



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

이 학 석 사 학 위 논 문

홍바리(*Epinephelus fasciatus*) 난황형성기

난모세포에서의 성호르몬 대사



2013 년 8 월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 생 물 학 과

김 슬 기

이 학 석 사 학 위 논 문

홍바리(*Epinephelus fasciatus*) 난황형성기

난모세포에서의 성호르몬 대사

지도교수 백혜자

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2013 년 8 월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 생 물 학 과

김 슬 기

# 김슬기의 이학석사 학위논문을 인준함

2013년 8월 23일



주 심 이학박사 김진구



위 원 이학박사 김현우



위 원 이학박사 백혜자



# 목 차

List of Figures .....	ii
List of Tables .....	iv
Abstract .....	v
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
1. 실험어 .....	3
2. 난소의 조직학적 관찰 .....	4
3. 난모세포의 분리 및 배양 .....	5
4. 스테로이드 호르몬 대사물질 분석 및 동정 .....	6
5. 성 스테로이드 호르몬 분석 .....	7
III. 결 과 .....	11
1. 난모세포의 조직학적 관찰 .....	11
2. 난모세포의 스테로이드 대사물질 추적 .....	13
3. 난모세포의 스테로이드 대사물질 대사율 변화 .....	22
4. 혈중 성 호르몬 농도 변화 .....	24
IV. 고 찰 .....	26
V. 요약 .....	29
VI. 참고문헌 .....	30

## List of Figures

<b>Fig. 1.</b> Experimental fish female of Blacktip grouper, <i>Epinephelus fasciatus</i> . .....	3
<b>Fig. 2.</b> Histological observation of oocytes in blacktip grouper. ....	12
<b>Fig. 3.</b> Autoradiograms of steroid metabolites incubated with [ <sup>3</sup> H]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone from greenling ovarian follicles at three different oocyte diameter. ....	14
<b>Fig. 4.</b> Comparison of radioactivity on the TLC plate by digital photo-stimulated luminescences (PSL) autoradiography. ....	15
<b>Fig. 5.</b> Chromatograms showing retention times (in minutes) over a 20min chromatographic run-time. ....	16
<b>Fig. 6.</b> Chromatograms showing retention times (in minutes) over a 20min chromatographic run-time. ....	17
<b>Fig. 7.</b> HPLC elution profile of the radioactive standard steroid and metabolites. ....	18
<b>Fig. 8.</b> HPLC elution profile of the radioactive standard steroid and metabolites. ....	19
<b>Fig. 9.</b> Mass spectra of steroid metabolized by blacktip grouper. ....	20
<b>Fig. 10.</b> Mass spectra of steroid metabolized by blacktip grouper. ....	21

**Fig. 11.** Radioactivities of steroid metabolites from [<sup>3</sup>H]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in blacktip grouper oocytes. .... 23

**Fig. 12.** Change in plasma level of E<sub>2</sub> in the blacktip grouper. .... 25



## List of Tables

<b>Table 1.</b> The retention factor (Rf) values of steroid metabolites on the TLC plates .....	8
<b>Table 2.</b> HPLC instruments and analysis conditions for separation of steroid metabolites .....	9
<b>Table 3.</b> Analytical conditions of GC/MS for identification of steroid metabolites .....	10



# Steroid metabolism in the blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus* during oocyte vitellogenesis

Seol-Ki Kim

Department of Marine Biology, Graduate School,  
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

## Abstract

We studied oocyte steroidogenesis by blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus* ovarian follicles during vitellogenesis. Vitellogenic oocytes with average diameters of 0.45, 0.48 and 0.50 mm were used for the studies and were incubated in vitro in the presence of [3H]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone as a precursor. The steroid metabolites were analyzed using a thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The major metabolites were androstenedione (A4), testosterone (T), estradiol-17 $\beta$  (E2) and estrone (E1) in vitellogenic oocytes. The metabolite of A4 was increased at the oocytes of 0.50 mm, while that of E1 was decreased. The metabolite of E2 was lower in the oocytes of 0.50 mm than that in the oocytes of 0.48 mm. These results suggest that the oocytes with average diameter of 0.50 mm are fully vitellogenic stage in blacktip grouper. Interestingly, the metabolic pattern of E1 was similar to E2 in tested oocytes. Previous studies have demonstrated that E2 is synthesized via E1 in some hermaphrodite species. However, it is still unknown whether the E1-E2 pathway is conserved in blacktip grouper. Future studies should examine the roles of E1 during vitellogenesis in this species.

## I. 서론

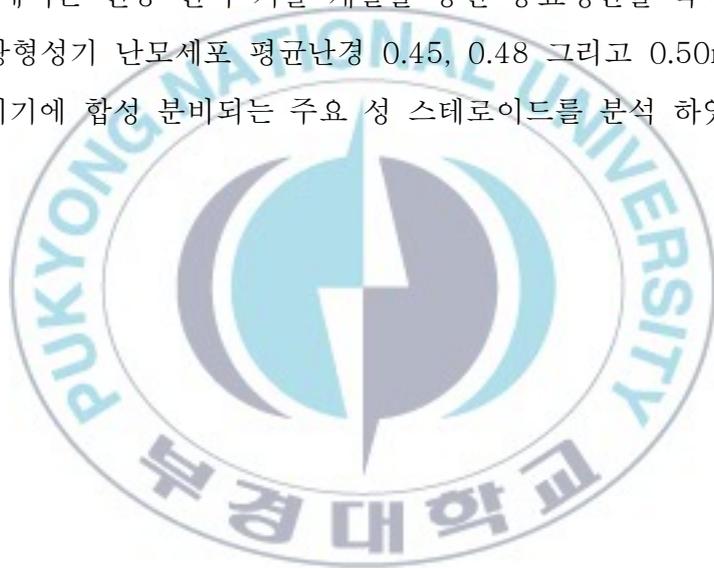
어류의 난 성숙 과정은 여포층에서 생성·분비되는 성 스테로이드 호르몬에 의해 조절되고 있으며, 뇌하수체의 생식선자극호르몬(gonadotropin)이 그 매개체 역할을 하고 있다. 난소에 난황이 축적되기 시작하는 난황형성기(vitellogenesis)에는 estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)가 주요 스테로이드로 작용하며, 난황축적이 종료된 직후부터 배란시기까지는 progesterone의 유도체인 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP)나 17,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17 $\alpha$ 20 $\beta$ 21P)등이 주요 성 스테로이드 호르몬으로 알려져 있다(Nagahama et al., 1994; Yoshizaki et al., 2001; Patino et al., 2003). 특히 배란 전에 난핵포붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)를 포함하는 일련의 최종성숙 과정은 20 $\beta$ -hydroxy group을 가지고 있는 스테로이드에 의해 유도된다고 알려져 있다(Trant et al., 1988; Canario et al., 1988).

난황형성기는 경골어류의 번식에서 중요한 과정이며 간에서 난황전구물질(vitellogenin, Vg)이 합성·분비되어, 난모세포내에 축적 그리고 난황물질(vitellin)로의 전환과정을 포함한다. 이 기간 동안에 난모세포가 주로 성장하게 되는데, 난모세포 크기가 점점 증가하면서 크기가 최종 난모세포의 98% 까지 도달하게 된다(Tyler et al., 1990).

홍바리(*Epinephelus fasciatus*)는 농어목 바리과에 속하는 어류로서 다른 바리과 어류와 마찬가지로 자선성숙형 자웅동체이고 한번 산란기 동안에 여러번 산란하는 다회산란종(multiple spawner)이다(Kawabe et al 2009). 우리나라 근해에 서식하는 바리과 중에서 홍바리는 상업적으로 매우 중요한 회귀 어종으로 개체수가 적어 자원증강이 시급한 어종이

다(Annalie et al., 2000). 최근 홍바리의 번식생리특성에 관한 연구들이 이루어지고 있다(Song et al., 2005; Lee et al., 2010; Hwang et al., 2012). 하지만 성 성숙유도를 통한 종묘생산 또한 생존율 저하로 어려운 실정이다(Park et al., 2012; Kang et al., 2012; Kawabe et al., 2009). 또한, 홍바리는 최고 상위 포식자로서 그 해역 생태계를 조절하는 핵심(Keystone species) 역할을 하므로 홍바리의 적정 개체수 유지가 매우 중요하다고 사료된다.

본 연구에서는 인공 번식 기술 개발을 통한 종묘생산을 목적으로 홍바리의 난황형성기 난모세포 평균난경 0.45, 0.48 그리고 0.50mm를 대상으로 이시기에 합성 분비되는 주요 성 스테로이드를 분석 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 실험어

실험어인 홍바리는 제주대학교 해양과환경연구소에서 수온과 광주기 (25℃, 14L:10D) 조절로 성숙 유도시킨 홍바리 3개체를 대상으로 하였다. 실험어의 전장과 체장은 0.1 cm, 체중은 1 g까지 측정하였으며, 실험에 사용된 개체의 전장은 31.6 - 37.0 cm, 체중은 528 - 851 g 이었다.



Fig. 1. Experimental fish female of Blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*

## 2. 난소의 조직학적 관찰

난경별 난모세포 발달 단계의 조직학적 관찰을 위해 적출한 난소를 Bouin's 용액에 고정하여 파라핀으로 포매한 후 5-6  $\mu\text{m}$  두께의 절편을 만들어 Mayer's hematoxylin과 eosin으로 비교 염색하여 광학현미경(U-ND25-2, OLYMPUS, JAPAN)하에서 관찰하였다.



### 3. 난모세포의 분리 및 배양

실험어는 0.5 mL/L의 2-phenoxyethanol로 마취시켜 전 채혈한 후 무균상태에서 난소를 절취하여 ice-cold balanced salt solution (132.96 mM NaCl, 3.09 mM KCl, 0.28 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.98 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3.40 mM CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3.65 mM HEPES)으로 세척하였다. 절취된 난소는 가는 핀셋을 이용하여 난경별로 각각의 난모세포로 분리하였다. 분리된 난모세포는 난경별로 24-well plate에 well당 Leibovitz L-15 (L-15) 배양액(Gibco) 1mL에 적출한 난소조직일부(5.1 ~ 10.9mg)를 넣은 후 18℃에서 24시간 배양하였다. Balanced salt solution과 L-15 배양액의 pH는 7.85, 삼투농도는 370 milliosmol로 조절하였다. 난모세포에서 생성되는 성 스테로이드 호르몬종류를 분석하기 위해 방사표지된 전구물질인 17α-hydroxyprogesterone ([<sup>3</sup>H]-17α P, Amersham Life Science, England)을 난경별로 각각 55 kBq 첨가하여 배양하였다.

#### 4. 스테로이드 호르몬 대사물질 분석 및 동정

배양 후 난모세포와 배양액은 함께 80% ethanol로 균질화하여 원심분리한 후 상등액만을 모아 건조시킨 뒤 증류수 500  $\mu$ l에 용해시켜 dichloromethane으로 2번 추출하여 유리 스테로이드만을 얻었다.

스테로이드 추출물은 스테로이드 표준물질과 동시에 실리카겔을 입힌 얇은 막 지지체(TLC plate, 60F<sup>254</sup>, Merck)에 점적시킨 후 밀폐된 혼합용매(benzene : acetone = 80 : 20 와 Benzene : ethylacetate = 80 : 20)속에서 전개시켰으며, 각각의 반점에 해당하는 Rf 값은 Table 2와 같다. 전개 후 TLC plate를 건조시킨 뒤 대사물질들의 반점 중 estrone (E<sub>1</sub>)과 estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)는 요오드 증기로, 나머지 반점들은 254 nm의 자외선 하에서 확인하였다. TLC plate에 나타난 대사물질들은 방사선 사진법(autoradiography, Fuji Bas 3000)으로 재확인하였으며, 재확인된 반점에 해당되는 실리카겔 밴드를 잘라 5 mL의 혼합용매(dichloromethane : methanol = 9:1)로 용리하였다. 용리된 대사물질은 HPLC (high performance liquid chromatography, Waters)를 이용하여 표준물질의 retention time과 일치하는 fraction만을 분리하였다. 분리된 fraction은 Liquid Scintillation Counter (PACKARD TR-CARB-2100T, USA)를 이용하여 radioactivity 측정 후 대사물질별로 대사율을 계산하였으며, 분리된 대사물질은 HPLC-radiodetector로 확인하였다. HPLC 기기분석 조건은 Table 3와 같다. HPLC-radiodetector로 확인된 대사물질은 gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)로 동정하였으며, GC/MS (GCMS-QP5050A, Shimadzu, Japan) 작동조건은 Table 3와 같다.

## 5. 성 스테로이드 호르몬 분석

난모세포의 vitellogenesis과정 중 혈중 성 스테로이드 호르몬 Estradiol-17 $\beta$ 의 농도 변화를 조사하기 위해서 어체의 미부동맥으로부터 채취된 혈액은 4 $^{\circ}$ C, 15,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 혈장만 분리하였다.

이후 혈장 내 스테로이드를 diethylether로 2회 추출하여 유리(free) 스테로이드만을 얻은 후, 정량분석에 이용하였다. 혈장 내 E<sub>2</sub> 분석은 Kobayashi et al. (1988)의 방법을 수정하여 방사면역측정법 (Radioimmunoassay:RIA)으로 측정하였으며, 실험에 사용된 E<sub>2</sub> 항체는 프랑스 국립농업연구소(INRA, Rennes, France)로부터 얻었다. E<sub>2</sub> Standard 호르몬은 Sigma Chemical (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 또한 방사표지된 [2,4,6,7-<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub>는 Amersham Life Science(England)로부터 구입하였다.

Table 1. The retention factor (Rf) values of steroid metabolites on the TLC plates

Steroid standard	Migration distance (cm)	Rf values <sup>a</sup>
E1	12.9	0.86
A4	11.4	0.76
E2	10.35	0.69
17 $\alpha$ P	9.15	0.61
T	8.25	0.55
17 $\alpha$ 20 $\beta$ P	4.8	0.32
17 $\alpha$ 20 $\alpha$ P	3	0.20
17 $\alpha$ 20 $\beta$ 21P	1.05	0.07

<sup>a</sup>Rf, is defined as the distance traveled by the compound divided by the distance traveled by solvent (15cm).

Solvent system of mobile-phase was 3 times of benzene : ethylacetate = 4 : 1 (V/V) after 2 times of benzene : acetone = 4 : 1 (V/V). E1, estrone; A4, androstenedione; E2, estradiol-17 $\beta$  17 $\alpha$ P, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone; T, testosterone; 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P, 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one; 17 $\alpha$ 20 $\alpha$ P, 17,20 $\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one; 17 $\alpha$ 20 $\beta$ 21P, 17 $\alpha$ 20 $\beta$ 21-dihydroxy-4-pregnen-3-one.

Table 2. HPLC instruments and analysis conditions for separation of steroid metabolites

HPLC	Waters Alliance
Column	SunFire C <sub>18</sub> , 4.6×150 mm
Mobile phase	20% methanol : acetonitrile = 60 : 40
Flow rate	1 mL/min
UV detector	Waters 2487 Multiwavelength Absorbance Detector
Radio detector	β-RAM Model 4-Radio-HPLC Detector (IN/US system, USA)
Injection volume	20 $\mu$ l
Ending time	15 min



Table 3. Analytical conditions of GC/MS for identification of steroid metabolites

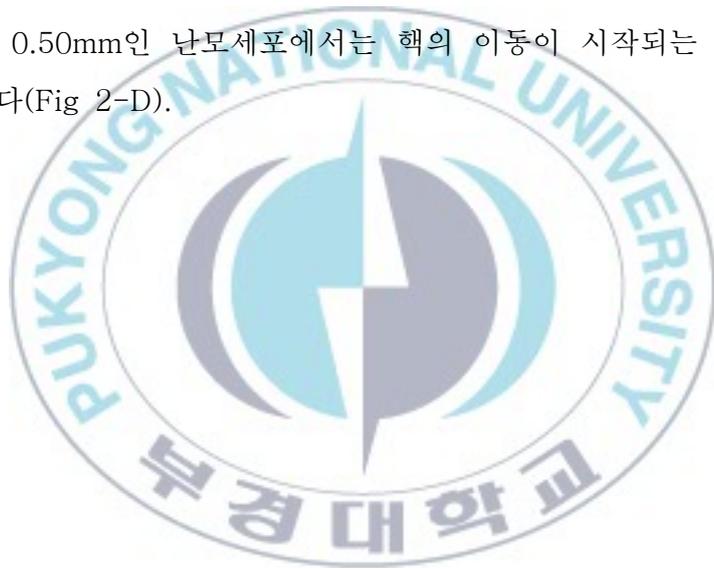
Instrument	GC/MS (Shimadzu 5050A)
Column	DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 $\mu$ m)
Flow rate (gas)	1 mL/min (He, 99.999 %)
Injection mode	Splitless mode
Injector temperature	260.00 °C
Detector temperature	300.00 °C
Oven temperature	60.00 °C (2.00 min) → 10.00 °C/min, 150.00 °C (0 min) → 5.00 °C/min, 295.00 °C (4 min)



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 난모세포의 조직학적 관찰

홍바리의 난소내 난모세포의 조직학적 관찰은 Fig. 1과 같다. 평균 난경 0.45, 0.48 그리고 0.5 mm에 해당하는 난모세포들은 모두 세포질 내에 난황과립(yolk granule, Yg)이 충전하였으며, 다양한 크기의 유구(oil droplet, OD)들이 관찰되었다(Fig 2-A,B,C). 난경 0.45과 0.48mm인 난모세포에서는 핵(nucleus, N)이 대부분 세포질 중앙에 위치 하였으나, 난경 0.50mm인 난모세포에서는 핵의 이동이 시작되는 난모세포도 관찰되었다(Fig 2-D).



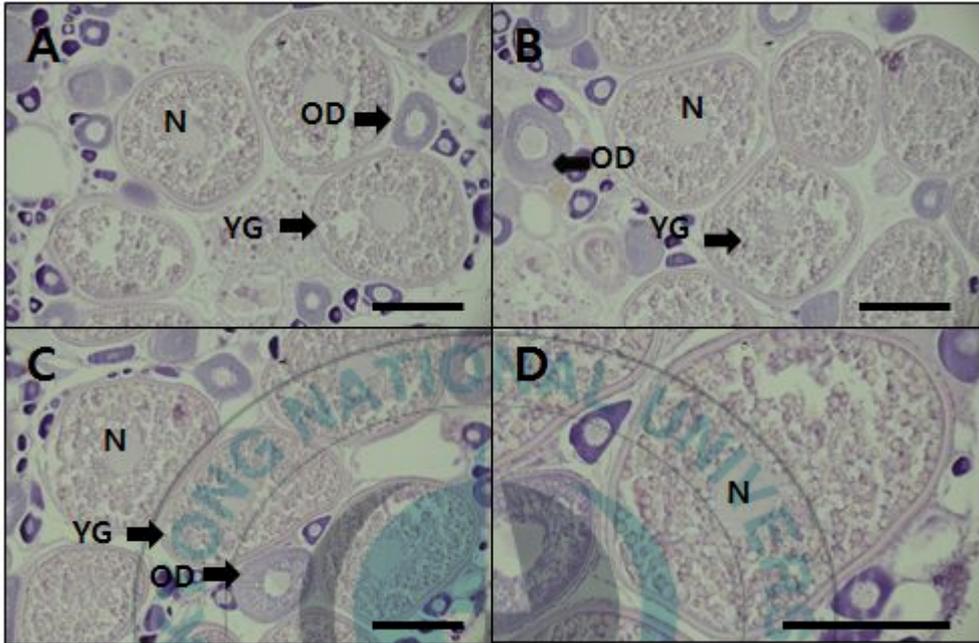


Fig. 2. Histological observation of oocytes in blacktip grouper. A, ovary with oocyte of 0.45mm in average diameter; B, ovary with oocyte of 0.48mm in average diameter; C, D, ovary with oocyte of 0.50mm in average diameter; N, nucleus; OD, oil droplet YG, yolk globule. Scale bars indicate 250µm.

## 2. 난모세포의 스테로이드 대사물질 추적

평균난경이 약 0.45, 0.48, 그리고 0.50mm인 난모세포에서 [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone으로부터 생성된 스테로이드 대사물질들의 TLC 상의 반점은 A<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub> 그리고 E<sub>1</sub> 등의 표준물질과 일치하였다. (Fig. 3) 전구물질로부터 생성된 주요 대사물질들 즉, A<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub> 는 HPLC-radiodetector를 거쳐 GC-MS에 의해 최종 동정되었다. (Fig. 5-10.) 그리고 E<sub>1</sub>은 대사된 농도가 낮아 Radiodetector에서는 검출되지 않았지만 GC-MS에 의해 동정되었다. (Fig. 7)



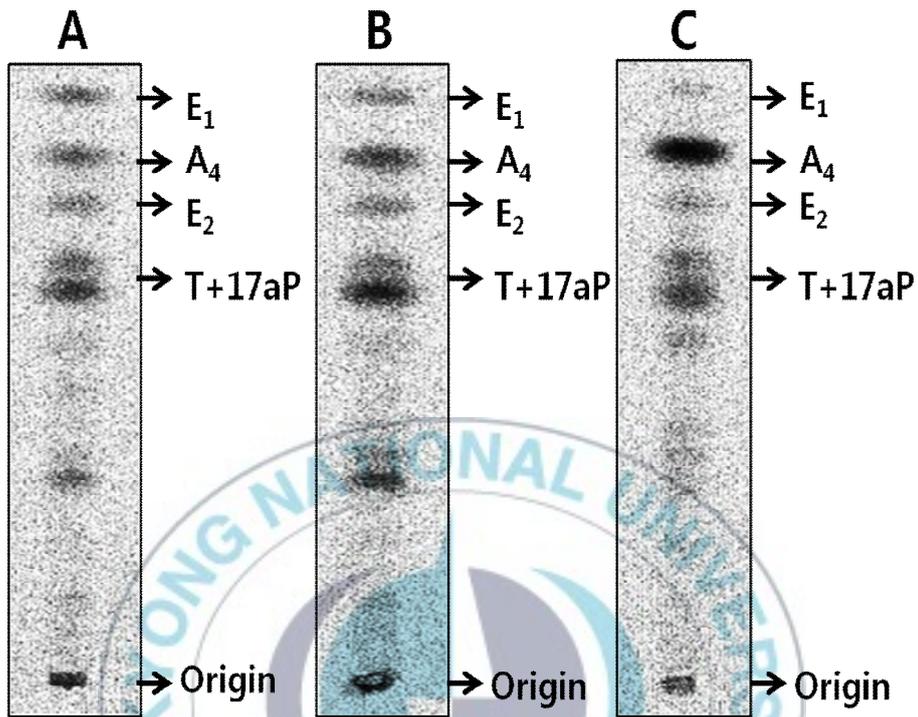


Fig. 3. Autoradiograms of steroid metabolites incubated with [<sup>3</sup>H]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone from greenling ovarian follicles at three different oocyte diameter. Four metabolites were separated by thin layer chromatography developed with a benzene : acetone (4:1) and benzene : ethyl acetate (4:1) solvent system. A; Oocytes of 0.45 mm diameter. B; Oocytes of 0.48 mm diameter. C; Oocytes of 0.50 mm diameter. A<sub>4</sub>, androstenedione; E<sub>1</sub>, estrone; E<sub>2</sub>, estradiol-17 $\beta$ ; T, testosterone.

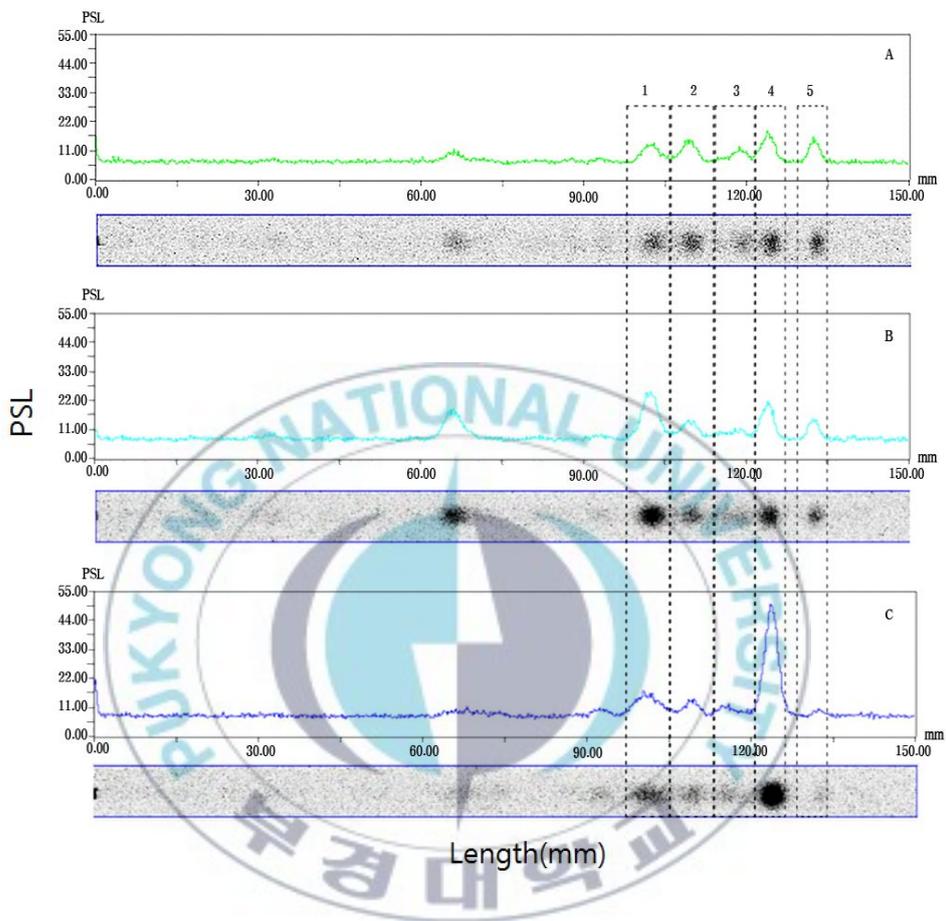


Fig. 4. Comparison of radioactivity on the TLC plate by digital photo-stimulated luminescences (PSL) autoradiography. A; Ovary with oocyte of 0.45 mm diameter. B; Ovary with oocytes of 0.48 mm diameter. C; Ovary with oocytes of 0.50 mm diameter. 1; fraction of T metabolite, 2; fraction of 17 $\alpha$ P metabolite, 3; fraction of E<sub>2</sub> metabolite, 4; fraction of A<sub>4</sub> metabolite, 5; fraction of E<sub>1</sub> metabolite.

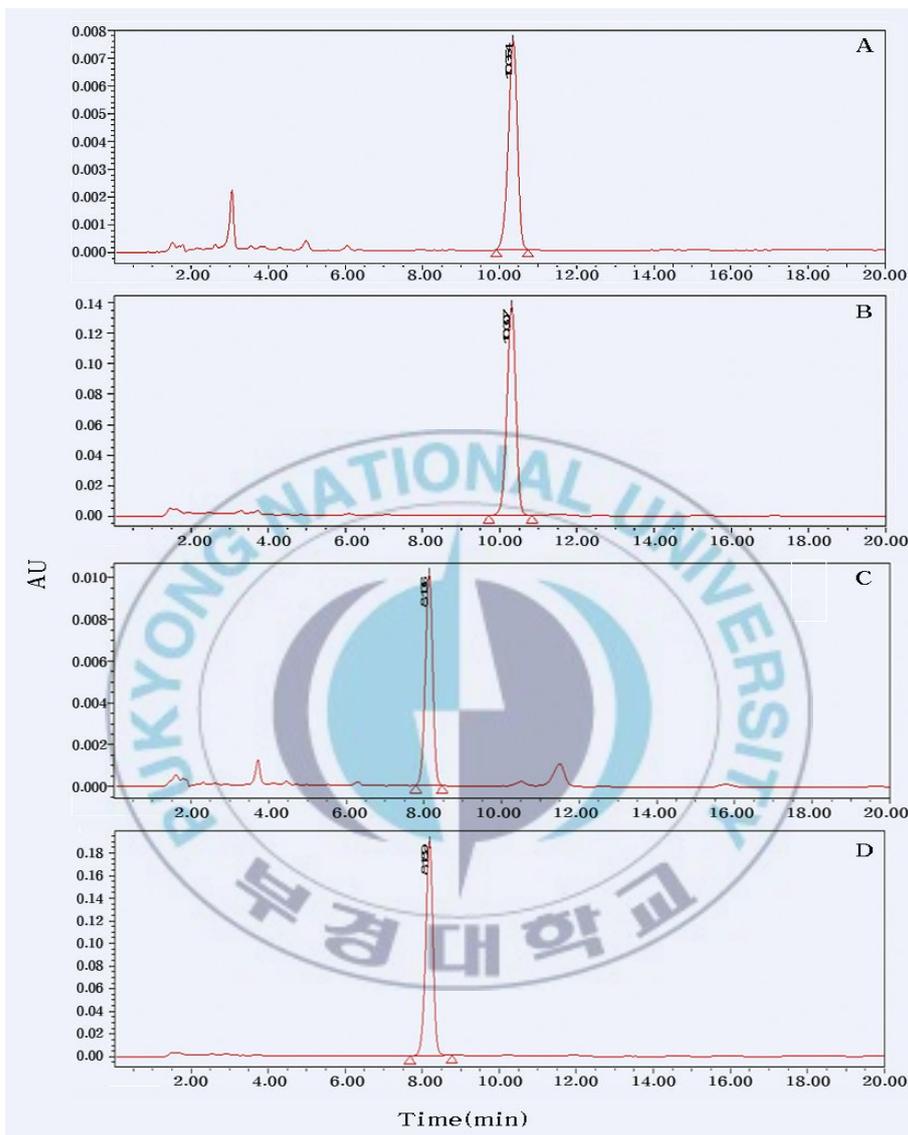


Fig. 5. Chromatograms showing retention times (in minutes) over a 20min chromatographic run-time for A, authentic  $A_4$ ; B, metabolized  $A_4$  C, authentic T; D, metabolized T. Steroid hormones were injected onto C18 column.

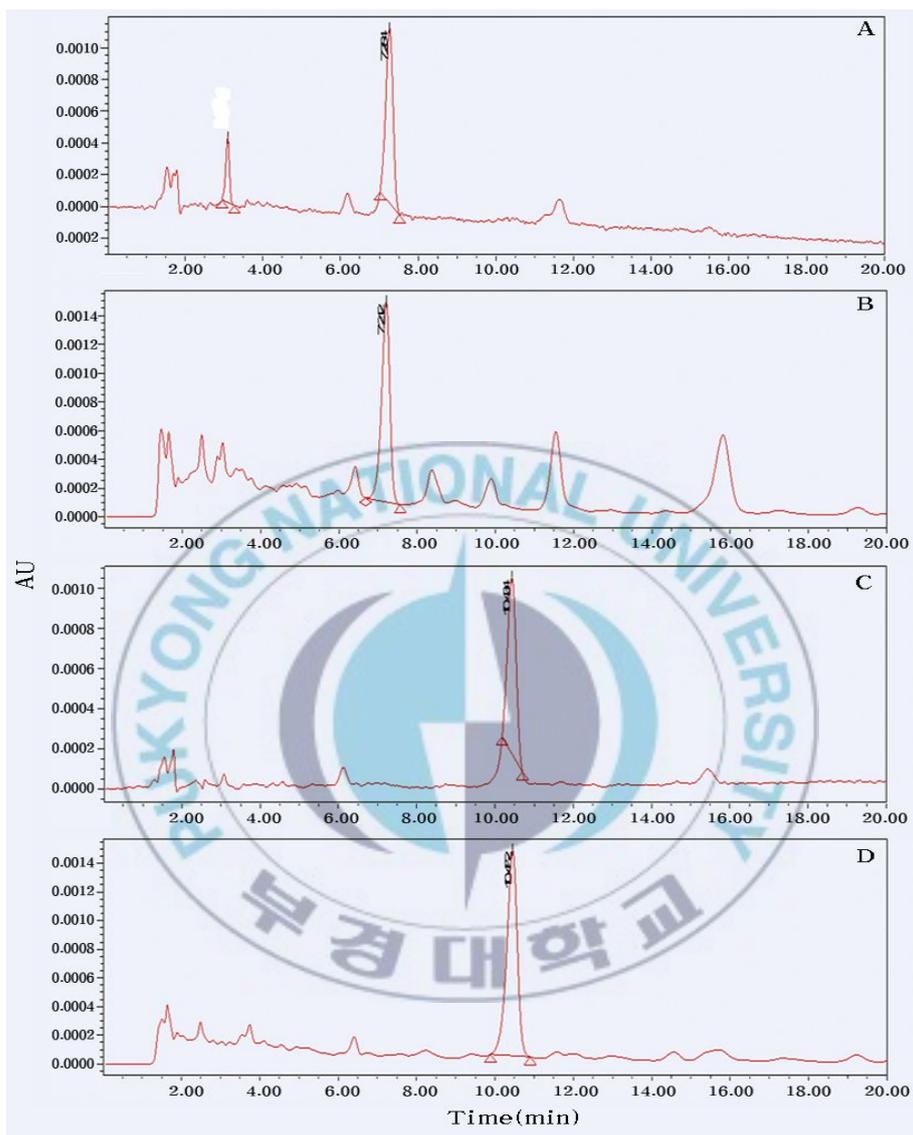


Fig. 6. Chromatograms showing retention times (in minutes) over a 20min chromatographic run-time for A, authentic E<sub>2</sub>; B, metabolized E<sub>2</sub> C, authentic E<sub>1</sub>; D, metabolized E<sub>1</sub>. Steroid hormones were injected onto C18 column.



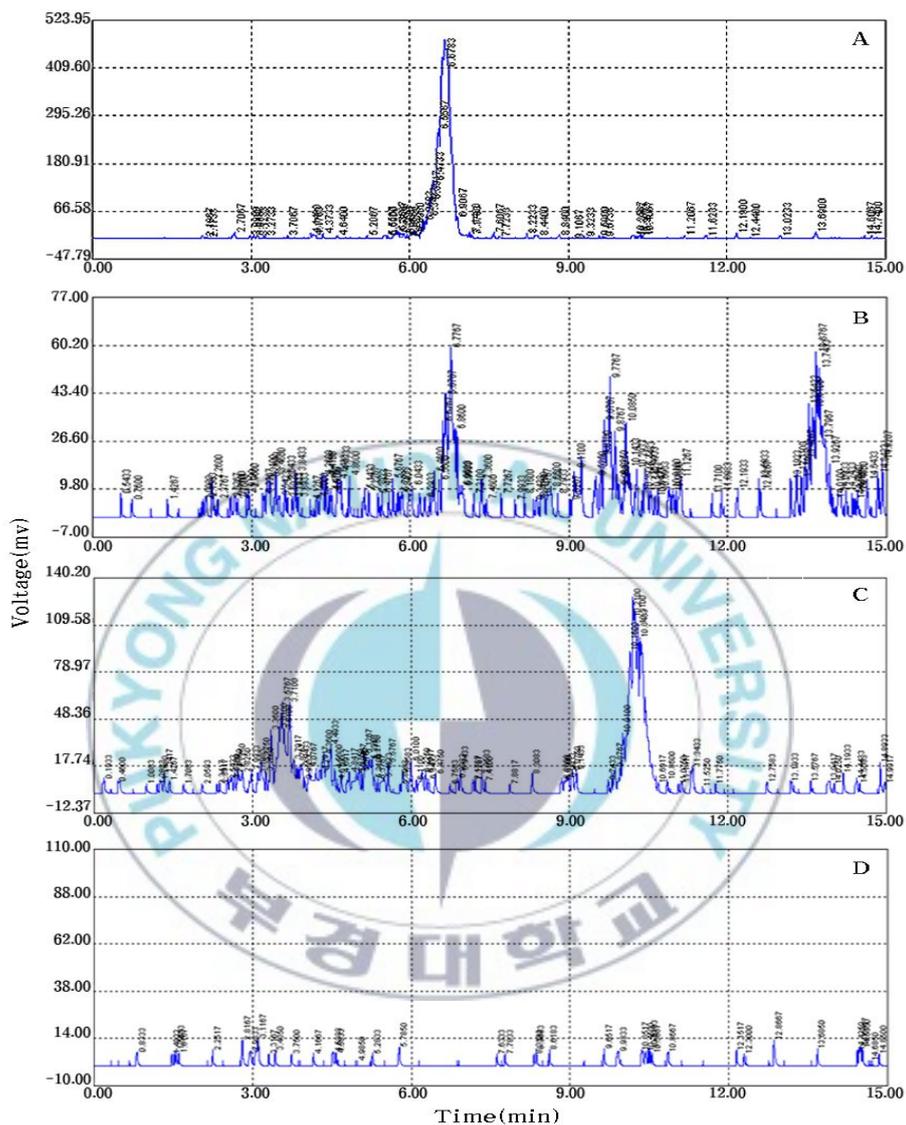


Fig. 8. HPLC elution profile of the radioactive standard steroid and metabolites. A, authentic E<sub>2</sub>; B, metabolized E<sub>2</sub> C, authentic E<sub>1</sub>; D, metabolized E<sub>1</sub>.

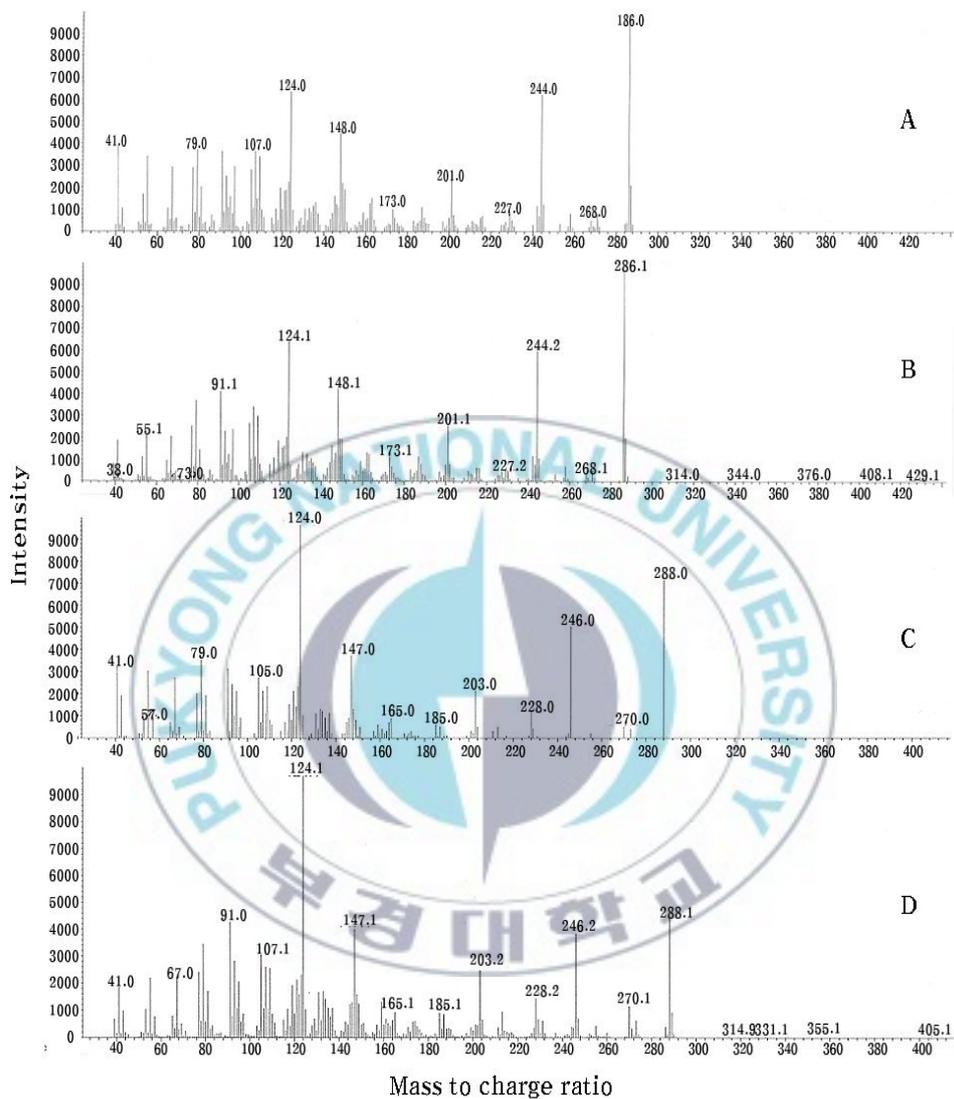


Fig. 9. Mass spectra of steroid metabolized by blacktip grouper. Oocytes identified as androstenedion (A<sub>4</sub>), testosterone (T). A, authentic A<sub>4</sub>; B, metabolized A<sub>4</sub> C, authentic T; D, metabolized T. Analytical conditions are summarized in table 4.

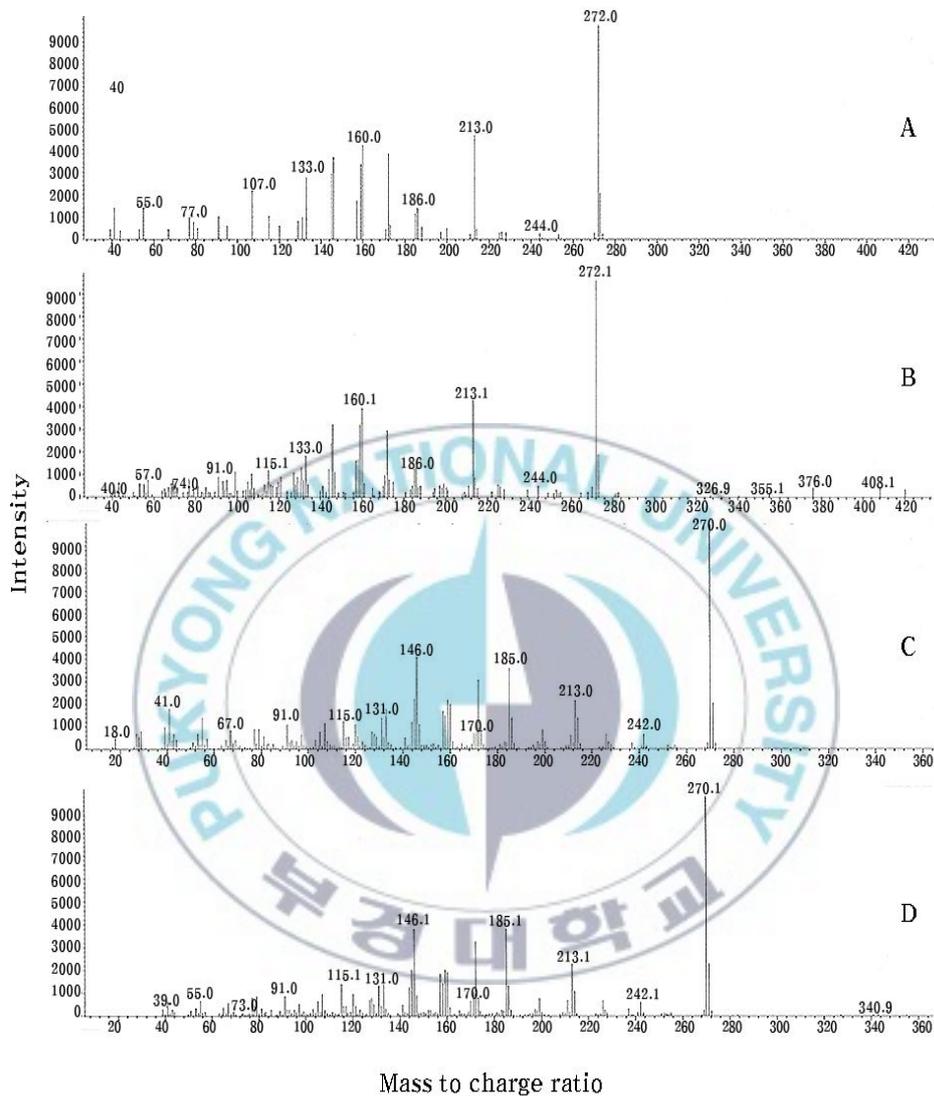


Fig. 10. Mass spectra of steroid metabolized by blacktip grouper. Oocytes identified as androstenedion ( $A_4$ ), testosterone (T), authentic  $E_2$ ; B, metabolized  $E_2$  C, authentic  $E_1$ ; D, metabolized  $E_1$ . Analytical conditions are summarized in table 4.

### 3. 난모세포로부터 생성된 성 스테로이드 대사율

난황형성기 난모세포에서 전구물질, [<sup>3</sup>H]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone로 전환된 성 스테로이드 대사율은(Fig.10-11)과 같다. A<sub>4</sub>의 대사율은 평균난경 0.45, 0.48mm인 난모세포에서 각각 73.51, 67.15% 였고 0.50mm인 난모세포에서 80%이상의 높은 대사율을 보였다. T로의 대사율에서는 평균난경 0.45, 0.48mm인 난모세포에서 각각 6.05, 8.03% 였고 난경 0.50mm인 난모세포에서 13.15%로 증가하였다. E<sub>2</sub>의 대사율은 평균난경 0.45, 0.48mm 난모세포에서 각각 2.94, 2.58% 였고 평균난경 0.50mm 난모세포에서 0.51%로 낮은 대사율을 나타냈다. E<sub>1</sub>의 대사율도 평균난경 0.50mm인 난모세포에서 0.31%를 나타냈다.



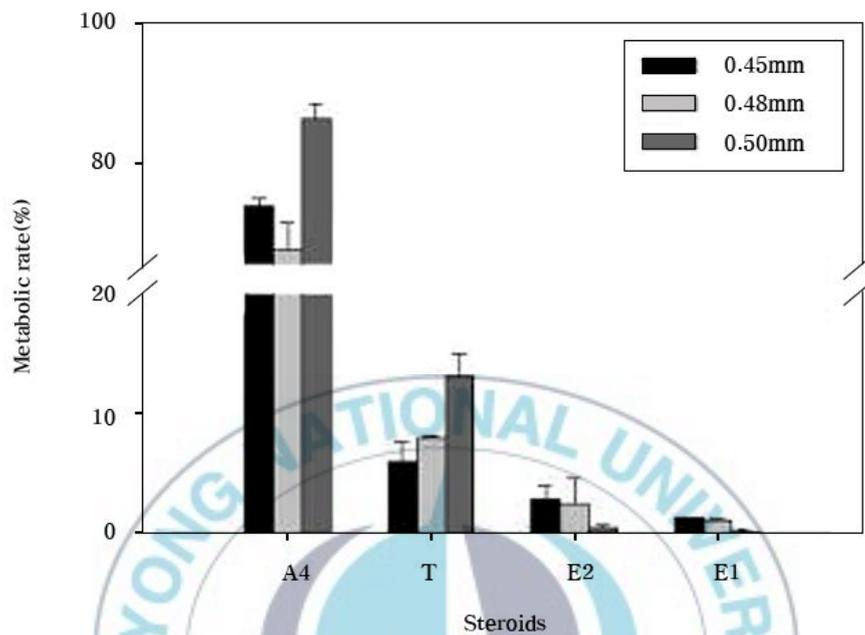


Fig. 11. Radioactivities of steroid metabolites from [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in blacktip grouper oocytes. The percentage of radioactivity associated with each isolated steroid was calculated to the percentage of total steroid recovered from HPLC. Values are mean $\pm$ SE. A<sub>4</sub>, androstenedione ; E<sub>1</sub>, estrone; E<sub>2</sub>, estradiol-17 $\beta$ ; T, testosterone.

#### 4. 혈중 성 호르몬 농도 변화

수은과 광주기 조절로 성숙 유도시킨 홍바리 3개체의 혈중 estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)의 농도를 측정하였다. 난경 0.45 mm 개체에서는 최소 검출량 이하로 검출되었고, 난경 0.48 , 0.50mm의 개체에서는 각각 2.7ng/mL, 1.9ng/mL의 농도로 측정되었다.



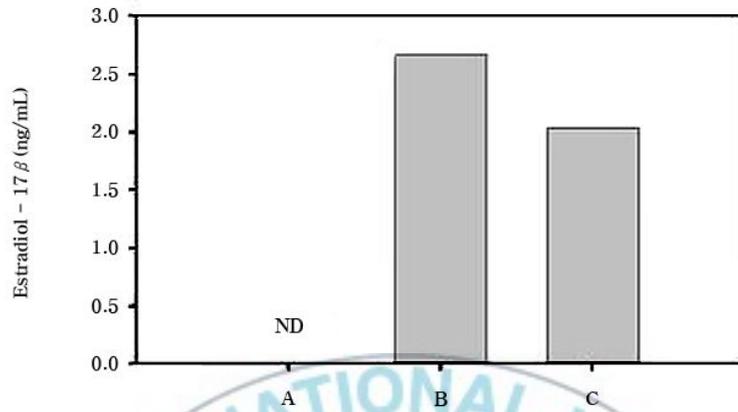


Fig. 12. Change in plasma level of E<sub>2</sub> in the blacktip grouper. A; Oocytes of 0.45 mm diameter. B; Oocytes of 0.48 mm diameter. C; Oocytes of 0.50 mm diameter. ND, not detected

#### IV. 고찰

일반적으로 어류의 난모세포 성숙 과정은 시상하부-뇌하수체-생식소의 축을 따라 여포층에서 생성·분비되는 성 스테로이드 호르몬에 의해 조절되며, 뇌하수체에서 생성·분비되는 생식선 자극호르몬 (gonadotropin)을 매개체로 난황형성기에는 E<sub>2</sub>가, 난황축적 이후 배란시기까지 최종성숙과정은 17α20βP 또는 17α20β21P 등이 주요하게 작용하는 성 스테로이드 호르몬으로 알려져 있다 (Nagahama et al., 1994; Goetz et al., 1987; yoshizaki et al., 2001; Patino et al., 2003).

본 연구에서 사용된 홍바리의 난소 내 난경 0.45, 0.48 그리고 0.50 mm인 난모세포 모두 세포질 내에 난황과립이 축적 되어있었으며, 난경 0.50 mm인 난모세포에서는 세포질 내에 유구들이 산재해 있었고, 핵의 이동이 시작하는 것으로 보아, 이 시기의 난모세포는 난황형성 종료 직후의 발단단계인 것으로 생각된다.

[<sup>3</sup>H]17α-hydroxyprogesterone으로부터 대사화된 주요 스테로이드 호르몬은 androgens인 A<sub>4</sub>와 T, estrogens인 E<sub>2</sub>와 E<sub>1</sub>으로 확인하였다. 난경에 따른 주요 스테로이드 호르몬의 대사율 변화를 살펴보면 estrogens인 E<sub>2</sub>와 E<sub>1</sub>는 난경의 크기가 증가할수록 감소하는 것을 확인하였다. 즉, 난경 0.50 mm 난모세포에서는 난경 0.45, 0.48 mm의 난모세포보다 급격하게 감소하는 것을 확인하였다. androgens의 대사율은 estrogen의 대사율과는 반대로 난경 0.45, 0.48 mm의 난모세포보다 난경 0.50 mm의 난모세포에서 증가하였다.

일반적으로 알려진 경골어류의 스테로이드 호르몬 대사과정에 있어서 testosterone (T)은 aromatase에 의해 E<sub>2</sub>로 전환되는 전구물질로 (Kagawa et al., 1982) 난소내에서 GtH (gonadotropic hormone)의 반

응을 높여주는 것으로 보고되어 있다(Fostier et al., 1983). 또한 T는 aromatase에 의해 E<sub>2</sub>로의 전환이 충분히 이루어진 후에는 혈중으로 분비된다고 알려져 있으나(Campbell et al., 1976), 참돔, *Pagrus major*의 난소 스테로이드 대사과정에서는 T가 아닌 E<sub>1</sub>이 E<sub>2</sub> 대사의 주요 전구물질로 작용한다고 보고되어 있다(Ohta et al., 2002). 황놀래기, *Pseudolabrus sieboldi*의 E<sub>2</sub> 합성 경로에서도 E<sub>1</sub>으로부터 17 $\beta$ -hydrocysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD)에 의해 E<sub>2</sub>가 대사되는 것으로 알려져 있다(Ohta et al., 2001). 본 연구결과에서 홍바리 난모세포의 스테로이드 대사율 변화를 살펴볼 때, 난경 증가에 따라 T의 대사율이 증가하는 동시에 E<sub>2</sub>의 대사율이 감소하는 것으로 보아, T가 아닌 E<sub>1</sub>이 E<sub>2</sub>대사의 주요 전구물질로 생각 되어진다. 이와 반대 결과로 쥐 노래미, *Hexagrammos otakii*의 성숙기 난경별 난모세포에서 fully vitellogenic stage까지 난경 증가와 함께 estrogen인 E<sub>1</sub>과 E<sub>2</sub> 모두 증가하는 것으로 보고되어 있다(Hwang et al., 2007). 따라서 향후 연구에서 17 $\beta$ -HSD, aromatase의 발현양을 조사하여 정확한 대사 경로를 밝히는 동시에 E<sub>1</sub>의 활성변화와 그 역할에 대한 연구도 요구된다.

본 연구 결과에서 androgen인 A<sub>4</sub>와 T의 대사율이 estrogen인 E<sub>2</sub>와 E<sub>1</sub>에 비해 높게 나타난 것을 확인 할수 있었다. Cardwell & Lildy (1991)에 의하면 androgen은 몇몇 자성성숙 어류에서 성 전환을 유도하는 것으로 알려져있다. androgens은 시상하부에서 스테로이드 호르몬의 분비를 조절하는 것과 estrogen 분비를 위한 전구물질로 알려져있다 (Montero et al., 1995). 그리고 척추동물에서 androgen은 생식학적으로 여러기능을 할뿐만 아니라, 생식외적인 부분인 뉴런의 성장, 근육과 뼈의 발달, 표피세포의 발달에 중요한 역할을 한다(Staub et al., 1997). 본 연구는 평균난경이 0.50mm의난모세포에서 androgen의 대사율이 가

장 높은것으로 볼 때, estrogen으로 전환 보다는 fully vitellogenic에서 성숙단계로 넘어가는 과정에서 여러 생리학적 기능을 담당하는 것으로 생각되어진다.

난모세포에서 생성되는 성 스테로이드 호르몬 중에서 progesterone의 유도체인  $17\alpha 20\beta P$  그리고  $17\alpha 20\beta 21P$  등이 난모세포의 배란과 최종 성숙 과정을 유도하는 성숙유도 호르몬 (maturation inducing hormone; MIH)으로 작용한다고 알려져 있다(Canario and Scott, 1989; Nagahama, 1997; Rocha and Reis-Henrique, 1998, 2000; Pankhurst and Riple, 2000). 특히,  $17\alpha 20\beta P$ 는 연어과 어류를 비롯한 기타 경골어류에서(Scott and Canario, 1992; Baek, 2008; Nagahama, 1997),  $17\alpha 20\beta 21P$ 는 Atlantic coaker, spotted seatrout 등의 민어과 어류 (Thomas and Trant, 1989; Patino and Thomas, 1990) 그리고 농어류 (King et al., 1997; Rocha and Reis-Henrique, 2000) 등에서 MIH로 작용한다고 보고되어 있다. 그러나 홍바리의 MIH 종류와 성숙과정을 비롯한 생리적 역할은 명확하지 않은 실정이다. 본 연구에서는 vitellogenesis 단계의 난모세포를 대상으로 실험하여 성숙 유도 호르몬은 확인 되지 않았다. 향후 연구에서 성숙한 홍바리의 난모세포를 대상으로 대사되어지는 MIH를 HPLC 및 GC-MS를 통해 조사해야 할것으로 생각되어진다.

## V. 요약

홍바리의 난황형성기에 생성되는 스테로이드 호르몬을 확인하기 위해 평균난경 0.45, 0.48 그리고 0.50mm의 난모세포에 방사표지된 스테로이드 전구물질인 [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone을 첨가하여 배양하였다. 배양 후 배양액과 난모세포로부터 스테로이드 호르몬을 추출하여 박막 크로마토그래피(thin lay chromatography)를 한뒤 분리된 대사물질을 high performance liquid chromatography, Waters (HPLC)와 gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)로 동정하였다. 홍바리의 난모세포에서 생성된 주요 대사물질은 androgens인 androstenedione ( $A_4$ )와 testosterone (T)으로, estrogens인 estradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ )와 estrone( $E_1$ )로 확인되었다.

이들의 대사율은 0.50mm의 난모세포에서 0.45mm 와 0.48mm의 난모세포에 비해  $A_4$ 가 크게 증가하였고,  $E_2$ 와  $E_1$ 은 급격히 감소 하는것을 확인 하였다. 난이 발달할수록  $A_4$ 의 증가에따른  $E_2$ 와  $E_1$ 가 감소하는 것으로 볼때  $E_2$ 의 전구물질은  $A_4$ 가 아닌  $E_1$ 인 것으로 생각되어진다. 그리고 홍바리의 난모세포는  $E_2$ 와  $E_1$ 의 대사율이 감소하는 0.50mm에서 난황형성이 완료되고 성숙단계로 넘어가는 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

- Annalie, V.M., Roberts, C.M., Hawkins, J.P., (2000). The treated status of groupers (Epinephelinae). *Biodivers Conserve.*, 9, 919-942.
- Baek, H. J., (2008). Production of C<sub>21</sub>-Steroids in Longchin Goby, *Chasmichthys dolichognathus* during oocyte maturation. *Dev. Reprod.*, 1, 107-112.
- Campbell, C.M., Walsh, J.M. and Idler, D.R., (1976). Steroids in the plasma of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* Walbaum: a seasonal study and investigation of steroid involvement in oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrin.*, 29, 14-20.
- Canario A.V.M., Scott, A.P., (1989). Effect of steroids and human chorionic gonadotropin on in vitro oocyte final maturation in two marine flatfish: the dab *Limanda limanda*, and the plice, *Pleuronectes platessa*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76, 147-158.
- Canario, A,V,M., Scott, A.P., (1988). Structure-activity relationship -s of C<sub>21</sub> steroids in an in vitro oocyte maturation bioassay In rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71, 338-348.
- Cardwell, J.R. and Liley, N.R., (1991). Hormonal control of sex and color change in the stoplight parrotfish, *Sparisoma viride*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 81, 7-20.

- Fostier, A.B., Jalabert, R., Billard, Breton, B and Zohar, Y., (1983).  
The gonadal steroids. *Fish Physiol.*, 9A, 272-372.
- Goetz, F.W., Fostier, A.Y., Breton, B., Jalabert, B., (1987).  
Hormonal changes during meiotic maturation and ovulation in  
the brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Fish Physiol. Biochem.*  
3(4), 203-211.
- Hwang, I.J., S.K. Kim, S.J. Choi, C.H. Lee, Y.D. Lee, H.B. Kim, H.  
J. Baek, (2012). Effects of steroid hormones on In vitro  
GVBD and Oocyte steroidogenesis in Blacktip Grouper,  
*Epinephelus fasciatus*. *Dev. Reprod.*, 16(1), 39-45.
- Hwang I.J., S.Y. Kim, H.J. Baek. (2007). Activity of sex steroid  
hormones on ovarian development in the greenling  
*Hexagrammos otakii*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 40, 153-159.
- Kagawa, H., Young, C., Adachi, S., Nagahama, Y., (1982).  
Estradiol-17 $\beta$  production in amago salmon (*Oncorhynchus*  
*rhodurus*) ovarian follicles: Role of the thecal layer and  
granulose cells. *Gen. Comp. Endocrino.*, 47, 440-448.
- Kang. H. C., C.H. Lee, Y.B. Song, H. J. Baek, H. B. Kim, Y. D.  
Lee, (2012). KISS1, KISS2, GPR54 mRNA Expression of the  
Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus*. *Dev. Reprod.*, 16,  
121-128.
- Kawabe K and Kohno H., (2009). Morphological development of  
larval and juvenile blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*.  
*Fish Sci.*, 75, 1239-1251.

- King W., Ghosh S., Thomas P., Sullivan C.V., (1997). A receptor for the oocyte maturation-inducing hormone 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one on ovarian membranes of striped bass. *Biol. Reprod.*, 56, 266-271.
- Montero, M., Le Belle N, King J.A., Millar, R.P., Dufour, S., (1995). Differential regulation of the two forms of gonadotropin releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel, *Anguilla anguilla*. *Neuroendocrinol.*, 61, 525-535.
- Nagahama, Y., (1997). 17-alpha, 20-beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids.*, 62, 190-196.
- Ohta, K., Yamaguchi S., Yamaguchi A., Okuzawa K., Kagawa H., Matsuyama, M. (2002). Biosynthesis of estradiol-17 $\beta$  in the ovarian follicles of the red seabream *Pagrus major* during vitellogenesis. *Fish. Sci.*, 68, 680-687.
- Ohta K., Mine T., Yamaguchi A. and Matsuyama M. (2001). Steroidogenic Pathway to Estradiol-17 $\beta$  Synthesis in the ovarian Follicles of the Protogynous Wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Zool. Sci.*, 18, 937-945.
- Park. Y.J., H.C. Kang, C.H. Lee, Y.B. Song, H.J. baek, H.B. Kim, K. Soyano and Y. D. Lee 2012. Isolation and Identification of FSH $\beta$  and LH $\beta$  Subunits in the Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus*. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.*, 45, 17-24.

- Patino R, Thomas P, Yoshizaki G., (2003). Ovarian follicle maturation and ovulation: and integrated perspective. *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 305-308.
- Pankhurst N.W. and Riple G., (2000). Caraterization of parameter for in vitro culture of isolated ovarian follicles of greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. *Com. Biochem. Physiol.*, 127, 177-189.
- Patino R., Thomas P., (1990). Induction of maturation of atlantic croaker oocytes by 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in vitro: Consideration of some biological and experimental variables. *J. Exp. Zool.*, 255, 97-109.
- Rocha Monteiro P.R., Reis-Henriques M.A., Coimbra J., (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder(*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.*, 48, 549-559.
- Scott, A. P., Canario, A. V. M. (1992). 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate: a major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 85, 91-100.
- Song. Y.B., H.J. Baek, H.B. Kim, K.J. Lee, K. soyano and Y. D. Lee, (2005). Induced sex reversal of sevenband grouper, *Epinephelus septempasciatus* by 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *J. Aquacult.*, 18,167-172.

- Staub N.L. and De Beer M., (1997). The role of androgens in female vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 108, 1-24.
- Thomas P., Trant J., (1989). Evidence that 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation-inducing steroid in spotted trout. *Fish Physiol. Biochem.*, 7, 185-191.
- Trant J. M. and Thomas P. (1988). Structure-activity relationships of steroids in inducing germinal vesicle breakdown of Atlantic croaker oocytes in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71, 307-317.
- Tyler C.R., Sumpter J.P., Bromage N.R., (1998). Selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.*, 248, 199-206.
- Yoshizaki G., Shusa M., Takeuchi T., Patino R., (2001). The induction of oocyte maturational competence by gonadotropin in Nibe, *Nibe mitsukurii*(Teleostei, Sciaenidae) requires activation of the protein kinase A pathway, and RNA and protein synthesis. *Fish Physiol. Biochem.*, 25, 201-208.

## 감사의 글

대학원을 진학한지 어느덧 3년 반이라는 시간이 흘렀습니다. 그 시간동안 기쁜 일, 힘든 일들이 있을 때 마다 저에게 큰 힘이 되어준 많은 분들께 이 자리를 빌려 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저, 학부생부터 대학원 졸업까지 물심양면으로 지도해 주신 백해자 교수님께 진심으로 감사드립니다. 연구의 새로운 관점을 제시해주시고 논문의 완성도를 높이기 위해 아낌없는 조언을 해주신 김진구 교수님, 김현우 교수님께도 감사드립니다. 또한 학부와 대학원을 거치는 동안 학문적 소양을 쌓고 예비 사회인으로써 마음가짐을 가질 수 있도록 지도해 주시고 가르침을 주신 남기완 교수님, 김수암 교수님, 오철용 교수님, 박원규 교수님께도 감사드립니다.

6년 동안 함께 동고동락했던 발생생식내분비 연구실의 가족들에게도 감사한 마음을 전합니다. 지금은 취업해서 나가있지만 오랜기간 동안 같이 생활하면서 많은것을 가르쳐주신 상준선배, 인준선배, 문창선배, 도형선배, 수성이형에게 감사함을 전합니다. 그리고 실험 및 논문 작성에 많은 도움을 준 친구 조현철에게 감사합니다. 현재 실험실에서 열심히 공부하면서 실험실을 이끌어가고 있는 대근형, 준규형, 효은, 지은, 해경 그리고 지금은 취업준비를 하고 있는 최진형에게도 감사함을 전합니다.

실험을 할수 있게 도와주신 제주대학교 이영돈 교수님, 송영보 박사님, 이치훈 박사님, 허상우 박사님, 강형철님에게도 감사의 말씀을 드립니다.

그리고 실험실에 들어왔을 때 항상 신경 써주시고 학문적으로 조언을 많이 해주신 박경동 선배님, 김보광 선배님, 강필준 선배님, 김경수 선배님, 김경률 선배님, 김형기 선배님, 정주학 선배님께 감사의 말씀을 전합니다.

항상 힘들때 옆에서 용기와 힘을 줬던 친구들 추성민, 이성엽, 허성현, 최길환, 이종원, 오세직, 이재동, 최승연, 장지은 그리고 같이 일한 학과 사무실 식수들인 조혜정님, 변은덕, 배진호, 권민재 양에게도 감사의 글을 전합니다.

마지막으로, 든든한 가족이 제가 힘들 때 가장 큰 버팀목이 되었습니다. 묵묵히 저의 뒷바라지를 해주신 부모님, 동생에게 평소에 자주 표현하지 못했지만 정말 사랑한다고, 감사하다고 말씀드리고 싶습니다.

앞으로도 제자리에 멈춰서 있지 않고 계속 발전해 나가는 사람이 될 것을 약속드리며 글을 마칩니다.

