

뱀장어 *Anguilla japonica*의 인위 성 성숙유도에 관한 연구

이승현 · 허상우 · 이치훈 · 허성표 · 이영돈*

제주대학교 해양과학연구소

Induced sexual maturation of Japanese eel, *Anguilla japonica*

Seung-Hyun Lee, Sang-Woo Hur, Chi-Hoon Lee, Sung-Pyo Hur and Young-Don Lee*

Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 695-965, Korea

Japanese eel, *Anguilla japonica* is a commercially important species and catadromous fish that grows in fresh water, and moves to the sea to spawn. This study investigated the gametogenesis process based on artificially induced sexual maturity of *A. japonica* based on sexual maturity where it acclimated to the aquatic environment of the seawater.

10 female *A. japonica* (mean TL 70.1 ± 2.3 cm, mean BW 727 ± 74 g) were used for the inducement of sexual maturity. And specimens were treated with salmon pituitary extracts (SPE) once per week, and induced sexual maturity after 8-12 weeks, and then gametogenesis process was observed. Male *A. japonica* (mean TL 47.2 ± 2.5 cm, mean BW 322.8 ± 14 g) were treated with human chronic gonadotropin (HCG) every week, and allocation was induced after 6-8 weeks, and then spermatogenesis was observed.

Key words : Japanese eel, sexual maturity, gametogenesis

서론

뱀장어목 뱀장어과에 속하는 어류는 세계적

으로 18종이 분포하며, 우리나라에는 뱀장어 (*Anguilla japonica*), 무태장어(*Anguilla marmorata*), 2종이 서식한다. 뱀장어(*A. japonica*)는 우리나라

동해 북부지방을 제외한 전국적으로 강이나 호수 하천에 서식하며 담수에서 5~10년 동안 성장한 뱀장어는 산란을 위해 바다로 돌아가는 강하성(catadromous)어류이다.

뱀장어의 산란지역은 오랫동안 밝혀지지 않았지만 Tsukamoto et al. (2006)는 북태평양 서부 마리아나해구 남쪽(14 N, 142 E)해역에서 pre-*leptocephalus*(전장 4.2~6.5 mm)를 대량 채집하여 유전자 분석을 통해 뱀장어의 유생임을 확인하고 이 부근이 뱀장어의 산란장임을 추정하였다. 부화된 치어들은 구로시오해류를 통해 이동하면서 변태과정을 거치며 강 하구로 소상한다. 뱀장어 양식은 소상하는 실뱀장어를 포획하여 종묘로 사용하기 때문에 매년 실뱀장어의 체포량에 따라서 가격 및 생산량의 변동 폭이 크다. 전체 내수면어업에서 뱀장어양식이 차지하는 비중은 갈수록 감소하고 있다. 뱀장어 생산량은 통계청자료에 의하면 2011년 7,822톤에서 2012년 4,344톤으로 2011년 대비 생산량(40 %) 급격하게 감소하는 경향이 나타났다. 실뱀장어 자원의 감소로 인한 문제점을 해결하기 위해 일본을 중심으로 뱀장어 인공종묘생산기술 연구가 이루어져 왔다(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Otake et al., 1993; H. Tanaka et al., 2001).

뱀장어는 일반적인 양식장의 환경에서는 gonadotropins (GTHs) 합성 능력이 미흡하여 생식소 발달이 일어나지 않는다(Nagahama et al., 1973). GTH는 두 종류의 follicle stimulating hormone(FSH; 여포 자극 호르몬), luteinizing hormone(LH; 황체 형성 호르몬)의 호르몬 분비를 촉진하며, 어류를 포함한 척추동물의 생식소 발달에 필수적인 것으로 보고되었다(Schulz, 1995; Nagahama, 2000).

따라서 뱀장어의 성 성숙 유도의 경우 GTH를 포함하는 salmon pituitary extracts (SPE)의 반복 주사를 통해 인위적 성 성숙을 유도하며, 난황형성이 완료된 개체는 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)를 주사하여 최종배란을 유도한다(Yamamoto and Yamauchi 1974; Ohta et al., 1996). 최근 다른 방법으로는 암·수 뱀장어 복강에 human chronic gonadotropin(HCG), SPE를 저장하고 지속적으로 방출하는 osmotic pump를 삽입하여 성 성숙과 배정을 유도하였다(Kagawa et al., 2009, 2013). 또한 뱀장어의 초기 부화자어는 먹이불임이 매우 낮아 자어의 생존율에 많은 비중을 차지하는 초기사료에 관한 연구가 이루어지고 있으며(Otake et al., 1993; Tanaka et al., 2001), 자어의 낮은 생존율의 원인은 친어사육과 번식학적, 영양적인 측면으로 보고하고 있다(Kwon and Adachi 2008). 우리나라에서도 재조합 호르몬을 이용한 뱀장어 성 성숙(Kim et al., 2008) 및 저수온 성 성숙유도(Kim et al., 2009)에 관한 연구 등이 진행되어 왔다.

Tanaka (2003)는 치어 먹이에 관한 연구로 뱀장어 수정란에서 부화자어의 사육과 실뱀장어로 변태에 성공하였고, 2010년 뱀장어 완전 양식에 성공하였다. 이러한 결과는 뱀장어 종묘생산기술의 발전으로 이어지고 있다.

이 연구는 뱀장어의 수정란 생산을 위한 번식생물학적 연구의 일환으로 뱀장어를 담수에서 해수 환경으로 순치시킨 후 인위적 성 성숙을 유도에 따른 난 형성 과정 및 정자형성과정을 조직학적 방법을 이용하여 분석하였다.

재료 및 방법

실험어

실험에 이용한 뱀장어(평균 전장 62 ± 2 cm, 평균 체중 578 ± 43 g)는 제주도 성산에 위치한 축양장에서 구입하여 제주대학교 해양과환경연구소로 이송 후, 25마리를 순환여과시스템(규격 $230 \times 70 \times 120$ cm, water temperature $20 \pm 1^\circ\text{C}$)하에서 사육관리 하였다.

순환여과 시스템의 시설은 실험어의 인위적 성 성숙 유도조건을 유지하기 위해 수중펌프(120 W), 히터(2 KW) 및 냉각기를 가동하였다(Fig. 1).

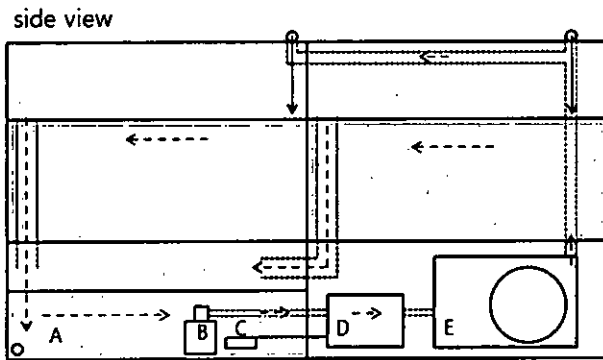


Fig. 1. Diagram of recirculating rearing system used for broodstock. A: bio-chemical filter chambers, B: water pump, C: immersion heater, D: water temperature controller, E: condenser chamber.

사육관리

실험어의 안정을 취하기 위해 1주간 담수에 순치 시킨 후 실험어로 사용 하였다. 해수순치는 1일 50L씩 10일에 걸쳐 해수로 전량환수

시켰고, 실험어의 안정을 위해 차광필름을 이용하여 수조 외부의 빛을 차단하였다. 실험 기간 동안 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 로, 용존산소는 8 ± 1 mg/L 을 유지시켜 사육하였다.

성 성숙 및 배란유도

해수순치 1개월 이후 안정된 실험어(평균 전장 70.1 ± 2.3 cm, 평균 체중 727 ± 74 g) 10마리를 선별하여 성 성숙 실험에 사용하였다. 개체를 식별하기 위해 ID microchip (Trovan ID-100K) 을 등 근육에 삽입하였으며, 실험시 Trovan GR-251 RFID Reader를 사용하여 개체별 추적관리를 하였다(Table 1, Fig. 2).

Table 1. Body weight and body length of female *A. japonica* used in induction of sexual maturity

ID No.	Body Weight (g)	Body Length (cm)
6FE3EDA	502	68
6FE43EB	515	62
6FE30E1	578	66
6FE221B4	579	65
6FE1601	604	71
6FE1A52	605	63
6FE28F8	712	67
6FE1C7D	1006	78
6FE3A1F	1086	84
6FE243A	1087	77

암컷 뱀장어는 salmon pituitary extracts (SPE, 20 mg/kg body weight/week)를 매주 1회 복강 주사하여 성 성숙을 유도하였으며(Yamamoto and Yamauchi 1974), 실험어중 체중이 증가한 개체(Fig. 3)는 2-phenoxyethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; USA; 300 ppm)에 마취시킨 후 내외

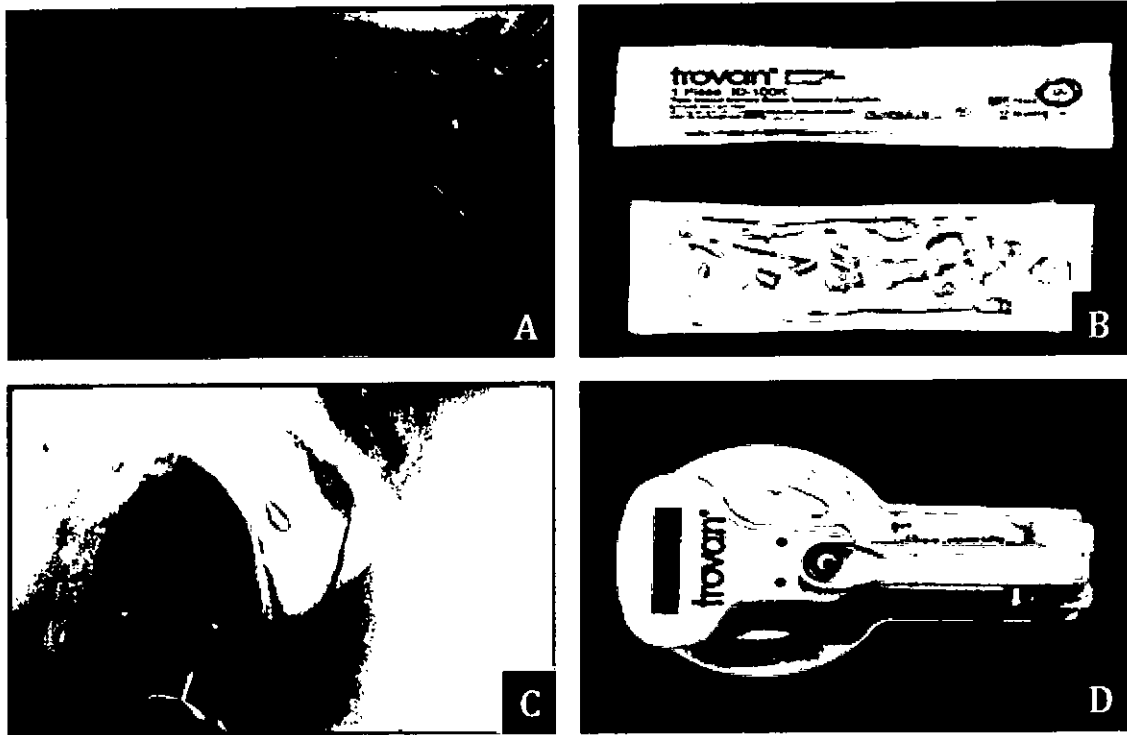


Fig. 2. Broodstock management of *A. japonica*. A: anaesthetization, B: ID chip injector, C: tagging with ID chip, D: ID chip reader.

경 1.0 mm인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation을 하여 난 성숙도를 조사하였다(Fig. 4A). 최종 배란유도를 하기 위해 약 750~850 μm 의 난모세포를 가진 실험어를 대상으로 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregen-3-one (DHP, Sigma, 2 mg/kg body weight)를 주사하여 최종배란을 유도하였다(Fig. 4B, C).

수컷 뱀장어(평균 전장 47.2 ± 2.5 cm, 평균 체중 322.8 ± 14 g)는 Yamamoto and Yamauchi (1974)의 방법으로 human chronic gonadotropin (HCG, Sigma, 1 IU/g body weight/week) 10주간 매주 1회 복강 주사 하여 생식소의 성숙을 유도하였다.

배정된 정자는 Ohta (1996)의 방법으로 뱀장어 인공정장액(114.5 mM NaCl, 30 nM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 1.3 mM CaCl, 20 mM NaHCO₃, pH

8.2)에 희석하여 정자를 보관하여 수정에 사용하였다.

배우자형성과정 조직학적 관찰

담수구, 해수처리구(SPE injection, 6 weeks) 및 배란 후 뱀장어의 생식소를 적출하여 Bouin's solution에 고정하였고 70% EtOH 에 탈수 하였다. 이후 paraffin 절편법에 의해 5~7 μm 절편을 제작하여 Hansen's hematoxylin과 0.5% eosin으로 비교염색 하여 광학현미경(optical microscope; Axioskop ZEISS, Germany)하에서 배우자형성과정을 조직검경 하여 관찰하였다.

전자 현미경적 관찰

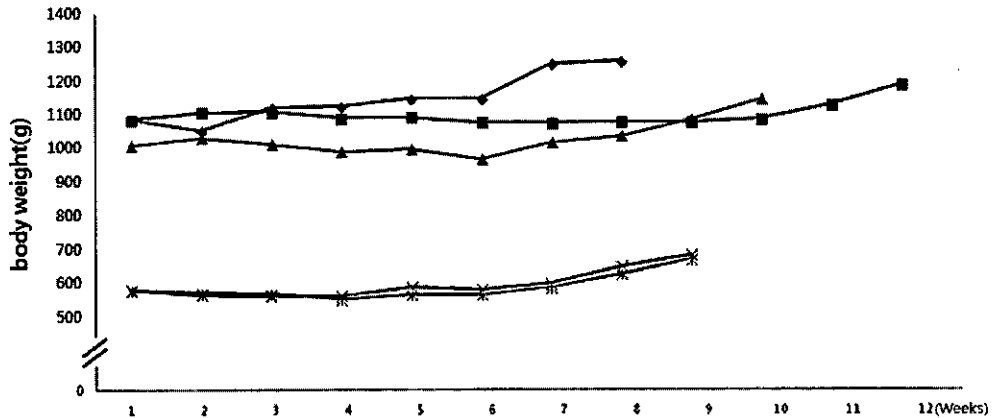


Fig. 3. Change of body weight with salmon pituitary extracts (SPE) injection.

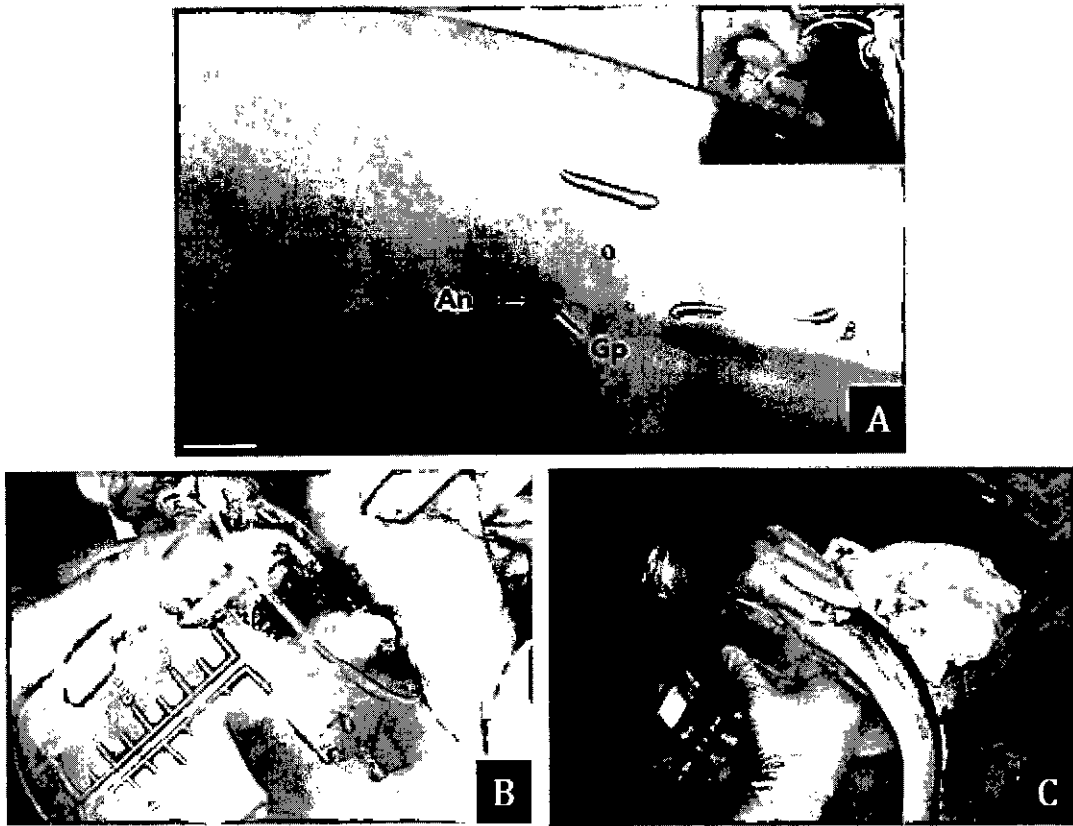


Fig. 4. Examination steps for artificial ovulation of mature stage of female *A. japonica*. A: external features of genital pore, B and C: egg stripping, An: anus, Gp: genital pore. Scale bar indicates 1 cm.

정자의 외부 형태적 특징을 조사하기 위해 배정된 정자를 2.5% glutaraldehyde 용액에 90분 동안 전고정을 하였으며 2% osmium tetroxide

용액에 1시간 동안 후고정 하였다. 50% EtOH로부터 탈수하고 isoamylacetate를 사용하여 치환시켰다. 형태적 특징은 주사전자현미경(Scanning

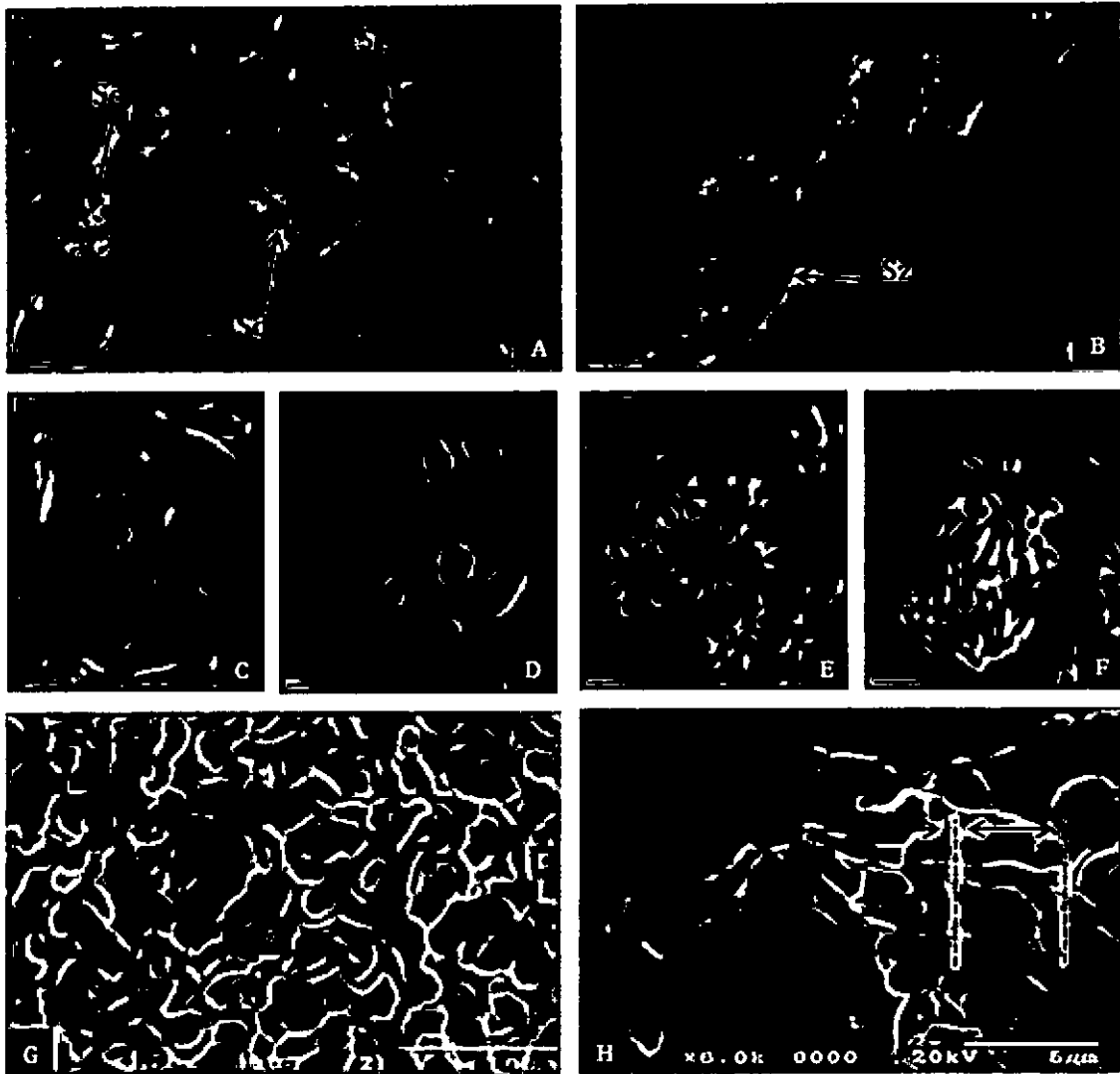


Fig. 5. Photomicrographs and electron microscope of sperm developmental stages of *A. japonica*. A: growing stage, scale bar = 10 μm . B: mature stage, scale bar = 10 μm . C: spermatogonia, scale bar = 5 μm . D: spermatocyte, scale bar = 5 μm . E: spermatid, scale bar = 5 μm . F: spermatozoa, scale bar = 5 μm . G: electronic micrographs of spermatozoa group. H: electronic micrographs of Spermatozoa. h: head, 4 μm . t: tail, 14 μm . Sc: Spermatocyte, Sd: spermatid, Sz: Spermatozoa.

Electron Microscope)을 이용하여 조사하였다.

결과

성 성숙 및 배란 유도

호르몬처리와 수정란 생산

실험어는 해수순치 1개월 이후 8~12주 동안 salmon pituitary extracts (SPE) 및 human chronic gonadotropin (HCG)를 처리하여 암·수 실험어의 성 성숙을 유도하였다. 암컷 실험어는 SPE 처리 3~5주 이후부터 체중이 증가하기 시작하

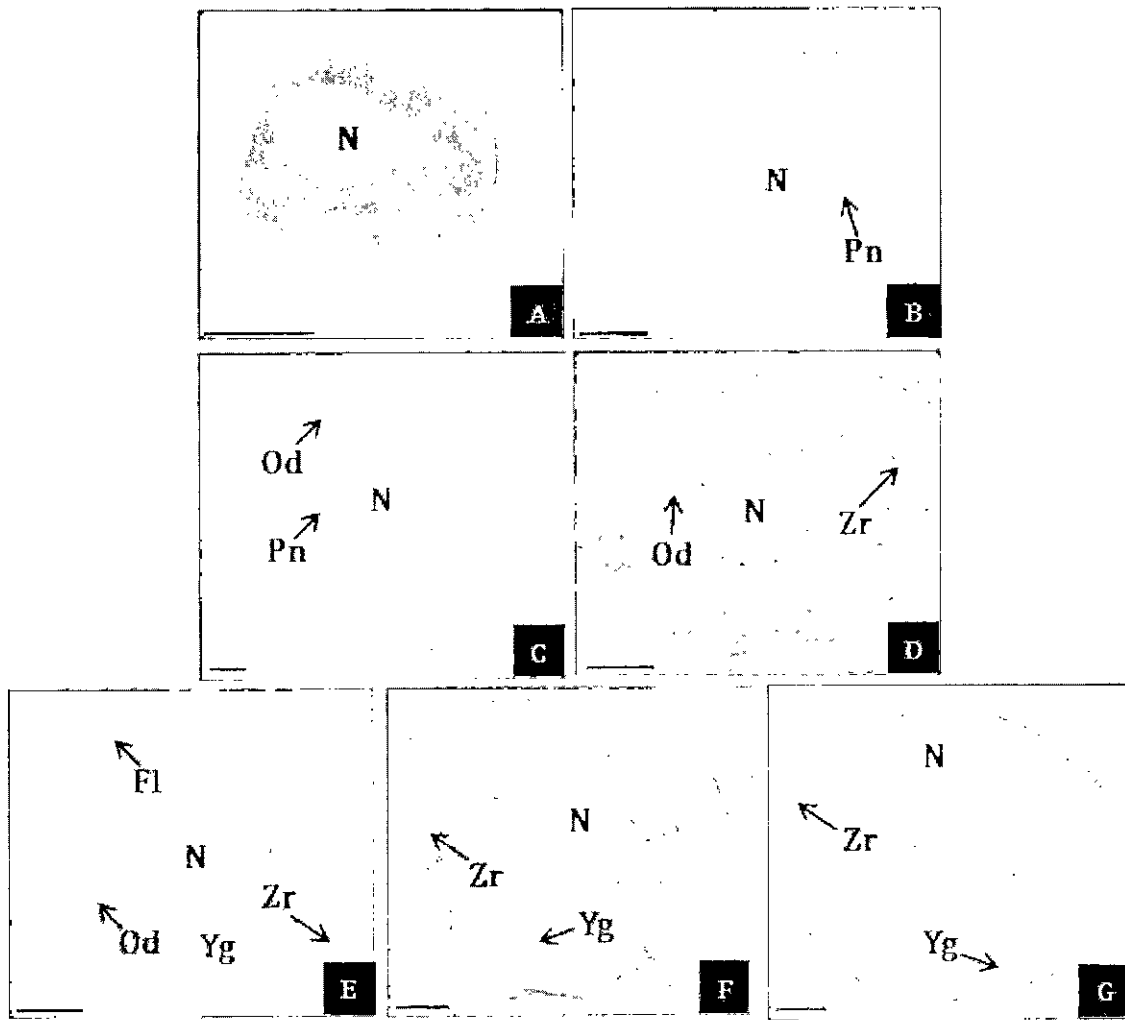


Fig. 6. Photomicrographs of ovarian developmental stages of *A. japonica*. A: early perinucleolus stage, scale bar = 10 μm B: perinucleolus stage, scale bar = 10 μm C: oil droplet stage, scale bar = 50 μm D: vitellogenic stage, scale bar = 50 μm E: vitellogenic stage, scale bar = 50 μm F: migratory nucleus stage, scale bar = 100 μm . G: migratory nucleus stage (overripe), scale bar = 100 μm . Fl: follicle layer, Yg: yolk globules, N: nucleus, Od: oil droplet, Pn: perinucleolus, Zr: zona radiata.

여 8~12주 이후 성 성숙이 완료되어 실험어의 체중이 급격하게 증가하였다(Fig. 3). 호르몬 처리 기간 동안 실험어 5마리의 개체에서 성 성숙이 유도되었으며, 성숙이 유도된 개체는 내외경 1.0 mm인 실리콘 재질의 튜브를 이용하여 cannulation을 실시하여 난정을 측정하였다(Fig. 4A). 난정관찰 후 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregen-

3-one (DHP, Sigma, 2mg/kg body weight)를 복강 주사하여 최종배란을 유도하였다(Fig. 4B, C). 수컷 실험어는 매주 human chronic gonadotropin (HCG)를 복강주사 하여 실험시작 6주부터 정자형성(spermatogenesis) 및 배정(spermiation)이 유도되어 배우자형성과정을 관찰한 후 배정된 정자는 Ohta et al., (2006)의 방법으로 인공 정장

액에 정자를 보관하여 수정에 사용하였다. 수정에 사용된 난의 양은 400 cc, 부상란의 양은 200 cc 였으며, 배체형성이 시작될 무렵 발달이 정지되어 발생 관찰은 실시하지 못했다.

배우자 형성 과정

정자형성과정

정소 발달과 함께 정소소엽내 정원세포, 정모세포, 정세포 무리들이 관찰되었다(Fig. 5A, C, D, E). HCG 처리 6주후 성숙한 정소는 소엽내 변태를 마친 정자 무리들이 가득차 있었다(Fig. 5B, F). 배정된 정자를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 정자의 총 길이는 18~20 μm 로 머리(head) 부분이 4 μm , 중간부분(middle piece)과 끝부분(end piece)의 꼬리가 14~16 μm 이었다(Fig. 5G, H).

난 형성과정

난 형성 과정을 관찰하기 위해 담수구, 해수처리구 및 배란 후 뱀장어 생식소를 절취하여 성숙상태를 조직학적인 방법으로 조사하였다.

염색인기의 난모세포는 난경이 약 10 μm 내외로 세포질 대부분을 차지하는 큰 핵을 가지고 있으며 haematoxylin에 짙게 염색되는 단일 인이 분포하였다(Fig. 6A). 주변인기 난모세포는 난경이 40~80 μm 로 핵막을 따라 인이 분산되어 관찰 되었다(Fig. 6B).

유구기 난모세포는 난경이 약 80~180 μm 로 핵주변의 세포질에 유구가 출현하며 유구기 초기에는 핵을 따라 공포상의 유구가 위치하였다. 난모세포 들이 성장함에 따라 세포질 전역에

유구가 산재하였다(Fig. 6C). 핵과 세포질이 증가하여 난경이 약 200~400 μm 에 이르면 세포질에 난황구가 축적 되어 난황구기 난모세포로 발달하였다(Fig. 6D). 후기 난황구기 난모세포들은 난경이 400~700 μm 로 성숙하였고 난황구와 공포상의 유구들이 분포하였다(Fig. 6E).

핵 이동기의 난모세포들은 난경이 약 700~850 μm 이상으로 발달되었으며 핵막이 거치화 되면서 핵이 동물극 쪽으로 이동하였다(Fig. 6F, G).

고찰

어류의 성 성숙 및 산란을 제어하는 요인으로 내적 요인과 함께 환경요인으로 광주기와 수온이 깊이 관여하고(Nish, 1979), 대부분 어류는 광주기의 계절적 변화 패턴에 따라 생식 활동 특성을 가진다(Aida 1991; Bromega et al., 2001).

Tzeng et al. (1996)에 의하면 양식산 뱀장어를 수조에 20마리/ m^2 의 양식밀도로 사육한 결과 40~55cm의 범위 내에서는 수컷의 비가 높았으며, 60cm 이상에서는 암컷의 비가 높다. 이러한 연구결과를 고려하여 암컷 성 성숙유도를 위하여 연구에 사용한 실험어는 평균길이 70.1 \pm 2.3 cm, 평균 체중 727 \pm 74g의 양식산 뱀장어를 사용하였다.

어류의 성 성숙과 산란은 뇌-뇌하수체-생식선의 축(Brain-Pituitary-Gonad axis; B-P-G axis)으로 이루어져 있으며 외부 환경요인에 자극을 받은 뇌의 시상하부에서 GnRH가 분비되고 뇌하수체에서 분비되는 Gonadotropic hormone (GTH; 생식선자극 호르몬)의 자극에 의해 Follicle stimulating hormone (FSH; 여포자극호르몬) 과 Luteinizing

hormone (LH; 황체 형성 호르몬)의 분비를 촉진한다. 암컷에 있어 FSH는 성숙초기에 여포세포의 난황축척에 관여하며, LH는 성숙후기 난의 최종성숙과 배란을 조절하는 것으로 알려져 있다(Schulz, 1995, Nagahama, 2000).

Gonadotropins (GTH)의 일종인 human chorionic gonadotropin (HCG)는 11-KT 합성을 유도, 11-KT는 정원세포의 분화를 유도한다. 성숙과정에서 P전구체가 합성되어 정자내의 20 β -hydroxy steroid dehydrogenase (20 β -HSD)의 작용에 의해 pH를 상승시켜 정자의 성숙을 유도한다(Miura et al., 1991, 1991, 2003). 수컷의 정자는 HCG를 6~8주간 복강주사 후 정자형성 및 배정을 유도하여 배우자형성과정을 관찰할 수 있었다.

이 연구에서는 해수순치 1개월 이후 인위적인 성 성숙을 통하여 뱀장어 10마리 중 5마리에서 성 성숙이 유도되었다. 성 성숙이 유도되지 않은 실험어는 담수시기의 생식소 발달이 미흡하여, 성 성숙에 영향을 미치지 못하는 것으로 추측된다. 이전 연구에서는 양식산 뱀장어를 대상으로 3개월 해수순치 하여 생식소의 발달을 유도한 결과 GSI증가와 난황형성이 유도되어 자연에서의 암컷 뱀장어가 산란을 위해 바다로 내려갈 시기의 생식소 발달단계와 유사하다고 보고하였다(Kagawa et al., 1998). 이 연구에서는 양질의 수정란 생산은 할 수 없었지만 1개월의 해수순치로 성 성숙이 유도되었다. 이러한 결과는 해수순치의 기간보다는 초기 생식소 상태에 따라 성 성숙에 미치는 영향이 큰 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aida K. 1991. Environmental regulation of reproductive rhythms in teleostei. Bull. Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph. 16, 173-187.
- Bromage N, M Porter and C Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture. 197, 63-98.
- Kagawa H, Iinuma N, Tanaka H, Ohta H and Okuzawa. 1998. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci, 64, 77-82.
- Kagawa H, Kasuga Y, Asachi J, Nishi A, Hashimoto H, Imaizumi H, Kaji S. 2009. Effects of continuous administration of human chorionic gonadotropin, salmon pituitary extract, and gonadotropin-releasing hormone using osmotic pumps on induction of sexual maturation in male Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture. 296, 117-122.
- Kagawa H, Fujie N, Imaizumi H, Masuda Y, Oda K, Adachi J, Nishi A, Hashimoto H, Teruya K, Kaji S. 2013. Using osmotic pumps to deliver hormones to induce sexual maturation of female japanese eels, *Anguilla japonica*. Aquaculture. 388-391, 30-34.
- Kim DJ, Kim YC, Choi YK, Son MH, Lee JU, Park MS and Heo YS. 2009. Effects of

- Rearing Condition during the Winter Period on Artificial Maturation and Reproduction of Cultured Female Eel, *Anguilla japonica*. Dev. Reprod. 13, 35-41.
- Kim DJ, Park WD, Sohn YC, Bae JY, Yoon SJ, Son MH, Makito and Han CH. 2008. Maturation Induction by Manchurian Trout Recombinant Gonadotropin Hormone (mt-rGTH) in Female Eel, *Anguilla japonica*. Dev. Reprod. 12, 261-266.
- Kwon ON and Adachi S. 2008. Biochemical Overripeness Characterization of Artificially Matured Japanese Eel *Anguilla japonica* Egg. J. Aquaculture. 21(3), 176-180.
- Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y and Takahashi H. 1991a. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica* by asingleinjection of human chorionic gonadotropin. Zool. Sci, 8, 63-73.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H and Nagahama Y. 1991b. Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Dev. Biology. 146, 258-262.
- Miura T, Miura C and Yamauchi K. 2003. Spermatogenesis in the Japanese eel. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds.), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, 319-329.
- Nagahama Y and Yamamoto K. 1973. Cytological changes in the adenohipophysis of freach water cultivated male Japanese eel, *Anguilla japonica* induced to maturation by transfer to sea water and synahorin injection. Bull, Jap, Soc, Sci. Fish, 39, 585-594.
- Nagahama Y. 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E., Stefansson, S. O.(Eds.), Proceeding of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Bergen, 211-222.
- Nish K. 1979. A daily rhythm in the photosensitive development of the in the bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 30, 109-115.
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K and Hirose K. 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture. 139, 291-301.
- Otake T, Nogami K, Maruyama K. 1993. Dissolved and particulate organic matter as possible food source for eel leptocephali. Mar. Ecol Prog. Ser. 92, 27-34.
- Schulz RW. 1995. Physiology, morphological, and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. (in) Reproductive Physiology of Fish (eds.) Goetz, F. W. and P. Thomas, Fish Symposium 95. Austin, Texas, 2-6.
- Tanaka H, Kagawa H and Ohta H. 2001. Production of leptocephali of Japanese eel. *Anguilla japonica* in captivity. aquaculture, 201, 51-60.

- Tanaka H, Kagawa H, Ohta H, Unuma T and Nomura. 2003. The first production of glass eel in captivity : fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. Fish Physiol, 28, 493-497.
- Tsukamoto K. 2006. Spawning of eels near a seamount. Nature, 439(23), 929.
- Tzeng WN. 1996. Short-and long term fluctuations in catches of elvers of the Japans eel, *anguilla paponica*. D. A. Hancock, D. C. Smith, A. Gant and J. B. Beumer, Developing and sustaining world fisheries resources, the state of science and management. 2nd world fisheries compass proceedings. CSIRO publishing, victoria, australia, 11-128.
- Yamamoto K and Yamauchi K. 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature. 251, 220-221.