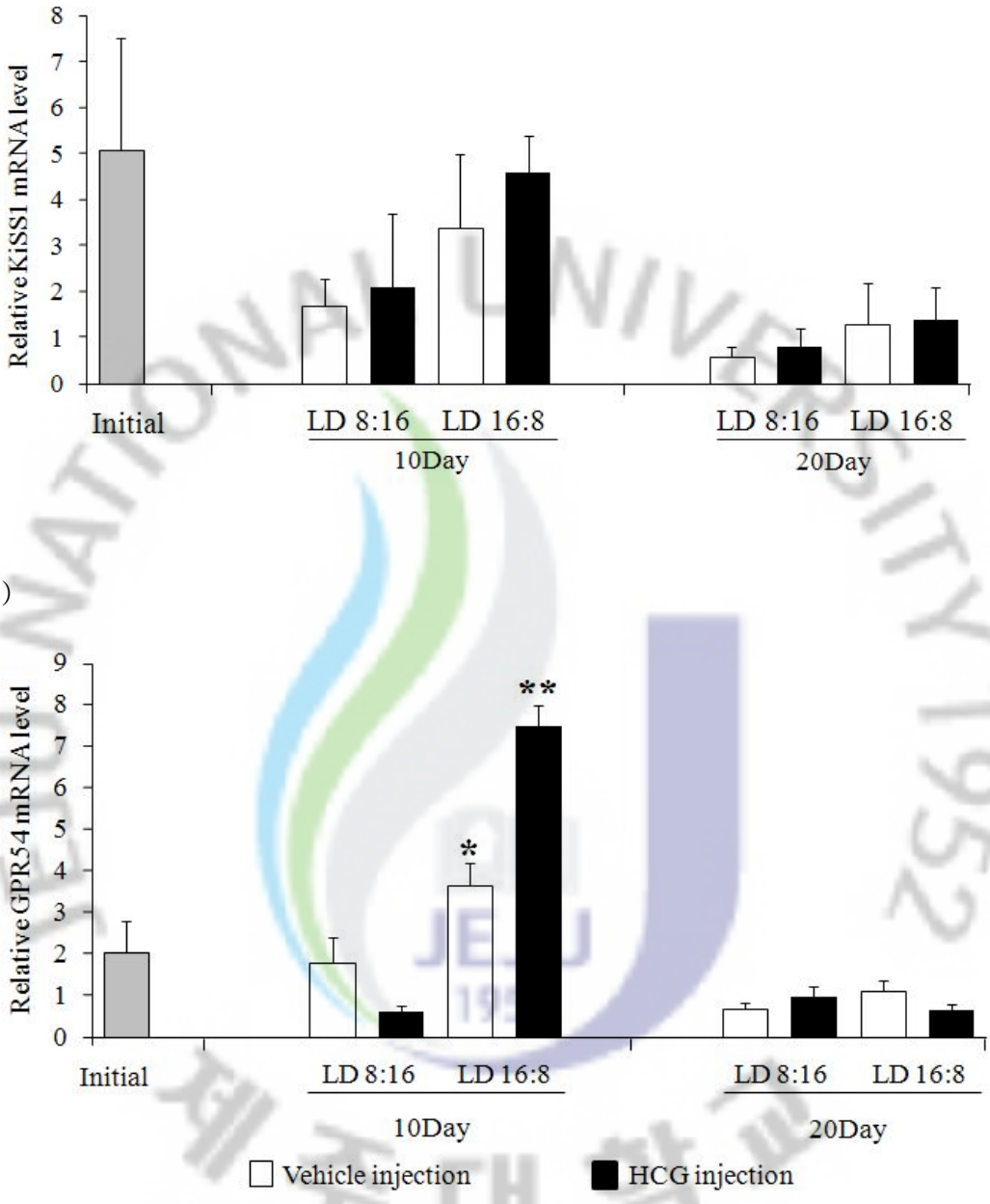


Fig. 8. Expression levels of KiSS1 (A) and GPR54 mRNA (B) in the hypothalamus of *E. bruneus* by photoperiod and HCG injection. Data are expressed as mean±sem. Asterisks indicated significant differences at $P<0.05$.

dCollection @ jeju

(A)

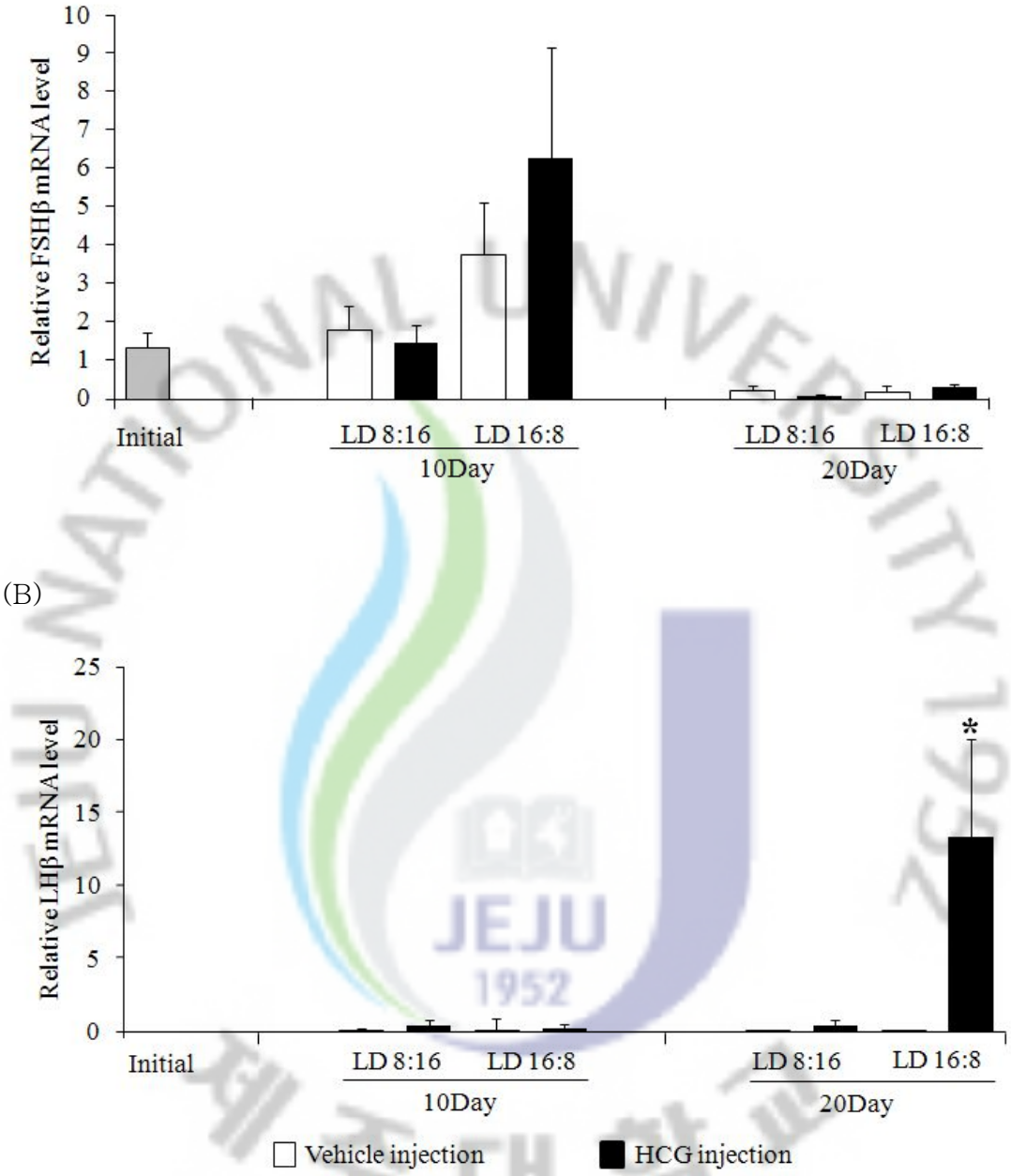


Fig. 9. Expression levels of FSHβ (A) and LHβ mRNA (B) in the pituitary of *E. bruneus* by photoperiod and HCG injection. Data are expressed as mean±sem. Asterisks indicated significant differences at $P<0.05$.

dCollection @ jeju

2. KiSS1의 빛 감수성 실험

KiSS1의 빛에 대한 반응을 확인하기 위한 빛 감수성 실험결과, 2시간동안 빛에 노출한 경우 계속적으로 암조건인 경우에 비해 KiSS1 mRNA의 발현량이 유의적으로 높았다($P<0.05$, Fig. 10).

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

dCollection @ jeju

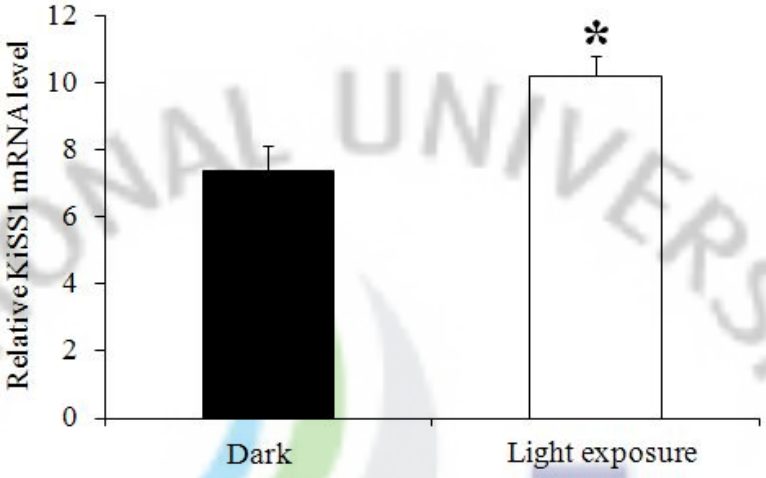


Fig. 10. KiSS1 mRNA expression of 2 hr light exposure in the hypothalamus of *E.bruneus*. Data are expressed as means±sem. Asterisks indicated significant differences at $P<0.05$.

dCollection @ jeju

3. 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 mRNA발현 조절 연구

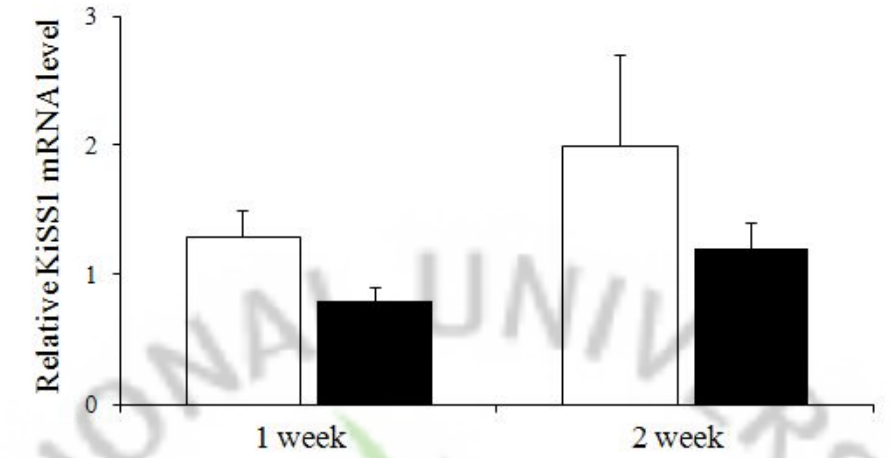
빛 조건에 의한 KiSS1과 GPR54의 발현이 빛 신호의 전달 호르몬인 멜라토닌에 의한 영향인지 탐색하기 위하여 자바리에 멜라토닌 투여를 실시한 후 KiSS1/GPR54 mRNA의 발현량을 확인하였다.

KiSS1 mRNA의 발현은, 멜라토닌 투여 7일 후 멜라토닌 투여 실험구에서 vehicle 투여구에 비해 낮았으며, 14일 후 역시 멜라토닌 투여 실험구에서 vehicle 투여구에 비해 낮았다.

GPR54 mRNA의 발현은, 7일 후 멜라토닌 투여 실험구에서 vehicle 투여구에 비해 낮았으며, 14일 후 역시 멜라토닌 투여 실험구에서 vehicle 투여구에 비해 낮았다. 또한 7일째에 비해서도 감소하였다(Fig. 11).

Collection @ jeju

(A)



(B)

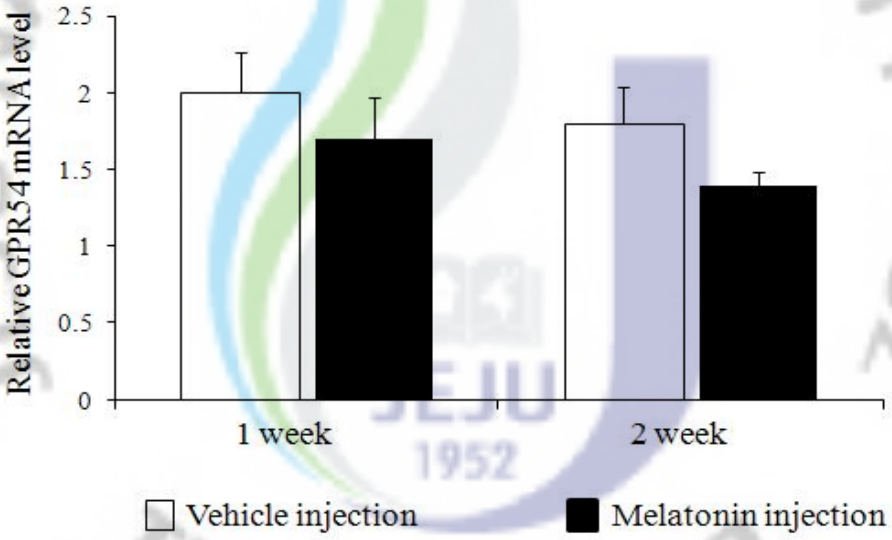


Fig. 11. Expression levels of KiSS1 (A) and GPR54 mRNA (B) in the hypothalamus of *E. bruneus* by melatonin treatments. Data are expressed as mean±sem. Asterisks indicated significant differences at $P<0.05$.

dCollection @ jeju

고 찰

어류의 성 성숙 조절은 빛과 수온과 같은 외부 환경 요인에 영향을 받으며 번식내분비의 변화에 의해 이루어진다(Nish, 1979). 특히 빛의 자극은 멜라토닌 분비에 영향을 주며, 멜라토닌은 스테로이드 호르몬과의 관계를 통해 시상하부의 GnRH 분비에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Karsch et al., 1993; Tamarkin 1976; Goodman 1982). 최근 mice와 hamster 같은 설치류에서 KiSS1/GPR54 역시 다른 번식내분비 호르몬들과 유사하게 빛과 멜라토닌에 의한 조절을 받는 것으로 보고되고 있으나(Greives et al., 2007; Mason et al., 2007; Simonneaux, 2009), 어류에서는 빛과 KiSS1/GPR54의 관계에 대한 연구가 거의 이루어져 있지 않다.

이 연구에서는 광주기에 의해 성 성숙이 조절되는 자바리를 대상으로 빛과 빛 신호의 전달 호르몬인 멜라토닌이 KiSS1/GPR54의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 탐색하기 위해, 광주기 조절 실험과 멜라토닌 투여 실험을 실시하여 뇌의 시상하부 조직에서 발현을 측정하였다.

광주기 조절 실험 결과 KiSS1과 GPR54 모두 실험시작 10일째 LD 16:8의 실험구에서 LD 8:16의 실험구에 비해 높았으며, 초기 성 성숙에 영향을 주는 FSH β mRNA의 증가가 나타났다. 20일째에는 최종배란에 영향을 주는 LHβ mRNA가 급격히 증가하였으며, 전체적으로 HCG 투여에 의해 발현이 높았다. 장주기 조건에 의한 자바리 시상하부 조직에서 KiSS1/GPR54의 발현증가는 일장 증가에 의해 번식활동을 하는 Syrian hamster 그리고 Siberian hamster와 유사하였다. Syrian hamster의 경우 장주기 실험구에서 단주기 실험구에 비해 시상하부의 anteroventral periventricular (AVPV)와 arcuate (ARC) nuclei 부위에서 KiSS1 cell의 수가 많았으며, 생식소 무게와 testosterone 발현이 높았다(Revel et al., 2006). Siberian hamster의 경우에도 장주기 실험구에서 단주기 실험구에 비해 AVPV 부위에서 KiSS1 cell의 수가 많았고 생식소의 무게가 증가하여 장주기 자극에 의한 성 성숙과 KiSS1의 증가를 나타냈다(Greives et al., 2007). 이 연구의 자바리 역시 일장증가에 의한 성숙개시가 이루어지는 어종으로, 장주

Collection @ jeju

기조건에 의해 KiSS1 mRNA와 초기 성 성숙에 영향을 주는 FSHβ mRNA의 발현이 증가한 것으로 사료된다.

KiSS1의 발현은 스테로이드 호르몬에 의한 negative feddback과 positive feedback의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 암컷과 수컷 mouse에서 스테로이드 호르몬이 생성되는 생식소의 제거와 생식소 제거 후 스테로이드 호르몬의 투여가 KiSS1의 발현에 미치는 영향을 연구한 결과, 암컷과 수컷 모두에서 생식소가 제거되었을때 AVPV부위에서 KiSS1의 발현은 감소하였으며, ARC 부위에서는 증가하였다. 그리고 생식소 제거 후 스테로이드 호르몬을 주사하였을때 AVPV부위에서 KiSS1의 발현은 증가하였으며, ARC 부위에서는 감소하여 각각의 부위에서 스테로이드 호르몬에 의한 positive feedback과 negative feedback이 존재하는 것으로 나타났다(Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). HCG는 어류의 성숙유도에 널리 사용되고 있으며, 최종 성숙 및 배란 유도에 효과를 내는 GTH 계열의 호르몬이다(Lam, 1982; Donaldson and hunter, 1983; Hodson and Sullivan, 1993). GTH는 번식내분비에서 뇌하수체에서 생성되어 생식소의 스테로이드 호르몬의 분비를 자극한다(Tena-Sempere and Huhtaniemi, 2003). 이 실험에서 나타난 HCG 투여에 따른 KiSS1/GPR54 mRNA의 발현 증가는 HCG 투여에 의해 GTH와 스테로이드 호르몬 분비가 증가하여 positive feedback이 작용한 결과로 생각된다.

광주기 조건에 따른 KiSS1/GPR54의 발현 차이가 빛 신호를 체내로 전달하는 매개체인 멜라토닌의 영향인지 알아보기 위해, 14일간 매일 소등 2시간 전 멜라토닌을 투여하여 vehicle 투여구에 비해 야간의 생리조건을 2시간 앞당겨 주었다. 그 결과 KiSS1/GPR54 모두 7일과 14일에 vehicle 투여구에 비해 멜라토닌 투여구에서 발현이 감소하였다. 단주기 광조건에서 KiSS1이 감소하는 Syrian hamster의 경우 단주기 광조건에서 멜라토닌의 생성 기관인 송과체를 제거하였을 때 KiSS1이 지속적으로 높게 발현되었으며, 8주간 멜라토닌 주사를 실시하여 생식소무게와 KiSS1 발현이 감소하는 것으로 보고되었다(Revel et al., 2007; Simonneaux et al., 2009). 이 연구에서도 멜라토닌 투여에 의해 KiSS1/GPR54의 억제가 확인되었으며, 광주기 조건에 의한 KiSS1/GPR54의 변화는 그에 따른 멜라토닌 분비에 의해 조절 받은 것으로 생각된다.

dCollection @ jeju

위의 결과들을 종합하여 보면, 자바리의 KiSS1/GPR54는 장주기 광조건에서 발현이 증가하였으며, 멜라토닌 투여 실험에서는 멜라토닌 투여구에서 발현이 낮아 KiSS1/GPR54의 발현은 빛과 멜라토닌에 의해 조절 받음을 확인 할 수 있었다. 향후 연구에서는 kisspeptin이 GnRH와 GTH에 미치는 직접적인 영향과 스테로이드 호르몬과의 feedback 관계를 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Collection @ jeju

요 약

KiSS1의 단백질 산물인 kisspeptin은 그의 수용체인 GPR54와 함께 번식내분비에 있어 GnRH와 직접적 관계를 통한 성 성숙과 배란에 관여한다고 알려져있으며, 이와 같은 최근의 연구들로 번식내분비의 중요 조절자로 제시되고 있다.

바리과의 자바리 *E. bruneus*는 자성선숙형 자웅동체로, 5년 이상의 개체에서 수컷으로 성전환이 일어나며 성 성숙이 이루어지기까지 오랜 시간이 걸리는 어류이다. 이와 같은 이유로 안정적 수정란 생산과 암컷의 성 특성 이해에 많은 어려움이 있다. 이 연구는 자바리에 있어 KiSS1/GPR54 system의 발현 기작을 이해하기 위한 기초 연구로서 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54의 cDNA 분리·동정과 KiSS1/GPR54 mRNA의 조직별 발현, 빛과 멜라토닌에 의한 발현 조절을 이해하기 위한 광주기 조절 실험을 실시하였다.

Ⅰ. 자바리 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54 cDNA 분리 및 조직별 발현

자바리의 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54 cDNA의 길이는 각각 516 bp (125 aa), 557 bp (125 aa) 그리고 1230 bp (378 aa)였다. 다른 경골어류들과 아미노산 서열에 대한 상동성은 약 70% (KiSS1), 90% (KiSS2) 그리고 95% (GPR54)를 나타내었다. 계통유연관계 분석에서는 자바리 KiSS1의 경우 european seabass 그리고 KiSS2, GPR54의 경우 근연종인 orange-spotted grouper와 그룹을 형성하였다. 조직별 발현 결과 KiSS1과 GPR54 모두 뇌에서 공통적으로 발현하였으며 시상하부에서 집중적으로 발현하였다. 따라서 자바리에 있어 KiSS1과 KiSS2가 공존하며, KiSS1/GPR54 system의 번식조절자로서의 가능성을 확인하였다.

Ⅱ. 광주기 조절과 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 발현 연구

1. 광주기 조절과 HCG 투여에 따른 KiSS1/GPR54의 발현

Collection @ jeju

광주기 조건을 장주기 조건(LD 16:8, light on at 04:30 h)과 단주기 조건(LD 8:16, lights on at 08:30 h)으로 나누어 HCG를 투여한 결과 KiSS1과 GPR54 모두 장주기 조건과 HCG 투여구에서 높았다. 따라서 자바리의 KiSS1/GPR54 mRNA는 장주기 광조건에 의해 증가하며 GTH에 의한 positive feedback이 존재하는 것으로 생각된다

2. KiSS1의 빛 감수성 실험

자바리를 LD 12:12의 조건에서 7일간 순치하였으며, 7일 후 암조건 시간인 오전 01:00시와 그 후 실험어를 2시간 동안 빛에 노출한 오전 03:00시에 샘플링을 하였다. 그 결과, 빛에 노출한 실험구에서 KiSS1 mRNA의 발현이 유의적으로 높았다. 따라서 KiSS1은 빛에 대한 감수성이 존재하는 것으로 생각된다.

3. 멜라토닌에 의한 KiSS1/GPR54 발현 조절 연구

멜라토닌과 대조구로 vehicle 투여를 2주간 실시한 결과, 7일과 14일 모두 멜라토닌 투여구에서 vehicle 투여구에 비해 KiSS1/GPR54 mRNA의 발현이 낮았다. 따라서 자바리의 KiSS1/GPR54 mRNA의 발현은 멜라토닌에 의해 억제되는 것으로 생각된다.

Collection @ jeju

참고 문헌

Annalie, V. M., Roberts, C. M. and Hawkins, J. P., 2000. The threatened status of grouper (Epinephelinae). Biodivers. Conserv. 9, 919-942.

Arendt, J., 1997. The pineal gland, circadian rhythms and photoperiodism. In Physiology and Pharmacology of biological Rhythms (Redfern, P.H. and Lemmer, B., eds), Springer-Verlag Berl. pp. 375-414.

Axelrod, J., Wurtman, R. J. and Snyder, S. H., 1965. Control of hydroxyindole-methyltransferase activity in the rat by environmental lighting. J. Biol. Chem. 240, 949-954.

Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C., Malli, R., Sharabi, A., Hiden, U., Graier, W. et al., 2004. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. J. Cell Sci. 117, 1,319-1328.

Castellano, J. M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navvaro, V. M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sanchez-Criado, J. E., Pinilla, L., Gaytan, F. and Tena-Sempere, M., 2006. Expression of KiSS-1 in rat Ovary: Putative local regulation of Ovulation?. Endocrinology 147, 4852-4862.

Colledge, W. H., 2004. GPR54 and puberty, Trends Endocrinol. Metab. 15, 448-453.

Colledge, W. H., 2008. GPR54 and kisspeptins. Results Probl. Cell Differ. 46, 117-143.

Colledge, W. H., 2009. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. Trends Endocrinol. Metab. 20, 115-121.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J. C., Matsuda, F., Chaussain, J. L. and Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to

Collection @ jeju

loss of function in the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 10972-10976.

Donaldson, E. M. and Hunter, G. A., 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. Eds., Fish Physiology. Reproduction, Vol. IX B, Academic Press, Orlando, FL, pp. 351-403.

Duncan, D. B. 1955. Multiple-range test and multiple F test. Biometrics, 11 : 1~42.

Ekstrom, P. and Meissl, H., 1997. The pineal organ of teleost fishes. Rev. Fish Biol. Fish. 7, 199-284.

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M. and Gomez. A., 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. Molecular and Cellular Endocrinology 312, 61-71.

Filby, A. L., van Aerle, R., Duitman, J., Tyler, C. R., 2008. The kisspeptin/Gonadotropin-Releasing Hormone Pathway and Molecular Signaling of Puberty in Fish. Biol. Reprod. 78, 278-289.

Funes, S., Hendrick, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F. J. and Gustafson, E. L., 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 312, 1357-1363.

Goodman, R. L., Bittman, E. L., Foster, D. L. and Karsch, F. J., 1982. Alteration in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal variation in estradiol negative feedback in the ewe. Biol. Reprod. 27, 580-589.

Goos, H. J. Th., 1993. Pubertal development: big questions, small answers. (In) F. Facchinetti, I. W. Henderson, R. Pierantoni and A.

Collection @ jeju

M. Polzonetti-Magni (eds.), Cellular communication in reproduction, J. Endocrinology. Bristol, UK, pp. 11-20

Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Seminara, S., Clifton, D. K., and Steiner, R. A., 2004. A role for kisspeptinsin the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology 145, 4073-4077.

Greives, T. J., Mason, A. O., Scotti, M. A. L., Levine, J., Ketterson, E. D., Kriegsfeld, L. J. and Demas, G. E. 2007. Environmental Control of Kisspeptin: Implications for Seasonal Reproduction. Endocrinology 148, 1158-1166.

Herrero, M. J. et al., 2005. Demand-feeding rhythms and feeding entrainment of locomotor activity rhythms in tench, *Tinca tinca*. Physiol. Behav. 84, 595-605.

Hodson, R. and Sullivan, C. V. 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG, Aquacult. Fish. Manage. 24, 389-398.

Hur. S. P., 2008. Masculinization of Juvenile Longtooth Grouper, *Epinephelus bruneus* controlled by Endogenous Hormone. M. S. thesis, Jeju Nat'l Univ., Jeju. Korea, pp. 1-31 (in Korean).

Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., Gottsch, M. L., Clifton, D. K., and Steiner, R. A., 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. Neuroendocrinology 80, 264-272.

Kanda, S., Akazome. Y., Matsunaga, T., Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K-i. and Oka, Y., 2008. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka. Endocrinology 149, 2467-2476.

Collection @ jeju

Karsch, F. J., Dahl, G. E., Evans, N. P., Manning, J. M., Mayfield, K. P., Moenter, S. M. et al., 1993. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. Biol. Repro. 49, 1377-1383.

Kim, I. S., Choi, Y., Lee, C. L., Lee, Y. J., Kim, B. J. and Kim, J. H., 2005. Illustrated book of korean fishes. Kyo-hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea, pp. 615. (in Korean)

Kitahashi, T., Ogawa, S. and Parhar, I. S., 2009. Cloning and expression of Kiss2 in the zebrafish and medaka. Neuroendocrinology 150, 821-831.

Klein, D. C., Weller, J. L. and Moore, R. J., 1971. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin:acetyl coenzyme A *N*-acetyltransferase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 3107-3110.

Kobayashi, M., Amano, M., Kim, M. H., Yoshiura, Y., Sohn, Y. C., Suetake, H. and Aida, K., 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. Fish Physiol. Biochem., 17, 1-8.

Lam, T. J., 1982. Application of endocrinology of fish culture. Can. J. Aquat. Fish. Sci., 39, 11-137.

Lee, D. K., Nguyen, T., O'Neill, G. P. et al., 1999. Discovery of a receptor related to galanin receptors. FEBS Lett. 446, 103-107.

Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E. and Welch, D. R., 1996. KiSS-1, a novel malignant melanoma metastasis-suppressor gene. J. Natl. Cancer Inst. 88, 1731-1737.

Mason, A. O., Greives, T. J., Scotti, M. A. L., Levine, J., Frommeyer, S., Ketterson, E. D., Demas, G. E. and Kriegsfeld, L. J., 2007.

Collection @ jeju

Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitive following exposure to inhibitory day length in female Siberian hamsters. Hormones and Behavior 52, 492-498.

Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. and Ohtaki, T., 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 383-388.

Mayer, I., Bornestaf, C. and Borg, B.,1997. Melatonin in non-mammalian vertebrates: Physiological role in reproduction?. Comp. Biochem. Physiol. 118, 515-531.

Mechaly, A. S., Vinas, J. and Piferrer, F., 2009. Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) Generated by Alternative splicing in a Modern Teleost, the senegalese sole (*Solea senegalensis*). Biol. Reprod. 80, 60-69.

Messager, S., Chatzidaki, E. E., Ma, D., Hendrick, A. G., Zhan, D., Dixon, J., Thresher, R. R., Malinge, I. et al., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein coupled receptor 54. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1761-1766.

Mohamed, J. S., Benninghoff, A. D., Holt, G. J. and Khan, I. A., 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. J. Molecular Endocrinology 38, 235-244.

Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A. et al., 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor. Nature 411, 613-617.

Navarro, V. N., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J. M., Roa. J., Mayen, A., Barreiro, M. L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C. et al., 2004. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide,

Collection @ jeju

the endogenous ligand of GPR54. J. Physiol. 561, 379-386.

Nish, K., 1979. A daily rhythm in the photosensitive development of the in the bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Bul. Fac. Hokkaido Univ., 30, 109-115.

Nocillado, J. N., Levavi-Sivan, B., Carrick, F. and Elizur, A., 2007. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54) gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. General and Comparative Endocrinology 150, 278-287.

Oh, S. R., 2006. Seed production of longtooth grouper, *Epinephelus bruneus* with induced sex reversal and maturation. Ph. D. thesis, Jeju Nat'l Univ., Jeju. Korea, pp. 1-47 (in Korean).

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Tearo, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y. et al., 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encode peptide ligand of a G protein-coupled receptor. Nature 411, 613-617.

Okuzawa, K. and Kobayashi, M. 1999. Gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in the teleostean brain and functional significance. (in) P. D. Prasada Rao and R. E. Peter (eds.), Neural regulation in the vertebrate endocrine system. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 85-100.

Parhar, I. S., Ogawa, S., and Sakuma, Y., 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. Endocrinology 145, 3613-3618.

Pinillos, M. L. et al., 2001. Food intake inhibition by melatonin in goldfish (Carassius auratus). Physiol. Behav. 72, 629-634.

Plant, T. M., Ramaswamy, S. and Dipietro, M. J., 2006. Repetitive

Collection @ jeju

administration of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin -releasing hormone discharges. Endocrinology 147, 1007-1013.

Revel, F. G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Simonneaux, V., Horvath, T. L. and Mikkelsen, J. D., 2006. Kiss-1 is a likely candidate for the photoperiodic control of reproduction. Chronobiol. Int. 23, 277-287.

Revel, F. G., Ansel, L., Klosen, P., Saboureau, M., Pevet, P., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V., 2007. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. Rev. Endocr. Metab. Disord. 8, 57-65.

Ryu. Y. W., 2008. Mature characteristics and induction of puberty in female longtooth grouper, *Epinephelus bruneus.* M. S. thesis, Jeju Nat'l Univ., Jeju. Korea, pp. 1-47 (in Korean).

Seminara, S. B., Messager, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K. M., Hendrick, A. G. et al., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N. Engl. J. Med. 349, 1614-1627.

Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S. B., Crowley, W. F., Ojeda, S. R. and Plant, T. M., 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2129-2134.

Simonneaux, V., Ansel, L., Revel, F. G., Klosen, P., Pevet, P. and Mikkelsen, J. D., 2009. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamster. Peptides 30, 146-153.

Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. and Steiner RA, 2005a. Reglation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. Endocrinology 146, 3686-3692.

Smith, J. T., Dungan, H. M., Stoll, E. A., Gottsch, M. L., Braun, R. E.,

Collection @ jeju

Eacker, S. M., Clifton, D. K. and Steiner, R. A., 2005b. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. Endocrinology 146, 2976-2984.

Tamarkin, L., Hutchison, J. S. and Goldman, B. D., 1976. Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. Endocrinology 99, 1528-1533.

Tena-Sempere, M. and Huhtaniemi, I., 2003. Gonadotropins and Gonadotropin receptors. In Fauser BCJM (ed.) Reproductive Medicine-Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals. Parthenon Publishing, New York, USA, pp. 225-244.

Thompson, E. L., Patterson, M., Murphy, K. G., Smith, K. L., Dhillo, W. S., Todd, J. F., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R., 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. J. Neuroendocrinology 16, 850-858.

Underwood, H., 1989. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. Cellular and Molecular Life Sciences 45, 914-922.

van Aerle, R., Kille, P., Lange, A. and Tyler, C. R., 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathwayin fish. Peptides 29, 57-64.

Voisin, P., Namboodiri, M. A. and Klein, D. C., 1984. Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. J. Biol. Chem. 259, 10913-10918.

Yang, B., Jiang, Q., Chan, T., Ko, W. K .W. and Wong, A. O. L., 2010. Goldfish kisspeptin: Molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. General and Comparative

Collection @ jeju

Endocrinology 165, 60-71.

Zhdanova, I. V. et al., 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. Brain Res. 903, 263-268.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

dCollection @ jeju

감사의 글

남들보다 조금 돌아온 석사 학위과정을 마치며 이렇게 감사의 글을 쓰고 있자니, 이제껏 힘들고 어렵다고 느껴졌던 지난 과정의 일들이 모두 웃으며 추억할 수 있는 감사한 경험으로 가슴에 남는 듯 합니다.

저에게 학문과 생물에 대한 배움의 기회와 여러 고민으로 어려워할 때 묵직한 충고를 아끼지 않으셨던 이영돈 교수님 정말 감사합니다. 논문이 완성되는 동안 충고와 격려의 말로 힘을 주셨던 여인규 교수님, 김기영 교수님에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 언제나 후학 양성에 열정을 다하시는 이기완 교수님, 최광식 교수님, 이경준 교수님, 정준범 교수님에게도 늦게나마 감사의 마음을 전합니다.

저에게 있어 발생생물학 실험실은 두 번째 가족입니다. 매일 아침에 눈을 뜰때부터 잠자리에 들기 전까지, 수년간 동고동락을 하며 살과 땀을 나누는 동안 서로 많이 웃기도 다투기도 했지만 그렇기에 실험실 식구들의 우정과 애정이 더욱 깊었습니다. 제가 실험실에 들어오게된 계기와 저에게 “Jr. 송” 이라는 별명을 갖게 해주신 송영보 박사님..형 항상 미안하고 감사하고 또 감사해요. 이 논문이 나올 수 있도록 갖고계신 모든 것을 베풀어주신 박용주 박사님.. 형 정말정말 너무너무 감사했습니다, 사랑의 채찍과 애증으로 학자로서 마음가짐을 잃지 않게 해주신 임봉수 박사님, 비슷하게 서울로 상경했다 1년 후 같은 날 손잡고 제주도로 내려온 이불에서 부활하는 불사조 이치훈 박사님..형 우린 운명이야, 샤우팅을 사랑하시는 김성훈 박사님, 좋아한 만큼 참 많이 다투었던 상우형.. 형 내 맘 알지? 눈빛으로 내 마음을 꿰뚫어보는 놀래기보살 허간지 성표사마, 열정으로 홋카이도 북벌중인 강한남자 용운이형.. 성표형! 용운형! 형들 항상 그립고 또 너무 자랑스러워..지금처럼만 열심히 해줘요, 우리 실험실의 내 새끼들.. 수산계의 서태지가 될 승현이, 실험실의 얼굴마담 얼짱거지 병훈이, 해병기수 천기수 송기수.. 모두들 형이 격하게 아낀다!! 그리고 우리 실험실의 큰 산이신 선배님들.. 김병호·오성립·나오수·김봉원·김한준·박창범·최정권·고호진·고범호·진영석·강지웅·김삼연 선배님 항상 감사합니다. 제가 해양과환경연구소에서 실험을 할 수 있도록 많

dCollection @ jeju

은 지원과 도움을 주셨던 강태연 선생님, 송경택 선생님, 고성대 선생님, 김선희 선생님, 임지일 선생님, 강성윤 선생님께도 진심으로 감사의 말을 전합니다. 또한 맛있고 영양만점 식사로 지치지 않는 체력을 만들어 주신 윤태석 이모님께도 감사의 마음을 표현합니다. IRIS 못지않은 의지와 끈기로 열심히 일하는 모습으로 감동을 주시는 넙치 RIS 사업단의 박미애 선생님, 오태헌 선생님 그리고 현주에게도 정말 수고하신다는 말과 함께 관심과 격려에 대해 감사를 전합니다.

긴 시간은 아니었지만 저에게 사회생활의 경험과 생물에 대한 열정을 보여주셨던 코엑스아쿠아리움 어류연구팀의 태호형·진선이형·영환이형·종우형·세호형·용삼이·박영균 과장님·장유진 과장님·김경연 과장님과 오태엽 팀장님·한원민 팀장님..그리고 낙성대 추장님 철환이형과 익로·재춘·으뜸·초롱이 항상 생각하고 있습니다. 정말 감사했습니다.

대학원에 진학하며 새로운 인연을 알게되었고 지금은 저에게 누구 못지 않은 큰 격려와 도움을 주시는 현성형·현기·희중·희도와 사랑하는 동기들 봉규·상혁·지웅·경용·기천·진이·선희 그리고 존경하는 하얀 카리스마 정형복 선배님, 멀리서 취중농담의 응원을 해주시는 황인준 실장님, 저희 실험실에 항상 깊은 관심과 애정을 가져주시는 강원도립대학의 김형배 교수님, 부경대학교의 백혜자 교수님에게도 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 못난 아들 항상 믿어주시고 기다려주신 저희 아버지와 어머니, 지영, 형민에게도 처음으로 감사하다는 말을 표현합니다. 바쁘다는 핑계로 집에도 자주 들르지 못했고 많이 소홀했지만 앞으로 원하시고 바라시는 좋은 모습으로 꼭 효도하도록 하겠습니다. 그리고 제가 모시고 챙겨드려야 하는데 항상 먼저 연락주시고 저를 걱정해주시는 한림 어머니에게도 감사의 마음과 막내아들로 꼭 효도하겠다는 말씀 전합니다.

지금 말씀드린 분들과 저를 아는 모든 분들에게 앞으로 더 열심히 살아가는 모습 보여드릴 것이라고 약속드립니다. 감사합니다.

dCollection @ jeju