

열목어 재조합 생식선자극호르몬(mt-rGTH)에 의한 암컷 뱀장어의 성성숙 유도

김대중 · 박우동 · 손영창¹ · 배준영 · 윤성중 · 손맹현 · 고바야시 마키토² · 한창희^{3,†}

국립수산과학원 양식관리과, ¹강릉대학교 해양생명공학부, ²일본 국제기독교대학, ³동의대학교 분자생물학과

Maturation Induction by Manchurian Trout Recombinant Gonadotropin Hormone (mt-rGTH) in Female Eel, *Anguilla japonica*

Dae-Jung Kim, Woodong Park, Young Chang Sohn¹, Jun-Young Bae, Seong Jong Yoon,
Maeng Hyun Son, Makito Kobayashi² and Chang-Hee Han^{3,†}

Division of Aquaculture Management, NFRDI, Busan 619-902, Korea

¹Dept. of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea

²Dept. of Biology, International Christian University, Tokyo 181-8585, Japan

³Dept. of Molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

ABSTRACT : In the present study, we investigated *in vivo* effects of Manchurian trout recombinant gonadotrophin hormone (mt-rGTH) on the induction of maturation in female eel, *Anguilla japonica*. The brood stock, female eel (450±50 g) were weekly injected intramuscularly with different doses of 0.1, 1, 10 µg/ml/fish (mt-rFSH or mt-rLH) for 10 week. The effects of r-mtGTH were analyzed by gonadosomatic index (GSI), ovarian follicle diameter and sex steroid levels. All groups did not exhibit significant differences in the GSI values. Whereas plasma testosterone (T) and estradiol-17β (E2) levels did not change significantly in control group, plasma levels of T and E2 by injection of the r-mtFSH or r-mtLH were increased at 2 or 4 week after injection. In addition, injection of the mt-rFSH (1, 10 µg/ml/fish) or mt-rLH (0.1, 1, 10 µg/ml/fish) significantly increased follicle diameters comparing to the control group. These results demonstrate that the recombinant hormone may affect early ovary development and maturation in female eel. Taken together, these results suggest that the recombinant Manchurian trout FSH and LH are effective for reproductive activities in female eel.

Key words : *Anguilla japonica*, Manchurian trout recombinant GTH, Sex steroid hormone.

요 약 : 연어과 어류인 열목어 재조합 생식선자극호르몬(r-mtFSH 또는 r-mtLH) 투여에 따른 암컷 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 성성숙 유도 효과를 조사하였다. 양식산 암컷 뱀장어를 해수에 적응시킨 후 매주 복강에 재조합 호르몬을 농도별(0.1, 1, 10 µg/ml/fish)로 10주 반복 주사하였다. 매주 증체중을 측정하였고, 생식소중량지수 [GSI;(생식소중량/체중량×100)]와 혈중 성호르몬 농도 변화를 조사하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 GSI는 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 대조구에서 혈중 testosterone (T)과 estradiol-17β (E2)는 유의적인 증가를 보이지 않았지만, 재조합 호르몬을 투여한 실험군에서 투여 2주와 4주 후에 T와 E2 농도가 증가하였다. 또한, mt-rFSH(1, 10 µg/ml/fish) 또는 mt-rLH(0.1, 1, 10 µg/ml/fish)을 투여한 실험군에서는 난경이 대조구에 비해 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 열목어 재조합 생식선자극호르몬이 암컷 뱀장어의 초기 난성숙 발달을 유도함을 시사한다.

서 론

† 교신저자: 부산광역시 부산진구 가야3동, 동의대학교 분자생물학과,
(우) 614-714, (전) +82-51-890-1541, (팩) +82-51-890-1521, E-mail:
chhan@deu.ac.kr

어류의 성성숙은 다른 척추동물과 마찬가지로 여러 가지 호르몬들이 중요한 역할을 하고 있으며, 그 중에서도 뇌하수

체에서 분비되는 생식선자극호르몬(gonadotropin; GTH)은 생식에 관여하는 호르몬 중 가장 중요한 것 중의 하나이다. 특히 GTH는 생식소에 작용해서 성호르몬의 분비를 촉진시켜 생식소의 기능 발현에 중요한 역할을 담당하고 있다(Yaron et al., 2003). 그러나 고등 척추동물들과는 달리 어류에 있어서는 한 종류의 GTH가 존재하여 생식에 관련된 전과정을 조절한다고 알려져 왔으나(Fontaine & Dufour, 1987), 연어과 어류를 비롯한 경골어류에 있어서 2종류의 GTH[follicle stimulating hormone(FSH)와 leuteinizing hormone(LH)]가 뇌하수체에서 분리·정제되었으며, 이들 GTH는 물리화학적으로 하나의 α -subunit와 제각기 특이적인 β -subunit가 heterodimer로 구성된 당단백질성 호르몬이다(Suzuki et al., 1988). 이러한 GTH의 성성숙 유도에 관한 내분비학적인 기능은 FSH의 경우 난황형성 및 정자형성의 초기 단계, LH는 배란 및 배정에 관련한 최종 성숙 단계에 제각기 생성·분비되어 배우자형성 및 생식소 발달을 조절하는 것으로 알려져 있다.

뱀장어의 경우, 사육환경에서 뇌하수체 GTH 합성 능력이 미약하여 생식소 발달 및 최종 성숙 유도가 어렵기 때문에 외재성 호르몬 처리에 의해 인위적인 성성숙을 유도하고 있다(Nagaham & Yamamoto, 1973). 이러한 외재성 호르몬으로 유럽산 뱀장어(*Anguilla anguilla*)의 경우 잉어 뇌하수체 추출물(Fontaine et al., 1964)이 사용되어져 왔으며, 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 경우 연어 뇌하수체 추출물(Yamamoto & Yamauchi, 1974; Tanaka et al., 2001; Kim et al., 2006)이 사용되어져 왔다. 그러나 뇌하수체 추출물의 경우 뇌하수체 Whole body 자체를 균질화하기 때문에 뇌하수체성 타 호르몬 및 미지의 물질들의 작용에 의해 난질 및 기형 유발 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Shin, 2004).

최근 생명공학 기술의 발달로 어류 뇌하수체 기원 GTH 유전자의 cloning(Choi et al., 2005) 및 이들 유전자를 효모 세포(Kamei et al., 2003) 혹은 누에유충(Kobayashi et al., 2006; Ko et al., 2007)과 같은 bioreactor를 이용하여 유전자 재조합 단백질생산 기술이 확립되었으며, 그 중 Ko et al.(2007)의 열목어 재조합 생식선자극호르몬(mt-rGTH)은 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 성호르몬 분비 능력과 난소 발달 유도 등에 효과적인 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 뱀장어 성성숙 유도에 관한 GTH의 생물학적 활성을 조사하기 위하

여 같은 연어과 어류인 열목어 재조합 생식선자극호르몬 투여에 따른 *in vivo*에서 암컷 뱀장어의 성성숙 유도 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 사육관리

실험어는 국립수산물과학원 남부 내수면 연구소에서 사육중인 3년생 양식산 뱀장어 암컷(450±50 g)을 일주일간 1일 5 psu씩 점차적으로 해수에 적응시킨 후 1,000 l 유수식 사육수조에 실험구당 6마리씩 수용하였다. 사육수온은 히터 펌프를 이용하여 19±1℃를 유지하였고, 충분한 산소를 공급하였다. 실험기간 동안 사료는 별도로 공급하지 않았고, 수조 위에 검정색 차광막을 덮어서 친어가 안정되게 하였다.

2. 호르몬 투여 및 혈액채취

해수순치 후, 실험구별 각 개체들은 호르몬 투여 직전에 ID microchip(φ 2.1×12 mm)을 등 근육에 삽입하여 mini portable reader(HS5900LF, DESTRON technologies, USA)로 개체를 식별하였다. 열목어 재조합 생식선자극호르몬(mt-rGTH)은 single chain의 재조합 여포자극호르몬(mt-rFSH β / α ; Ko et al., 2007)과 재조합 황체형성 호르몬(mt-rLH β / α ; Ko et al., 2007) 2종류로 각기 bovine serum albumin(BSA) 0.1%를 첨가한 eel's ringer에 희석하여 농도별(0.1, 1, 10 μ g/ml/fish)로 매주 실험어의 복강 내에 반복 주사하였다. 매주 증체량(WG%, Weight Gain=[(final body weight - initial body weight)/initial body weight×100] 측정을 통해 성숙도를 결정하였고, 격주 간격으로 heparin이 처리된 일회용 주사기로 채혈하였다. 그 후, 4℃, 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 radioimmunoassay법으로 혈중 sex steroid hormone을 측정하기 전까지 -40℃에서 보관하였다.

3 Radioimmunoassay(RIA)

혈중 sex steroid hormone 농도는 Kim et al.(2006)의 방법에 따라 RIA법에 의해 측정하였다. 각 sex steroid hormone RIA계에 있어서 사용된 토끼 항혈청은 Cosmo-Bio Co. Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하였고, 비방사선 standard steroid들은 Steraloids Inc.(Wilton, NH, USA)로부터 구입하였

다. 또한, 방사선 표지 steroid들은 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였다.

4. 조직학적 관찰

양식산 암컷 뱀장어의 난소 발달 정도를 확인하기 위해 실험종료 후, 각 실험구당 3마리씩 2-phenoxyethanol(200 ppm)로 마취시킨 뒤 난소를 적출하여 Bouin's액에 고정하였다. 고정된 조직들은 paraffin 상법에 따라 paraplast로 포매한 후, 미세 조직 절편기를 이용하여 5 μm 크기로 연속 절편하였다. 각 조직의 절편은 hematoxylin-eosin으로 이중염색하여 Kagawa et al.(1997)의 방법에 따라 난소 발달 정도를 판독하였고, 광학현미경(Image acquisition and analysis system, ZEISS, Germany)을 통해 난경을 측정하였다.

5. 통계처리

통계처리는 분산분석 후, Duncan's new multiple range test에 의해서 유의성을 검정하였다($p < 0.05$ or $p < 0.01$).

결 과

1. 열목어 재조합 생식선자극호르몬(mt-rGTH) 투여에 따른 체중 및 혈중 성호르몬 농도 변화

mt-rGTH 투여에 따른 체중 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과, 대조구에서는 투여 2주째 약간 증가 후 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며, mt-rGTH(mt-rFSH 및 mt-rLH) 투여군의 경우 각 호르몬의 농도에 관계없이 서서히 감소하

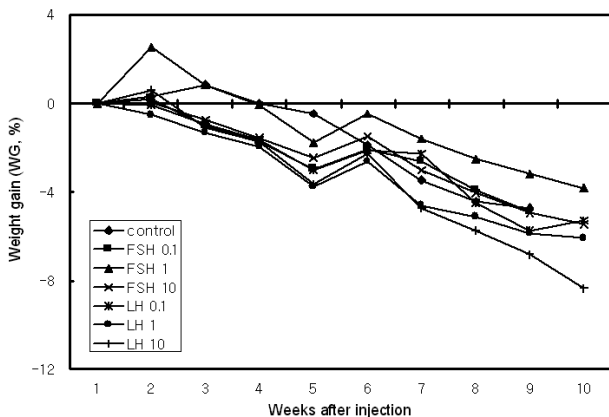


Fig. 1. Changes in body weight (BW) in female eel injected with Manchurian trout gonadotropin hormone (mt-rGTH).

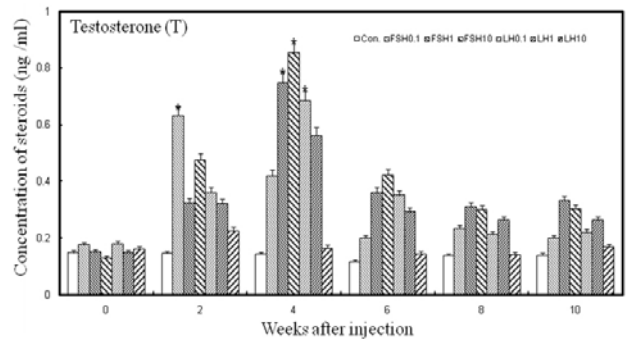


Fig. 2. In vivo effects of Manchurian trout gonadotropin hormone (r-mtGTH) on plasma testosterone levels in female eel. Vertical bar represent the mean±SEM Significant differences at $p < 0.01$.

는 경향을 나타내었다. Fig. 2는 in vivo에서 mt-rGTH 투여에 따른 혈중 testosterone(T) 농도 변화를 나타내었다. 그 결과, 대조구에서는 실험기간동안 유의한 변화가 관찰되지 않았다. mt-rFSH 실험구의 경우 0.1 μg/ml/fish 농도의 투여 2주째 혈중 T농도가 유의적으로 증가하였으며($p < 0.01$), 4주 후부터 감소하는 경향을 나타내었다. 1과 10 μg/ml/fish 농도의 mt-rFSH를 투여한 실험구는 2주 후부터 대조구보다 혈중 T농도가 증가하여 4주째에 유의한 증가가 관찰되었으며($p < 0.01$), 그 이후 감소하는 경향을 나타내었다. mt-rLH 투여에 따른 혈중 T농도 변화는 0.1과 1 μg/ml/fish 농도의 경우 4주까지 증가하며, 특히 1 μg/ml/fish 농도에서 유의한 증가가 관찰되었으며, 6주째부터 서서히 감소하는 경향을 보였다. 그러나 10 μg/ml/fish 농도의 경우 유의한 변화가 관찰

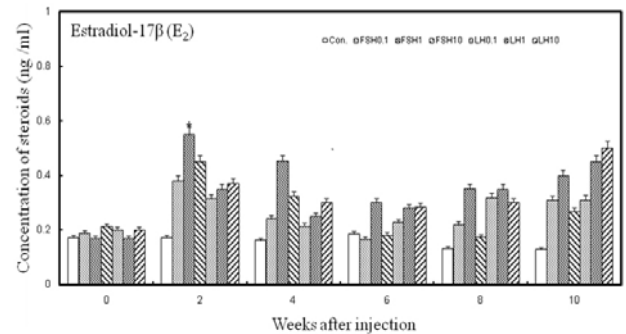


Fig. 3. In vivo effects of Manchurian trout gonadotropin hormone (mt-rGTH) on plasma estradiol-17β (E₂) levels in female eel. Vertical bar represent the mean±SEM Significant differences at $p < 0.01$.

되지 않았다. Fig. 3은 *in vivo*에서 mt-rGTH 투여에 따른 뱀장어 혈중 estradiol-17β(E₂) 농도를 나타내었다. 그 결과, 실험 기간동안 대조구에서 유의한 변화가 나타나지 않았다. 한편, mt-rFSH를 투여한 농도별 실험구 모두 투여 2주째 혈중 E₂ 농도가 실험 기간중 가장 높았으며, 특히 1 μg/ml/ fish 농도 투여구에서 유의한 증가가 관찰되었고, 그 이후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. mt-rLH 역시 투여 2주째에 혈중 E₂ 농도가 낮은 수준이지만 약간의 증가를 나타내었고, 4주부터 감소하여 8주까지 비슷한 수준을 유지하였으며, 10주째에 1 혹은 10 μg/ml/fish 농도 투여구에서 E₂ 농도가 가장 높게 증가하였다.

2. 열목어 재조합 생식선자극호르몬(mt-rGTH) 투여에 따른 난경 및 난소 발달 변화

mt-rGTH(mt-rFSH 혹은 mt-rLH) 농도별 투여 효과를 각각 10회 투여 후에 난경의 변화와 난소 발달 정도를 통해서 조사하였다. 그 결과, 대조구와 mt-rGTH 투여군 사이에서 GSI의 유의한 변화가 관찰되지 않았지만(data not shown), mt-rFSH 1 혹은 10 μg/ml/fish 투여구와 mt-rLH 투여한 모든 그룹에서 난경이 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다(Fig. 5). 또한, 조직학 실험 결과 역시 대조구(Fig. 4A)의 난모세들에 비해 mt-rFSH(Fig. 4B~D)와 mt-rLH(Fig. 4E~G) 투여한 일부 뱀장어의 난모세포들에서 상대적으로 발달한 유구기와 핵인이 관찰되었다.

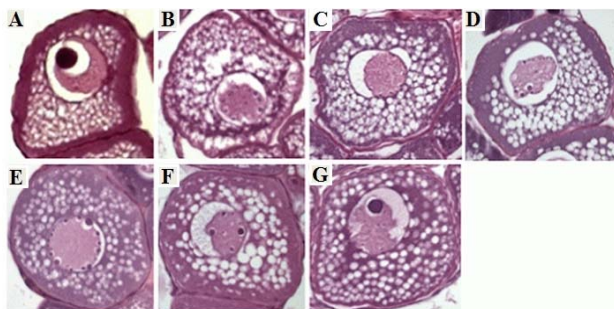


Fig. 4. Light micrographs of the ovaries in female eel. A: Oocyte of a control fish without treatment at the start of the experiment in eel. B~D: Oocyte of a mt-rFSH (B: 0.1 μg; C: 1 μg; D: 10 μg) injected fish after 10 weeks from the start of the experiment in eel. E~G: Oocyte of a mt-rLH (E: 0.1 μg; F: 1 μg; G: 10 μg) injected fish after 10 weeks.

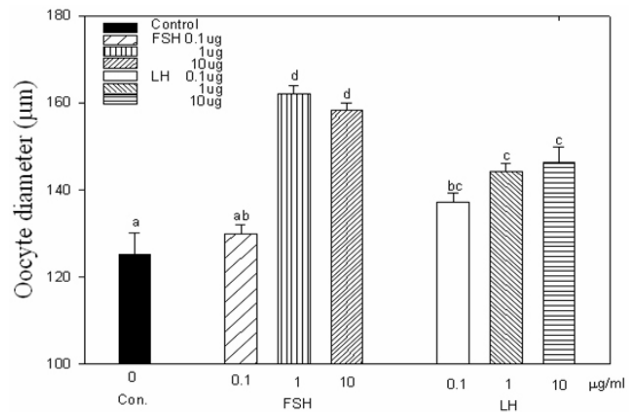


Fig. 5. *In vivo* effect of the Manchurian trout gonadotrophin hormone (mt-rGTH) on oocyte diameter. Values sharing the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$).

고찰

GTH은 생식소에 작용하여 성호르몬 분비를 촉진하여 생식소 기능을 발현한다고 알려져 있다. 이와 같은 원리를 이용한 뱀장어 인공 성성숙 유도에 응용한 외재성 호르몬 처리에 있어서 주로 SPE(연어뇌하수체 추출물)를 이용하여 인공 성성숙을 유도하는 것이 일반화 되어 있다(Yamamoto & Ymauchi, 1974). 그렇지만 인공성성숙에 필요한 SPE의 추출 과정에서 야기되는 GTH 외의 성성숙과 직접적 관련이 없는 여러 단백질 등이 포함되어져 있기 때문에 SPE 주사에 따른 난질의 저하, 부화후의 유생기형, 부화율의 저하 등의 원인으로 추측되어지고 있다. 이와 같은 부작용을 최소화 하기 위하여 보다 순수한 GTH를 추출하기 위한 하나의 방법으로 같은 연어과의 열목어 유전자를 이용하여 재조합한 생식선 자극 호르몬(mt-rGTH)을 이용한 방법을 응용하게 되었다.

본 연구의 혈중 성호르몬의 실험 결과에 의하면 mt-rGTH가 뱀장어의 난황형성과 난모세포의 발달 초기에 작용하는 것으로 생각된다. mt-rFSH를 투여한 뱀장어의 혈중 T와 E₂ 농도는 초기 2~4주째에 대조구에 비해 상대적으로 높았으며, mt-rLH를 투여한 뱀장어 역시 mt-rFSH와 비슷하게 초기에 높은 농도를 보였다. 경골어류에서 난소의 여포세포에서 분비되는 E₂가 혈류를 통하여 간에 도달한 후, 난황단백전구체(vitellogenin; VTG)를 합성하고 난황단백전구체가 혈중으로 분비되어 난모세포로 축적되어 난황형성을 진행한다고 알려져 있으며(Nagahama et al., 1997), 이 기간 동안의

혈중 내 E_2 및 T의 증가는 성성숙 초기에 나타나는 내분비학적 지표가 되고 있다(Lokman & Young, 1995; Lokman et al., 1998). 따라서 본 연구의 실험결과 E_2 와 T의 변화를 통해서 mt-rGTH가 암컷 뱀장어의 난 발달 초기에 효과적으로 작용하는 것으로 생각되어진다.

본 실험에서 mt-rGTH가 뱀장어 성숙에 효과적으로 작용하는지 혈장내 성성숙 호르몬의 변화를 통해서 알 수 있지만, *in vivo*에서 성성숙에 따른 난경의 크기를 조사한 결과를 통해서 그 효과를 명확하게 알 수 있었다. 해부학적 측면에서 뱀장어 난경이 대조구에 비해 mt-rFSH와 mt-rLH를 투여한 그룹 중 1, 10 $\mu\text{g/ml/fish}$ 농도에서 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 조직한 실험 결과에서도 mt-rGTH에 의해서 난모세포가 대조구에 비해 발달한 것을 관찰할 수 있었다. 또한, mt-rFSH 투여구에서 최종성숙 단계까지 성숙이 유도된 개체가 관찰되었다(data not shown). 그러므로 이러한 결과는 뱀장어 난 성숙에 있어 mt-rFSH와 mt-rLH가 효과적으로 난황형성과 난모세포의 발달에 작용하는 것으로 생각된다. 어류 암컷에서 FSH는 초기 정자형성과 난황형성에 중요한 역할을 하며, LH는 난모세포의 최종성숙 및 배란 같은 최종성숙에 관여한다고 알려져 있다(Yaron et al., 2003). 최근에 보고된 Hayakawa et al.(2008) 연구에 의하면 금붕어 재조합 단백질을 미성숙 수컷 뱀장어에 투여한 후에 초기 정자형성이 유도되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 다른 어종의 생식선자극호르몬이 뱀장어에서 초기 발생에 작용함을 보여준다. 또한, Ko et al.(2007) 연구에서도 열목어 재조합 단백질을 이용하여 미성숙 무지개 송어에서 생식소가 발달됨을 보고하였다. 이러한 결과를 봤을 때, mt-rGTH는 뱀장어 성성숙 유도제로서 가치를 가지고 있다고 생각되어진다. 그러나 경골어류와 달리 뱀장어에서 아직 mt-rFSH와 mt-rLH가 *in vivo*에서 각각의 수용체에 작용하여 난모세포를 발달시키는지 명확하게 규명되어 있지 않아 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

지금까지 뱀장어 인공성성숙 유도에서 일반적으로 사용되는 어지는 SPE는 연어의 뇌하수체 추출물을 사용하였지만, SPE는 FSH와 LH 이외의 여러 물질이 혼합되어 있는 복합물질이었다. 이러한 복합물질은 성성숙 관련 호르몬 이외에 다른 호르몬들의 길항작용 및 상승작용 등에 의해서 난질의 저하, 수정을 감소, 부화율 저하 및 기형 유생 발생 등의 직간접적인 원인으로 추측되어지고 있다. 따라서 이와 같은 전체적인 원인에 대응하는 기초적인 연구 일환으로 뱀장어 인공 성성숙

에 있어서의 mt-rGTH의 투여에 따른 인공 성성숙 기술이 한 발 더 진보하는 기초적 자료를 제공할 것이라고 생각되어졌다. 또한, 지금까지 SPE 주사를 하였을 경우 난의 최종성숙 및 배란을 유발하는 난성성숙유도 스테로이드 호르몬(Maturation inducing steroid hormone; MIH)이 분비가 되지 않았던 문제점(Kim et al., 2006)에 대하여 mt-rGTH를 투여하였을 경우 이와 같은 문제가 해결될 것인지에 관한 연구가 지속적으로 필요하다고 생각되어진다. 따라서 뱀장어 인공 성성숙 유도에 따른 두 호르몬의 적절한 농도와 혼합 투입 시기 등의 연구가 앞으로 더 상세하게 연구되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원(수산물품질관리기구 연구, RP-2008-AQ-0135)의 지원에 의해 운영되었습니다.

인용문헌

- Choi E, Ko H, Shin J, Kim MA, Sohn YC (2005) Expression of gonadotropin genes in Manchurian trout *Brachymystax lenok* and production of recombinant gonadotropins. *Fisheries Sci* 71:1193-1200.
- Fontaine M, Bertrand E, Lepez E, Callamand O (1964) Gonadal maturation of female eel (*Anguilla anguilla*) and spontaneous emission of eggs in aquarium. *CR Acad Sci Paris*, 259:2907-2910.
- Fontaine YA, Dufour S (1987) Current-status of LH-FSH like gonadotropin in fish. In *Proceeding of the 3th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Memorial University of Newfoundland, S. John's, Newfoundland, Canada, pp 48-56.
- Hayakawa Y, Morita T, Kitamura W, Kanda S, Banba A, Nagaya H, Hotta K, Sohn YC, Yoshizaki G, Kobayashi M (2008) Biological activities of single-chain goldfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Aquaculture* 274:408-415.
- Kagawa H, Iinuma N, Tanaka H, Ohta H, Okuzawa K (1997) Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*.

- Fisheries Sci 64:77-82.
- Kamei H, Ohira T, Yoshiura Y, Uchida N, Nagasawa H, Aida K (2003) Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. Gen Comp Endocrinol 134:244-254.
- Kim DJ, Kim EH, Park MW, Cho YC, Lim SG (2006) Plasma sex steroid hormone profiles in artificially maturing wild eel, *Anguilla japonica*. J Aquacult 19:267-274.
- Kobayashi M, Morita T, Ikeguchi K, Yoshizaki G, Suzuki T, Watabe S (2006) *In vivo* biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silkworm larvae. Aquaculture 256:433-442.
- Ko H, Park W, Kim DJ, Kobayashi M, Sohn YC (2007) Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. J Mol Endocrinol 38:99-111.
- Lokman PM, Young G (1995) *In vitro* biosynthesis of oestradiol-17 β and 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by vitellogenic ovarian follicles from migrating New Zealand longfinned eels (*Anguilla dieffenbachii*). Aquaculture 135:17-26.
- Lokman PM, Vermeulen GD, Lambert JGD, Young G (1998) Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eel (*Anguilla dieffenbachia* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. Fish Physiol Biochem 19:325-338.
- Nagahama Y, Yamamoto K (1973) Cytological changes in the adenohipophysis of fresh 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 (1997) 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocyte: Mechanisms of synthesis and action. Steroids 62:190-196.
- Shin DH (2004) Biochemical and histological studies on egg quality in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, pp 3-20.
- Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y (1998) Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. Gen Comp Endocrinol 71:292-301.
- Tanaka H, Kagawa H, Ohta H (2001) Production of leptcephali of Japanese eel, *Anguilla japonica* in captivity. Aquaculture 201:51-60.
- Yamamoto K, Yamauchi K (1974) Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature 251:220-221.
- Yaron ZG, Gur P, Melamed H, Rosenfeld A, Elizur B, Levavi-Sivan (2003) Regulation of fish gonadotropins. Int Rev Cytol 225:131-185.

(received 17 October 2008, received in revised form 16 November 2008; accepted 17 November 2008)