JFMSE, 31(2), pp. 418~425, 2019.
수산해양교육연구, 제31권 제2호, 통권98호, 2019.
www.ksfme.or.kr
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2019.4.31.2.418

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 배발생동안 인슐린유사성장인자와 비텔로제닌의 발현

박수진 · 문지성 · 서진송 · 최윤희†
부경대학교(학생) · †부경대학교(교수)

The Expression of Insulin-like Growth Factor and Vitellogenin During Embryonic Development in the Olive Flounder(*Paralichthys olivaceus*)

Su-Jin PARK · Ji-Sung MOON · Jin-Song SEO · Youn Hee CHOI†
Pukyong National University(student) · †Pukyong National University(professor)

Abstract

This study investigated the expression of insulin-like growth factor(IGF) and vitellogenin(Vtg) during embryonic development in the olive flounder(*Paralichthys olivaceus*). Morphological stages were divided into four developments as prehatching, hatching, 1 day after hatching, and 2 days after hatching. During embryonic development, expression of mRNA and protein of IGF-I, IGF-II, IGF-I receptor(IGF-IR), and Vtg were investigated using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blot analysis. During development progresses, the IGF-II mRNA level was higher expressed than that of IGF-I. In addition, the level of IGF-II and IGF-IR mRNA had highest value in the hatching period. The Vtg mRNA showed a very similar pattern. Meanwhile, the IGF-IR β-subunit was not detected. However, tyrosine phosphorylation of the intracellular β-subunit was clearly expressed. The results of this study provide basic information on the involvement of IGF system and Vtg during embryonic development of olive flounder(*P. olivaceus*).

Key words : Olive flounder, Insulin-like growth factor, Vitellogenin, Embryonic development

Ⅰ. 서 론

성장인자는 세포 내 성장, 분열, 분화 및 치료를 자극할 수 있는 물질로서 알려져 있으며, 특히, 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor, IGF)는 포유류와 어류에서 성장, 물질대사, 발생, 번식, 삼투압 조절과 면역반응을 조절하는 주된 인자로 알려져 있다(Li et al., 2012; Vera Cruz et al., 2006). IGF 시스템은 3가지 요소인, IGF-I과 IGF-II를 포함한 리간드, IGF-결합단백질인 IGFBPs(IGF Binding Proteins), IGF 수용체인 IGF-IR(IGF-I Receptor)를 가지고 있다(Duan, 1997). 포유류에서 IGF-I과 IGF-II는 초기 배발생 과정을 조절하는 주요한 내분비 시그널로서 작용하며(Chandra et al., 2011), 어류에서는 zebrafish, *Danio rerio*(Li et al., 2014; Schlueter et al., 2007; Zou et al., 2009), starry flounder, *Platichthys stellatus*(Xu et al., 2015) 등의 배발생 과정에서도 IGF 시스템에 관한 역할이 보고되고 있다.

또한, 경골어류의 알은 상당한 양의 난황물질

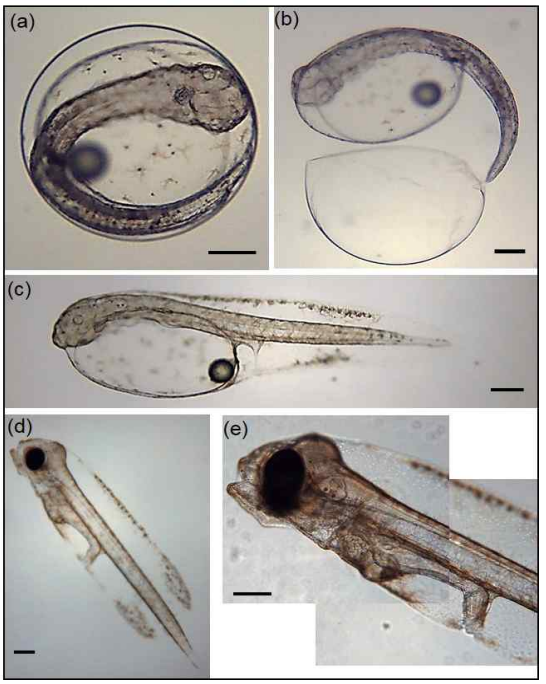
† Corresponding author : 051-629-5915, unichoi@pknu.ac.kr
※ 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2017년)에 의해 연구되었음.

을 가지고 있으며 이들은 단백질과 지질이 풍부한 영양원으로서 배(embryo)의 발생과 유생의 성장을 위해 공급된다. 특히, 난황의 대부분을 차지하고 있는 비텔로제닌(vitellogenin, Vtg)은 주요한 난황전구단백질로서 성숙한 암컷의 간에서 에스트로겐의 조절에 의해 합성되는 물질이며, 알의 성숙에 관여한다(Mouchel et al., 1996; Hartling and Kunkel, 1999). 한편, Vtg로부터 유래된 난황단백질은 난모세포가 성숙하는 동안 난모세포의 수화(hydration)를 촉진시켜 해산 경골어류의 부성란이 부력을 가질 수 있도록 도와주는 역할도 하는 것으로 보고되고 있다. Vtg에 관한 연구는 난모세포의 성장과 성숙이 이루어지는 동안 Vtg의 구조(Mouchel et al., 1996; Matsubara et al., 1999; Hiramatsu et al., 2015)와 분자학적 성상(Sawaguchi et al., 2006)을 중심으로 이루어져 왔으며, 최근 Kim et al.(2018)이 넙치의 배발생에 따른 Vtg의 변화에 대하여 보고하였다. 그러나, 부화전후의 배 내에서 성장 및 난황물질과 관련된 IGF의 발현시스템과 Vtg의 변화에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 넙치의 수정란을 사용하여 발생단계가 부화직전 및 부화직후, 부화 후 1일, 부화 후 2일째의 자어를 대상으로 IGF 시스템과 비텔로제닌의 발현을 조사하여 이들이 배의 발달과 자어의 성장에 미치는 영향을 연구하였다.

Ⅱ. 연구 방법

1. 샘플 준비

넙치 수정란은 제주시 구좌읍에 소재한 양식장에서 자연산란된 것을 사용하였다. 30 L 원형수조(n=3)에서 수온 20±0.5℃를 유지하면서 발생실험을 진행하였다. 부화직전(수정 후 45시간), 부화직후(수정 후 50시간), 부화 후 1일(수정 후 74시간) 및 부화 후 2일(수정 후 98시간)에 발생배와 자어를 채취하였다([Fig. 1]). 채취한 샘플(n=50)은 즉시 액체질소에서 동결한 다음 실험에 사용하기 전까지 -75℃에 보관하였다.



[Fig. 1] Development of eggs and hatched larvae of the olive flounder(*Paralichthys olivaceus*). Developmental stages: (a) Prehatching, (b) Hatching, (c) 1 day after hatching, (d) and (e) 2 days after hatching. Scale bar=200 μm.

2. Western blot 분석

넙치 수정란의 발생에 따라 배와 부화자어에 IGF 및 Vtg의 발현을 확인하기 위해 immunoblot assay를 실시하였다. 배와 부화자어를 각각 50개체씩 RIPA buffer(50 mM Tris, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate)를 이용하여 균질화하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 채취하였다. 이때 RIPA buffer에는 단백질 가수분해효소 억제제(1 μg mL-1 aprotinin, 1 μg mL-1 leupeptin, 1 μg mL-1 pepstatin, 1 mM Na3VO4, 1 mM NaF, 1 mM

phenylmethanesulfonyl fluoride)를 포함하였다. 단백질 농도는 BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 50 μg의 단백질을 8-10% polyacrylamide gels을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하여 분리한 다음 polyvinyl difluoride membranes(Millipore)을 이용하여 transfer 하였다. 각 membrane은 1% BSA를 함유한 TBS-T(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5, 0.1% Tween 20)로 블로킹하였으며, 1차 항체는 1:1,000, 2차 항체는 1:10,000의 비율로 희석하여 사용하였다. 실험에 사용한 1차 항체는 IGF-I, IGF-II, IGF-IR ß-subunit, ß-actin(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)과 vitellogenin(abcam, Cambridge, UK)을 사용하였다. 2차 항체는 HRP-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (Santa Cruz Biotechnology) 혹은 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. ß-actin은 대조구로서 사용하였으며, GeneSys imaging system(SynGene Synoptics, Ltd., London, UK)을 사용하여 분석하였다.

3. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA 추출은 Trans Zol Up(TransGen Biotech, Beijing, China)을 이용하여 분리하였고, cDNA 합성은 total RNA를 주형으로 Prime Script First cDNA Synthesis Kit(TaKaRa Bio, Shiga, Japan)을 사용하여 합성하였다.

4. Quantitative real time polymerase chain reaction(RT qPCR)

각 유전자들의 발현은 real-time qPCR을 사용하여 정량분석하였다. 분석은 TB Green Premix Ex Taq II(TaKaRa Bio, Shiga, Japan)를 사용하였으며, Thermal Cycler Dice Real Time System을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 <Table 1>에 나타내었으며, 95°C에서 5초 및 60°C에서 30초 2단계를 50회 반복하여 각 유전자를 증폭하였다. 각 유전자의 발현은 GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen-ase)의 상대정량을 통해 분석하였다.

5. 통계처리

모든 자료는 one-way ANOVA(Statistical Package for the Social Sciences, ver. 10.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)로 분산분석을 실시하여 최소 유의차 검정으로 평균간의 유의차 유무를 판정하였다.

<Table 1> Oligonucleotide sequences of primers for the real-time qPCR assay

Identification	Sequence (5′-3′)	Amplicon size (bp)	GenBank#
Vitellogenin-I	(F)-TGAGCTCTTTGAGTACAGCG	181	AB200267.1
	(R)-TCCTCTCTGGATGTTCAGCA		
Insulin-like growth factor-I	(F)-CGGCGCCTGGAGATGTACTG	144	AF016922.2
	(R)-TGTCCTACGCTCTGTGCCCT		
Insulin-like growth factor-II	(F)-CAGCATGTGACCGTGAAGTA	138	XM_020102187.1
	(R)-CTGCTCCTGTGCTTTGATCT		
Insulin-like growth factor-I receptor	(F)-ACCATCATCACGGACTACCT	165	AB065098.1
	(R)-CAGGTTGTACAGGCCAATGT		

F, forward; R, reverse.

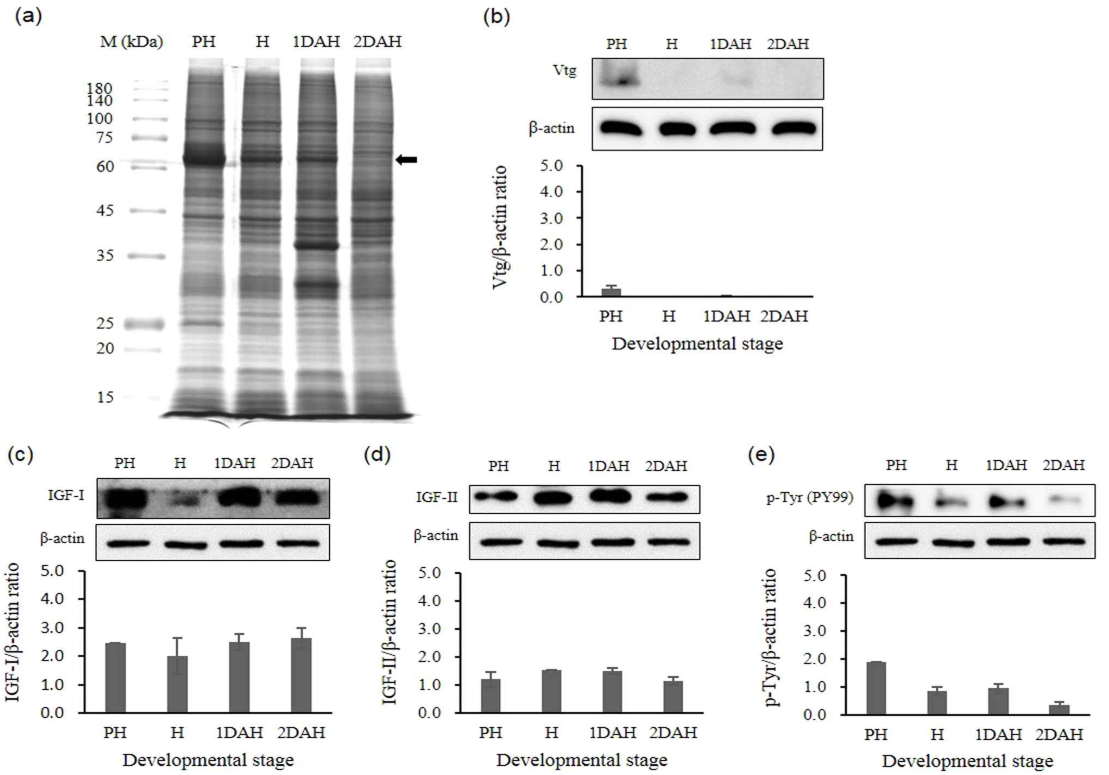
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 넙치 발생배와 부화자어

본 연구에 사용된 넙치의 수정란은 수정 후 45시간이 경과되었을 때 해당발생 단계의 90%가 부화직전(지름 0.95±0.02 mm)에 이르렀으며, 부화 직후의 자어(전장 2.14±0.01 mm)는 50시간, 부화 후 1일된 자어(전장 2.14±0.19 mm)는 74시간, 부화 후 2일된 자어(전장 3.23±0.18 mm)는 98시간이 소요되었다. Kim et al.(2010)에 의하면, 제주산 넙치의 수정란이 부화에 이르는 시간은 20℃를 기준으로 39.5시간이 소요되었으며, Kim et al.(2018)은 18℃에서 42시간 이상이 소요하는 것으로 보고하였다. 이는 해당 발생단계의 기준이 연구자마다 다르게 설정하였기에 본 연구와 차이가 나타난 것으로 사료된다. 한편, 부화 직후 및 부화 1일된 자어는 난황을 가지고 있으며 장이 닫혀 있었으나, 부화 후 2일된 자어는 입과 장이 열려 있는 모습을 확인할 수 있었다([Fig. 1]).

2. 비텔로제닌과 IGF-related protein의 발현

SDS-PAGE 분석 결과, 발생단계에 따라 단백질의 발현이 다르게 나타났다([Fig. 2a]),

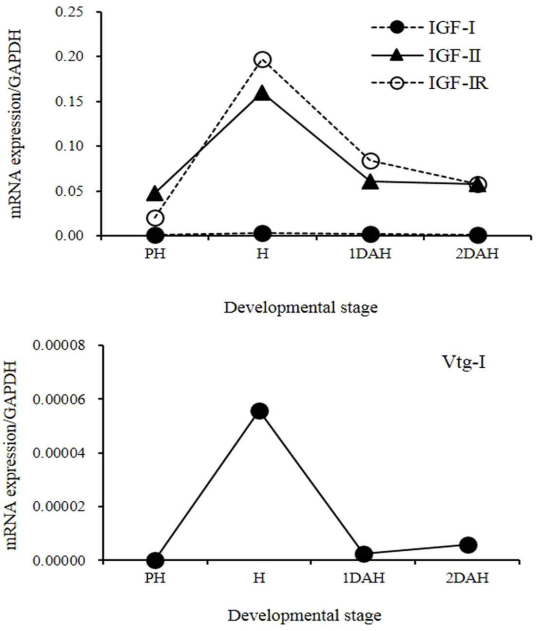


[Fig. 2] Changes in protein during development in the olive flounder(*Paralichthys olivaceus*). (a) SDS-PAGE of whole extracts of embryos and larvae, (b) Western blot of vitellogenin expression in whole extracts of embryos and larvae, (c-e) Western blot of IGF-I, IGF-II, and phospho-tyrosine (PY99) expression in whole embryos and larvae. M, marker; PH, Prehatching; H, Hatching; 1DAH, 1 day after hatching; 2DAH, 2 days after hatching; Vtg, vitellogenin. arrow shows vitellogenin fragment.

특히 67 kDa에서 밴드의 발현이 뚜렷하게 감소하는 경향을 보였으며, 이는 Vtg의 fragment인 것으로 확인되었다([Fig. 2b]). Walleye pollock, *Theragra chalcogramma*(Bailey et al., 2002)의 수정란과 난황을 가진 자어에서 66 kD의 난황단백질이 보고되었고, barfin flounder, *Verasper moseri*(Matsubara et al., 1999)의 성숙기 난모세포와 배란된 알에서 다양한 크기의 Vtg의 chain들이 보고된 바 있다.

난모세포의 최종 성숙기간 동안 난황 단백질이 가수분해되어 유리아미노산으로 되는 과정은 부성란이 부유할 수 있도록 하며, 이러한 기능은 배발생동안 이루어지며, 배에서 자어로 진행될수록 리포비텔린(lipovitelline)의 함량은 감소하게 된다(Hartling and Kunkel, 1999). 본 연구에서도, Vtg의 함량은 발생이 진행될수록 감소하였으며, 부화 후 2일된 자어에서는 거의 나타나지 않았다([Fig. 2a, 2b]).

또한, western-blot 분석을 통한 IGF-related protein의 발현 결과, IGF-I과 IGF-II는 시기별 양의 차이는 있었으나 모두 발현되었다([Fig. 2c-d]). IGF-IR β-subunit의 발현은 확인되지 않았으나, 이들의 활성화 유무를 확인하는 tyrosine phosphorylation(PY99)을 조사한 결과, 전 개체에서 뚜렷하게 나타났다([Fig. 2e]). 한편, RT qPCR에서는 IGF-I, IGF-II, IGF-IR, Vtg mRNA의 발현이 동일한 경향을 보였으나 극소량의 차이로 인해 유의차는 없었다($P>0.05$)([Fig. 3]). 특히, 모든 발생 단계에서 IGF-II와 IGF-IR의 발현이 IGF-I에 비해 높았으며, 부화직후 높은 활성을 보이다가 부화 후 1일부터 급격히 감소하였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다($P>0.05$). 일반적으로, 어류의 배발생과정 동안 IGF-II의 발현이 IGF-I보다 높은 수준으로 나타나며(Greene and Chen, 1999; Ayson et al., 2002), 일부 종에서는 이들의 변화가 관찰되지 않았다(Maures et al., 2002). Kim et al.(2018)은 수정란에서 발생이 진행되어 부화에 이를수록 IGF-II의 발현이 높게 나타나, 배의 성



[Fig. 3] (a) Expression of IGF-I, IGF-II, and IGF-IR mRNA and (b) vitellogenin in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Vtg, vitellogenin.

장에 영향을 주는 것으로 보고하였다. 틸라피아, *Oreochromis niloticus*(Berishvili et al., 2006), 서대, *Solea senegalensis*(Funes et al., 2006), 농어, *Dicentrarchus labrax*(Radaelli et al., 2008)의 경우에도 부화직전 IGF-II mRNA가 IGF-I보다 높게 발현되었다. 그러나, starry flounder, *P. stellatus*에서는 IGF-I mRNA의 수준이 IGF-II의 발현 수준보다 높은 것으로 보고하였다(Xu et al., 2015). 한편, 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*(Malkuch et al., 2008)에서는 부화전후 IGF-I과 IGF-II가 모두 발현되었으나, IGF-I이 IGF-II mRNA의 발현보다 높은 값을 나타내어, 배발생 과정에서 종특이성을 보여주었다.

일반적으로 포유류의 태아기에서는 IGF-II가 여러조직에서 뚜렷하게 발현되며, IGF-I은 태아기뿐만 아니라 출생 후에도 발현된다. 이는 출생직후 간(liver)이 성장호르몬(growth hormone, GH)의 조절하에 IGF-I 생산을 위한 주된 장소로 되

기 때문이며, 경골어류에서도 이와 같은 현상이 나타난다(Duan, 1998). Gilthead seabream, *Sparus aurata*에서 부화 후 IGF-I과 IGF-II mRNA가 확인되었으며, IGF-II mRNA의 수준이 부화 후 1일된 자어에서 가장 높은 값을 보인 후 감소하였으며(Duguay et al., 1996), 연어에서는 초기발생과정동안 IGF의 발현에 대한 자료가 없다. 또한, turbot, *Scophthalmus maximus*에서는 개체발생을 위해 IGF-I과 insulin이 연구되기도 하였다(Berwert et al., 1995). 이와 같이 GH를 포함한 IGF 발현 수준은 어류의 성장과 밀접한 관계가 있으며, 환경변화에 따른 내분비계의 생리적인 반응이 반영된 것이라 할 수 있다(Duan, 1998).

본 연구에서 부화 시 높은 수준으로 나타난 IGF-II mRNA는 자어의 성장을 위해 사용되는 것으로 생각되며, 개구 후 먹이를 공급하지 않아 IGF의 발현율이 다소 감소하는 것으로 보인다. Bangcaya(2004)는 IGF-I, IGF-II, IGF-IR의 발현량이 높았던 숭어, *Mugil cephalus*의 배가 부화율이 높았으며, 또한, 산란을 하여 부화가 이루어진 배가 부화하지 않았던 배에 비해 높은 수준의 Vtg 값을 유지한 것으로 보고하여 IGF 시스템과 Vtg과의 상관관계를 보고하였다.

Ⅳ. 결 론

본 연구는 넙치의 배발생 과정에서 IGF 시스템과 Vtg 발현과의 관계를 규명하기 위해 부화전후 자어를 대상으로 IGF-I, IGF-II, IGF-IR, Vtg의 발현 실험을 실시하였다. mRNA 수준에서 IGF-II의 발현량은 IGF-I에 비해 상당히 높은 값을 나타내었으며, 또한 IGF-IR의 경우에도 IGF-II의 발현값과 유사하게 나타났다. 한편, 난모세포의 성숙과 수정란 부유에 관여하는 Vtg의 양 역시 IGF-II와 IGF-IR의 발현과 유사한 경향을 보였다. 그러나, 배발생에 앞서 Vtg의 합성에 관여하는 에스트로겐의 양, 간에서 합성되는 Vtg의 양, 난모세포의 발달에 따른 Vtg의 구조와 함량, 먹이 섭취 후 자어의 성장에 따른 IGF 시스템의 발현 및 이들의 상관관계에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

Ayson F, E deJesus S, Moriyama S, Hyodo S, FunkensteinB, Getler A and Kawauchi H(2002). Differential expression of insulin-like growth factor I and II mRNAs during embryogenesis and early larval development in rabbit fish, *Siganus guttatus*. Gen Comp Endocrinol 126, 165~174. https://doi.org/10.1006/gcen.2002.7788

Bailey KM, Merati N, Melser M, Hiramatsu N and Hara A(2002). Developmental changes in egg yolk proteins of walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, and a comparative study of immunoreactivity of other North Pacific teleosts and invertebrate eggs. Bull Fish Sci Hokkaido Univ 53, 95~105.

Bangcaya JP(2004). IGF-I, IGF-II and IGF-IR expression as molecular markers for egg quality in mullet and grouper. Masters by Research thesis, Queensland University of Technology, Australia.

Berishvili G, Shved N, Eppler E, Clota F, Baroiller JF and Reinecke M(2006). Organ specific expression of IGF-I during early development of bony fish as revealed in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, by in situ hybridization and immunohistochemistry: indication for the particular importance of local IGFI. Cell Tissue Res 325, 287~301. https://doi.org/10.1007/s00441-005-0133-9

Berwert L, Segner H and Reinecke M(1995). Ontogeny of IGF-I and the classical islet hormones in the turbot, *Scophthalmus maximus*. Peptides 16, 113~122.

Chandra V, Kumar GS and Sharma GT(2011). Temporal expression pattern of insulin-like growth factors (IGF-1 and IGF-2) ligands and their receptors (IGF-1R and IGF-2R) in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced in vitro. Live Sci 135, 225~30.

https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.07.016
Duan C(1997). The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. Amer Zool 37, 491~503. Fish Aquat Sci 15, 21～27. https://doi.org/10.1093/icb/37.6.491
Duan C(1998). Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. J Nutr 128, 306S~314S. https://doi.org/10.1093/jn/128.2.306S
Duguay SJ, Lai-Zhang J, Steiner DF, Funkenstein B and Chan SJ(1996). Developmental and tissue regulated expression of insulin-like growth factor I and II mRNA in *Sparus aurata*. J Mol Endocrinol 16, 123~132.
Funes V, Asenio E, Ponce M, Infante C, Canavate JP and Manchado M(2006). Insulin-like growth factors I and II in the sole *Solea senegalensis*: cDNA cloning and quantitation of gene expression in tissues and during larval development. Gen Comp Endocrinol 149, 166~172. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.05.017
Greene M and Chen T(1999). Quantitation of IGF-I, IGF-II and multiple insulin receptor family member messenger RNAs during embryonic development in rainbow trout. Mol Reprod Dev 54, 348~361. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199912)54:4<348::AID-MRD5>3.0.CO;2-N|
Hartling R and Kunkel J(1999). Developmental fate of the yolk protein lipovitellin in embryos and larvae of winter flounder, *Pleuronectes americanus*. J Exp Zool 284, 686~695.
Hiramatsu N, Todo T, Sullivan CV, Schilling J, Reading BJ, Matsubara T, Ryu YW, Mizuta H, Luo W, Nishimiya O, Wu M, Mushirobira Y, Yilmaz O and Hara A(2015). Ovarian yolk formation in fishes: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. Gen Comp Endocrinol 221, 9~15. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.025
Kim KW, Nam TJ and Choi YH(2018). Protein variation and involvement of insulin-like growth factor during embryonic development in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Aqua Sci 21, 4. https://doi.org/10.1186/s41240-018-0082-3
Kim YS, Do YH, Kim SY and Chang YJ(2010). Developmental speed of olive flounder *Paralichthys olivaceus* eggs in various water temperatures. Dev Reprod 14, 59～63.
Li J, Wu P, Liu Y, Wang D and Cheng CHK(2014). Temporal and spatial expression of the four Igf ligands and two Igf type 1 receptors in zebrafish during early embryonic development. Gene Exp Patt 15, 104~111. https://doi.org/10.1016/j.gep.2014.05.006
Li Y, Wu S, Ouyang J, Mao L, Li W and Lin H(2012). Expression of insulin-like growth factor-1 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in yeast *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 84, 80~85. https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.019
Malkuch H, Walock C, Kittilson JD, Raine JC and Sheridan MA(2008). Differential expression of pre‐osomatostatin and somatostatin receptor-encoding mRNAs in association with the growth hormone-insulin-like growth factor system during embryonic development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol 159, 136~142. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.08.005
Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T, Sullivan C and Hara A(1999). Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. Devel Biol 213, 18~32. https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9365
Maures T, Chan SJ, Xu B, Sun H, Ding J and Duan C(2002). Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor I receptors and their ligands in zebrafish. Endocrinol 143, 1858~1871. https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8768
Mouchel N, Trichet V, Betz A, Le Pennec JP and Wolff J(1996). Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gene 174, 59~64. https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00336-8
Radaelli G, Poltronieri C, Bertotto D, Funkenstein B and Simontacchi C(2008). Cellular localization of insulin-like growth factor-II protein in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from hatching to adult. Histol Histopathol 23, 523~530.

DOI: 10.14670/HH-23.523

Sawaguchi S1, Kagawa H, Ohkubo N, Hiramatsu N, Sullivan CV and Matsubara T(2006). Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. Mol Reprod Dev 73, 719~736. https://doi.org/10.1002/mrd.20446

Schlueter PJ, Peng G, Westerfield M and Duan C(2007). Insulin-like growth factor signaling regulates zebrafish embryonic growth and development by promoting cell survival and cell cycle progression. Cell Death Differ 14, 1095~1105. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402109

Vera Cruz EM, Brown CL, Luckenbach JA, Picha ME, Bolivar RB and Borski RJ(2006). Insulin-like growth factor-I cDNA cloning, gene expression and potential use as a growth rate indicator in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 251, 585~595. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.039

Xu Y, Zang K, Liu X, Shi B, Li C and Shi X(2015). Insulin-like growth factors I and II in starry flounder (*Platichthys stellatus*): molecular cloning and differential expression during embryonic development. Fish Physiol Biochem 41, 139~152. https://doi.org/10.1007/s10695-014-0012-y

Zou S, Kamei H, Modi Z and Duan C(2009). Zebrafish IGF genes: gene duplication, conservation and divergence, and novel roles in midline and notochord development. PLoS ONE 9, e7026. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007026

• Received : 14 January, 2019
• Revised : 25 February, 2019
• Accepted : 01 March, 2019