

점농어, *Lateolabrax maculatus* 난소에서 생성되는 C₂₁-스테로이드

백혜자⁺ · 안철민* · 김형배**
 부경대학교 해양생물학과, *국립수산진흥원 양식개발과,
 **강원도립대학 해양생물공학과

Biosynthesis of C₂₁-steroids in Spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*) Ovaries

Hea-Ja BAEK⁺, Cheul-Min AN* and Hyung-Bae KIM**

Department of Marine Biology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
 *Aquaculture Division, National Fisheries Research & Development Institute, Pusan 619-900, Korea
 **Department of Marine Biotechnology, Kangwon Province University, Kangnung-shi,
 Kangwon-do 210-800, Korea

To investigate the production of C₂₁-steroids during the spawning period of spotted sea bass, *Lateolabrax maculatus*, we have incubated maturing and ovulating follicles with radiolabeled pregnenolone and 17 α -hydroxyprogesterone for 24 hours. The resulting metabolites were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). When maturing follicles (700~800 μ m in diameters) were incubated with radiolabeled precursors, C₂₁-metabolites were corticosteroids and 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β OHP). When ovulation follicles (1,000~1,150 μ m in diameters) were incubated with radiolabeled precursors, the major C₂₁-metabolites were 17 α 20 β OHP, 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β 21P), and corticosterone. Additional chromatography by TLC and HPLC confirmed the presence of radioactive 17 α 20 β OHP in the maturing follicles, and 17 α 20 β OHP, 17 α 20 β 21P and corticosterone in ovulating follicles. Although 17 α 20 β OHP was found in a small peak, the synthesis of this steroid suggests that it may play a role in regulating the oocyte maturation process. Whereas ovulation is regulated by both 17 α 20 β OHP and 17 α 20 β 21P in the spotted sea bass. In addition, an unusual finding was the biosynthesis of corticosterone. Whether this production is responsible for the ovulation, and is an area requiring continued research.

Key words: Biosynthesis, Maturation, Ovulation, C₂₁-steroids, Spotted sea bass, Oocyte

서 론

경골어류의 난성숙 과정은 여포층에서 생성·분비되는 性 스테로이드 호르몬에 의해 조절되고 있으며, 뇌하수체의 생식선 자극 호르몬이 그 매개체 역할을 한다 (Goetz, 1983). 性 스테로이드 호르몬 중에서도 C₂₁-스테로이드가 난모세포의 성숙 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 progesterone의 유도체인 20 α 와 20 β -hydroxy group을 가지고 있는 스테로이드가 성숙유도에 가장 효과적인 것으로 보고하고 있다 (Canario and Scott, 1989; 1990; Nagahama, 1997). 몇몇 어종에서는 11-oxygenated corticosteroids도 난성숙 유도에 효과적이라고 보고된 바 있다 (Goetz, 1983).

최근까지 연구된 결과들은 두 종류의 C₂₁-스테로이드 존재를 부각시키고 있다. 이들은 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β OHP)와 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β 21P)인데 특히, 전자는 연어류의 기타 경골어류 (Nagahama and Adachi, 1985; Scott and Canario, 1987; Baek, 1990; Nagahama, 1997)에서 후자는 민어류 (Trant et al., 1986; Thomas and Trant, 1989; Trant and Thomas, 1989; Patino and Thomas, 1990)와 농어류 (King et al., 1997; Rocha and Reis-Henriques, 1999)에서 성숙유

도 스테로이드 (maturation inducing steroid, MIS)로 알려져 있다. 민어류와 농어류에서는 두 종류 모두 MIS일 가능성을 제시하였다 (Trant and Thomas, 1988; Berlinsky and Specker, 1991; King et al., 1994a, b; Sorbera et al., 1999). 또한 17 α 20 β OHP와 17 α 20 β 21P는 경골어류의 최종성숙에 연이어 나타나는 과정인 배란유도에도 중요한 역할을 한다고 하여 (Pinter and Thomas, 1999) 최종성숙과 배란과정 모두 MIS에 의해 조절된다고 하였다.

어류의 성숙과 배란과정에 관여하는 호르몬 종류와 이들 상호간의 작용을 밝히는 연구는 양식현장에서 시도되고 있는 인위적 성숙과 배란조절에 중요한 자료로 제공된다.

따라서 본 연구에서는 현재 완전 인공종묘생산이 어려운 자연산 농어 (*Lateolabrax maculatus*) 어미를 대상으로 난모세포의 성숙과 배란과정에서 생성·분비되는 C₂₁-스테로이드의 종류와 그 외 다른 性 스테로이드 물질의 존재 가능성을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험어는 경남 거제도 부근 가두리에서 양성시킨 전장 64~78 cm, 체중 3.2~4.3 kg에 해당되는 점농어 암컷과 산란시기인 10월에 전남 목포 근해에서 채집된 점농어 암컷, 전장 73~95 cm, 체중 3.9~10.0 kg을 대상으로 하였다.

실험어는 2-phenoxyethanol 0.3 mL/L로 마취시켜 전 체혈한 후

⁺Corresponding author: hjbaek@pknu.ac.kr

즉시 실험실로 옮겨져 무균상태에서 난소를 절취, 1%의 항생제 (streptomycin)를 포함한 TBSS (trout balanced salt solution)로 세척하였다. 절취된 난소는 핀셋으로 잘게 분리한 후 난모세포 또는 조직 상태로 각각 well당 40 oocytes 또는 40~100 mg이 되도록 분리하여 L-15 (Leibovitz's L-15) 배양액 1 mL씩 첨가한 뒤 방사선으로 표지된 스테로이드 전구물질인 ³H-pregnenolone (NEN) 또는 ³H-17 α hydroxyprogesterone (Amersham)과 함께 14°C에서 24시간 배양하였다 (1.5 μ Ci/mL). 배양 세척액과 배양액의 pH는 7.9, 삼투농도는 340 milliosmol로 조절하였다. 이후 80% 에탄올로 난모세포와 배양액을 함께 균질화하여 원심 분리한 뒤 에탄올 상등액을 건조시킨 후 500 μ L 물에 용해시켜 다시 dichloromethane으로 2번 추출하여 스테로이드 (free steroids)만을 얻었다. 스테로이드 추출물은 표준 스테로이드와 동시에 실리카겔을 입힌 얇은 막 지지체 (60F²⁵⁴, Merck)에 점적시킨 후 밀폐된 혼합용매 (benzene: acetone=80:20) 속에서 전개시켰다. 일정시간 후 얇은 막을 건조시킨 뒤 자외등 (254 nm)이나 발색시약을 뿌려 대사물질의 반점을 확인하였다. 얇은 막에 나타난 대사물질들은 방사선 사진법 (autoradiography)으로 재확인하였으며, 필요한 경우 대사물질에 해당되는 실리카겔 밴드를 잘라 5 mL의 혼합용매 (dichloromethane: methanol=9:1)로 용리한 후 고성능액체크로마토그래피 (reversed-phase HPLC, acetonitril: water=35:65, flow rate=1.45 mL/min)에 의해 재확인하였다. 칼럼은 Nova-Pak C18 (15 cm \times 3.9 mm, 4 μ m)을 사용하였으며, 대사물질 peak 비교 확인은 UV와 Radiomatic (Flow Scintillation Analyzer, Packard) 검출기로 이루어졌다.

결과 및 고찰

점농어의 성숙기 난소 (난경 700~800 μ m)를 대상으로 전구물질 ³H-pregneolone와 ³H-17 α hydroxyprogesterone를 첨가하여 24시간 배양 뒤 생성된 C₂₁-스테로이드는 Fig. 1과 같다.

전구물질 ³H-pregneolone로부터 생성된 TLC상의 반점은 17 α 20 β OHP, 17 α 20 α OHP (17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone), corticosterone과 cortisone, 그리고 전구물질 ³H-17 α hydroxyprogesterone에서 생성된 C₂₁-스테로이드는 17 α 20 β OHP와 cortisone 등의 표준물질 위치와 일치하였다. 이들 각각의 반점에 해당되는 실리카겔 밴드를 잘라 용리 후 UV/Radiomatic HPLC로 재확인 한 결과 아주 낮은 peak의 17 α 20 β OHP (13.62 min in UV/13.70 min in Radio-detector)만이 확인되었다 (Fig. 2). 이때 사용한 표준물질로는 17 α 20 β 21P, cortisol, 17 α 20 α OHP, cortisone, corticosterone, 17 α 20 β OHP, 11-deoxycortisol 등이었다.

배란중인 점농어 난소 (난경 1,000~1,150 μ m)를 대상으로 전구물질 ³H-pregneolone와 ³H-17 α hydroxyprogesterone를 첨가하여 24시간 배양 뒤 생성된 C₂₁-스테로이드는 Fig. 3과 같다. 이들 전구물질로부터 생성된 물질들은 17 α 20 β OHP, corticosterone 그리고 17 α 20 β 21P로 예측되었다. 각각에 해당되는 TLC상의 실리카겔 밴드를 용리하여 UV/Radiomatic HPLC로 재확인한 결과는 Fig. 4와 같다. 이때의 elution time은 17 α 20 β 21P 4.80 min, corticosterone

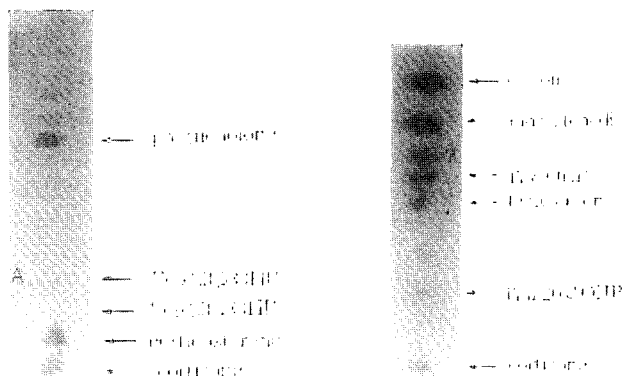


Fig. 1. Autoradiographs of the thin-layer chromatograms of the metabolites formed from [³H]pregnenolone (left) and [³H]17 α -hydroxyprogesterone (17 α OHP) (right) after 24 hrs incubation with isolated oocytes (40 oocytes/mL/well).

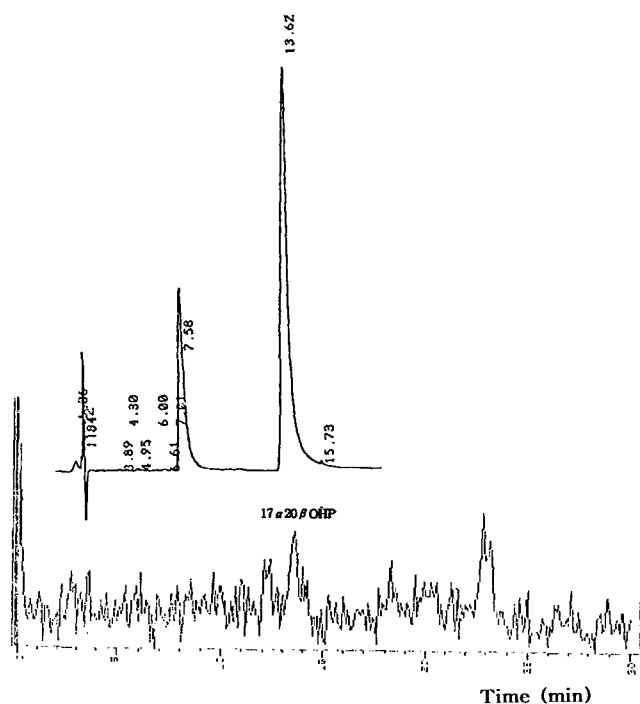


Fig. 2. Reverse-phase HPLC elution profile of the band A from Fig. 1 detected by the radioactivity monitor (below), and authentic steroid, 17 α 20 β OHP (17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone) detected by the UV monitor at 254 nm (upper).

7.10 min, 그리고 17 α 20 β OHP 13.70 min이었다.

이상의 결과에서 보면 연어류의 기타 경골어류 (Nagahama and Adachi, 1985; Scott and Canario, 1987; Baek, 1990; Nagahama, 1997)에서 MIS로 알려진 17 α 20 β OHP는 점농어의 난소 성숙기에 합성·분비되어 최종성숙과 배란 과정에 중요한 역할을 하는 것

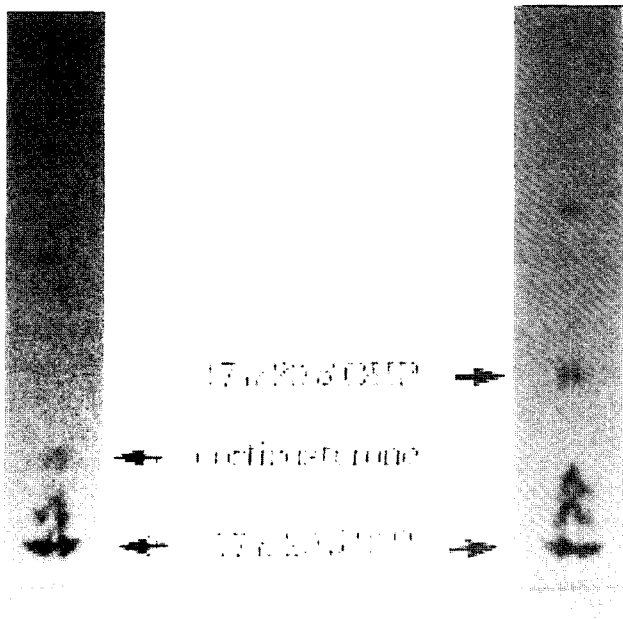


Fig. 3. Autoradiographs of the thin-layer chromatograms of the metabolites formed from $[^3\text{H}]$ pregnenolone (left) and $[^3\text{H}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone ($17\alpha\text{OHP}$) (right) after 24 hrs incubation with ovulating ovarian tissues (40~100 mg/mL/well).

으로 생각되나 점농어에 있어서 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ 이 MIS일 가능성 여부는 불분명한 것 같다. *In vitro* 난성숙유도를 위한 예비실험에서도 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ (25 ng/mL)이 대조군보다 거의 2배 정도 높은 성숙유도 (GVM, germinal vesicle migration) 효과를 나타냈으므로 (미발표) 성숙과 관련이 있는 것은 사실인 것 같다. 특히 배란중인 점농어 난소조직에서는 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ 뿐만 아니라 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 의 존재가 뚜렷하였다. 따라서 점농어의 경우에는 난소의 성숙과 배란과정 모두에 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ 이 관여하며, 배란에 이르면서 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 이 많이 관여하는 것으로 생각된다. corticosterone의 존재에 대해서는 이 물질이 점농어의 배란과 관련이 있는지 또는 스트레스 조건에서 나타나는 순간적인 생성물인지 앞으로 더욱 상세한 분석방법으로 접근해야 할 부분이다. Rocha and Reis-Henriques (1999)와 Carragher et al. (1989) 등은 스트레스 상태가 생식소 호르몬 합성을 방해할 수 있으며, glucocorticoids의 생성을 유발시킨다고도 하였다.

민어류에서는 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ 와 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 이 MIS로 증명되었으며 (Trant et al., 1986; Trant and Thomas, 1988), 유럽산 농어, *Dicentrarchus labrax*의 경우는 특히 배란중인 개체에서 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 농도가 급격히 증가한다고 하였다. 그러나 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 이 *D. labrax*의 최종성숙에 관여하는 지의 여부는 밝히지 않았다 (Scott et al., 1990). 최근에 *D. labrax*를 대상으로 난소발달과정동안 측정된 혈중 스테로이드 호르몬 농도 변화를 보면 산란기때 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 의 농도가 가장 높았고 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ 는 매우 낮은 농도로 뚜렷한 변화를 보이지 않았으며, 반면 이 시기에 cortisol 농도 증가를 지적하였다. 산란기때 cortisol 농도 증가는 사육상태에 있는 *D. labrax*의 산란

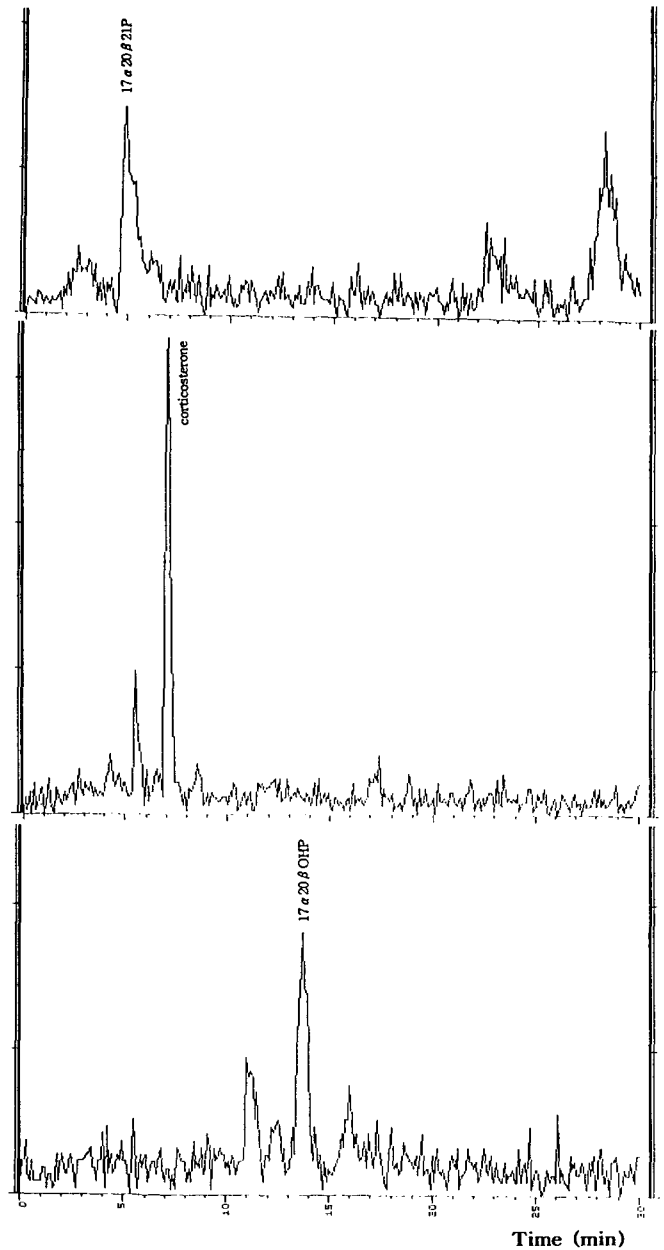


Fig. 4. Reverse-phase HPLC elution profile of bands $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ ($17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one), corticosterone and $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ (17α -hydroxy, 20β -dihydroprogesterone) from Fig. 3 detected by the radioactivity monitor.

시기를 자연산보다 약간 지연시킬 뿐 생식소 스테로이드 농도변화는 아무런 관련이 없는 것 같다고 하였다. 또한 *D. labrax*의 최종성숙과정에 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 이 중요한 역할을 한다고 보고하였다 (Rocha and Reis-Henriques, 1999). *D. labrax*에 대한 Prat et al. (1990)의 연구결과에서도 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ 는 매우 낮은 값으로 계절적인 변화를 보이지 않았다고 하였다. 한편 Sorbera et al. (1999)은 *in vitro* 실험에서 $17\alpha,20\beta\text{OHP}$ 와 $17\alpha,20\beta,21\text{P}$ 모두 gonadotropins에 의해 자극 받은 난모세포의 성숙을 유도할 수 있으며, 난

모세포들은 17 α 20 β OHP에 더 민감하게 반응한다고 하였다.

Striped bass (*Morone saxatilis*)의 경우 17 α 20 β OHP와 17 α 20 β 21P 모두 난소의 최종성숙과정에 중요한 스테로이드임을 강조하였다 (Berlinsky and Specker, 1991; King et al., 1994a, b). 그러나 이 시기의 난소막 수용체 실험결과에 의해 17 α 20 β 21P이 Striped bass의 MIS라고 주장하였다 (King et al., 1997). 본 종의 경우 성숙기의 난소로부터 17 α 20 β 21P는 검출되지 않았다.

이와 같이 민어류와 농어류를 대상으로 한 여러 연구 결과에서 보면 17 α 20 β OHP와 17 α 20 β 21P 모두 MIS일 가능성을 제시하고 있으며, 또한 이들 스테로이드 호르몬이 배란과정에도 관여함을 제시하고 있다.

요 약

점농어의 난소성숙과 배란과정에서 생성되는 성 스테로이드 호르몬 특히, C₂₁-스테로이드를 분석하고자 전구물질 ³H-pregneolone와 ³H-17 α hydroxyprogesterone를 난소조직 배양초기에 첨가하여 24시간 배양 뒤 생성된 물질은 성숙기 난소 (난경 700~800 μ m)의 경우 corticosteroids계의 호르몬과 17 α 20 β OHP가 관찰되었으나 17 α 20 β OHP만이 HPLC상에서 확인되었다. 특히 배란중인 점농어에서는 17 α 20 β OHP, 17 α 20 β 21P 그리고 corticosterone의 존재가 뚜렷하였다.

따라서 점농어에서는 난소의 성숙과 배란과정에 17 α 20 β OHP이 모두 관여하며, 배란에 이르면서 17 α 20 β 21P의 출현이 뚜렷한 것으로 생각된다. corticosterone의 존재에 대해서는 이 물질이 점농어의 배란과 관련이 있는지 또는 스트레스 조건에서 나타나는 순간적인 생성물인지 앞으로 더욱 상세한 분석방법으로 접근해야 할 부분이다.

감사의 글

본 연구의 일부는 국립수산진흥원 수산시험연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Baek, H.J. 1990. Biosynthese du steroide inducteur de la maturation ovocytaire par les cellules de granulosa du follicule ovarien de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. These de docteur de l'Universite Pierre et Marie Curie, Paris 6.

Berlinsky, D.L. and J.L. Specker. 1991. Changes in gonadal hormones during oocyte development in the striped bass *Morone saxatilis*. *Fish Physiol. Biochem.*, 9, 51~62.

Canario, A.V.M. and A.P. Scott. 1989. Synthesis of 20 α -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76, 147~158.

Canario, A.V.M. and A.P. Scott. 1990. Effects of steroids and human chorionic gonadotrophin on *in vitro* oocyte final maturation in two marine flatfish: the dab, *Limanda limanda*, and the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77, 161~179.

Carragher, J.F., J.P. Sumpster, T.G. Pottinger and A.D. Pickering. 1989. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76, 310~321.

Goetz, F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In *Fish Physiology*, Vol. IXB, W.S. Hoar, W. J. Randall, E.M. Donaldson, eds., Academic Press, New York, pp. 117~170.

King, V.W., P. Thomas and C.V. Sullivan. 1994a. Hormonal regulation of final maturation of striped bass oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 96, 223~233.

King, V.W., P. Thomas, R.M. Harrell, R.G. Hodson and C.V. Sullivan. 1994b. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95, 178~191.

King, V.W., S. Ghosh, P. Thomas and C.V. Sullivan. 1997. A receptor for the oocyte maturation-inducing hormone 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one on ovarian membranes of striped bass. *Biol. Reprod.*, 56, 266~271.

Nagahama, Y. and S. Adachi. 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Biol.*, 109, 428~435.

Nagahama, Y. 1997. 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one: a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanism of synthesis and action. *Steroids*, 62, 190~196.

Patino, R. and P. Thomas. 1990. Gonadotropin stimulates 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one production from endogenous substrates in Atlantic croaker ovarian follicles undergoing final maturation *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78, 474~478.

Pinter, J. and P. Thomas. 1999. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 115, 200~209.

Prat, F., S. Zanuy, M. Carrillo, A. De Mones and A. Fostier. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78, 361~373.

Rocha, M.J. and M.A. Reis-Henriques. 1999. Plasma levels of C₁₈, C₁₉ and C₂₁-steroids in captive and feral female sea bass. *J. Fish Biol.*, 55, 26~34.

Scott, A.P. and A.V.M. Canario. 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. In *Reproductive Physiology of Fish*, D.R. Idler, L.W. Crim and J.M. Walsh, eds., pp. 224~234.

Scott, A.P., A.V.M. Canario and F. Prat. 1990. Radioimmunoassay of ovarian steroids in plasma of ovulating female sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78, 299~302.

Sorbera, L.A., J.F. Asturiano, M. Carrillo, J. Cerda, D.E. Kime and S. Zanuy. 1999. *In vitro* oocyte maturation in the sea bass: effects of hCG, pituitary extract and steroids. *J. Fish Biol.*, 55, 9~25.

Thomas, P. and J.M. Trant. 1989. Evidence that 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation-inducing steroid in spotted seatrout. *Fish Physiol. Biochem.*, 7, 185~191.

Trant, J.M. and P. Thomas. 1988. Structure-activity relationships of steroids in inducing germinal vesicle breakdown of Atlantic croaker oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71, 307~317.

Trant, J.M. and P. Thomas. 1989. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced *in vitro* by ovaries of Atlantic croaker.

Gen. Comp. Endocrinol., 75, 397~404.
Trant, J.M., P. Thomas and C.H.L. Shackleton. 1986. Identification of
17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one as the major ovarian ste-
roid produced by the teleost *Micropogonias undulatus* during

final oocyte maturation. Steroids, 47, 89~99.

2001년 8월 20일 접수
2001년 11월 19일 수리