

GOVP1200814039

T 0024461

최 중
연구보고서

무지개송어 뇌, 뇌하수체 및 간의 성숙속
호르몬 유전자를 활용한 성숙시기
조절법에 관한 연구

A method to control sexual maturation of
rainbow trout using maturational genes
in brain, pituitary and liver

강릉대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “무지개송어 뇌, 뇌하수체 및 간의 성성숙 호르몬 유전자를 활용한 성숙시기 조절법에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 1월 일

주관연구기관명 : 강릉대학교

주관연구책임자 : 손 영 창

세부연구책임자 : 김 길 중

연 구 원 : 김 미 애

연 구 원 : 최 은 주

연 구 원 : 박 우 동

연 구 원 : 최 성 창

여 백

요 약 문

I. 제 목

무지개송어 뇌, 뇌하수체 및 간의 성성숙 호르몬 유전자를 활용한 성숙시기 조절법에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

II-1. 목적

1. 강원도 내수면 양식의 대표종인 무지개송어의 연중 종묘생산을 위한 생명공학적 연구방법을 검토하고자 함
2. 인위적인 호르몬 투여가 아닌 자연광주기를 조절하는 친환경적 종묘생산기법의 개발
3. 성숙지표를 성성숙 관련 유전자 및 호르몬 수준에서 조사하여 향후 산업화를 위한 기반연구 수행

II-2. 필요성

- 냉수성 어류인 무지개송어는 강원도의 대표적인 특산품으로 지역경제 발전에 많은 기여를 하는 양식 어종임
- 특히, 우리나라에서 무지개송어 종묘생산은 10~12월에 편중되어 있어 종묘생산과 식용어 생산이 일시에 이루어져 판매가격의 하락현상이 심각함
- 겨울철의 채란작업은 노동강도의 심화, 나아가 양식현장에서

- 필요한 숙련된 노동력의 확보에 큰 어려움을 겪고 있음
- 광주기 조절 및 호르몬요법으로 생산시기를 조기화(성숙촉진)하거나 만기화(성숙억제)할 필요성이 있음

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

빛을 차단 (차광)하여 일조시간을 자연일장보다 단축하는 방법을 사용하여 성성숙의 촉진을 유도하며, 생식선발달에 미치는 호르몬 유전자의 발현정도 및 활성도를 모니터링

<실험 환경>

- 연구소 수준 및 산업체 수준의 연구를 동시에 수행함
- 인공광 (300W 수은등)을 이용해서 일조시간을 일단 증가시킨 후 차광에 의해서 자연일장보다 일찍 단축하는 방법을 사용
- 야외사육지에 간단한 전조시설을 만들어 일정기간 장일처리를 하고(야간에만 조사), 그 후 자연일장하에 두는 방법
- 자연일장보다 짧게 명주기 12시간부터 시작해서, 10일째에 10시간, 8시간으로 단축해서 이후는 1일당 8시간으로 점차적으로 단축

<성숙관련 유전자의 발현 및 활성도>

- 광주기의 인위적인 조절이 무지개송어의 성성숙에 어떠한 영향을 주고 있는지 내분비학적으로 증명하고 과학적인 종묘생산의 기법을 확립하기 위해서 다음과 같은 항목을 조사하고자 함

1) 뇌: 생식선자극호르몬방출호르몬(GnRH) 유전자 발현

광주기, 수온과 같은 환경정보는 감각기관에서 수용된 후, 뇌의 시상하부에서 통합되어 신경정보로서 뇌하수체로 전달되므로, 뇌의 생식선자극호르몬 방출호르몬 펩타이드인 GnRH의 분자 활성도를 모니터링하기 위해 정량PCR 방법을 확립하고 광주기에 따른 무지개송어의 성숙변화를 분자내분비학적으로 조사

2) 뇌하수체: 생식선자극호르몬 (FSH, LH) 유전자 발현

광주기의 변화에 따른 뇌하수체 여포자극호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH) 분자의 변동을 정량PCR방법으로 조사

3) 간: 난황단백전구물질 (VTG) 유전자 발현

난모세포의 성장에 필수적인 난황단백질 (yolk protein)은 미성숙기의 초기 난모세포가 간에서 생합성된 난황단백전구물질 (VTG)을 흡수하여 형성되므로, 무지개송어 간조직의 VTG 유전자 발현율을 조사하여 충실한 성숙난모세포가 되는 과정을 성숙시기별로 조사

< 수정란의 발생과정 조사 >

무지개송어 친어로부터 획득된 배우자의 양적인 차이, 난질, 수정율 및 발안율 등 자어의 건강도를 조사하여 자연적인 광주기 대조군과 차이가 있는지 조사

< 과제수행시 연구범위 및 기법 >

- 1) 차광 및 인공광 조사
- 2) 조직절제, mRNA추출, cDNA합성
- 3) real-time (q)PCR, 상대적 mRNA 정량법

4) Radioimmunoassay (방사면역측정법)

5) 난질, 발생과정, 수정율 및 발안율

IV. 연구개발 결과

- 단일 광주기를 조사한 제3그룹에서 9월에 대조군 및 다른 광주기 조절 그룹보다 성숙이 크게 유도된 것으로 나타났음 (생식선중량지수)
- 민간양어장에서는 용천수를 이용한 일정한 수온조건으로 통상적인 자연채란(11월 하순)보다 3~4개월 정도 조기채란이 가능하였고, 광주기 조절로 암컷의 성숙뿐만 아니라 수컷의 성숙도 양호하여 양질의 수정란 확보가 가능하였으며, 부화율도 11월 자연산란군 이상의 77%로 매우 높게 나타났음
- 간중량지수는 성숙기인 9월의 제3그룹이 가장 낮은 것으로 나타났는데, 무지개 송어가 성숙함에 따라서 간에서 생산된 vitellogenin이 생식소로 이동해 난황단백질로서 난황구내에 축적되었음을 알 수 있었음
- 단일주기를 조사한 제3그룹에서 vitellogenin (VTG) mRNA level이 다른 그룹들에 비해 월등히 낮은 것을 알 수 있었으며, 이 지표는 난모세포의 VTG이동시기가 이미 지나서 성숙기에 달하였음을 알 수 있음
- 뇌하수체의 생식선자극호르몬 subunit인 GTH α 및 LH β 의 mRNA 농도는 최종성숙기가 되면 급격히 증가하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서도 단일주기에 의해 가장 성숙된 그룹인 제3그룹에서의 농도가 가장 높았음

- 생식선자극호르몬 FSH β 및 뇌의 GnRH는 생식선의 발달상황과 유의할만한 변화를 보이지 않았으며, 이는 광주기조절에 의한 성숙지표로서는 적합하지 않은 것으로 판단됨

V. 연구개발 결과의 활용계획

- 경제적 가치가 높은 어종의 연중생산을 위한 산업화 연구가 가능함
- 친환경적이며 계획적인 양식방법의 개선에 기여함
- 강원도 내수면 양식어업의 경쟁력 향상
- 무지개송어의 안정정인 연중공급 체계 확립
- 고품질 양식 어류의 생산
- 연어과 어류의 자연자원 조성을 위한 과학적이고 합리적인 방법 개발
- 적절한 번식시기를 이해하고 인공번식방법을 개발

SUMMARY (영문요약문)

Rainbow trout is a coldwater fish species classified as the Salmonidae. Their natural spawning season at aquacultural farm is between October and December in Korea. Seed production industry of rainbow trout has low commercial value, because seed production of rainbow trout concentrate on the short-term period in Korea. Hence, artificial acceleration of sexual maturation is important objectives in fisheries farm. Photoperiod is an environmental cue that adjusts the seasonal timing of sexual maturation in salmonids. Gonadal maturation in teleost fish is regulated by the brain-pituitary-gonadal axis. Initially, gonadotropin releasing hormones (GnRH), which are produced in the brain and released into the pituitary stimulates the synthesis and release of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in pituitary. Expression of FSH triggers production of estradiol (E2) that is one of the major inducers of vitellogenin (VTG) synthesis in hepatocytes. VTG is released into the blood stream and stored in developing oocytes. LH stimulates final maturation of the oocytes by increasing the production of $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP).

The purpose of this study was to investigate the effects of various photoperiod manipulation on induction of sexual maturation in female rainbow trout. In our results, gonadosomatic index (GSI) of female rainbow trout which were exposed to shorter light photoperiod regime were significantly higher than other groups, whereas hepatosomatic index (HSI) of the experimental group was significantly lower than other groups. In addition, female rainbow trout of the experimental group only ovulated in

september, but female rainbow trout of other groups did not ovulate in the same time-point. Furthermore, mRNA levels of VTG and FSH β in the experimental fish were significantly lower than other groups, whereas mRNA levels of GTH α and LH β were significantly higher than other groups. Therefore, we suggest that shorter light photoperiod regimes accelerate sexual maturation of female rainbow trout.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction (13)

Chapter 2. Recent situation in domestic and international
research field (17)

Chapter 3. Results (20)

Chapter 4. Achievement and Contribution (40)

Chapter 5. Plan for the usage of these results (42)

Chapter 6. References (43)

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	(13)
제 2 장	국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보	(17)
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	(20)
제 4 장	연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	(40)
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	(42)
제 6 장	참고문헌	(43)

여 백

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적

최종목적 :

강원도 내수면 양식의 대표종인 무지개송어의 연중 종묘생산을 위한 생명공학적 연구방법을 검토하고자 함

- 인위적인 호르몬 투여가 아닌 자연광주기를 조절하는 친환경적 종묘 생산기법의 개발
- 성숙지표를 성성숙 관련 유전자 및 호르몬 수준에서 조사하여 향후 산업화를 위한 기반연구 수행

2절 연구개발의 필요성

- 냉수성 어류인 무지개송어는 강원도의 대표적인 특산품으로 지역경제 발전에 많은 기여를 하는 양식 어종임
- 전통적인 양식산업의 한계성 그리고 조방적인 어업방식에 주로 의존하는 제약성으로 인하여 현재 손익분기점의 한계 상황에 직면하고 있음
- 특히, 우리나라에서 무지개송어 종묘생산은 10~12월에 편중되어 있어 종묘생산과 식용어 생산이 일시에 이루어져 판매가격의 하락현상이 심각함
- 겨울철의 채란작업은 노동강도의 심화, 나아가 양식현장에서 필요한 숙련된 노동력의 확보에 큰 어려움을 겪고 있음
- 따라서, 국내 무지개송어의 생산성 및 경제성 향상 그리고 채란효율성을 제고하기 위해서는 종묘 생산시기의 조절이 필요함
- 광주기 조절 및 호르몬요법으로 생산시기를 조기화(성숙촉진)하거나

만기화(성숙억제)할 필요성이 있음

- 나아가 연중 종묘생산 시스템의 확립이 요구됨
- 본 연구의 의의는 1) 기초적인 어류내분비학적 지식을 활용하여 무지개송어의 성성숙을 조절하며, 2) 최적의 성숙상태를 과학적으로 판단할 수 있는 기초자료를 어민들에게 제공하고자 함

3절 연구개발의 범위

연어과 어류의 성성숙을 유도하는 자연조건 즉, 빛을 차단 (차광)하여 일조시간을 자연일장보다 단축하는 방법을 사용하여 성성숙의 촉진을 유도하며, 생식선발달에 미치는 호르몬 유전자의 발현정도 및 활성도를 모니터링

<실험 환경>

- 연구소 수준 및 산업체 수준의 연구를 동시에 수행함
- 인공광 (300W 수은등)을 이용해서 일조시간을 일단 증가시킨 후 차광에 의해서 자연일장보다 일찍 단축하는 방법을 사용
- 일조시간을 자연일장 조건보다 단축하는 방법
- 야외사육지에 간단한 전조시설을 만들어 일정기간 장일처리를 하고(야간에만 조사), 그 후 자연일장하에 두는 방법
- 자연일장보다 짧게 명주기 12시간부터 시작해서, 10일째에 10시간, 8시간으로 단축해서 이후는 1일당 8시간으로 점차적으로 단축

<성숙관련 유전자의 발현 및 활성화도>

- 생리적인 요인 중에서 명확한 메카니즘이 알려진 뇌-뇌하수체-생식소로 이어지는 생식내분비기관의 핵심축에서 생산되는 생식선관련 호르몬은 번식

조절에서 중추적인 역할을 하고 있음이 잘 알려져 있음

- 따라서, 광주기의 인위적인 조절이 무지개송어의 성성숙에 어떠한 영향을 주고 있는지 내분비학적으로 증명하고 과학적인 종묘생산의 기법을 확립하기 위해서 다음과 같은 항목을 조사하였음

1) 뇌: 생식선자극호르몬방출호르몬(GnRH) 유전자 발현

광주기, 수온과 같은 환경정보는 감각기관에서 수용된 후, 뇌의 시상하부에서 통합되어 신경정보로서 뇌하수체로 전달되므로, 뇌의 생식선자극호르몬 방출호르몬 펩타이드인 GnRH의 분자 활성도를 모니터링하기 위해 정량PCR 방법을 확립하고 광주기에 따른 무지개송어의 성성숙변화를 분자내분비학적으로 조사

2) 뇌하수체: 생식선자극호르몬 (FSH, LH) 유전자 발현

광주기의 변화에 따른 뇌하수체 여포자극호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH) 분자의 변동을 정량PCR방법으로 조사

3) 간: 난황단백전구물질 (VTG) 유전자 발현

난모세포의 성장에 필수적인 난황단백질 (yolk protein)은 미성숙기의 초기 난모세포가 간에서 생합성된 난황단백전구물질 (VTG)을 흡수하여 형성되므로, 무지개송어 간조직의 VTG 유전자 발현율을 조사하여 충실한 성숙난모세포가 되는 과정을 성숙시기별로 조사

< 성숙관련 성호르몬의 혈중 농도 >

배우자세포의 성숙과정은 뇌, 뇌하수체, 간의 펩타이드성 호르몬 뿐만이 아니라 생식선의 여포세포 및 주변세포에서 생산되는 성스테로이드호르몬에 의해 직접적으로 조절되므로, 혈액중의 중요한 성스테로이드의 농도변화를 조사하여 광주기변화와의 상호관계를 조사

< 수정란의 발생과정 조사 >

무지개송어 친어로부터 획득된 배우자의 양적인 차이, 난질, 수정율 및 발안율 등 자어의 건강도를 조사하여 자연적인 광주기 대조군과 차이가 있는지 조사

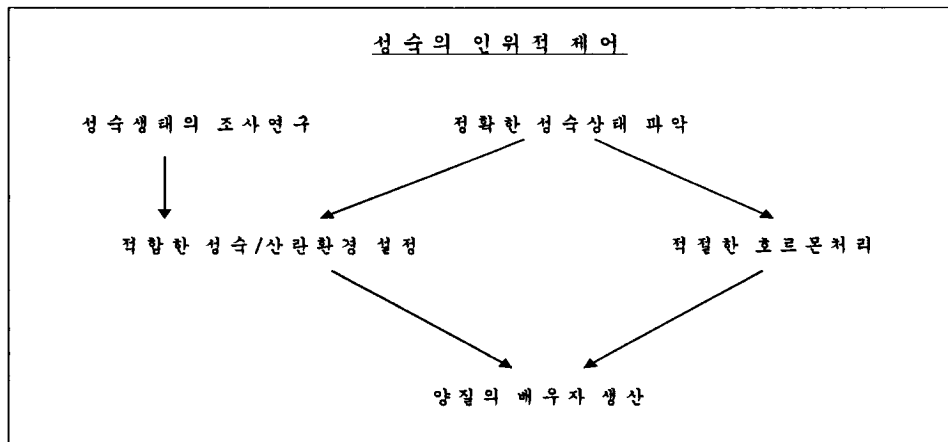
< 과제수행시 연구범위 및 기법 >

- 1) 차광 및 인공광 조사
- 2) 조직절제, mRNA추출, cDNA합성
- 3) real-time (q)PCR, 상대적 mRNA 정량법
- 4) Radioimmunoassay (방사면역측정법)
- 5) 난질, 발생과정, 수정율 및 발안율

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

1절 국내외 기술개발 현황

- 강원도 무지개송어 양식생산량 1,623톤 (6,380 백만원/년), 전국 대비 56.9% (강원도 환동해출장소, 2004)
- 종묘생산 양어장 수는 강원도 23개소로 전국대비 65.6%, 종묘생산량은 강원도 9,835천 마리로 전국대비 84.1% (국립수산과학원 동해수산연구소 연어연구센터, 2005)
- 외국수입 의존도 높음: 무지개송어 발안난 구입은 4,885천개로 전체 종묘생산의 46.2% 정도를 차지 (연어연구센터, 2005)
- 기술적으로 광주기 조절에 의한 산란유도는 가능함
- 난질과 부화율, 자어의 건강도 등에 미치는 영향은 불명확함
- 성숙관련 유전자 및 성호르몬 분석 등 내분비·생리학적 기초연구미흡
- 북미, 북유럽, 이스라엘 및 일본에서는 종래의 양식방법을 초월하여 경제적 가치가 높은 어종을 보존하고 번식시키는 양식산업화를 추진 개발하고 있으며, 친환경적인 양식방법을 연구하고 있음
- 국내의 산업체는 주로 경험적인 방식으로 조기산란 무지개송어 친어를 관리하고 있음



2절 관련 과학기술정보

- 어류는 호르몬 요법이 아닌 자연적인 환경요인의 변화 특히, 수온 및 광 주기를 변화시키면 성숙의 억제 또는 촉진이 유도된다고 알려져 있음
- 무지개송어를 포함하는 연어과 어류는 광주기 조절 특히 단일주기에 의해 생식소 발달에 관한 연구가 수행됨
- 생리적인 요인 중에서 명확한 메카니즘이 알려진 뇌-뇌하수체-생식소로 이어지는 생식내분비기관의 핵심축에서 생산되는 생식선관련 호르몬은 번식조절에서 중추적인 역할을 하고 있음이 잘 알려져 있음
- 뇌의 시상하부호르몬인 GnRH (현재까지 13종의 호르몬이 발견됨, 대표적으로 sGnRH, cGnRH-II)가 환경요인의 변화를 먼저 인지하여 뇌하수체로 정보를 전달함
- 최근에는 생식소(1990년대 말)에서도 발견되었으며, 뇌하수체로의 투사는 sGnRH만. sGnRH는 noradrenalin에 의해 촉진, dopamine에 의해 억제
- 뇌하수체에서는 2종류의 생식선자극호르몬이 GnRH의 신호전달을 받아서 생식선자극호르몬이 생합성되고 혈액중으로 방출됨
- 당단백질성 이량체 호르몬으로서 두 종류의 생식선자극호르몬, 여포 자극호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH)이 존재하며, FSH는 주로 성숙초기의 배우자세포에 작용하여 난모세포의 성장과 정자형성에 관여하며 LH는 최종성숙을 조절하여 산란과 방정을 유도한다고 알려져 있음
- 난모세포의 성장에 필수적인 난황단백질 (yolk protein)은 미성숙기의 초기 난모세포가 간에서 생합성된 난황단백전구물질 (VTG)을 흡수하여 형성된 되며, 뇌하수체에서 분비된 FSH의 자극에 의해서 유도되어 지며 난모세포의 정상적인 발생과정에서 중요한 내분비적 요인이 됨
- 혈중 스테로이드 호르몬은 난모세포의 성장, 분화, 성숙, 배란에 큰 영향을 미치는 생리적으로인이며 특히, 성숙과정중에 생식선에서 분비되는 혈액중의 여성호르몬 (estradiol-17beta)과 남성호르몬

(testosterone)은 난모세포의 성장에 필요한 난황단백전구물질을 흡수하게 하는 물질로 알려져 있음

- 최종성숙유기호르몬 (17alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one)은 성숙된 난모세포의 배란과 산란에 직접적으로 영향을 미침

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 이론적, 실험적 접근방법

- 어류의 번식조절은 환경적요인 및 생리적요인이 통합적으로 작용하여 이루어지며, 연어과 어류를 중심으로 내분비적 조절 메카니즘이 알려져 있음
- 특히, 뇌-뇌하수체-생식소로 이어지는 내분비기관이 중추적인 역할을 함
- 연어과 어류에 속한 무지개송어는 일정한 저수온환경에서 일장시간 (day length)이 짧아지는 9월부터 성숙이 시작됨
- 성숙상태를 정확히 파악하여 최종성숙이 정상적으로 완료되고 배란되는 개체로부터 양질의 수정란을 얻을 수 있음
- 따라서, 단일주기로 사육환경이 조절된 무지개송어의 친어에서 뇌-뇌하수체-생식소의 주요 성숙관련 유전자 및 호르몬의 변화를 조사하여 합리적이고 과학적인 종묘생산의 방법을 개발하고자 함

2절 과제의 세부 연구 내용 및 범위

차광에 의하여 일조시간을 자연일장보다 단축하는 방법을 사용하여 성성숙의 촉진을 유도하며, 생식선발달에 미치는 호르몬 유전자의 발현정도 및 활성도를 모니터링

가. 무지개송어 생체 (*in vivo*) 실험

- 1) 인공광 (300W 수은등)을 이용해서 일조시간을 일단 증가시킨 후 차광에 의해서 자연일장보다 일찍 단축하는 방법을 사용
- 2) 일조시간을 자연일장 조건보다 단축하는 방법

- 3) 야외사육지에 간단한 전조시설을 만들어 일정기간 장일처리를 하고 (야간에만 조사), 그 후 자연일장하에 두는 방법
- 4) 자연일장보다 짧게 명주기 12시간부터 시작해서, 10일째에 10시간, 8시간으로 단축해서 이후는 1일당 8시간으로 점차적으로 단축

나. 사육시설 및 광조도

1) 사육시설 및 실험어

- 연구소: 야외 콘크리트수조 1.5×16 m 4개소
2004년산 친어 200마리(♀ 120마리, ♂ 80마리)
- 민간양어장: 야외 콘크리트수조 6×16.5 m 2개소
2005년산 친어 1,200마리(♀ 1,000마리, ♂ 200마리)

2) 광주기 처리방법

< 연구소 >

- 1시험구: 처음에 일조시간을 자연일장 보다도 길게 1달동안 18시간으로 한 후 10일 간격으로 14시간, 12시간, 10시간, 8시간으로 단축해서 이 후는 1일 당 8시간으로 설정 (1-4호지)

날 짜	3월 2일	4월 2일	4월 12일	4월 22일	5월 2일	채란까지
조 명	18L/6D	14L/10D	12L/12D	10L/14D	8L/16D	8L/16D
명기시간	07시~01	07~21	07~19	07~17	07~15	07~15

* 일정시간 조사하는 경우에는 time switch를 사용 후 소등

- 2시험구: 야외사육지에 간단한 전조시설을 만들어 일정기간 장일처리를 하고(야간에만 조사), 그 후 자연일장으로 설정 (1-3호지)

날 짜	3월 2일~7월 2일	7월 2일~채란까지
조 명	야간조명	자연일장

* 조사방법으로는 24시간의 경우에는 day light switch를 사용해서 어두워지면 점등하고, 밝으면 소등

- 3시험구: 자연일장 보다도 짧게 12시간부터 시작해, 10일째에 10시간, 8시간으로 단축해서 이 후는 1일 당 8시간으로 설정 (1-2호지)

날 짜	3월 2일	3월 12일	3월 22일	채란까지
조 명	12L/12D	10L/14D	8L/16D	8L/16D
명기시간	07~19	07~17	07~15	07~15

* 일정시간 조사하는 경우에는 time switch를 사용 후 소등

- 4시험구: 대조구(1-1호지)

날 짜	3월 2일~채란까지
조 명	자연일장

< 민간양어장 >

날 짜	2월 1일	2월 11일	3월 11일	3월 21일	3월 31일	4월 11일	채란까지
조 명	17L/7D	24L/0D	20L/4D	18L/6D	16L/8D	14L/10D	자연일장
명기시간	07시~24	07~07	07~03	07~01	07~23	07~21	자연일장

3) 광의 조도

- 연구소 : 시험구당 40W 형광등 4개(조도 125~340Lux)
- 민간양어장 : 시험구당 40W 형광등 12개(조도 80~112Lux)

4) 성숙관련 유전자의 발현 및 활성화도 조사

뇌: 생식선자극호르몬방출호르몬(GnRH) 유전자

- 광주기, 수온과 같은 환경정보는 감각기관에서 수용된 후, 뇌의 시상하부에서 통합되어 신경정보로서 뇌하수체로 전달되며, 이때 뇌에서는

뇌하수체 생식선자극호르몬의 생합성과 분비를 조절하는 시상하부호르몬인 GnRH (sGnRH, cGnRH-II)가 주된 역할을 담당함

- 따라서, 펩타이드호르몬인 GnRH의 분자 활성도를 모니터링하기 위해 real-time polymerase chain reaction (정량PCR, qPCR) 방법을 확립하고 광주기에 따른 무지개송어의 성숙속변화를 분자내분비학적으로 조사

뇌하수체: 생식선자극호르몬 (FSH, LH) 유전자

- 뇌하수체에서 생성되는 당단백질성 이량체 호르몬으로서 두 종류의 생식선자극호르몬, 여포자극호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH)이 존재
- FSH는 주로 성숙초기의 배우자세포에 작용하여 난모세포의 성장과 정자형성에 관여하며 LH는 최종성숙을 조절하여 산란과 방정을 유도
- 본 연구에서는 광주기의 변화에 따른 FSH 및 LH mRNA 분자의 변동을 정량PCR방법으로 조사

간: 난황단백전구물질 (VTG) 유전자 발현

- 난모세포의 성장에 필수적인 난황단백질 (yolk protein)은 미성숙기의 초기 난모세포가 간에서 생합성된 난황단백전구물질 (VTG)을 흡수하여 형성된 것이다. 또한, 뇌하수체에서 분비된 FSH의 자극에 의해서 유도되어 지며 난모세포의 정상적인 발생과정에서 중요한 내분비적 요인
- 따라서, 무지개송어 간조직의 VTG 유전자 발현율을 조사하여 충실한 성숙난모세포가 되는 과정을 성숙시기별로 조사

real-time polymerase chain reaction (정량PCR, qPCR) 방법

가) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

- 선별된 initial control 그룹 5마리를 마취시킨 후 해부하여 간, 뇌 뇌하수체를 채취
- 6월과 9월에 각 그룹에서 5마리씩 선별하여 간, 뇌 뇌하수체를 채취한 뒤 액체질소에 급속 동결한 후 -80℃에서 mRNA 추출 전까지 보관

- 각 조직들은 RNeasy MINI kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 total RNA를 추출
- 추출한 total RNA는 1 ug 정량한 후 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사의 지시서에 따라 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 합성

나) Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) 분석

- qPCR에 사용한 올리고 프라이머들은 *O. mykiss*의 염기서열을 바탕으로 Primer express v3.0 software (Applied Biosystems, Boston, MA, USA)를 사용하여 제작
- 무지개 송어의 각 조직들의 total RNA로부터 합성한 cDNA (0.45 ug), Power SYBR Green 1 PCR Master Mix (10 uL) (Applied Biosystems) 및 표적유전자의 올리고 프라이머 세트와 함께 총량 20 uL로 PCR system (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems)을 이용하여 반응을 진행
- PCR 프로토콜은 지시서에 따라, 50℃에서 2분, 95℃에서 10분 반응 후 , two-step PCR방법으로 실시
- denaturing step (95℃, 15초), annealing 및 extension step (60℃, 1분)의 조건으로 총 40cycle을 수행

Primer	Direction	Sequence
rtGTHa-F	Forward	5'-CCCACTACGGTCCAAGCAA-3'
rtGTHa-R	Reverse	5'-ACAAGGAGATTCCAGCCCATAC-3'
rtFSHb-F	Forward	5'-GTATGGCTGCCGACTAAACAACA-3'
rtFSHb-R	Reverse	5'-GCTCTTGGCAACGGGTATGA-3'
rtLHb-F	Forward	5'-GCCCTGTCAGCCCATCAA-3'
rtLHb-R	Reverse	5'-CCAAGGGGGACAGTCAGGTA-3'
rtVTG-F	Forward	5'-CATTCATCCAGGCTGCTATTATGG-3'
rtVTG-R	Reverse	5'-CAGCAAAAGAGGCAGCAGAAT-3'
rtb-actin-F	Forward	5'-CTTCCTCGGTATGGAGTCTTGG-3'
rtb-actin-R	Reverse	5'-GTGGGGGGGCGATGAT-3'

QPCR에 사용된 올리고프라이머의 염기서열

성숙관련 성호르몬의 혈중 농도 조사

배우자세포의 성숙과정은 뇌, 뇌하수체, 간의 펩타이드성 호르몬 뿐만이 아니라 생식선의 여포세포 및 주변세포에서 생산되는 성스테로이드호르몬에 의해 직접적으로 조절된다. 따라서, 성숙과정중에 생식선에서 분비되는 혈액중의 성스테로이드 (estradiol-17beta, testosterone, 17 and 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one)들의 농도변화를 조사하여 광주기변화, 성성숙관련 호르몬 유전자의 발현, 생식소의 발달과의 상호관계를 밝힘

수정란의 발생과정 조사

광주기의 변화로 성숙속도가 차이날 것으로 예상되는 무지개송어 친어로부터 획득된 배우자세포의 양적인 차이, 난질, 수정율 및 발안율 등 자어의 건강도를 조사하여 종묘생산현장에 종사하는 어민들에게 실질적인 도움을 줄 수 있는 생물학적인 기초자료를 제시하고자 함

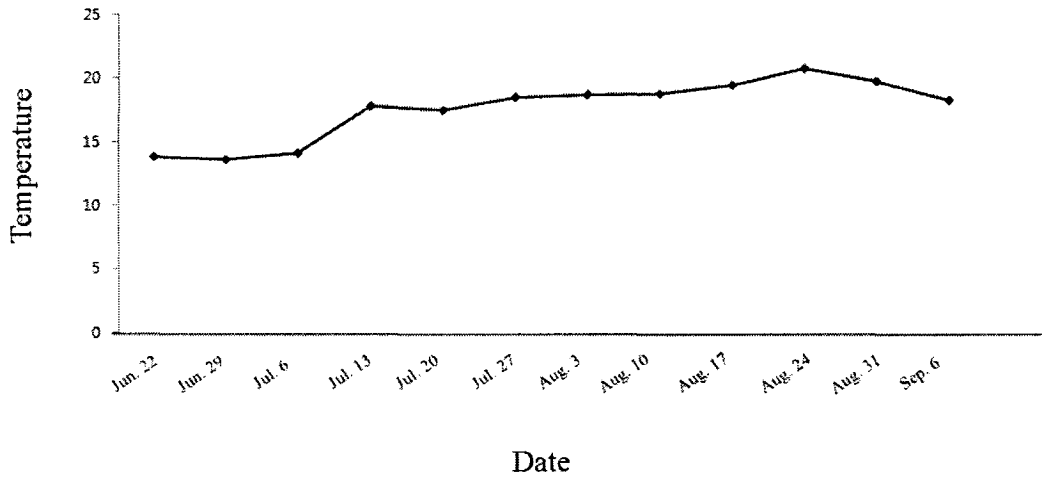
다. 과제수행시 연구범위 및 기법 정리

- 1) 차광 및 인공광 조사
- 2) 조직절제, mRNA추출, cDNA합성
- 3) real-time (q)PCR, 상대적 mRNA 정량법
- 4) Radioimmunoassay (방사면역측정법)
- 5) 난질, 발생과정, 수정을 및 발안을

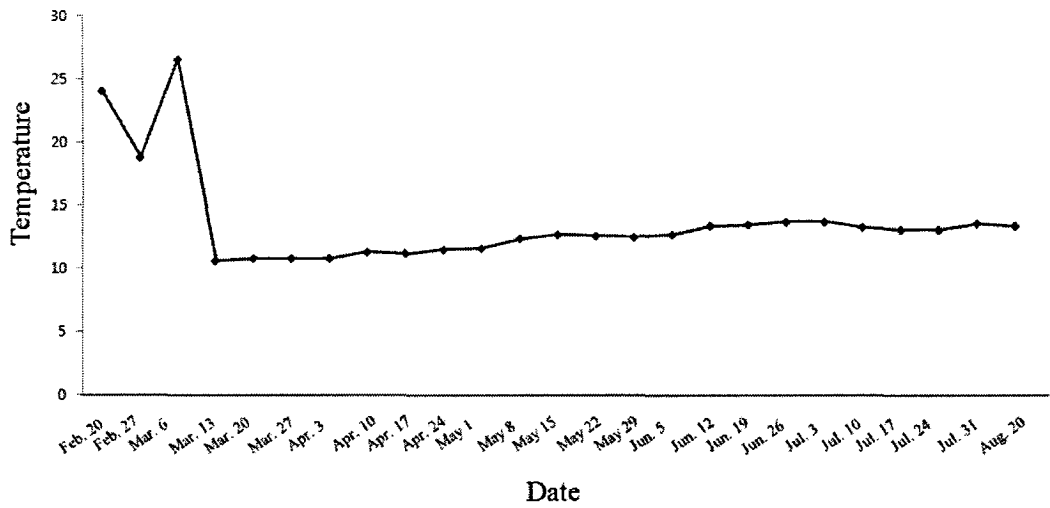
3절 연구결과

1항 사육수온

<연구소>



<민간 양어장>



2항 생물학적 조사

1) 생체조사

< 연구소 >

항목	시험구	성별	체장(cm)	체중(g)	HSI	GSI	비고
시작 (3. 7)		♀	41.1	1214.6	1.35	9.64	묵은알
		♂	41.0	896.0	1.24	3.51	
중간 (6. 21)	1 시험구	♀	42.2	1184.8	1.91	3.97	중간발달
		♂					
	2 시험구	♀	43.2	1361.8	1.19	0.97	초기단계
		♂					
	3 시험구	♀	44.1	1246.1	1.19	0.95	묵은알
		♂					
	4 시험구	♀	45.2	1462.0	1.16	0.99	초기단계
		♂					
종료 (9. 6)	1 시험구	♀	49.2	1891.5	0.82	18.71	과숙
		♂					
	2 시험구	♀	47.5	1837.8	1.06	5.02	중간발달
		♂					
	3 시험구	♀	48.1	1930.5	0.98	5.87	중간발달
		♂					
	4 시험구	♀	48.8	1877.3	1.22	6.53	중간발달
		♂					

< 민간 양어장 >

항목	시험구	성별	체장(cm)	체중(g)	HSI	GSI	비고
시작 (2. 8)	시험구	♀	60.8	2360.1	1.44	2.85	묵은알
		♂					
	대조구	♀	39.6	1095.9	1.47	0.13	초기단계
		♂					
중간 (6. 22)	시험구	♀	53.1	2447.4	1.19	2.11	중간발달
		♂					
	대조구	♀	45.2	1467.5	1.09	0.55	초기단계
		♂					
종료 (8. 1)	시험구	♀	58.6	3050.8	1.11	11.61	채란
		♂					
	대조구	♀	47.6	1344.0	1.17	1.01	초기단계
		♂					
종료 (12. 11)	시험구	♀	실험 종료				
		♂					
	대조구	♀	51.6	2026.0	0.94	13.56	채란
		♂					

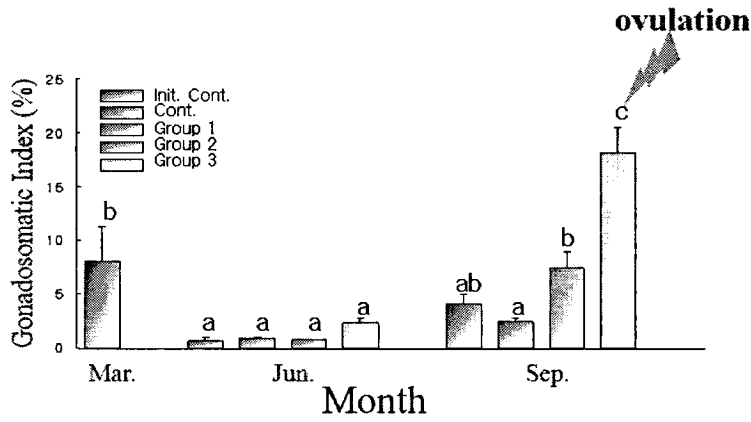
2) 부화율 조사

< 민간 양어장 >

시기	시험구	사용친어		채란량	발안율	부화율	비고
8. 1	광주기 조절	19	6	112,000	95,000 (84.8%)	86,000 (76.8%)	난경: 0.417cm 난중량: 0.054g
12. 9	대조구	130	15	528,000	372,000 (70.5%)	336,000 (63.6%)	난경: 0.431cm 난중량: 0.066g

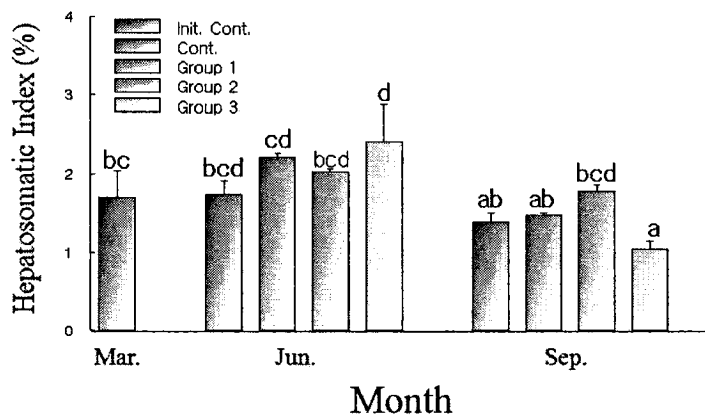
민간양어장에서는 용천수를 이용한 일정한 수온조건으로 7월 25일 채란하여 통상적인 자연채란(11월 하순)보다 4개월 정도 빨리 조기채란이 가능하였고, 광주기 조절로 암컷의 성숙뿐만 아니라 수컷의 성숙도 양호하여 양질의 수정란 확보가 가능하였으며, 부화율도 77%로 매우 높게 나타났음

3) 생식소: 생식소중량지수(GSI) 변화



- 3월의 initial control의 경우 전년도의 알들이 완전히 흡수되지 않고 남아있어서 GSI가 6월에 비해서 높게 나타났으나 흡수되지 않고 남아 있는 알들은 생식 능력이 없어 성숙도에는 영향을 미치지 못함.
- 9월의 3그룹이 control 그룹과 다른 광주기 조절 그룹보다 성숙된 것으로 나타났음

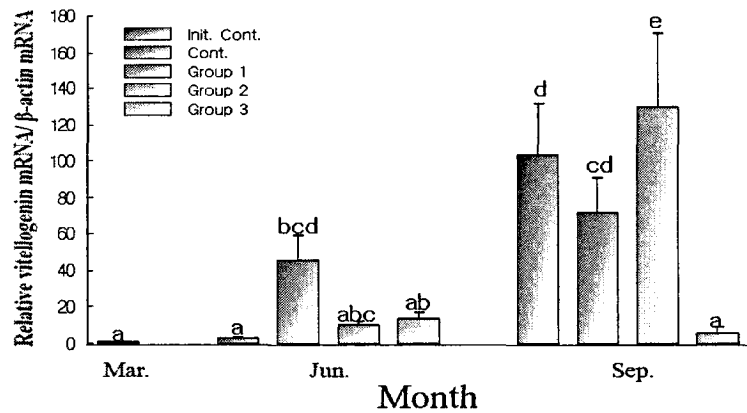
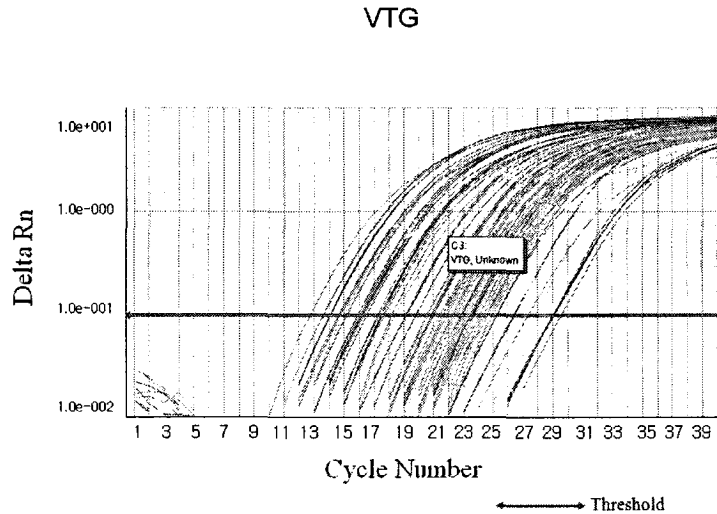
4) 간: 간중량지수(HSI) 변화



- HSI의 경우 성숙기인 9월의 3그룹이 가장 낮은 것으로 나타났는데, 무지개 송어가 성숙함에 따라서 간에서 생산된 vitellogenin이 생식소로 이동해 난황단백질로서 난황구내에 축적되었음을 예상할 수 있고, vitellogenin의 이동결과로 간의 중량지수가 줄어들었음

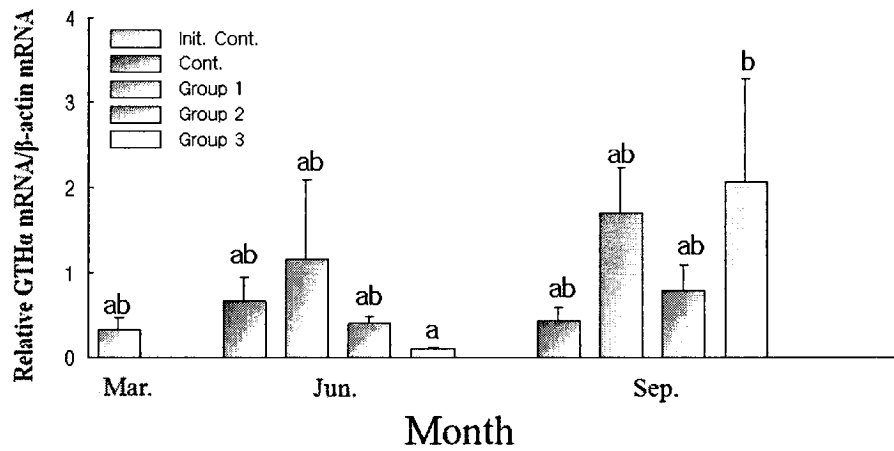
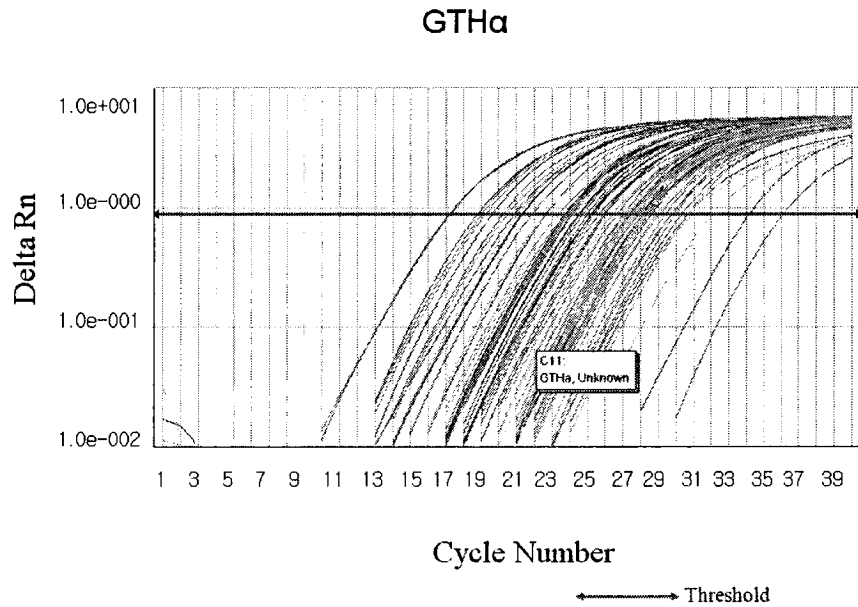
3항 성숙지표호르몬 유전자의 발현조사

1) 간: 난황단백전구물질 (VTG) 유전자 발현양상



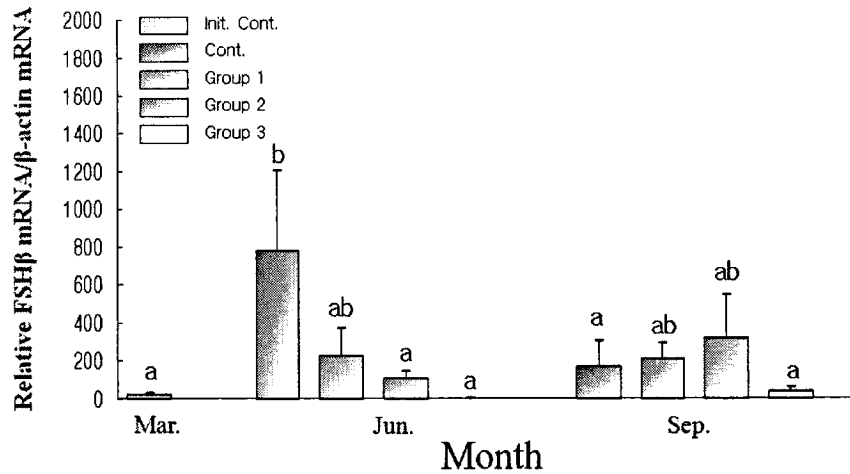
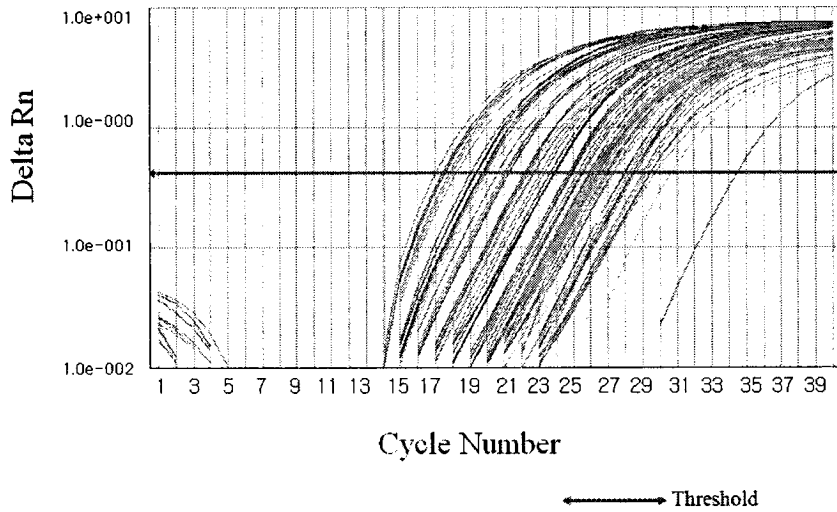
- 9월의 3그룹에서 vitellogenin의 수치가 다른 그룹들에 비해 월등히 낮은 것을 알 수 있음
- vitellogenin의 수치를 HSI 수치와 비교하여 보면 더욱 잘 알 수 있는데, 짧은 일장주기에 의해 난황형성전구물질의 합성은 간에서 일어나지 않고, 난모세포로의 이동시기가 이미 지난 성숙기에 달하였음을 알 수 있음

2) 뇌하수체: 생식선자극호르몬 (GTH, FSH, LH) 유전자 발현양상



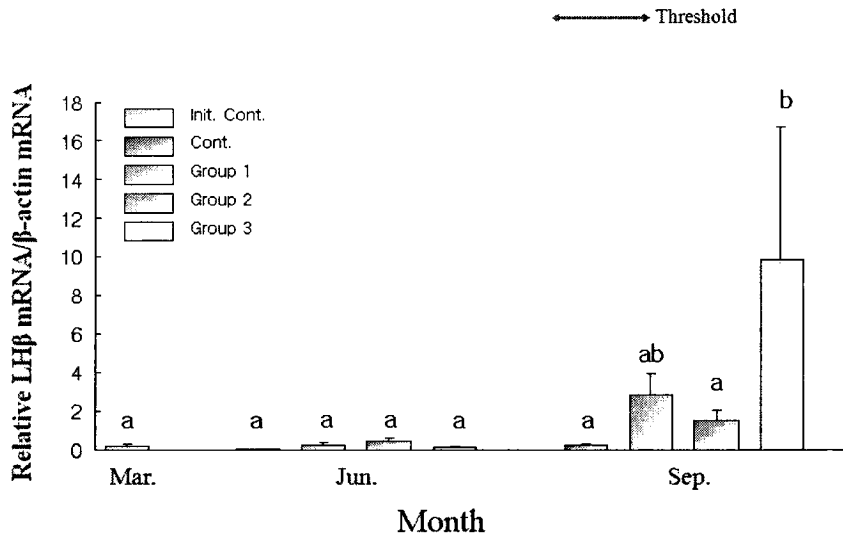
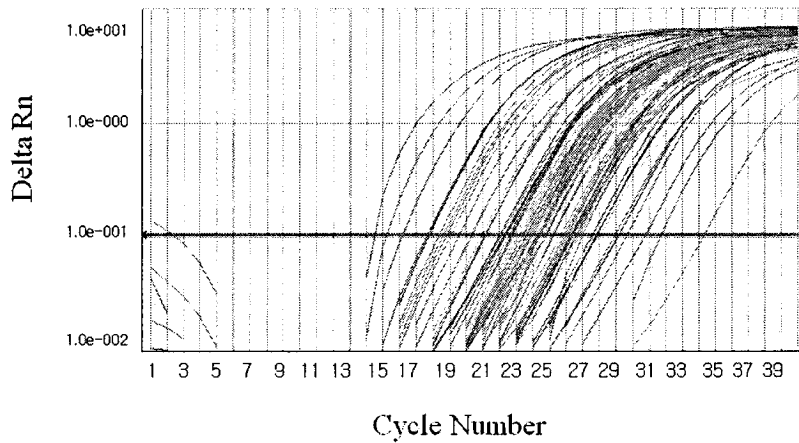
- 뇌하수체의 GTH α 호르몬의 분비는 성숙함에 따라 높아진다는 사실이 알려져 있는데, 단일주기에 노출된 무지개 송어에서도 GTH α mRNA 농도도 유사한 경향을 보이는 것으로 나타났음

FSH β



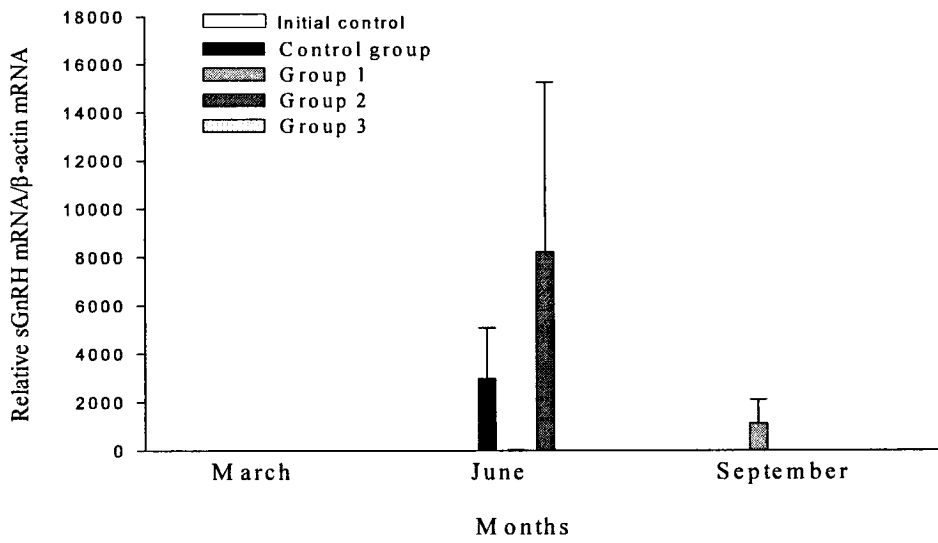
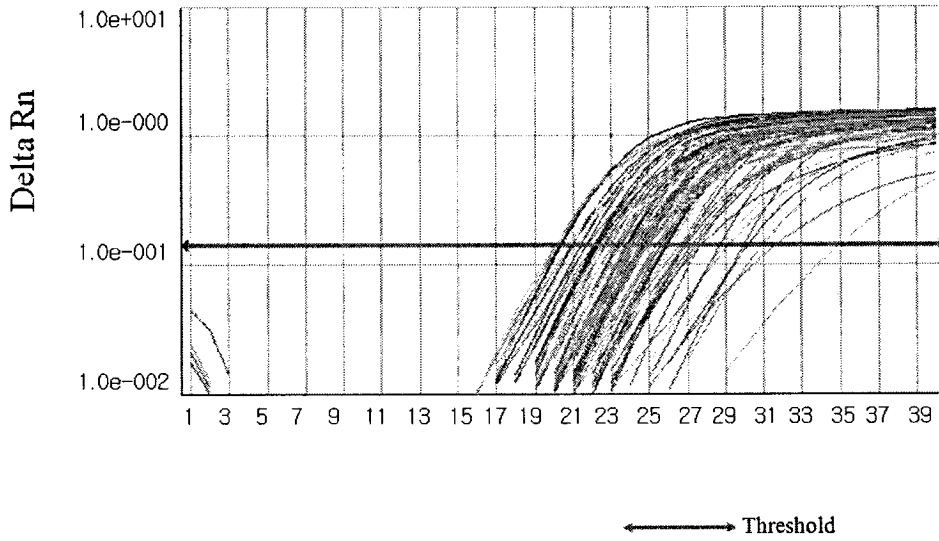
- FSH β 의 합성은 성숙기 동안에는 높은 수치를 보이다가 최종성숙기가 되면 수치가 낮아지나, 본 실험에서는 가장 성숙된 그룹인 3그룹에서 6월과 9월의 차이가 없는 것으로 보이는데, 이는 6월과 9월사이의 7, 8월에 변화를 보인 것으로 예상되나 본 실험에서는 3, 6, 9월에만 sampling을 하여 그 사이의 변화를 볼 수 없는 것으로 사료됨

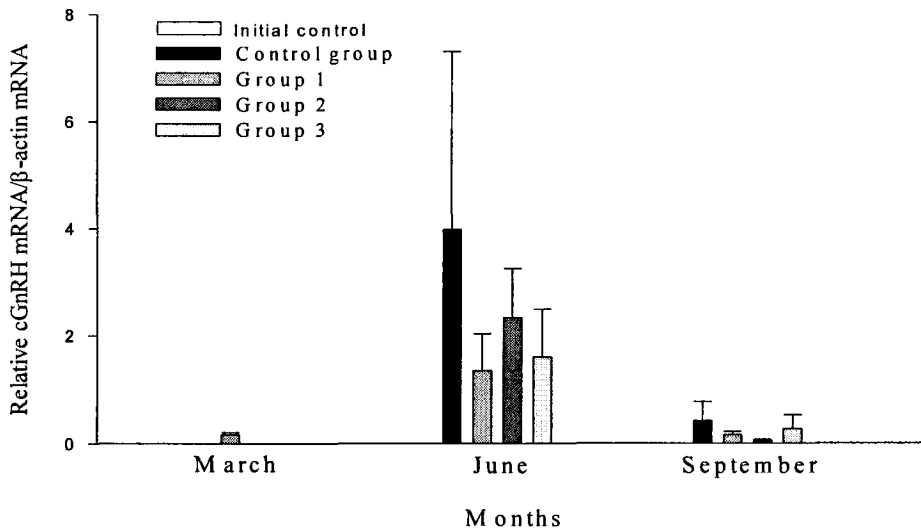
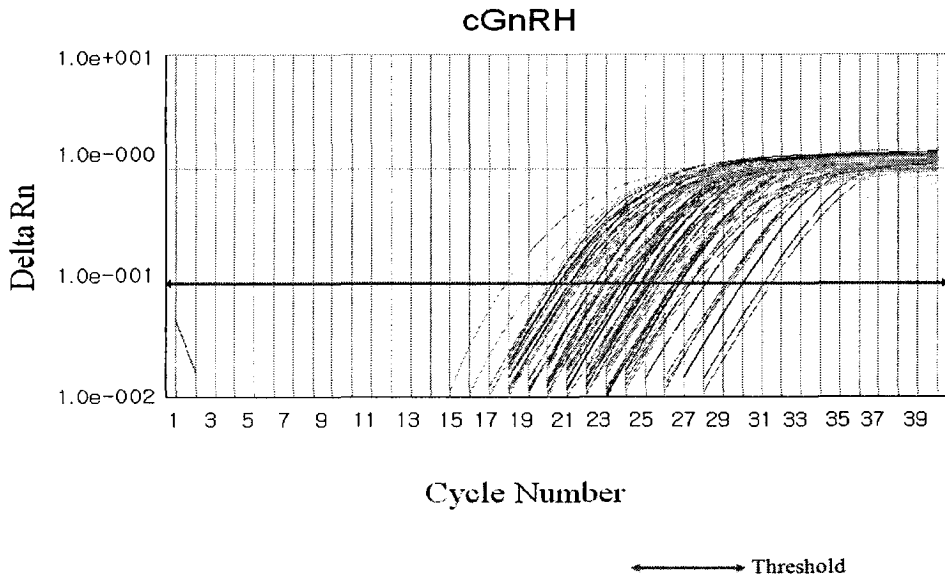
LHβ



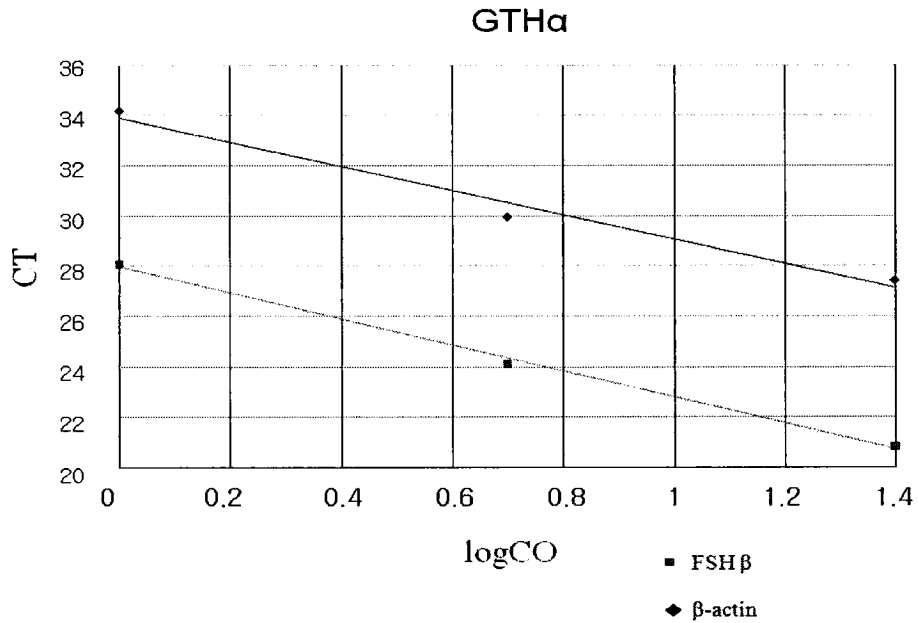
- 연어과 어류의 LH는 최종성숙을 조절하며 산란과 방정을 유도한다고 알려져 있음
- LHβ의 mRNA농도 및 단백질 합성은 성숙기 동안에는 변화를 관찰할 수 없다가 최종성숙기가 되면 급격히 변화하는 것으로 알려져 있음
- 본 실험에서도 단일주기에 의해 가장 성숙된 그룹인 3그룹에서의 수치가 가장 높았음
- 평균오차가 높은 이유는 3그룹에서 배란하지 않은 개체가 있어 영향을 준 것으로 사료됨

sGnRH





- 생식선자극호르몬의 생합성과 분비를 조절하는 시상하부호르몬인 GnRH (sGnRH, cGnRH-II)가 주된 역할을 담당한다고 알려져 있음
- 한편, 본 연구결과는 GnRH와 광주기조절에 의해 성숙된 그룹과의 직접적인 상관관계는 관찰할 수 없었음



- 각각의 개체로부터 획득한 mRNA의 상대적인 양을 일관되게 보정해 주기 위하여 house-keeping 유전자 beta-actin의 mRNA를 사용하였음
- sGnRH, cGnRH, GTHalpha, FSHbeta, LHbeta 및 VTG mRNA들은 모두 각각의 조직으로부터 증폭시킨 beta-actin의 mRNA로서 보정하였음
- 대표적으로 GTHalpha의 유전자발현을 보정한 것을 나타냄

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 연구개발목표의 달성도

1. 강원도 내수면 양식의 대표종인 무지개송어의 연중 종묘생산을 위하여 자연광주기를 조절하는 친환경적 종묘생산기법의 개발
2. 성숙지표를 성성숙 관련 유전자 및 호르몬 수준에서 조사하여 향후 산업화를 위한 기반연구 수행
3. 연구소 및 산업체 수준의 연구를 동시에 수행하여 향후 관련 지역산업의 활성화를 촉진할 수 있게 되었음

4. 학문적 성과

가. 학술회의 발표 :

- Induction of sexual maturation with hormone treatment and photoperiod control in salmonids, The 3rd International Symposium on Advanced Materials, Natural Product and Marine Biotechnology (2007, 02, 01)
- 광주기 변화에 따른 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 성숙유도와 성숙지표호르몬 유전자의 변화, 2007년도 한국수산과학총연합회 공동학술대회 (2007, 05, 18)

나. 학회지 논문발표 :

- Artificial acceleration of sexual maturation with photoperiod manipulation in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (in preparation)

2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 강원도 내수면 양식어업의 경쟁력 향상
- 무지개송어의 안정정인 연중공급 체계 확립
- 친환경적 종묘생산에 따른 고품질 양식 어류의 생산
- 수산생물의 분자내분비학적인 연구능력과 분석력이 증진됨
- 연어과 어류의 자연자원 조성을 위한 과학적이고 합리적인 방법 개발
- 적절한 번식시기를 이해하고 인공번식방법의 개발

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 강원도 무지개송어 양어장 및 종묘생산시설에 연구개발결과를 확산시켜 연중생산을 추구하며, 특히 여름철에 종묘생산이 가능하게 할 계획 확임
2. 배란, 발란 및 부화에는 단일주기 처리에 의해 생물학적 이상은 관찰 되지 않았으나, 그 이후의 치어기에 어떠한 영향을 미치는 지 지속적으로 관찰하여 초기종묘생산 전과정을 조사하여야 할 것으로 판단됨
3. 기술적으로 광주기 조절에 의한 배란유도는 가능하였으나, 배란된 난모세포의 크기가 대조군에 비하여 작았으므로 그 이유에 대한 추가연구가 필요함
4. 최종성숙기까지는 광주기조절법으로 성숙을 유도하고, 배란은 생식선자극호르몬으로 유도하는 복합적인 응용연구가 필요할 것으로 사료됨
5. 배우자세포의 성숙과정에 중요한 성스테로이드의 농도변화는 최종적인 실험이 끝난 12월 실험군까지의 혈액을 보관하여 전체를 동시에 조사하여야 하므로, 현재 면역방사측정법으로 연구를 진행중

제 6 장 참고문헌

Alestrom,P., Kisen,G., Klungland,H. and Andersen,O. Fish gonadotropin-releasing hormone gene and molecular approaches for control of sexual maturation: development of a transgenic fish model Mol. Marine Biol. Biotechnol. 1 (4-5), 376-379 (1992)

Blazquez, M., Bosma, P.T., Fraser, E. J., Van Look, K.J.W., Trudeau, V.L., Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. Comp. Biochem. Physiol. Part C 119, 1998, 345-364.

Chang YS, Huang CJ, Huang FL, Lo TB. Primary structures of carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequences. Int J Pept Protein Res. 1988 Dec;32(6):556-64.

Gen K, Maruyama O, Kato T, Tomizawa K, Wakabayashi K, Kato Y. Molecular cloning of cDNAs encoding two types of gonadotrophin alpha subunit from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: construction of specific oligonucleotides for the alpha 1 and alpha 2 subunits. J Mol Endocrinol. 1993 Dec;11(3):265-73.

Habibi H and Huggard D. Control of gonadotropin production in fish. In: S. Kawashima and S. Kikuyama, Editors, *Advances in Comparative Endocrinology*, Moduzzi Editore, Bologna, 1997, pp. 829 - 834.

Hassin S, Elizur A, Zohar Y. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin-I and -II subunits. J Mol Endocrinol. 1995 Aug;15(1):23-35.

Itoh H, Suzuki K, Kawauchi H. The complete amino acid sequences of beta-subunits of two distinct chum salmon GTHs. Gen Comp Endocrinol. 1988

Sep;71(3):438-51.

Itoh H, Suzuki K, Kawauchi H. The complete amino acid sequences of alpha subunits of chum salmon gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol.* 1990 Apr;78(1):56-65.

Kato Y, Gen K, Maruyama O, Tomizawa K, Kato T. Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotrophin beta subunits (GTH-I beta and -II beta) from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: rapid divergence of the GTH-I beta gene. *J Mol Endocrinol.* 1993 Dec;11(3):275-82.

Klein, J., Lobel, L., Pollak S., Ferin M., Xiao E., Sauer M.V. and Lustbader J.W., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotropin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey. *Fertility and Sterility*, 2002, 77: 1248-1255.

Klein, J., Lobel, L., Pollak S., Lustbader B., Ogden R.T., Sauer M.V. and Lustbader J.W., Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist. *Human Reproduction*, 2003, 18: 50-56.

Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, Elizur A and Yaron Z. The mRNA levels of GTH I β , GTH II β and GH in relation to testicular development and testosterone treatment in pituitary cells of male tilapia. *Fish Physiol. Biochem.* 1997, 17, 93 - 98.

Mouchel,N., Trichet,V., Betz,A., Le Pennec,J.P. and Wolff,J. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene* 174 (1), 59-64 (1996)

Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:465-95.

Planas JV, Athos J, Goetz FW, Swanson P. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biol Reprod.* 2000 May;62(5):1262-9.

Querat B., Structural relationships between fish and tetrapod gonadotropin. In; Goetz F.W., Thomas P. (Eds.), *Proc. 5th Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish FishSymp 95*, University of Texas, Austin, TX, 1995. pp. 7-9.

Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen Comp Endocrinol.* 1988 Aug;71(2):292-301.

Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod.* 1991 Jan;44(1):29-38.

Swanson P., Dittman A., Pituitary gonadotropin and their receptors in fish. In: Kawashima S, Kikuyama S. (Eds.), *Advance in Comparative Endocrinology XIII International Congress of Comparative Endocrinology*, Yokohama, Japan, 1997. pp. 841-846.

Thiebaud,P., Rescan,P.Y., Barillot,W., Ralliere,C. and Theze,N. Developmental program expression of myosin alkali light chain and skeletal actin genes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* 1519 (1-2), 139-142 (2001)

Trinh KY, Wang NC, Hew CL, Crim LW. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin beta subunit. *Eur J Biochem.* 1986 Sep 15;159(3):619-24.

Tyler CR, Sumpter JP, Kawauchi H, Swanson P. Involvement of gonadotropin in

the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol. 1991 Nov;84(2):291-9.

von Schalburg, K.R., Harrower, W.L. and Sherwood, N.M. Regulation and expression of gonadotropin-releasing hormone in salmon embryo and gonad. Mol. Cell. Endocrinol. 157 (1-2), 41-54 (1999)

Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Levavi-Sivan B, Elizur A. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2001 Jun;129(2-3):489-502.