



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

극동산 뱀장어
(*Anguilla japonica*)의 난모세포
발달에 따른 조직별 estrogen
수용체 mRNA 발현 특성

제주대학교 대학원

생물학과

현 지 연

2019년 8월

극동산 뱀장어 (*Anguilla japonica*)의
난모세포 발달에 따른 조직별
estrogen 수용체 mRNA 발현 특성

지도교수 김 세 재

현 지 연

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2019년 8월

현지연의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>이 선 령</u>	
위 원	<u>김 세 재</u>	
위 원	<u>최 성 훈</u>	

제주대학교 대학원

2019년 8월

mRNA Expression Patterns of Estrogen Receptors
during Oocyte Development of Eel,
Anguilla japonica

Ji-Yeon Hyeon
(Supervised by professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for degree of
Master of Science

AUGUST 2019

This thesis has been examined and approved.

Sun Ryung Lee

Thesis director, Sun-Ryung Lee, Prof. of Biology

Se Jae Kim

Sung Pyo HUR

(Name and signature)

2019. 6

Date

Department of Biology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목차

목차	I
List of Figures	III
List of Tables	IV
Abstract	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	
1. 실험어 및 호르몬 처리	8
2. SPE 호르몬 처리를 통한 성 성숙 유도	9
3. 조직학적 관찰	13
4. 혈중 성 호르몬 분석	14
5. Total RNA 추출 및 cDNA 합성	15
6. Real-time qRT-PCR (qPCR)	15
7. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH)	17
8. 통계분석	20

III. 결과

1. SPE 처리에 따른 난모세포 발달..... 21

2. 난모세포 발달단계에 따른 morphometric parameters..... 23

3. 난모세포 발달단계별 혈중 E2 농도 변화..... 27

4. 난모세포 발달단계별 ER mRNA 발현 변화..... 29

5. 망막 내 ERs subtype mRNA 조직 발현..... 32

IV. 고찰..... 35

참고문헌..... 41

요약..... 48

List of Figures

Figure 1. The biological life cycle of Japanese eel	6
Figure 2. Morphological change during silvering	7
Figure 3. Outline of the artificial maturation process	11
Figure 4. Formula to calculate eye index (EI)	12
Figure 5. Histological section of oocytes at different development stages during SPE treatment	22
Figure 6. Changes in morphometric parameters in female eel during artificial maturation	25
Figure 7. Eye index (EI) change in female eel during artificial maturation	26
Figure 8. Plasma levels of E2 in female eel during artificial maturation	28
Figure 9. The mRNA expression of ER α by real-time quantitative PCR	30
Figure 10. The mRNA expression of ER β by real-time quantitative PCR	31
Figure 11. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization of ER α mRNA in sexually immature and mature retina sections	33
Figure 12. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization of ER β mRNA in sexually immature and mature retina sections	34
Figure 13. Scheme diagram of this study	40

List of Tables

Table 1. Primer sets for Real-time qRT-PCR.....	16
Table 2. ER α probe sets for Fluorescence <i>in situ</i> hybridization.....	18
Table 3. ER β probe sets for Fluorescence <i>in situ</i> hybridization.....	19
Table 4. Gonadosomatic index (GSI), oocyte diameter (OD), eye index (EI) changes in the female Japanese eel after intraperitoneal injections of SPE.....	24

Abstract

During the long migration from river habitats to the spawning ground, the Japanese eel undergoes sexual maturation. This spawning migration occurs concurrently with morphological changes, such as increases in eye size; however, the mechanisms by which sex steroids and their receptors influence these changes in peripheral tissues remain unclear. The aim of this study was to investigate changes in the eyes of female Japanese eels during sexual maturation, and our research focused on estrogen receptor (ER) α and ER β transcripts. During ovarian development, the gonadosomatic index increased and yolk-laden oocytes developed rapidly. These changes occurred in conjunction with a steady increase in plasma levels of estradiol-17 β (E2). Concomitant increases in transcript levels of ER α and ER β in eye, brain, pituitary, and ovary were also observed. Fluorescence *in situ* hybridization analyses revealed that ER α and ER β transcripts were present in the choriocapillary layer and photoreceptor layer of the eyes, and the analysis also revealed that their signals in these layers became stronger in mature females compared to those observed in immature females, suggesting that under the influence of gonadotropins, morphological changes in the eyes are regulated by E2 through the activation of its receptors. In conclusion, E2 plays a crucial role in physiological adaptations that occur in peripheral tissues during the spawning migration.

I. 서론

경골어류의 번식내분비 활성화는 기존에 알려진 다른 척추동물과 마찬가지로 뇌-뇌하수체-생식선 축(Brain-Pituitary-Gonad axis, BPG axis)으로 이루어진 생식내분비계에 의해 지배된다(Pankhurst, 1998). 특히 암컷 경골어류의 번식내분비 활성화는 뇌 시상하부에서 합성 분비되는 생식선자극호르몬 분비호르몬 (GnRH, gonadotropin releasing hormone)의 자극으로 뇌하수체에서 생식선자극호르몬 [gonadotropins, GtHs; follicle stimulating hormone (FSH)와 luteinizing hormone (LH)]의 합성과 분비를 통해 조절된다. 뇌하수체 전엽에서 합성 분비된 GtHs는 혈액으로 방출되어 난소의 여포 세포를 자극하여 성 호르몬 (sex steroid)의 합성에 직간접적으로 영향을 미친다. 일반적으로 경골어류의 성 호르몬 중 estradiol-17 β (E2)는 난소의 과립막 세포에서 aromatase의 촉매 활성을 통해 testosterone으로부터 전환된다(Chaube et al. 2015; Li et al. 2007).

어류에서 E2는 암컷의 번식 주기를 조절하는 중요한 역할을 한다(Fostier et al. 1978). E2에 대한 생식선 반응은 종과 실험조건에 따라 다양하게 나타나지만, 기본적으로 암컷의 난모세포 발달 및 난황 형성에 직접적으로 관여한다고 알려져 있다(Fostier et al. 1987). 난모세포 발달은 뇌하수체에서 GtHs 자극을 받은 난소의 여포 세포에서 E2가 분비되고 이후 간으로 전달되어 난황단백질인 vitellogenin을 생산하기 시작한다(Ng and Idler, 1983; Nagahama et al. 1993). 무지개송어(*Salmo gairdneri*)를 대상으로 한 연구에서는 혈중 E2와 vitellogenin의 분비양상이 일치하였다(Bromage et al. 1982). 혈중 E2 농도는 난황 형성 후기 단계까지 증가하였지만 난핵포붕괴(germinal vesicle break down) 단계에서는 감소하는 경향을 보였다(Fostier and Jalabert 1986). Brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*)는 산란 직후 혹은 휴지기보다 산란 직전과 산란기에 혈중 E2 농도가 높았다(Burke et al. 1984). 이러한 연구들은 어류 종마다 난소발달에 따른 E2의 분비 경향이 조금씩 다르게 나타나지만 결국 혈중 E2의 분비가 난모세포 발달에 직접적인 영향을 미치는 것임을 암시한다.

E2의 조직 특이적 반응은 핵수용체 superfamily에 속하는 estrogen receptor (ER)와 E2의 반응에 의해 기능적으로 영향을 받는다(Hojo et al. 2004; Holloway and Clayton. 2001). ER subtype에 대한 기존의 연구는 포유류의 경우, 두 종류의 ER subtype(ER α 와 ER β)이 동정되었고(Planey et al. 2014; Paterni et al. 2014), 경골어류는 세 종류의 ER subtype(ER α , ER β 1 그리고 ER β 2)이 동정되었다(Pakdel et al. 1991; Chen et al. 2011; Nagler et al. 2012; Mu et al. 2013; Lafont et al. 2016). 암컷 어류의 성 성숙 과정에서 뇌하수체를 포함한 뇌, 간 그리고 난소에서 ERs 전사체 발현이 증가된다. 간에서 ERs 전사체 발현량 변화는 일반적으로 경골어류의 vitellogenin 합성 조절과 밀접한 관련이 있다고 보고되었다(Mu et al. 2013; Nelson et al. 2007). 무지개송어 난소의 ERs mRNA 발현은 난소의 과립막 세포 크기 변화에 영향을 미친다는 보고가 있다(Nagler et al. 2000). 이 연구 결과는 성 성숙 과정에 직접 작용을 하는 E2를 조절하기 위해 난소 조직에 ER-mediated signaling pathway가 존재한다는 것을 보여주고 있다(Nagler et al. 2000). 그러나 성 성숙과 관련하여 난소를 제외한 다른 말초조직 및 신경조직에서 ER-mediated signaling pathway의 생리학적 중요성은 언급된 바 없다(Mu et al. 2013).

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)는 생태학적으로 강하성 어류이며 동북아시아 지역에서 산업적으로 중요한 어종이다(Tsukamoto, 1990). 현재까지 이 종의 양식 산업화를 위한 대량생산 연구가 동북아지역을 중심으로 활발히 진행되고 있으나 종묘생산을 포함한 양식기술이 아직 개발되지 않았다. 현재까지 알려진 극동산 뱀장어의 생태는 다른 어류들에 비교해서 상대적으로 복잡하다. 극동산 뱀장어의 유생 성장, 유생 기간, 변태와 같은 초기 생활사에 관한 연구들은 알에서 부화한 뱀장어(leptocephalus)가 실뱀장어(Glass eel)로 변태 후 강이나 호수와 같은 담수 지역으로 이주한다고 보고하였다(Tsukamoto, 1990, 1992; Tzeng, 1990; Cheng and Tzeng, 1996; Arai et al, 1997). 실뱀장어는 담수 지역으로 이주를 한 후 체색이 황색으로 변하는 형태적인 변화(황뱀장어, yellow eel)를 겪는다. 이때 뱀장어는 성적으로 미성숙한 개체로 산란장으로 추측되는 마리아나 해구 부근으로 산란 회유를 개시하기 전까지 생식 활성이 일어나지 않는다. 황뱀장어는 약 5에서 15년 정도 담수 지역에서 성장기를 거친 후 산란을 위해 강하를 개시한다. 산란

장으로 회유를 개시한 극동산 뱀장어는 이 시기부터 번식을 위해 생식세포들이 발달하기 시작하고(Tsukamoto. 1992; Aoyama. 2009; Aoyama et al. 2014), 이와 동반되어 체색이 은색(은뱀장어, silver eel)으로 변화하고 눈이 커지는 형태적인 변화가 나타난다(Aoyama and Miller, 2003; Han et al, 2003a)(Figure 1과 Figure 2). 하지만 극동산 뱀장어를 포함한 뱀장어과(Anguillid)에서 산란 회유와 관련한 생태학적 변화와 이에 동반되는 생리학적 연구는 현재까지 보고된 바 없다. 이러한 생태학적인 이유로 자연 상태에서 성 성숙한 개체를 포획하기가 불가능하므로 이 종을 대상으로 한 연구는 매우 제한적이다. 특히 산란 회유 그리고 성 성숙 과정이 진행되는 기전에 대해 명확하게 밝혀지지 않았다(Kagawa. 2013). 자연에서 채포하는 실뱀장어의 자원량은 최근 국제적으로 급격한 감소세를 보이는 실정으로 2014년에 국제자연보호연맹(International Union for Conservation of Nature)에서 Red List로 분류되었다(<https://www.iucnredlist.org>). 이러한 문제를 해결하기 위해서 한국 및 유럽연합(EU), 일본 그리고 대만에서 자원회복을 위한 종묘생산 연구가 진행되고 있다. 인위적인 사육환경에서 Anguillid의 성 성숙 유도는 암컷의 경우 Salmon pituitary extracts (SPE), 수컷의 경우 hCG (human chorionic gonadotropin)와 같은 외인성 호르몬을 장기간 처리하여 성 성숙을 유도하고 있다(Kagawa. 2013). 또한, 최근에는 극동산 뱀장어 특이적 재조합 gonadotropins의 투여로 암컷 뱀장어 성 성숙 유도에 성공하였다(Kobayasi et al. 2010). 하지만 이러한 방법들은 성 성숙 유도 성공률이나 수정률이 낮은 문제점이 제기되고 있다.

극동산 뱀장어는 성 성숙 과정 중에 눈 크기가 증가하는 형태적인 변화를 동반한다(Han et al. 2003a; Beullens et al. 1997; Pankhurst. 1982; Okamura et al. 2007; Okamura et al. 2008). Sudo *et al.* 2012는 암컷 극동산 뱀장어의 난소 내 난황 형성 시기 초반에 경골어류에서 응성호르몬으로 작용을 하는 11-ketotestosterone (11-KT)가 일시적으로 증가한다고 보고하였다. 이는 결국 눈 크기의 증가가 성 성숙 과정 중에 분비되는 성 호르몬의 영향에 의한 것으로 추측하고 있다. 암컷 극동산 뱀장어 또한 일반 경골어류와 같이 난황 형성 초기부터 혈중 E2가 증가할 것으로 추측하고 있지만 극동산 뱀장어를 포함한 Anguillid를 대상으로 성 성숙 전 과정 연구는 극히 제한적이다. 특히 성 호르몬인 E2는

암컷 특이적인 자성호르몬으로써 경골어류의 성 성숙에 직접적으로 영향을 미치지 않지만, 난소에서 분비된 E2가 신경조직 이외의 말초조직에서의 생리학적 역할에 대해서는 연구가 부족한 실정이다.

따라서 이 연구는 뱀장어 암컷에서 성 성숙 과정 중의 BPG axis의 변화에 따른 E2의 작용기전을 규명하고자 수행하였다. 성 성숙에 따른 혈중 성 호르몬의 함량 변화를 enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)를 통해 조사하였고 또한 신경조직(뇌), 말초조직(뇌하수체, 난소, 눈)에서 두 종류의 ERs subtype mRNA의 발현 양상을 real-time qPCR을 통해 조사하였다. 그리고 성 성숙 과정 중의 눈의 크기 변화에 따른 망막에서 ERs subtype mRNA 발현을 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 방법을 통해 조사하였다.

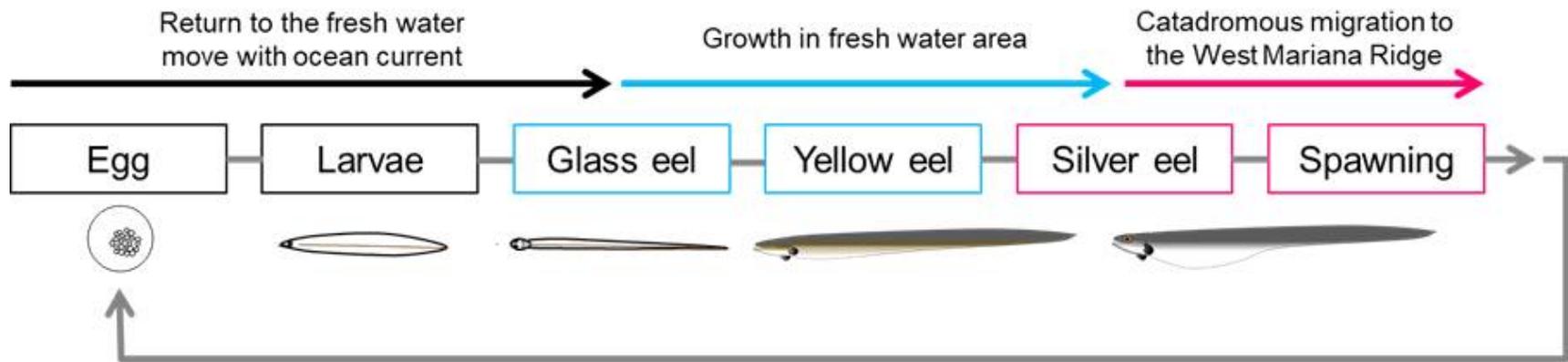


Figure 1. The biological life cycle of Japanese eel.



Figure 2. Morphological change during silvering. (A) Yellow eel, (B) Pre-silver eel, (C) Silver eel.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 호르몬 처리

극동산 뱀장어의 채집은 산란 회유를 개시하는 9월에서 10월 사이에 실시하였다. 실험어는 제주도 하도리(33°N, 126°E)에 위치한 담수와 해수가 만나는 지역에서 일몰 무렵부터 야간까지 그물과 통발을 이용하여 채집되었다. 채집된 개체들은 제주테크노파크 용암해수사업단 내 해양생물사육시설로 이동하여 실험에 이용하기 전까지 사육하였다. 채집된 개체들은 순치를 위해 아크릴 재질의 담수 수조(1 ton/ 유효수량)에서 사육하였다. 사육 시스템은 완전순환여과방식을 이용하였고 수조의 수온은 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 사육 수조의 광주기 조건은 백열등을 이용하여 명기 12시간 그리고 암기 12시간을 유지하였다(10W, 600 lx, PPFD= $10.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\lambda_p = 545 \text{ nm}$) (LD = 12:12, light-on= 06:00 h and light-off= 18:00 h). 실험어 사료는 실험이 종료 시까지 급이 하지 않았다.

2. SPE 호르몬 처리를 통한 성 성숙 유도

성 성숙 유도를 위해 담수 사육 수조에서 최소 일주일간 순치된 실험어를 대상으로 사육 수조 내 사육수를 담수에서 해수로 전환하였다. 해수 순치를 위한 사육수의 전환은 해수 순치 시작부터 총 7일간 사육수의 염분농도를 일 10~20%씩 교환하였으며 7일째 사육수조 내 사육수의 염분이 34.0%가 되도록 교환하였다. 사육 수조는 완전순환여과방식을 이용하였고 실험 기간 동안 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 사육 수조의 광주기 조건은 백열등을 이용하여 명기 12시간 그리고 암기 12시간을 유지하였다(10W , 600 lx , $\text{PPFD} = 10.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda_p = 545 \text{ nm}$) ($\text{LD} = 12:12$, light-on at 06:00 h and light-off at 18:00 h). 모든 실험어는 개체별 추적을 위해 해수 순치 직후 MS-222 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 마취시킨 후 개체별 체중을 측정하고 ID 칩을 삽입하였다. 성 성숙 유도를 위해 사용한 연어 뇌하수체 추출물(SPE)은 일본 Ryukyus 대학의 Akihiro Takemura 교수로부터 제공받았다. SPE 제조하기 위해 연어 뇌하수체를 100% Aceton (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)에서 3일간 탈수 후 Homogenizer (T10-Basic, IKA Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 연어 뇌하수체는 24시간 동안 실온에서 건조한 후 실험에 이용할 때까지 -20°C 에 보관하였다. SPE는 생리식염수에 희석 후 1주일 간격으로 $20 \text{ mg/BW}\cdot\text{kg}^{-1}$ 의 농도로 복강에 주사하였다(Figure 3). 성 성숙 유도 정도를 확인하기 위해 ID-chip 판별기를 이용하여 개체의 증체량 변화를 매주 조사하였고 증체량의 변화를 통해 성 성숙 정도를 확인하여 샘플링을 시행하였다.

성 성숙 단계별 샘플링은 2주 간격으로 총 4회 실시하였다. 샘플링은 실험어를 0.05%의 MS-222를 이용하여 마취한 후 체중(g)을 측정하였고 버니어 캘리퍼스를 이용하여 눈의 직경(mm)을 측정하여 눈의 크기지수(Eye Index; EI)를 산출하였다. 혈액은 마취된 실험어 미부의 정맥에서 heparin 처리된 주사기를 이용하여 채취하였으며, 즉시 원심분리기를 통해 혈장을 분리($8000 \times \text{g}$, 10분, 4°C)하였다. 분리된 혈장은 실험에 이용하기까지 -80°C 에서 보관하였다. 혈액 채취 후 실험어는 칼을 이용해 척추를 잘라 즉살시킨 후 눈, 전뇌, 뇌하수체, 난소를 적출하였다.

적출한 난소는 생식선중량지수(gonadosomatic index; GSI)를 구하기 위해 무게(g)를 측정하였다. 적출한 조직들은 분석에 사용할 때까지 -80°C 에 보관하였다. 암컷 난모세포 발달단계별 GSI와 EI는 아래와 같이 산출되었다.

$$\text{GSI} = (\text{생식선 무게} / \text{체중}) \times 100$$

$$\text{EI} = \{[(D_h + D_v) / 4]^2 \times \pi / \text{TL (mm)}\} \text{ (Figure 4)}$$

D_h 는 눈의 horizontal orbital diameter (mm), D_v 는 눈의 vertical orbital diameter (mm)

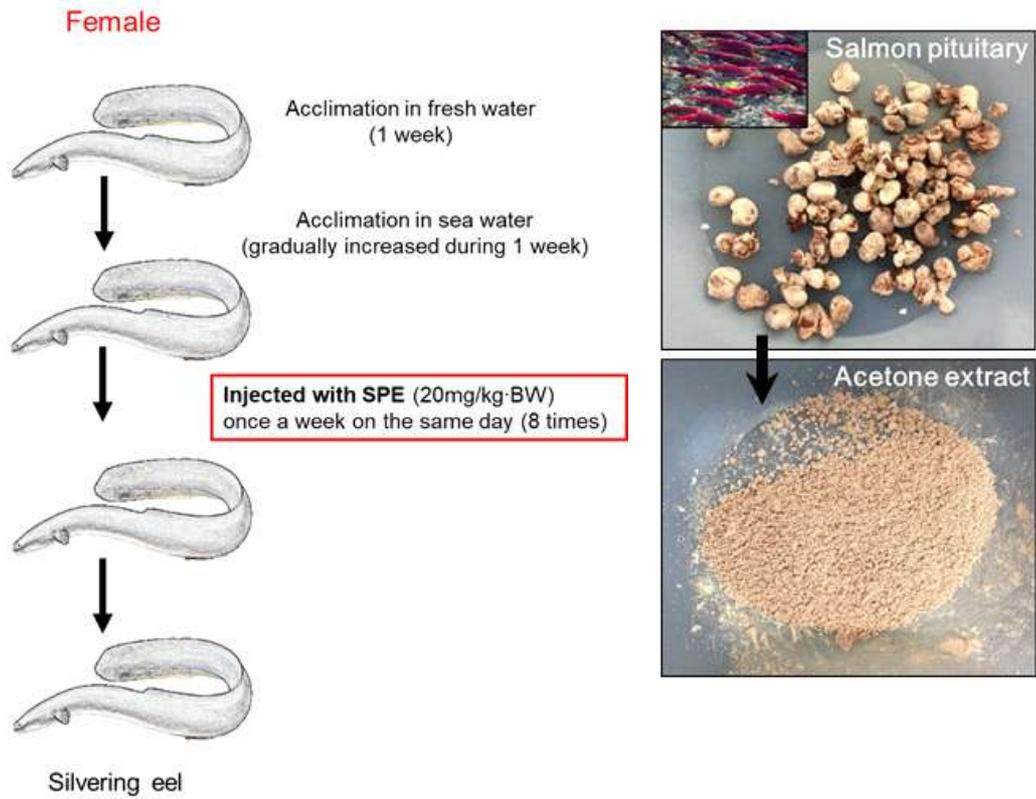
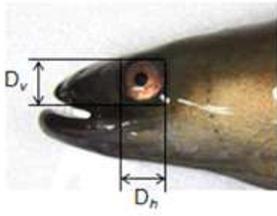


Figure 3. Outline of the artificial maturation process.



D_h : horizontal orbital diameter

D_v : vertical orbital diameter

$$\text{Eye index (EI)} = \{[(D_h + D_v)/ 4]^2 \times \pi/ \text{TL (mm)}\}$$

Figure 4. Formula to calculate eye index (EI).

3. 조직학적 관찰

난모세포 발달단계 변화는 조직학적 방법을 이용하여 분석하였다. 적출된 난소는 Bouin's solution에 24시간 고정하였다. 고정된 조직은 증류수로 수세한 후 에탄올을 이용하여 농도 단계별로 탈수 과정을 거쳤다. 조직 샘플은 파라핀 포매하여 블록을 제작하였다. 파라핀 블록은 7-8 μm 두께로 절편 하였다. 제작된 절편은 Mayer's hematoxylin과 0.5% eosin을 이용하여 비교 염색하였다.

4. 혈중 성 호르몬 분석

혈중 E2 농도는 Asahina *et al.* 1995가 보고한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 측정하였다. 각 혈장 샘플(100 μ L)은 3배 용량(300 μ L)의 diethyl ether 첨가 후 드라이아이스에서 상층에 분리된 지질층만을 새 glass tube 에 옮기는 과정을 2~3회 반복하였다. 분리된 상층액은 원심농축기(VEC-310, EYELA, Tokyo, Japan)에서 증발시킨 후 50 mM borate buffer (pH 7.8, containing 0.5% bovine serum albumin) 100 μ L를 첨가하였다. 96-well plate의 blank well을 제외한 모든 well은 50 mM carbonate buffer (pH 9.6)에 희석된 Affinipure goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) 100 μ L (15 μ g/mL)를 분주하여 4°C에서 2시간 반응하여 코팅하였다. 항체가 코팅된 plate는 Immuno Wash 1575 microplate washer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 0.05% Tween (PBS-Tween)이 포함된 10 mM PBS로 3회 세척하였다. E2 standard (Sigma-Aldrich; 12.8-0.025 ng/mL) 그리고 혈장 샘플 50 μ L, steroid labeled with horseradish peroxidase (Cosmo-Bio, Tokyo, Japan) 50 μ L, rabbit anti-E₂ antibody(Cosmo-Bio) 50 μ L를 각 well에 분주하고 20°C에서 2시간 반응시켰다. PBS-Tween으로 3회 세척 후 0.01% o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich)와 0.04% H₂O₂를 녹인 0.2 M citrate buffer (pH 4.5) 100 μ L를 각 well에 첨가하였다. Plate는 암흑조건의 실온에서 30분간 반응시켰고 4 N H₂SO₄ 25 μ L를 첨가하여 반응을 중지하였다. 흡광도는 microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)에서 450nm의 파장으로 혈중 E2 농도를 측정하였다.

5. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

적출한 좌측 눈, 뇌, 뇌하수체, 난소는 RNA-iso Plus (Takara Bio, Otsu, Japan)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. Genomic DNA contamination을 피하고자 추출된 total RNA(1 µg)는 DNase I (Promega, Madison, WI, USA)를 처리하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. Total RNA의 정성 및 정량 분석은 NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA)을 이용하여 A260/A280에서 분석하였다. Total RNA 정성분석에서 A260/A280 ratio가 1.8-2.0인 샘플을 대상으로 cDNA 합성을 진행하였다. cDNA 합성은 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)를 사용하였다.

6. Real-time qRT-PCR (qPCR)

ER mRNA 발현량은 Dice real time thermal cycler (Takara Bio)와 SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara Bio)를 이용하여 분석하였다. Target gene에 대한 RT-PCR primer는 ER α (GenBank Accession No. HM545084.1), ER β (AB003356.1)을 사용하였고 reference gene은 Ef1 α (MH020210)을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다(Table 1). SYBR Premix 5 µL와 0.2 µM의 forward와 reverse primer, 50 ng의 cDNA template를 혼합하여 95°C에서 5 sec. denaturation, 60°C에서 30 sec. annealing과 extension 조건으로 40 cycle 증폭하였다. Target gene에 대한 상대적인 mRNA 발현량은 $\Delta\Delta\text{Ct}$ method를 이용하여 산출하였다.

Table 1. Primer sets for Real-time qRT-PCR.

Gene (Accession No.)	Primer	Oligo	Product size (bp)
Efl α (MH020210)	Forward	5'-TCACCCTGGGAGTAAAGCAG-3'	222
	Reverse	5'-TCCATCCCTTGAACCAGGAC-3'	
ER α (HM545084)	Forward	5'-TGATCGCTTGGGCTAAGAAAGT-3'	209
	Reverse	5'-GTCGAAAATCTCGGCCATGC-3'	
ER β (AB003356)	Forward	5'-AAGTACACCTGCTGGAGTGC-3'	220
	Reverse	5'-AGGCACACATACTCCTCCCT-3'	

7. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

FISH 방법을 이용하여 미성숙 개체와 성숙 개체의 망막 조직 내 ER subtypes mRNA 발현을 확인하였다. 실험어의 우측 눈은 4% paraformaldehyde에 24시간 동안 고정하였다. FISH는 Stellaris RNA FISH (Biosearch Technologies, Novato, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 실험에 사용한 RNA probe (Table 2와 Table 3)는 CAL Flour Red 590이 label된 극동산 뱀장어의 ER α and ER β 서열들을 이용하여 디자인하였다. 망막 조직은 4% paraformaldehyde 용액에 24시간 고정하였다. 고정된 조직은 에탄올을 이용하여 농도 단계별로 탈수 과정을 거친 후 파라핀 포매하였다. 파라핀 블록은 7-8 μm 두께로 절편 하여 표본을 만들었다. 절편 표본은 xylene을 이용하여 탈파라핀 후 에탄올을 이용하여 농도 단계별로 함수 과정을 거쳤다. 절편 표본은 실온에서 1시간 동안 70% ethanol에 담근 후 5분간 1x PBS로 수세하였다. 37°C의 proteinase K solution (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K in 1x PBS)에 20분간 반응 후 1x PBS에 5분, wash buffer에 5분간 수세하였다. 각 조직 절편은 100 μL 의 probe (125 nM)가 혼합된 hybridization buffer를 조직 절편 위로 분주하고 37°C에서 12시간 암흑조건으로 반응시켰다. 반응 시간 후 조직 절편은 암흑조건에서 wash buffer A를 이용하여 37°C에서 30분간 세척 후 37°C의 5 ng/mL DAPI (Sigma-Aldrich)가 혼합된 wash buffer에서 암흑조건으로 30분간 염색하였다. 마지막으로 wash buffer에서 5분간 blocking 후 50 μL 의 VectaMount AQ Aqueous Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 봉입하였다.

Table 2. ER α probe sets for fluorescence *in situ* hybridization.

Gene (Accession No.)	Probe Sequence (5' to 3')
ER α (HM545084)	ATGATCGCTTGGGCTAAGAA
	AGTACCCGGGTTCCAGGAGC
	TGTCGCTCCACGACCAGGTG
	CAGCTGCTGGAGAGCTCCTG
	GCTGGAGGTGCTGATAATCG
	GGCTGGTGTGGCGCTCCATC
	CACAGCCCCGGAAAGCTCCT
	GTTTCGCCCAGGACCTGATCC
	TGGACAGGAACGAGGGCAGC
	TGCGTGGAGGGCATGGCCGA
	GATTTTCGACATGATCCTCG
	CCACCGTCGCCCCGGTTCCGC
	GCTCTCAAGCTGAAGTCCGA
	GGAGTTCGTCTGCCTCAAGG
	CCATCATACTGCTCAACTCC
	GGTGCCTTCCCCTTCTGCAC
	CAGCTCTGTGGAGCCCCTGA
	ACGACAGCTTTACGGTGCAG
	TGCATGCTGGATAAGATCAC
	GGACACCCTCATATATTACA
	TCAGCAAGTCGGGGCTGGCG
	GTCCAGCAGCAGTCCAGGAGG
	CAGGCGCAGCTGCTCCTGCTG
	CTCTCGCACATACGACACATG
	AGCAACAAAGGCATGGAGCA

Table 3. ER β probe sets for fluorescence *in situ* hybridization.

Gene (Accession No.)	Probe Sequence (5' to 3')
ER β (AB003356)	TGAAGCTGCAGGAGAGGTAG TTATACATGGTGGGCAGCAA CAGAAGAGGGAGGGGCTGAG ACACGGCACAGAAGTGCATG GATGCTCCTCTTGAAGAAGG TTCTTGTCGATGGTGC ACTG ACTTCGTAGCACTTGCGGAG TCACACCACACTTCATCATG ATGCGGTTGATTA ACTGCTC CTTTCATGAGGTAGATCTCCG TCGGTGAAGGGCTTCTTCAG GTTGGTGAGTGACATCATCA CAGCTGATCATGAGGACGAG CAAACCCAGGGATCTTTTTG AGGTGTA CTTGGTCAGACAG AAAGATGAGTTTCCCAGGGT CTGTTGAGCTTGAGGTCTGG ACCATGTCGAAGATTTCCAG TG TAGCTTCAGCTCCCGAAA TTTGAGGCACACATACTCCT TGGGGTTGAGGAGGATAATG TCGCTAGACGTTGTGCACAG GACTGCTGCTGAAAGGTCAG TATTACTGAGGTGGCGGATG CTCTTCATGTTGGACAGGTG AGGAGTACGACCGCCGACATG TAGATGGTACTGCTTTCCTT

8. 통계 분석

모든 통계분석은 GraphPad prism 8.0.2 Software를 사용하였다. 암컷 극동산 뱀장어의 난모세포 발달단계별 혈중 E2 농도, morphological index (GSI, EI), ERs mRNA 발현 변화는 Tukey multiple comparison test (One-way ANOVA)로 유의성 검정을 시행하였다. 모든 data는 box-whiskers format으로 나타냈으며 box 안 band는 50% 백분위수, box의 양 끝 band는 각각 25, 75% 백분위수, whisker는 최솟값과 최댓값 그리고 점은 평균값을 나타낸다.

Ⅲ. 결 과

1. SPE 처리에 따른 난모세포 발달

난모세포 발달은 광학현미경으로 난소 조직을 관찰한 후 총 다섯 단계로 분류하였고(Figure 5) 유럽산 뱀장어(European eel; *Anguilla anguilla*)에서 보고된 난모세포 발달단계 분류를 참조하여 아래와 같이 분류하였다(Pérez et al. 2011).

- Stage 1: 주변인기단계 난모세포 관찰 (미성숙단계; immature stage; Figure. 5a, n=8).
- Stage 2: 난모세포의 세포질 가장자리 주변으로 난황을 축적하기 시작, 유구기 난모세포와 난황구기 난모세포 관찰 (초기 난황형성기; early vitellogenic stage; Figure. 5b, n=13).
- Stage 3: 난모세포의 핵 주변에 난황이 축적 개시, 다양한 크기의 난황구가 관찰(중기 난황형성기; mid vitellogenic stage; Figure. 5c, n=8).
- Stage 4: 난모세포 전체에 난황구들이 관찰(후기 난황형성기; late vitellogenic stage; Figure. 5d, n=6).
- Stage 5: 핵이 난모세포의 중앙에서 동물극으로 이동하기 시작(최종성숙단계; final maturation stage; Figure. 5e, n=6).

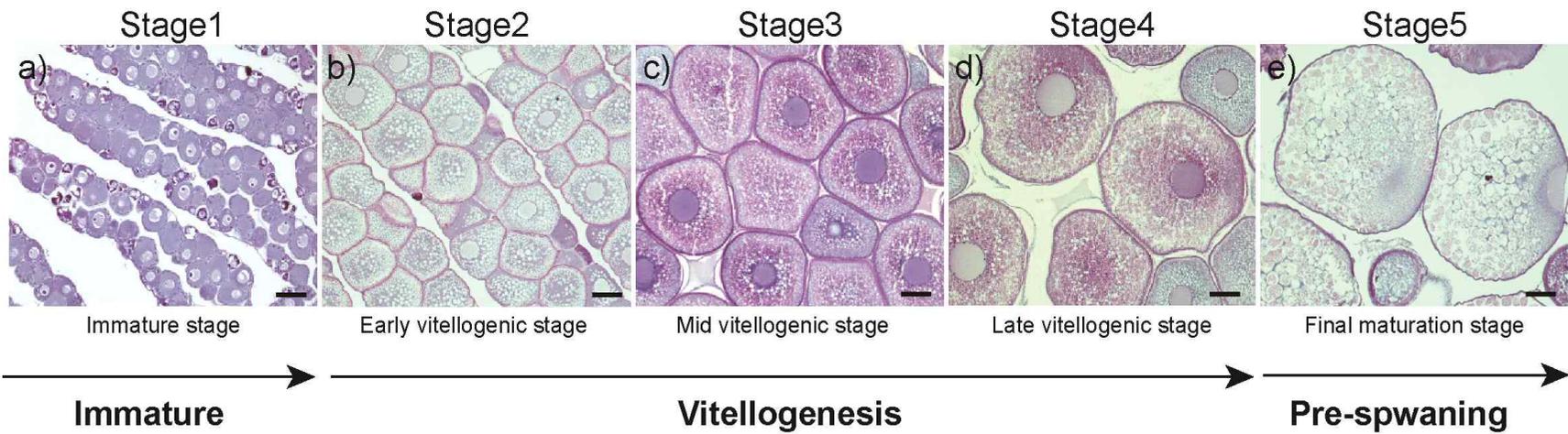


Figure 5. Histological section of oocytes at different development stages during SPE treatment. (a) Immature stage, (b) Early vitellogenic stage, (c) Mid vitellogenic stage, (d) Late vitellogenic stage, (e) Final maturation. Scale bar = 100 μ m.

2. 난모세포 발달단계에 따른 morphometric parameters

암컷 극동산 뱀장어의 난모세포 발달단계에 따른 GSI, OD와 EI의 변화를 조사하였다(Table 4, Figure 6과 Figure 7). 각각의 성 성숙 단계별 morphometric parameter는 난모세포 발달단계를 토대로 구분하였다. 암컷 뱀장어의 난모세포 발달단계별 GSI는 미성숙단계인 stage 1 (0.18 ± 0.07)과 stage 2 (1.8 ± 0.1)에서 낮은 값을 보였다. 성 성숙 개시단계인 stage 3 (12.1 ± 1.1)부터 유의적으로 높은 값을 보인 후 산란 직전인 stage 5 (40.7 ± 2.8)까지 미성숙단계인 stage 1과 stage 2보다 유의적으로 높은 값을 보였다($P < 0.001$). 난모세포 발달단계에 따른 OD는 stage 1 (78.4 ± 3.6)과 stage 2 (174.6 ± 3.3)에서 낮은 값을 보였다. stage 3 (357.5 ± 12.6)부터 유의적으로 높은 값을 보인 후 stage 5 (892.2 ± 83.3)까지 유의적으로 높은 값을 보였다($P < 0.001$). EI는 stage 1 (3.04 ± 0.21)과 stage 2 (3.85 ± 0.15)에서 낮은 값을 보였다. stage 3 (4.99 ± 0.18)부터 값이 유의적으로 증가($P < 0.01$)하였고 stage 5 (6.21 ± 0.47)에서 stage 3보다 높은 값을 보였다($P < 0.05$).

Table 4. Gonadosomatic index (GSI), oocyte diameter (OD), eye index (EI) changes in the female Japanese eel after intraperitoneal injections of SPE.

	Stage 1 (n=8)	Stage 2 (n=13)	Stage 3 (n=8)	Stage 4 (n=6)	Stage 5 (n=6)
GSI (mean ± SEM)	0.1 - 0.6 (0.18 ± 0.07)	1.4 - 3.0 (1.8 ± 0.1)	6.4 - 17.3 (12.1 ± 1.1)	16.3 - 45.2 (24.8 ± 2.0)	27.6 - 46.2 (40.7 ± 2.8)
OD (mean ± SEM)	65.7 - 92.5 (78.4 ± 3.6)	155.5 - 197.1 (174.6 ± 3.3)	306.7 - 423.0 (357.5 ± 12.6)	457.0 - 638.7 (522.0 ± 27.4)	975.8 - 1078.6 (892.2 ± 83.3)
EI (mean ± SEM)	2.41 - 3.98 (3.04 ± 0.21)	3.16 - 4.89 (3.85 ± 0.15)	4.29 - 5.87 (4.99 ± 0.18)	4.02 - 5.10 (4.73 ± 0.16)	6.63 - 7.15 (6.21 ± 0.47)

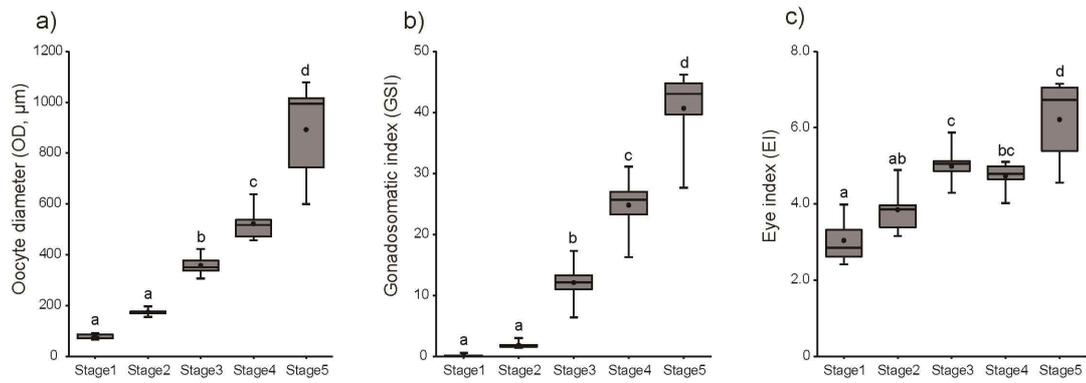


Figure 6. Changes in morphometric parameters, (a) GSI, (b) OD and (c) EI, in female eel during artificial maturation. Boxplots show min and max values (whiskers), first and third quartiles (box limits), and median (box inner line) of morphometric parameters. Dots represent mean values of GSI, OD and EI. The different letters mean significant differences for parameter values and same letter are not significantly different (a vs. b; $P < 0.05$, a vs. c; $P < 0.01$, a vs. d; $P < 0.001$).



Figure 7. Eye index (EI) change in female eel during artificial maturation. (A) Yellow eel, (B) Pre-silver eel, (C) Silver eel. Scale bar = 200 μ m.

3. 난모세포 발달단계별 혈중 E2 농도 변화

암컷 뱀장어 난모세포 발달에 따른 혈중 E2 농도의 변화는 난황 형성 중기부터 급격히 증가하는 양상을 나타내었다. Stage 1에서의 혈중 E2 농도는 다른 단계와 비교해 상대적으로 낮은 농도(0.42 ± 0.06 ng/mL)를 보였다. Stage 2에서는 Stage 1과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 난황 형성이 본격적으로 개시하는 시점인 stage 3에서 혈중 E2 농도는 stage 1과 2와 비교하여 유의적으로 높은 농도(3.49 ± 0.63 ng/mL, $P < 0.01$)를 보였다. 난황 형성 중기와 후기인 stage 4 (3.51 ± 0.62 ng/mL)와 stage 5(3.03 ± 0.76 ng/mL)에서는 stage 3과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다(Figure 8).

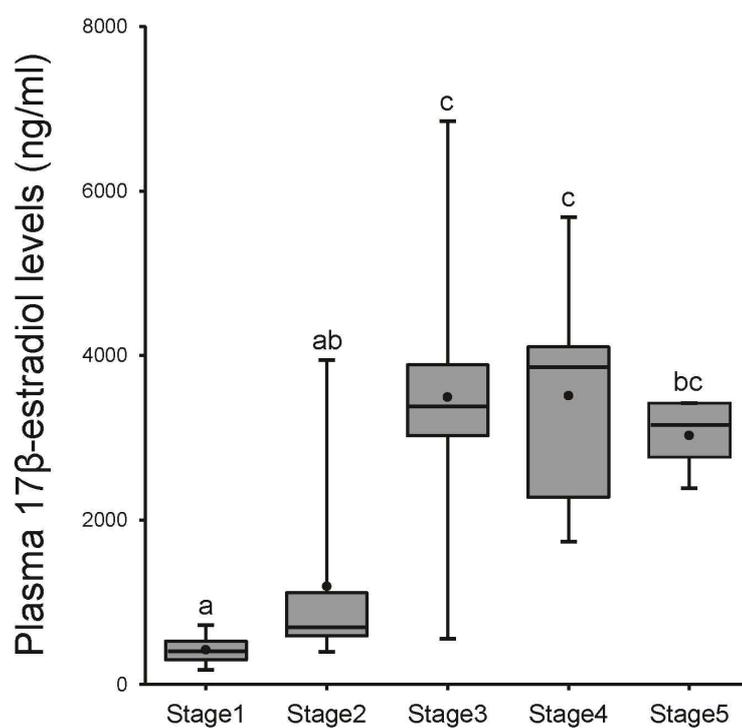


Figure 8. Plasma levels of E2 in female eel during artificial maturation. Boxplots show min and max values (whiskers), first and third quartiles (box limits), and median (box inner line) of plasma levels of E2. Dots represent mean values of plasma levels of E2. The different letters mean significant differences for plasma levels and same letter are not significantly different (a vs. b; $P < 0.05$, a vs. c; $P < 0.01$).

4. 난모세포 발달단계별 ER mRNA 발현 변화

눈, 전뇌, 뇌하수체 그리고 난소의 ER α 와 ER β mRNA 발현량의 변화는 real-time qPCR을 통해 분석하였다. SPE 복강 주사를 통해 성 성숙을 유도하였고 성 성숙이 진행됨에 따라 모든 조직에서 발현이 증가하는 양상은 유사하지만, 각각의 조직에 따라 난모세포 발달단계별 다른 발현 양상을 보였다(Figure 9과 Figure 10). 눈에서 ER α mRNA 발현은 stage 1부터 유의적으로 증가하여 stage 4에서 가장 높은 값을 보였고(P < 0.001) stage 5까지 높은 값을 유지하였다. 반면에 눈에서 ER β mRNA 발현은 stage 1부터 stage 5까지 점차 증가하여 stage 5에서 가장 높은 발현 값을 보였다(P < 0.001). 전뇌에서 ER α mRNA 발현은 stage 2부터 stage 5까지 지속해서 증가하고 stage 5에서 가장 높은 발현 값을 보였다(P < 0.01). 전뇌에서 ER β mRNA 발현은 난모세포 발달단계별 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 뇌하수체에서 ER α mRNA 발현은 stage 1부터 stage 3까지 증가(P < 0.01)하였지만, stage 4부터 감소하는 추세를 보였다. 뇌하수체에서 ER β mRNA의 발현은 stage 1부터 stage 5까지 유의한 차이가 없었다. 난소에서 ER α 와 ER β mRNA 발현 모두 stage 2부터 stage 5까지 유의하게 증가하였으며 stage 5에서 가장 높은 값을 보였다(P < 0.001).

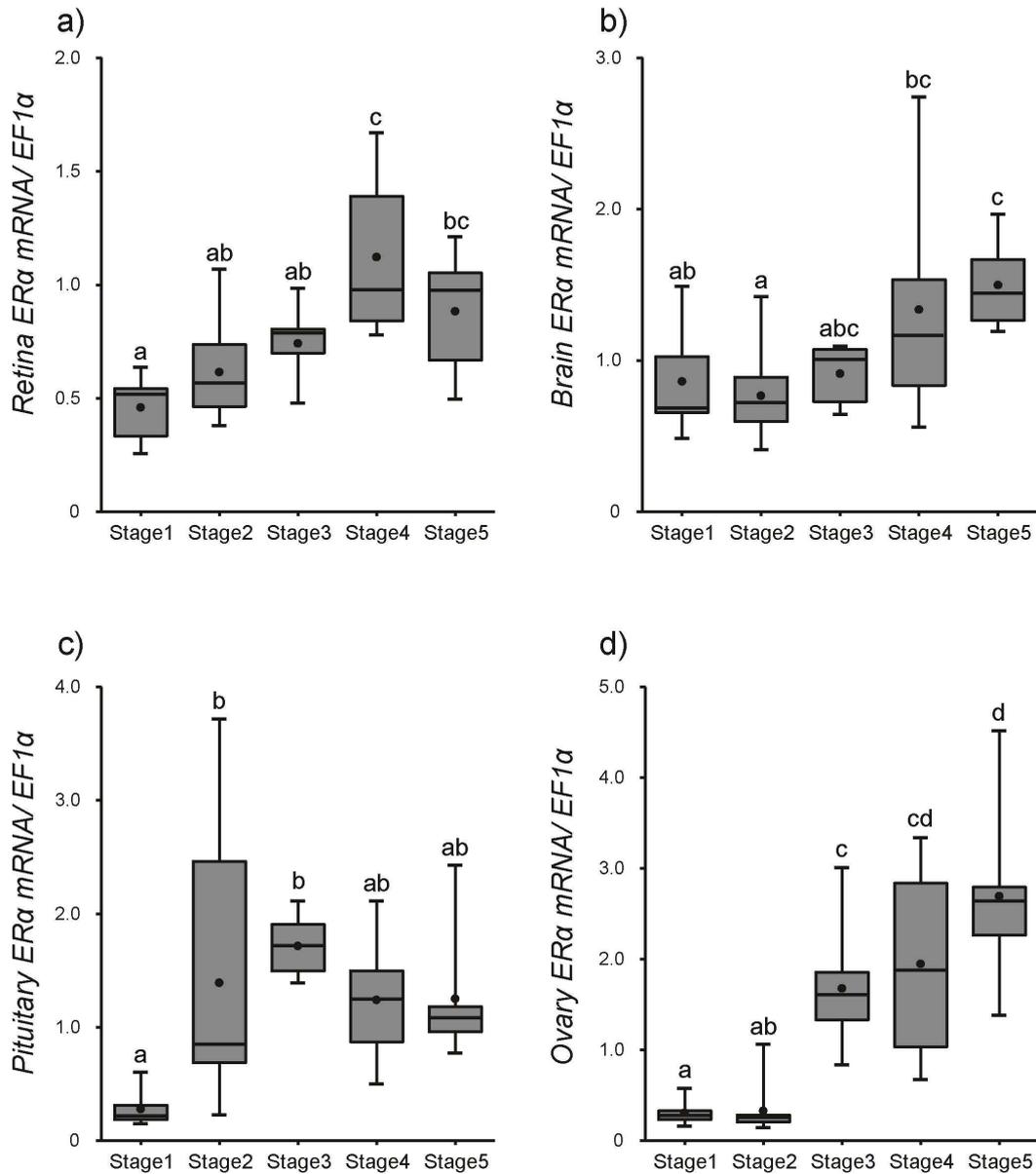


Figure 9. The mRNA expression of ER α in female eel in (a) eye, (b) brain, (c) pituitary and (d) ovary during artificial maturation as measured by real-time quantitative PCR. Boxplots show min and max values (whiskers), first and third quartiles (box limits), and median (box inner line) of mRNA expression levels. Dots represent mean values of mRNA expression levels. The different letters mean significant differences for mRNA expression and same letter are not significantly different (a vs. b; P < 0.05, a vs. c; P < 0.01, a vs. d; P < 0.001).

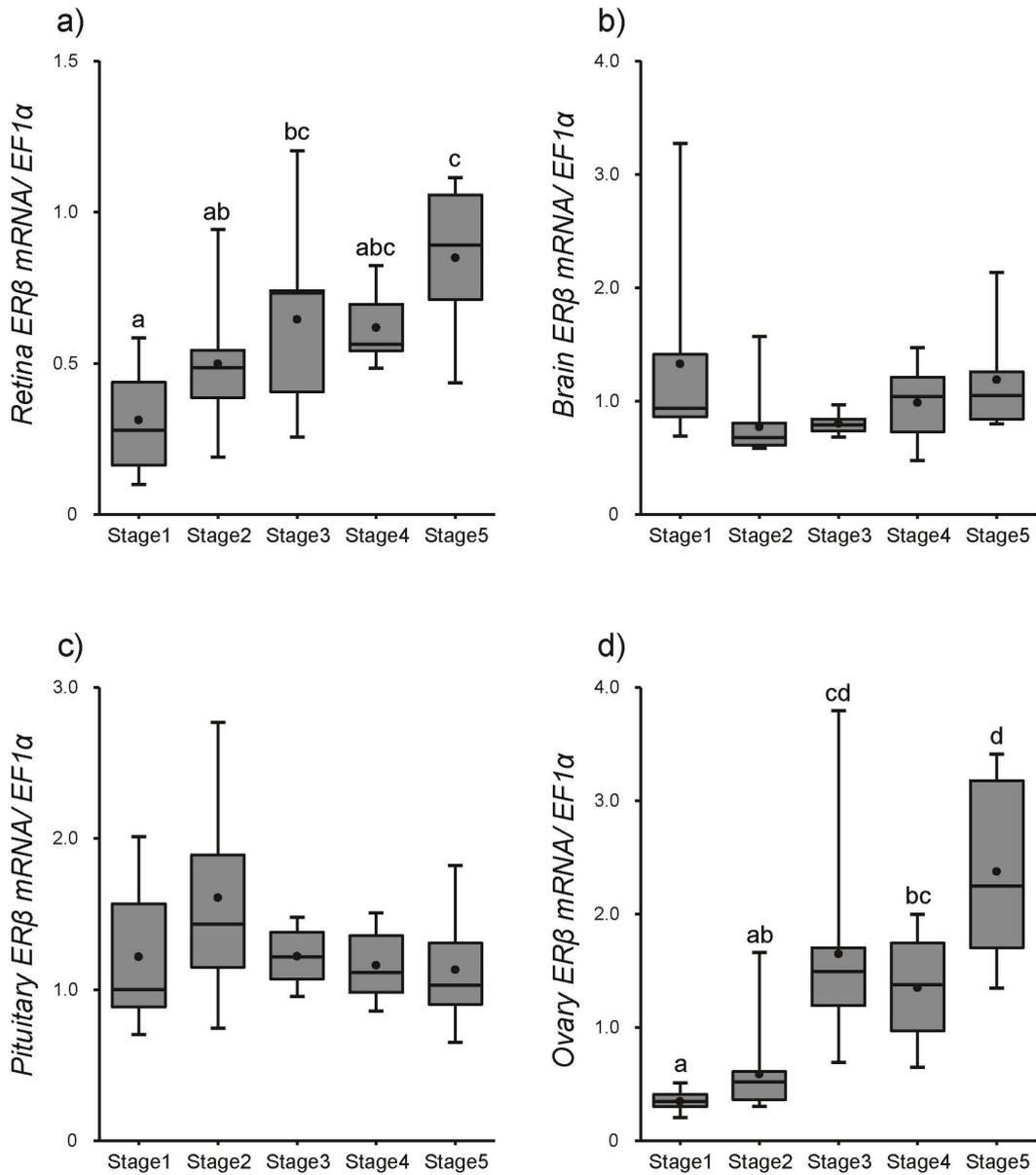


Figure 10. The mRNA expression of ERβ in female eel in (a) eye, (b) brain, (c) pituitary and (d) ovary during artificial maturation as measured by real-time quantitative PCR. Boxplots show min and max values (whiskers), first and third quartiles (box limits), and median (box inner line) of mRNA expression levels. Dots represent mean values of mRNA expression levels. The different letters mean significant differences for mRNA expression and same letter are not significantly different (a vs. b; $P < 0.05$, a vs. c; $P < 0.01$, a vs. d; $P < 0.001$).

5. 망막 내 ERs subtype mRNA 조직 발현

망막 내 ER α (Figure 11)와 ER β (Figure 12) mRNA가 발현되는 위치를 FISH 방법으로 확인하였고 또한 미성숙 개체와 성숙 개체 간의 ERs subtype mRNA 발현량을 비교 분석하였다. 망막 내 ER α 와 ER β mRNA 발현은 맥락막모세혈관층(choriocapillary layer; CCL)과 광수용체층(photoreceptor layer; PRL)에서 모두 확인되었다. CCL에서 ER α 와 ER β mRNA는 미성숙한 개체에 비해 성숙한 개체에서 발현이 증가하는 양상을 보였다. 하지만 PRL에서는 미성숙과 성숙한 개체 간 ER α 와 ER β mRNA 발현량의 차이는 관찰되지 않았다.

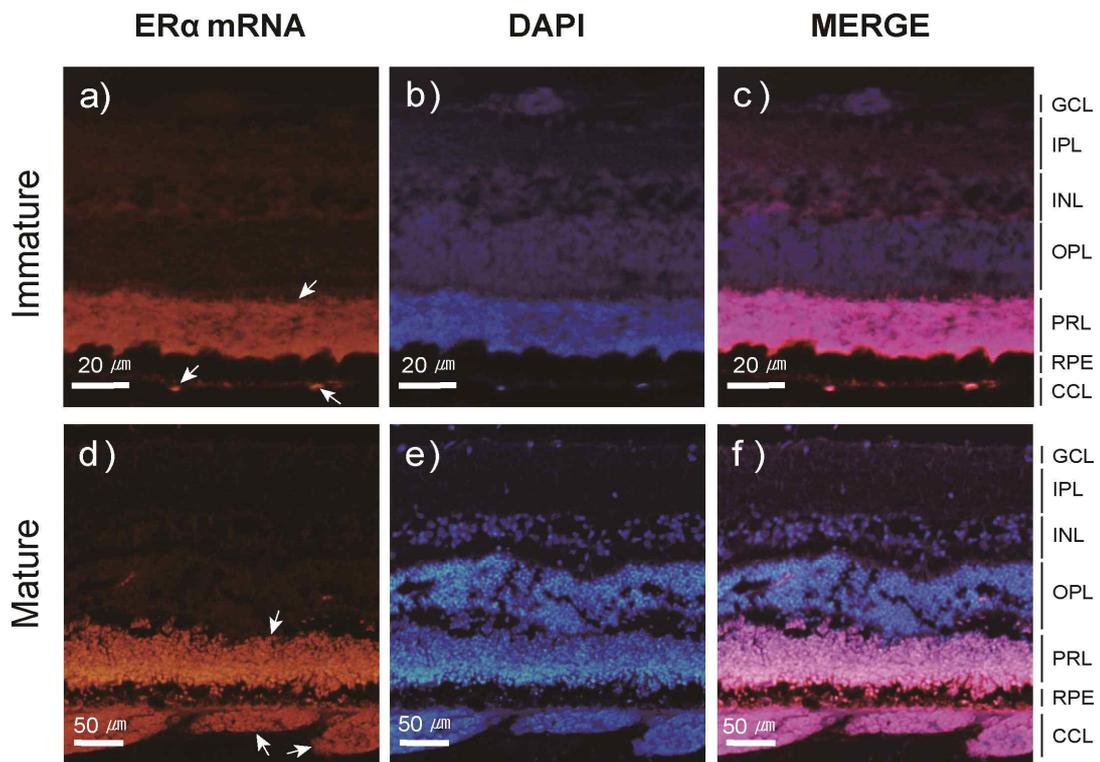


Figure 11. Fluorescence *in situ* hybridization of ER α mRNA in sexually immature and (a) and mature (d) retina sections. Nuclei were stained with DAPI (b, e). A merge of the two different channels (c, f). The arrow indicate the expression of ER α mRNA in Japanese eel eye. Abbreviations: choriocapillary layer (CCL), ganglion cell layer (GCL), inner nuclear layer (INL), inner plexiform layer (IPL), outer plexiform layer (OPL), photoreceptor layer (PRL), retinal pigment epithelium (RPE).

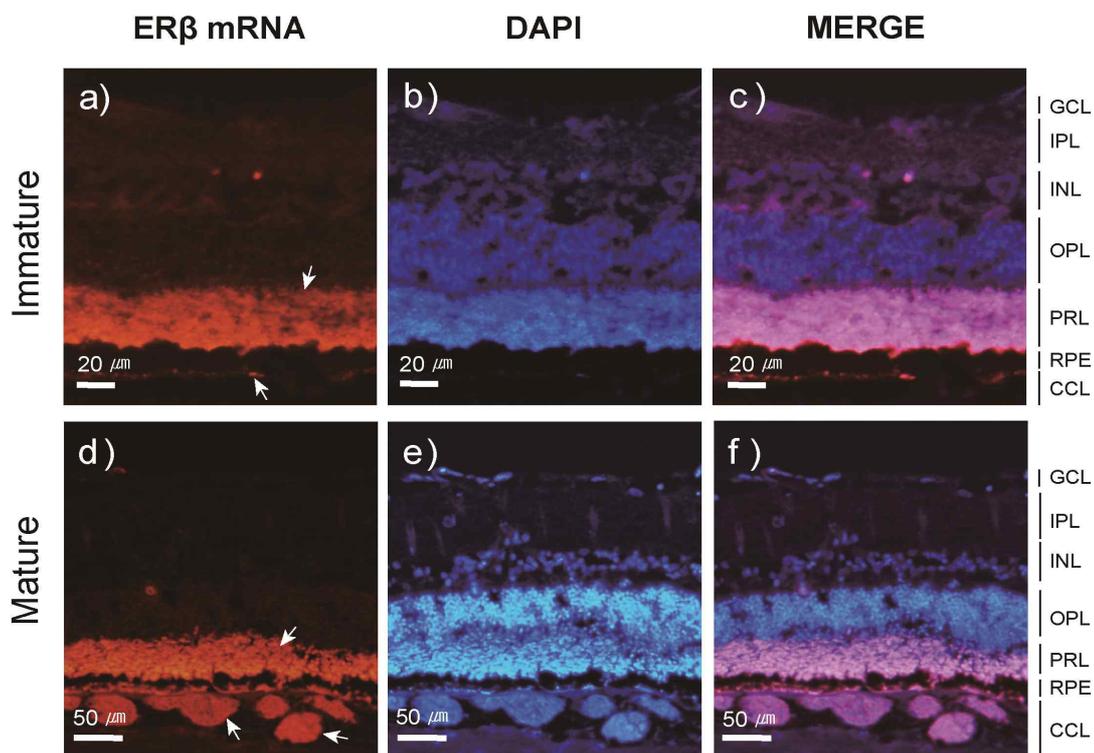


Figure 12. Fluorescence *in situ* hybridization of ER β mRNA in sexually immature and (a) and mature (d) retina sections. Nuclei were stained with DAPI (b, e). A merge of the two different channels (c, f). The arrow indicate the expression of ER β mRNA in Japanese eel eye. Abbreviations: choriocapillary layer (CCL), ganglion cell layer (GCL), inner nuclear layer (INL), inner plexiform layer (IPL), outer plexiform layer (OPL), photoreceptor layer (PRL), retinal pigment epithelium (RPE).

IV. 고찰

이 연구에서는 암컷 극동산 뱀장어에 SPE를 복강 주사하여 인위적으로 성 성숙을 유도하였다. 그리고 난모세포 발달단계에 따라 morphological parameter (GSI, EI)가 증가되고 있음을 확인할 수 있었다. 이전 연구들은 Anguillid 간 조직에서 vitellogenin 합성과 난모세포 발달과 관련하여 이러한 parameter 들이 증가한다는 것을 보여주었다. 자연에서 포획한 극동산 뱀장어를 대상으로 한 연구에서는 yellow eel에서 보다는 silver eel에서 morphological parameter들이 유의적으로 증가하였고(Han et al. 2003a; Beullens et al. 1997), 유럽산 뱀장어에서도 이와 유사한 결과들이 보고되었다(Pankhurst. 1982; van den Thillart and Dufour.2009; Mordenti et al. 2013).

SPE 복강 주사로 성 성숙을 유도한 극동산 뱀장어에서 난황 형성(stage 2부터 stage 4)과 성숙 난모세포(stage 5)를 조직학적 관찰을 통해 명확하게 확인할 수 있었다. E2의 혈중 농도는 난황이 본격적으로 축적되기 시작하는 stage 3부터 증가하기 시작하였고 산란 직전인 stage 5까지 높게 유지되었다. 이러한 결과는 E2가 난황 형성에 관여한다는 것을 암시해 주었다. Han et al. 2003b의 보고에 따르면 혈중 E2 농도는 유구기 난모세포를 가진 silver eel보다는 주변인기 난모세포를 가진 pre-silver eel에서 유의적으로 높았다. 이러한 결과는 난소 내 vitellogenin의 축적을 개시한 이후에 간에서 E2가 합성·분비되기 때문으로 사료된다. 유럽산 뱀장어도 이와 유사한 결과를 확인할 수 있었다(Pérez et al. 2011; Mordenti et al. 2013). 호르몬 처리를 하지 않은 New Zealand longfinned eel (*Anguilla dieffenbachii*)의 난소에서 산란 회유 기간 동안 혈중 E2 농도는 초기 난황 형성기와 중기 난황 형성기의 난모세포를 가진 개체에서 유의하게 증가하는 경향을 보였다(Lokman and Young. 1995). 이러한 결과들을 종합해 보면, 경골어류와 마찬가지로 뱀장어에서도 난소 내 난황축적이 시작되면서 혈중 E2 농도가 증가하고 이로 인해 성 성숙이 본격적으로 진행되는 것으로 사료된다. 최근 암컷 뱀장어를 대상으로 androgen 계열의 호르몬을 이용하여 인위적 성 성숙 유도를 시도하였다(Sudo et al. 2012; Mordenti et al. 2018). 이러한 연구는 11-KT가 암컷의 초기 난

모세포 발달에도 영향을 미친다는 연구 결과들을 근거로 하고 있다(Lokman et al. 2007). 하지만 혈중 11-KT 농도가 E2 농도보다 상대적으로 낮으므로 E2보다 우세하지는 않지만 11-KT가 특정 난모세포 발달이나 난황 형성에 일부 관여할 것으로 추측된다. 따라서 난모세포 발달단계에서 androgen과 estrogen의 번식생리학적 기전을 밝히는 추가 연구가 필요하다.

Anguillid의 경우, 종 특이적 형태 변화는 강하성 산란 회유 동안의 행동 변화와 동반한 내분비적 signal에 의해 결정될 것으로 추측된다. 그러나 생리학적 측면에서 EI 증가와 같은 형태적 변화에 대한 직접적이고 구체적인 연구는 추측만 존재할 뿐 이에 대한 기전연구는 연구는 극히 제한적이다. 이전의 몇 연구에서 뱀장어의 눈의 크기 증가는 깊은 수심의 산란 장소에 적응하기 위한 것이고 여기에 11-KT가 영향을 미친다고 제시하였지만(Pankhurst. 1982), 현재까지 정확한 기전은 명확히 알려진 바 없다. Anguillid sp.의 성 성숙 과정 동안 동반하는 여러 형태적 변화 중 눈 크기 변화는 유럽산 뱀장어에서 성 성숙도를 분류하는 기준 ($EI \leq 6.5$)으로 사용된다(Pankhurst. 1982). 그리고 극동산 뱀장어의 경우에도 $EI \leq 5.0$ 을 기준으로 성 성숙 정도를 구별할 수 있다고 보고하였다(Okamura et al. 2007; Okamura et al. 2008). 성 성숙 과정 동안 Anguillid sp.에서 눈 크기가 증가하는 것은 수치상으로 조금씩 차이가 있을 수 있지만, 눈 크기 증가와 성 성숙은 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

Estrogen 수용체는 세포 내 혹은 neuron에서 estrogen 신호를 전달하는 전달자이기 때문에 ER mRNA 발현은 estrogen의 생리적 기능과 조절에 밀접하게 관련된다(Mu et al. 2013). 몇몇 어류에서 혈중 E2 농도와 E2 수용체의 발현 양상이 일치한다고 보고된 바 있다. 경골어류에서 ERs은 일반적으로 E2 분비로 조절된다고 알려졌지만, 어종별, 조직별, 성별, 그리고 성 성숙 정도에 따라 다르게 나타나기도 한다. 이 연구 결과는 SPE 호르몬을 처리하여 성 성숙을 유도한 암컷 극동산 뱀장어의 ER α mRNA 발현 양상은 모든 조직에서 혈중 E2 농도 양상과 일치하였다. 그러나 ER β mRNA 발현은 난소에서만 stage 3에서 증가하여 stage 5까지 높은 값을 유지하였다. 즉, 암컷 극동산 뱀장어의 성 성숙 동안 ER α 는 BPG axis에서 ER β 는 난소에서 up-regulation 되고 있음을 보여주었다. 이러한 결과들은

암컷 극동산 뱀장어의 성 성숙 동안 ER α 는 E2의 분비와 BPG axis에서 직접적으로 관련이 있고 성 성숙 과정 중 ER α 와 ER β 이 서로 다른 역할을 한다는 것을 암시해 준다. 비슷한 연구로 Jeng *et al.* 2012는 암컷 극동산 뱀장어의 뇌에서 혈 중 E2 농도가 ESR(estrogen receptor)- β 가 아닌 ESR- α mRNA 발현을 up-regulation 한다고 보고했다. 그리고 암컷 유럽산 뱀장어에 잉어 뇌하수체 추출물(carp pituitary extract; CPE)을 처리하여 성 성숙 유도했을 때, 뇌와 뇌하수체의 ESR- α mRNA 발현은 유의적으로 증가하였지만 ESR- β mRNA는 유의적인 차이가 없었다. 일반적으로 경골어류에서는 E2 분비와 ER 발현 양상은 생식선 혹은 여타 조직의 발달단계에 따라 다르다. 예를 들어 금붕어(*Carassius auratus*)(Choi and Habibi, 2003), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)(Chen *et al.* 2011)와 무지개송어(Nagler *et al.* 2000)의 난소에서 ESR1 mRNA 발현은 생식선 발달에 따라 증가하였고, Asian swamp eel (*Monopterus albus*)(Ding *et al.* 2016)와 orange-spotted grouper (Chen *et al.* 2011)의 난소에서는 ER α 발현이 유의하게 증가하였다. 그리고 인위적으로 성 성숙을 유도한 암컷 유럽산 뱀장어의 뇌, 뇌하수체, 간, 난소에서 ESR1 mRNA 발현은 대조군보다 유의하게 증가하였다(Lafont *et al.* 2016). 암컷 금붕어에 E2를 처리했을 때 간에서 ER alpha와 ER beta I이 모두 증가하였다(Nelson *et al.* 2007). 또한 medaka의 뇌에서 ER이 발현되었으며 생식주기와 일주기에 영향을 받아 발현된다고 보고된 바 있다(Hiraki *et al.* 2012). 이러한 결과들을 바탕으로 극동산 뱀장어는 E2의 분비와 BPG axis에서 ER α 가 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다. 기본적으로 ESR1은 포유류에서 번식에 주요한 역할을 한다고 알려져 있지만, 다른 척추동물에서 ESR subtype 각각의 역할에 대한 정보는 제한적이다. 예를 들어 암컷 척추동물에서 에스트로겐은 간에서 vitellogenin 생산을 유도하지만 ESR subtype이 그 과정에 직접적으로 관여하는지는 명확히 알려진 바 없다. 최근에 제브라피쉬에서 생식선 발달과 기능에 영향을 미치지 않는다는 ESR1 돌연변이체가 보고된 바 있다(Lu *et al.* 2017). Anguillid eel은 아직 종묘 생산 기술이나 인위적인 성숙을 제어하는 기술을 연구하는 단계이기 때문에 이러한 실험기법을 적용할 수 없다.

이번 연구에서는 이전에 보고된 암컷 극동산 뱀장어의 성 성숙 과정 중 BPG

axis에서 ERs의 발현 특징뿐 아니라 eel의 눈에서 ER α mRNA 발현 양상을 조사하였다. 이 연구 결과는 성 성숙 유도 중 혈중 E2 농도 증가 양상과 눈에서 ER mRNA 발현 양상이 평행하게 유지되었지만 ER β mRNA 발현은 성 성숙이 진행됨에 따라 점차 증가하여 산란 직전인 stage 5에서만 유의적으로 높은 발현 값을 보였다. 이는 극동산 뱀장어의 눈이 E2와 관련하여 암컷의 성 성숙에 중요한 역할을 할 것을 제시해 준다. 금붕어와 무지개송어의 눈에서도 ER 유전자는 발현되고, 제브라피쉬 눈에서도 ESR, ESR2a와 ESR1 mRNA가 발현된다(Tchoudakova et al. 1999; Begay et al. 1994; Chandrasekar et al. 2010). 특히 E2 노출에 따라 눈에서 ESR1 mRNA가 증가하였지만 성 성숙이나 다른 생리적인 영향에 대한 mechanism은 언급하지 않았다. 그리고 유럽산 뱀장어의 silvering 과정 동안 눈에서 ESR1, ESR2와 G-protein coupled estrogen receptor 발현을 확인하였지만 생리적인 mechanism은 언급하고 있지 않았다. 경골어류의 눈에서 ERs의 역할에 관한 연구는 극히 제한적이다. Anguillid의 망막 변화에 관한 연구는 유럽산 뱀장어에서 silvering 과정 중 망막 구조의 형태적 변화와 망막 내 광수용체층의 cone-opsin 밀도 변화에 대해 보고하였지만 내분비학적인 접근에 관한 연구는 보고된 바 없다. 11-KT를 처리한 암컷 극동산 뱀장어에서 EI가 높았기 때문에 11-KT가 초기 난모세포 발달과 눈 크기의 증가에 영향을 미칠 것이라 추측하였다(Sudo et al. 2012). 하지만 난황이 축적되기 전 단계의 난모세포 oil droplet stage (현재 연구에서 stage 2)에서 눈 크기와 성 성숙 사이의 관계를 증명하기는 어려울 것으로 사료된다. 이전의 사람의 눈을 대상으로 한 몇몇 연구들은 에스트로겐 수용체의 생리적 기능에 대해서 조금 더 구체적으로 설명하고 있다. Kobayashi et al. 2002에 의하면 *In situ* hybridization방법을 이용해 맥락막 신생 혈관 막(choroidal neovascular membrane; CNVMs)에서 에스트로겐 수용체 mRNA의 발현을 확인하였고 남자보다 여자에서 고도근시 증세가 상대적으로 많이 발생한다고 하였다. 이는 estrogen이 사람의 고도근시 눈에서 CNVMs 형성 시 세포 증식을 촉진 시킬 것을 암시하고 있다. 또한 사람 눈에서 ER α mRNA가 감지되었고 성별 나이별로 mRNA 발현이 다르게 나타나며 이는 에스트로겐의 영향에 의한 것으로 추측하고 있다(Ogueta et al. 1999). 이러한 결과들을 종합해 보면 뱀장어에서도 성 성숙 유도과정 중에 혈중 E2 농도변화와 눈의 ER α 발현은 상관성

이 있음을 보여준다. 따라서 뱀장어의 경우에도 눈은 번식내분비에 중요한 역할을 하는 organ으로서의 가능성을 제시해 주지만 이에 대한 추가 연구가 필요하다.

FISH 방법을 사용하여 극동산 뱀장어의 눈에서 ER mRNA의 발현 위치와 그 발현량을 확인하였다. ER α 와 ER β mRNA 모두 PRL과 CCL에서 발현되었고 CCL에서 성숙한 개체와 미성숙한 개체 사이에 mRNA 발현 양상이 차이를 보였다. 특히 CCL 모세혈관 내피세포(capillary endothelial cell)의 크기와 ERs mRNA의 발현 양상은 미성숙 개체와 성숙 개체 간의 확연한 차이를 보였다. 이는 E2가 눈에서 모세혈관 내피세포의 증식에도 관여한다고 추측된다. 포유류를 대상으로 망막에서 ER mRNA의 발현을 연구한 결과들에 따르면 ER이 망막세포상피층(retinal pigment epithelium; RPE), 맥락막의 혈관에 존재한다고 보고하였다(Ogueta et al. 1999; Kobayashi et al. 1998; Munaut et al. 2001). 특히 사람의 눈에서 E2가 맥락막의 새로운 혈관 형성 발달에 큰 영향을 미치고 망막에서 receptor-mediated pathway를 통해 모세혈관 내피세포 성장을 조절한다고 보고하였다(Kobayashi et al. 2002). 하지만 ERs이 성 성숙 과정 중에 미치는 생리적인 기전에 관한 연구는 제한적이다. 특히 Anguillid sp.와 같이 성 성숙 과정 중에 뚜렷한 형태적인 차이를 보이는 현상에 대해 좀 더 구체적으로 눈과 번식 기전과의 연관성을 찾는 연구가 필요하다고 사료된다.

요약해 보면, 인위적으로 성 성숙을 유도한 극동산 뱀장어에서 난모세포 발달 그리고 EI, GSI 변화에 동반하여 혈중 E2 농도가 증가하였고 이와 더불어 BPG axis의 ER α mRNA 발현도 증가하였다. E2는 극동산 뱀장어의 난모세포 발달 전 과정에 관여하며, 눈의 크기 증가에 따라 눈에서 ERs mRNA 발현 또한 증가하였다(Figure 13). 특히, E2가 망막에서 CCL의 모세혈관 내피세포 증식에 관여할 것 이란 가능성을 제시하였다. 따라서 극동산 뱀장어의 눈은 성 성숙에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

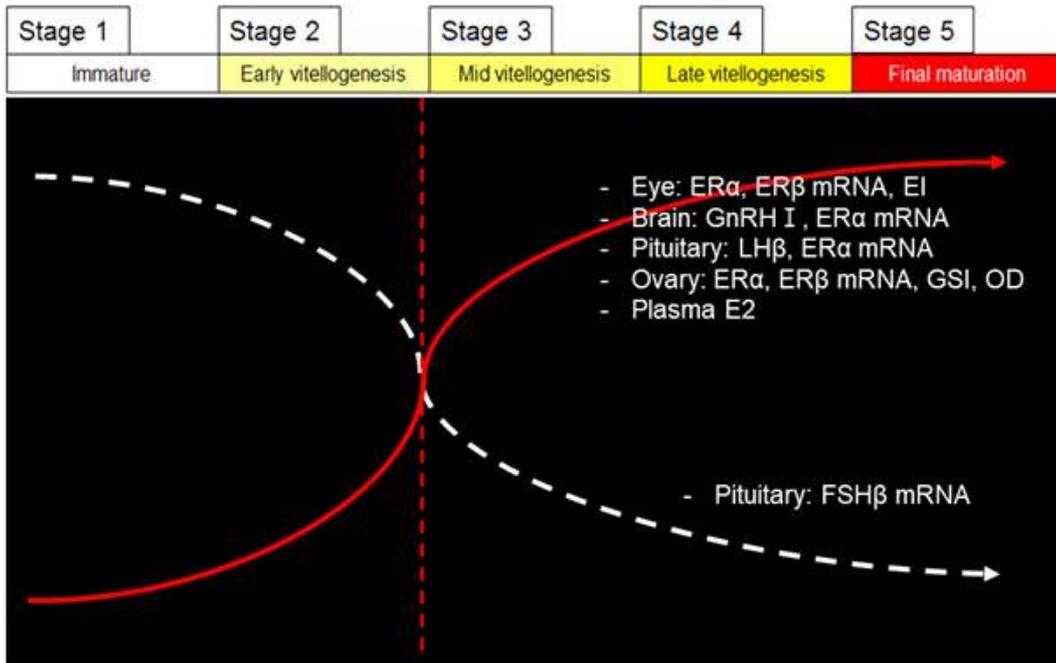


Figure 13. Scheme diagram of this study

참고문헌

- Aoyama, J.; Miller, M.J. The silver eel, Springer: USA, New York, 2003, pp. 107-117.
- Aoyama, J. Life history and evolution of migration in catadromous eels (Genus *Anguilla*). *Aqua-Bio. Sci.* 2009, 2, 1-42.
- Aoyama, J.; Watanabe, S.; Miller, M.J.; Mochioka, N.; Otake, T.; Yoshinaga, T.; Tsukamoto, K. Spawning sites of the Japanese eel in relation to oceanographic structure and the West Mariana Ridge. *PLoS ONE*. 2014, 9(2), e88759.
- Arai, T.; Otake, T.; Tsukamoto, K. Drastic changes in otolith microstructure and microchemistry accompanying the onset of metamorphosis in the Japanese eel *Anguilla japonica*. 1997, 161. 17-22.
- Asahina, K.; Kambegawa, A.; Higashi, T. Development of a microtiter plate enzyme-linked immunosorbent assay for $17\alpha,20\beta$ -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost gonadal steroid. *Fisheries. Sci.* 1995, 61, 491-494.
- Begay, V.; Valotaire, Y.; Ravault, J.P.; Collin, J.P.; Falcon, J. Detection of estrogen receptor mRNA in Trout pineal and retina: estradiol- 17β modulates melatonin production by cultured pineal photoreceptor cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1994, 93, 61-69.
- Beullens, K.; Eding, E.H.; Gilson, P.; Ollevier, F.; Komen, J.; Richter, C.J.J. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture*. 1997, 153, 135-150.
- Bromage, N.R.; Whitehead, C.; Breton, B. Relationships between serum levels of gonadotropin, oestradiol- 17β , and vitellogenin in the control of ovarian development in the rainbow trout: II. The effects of alterations in environmental photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1982, 47, 366-376.

- Burke, M.G.; Leatherland, J.F.; Sumpter, J.P. Seasonal changes in serum testosterone, 11-ketotestosterone, and 17 β -estradiol levels in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *Canadian. J. Zool.* 1984, 62, 1195-1199.
- Chandrasekar, G.; Archer, A.; Gustafsson, J.A.; Lendahl, M.A. Level of 17 β -estradiol receptors expressed in embryonic and adult Zebrafish following in vivo treatment of natural or synthetic ligands. *PLoS ONE.* 2010, 5(3), e9678.
- Chaube, R.; Rawat, A.; Joy, K.P. Molecular cloning and characterization of brain and ovarian cytochrome P450 aromatase genes in the catfish *Heteropneustes fossilis*: Sex, tissue and seasonal variation in, and effects of gonadotropin on gene expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015, 221, 120-133.
- Chen, H.; Zhang, Y.; Li, S.; Lin, M.; Shi, Y.; Sang, Q.; Liu, M.; Zhang, H.; Lu, D.; Meng, Z.; Liu, X.; Lin, H. Molecular cloning, characterization and expression profiles of three estrogen receptors in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011, 172, 371-381.
- Cheng, P.W.; Tzeng W.N. Timing of metamorphosis and estuarine arrival across the dispersal range of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine. Ecol. Prog. Series.* 1996, 131, 87-96.
- Choi, C.Y.; Habibi, H.R. Molecular cloning of estrogen receptor α and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Mol. Cellul. Endocrinol.* 2003, 204, 169-177.
- Ding, W.; Cao, L.; Cao, Z.; Bing, X.; Zhao, F. Molecular characterization and expression profile of the estrogen receptor α gene during different reproductive phases in *Monopterus albus*. *Nature.* 2016, 6, 27924.
- Fostier, A.; Claudine, W.; Terqui, M.; Breton, B.; Jalabert, B. Plasma estradiol-17 β and gonadotropin during ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 1978, 18, 929-936.
- Fostier, A.; Jalabert, B. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various

- preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish. Physiol. Biochem.* 1986, 2, 87-99.
- Han, Y.S.; Liao, I.C.; Huang, Y.S.; He, J.T.; Chang, C.W.; Tzeng, W.N. Synchronous change of morphology and gonadal development of silvering Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. 2003a, 219, 783-796.
- Han, U.S.; Liao, I.C.; Tzeng, W.N.; Huang, Y.S.; Yu, Y.L. Serum estradiol-17 β and testosterone levels during silvering in wild Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003b, 136, 912-920.
- Henkel, C.V.; Dirks, R.P.; de Wijze, D.L.; Minegishi, Y.; Aoyama, J.; Jansen, H.J.; Turner, B.; Knudsen, B.; Bundgaard, M.; Hvam, K.L.; Boetzer, M.; Pirovano, W.; Weltzien, F.A.; Dufour, S.; Tsukamoto, K.; Spaink, H.P.; van den Thillart, G.E. First draft genome sequence of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gene*. 2012, 511, 195-201.
- Hiraki, T.; Takeuchi, A.; Tsumaki, T.; Zempo, B.; Kanda, S.; Oka, Y.; Nagahama, Y.; Okubo, K. Female-specific target sites for both oestrogen and androgen in the teleost brain. *Proc. R. Soc. B.* 2012, doi:10.1098/rspb.2012.2011.
- Hojo, Y.; Hattori, T.; Enami, T.; Furukawa, A.; Suzuki, K.; Ishii, H.; Mukai, H.; Morrison, J.; H.; Janssen, W.G.M.; Kominami, S.; Harada, N.; Kimoto, T.; Kawato, S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *PNAS*. 2004, 101, 865-870.
- Holloway, C.C.; Clayton, D.F. Estrogen synthesis in the male brain triggers development of the avian song control pathway in vitro. *Nature. Neuroscience*. 2001, 4, 170-175.
- Jansen, H.J.; Liem, M.; Jong-Raadsen, S.A.; Dufour, S.; Weltzien, F.A.; Swinkels, W.; Koelewijn, A.; Palstra, A.P.; Pelster, B.; Spaink, H.P.; van den Thillart, G.E.;

- Dirks, R.P.; Henkel, C.V. Rapid de novo assembly of the European eel genome from nanopore sequencing reads. *Sci. Rep.* 2017, 7, 7213.
- Jeng, S.R.; Pasquier, J.; Yueh, W.S.; Chen, G.R.; Lee, Y.H.; Dufour, S.; Chang, C.F. Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) reveals steroid dependent and independent mechanisms. *General. Comp. Endocrinol.* 2012, 175, 163-172.
- Kagawa, H. Oogenesis in Teleost Fish. *Aqua-Bio. Sci.* 2013, 6, 99-127.
- Kobayashi, K.; Kobayashi, H.; Ueda, M.; Honda, Y. Estrogen receptor expression in bovine and rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998, 39, 2105-2110.
- Kobayashi, K.; Mandai, M.; Suzuma, I.; Kobayashi, H.; Okinami, S. Expression of estrogen receptor in the choroidal neovascular membranes in highly myopic eyes. *Retina.* 2002, 22, 418-422.
- Kobayashi, M.; Hayakawa, Y.; Park, W.; Banda, A.; Yoshizaki, G.; Kumamaru, K.; Kagawa, H.; Kaki, H.; Nagaya, H.; Sohn, Y.C. Production of recombinant Japanese eel gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *General. Comp. Endocrinol.* 2010, 167, 379-386.
- Lafont, A.G.; Rousseau, K.; Tomkiewicz, J.; Dufour, S. Three nuclear and two membrane estrogen receptors in basal teleosts, *Anguilla* sp.: identification, evolutionary history and differential expression regulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2016, 235, 177-191.
- Li, G.L.; Liu, X.C.; Lin, H.R. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Ani. Rep. Science.* 2007, 99, 156-166.
- Lokman, P.M.; Young, G. 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.* 1995, 135, 17-26.

- Lokman, P.K.; Vermeulen, G.J.; Lambert, J.G.D.; Young, G. Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. *Fish. Physiol. Biochem.* 1998, 19, 325-338.
- Lokman, P.M.; George, K.A.N.; Divers, S.L.; Algie, M.; Young, G. 11-ketotestosterone and IGF-1 increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, in vitro. *Reprod.* 2007, 133, 955-967.
- Lu, H.; Cui, Y.; Jiang, L.; Ge, W. Functional analysis of nuclear estrogen receptors (nERs) in zebrafish reproduction by genome editing approach. *Endocrinology.* 2017, 158, 2292-2308.
- Mordenti, O.; Biase, A.D.; Bastone, G.; Sirri, R.; Zaccaroni, A.; Parmeggiani, A. Controlled reproduction in the wild European eel (*Anguilla anguilla*): two populations compared. *Aquacult. Int.* 2013, 21, 1045-1063.
- Mordenti, O.; Emmanuele, P.; Casalini, A.; Lokman, P.M.; Zaccaroni, A.; Biase, A.D.; Parmeggiani, A. Effect of aromatizable androgen (17 α -methyltestosterone) on induced maturation of silver European eels (*Anguilla Anguilla*): Oocyte performance and synchronization. *Aquacult. Research.* 2018, 49, 442-448.
- Mu, W.J.; Wen, H.S.; Shi, D.; Yang, Y.P. Molecular cloning and expression analysis of estrogen receptor betas (ER β 1 and ER β 2) during gonad development in the Korean rockfish, *Sevastes schlegeli*. *Gene.* 2013, 523, 39-49
- Munaut, C.; Lambert, V.; Noël, A.; Frankenne, F.; Deprez, M.; Foidart, J.M.; Rakic, J.M. Presence of oestrogen receptor type β in human retina. *British. J. Ophthalmol.* 2001, 85, 877-882.
- Ng, T.B.; Idler, D.R. 8 yolk formation and differentiation in teleost fishes. *Fish. Physiol.* 1983, 9, 373-404.
- Nagahama, Y.; Yoshikuni, M.; Yamashita, M.; Sakai, N.; Tanaka, M. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish. Physiol. Biochem.*

- 1993, 11, 3-14.
- Nagler, J.J.; Krisfalusi, M.; Cyr, D.G. Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor-alpha messenger RNA and its expression in the ovary during the reproductive cycle. *J. Mol. Endocrinol.* 2000, 25, 243-251.
- Nagler, J.J.; Cavileer, T.D.; Verducci, J.S.; Schultz, I.R.; Hook, S.E.; Hayton, W.L. Estrogen receptor mRNA expression patterns in the liver and ovary of female rainbow trout over a complete reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012, 178, 556-561.
- Nelson, E.R.; Wiehler, W.B.; Cole, W.C.; Habibi, H.R. Homologous regulation of estrogen receptor subtypes in goldfish (*Carassius auratus*). *Col. Reprod. Dev.* 2007, 74, 1105-1112.
- Ogueta, S.B.; Schwartz, S.D.; Yamashita, C.K.; Farber, D.B. Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression. *Ophthalmol. Visual. Sci.* 1999, 40, 1906-1911.
- Okamura, A.; Yamada, Y.; Yokouchi, K.; Horie, N.; Mikawa, N.; Utoh, T.; Tanaka, S.; Tsukamoto, K. A silvering index for the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Environ. Bio. Fishes.* 2007, 80, 77-89.
- Okamura, A.; Yamada, Y.; Horie, N.; Utoh, T.; Mikawa, N.; Tanaka, S.; Tsukamoto, K. Effects of silvering state on induced maturation and spawning in wild female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 2008, 74, 642-648.
- Pakdel, F.; Féon, S.; Gac, F.L.; Menn, F.L.; Valotaire, Y. In vivo estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Mol. Cell. Endocrinology.* 1991, 75, 205-212.
- Pankhurst, N.W. Relation of visual change to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Department of Zoology.* 1982, 21, 127-140.
- Paterni, I.; Granchi, C.; Katzenellenbogen, J. A.; Minutolo, F. Estrogen receptors alpha (ERa) and beta (ERb): Subtype-selective ligands and clinical potential.

- Steroids. 2014, 90, 13-29.
- Pérez, L.; Peñaranda, D.S.; Dufour, S.; Baloché, S.; Palstra, A.P.; van den Thillart, G.E.; Asturiano, J.F. Influence of temperature regime on endocrine parameters and vitellogenesis during experimental maturation of European eel (*Anguilla anguilla*) females. *General. Comp. Endocrinol.* 2011, 174, 51-59.
- Planey, S.L.; Kumar, R.; Arnott, J.A. Estrogen receptors (ER α versus ER β): friends or foes in human biology? *J. Recept. Signal. Transduct.* 2014, 34, 1-5.
- Sudo, R.; Tosaka, R.; Ijiri, S.; Adachi, S.; Aoyama, J.; Tsukamoto, K. 11-ketotestosterone synchronously induces oocyte development and silvering-related changes in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Zool. Sci.* 2012, 29, 254-259.
- Tchoudakova, A.; Pathak, S.; Callard, G.V. Molecular cloning of an estrogen receptor β subtype from the Goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1999, 113, 388-400.
- Tsukamoto, K. Recruitment mechanism of the eel, *Anguilla japonica*, to the Japanese coast. *J. Fish. Biol.* 1990, 36, 659-671.
- Tsukamoto, K. Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature.* 1992, 356, 789-791.
- Tzeng, W.N. Relationship between growth rate and age at recruitment of *Anguilla japonica* elvers in a Taiwan estuary as inferred from otolith growth increments. *Marine. Biol.* 1990, 107, 75-81.
- van den Thillart, G.E.; Dufour, S. *Spawning Migration of the European Eel*, Springer: USA, New York, 2009, pp. 3-9.

요약

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 성 성숙은 강에서부터 산란 장소로 회유하는 동안 이루어진다. 이 산란 회유는 눈의 크기가 커지는 것과 같은 형태적 변화를 동반하지만 이러한 생태학적 변화에 대한 내분비 기전은 아직 명확히 알려진 바 없다. 이 연구는 암컷 극동산 뱀장어의 성 성숙 과정 중의 내분비학적 변화를 조사하고자 수행하였다. 암컷 극동산 뱀장어의 성 성숙은 연어뇌하수체추출물 (Salmon pituitary extract, SPE)을 복강 주사하여 인위적으로 유도하였다. 그리고 성 성숙 과정 중의 난모세포 발달단계에 따른 형태학적 변화, ER α 및 ER β mRNA의 발현 양상을 real-time qPCR 방법으로 분석하였다. 그리고 성숙한 개체와 미성숙한 개체의 망막 조직에서 ER α 와 ER β mRNA 발현 변화를 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 방법으로 분석하였다. 난모세포 발달단계 과정 중 gonadosomatic index (GSI)와 eye index (EI)는 중기 난황 형성기부터 급격히 증가하였다. 또한 혈중 estradiol-17 β (E2) 농도는 난모세포의 중기 난황 형성기에 급격히 증가하였다. 성 성숙에 따라 ER α 와 ER β mRNA 발현은 눈, 뇌, 뇌하수체, 난소에서 증가하였다. ER α 및 ER β mRNA는 눈의 맥락막모세혈관층과 광수용체층에서 발현되었지만, 미성숙한 암컷과 비교하였을 때 성숙한 암컷의 맥락막모세혈관층에서 강하게 발현되었다. 이 연구 결과는 극동산 뱀장어에서 E2는 산란 이주를 하는 동안 말초조직에서 일어나는 생리적 적응에 중요한 역할을 한다는 것을 제시해 준다.