

## 홍바리 *Epinephelus fasciatus*의 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA 발현양상

강형철<sup>1</sup> · 이치훈<sup>1</sup> · 송영보<sup>1</sup> · 백혜자<sup>2</sup> · 김형배<sup>3</sup> · 이영돈<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 해양과환경연구소, <sup>2</sup>부경대학교 자원생물학과, <sup>3</sup>강원도립대학 해양생명과학과

### KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA Expression of the Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus*

Hyeong-Cheol Kang<sup>1</sup>, Chi-Hoon Lee<sup>1</sup>, Young-Bo Song<sup>1</sup>, Hea-Ja Baek<sup>2</sup>, Hyung-Bae Kim<sup>3</sup> and  
Young-Don Lee<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Marine and Environmental Research Institute of Jeju National University, Jeju 695-965, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Marine Bio-resources, Gangwon Provincial University, Gangnung 210-804, Korea

**ABSTRACT** : Kisspeptin has been reported to facilitate sexual maturation and ovulation by directly stimulating GnRH neurons via its receptor, GPR54. The KiSS-GPR54 system is playing an important role in the reproduction of several mammalian species. However, little is known about their function in fish. The aim of this study is to understand the physiological function and evolutionary conservation of KiSS-GPR54 system in teleost fish blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. In the present study, we have partial cloned KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNAs from a brain samples. Tissue distribution analysis using RT-PCR revealed that the KiSS1, KiSS2, GPR54 transcripts were expressed in different tissue. The KiSS-GPR54 system in gonadal of immature and mature stage were analyzed using qRT-PCR. The partial sequence of KiSS1, KiSS2, GPR54 were 232 bp, 304 bp, 613 bp long, respectively. KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNAs are shown common expression in the brain. The amount of KiSS1, KiSS2 mRNAs expression were significantly higher in mature stage than immature stage. However GPR54 mRNA expression was higher in immature stage. These results are in good agreement with the hypothesis that KiSS-GPR54 system plays an important role in the regulation of reproductive function in the blacktip grouper.

**Key words** : Blacktip grouper, KiSS1, KiSS2, GPR54

**요 약** : 최근 여러 포유류 종에서 Kisspeptin이 그 수용체인 GPR54와 함께 GnRH 분비를 자극하여 성 성숙과 최종배란에 영향을 미친다고 보고되고 있다. 이러한 보고들은 KiSS-GPR54 system이 번식과 밀접한 연관이 있음을 제시하고 있지만, 어류에 관한 연구는 미비한 실정이다. 이 연구는 어류에서의 KiSS-GPR54 system의 생리적 기능과 번식내분비적 기능을 탐색하기 위해 홍바리 *Epinephelus fasciatus* 뇌에서 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 부분 염기서열을 클로닝 하였으며, KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 각 조직별 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 성 성숙과 KiSS-GPR54 system과의 연관성을 확인하기 위해 생식소 발달 상태(성숙과 미성숙)에 따른 발현을 qRT-PCR을 이용하여 분석하였다. KiSS1, KiSS2, GPR54의 부분 염기서열은 각각 232 bp, 304 bp, 613 bp 였으며, 조직별 발현을 조사한 결과 공통적으로 뇌에서 발현되었다. 생식소발달에 따른 발현 양상은 KiSS1, KiSS2 mRNA의 경우 성숙 상태에서가 미성숙 상태에 비해 유의적으로 높게 발현되었다. 하지만 GPR54 mRNA의 경우 미성숙 상태에서 더 높게 발현되었다. 이러한 결과들로 미루어 보아, KiSS-GPR54 system은 홍바리에 있어 번식과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

## 서 론

\* 교신저자: 이영돈, 제주특별자치도 제주시 조천읍 함덕리 3288 제주대학교 해양과환경연구소, (우) 695-965, (전) 064-782-8922, (팩) 064-782-8281, E-mail: leemri@jeju.ac.kr

어류의 번식내분비계는 뇌-뇌하수체-생식소의 축(brain-

pituitary-gonad; B-P-G axis)으로 이루어져 있으며, 각각의 기관들은 서로 상보적인 기능에 의하여 조절된다. 어류의 번식내분비계 활동은 빛과 수온 등 외부환경요인에 의하여 개시되며(Goos et al., 1993), 이와 같은 환경요인들은 감각기관을 거쳐 뇌의 시상하부에서 통합되어진 후 Gonadotropin-releasing hormone(GnRH, 생식소자극호르몬방출호르몬)의 방출을 유도한다(Kobayashi et al., 1997). GnRH는 뇌하수체로 전달되어 두 가지 종류의 Gonadotropin(GTH, 생식소자극호르몬), 즉 FSH와 LH의 방출을 자극하게 된다. 생식소에는 FSH와 LH의 특이적 수용체가 존재하며, 각각의 GTH는 정소와 난소로 전달되어 기능을 나타낸다. FSH의 경우, 성숙초기에 암컷의 난황축척과 수컷의 정자형성에 관여하며, LH의 경우 성숙후기에 암컷에서 난의 최종배란을 유도한다. 생식소에서는 이와 같은 자극에 의해 스테로이드 호르몬이 분비되며, 스테로이드 호르몬들은 다시 뇌와 뇌하수체로 전달되어 negative feedback과 positive feedback을 이루어 B-P-G axis를 조절하게 된다(Tena-Sempere & Huhtaniemi, 2003). B-P-G axis에 의한 번식내분비의 조절은 지난 10년간 어류를 포함한 여러 척추동물의 번식생물학연구에 가장 핵심이 되는 내용이었으나, 최근 KiSS1과 그의 수용체인 G protein-coupled receptor 54(GPR54)의 발견으로 새로운 번식내분비계의 축이 구성되어지고 있다. KiSS1은 피부암의 일종인 malignant melanoma(악성 흑색종)의 전이 억제 유전자로 최초 발견된 후 유방암, 갑상샘유두암종 그리고 췌장암과 같은 악성종양의 특이적 전이 억제 유전자로 밝혀졌다(Lee et al., 1996). 현재 포유류에서 KiSS 유전자 산물인 kisspeptin은 cleavage product에 따라 kisspeptin-54, kisspeptin-14, kisspeptin-13, 그리고 kisspeptin-10이 나타나는 것으로 알려져 있다(Othaki et al., 2001). 세포막수용체 계열인 G protein-coupled receptor에 관한 연구는 인간을 중심으로 활발히 이루어졌으며, 현재 약 160여 종류의 G protein-coupled receptor가 밝혀져 있다. GPR54 역시 G protein-coupled receptor의 계열로써 kisspeptin의 수용체로 기능함이 밝혀졌으며, 쥐에서는 GPR54 그리고 사람에서는 AXOR12로 각각 명명되어 보고되었다(Lee et al., 1999; Muir et al., 2001). GPR54의 경우 어류에서 많은 연구가 수행되고 있으며, cichlid fish *Haplo chromisburtoni*, cobia *Rachycentron canadum*, flathead mullet *Mugil cephalus*, zebrafish *Danio rerio*, fathed minnow *Pimephales promelas* 그리고 senegalese

sole *Solea senegalensis* 등에서 분리·동정되어 어류의 성 성숙과 puberty의 관계를 중심으로 다양한 연구가 수행되고 있다(Parhar et al., 2004; Mohamed et al., 2007; Nocillado et al., 2007; Mechaly et al., 2009).

악성종양의 전이억제 유전자로 밝혀진 KiSS-GPR54의 번식내분비 관여 여부는 쥐와 사람에서 GPR54의 변이로 인해 hypogonadotropic hypogonadism(저생식샘자극호르몬 생식샘저하증)이 발생하여 성 성숙의 저해와 puberty 이상발동이 나타남으로서 알려지게 되었다(de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). 이와 같은 발견 이후 KiSS-GPR54와 B-P-G axis와의 번식내분비적 상관관계는 다양한 방면에서 많은 연구가 진행되고 있으며, 현재 KiSS1, KiSS2, GPR54의 기능과 발현기작에 관한 연구는 대부분 포유류를 중심으로 B-P-G axis에서 GnRH와 GTH(FSH $\beta$ , LH $\beta$ ) 발현에 미치는 영향(Gottsch et al., 2004; Irwig et al., 2004; Thompson et al., 2004; Shahab et al., 2005)과 스테로이드 호르몬에 의한 feedback 관계(Smith et al., 2005), 그리고 puberty의 발동(Funes et al., 2003; Plant et al., 2006) 등에 관해 이루어지고 있다.

바리와 어류는 전세계적으로 기호도가 높아 고가에 거래가 이루어지고 있으며, 양식기술개발을 위한 종묘생산과 번식생리특성에 관한 연구들이 이루어지고 있다(Song et al., 2005; Lee et al., 2010). 홍바리 *Epinephelus fasciatus*는 몸길이 40 cm의 소형 바리과로서, 제주도 근해를 포함한 중국, 필리핀, 일본 등지에 서식하지만, 개체수가 매우 적어 자원회복이 시급한 어종이다. 하지만 홍바리에 관한 번식생물학적 연구는 현재 미비한 상태이며, 성 성숙유도를 통한 종묘생산 또한 생존을 저하로 어려운 실정이다(Kawabe & Kimura, 2007).

이 연구는 최근 B-P-G axis에 있어 번식내분비의 gate-keeper 또는 new frontier 라고 불리는 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54의 홍바리 *Epinephelus fasciatus* 각 조직별 발현과 미성숙 단계와 성숙 단계의 발현을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 부분염기서열 확인 및 조직별 발현

홍바리 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 부분 염기서열 확인을 위해 제주대학교 해양과환경연구소에서 사육 중인

홍바리를 저온 마취 후 뇌를 적출하여 재료로 사용하였으며, KiSS1의 경우 European seabass와 medaka, KiSS2의 경우 European seabass와 Orange-spotted grouper, GPR54의 경우 Orange-spotted grouper와 cobia 등의 NCBI 자료를 바탕으로 degenerated primer를 제작하였다. 조직별 발현을 확인하기 위해 뇌, 뇌하수체 그리고 기관별(망막, 아가미, 심장, 신장, 비장, 간, 피부, 장, 생식소) 각 조직을 적출하여 total RNA를 분리한 뒤 RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 확인된 부분 염기서열을 참고로 제작하였으며, housekeeping gene으로는 18s rRNA를 사용하였다(Table 1). RT-PCR 반응은 2.5 µL의 cDNA를 주형으로 Go taq Green Master mix (Promega, USA)와 primer 세트를 혼합하여 95°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 90초 씩 35 cycle을 증폭하였다.

2. 수온과 광주기 조절에 의한 홍바리의 성숙 조절

수온조절이 가능한 순환여과 시스템의 원형수조(ø 450×

90 cm) 2개에 홍바리를 사육하였으며, 각각의 수조는 차광막을 설치하여 외부의 빛을 차단하였고, 삼파장램프(75 W)와 24시간 타이머를 설치하여 광주기를 조절하였다. 대조구의 경우, 12L/12D의 광주기와 16.5°C의 수온조건으로 8주간 사육하였으며, 성숙유도 실험구의 경우 14L/10D의 광주기와 26.5±0.5°C의 수온조건으로 8주간 사육하였다.

3. 조직학적 처리

생식소의 발달을 조사하기 위해 적절한 생식소를 Bouin's solution에 24시간 고정된 후, 파라핀 절편법에 의해 4~6 µm 두께의 조직별편을 제작하여 조직표본을 만들었으며, 제작된 조직표본은 Hansen's haematoxylin과 0.5% eosin으로 비교염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다

4. 성숙단계에 따른 KiSS1, KiSS2, GPR54 그리고 GnRH1 mRNA 발현

각각의 실험구에서 3마리를 무작위로 추출한 뒤, 얼음마취

Table 1. Primersets used for the cloning, RT-PCR and qRT-PCR of KiSS1, KiSS2 and GPR54

Primer	Sequence	Note
KiSS1 F	CTCTGATGATGGCTGCTTTG	Forward and reverse primers set for KiSS1 partial cloning
KiSS1 R	TTSGTCTGAGGGAAGAYCAC	
KiSS2 F	CTCTGCCGGRAYTYGACTCT	Forward and reverse primers set for KiSS2 partial cloning
KiSS2 R	GWAGGCACCTCCAGTTCTCG	
GPR54 F	YCTCCCTGGATGGATCTTYG	Forward and reverse primers set for GPR54 partial cloning
GPR54 R	CAGTTGGCCCAHGTCTTGAT	
RT-KiSS1 F	CTCTGATGATGGCTGCTTTG	Forward and reverse primers set for RT-PCR of KiSS1
RT-KiSS1 R	ATCAGCTGAATGGACCCTGT	
RT-KiSS2 F	GCACTGAGGAGAAGGAGCAC	Forward and reverse primers set for RT-PCR of KiSS2
RT-KiSS2 R	GTAGGCACCTCCAGTTCTCG	
RT-GPR54 F	CGTTCCTACAGCAGGTGACA	Forward and reverse primers set for RT-PCR of GPR54
RT-GPR54 R	CCACAACCATCTTGGAGACTT	
RT-18srRNA F	GATCAATTGGAGGGCAAGTC	Forward and reverse primers set for RT-PCR of 18s rRNA
RT-18srRNA R	CCTCCGACTTTCGTTCTTGA	
qRT-KiSS1 F	CATGCATCAATATCGCCATC	Forward and reverse primers set for qRT-PCR of KiSS1
qRT-KiSS1 R	AGATCCACCATCCTGACCTG	
qRT-KiSS2 F	AACAGGGTCCATCCTGTCTG	Forward and reverse primers set for qRT-PCR of KiSS2
qRT-KiSS2 R	CGCTCGTCTCATTCTCTCT	
qRT-GPR54 F	TTGTTGCGTTCCTACAGCAG	Forward and reverse primers set for qRT-PCR of GPR54
qRT-GPR54 R	GATGGCGGAGAGATTTTCCAGA	
qRT-18s rRNA F	AAACGGCTACCACATCCAAG	Forward and reverse primers set for qRT-PCR of 18s rRNA
qRT-18s rRNA R	GGCTCGAAAGAGTCTCTGTA	

후 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌에서 TRI REAGENT(MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용해 total RNA를 분리하였으며, total RNA 0.5 µg을 주형으로 PrimeScript™ RT reagent Kit(Takara, Japan)를 이용해 cDNA를 합성하였다. Real-time quantitative RT-PCR의 반응은 SYBR Premix Ex Taq II kit(Takara)를 사용하였으며, 각 유전자의 염기서열을 참고로 특이적 primer를 제작하였다. 반응액은 3 µL의 cDNA를 주형으로, 12.5 µL의 SYBR Premix Ex Taq와 1.0 µL의 primer 세트 그리고 8.5 µL의 nuclease free 증류수를 혼합하여 총 25 µL의 volume으로 실시하였다. Real-time quantitative RT-PCR의 수행은 CFX96™ Real-Time System(BIO-RAD, USA)을 이용하여 95°C에서 30초간 initial denaturation하였으며, 95°C에서 5초 denaturation, 60°C에서 30초 annealing과 elongation하여 40 cycle을 반응시켜 주었다. 각 샘플은 2반복 이상 측정하였으며, 18s rRNA를 이용하여 상대정량을 하였다.

5. 통계처리

측정 값의 통계처리는 SPSS version 12.0을 이용하였으며, ANOVA-test를 실시하여 Duncans's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 홍바리 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 부분염기서열 확인 및 조직별 발현

홍바리의 뇌 조직을 이용해 제작한 cDNA를 주형으로, KiSS1, KiSS2, GPR54의 부분 염기서열을 조사한 결과, 각각 232 bp, 304 bp, 613 bp를 확인하였다(Fig. 1). 홍바리의 뇌, 뇌하수체, 망막, 심장, 신장, 비장, 간, 피부, 장 그리고 생식소에서 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, KiSS1과 KiSS2는 뇌에서만 발현이 나타났고, GPR54의 경우 뇌와 뇌하수체에서 발현이 나타났다(Fig. 2).

2. 성숙단계별 생식소 발달 비교

성숙단계에 따른 생식소의 발달 단계를 조직학적 방법을 이용해 확인하였다. 대조구의 경우, 핵 주변에 인이 존재하는 주변인기 난모세포(난경 200 µm 미만)가 대부분을 차지한

```
(A) KiSS1 mRNA partial sequence 232 bp
CTCTGATGATGGCTGCTTTGTCAACAGAGTCTGCACCCTGGCAGTTTGAATCGACCT 60
ACCACAGTGAAGATCAAAGAGTACTCAAAGCTCTCAGAGATTTAAGCCATGCATCAATAT 120
CGCCATCAGGAAAGAGTTTGGTGAATTTACCTGCTGCACAGGGTCCATTCAGTGTGGAA 180
AGTTTCCCAGGTCAGGATGGTGGATCTTAAAGTGATCTTCCCTCAGACCAA 232

(B) KiSS2 mRNA partial sequence 304 bp
CTCTGCCGGAACCTGACTCTGCACAGAGGACACGTGCAACAGGGTCCATCCTGTCTGCAC 60
TGAGGAGAAGGAGCAGCAGGAGAGTTTGTGGCGGAGGATACAGCCCGTGTTCCTCCCTGA 120
GAGAGAATGAGGAGCAGCGGAGTGTGTGTATGACCCGAGGAGTAAATTCACCTCA 180
ACCCATTTGGCCTCCGCTTGGCAAAGATACAACGGCTACATTTACAGGAGAGCCGTGA 240
AAACAGCCAGGACAATAAGTTTTACCCCTTTTCTCTTCTCGCGAGAAGTGGAGTGC 300
CTAC 304

(C) GPR54 mRNA partial sequence 613 bp
TCCCTGGATGGATCTTTGGCAACTTCATGTGCAAAATTTGTTGCGTTCCTACAGCAGTGA 60
CAGTCCAAGCCACCTGTATCACTCTGACAGCTATGAGTGGGGACCGCTGTTACGTCACTG 120
TCTACCTCTGAATCTCTCCGCCATCGCACCCCGAGAGTAGCCATGATGTGTCAGCATCT 180
GCATTTGGATTGGCTCCTTCATCCTGTCCAGCCGATTTAATGTACCAGCGTATAGAGG 240
AGGGTTATTGGTACGGCCCGAGGAGTACTGCATGGAGAGATTTCCCTCAAAGACACATG 300
AGAGGGCTTTTACCTCTACCAGTTCATTGCTGCTACCTGCTGCTGCTCCTCACTATCT 360
CATCTCTGTACACGCTGATGGTGAAGAGGGTGGGCCAGCCACTGTGGAACTGTTGACA 420
ACAACTATCAGGTCACCTGTCTGTGAGAGAACTATCAGTATCAGGAGCAAAGTCTCCA 480
AGATGGTTGGTAAATCGTCTCCTCTTCGCCATCTGCTGGGTCCCATTCAGATCTTCG 540
TCTCTTCCAGTCTTTCTATCCAACTACCAGCCCACTACGCCACATACAAGATCAAGA 600
CGTGGCCCAACTG 613
```

Fig. 1. The partial nucleotide sequence of blacktip grouper KiSS1, KiSS2 and GPR54.

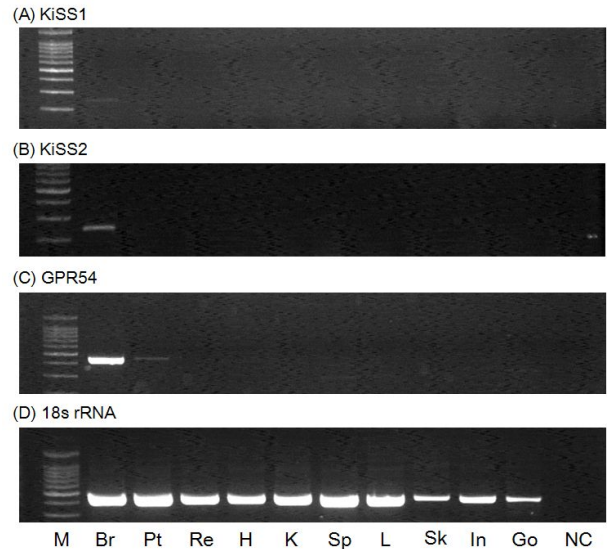
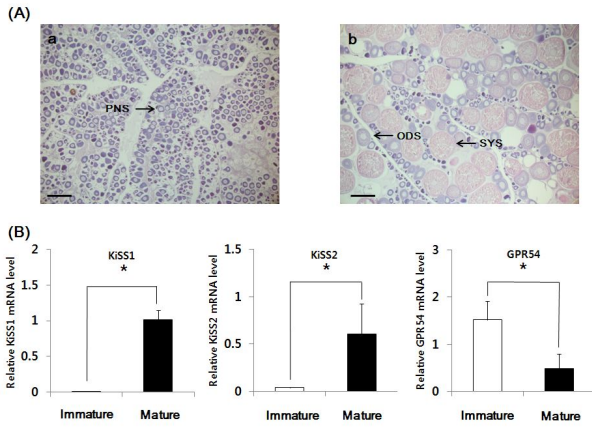


Fig. 2. The tissue-specific expression of blacktip grouper (A) KiSS1, (B) KiSS2, (C) GPR54, (D) 18s rRNA mRNA assessed by RT-PCR. M; marker. Br; brain, Pt; pituitary, Re; retina, H; heart, K; kidney, Sp; spleen, L; liver, Sk; skin, In; intestine, Go; gonad, NC; negative control. Negative control for PCR which were performed with sterile water as template. 18s rRNA transcripts was used as a control to verify the quality of the RT products.



**Fig. 3.** The representative (A) micrographs of ovarian stages and the (B) relative expression level of KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA in brain between the immature and mature blacktip groupers. (a) Immature stage; (b) mature stage. PNS, peri-nucleolus stage; ODS, oil-droplet stage; SYS, secondary yolk stage. Scale bars correspond to 400  $\mu$ m. Data are expressed as mean $\pm$ sem. Asterisks indicated significant differences at  $P < 0.05$ .

반면, 성숙유도 실험구의 경우 공포상의 유구가 핵 주변에 존재하는 유구기 난모세포(난경 200~300  $\mu$ m)와 세포질의 가장 자리에 난황구가 출현하기 시작하는 난황형성기 난모세포(난경 400~500  $\mu$ m)가 대부분을 차지하고 있었다(Fig. 3A).

### 3. 성숙단계에 따른 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA 발현

성숙단계에 따른 KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 발현을 real time quantitative RT-PCR을 이용하여 확인하였다. KiSS1 mRNA의 발현은, 성숙 상태에서가 미성숙 상태에 비해 유의적 차이를 보이며 높았으며, KiSS2 mRNA 역시 성숙 상태에서가 미성숙 상태에 비해 유의적 차이를 보이며 높았다( $P < 0.05$ ). GPR54 mRNA의 경우, KiSS1, KiSS2 mRNA와 반대로 미성숙 상태에서가 성숙 상태에 비해 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ , Fig. 3B).

## 고 찰

최근 어류를 포함한 척추동물의 번식내분비에 있어 KiSS1과 KiSS1 수용체인 GPR54의 기능에 관한 연구가 수행되고 있으며, 포유류에서는 존재하지 않는 KiSS1-like gene인

KiSS2의 존재가 medaka, zebrafish 그리고 seabass와 같은 경골어류를 중심으로 밝혀지고 있다(Kanda et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009). Kisspeptin에 의한 번식생리조절 연구는 대부분 포유류를 중심으로 이루어졌으며, 그에 관한 기초 연구로써 각 기관별 발현 유무에 관한 연구가 이루어졌다. 포유류의 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54는 태반과 뇌, 뇌하수체와 같은 번식과 직접적으로 연관이 있는 조직에서 주로 발현이 되며(Muir et al., 2001; Colledge, 2004), 특히 KiSS1과 GPR54는 조직학적 관찰에 의해 뇌의 시상하부에 존재하는 GnRH neuron과 동일한 위치에서 분포가 확인되어 GnRH와 상호적 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005). 홍바리에서 KiSS1, KiSS2 그리고 GPR54 mRNA의 조직별 발현 결과, KiSS1과 KiSS2는 뇌에서만 발현이 되었으며, GPR54는 뇌와 뇌하수체에서 발현이 되었다. 홍바리의 KiSS1 조직별 발현은 medaka, seabass, zebrafish 그리고 goldfish와 유사하였다. Medaka, seabass, zebrafish의 경우 뇌와 생식소에서만 발현되었으며, goldfish의 경우 뇌와 생식소외에 소화관, 신장, 간에서도 발현되었다(Kanda et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009; Yang et al., 2010). 이와 같은 결과는 Kisspeptin이 뇌의 시상하부에 분포하고 있는 GnRH의 조절자로서 기능과, 생식소에서 분비되는 스테로이드 호르몬들이 뇌로 전달되어 kisspeptin의 positive feedback과 negative feedback 관계에 관여한다는 연구를 뒷받침한다(Colledge, 2009). GPR54 역시 KiSS1과 동일하게 뇌에서 강한 발현이 관찰되어 KiSS1의 수용체로서 KiSS1과 함께 중추신경 내에서 번식관련 기능을 수행할 것으로 생각된다. 어류의 성 성숙 조절은 빛과 수온과 같은 외부 환경 요인에 영향을 받아 번식내분비의 변화에 의해 이루어진다(Goos et al., 1993). 특히 빛의 자극은 멜라토닌 분비에 영향을 주며, 멜라토닌은 스테로이드 호르몬과의 관계를 통해 시상하부의 GnRH 분비에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Karsch et al., 1993). 최근 mouse와 hamster 같은 설치류에서 광주기 조절을 통한 성숙조절에서 GnRH와 KiSS1/GPR54의 발현양상에 관한 연구가 이루어지고 있으나(Greives et al., 2007), 어류에서는 성숙단계에 따른 Kisspeptin과 다른 번식내분비 호르몬들과의 관계 연구가 미흡하다. 이 연구에서 홍바리를 대상으로 성숙 단계에 따른, KiSS1, KiSS2, GPR54 mRNA의 발현을 확인한 결과, KiSS1과 KiSS2 mRNA

는 성숙 상태에서 미성숙 상태에 비해 유의적으로 높았으며, GPR54의 경우 반대의 발현 양상을 나타냈다. 성숙 상태에서 KiSS1 mRNA의 발현증가는 설치류인 Syrian hamster 그리고 Siberian hamster에서도 나타났다. Syrian hamster의 경우, 광주기를 통한 성숙유도 실험구에서 생식소 무게와 testosterone 발현이 높았으며, 성숙억제 실험구에 비해 시상하부의 anteroventral periventricular(AVPV)와 arcuate(ARC) nuclei 부위에서 KiSS1 cell의 수가 많았다(Revel et al., 2006). Siberian hamster의 경우에도 광주기를 통한 성숙유도 실험구에서 성숙억제 실험구에 비해 AVPV 부위에서 KiSS1 cell의 수가 많았고, 생식소의 무게가 증가하여 성 성숙이 이루어졌을 때 KiSS1의 발현 증가를 나타냈다(Greives et al., 2007). KiSS2의 경우, 홍바리와 같은 농어목 어류인 red seabream *Pagrus major*에서 생식소 성숙지수인 GSI가 가장 높은 성숙시기에 암·수 모두에서 KiSS2 발현 세포들이 증가하는 경향을 나타냈으며(Shimizu et al., 2012), grass puffer *Takifugu niphobles*와 chub mackerel *Scomber japonicus*에서도 생식소가 발달하기 시작하는 난황주기 난모세포 단계에서 KiSS2 mRNA의 발현이 증가하였다(Selvaraj et al., 2010; Shahjahan et al., 2010). GPR54의 경우, KiSS1, KiSS2와 반대로 미성숙 상태에서 발현이 높게 나타났다. 일반적으로 포유류에서는 성 성숙 능력을 얻기 전 puberty 단계에서 GPR54의 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있다(Dungan et al., 2006). 하지만 설치류의 경우, puberty 전과 후 모두에서 GPR54가 높게 나타나거나(Han et al., 2005), 성숙단계에 상관없이 일정하게 발현이 나타나(Roa et al., 2006), GPR54의 경우 종특이적 발현양상이 존재하는 것으로 여겨지고 있다. 어류에서 Grey mullet *Mugil cephalus*은 홍바리와 동일하게 미성숙 시기가 성숙시기에 비해 GPR54의 발현이 높게 나타났으며, 이때 번식행동과 관련이 있는 GnRH2, GnRH3가 GTH의 발현을 조절하는 GnRH1에 비해 높은 발현이 나타났다(Nocillado et al., 2007). 하지만 Nile tilapia *Oreochromis niloticus*에서는 성숙상태에서 미성숙 상태에 비해 GPR54와 GnRH1의 발현이 모두 높게 나타났다(Parhar et al., 2004). GPR54가 성 성숙의 개시 여부를 결정하는 Puberty와 연관성이 높다는 연구들은 GnRH 분비조절자로서의 GPR54 기능에 초점을 맞추고 있으며, GTH의 분비를 자극하는 GnRH1과 깊은 관련이 있다고 여겨지나, 번식행동을 조절하는 GnRH2, GnRH3와의 관계도 존재한다고 여겨지고 있다. 이 연구에서

는 성숙상태에 따른 GnRH의 발현을 확인하지 못하여 홍바리에서 GPR54와 GnRH의 상관관계를 탐색하지는 못하였으나, 최근 번식내분비의 gatekeeper로 보고되고 있는 KiSS1, KiSS2, GPR54의 성숙상태에 따른 발현차이를 확인하였으며, 앞으로 GnRH의 발현을 중심으로 번식 조절자로서 기능에 대한 연구가 추가 수행되어야 할 것이다.

## 감사의 글

이 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 109197-3, 홍바리 *Epinephelus fasciatus* 양식산업 최적화 기술개발)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Colledge WH (2004) GPR54 and puberty. Trends Endocrinol Metab 15:448-453.
- Colledge WH (2009) Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. Trends Endocrinol Metab 20:115-121.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function in the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci USA 100:10972-10976.
- Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA (2006) Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of GnRH secretion. Endocrinology 147:1154-1158.
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gomez A (2009) Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. Mol Cell Endocrinol 312:61-71.
- Funes S, Hendrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochem Biophys Res Commun 312:1357-1363.

- Goos HJT, Facchinetti F, Henderson IW, Pierantoni R, Polzonetti-Magni AM (1993) Pubertal development: big questions, small answers. *Cell Comm Repord* 11-20.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA (2004) A role for kisspeptin in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073-4077.
- Greives TJ, Mason AO, Scott, MAL, Levine J, Ketterson ED, Kriegsfeld LJ, Demas GE (2007) Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology* 148:1158-1166.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349-11356.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264-272.
- Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda K-i, Oka Y (2008) Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka. *Endocrinology* 149:2467-2476.
- Karsch FJ, Dahl GE, Evans NP, Manning JM, Mayfield KP, Moenter SM (1993) Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol Repro* 49:1377-1383.
- Kawabe K, Kimura J (2007) Seedling production of blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* in small tanks. *Saibai Giken* 35:11-21. (In Japanese)
- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS (2009) Cloning and expression of Kiss2 in the zebrafish and medaka. *Neuroendocrinology* 150:821-831.
- Kobayashi M, Amano M, Kim MH, Yoshiura Y, Sohn YC, Suetake H, Aida K (1997) Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiol Biochem* 17:1-8.
- Lee CH, Hur SW, Song YB, Takano K, Takemura A, Lee YD (2010) Effect of 11-ketotestosterone (11-KT) on gonadal sex reversal and spermatogenesis of honeycomb grouper *Epinephelus merra*. *Dev Reprod* 14(1):1-5.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996) KiSS-1, a novel malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731-1737.
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP (1999) Discovery of a receptor related to galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103-107.
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F (2009) Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) Generated by Alternative splicing in a Modern Teleost, the senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Biol Reprod* 80:60-69.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zhan D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1761-1766.
- Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA (2007) Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J Mol Endocrinol* 38:235-244.
- Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617.
- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A (2007) Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54) gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *Gen Comp Endocrinol* 150:278-287.
- Othaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Tearo Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encode

- peptide ligand of a G protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y (2004) Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel g protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145:3613-3618.
- Plant TM, Ramaswamy S, Dipietro MJ (2006) Repetitive administration of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 147:1007-1013.
- Revel FG, Saboureau M, Masson-Pevet M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2006) Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16:1730-1735.
- Roa J, Vigo E, Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M (2006) Hypothalamic expression of KISS-1 system and gonadotropin releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat. *Endocrinology* 147:2864-2878.
- Selvaraj S, Kitano H, Fujinaga Y, Ohga H, Yoneda M, Yamaguchi A, Shimizu A, Matsuyama M (2010) Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages. *Gen Comp Endocrinol* 169:28-38.
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627.
- Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2129-2134.
- Shahjahan M, Motohashi E, Doi H, Ando H (2010) Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. *Gen Comp Endocrinol* 169:48-57.
- Shimizu Y, Tomikawa J, Hirano K, Nanikawa Y, Akazome Y, Kanda S, Kazeto Yi, Okuzawa K, Uenoyama Y, Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K-i, Gen K, Oka Y, Yamamoto N (2012) Central distribution of kiss2 neurons and peri-pubertal changes in their expression in the brain of male and female red seabream *Pagrus major*. *Gen Comp Endocrinol* 175:432-442.
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA (2005) Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146:2976-2984.
- Song YB, Oh SR, Seo JP, Ji BG, Lim BS, Lee YD (2005) Larval development and rearing of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in Jeju Island, Korea. *J World Aquacult Soc* 36: 209-216.
- Tena-Sempere M, Huhtaniemi I (2003) Gonadotropins and gonadotropin receptors. In: Fauser BCJM (ed.), *Reproductive Medicine-Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals*. Parthenon Publishing, New York, pp 225-244.
- Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR (2004) Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16:850-858.
- Yang B, Jiang Q, Chan T, Ko WKW, Wong AOL (2010) Goldfish kisspeptin: Molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. *Gen Comp Endocrinol* 165:60-71.

---

(Received 18 March 2012, Received in revised form 30 March 2012, Accepted 10 June 2012)