

## 조피볼락, *Sebastes schlegeli*의 성분화 기간 중 Cytochrome P450 Aromatase 유전자의 발현

이 찬 희<sup>1</sup> · 권 준 영<sup>†</sup>

<sup>1</sup>한국생명과학연구소, 선문대학교 응용생물과학부

### Expression of Cytochrome P450 Aromatase Genes during Sex Differentiation in Korean Rockfish, *Sebastes schlegeli*

Chan Hee Lee<sup>1</sup> and Joon Yeong Kwon<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Hankook Institute of Life Science, Seoul 110-521, Korea

Division of Applied Biological Sciences, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea

**ABSTRACT** : Sex determination and sex differentiation are influenced by genotype in many gonochoristic fish. Cytochrome P450 aromatase (CYP19) is the terminal enzyme in steroidogenic pathway that converts androgens into estrogens. In this study, partial fragments of aromatase genes (ovarian aromatase, P450aromA and brain aromatase, P450aromB) were cloned and sequenced in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*), and gene specific primers were designed based on their sequences. Using these primers, aromatase gene expression during sex differentiation was investigated by RT-PCR. Expression of these aromatase genes were detected both in the head and body parts at 35 dab (days after birth). The number of fish that expressed the aromatase genes decreased at 52 dab, implying down-regulation of these genes. However, these genes were expressed at 59 dab in almost all fish studied here. The expression patterns of both genes are similar throughout the investigated period except for 45 dab where the expression of P450aromB was detected in more fish than that of P450aromA both in the head and body parts. Timing of sex differentiation in this species has been shown to be at around 50~65 dab by histological analysis. However, the results from this study suggest that sex differentiation of rockfish may take place 1~2 weeks earlier than the period proposed previously. The results also suggest that the mechanism of sex differentiation in viviparous fish may be similar to that in oviparous fish in terms of the importance of aromatase action during the critical period.

**Key words** : Aromatase, Gene expression, Brain, Ovary, Sex differentiation, Viviparous, Rockfish, *Sebastes schlegeli*.

요 약 : 자웅이체형 어류의 성결정 및 성분화는 일반적으로 각 개체의 유전형을 따른다. 자연환경에서는 자신이 가진 유전정보의 조절에 따라 성분화 시기에 아로마테이즈 유전자의 발현이 증가하거나 감소하고, 그 결과 스테로이드 호르몬들의 조성이 결정되어 각기 다른 방향으로 성분화하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 해산 태생 어류인 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)의 ovarian type aromatase (P450aromA)와 brain type aromatase (P450aromB)의 유전자를 부분적으로 클로닝하여, 이들의 염기서열을 밝혔으며, 각 유전자에 대한 primer를 제작한 후 성분화 기간 중 이 유전자들의 발현을 조사하였다. 조피볼락 아로마테이즈 유전자들은 조사를 시작한 출산 후 35일째에 여러 개체의 머리와 몸에서 각각 발현되었으나, 52일째에는 아로마테이즈 유전자들의 발현 개체수가 현저히 감소하였다. 그리고 출산 59일째에는 발현 개체 수가 다시 증가하였다. P450aromA와 P450aromB의 발현 양상은 전반적으로 유사하였으나, 45일째에는 P450aromB의 발현 개체

수가 P450aromA 발현 개체 수보다 훨씬 많았다. 조직학적 분석을 통해 제시된 이 종의 성분화 시기는 지금까지 출산 50~65일 전후로 알려져 왔으나, 본 연구에서 나타난 아로마테이즈 유전자들의 발현 결과를 볼 때, 이 종의 실질적인 성분화는 알려진 것보다 최소한 1~2주 정도 빨

<sup>†</sup> Correspondence: Division of Applied Biological Life Sciences, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea, Tel: +82-41-530-2284, Fax: +82-41-530-2917, E-mail: jykwon@sunmoon.ac.kr

리 진행될 가능성이 있다. 본 연구의 결과는 또한 태생어류의 성분화도 난생어류의 성분화에서 보고된 것과 마찬가지로 아로마타이즈의 작용과 밀접하게 연관되어 있다는 사실을 시사한다.

## 서 론

조피볼락(*Sebastes schlegeli*)은 우리나라 연안에 서식하는 대표적인 해산태생 어류이다. 체외에 알을 낳아서 번식하는 난생어류와 달리, 이 종은 약 50일간의 임신기간을 거친 후(Yamada & Kusakari, 1991) 작은 새끼 물고기를 출산한다. 이 종은 또한 성장이 빠르고 겨울철 저수온에도 강하여 넙치와 더불어 우리나라의 대표적인 해산 양식어종으로 개발되어 있다. 뿐만 아니라, 우리나라 전 연안에 분포하여 환경생태학적 중요성도 높다.

이 종의 성분화 현상에 대한 연구는 조직학적 방법을 이용하여 성분화 시기를 추정한 연구(Lee et al., 1996), 외인성 스테로이드 호르몬의 처리가 성분화에 미치는 영향에 관한 연구(Lee et al., 2000; Kwon et al., 2006) 등이 있다. 그러나 이 종의 성분화 과정을 보다 깊이 이해하기 위하여 필요한 성분화 과정중의 내분비 메카니즘 및 성스테로이드 생합성 효소에 대한 연구는 이루어지지 못하였다. 난생어종에서는 aromatase (cytochrome P450 aromatase, CYP19)라는 효소가 발생중인 어린 물고기의 체내에서 스테로이드 호르몬들의 균형을 조절하여 성분화를 유도 및 완성시키는 과정에 관련한다는 주장(Kitano et al., 2000; Kwon et al., 2000; Kwon et al., 2001; Kwon et al., 2002)이 제시된 바 있다. 즉, aromatase는 체내에서 성스테로이드 호르몬의 생합성 경로에 관여하여 응성호르몬(androgens)을 자성 호르몬(estrogens)으로 전환시키는 역할을 하는데, 성분화 기간에 aromatase 유전자의 발현이 증가하면(Up-regulation, 정상적인 환경하에서 XX 염색체를 가진 개체에서 관찰됨) 그 개체는 암컷으로 분화되고, 감소되면(Down-regulation, 정상적인 환경하에서 XY 염색체를 가진 개체에서 관찰됨) 수컷으로 분화한다(Kwon et al., 2001).

대부분의 포유류나 조류는 한 가지의 aromatase gene을 가지고 있지만, 예외적으로 돼지와 같이 여러 개의 aromatase 유전자를 가지는 사례도 보고된 바 있다(Choi et al., 1997). 그러나, 어류에서는 두 개의 다른 aromatase 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있는데, 이들은 ovarian aromatase gene (P450 aromA)과 brain aromatase gene (P450 aromB)이다(Tchoudako-

va & Callard, 1998; Chiang et al., 2001; Blazquez & Piferrer, 2004). 예외로 뱀장어의 경우는 지금까지 하나의 aromatase 유전자만이 발견되었다(Ijiri et al., 2003).

이상의 연구들은 담수산 난생어류인 tilapia (Kwon et al., 2000, 2001, 2002), zebrafish (Kishida & Callard, 2001) 등과 해산 난생어류인 flounder (Kitano et al., 2000), Japanese eel (Ijiri et al., 2003), sea bass (Blazquez & Piferrer, 2004) 등을 대상으로 진행되었으며, 해산 태생어류에 대한 연구는 아직 진행된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 해산 태생어류인 조피볼락의 초기 성분화 과정 중 aromatase의 중요성을 밝히기 위하여, 이 종의 생식소 조직으로부터 P450aromA와 P450aromB를 부분적으로 클로닝하였으며, 얻어진 sequence에 기초하여 primer를 제작하고 성분화 기간 중 이 유전자들의 발현을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 조피볼락 P450aromA와 P450aromB의 부분적 염기서열 파악

조피볼락 암컷 3마리(598±119 g)로부터 난소(1.76±0.9 g, 미성숙)를 분리한 후 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 방법(TRI Reagent, MRC Inc.)으로 total RNA를 추출하였다. 얻어진 total RNA를 DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega)로 처리하여 genomic DNA를 제거하였으며, 그 후 oligo (dT)<sub>15</sub> primer (Promega)와 M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 이 total RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 그리고 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 기법을 활용하여 이 cDNA로부터 조피볼락 P450aromA와 P450aromB의 부분적 염기서열을 파악하였다.

조피볼락 P450aromA 및 P450aromB의 증폭을 위해 사용한 PCR primer들은 이미 밝혀진 타 어종들의 P450aromA (orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*; red-spotted grouper, *E. akaara*; European sea bass, *Dicentrarchus labrax*; barramundi perch, *Lates calcarifer*; black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*)들과 P450aromB (European sea

bass, *D. labrax*; orange-spotted grouper, *E. coioides*; red-spotted grouper, *E. akaara*; Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*; Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*; medaka, *Oryzias latipes*; rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*; Mozambique tilapia, *O. mossambicus*)들의 염기서열을 비교 분석한 후, 중간 보존도가 높은 염기서열 부분을 활용하여 제작하였다(Table 1). 그리고 제작한 primer들과 조피볼락 생식소 cDNA를 이용하여 일련의 PCR을 진행하였다. PCR에 사용한 *Taq* DNA polymerase 및 주요 시약은 Takara 제품을 사용하였으며, thermocycler는 T-gradient model (Biometra) 이었다. PCR 진행과정은 pre-denaturation 5분(94°C) 그리고 연속적인 34 cycle의 denaturation (94°C, 1분), Annealing (50~58°C, 30초), extension (72°C, 1분)의 순이었으며, 끝으로 6분간의 post-extension time (72°C)이 주어졌다. PCR 생성물은 1% agarose gel (in TBE buffer with ethidium bromide, EtBr)을 사용하여 전기영동한 후 Image analysis system (Kodak)을 이용하여 분석하였다.

분석 후 예상 범위에 속하는 크기의 PCR 생성물들을 Wizard SV-Gel and PCR clean-up system (Promega)을 이용하여 정제한 다음, T-vector (pGEM-T easy vector, Promega)와 ligation시켰고, 이 ligation 반응물을 이용하여 고효율 JM109 competent cells (Promega)을 형질 전환시켰다. 형질 전환된 세포들은 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)과 IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) 그리고 ampicilin (Sigma)이 첨가된 평판배지 상에서 12시간 배양되었다. 배양 후에는 독립된 white colony의 세포를 액체 배지인 LB-broth (Difco)에서 다시 배양한 다음 plasmid DNA를 추출하여 (plasmid isolation kit, Roche), 그 염기서열을

**Table 1. Primers for PCR cloning of aromatase gene fragments from Korean rockfish *Sebastes schlegeli***

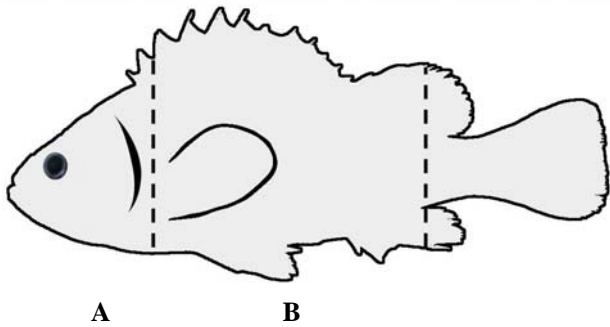
Aromatase	Primer sequence (5'→3')
Forward 1 (F1)	5'-ACAGCCAGCAACTACTACAACAA-3'
Forward 2 (F2)	5'-AGATGGTGATTGCAGCACCAGAC-3'
Reverse 1 (R1)	5'-GTCTGGTGCTGCAATCACCATCT-3'
Reverse 2 (R2)	5'-CTGGGAGAGGTTGTTGGTCTG-3'
Reverse 3 (R3)	5'-GCTGCTATCACCATCTCCA-3'
Reverse 4 (R4)	5'-CGCATGGTGAAGTCCACCA-3'
Reverse 5 (R5)	5'-CATCATCACCATGGCGATG-3'

분석하였다. 이상의 과정을 통하여 파악한 염기서열들을 GenBank database (NCBI)에 있는 다른 어종들의 aromatase gene 염기서열과 비교하였다.

## 2. 조피볼락 성분화 기간 중 P450aromA 및 P450aromB 발현

조피볼락의 성분화 과정 중 P450aromA와 P450aromB의 발현을 조사하기 위해, 기존에 이 어종의 성분화 시기로 추정된 생후 50~65일령(days after birth, dab) (Lee et al., 1996; Kwon et al., 2006)보다 20~30일 정도 빠른 생후 35 dab부터의 치어를 사육하면서 35, 45, 52 그리고 59 dab에 각각 10마리씩 무작위로 잡아내어 분석하였다. 실험어는 대형 콘크리트 사각 수조에 가두리망을 띄워 사육하였고, 자연 해수를 펌프로 공급하였다. 사육기간에 먹이는 일 3회 포식시켰으며, 평균수온은 15.8±2.3°C, 평균 염분도는 33.4±1.0‰로 유지하였다. 분석에 사용된 실험어의 크기는 35 dab에 체중 0.24±0.08 g, 전장 25.30±5.90 mm, 45 dab에 체중 0.40±0.12 g, 전장 30.60±3.62 mm, 52 dab에 체중 0.55±0.16 g, 전장 35.10±3.39 mm, 59 dab에 체중 1.06±0.27 g, 전장 41.50±3.72 mm였다. 각 일령별 치어들은 잡아낸 후 크기를 측정하고 곧 바로 dry ice로 급속 냉동시켜 -70°C에 보관하였다가 유전자 발현 분석에 이용하였다.

유전자 발현 분석은 RT-PCR 기법을 이용하여 실시하였는데, 과정을 간단히 정리하면 다음과 같다. 먼저, 냉동하여 보관중인 각 조피볼락 치어의 아가미와 가슴지느러미 사이를 수직으로 절단하여 뇌를 포함한 머리부분과 생식소를 포함한 몸통부분으로 나누었고, 각 부분으로부터 total RNA를 추출하여(Fig. 1), cDNA 합성에 이용하였다. total RNA의 추출방법과 cDNA의 합성 방법 및 PCR 진행조건과 절차는 앞에서 서술한 바와 같다. 조피볼락 P450aromA (forward: 5'-CGCTGCACCGTAGTCGACAT-3', reverse: 5'-GCGATCACCATCTCCAACAC-3', product size 430 bp)와 P450aromB (forward: 5'-GATGGTGATTGCAGCACAAG-3', reverse: 5'-TTCATCATCACCATGGCGAT-3', product size 330 bp)의 gene specific primer들은 본 연구에서 파악한 이 유전자들의 염기서열을 활용하여 제작되었다. 대조 유전자(internal control gene)로는 actin (GenBank database accession number: Y18689)을 이용하였다(actin primer forward: 5'-AATCGTGCGTGACATCAAGG-3', reverse: 5'-AGTATTTACGCTCA-



**Fig. 1.** Total RNA for RT-PCR analysis was extracted from the head part (A) and body part (B) of Korean rockfish *Sebastes schlegeli* sampled during sex differentiation.

GGRGGG-3', product size 392 bp). PCR 생성물은 전술한 바와 같이 1% agarose gel (in TBE buffer with EtBr)을 사용하여 전기영동한 후 Image analysis system (Kodak)을 이용하여 분석하였다.

**결 과**

**1. 조피볼락 P450aromA와 P450aromB의 부분적 염기서열**

조피볼락의 두 aromatase 유전자들의 단편을 얻기 위하여 Table 1의 primer들을 F1-R1, F1-R3, F1-R4, F2-R2, F2-R4, F2-R5로 조합하여 RT-PCR을 진행하였고, 증폭 산물을 1% agarose gel상에서 전기영동하여 조사하였다. 그 결과 F1-R1, F1-R3, F2-R2에서는 예상한 크기의 DNA 증폭 산물을 확인할 수 없었으며, F1-R4, F2-R5에서 예상한 크기와 근접한 DNA 단편들(468 bp, 985 bp)을 얻어냈다. 이 두 단편들을 pGEM-T easy vector와 JM109 competent cell을 이용하여 cloning하여 염기서열을 분석한 결과, 985 bp의 DNA 단편은 타 어종의 P450aromA과 높은 일치도를 보였으며(Fig. 2), 468 bp 단편의 염기서열은 타 어종의 P450aromB과 높은 일치도를 보였다(Fig. 3). 985 bp 단편의 염기서열과 타 어종의 P450aromA 염기서열의 일치도는 red-spotted grouper에서 91% (AY547354), orange-spotted grouper에서 90% (AY510711), seabream, *Sparus aurata*에서 88% (AF399824), Nile tilapia에서 85% (U72071), Mozambique tilapia에서 85% (AF135851)였다. 따라서 조피볼락의 난소 cDNA에서 얻은 985 bp의 염기서열은 P450aromA로 판단되었다. 한편, 468 bp 단편의

S. S. gnu	1:	-----GAGTGTGATGATCGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCAGCTGCGATGCTC	54
E. A. gnu	241:	ACACAGACAAGAAAACCTGTGCCAGGTCGGCTCTTCTGTCTGGGTTTGGGGCCACTTCTGT	300
E. C. gnu	241:	ACACAGACAAGAAAACCTGTGCCAGGTCGGCTCTTCTGTCTGGGTTTGGGGCCACTTCTGT	300
O. C. gnu	197:	ACACGGACAAGAAAATTGTGCCAGGTCCTCTTCTGTCTGGGTTTGGGGCCACTTCTGT	256
O. M. gnu	196:	ACACGGACAAGAAAATTGTGCCAGGTCCTCTTCTGTCTGGGTTTGGGGCCACTTCTGT	255
S. A. gnu	227:	GCAATGGAGAAGAAATCTGTACCAGGCCCTCTTCTGTCTGGGTTTGGGGCCACTTCTGT	286
S. S. gnu	55:	CCGGCCGCCATGCGGCCCGGGGAATTCGATTACAGCCAGCAACTACTACAACAAGT	114
E. A. gnu	301:	CATACGTGAGGTTTCATCTGGACTGGCATAGGCACAGCCAGCAACTACTACAACAAGT	360
E. C. gnu	301:	CATATGTGAGGTTTCATCTGGACTGGCATAGGCACAGCCAGCAACTACTACAACAAGT	360
O. C. gnu	257:	CATATCTGAGATTTATCTGGACTGGCATAGGCACAGCCAGCAACTACTACAACAAGT	316
O. M. gnu	256:	CATATCTGAGATTTATCTGGACTGGCATAGGCACAGCCAGCAACTACTACAACAAGT	315
S. A. gnu	287:	CATATCTGAGATTCAGCTGGACCGGGCATGGCCAGCCAGCAACTACTACAACAAGT	346
S. S. gnu	115:	ACGGAGACATTTGTGAGAGTGTGGATCAACGGAGAGGACCCCTCATACTCAGCAGGGCAT	174
E. A. gnu	361:	ATGGAGACATTTGTGAGAGTGTGGATCAATGGAGAGGAGACACTCATACTCAGCAGGGCAT	420
E. C. gnu	361:	ATGGAGACATTTGTGAGAGTGTGGATCAATGGAGAGGAGACACTCATACTCAGCAGGGCAT	420
O. C. gnu	317:	ATGGAGACATTTGTAGAGTCTGGATCAACGGAGAGAAACCGCTCATACTAAGCAGATCTT	376
O. M. gnu	316:	ATGGAGACATTTGTAGAGTCTGGATCAACGGAGAGAGACCGCTCATACTAAGCAGATCTT	375
S. A. gnu	347:	ATGGAGACATTTGTGAGAGTGTGGATCAATGGAGAGGAAACCCCTCATCTCAGCAGGGCAT	406
S. S. gnu	175:	CAGCGGTGCACCATGTGCTGAAGATGGACATACACTTCAAGTTTTGGGAGCAAGCAGG	234
E. A. gnu	421:	CAGCGGTGCACCATGTGCTGAAGATGGACATACACTTCAAGTTTTGGGAGCAAGCAGG	480
E. C. gnu	421:	CAGCGGTGCACCATGTGCTGAAGATGGACATACACTTCAAGTTTTGGGAGCAAGCAGG	480
O. C. gnu	421:	CAGCGGTGCACCATGTGCTGAAGATGGACATACACTTCAAGTTTTGGGAGCAAGCAGG	436
O. M. gnu	376:	CAGCAGTGCACCATGTGCTGAAGATGGACATACACTTCAAGTTTTGGGAGCAAGCAGG	435
S. A. gnu	407:	CAGCTGTGCACCATGTGCTGAAGATGGACATACACTTCAAGTTTTGGGAGCAAGCAGG	466
S. S. gnu	235:	GACTCAGCTGGTGGGATGAATGAGAGGGCATCATATTCAACAACAACGCTCACTCTGT	294
E. A. gnu	481:	GACTCAGCTGCATCGGCATGAACGAGAGAGGCATCATATTCAACAACAACGCTGGAGTGT	540
E. C. gnu	481:	GACTCAGCTGCATCGGCATGAACGAGAGAGGCATCATATTCAACAACAACGCTGGAGTGT	540
O. C. gnu	437:	GACTCAGCTACCTCGGCATGAACGAGAGAGGCATCATATTCAACAACAACGCTCACTCTGT	496
O. M. gnu	436:	GACTCAGCTGCCTCGGCATGAACGAGAGAGGCATCATATTCAACAACAACGCTCACTCTGT	495
S. A. gnu	467:	GACTCAGCTGCATCGGCATGAACGAGAGAGGCATCATATTCAACAACAACGCTGACCTGT	526
S. S. gnu	295:	GGAAAAAGATACGCACCTACTTCCAAAGCCCTGACAGCTCCGGGCTTGCACAGACAG	354
E. A. gnu	541:	GGAAAAAGATTCGCACCTACTTCTCCAAAGCCCTGACAGCTCCAGGCTTGCACAGACAG	600
E. C. gnu	541:	GGAAAAAGATTCGCACCTACTTCTCCAAAGCCCTGACAGCTCCGGGCTTGCACAGACAG	600
O. C. gnu	497:	GGAAAAAGATACGCACCTATTTTGTCTAAAGCTTGCACAGGCCAAATTTGCACAGACCG	556
O. M. gnu	496:	GGAAAAAGATACGCACCTATTTTGTCTAAAGCTTGCACAGGCCAAATTTGCACAGACCG	555
S. A. gnu	527:	GGAAAAAGATACGCACCTATTTCCAAAGCCCTGACCGGCCAGGCTTGCACAGACAG	586
S. S. gnu	355:	TGGAGGTCAGGCTCTCTCTCCACAGACTCACTTGGACGACCTGGACAGTTTGGCTCATG	414
E. A. gnu	601:	TGGAGGTCAGTGTCTCCGCCACAGACTCACTTGGACGACCTGGACGCTTGGGTCATG	660
E. C. gnu	601:	TGGAGGTCAGTGTCTCCGCCACAGACTCACTTGGACGACCTGGACGCTTGGGTCATG	660
O. C. gnu	557:	TGGATGTTTGGTCTCTCCATACAGGCTCACTTGGACGACCTGGACGCTTGGGTCATG	616
O. M. gnu	556:	CGGATGTTTGGTCTCTCCATACAGGCTCACTTGGACGACCTGGACGCTTGGGTCATG	615
S. A. gnu	587:	TGGAGTCTGGTCTCTCTCCAGCGGACTCACTTGGACGACCTGGACGCTTGGATCAGG	646
S. S. gnu	415:	TGGATGTCCTCAGTCTGCTGGCTGCACCGTAGTCGACATCTCCAATAGACTTCTCTGG	474
E. A. gnu	661:	TGGATGTCCTTAGTTTGCTGGCTGCACCGTGGTCAACATCTCCAACAGACTTCTCTGG	720
E. C. gnu	661:	TGGATGTCCTCAGTTTGTGGCTGCACCGTGGTCAACATCTCCAACAGACTTCTCTGG	720
O. C. gnu	617:	TTGATGTCCTCAATTTGCTGGCTGCACCGTGGTCAACATCTCCAACAGACTTCTCTGG	676
O. M. gnu	616:	TTGATGTCCTCAATTTGCTGGCTGCACCGTGGTCAACATCTCCAACAGACTTCTCTGG	675
S. A. gnu	647:	TGGATGTCCTCAGTTTGTGGCTGCACCGTGGTGAACATCTCCAACAGACTTCTCTGG	706
S. S. gnu	475:	GGTACCTGTCAATGAAAAAGAGCTGCTGCTGAAGATTGACAGATATTTTGCACGCTGGC	534
E. A. gnu	721:	ATGTACCTGTCAATGAAAAAGAGCTGCTGCTGAAGATTGACAGATATTTTGCACAGCTGG	780
E. C. gnu	721:	ATGTACCTGTCAATGAAAAAGAGCTGCTGCTGAAGATTGACAGATATTTTGCACAGCTGG	780
O. C. gnu	677:	ACGTACCTTCAATGAGAAGAGCTGCTGCTGAAGATTGACAGATATTTTGCACAGCTGG	736
O. M. gnu	676:	ACGTACCTTCAATGAGAAGAGCTGCTGCTGAAGATTGACAGATATTTTGCACAGCTGG	735
S. A. gnu	707:	ATACACTGTGGATGAGAAGAGCTGCTGCTGAAGATTGACAGATATTTTGCACACTGGC	766
S. S. gnu	535:	AGACTGTGCTGATCAAAACAGAGCTTTACTCAAGTTTAACTGGATTACCCAGAGGCACA	594
E. A. gnu	781:	AGACTGTGTTGATCAAACTGACGTCTACTCAAGTTTAACTGGATTACCCAGAGGCACA	840
E. C. gnu	781:	AGACTGTGTTGATCAAACTGACGTCTACTCAAGTTTAACTGGATTACCCAGAGGCACA	840
O. C. gnu	737:	AGGATGTGTTATCAAACTGACATCTACTCAAGTTTAACTGGATTACCCAGAGGCACA	796
O. M. gnu	736:	AGGATGTGTTATCAAACTGACATCTACTCAAGTTTAACTGGATTACCCAGAGGCACA	795
S. A. gnu	767:	AGACTGTGCTGATCAAAACAGACATTTACTCAAGTTTAACTGGATTACCCAGAGGCACA	826
S. S. gnu	595:	AGACAGCAGCCAGGAGCTTCAAGAGCCCATAGAGAGTCTTGTGAGCAGAAAGAGAGAG	654
E. A. gnu	841:	AGACAGCAGCCAGGAGCTGCAAGAGCCCATAGAAAGTCTTGTGAGCAGAAAGAGAGAG	900
E. C. gnu	841:	AGACAGCAGCCAGGAGCTGCAAGAGCCCATAGAAAGTCTTGTGAGCAGAAAGAGAGAG	900
O. C. gnu	797:	AGACAGCAACCCAGGAGTTACAGAGATGCCATTAAACGCTTGTGAGTCAAAAAGAGGAAA	856
O. M. gnu	796:	AGACAGCAACCCAGGAGTTACAGAGATGCCATTAAACGCTTGTGAGTCAAAAAGAGGAAA	855
S. A. gnu	827:	AGGCTGACAGCCAGGAGCTGCAAGATGCCATTAGAAAGCTTGTGAGCAGAAAGAGAGAG	886
S. S. gnu	655:	ATATTGAGCAGGCAGATAAATGGATAACATCAACTTCCACCGCCAGCTCATATTTGCAC	714
E. A. gnu	901:	ACATGGAGCAGGCAGATAAGCTCGATAACATCAACTTCACTGCAGAGCTCATATTTGCAC	960
E. C. gnu	901:	ACATGGAGCAGGCAGATAAGCTCGATAACATCAACTTCACTGCAGAGCTCATATTTGCAC	960
O. C. gnu	857:	ATATTGAGCAGGCAGATAAGCTGGACAACATCAACTTCACTGCAGAGCTCATATTTGCAC	916
O. M. gnu	856:	ATATTGAGCAGGCAGATAAGCTGGACAACATCAACTTCACTGCAGAGCTCATATTTGCAC	915
S. A. gnu	887:	ATATTGAGCAGGCAGTATAAATGGACAACATCAACTTCACTGCAGAGCTCATATTTGCAC	946

**Fig. 2.** Alignment of Korean rockfish *S. schlegeli* P450aromA partial sequence with sequences of P450aromAs from other fish species. S. S: rockfish (*S. schlegeli*), E. A: red-spotted grouper (*E. akaara*), E. C: orange-spotted grouper (*E. coioides*), O. C: Nile tilapia (*O. niloticus*), O. M: Mozambique tilapia (*O. mossambicus*), S. A: seabream (*S. aurata*).

S. S.gnu 715: AGAACACGCGAGCTGTCTGCGGAGAATGTAGGCGAGTGTGTGGAGATGGTATCG 774  
 E. A.gnu 961: AGAACCATGGTGAACCTGTCTGCAGAGAAGCTGAGGCGAGTGCCTGGAGATGGTATAG 1020  
 E. C.gnu 961: AGAACCATGGTGAACCTGTCTGCAGAGAAGCTGAGGCGAGTGCCTGGAGATGGTATAG 1020  
 O. M.gnu 917: AAAACACGCGTGTAGCTGTCTGAGAAATGTAGGCGAGTGCCTGGAGATGGTATAG 976  
 O. N.gnu 916: AAAACACGCGTGTAGCTGTCTGAGAAATGTAGGCGAGTGCCTGGAGATGGTATAG 975  
 S. A.gnu 947: AGAACACGCGGAACTGTGCGGAGAAATGTAGGCGAGTGTGTCTGGAGATGGTATCG 1006

S. S.gnu 775: CAGCACAGACACTGTGCCATCAGCCTCTTTTTCACACTGCTGCTCTCAACAGAATC 834  
 E. A.gnu 1021: CAGCACAGACACTGTGCCATCAGCCTCTTTTTCACACTGCTGCTCTCAACAGAATC 1080  
 E. C.gnu 1021: CAGCACAGACACTGTGCCATCAGCCTCTTTTTCACACTGCTGCTCTCAACAGAATC 1080  
 O. M.gnu 977: CAGCTCGGACACTGTGCCATCAGCTCTCTTTTCACACTGCTGCTCTCAACAGAATC 1036  
 O. N.gnu 976: CAGCTCGGACACTGTGCCATCAGCTCTCTTTTCACACTGCTGCTCTCAACAGAATC 1035  
 S. A.gnu 1007: CAGCACAGACACTGTGCCATCAGCCTCTTTTTCACACTGCTGCTCTCAACAGAATC 1066

S. S.gnu 835: CAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTTCAGGAGATAGACACTGCTGTAGGTGAGAGACCGCTCC 894  
 E. A.gnu 1081: CAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTTCAGGAGATAGACACTGCTGTAGGTGAGAGACCGCTCC 1140  
 E. C.gnu 1081: CAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTTCAGGAGATAGACACTGCTGTAGGTGAGAGACCGCTCC 1140  
 O. M.gnu 1037: CAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTTCAGGAGATAGACACTGCTGTAGGTGAGAGACCGCTCC 1096  
 O. N.gnu 1036: CAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTTCAGGAGATAGACACTGCTGTAGGTGAGAGACCGCTCC 1095  
 S. A.gnu 1067: CAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTTCAGGAGATAGACACTGCTGTAGGTGAGAGACCGCTCC 1126

S. S.gnu 895: AGAACGCGGACCTTCAGAACTCGAGTGTGGAGAGCTTCATCAAGAAATGCTTGGCGT 954  
 E. A.gnu 1141: AGAACGCGTGAACCTTCAGAAAGCTGCAGGTGCTGGAGAGCTTCATCAAGAAATGCTTGGCGT 1200  
 E. C.gnu 1141: AGAAATGGTGAACCTTCAGAAAGCTGCAGGTGCTGGAGAGCTTCATCAAGAAATGCTTGGCGT 1200  
 O. M.gnu 1097: AGAACGAGGATCTTCAGAAAGCTGCAGGTGCTGGAGAGCTTCATCAAGAAATGCTTGGCGT 1156  
 O. N.gnu 1096: AGAACGAGGATCTTCAGAAAGCTGCAGGTGCTGGAGAGCTTCATCAAGAAATGCTTGGCGT 1155  
 S. A.gnu 1127: AGAACGCGGACCTTCAGAAAGCTGCAGTGTGCTGGAGAGCTTCATCAAGAGTGCCTGGCGT 1186

S. S.gnu 955: TCCCCCTGTGGTGAACCTCACCATGCGGACA----- 985  
 E. A.gnu 1201: TCCACCCCGTGGTGAACCTCACCATGCGTGGAGCCCTGTCTGATGACATCATAGTGGCT 1260  
 E. C.gnu 1201: TCCACCCCGTGGTGAACCTCACCATGCGTGGAGCCCTGTCTGATGACATCATAGTGGCT 1260  
 O. M.gnu 1157: TCCACCCCGTGGTGAACCTCACCATGCGTGGAGCCCTGTCTGATGACATCATAGAGGCT 1216  
 O. N.gnu 1156: TCCACCCCGTGGTGAACCTCACCATGCGTGGAGCCCTGTCTGATGACATCATAGAGGCT 1215  
 S. A.gnu 1187: TCCACCCCTGTGGTGAACCTCACCATGCGGCGAGCTTGTCTGATGACATCATAGAGGCT 1246

S. S.gnu 1:-----GCCCCGGGAAATCGA 16  
 E. A.gnu 1021: GCTTATCTTTGCTCAGAACGTCGGAGACTTTCGGCAGATAAGCTCAGGCAAGTGGTACT 1080  
 E. C.gnu 1012: GCTTATCTTTGCTCAGAACGTCGGAGACTTTCGGCAGATAAGCTCAGGCAAGTGGTACT 1071  
 O. M.gnu 833: GCTCATCTTCGCCAGAACCCGAGAGCTATCAGCAGATAAGCTCAGGCAAGTGGTACT 892  
 O. N.gnu 793: GCTCATCTTCGCCAGAACCCGAGAGCTATCAGCAGATAAGCTCAGGCAAGTGGTACT 852

S. S.gnu 17: TTAGATGGTATTGCAGCAAGACACACTTCCATCAGCCTCTTCTTCAAGCTGCTGCT 76  
 E. A.gnu 1081: GGAGATGGTATTGCAGGACCTGATACTTTCATCAGCCTCTTCTTCAAGCTGCTGCT 1140  
 E. C.gnu 1072: GGAGATGGTATTGCAGGACCTGATACTTTCATCAGCCTCTTCTTCAAGCTGCTGCT 1131  
 O. M.gnu 893: AGAGATGGTATTGCAGGACCTGATACTTTCATCAGCCTCTTCTTCAAGCTGCTGCT 952  
 O. N.gnu 853: AGAGATGGTATTGCAGGACCTGATACTTTCATCAGCCTCTTCTTCAAGCTGCTGCT 912

S. S.gnu 77: GCTGAAAGAAAACCCAGACGATGAGATGAGGATAGTGGAGGAGATGAACACTGCTTGG 136  
 E. A.gnu 1141: GCTGAAACAAAACCCAGATGTGAGCTGAGGATAGTGGAGGAGATGAACACTGCTTGG 1200  
 E. C.gnu 1132: GCTGAAACAAAACCCAGATGTGAGCTGAGGATAGTGGAGGAGATGAACACTGCTTGG 1191  
 O. M.gnu 893: GCTGAAACAAAACCCAGATGTGAGCTGAGGATAGTGGAGGAGATGAACACTGCTTGG 1012  
 O. N.gnu 913: GCTGAAACAAAACCCAGATGTGAGCTGAGGATAGTGGAGGAGATGAACACTGCTTGG 972

S. S.gnu 137: TGACAAAGGTGAAGAGCTGATTATCAAGGCTTGAAGTGTGGAGAGTTTCATCAACA 196  
 E. A.gnu 1261: TGATGACAGTGAAGAACTTGTATTCAAGGTTGAAAGTGTGGAGAGTTTCATCAACA 1260  
 E. C.gnu 1192: TGATGACAGTGAAGAACTTGTATTCAAGGTTGAAAGTGTGGAGAGTTTCATCAACA 1251  
 O. M.gnu 1013: TGAAAGAGAGTGAAGAAATATGATATCAAGGTTGAAAGTGTGGAGAGTTTCATCA 1072  
 O. N.gnu 973: TGAAAGAGAGTGAAGAAATATGATATCAAGGTTGAAAGTGTGGAGAGTTTCATCA 1032

S. S.gnu 197: GCTGTTAAGGTTTTCATCGGTGTTGATTTCACAGTGCAGAAAGCTCGGAAGAGCAG 256  
 E. A.gnu 1261: GCTGTTAAGGTTTTCATCGGTGTTGATTTCACAGTGCAGAAAGCTCGGAAGAGCAG 1320  
 E. C.gnu 1252: GCTGTTAAGGTTTTCATCGGTGTTGATTTCACAGTGCAGAAAGCTCGGAAGAGCAG 1311  
 O. M.gnu 1013: GCTGTTAAGGTTTTCATCGGTGTTGATTTCACAGTGCAGAAAGCTCGGAAGAGCAG 1132  
 O. N.gnu 1033: GCTGTTAAGGTTTTCATCGGTGTTGATTTCACAGTGCAGAAAGCTCGGAAGAGCAG 1092

S. S.gnu 257: CATCGAAGGCACTAAAATCAAAAAGAACCAACATCATTCTCAACATGGTCTCATGCA 316  
 E. A.gnu 1321: CATCGAAGGCACTAAAATCAAAAAGAACCAACATCATTCTCAACATGGTCTCATGCA 1380  
 E. C.gnu 1312: CATCGAAGGCACTAAAATCAAAAAGAACCAACATCATTCTCAACATGGTCTCATGCA 1371  
 O. M.gnu 1133: TGACATCGAGGCACTAAAATCAAAAAGAACCAACATCATTCTCAACATGGTCTCATG 1192  
 O. N.gnu 1093: TGACATCGAGGCACTAAAATCAAAAAGAACCAACATCATTCTCAACATGGTCTCAT 1152

S. S.gnu 317: TAAACTGAATTTTCCAAAACCCAAAGGTTCAACCTGATGAACCTTGACAAAACAGT 376  
 E. A.gnu 1381: CAAGACTGAATTTTCCAAAACCCAAAGGTTCAAGCTGATGAACCTTGACAAAACAGT 1440  
 E. C.gnu 1372: CAAGACTGAATTTTCCAAAACCCAAAGGTTCAAGCTGATGAACCTTGACAAAACAGT 1431  
 O. M.gnu 1193: GCACAAAACCGAATTTTCCAAAACCCAAAGGTTCAACCTGATGAACCTTGAAAAAC 1252  
 O. N.gnu 1153: GCACAAAACCGAATTTTCCAAAACCCAAAGGTTCAACCTGATGAACCTTGAAAAAC 1212

S. S.gnu 377: GCCCAATCGTTTCTCCAGCCCTTCGCGTGCAGGACTGCTGCTGCGTGGGCAACACAT 436  
 E. A.gnu 1441: GCCCAATCGTTTCTCCAGCCCTTCGCGTGCAGGACTGCTGCTGCGTGGGCAACACAT 1500  
 E. C.gnu 1432: GCCCAATCGTTTCTCCAGCCCTTCGCGTGCAGGACTGCTGCTGCGTGGGCAACACAT 1491  
 O. M.gnu 1253: GGTACCCAGTGGTACTTCCAGCCCTTCGCGTGCAGGACTGCTGCTGCGTGGGCAAC 1312  
 O. N.gnu 1213: GGTACCCAGTGGTACTTCCAGCCCTTCGCGTGCAGGACTGCTGCTGCGTGGGCAAC 1272

S. S.gnu 437: CGCCATGGTGTGATGATGAATCACTAGTGAATC----- 468  
 E. A.gnu 1501: CGCCATGGTGTGATGATGAAGGCCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1560  
 E. C.gnu 1492: CGCCTTAGTGTGATGATGAAGGCCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1551  
 O. M.gnu 1313: CATCGCCATGGTGTGATGATGAAGGCCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1372  
 O. N.gnu 1273: CATCGCCATGGTGTGATGATGAAGGCCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1332

Fig. 2. Continued

염기서열과 타 어종의 P450aromB 염기서열의 일치도는 red-spotted grouper에서 89% (AY510712), orange-spotted grouper에서 89% (AY547353), Nile tilapia에서 84% (AF306786), Mozambique tilapia에서 85% (AF135850)였다. 따라서 조피볼락 난소 cDNA에서 얻어낸 468 bp의 염기서열은 P450aromB로 판단되었다.

2. 조피볼락 성분화 기간 중 P450aromA 및 P450aromB 발현

조피볼락의 성분화 기간 중 각 개체별로 P450aromA과 P450aromB의 발현 유무를 조사하기 위하여, 각각의 sample들을 3회에 걸쳐 반복 분석하였다. 본 연구에서 밝혀낸 부분적인 염기서열을 이용하여 제작한 조피볼락 P450aromA primer로 각 개체의 머리부분(뇌 포함 부위)으로부터 얻은 cDNA와 몸통부분(생식소 영역 포함)으로부터 얻은 cDNA를 PCR 분석한 결과는 Table 2(유전자 발현이 관찰된 개체는 +로, 관찰되지 않은 개체는 -로 표시)와 같다. 머리부분에서 P450aromA은 35 dab와 45 dab에 각각 5마리와 6마리로부터 관찰되었으며, 52 dab에는 1마리에서만 관찰되었다가 59 dab에는 10마리 전체로부터 관찰되었다. 이 결과는 52 dab에 P450aromA의 발현이 머리부분에서 down-regulation된다는 사실을 의미한다. 몸통부분에서 P450aromA 발현은 35 dab (4마리에서 발현), 45 dab (3마리에서 발현), 52 dab (4마리에서

Fig. 3. Alignment of Korean rockfish *S. schlegeli* P450aromB partial sequence with sequences of P450aromBs from other fish species. S. S: rockfish (*S. schlegeli*), E. A: red-spotted grouper (*E. akaara*), E. C: orange-spotted grouper (*E. coioides*), O. M: Mozambique tilapia (*O. mossambicus*), O. N: Nile tilapia (*O. niloticus*).

발현) 사이에는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 59 dab에만 조사한 거의 모든 개체(9/10)에서 관찰되었다. 한편, 조사한 모든 sample에서 actin유전자는 고르게 발현되어졌다.

동일한 cDNA sample들을 primer만 바꾸어 조피볼락 P450aromB primer로 다시 PCR 분석한 결과는 Table 3과 같다. 머리부분에서 P450aromB는 35 dab와 45 dab에 각각 7마리와 10마리로부터 관찰되어져 같은 시기 P450aromA 보다 많은 수의 개체로부터 관찰되었으며, 52 dab에는 5마리에서만 관찰되었다가 59 dab에는 8마리로부터 관찰되었다. 이 결과는 P450aromB의 발현이 P450aromA의 경우와 마찬가지로 52 dab에 머리부분에서 down-regulation되는 경향이 있음을 의미한다. 몸통부분에서도 P450aromB 발현은 머리부분에

**Table 2. Expression of ovarian aromatase gene (P450aromA) in the head and body part of Korean rockfish *S. schlegeli* during sex differentiation**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	No of fish expressed P450aromA
35 dab in head	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	5/10
45 dab in head	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	6/10
52 dab in head	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10
59 dab in head	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	No of fish expressed P450aromA
35 dab in head	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	4/10
45 dab in head	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	3/10
52 dab in head	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	4/10
59 dab in head	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	9/10

**Table 3. Expression of brain aromatase gene (P450aromB) in the head and body part of Korean rockfish *S. schlegeli* during sex differentiation**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	No of fish expressed P450aromA
35 dab in head	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	7/10
45 dab in head	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
52 dab in head	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	4/10
59 dab in head	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8/10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	No of fish expressed P450aromA
35 dab in head	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	5/10
45 dab in head	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
52 dab in head	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2/10
59 dab in head	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	9/10

서의 발현 경향과 유사하여 35 dab와 45 dab에 각각 5마리와 10마리로부터 관찰되어졌으며, 52 dab에는 2마리에서만 관찰되었다가 59 dab에는 9마리로부터 관찰되었다. 이는 머리와 마찬가지로 몸통에서도 P450aromB가 52 dab에 down-regulation되었음을 의미한다.

#### 고 찰

본 연구에서는 조피볼락 난소 조직으로부터 두 종류의 서로 다른 aromatase gene fragments를 얻었으며, 염기서열 분석결과 이들은 각각 P450aromA와 P450aromB로 밝혀졌다. 얻어진 P450aromA fragment의 크기는 985 bp였으며, P450aromB fragment의 크기는 468 bp였다. 이 조피볼락 P450aromA와 P450aromB의 염기서열을 서로 비교한 결과, 이 두 유전자 사이의 유사성은 타 어종의 동일 aromatase 유전

자와의 유사도보다 더 낮은 것으로 나타났다.

지금까지 연구된 대다수의 어류는 조피볼락의 경우와 마찬가지로 두 종류의 aromatase gene을 갖는 것으로 확인되어졌다(goldfish: Tchoudakova & Callard, 1998; orange-spotted grouper: Zhang et al., 2004; seabass: Blazquez & Piferrer, 2004; tilapia: Kwon et al., 2001; Chang et al., 2005; zebrafish: Kishida & Callard, 2001; Rie et al., 2004). 이러한 사실이 가장 먼저 알려진 어종은 goldfish로서, 이 종의 P450aromA는 생식소에서만, P450aromB는 생식소와 뇌 모두에서 발현되었다(Tchoudakova & Callard, 1998). Zebrafish에서도 goldfish에서와 유사하게 조직 특이적으로 발현량이 다른 두 종류의 aromatase gene이 밝혀져 있다(Gelinas et al., 1998). Tilapia에서도 역시 aromatase gene이 생식소와 뇌에서 모두 발현되지만, 그 발현량은 조직 특이적이라고 하는 사실(Kwon et al., 2000; Chang et al., 2005)이 밝혀진 바 있다. 이상에서 설명한 어류는 모두 두 종류의 aromatase gene을 가지는데, 이들의 공통된 특징은 번식방법이 알을 낳는 난생이라는 점이다. 조피볼락은 어류이지만 전술한 바와 같이 알이 아닌 새끼를 낳는 태생이다. 태생에 속하는 대표적 동물인 포유류는 난생어류와 달리 하나의 aromatase gene을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 태생어류의 aromatase 유전자에 대한 연구는 보고된 바 없었다. 따라서 두 종류의 aromatase gene을 가지는 것이 어류의 특징인지, 난생동물의 공통된 특징인지도 명확하게 밝혀지지 못했다. 그러나 본 연구의 결과, 어류이지만, 포유류와 유사하게 새끼를 낳아 번식하는 태생어류인 조피볼락에서도 두 종류의 aromatase gene이 존재한다는 사실이 밝혀졌기 때문에, 두 종류의 aromatase gene을 갖는 것이 난생동물의 특징이라기보다는 어류의 일반적인 특징이라는 사실을 확인할 수 있었다. 왜 어류가 포유동물과 달리 두 종류의 aromatase 유전자를 갖는지에 대한 생물학적 의미는 앞으로 보다 심화된 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

최근 10여 년의 연구들은 aromatase가 어류의 성분화에 결정적 역할을 한다는 사실을 반복적으로 증명해왔다(Kwon et al., 2001; Blazquez & Piferrer 2004; Chang et al., 2005). 정상적인 환경에서는 일반적으로 각 개체의 유전형을 따라 성분화 시기에 aromatase gene의 발현이 조절된다(Kwon et al., 2001). 성분화 시기 중 aromatase gene의 상승 발현(up-regulation)은 체내 estrogen량의 증가를 유발하여 그 개체를

암컷으로 분화시키고, 반대로 aromatase gene 발현의 감소(down-regulation)는 estrogen량의 상대적 감소를 유발해 수컷으로 분화시킨다. 위의 내용은 tilapia 성분화 시기 자어를 대상으로한 성전환 유도 실험을 통하여 사실로 입증되어진 바 있다(Kwon et al., 2000).

조피볼락의 성분화 시기는 출생 후 50~65일 전후(Lee et al., 1996; Kwon et al., 2006)인 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 이보다 20~30일 빠른 생후 35 dab부터 머리 부분과 몸통부분에서 두 aromatase gene 발현을 각각 조사하였다. 두 aromatase gene은 35 dab에 이미 머리부분과 몸통부분 모두에서 관찰되었다. 이후 45, 52, 그리고 59 dab에 두 aromatase gene이 머리부분과 몸통부분에서 모두 발현되기는 하였으나, 발현 개체의 수는 조사 시기에 따라 차이를 보였다. 가장 뚜렷한 차이가 관찰된 시기는 52 dab와 59 dab로, 52 dab에서는 두 aromatase gene 발현 개체수가 감소하였고, 59 dab에는 거의 모든 개체에서 이들 유전자가 발현되었다. 이러한 사실은 두 aromatase gene 발현이 up or down regulation 되는 것으로 판단할 수 있으며, 이를 바탕으로 이 종의 실질적 성분화 시기가 52 dab 전후임을 추정할 수 있다. 59 dab에 P450aromA와 P450aromB가 전 개체에서 거의 대부분 발현되었다는 사실은 이 시기에 이 종의 성분화가 이미 많이 진행되었거나 또는 완료되었음을 시사한다. Seabass에서도 성분화 후 수컷의 뇌에서 P450aromB 발현이 증가되어지는 현상이 관찰된 바(Blazquez & Piferrer, 2004) 있으며, tilapia에서 성분화 시기 중 암수간에 P450aromA의 발현이 차별화 된다는 사실이(Kwon et al., 2000, Chang et al., 2005) 밝혀져 있다.

그런데, 척추동물에서 aromatase gene의 발현은 난소와 정소(Silberzahn et al., 1988), 태반(Kellis & Vickery, 1987), 뇌와 뇌하수체(Pasmanik and Callard, 1985), 중추신경계(Gelinas & Callard, 1993) 등을 포함한 다양한 세포나 조직에서 관찰되고 있다. 본 연구에서 사용한 조피볼락 치어는 그 크기가 작아 뇌와 생식소의 조직만을 각각 따로 분리하기가 쉽지 않았다. 따라서 뇌를 포함하고 있는 머리 부분과 생식소를 포함하고 있는 몸통부분으로 어체를 분리하여 분석을 진행하였다. 연구 결과, 조피볼락은 머리 부분과 몸통부분에서 발현되었지만, 위에서 제시한 것처럼 다양한 조직에서 발현되어지므로 본 연구에서 얻어진 결과가 조직 특이적 발현이라고 단정 짓기는 어렵다. 그리고 1차적인 성분화가 일

어니는 부위가 머리인지 생식소 부위인지도 본 연구의 결과만으로는 결론을 내릴 수 없다.

이상의 내용들은 태생어류인 조피볼락도 구조적으로 다른 두 가지의 aromatase gene을 가지는 데, 이들이 이 종의 성분화 시기에 차별적으로 발현되어(down-regulation at 52 dab) 초기 성분화 과정에 중요한 기능을 할 가능성이 있음을 제시한다. 앞으로 이 두 유전자의 차별적 기능을 밝히기 위하여 coding sequence 전체에 대한 연구 및 정량적인 유전자 발현 연구가 뒤따라야 할 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(RO1-2002-000-00568-0) 지원으로 수행되었습니다.

### 인용문헌

- Blazquez M, Piferrer F (2004) Cloning sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neutral form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol Cell Endocrinol* 219:83-94.
- Chang X, Kobayashi T, Senthilumaran B, Kobayashi-Kajura H, Sudhakumari C, Nagahama Y (2005) Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 141:101-115.
- Chiang EF, Yan YL, Guiguen Y, Postlethwait J, Chung B (2001) Two Cyp19 (P450aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol Biol Evol* 18:542-550.
- Choi I, Troyer DL, Cornwell DL, Kirby-Dobbels KR, Collante WR, Simmen FA (1997) Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase. *DNA Cell Biol* 16:769-777.
- Gelinas D, Callard G (1993) Immunocytochemical and biochemical evidence for aromatase in neurons of the retina, optic tectum and retinotectal pathway in goldfish. *J Neuroendocrinol* 5:635-638.
- Gelinas D, Pitoc G, Callard G (1998) Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol Cell Endocrinol* 138:81-93.
- Ijiri S, Kazeto Y, Lokman M, Adachi S, Yamauchi K (2003) Characterization of a cDNA encoding P450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during indeed ovarian development. *Gen Comp Endocrinol* 130:193-203.
- Kellis J, Vickery L (1987) Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P450. *J Biol Chem* 262:4413-4420.
- Kishida M, Callard G (2001) Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 142:740-750.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI (2000) Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*). *Mol Reprod Dev* 56:1-5.
- Kwon JY, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, McAndrew BJ, Penman DJ (2000) Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J Exp Zool* 287:46-53.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ (2001) Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59:359-370.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ (2002). Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. *J Fish Biol* 60:625-636.
- Kwon JY, Lee CH, Kim J, Kim SH, Kim DJ, Han HK,



- Lim HK, Byun SG (2006) Disruption of sex differentiation by exogenous sex steroid hormones in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. Dev Reprod 10:247-254.
- Lee CH, Na OS, Yeo IK, Baek HJ, Lee YD (2000) Effect of sex steroid hormones and high temperature on sex differentiation in black rockfish, *Sebastes schlegeli*. J Korean Fish Soc 33:373-377.
- Lee YD, Rho S, Chang YJ, Baek HJ, An CH (1996) Sex differentiation of the rockfish, *Sebastes schlegeli*. J Korean Fish Soc 29:44-50.
- Pasmanik M, Callard G (1985) Aromatase and 5 $\alpha$ -reductase in the teleost brain, spinal cord and pituitary gland. Gen Com Endocrinol 60:244-251.
- Rie G, Katherine E, Yonathan Z, Allen R, John M (2004) Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. Gen Comp Endocrinol 139:72-84.
- Silberzahn P, Gaillard JL, Quincey D, Dintinger T, Al-Timmi I (1988) Aromatization of testosterone and 19-nortestosterone by a single enzyme from equine testicular microsomes. Differences from human placental aromatase. J Steroid Biochem 29:119-125.
- Tchoudakova A, Callard G (1998) Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. Endocrinology 139:2179-2189.
- Yamada J, Kusakari M (1991) Staging and the time course of embryonic development in kurosoi, *Sebastes schlegeli*. Environ Biol Fishes 30:103-110.
- Zhang Y, Zhang W, Zhang L, Zhu T, Tian J, Li X, Lin H (2004) Two distinct cytochrome P450 aromatase in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: cDNA cloning and differential mRNA expression. J Steroid Biochem 92:39-50.