



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

광량에 따른 붉바리(*Epinephelus akaara*)의  
멜라닌 관련유전자 발현 특성

제주대학교 대학원

해양생명과학과

최 송 희

2019년 2월

Expressions of melanin related factors in light intensity on  
red spotted grouper, *Epinephelus akaara*

Song-Hee Choi

(supervised by professor Young-Don Lee)

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

2019. 2

MARINE LIFE SCIENCE  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

광량에 따른 붉바리(*Epinephelus akaara*)의  
멜라닌 관련유전자 발현 특성




지도교수 이 영 돈

최 송 희

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2019년 2월

최송희의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장	<u>여 인 규</u>	
위 원	<u>김 기 영</u>	
위 원	<u>이 영 돈</u>	

제주대학교 대학원

2019년 2월



# 목 차

I. 목차 .....	i
II. List of figures .....	iii
III. List of tables .....	iv
IV. Abstract .....	v
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 붉바리 멜라닌 관련유전자의 partial sequencing과 조직별 발현 .....	4
1) 실험어	
2) Total RNA추출 및 cDNA합성	
3) Partial sequencing	
4) 계통분석	
5) 멜라닌 관련유전자들의 조직별 발현	
2. 붉바리 발달단계에 따른 멜라닌 관련유전자의 발현 .....	14
1) 실험어	
2) 사육관리	
3) Total RNA추출 및 cDNA합성	
4) 멜라닌 관련유전자의 발현양상	
5) 통계처리	
3. 광량에 따른 멜라닌 관련유전자 발현 .....	16
1) 실험어	
2) Total RNA추출 및 cDNA합성	
3) 멜라닌 관련유전자의 발현양상	
4) 통계처리	
5) RGB 색상코드	
III. 결과 .....	18
1. 붉바리 멜라닌 관련유전자 클로닝 및 조직별 발현 .....	18
1) 붉바리에서 멜라닌 관련유전자의 partial sequencing	

2) 상동성	
3) 멜라닌 관련유전자 조직별 발현	
2. 붉바리 발달단계에 따른 멜라닌 관련유전자의 발현	37
1) 발달단계별 체색 발달 형태	
2) 발달단계에 따른 멜라닌 관련유전자들의 mRNA 발현	
3. 광량에 따른 멜라닌 관련유전자 발현	42
1) 광량에 따른 멜라닌 관련유전자들의 mRNA 발현	
2) 피부 RGB 체색계수	
IV. 고찰	47
V. 참고문헌	50

## List of figures

Fig. 1. The MCH partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. .....	19
Fig. 2. The POMC partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. .....	20
Fig. 3. The MC1R partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. .....	21
Fig. 4. The ASIP partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. .....	22
Fig. 5. Phylogenetic tree of red spotted grouper <i>mch</i> cDNA .....	28
Fig. 6. Phylogenetic tree of red spotted grouper <i>pomc</i> cDNA .....	29
Fig. 7. Phylogenetic tree of red spotted grouper <i>mclr</i> cDNA .....	30
Fig. 8. Phylogenetic tree of red spotted grouper <i>asip</i> cDNA .....	31
Fig. 9. Tissue specific expression of <i>mch</i> mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. .....	33
Fig. 10. Tissue specific expression of <i>pomc</i> mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. .....	34
Fig. 11. Tissue specific expression of <i>mch</i> mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. .....	35
Fig. 12. Tissue specific expression of <i>asip</i> mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. .....	36
Fig. 13. Development stage of pigmentation in the red spotted grouper. ....	38
Fig. 14. Expression of development stage of melanin related factor in the red spotted grouper by Real-time qPCR. ....	40
Fig. 15. Expression of development stage of melanin related factor in the red spotted grouper by Real-time qPCR. ....	41
Fig. 16. Expression changes of <i>mch</i> and <i>pomc</i> mRNA in the red spotted grouper brain and pituitary under different light intensity conditions .....	43
Fig. 17. Expression changes of <i>mclr</i> and <i>asip</i> mRNA in the red spotted grouper skin under different light intensity conditions .....	44
Fig. 18. RGB code value extracted form Red spotted grouper skin .....	46

## List of table

Table 1. Degenerated primer sets used in melanin related genes cDNA partial sequencing. ...	6
Table 2. Gene information of used for multiple alignment. ....	8
Table 3. Gene information of used for multiple alignment. ....	9
Table 4. Gene information of used for multiple alignment. ....	10
Table 5. Gene information of used for multiple alignment. ....	11
Table 6. Primer sets used in real-time qPCR. ....	13
Table 7. Overall amino acid identities of MCH between <i>Epinephelus akaara</i> and other fishes. .....	24
Table 8. Overall amino acid identities of POMC between <i>Epinephelus akaara</i> and other fishes. .....	25
Table 9. Overall amino acid identities of MC1R between <i>Epinephelus akaara</i> and other fishes. .....	26
Table 10. Overall amino acid identities of ASIP between <i>Epinephelus akaara</i> and other fishes. .....	27



## Abstract

The present study was investigated the expression of melanin related factors on the developmental stage and light intensity in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. The expression of melanin related factors on the developmental stage of red spotted grouper was conducted from 1 DAH (Day after hatching) to 50 DAH. At 5 DAH, the expression level of melanin concentrating hormone (*mch*) mRNA, pro-opiomelanocortin (*pomc*) mRNA and melanocortin 1 receptor (*mclr*) mRNA were significantly higher than the other stage. And also at 10 DAH, the expression level of agouti signalling peptide (*asip*) mRNA was significantly higher than the other stage. The light intensity experiment was examined by expression of the melanin related genes and RGB cod value. Experiment performed from July 2017 to October 2017. Fish (n=200, body weight  $0.5 \pm 0.1$  g, total length  $3.2 \pm 0.9$  cm) was reared under different light intensity (i.e., 0 lux, 200 lux, 1,000 lux and 2,000 lux) for 9 week under 12 hour light and 12 hour dark photoperiod and natural water temperature ( $20.1 \sim 28.9$  °C). After exposure of four different light intensity for 3, 6 and 9 weeks, the *mch* mRNA, *pomc* mRNAs, *mclr* mRNA and *asip* mRNA, were analyzed in the brain with pituitary and skin. At 6 weeks, the expression level of *mch* mRNA in the 2,000 lux treatment group were significantly higher than the other light intensity exposed groups ( $P < 0.05$ ). At 9 weeks, the expression level of *pomc* mRNA and *mclr* mRNA in the 1,000 lux treatment group were significantly lower than the other light intensity exposed groups ( $P < 0.05$ ). The expression level of *asip* mRNA showed no significant difference between treatment groups. The highest expression level of *asip* mRNA was at the initial state, and after 3 weeks it decreased rapidly and stayed low until 9 weeks. The results of the RGB (Red, Green, Blue) code values in 0 lux, 200 lux, 1000 lux and 2000 lux under different light intensity treatment groups were the brightest at 1000 lux and the darkest at 0 lux. The *pomc* mRNA and *mclr* mRNA might play an important melanin synthesis parameters role. In this study, these genes were affected by the light intensity, and the expression level were varied according to the light intensity. To understand the molecular mechanism of the coloration better in red spotted grouper, further studies are needed to clarify the relationship between melanophores development and its related genes (e.g., *pomc* mRNA, *mclr* mRNA and *mch* mRNA).

## I. 서론

멜라닌(Melanin)은 인간을 포함한 척추동물에서 모색과 피부색을 결정짓는 중요한 요인 중 하나이며, 대다수의 생명체의 색은 자신들이 가지고 있는 멜라닌의 형태와 비율에 따라 체색이 결정된다. 멜라닌은 유멜라닌(Eumelanin), 페오멜라닌(Pheomelanin), 뉴로멜라닌(Neuromelanin)의 세가지 형태로 구분된다. 유멜라닌은 주로 갈색과 검은색 색조를 나타내고 피부와 모색에 영향을 끼치며, 페오멜라닌은 빨간색과 노란색 색조를 나타내며 모색에 영향을 미친다. 뉴로멜라닌은 뇌조직에 있는 검은색의 멜라닌으로 파킨슨병과 같은 뇌질환과 관련이 있는 멜라닌이다(Good et al., 1992; Sasaki et al., 2006). 세 종류의 멜라닌 중 피부와 모색에 영향을 주는 유멜라닌과 페오멜라닌의 합성은 멜라노사이트(Melanocyte)의 멜라노솜(Melanosome)에서 생산된다. 유멜라닌과 페오멜라닌은 멜라닌세포가 외부 신호를 받아들여 수용체가 활성화되고 멜라노솜에서 티로신(Tyrosine)의 산화 및 티로시나아제(Tyrosinase)가 증가하여 최종적으로 멜라노솜 안에서 합성된다(Seiji et al., 1963; Korner et al., 1982; Kobayashi et al., 1994). 유멜라닌은 멜라닌세포의 가지돌기(Dendrites)를 따라 피부의 각질형성세포(Keratinocyte)층으로 이동하여 체색을 띠게 되며, 자외선으로부터 피부조직과 피하조직의 세포변형 및 파괴에 대한 방어기작을 갖는다(Sulaimon et al., 2003; Costin et al., 2007; Kondo et al., 2011; Cichorek et al., 2013).

해양동물에서 멜라닌은 자외선으로부터의 방어 기능을 지니고 있어 세포 손상과 관련된 스트레스로부터 세포를 보호하는 작용을 한다(Suzuki et al., 1999; Adachi et al., 2005). 광어(Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)와 문어(Octopus, *Octopus vulgaris*)는 주변환경에 따라 체색을 변화시키는 보호색을 통하여 포식자에 대한 방어능력을 갖으며(Braasch et al., 2007; Maan et al., 2013; Cal et al., 2017), 스트레스에 따라 체색이 변화하기도 한다(Salm et al., 2005; Kittilsen et al., 2009). 또한 멜라닌은 문어와 오징어 같은 두족류의 먹물의 주요성분 중 하나이다(Nicolaus et al., 1964; Palumbo et al., 2000; Derby, 2014). 어류에서 멜라닌은 피부보호의 역할과 더불어 체내외 멜라닌 색소의 침착과 어류행동 및 면역, 스트레

스 등의 생리기능에 관여한다(Cone, 2006; Amiya et al., 2008; Kittilsen et al., 2009; Skeld et al., 2013). 어류의 체색을 구성하는 색소포(chromatophore)는 크게 여섯 가지로 나뉘며 검은색의 흑색소포(melanophores), 적색의 적색소포(erythropores), 황색의 황색소포(xanthophores), 백색의 백색소포(leucophores) 그리고 은백색의 홍색소포(iridophores)가 존재하며, 최근 청색의 cyanophores가 발견되었다(Fujii, 2000). 이러한 다양한 색소포들의 발현패턴에 따라 어류는 다채로운 체색을 띤다. 색소포를 이용하여 빛이나 배경색과 같은 외부환경조건에 적응하는 적응색으로 사용하거나(Bradner et al., 2001; Calvo et al., 2016), 번식기에 혼인색을 나타내기도 한다(McLennan, 1995; Beeching et al., 1998).

Melanocortins 펩타이드호르몬 집단의 pro-opiomelanocortin (POMC)은 주로 뇌하수체에서 분비되며, alpha-melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 및  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ -END)을 비롯한 여러 펩타이드의 전구체로서 작용한다. Melanocortin 수용체는 melanocortin 1 receptor (MC1R)부터 MC2R, MC3R, MC4R, MC5R 까지 다섯 종류로 구분된다. MC1R은 멜라닌 합성에 관여하며 MC2R은 ACTH의 수용체로 면역기능, MC3R은 식욕과 에너지 항상성 유지, MC4R은 비만, 음경 발기의 지속(priapism), 혈압 상승 효과, 그리고 MC5R은 면역 조절 및 적혈구 분화, 염증, 항상성 유지에 관련되어 있으며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Cerdá-Reverter et al., 2011; Ju et al., 2018).  $\alpha$ -MSH는 MC1R을 활성화시킴으로서 피부 멜라닌 세포에서 유멜라닌의 합성을 자극하여 피부를 어둡게 만든다. 어류의 피부에서 agouti signaling peptide (ASIP)는  $\alpha$ -MSH의 결합을 저해하여 MC1R을 비활성화시킴으로서 어류에서 배 쪽의 멜라닌 색소 형성을 억제한다(Cal et al., 2015). 피부 멜라닌 세포에서 갈색의 pheomelanin의 합성을 자극하여 피부가 갈색을 띄거나 얼어지게 만드는 작용을 한다. 뇌에서 분비되는 MCH (Melanin concentrating hormone)은 어류에서 색소포의 멜라닌 응집과 분산을 조절하여 체색의 급격한 변화를 일으키며, 이외에도 식욕 조절, 면역 반응 등 다양한 역할을 수행한다(Harris et al., 1998; Richard et al., 2001; Takahashi et al., 2004; Matsuda, 2009).

다채로운 어류의 체색은 다양한 생태적, 생리적 정보를 제공하며, 어류의 체색은 상업적 가치를 결정하는 요인으로서 작용한다(Paripatananont et al., 1999;

Kalinowski et al., 2005; Wang et al., 2006). 바리과 어종은 다채로운 색과 뛰어난 맛으로 기호도가 높다. 그중 붉바리(Red spotted grouper, *Epinephelus akaara*)는 붉은색 반점이 체표에 분포하여 소비자들의 기호도가 높으며 이로인한 무분별한 남획으로 인해, 현재 붉바리를 포함한 20여 종의 바리과 어류는 멸종위기종에 속한다(IUCN, 2003). 국내외적으로 바리과 어류의 시장기호도가 높고 자원의 회복을 위하여 바리과 어류 양식에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이 연구는 내외부 환경조건에 따라 다양한 체색변화 반응을 보이는 붉바리 치어( $3.2 \pm 0.2$  cm,  $0.34 \pm 0.1$  g)를 대상으로 광량에 따른 피부 발색조건을 향상시키기 위한 기초정보를 얻기 위하여 수행하였다. 이를 위하여 붉바리에서 멜라닌 관련유전자의 *partial sequencing*을 수행하였으며, 각각의 광량조건에서 붉바리를 사육하여 멜라닌 관련유전자들의 발현과 체색의 밝기변화를 탐색하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 붉바리 멜라닌 관련유전자의 partial sequencing과 조직별 발현

#### 1) 실험어

멜라닌 관련유전자의 partial sequencing은 제주대학교 해양과학연구소에서 사육 중인 붉바리를 대상으로 수행되었다. 붉바리는 3마리를 무작위로 선택하여 0.01%의 2-phenoxyethanol (JUNSEI, Japan) 에서 마취 후, 전조직을 적출하여 partial sequencing에 사용하였다. 멜라닌 관련유전자의 조직별 발현을 위하여 붉바리 조직을 각각 중추신경조직(단뇌, 시개, 소뇌, 시상하부, 연수, 뇌하수체)과 주변조직(눈, 혀, 심장, 신장, 위, 장, 간, 생식소, 지느러미, 피부, 근육)으로 구분하여 적출하였으며, real-time qPCR을 이용하여 유전자들의 발현을 분석하였다.

#### 2) Total RNA추출 및 cDNA합성

Total RNA는 적출한 뇌와 뇌하수체, 피부조직에서 추출되었다. 각각의 조직들에 RiboEx™ (GeneAll, Korea) 600  $\mu$ l을 넣고 homogenizer로 조직을 완전히 균질화시켰다. 균질화된 tube에 RiboEx™ 1.0  $\mu$ l당 0.2  $\mu$ l의 chloroform을 넣은 후 상온에서 5분간 반응시켰으며, 원심분리기에서 4°C, 12,000  $\times$  g의 조건으로 15분간 분리하여 total RNA를 획득하였다. 분리된 total RNA는 새로운 tube에 옮겨 500  $\mu$ l의 iso-propanol을 넣고 상온에서 반응을 시킨 후, 4°C에서 10분간 12,000  $\times$  g로 total RNA pellet을 침전시켰다. 침전된 total RNA pellet을 제외한 나머지 상층액은 제거 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 처리된 H<sub>2</sub>O를 이용하여 만든 ethanol로 수세하였으며, DEPC H<sub>2</sub>O를 이용하여 total RNA pellet을 용해시켰다. 획득한 total RNA는 Nano Vue (GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 A260/A280nm의 비율이 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 total RNA만을 실험에 사용하였다.

cDNA 합성은 뇌 조직의 500  $\mu$ l의 total RNA를 주형으로 RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega, USA)를 사용하여 DNase 처리 후 PrimeScript™ 1<sup>st</sup> strand

cDNA synthesis Kit (Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. DNase 처리한 RNA는 RNase-free H<sub>2</sub>O를 사용하여 8.0  $\mu$ l의 volume을 맞추었고 Random 6mers 1.0  $\mu$ l, dNTP mixture 1.0  $\mu$ l 를 65°C에서 5분동안 반응시켰다. 이후 5 × PrimeScript Buffer 4.0  $\mu$ l, RNase inhibitor 0.5 $\mu$ l PrimeScript RTase 10  $\mu$ l, RNase free dH<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ l를 첨가하여 총 20  $\mu$ l의 volume으로 30°C에서 10분, 42°C에서 60분 반응시킨 후 95°C에서 5분간 효소 활성화 후 cDNA 합성을 완료하였다.

### 3) Partial sequencing

북바리의 멜라닌 관련유전자의 partial sequencing을 위하여 degenerated primer는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 보고된 다른 어종들의 멜라닌 관련유전자들의 정보를 이용하였다(Table 1). 멜라닌 관련유전자들은 북바리 전조직 cDNA와 degenerated primer의 RT-PCR 을 통하여 증폭되었으며, PCR은 95°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 90초의 조건으로 총 35 cycle을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물들은 1.0% agarose gel의 전기영동을 통하여 유전자 band를 확인하였으며, 확인된 유전자 band를 cutting하여 Dyne Power Gel Extraction Kit (Dyne Bio, Korea)를 사용하여 Elution하여 PCR산물을 추출하였다. 추출된 PCR산물은 Genotech (Korea)에 의뢰 후 부분염기서열을 분석하였으며, NCBI의 BLAST를 이용하여 아미노산 서열을 확인하였다.

Table 1. Degenerated primer sets used in melanin related genes cDNA partial sequencing

Gene	Primer information	
	Primer	Sequence (5'-3')
MCH	MCH F	RTTACCCATGGSCAAGRCYG
	MCH R	CGTCCCACCATGCACCTC
POMC	POMC F	AGTCAGTGCTGGGAACATCC
	POMC R	TGCTTCATCTTGTACCCGCC
MC1R	MC1R F	AAGAACCGCAACCTGCACTC
	MC1R R	GGCTCCGGTACGCGTAGAT
ASIP	ASIP F	GCTTGGCTGCCTTTTACTCG
	ASIP R	AAAGGGCAGTTCTCTGTGGC

#### 4) 계통 분석

Partial sequencing된 붉바리 멜라닌 관련유전자들은 NCBI에 등록된 다른 어종들의 멜라닌 관련유전자들의 정보(Table 2~5)를 이용하여 어종간 상동성을 분석하였다. 상동성 분석은 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 이용하여 분석되었다.

붉바리 멜라닌 관련유전자와 다른 어종간의 계통수 분석은 다른 어종들의 유전자정보 (Table 2~5)와 MEGA version X을 이용하여 계통수를 분석하였다(Sudhir et al. 2018).



Table 2. Gene information of used for multiple alignment

Gene	Species	GeneBank Accession No.
	Teleostei	
	Perciformes	
	<i>Epinephelus akaara</i>	-
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	BAP46309
	<i>Notothenia coriiceps</i>	XP_010795756
	Pleuronectiformes	
	<i>Scophthalmus maximus</i>	AWP14936
	<i>Verasper moseri</i>	BAC82350
	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	AEE36642
	Gasterosteiformes	
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	ALD51525
MCH	Salmoniformes	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021458034
	<i>Oncorhynchus keta</i>	AAA49420
	Cyprinodontiformes	
	<i>Fundulus heteroclitus</i>	XP_012719615
	Cichliformes	
	<i>Oreochromis aureus</i>	AAN77174
	<i>Oreochromis niloticus</i>	AAN77173
	<i>Carassuis auratus</i>	XP_026098309
	<i>Danio rerio</i>	NP_001155960
	<i>Schizothorax davidi</i>	AYA43842
	<i>Schizothorax prenanti</i>	AIJ28808

Table 3. Gene information of used for multiple alignment

Gene	Species	GeneBank Accession No.
	<i>Teleostei</i>	
	Perciformes	
	<i>Epinephelus akaara</i>	-
	<i>Epinephelus coioides</i>	AAO11696
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AAU00742
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	AAD41261
	<i>Acanthopagrus latus</i>	AAF22342
	<i>Sparidentex hasta</i>	AAF22343
	Synbranchiiformes	
	<i>Mastacembelus armatus</i>	XP_026157791
	Cichliformes	
	<i>Maylandia zebra</i>	XP_012771156
	Cyprinodontiformes	
	<i>Nothobranchius rachovii</i>	SBS12358
POMC	<i>Fundulus heteroclitus</i>	XP_012713551
	Belontiiformes	
	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004066504
	<i>Oryzias melastigma</i>	XP_024144981
	Tetraodontiformes	
	<i>Takifugu rubripes</i>	BAV10397
	Salmoniformes	
	<i>Salvelinus alpinus</i>	XP_023999323
	Cypriniformes	
	<i>Danio rerio</i>	AAM93491
	<i>Schizothorax prenanti</i>	AFT92021
	<i>Carassius auratus</i>	XP_026141582
	Siluriformes	
	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAO25530
	Anguilliformes	
	<i>Anguilla japonica</i>	AAO17793
	Pleuronectiformes	
	<i>Solea solea</i>	ABI26718

Table 4. Gene information of used for multiple alignment

Gene	Species	GeneBank Accession No.
	<i>Teleostei</i>	
	Perciformes	
	<i>Epinephelus akaara</i>	-
	<i>Cromileptes altivelis</i>	AGK07513
	<i>Mycteroperca marginata</i>	AGK07442
	<i>Belonoperca chabanaudi</i>	AGK07508
	<i>Grammistops ocellatus</i>	AGK07504
	<i>Variola louti</i>	AGK07512
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AGK07521
	<i>Amblycirrhitis bimacula</i>	AGK07477
	Scorpaeniformes	
	<i>Trigloporus lastoviz</i>	AGK07439
MC1R	<i>Liparis montagui</i>	AGK07449
	<i>Dendrochirus biocellatus</i>	AGK07479
	<i>Ebosia bleekeri</i>	AGK07432
	<i>Pterois antennata</i>	AGK07469
	<i>Scorpaenodes corallinus</i>	AGK07478
	<i>Scorpaenodes guamensis</i>	AGK07463
	<i>Neomerinthe folgori</i>	AGK07440
	Gasterosteiformes	
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	AGK07445
	Trachiniformes	
	<i>Echiichthys vipera</i>	AGK07497
	<i>Cheimarrichthys fosteri</i>	AGK07501
	Syngnathiformes	
	<i>Hippocampus hippocampus</i>	AGK07494

Table 5. Gene information of used for multiple alignment

Gene	Species	GeneBank Accession No.
	<i>Teleostei</i>	
	Perciformes	
	<i>Epinephelus akaara</i>	-
	<i>Labrus bergylta</i>	XP_020508842
	Synbranchiformes	
	<i>Mastacembelus armatus</i>	XP_026163338
	Anabantiformes	
	<i>Anabas testudineus</i>	XP_026204859
	Tetraodontiformes	
	<i>Takifugu rubripes</i>	NP_001092136
	Cichliformes	
	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003448419
	Cyprinodontiformes	
	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	XP_017284761
ASIP	Pleuronectiformes	
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019960768
	<i>Scophthalmus maximus</i>	CCD42017
	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_008319411
	<i>Solea senegalensis</i>	CCD42018
	Osteoglossiformes	
	<i>Paramormyrops kingsleyae</i>	XP_023651059
	Cypriniformes	
	<i>Carassius auratus</i>	XP_026121989
	<i>Culter alburnus</i>	AXB88332
	Gasterosteiformes	
	<i>Gsterosteus aculeatus</i>	CCB84813
	Salmoniformes	
	<i>Salvelinus alpinus</i>	XP_023846519

## 5) 멜라닌 관련유전자들의 조직별 발현

멜라닌 관련유전자들의 조직별 발현은 real-time quantitative PCR (qPCR)을 수행하여 분석되었다. Real-time qPCR을 수행하기 위한 종특이적인 primer 제작은 partial sequencing된 멜라닌 관련유전자들의 부분염기서열을 이용하였다(Table 6). Real-time qPCR은 0.2  $\mu$ l의 cDNA와 Evagreen premix PCR kit (abm, Canada)를 이용하여 수행하였다. Real-time qPCR은 CFX96™ Real Time System (BIO-RAD, USA)을 이용하여 95℃에서 10분간 initial denaturation 시킨 후 95℃에서 15초, 60℃에서 1분간 반응하여 40 cycle 수행 후 60℃에서 1분간 반응시켰다. 멜라닌 관련유전자 발현은  $\beta$ -actin을 internal control로 사용하여 상대정량 하였다.

Table 6. Primer sets used in real-time qPCR

Gene	Primer information	
	Primer	Sequence (5'-3')
MCH	MCH F	CTGTTGTCGTCAGCTCTCCG
	MCH R	GGGATGCAGATCTACCCACTG
POMC	POMC F	GAACATCCGAGCTGTCAGGA
	POMC R	CATGGAGTAGGAGCGCTTGG
MC1R	MC1R F	GTTGGCCATCTTCAAGAACCG
	MC1R R	TCACGTCGATGACGTTGTCC
ASIP	ASIP F	GGCCACCTCCTGTTGTTATT
	ASIP R	GACAGTTCTGAAGAGCCGACA
$\beta$ -actin	$\beta$ -actin F	GAGGGGTATCCTGACCCTGA
	$\beta$ -actin R	CTCCTCAGGGGCAACTCTC

## 2. 붉바리 발달단계에 따른 멜라닌 관련유전자의 발현

### 1) 실험어

실험어는 붉바리 친어 암컷과 수컷을 이용하여 인공수정 시킨 후 부화된 자어를 이용하였다. 부화자어는 수정 후 부화 1일차(day after hatching, DAH)부터 2, 3, 5, 10, 14, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 DAH까지 발달 단계에 따라 sampling하여 분석 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 2) 사육관리

실험어는 제주대학교 해양과학연구소의 순환여과 시스템에서 사육하였으며, 사육수의 pH는 6.3 ~ 8.2, 용존산소는 6.5 ~ 8 mg/l, 사육수온은  $24 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 조건에서 사육하였다. 부화자어의 먹이공급은 부화 3일부터 30일까지 로티퍼를 공급하였고, 부화 후 20일부터 50일까지 알테미아(INVE SEP Art)를 공급하였다. 초기미립자 사료(LOVE LARVA, HAYASHIKANE SANGYO)는 부화 후 12일부터 실험 종료시까지 공급하였다.

### 3) Total RNA추출 및 cDNA합성

실험 1 에서의 방법과 동일

### 4) 멜라닌 관련유전자의 발현양상

실험 1 에서의 방법과 동일

#### 5) 통계처리

통계분석은 SPSS version 21을 이용하였으며, One-Way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)를 통하여 유의성을 검정하였다. 평균값은  $\pm$  표준편차를 이용하여 나타내었으며, 유의차는  $P < 0.05$  일 때 통계적인 유의성을 인정하였다.



### 3. 광량에 따른 멜라닌 관련유전자 발현

#### 1) 실험어

실험어는 제주대학교 해양과학연구소에서 사육중인 부화 후 60일째 붉바리 치어( $n=200$ ,  $3.2 \pm 0.2$  cm,  $0.34 \pm 0.1$  g)를 이용하였다. 광량 조절에 따른 멜라닌 관련유전자들의 발현은 유수식 시스템의 90 L수조에서 12L:12D의 광주기조건과 자연수온조건에서 사육된 실험어를 이용하였다. 광원은 LED (light emitting diode, 125W; Sanver, Korea)를 이용하였으며, 실험구는 조도계(DX-200, Taiwan)를 이용하여 광량에 따라 0 lux, 200 lux, 1000 lux, 2000 lux 조건으로 구분되었다. 실험어는 각각의 실험그룹에 따라 50마리씩 입식되었으며, 총 9주간 사육되었다. 실험기간동안 사료(Deahan co., MP3, Busan, South Korea)공급은 1일 3회 만복급이 하였다. Sampling은 3주 간격으로 총 3회 이루어졌으며, 각각의 수조에서 5마리씩 sampling 되었다. 실험어는 0.01%의 2-phenoxyethanol을 이용하여 마취시킨 후 전장과 체중을 측정하였고, 뇌하수체를 포함한 뇌와 피부를 적출하여 liquid nitrogen에서 급속 냉각시킨 후 분석 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

#### 2) Total RNA추출 및 cDNA합성

실험 1 에서의 방법과 동일

#### 3) 멜라닌 관련유전자의 발현양상

실험 2 에서의 방법과 동일

#### 4) 통계처리

실험 2에서의 방법과 동일

#### 5) RGB 색상코드

RGB 색상코드(Red Green Blue Color Code)분석은 Get Average Color of Image 를 이용하여 동일한 면적의 Image에서 색상 코드를 추출하였다 (<http://matkl.github.io/average-color/>).

### Ⅲ. 결과

#### 1. 붉바리 멜라닌 관련유전자 클로닝 및 조직별 발현

##### 1) 붉바리 멜라닌 관련유전자의 partial sequencing

붉바리의 전조직을 대상으로 MCH, POMC, MC1R, ASIP 유전자의 partial sequencing 분석 결과, MCH 유전자의 부분염기서열은 총 309 bp, 103 amino acid (aa) 서열로 구성되었고(Fig. 1), POMC 유전자의 부분염기서열은 총 459 bp, 153 aa 서열로 구성되었다(Fig. 2). MC1R 유전자의 부분염기서열은 총 705 bp 길이의 염기서열과 235 aa 이 확인되었으며(Fig. 3), ASIP 유전자는 총 309 bp의 부분염기서열과 103 aa가 확인되었다(Fig. 4).

```

TTACCCATGGGCAAGACTGACGACGGCTCCTTGGAACAGGATACTTTGGCCTCGCTGCTG 60
L P M G K T D D G S L E Q D T L A S L L
AGTGATGAAACACCAGAAAACAGCCTTGGGGATGCAGATCTACCCACTGTGGGCAAAACC 120
S D E T P E N S L G D A D L P T V G K T
AGAGGGCCGAGGGTAATCGTCATCGCCGATCCGAGCCTGTGGAGGGACCTGCGGGTGCTG 180
R G P R V I V I A D P S L W R D L R V L
CACAATGGACTGTCCCTTCACAAACGGAGAGCTGACGACAACAGCATGGTCATCGAGCAC 240
H N G L S L H K R R A D D N S M V I E H
AGAGACGCCGGCCAGGACCTGAGCATCCCCATCCTGAGGAGGGACACAATGAGGTGCATG 300
R D A G Q D L S I P I L R R D T M R C M
GTGGGACGA 309
V G R

```

Fig. 1. The MCH partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. 309 base pairs long, encoding 103 amino acid.

```

AGTCAGTGCTGGGAACATCCGAGCTGTCAGGAGGTCAAGTCTGAGGGCAGCATGATGGAA 60
S Q C W E H P S C Q E V K S E G S M M E
TGCATCCAGCTCTGTGCTCCGACCTCACCGCAGAGACACCTGTCATCCCAGGGGACAAC 120
C I Q L C R S D L T A E T P V I P G D N
CACCTCCAACCTGTTCCCTCCATCAGATCTCGATTCTCTGCCTCCCCTCCCTCTTTTATCT 180
H L Q P V P P S D L D S L P P L P L L S
TCCCCCTCCTCCTCAGGCCAAGCGCTCCTACTCCATGGAGCATTTCGCTGGGGGAAG 240
S P S S P Q A K R S Y S M E H F R W G K
CCTGTTGGACGAAAGCGCCCGCGTCAAAGTCTACACCTCAAACGGCGTAGAAGAAGAG 300
P V G R K R R P V K V Y T S N G V E E E
TCAGCCGAGCTTTTCCCCGGAGAGATGAGGAGGCGGGAGCTCACCAGCAAGCTGCTTGCA 360
S A E L F P G E M R R R E L T S K L L A
GCAGAGGAAGAGGAGAAGGCGCAGGAGGTGGCAGAAGACGAGCAGGAGCAGCTCCCGGGT 420
A E E E E K A Q E V A E D E Q E Q L P G
GACATCCACGAAAAGAAAGATGGCGGGTACAAGATGAAG 459
D I H E K K D G G Y K M K

```

Fig. 2. The POMC partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. 459 base pairs long, encoding 153 amino acid.

```

TTGGCCATCTTCAAGAACCGCAACCTGCACTCGCCCATGTACTACTTCATCTGCTGCCTG 60
L A I F K N R N L H S P M Y Y F I C C L
GCGGTGTCCGACATGCTGGTCAGCGTCAGCAACGTGGTGGAGACTATGTTTCATGCTTCTC 120
A V S D M L V S V S N V V E T M F M L L
AACGACCACGGCCTGATGGACATGCACCCTGGCATGCTGCGCCACCTGGACAACGTCATC 180
N D H G L M D M H P G M L R H L D N V I
GACGTGATGATCTGCAGCTCCGTGGTGTCTCGCTGTCTTTCTGTGCACCATCGCAGCG 240
D V M I C S S V V S S L S F L C T I A A
GACCGCTACATCACCATCTTTTACGCGCTGCGTTATCACAGCATCATGACCACGCAGCGC 300
D R Y I T I F Y A L R Y H S I M T T Q R
GCCGTCAACATCATCGTGGTGGTGTGGCTGGCCAGCATCACCTCCAGCATCCTGTTTATT 360
A V N I I V V V W L A S I T S S I L F I
GTGTACCACACCGACAACGCTGTCATCGTGTGCCTCGTGACCTTCTTCTGCACCACCCTG 420
V Y H T D N A V I V C L V T F F C T T L
GTGTTTAACGCCGTGCTGTACCTGCACATGTTCTCTGCTCACCTGCACTCGCGGCGC 480
V F N A V L Y L H M F L L A H L H S R R
ATTGTGGCTTTCCACAAAAGCAGGCGCCAATCCACGAGCATGAAGGGCGCGATGACCCTC 540
I V A F H K S R R Q S T S M K G A M T L
ACCATCCTGCTCGGGGTCTTCATTGTATGCTGGGGCCCCTTCTTCTCCACCTCATCCTC 600
T I L L G V F I V C W G P F F L H L I L
ATCCTCACCTGCCCCACCAGTCCCTTCTGCAACTGTTTCTTCAGAACTTTAACCTTTTC 660
I L T C P T S P F C N C F F R N F N L F
CTCATCCTCATCATCTGCAACTCGCTCATCGACCCGCTCATCTAC 705
L I L I I C N S L I D P L I Y

```

Fig. 3. The MC1R partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. 705 base pairs long, encoding 235 amino acid.

```

ATGATCCCTGATGAGAGACTCGCCACCAATAAGGTCCTTGTATCCAATGCTCTGTCTCAA 60
M I P D E R L A T N K V L V S N A L S Q
AGCCTCGACACAGGCCACCTCCTGTTGTTATTGTAGAGTTGCCGAAATCGGCGAGGAAG 120
S L D T G P P P V V I V E L P K S A R K
AACAAAAAGACAAAGAAACAAAAAAGAACAAATTAAGTGTGAAGAAGCGTCCTCCTCCT 180
N K K T K K Q K K N K L S V K K R P P P
CCTGCTAATTGCATTCCCTTGTGGGAAGCTGTAATCTCCAAACAATGTGTGCTGTGAC 240
P A N C I P L W G S C K S P N N V C C D
TTTTGTGCTTTCTGCCAGTGTGGCTCTTCAGAACTGTCTGTTTCTGTGCAATGGGCAAC 300
F C A F C Q C R L F R T V C F C R M G N
CCTCGATGC 309
P R C

```

Fig 4. The ASIP partial nucleotide and deduced amino acid sequence of red spotted grouper. 309 base pairs long, encoding 103 amino acid.

## 2) 상동성

붉바리에서 확인된 멜라닌 관련유전자의 아미노산서열과 다른 어종간 계통수를 분석한 결과, 붉바리의 MCH 아미노산 서열은 전갱이과(Carangidae)의 방어(Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*)와 가장 높은 75.7%의 상동성을 보였고, 잉어과(Cyprinidae)의 제브라피쉬(Zebra fish, *Danio rerio*)와 가장 낮은 39.5%의 상동성을 보였다(Table 7). POMC 아미노산 서열은 바리과(Serranidae)의 갈색등근바리(Orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*)와 가장 높은 97.3%의 상동성을 보였고, 뱀장어과(Anguillidae)의 뱀장어(Japanese eel, *Anguilla japonica*)와 가장 낮은 46.5%의 상동성을 보였다(Table 8). 붉바리 MC1R 아미노산 서열은 바리과(Serranidae)의 팬더그루퍼(Panther Grouper, *Cromileptes altivelis*)와 가장 높은 99.6%의 상동성을 보였으며, 큰가시고기과(Gasterosteidae)의 큰가시고기(Three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*), 동미리과(Trachinidae)의 lesser weever (*Echiichthys vipera*)와 가장 낮은 94.04%의 상동성을 보였다(Table 9). 하지만 붉바리 MC1R 유전자는 대부분 다른 어종들과 높은 상동성을 보이는 것으로 나타났다. ASIP 아미노산 서열은 놀래기과(Labridae)의 양놀래기(Ballan wrasse, *Labrus bergylta*)와 가장 높은 81.6%의 상동성을 보였고, 잉어과(Cypriniformes)의 금붕어(Gold fish, *Carassius auratus*)와 가장 낮은 54.5%의 상동성을 보였다(Table 10).

종간 계통 유연관계를 분석한 결과, 붉바리의 MCH 아미노산 서열은 방어와 가장 인접한 유연관계에 있었다(Fig. 5). POMC 아미노산 서열은 갈색등근바리와 가장 인접한 유연관계에 있었으며(Fig. 6), MC1R 아미노산 서열은 팬더그루퍼와 가장 인접한 유연관계에 있었다(Fig. 7). ASIP 아미노산 서열은 양놀래기와 가장 인접한 유연관계에 있었다(Fig. 8).



Table 7. Overall amino acid identities of MCH between *Epinephelus akaara* and other fishes

Species		MCH Homology(%)
Teleostei		
Perciformes	<i>Seriola quinqueradiata</i>	75.7
Gasterosteiformes	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	75.5
Perciformes	<i>Notothenia coriiceps</i>	74.5
Cichliformes	<i>Oreochromis aureus</i>	72.8
Cichliformes	<i>Oreochromis niloticus</i>	70.9
Pleuronectiformes	<i>Verasper moseri</i>	69.6
Pleuronectiformes	<i>Scophthalmus maximus</i>	68.0
Cyprinodontiformes	<i>Fundulus heteroclitus</i>	67.0
Pleuronectiformes	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	57.1
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus keta</i>	52.1
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	52.1
Cichliformes	<i>Schizothorax davidi</i>	47.1
Cichliformes	<i>Schizothorax prenanti</i>	47.1
Cichliformes	<i>Carassuis auratus</i>	47.1
Cichliformes	<i>Danio rerio</i>	40.2

Table 8. Overall amino acid identities of POMC between *Epinephelus akaara* and other fishes

Species		POMC Homology(%)
<i>Teleostei</i>		
Perciformes	<i>Epinephelus coioides</i>	97.3
Perciformes	<i>Dicentrarchus labrax</i>	79.6
Perciformes	<i>Acanthopagrus latus</i>	78.0
Perciformes	<i>Sparidentex hasta</i>	76.7
Perciformes	<i>Oreochromis mossambicus</i>	75.4
Cichliformes	<i>Maylandia zebra</i>	75.4
Synbranchiformes	<i>Mastacembelus armatus</i>	74.8
Cyprinodontiformes	<i>Fundulus heteroclitus</i>	73.8
Beloniformes	<i>Oryzias latipes</i>	70.8
Beloniformes	<i>Oryzias melastigma</i>	70.3
Cyprinodontiformes	<i>Nothobranchius rachovii</i>	66.7
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	65.8
Pleuronectiformes	<i>Solea solea</i>	64.3
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	62.2
Salmoniformes	<i>Salvelinus alpinus</i>	59.9
Cypriniformes	<i>Schizothorax prenanti</i>	58.3
Cypriniformes	<i>Carassius auratus</i>	56.1
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	55.0
Anguilliformes	<i>Anguilla japonica</i>	46.5

Table 9. Overall amino acid identities of MC1R between *Epinephelus akaara* and other fishes

Species	MC1R Homology(%)
<i>Teleostei</i>	
Perciformes <i>Cromileptes altivelis</i>	99.6
Perciformes <i>Mycteroperca marginata</i>	99.2
Perciformes <i>Belonoperca chabanaudi</i>	97.9
Perciformes <i>Variola louti</i>	97.4
Perciformes <i>Grammistops ocellatus</i>	97.0
Scorpaeniformes <i>Dendrochirus biocellatus</i>	97.0
Scorpaeniformes <i>Ebosia bleekeri</i>	97.0
Scorpaeniformes <i>Scorpaenodes corallinus</i>	97.0
Scorpaeniformes <i>Scorpaenodes guamensis</i>	97.0
Perciformes <i>Amblycirrhitus bimacula</i>	96.6
Scorpaeniformes <i>Trigloporus lastoviza</i>	96.6
Scorpaeniformes <i>Pterois antennata</i>	96.6
Scorpaeniformes <i>Neomerinthe folgori</i>	96.6
Trachiniformes <i>Cheimarrichthys fosteri</i>	96.6
Syngnathiformes <i>Hippocampus hippocampus</i>	96.6
Perciformes <i>Dicentrarchus labrax</i>	95.7
Scorpaeniformes <i>Liparis montagui</i>	95.3
Gasterosteiformes <i>Gasterosteus aculeatus</i>	94.0
Trachiniformes <i>Echiichthys vipera</i>	94.0

Table 10. Overall amino acid identities of ASIP between *Epinephelus akaara* and other fishes

Species		ASIP Homology(%)
<i>Teleostei</i>		
Perciformes	<i>Labrus bergylta</i>	81.6
Pleuronectiformes	<i>Scophthalmus maximus</i>	80.0
Cichliformes	<i>Oreochromis niloticus</i>	80.6
Gasterosteiformes	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	80.6
Synbranchiformes	<i>Mastacembelus armatus</i>	79.6
Pleuronectiformes	<i>Solea senegalensis</i>	76.7
Anabantiformes	<i>Anabas testudineus</i>	75.7
Cyprinodontiformes	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	74.8
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	72.8
Pleuronectiformes	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	64.4
Salmoniformes	<i>Salvelinus alpinus</i>	64.3
Osteoglossiformes	<i>Paramormyrops kingsleyae</i>	63.4
Cypriniformes	<i>Culter alburnus</i>	56.0
Cypriniformes	<i>Carassius auratus</i>	54.5

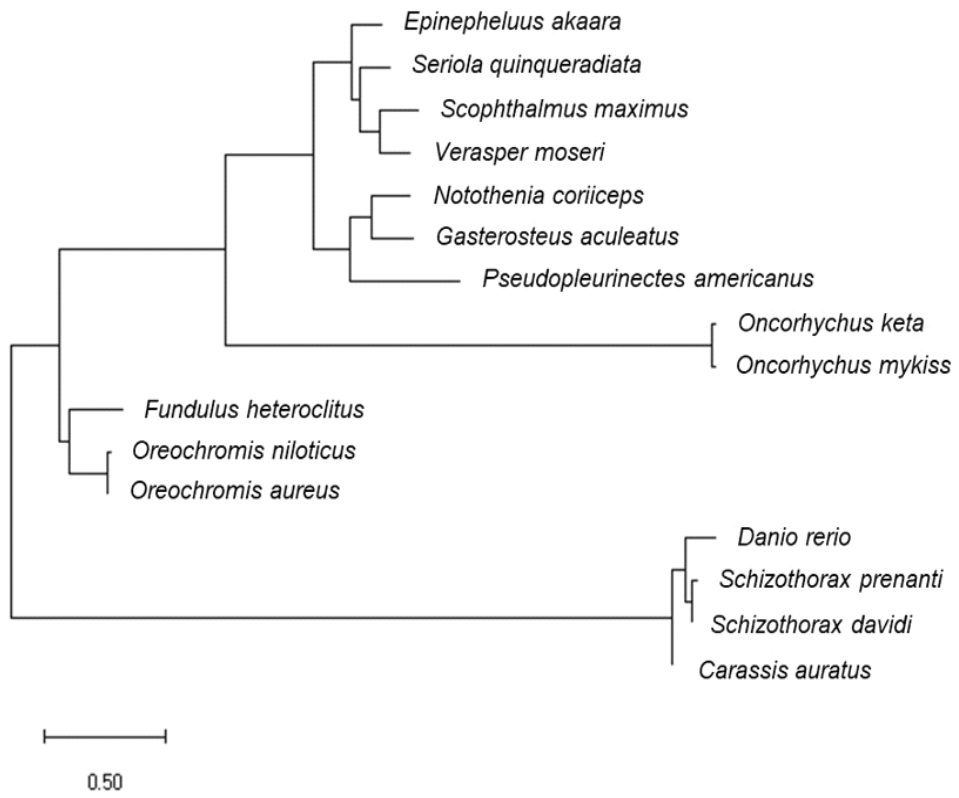


Fig. 5 Phylogenetic tree of red spotted grouper *mch* cDNA

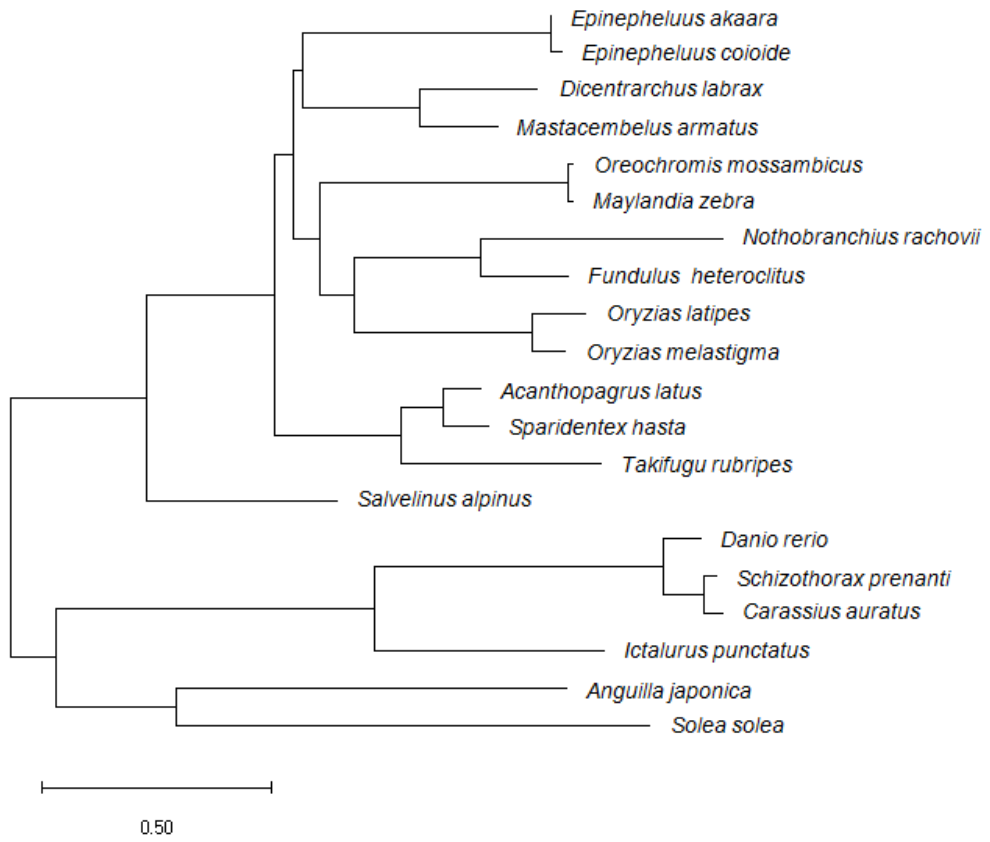


Fig. 6. Phylogenetic tree of red spotted grouper *pomc* cDNA

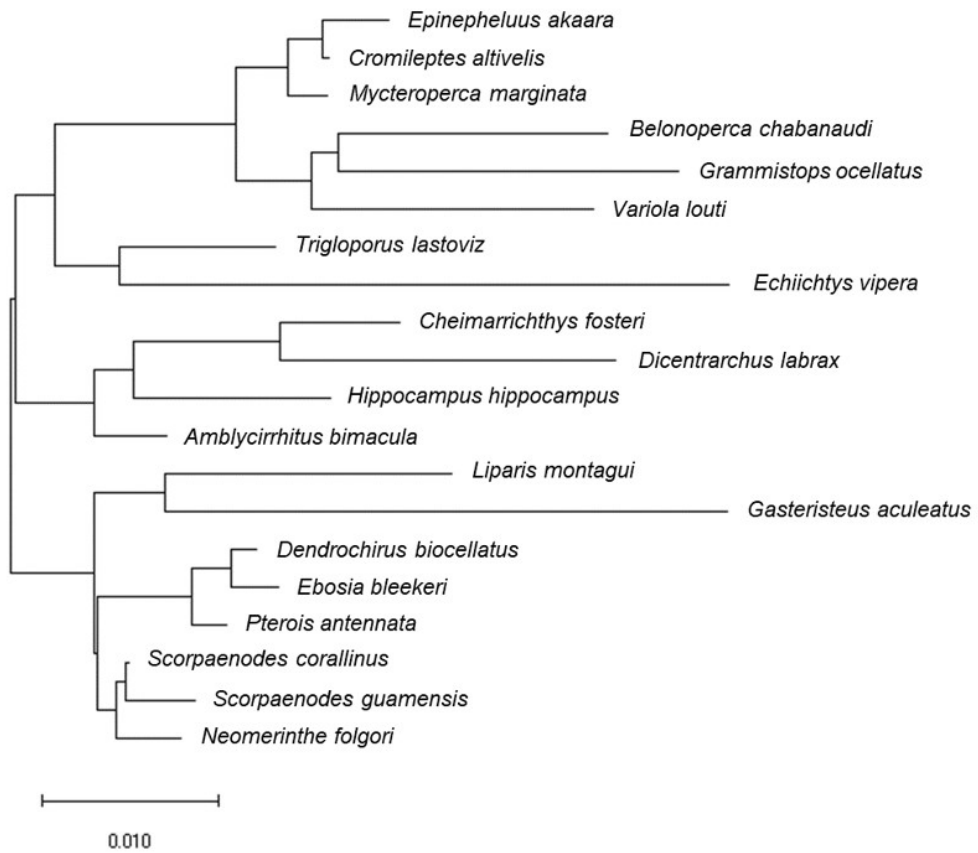


Fig. 7. Phylogenetic tree of red spotted grouper *mclr* cDNA

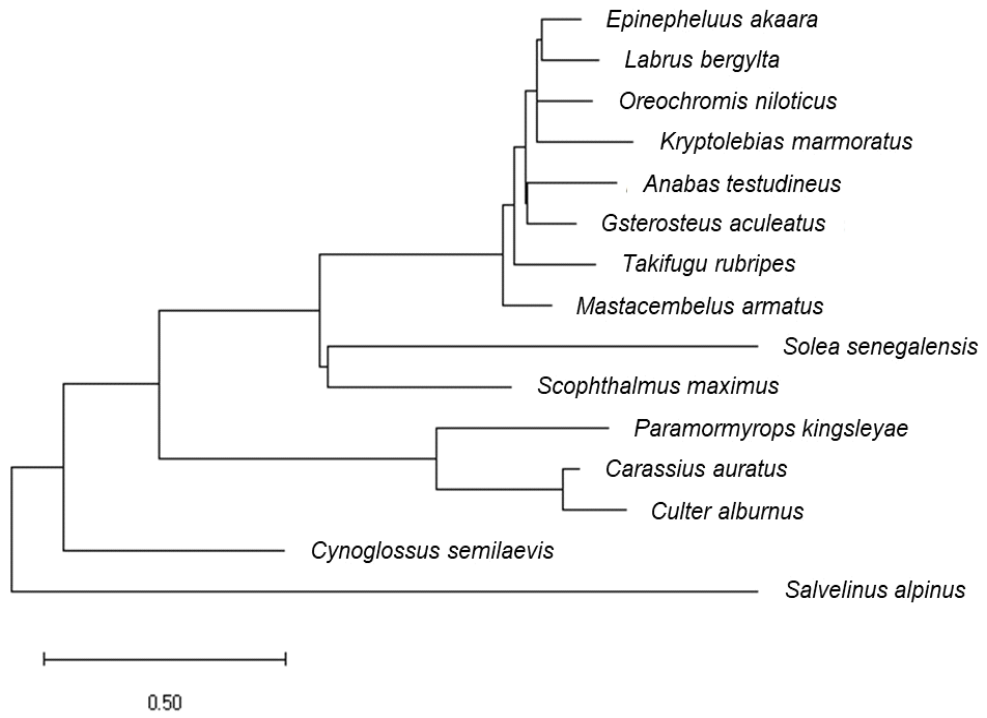


Fig. 8. Phylogenetic tree of red spotted grouper *asip* cDNA



### 3) 멜라닌 관련유전자 조직별 발현

북바리의 중추신경조직과 주변조직에서 *mch*, *pomc*, *mclr*, *asip*의 mRNA 발현을 확인한 결과, *mch* mRNA는 중추신경조직에서의 간뇌 (diencephalon, Di)에서 특이적으로 발현이 높았다(Fig. 9). *pomc* mRNA의 발현은 오직 뇌하수체에서 특이적으로 발현이 높았다(Fig. 10). *mclr* mRNA의 발현은 대부분의 조직에서 발현이 확인되었으며, 특히 피부조직과 지느러미 조직에서 높은 발현이 나타났다(Fig. 11). *asip* mRNA의 발현은 특이적으로 혀와 배 부분의 피부에서 높은 발현이 나타났다(Fig. 12).

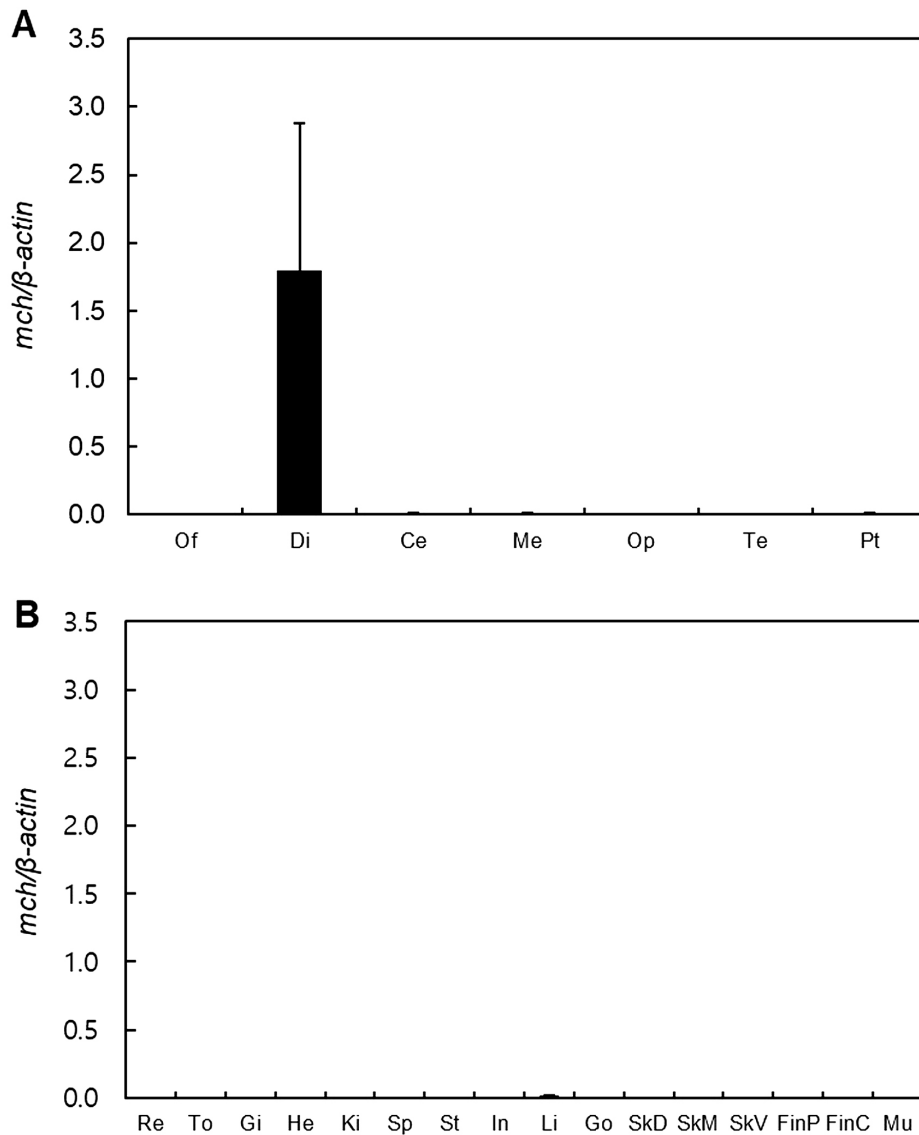


Fig. 9. Tissue specific expression of *mch* mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. Nerve tissue (A) and peripheral tissue (B). Of, olfactory lobe; Te, telecephalon; Op, optic tetum; Di, diencephalon; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongata; Pt, pituitary; Re, retina; To, tongue; Gi, gill; He, heart; Ki, kidney; Sp, spleen; St, stomach; In, intestine; Li, liver; Go, gonad; SkD, skin dosal; SkM, skin middle; SkV, skin ventral; FinP, pectoral fin; FinC, caudal fin; Mu, muscle.

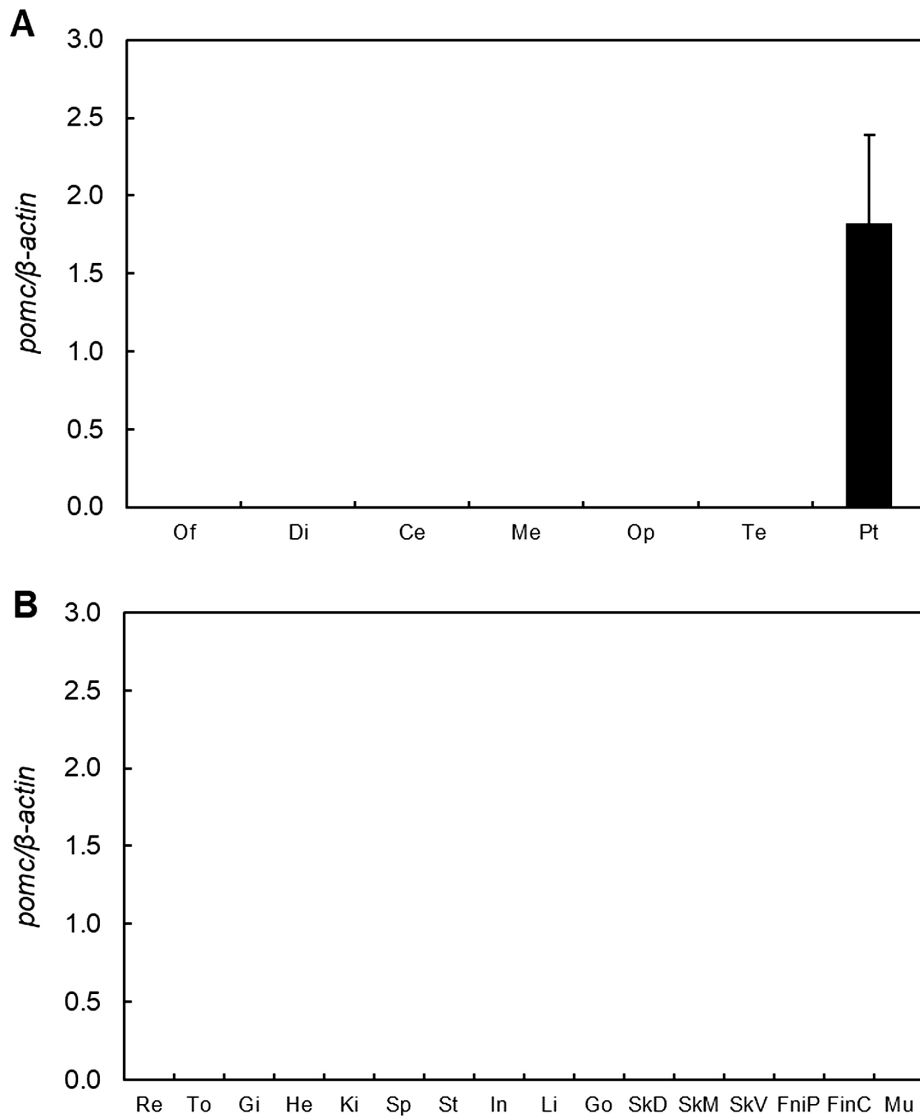


Fig. 10. Tissue specific expression of *pomc* mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. Nerve tissue (A) and peripheral tissue (B). Of, olfactory lob; Te, telecephalon; Op, optic tetum; Di, diencephalon; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongata; Pt, pituitary; Re, retina; To, tongue; Gi, gill; He, heart; Ki, kidney; Sp, spleen; St, stomach; In, intestine; Li, liver; Go, gonad; SkD, skin dosal; SkM, skin middle; SkV, skin ventral; FinP, pectoral fin; FinC, caudal fin; Mu, muscle.

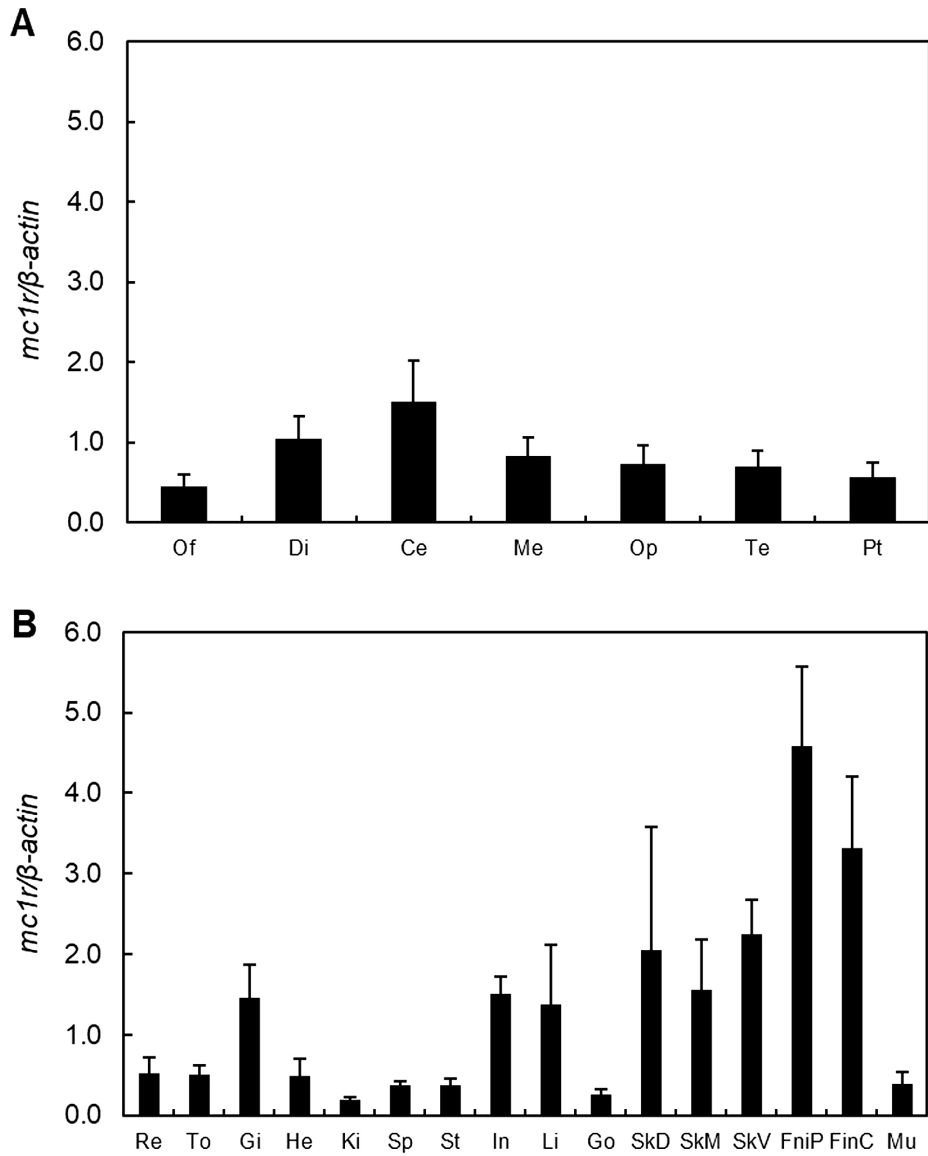


Fig. 11. Tissue specific expression of *mclr* mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. Nerve tissue (A) and peripheral tissue (B). Of, olfactory lob; Te, telecephalon; Op, optic tetum; Di, diencephalon; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongata; Pt, pituitary; Re, retina; To, tongue; Gi, gill; He, heart; Ki, kidney; Sp, spleen; St, stomach; In, intestine; Li, liver; Go, gonad; SkD, skin dosal; SkM, skin middle; SkV, skin ventral; FinP, pectoral fin; FinC, caudal fin; Mu, muscle.

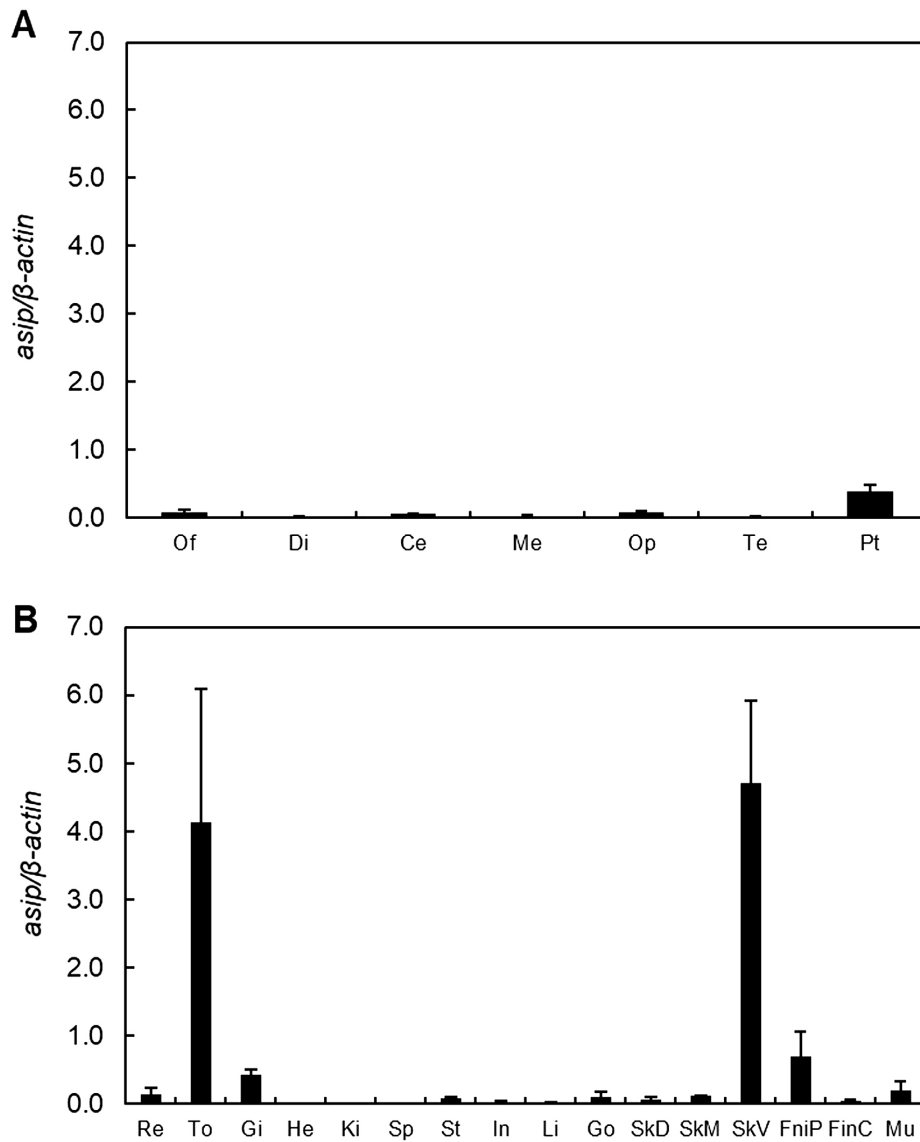


Fig. 12. Tissue specific expression of *asip* mRNA in the red spotted grouper by Real-time qPCR. Nerve tissue (A) and peripheral tissue (B). Of, olfactory lob; Te, telecephalon; Op, optic tetum; Di, diencephalon; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongata; Pt, pituitary; Re, retina; To, tongue; Gi, gill; He, heart; Ki, kidney; Sp, spleen; St, stomach; In, intestine; Li, liver; Go, gonad; SkD, skin dosal; SkM, skin middle; SkV, skin ventral; FinP, pectoral fin; FinC, caudal fin; Mu, muscle.

## 2. 붉바리 발달단계에 따른 멜라닌 관련유전자의 발현

### 1) 발달단계별 체색 발달 형태

붉바리 부화 직후의 자어에서는 흑색소포가 관찰되지 않았으며(Fig. 13A), 부화 1일째 안구의 바깥 측으로 멜라닌 띠가 형성되는 것을 확인하였다(Fig. 13B). 2일째 안구 바깥 측의 띠에서부터 중심으로 멜라닌이 뒤덮이기 시작하였으며(Fig. 13C), 3일째 안구가 완전히 흑색소포로 덮였으며, 등쪽의 막지느러미와 복강에 흑색소포가 형성되기 시작하였다(Fig. 13D). 5일째 복강의 흑색소포들이 척추로 퍼지고(Fig. 13E), 10일째 척추의 흑색소포의 분포범위가 넓어졌다(Fig. 13F). 14일째 복강에 흑색소포가 완전히 덮여지고(Fig. 13G), 20일째 미병부에서 흑색소포가 처음으로 관찰되었으며(Fig. 13H), 25일째 극의 가장자리에서 흑색소포가 분포하고, 미병부에서 흑색소포수가 증가하였다(Fig. 13I). 35일째 뺨에서 붉은색을 보이는 색소포가 처음으로 관찰되었으며(Fig. 13J), 40일째 등지느러미와 등의 가장자리와 척추를 따라 흑색소포가 발달하였고(Fig. 13K), 45일째 흑색소포들이 등지느러미와 전신에 분포되었다(Fig. 13L).

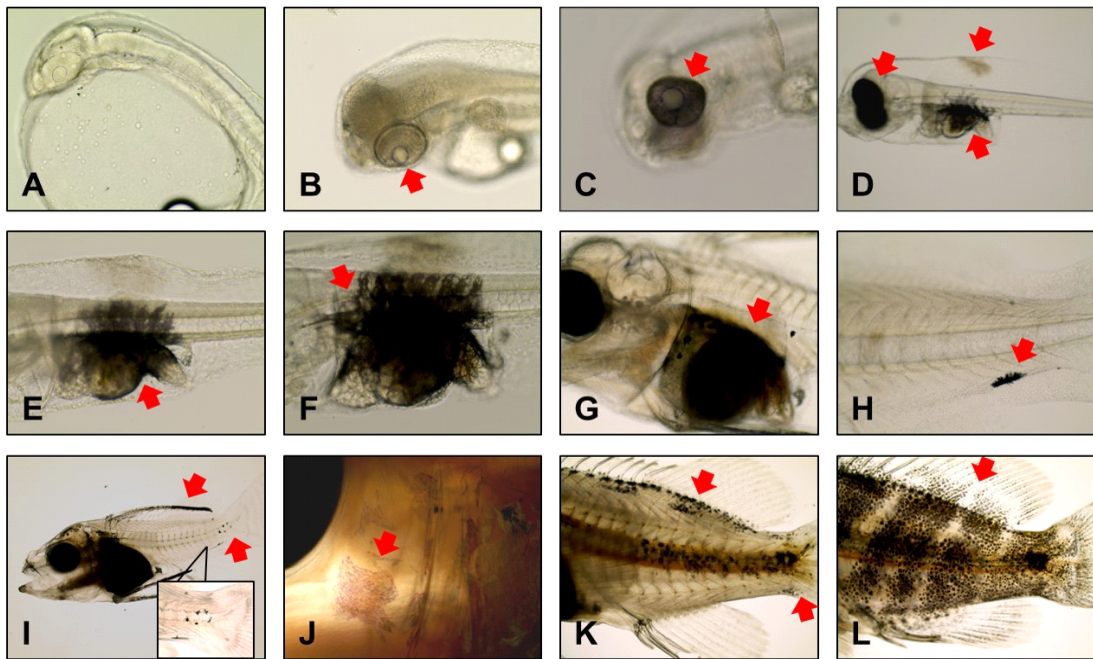


Fig. 13. Development stage of pigmentation in the red spotted grouper. 0DAH (A), 1DAH (B), 2DAH (C), 3DAH (D), 5DAH (E), 10DAH (F), 14DAH (G), 20DAH (H), 25DAH (I), 35DAH (J), 40DAH (K), 50DAH (L). DAH, day after hatching; allow, melanin.

## 2) 발달단계에 따른 멜라닌 관련유전자들의 mRNA 발현

북바리의 발달단계에 따른 *mch*, *pomc*, *mclr*, *asip*의 mRNA 발현을 조사한 결과, *mch* mRNA의 발현은 부화 후 3일째에 증가하기 시작하여 부화 후 5일째 가장 높게 발현하였고, 이후 급격히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 14A). *pomc* mRNA의 발현 역시 부화 후 3일째부터 증가하기 시작하여 부화 후 5일째 가장 높게 발현하였으며, 부화 14일째까지 감소한 이후 낮게 발현하였다(Fig. 14B). *mclr* mRNA의 발현은 부화 후 5일째까지 높게 발현하였으며, 부화 후 25일째까지 감소하면서, 이후 낮은 발현을 보였다(Fig. 15A). *asip* mRNA의 발현은 부화 후 10일째까지 서서히 증가하여 가장 높게 발현하였다가, 이후 부화 후 50일째까지 서서히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 15B).



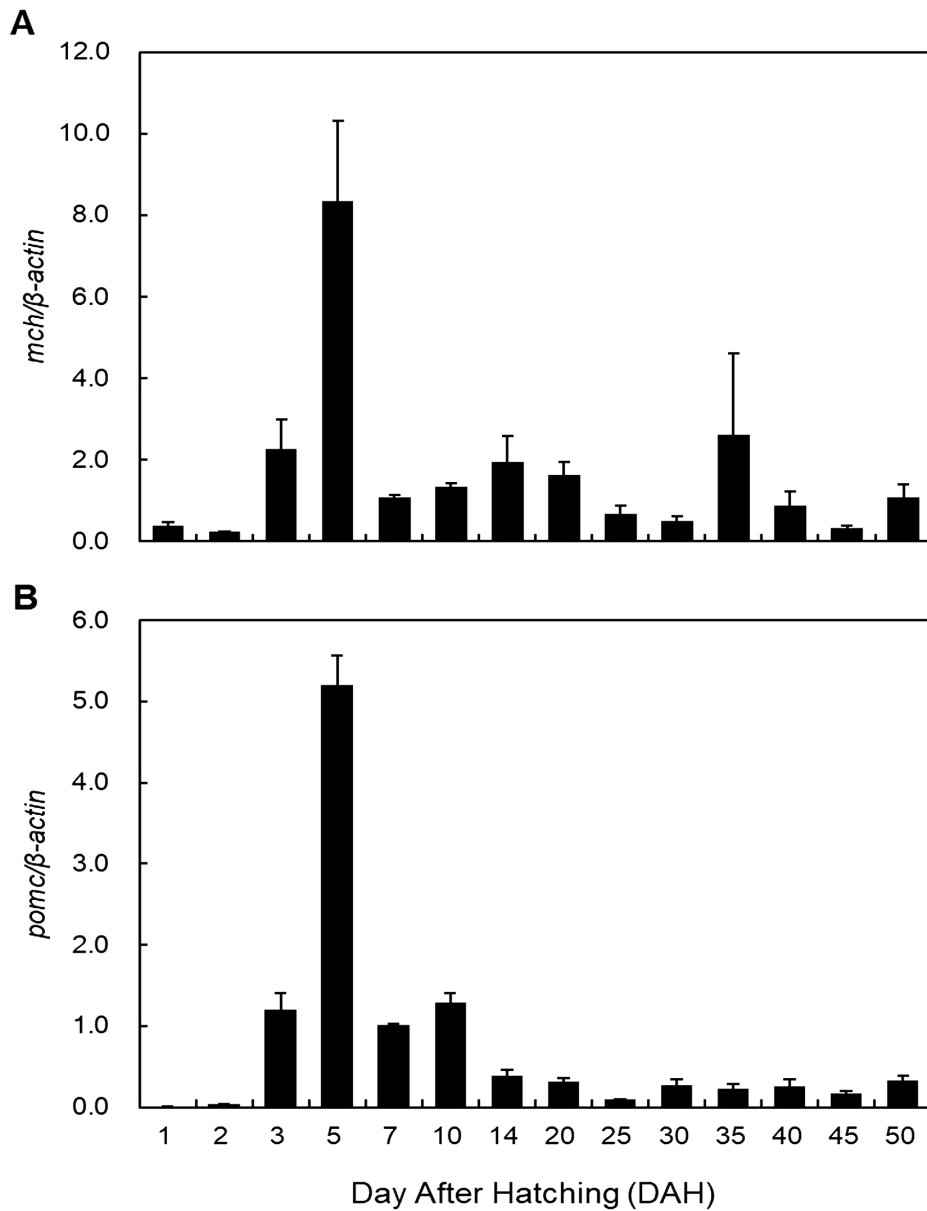


Fig. 14. Expression of development stage of melanin related factor in the red spotted grouper by Real-time qPCR. *mch* (A), *pomc* (B) mRNA.

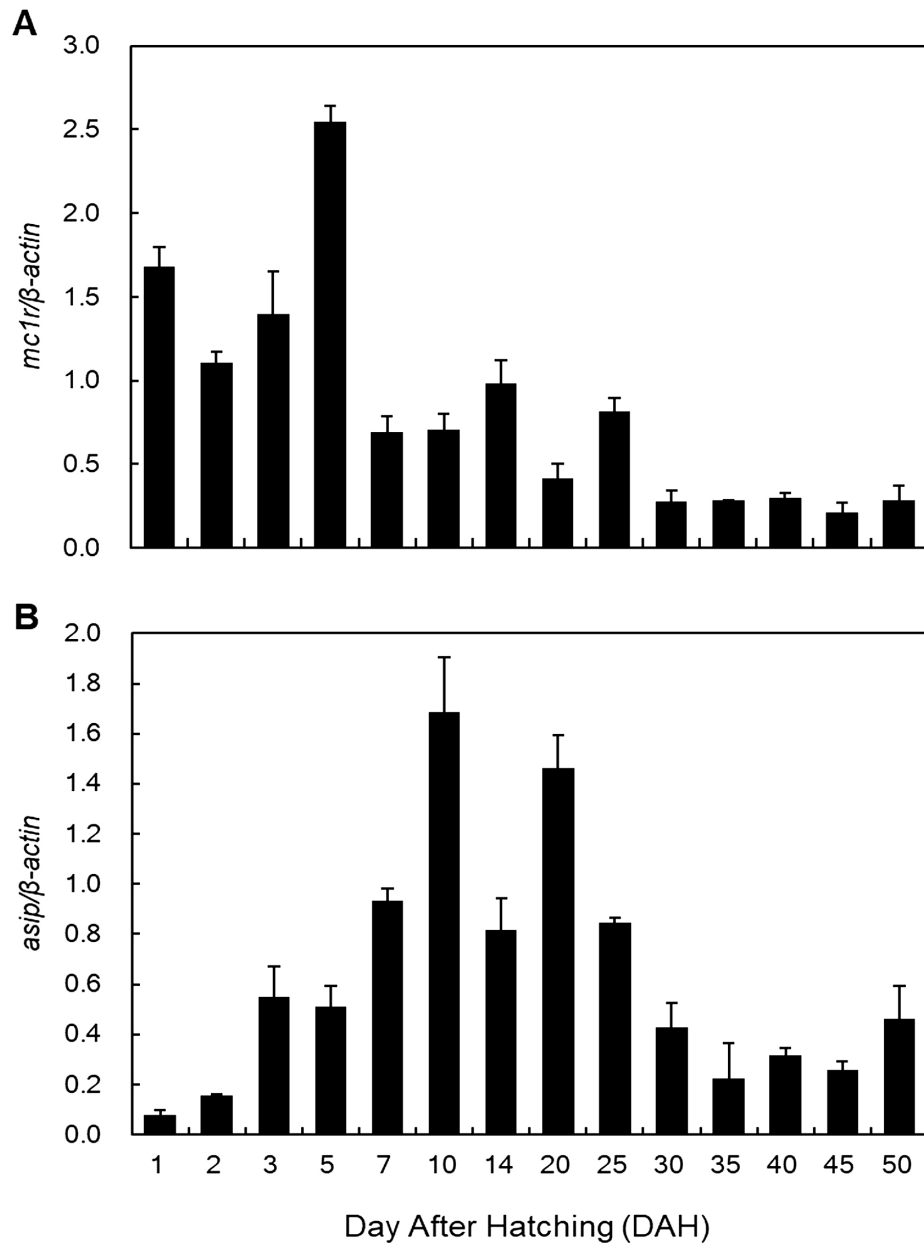


Fig. 15. Expression of development stage of melanin related factor in the red spotted grouper by Real-time qPCR. *mc1r* (A), *asip* (B) mRNA.

### 3. 광량에 따른 멜라닌 관련유전자 발현

#### 1) 광량에 따른 멜라닌 관련유전자들의 mRNA 발현

북바리 뇌와 뇌하수체의 조직에서 *mch* mRNA와 *pomc* mRNA의 발현을 조사한 결과, *mch* mRNA의 발현이 실험 6주째 2000 lux에서 가장 높았으며, 0 lux에서 가장 낮은 발현을 보였다( $P<0.05$ ). 하지만 실험 9주째에서는 그룹간 유의적인 차이가 없어졌으며(Fig. 16A). *pomc* mRNA의 발현은 실험 6주째 200 lux에서 가장 높으며, 실험 9주째는 0 lux에서 가장 높았으며, 1000 lux에서 가장 낮았다( $P<0.05$ ) (Fig. 16B).

북바리 피부조직에서 *mclr* mRNA와 *asip* mRNA의 발현을 조사한 결과, *mclr* mRNA의 발현은 실험 3주째 200 lux에서 가장 높았고 2000 lux에서 가장 낮았다( $P<0.05$ ). 그러나 실험 6주째 그룹간 유의차는 없었다. 실험 9주째에는 0 lux에서 가장 높게 발현 하였으며 1000lux 낮게 발현을 확인하였다(Fig. 17A). *asip* mRNA의 발현은 실험 시작시 가장 높게 발현하였으며, 이후 매우 낮은 발현을 유지하였으며 실험기간동안 모든 그룹간 유전자 발현의 차이는 없었다(Fig. 17B).

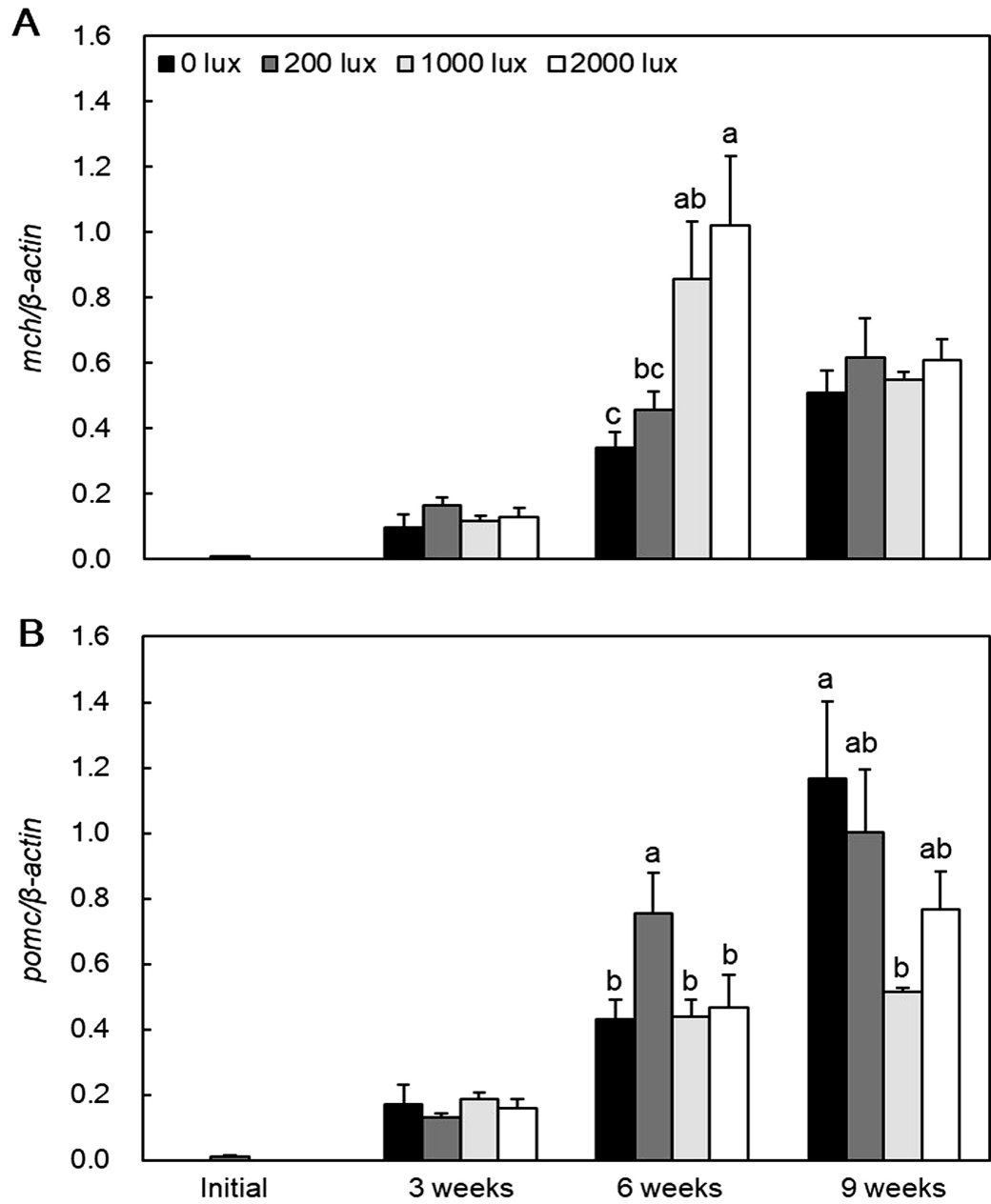


Fig. 16. Expression changes of *mch* and *pomc* mRNA in the red spotted grouper brain and pituitary under different light intensity conditions.

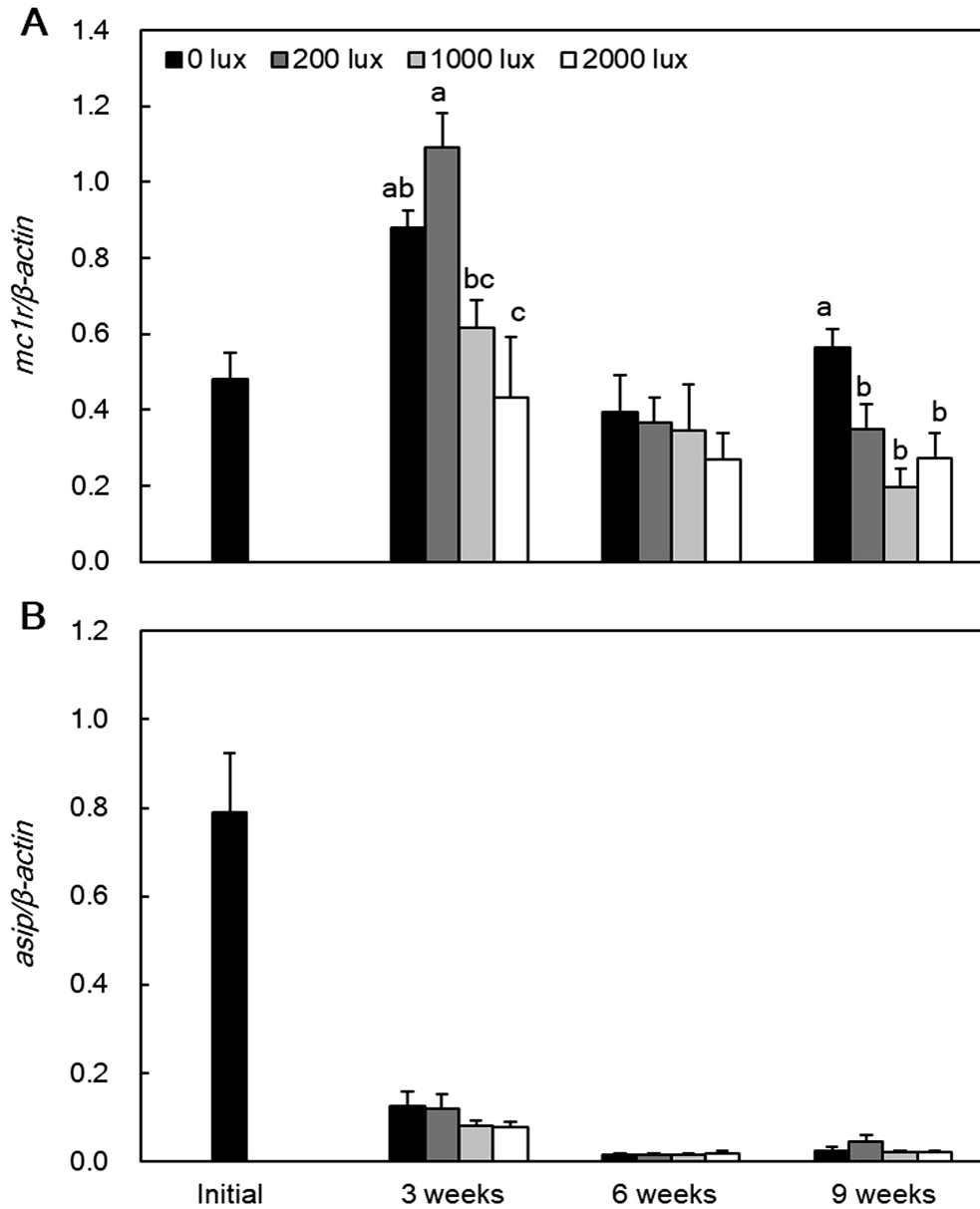


Fig. 17. Expression changes of *mc1r* and *asip* mRNA in the red spotted grouper skin under different light intensity conditions.

## 2) 피부 RGB 채색계수

광량에 따른 붉바리 피부의 RGB 채색계수를 조사한 결과, 0 lux 그룹에서는 RGB 계수가 각각 86, 71, 58으로 나타났으며, 가장 어두운 채색을 띠었다. 200 lux의 그룹에서는 RGB 계수가 각각 88, 71, 59이었고, 1000 lux에서는 각각 137, 116, 99를 나타내었으며, 1000 lux 그룹의 채색이 가장 밝은 색을 띠었다. 2000 lux에서는 각각 105, 92, 81이었다(Fig. 18).

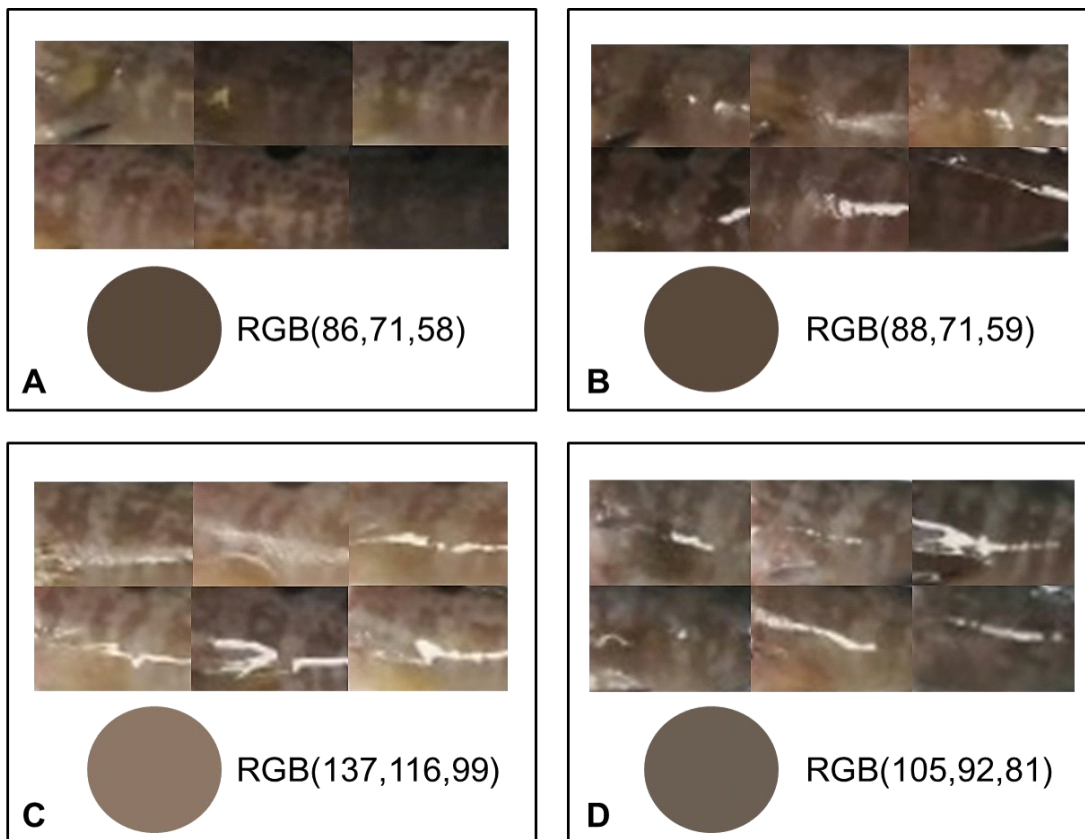


Fig. 18. RGB code value extracted form Red spotted grouper skin. 0 lux (A), 200 lux (B), 1000 lux (C), 2000 lux (D) condition.

#### IV. 고찰

최근 어류의 광생물학적(photobiology) 분야에서 체색, 성장, 신진대사, 섭이 등 다양한 적응생리특성에 관한 연구가 진행되고 있다(Appelbaum et al., 2000; Petrell et al., 2001). 이 연구는 붉바리를 대상으로 광량에 대한 체색관련유전자들의 적응생리특성을 조사하기 위하여 수행되었다. 이를 위해 붉바리에서 멜라닌 관련유전자들의 partial sequencing을 수행한 결과 MCH, POMC, MC1R, ASIP 유전자들은 각각 총 309, 459, 705, 309 bp의 부분염기서열이 확인되었다. 확인된 붉바리의 체색관련유전자 정보를 이용하여 부화 자어의 체색발달에 따른 유전자 발현을 조사한 결과, *mch*, *pomc*, *mclr* mRNA의 발현이 부화 후 3일째에 증가하기 시작하여 부화 후 5일째 가장 높았다. 이 시기 붉바리 자어는 안구가 완전히 흑색소포로 덮히고, 등쪽의 막지느러미와 복강에 흑색소포가 형성되기 시작하였다. 이러한 결과는 붉바리 자어의 부화 후 3일째부터 5일째까지 체색관련유전자들의 발현이 활성화되고, 이로 인하여 멜라닌 합성이 유도되는 것으로 생각된다. *asip* mRNA의 발현은 부화 후 7일째에서 25일째까지 높게 발현하였으며, 이 시기의 부화자어의 복강에서 흑색소포의 증가한 후 복강이 덮이고 복강의 외부로 홍색소포가 둘러싸는 것이 관찰되었다. 설치류에서 ASIP는 육상 척추동물에서 MC1R의  $\alpha$ -MSH 효과를 길항하여 유멜라닌과 페오멜라닌의 생산을 전환시키는 작용을 하며, 또한 *asip*는 멜라닌 세포의 분화 및 증식을 억제하여 털을 밝게 만들어 주는 기능을 한다(Suzuki, 2013). 금붕어를 대상으로 한 연구결과에서 ASIP는 포유동물의 ASIP와 유전적 상동성을 지니고 있으며 쥐와 마찬가지로 복부 체색 패턴에 중요한 역할을 하며 금붕어에서 지느러미 및 복부 색소 피부에서 흑색소포의 분화를 억제하며 홍색소포의 분화를 촉진하는 것으로 나타났다(Cerdá et al., 2005). 따라서 붉바리 자어의 부화 후 7일째부터 ASIP 발현의 증가는 복강 외부에서 홍색소포를 발달시키기 위해 활성화되는 것으로 생각된다.

붉바리의 흑색소포는 부화 후 1일째 안구의 바깥 측으로 멜라닌 띠가 관찰되고, 3일째 등쪽의 막지느러미와 복강에 흑색소포가 처음으로 관찰되었다. 부화 후 5일째 자어의 척추에서 흑색소포가 관찰되었으며, 20일째 미병부에서 흑색소



포가 처음으로 관찰되면서 몸통에 체색이 발달하기 시작하였다. 부화 후 35일째 두부 안면에서 붉은색을 보이는 색소포가 처음으로 관찰되었으며, 40일째부터 본격적으로 몸통의 흑색소포들이 등지느러미와 전신에 체색을 지니기 시작하였다. 이러한 붉바리의 자어의 체색발달은 같은 바리과인 Brown-marble grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) 자어의 체색발달과 유사한 패턴을 보였다. Brown-marble grouper 자어의 체색발달 역시 안구에서 흑색소포가 처음으로 확인되며, 이후 복강과 극, 미병부의 색소포가 발달하기 시작한다. 그리고 극의 끝과 미병부에 흑색소포가 응집되기 시작하며, 두부와 지느러미, 등 가장자리에서 흑색소포가 발달되며 전신으로 체색이 발달한다(Kohno, 1993). 하지만 이러한 체색변화는 종특이성을 보이며, 강담돔(Rock porgy, *Oplegnathus punctatus*)의 경우 흑색소포가 부화하기 전부터 관찰된다(박 등, 2015). 강담돔은 부화 전인 수정 후 15시간째인 기관형성시기부터 흑색소포가 두부 뒷부분과 근절 주위에서 꼬리부분까지 침착되고 유구 주변에 형성되어 체표를 뒤덮은 상태로 부화한다. 강도다리(Starry flounder, *Platichthys stellatus*)의 경우 안구 흑색소포가 발달하기 전 막지느러미와 꼬리측부터 흑색소포가 발달하며, 안구의 흑색소포 발달 후 막지느러미와 체측 중앙에서 전신으로 흑색소포의 발달이 시작된다(Yamashita, 2014). 이러한 결과들에서 어류의 부화자어시기 흑색소포발달은 종마다 다르게 나타나는 종특이적인 특성을 갖는 것으로 생각된다.

붉바리에서 광량 조절에 따른 멜라닌 관련유전자의 발현을 조사한 결과 *mch* mRNA의 경우 광량이 증가함에 따라 발현이 증가하는 경향을 보였다. 하지만 *pomc* mRNA, *mclr* mRNA의 발현은 빛이 없는 0 lux 에서 유의적으로 가장 높았으며, 1,000 lux에서 가장 낮았다. *mclr* mRNA의 발현은 실험 종료시 0 lux에서 가장 높았으며 1000 lux에서 낮았다. 하지만 *asip* mRNA의 발현은 실험 시작시에서 가장 높게 발현 하였으며, 이 후에는 낮은 발현값을 유지하였다. RGB코드를 이용하여 체색의 밝기를 조사한 결과, 0 lux 에서 가장 어두운 체색을 보였고, 200 lux, 2000 lux, 1000 lux 의 순서로 점점 밝아지는 체색을 확인하였다.

어류에 있어서 광량이 생존율, 성장, 영양, 섭이, 체색 등 다양한 생리현상에 미치는 영향에 대한 연구들이 수행되고 있다(Batty et al., 1990; Boeuf et al., 1999; Reichard et al., 2002; Richmond et al., 2004; Luchiari et al., 2006; Liu et al., 2012;

Lee et al., 2017). 광을 조사하는 것은 흑색소포와 멜라닌의 발현을 유발 할 수 있으며, 흑색소포의 수를 늘어나거나 흑색소포 내에 존재하는 멜라닌의 양의 증가는 어류의 체색을 어둡게 만들 수 있다(Odiorne, 1957). 금색돔(Australian snapper, *Pagrus auratus*)의 경우, 해상가두리를 통한 사육에 있어서 차광막을 이용하여 각각 광량을 0%, 50%, 95%의 조건으로 차단하여 사육하였을 때, 다른 그룹보다 0% 그룹에서 체색이 어두워지는 경향을 보였다(Booth et al., 2004). 참돔(Red porgy, *Pagrus pagrus*)에 있어서 광량에 따른 체색의 변화를 조사한 결과, 흰배경색을 갖는 수조에서 광량이 높을 때 체색이 밝아지는 경향을 보였다(Pavlidis et al., 2008). Ocellaris clownfish (*Amphiprion ocellaris*)에서 20-50, 600-850, 2700-3500 lux 조건에서 5주간 사육 후 체색변화를 조사한 결과, 낮은 광량에서 등지느러미와 꼬리지느러미 발색은 밝아지는 경향을 보였다(Yasir et al., 2009). Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris Günther*)에서 서로 다른 광량 조건에 따른 생존율 및 체색의 변화를 조사한 결과, 광량이 높을수록 체색이 어두워지는 경향을 보였으나, 너무 높은 광량에서는 생존율이 감소하는 경향을 보였다(Han et al., 2005). 붉바리의 멜라닌관련 유전자 *pomc* mRNA, *mclr* mRNA, *mch* mRNA는 광량조절에 따라 발현양상이 달라지는 것을 확인 할 수 있었지만, *asip* mRNA의 발현은 광량에 영향을 받지 않았다. 이는 광량조건에서 *pomc* mRNA와 *mclr* mRNA의 발현을 통한 멜라닌 합성과 *mch* mRNA의 발현을 통한 멜라닌 응집이 광량조건에 영향을 받는 것으로 사료되며, *asip* mRNA의 낮은 발현은 자어가 성장 발달하면서 복강에서 은색을 띠는 홍색소포의 발달이 종료되어 낮은 발현을 보이는 것으로 사료된다.

이 연구결과는 사육환경에 따른 붉바리의 발색유도를 향상시키기 위한 기초자료로서 사용될 수 있을 것이라 생각되며, 추후 외부환경에 따른 멜라닌합성관련 유전자들의 발현과 체색 변화간의 상관관계를 이해하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 참고문헌

- Adachi K, Kato K, Wakamatsu K, Ito S, Ishimaru K, Hirata T, Osamu M, Kumai H (2005) The histological analysis, colorimetric evaluation, and chemical quantification of melanin content in 'suntanned' fish. *Pigment cell research* 18:465-468.
- Amiya N, Amano M, Iigo M, Yamanome T, Takahashi A, Yamamori K (2008) Interaction of orexin/hypocretin like immunoreactive neurons with melanin concentrating hormone and  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone neurons in brain of a pleuronectiform fish, barfin flounder. *Fisheries science* 74:1040-1046.
- Appelbaum S, Kamler E (2000) Survival, growth, metabolism and behaviour of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) early stages under different light conditions. *Aquacultural Engineering* 22:269-287.
- Batty RS, Blaxter JHS, Richard JM (1990) Light intensity and the feeding behaviour of herring, *Clupea harengus*. *Marine Biology* 107:383-388.
- Beeching SC, Gross SH, Bretz HS, Hariatis E (1998) Sexual dichromatism in convict cichlids: the ethological significance of female ventral coloration. *Animal Behaviour* 56:1021-1026.
- Boeuf G, Le Bail, PY (1999) Does light have an influence on fish growth?. *Aquaculture* 177:129-152.
- Braasch I, Schartl M, Volf JN (2007) Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evolutionary Biology* 7:74.
- Bradner J, McRobert, SP (2001) Background colouration influences body colour segregation in mollies. *Journal of fish biology* 59:673-681.
- Cal L, Suarez-Bregua P, Cerdá-Reverter JM, Braasch I, Rotllant J (2017) Fish pigmentation and the melanocortin system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 211:26-33.
- Calvo NS, Roldán-Luna M, Argáez-Sosa JA, Martínez-Moreno G L, Mascaró M, Simões N (2016) Reflected light Influences the Coloration of the Peppermint

- Shrimp, *Lysmata boggei* (Decapoda: Caridea). Journal of the World Aquaculture Society 47:701-711.
- Cal L, Gómez-Marín C, Gómez-Skarmeta JL, Cerdá-Reverter JM, Kelsh RN, Rotllant J (2015) A Bac transgenic analysis of the *asip1* locus reveals developmental mechanisms of dorso-ventral pigmentation in fish. The International Symposium on Genetics in Aquaculture XII.
- Cerdá-Reverter JM, Haitina T, Schiöth HB, Peter RE (2005) Gene structure of the goldfish agouti-signaling protein: a putative role in the dorsal-ventral pigment pattern of fish. Endocrinology 146:1597-1610.
- Cerdá-Reverter JM, Agulleiro MJ, Guillot R, Sánchez E, Ceinos R, Rotllant J (2011) Fish melanocortin system. European journal of pharmacology 660:53-60.
- Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyimińska A (2013) Skin melanocytes: biology and development. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii 30:30.
- Cone RD (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. Endocrine reviews 27:736-749.
- Costin GE, Hearing VJ (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. The FASEB journal 21:976-994.
- Derby C (2014) Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. Marine drugs 12:2700-2730.
- Ducrest AL, Keller L, Roulin A (2008) Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. Trends in ecology & evolution 23:502-510.
- Fujii R (2000) The regulation of motile activity in fish chromatophores. Pigment Cell Research 13:300-319.
- Good PF, Olanow CW, Perl DP (1992) Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. Brain research 593:343-346.
- Harris J, Bird DJ (1998) Alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) and melanin-concentrating hormone (MCH) stimulate phagocytosis by head kidney

- leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vitro. Fish & Shellfish Immunology 8:631-638.
- Han D, Xie S, Lei W, Zhu X, Yang Y (2005) Effect of light intensity on growth, survival and skin color of juvenile Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris Günther*). Aquaculture 248:299-306.
- Ju SH, Cho GB, Sohn JW (2018) Understanding melanocortin-4 receptor control of neuronal circuits: toward novel therapeutics for obesity syndrome Pharmacological research 129:10-19
- Kalinowski CT, Robaina LE, Fernandez-Palacios H, Schuchardt D, Izquierdo MS (2005) Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. Aquaculture 244:223-231.
- Kittilsen S, Schjolden J, Beitnes-Johansen I, Shaw JC, Pottinger TG, Sørensen C, Braastad BO, Bakken M, Øverli Ø (2009) Melanin-based skin spots reflect stress responsiveness in salmonid fish. Hormones and behavior 56:292-298.
- Kondo T, Hearing VJ (2011) Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. Expert review of dermatology 6:97-108.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García-Borrón JC, Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. The EMBO journal 13:5818-5825.
- Kohno H, Diani S, Supriatna A (1993) Morphological development of larval and juvenile grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. Japanese Journal of Ichthyology 40:307-316.
- Korner A, Pawelek J (1982) Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. Science 217:1163-1165.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular biology and evolution 35:1547-1549.
- Lee JS, Britt LL, Cook MA, Wade TH, Berejikian BA, Goetz FW (2017) Effect of

- light intensity and feed density on feeding behaviour, growth and survival of larval sablefish *Anoplopoma fimbria*. *Aquaculture Research* 48:4438-4448.
- Liu Y, Mou Z, Xu G, Li Y, Wang C (2012) The effect of light intensity on the growth of *Brachymystax lenok* (Pallas, 1773). *Aquaculture Research* 43:1838-1844.
- Luchiari AC, De Moraes-Freire FA, Koskela J, Pirhonen J (2006) Light intensity preference of juvenile pikeperch *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture research* 37:1572-1577.
- Odiome JM (1957) "Color changes." *The physiology of fishes* 2:387-401.
- Reichard M, Jurajda P, Ondračková M (2002) The effect of light intensity on the drift of young of the year cyprinid fishes. *Journal of Fish Biology* 61:1063-1066.
- Richmond HE, Hrabik TR, Mensinger AF (2004) Light intensity, prey detection and foraging mechanisms of age 0 year yellow perch. *Journal of Fish Biology* 65:195-205.
- Salm A (2005) aMSH in fish: functions in stress responses and skin colour change. [SI: sn].
- Sasaki M, Shibata E, Tohyama K, Takahashi J, Otsuka K, Tsuchiya K, Takahashi S, Ehara S, Terayama Y, Sakai A (2006) Neuromelanin magnetic resonance imaging of locus ceruleus and substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroreport* 17:1215-1218.
- Seiji M, Shima K, Birbeck MSC, Fitzpatrick TB (1963) Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 100:497-533.
- Sköld HN, Aspengren S, Wallin M (2013) Rapid color change in fish and amphibians - function, regulation, and emerging applications. *Pigment cell & melanoma research* 26:29-38.
- Sulaimon SS, Kitchell BE (2003) The biology of melanocytes. *Veterinary dermatology* 14:57-65.
- Suzuki I, Im S, Tada A, Barsh G, Hearing V, Scott C, Akcali C, Davis MB, Abdel-Malek Z (1999) Participation of the melanocortin-1 receptor in the UV

- control of pigmentation. In Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 4:29-34.
- Suzuki H (2013) Evolutionary and phylogeographic views on Mc1r and Asip variation in mammals. Genes & genetic systems 88:155-164.
- Takahashi A, Tsuchiya K, Yamanome T, Amano M, Yasuda A, Yamamori K, Kawauchi H (2004) Possible involvement of melanin-concentrating hormone in food intake in a teleost fish, barfin flounder. Peptides 25:1613-1622.
- Maan ME, Sefc KM (2013) Colour variation in cichlid fish: developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences. In Seminars in Cell & Developmental Biology 24:516-528.
- Matsuda K (2009) Recent advances in the regulation of feeding behavior by neuropeptides in fish. Annals of the New York Academy of Sciences 1163:241-250.
- McLennan DA (1995) Male mate choice based upon female nuptial coloration in the brook stickleback, *Culaea inconstans* (Kirtland). Animal Behaviour 50:213-221.
- Nicolaus RA, Piattelli M, Fattorusso E (1964) The structure of melanins and melanogenesis –IV: On some natural melanins. Tetrahedron 20:1163-1172.
- Palumbo A, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M (2000) N-Methyl-D-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric oxide/cGMP signal transduction pathway. Journal of Biological Chemistry.
- Pavlidis M, Karkana M, Fanouraki E, Papandroulakis N (2008) Environmental control of skin colour in the red porgy, *Pagrus pagrus*. Aquaculture research 39:837-849.
- Paripatananont T, Tangtrongpaioj J, Sailasuta A, Chansue N (1999) Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish *Carassius auratus*. Journal of the World Aquaculture Society 30:454-460.
- Petrell RJ, Ang KP (2001) Effects of pellet contrast and light intensity on salmonid feeding behaviours. Aquacultural Engineering 25:175-186.
- Wang YJ, Chien YH, Pan CH (2006) Effects of dietary supplementation of

- carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture* 261:641-648.
- Yamashita YT, Aritaki M, Kurita Y, Tanaka M (2014) Early growth and development of reciprocal hybrids of the starry flounder *Platichthys stellatus* and stone flounder *Kareius bicoloratus*. *Journal of fish biology* 84:1503-1518.
- Yasir I, Qin JG (2009) Effect of light intensity on color performance of false clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society* 40:337-350.
- 박재민, 이성훈, 윤성민, 나해춘, 한경호 (2015) 강담돔 (*Oplegnathus punctatus*) 의 난 발생 및 자치어 형태발달. *한국어류학회지* 27:71-77..



## 감사의 글

바다 없는 동네에서 바다 공부를 하고 싶다며 제주도에 내려와 대학입학을 한 게 엇그제 같은데 벌써 석사과정을 마치며 감사의 글을 씁니다. 연구소로 이끌어 주시고 항상 많은 격려와 지도로 학사 그리고 석사과정을 이끌어주신 지도교수님 이영돈 교수님께 진심으로 감사드립니다. 부족한 저의 학위논문 심사를 맡아 주시고 세심한 앞으로에 대한 조언과 격려로 힘을 주신 여인규 교수님, 김기영 교수님께 감사의 마음 전합니다.

긴 타지생활을 하며 학위를 받도록 도와주신 연구소 가족들 덕분에 놓지 않고 학사 그리고 석사 과정을 마친 것 같습니다. 언제나 감사한 마음이 가득합니다. 실험실의 기둥 이치훈 박사님, 언제나 유쾌하고 위트가 넘치시는 문영건 박사님, 고민에 빠져 있을 때마다 옆에서 도와주신 김유경 박사님, 매일같이 저 때문에 스트레스 받아하시지만 누구보다 저를 챙겨주신 김병훈 박사님, 대학원에 들어와 석사과정을 함께 해주시고 챙겨주신 고신자 선배님, 뭐든 물어보면 알려주시고 다 잘하시는 맥가이버 부문수 선배님, RIS 사업단의 강창협 선생님, 이보람 선생님 감사합니다.

학위준비를 위해 실험에 편의를 주신 해양과학연구소 강태연 선생님 김승필 선생님 현창철 선생님, 항상 맛있는 식사를 할 수 있게 도와주신 윤태석 이모님 쾌적한 환경을 위해 아침 일찍부터 힘써주시는 김성미 이모님 감사합니다.

본받고 싶은 정도로 부지런하고 언제나 종묘일을 열심히 해내는 수민이, 민영이 학위를 위해 열심히 실험을 배우고 노력하는 민석이, 지은이 실험실에 알바로 들어와 열심히 일한 현정이, 강희, 양완이, 강수 앞으로도 화이팅 하자.

학위과정을 묵묵히 지켜봐 주시고 오랜시간 제주도에 내려와 힘이 들 때 늘 조언과 도움을 주신 아버지, 항상 걱정해주시고 격려해주시는 매일 보고싶고 자주 올라가지 못해 죄송한 마음이 가득한 어머니, 언제나 나를 챙겨주는 듬직한 동생 정희 그리고 석사과정에 들어온다는 이야기에 아낌없이 격려해주신 친척분들 언제나 사랑합니다.

제주도에서 언제 올라오느냐며 힘들 때면 언제나 걱정해주고 장난기 섞인 말들로 기운 내라고 격려해주는 내가 항상 아끼고 사랑하는 친구들 일일이 적지 못해도 모두에게 언제나 고맙다. 앞으로도 잘 부탁드립니다.

지금까지 부족한 저를 아껴주시고 격려해주시는 저를 아시는 모든 분들에게 앞으로 더 열심히 살아가는 모습 보여드리겠습니다. 모두 언제나 감사하고 사랑합니다.