

# 누에에서 생산된 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬이 암컷 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 성성숙 유도에 미치는 영향

김대근 · 김효원 · 김정현 · 이배익 · 홍선미<sup>1</sup> · 민관식<sup>2</sup> · 명정인 · 김대중\*

국립수산과학원 전략양식부 양식관리과, <sup>1</sup>경북해양바이오산업연구원, <sup>2</sup>한경대학교 생물정보통신대학원

## Induction of Sexual Maturation in Female Eels *Anguilla japonica* by Recombinant Eel Gonadotropin Produced in Silkworm

Dae-Geun Kim, Hyo-Won Kim, Jung-Hyun Kim, Bae-Ik Lee, Sun-Mee Hong<sup>1</sup>, Kwan-Sik Min<sup>2</sup>, Jeong-In Myung and Dae-Jung Kim\*

Aquaculture Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

<sup>1</sup>Department of Research and Development, Institute of Gyeongbuk Marine Bioindustry, Uljin 36315, Korea

<sup>2</sup>Animal Biotechnology, Graduate School of Future Convergence Technology, Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

This study investigated the effects of recombinant eel gonadotropin hormone (rJeGTH) produced in silkworms, with and without a carboxyl-terminal peptide from equine chorionic gonadotropin (eCG), on the induction of sexual maturation in female eels *Anguilla japonica*. Experiments were conducted both *in vivo* and *in vitro*. In *in vitro* trials, germinal vesicle breakdown (GVBD) induction did not significantly differ between rJeFSH and rJeFSH·eCG treatments and the control group. However, previous studies did find that rJeLH and rJeLH·eCG treatments induced GVBD in female eels. Our *in vitro* exploration of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) levels in immature ovarian tissues revealed significantly higher E<sub>2</sub> levels in the group treated with rJeFSH·eCG 1  $\mu$ g/mL than in the control group. In contrast, the *in vivo* experiments showed no effect of recombinant hormones on the sexual maturation of feminized eels. Previous studies and our own *in vitro* results have clearly shown that rJeGTH and rJeGTH·eCG have a positive effect on the sexual maturation of feminized eels. To develop the activity of rJeGTH *in vivo*, further studies should confirm circulation time and activity of these hormones in eels' bloodstream, modify the structure of the recombinant gene, and implement additional glycosylation.

Key words: Eel *Anguilla japonica*, Gonadotropin, Sexual maturation, Recombinant protein, Silkworm

### 서론

어류의 생식소 발달 및 성성숙은 뇌하수체에서 생산되는 두 종류의 생식소자극호르몬(gonadotropin, GTH), 즉 여포자극호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)과 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)에 의해 조절된다(Nagahama, 1994; Swanson et al., 2003). FSH와 LH는 공통의  $\alpha$ -subunit과 각 호르몬의 특성을 나타내는  $\beta$ -subunit으로 구성되어 있는 당단백질 호르몬으로서(Combarous, 1992) 각각의 특이적 수용체가 존재하는 생식소로 전달되어 그 기능을 나타낸다.

한편, 뱀장어는 인위적인 사육환경에서 뇌하수체의 GTH 합성능력이 부족하여 생식소 발달 및 성숙이 매우 어렵기 때문에 고농도의 외인성 호르몬제를 주기적으로 투여하여 성성숙을 유도하고 있다(Boëtius et al., 1962; Fontaine et al., 1964; Nagahama and Yamamoto, 1973). 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 경우, 고농도의 연어 뇌하수체 whole body를 균질화한 추출물(Salmon Pituitary Extract, SPE)을 반복 투여하여 성성숙을 유도하고 있지만(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Kagawa et al., 1997; Kim et al., 2006) 난질 및 수정률 저하, 기형어를 유발하는 것으로 알려져 있다(Shin, 2004). 이러한 이유

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0770>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(6) 770-776, December 2017

Received 16 November 2017; Revised 7 December 2017; Accepted 11 December 2017

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2430 Fax: +82. 51. 720. 2439

E-mail address: djkim4128@korea.kr

로 난질 개선 및 우량 수정란 확보를 통한 뱀장어의 안정적인 인공 종자 생산을 위해 대체 성성숙 유도 호르몬제 개발의 필요성이 대두되고 있다.

최근 생명공학 기술의 발전으로 무척추동물의 bioreactor 시스템을 이용하여 어류 재조합 성성숙관련 단백질을 생산할 수 있게 되었으며, 그 중에서도 누에를 외래 단백질 생산 시스템으로 사용하면 짧은 시간, 노동력 단축, 저가로 많은 양의 단백질을 생산할 수 있다는 보고가 있다(Maeda, 1994). 또한 다양한 어류들을 대상으로 성성숙에 미치는 재조합 GTH의 *in vivo/in vitro* 영향을 조사하여 재조합 시스템에서 생산된 성성숙관련 호르몬의 생물학적 활성평가가 수행되고 있으며 그 결과는 다양하다(Kamei et al., 2003; Vischer et al., 2003; Kazeto et al., 2008; Kobayashi et al., 2010; Choi et al., 2016; Kim et al., 2016). 더불어, 재조합 GTH (FSH와 LH)  $\beta$ -subunit의 carboxyl-terminal peptide (CTP) 길이와 당쇄부가에 따라 생물학적 활성과 반감기의 차이가 보고되었고(Klein et al., 2003; Cahoreau et al., 2015), 이에 재조합 성성숙 호르몬의 활성을 높이기 위한 방법으로 당단백질 호르몬 중 가장 무거운 당화를 가진 말 용모성 생식소자극호르몬(equine chorionic gonadotropin, eCG)의 CTP를 삽입한 재조합체의 생산 및 생물학적 활성이 평가되고 있다(Min et al., 2004; Legardinier et al., 2005; Kobayashi et al., 2010). 특히 우리의 앞선 연구에서 누에(*Bombyx mori*)를 이용하여 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬(rJeGTH, rJeFSH, rJeLH)과 eCG의 베타 사슬 C말단의 CTP가 삽입된 rJeGTH·eCG (rJeFSH·eCG, rJeLH·eCG)를 생산하였고, *in vitro* 실험을 통해 rJeLH 및 rJeLH·eCG가 뱀장어 난모세포의 최종성숙 유도에 효과적인 것으로 밝혀졌다(Choi et al., 2016).

따라서, 본 연구에서는 암컷 뱀장어의 *in vivo/in vitro* 성성숙 유도 실험을 통해 누에 재조합 시스템에서 생산된 4가지 타입의 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬(rJeFSH, rJeFSH·eCG, rJeLH, rJeLH·eCG)의 생물학적 활성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

실험어는 국립수산물연구원 내수면양식연구센터에서 사육중인 암컷화 유도 뱀장어 친어(feminized eel)를 사용하였다. 암컷화 유도 뱀장어는 Kim et al. (2013) 방법에 의해 실험뱀장어 단계에 E<sub>2</sub> 함유 배합사료를 경구 투여하여 암컷화를 유도하였고, 만 3년생 뱀장어를 선별하여 1일 5 psu씩 1주일간 해수에 점차적으로 적응시킨 후 1 ton 유수식 사육수조에 수용하였다. 실험기간 동안 먹이는 공급하지 않았고, 사육수온은 20±0.5℃를 유지하였으며 실험어의 안정을 위하여 검정색 덮개를 수조위에 설치하였다. 실험에 이용된 암컷화 유도 친어들은 개체별 관리를 위해 ID microchip (φ 2.1×12 mm)을 등 근육에 삽입하였고 식별은 mini potable reader (HS5900LF, DESTRON technolo-

gies, USA)를 이용하였다.

### 재조합 단백질 발현 및 생산

뱀장어 여포자극호르몬과 황체형성호르몬의 재조합 단백질 발현벡터 구축과 생산은 Choi et al. (2016)의 방법에 따라 pENTR11(invitrogen, USA)에 KOD-plus(TOYOBO, Japan)을 이용해서 PCR법으로 증폭된 FSH $\beta$ /GTH $\alpha$ , FSH $\beta$ /eCG/GTH $\alpha$ , LH $\beta$ /GTH $\alpha$ , LH $\beta$ /eCG/GTH $\alpha$ 를 NcoI과 NotI 제한효소 처리 후 클로닝 하였다. 클로닝 된 벡터는 pDEST8(invitrogen, USA) 발현 벡터에 LR 효소를 이용하여 형질 전환 후, BmNPV 균주에 재 형질전환하여 베쿨로바이러스를 완성하였다. 완성된 4가지 타입의 베쿨로바이러스는 BmN 세포에 감염하여 5일 후 상층액을 얻어 누에 감염에 사용하였다. 누에에 베쿨로바이러스를 주사한 후 4일째, 뱀장어 생식소자극 호르몬을 발현하는 누에의 혈액을 모아 3.5 MWCO (Thermo, USA)로 투석하여 동결건조 후 분말화하여 *in vivo* 실험에 사용하였다. 또한 *in vitro* 실험을 위해 누에 혈액을 Millex AA 실린저(Millipore, USA)로 필터링 후 FPLC 시스템(Healthcare, USA)에서 HiTrap TALON (Healthcare, USA) 컬럼을 이용해서 정제된 단백질을 동결건조하여 사용하였다.

### 난모세포배양 및 GVBD 조사

연어 뇌하수체 추출물(Salmon Pituitary Extract, SPE) 복강 주사에 의해 성성숙 유도된 만 3년생 암컷화 유도 뱀장어에서 성숙한 난모세포(난경 850-900  $\mu$ m)를 얻었으며, 24well plate에 1 mL/well의 배양액과 함께 난모세포를 20개/well로 분주하였다(n=6). 난모세포배양은 Kagawa et al. (1995)에 따라 L-15 medium (Sigma) (penicillin G sodium 70 mg/L, Streptomycin 100 mg/L, HEPES 10 mM, pH 7.4)을 제조하여 20℃에서 2시간 사전배양 하였고, 그 후 positive control로 SPE (1.0 mg/mL)와 17, 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP; 100 ng/mL; Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA)와 함께 누에(*B. mori*) 유충을 bioreactor로 하여 생산된 뱀장어 재조합 여포자극호르몬(Choi et al., 2016)인 rJeFSH와 rJeFSH·eCG을 각 well당 0.1, 1 그리고 1  $\mu$ g/mL 농도로 첨가하여 20℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 Serra's solution (70% Ethanol: Formalin: Acetic acid=6:3:1) (Stoekel, 2000)을 첨가하여 GV를 가시화한 후, 광학현미경(Image acquisition and analysis system, ZEISS, Germany)을 통해 GVBD를 관찰하였다.

### 난소조직배양 및 성호르몬 측정

선별된 만 3년생 암컷화 뱀장어를 2-phenoxyethanol (200 ppm)로 마취시킨 후 무균상태에서 난소를 적출하여 생식소 중량지수(gonadosomatic index, GSI; 생식소무게/체중)를 측정하였고, GSI가 2.1인 미성숙한 개체의 난소조직을 100 mg/well이 되도록 절편하여 1 mL/well의 배양액과 함께 24 well plate에 분주하였다(n=6). 난소조직배양은 Kagawa et al.

(1995)에 따라 L-15 medium (Sigma) (penicillin G sodium 70 mg/L, Streptomycin 100 mg/L, HEPES 10 mM, pH 7.4)을 제조하여, 20°C에서 2시간동안 사전배양을 진행한 후 rJeFSH, rJeFSH·eCG, rJeLH 그리고 rJeLH·eCG를 각 well당 0.1, 1 그리고 10 µg/mL 농도로 첨가한 후 20°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 배양액은 ELISA kit (DRG, Estradiol ELISA, EIA-2693)를 이용하여 estradiol-17β (E<sub>2</sub>) 농도를 측정하였다.

### in vivo 호르몬 투여

체중 450±50 g의 만 3년생 암컷화 유도 뱀장어를 대상으로 Eel Ringer's solution (250 µL/fish; 대조구), SPE (20 mg/fish), 4 µg/g BW 농도의 rJeFSH, rJeFSH·eCG, rJeLH 그리고 rJeLH·eCG를 각각 단독 투여한 실험구를 설정하였다(n=15/group). 또한 1-5주차에 rJeFSH (4 µg/g bw)를 투여하고 6-10주차에는 4 µg/g BW 농도로 rJeLH 및 rJeLH·eCG를 투여한 혼합 처리구도 설정하였다(n=15/group). 실험구별 호르몬처리는 매주 1회씩 10주간 실험어의 복강 내에 반복 주사하였고, 각 실험구별로 주사 5주째에 5마리씩, 10주째는 10마리씩 샘플링하여 혈액 채취, GSI 및 조직검사를 통한 난정을 조사하였다.

### 혈중 성호르몬 측정

혈액은 heparin이 처리된 1 mL 일회용 주사기(23G)를 이용하여 미부동맥에서 채혈한 다음 4°C, 4,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 ELISA kit (DRG, Estradiol ELISA, EIA-2693)를 이용하여 E<sub>2</sub> 농도를 측정하였다.

### 통계처리

통계처리는 분산분석 후, Duncan's new multiple range test 의

해서 유의성을 검정하였다(P<0.05).

## 결 과

### in vitro 뱀장어 재조합 여포자극호르몬(rJeFSH) 처리에 따른 GVBD 유도율 조사

rJeFSH 및 rJeFSH·eCG 처리에 따른 난모세포의 GVBD 율을 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과, DHP 및 SPE 처리구에서 GVBD 율이 95±2% 및 57±5%로 나타나 대조구(32±4%)보다 유의하게 증가하였으나(P<0.05), rJeFSH 및 rJeFSH·eCG 농도구배에 따른 난모세포 GVBD율의 두드러진 변화는 나타나지 않았다.

### in vitro 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬(rJeGTH) 처리에 따른 미성숙 난소조직 내 E<sub>2</sub> 생성 효과

미성숙 난소를 rJeGTH 및 rJeGTH·eCG로 처리하여 배양한 후 배양액의 estradiol-17β (E<sub>2</sub>)농도를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. rJeFSH 농도가 증가함에 따라 미성숙한 난소조직 내의 E<sub>2</sub> 생성도 증가하는 경향을 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다(P>0.05). 그러나 rJeFSH·eCG를 1 µg/mL 처리하였을 때 대조구보다 유의하게 E<sub>2</sub>농도가 증가하였다(P<0.05). 한편 rJeLH 및 rJeLH·eCG 처리에 따른 미성숙 난소 내 E<sub>2</sub>농도는 대조구와 두드러진 차이를 보이지 않았다.

### in vivo 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬(rJeGTH) 투여에 따른 GSI와 난정 변화

rJeGTH, rJeGTH·eCG 및 SPE를 미성숙한 뱀장어 암컷의 복강 내에 매주 1회씩 투여하고 주사 5주 그리고 10주후 GSI 변

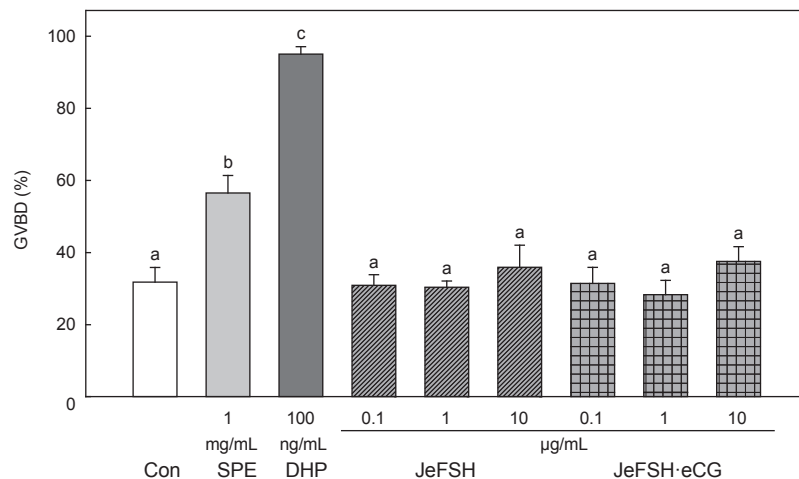


Fig. 1. *In vitro* effects of recombinant eel FSH (rJeFSH, rJeFSH·eCG) on germinal vesicle breakdown (GVBD) in oocytes of eel *Anguilla japonica*. Each value represents the mean and SEM (n=6). The different letters were statistically significant differences (P<0.05) according to Duncan's multiple range test. Con, hormone free medium; SPE, Salmon Pituitary Extract; DHP, 17, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one.

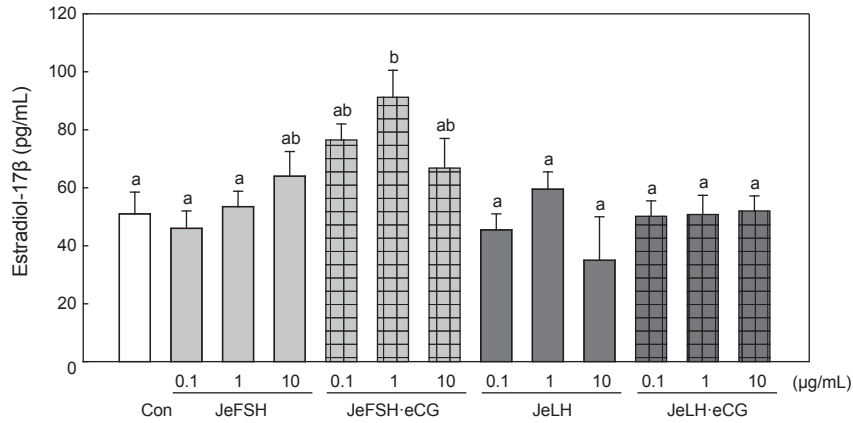


Fig. 2. *In vitro* effects of rJeGTH and rJeGTH·eCG on estradiol-17β (E<sub>2</sub>) levels in ovarian tissues of immature eel *Anguilla japonica*. Each value represents the mean and SEM (n=6). The different letters were statistically significant differences (P<0.05) according to Duncan's multiple range test. Con, hormone free medium.

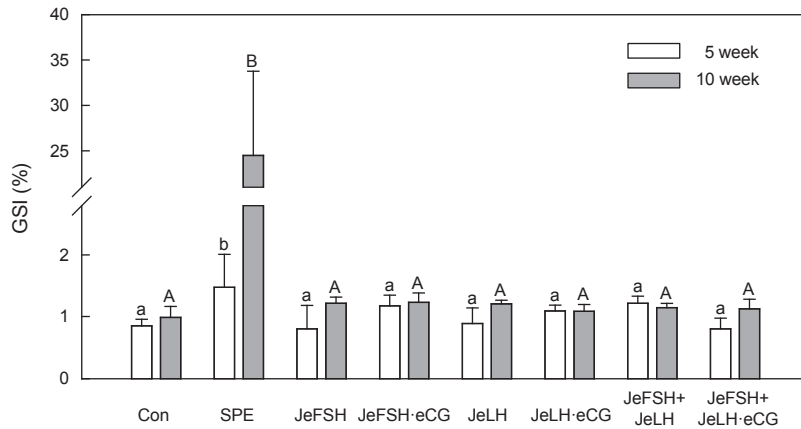


Fig. 3. *In vivo* effects of SPE, rJeGTH, rJeGTH·eCG and rJeFSH+rJeLH(·eCG) on GSI of female eel *Anguilla japonica*. rJeGTH(·eCG) or SPE were administered weekly into immature female eels for maximally 10 week. After 5 and 10 weeks, GSI was calculated. Columns and bars indicate the mean and SEM. Difference capital letters (10 week) and lowercase letters (5 week) above bars indicate statistical significance (P<0.05) according to Duncan's multiple range test. Con, Eel Ringer's solution; SPE, Salmon Pituitary Extract; GSI, gonadosomatic index.

화를 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 기존의 성성숙 유도호르몬제인 SPE를 처리한 실험구에서 주사 5주 및 10주후 대조구보다 GSI가 유의하게 증가하였으나(P<0.05), 다른 실험구에서는 두드러진 GSI 변화를 나타내지 않았다. Fig. 4는 rJeGTH, rJeGTH·eCG 및 SPE 투여에 따른 난경 변화를 나타내었다. 그 결과, SPE 처리구의 주사 5주 및 10주후 난경은 대조구보다 유의하게 증가하였으나(P<0.05), rJeGTH, rJeGTH·eCG 및 rJeFSH+rJeLH(·eCG) 투여에 따른 주사 5주 및 10주후 난경변화는 관찰되지 않았다.

### *in vivo* 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬(rJeGTH) 투여에 따른 혈중 E2 농도 변화

rJeGTH, rJeGTH·eCG 및 SPE 투여에 따른 혈중 E2 농도변화를 관찰한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과, SPE 처리구에서 주사 5주 및 10주후 혈중 E2 농도가 대조구보다 유의하게 증가하였으나(P<0.05), SPE 처리구를 제외한 모든 실험구에서 대조구와 비교하여 두드러진 혈중 E<sub>2</sub> 농도 변화가 관찰되지 않았다.

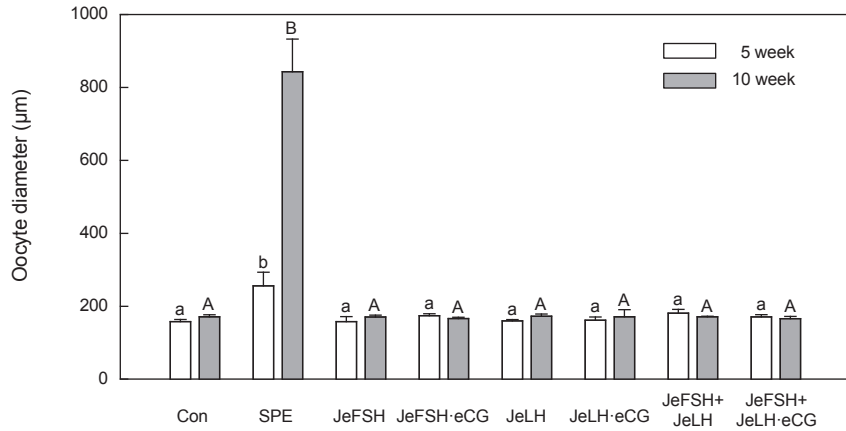


Fig. 4. *In vivo* effects of SPE, rJeGTH, rJeGTH·eCG and rJeFISH+rJeLH(·eCG) on oocyte diameter of eel *Anguilla japonica*. SPE, rJeGTH and rJeGTH·eCG were administered weekly into immature female eels for maximally 10 week. After 5 and 10 weeks, the oocyte diameters of each experimental group were measured. Columns and bars indicate the mean and SEM. Difference capital letters (10 week) and lowercase letters (5 week) above bars indicate statistical significance ( $P<0.05$ ) according to Duncan's multiple range test. Con, Eel Ringer's solution; SPE, Salmon Pituitary Extract.

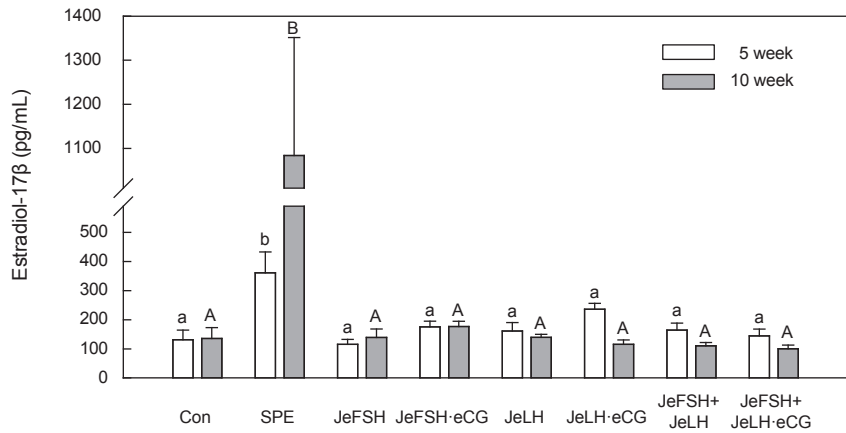


Fig. 5. *In vivo* effects of SPE, rJeGTH and rJeGTH·eCG on plasma estradiol-17β ( $E_2$ ) levels of female eel *Anguilla japonica*. SPE, rJeGTH and rJeGTH·eCG were administered weekly into immature female eels for maximally 10 week. After 5 and 10 weeks, plasma  $E_2$  levels of each experimental group were measured. Columns and bars indicate the mean and SEM. Difference capital letters (10 week) and lowercase letters (5 week) above bars indicate statistical significance ( $P<0.05$ ) according to Duncan's multiple range test. Con, Eel Ringer's solution; SPE, Salmon Pituitary Extract.

### 고 찰

뱀장어의 인위적 성숙속 유도를 위한 외인성 호르몬제 처리는 난질 저하의 원인으로 제기되었고(Shin, 2004), 이를 해결하기 위해 포유류세포(Chinese hamster ovary cell, CHO cell; Gregorio et al., 2011), 누에(*B. mori*; Kim et al., 2008; Choi et al., 2016) 및 효모(*Pichia pastoris*; Kasuto and Levavi-Sivan, 2005)등을 bioreactor로 활용하여 활성형 생식소자극호르몬의 생산 및 생물학적 활성평가가 진행되고 있다.

본 연구는 누에 재조합 시스템에서 생산된 4가지 타입의 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬(rJeFISH, rJeFISH·eCG, rJeLH, rJeLH·eCG)이 뱀장어 난모세포의 GVBD 유도과 미성숙 난소조직 내  $E_2$  생성에 미치는 *in vitro* 영향을 실험한 결과, rJeFISH·eCG 처리에 따른 미성숙 난소조직 내  $E_2$  생성이 증가하였으나, GVBD 유도에는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 1과 2). rJeLH 및 rJeLH·eCG 처리는 미성숙 난소조직 내  $E_2$  생성에 영향을 미치지 않았으나 우리의 앞선 *in vitro* 연구 결과에서(Choi et al., 2016) rJeLH가 뱀장어의 난모세포 최종성숙유

도에 효과적인 것으로 나타나 본 연구의 결과와 더불어 rJeFSH와 rJeLH는 *in vitro* 뱀장어 성성숙에 제각기 다른 역할을 수행하는 것으로 보여진다. 반면 동일한 누에(*B. mori*)를 bioreactor로 이용한 Kobayashi et al. (2008)의 연구 결과에 의하면, *in vitro* 실험에서 rJeLH뿐만 아니라 rJeFSH도 뱀장어 난모세포의 GVBD 율을 SPE처리와 유사하게 유도시킨다고 보고하였다. 이러한 결과의 차이는 동일한 누에 bioreactor를 이용하여 FSH와 LH를 생산하더라도 생산시스템 및 재조합체의 분자구조적인 차이 등으로 인해 민감성과 활성이 달라질 수 있음을 시사하며, 생산시스템 차이에 따른 재조합체의 생물학적 활성평가 등 추가적인 연구가 필요하다. 경골어류의 암컷에 있어서, 난황형성기(vitellogenesis)에 주요 스테로이드로 작용하는 E<sub>2</sub>는 난황전구단백질(vitellogenin) 유전자 전사를 촉진하여 난모세포의 난황형성을 진행하고(Nagahama et al., 1994; Kazeto et al., 2011), 뱀장어의 난모세포는 LH에 의해 여포층에서 성숙유도 호르몬(maturation inducing hormone)생산이 유도되어 최종성숙이 일어난다고 알려져 있다(Kagawa et al., 2013). 또한 LH 수용체의 활성은 FSH에 의한 것이 아닌 LH에 특이적임이 보고되었다(Kazeto et al., 2008). 따라서 본 연구의 *in vitro* 미성숙 난소조직 내 E2 생성 결과와 Choi et al. (2016)의 GVBD 유도 실험결과를 통해 rJeFSH 및 rJeFSH·eCG는 암컷 뱀장어의 초기 난소 발달에, rJeLH 및 rJeLH·eCG는 뱀장어 난모세포 최종성숙에 제각기 작용을 할 것이라 생각된다.

한편 *in vivo* 실험에서 암컷화 유도 뱀장어의 혈중 E<sub>2</sub>농도, 난모세포 발달 및 GSI에 미치는 rJeGTH의 두드러진 효과는 관찰되지 않았다. Legardinier et al. (2005) 연구에 의하면 재조합 GTH는 생체 내에서 빠른 대사적 제거(metabolic clearance)가 일어나므로 혈중 내 체류 시간을 연장하기 위해 재조합 단백질의 베타 subunit 말단에 충분한 탄수화물 사슬(carboxyl-terminal peptide, CTP)의 당화(glycosylation)가 이루어져야 한다고 보고하였다. 이에 Choi et al. (2016)은 말 용모성 생식소자극호르몬(equine chorionic gonadotropin, eCG)의 베타 사슬 C말단의 CTP 28개 아미노산을 rJeLH에 삽입한 rJeLH·eCG를 생산하여 뱀장어 암컷의 성성숙에 미치는 *in vitro* 효과를 확인하였으나, *in vivo* 효과는 본 연구에서 뚜렷한 영향이 없는 것으로 나타났다. 따라서, 효과적인 *in vivo* 성성숙 유도를 위해 본 연구의 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬의 혈액 내 체류 시간을 확인하고 재조합 분자의 구조적 수정, 생산 시스템 및 활성 평가 방법 보완 등 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

뱀장어의 인공종자생산은 Yamamoto and Yamauchi (1974)에 의해서 시도되어 그 가능성이 인정된 후 보다 효과적인 인위적 성성숙 유도에 관한 연구가 국내외에서 다양하게 진행되고 있다. 현재 암컷 뱀장어의 외인성 성성숙 유도 호르몬제로 사용하는 연어 뇌하수체 추출물(SPE)은 난질저하, 수정률 및 부화율의 감소, 기형어 유발 및 공급의 한계 등의 문제점이 있어, 보다 안정적인 뱀장어 인공종자생산을 위하여 대체 성성숙 유

도 기술개발이 요구된다. 이에 본 연구에서 이용한 누에 재조합 단백질 생산 시스템은 뱀장어 재조합 생식소자극호르몬의 대량생산, 활성형 단백질로서의 수정, 당쇄 부가 등이 가능하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 제시한 rJeGTH의 생물학적 활성은 *in vitro* 성성숙 유도효과가 확인되었으나 *in vivo* 효과는 미비하였다. 이는 본 연구에서 사용된 호르몬은 발현 누에 동결건조품의 정제되지 않은 호르몬이며, 보다 고농도로 정제된 호르몬의 투여에 대한 확인이 필요할 것으로 생각된다. 또한 누에 외래 단백질 생산 시스템을 비롯한 타 bioreactor를 이용한 단백질 생산 시스템 개발, 생산 시스템의 보완, 성성숙 호르몬의 구조 변화, 당쇄 부가 및 어류 체내의 호르몬 변화 양상을 확인하기 위한 추가연구가 진행되어야 할 것이다.

## 사 사

본 연구는 국립수산물과학원 연구사업(P2017020)의 지원을 받아 수행되었습니다.

## References

- Boëtius J, Boëtius I, Hemmingsen AM, Bruun AF and Møller-Christensen E. 1962. Studies of ovarian growth induced by hormone injections in the European and American eel (*Anguilla Anguilla* L. and *Anguilla rostrata* LeSueur). Medd Dan Fisk Havunders New Ser 3, 183-198.
- Cahoreau C, Klett D and Combarnous Y. 2015. Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunit'ancestors. Front Endocrinol (Lausanne) 6, 1-14. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2015.00026>.
- Choi JH, Kim DJ, Hong SM, Jo SJ, Min KS, Sohn YC, Lee JM and Kusakabe T. 2016. Molecular analysis and bioactivity of luteinizing hormone from Japanese eel *Anguilla japonica*, produced in silkworm. Biotechnol Bioproc E 17, 591-597. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-016-0042-7>.
- Combarnous Y. 1992. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to receptors. Endocr Rev 13, 670-691. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-13-4-670>.
- Fortaine M, Bertrand E, Lepez E and Callamand O. 1964. Gonadal maturation of female eel *Anguilla anguilla* and spontaneous emission of eggs in aquarium. CR Acad Sci Paris 259, 2907-2910.
- Gregorio M, Silvia Z, Iciar M, Berta C, Iago M, Evarisot M, and Ana G. 2011. Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (Fsh and Lh) produced in different host system. Biology of reproduction 84. 1171-1181. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.086470>.
- Kagawa H, Tanaka H, Ohta H, Okuzawa K and Hirose K. 1995. In vitro effects of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -

- dihydroxy-4-pregnen-3-one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 61, 1012-1015. <http://dx.doi.org/10.2331/fishsci.61.1012>.
- Kagawa H, Iinuma N, Tanaka H, Ohta H and Okuzawa K. 1997. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 64, 77-82. <http://dx.doi.org/10.2331/fishsci.64.77>.
- Kagawa H, Sakurai Y, Horiuchi R, Kazeto Y, Gen K, Imaizumi H and Masuda Y. 2013. Mechanism of oocyte maturation and ovulation and its application to seed production in the Japanese eel. *Fish physiol Biochem* 39, 13-17. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-012-9607-3>.
- Kamei H, Ohira T, Yoshiura Y, Uchida N, Nagasawa H and Aida K. 2003. Expression of a biologically active recombinant follicle stimulation hormone of Japanese eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast *Pichia Pastoris*. *Gen Comp Endocrinol* 134, 244-254. [http://dx.doi.org/10.1016/s0016-6480\(03\)00259-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0016-6480(03)00259-4).
- Kazeto Y, Tosaka R, Matsubara H, Ijiri S and Adachi S. 2011. Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *Steroid Biochem Mol Biol* 100, 193-201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2011.03.013>.
- Kazeto Y, Kohara M, Miura T, Miura C, Yamaguchi S, Trant JM, Adachi S and Yamauchi K. 2008. Japanese eel follicle-stimulating hormone (fsh) and luteinizing hormone (lh): production of biologically active recombinant fsh and lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biol Reprod* 79, 938-946. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.070052>.
- Kim DJ, Kim EH, Park Mw, Cho YC and Lim SG. 2006. Plasma sex steroid hormone profiles in artificially maturing wild eel, *Anguilla japonica*. *J Aquaculture* 19, 267-274.
- Kim DJ, Park DW, Sohn YC, Bae JY, Yoon SJ, Son MH, Kobayashi M and Han CH. 2008. Maturation induction by Manchurian trout recombinant gonadotropin hormone (mt-rGTH) in female eel, *Anguilla japonica*. *Dev Reprod* 12, 261-266.
- Kim DJ, Lee BI, Kim KK, Kim EO, Son MH and Seong KB. 2013. Effects of estradiol-17 $\beta$  on the feminization of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J life sci* 23, 998-1003. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2013.23.8.998>.
- Kim DJ, Park CW, Kim DW, Park HK, Byambaragchaa M, Lee NS, Hong SM, Seo MY, Kang MH and Min KS. 2016. Production and characterization of monoclonal antibodies against recombinant tethered follicle-stimulation hormone from Japanese eel *Anguilla japonica*. *Gen Com Endocrinol* 233, 8-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcn.2016.04.030>.
- Klein J, Lobel L, Pollak S, Lustbader B, Ogden RT, Sauer MV and Lustbader JWJ. 2003. Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist. *Human Reprod* 18, 50-56. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deg024>.
- Kobayashi M, Hayakawa Y, Park W, Banda A, Yoshizaki G, Kumamaru K, Kagawa H, Nagaya H and Sohn YC. 2010. Production of recombinant Japanese eel gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *Gen Comp Endocrinol* 167, 379-386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcn.2010.01.003>.
- Legardinier S, Dounor-Cerutti M, Decauchelle G, Combarous Y and Cahoreau C. 2005. Biological activities of recombinant equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (eLH/CG) expressed in Sf9 and Mimic insect cell lines. *Mol Endocrinol* 34, 47-60. <http://dx.doi.org/10.1677/jme.1.01624>.
- Maeda S. 1994. Expression of foreign gene in insect cells using baculovirus vectors. In: *Insect cell biotechnology*. Maramorosch K and McIntosh AH eds. CRC Press, Boca Raton, U.S.A., 1-31. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.002031>.
- Min KS, Hiyama T, Seong HW, Hattori N, Tanaka S and Shiota K. 2004. Biological activities of tethered equine chorionic gonadotropin (eCG) and its deglycosylated mutants. *J Reprod Dev* 50, 297-304. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd/50.297>.
- Nagahama Y and 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. <http://dx.doi.org/10.2331/suisan.39.585>.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 38, 217-229. <http://dx.doi.org/>
- 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, Spapporo, Japan, 3-20.
- Swanson P, Dickey JT and Campbell B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish physiol Biochem* 28, 53-59. <http://dx.doi.org/10.1023/b:fish.0000030476.73360.07>
- Vischer HF, Granneman JC, Linskens MH, Shulz RW and Bogerd J. 2003. Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J Mol Endocrinol* 31, 133-140. <http://dx.doi.org/10.1677/jme.0.0310133>.
- Yamamoto K and Yamauchi K. 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature* 251, 220-221. <http://dx.doi.org/10.1038/251220a0>.