

황점볼락 난소 발달에 따른 혈중 성호르몬과 난황단백전구체의 변동

김대현¹, 정지현², 윤성종³, 황형규¹, 이윤희¹, 김대중^{4,*}

¹국립수산과학원 남해수산연구소, ²한국해양연구원, ³국립수산과학원 양식관리과, ⁴국립수산과학원 남부내수면연구소

Profiles of Plasma Sex Steroid Hormone and Vitellogenin According to Ovarian Development of the Oblong Rockfish *Sebastes oblongus*

Dae Hyun Kim¹, Jee Hyun Jeong², Seong Jong Yoon³, Hyung Gue Hwang¹,
Yoon Ho Lee¹, and Dae Jung Kim^{4,*}

¹South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Yosu 556-906, Korea

²South Sea Institute, KORDI, Geoje 656-830, Korea

³Aquaculture management Division, NFRDI, Busan 619-902, Korea

⁴Southern Regional Inland Fisheries Research Institute, NFRDI, Jinhae 645-805, Korea

To understand the steroidogenic activities and plasma vitellogenin (VTG) profiles according to the reproductive phases in the oblong rockfish *Sebastes oblongus*, we examined changes in sex steroid hormones and plasma vitellogenin. Plasma levels of testosterone (T) was significantly higher value in only ovulation stage ($P<0.05$). In vitellogenesis, plasma estradiol-17 β (E_2) had a high level in August which was a similar higher level until ovulation than other ovarian development stages ($P<0.05$). However, E_2 was significantly decreased after embryo stage ($P<0.05$). This indicates that variability in E_2 at different stage is associated with the development of the oocytes. Plasma levels of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) were significantly high at the stages of vitellogenesis and ovulation ($P<0.001$). It is assumed that DHP plays an important role in vitellogenesis. Also, We determined the plasma levels of vitellogenin (VTG) divided the development stage into four steps: immaturation, vitellogenesis, and ovulation and parturition. A significant lower levels of VTG were shown in immaturation and parturition ($P<0.05$), which did not discriminate between them. However, in vitellogenesis and ovulation were shown in a remarkable higher levels of VTG ($P<0.05$), but not significantly different between them. Consequently, plasma VTG levels were considerably increased after October and maintained a higher concentration until ovulation, but significantly decreased after ovulation. It is suggested that VTG plays also an important role in the development of vitellogenesis and oogenesis.

Keywords: *Sebastes oblongus*, Sex steroid hormone, Vitellogenin, Ovarian development

서 론

최근 연안 수산자원 증대를 위한 일환으로 어장조성 사업과 함께 방류에 의한 자원조성 사업이 활발히 이루어지고 있다. 이 가운데 방류대상 어종은 종묘방류를 위한 대량의 종묘생산이 가능한 어종이면서 정착성이 강하여 방류 후에도 크게 분산되지 않고 연안역의 자연암반이나 인위적으로 설치한 인공어초 등에 잘 정착하여 어초 어장내의 생산성을 높일 수 있는 어종이 선호되고 있다. 황점볼락은 연안의 암초 등을 은신처로 하여 서식하며 저수온에 잘 적응한 어종으로 겨울철 적수온을 따라 이동하는 타 어종에 비해 정착성이 높을 뿐만 아니라, 교미에 의한

체내수정으로 자어를 신출하는 난태생 어류로서 수정 및 부화 관리가 필요 없으며 출산한 자어는 비교적 생존율도 높아 대량 종묘생산이 이루어지고 있는 어종이다. 하지만 본종에 관해서 알과 자어 발달에 관한 형태학적 기재(藤田, 1958), 성숙과 생식주기(Chang et al., 1995), 인공종묘의 생식소 발달과 성분화(Kwak et al., 2006), 자치어 성장과 생존에 미치는 환경과 먹이의 영향(Yoon et al., 2007)에 대한 보고가 있다.

그러나 생식내분비학의 기초 자료로 이용되는 혈중 성호르몬과 난황단백전구체 변동에 관한 연구는 거의 찾아보기 어렵다. 본 연구에서는 난태생 어류인 황점볼락의 난소발달에 따른 혈중 성호르몬 및 난황단백전구체들의 혈중 변동을 조사하여 생식주기를 보다 명확히 해명하고, 본종의 성숙과정과 배란에 있

*Corresponding author: djkim4128@nfrdi.go.kr

어 성호르몬의 역할을 파악하여 본 종의 번식생물학적 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

2007년 1월부터 12월까지 전남 여수 돌산에 위치한 해상가두리에서 사육 중인 체중 250 g이상인 개체를 구입하여 국립수산물연구원 남해수산연구소의 생물사육동에 수용한 후 각 실험재료로 활용하였다.

혈액 채취

실험어를 2-phenoxyethanol (100 mg/L)로 마취시켜 체중을 측정 후, heparin 처리한 일회용 3 mL 주사기로 미부 혈관으로부터 채혈하였다. 혈액은 4°C, 3600 g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였으며, 방사선면역측정법에 의한 성호르몬 측정 및 효소면역측정법에 의한 vitellogenin (VTG) 측정 전까지 -80°C에 보관하였다.

생식소 발달단계

황점볼락의 생식주기는 Chang et al. (1995)의 보고에 따라 실험어를 채집한 후, 생식소를 절취하여 Bouin's액에 고정한 후, 상법에 따라 paraplant로 포매한 후 5 µm크기로 절편하여 hematoxylin-eosin으로 염색하여 구분하였다.

성호르몬 분석

황점볼락 성호르몬은 배 발생(1월), 산출 후(3월), 미성숙(6~8월), 난황형성기(9~10월) 그리고 배란(12월)의 5단계로 구분하여 혈액을 샘플하였다. 혈중 성호르몬 농도 Kim et al. (2007)의 방법에 따라 방사선면역측정법(Radioimmunoassay; RIA)에 의해 testosterone (T), estradiol-17β (E₂) 및 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)를 측정하였다. 각 성호르몬에 대한 항체는 Cosmo-Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였고, 비방사선 standard steroid들은 Steroids Inc. (Wilton, NH, USA)로부터 구입하였다. 또한 방사선 표지 steroid들은 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였다.

Vitellogenin (VTG) 분석

혈중 VTG 농도는 Jung et al. (2004)에 의해 개발된 조피볼락 VTG 측정계를 이용하여 측정평형선 감정을 실시한 후 황점볼락 혈중 농도를 효소면역측정법(ELISA; Enzymelinked immunosorbent assay)으로 측정하였다.

통계분석

실험결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 SAS 통계프로그램으로 검정하였다.

결 과

생식소중량지수의 변화

황점볼락 생식소 발생단계에 따른 생식소중량지수(GSI)의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 배 발생기와 배란기에 가장 높은 값을 나타낸 후 산출기와 미성숙 그리고 난황형성기에는 5이하의 속도지수를 보였다($P<0.05$).

암컷 황점볼락 어미의 혈중 성호르몬 농도 변화

암컷 혈중 testosterone (T) 농도의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. T 농도는 배란기(12월)에서만 유의하게 높은 혈중 농도(3,091 pg/mL)를 보이거나 나머지 발생 단계에서는 매우 낮은 농도를 나타내면서 각 발생단계 상호간의 변화는 유의한 차이를 보이지 않았다($P<0.05$). 암컷의 혈중 E₂ 농도는 난황형성기(9월)에 가장 높은 평균 531.8 pg/mL의 농도를 나타낸 후 배란

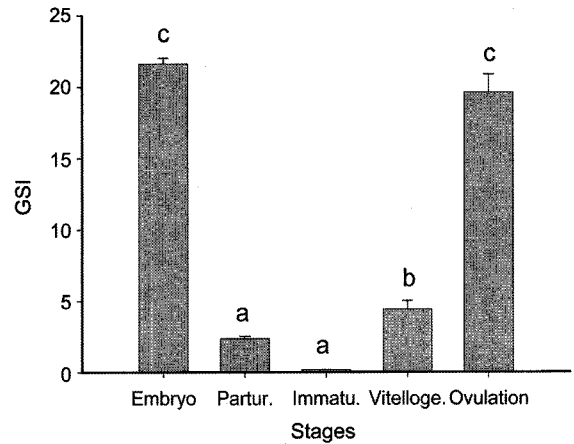


Fig. 1. Changes in gonadosomatic indexes according to ovarian development in *Sebastes oblongus*. Each value represents mean±S.E. and different letters do significant differences ($P<0.05$).

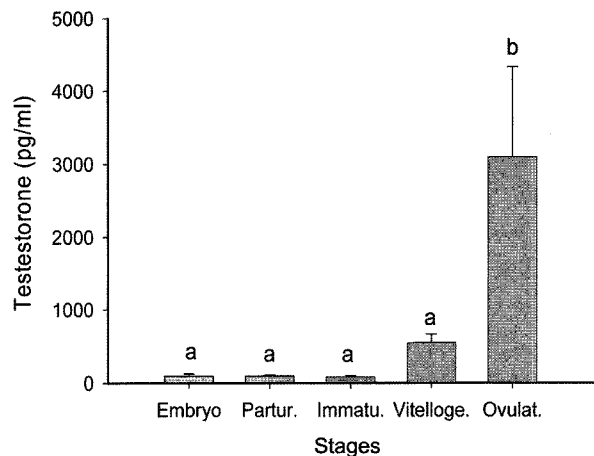


Fig. 2. Changes in plasma levels of testosterone (T) according to ovaria development in *Sebastes oblongus*. Each value represents mean±S.E. and different letters do significant differences ($P<0.05$).

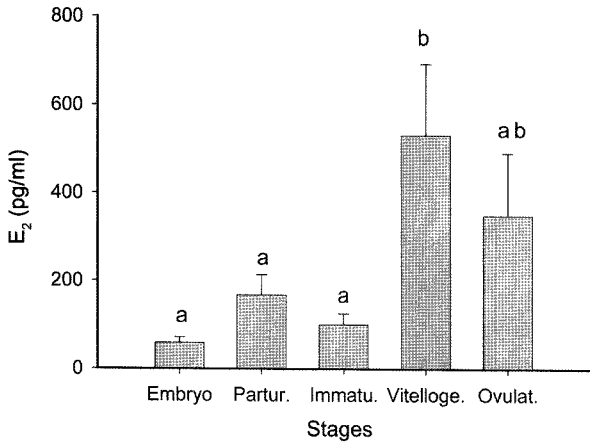


Fig. 3. Changes in plasma levels of estradiol-17 β (E₂) according to ovarian development in *Sebastes oblongus*. Each value represents mean \pm S.E. and different letters do significant differences ($P<0.05$).

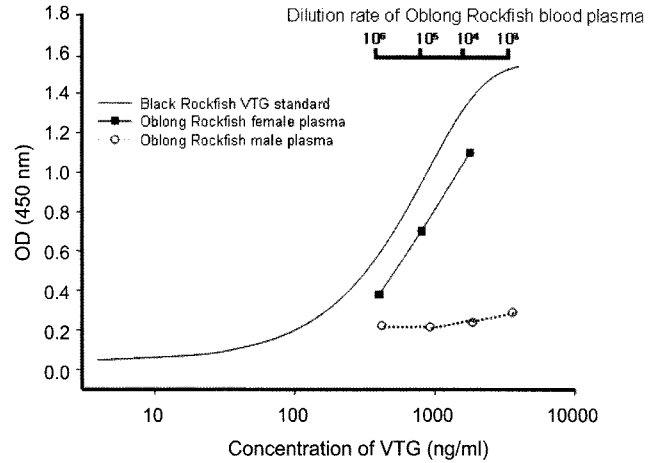


Fig. 5. Displacement curves for blood plasma of oblong rockfish female or male in the black rockfish vitellogenin (VTG) ELISA system. Each point is the mean of duplications.

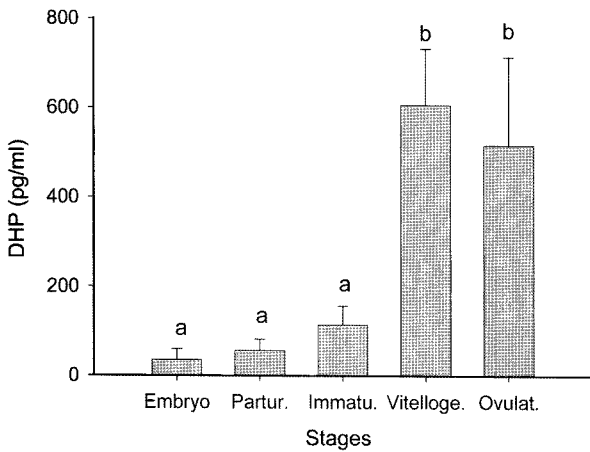


Fig. 4. Changes in plasma levels of DHP according to ovarian development in *Sebastes oblongus*. Each value represents mean \pm S.E. and different letters do significant differences ($P<0.001$).

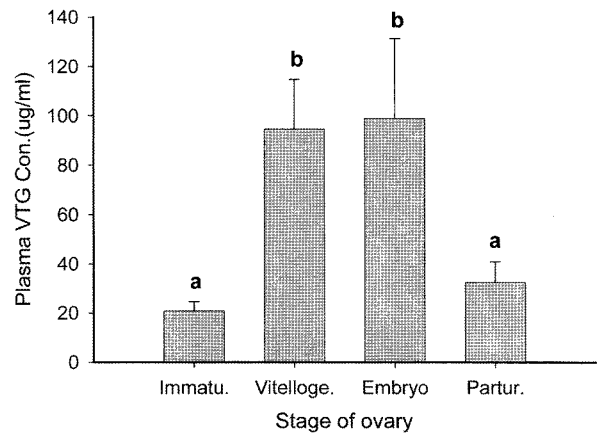


Fig. 6. Changes in plasma VTG levels according to ovarian development in *Sebastes oblongus*. Each value represents mean \pm S.E. and different letters do significant differences ($P<0.05$).

기까지 다른 발생 단계의 혈중 농도보다 유의하게 높은 농도를 유지하다가 배 발생기부터 급격히 낮아지는 경향을 보였다 ($P<0.05$) (Fig. 3). 암컷 황점볼락 DHP 혈중농도의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. DHP의 농도는 난황형성기와 배란기에 유의하게 높았으며, 배 발생, 산출 후, 미성숙시기의 혈중농도는 발생 단계에 상관없이 낮은 농도를 보였다($P<0.001$).

혈중 난황단백전구체(VTG) 농도 변화

조피볼락 혈중 VTG ELISA계에 있어서 황점볼락 혈중 VTG 농도 측정 가능성 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과 조피볼락 혈중 VTG ELISA계에 있어서 조피볼락 VTG 표준곡선에 대해 황점볼락 암컷의 혈장은 희석 비율에 따라 평행하게 일치하였다.

황점볼락 혈중 VTG 농도를 난소발달 단계인 미성숙(8월), 난황형성기(10월), 배란기(12월) 산출 후(3월) 4단계로 나뉘어 측정된 결과, 혈중 VTG농도는 미성숙 시기와 산출 후의 혈중

농도가 나머지 발생단계에 비해 유의하게 낮지만 이들 발생 단계간유의적인 농도 차는 보이지 않았다. 한편 난황형성기와 배 발생 시기에는 미성숙 및 산출후 시기에 비해 유의하게 높은 농도치를 보이나, 양 발생 단계간의 유의성은 나타나지 않았다 ($P<0.05$) (Fig. 6).

고 찰

대부분 어류의 생식주기는 수온이나 일장 등의 환경적 요인에 영향을 받는 것으로 잘 알려져 있다(Aida, 1991). 새로운 양식대상종의 개발에 있어 그 어종에 대한 생식주기의 조절에 관한 연구결과들의 누적은 대상 어종에 대한 보다 명확한 생식 전략에 대한 자료를 제공하며, 산업적으로 이용될 때 인위적 산란조절에 의한 종묘의 계획생산에 많은 도움을 줄 수 있다(Ko et al., 1998).

수온과 일장 등과 같은 환경요인이 어류의 성숙과 산란에 미치는 영향에 관한 연구는 대부분 난생 어류(Tsuruda and Hirose, 1989; Matsuyama et al., 1991; Park et al., 2005; Kim et al., 2006)에 집중 되어 있는 반면, 황점볼락과 같은 난태생 어류에 관한 연구는 찾아보기 어렵다. 황점볼락의 생식에 관한 기존의 연구보고에 의하면 수온이 하강할 때 성숙하여 겨울에 출산하는 동계 출산종으로 보고하고 있으며, 황점볼락 암컷에서 GSI는 낮의 길이가 짧아지고 수온이 하강하는 9월부터 증가하기 시작하여 연중 낮의 길이가 가장 짧고 저수온기인 12월에 최대치를 나타내어 황점볼락의 난소는 광주기의 단일화와 저수온에 의해 성숙 촉진되고, 수컷의 경우는 암컷보다 1개월 빠른 8월부터 급격히 증가하여 9월에 연중 최고치에 도달한다고 하였다(Chang et al., 1995). 따라서 황점볼락의 번식생리에 관한 정보를 축적하기 위해서는 생식소 발달단계에 따른 성호르몬의 변동을 분석할 필요가 있다.

본 연구의 결과, 황점볼락 암컷 혈중 T의 농도는 난황형성기 및 배란기에서 유의하게 높고 나머지 발생 단계에서는 매우 낮은 농도로 각 발생단계의 상호간 변화는 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 조피볼락, *Sebastes schlegelii*의 혈중 T 농도는 난황형성기에 서서히 증가하기 시작하여 임신기에 연중 최고치를 나타내며 산출후 급격히 감소하여(Baek et al., 2000), 본 종의 경향과 다소 차이를 보이고 있다. 난태생 암컷 어류에 있어서 T의 작용은 아직 확실히 보고되어진 사례는 없으나, 아마도 배란 혹은 임신기에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추측되어진다.

황점볼락 암컷의 E₂의 농도는 난황형성기간 동안 높았다가 임신기(배 발생기)에 낮아지는 경향을 보였는데 이러한 결과는 황점볼락, *Sebastes oblongus* (Chang et al., 2001)과 탁자볼락, *S. taczanowskii* (Nagahama et al., 1991)에서도 유사하게 나타났다. 한편 혈중 E₂와 VTG의 상관관계에 대해 잿방어, *Seriola dumerilii* (Mandich et al., 2004), greenback flounder, *Rhombosolea tapirina* (Sun and Pankhurst, 2004), 청어, *Clupea pallasii* (Koya et al., 2003), 독가시치 golden rabbitfish, *Siganus guttatus* (Rahman et al., 2000), 참돔 red porgy, *Pagrus pagrus* (Kokokiris et al., 2000) 및 Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Methven et al., 1992), 문치가자미, *Limanda yokohamae* (Kim et al., 2006) 등의 보고에서 GSI가 연중 최고치를 나타내는 산란기에 혈중 VTG와 E₂ 농도도 연중 최고치에 도달한다고 보고하였다. 한편 동계의 연 1회 산란형에 속하는 본 종의 혈중 VTG의 농도는 GSI와 혈중 E₂ 농도 변화와 유사한 경향을 보였다. 난황단백전구체가 10월부터 급격히 증가하여 배란기까지 높은 수준을 유지하고 산출 후에 급격히 낮아지는 결과들은 난모세포의 성장과 난황형성에 밀접하게 관여하는 것으로 추측된다. 또한 산란기에 혈중 E₂ 농도가 고농도로 존재하는 것은 VTG 생성과 유지하는데 필요하며 고농도의 혈중 VTG와 E₂ 농도가 난 성숙에 직접적으로 관여하지 않나 추측되어진다.

한편, 혈중 DHP의 농도는 난황형성기와 배란기에 유의하게

높았으며, 배 발생, 산출 후, 미성숙 시기의 혈중농도는 낮은 수준을 보였다. 이러한 결과는 경골어류에 있어서 생식선자극호르몬의 작용에 의해 난황축적을 완료한 난모세포의 여포조직에서 생성되어, 최종적으로 난성숙을 특이적으로 유도하는 C21-steroid를 난성숙유도스테로이드(Maturation Inducing Steroid; MIS)라고 부르고 있으며(Nagahama, 1997), 연어과, 잉어과 및 대부분의 경골어류에서 DHP가 MIS로 작용한다고 보고하고 있다(Aida, 1988; Nagahama, 1997). 본 연구 결과, 배란기 뿐만 아니라 난황형성기에 도 혈중 DHP 농도가 타 어종의 난소 발달 단계 보다 유의적으로 높아 난황형성기에 있어서 DHP의 내분비학적인 역할은 추후에 연구되어야 할 부분이다.

요 약

황점볼락 생식주기에 따른 성호르몬과 난황단백전구체의 혈중 농도변화를 조사하였다. Testosterone 농도는 배란기(12월)에서만 유의하게 높은 평균 3,091 pg/mL의 혈중 농도를 보이거나 나머지 발생 단계에서는 매우 낮은 농도를 나타내면서 각 발생단계 상호간의 변화는 유의한 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$). 혈중 E₂ 농도는 난황형성기(9월)에 가장 높은 평균 농도(531.8 pg/mL)를 나타낸 후 배란기까지 다른 발생 단계의 혈중 농도보다 유의하게 높은 농도를 유지하다가 배 발생기부터 급격히 낮아지는 경향을 보였다($P < 0.05$). 이러한 난황형성기간 동안 높았다가 임신기에 낮아지는 E₂의 농도는 난생 어류에서와 같이 난태생어류에서도 난모세포의 성숙에 관여하는 것으로 추정된다. DHP의 농도는 난황형성기와 배란기에 유의하게 높았으며, 배 발생, 산출 후, 미성숙시기의 혈중농도는 발생단계에 상관없이 낮은 농도를 보였다($P < 0.001$). DHP는 난황형성기에 높은 혈중 농도를 나타내고 있어 난황형성과 밀접한 관계를 가지는 것으로 추측된다. 혈중 VTG 농도를 난소발달 즉 미성숙(8월), 난황형성기(10월), 배란기(12월) 산출 후(3월) 등 4단계로 나누어 조사한 결과, 혈중 VTG농도는 미성숙 시기(8월)와 산출 후(3월)의 혈중농도가 나머지 발생단계에 비해 유의하게 낮지만 이들 발생 단계간의 농도 차는 보이지 않았다. 한편 난황형성기와 배 발생 시기에는 다른 시기에 비해 유의하게 높은 값을 보이나, 양 발생 단계간의 유의성은 나타나지 않았다($P < 0.05$). 난황단백전구체가 10월부터 급격히 증가하여 배란기까지 높은 수준을 유지하고 산출 후에 급격히 낮아지는 경향은 난모세포의 성장과 난황형성에 밀접하게 관여하고 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원(남해특산품중앙식품산업화기술개발; RP-2008-AQ-115)의 지원에 의해 운영되었습니다. 황점볼락 실험에 관리에 많은 도움을 주신 김원호, 이한배 님께 감사의 말씀을 전합니다.

참고문헌

- Aida, K. 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture*, 74, 11–21.
- Aida, K. 1991. Environmental regulation of reproductive rhythms on teleosts. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph*, 16, 173–187.
- Baek, J.M., C.H. Han, D.J. Kim, C.W. Park and K. Aida. 2000. Reproductive cycle of a rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 33, 431–438.
- Chang, Y. J., H. K. Lim, and S. G. Byun. 1995. Gonadal maturation and reproductive cycle in oblong rockfish, *Sebastes oblongus*. *J. Aquacult.*, 8, 31–46.
- Chang, Y. J., H. K. Lim, and J. Y. Kwon. 2001. Changes in plasma steroid hormone level in rockfish, *Sebastes inermis* by the controlled water temperature and photoperiod. *J. Korean Fish. Soc.*, 34, 13–16.
- Jung, H. J., D. J. Kim and C. H. Han. 2004. Rockfish (*Sebastes schlegeli*) vitellogenin: Purification, characterization and development of sandwich ELISA system. *J. Fish. Sci. Tech.*, 7, 99–108.
- Kim, D. J., C. M. An and K. S. Min. 2006. Plasma sex steroid hormone and vitellogenin profiles during ovarian development of the wild marbled sole, *Limanda yokohamae*. *J. Kor. Fish. Soc.* 39, 391–397.
- Kim, D. J., J. Y. Bae and E. O. Kim. 2007. Changes in sex steroid hormones and ovarian development during artificial maturation of female eel, *Anguilla japonica*. *Integrative Biosciences*, 11, 117–124.
- Ko, C. S., Y. J. Chang, H. K. Lim, J. H. Kim, and K. C. Cho. 1998. Controlled reproductive cycle of rockfish (*Sebastes inermis*) by water temperature and photoperiod. *J. Korean Fish. Soc.* 31, 713–720.
- Kokokiris, L., B. Mourot, F. Le Menn, M. Kentouri and A. Fostier. 2000. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei, Sparidae). *Fish. Physiol. Biochem.*, 23, 1–11.
- Koya, Y., K. Soyano, K. Yamamoto, H. Obana and T. Matsubara. 2003. Oocyte development and serum profiles of vitellogenin and steroid hormone levels in captive female Pacific herring *Clupea pallasii* during their first maturational cycle. *Fisher. Sci.*, 69, 137–145.
- Kwak, E. J., K. W. Lee, S. W. Yang, N. H. Choi, C. K. Park, K. H. Han, and W. K. Lee. 2006. Gonadal development and sex ratio of artificial seedlings of the oblong rockfish *Sebastes oblongus*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 39, 297–302.
- Mandich, A., A. Massari, S. Bottero, P. Pizzicori, H. Goos and G. Marino. 2004. Plasma sex steroid and vitellogenin profiles during gonadal development in wild Mediterranean amberjack (*Seriola dumerilii*). *Mar. Biol.*, 144, 127–138.
- Matsuyama, M., S. Adachi, Y. Nagahama, C. Kitajima and S. Matsuura. 1991. Annual reproductive cycle of the captive female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. *Mar. Biol.*, 108, 21–29.
- Methven, D.A., L.W. Crim, B. Norberg, J.A. Brown, G.P. Goff and I. Huse. 1992. Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49, 754–759.
- Nagahama, Y., A. Takemura, K. Takano, S. Adachi and M. Kusakari. 1991. Serum steroid hormone levels in relation to the reproductive cycle of *Sebastes taczanowskii* and *S. schlegeli*. *Environ. Biol. Fishes*, 30, 31–38.
- 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.
- Park, M.H., I.J. Hwang, D.J. Kim, Y.D. Lee, H.B. Kim and H.J. Baek. 2005. Gonadal Development and sex steroid hormone levels of the yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 38, 309–315.
- Rahman, M.S., A. Takemura and K. Takano. 2000. Annual changes in ovarian histology, plasma steroid hormones and vitellogenin in the female golden rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Bull. Mar. Sci.*, 67, 729–740.
- Sun, B. and N.W. Pankhurst. 2004. Patterns of oocyte growth, vitellogenin and gonadal steroid concentrations in greenback flounder. *J. Fish Biol.*, 64, 1399–1412.
- Tsuruda, Y. and K. Hirose. 1989. Internal regulation of reproduction in Japanese anchovy (*Engraulis japonica*) as related to population fluctuation. *Can. Spec. Pub. Fish. Aquatic Sci.*, 108, 111–119.
- Yoon, S. J., D. H. Kim, H. G. Hwang, G. C. Song, and Y. C. Kim. 2007. Effects of water temperature, stocking density and feeding frequency on survival and growth in the oblong rockfish *Sebastes oblongus* larvae. *Korean J. Ichthyol.*, 19, 154–159.
- 勝田失郎. 1958. 胎生魚タケノコメバルの卵発生と子魚期. *日本誌*. 24, 475–479.

논문접수 : 2008년 9월 29일

심사완료 : 2008년 11월 14일

수정본 수리 : 2009년 1월 15일