



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

넙치(*Paralichthys olivaceus*)의


PSS I /GH mRNA 발현 특성

제주대학교 대학원

해양생명과학과

김 병 훈

2011년 12월



Preprosomatostatin I and growth hormone
mRNA expression in the olive flounder,
Paralichthys olivaceus

Byeong Hoon Kim

(supervised by professor Young-Don Lee)

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

2011. 12

MARINE LIFE SCIENCE GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY



넙치(*Paralichthys olivaceus*)의
PSS I /GH mRNA 발현 특성

지도교수 이 영 돈

김 병 훈

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2011년 12월

김병훈의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 여 인 규 (인)

위 원 이 경 준 (인)

위 원 이 영 돈 (인)

제주대학교 대학원

2011년 12월

목 차

목차	i
List of figure	iii
List of table	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 넙치 PSS I 유전자의 클로닝과 PSS I/GH cDNA의 조직별 발현	4
1) 실험어	
2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성	
3) PSS I 유전자 클로닝	
4) 염기서열 분석	
5) RT-PCR	
2. 넙치의 PSS I/GH mRNA 일주기 리듬	11
1) 실험어	
2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성	
3) Real-time quantitative RT-PCR	
4) 통계처리	
3. 멜라토닌이 PSS I/GH mRNA 발현에 미치는 영향	14
1) 실험어	

2) cDNA 합성 및 Real-time quantitative RT-PCR

3) 통계처리

4. hCG와 E₂ 투여에 따른 PSS I /GH mRNA 발현 15

1) 실험어

2) 호르몬 투여와 샘플링

3) cDNA 합성 및 Real-time quantitative RT-PCR

4) 통계처리

III. 결과 16

1. 넙치 PSS I 유전자의 클로닝과 PSS I /GH cDNA의 조직별 발현 16

2. 넙치의 PSS I /GH mRNA 일주기 리듬 21

3. 멜라토닌이 PSS I /GH mRNA 발현에 미치는 영향 24

4. hCG와 E₂ 투여에 따른 PSS I /GH mRNA 발현 26

IV. 고찰 29

V. 요약 37

VI. 참고문헌 39

List of figures

Fig. 1. Separate brain area of the <i>Paralichthys olivaceus</i> that used in the tissue specific expression by RT-PCR.	7
Fig. 2. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of <i>Paralichthys olivaceus</i> PSS I	17
Fig. 3. Phylogenetic relationship of PSS I between <i>Paralichthys olivaceus</i> and other fishes.	19
Fig. 4. Tissue specific expression of <i>Paralichthys olivaceus</i> PSS I and GH in nerves and peripheral tissue by RT-PCR.	20
Fig. 5. PSS1 mRNA levels in the hypothalamus of <i>Paralichthys olivaceus</i> under 12L:12D (A), 24D (B), 24L (C) condition.	22
Fig. 6. GH mRNA levels in the pituitary of <i>Paralichthys olivaceus</i> under 12L:12D (A), 24D (B), 24L (C) condition.	23
Fig. 7. Expression of PSS I (A) and GH (B) mRNA in <i>Paralichthys olivaceus</i> by melatonin injection.	25
Fig. 8. Expression of PSS I (A) and GH (B) mRNA in <i>Paralichthys olivaceus</i> by human chorionic gonadotropin injection.	27
Fig. 9. Expression of PSS I (A) and GH (B) mRNA in <i>Paralichthys olivaceus</i> by estradiol-17 β injection.	28

List of tables

Table 1. Primer sets used for cloning of PSS I in <i>Paralichthys olivaceus</i>	8
Table 2. Gene information of used for multiple alignment	9
Table 3. Primer sets used of RT-PCR of PSS I, GH and 18s rRNA in <i>Paralichthys olivaceus</i>	10
Table 4. Primer sets used of Real-time quantitative RT-PCR of PSS I, GH and 18s rRNA in <i>Paralichthys olivaceus</i>	13
Table 5. Overall amino acid adentities of PSS I between <i>Paralichthys olivaceus</i> and other fishes	18

ABSTRACT

Growth hormone (GH) and preprosomatostatin (PSS) play an important role in vertebrates including fish. GH which affects multifunctions, including somatic growth, reproduction, feeding and osmoregulation. PSS is a hypothalamic hormone which primarily releases-inhibiting GH secretion from the pituitary. PSS is widely detected not only in the central nervous system but in peripheral tissues and modulates a number of physiological processes, including feeding behavior, digestion, reproduction and osmoregulation. Although functions of PSS have mainly been studied in mammalian, little information has been reported about the physiological roles in fish. In order to characterize the expression pattern of PSS I and GH mRNA in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), we performed PSS I mRNA cloning, and investigated tissue-specific expression and daily rhythm of PSS I and GH mRNA. We also investigated regulation of PSS I and GH mRNA expression by melatonin, human chorionic gonadotropin (hCG), estradiol-17 β (E₂).

A nucleotide sequence (638 bp in length) of PSS I mRNA was obtained from the hypothalamus of olive flounder. The homology of PSS I amino acid sequence between other fish was 86%. Phylogenetic analysis revealed that the olive flounder PSS I was grouped with burtoni (*Haplochromis burtoni*). The strong band for PSS I mRNA was detected in the telencephalon and hypothalamus, GH mRNA was detected in the pituitary.

To investigate the biological rhythm of PSS I and GH mRNA in olive flounder, experiment groups were categorized into three groups; 12L:12D, continuous dark (24D) and continuous light (24L) condition, respectively. In the treatment group under 12L:12D condition, PSS I mRNA expression

in the hypothalamus was significantly higher during light phase than during dark phase ($P < 0.05$). Circadian rhythm of PSS I mRNA was observed under 24D condition. In case of GH mRNA, no significant expression pattern under all photoperiod conditions ($P > 0.05$).

In the melatonin injection experiment, PSS I and GH expression was higher in 5 and 1 mg/kg body weight injection group, respectively. In the hCG and E_2 injection experiment, treatment with hCG at 500 IU/kg body weight increased the both PSS I and GH mRNA expression, treatment with E_2 at 10 mg/kg body weight increased only PSS I mRNA expression.

These suggested that circadian rhythm of PSS I mRNA was observed, but no detected rhythm of GH mRNA in olive flounder. Especially, PSS I mRNA expression was regulation by external light and darkness change or biological clock, and GH mRNA expression was regulation by melatonin. Also, considered expression of PSS I and GH mRNA have important effect in olive flounder sex maturation.

I. 서론

어류의 성장은 유전적 특이성 또는 수온, 광주기 그리고 먹이 등 다양한 환경적인 요인들에 의해 영향을 받는다. 이러한 요인들은 생체 내신호로 전환되어 호르몬의 내분비를 조절하고, 호르몬간의 상호작용으로 인해 성장을 조절한다. 특히 뇌하수체에서 분비되는 Growth hormone (GH)과 간에서 분비되는 Insulin-like growth factor-I (IGF-I)은 GH-IGF 축을 형성하여 성장조절에 중요한 역할을 담당한다(Wood et al., 2005).

GH는 포유류에 있어서 가장 흔히 알려진 성장 촉진 호르몬으로서 시상하부에서 분비되는 Growth hormone releasing hormone (GHRH)의 작용에 의해 뇌하수체에서 합성된다. 뇌하수체에서 분비된 GH는 혈액순환계를 통해 각 세포나 기관에 전달되어 체세포 형성과 발달 등에 영향을 미친다(Corin et al., 1990; Copeland and Nair, 1994). 이외에도 단백질 합성이나 스테로이드 합성과도 관련이 있으며 무지개송어(rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*)에서 특이적으로 삼투작용에 관여하며(Sakamoto et al., 1993; Tatsuta and Hirano, 1993), 금붕어(goldfish, *Carassius auratus auratus*)와 gilthead sea bream (*Sparus aurata*)등에서는 생식에도 관여한다(Van Der Kraak et al., 1990; Le Gac et al., 1993; Mingarro et al., 2002).

Somatostatin (SS)은 시상하부에서 합성, 분비되는 시상하부호르몬이다. 양(Ovine)의 시상하부에서 처음 발견된 SS는 주로 뇌하수체에서 분비되는 GH의 방출을 억제하는 성장호르몬방출억제호르몬으로 중추신경뿐만 아니라 여러 주변 조직에 넓게 분포한다(Brazeau et al., 1973; Reichlin, 1983; Patel, 1999; Trabucchi et al., 2002). SS는 전구체단백질인 Preprosomatostatin (PSS)에 의해 합성되며 PSS가 SS으로의 전환과정에 따라서 다양한 SS isoform이 존재하게 된다. 어류에서는 SS가 칠성장어(*Petromyzon marinus*)에서 최초로 분리되었고(Andrews et al., 1988), 이 후 다양한 종에서 PSS I, PSS II, PSS III가 분리되었으며 각각의 SS는 분자적인 구조에 있어서 C-말단의 차이로 구분된다. PSS I 은 C-말단에 14-아미노산 염기서열이 존재하고 (SS-14-I), PSS II는

[Tyr⁷, Gly¹⁰]-SS-14 (SS-14-II), PSSⅢ는 [Pro²]-SS-14 (SS-14-Ⅲ)의 구조를 갖는 것이 확인되었다(Sheridan et al., 2000; Nelson and Sheridan, 2005).

어류에서 *In vivo*와 *In vitro* 실험을 통하여 PSS I 은 GH의 방출 억제와 관련이 있음이 증명되었다(Rousseau et al., 2001; Very and Sheridan, 2002; Canosa et al., 2007). 하지만 모든 SS form에서 이러한 GH방출 억제효과가 있는 것은 아니며, 연어에서 분리된 PSSⅡ는 금붕어의 뇌하수체에서 분비되는 GH에 아무런 영향을 미치지 않았다(Marchant and Peter, 1989). 이외에도 PSS는 대서양대구(Atlantic cod, *Gadus morhua*), 무지개송어, 갈색등근바리(Orange-spotted grouper, *Epinephelus coioids*)에서 소화 작용이나 삼투압 조절, 그리고 성스테로이드 호르몬의 활성화에도 관여하는 것으로 일부 알려지고 있다(Holstein and Cederberg, 1988; Very et al., 2001; Poppinga et al., 2007; Zhang et al., 2009). 하지만 어류의 PSS는 아직까지 그 기능에 대해 명확히 밝혀져 있지 않고 종 특이적인 특성을 나타낼 때도 있다.

척추동물에 있어서 빛은 멜라토닌의 일일 또는 계절적 분비를 조절하는 주요 환경요소이다(Falcòn, 1999). 멜라토닌은 주로 빛을 감지하는 망막과 송과체에서 생성되는 신경내분비 호르몬으로서 혈액순환계를 통하여 운반된다. 모든 척추동물에 있어서 혈중의 멜라토닌 농도는 밤에 증가하고 낮에 감소하는 일주기성을 나타내며 밤의 길이가 짧은 여름보다 밤의 길이가 긴 겨울에 멜라토닌의 분비가 증가하는 년주기성을 보인다(Underwood, 1989; Arendt, 1997; Ekstrom and Meissl, 1997). 멜라토닌의 일주기성은 zebrafish (*Danio rerio*)와 금붕어 등에서 수면, 채색변화, 먹이섭식과 같은 다양한 생리적 기능에 관여하며(Zachmann A et al., 1992; Zhdanova et al., 2001; De Pedro et al., 2008), 멜라토닌의 년주기성은 무지개송어와 European eel (*Anguilla anguilla*)에서 성장과 생식에 영향을 미친다(Falcòn et al., 2003; Sébert et al., 2008).

넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)는 가자미목(Pleuronectiformes) 넙치과(Paralichthyidae)에 속하는 어류로 수심 10~200m 주변의 모래 바닥에 주로 서식하며 우리나라의 전 연안과 일본 그리고 남중국해 등지에 분포한다(김익수 외 2005). 넙치는 국내양식산업의 대표적인 어종으로서 1984년 인공종묘

생산기술이 개발되어 양식이 시작된 이후 생산량이 꾸준히 증가하여 총 어업생산량의 절반을 넘는 생산량을 차지하고 있다.

이 연구는 제주양식넙치를 대상으로 성장조절에 관여하는 PSS I 과 GH 유전자 특성을 알아보기 위하여 각 유전자 염기서열을 동정하였고, 생물시계에 의한 생체리듬의 형성에 대해 조사하였다. 또한 생물 체내의 빛 신호전달 호르몬인 멜라토닌과 성선자극호르몬인 human chorionic gonadotropin (hCG), 성스테로이드 호르몬 estradiol-17 β (E₂)를 주사하여 각각의 호르몬이 PSS I 과 GH mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 넙치 PSS I 유전자의 클로닝과 PSS I /GH cDNA의 조직별 발현

1) 실험어

실험어는 제주대학교 해양과환경연구소에서 사육중인 넙치(평균전장 25.6 ± 0.6 cm, 평균체중 164.8 ± 8.0 g)를 사용하였다. PSS I 과 GH 유전자분석을 위해서 실험어는 2-phenoxyethanol(Sigma Co.)를 이용하여 마취한 후, 시상하부와 뇌하수체를 적출하였다(Fig. 1). 또한 조직별 발현을 확인하기 위하여 중추신경조직(단뇌, 시개, 소뇌, 시상하부, 뇌하수체)과 주변조직(간, 신장, 장, 생식소)을 부위별로 적출하였다.

2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

넙치에서 적출한 조직들에 RNAiso Reagent(Takara, Japan) 500 μ l를 첨가하여 homogenizer로 완전히 분쇄하였다. Chloroform을 100 μ l을 첨가하여 혼합한 후 원심분리기로 원심분리하였다. RNA가 포함된 상층액을 튜브로 옮겨 동일량의 iso-propanol을 첨가하여 12000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 침전시켰다. DEPC가 첨가된 75% 에탄올을 이용하여 수세하여 에탄올을 제거한 후 RNase-free 증류수로 RNA pellet을 용해시켜 total RNA를 얻었다. 이후 Total RNA 2.0 μ g 을 주형으로 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA)를 이용하여 DNase 처리를 하였다. Total RNA와 증류수를 첨가하여 7.5 μ l 부피를 맞추고 RQ NRase-Free DNase 10×Reaction buffer 1 μ l, RQ RNase-Free DNase 1.5 μ l를 총 부피 10 μ l가 되도록 첨가하였다. 이후 37°C에서 30분간 반응 후 1 μ l의 Stop Solution을 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켜 DNase 처리를 중단하였다. total RNA는 Nano Vue(GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 농도를 측정하였고, A260/A280nm의

비율이 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA만을 선택하여 실험에 사용하였다.

cDNA는 DNase 처리된 total RNA 0.5 μ g을 주형으로 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. Total RNA에 증류수를 첨가하여 총 부피가 6.5 μ l 되도록 맞춘 후 Oligo dT primer 0.5 μ l, Random 6mer 0.5 μ l, PrimeScript™ RT Enzyme mix 0.5 μ l, 5× PrimeScript™ Buffer 2 μ l를 각각 첨가하여 총 10 μ l 부피가 되도록 만들고, 37°C에서 15분간 반응 후 85°C에서 합성을 중단시켰다. 합성이 끝난 후 각각의 cDNA에 40 μ l의 Nuclease-free 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μ l가 되게 희석하였다.

3) PSS I cDNA 분리

넙치의 PSS I cDNA를 분리하기 위하여 *Ctenopharyngodon idella* (accession number, EU571475), *Megalobrama pellegrini* (accession number, AY247267), *Carassius auratus* (accession number, CAU40754)에서 보고된 염기서열을 이용하여 degenerate primer를 제작하였다(Table 1). Degenerate primer를 PCR 기법을 통하여 유전자를 증폭시켜 pGEM-T easy vector (promega, USA)에 삽입하여 JM109 competent cell (Takara, Japan)에 형질전환 시켰다. 배양된 plasmid DNA를 분리하여 Genotech (Korea)에 의뢰 후 부분염기서열을 분석하였다. 부분염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST 검색을 통하여 확인하였고, 확인된 부분염기서열을 이용하여 종 특이적 primer 세트를 제작하였다(Table 1). PSS I의 전체염기서열은 SolGent T-Blunt PCR 클로닝 kit (SolGent, Korea)를 이용하여 확인하였다.

4) 염기서열 분석

PSS I의 signal peptide 분석은 SignalP4.0을 이용하여 분석하였으며, 중간계통유연관계 분석은 PHYLIP 프로그램을 이용하여 분석하였다. 분석에 이용된

종들의 아미노산 서열 Multiple alignment는 ClustalW 프로그램을 이용하여 분석하였고, BOOTSTRIP 분석은 SEQBOOT 프로그램을 이용하여 1000회 반복하였다. SEQBOOT에 의해 align된 1000 set은 PRODIST 프로그램을 이용하여 distance matrices를 계산하였다. 계산된 distance matrices는 NEIGHBOR 프로그램의 tree 작성 input 데이터로 이용하였고, CONSENSE 프로그램을 이용하여 consense tree를 작성하였다. 각 유전자의 multiple alignment에 이용된 종과 유전자는 Table 2에 나타내었다.

5) RT-PCR

PSS I 과 GH mRNA의 조직별 발현양상을 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 Primer는 PSS I 의 경우 분리된 염기서열을 기초로 제작하였고, GH는 NCBI에 등록되어있는 넙치의 염기서열(accession number, PAIFGH)을 참고하여 제작했으며, housekeeping gene으로는 18s rRNA를 사용하였다(Table 3). 반응조건 95℃에서 45초, 55℃에서 45초, 72℃에서 90초, 35cycle 하에서 cDNA를 증폭시켰으며, 증폭된 산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

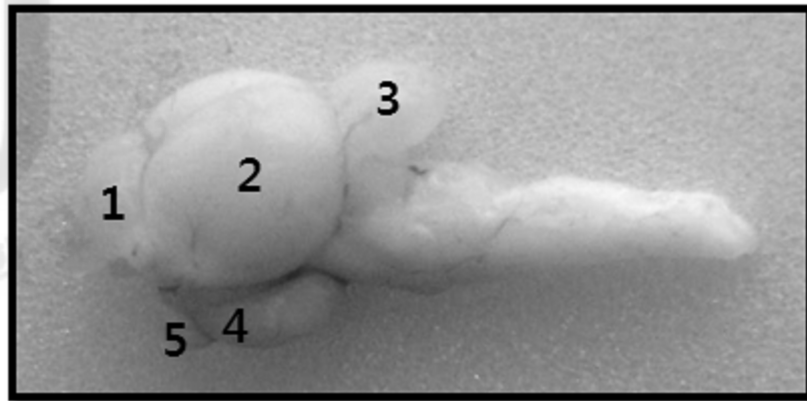


Fig. 1. Separate brain area of the *Paralichthys olivaceus* that used in the tissue specific expression by RT-PCR. 1, telencephalon; 2, optic tectum; 3, cerebellum; 4, hypothalamus; 5, pituitary.

Table 1. Primer sets used for cloning of PSS I in *Paralichthys olivaceus*

Primers	Sequence(5'-3')	Note
PSS I F	GCSCAGAGAGACTCCAAACT	forward degenerated primer
PSS I R	GAAGTTCTTGCAKCCAGCTT	reverse degenerated primer
PSS1-5R	CGTTCCAGATCCACATGGATGTCCT	forward gene specific primer
PSS1-3R	AGAGACTCCAAACTCCGCCTGTTGC	reverse gene specific primer
PSS1-N5R	TCTCCTCCTCCAGAGCCTCGTTCTC	forward nest gene specific primer
PSS1-N3R	CCGCTGCTCTCCAACAAACAGGAAC	reverse nest gene specific primer

Table 2. Gene information of used for multiple alignment

Gene	Species	Accession number
	<i>Teleostei</i>	
	Pleuronectiformes <i>Paralichthys olivaceus</i>	-
	Cypriniformes <i>Carassius auratus</i>	CAU40754
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	EU571475
	<i>Megalobrama pellegrini</i>	AY247267
	<i>Danio rerio</i>	AF435965
PSS I	Lepidosireniformes <i>Protopterus annectens</i>	AF126243
	Perciformes <i>Epinephelus coioides</i>	AY677120
	<i>Haplochromis burtoni</i>	AY585720
	<i>Siniperca chuatsi</i>	JN034584
	Siluriformes <i>Pelteobagrus vachellii</i>	HQ830200
	<i>Chondrostei</i>	
	Acipenseriformes <i>Acipenser sinensis</i>	FJ792687
	<i>Teleostei</i>	
	Cypriniformes <i>Carassius auratus</i>	CAU60262
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	EU571476
PSS II	Osteoglossiformes <i>Chitala chitala</i>	AY785129
	<i>Gnathonemus petersii</i>	AY785130
	Perciformes <i>Epinephelus coioides</i>	AY677121
	<i>Siniperca chuatsi</i>	JN104627
	Salmoniformes <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM_001124703
	<i>Teleostei</i>	
	Cypriniformes <i>Ctenopharyngodon idella</i>	EU571477
PSS III	Perciformes <i>Epinephelus coioides</i>	AY677122
	<i>Siniperca chuatsi</i>	JN104628
	<i>Chondrostei</i>	
	Acipenseriformes <i>Acipenser sinensis</i>	FJ792688

Table 3. Primer sets used of RT-PCR of PSS I, GH and 18s rRNA in *Paralichthys olivaceus*

Primers	Sequence(5'-3')	Note
PSS I F	CAACAAACAGGAACTGTCTCG	forward primer
PSS I R	TTCTTGCATCCAGCTTTCCT	reverse primer
GH F	TGTCCTCTCAGCCAATCACA	forward primer
GH R	GAGAATCCACCTGCTCCATC	reverse primer
18s rRNA F	AAACGGCTACCACATCCAAG	forward primer
18s rRNA R	CCTCCGACTTTCGTTCTTGA	reverse primer

2. 넙치의 PSS I /GH mRNA 일주기 리듬

1) 실험어

실험어는 양식산 넙치(평균전장 25.2 ± 0.4 cm, 평균체중 153.5 ± 8.5 g) 96마리를 3개의 FRP수조($150 \times 150 \times 150$ cm)에 32마리씩 무작위로 수용하여 명기 12시간과 암기 12시간(12L:12D)의 광조건에서 유수식으로 사육하였다. 3개의 수조는 샘플링 하루 전 두 개의 수조를 각각 연속암기(24D), 연속명기(24L)의 광조건으로 바꾸어 총 3개의 실험구로 구분하였다. 실험기간 동안 수온은 평균 $18.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 였으며 모든 실험구의 실험어들은 6시간 간격으로 4번에 걸쳐 뇌의 시상하부와 뇌하수체들을 적출하였다.

2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

실험 1 에서의 방법과 동일

3) Real-time quantitative RT-PCR

실험에 사용된 primer는 PSS I 과 GH 각각의 염기서열을 참고로 하여 특이적 primer를 제작하였으며(Table 4), Real-time quantitative RT-PCR은 SYBR Premix Ex Taq II kit (Takara)를 사용하였다. cDNA 3 μl 를 template로 하여 SYBR Premix Ex Taq 12.5 μl , primer ste 1.0 μl , nuclease-free water 8.5 μl 를 각각 첨가하여 총 25 μl 의 volume으로 반응하였다. Real time quantitative RT-PCR은 CFX96TM Real-Time System (BIO-RAD, USA)을 이용하였으며, 95 $^\circ\text{C}$ 에서 30초간 initial denaturation, 95 $^\circ\text{C}$ 에서 5초간 denaturation, 60 $^\circ\text{C}$ 에서 30초간 annealing과 elongation 하였으며 40 cycle을 반응시켜 주었다. 각 샘플은 3반복으로 수행되었으며, 18s rRNA를 이용하여 상대정량 하였다.

4) 통계처리

측정값은 SPSS version 17.0을 이용하였으며, ANOVA-test를 실시하여 Duncans's multiple range test (Duncan, 1955)로 측정 평균값끼리의 유의성을 검정하였다.

Table 4. Primer sets used of Real-time quantitative RT-PCR of PSS I, GH and 18s rRNA in *Paralichthys olivaceus*

Primers	Sequence(5'-3')	Note
PSS I F	CAACAAACAGGAACTGTCTCG	forward primer
PSS I R	AGGGAAGTTCTCCTCCTCCA	reverse primer
GH F	TGAGGACCCAGGTTACATCC	forward primer
GH R	GAGAATCCACCTGCTCCATC	reverse primer
18s rRNA F	AAACGGCTACCACATCCAAG	forward primer
18s rRNA R	GGCCTCGAAAGAGTCCTGTA	reverse primer

3. 멜라토닌이 PSS I /GH mRNA 발현에 미치는 영향

1) 실험어

실험어는 양식산 넙치(평균 전장 24.7 ± 0.2 cm, 평균 무게 153.1 ± 3.4 g)를 3개의 수조에 수용하여 유수식 사육 시스템을 이용하여 사육하였으며, 타이머를 이용하여 광주기를 12시간 명기와 12시간 암기(12L:12D)를 일정하게 유지하였고, 실험기간동안 평균수온은 18.0 ± 0.2 °C였다. 멜라토닌 투여 농도는 실험어 체중당 1 mg/kg, 5 mg/kg, 25 mg/kg으로 하였고, 복강주사 하였다. 실험어를 멜라토닌 복강주사 전과 복강주사 후 1시간 경과하였을 때 실험구별로 각각 8마리씩 채집 후 시상하부와 뇌하수체를 적출하였다.

2) cDNA 합성 및 Real-time quantitative RT-PCR

실험 2에서의 방법과 동일

3) 통계처리

실험 2에서의 방법과 동일

4. hCG와 E₂ 투여에 따른 PSS I/GH mRNA 발현

1) 실험어

실험어는 양식산 넙치 60 마리(평균전장 35.8±0.1 cm 평균체중 486.0±6.9 g)를 2 개의 실험구와 1 개의 대조구로 구분하여 3개의 수조에 각각 20마리씩 무작위로 수용하여 유수식 사육 시스템으로 사육하였다. 실험기간동안 수온은 평균 12.3±0.1℃였으며, 광조건은 모든 수조에 12 시간 명기와 12 시간 암기(12L:12D)로 일정하게 유지시켰다.

2) 호르몬 투여와 샘플링

호르몬은 성선자극호르몬인 human chorionic gonadotropin (hCG)와 성스테로이드호르몬인 estradiol-17β (E₂)를 사용하였고, 실험어 체중당 hCG 500 IU/kg), E₂ 10 mg/kg을 근육주사 하였다. 호르몬 주사 전 실험구별로 2마리씩 채집하였고, 호르몬 주사 후 12, 24, 48 시간 경과하였을 때 각각 8마리씩 채집하여 심장하부와 뇌하수체를 적출하여 분석하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

3) cDNA 합성 및 Real-time quantitative RT-PCR

실험 2에서의 방법과 동일

4) 통계처리

실험 2에서의 방법과 동일

III. 결과

1. 넙치 PSS I 유전자의 클로닝과 PSS I /GH cDNA의 조직별 발현

1) 넙치에서의 PSS I cDNA 분리 및 상동성 비교

넙치의 시상하부 조직을 대상으로 PSS I cDNA를 분리하여 염기서열을 분석한 결과 총 638 bp 길이의 염기서열을 확인하였다. PSS I의 open reading frame (ORF) 길이는 363 bp (120 aa)이었으며, 5' UTR과 3' UTR의 길이는 각각 96 bp와 179 bp였다. 또한 26개의 signal peptide 아미노산 염기서열을 확인하였으며, C-말단에서 SS-14- I의 14개 아미노산 염기서열을 확인하였다 (Fig. 2).

넙치에서 확인된 PSS I cDNA와 다른 어종간의 아미노산 상동성 분석 결과 농어목의 어류와 높은 상동성을 보였으며, 시클리과(Cichlidae)의 *Haplochromis burtoni* 와 86.0%로 가장 높은 상동성을 보였다(Table 5). PSS I의 중간 계통 유연관계를 분석한 결과 *Haplochromis burtoni* 와 가장 인접한 유연관계에 있었다(Fig. 3).

2) 넙치 PSS I/GH mRNA의 조직별 발현

넙치의 중추신경조직과 주변조직에서 PSS I 과 GH mRNA의 발현을 RT-PCR을 통하여 확인한 결과 PSS I 은 신경조직에서 단뇌와 시상하부에서 뚜렷하게 발현되는 것을 확인하였다. 또한 시계에서도 발현이 확인되었고, 주변조직인 생식소에서도 발현이 확인되었으나 발현정도가 매우 미약하였다(Fig. 4). GH는 신경조직에서는 오직 뇌하수체에서만 뚜렷하였으며, 주변조직에서는 생식소에서만 매우 미약하게 발현하였다(Fig. 4).

Table 5. Overall amino acid identities of PSS I between *Paralichthys olivaceus* and other fishes

	Species	PSS I Homology(%)
<i>Teleostei</i>		
Perciformes	<i>Haplochromis burtoni</i>	86.0
	<i>Epinephelus coioides</i>	85.0
	<i>Siniperca chuatsi</i>	85.0
Cypriniformes	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	54.0
	<i>Megalobrama pellegrini</i>	53.0
	<i>Danio rerio</i>	53.0
	<i>Carassius auratus</i>	52.0
Lepidosireniformes	<i>Protopterus annectens</i>	42.0
	<i>Pelteobagrus vachellii</i>	41.0
<i>Chondrostei</i>		
Acipenseriformes	<i>Acipenser sinensis</i>	45.0

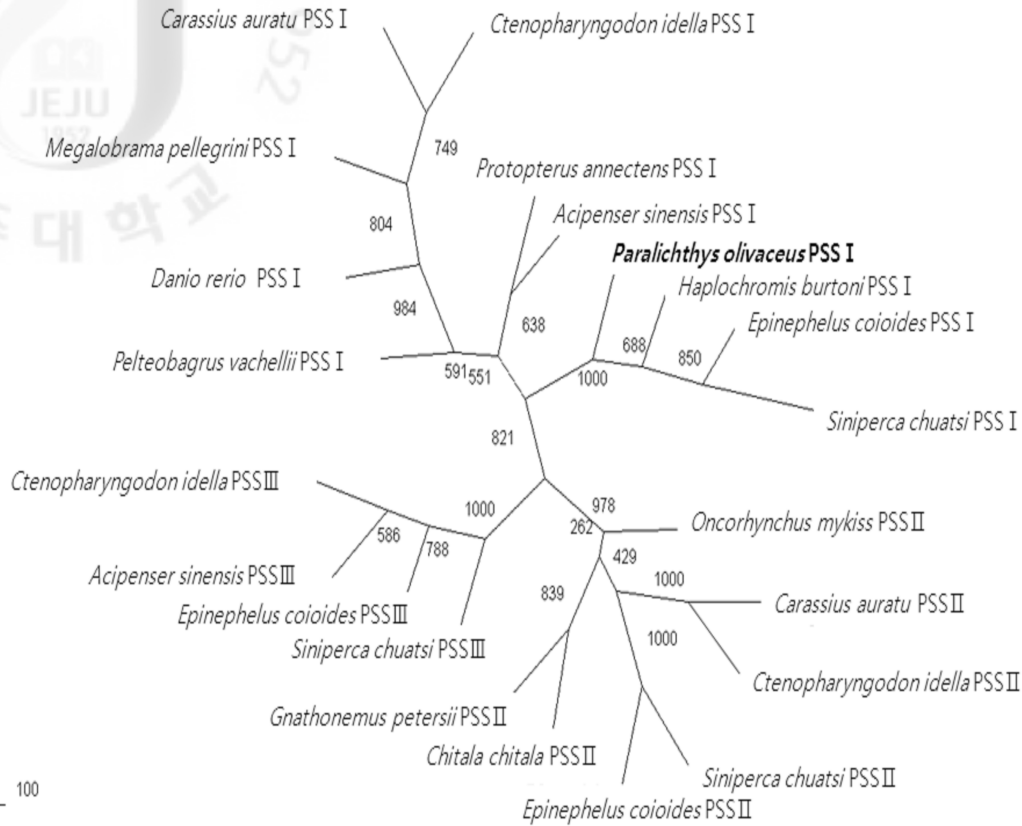


Fig. 3. Phylogenetic relationship of PSS I between *Paralichthys olivaceus* and other fishes. Thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes.

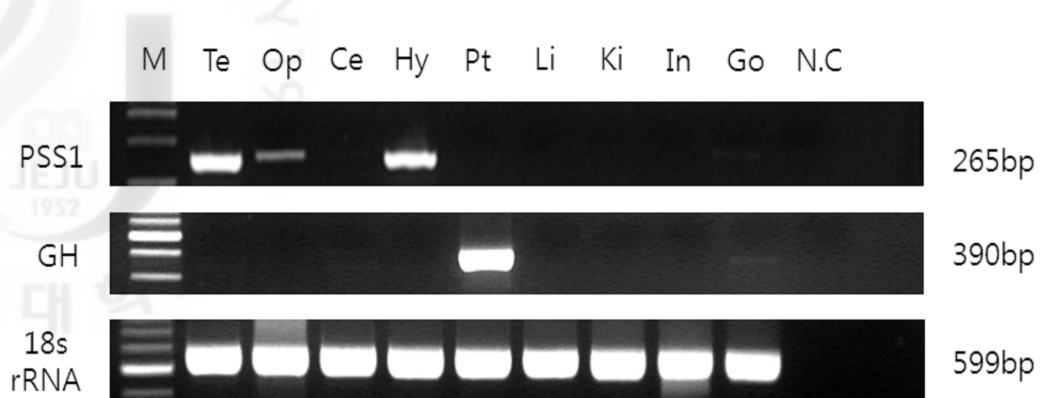


Fig. 4. Tissue specific expression of *Paralichthys olivaceus* PSS I and GH in nerves and peripheral tissue by RT-PCR. 18s rRNA was amplified at the same conditions as a positive control in sample. Negative control for PCR which were performed with sterile water as template. M; 100 bp DNA ladder marker, Te; Telencephalon, Op; Optic tectum, Ce; Cerebellum, Hy; Hypothalamus, Pt; Pituitary, Li; Liver, Ki; Kidney, In; Intestine, Go; Gonad, N.C; Negative control.

2. 녁치의 PSS I /GH mRNA 일주기 리듬

실험어는 각각 12L:12D, 24D, 24L의 광조건으로 실험이 진행되었다. 광주기 12L:12D 조건에서 PSS I 은 명기시기의 9시와 15시에서 높게 발현하였으며, 암기의 21시부터 발현이 낮아지기 시작하여 3시에는 유의적으로 가장 낮은 발현을 보여, PSS I 이 암기에서보다 명기에서 높은 발현을 보이는 일주기 리듬을 확인하였다(Fig. 5A). GH의 경우 모든 시간대에서 유의적인 차이는 없었으나 PSS I 과는 반대로 암기에서 높은 발현경향을 보였다(Fig. 6A). 24시간 암기 조건에서 PSS I 은 9시부터 15시까지 감소하는 경향을 보이다 21시에 유의적으로 낮게 발현하였으며, 이 후에 반대로 발현이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5B). 하지만 GH는 모든 시간대에서 특이적인 발현양상을 확인 할 수 없었다(Fig. 6B). 24시간 명기에서는 PSS I 과 GH 모두 특이적인 발현변화를 확인할 수 없었다(Fig. 5C, 6C).

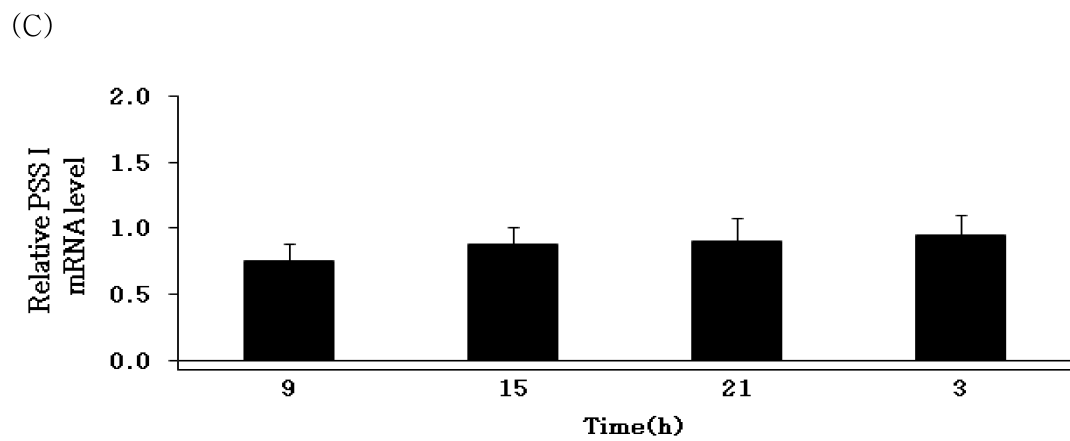
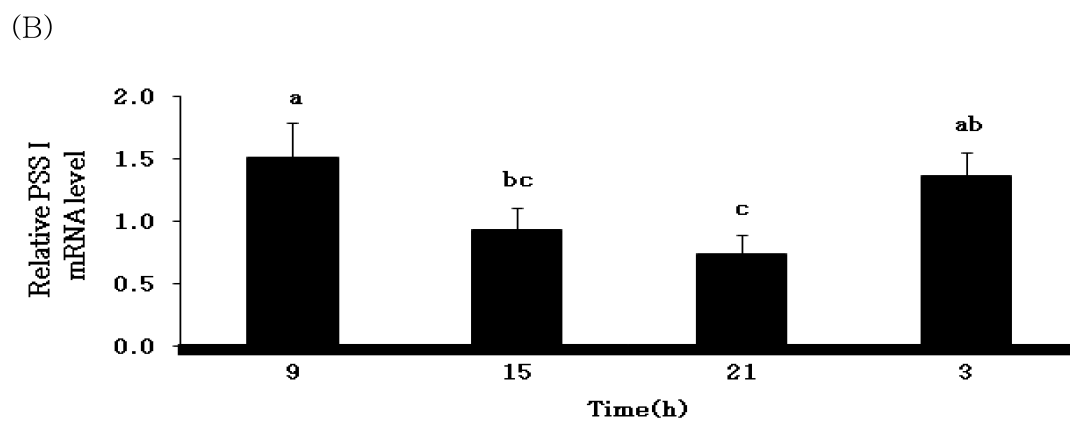
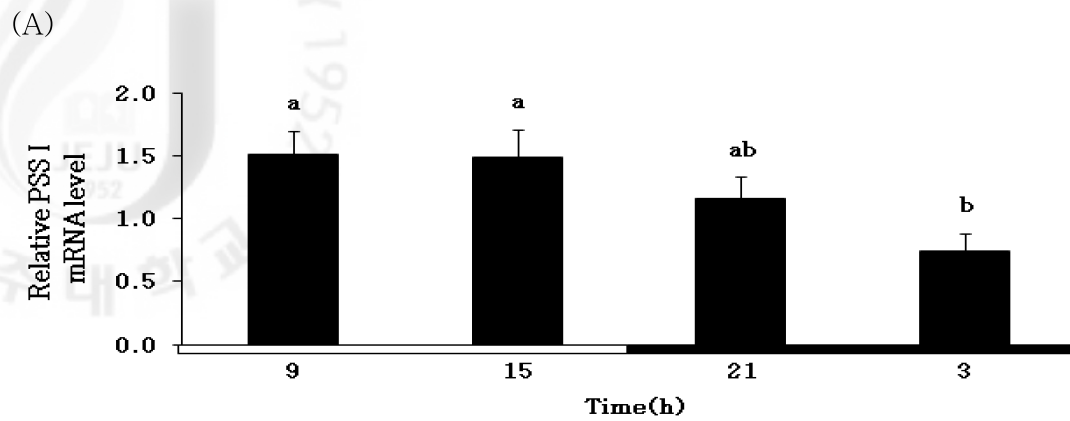


Fig. 5. PSS1 mRNA levels in the hypothalamus of *Paralichthys olivaceus* under 12L:12D (A), 24D (B), 24L (C) condition. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). Values are mean \pm S.E.

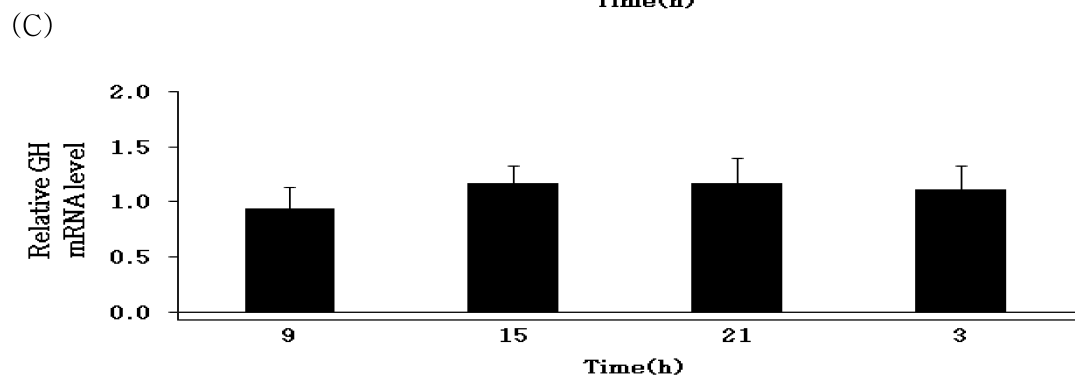
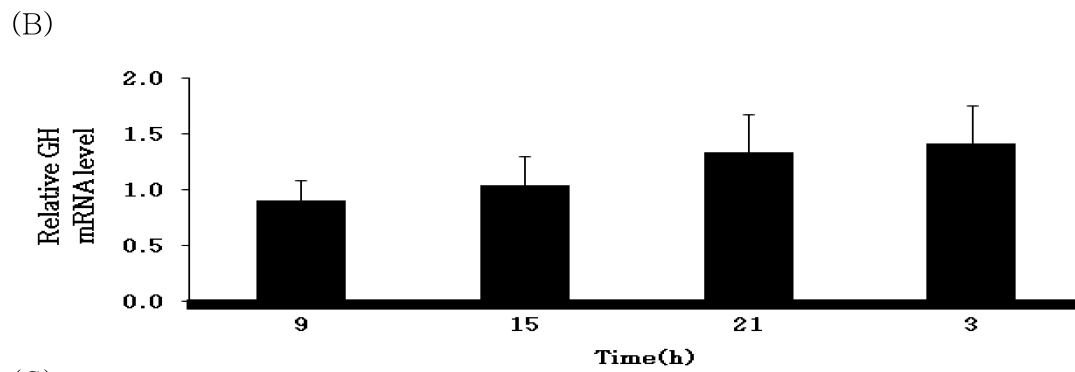
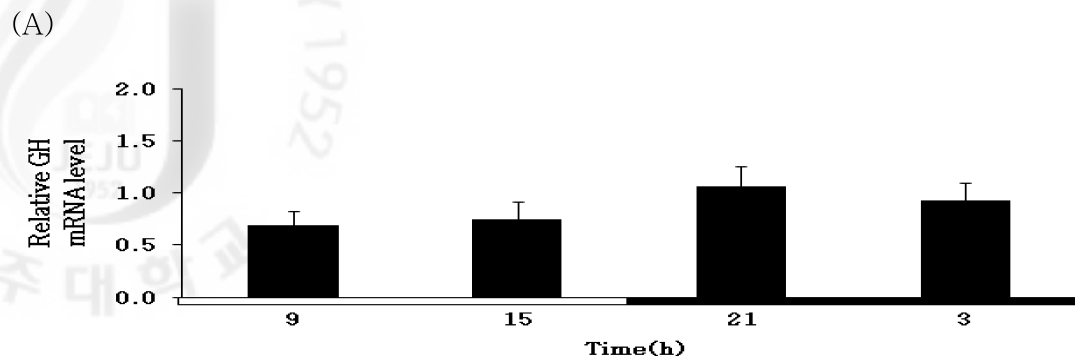


Fig. 6. GH mRNA levels in the pituitary of *Paralichthys olivaceus* under 12L:12D (A), 24D (B), 24L (C) condition. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). Values are mean \pm S.E.

3. 멜라토닌이 PSS I /GH mRNA 발현에 미치는 영향

넙치에서 멜라토닌에 의한 시상하부 PSS I 과 뇌하수체 GH mRNA의 발현 변화를 조사하였다. PSS I 의 경우 대조구와 비교했을 때 멜라토닌 1 mg/kg 처리구에서는 특이적인 발현변화를 확인 할 수 없었으며, 5 mg/kg 그룹에서 PSS I 이 유의적으로 높은 발현을 나타냈으나, 멜라토닌 25 mg/kg 처리구에서는 PSS I 의 발현이 다시 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7A). GH는 멜라토닌 1 mg/kg 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 높은 발현이 나타났으며, 멜라토닌 25 mg/kg 그룹에서는 발현이 감소하는 경향을 보였으나 대조구와 유의차는 없었다(Fig. 7B).

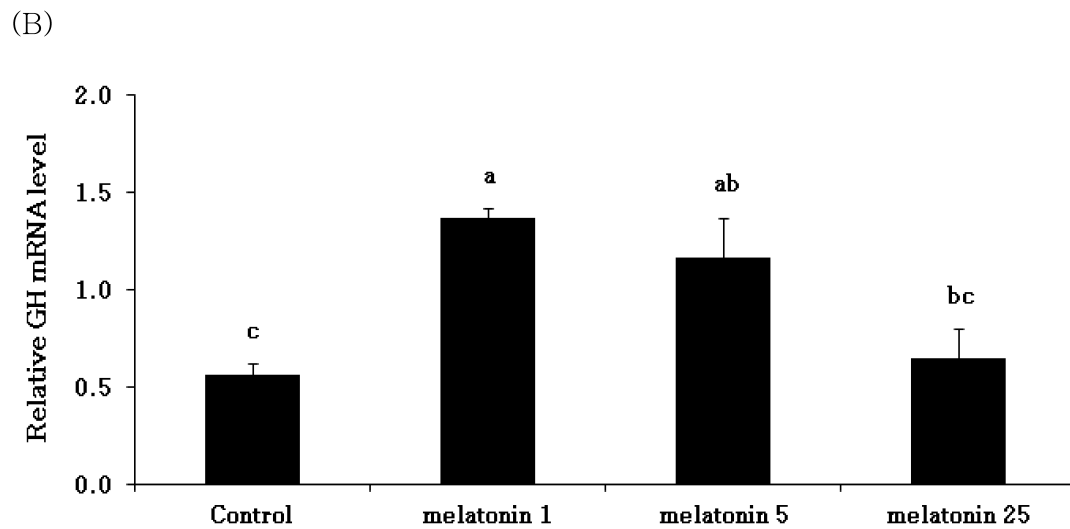
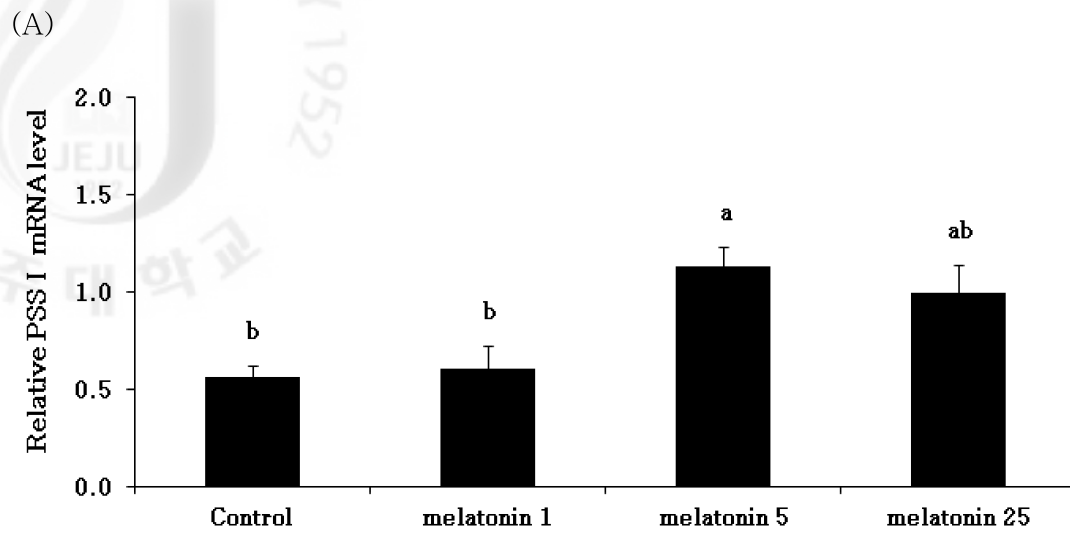


Fig. 7. Expression of PSS I (A) and GH (B) mRNA in *Paralichthys olivaceus* by melatonin injection (1, 5, 25 mg/ BW kg). Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). Values are mean \pm S.E.

4. hCG와 E₂ 투여에 따른 PSS I/GH mRNA 발현

성선자극호르몬인 human chorionic gonadotropin (hCG)와 성스테로이드호르몬 estradiol-17 β (E₂) 투여에 의한 넵치의 PSS I 과 GH mRNA 발현량의 시간별 변화를 조사하였다. hCG 호르몬 주사 후 PSS I mRNA는 24 시간까지 대조구와 유사한 발현을 보였으며, 주사 후 48 시간째에 유의적으로 높은 발현을 나타냈다(Fig. 8A). GH mRNA의 경우 PSS I mRNA의 발현과 비슷하여 24 시간까지는 변화 차이가 없었으며, 48 시간째에서 유의적으로 높은 발현을 보였다(Fig. 8B).

E₂ 호르몬 주사실험 결과 PSS I mRNA는 주사 후 시간이 지남에 따라 발현이 서서히 증가하는 경향을 보이다 48 시간째에 유의적으로 높은 발현을 보임으로써 hCG 호르몬 주사실험 결과와 동일한 결과를 보였다(Fig. 9A). 하지만 GH mRNA는 E₂ 호르몬 주사 후 시간이 지나도 특이적인 발현 변화를 확인 할 수 없었다(Fig. 9B).

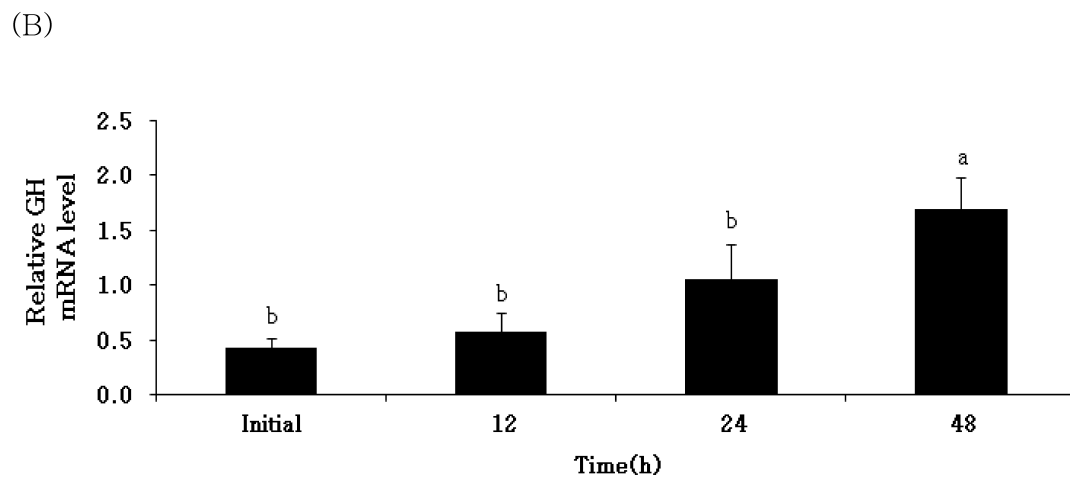
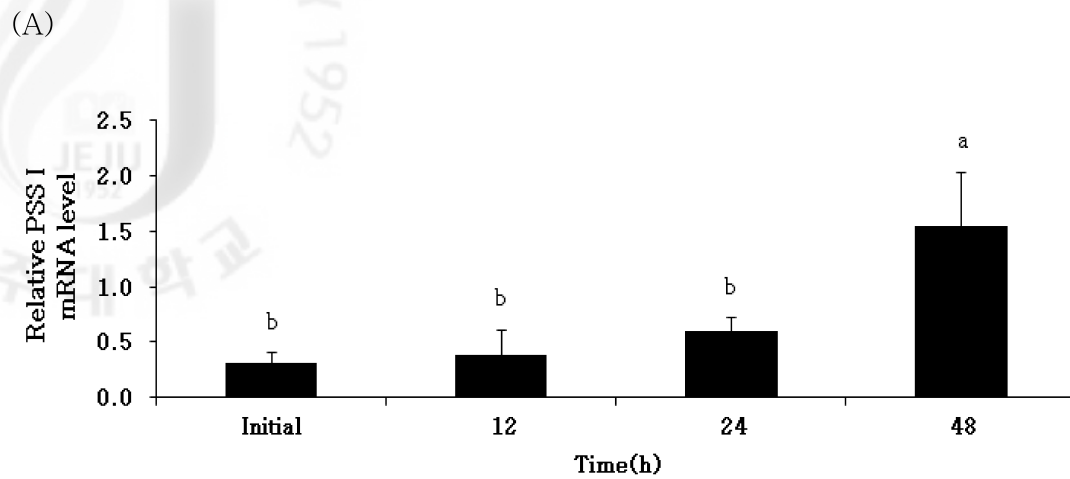


Fig. 8. Expression of PSS I (A) and GH (B) mRNA in *Paralichthys olivaceus* by human chorionic gonadotropin (hCG, 500 IU/kg) injection. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). Values are mean \pm S.E.

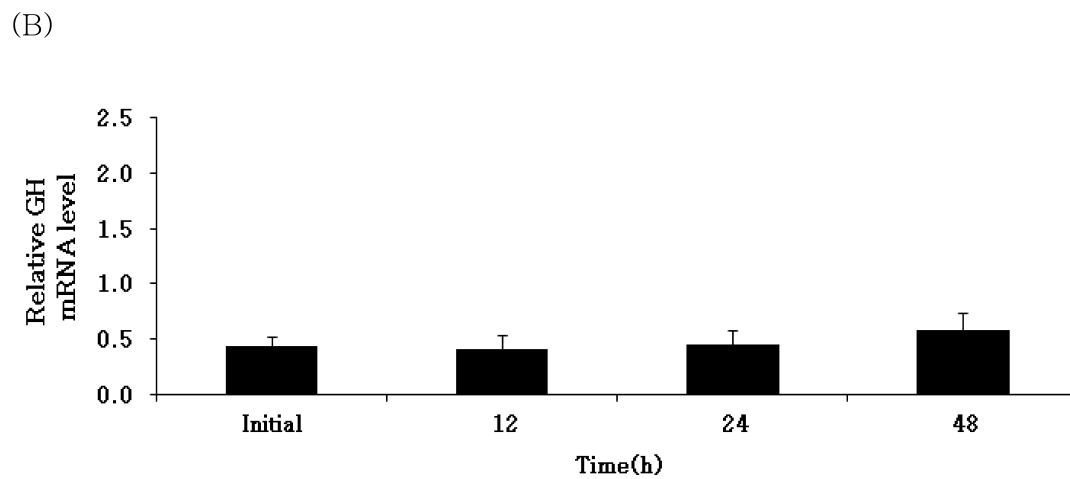
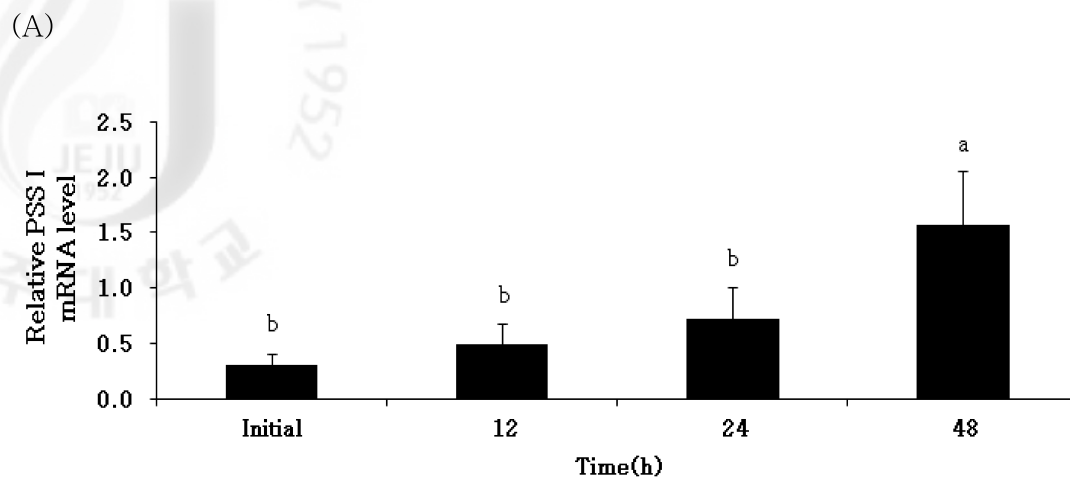


Fig. 9. Expression of PSS I (A) and GH (B) mRNA in *Paralichthys olivaceus* by estradiol-17 β (E₂, 10 mg/kg) injection. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). Values are mean \pm S.E.

IV. 고찰

1. 넙치 PSS I 유전자의 클로닝과 PSS I /GH cDNA의 조직별 발현

이 연구에서 넙치 PSS I 유전자를 클로닝 한 후 염기서열 분석결과 총 638 bp의 길이로 구성되었으며, PSS I 유전자가 SS-14- I의 전구체임을 확인 할 수 있는 C-말단에서 14개의 아미노산 염기서열을 확인할 수 있었다.

척추동물에 있어서 PSS I은 시상하부를 포함하는 뇌의 중추신경계에서 발현되고 뇌하수체에서의 GH의 분비를 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다(Brazeau et al., 1973). 어류에 있어서 PSS I이 무지개송어와 금붕어, 대서양대구 등에서 뇌의 중추신경계의 대부분에서 발현이 확인되며(Kittilson et al., 1999; Lin et al., 1999; Xu and Volkoff., 2009), 주변조직에서에서도 발현이 확인되어 다양한 생리적 작용에 관여하는 것으로 알려진다(Patel, 1999; Lin and Peter, 2001). 이 실험에서 넙치 PSS I은 뇌의 중추신경조직에서 단뇌와 시개, 시상하부에서의 발현을 확인하였고, 주변조직에서는 오직 생식소에서만 발현이 확인되었다. 이 결과는 바리과인 갈색등근바리에서 PSS I이 중추신경조직에서의 발현뿐만 아니라 주변조직인 생식소에서도 발현결과(Ye et al., 2005; Li et al., 2009)와 유사함을 알 수 있었다.

GH는 뇌하수체에서 주로 발현되지만 주변조직에서도 발현이 확인된다. 무지개송어의 경우 뇌하수체에서의 발현 이외에도 아가미나 심장, 신장, 간, 생식소 등과 같은 주변조직에서도 발현되는 것으로 알려져 있으며, 갈색등근바리에 있어서도 비장, 생식소에서 GH의 발현이 확인되었다(Yang et al., 1999; Li et al., 2005). 이 실험에서도 넙치의 뇌하수체에서 GH의 발현이 뚜렷하게 확인 할 수 있었으며, 주변조직에서는 생식소에서만 발현이 확인되었다.

이상의 결과에서 넙치의 PSS I과 GH mRNA는 각각 시상하부와 뇌하수체에서 높은 발현을 나타내었으며, 각각의 유전자가 성장 촉진 및 억제 작용에 관여 할 것이라 생각된다. 또한 PSS I은 단뇌와 시개에서도 발현을 하는 것으로 보아 중추신경계에서 신경조절자 또는 신경전달자로서의 기능을 수행하는 것으로 생각

되며, PSS I 과 GH 모두 주변조직인 생식소에서 발현이 확인되는 것으로 보아 생식소의 발달 및 성성숙과 같은 번식작용에도 관여하는 것으로 사료된다.

2. 넙치의 PSS I /GH mRNA 일주기 리듬

대부분의 생물들은 일정한 생활 패턴을 가지며 살아간다. 이러한 생물학적 리듬은 빛, 온도, 먹이섭이 등과 같은 외부환경에 의해 영향을 받으며, 내분비시스템을 자극하여 다양한 호르몬들의 분비를 조절한다.

이 실험에서 광주기를 조절하여 넙치를 대상으로 somatstatin (SS)의 전구체인 PSS I 와 GH의 일주기 리듬을 조사한 결과 PSS I 은 광주기 12L:12D 조건에서 암기에서보다 명기에서 유의적으로 높은 발현을 보이는 일주기 리듬을 확인하였다. 또한 24D 조건에서 circadian 리듬을 확인 할 수 있었다. 하지만 circadian 리듬은 12L:12D 조건에서와 동일시간대의 발현패턴을 보이지 않았으며, 이는 12L:12D 조건에서 24D 조건으로 넘어가는 단계에서 phase shifting 현상이 일어난 것으로 사료된다. SS의 리듬에 관한 연구는 쥐를 이용하여 다소 이루어졌지만(Fukuhara et al., 1993; Holloway et al., 1994; Takeuchi et al., 1992), 어류에서는 거의 연구가 미비한 실정이다. 쥐의 시교차상핵에서 밝혀진 PSS I mRNA의 리듬 역시 낮에 높은 일주기 리듬이 확인되었으며, 빛이 전혀 없는 환경으로 전환되어서도 일정한 리듬을 보이는 circadian 리듬이 확인되었다(Nishiwaki et al., 1995). 하지만 빛을 감지할 수 없는 쥐를 대상으로 한 실험에서도 마찬가지로 비슷한 패턴의 유전자 발현이 확인됨으로서(Yang et al., 1994), PSS I 과 빛과의 관계는 더욱 연구가 필요할 것으로 생각된다.

어류에 있어서 GH 분비의 일주기 및 circadian 리듬은 무지개송어와 금붕어를 통하여 밝혀졌다(Reddy and Leatherland, 1994; Gomez et al., 1996; Canosa and Peter, 2005). 하지만 GH의 리듬이 항상 일정하게 관찰되지는 않는다. 금붕어와 치누크연어(chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*)의 혈중 GH level 분석 결과 일정한 일주기 리듬이 관찰되지 않으며(Le Bail et al., 1991), 무지개송어의 경우 낮 시간동안 한번 또는 다수의 최대치의 높은 발현을 보이기도 한다(Niu et al., 1993). 이 연구에서 광주기 조절에 의한 넙치 GH mRNA의 발현 결과 GH는 모든 광주기 조건에서 유의적으로 특이한 발현리듬을 확인 할 수 없었다. 하지만 12L:12D의 조건에서 GH는 PSS I 과는 반대로 명기에서보다 암기에서 다소 발현량이 증가하는 경향을 나타내었다. 독가시치(rabbitfish,

Siganus guttatus)의 뇌하수체에서 GH 발현을 조사한 연구에서 암기보다 명기에서 높은 발현을 보이는 일주기 리듬이 확인되고 있다(Ayson and Takemura., 2006). 넙치에서 GH mRNA의 일주기 리듬에 대한 연구는 추후 세심한 연구가 필요하다고 사료된다.

이상의 결과에서 넙치의 PSS I mRNA는 광주기 조절에 의한 주행성의 일주기 리듬과 circadian 리듬을 확인하였다. 반면 GH mRNA는 어떠한 광주기 조절에 있어서도 유의적인 발현차이를 보이지 않았다. 하지만 광주기 12L:12D 조건에 있어서 유의적인 차이는 없지만 암기에서 다소 발현량이 증가하고 PSS I의 발현패턴과 반대되는 경향을 보였다. 이는 GH의 일주기 리듬 또는 PSS I 발현에 의한 GH 발현 억제작용으로 인한 결과로 사료된다.

3. 멜라토닌이 PSS I/GH mRNA 발현에 미치는 영향

빛과 수온, 먹이 같은 외부환경은 어류의 성장에 영향을 미치며, 특히 광주기에 의해 성장이 계절적인 차이를 보이며(Boeuf and Falcón, 2001), 인위적인 광주기 조절을 통하여 대서양넙치(Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L.), 무지개송어 등에서 성장을 조절 할 수 있다(Norberg et al., 2001; Moustakas et al., 2004; Taylor et al., 2005).

멜라토닌은 빛에 의해 분비가 조절되는 대표적인 호르몬으로서 생물의 행동과 발달에 있어서 주기적인 생물학적 시계를 조절하는 호르몬이다. 멜라토닌은 어류에 있어서 수온감지, 삼투압, 회유, 먹이섭이, 생식과 성장 등 다양한 생리적작용에 관여하는 것으로 알려져 있다(Falcón et al., 2007a; Falcón et al., 2010). 또한 멜라토닌은 금붕어와 대서양연어(atlantic salmon, *Salmo salar*)에서 체중 증가 유도 작용을 한다(De Vlaming, 1980; Poter et al., 1998). 하지만 이와 대조적으로 멜라토닌이 체중과 성장률이 감소시키고(Taylor et al., 2005), 먹이섭이에 관여하여 먹이섭이율을 감소시키는 결과를 나타내기도 한다(Rubio Sánchez-Vázquez, 2004; López-Oleda et al., 2006; De Pedro et al., 2008). 그리고 멜라토닌은 무지개송어에서 시상하부에서 뇌하수체로 이어지는 hypothalamo-pituitary 축에 영향을 미쳐 다양한 내분비시스템을 조절하고, 뇌하수체호르몬인 GH 역시 멜라토닌에 의해 분비가 조절되는 것으로 알려져 있다(Falcón et al., 2003).

이 연구에서는 앞선 연구에서 광주기 조절에 의한 PSS I 과 GH mRNA의 발현 차이가 빛을 감지하여 분비되는 멜라토닌에 의한 작용인지를 알아보기 위해 수행되었다. 멜라토닌 감수성 실험을 위하여 멜라토닌을 넙치 체중당 각각 1, 5, 25 mg/kg의 농도로 주사하였다. 그 결과 PSS I 은 멜라토닌 5 mg/kg 처리구에서 유의적으로 높은 발현을 보였으며, GH는 1 mg/kg 처리구에서 유의적으로 높은 발현을 보였다. 어류를 대상으로 PSS I 과 멜라토닌에 관한 연구는 미흡한 실정이나, 포유류에 있어서 광주기에 의한 PSS I 발현 조사에서 PSS I 이 일주기 리듬을 갖는다고 알려져 있다(Nishiwaki et al., 1995). 앞선 연구에서 PSS I 은 광주기에 의한 일주기 리듬을 보였으며, 이 실험에서 PSS I 은 멜라토닌 5 mg/kg

처리구에서 유의적으로 높은 발현을 보여 멜라토닌이 PSS I 발현 조절에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 다만 GH와 비교했을 때 멜라토닌에 대한 감수성은 다소 떨어졌다. 반면 GH는 멜라토닌 1 mg/kg처리구에서 유의적으로 높은 발현을 보여 PSS I 보다는 멜라토닌에 대한 감수성이 높은 것을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 넙치 뇌하수체의 GH mRNA는 외부의 빛 정보에 의해 낮 보다 밤에 그 분비가 증가하는 멜라토닌 호르몬을 통해 조절됨을 확인하였다. 반면 멜라토닌의 감수성이 상대적으로 약한 PSS I mRNA는 외부의 빛 정보에 대해서 멜라토닌이 아닌 다른 생체리듬조절인자를 통해 조절될 것이라 생각되나 추후 연구가 필요하다고 사료된다.

4. hCG와 E₂ 투여에 따른 PSS I/GH mRNA 발현

포유류에 있어서 성스테로이드호르몬인 estrogen이 시상하부의 SS 분비를 조절한다는 사실이 알려졌으며, 암컷 양에서 estradiol-17 β (E₂)처리 후 시상하부와 생식소에서 PSS I mRNA의 발현이 증가하였고(Pillon et al., 2004), 쥐에 있어서도 E₂가 시상하부에서의 PSS 유전자 발현을 자극하였다(Zorrilla et al., 1990). 하지만 어류에 있어서는 estrogen에 의한 PSS 조절에 관한 연구는 아직 불분명하며, 호르몬에 의해 다양한 발현 패턴을 보인다(Nelson and Sheridan, 2005). 무지개송어는 E₂를 주사한 경우 시상하부에서의 PSS I 과 PSSII의 발현이 억제되었으나, 금붕어의 경우 PSS I 과 PSSIII는 E₂에 의해 증가하였으며, 갈색등근바리에서는 PSS I 이 증가하여 어종에 따라 다양한 발현패턴을 보였다(Holloway et al., 2000; Canosa et al., 2002; Zhang et al., 2009).

어류에 있어서 GH의 분비는 뚜렷한 계절적인 경향을 보이며, 성스테로이드 호르몬이 증가하는 성적 성숙시기에 GH의 분비가 증가한다(Marchant and Peter, 1986; Einarsdottir et al., 2002). 이러한 GH 분비변화는 생식소 발달시기에 분비되는 성스테로이드 호르몬에 의한 것으로 금붕어와 틸라피아, 무지개송어에 있어서 E₂를 처리했을 때 혈중 GH의 양이 증가하였다(Trudeau et al., 1992; Melamed et al., 1995; Holloway and Leatherland, 1997; Canosa et al., 2002). 하지만 이와 대조적으로 금붕어나 Fathead minnow (*Pimephales promelas*)에서는 E₂가 뇌하수체에서의 GH mRNA 발현에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 알려져(Zou et al., 1997; Filby et al., 2006), 성스테로이드 호르몬과 GH 합성조절작용에 대해서는 아직까지 불분명한 상황이다.

이 연구에서는 넙치의 성성숙에 있어서 PSS I 과 GH 유전자의 연관성을 알아보기 위해 성선자극호르몬인 chorionic gonadotropin (hCG)와 성스테로이드호르몬 E₂를 주사하여 각각의 유전자 발현거동을 조사하였다. 그 결과 hCG처리구에서는 PSS I 과 GH mRNA 모두 48시간째에 증가하였고, E₂처리구에서 PSS I 은 48시간째 증가하였지만, GH는 시간이 지나도 아무런 발현변화를 확인할 수 없었다.

이 실험 결과 외적인 hCG 처리는 시상하부 PSS I mRNA와 뇌하수체 GH

mRNA 모두 영향을 미치지만, E₂는 시상하부 PSS I mRNA에만 영향을 미치고 뇌하수체 GH mRNA의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 또한 뇌하수체의 성숙과 PSS I 과 GH 유전자의 연관성에 대한 연구는 추후 실험어의 계절별 또는 생식소 발달단계에 따른 실험이 필요할 것으로 사료된다.

V. 요약

어류에 있어서 Growth hormone (GH)는 성장 이외에도 먹이섭이, 생식, 그리고 삼투압 등에 관여한다. Preprosomatostatin (PSS)은 뇌의 시상하부에서 분비되는 호르몬으로 뇌하수체에서 GH의 분비를 억제하는 역할을 한다. PSS는 중추신경뿐만 아니라 주변조직에서도 넓게 작용하며 섭이활동, 소화, 생식 그리고 해수적응 등의 다양한 생리적 역할에 관여한다. 하지만 PSS는 주로 포유류를 대상으로 연구가 이루어졌으며, 어류에서의 생리적 역할에 대해서는 현재까지 불분명한 점이 많다. 이 연구는 넙치를 대상으로 GH와 PSS의 발현특성을 조사하기 위해 PSS I 유전자 클로닝을 실시하였고, 두 유전자의 조직별 발현과 일주기 리듬을 조사하였다. 또한 생물 체내의 빛 신호전달 호르몬인 멜라토닌과 성선자극호르몬 human chorionic gonadotropin (hCG), 성스테로이드 호르몬 estradiol-17 β (E₂)를 주사하여 각 호르몬이 PSS I 과 GH 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

넙치의 시상하부에서 추출한 PSS I 의 cDNA는 총 638 bp의 염기서열을 가지며, 다른 어종간 아미노산 유연관계 분석결과 약 41~86%의 상동성을 보였다. 조직별 발현 분석결과에서 PSS I 은 단뇌와 시상하부에서 발현이 높았으며, GH는 뇌하수체에서 뚜렷한 발현을 보였다.

PSS I 과 GH 발현의 생체리듬을 조사하기 위해 실험어는 광주기 조건을 명기 12시간과 암기 12시간(12L:12D), 24시간 연속암기(24D), 24시간 연속 명기(24L) 연속명기의 조건으로 구분하여 조사 하였다. 그 결과 12L:12D 조건에서 PSS I 은 암기에서보다 명기에서 발현이 높은 일주기 리듬을 확인하였으며 24D 조건에서도 12L:12D 조건에서의 변동과 유사한 circadian 리듬을 확인하였다. GH의 경우 모든 조건에서 유의적인 발현차이는 없었으나 12L:12D, 24D 조건에서 PSS I 과 반대의 발현경향을 확인할 수 있었다.

멜라토닌 주사실험에서 실험구는 멜라토닌의 농도별로 각각 1, 5, 25 mg/kg으로 처리되었다. 실험결과 PSS I mRNA는 5 mg/kg, GH mRNA는 1 mg/kg에서 높은 발현을 보였으며, GH mRNA가 PSS I mRNA에 비해 상대적으로 멜라토닌에 대

한 감수성이 높았다.

성선자극호르몬과 성스테로이드호르몬 주사결과 hCG (500 IU/kg)는 PSS I 과 GH mRNA의 발현을 증가시키는 결과를 보였으며, E₂ (10 mg/kg)는 PSS I mRNA의 발현은 증가시켰지만 GH mRNA의 발현에는 아무런 영향을 미치지 못하였다.

이러한 결과들에서 넙치의 PSS I mRNA의 발현변동이 24시간의 일정한 일주기 리듬을 가지는 것을 확인할 수 있었지만, GH mRNA는 정확한 리듬을 확인할 수 없었다. 특히 PSS I mRNA의 발현은 외부의 명암변화와 생물 자체가 지니는 생체시계에 의해 조절되며, GH mRNA는 외부의 명암변화에 대해 멜라토닌을 통하여 발현이 조절되는 것으로 사료된다. 또한 PSS I 과 GH mRNA의 발현은 넙치의 성성숙에 대해서도 관여하는 것으로 추측되어진다.

참고 문헌

- Andrews, P.C., Pubols, M.H., Hermodson, M.A., Shears, B.T., Dixon, J.E., 1988. Isolation and characterization of a variant somatostatin-14 and two related somatostatins of 34 and 37 residues from lamprey (*Petromyzon marinus*). J. Biol. Chem. 263, 15809-15814.
- 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.
- Ayson, F.G., Takemura, A., 2006. Daily expression patterns for mRNAs of GH, PRL, SL, IGF-I and IFG-II in juvenile rabbitfish, *Siganus guttatus*, during 24-h light and dark cycles. Gen. Comp. Endocrinol. 149, 261-268.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R., 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science 179, 77-79.
- Boeuf, G., Falcón, J., 2001. Photoperiod and growth in fish. Vie Milieu-Life Environ. 51. 247-266.
- Canosa, L.F., Peter, R.E., 2005. Pre-pro-somatostatin-III may have cortistantin-like functions in fish.
- Canosa, L.F., Chang, J.P., Peter, R.E., 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 151, 1-26.
- Canosa, L.F., Lin, X., Peter, R.E., 2002. Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. Neuroendocrinology 76, 8-17.
- Copeland, K.C., Nair, K.S., 1994. Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 78,

- 1040-1047.
- Corin, R.E., Guller, S., Wu, K.T., Sonenberg, M., 1990. Growth hormone and adipose differentiation: growth hormone-induced antimitogenic state in 3T3-F442A preadipose cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7507-7511.
- De Pedro, N., Marinez-Álvarez, R.M., Delgado, M.J., 2008. Melatonin reduces body weight in goldfish (*Carassius auratus*): effects on metabolic resources and some feeding regulators. *J. Pineal Res.* 45, 32-39.
- De Vlaming, V.L., 1980. Effect of pinealectomy and melatonin treatment on growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 40, 245-250.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple-range test and multiple F test. *Biometrics*, 11 : 1-42
- Einarsdottir, I.E., Sakata, S., Björnsson, B.T., 2002. Atlantic halibut growth hormone: structure and plasma levels of sexually mature males and females during photoperiod-regulated annual cycles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127, 94-104.
- Ekstrom, P. and Meissl, H., 1997. The pineal organ of teleost fishes. *Rev. fish Biol. fish.* 7, 199-284.
- Falcón, J., 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol* 58, 121-162.
- Falcón, J., Besseau, L., Fazzari, D., Attia, J., Gaildrat, P., Beauchaud, M., Boeuf, G., 2003. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* 144 (10), 4648-4658.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S., Boeuf, G., 2007a. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 81-88.

- Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J.A., Carrillo, M., 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 469-482.
- Filby, A.L., Thorpe, K.L., Tyler, C.R., 2006. Multiple molecular effect pathways of an environmental oestrogen in fish. *J. Mol. Endocrinol.* 37, 121-134.
- Fukuhara, C., Shinohara, K., Tominaga, K., Otori, Y., Inoue, S.-I.T., 1993. Endogenous circadian rhythmicity of somatostatin like immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 606, 28-35.
- Gomez, J.M., Boujard, T., Fostier, A., Le Bail, P.Y., 1996. Characterization of growth hormone nycthemeral plasma profiles in catheterized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* 274, 171-180.
- Holloway, A.C., Melroe, G.T., Ehrman, M.M., Reddy, P.K., Leatherland, J.F., Sheridan, M.A., 2000. Effect of 17β -estradiol on the expression of somatostatin genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol.* 279, R389-R393.
- Holloway, A.C., Leatherland, J.F., 1997. Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 246-254.
- Holloway, A.C., Reddy, P.K., Sheridan, M.A., Leatherland, J.F., 1994. Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormones, cortisol, and glucose concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. *Biol. Rhythm Res.* 25, 415-432.
- Holstein, B., Cederberg, C., 1988. Effect of somatostatin on basal and stimulated gastric secretion in the cod, *Gadus morhua*. *Am. J. Physiol.* 254, G183-G188.

- Kittilson, J.D., Moore, C.A., Sheridan, M.A., 1999. Polygenic expression of somatostatin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: evidence of a preprosomatostatin encoding somatostatin-14. *Gen. Comp. Endocr.* 114, 88-96.
- Le Bail, P.Y., Sumpter, J.P., Carragher, J.F., Mourot, B., Niu, P.D., Weil, C., 1991. Development and validation of a highly sensitive radioimmunoassay for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 75-85.
- Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C., 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 219-232.
- Li, C.H., Wei, Q.W., Zhou, L., Cao, H., Zhanj, Y., Gui, J.H., 2009. Molecular and expression characterization of two somatostatin genes in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 154, 127-134.
- Li, W.S., Chen, D., Wong, A.O.L., Lin, H.R., 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 144, 78-89.
- Lin, X.W., Otto, C.J., Peter, R.E., 1999. Expression of three distinct somatostatin messenger ribonucleic acids (mRNAs) in goldfish brain: characterization of the complementary deoxyribonucleic acids, distribution and seasonal variation of the mRNAs, and action of a somatostatin-14 variant. *Endocrinology* 140, 2089-2099.
- Lin, X.W., Peter, R.E., 2001. Somatostatins and their receptors in fish. *Comp. Biochem. Phys.* 129B, 543-550.
- López-Olmeda, J.F., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2006. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: diurnal (goldfish) and nocturnal (tench).

- Comp. Biochem. Physiol. A 144, 180-187.
- Marchant, T.A., Peter, R.E., 1989. Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish, *Carassius auratus*. Fish Physiol. Biochem. 7, 133-139.
- Marchant, T.A., Peter, R.E., 1986. Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. J. Exp. Zool. 237, 231-239.
- Moustakas, C.T., Watanabe, W. O., Copeland, K.A., 2004. Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival and osmoregulatory ability of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma*. Aquaculture. 229, 159-179.
- Mingarro, M., de Celis, S.V.R., Astola, A., Pendòn, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatotactin paradigm. Gen. Comp. Endocrinol. 128, 102-111.
- Nelson, L.E., Sheridan, M.A., 2005. Regulation of somatostatins and their receptors in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 142, 117-133.
- Nishiwaki, T., Okamura, H., Kanemasa, K., Inatomi, T., Ibata, Y., Fukuhara, C., Inouye, S.-I.T., 1995. Differences of somatostatin mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus under light-dark and constant dark conditions: an analysis by in situ hybridization. Neurosci. lett. 197, 213-234.
- Niu, P.D., Perez-Sanchez, J., Le Bail, P.Y., 1993. Development of a protein binding assay for teleost insulin-like growth-like: relationships between growth hormone and IGF-like in the blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol. Biochem. 11, 381-391.
- Norberg, B., Weltzien, F.A., Karlsen, Ø., Holm, J.C., 2001. Effects of photoperiod on sexual maturation and somatic growth in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Comp. Biochem.

- Physiol. B 129, 357-365.
- Patel, Y.C., 1999. Somatostatin and its receptor family. *front. Neuroendocrinol.* 20, 157-198.
- Pillon, D., Caraty, A., Fabre-Nys, C. C., Lomet, D., Cateau, M., Bruneau, G., 2004. Regulation by estradiol of hypothalamic somatostatin gene expression: possible involvement of somatostatin in the control of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Biol. Reprod.* 71, 38-44.
- Poppinga, J., Kittilson, J.K., McCormick, S.D., Sheridan, M.A., 2007. Effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis and seawater adaptation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 273, 312-319.
- Poter, M.J.R., Duncan, N.J., Mitchell, D., Bromage, N.R., 1998. The use of cage lighting to reduce plasma melatonin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its effects on the inhibition of grilising. *Aquaculture* 176, 237-244.
- Reddy, P.K., Leatherland, J.F., 1994. Does the time of feeding affect the diurnal rhythms of plasma hormone and glucose concentration and hepatic glycogen content of rainbow trout? *Fish Physiol. Biochem.* 13, 133-140.
- Reichlin, S., 1983. Somatostatin. *N. Engl. J. Med.* 309, 1495-1501.
- Rousseau, K., Le Belle, N., Pichavant, K., Marchelidon, J., Chow, B. K., Boeuf, G., Dufour, S., 2001. Pituitary growth hormone secretion in the turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern of neuropeptides. *Neuroendocrinology* 74, 375-385.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, J., 2004. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Pineal Res.* 37, 42-47.
- Sakamoto, T., McCormick, S.D., Hirano, T., 1993. Osmoregulatory actions

- of growth hormone and its mode of action in salmonids: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 155-164.
- Sheridan, M.A., Kittilson, J.D., Slater, B.J., 2000. Structure-function relationship of the signaling system for the somatostatin peptide hormone family. *AM. Zool.* 40, 269-286.
- Takeuchi, L., Nagasaki, H., Shinohara, K., Inoue, S.-I.T., 1992. A circadian rhythm of somatostatin messenger RNA levels, but not of vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine messenger NRA levels in rat suprachiasmatic nucleus. *Mol. Cell. Neurosci.* 3, 29-35.
- Tatsuya, S., Hirano, T., 1993. Expression of insulin-like growth factor I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish: possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1912-1916.
- Taylor, J.F., Migaud, H, Poter, M.J.R., Bromage, N.R., 2005. Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-I levels in juvenil rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen, Comp. Endocrinol.* 142, 169-185.
- Trabucchi, M., Tostivint, H., Lihrmann, I., Sollars, C., Vallarino, M., Dores, M.R., Vaudry, H., 2002. Polygenic expression of somatostatin in the sturgeon *Acipenser transmontanus*: molecular cloning and distribution of the mRNAs encoding two somatostatin precursors. *J. Comp. Neurol.* 443, 332-345.
- Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., 1992. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology* 56, 483-490.
- Underwood, H., 1989. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*

- 45, 914-922.
- Van Der Kraak, G., Rosenblum, P.M., Peter, R.E., 1990. Growth hormone-dependent potentiation of gonadotropin-stimulated steroid production by ovarian follicles of the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 233-239.
- Very, N.M., Knutson, D., Kittilson, J.D., Sheridan, M.A., 2001. Somatostatin inhibits growth of rainbow trout, *J. Fish Biol.* 59, 157-165.
- Very, N.M., Sheridan, M.A., 2002. The role of somatostatins in the regulation of growth in fish. *Fish physiol. Biochem.* 27, 217-226.
- Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* 243, 215-285.
- Xu, M., Volkoff, H., 2009. Cloning, tissue distribution and effects of food deprivation on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)/PACAP-related peptide (PRP) and preprosomatostatin 1 (PPSS1) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Peptides* 30, 766-776.
- Yang, B. Y., Greene, M., Chen, T.T., 1999. Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 127-134.
- Yang, J., Tominaga, K., Otori, T., Fukuhara, C., Tokumasu, A., Inouye, S.-I.T., 1994. Day-night variation of prepro-somatostatin messenger RNA level in the suprachiasmatic nucleus. *Mol, Cell. Neurosci.* 5, 97-102.
- Ye, X., Li, W., Lin, H., 2005. Polygenic expression of somatostatin in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): Molecular cloning and distribution of the mRNAs encoding three somatostatin precursors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 241, 62-72.
- Zachmann A, Ali MA, Falcòn, J., 1992. Melatonin and its effects in fishes: an overview. In: Ali MA, ed. *Rhythms in fishes*. New York: plenum Press; 149-165.

- Zhang L., Li W., Hong X. and Lin H., 2009. Regulation of preprosomatostatin 1 (PSS1) gene expression by 17β -estradiol and identification of the PSS1 promoter region in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 311, 87-93.
- Zhdanova, I. V., Wang, S.T., Leclair, O.U, Danilova, N.P., 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903, 263-268.
- Zorrilla, R., Simard, J., Rheaume, E., Labrie, F., Pelletier, G., 1990. Multihormonal control of pre-pro-somatostatin mRNA levels in the periventricular nucleus of the male and female rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 52, 527-536.
- Zou, J.J., Trudeau, V.L., Cui, Z., Brechin, J., Mackenzie, K., Zhu, Z., Houlihan, D. F., Peter, R.E., 1997. Estradiol stimulates growth hormone production female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 102-112.
- 김익수 · 최윤 · 이충렬 · 이용주 · 김병직 · 김지현. 2005. *한국어류대도감*. 교학사. pp. 472.

감사의 글

분위기에 휩쓸려 시작했던 실험실 생활이 어느덧 석사학위 과정의 끝자락에 서 있게 되었습니다. 이제까지 실험실에서 생활했던 시간들은 다음 과정을 준비하기 위한 시간으로 저에게 참 많은 것을 느끼게 해 주었던 시간이었습니다.

실험실 생활에 있어서 항상 부족한 저에게 항상 많은 격려와 지도를 통하여 계속해서 공부의 끈을 이어갈 수 있게 도와주신 지도교수님 이영돈 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 또한 부족한 석사학위 논문의 심사를 맡으시며 많은 조언과 격려해 주신 여인규 교수님과 이경준 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 해양과학대학의 발전을 위해 힘쓰시는 최광식 교수님, 허문수 교수님, 김기영 교수님, 정준범 교수님에게도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

제가 이렇게 석사 학위과정을 지내는 동안 많은 실험실 가족들의 힘이 있어서 더욱 열심히 할 수 있었습니다. 비록 지금은 떨어져 있으나 저에게 큰형님의 마음이 무엇인지를 느끼게 해주신 송영보 박사님, 항상 섬세하고 인자한 모습으로 후배들을 대하셨던 임봉수 박사님, 석사 과정 중 제 실험의 시작과 끝을 인도해주신 박용주 박사님, 동안의 외모와 마인드로 항상 후배들의 친형 같았던 이치훈 박사님, 아버지와 같은 마음으로 학생들을 대하셨던 김성훈 박사님.. 박사님들은 항상 우리 실험실에 중심이십니다. 그리고 예쁜 딸과 박사학위를 한꺼번에 이뤄내신 상우형, 모든 일에 앞장서서 열심히 하는 형철이형, 뱀장어 연구에 모든 것을 쏟아 붓는 켄틀맨 승현이형.. 실험실 생활이 즐겁고 의미가 있던 이유는 모두 선배님들이 있었기 때문이었습니다. 그리고 지금은 일본에서 공부하고 있지만 제주도에 들어올 때면 항상 실험실에 들려 후배들을 챙기시던 성표형, 그리고 저에게 실험실과의 인연을 만들어주셨던 용운이형.. 언젠가 감사드리며 일본에서 좋은 결과 얻으시기를 바랍니다. 지금은 같은 길을 가지는 않지만 유일한 내 후배였던 기수.. 시험 준비 잘해서 좋은 결과 얻기를 바란다. 비록 같은 실험실은 아니지만 제 실험에 대해 관심을 갖고 조언을 해주셨던 정형복 박사님, 짧은 합숙기간 동안이나마 많은 격려를 해주신 부경대의 상준이형과 인준이형.. 자기 실험실 후배처럼 아껴주신 그 마음을 잊지 않겠습니다. 그리고 공부하는데 있어 많은

힘과 용원을 보내주신 혜성희 선배님들께도 감사의 뜻을 전합니다.

석사학위를 준비하는 동안의 생활과 실험하는데 있어 편의를 제공해주신 해양과환경연구소의 강태연 선생님, 진찬경 선생님, 조창환 선생님, 임지일 선생님, 김선희 이모님..그리고 항상 맛있는 식사로 저희의 건강을 책임져 주시는 윤태석 이모님..모두 진심으로 감사드립니다.

공부하기가 지치고 어려울 때마다 함께 스트레스를 풀어가던 우리 04학번 민철, 창희, 일태, 용덕, 영민..다른 길을 걷더라도 항상 우리는 04학번임을 잊지 말자. 그리고 때로는 가까이..때로는 멀리에 있으면서도 서로의 성공을 의심치 않는 내 친구 창욱, 승민, 동찬, 정민, 정훈, 한종..너희들이 있었기에 나 역시 멈추지 않고 앞으로 나아갈 수 있었던 것 같아서 너무 고맙고 감사한다.

그리고 내 가족..자주 집에도 찾아가지 못하고 간혹 들어가도 못한 모습만 보여드려도 아무런 말없이 항상 저를 믿고 지켜봐주시는 아버지, 제대로 된 형 역할을 못해줘도 항상 믿고 따라주는 동생 충훈이, 멀리서나마 항상 걱정해주시는 어머니, 그리고 아무것도 못해드리고 보내드린 마음에 항상 죄송스러운 할머니..앞으로 집안의 믿음직한 장남, 존경받을 만한 형, 자랑스러운 손자가 되기 위해 더욱 노력하겠습니다. 항상 사랑하고 또 사랑합니다.

이제까지 부족한 저를 아껴주시고 사랑해 주시는 모든 분들께 더 나은 모습을 보여드리기 위해 최선을 다하겠다는 약속을 드리며 이 글을 마치겠습니다.

