

점망둑(*Chasmichthys dolichognathus*)의 성숙기 난모세포에서의 C₂₁-스테로이드 생성

백혜자[†]

부경대학교 자원생물학과

Production of C₂₁-Steroids in Longchin Goby, *Chasmichthys dolichognathus* during Oocyte Maturation

Hea Ja Baek[†]

Dept. of Marine Biology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT : To investigate the C₂₁-steroids produced from maturing oocytes in the longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus*, the oocytes (0.74~0.97 mm) were incubated with radiolabeled 17 α -hydroxyprogesterone (³H-17 α OHP) for 24 hours. The resulting metabolites were analyzed by thin layer chromatography and identified by gas chromatography-mass spectrometry. Two C₂₁-steroids, 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone (17 α 20 α P) and 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β P), were converted from ³H-17 α OHP in the maturing oocytes. These two main metabolites were detected at 0.80 mm diameter oocytes or greater. In addition, the effects of these metabolites on *in vitro* germinal vesicle breakdown (GVBD) were tested. The sensitivity of oocytes to the induction of GVBD was greater at 17 α 20 β P than 17 α 20 α P. This result showed that 17 α 20 β P is a major maturation inducing steroid (MIS) in longchin goby, suggesting 17 α 20 α P may play a role in regulating the oocyte maturation process.

Key words : *Chasmichthys dolichognathus*, Goby, Maturation inducing steroid, C₂₁-steroids, Oocytes, GVBD.

요약 : 점망둑의 난모세포 성숙과정에서 생성되는 주요 성 스테로이드 호르몬, C₂₁-스테로이드를 분석하고자 전구물질 ³H-17 α hydroxyprogesterone (³H-17 α OHP)를 성숙기 난모세포(난경 0.74~0.97 mm) 배양초기에 첨가하여 24시간 배양하였다. 스테로이드 대사물질 분석과 동정은 thin layer chromatography와 gaschromatography-mass spectrometry로 이루어졌다. ³H-17 α OHP로부터 생성된 주요 성 스테로이드 대사물질은 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone (17 α 20 α P)와 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β P)로 확인되었다. 이들 대사물질은 난경 0.80 mm 이상에서 관찰되었으며, GVBD (germinal vesicle breakdown) 유도 효능 테스트에서 점망둑의 난모세포는 17 α 20 β P에 더 민감하게 반응하였다. 이러한 결과는 점망둑의 난소성숙 과정에 17 α 20 α P와 17 α 20 β P이 모두 관여하나, MIS (maturation inducing steroid)로서의 가능성은 17 α 20 β P이 더 큰 것으로 관찰되었다.

서론

경골어류의 난모세포 성숙 과정은 여포층에서 생성·분비되는 성 스테로이드 호르몬에 의해 조절되며, 뇌하수체의 생식선자극호르몬(gonadotropin; GtH)이 그 매개체 역할을 하고 있다(Fostier et al., 1983; Goetz, 1983; Nagahama, 1983).

성 스테로이드 호르몬 중에서도 C₂₁-스테로이드가 난모세포 성숙 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 progesterone의 유도체인 20 α -와 20 β -hydroxy group을 가지고 있는 스테로이드, 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone (17 α 20 α P), 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β P) 그리고 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β 21P)가 성숙유도 과정에 효과적인 것으로 보고하였다(Canario & Scott, 1989, 1990; Nagahama, 1997; Rocha & Reis-Henrique, 1998, 2000; Pankhurst &

[†] 교신저자: 부산광역시 남구 대연3동 599-1, 부경대학교 자원생물학과 (우) 608-737, (전) +82-51-629-5924, (팩) +82-51-629-5931, E-mail: hjbaek@pknu.ac.kr

Riple, 2000). 몇몇 어종에서는 11-oxygenated corticosteroids도 난소성숙 유도에 효과적이라고 보고된 바 있다 (Goetz, 1983).

이러한 연구 결과들을 근거로 최근에는 경골어류의 난모세포 성숙과정에 두 종류의 C_{21} -스테로이드, $17\alpha 20\beta P$ 와 $17\alpha 20\beta 21P$ 의 존재를 부각시키고 있다. 특히, 전자는 연어류와 기타 경골어류(Nagahama & Adachi, 1985; Scott & Canario, 1987; Baek, 1990; Nagahama, 1997)에서, 후자는 민어류(Thomas & Trant, 1989; Patino & Thomas, 1990)와 농어류(King et al., 1997; Rocha & Reis-Henriques, 1999)에서 성숙유도 스테로이드(maturation inducing steroid, MIS)로 알려져 있다. 민어류와 농어류에서는 두 종류 모두 MIS일 가능성을 제시하였다(Trant & Thomas, 1988; Berlinsky & Specker, 1991; King et al., 1994a,b; Sorbera et al., 1999). 또한, $17\alpha 20\beta P$ 와 $17\alpha 20\beta 21P$ 는 경골어류의 최종 성숙에 연이어 나타나는 과정인 배란유도에도 중요한 역할을 한다(Pinter & Thomas, 1999). 그러나 MIS의 종류와 생리적 역할은 여전히 불분명하다.

어류의 난모세포 성숙과정에 관여하는 progestins의 종류와 MIS의 정확한 동정은 난모세포의 성숙을 인위적으로 제어하고자 하는 양식현장이나 어류 난자를 얻고자 하는 연구 분야에 중요한 자료로 활용되며, 또한 유해환경오염 물질에 노출된 어류의 번식력 평가에 과학적 근거자료로도 활용된다.

본 연구에서는 우리나라 연안의 오염 지표종으로 생각되는 점망둑, *Chasmichthys dolichognathus*를 대상으로 난모세포의 성숙과정에서 생성·분비되는 C_{21} -스테로이드의 종류와 그 외 다른 성숙 관련 스테로이드 물질의 존재 가능성을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 난모세포 배양

실험어는 4~5월에 부산 동백섬에서 채집한 전장 5.4~7.2 cm, 체중 1.4~3.9 g을 대상으로 하였다. 실험어는 2-phenoxy-ethanol로 마취 후 무균상태에서 난소를 절취하였다. 절취된 난소는 ice-cold BSS (balanced salt solution, 132.96 mM NaCl, 3.09 mM KCl, 0.28 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.98 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 3.40 mM $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 3.65 mM

HEPES)로 세척한 뒤 영상분석장치(Image-Pro, Media Cybernetics, USA)를 이용하여 난경을 측정된 후 난모세포들을 하나씩 분리하였다. 핵이 거의 중앙에 위치 또는 중앙에서 이동 중인 난모세포들을 선택하여 24 well plates에 well당 Leibovitz's L-15 (L-15) 배양액(Gibco) 1 mL에 20개의 난모세포를 분주한 뒤 방사선으로 표지된 스테로이드 전구물질인 [3H]-17 α hydroxyprogesterone ([3H]-17 α OHP, Amersham)을 첨가하여(1.5~2.0 μ Ci) 24시간 배양하였다.

BSS와 L-15 배양액의 pH는 7.7, 삼투농도는 300 milliosmol로 조절하였다.

2. 스테로이드 호르몬 대사물질 분석

배양 후 난모세포와 배양액은 함께 80% ethanol로 균질화하여 원심분리한 후 상등액을 모아 건조시킨 뒤 증류수 500 μ L에 용해시켜 dichloromethane으로 2번 추출하여 유리 스테로이드(free steroids)만을 얻어 TLC에 사용하였다.

스테로이드 추출물은 스테로이드 표준물질과 동시에 실리카겔을 입힌 얇은막 지지체($60F^{254}$, Merck)에 점적시킨 후 밀폐된 혼합용매(benzene:acetone=80 : 20와 Benzene : ethylacetate=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, Fuji Bas 3000)으로 재확인하였으며, 재확인된 반점에 해당되는 실리카겔 밴드를 잘라 5 mL의 혼합용매(dichloromethane : methanol=9 : 1)로 용리하였다. 이후 gaschromatography-mass spectrometry (Shimadzu GC-MS QP2010)을 이용하여 각 대사물질을 동정하였다. 사용한 column은 DB-5MS (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 온도 프로그램은 injector 온도는 280 $^{\circ}C$, oven 온도는 80 $^{\circ}C$ 에서 2분간 유지하였고, 증온 온도를 5 $^{\circ}C/min$ 으로 하여 최종온도가 300 $^{\circ}C$ 가 되도록 한 후 5분간 300 $^{\circ}C$ 를 유지하도록 하였다.

결 과

점망둑의 산란시기에 난소 성숙이 진행 중인 것으로 추정되는 개체들을 대상으로(평균 난경 0.74~0.97 mm) 전구물질 [3H]-17 α hydroxyprogesterone (3H -17 α OHP)를 첨가하여 24시간 배양한 뒤 생성된 주요 성 스테로이드 대사물질들은 Fig. 1과 같다.

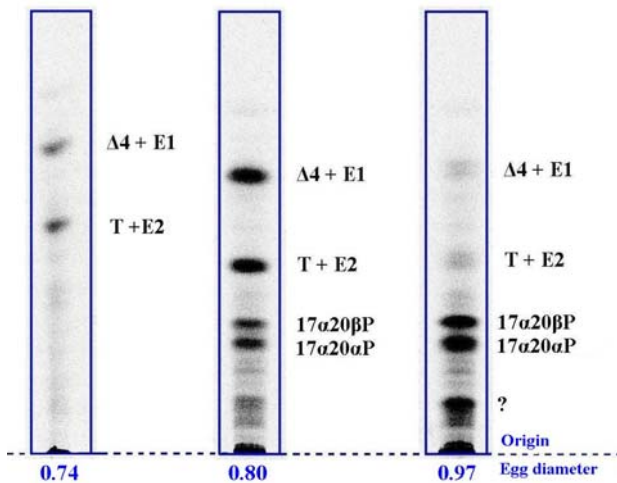


Fig. 1. Autoradiograms of steroid metabolites produced by longchin goby maturational oocytes (0.74, 0.80 and 0.97 mm) incubated with ³H-17 α hydroxyprogesterone for 24 hrs. T, testosterone; E2, estradiol-17 β ; Δ 4, androstenedione; E1, estrone; 17 α 20 α P, 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone; 17 α 20 β P, 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone.

평균 난경이 0.74 mm인 난모세포에서는 ³H-17 α OHP로부터 생성된 TLC 상의 반점은 testosterone (T)+estradiol-17 β (E2)와 androstenedione (Δ 4)+estrone (E1) 등의 표준물질 위치와 일치하였다. 평균난경 0.80과 0.97 mm의 경우에는 17 α 20 α P, 17 α 20 β P, T+E2 그리고 Δ 4+E1 등의 표준물질 위치와 일치하였다. 이후 C₂₁-스테로이드인 17 α 20 α P와 17 α 20 β P에 해당하는 TLC 상의 실리카겔 밴드를 잘라 용리하여 GC-MS로 재분석한 결과, 이들 반점은 ³H-17 α OHP의 대사물질로 확인되었다(Fig. 2).

C₂₁-스테로이드, 17 α 20 α P와 17 α 20 β P이 점망둑의 난모세포성숙 과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 난경 0.82 mm인 난모세포들을 대상으로 *in vitro* GVBD (germinal vesicle breakdown) 효과를 측정하였다(Fig. 3). 대조구에 비해 17 α 20 β P로 처리한 모든 농도의 실험구(5, 50, 500 ng/mL)에서 GVBD 유도 효과를 보였으며, 배란 현상도 관찰되었다. 17 α 20 α P는 50과 500 ng/mL에서 GVBD 유도 효과가 관찰되었으나 배란 현상은 관찰되지 않았다.

고 찰

점망둑의 성숙기 난모세포를 대상으로 전구물질 ³H-17 α

hydroxyprogesterone를 첨가하여 24시간 배양 뒤 생성된 C₂₁-스테로이드는 17 α 20 β P, 17 α 20 α P로 확인되었으며, 이들 스테로이드는 난경 0.80 mm 이상의 개체에서 관찰되었다. *In vitro* 상태에서 17 α 20 β P와 17 α 20 α P의 GVBD 유도 효과를 비교 테스트한 결과 17 α 20 β P에 대한 반응이 더 높은 것으로 나타났다.

연어류의 기타 경골어류(Nagahama & Adachi, 1985; Scott & Canario, 1987; Baek, 1990; Nagahama, 1997)에서 MIS (maturation inducing steroid)로 알려진 17 α 20 β P는 점망둑의 난소 성숙기에 합성·분비되어 최종성숙과 배란 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 그러나 yellow perch, *Perca flavescens* 경우 17 α 20 β P의 혈중 농도는 난성숙 시기에 아주 낮거나 거의 측정이 되지 않아 또 다른 난성숙 스테로이드, 17 α 20 α P의 존재를 확인하였다(Theofan and Goetz, 1983). Canario & Scott (1989, 1990, 1991)는 marine flatfish, *Limanda limanda*의 난소조직에서 17 α 20 α P가 합성되었으며, HCG로 자극을 받은 개체에서는 17 α 20 α P가 다른 C₂₁-스테로이드보다 고농도로 존재한다고 보고하여 MIS로서의 중요성을 강조하였다. 이와 유사한 결과는 범가자미, *Verasper variegatus*에서도 보고되었다(Baek, 2001). 본 연구에서 17 α 20 α P가 MIS일 가능성 여부는 명확하지 않으나, 점망둑의 난소성숙과 관련이 있는 것은 사실인 것으로 보인다.

C₂₁-스테로이드 중에서 난소성숙 유도에 대한 progestogens의 역할은 많은 어종에서 언급되었으며, 특히 17 α 20 β P가 가장 효과적인 스테로이드로 알려져 있지만(Goetz, 1983), 민어류와 농어류에서는 MIS로서 17 α 20 β P뿐만 아니라 17 α 20 β 21P도 중요하며, 이들은 GVBD에 연이어 나타나는 과정인 배란에도 중요한 역할을 한다고 하였다(Trant & Thomas, 1988; Berlinsky & Specker, 1991; King et al., 1994 a,b; Pinter & Thomas, 1999). Sorbera et al. (1999)은 *in vitro* 실험에서 17 α 20 β P와 17 α 20 β 21P 모두 gonadotropins에 의해 자극 받은 난모세포의 성숙을 유도할 수 있으며, 난모세포들은 17 α 20 β P에 더 민감하게 반응한다고 하였다.

Striped bass (*Morone saxatilis*)의 경우 17 α 20 β P와 17 α 20 β 21P 모두 난소의 최종성숙과정에 중요한 스테로이드임을 강조하였으나(Berlinsky and Specker, 1991; King et al., 1994a,b), 이 시기의 난소막 수용체 실험결과에 의해 17

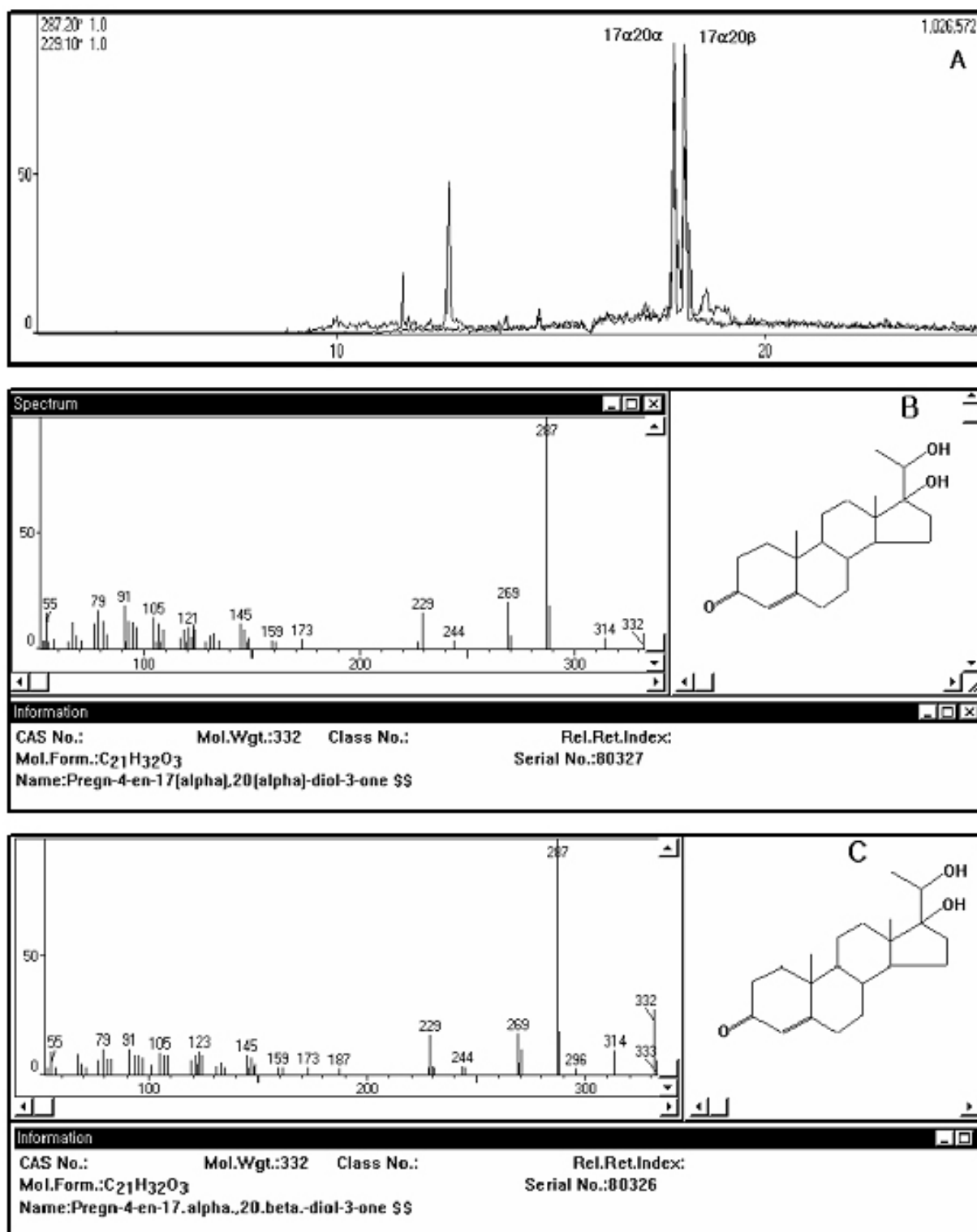


Fig. 2. Gas chromatogram (A) and mass spectrum (B and C) of metabolites from ^3H -17 α -hydroxyprogesterone after TLC elution. B: 17 α -hydroxy,20 α -dihydroxyprogesterone, C: 17 α -hydroxy,20 β -dihydroxyprogesterone.

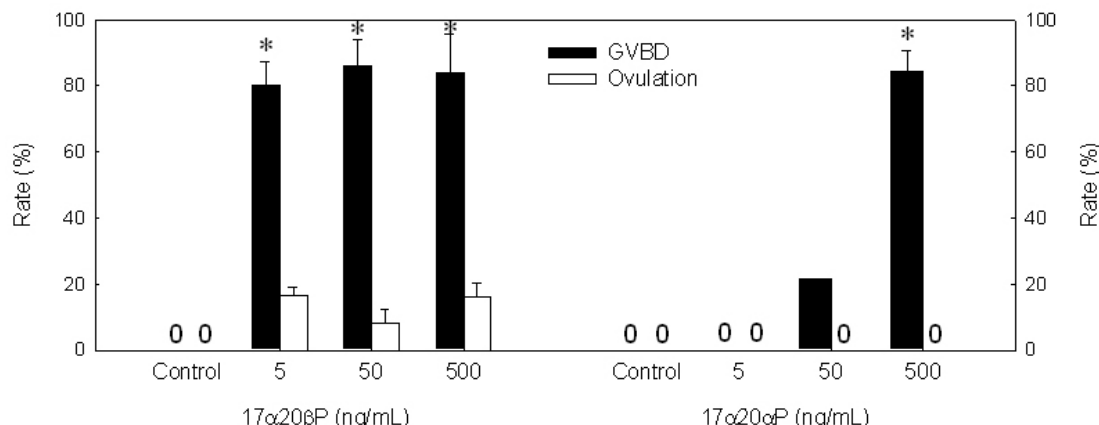


Fig. 3. The effects of 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β P) and 17 α -hydroxy,20 α -dihydroxyprogesterone (17 α 20 α P) on *in vitro* GVBD (diameter=0.82 mm) in longchin goby. Asterisks indicate significant differences from controls by ANOVA analysis ($P<0.05$).

α 20 β 21P이 Striped bass의 MIS라고 주장하였다(King et al., 1997).

본 실험에서 17 α 20 β 21P의 존재는 확인되지 않았다. GBVD 직전의 난모세포(난경 0.97 mm)에서 미확인된 반점이 관찰 되었으므로 다른 C₂₁-스테로이드의 존재 가능성도 있다고 생각된다. 그러나 이것이 점막독의 난소성숙 과정에 주 역할을 하는가의 여부는 연구가 더 필요하다.

인용문헌

Baek HJ (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.

Baek HJ (2001) Biosynthesis of 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone by ovaries of the spotted flounder (*Verasper variegatus*). J fish Sci Tech 4(2):70-74.

Berlinsky DL, Specker JL (1991) Changes in gonadal hormones during oocyte development in the striped bass, *Morone saxatilis*. Fish Physiol Biochem 9:51-62.

Canario AVM, Scott AP (1989) Synthesis of 20 α -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). Gen Comp Endocrinol 76:147-158.

Canario AVM, Scott AP (1990) Effects of steroids and human chorionic gonadotropin on *in vitro* oocyte final maturation in two marine flatfish: the dab, *Limanda limanda*, and the plaice, *Pleuronectes platessa*. Gen Comp Endocrinol 77:161-176.

Canario AVM, Scott AP (1991) Plasma levels of ovarian steroids, including 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 17 α ,20 β -trihydroxy-5pregnane in female dabs (*Limanda limanda*)-marine flatfish-induced to mature and ovulate with human chorionic gonadotropin. Gen Comp Endocrinol 77:177-191.

Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y (1983) The gonadal steroids. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (ed.), Fish Physiology, Vol IX Reproduction. Academic Press, New York, pp 277-372.

Goetz FW (1983) Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (ed.), Fish Physiology, Vol IX Reproduction. Academic Press, New York, 117-170.

King WV, Thomas P, Sullivan CV (1994a) Hormonal regulation of final maturation of striped bass oocytes *in vitro*. Gen Comp Endocrinol 96:223-233.

King WV, Berlinsky DL, Sullivan CV (1994b) Involvement of gonadal steroids in final oocyte maturation of

- white perch (*Morone americana*) and white bass (*M. chrysops*): *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiol Biochem* 14:489-500.
- King WV, Ghosh S, Thomas P, Sullivan CV (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.
- Nagahama Y (1983) The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, (ed.), *Fish Physiology*, Vol IX Reproduction. Academic Press, New York. 9A:233-273.
- Nagahama Y, Adachi S (1985) Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev Biol* 109:428-435.
- Nagahama Y (1997) $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation inducing hormone in fish oocytes: mechanism of synthesis and action. *Steroids* 62:190-196.
- Pankhurst NW, Riple G (2000). Characterization of parameters for *in vitro* culture of isolated ovarian follicles of greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. *Comp Biochem Physiol A* 127:177-189.
- Patino R, Thomas P (1990) Characterization of membrane receptor activity for $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gen Comp Endocrinol* 78:204-217.
- Pinter J, Thomas P (1999) Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *Gen Comp Endocrinol* 115:200-209.
- Rocha MJ, Reis-Henriques MA (1998) Steroid metabolism by ovarian follicles of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). *Comp Biochem Physiol* 121B: 85-90.
- Rocha MJ, Reis-Henriques MA (1999) Plasma levels of C18, C19 and C21-steroids in captive and feral females sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Fish Biol* 55:26-34.
- Rocha MJ, Reis-Henriques MA (2000) Steroid metabolism by ovarian follicles of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Comp Biochem Physiol Part C* 125:85-91.
- Scott AP, Canario AVM (1987) Status of oocyte maturation inducing steroids in teleosts. In: Proc. 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Memorial University Press, St. Johns, Newfoundland. 224-234.
- Sorbera LA, Asturiano JF, Arrillo MC, Cerda J, Kime DE, Zanuy S (1999) *In vitro* oocyte maturation in the sea bass: effects of hCG, pituitary extract and steroids. *J Fish Biol* 55:9-25.
- Theofan G, Goetz FW (1983) The *in vitro* synthesis of final maturational steroids by ovaries of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*). *Gen Comp Endocrinol* 51:84-95.
- Thomas P, Trant JM (1989) Evidence that $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation-inducing steroid in spotted seatrout. *Fish Physiol Biochem* 7: 185-191.
- Trant JM, 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.