



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

자성선속어 자바리에서 생식선 호르몬
(GTHs; GTH common- α , FSH β , LH β)
cDNAs의 분리에 관한 연구



제주대학교 대학원

생명과학과

현 경 만

2007년 8월

자성선속어 자바리(*Epinephelus bruneus*)에서
생식선 호르몬 (GTHs; GTH common- α ,
FSH β , LH β) cDNAs의 분리에 관한 연구

현 경 만

지도교수 김 세 재

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2007. 8.

현경만의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 印

위 원 _____ 印

위 원 _____ 印

제주대학교 대학원

2007년 8월

Molecular Cloning of Gonadotropin Hormone
(GTHs; GTH common- α , FSH β , LH β) cDNAs in
Protogynous Longtooth Grouper, *Epinephelus bruneus*

Kyoung-Man Hyun
(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2007. 8.

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Won-Taek Kim of life science

(Name and signature)

Date

DEPARTMENT OF Life Science
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

The protogynous longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*, is an important aquacultural species for its good taste and high price in Korea and the Southeast Asian countries. Large-scale aquaculture of groupers has been hindered by rarity of the natural males, because spontaneous sex inversion to male does not occur until it becomes about 5~7 years old. In teleosts, gonadotropin hormone (GTH) plays important roles in the regulation of gonadal development and maturation. In order to clarify the molecular biological effects of GTHs on the reproduction of longtooth grouper, three gonadotropin cDNAs (GTH α , FSH β , and LH β) from the pituitary gland were isolated using RACE. The cDNAs of GTH α , FSH β , and LH β were 509 bp (117 a.a), 576 bp (120 a.a) and 579 bp (148 a.a) long, respectively. Each subunit showed 65~99% (GTH α), 50~100% (FSH β), and 60~97% (LH β) homology in amino acid sequences comparing to each other among other teleosts. GTH α subunit of *E. bruneus* contains 10 conserved cysteine residues and two N-linked glycosylation sites. FSH β and LH β subunit of *E. bruneus* contains 11 and 12 conserved cysteine residues, respectively, but N-linked glycosylation site was found only in the LH β subunit. Phylogenetic analysis revealed that the longtooth grouper GTH subunits were grouped with orange-spotted grouper and convict grouper. Southern hybridization analysis revealed that the longtooth grouper GTHs are one-copy genes. RT-PCR result showed that the GTH subunit mRNAs were expressed at higher level in immature than mature pituitary, suggesting their role in gonadal maturation.

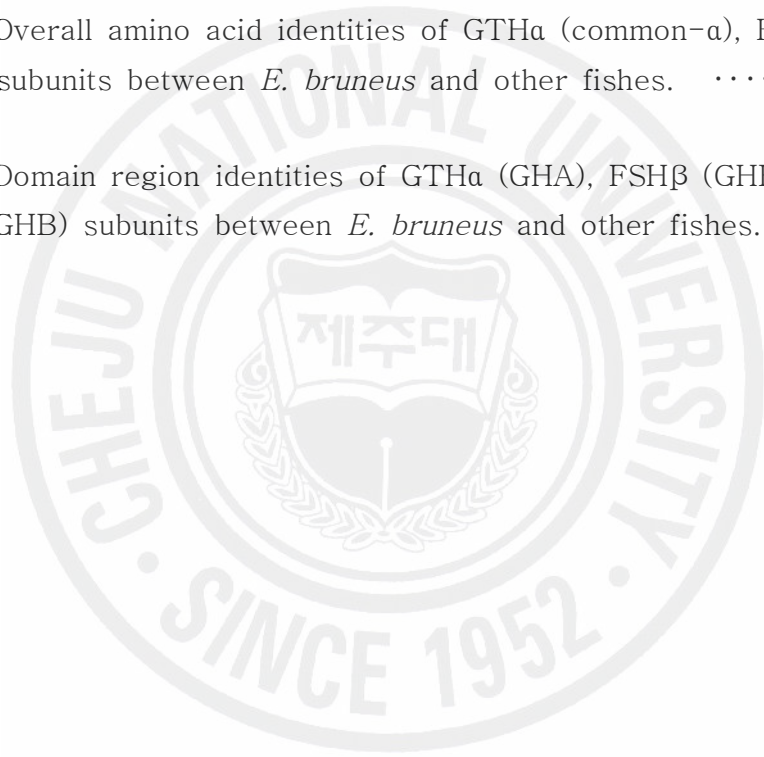
Keyword: Gonadotropin hormone (GTH), Pituitary, N-linked glycosylation, Southern hybridization, Grouper

목 차

A B S T R A C T	i
목 차	iii
LIST OF TABLES	iv
LIST OF FIGURES	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험동물	
2. Genomic DNA 및 Total RNA 분리	
3. H-E 염색	
4. cDNA 합성	
5. GTH α , FSH β , 그리고 LH β cDNAs의 분리	
6. 염기서열 분석	
7. RT-PCR 분석	
8. Southern hybridization	
III. 결 과	12
1. 자바리 GTH cDNAs의 분리 및 염기서열 분석	
2. Homology 비교 및 계통유연관계 분석	
3. 자바리의 성숙 시기에 따른 조직학적 관찰 및 GTHs의 발현양상 분석	
4. 자바리 GTHs의 Southern hybridization 분석	
IV. 고 찰	28
V. 참 고 문 헌	31
VI. 요 약	36

LIST OF TABLES

Table 1. Primer sets used for partial cloning of GTH subunits in <i>E. bruneus</i>	7
Table 2. Primer sets used for isolation of GTH subunits in <i>E. bruneus</i>	8
Table 3. Overall amino acid identities of GTH α (common- α), FSH β and LH β subunits between <i>E. bruneus</i> and other fishes.	21
Table 4. Domain region identities of GTH α (GHA), FSH β (GHB) and LH β (GHB) subunits between <i>E. bruneus</i> and other fishes. ..	22



LIST OF FIGURES

Figure 1. Photographs of <i>Epinephelus bruneus</i>	3
Figure 2. The nucleotide sequence and putative amino acid sequence of GTH α subunit of <i>E. bruneus</i>	14
Figure 3. The nucleotide sequence and putative amino acid sequence of FSH β subunit of <i>E. bruneus</i>	15
Figure 4. The nucleotide sequence and putative amino acid sequence of LH β subunit of <i>E. bruneus</i>	16
Figure 5. Alignment of amino acid sequences of the GTH α (common- α) subunit between <i>E. bruneus</i> and other fishes.	17
Figure 6. Alignment of amino acid sequences of the FSH β subunit between <i>E. bruneus</i> and other fishes.	18
Figure 7. Alignment of amino acid sequences of the LH β subunit between <i>E. bruneus</i> and other fishes.	19
Figure 8. Phylogenetic relationships of GTH subunits between <i>E. bruneus</i> and other species.	23
Figure 9. Histological observatin of ovary and expression of GTH subunits of <i>E. bruneus</i>	25
Figure 10. Southern hybridization to GTH subunits of <i>E. bruneus</i> genomc DNA.	27

I. 서 론

어류에서 사춘기 (puberty)는 처음으로 산란을 할 수 있는 능력을 가지는 시기를 의미하며, 사춘기 이후 산란 과정은 내분비계인 뇌-뇌하수체-생식소 (BPG) 축에 의해 조절된다 (Okuzawa *et al.*, 2002). 뇌의 시상하부에서 생성되는 생식선 자극 호르몬 (gonadotropin-releasing hormone; GnRH)은 10개의 아미노산으로 구성된 뉴로펩티드 (neuropeptide)로서 뇌하수체로부터 생식선 호르몬 (gonadotropin hormone; GTH)의 합성과 방출을 조절하는 일차적 요인이다 (Kumakura *et al.*, 2004). 생식선 자극 호르몬 (GnRH)의 자극으로 합성되는 생식선 호르몬에는 황체 형성 호르몬 (luteinizing hormone; LH)과 여포자극 호르몬 (follicle-stimulating hormone; FSH)이 있으며, 이들은 레이딕 세포와 세르톨리 세포에 작용하여 배우자 형성과 생식소 스테로이드 합성을 조절하는 당단백질 호르몬이다 (Schulz *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005).

포유류의 당단백질 호르몬은 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 갑상선 자극 호르몬 (thyroid-stimulating hormone; TSH)과 융모성 생식선 자극 호르몬 (chorionic gonadotropin; CG) 등 4 종류가 있으며, 경골어류의 경우에는 FSH (또는 GTH-I)와 LH (또는 GTH-II) 2종류가 존재하는 것으로 알려져 있다 (Liu *et al.*, 2001). FSH와 LH는 공통으로 존재하는 알파-소단위체 (α -소단위체)와 각각의 기능을 나타내는 베타-소단위체 (β -소단위체)가 비공유 결합으로 구성된 이합체 (heterodimer) 구조를 이루고 있다 (Pierce and Parsons, 1981; Sekine *et al.*, 1989; Bernard *et al.*, 2000; Gen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2002; So *et al.*, 2005). 약 100여개의 아미노산으로 구성되어 있는 소단위체들은 O-linked 또는 N-linked 올리고당 사슬과 이황화 교차결합을 이루는 시스테인 잔기들이 보존되어 있는 특징을 가지고 있다 (Mateos *et al.*, 2003). 척추동물에서 당단백질 호르몬의 보존적인 N-linked 올리고당 사슬 부위는 호르몬의 순환과 생리활성에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되어 있다 (Weltzien *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). 경골어류에서 GTH 소단위체 분리에 관한 연구는 연어류에서 처음 보고된 이래, 유럽산 뱀장어 (European eel),

줄무늬 농어 (Striped seabass), 유럽산 농어 (European seabass), 참돔 (Red seabream) 등에서 보고된 바 있다 (Li *et al.*, 2005).

농어목의 바리과에 속하는 연안성 해수어인 자바리 (*Epinephelus bruneus*)는 자성선숙어로 긴 이와 불규칙한 줄무늬를 갖는 것이 특징이며 (Fig. 1), 제주도에서는 “다금바리”라고 불린다 (Song *et al.*, 2005). 자바리를 포함한 능성어류는 한국을 비롯한 동남아시아의 양식 산업에서 매우 높은 고부가가치를 지니는 대표적 어종이다. 그러나 이들의 대량 양식은 높은 기형 발생율과 옹성의 희소성, 그리고 스테로이드 호르몬에 의한 산란 시기 조절이 쉽지 않은 점 등으로 제한을 받고 있다 (Zhang *et al.*, 2007). 능성어류에 대한 광범위한 양식학적 연구에도 불구하고 이들의 생식 조절과 관련된 분자생물학적 연구는 매우 미비한 실정이다. 본 연구에서는 능성어류의 생식 조절에 대한 분자생물학적 기작을 이해하기 위한 기초연구의 일환으로서 생식선 호르몬 소단위체의 cDNA들을 분리하여 그 발현양상을 분석하였다.



Figure 1. Photographs of *Epinephelus bruneus*. Longtooth grouper has irregular stripes on body and long tooth.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

생식선 호르몬 GTH α 소단위체 (common- α), FSH β 소단위체와 LH β 소단위체를 분리하기 위하여 수조에서 사육중인 성숙 및 미성숙 상태의 자성 자바리 (*Epinephelus bruneus*)들을 채집하였고, 얼음에서 마취 후 뇌하수체, 간, 그리고 생식소를 적출 하였다. 적출된 조직으로부터 DNA 및 RNA 추출에 사용할 조직들은 -80°C 에 보관하였고, 조직학적 분석에 사용할 조직은 Bouin's 용액에 보관하였다.

2. Genomic DNA와 Total RNA 분리

Genomic DNA는 성숙한 자바리로부터 적출된 간 조직으로부터 Genomic DNA Purification Kit(Promega, WI, USA)를 이용하여 분리 하였다. 적출된 간 조직 20mg에 Nuclei Lysis Solution $600\mu\text{l}$ 를 첨가하여 균질화한 후, 65°C 에서 25분간 반응시켰다. Lysis된 간 조직에 $3\mu\text{l}$ 의 RNase Solution을 첨가한 후, 37°C 에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거 하였고, $200\mu\text{l}$ 의 Protein Precipitation 용액을 첨가한 후 원심분리 시켰다. 상등액에 동량의 이소프로판올을 첨가한 후, 15,000rpm에서 1분간 원심 분리 시켜 DNA를 침전시키고 70% 에탄올로 세척한 후, 실온에서 건조하여 DNA Rehydration 용액 $100\mu\text{l}$ 에 녹였다. 분리된 DNA는 분광광도계를 이용하여 260nm 파장에서 정량 하였다.

Total RNA는 성숙한 자바리로부터 적출된 뇌와 뇌하수체 조직에 RNA-Bee (TEL-TEST, Friendswood, TX, USA) 또는 TRI REAGENT (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 4°C , 12,000g에서 15분간 원심분리 시켰다. 상등액에 동량의 이소프로판올을 첨가한 후, 12,000g에서 원심분리 시켜 RNA를 침전시켰다. 상등액을 버리고, DEPC가 처리된 80%의 에탄올을 첨가하여 세척한 뒤, 실온에서 5분간 건조한 후

RNase-free 증류수에 재현탁하여 사용하였다. 분리된 RNA는 분광광도계를 이용하여 정량하였고, A260/A280nm의 비율이 1.7~2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다.

3. H-E 염색

성숙 및 미성숙 정도를 확인하기 위하여 분리된 난소를 조직학적 관찰에 사용하였다. 분리된 조직들은 Bouin's 용액에서 2일간 고정한 후, 70% 에탄올에서 1일, 80% 에탄올에서 1시간, 95% 에탄올에서 1시간, 100% 에탄올에서 1시간씩 단계적으로 탈수하여 파라핀으로 포매 하였다. 포매된 각 조직들을 5~8 μ m 절편으로 절단하고 헤마토실린과 에오신으로 염색하여 광학현미경하에서 검경하였다.

4. cDNA 합성

cDNA는 자바리의 뇌하수체에서 분리된 total RNA 1 μ g를 주형으로 ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 합성하였다. Total RNA 1 μ g에 Oligo (dT) primer 1 μ g을 혼합하고 총 부피가 5 μ l가 되도록 증류수를 첨가하였다. 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 4 μ l의 5x Reaction buffer, 2 μ l의 25mM MgCl₂, 1 μ l의 10mM dNTP Mix, 20 unit의 Ribonuclease inhibitor와 1 unit의 Reverse transcriptase를 첨가하고, 총 부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 첨가한 다음, 25 $^{\circ}$ C에서 5분, 그리고 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응하여 cDNA를 합성한 후, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열하여 cDNA의 합성을 중단시켰다. 합성이 끝난 각 cDNA에 30 μ l의 Nuclease-free 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μ l되게 희석하였다.

5. GTH α , FSH β 그리고 LH β cDNA의 분리

GTH α , FSH β 그리고 LH β 의 cDNA를 분리하기 위해 갈색등근바리 (*Epinephelus coioides*, accession number. AY186243)에서 보고된 염기서열을

참고로 degenerate primer를 제작하여 (Table 1) 각 유전자 단편을 증폭하였다. 증폭산물은 1% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 확인 후 정제하였고, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 JM109 competent cell에 형질전환 시킨 후, 양성 콜로니로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 염기서열을 결정하였다. 각 유전자의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST 검색을 이용하여 분석하였다 (Altschul *et al.*, 1990). 자바리 GTHa cDNA는 DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit (Seegene, seoul, S. Korea)을 이용하여 분리 하였다. 표적 특이적인 프라이머 세트는 분리된 부분 서열을 참고로 제작되었다 (Table 2). FSHβ와 LHβ cDNA는 분리된 부분 서열을 참고로 제작된 유전자 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 (Table 2) SMART RACE cDNA amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 분리 하였다. 각 방법으로 증폭된 cDNA는 1% 아가로즈 겔에서 전기영동한 후 정제하였고, 정제된 cDNA는 RBC yT&A cloning vector (Real Biotech Corp, taiwan)에 삽입하여 클로닝 한 후 염기서열을 결정하였다.

Table 1. Primer sets used for partial cloning of GTH subunits in *E. bruneus*.

Name	Primer sequence*	Note
GTH α P1 (GTH α TSP1)	5'-CCAGAGCRTACCCAACACCT-3'	forward primer for GTH α cDNA fragment
	5'-CTCCAGTYCCCATCTGTCAT-3'	reverse primer for GTH α cDNA fragment
GTH α P2	5'-GGTAACTGCTGCAACCACGA-3'	forward primer for GTH α cDNA fragment
	5'-GGTGATGTTCTTRGGGATCG-3'	reverse primer for GTH α cDNA fragment
GTH α P3	5'-TGYATGGGCTGCTGCTTCT-3'	forward primer for GTH α cDNA fragment
	5'-GTCCTCCGTTTCTCGTCTT-3'	reverse primer for GTH α cDNA fragment
FSH β P1 (FSH β GSP1)	5'-TCGCCCCAAAGAACATCAGC-3'	forward primer for FSH β cDNA fragment
	5'-CAGACAAGGTCCCGCAGTC-3'	reverse primer for FSH β cDNA fragment
FSH β P2	5'-YRACCARCATCAGCATCC-3'	forward primer for FSH β cDNA fragment
	5'-CCGCAGTMYGTGTTYCTG-3'	reverse primer for FSH β cDNA fragment
FSH β P3	5'-GTTGTCATGGYAGCAGTG-3'	forward primer for FSH β cDNA fragment
	5'-TCTGTTCAGCCCAGTCATMA-3'	reverse primer for FSH β cDNA fragment
LH β P1	5'-TYGAGAAYGAGGGCTGTCC-3'	forward primer for LH β cDNA fragment
	5'-TCATGCAGAAGTYSGGYTG-3'	reverse primer for LH β cDNA fragment
β -actin	5'-CACCACAGCCGAGAGGGAAA-3'	forward primer for β -actin cDNA fragment
	5'-CATTTGCGGTGGACGATGGA-3'	reverse primer for β -actin cDNA fragment

* Degenerate Y; C, T., M; A, C., R; A, G., S; C, G.

Table 2. Primer sets used for isolation of GTH subunits in *E. bruneus*.

Name	Primer sequence	Note
GTH α TSP2	5'-ACCAAACATCGGCTGCGAGGA-3'	target specific primer for GTH α cDNA 5'
	5'-GCACTCCTCGCAGCCGATGTTT-3'	target specific primer for GTH α cDNA 3'
GTH α TSP3	5'-TGTATGGGCTGCTGCTTCTCCAG-3'	target specific primer for GTH α cDNA 5'
	5'-AGCCCATCGTGGTTGCAGCAGT-3'	target specific primer for GTH α cDNA 3'
FSH β GSP1	5'-CAGCATCAGCATCCCTGTGGAGA-3'	gene specific primer for FSH β cDNA 5'
	5'-CGCCCACTGGACATCCTTGAA-3'	gene specific primer for FSH β cDNA 3'
FSH β GSP2	5'-CCCTGATGACTGGGCTGAACAGA-3'	gene specific primer for FSH β cDNA 5'
	5'-CTCTCCACAGGGATGCTGATGCT-3'	gene specific primer for FSH β cDNA 3'
LH β GSP1	5'-GTCCTGCATCACCAAGGAC-3'	gene specific primer for LH β cDNA 5'
	5'-GCTCAAAGCCACAGGTTAG-3'	gene specific primer for LH β cDNA 3'
LH β GSP2	5'-AGCAATGTGTACGAGCATGTGT-3'	gene specific primer for LH β cDNA 5'
	5'-GTCCACGCCAGGAGGACAGT-3'	gene specific primer for LH β cDNA 3'
LH β GSP3	5'-CACCTACCCTGTGGCTTTGAG-3'	gene specific primer for LH β cDNA 5'
	5'-CATGCTCGTACACATTGCTGA-3'	gene specific primer for LH β cDNA 3'

6. 염기서열 분석

분리된 각 cDNA들의 염기서열은 분리된 플라스미드로부터 염기서열 분석을 의뢰하여 결정하였다. 결정된 염기서열을 기초로 아미노산 서열을 예측하였고 (BCM Sequence launcher; <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>), 중간 GTH 소단위체들의 유전자 염기서열 배열분석은 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)를 사용하였다. GTH 소단위체들의 계통유연관계 분석은 PHYIP 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각 분석에 이용된 경골어류 GTH 소단위체 아미노산 서열의 Multiple alignment는 ClustalW 프로그램 (gap opening penalty: 10, gap extension penalty: 0.05, gap distance: 8)을 이용하여 분석하였고, Bootstrap 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1000set은 PRODIST 프로그램의 JTT 방법을 이용하여 distance matrices을 계산하였다. 계산된 distance matrices는 NEIGHBOR 프로그램의 Tree 작성에 input 데이터로 이용되었고, CONSENSE 프로그램을 이용하여 각 GTH 소단위체들의 consense tree를 작성하였다. Out group은 사람의 TSH 알파 소단위체를 이용하였다. 각 유전자의 multiple sequence alignment에 이용된 종과 유전자는 다음과 같다. (1) GTH α 소단위체; 자바리 (lgGTH α ; accession number, EF583918), 갈색등근바리 (ogGTH α ; accession number, AAN18038), 붉바리 (hkGTH α ; accession number, AAO43056), 능성어 (cgGTH α ; accession number, BAC78811), 유럽산 농어 (euGTH α ; accession number, AAK49431), 참돔 (rbGTH α ; accession number, BAB18562), 줄무늬 농어 (stGTH α ; accession number, AAB66489), 민물장어 (slGTH α ; accession number, AAN77069), 은줄멸 (accession number, AAN77068), 나일틸라피아 (ntGTH α ; accession number, AAP49577), 송사리류 (kfGTH α ; accession number, AAB60605), 지브라피쉬 (zfGTH α ; accession number, AAR84285), 사람 (hnGTH α ; accession number, NP_000726). (2) FSH β 소단위체; 자바리 (lgFSH β ; accession number, EF583919), 갈색등근바리 (ogFSH; accession number, AAT79786), 능성어 (cgFSH; accession number, BAC78812), 유럽산 농어 (euFSH; accession number, AAN40506), 줄무늬 농어 (stFSH;

accession number, AAC38035), 삼점 구라미 (giFSH; accession number, AAD51934), 가물치 (shFSH; accession number, AAS01610), 참돔 (rbFSH; accession number, BAB18563), 볼락 (rfFSH; accession number, AAU14141), 넙치 (bhFSH; accession number, AAK58601), 은줄멸 (pyFSH; accession number, AAP85606), 큰 가자미 (ahFSH; accession number, CAD10501), 나일틸라피아 (ntFSH; accession number, AAP49575), 송사리류 (kfFSH; accession number, AAB59962), 사람 (hnFSH; accession number, NP_000501). (3) LH β 소단위체; 자바리 (lgLH β ; accession number, EF583920), 갈색둥근바리(ogLH; accession number, AF507939), 능성어 (cgLH; accession number, AB111458), 줄무늬 농어 (stLH; accession number, I50994), 유럽산 농어 (euLH; accession number, AF543315), 참돔 (rbLH; accession number, AB028213), 볼락 (rfLH; accession number, AY609080), 나일틸라피아 (ntLH; accession number, AY294016), 삼점구라미 (giLH; accession number, Q9PW98), 가물치 (shLH; accession number, AAS01609), 은줄멸 (pyLH; accession number, AAP85607), 새눈치 (ybLH; accession number, Q90225), 큰가시고기 (skLH; accession number, CAD59185), 넙치 (bhLH; accession number, BAB47388), 지브라피쉬 (zfLH; accession number, AAV31153), 사람 (hnLH; accession number, NP_000885). (4) Out group; 사람 (hnTSH; accession number, AAB30827).

7. RT-PCR

자바리 GTHs (GTH α , FSH β , 그리고 LH β) 유전자에 대하여 미성숙 시기의 뇌하수체 조직과 성숙 시기의 뇌하수체 조직에서 mRNA 발현양상을 비교 분석하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 프라이머는 분리된 자바리 염기서열을 기초로 하여 각각 제작하였다 (Table 2). RT-PCR 분석을 위한 대조군으로 자바리의 β -actin 프라이머를 사용하였다 (Table 1). PCR 반응은 1 μ l의 cDNA를 주형으로 하여 0.5 Unit의 *Taq* (BIONEER, daejeon, S. Korea), 2.5mM의 dNTPmix 등을 혼합하여 95 $^{\circ}$ C에서 45초, 55 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서

90초 씩 30cycle동안 증폭시켰다.

8. Southern hybridization

자바리의 간 조직으로부터 genomic DNA를 분리하였고, 분리된 genomic DNA (30 μ g)를 여러 제한효소로 처리하여 0.7% agarose gel에 1Volt/cm로 10시간 동안 전개하였다. 전개된 DNA 단편들을 Vacuum transfer 법을 사용하여 50mbar에서 3시간 동안 nylon membrane에 blotting 하였고, 150mJoule의 UV를 조사하여 cross-link 시켰다. 탐침 제작은 자바리 간 조직의 genomic DNA를 주형으로 하여, 각 유전자에 특이적인 프라이머를 통해 증폭시킨 후, 에탄올 침전법으로 정제하였고, HexaLabel™ DNA Labeling Kit (MBI, Hanover, MD, USA)로 표지하여 사용하였다. 100ng의 주형 DNA, 10 μ l의 헥사뉴클레오티드에 증류수로 최종부피 20 μ l로 맞추어 끓는 물에 5분간 변성시킨 후, 4 μ l의 10mM dNTP (minus dCTP), [α -³²P]-dCTP(50uCi), 2 unit의 Klenow fragment exo^- 를 더하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후, 4 μ l의 10mM dNTPmix를 넣고 5분간 처리하여 추가로 반응시켜 제작 하였다. Blotting이 끝난 membrane을 30분간 10ml의 Expresshyb (Clontech, Palo Alto, CA, USA) 용액으로 pre-hybridization 시킨 후, 1.5mg의 salmon sperm DNA와 함께 제작된 탐침을 처리하여 60 $^{\circ}$ C에서 10시간 동안 혼성화 시켰다. 혼성화된 membrane을 2 \times SSC/0.05% SDS로 상온에서 1시간, 0.1 \times SSC/0.1% SDS로 50 $^{\circ}$ C에서 1시간 세척 하였고, -80 $^{\circ}$ C에서 3일간 X-ray 필름에 감광시킨 후 현상하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 자바리 GTH cDNAs의 분리 및 염기서열 분석

자바리 뇌하수체의 cDNA를 주형으로 세 종류의 생식선 호르몬 소단위체 cDNA를 분리하여 뉴클레오티드 염기서열을 분석하였다. GTH α (common- α), FSH β 그리고 LH β 소단위체 각각의 cDNA 길이는 509 bp, 576 bp 그리고 579 bp였다. GTH α 소단위체의 ORF 길이는 351 bp (117 a.a)이었으며, 5' UTR과 3' UTR의 길이는 각각 136 bp와 19 bp였다. 또한, GTH α 소단위체 cDNA에는 당단백질 호르몬 알파 사슬 (glycoprotein hormone alpha chain; GHA) 도메인 영역 (33~117a.a)이 포함되어 있었다 (Fig. 2). FSH β 소단위체의 ORF 길이는 360 bp (120 a.a)이었으며, 5' UTR과 3' UTR의 길이는 각각 109 bp와 107 bp였다. FSH β 소단위체 cDNA에는 당단백질 호르몬 베타 사슬 (glycoprotein hormone beta chain; GHB) 도메인 영역 (23~117 a.a)이 포함되어 있었다 (Fig. 3). LH β 소단위체의 ORF 길이는 444 bp (148 a.a)이었으며, 5' UTR과 3' UTR의 길이는 각각 18 bp와 114 bp였다. LH β 소단위체 cDNA에는 당단백질 호르몬 베타 사슬 (glycoprotein hormone beta chain; GHB) 도메인 영역 (39~140 a.a)이 포함되어 있었다 (Fig. 4). 자바리의 GTH α , FSH β 그리고 LH β 소단위체 cDNA를 다른 종에서 보고된 GTH 소단위체들의 아미노산 서열과 각각 비교 분석한 결과, 근연종인 갈색등근바리 (*E. coioides*)와 능성어 (*E. septemfasciatus*)의 GTH 소단위체들과 가장 유사하였다 (Table 3). 자바리 GTH α 소단위체의 아미노산 서열에는 두 개의 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 존재하였고, 10 개의 시스테인 잔기를 가지고 있음을 확인하였다 (Fig. 2, Fig. 5). 자바리 FSH β 소단위체의 아미노산 서열에는 보고된 근연종인 능성어류에서와 같이 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 존재하지 않았으며, 11 개의 시스테인 잔기 중 7개의 잔기가 knot motif임을 확인하였다. 자바리 LH β 소단위체의 아미노산 서열에는 한 개의 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 존재하였고, 12 개의 시스테인 잔기 중 5개의 잔기가 knot motif임을 확인 하였다. 또한, FSH β

소단위체와 LH β 소단위체에는 수용체 결합 부위가 포함되어 있음을 확인하였다 (Fig. 6).



TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTAAACTACATGACGGGACGGACGTCC	60
TCAATAAAAAGCTGTCCTGCACAGAGGCACAATGAAGAGTCAACTCTCTCTCAACATGGT	120
AACTGCTGCAACCACGATGGGCTCAGTGAGATCAGCTGGACTGAATCTTCTCCTGTTGTC	180
M G S V R S A G L N L L L L S	15
TTTTCTATTTTACATAGCTGATTCTTACCCCAACATTGACTTACCAAACATCGGCTGCGA	240
F L F Y I A D S Y P N I D L P N I G C E	35
GGAGTGCACACTGAGGAAGAACAGTGTTTTCTCAAGGGATCGTCCGGTCTACCAGTGTAT	300
E C T L R K N S V F S R D R P V Y Q C M	55
GGGCTGCTGCTTCTCCAGAGCATATCCAACGCCTCTCAAGGCCATGAAGACAATGACGAT	360
G C C F S R A Y P T P L K A M K T M T I	75
CCCGAAGAACATCACCTCGGAGGCCACATGTTGTGTCGAAAACACAGCTATGAGACAGA	420
P K N I T S E A T C C V A K H S Y E T E	95
GGTGGCCGGCATAAGGGTGAGAAACCACACAGACTGCCACTGCAGCACCTGCTATTTCCA	480
V A G I R V R N H T D C H C S T C Y F H	115
CAAGATA TGAAGACGAGAAACCGGAGGAC	509
K I *	117

Figure 2. The nucleotide sequence and putative amino acid sequence of **GTH α** subunit of *E. bruneus*. The GTH α cDNA of *E. bruneus* was isolated by DNA Walking SpeedUp kit. It was 509 base pairs long, contains 351 base pairs of ORF region encoding 117 amino acids, 136 base pairs of 5' UTR and 19 base pairs of 3' UTR regions. Black box represents GHA (glycoprotein hormone alpha chain) domain region, white boxes in the black box represent cystein residues. This sequence was registered in the GenBank nucleotide database, under Accession No. EF583918.

```

GACAGCTGCTACAGATGTTACAGAGCAACAGAAGAAACAAGACGTGCAACTGAGGGTCC 60
AAGCAACAACGGAGCTCTACAGTATCTGACGTGAGACCTGCAGACGATGCAGCTGGTTGT 120
                                     M Q L V V 5
CATGGCAGCAGTGCTGGCACTGGCGGGGGCGGGGCCGGGCTGCCACTCCGACTGTCATCT 180
M A A V L A L A G A G P G C H S D C H L 25
GACCAGCATCAGCATCCCTGTGGAGAGCTGCGGCCGCACCGAGTACATCTACACCACCAT 240
T S I S I P V E S C G R T E Y I Y T T I 45
ATGTGAAGGACAGTGTACCACAAGGATCCGGTCTACATCGGCCCTGATGACTGGGCTGA 300
C E G Q C Y H K D P V Y I G P D D W A E 65
ACAGAAAGTCTGCAACGGGGACTGGACCTATGAGGTGAAACACTTCCAAGGATGTCCAGT 360
Q K V C N G D W T Y E V K H F Q G C P V 85
GGGCGTCACCTACCCTGTGGCCAGAAACTGCAAGTGACGGCGTGTAACGCAGGAAACAC 420
G V T Y P V A R N C K C T A C N A G N T 105
GTACTGCGGGCGCTTTCTGGAGACATATCCAGCTGTCTGTCCTTTTAAAGAAACCTGTC 480
Y C G R F P G D I S S C L S F * 120
CGTCCTACATTGACTTATTGTCTTTGTGTCACATGACTTAATATTAAATAAACAGGTAT 540
CACTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 576

```

Figure 3. The nucleotide sequence and putative amino acid sequence of FSH β subunit of *E. bruneus*. The FSH β cDNA of *E. bruneus* was isolated by RACE. It was 576 base pairs long, contains 360 base pairs of ORF region encoding 120 amino acids, 109 base pairs of 5' UTR and 107 base pairs of 3' UTR regions. Black box represents GHB (glycoprotein hormone beta chain) domain region, white boxes in the black box represent cystein residues. A putative polyadenylation signal (AATAAA) is designated as bold. This sequence was registered in the GenBank nucleotide database, under Accession No. EF583919.

```

CCTGCAGACACTAGAGAGATGATGGCTGTACAGGTCGGCAGAGTGATGTTTCCTTTGATG 60
                M M A V Q V G R V M F P L M 14
TTGAGTTTGTCTTCTGGGAGCCTCATCTTCCATTTGGTCTCTGGCTCCTGCAGCGGCCTTC 120
L S L F L G A S S S I W S L A P A A A F 34
CAGCTGCCCCCTGCCAGCTCATCAACCAGACAGTGTCTCTAGAGAAGGAAGGCTGTCCA 180
Q L P P C Q L I N Q T V S L E K E G C P 54
AAGTGTCACCAGTGGAAACAACCATCTGCAGCGTCACTGCATCACCAAGGACCCTGTG 240
K C H P V E T T I C S G H C I T K D P V 74
ATCAAGATACCATTAGCAATGTGTACGAGCATGTGTGCACATACCGGGACTTTTACCAC 300
I K I P F S N V Y E H V C T Y R D F Y H 94
AAGACATTTGAGCTTCTGACTGTCTCCCGGCGTGGACCCGACTGTCACCTACCCTGTG 360
K T F E L P D C P P G V D P T V T Y P V 114
GCTTTGAGCTGCCACTGCCGGCGTGTGCCATGGACACATCTGACTGCACCTTCGAGAGC 420
A L S C H C G R C A M D T S D C T F E S 134
CTGCAGCCCAACTTCTGCATGAATGACATACCTTTCTACTACTAGTCTCAAGCAATAGCA 480
L Q P N F C M N D I P F Y Y * 148
GCATTCAACACATTAAATAAACTGGATTTACATTACGCATCAACTGTTGTAAATAAAGATT 540
GTTACATTTACCAGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 579

```

Figure 4. The nucleotide sequence and putative amino acid sequence of LH β subunit of *E. bruneus*. The LH β cDNA of *E. bruneus* was isolated by RACE. It was 579 base pairs long, contains 444 base pairs of ORF region encoding 148 amino acids, 18 base pairs of 5' UTR and 114 base pairs of 3' UTR regions. Black box represents GHB (glycoprotein hormone beta chain) domain region, white boxes in the black box represent cysteine residues. A putative polyadenylation signal (AATAAA) is designated as bold. This sequence was registered in the GenBank nucleotide database, under Accession No. EF583920.

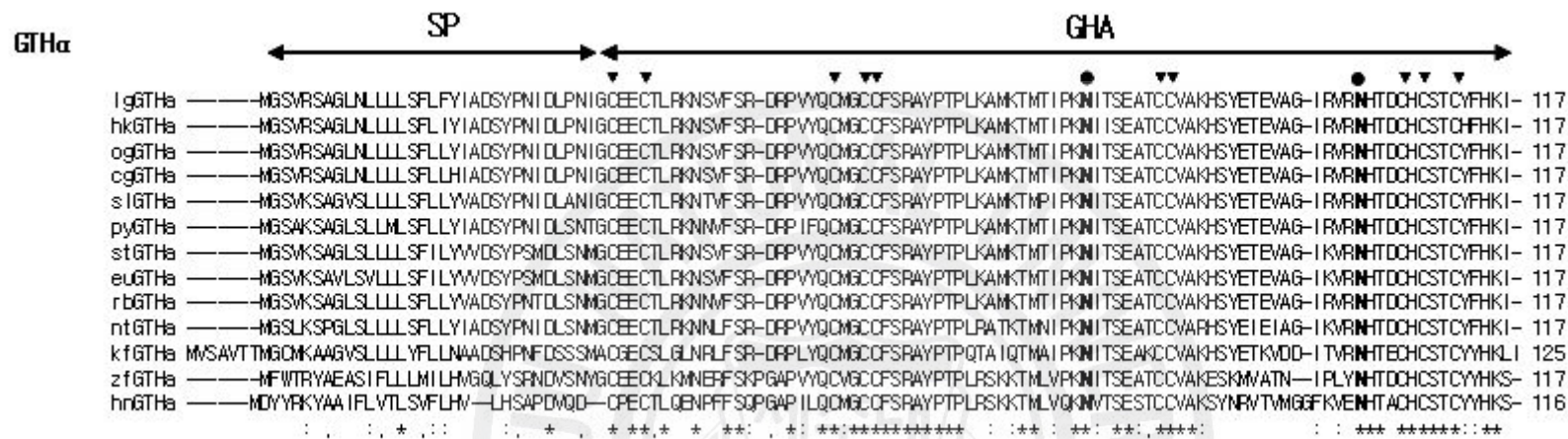


Figure 5. Alignment of amino acid sequences of the GTH α (Common- α) subunit between *E. bruneus* and other fishes. The sites of cysteine knot motif are indicated by black inverted triangles. The putative N-linked glycosylation sites are bold and black circles. The sequence corresponding to putative structural regions are indicated by numbers and overlines with arrowheads (SP is the signal peptide region, GHA is the glycoprotein hormone alpha chain domain region). Amino acid sequences used to alignment analysis were obtained from Entrez (NCBI) : lgGTH α (longtooth grouper, EF583918), hkGTH α (hong kong grouper, AAO43056), ogGTH α (orange spotted grouper, AAN18038), cgGTH α (convict grouper, BAC78811), slGTH α (swamp eel, AAN77069), pyGTH α (pejerry, AAN77068), stGTH α (striped sea bass, AAB66489), euGTH α (european sea bass, AAK49431), rbGTH α (red seabream, BAB18562), ntGTH α (nile tilapia, AAP49577), kfGTH α (killifish, AAB60605), zfGTH α (zebrafish, AAR84285), hnGTH α (human, NP_00076).

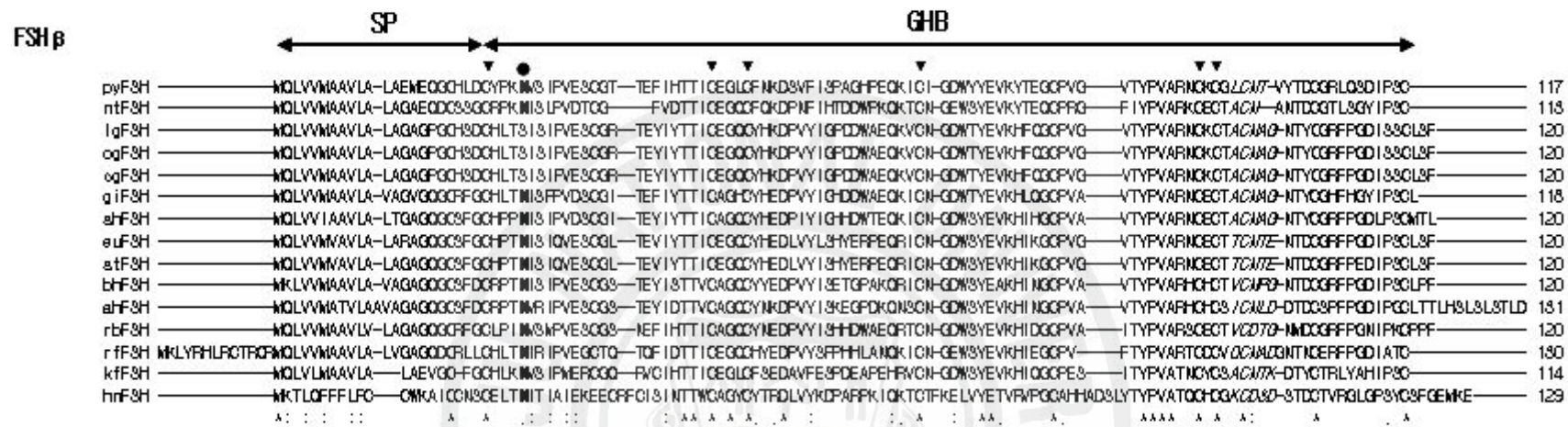


Figure 6. Alignment of amino acid sequences of the FSH β subunit between *E. bruneus* and other fishes. The sites of cysteine knot motif are indicated by black inverted triangles. The putative *N*-linked glycosylation sites are bold and black circle. The receptor binding site are bold and italic type. The sequence corresponding to putative structural regions are indicated by numbers and overlines with arrowheads (SP is the signal peptide region, GHB is the glycoprotein hormone beta chain region). Amino acid sequences used to alignment analysis were obtained from Entrez (NCBI) : lgFSH β (longtooth grouper, EF583919), ogFSH β (orange-spotted grouper, AAT79786), cgFSH β (convict grouper, BAC78812), euFSH β (european sea bass, AAN40506), stFSH β (striped sea-bass, AAC38035), giFSH β (three spot gourami, AAD51934), shFSH β (snakehead, AAS01610), rbFSH β (red seabream, BAB18563), rfFSH β (rockfish, AAU14141), bhFSH β (bastard halibut, AAK58601), pyFSH β (pejerrey, AAP85606), ahFSH β (atlantic halibut, CAD10501), ntFSH β (nile tilapia, AAP49575), kfFSH β (killifish, AAB59962), hfFSH β (human, NP_000501).

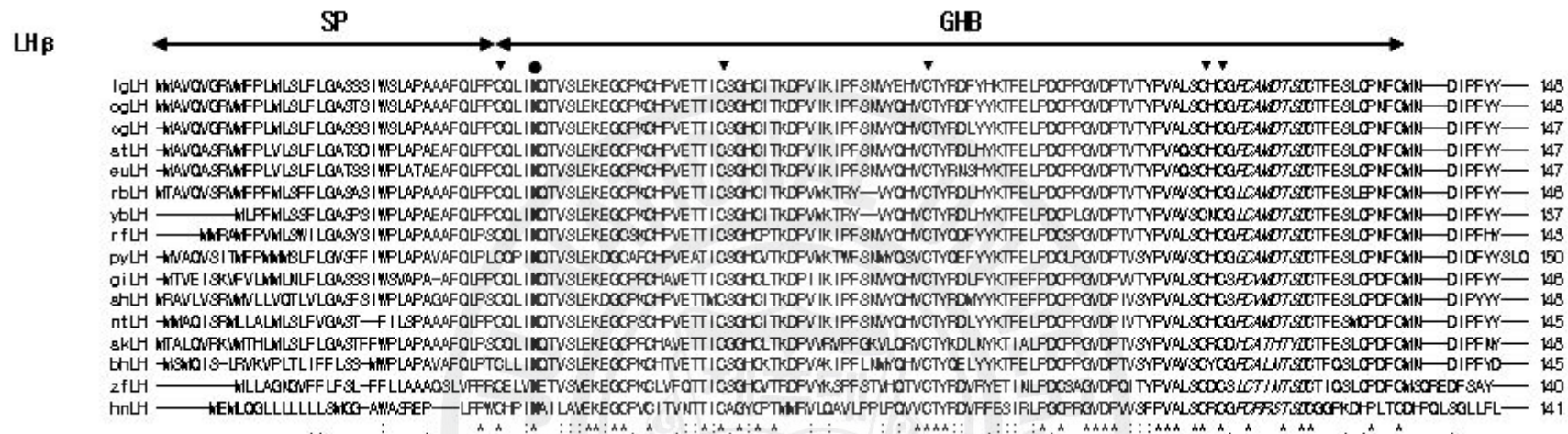


Figure 7. Alignment of amino acid sequences of the LHβ subunit between *E. bruneus* and other fishes. The sites of cysteine knot motif are indicated by black inverted triangles. The putative N-linked glycosylation sites are bold and black circle. The receptor binding site are bold and italic type. The sequence corresponding to putative structural regions are indicated by numbers and overlines with arrowheads (SP is the signal peptide region, GHB is the glycoprotein hormone beta chain domain region). Amino acid sequences used to alignment analysis were obtained from Entrez (NCBI) : lgLHβ (longtooth grouper, EF583920), ogLHβ (orange spotted grouper, AF507939), cgLHβ (convict grouper, AB111458), stLHβ (striped sea bass, I50994), euLHβ (european sea bass, AF543315), rbLHβ (red seabream, AB028213), rLHβ (rockfish, AY609080), ntLHβ (nile tilapia, AY294016), giLHβ (three spot gourami, Q9PW98), shLHβ (snakehead, AAS01609), pyLHβ (pejerrey, AAP85607), ybLHβ (yellowfin seabream, Q90225), skLHβ (three spined stickleback, CAD59185), bhLHβ (bastard halibut, BAB47388), zLHβ (zebrafish, AAV31153), hnLHβ (human, NP_000885).

2. Homology 비교 및 계통유연관계 분석

자바리의 GTH α 소단위체는 능성어류의 GTH α 소단위체와 98~99%의 상동성을 보여주는 반면, 가자미류의 GTH α 소단위체와 79~82%의 상동성을 보여주며, 지브라피쉬와 일본산 장어와는 각각 57%와 60%의 상동성을 나타내었다 (Table 3). 당단백질 호르몬 알파 사슬 (GHA) 도메인 영역 비교 분석 결과, 능성어류와 100%의 상동성을 보여주었고, 가자미류에서는 81~83%, 지브라피쉬와 일본산 장어와는 각각 68%와 62%의 상동성을 나타내었다 (Table 4).

자바리의 FSH β 소단위체는 능성어류의 FSH β 소단위체와 100%의 상동성을 보여주는 반면, 가자미류의 FSH β 소단위체와 65~69%의 상동성을 보여주며, 지브라피쉬와 일본산 장어와는 각각 41%와 39%의 낮은 상동성을 나타내었다 (Table 3). 당단백질 호르몬 베타 사슬 (GHB) 도메인 영역 비교 분석 결과, 능성어류와 100%의 상동성을 보여주었고, 가자미류에서는 63~70%, 지브라피쉬와 일본산 장어와는 각각 42%와 41%의 낮은 상동성을 나타내었다 (Table 4).

자바리의 LH β 소단위체는 능성어류의 LH β 소단위체와 97%의 상동성을 보여주는 반면, 가자미류의 LH β 소단위체와 76~80%의 상동성을 보여주며, 지브라피쉬와 일본산 장어와는 각각 64%와 61%의 상동성을 나타내었다 (Table 3). 당단백질 호르몬 베타 사슬 (GHB) 도메인 영역 비교 분석 결과, 능성어류와 97~100%의 상동성을 보여주었고, 가자미류에서는 82~84%, 지브라피쉬와 일본산 장어와는 각각 65%와 64%의 낮은 상동성을 나타내었다 (Table 4).

자바리의 GTH 소단위체들과 여러 종들의 GTH 소단위체들 간의 계통유연관계를 분석한 결과, 본 연구에서 분리된 자바리의 GTH 소단위체들은 갈색등근바리에서 보고된 GTH 소단위체들과 가장 가까운 유연관계를 나타내었으며, 각각의 GTH α , FSH β 그리고 LH β 소단위체는 능성어류 간에 그룹을 형성 하였다 (Fig. 6).

Table 3. Overall amino acid identities of GTH α (common- α), FSH β and LH β subunits between *E. bruneus* and other fishes.

Species	Overall amino acid identity(%)		
	GTH α	FSH β	LH β
<i>E. coioides</i> (orange spotted grouper)	99	100	97
<i>E. septemfasciatus</i> (seven band grouper)	98	100	97
<i>P. major</i> (red seabream)	93	66	87
<i>C. maculata</i> (snakeheadfish)	91	76	83
<i>M. saxatilis</i> (striped seabass)	90	75	91
<i>O. niloticus</i> (nile tilapia)	88	61	85
<i>D. labrax</i> (european seabass)	88	74	91
<i>S. schlegeli</i> (rockfish)	88	66	90
<i>P. olivaceus</i> (bastard halibut)	82	69	76
<i>H. hippoglossus</i> (atlantic halibut)	79	65	80
<i>A. anguilla</i> (japanese eel)	60	39	61
<i>D. rerio</i> (zebrafish)	57	41	64

Table 4. Domain regions identities of GTH α (GHA), FSH β (GHB) and LH β (GHB) subunits between *E. bruneus* and other fishes.

Species	Amino acid identity in glycoprotein hormone domain regions(%)		
	GTH α (GHA)	FSH β (GHB)	LH β (GHB)
<i>E. coioides</i> (orange spotted grouper)	100	100	100
<i>E. septemfasciatus</i> (seven band grouper)	100	100	97
<i>P. major</i> (red seabream)	98	65	95
<i>C. maculata</i> (snakeheadfish)	98	80	89
<i>M. saxatilis</i> (striped seabass)	98	73	95
<i>O. niloticus</i> (nile tilapia)	89	57	93
<i>D. labrax</i> (european seabass)	98	73	94
<i>S. schlegeli</i> (rockfish)	89	65	94
<i>P. olivaceus</i> (bastard halibut)	83	70	82
<i>H. hippoglossus</i> (atlantic halibut)	81	63	84
<i>A. anguilla</i> (japanese eel)	62	41	64
<i>D. rerio</i> (zebrafish)	68	42	65

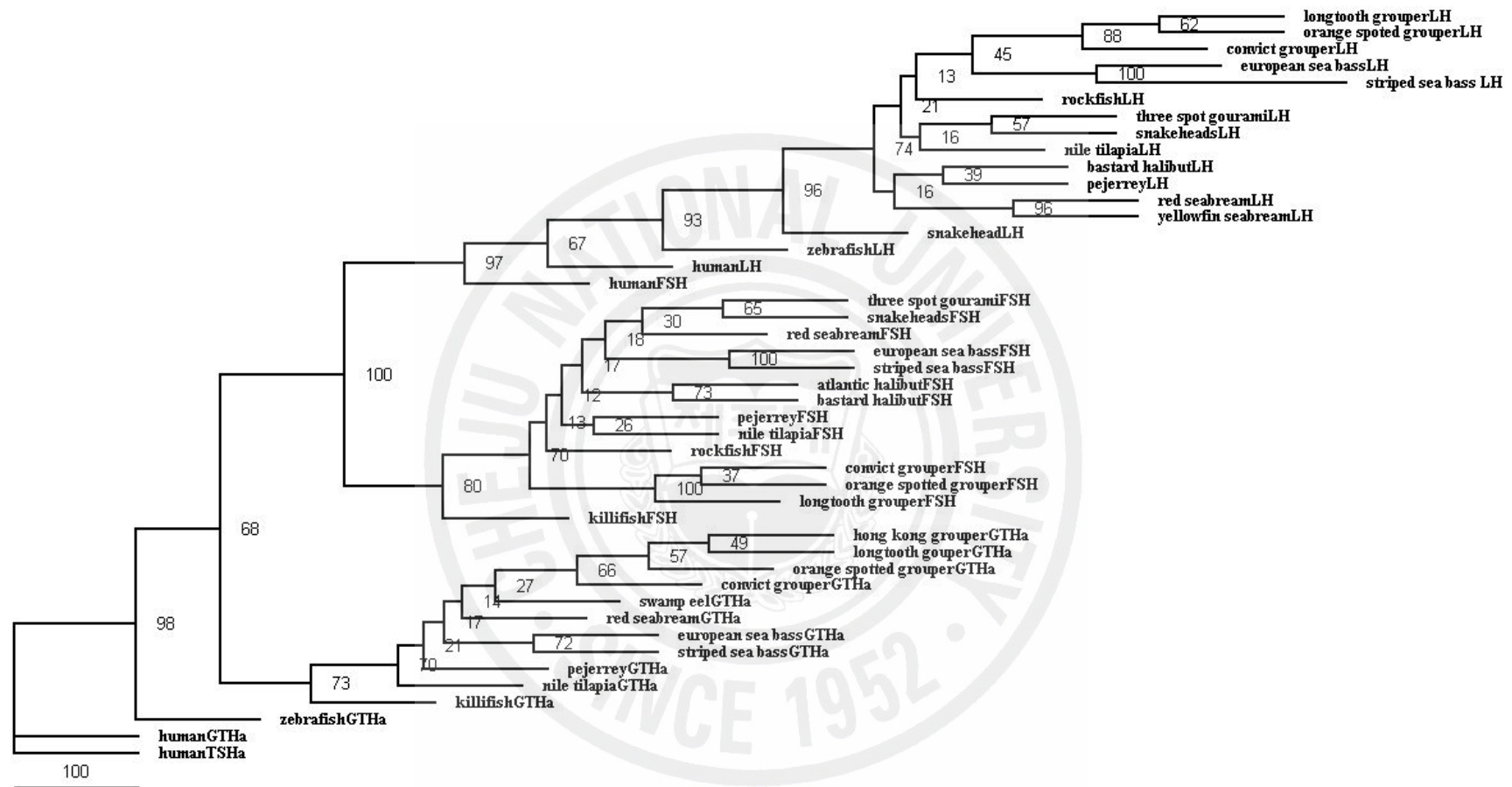
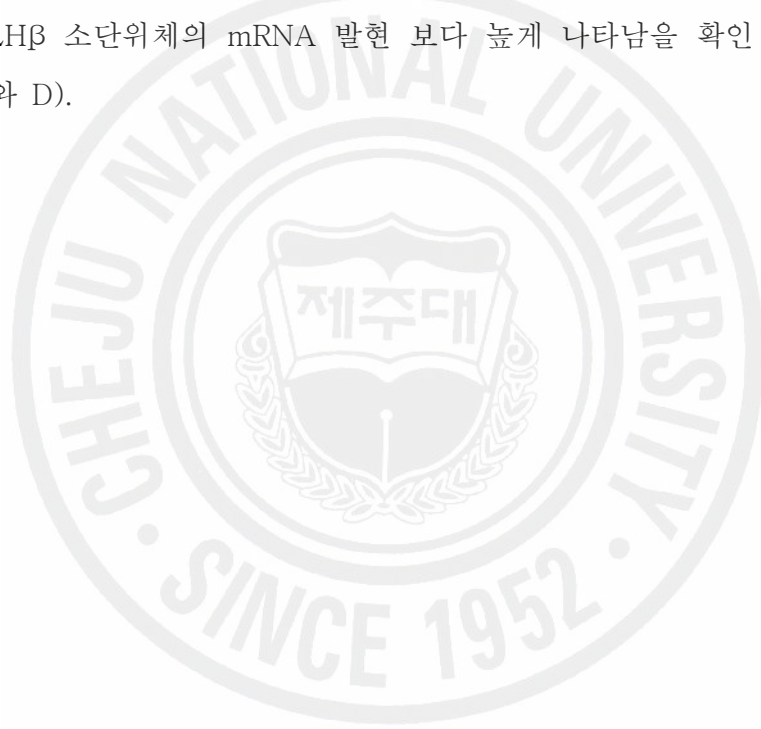


Figure 8. Phylogenetic relationships of GTH subunits between *E. bruneus* and other species. Thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes. Human thyroid-stimulating hormone common- α subunit was used as outgroup.

3. 자바리의 성숙 시기에 따른 조직학적 관찰 및 GTHs의 발현양상 분석

자바리의 미성숙 시기와 성숙 시기의 생식소 발달 상태를 H-E 염색을 통해 확인한 결과, 미성숙 시기의 자바리 생식소에서는 초기 주변인기 단계의 특징 및 일부 난원세포군을 확인 할 수 있었고 (Fig. 9 A), 성숙 시기의 자바리 생식소에서는 난핵의 이동되고 있는 단계임을 확인 할 수 있었다 (Fig. 9 B). 자바리의 미성숙 시기와 성숙 시기의 GTH 소단위체들의 mRNA 발현 변화를 RT-PCR 통해 확인 한 결과, 미성숙 시기의 GTH 소단위체들의 mRNA 발현이 성숙 시기의 발현정도 보다 높은 것을 알 수 있었으며, FSH β 소단위체의 mRNA 발현이 GTH α 와 LH β 소단위체의 mRNA 발현 보다 높게 나타남을 확인 할 수 있었다 (Fig. 9 C와 D).



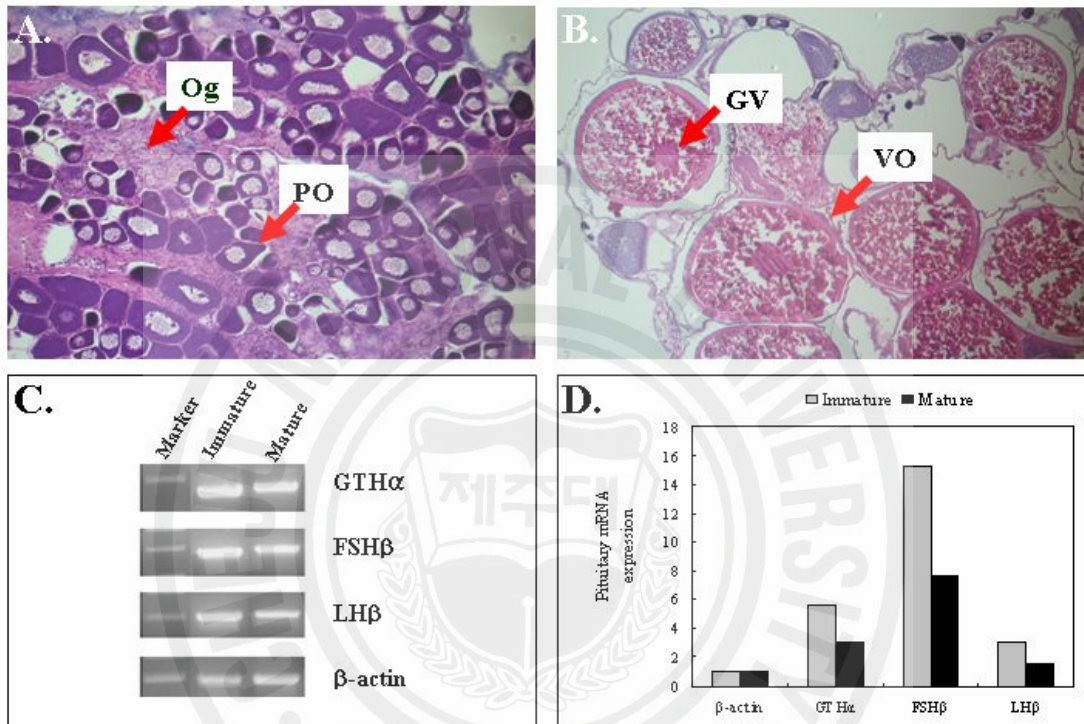


Figure 9. Histological observation of ovary and expression of GTH subunits of *E. bruneus*. A and B : H-E stained view of immature (A) and mature (B) ovary from *E. bruneus*. C and D : RT-PCR result of GTH subunits from pituitary of immature and mature *E. bruneus* and mRNA expression level was compared with β -actin as internal control (D). Og, oogonium ; PO, primary oocyte ; GV, germinal vesicle ; VO, vitellogenic oocyte.

4. 자바리 GTHs의 Southern hybridization 분석

자바리 GTH 소단위체들에 대한 southern hybridization을 수행하기 위하여 두 종류의 다른 제한효소를 처리한 genomic DNA 단편들을 각 유전자의 탐침과 혼성화 시켰다. 그 결과, *Hind*III와 *Pst*I이 처리된 genomic DNA에서 각각 7kb와 3.5kb 정도의 크기를 갖는 GTH α 소단위체의 단일 밴드가 나타남을 확인하였고, *Hind*III와 *Pst*I이 처리된 genomic DNA에서 각각 7kb와 1kb 정도의 크기를 갖는 FSH β 소단위체의 단일 밴드가 나타남을 확인하였다. 또한, *Eco*RI과 *Hind*III가 처리된 genomic DNA에서 각각 6kb와 2.4kb 정도의 크기를 갖는 LH β 소단위체의 단일 밴드가 나타남을 확인하였다 (Fig. 10).



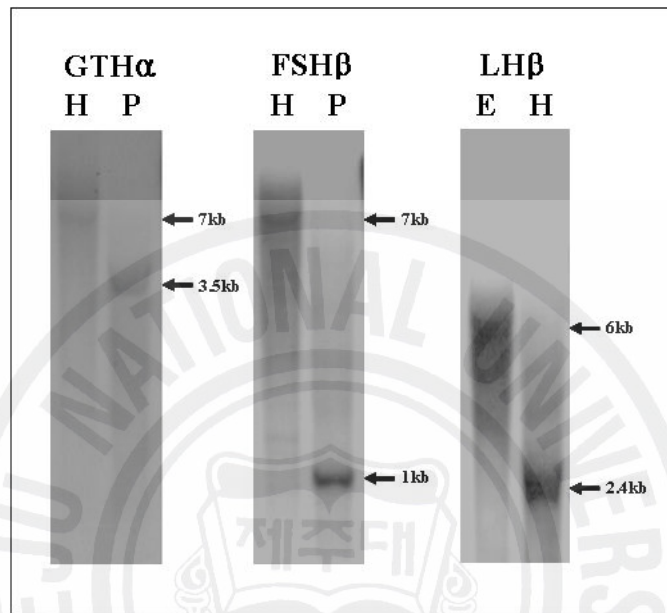


Figure 10. Southern hybridization to GTH subunits of *E. bruneus* genomic DNA. The one band obtained with each GTHs genes in different fractionated genomic DNAs from *E. bruneus*. 30 μ g of DNA was digested with *Hind*III (H), *Pst*I (P), and *Eco*RI (E) restriction enzymes, then fractionated as agarose gel, respectively.

IV. 고찰

본 연구에서 분리된 자바리의 GTH α 소단위체는 다른 어류들의 GTH α 소단위체들에서 나타나는 보존된 영역인 당단백질 호르몬 알파 사슬 (glycoprotein alpha chain domain; GHA) 도메인 영역을 포함하고 있었으며 (Fig. 2), FSH β 및 LH β 소단위체 또한, 당단백질 호르몬 베타 사슬 (glycoprotein beta chain domain; GHB) 도메인 영역을 포함하고 있었다 (Fig. 3, Fig. 4). 다른 어류들의 GTH 소단위체들과 비교한 결과, 자바리 GTH 소단위체들 내의 존재하는 시스테인 잔기는 매우 보존되어 있었다 (Fig. 5). 보존된 주요 구조적 특징인 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 자바리의 GTH α 소단위체에서는 2개, LH β 소단위체에서는 1개가 확인 되었다. GTH α 소단위체의 첫 번째 *N*-linked 올리고당 사슬 부위는 각각의 베타-소단위체들과의 이형중합체 형성 및 수용체와의 결합에 중요한 것으로 보고되어 있으며, 이 부위는 두 쌍의 시스테인 잔기와 상호작용 하는 것으로 알려져 있다 (Xia *et al.*, 1994, Gen *et al.*, 2000, Mateos *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2005). 본 연구에서도 자바리의 GTH α 소단위체는 첫 번째 *N*-linked 올리고당 사슬 부위를 전후하여 두 쌍의 시스테인 잔기가 보존되어 있는 것으로 확인 되었다 (Fig. 2). 대부분의 척추동물의 FSH β 소단위체에서는 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 보존적으로 존재하는 반면, 자바리 FSH β 소단위체에서는 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 결여되어 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 6). 이런 결과는 경골어류인 큰 가자미 (atlantic halibut)의 FSH β 소단위체와 능성어류 (갈색등근바리와 능성어)에서의 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 결여된 것으로 보고와 일치함을 보였다 (Weltzien *et al.*, 2003). 따라서, 자바리를 포함한 능성어류의 FSH β 소단위체에 *N*-linked 올리고당 사슬 부위의 결여가 구조적 특징이라 할 것이다. 한편, 다른 경골어류의 *N*-linked 올리고당 사슬 부위에 존재하는 아르기닌 아미노산 위치에 세린 아미노산이 능성어류에서 존재하는 것으로 보아 *O*-linked 올리고당 사슬 부위가 존재할 것으로 추정하는 연구 결과가 보고 되고 있다 (Li *et al.*, 2005).

본 연구에서 분리된 자바리 GTH α , FSH β , 그리고 LH β 소단위체들은 비교된 종들 중에 갈색등근바리 (*E. coioides*)와 능성어 (*E. septemfasciatus*)의 GTH α ,

FSH β , 그리고 LH β 소단위체와 각각 아미노산 상동성이 가장 높은 결과를 보였으며, 분리된 자바리 GTH 소단위체들 간의 상동성은 매우 낮았다 (data not show). 또한, 계통 유연관계 분석 결과에서도 자바리의 GTH α , FSH β , 그리고 LH β 소단위체들은 각기 분기되어 cluster를 형성하였고, 이들 모두는 능성어류와 가까운 그룹으로 구분 되었다.

연어류에서 보고된 바에 따르면 FSH는 사춘기와 배우자 형성시기에 발현되고, LH는 최종적인 생식소 성숙과 산란시기에 발현되어 생식 주기에 있어서 서로 다른 시기에 작용하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 연어류 뿐만 아니라 다른 경골어류들에서도 이와 같은 발현 양상을 나타내는 것으로 보고되어지고 있다 (Li *et al.*, 2005).

자바리의 미성숙 시기와 성숙 시기에서 GTH 소단위체들의 mRNA 발현 변화를 RT-PCR을 통해 살펴 본 결과, 미성숙 시기에 각각의 GTH α , FSH β , 그리고 LH β 소단위체들이 성숙 시기보다 높게 나타남을 확인하였다 (Fig. 9). 미성숙 자바리 뇌하수체에서 나타나는 FSH β 와 LH β 소단위체의 높은 발현은 경골어류인 틸라피아의 연구 결과와 일치함을 보였고, 이러한 결과에 비추어 볼 때, GTH 소단위체들은 생식소 발달 초기에 작용할 것으로 사료된다. 또한 틸라피아를 포함한 어류에서 LH β 소단위체는 성숙이 진행되는 단계와 산란이 끝난 후 퇴화되는 과정에서 높게 발현되며, 성숙단계에서는 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다 (Yaron *et al.*, 2001). 자바리 LH β 또한 성숙단계 뇌하수체 조직에서 감소한 것으로 나타나는 것은 선행 어류의 보고와 일치함을 보였다.

자바리의 Southern 분석 결과는 GTH α , FSH β , 그리고 LH β 소단위체들이 one-copy임을 확인하였고 (Fig. 10), 이는 하나의 유전자에 의해서 암호화되어 발현되는 것으로 사료되며, 이와 같은 결과는 대부분의 다른 경골어류 (Gen *et al.*, 2000; Mateos *et al.*, 2003)에서도 동일하게 보고되고 있다.

본 연구에서 분리된 cDNA들이 각각 GTH α , FSH β , 그리고 LH β 소단위체 cDNA인 것으로 확인되었으며, 능성어류의 한 종인 자바리를 이용한 이상의 결과들은 어류의 생리적인 기작을 연구하는데 기초적인 자료로서 뒷받침될 것으로 사료된다. 더욱이, 생식소 발달 단계에 따른 혈장 분석을 통한 스테로이드 호르몬과의 상호관계 및 생식선 자극 호르몬들 (GnRHs)의 발현과의 관계 등이 연구

가 진행된다면, 자바리와 같이 높은 교부가가치를 가진 어종의 대량 양식 산업에 기초자료로서 활용될 것으로 사료된다.



V. 참고 문헌

Ando, H., Hew, C.L., Urano, A., 2001. Signal transduction pathways and transcription factors involved in the gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin subunit gene expression. *Com. Biochem. Physiol. Part B.* 129, 525-532.

Bernard, D.J., Merzyak, I.Y., Horton, T.H., Turek, F.W., 2000. Differential regulation of pituitary gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in photostimulated siberian hamsters. *Biol. Reprod.* 62, 155-161.

Gen, K., Okuzawa, K., Senthilkumaran, B., Tanaka, H., Moriyama, S., Kagawa, H., 2000. Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol. Reprod.* 63, 308-319.

Gur, G., Bonfil, D., Safarian, H., Naor, Z., Yaron, Z., 2002. GnRH signaling pathways regulate differentially the tilapia gonadotropin subunit genes. *Mol. Cel. Endocrinol.* 189, 125-134.

Gur, G., Rosenfeld, H., Melamed, P., Meiri, I., Elizur, A., Yaron, Z., 2001. Tilapia glycoprotein hormone α subunit: cDNA cloning and hypothalamic regulation. *Mol. Cel. Endocrinol.* 182, 49-60.

Hellqvist, A., Bornestaf, C., Borg, B., 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.

Hellqvist, A., Schmitz, M., Mayer, I., Borg, B., 2006. Seasonal changes in expression of LH- β and FSH- β in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 145, 263-269.

Hurvitz, A., Degani, G., Goldberg, D., Din, Sv. T., Jackson, K., Levavi-Sivan, B., 2005. Cloning of FSH β , LH β , and glycoprotein α subunits from the Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), β -subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. Gen. Comp. Endocrinol. 140, 61-73.

Jackson, K., Goldberg, D., Ofir, M., Abraham, M., Degani, G., 1999. Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic β subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. J. Mol. Endocrinol. 23, 177-187.

Kim, D.J., Cho, Y.C., Sohn, Y.C., 2005. Molecular characterization of roachfish (*Sebastes schlegeli*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 141, 282-290.

Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K., Yamaguchi, S., Lim, B.S., Kagawa, H., 2004. Effects of gonadotropin-releasing hormone on pituitary-ovarian axis of one-year old pre-pubertal red seabream. Gen. Comp. Endocrinol. 138, 105-112.

Li, Ch.J., Wang, Y., Hong, Y.H., Gui, J.F., 2005. Molecular and expression

characterization of three gonadotropin subunits common α , FSH β and LH β in groupers. *Mol. Cel. Endocrinol.* 233, 33-46.

Liu Z.J., Kim, S.H., Karsi, A., 2001. Channel catfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: complementary DNA cloning and expression during ovulation. *Mar. Biotechnol.* 3, 590-599.

Mateos, J., Mananos, E., Martinez-Rodriguez, G., Carrillo, M., Querat, B., Zanuy, S., 2003. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 216-232.

McGonnell, I.M., Fowkes, R.C., 2006. Fishing for gene function-endocrine modelling in the zebrafish. *J. Endocrinol.* 189, 425-439.

Meethal, S.V., Atwood, C.S., 2005. The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cel. Mol. Life Sci.* 62, 257-270.

Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Yaron, Z., 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Com. Biochem. Physiol. Part C.* 119, 325-338.

Okuzawa, K., 2002. Puberty in teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 31-41.

Saito, A., Kano, Y., Suzuki, M., Tomura, H., Takeda, J., Tanaka, S., 2002. Sequence analysis and expressional regulation of messenger RHAs encoding β subunits of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Biol. Reprod.* 66,

1299-1309.

Schlz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E.B., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J.Th., Bogerd, J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Com. Biochem. Physiol. Part B.* 129, 407-417.

Sekine, S., Saito, A., Itoh, H., Kawauchi, H., Itoh, S., 1989. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Biochem.* 86, 8645-8649.

Shimizu, A., Sakai, T., Nashida, K. Honda, H., 2003. Universal antisera for immunocytochemical identification of two different gonadotrophs in acanthopterygian fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 275-287.

So, W.K., Kwok, H.F., Ge, W., 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II, cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits- their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol. Reprod.* 72, 1382-1396.

Song, Y.B., Oh, S.R., Seo, J.P., Ji, B.G., Lim, B.S., Lee, Y.D., 2005. Larval development rearing of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in Jeju Island, Korea. *J. WAS.* 36, 209-216.

Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Reprod. Fertility.* 2, 55-68.

Vidal, B., Pasqualini, C., Belle, N.L., Holland, M.C.H., Sbaihi, M., Vernier,

P., Zohar, Y., Dufour, S., 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile european eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol. Reprod.* 71, 1491-1500.

Weltzien, F.A., Kobayashi, T., Andersson, E., Norberg, B., Andersen, O., 2003. Molecular characterization and expression of FSH β , LH β , and common α -subunits in male atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 131, 87-96.

Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Levavi-Sivan, B., Elizur, A., 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. *Com. Biochem. Physiol. Part B.* 129, 489-502.

Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Kato, Y., Aida, K., 1997. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH-I β and -II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 379-389.

Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, L., Zhao, H., 2007. The mRNA expression of P450 aromatase, gonadotropin β -subunits and FTZ-F1 in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) during 17 α -methyltestosterone-induced precocious sex change. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 665-673.

VI. 요약

자바리를 포함한 능성어류는 한국을 비롯한 동남아시아 지역의 양식 산업에 있어서 높은 부가가치를 갖는 대표적인 어종이다. 그러나 이들의 대량 양식은 높은 기형이 발생률, 옹성의 희소성, 그리고 스테로이드 호르몬 처리를 통한 산란시기 조절이 쉽지 않은 점 등의 문제를 가지고 있다. 자바리의 산란시기에 있어서 GTHs의 분자생물학적인 영향을 살펴보고자, 생식 및 산란에 있어서 중요한 기능을 담당하는 것으로 알려진 세 개의 생식선 호르몬 소단위체들을 자바리의 뇌하수체로부터 RACE를 통해 분리하였다. 분리된 GTH α , FSH β , 그리고 LH β 소단위체 cDNA들의 길이는 각각 509 bp (117 a.a), 576 bp (120 a.a), 579 bp (148 a.a)였다. 다른 경골어류들간의 전체 아미노산 서열에 대하여 각 소단위체들의 상동성은 65~99% (GTH α), 50~100% (FSH β), 그리고 60~97% (LH β)를 나타내었다. 또한 자바리의 GTH α 소단위체는 10개의 시스테인 잔기와 2개의 *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 보존적으로 존재하였다. 자바리의 FSH β 와 LH β 소단위체는 각각 11개와 12개의 시스테인 잔기가 보존적으로 존재하였고, *N*-linked 올리고당 사슬 부위가 FSH β 소단위체에서는 결여되어 있었다. 계통유연관계 분석에서는 자바리의 GTH 소단위체들이 바리과의 능성어류와 그룹을 형성함을 나타내었다. Southern hybridization 분석의 결과에서는 자바리의 각 소단위체들이 단일 유전자 수를 가짐을 나타내었다. GTH 소단위체 mRNA의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과, 미성숙 뇌하수체에서 높게 발현되는 것으로 보아 GTH가 생식소 성숙에 관여하는 것으로 보여진다.

Keyword: Gonadotropin hormone (GTH), Pituitary, *N*-linked glycosylation, Southern hybridization, Grouper

감사의 글

지난 2년 반의 시간은 저에게 있어 단지 학문탐구의 기간만은 아니었습니다. 슬프고 기뻐던 많은 일들과 함께, 실험의 과정을 통해 자만했던 자신의 모습을 보게 되었으며, 제가 무척이나 부족한 존재임을 뼈저리게 깨달을 수 있었습니다. 제 자신을 조금 더 가까이서 볼 수 있게 된 지금, 그간의 결과를 부끄러운 마음으로 내놓았습니다.

먼저, 관심과 격려로 본 논문이 나오기까지 애써주신 김세재 교수님께 감사를 드립니다. 항상 건강하시고 하시는 모든 일들이 순조롭길 기원합니다. 또한, 논문의 부족한 많은 부분들을 지적해 주시고 점검해 주신 김원택 교수님과 이선령 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 여러 해 동안 저를 배움과 바른 가르침의 길로 이끌어 주신 이용필 교수님, 오덕철 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께도 진심어린 감사의 마음을 전합니다.

실험의 각 과정들에 있어 바로 옆에서 저에게 큰 도움을 주셨던 박지권 박사님과 정형복 선배님께도 감사를 드리며, 앞으로도 많은 지도를 부탁드립니다. 또한, 실험이 진행하는데 있어서 여러모로 도움을 주신 이영돈 교수님, 임봉수 박사님, 허성표 선배님과 류용운 학우에게도 감사를 드립니다. 실험실 내에서 항상 도와주던 신혜선, 홍혜진, 양운실, 홍윤석 후배들과 실험실 밖에서 저에게 힘과 용기를 주셨던 윤훈석, 진영준, 오대주 선배님들을 비롯한 여러 선배님들과 후배들, 이밖에도 많은 도움을 주었던 성일이형, 재웅이형에게도 감사의 마음을 전합니다. 마지막으로, 항상 저를 응원해준 철남, 승만, 성진, 재훈, 장용, 윤철, 치원, 정아, 지영와 그 밖의 많은 친구들에게도 고맙다는 말을 전합니다.

제가 하는 모든 일들을 항상 믿어주시고 존중해 주셨던 부모님과 누님들 그리고, 매형 분들께 특별한 감사의 말씀을 올립니다.

앞으로 더욱더 열심히 하는 모습을 보여드리겠습니다.

감사합니다.