

## 참개구리와 옴개구리 여포의 프로제스테론 생성과 난자의 성숙

권혁방 · 김지열\* · 고선근\*\*

전남대학교 자연과학대학 생물학과, \*의과대학 핵의학과, \*\*호남대학교 생물학과

참개구리와 옴개구리의 여포를 생체의 배양하면서 여포의 progesterone(P<sub>4</sub>) 생성과 난자의 성숙 및 cyclic AMP (cAMP)의 조절작용을 조사하였다. 참개구리의 여포에 뇌하수체 추출물 (frog pituitary homogenate, FPH)을 처리하면 농도에 의존하여 여포의 P<sub>4</sub> 생성이 증가하였으며 난자의 성숙(핵붕괴)이 일어났다. 이들 여포들을 배양하면서 3시간 간격으로 호르몬이 여포에 축적된 양, 배양액에 분비된 양 및 난자의 성숙율을 조사한 결과 FPH 처리군에서 P<sub>4</sub>는 3-6 시간에 최고치 (여포내, 약 400 pg/여포; 분비량, 약 800 pg/여포)를 나타내었으며 난자의 핵붕괴는 9-12 시간에 일어났다. 상기 여포들과 같은 조건으로 배양하면서 forskolin과 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 배양액에 처리하여 간접적으로 여포내 cAMP의 농도를 높여 주면 FPH와 유사한 양상으로 호르몬의 생성을 촉진하였다. 그러나 난자의 성숙은 전혀 일어나지 않았다. 옴개구리의 여포를 배양하면서 FPH를 처리했을 때는 아무 처리를 하지않은 대조군과 비교하여 거의 P<sub>4</sub>의 생성을 촉진하지 않았으며 난자의 성숙도 유도하지 못했다. 그러나 이들에게 forskolin과 IBMX를 처리하면 P<sub>4</sub>의 생성을 현저하게 촉진하여 다량의 P<sub>4</sub>가 여포내와 (약 800 pg/여포) 배양액에 (1700 pg/여포) 축적되었다.

**KEY WORDS:** Follicular steroidogenesis, Amphibia

양서류의 여포는 다른 척추동물에서와 같이 스테로이드를 왕성하게 생성하는 호르몬 분비기관이다(Schuetz, 1985). 제노푸스(*Xenopus*)에서 보면 여포들이 생성하는 스테로이드의 종류가 여포의 성장단계에 따라 달라서 난황물질을 활발히 합성하고 있는 성장 중인 여포는 주로 estradiol을 생성하고 성장이 완료된 번식기에 있는 여포들은 주로 P<sub>4</sub>를 생성한다고 알려져 있다(Fortune and Tsang, 1981; Fortune, 1983). 개구리(*Rana*)와 제노푸스에서 성장이 완료된 여포들이 주로 생성하는 스테로이드가 P<sub>4</sub>라는 것과 *in vitro*에서 이 스테로이드가 가장 효율적으로 난자의 성숙을 유도한다는 점에서 P<sub>4</sub>는 양서류의 성숙유도호르몬으로 간주되고 있다(Masui, 1967; Schuetz, 1974). 따라서 P<sub>4</sub>의 생성과정은 바로 난자의 성숙

조절과 직결되고 있다고 보겠다(reviewed by Masui and Clarke, 1979; Schuetz, 1985). 이러한 P<sub>4</sub> 생성조절의 중요성에도 불구하고 개구리에서는 이에 관한 정보가 매우 빈약한 편이다. 본인등이 표범개구리(*Rana pipiens*)를 사용하여 처음으로 여포의 P<sub>4</sub> 생성에 cAMP가 뇌하수체호르몬의 중개작용을 한다는 것을 밝힌 이래 (Kwon and Schuetz, 1985, 1986) 몇몇 연구자들이 이를 확인하였으며(Lin *et al.*, 1988; Kleis-San Francisco and Schuetz, 1988), 본 실험실에서도 북방산개구리를 사용하여 재차 확인한 바 있다(Kwon *et al.*, 1988).

본 연구는 국내에 서식하는 개구리들을 실험동물로 정착시키려는 노력의 일환으로 참개구리(*Rana nigromaculata*)와 옴개구리(*Rana rugosa*)를 사용하여 FPH가 여포의 P<sub>4</sub> 생성과 난자의 성숙을 촉진하는 과정을 조사하였으며 아울러 이 과정에서 다른 종에서와 같이 cAMP가 주요 조절요인으로 참여하는지를 알고자하였다. 본 실험의 결

본 연구는 1988년 문교부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임

과 참개구리의 여포는 통상적인 양서류의 여포와 매우 유사한 양상을 보여주나 옴개구리의 그것은 매우 특이함으로 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

본 실험에서 사용한 동물들은 모두 전남 일원에서 참개구리는 4-5월에 옴개구리는 5-6월에 채집하여 실험실에서 며칠 보관하면서 실험을 실시하였다.

### 여포배양 및 스테로이드 추출

개구리를 두부절개로 죽인 후 난소를 빼어내어 amphibian Ringer(AR) 용액에서 몇번 씻은 다음 해부현미경하에서 여포들을 예리한 핀셋(watch maker's forcep)으로 분리해 내었다. 분리해낸 여포들을 실험군의 수에 따라 무작위로 나눈다음 2 ml의 AR을 포함한 다공배양접시(24 well multidish, Nunclon)의 각 well에 20개씩 넣었으며 이곳에 필요한 시약이나 호르몬을 해당 농도가 되도록 미세피펫으로 첨가하였다. 여포들을 포함한 배양접시들을 진탕배양기(shaking incubator, 국제사이엔)에 옮기어 22-24 °C를 유지하고 일분에 80회전 진탕을 시키면서 일정기간 배양하였다. 실험계획에 따라 배양이 끝난 후 배양액을 회수하여 추후의 P<sub>4</sub> 분석을 위하여 -40°C를 유지하는 냉동기에 옮기어 보관하였으며 여포들만 남아있는 well에 메탄올을 1 ml 첨가하여 15분간 진탕을 시키면서 스테로이드를 추출하였다. 추출과정이 끝난 상기 메탄올 추출물을 시험관으로 옮긴 다음 냉동건조를 시킨 후 냉장고에 보관하였다. 난자의 성숙을 조사할 때에는 배양이 끝난 여포들을 가열하여 고정을 시킨 후 해부현미경하에서 여포들을 쪼개어 핵의 유무를 관찰하여 핵붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)가 일어난 것을 성숙을 일으킨 것으로 간주하였다.

### 호르몬 및 시약

뇌하수체추출물(FPH)은 개구리를 잡을 때마다 뇌하수체를 분리하여 냉동기에 보관시키다가

50 여개가 모이면 이들을 AR 용액에서 분쇄, 원심분리과정(10,000 rpm, 20 min)을 거쳐 상등액을 1 pituitary equivalent (pit. equiv.)/ml의 농도가 되도록 조절한 다음 0.5 ml씩 분주하여 -40°C에서 보관하였다. P<sub>4</sub>(Sigma)는 에탄올(GR, Merck)에 녹여 2 mg/ml의 농도로 만들어 사용하였으며 forskolin(Sigma)은 에탄올에 녹인 후 AR로 희석시켜 180 μM의 stock으로, IBMX(Sigma)는 AR에 직접 녹여 1.8 mM의 stock으로 만든 다음 필요할 때 AR로 희석시켜 사용하였다. 배양액내의 에탄올 농도는 0.02%를 넘지 않았다. 기타 자세한 과정은 전보에 기술한 바 있다(Kwon *et al.*, 1988a, b).

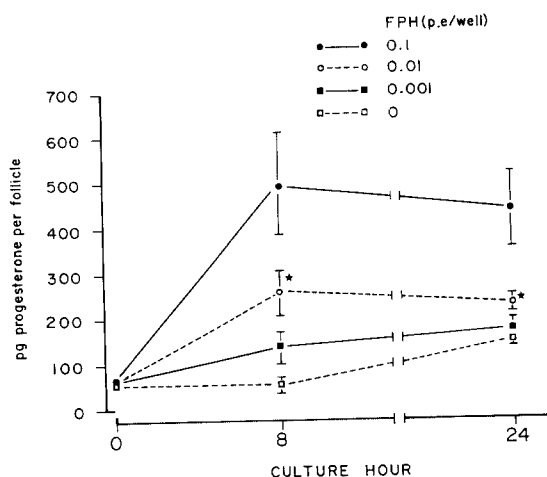
### Progesterone radioimmunoassay (RIA)

시료로 사용한 배양액과 여포의 메탄올 추출물은 더이상 분리과정을 거치지 않고 직접 P<sub>4</sub>를 정량하는데 사용하였다(Lin and Schuetz, 1985). 개구리 여포의 P<sub>4</sub> RIA에 대한 효용성은 이미 전보에서 자세히 기술한 바 있다(Kwon and Schuetz, 1985, 1986; Kwon *et al.*, 1989). 추적자로 1, 2, 6, 7, <sup>3</sup>H-progesterone(99 Ci/mmole, Amersham)을 사용하였으며 항혈청은 progesterone-11 α-hemisuccinate-BSA(Sigma)를 토끼에 면역주사하여 얻었고 최종적으로 1:28,000으로 희석하여 사용하였다. 이 항체의 교차반응도는 전보에 기술한바 있다(Kwon *et al.*, 1989). Scintillation cocktail로는 aquasol(NEN)을 사용하였고 Packard Tri-carb 1500 counter로 방사선량을 측정하였다. 통상 두조의 P<sub>4</sub> 표준시료(10-2000 pg)들을 정량과정에 포함시켜 표준곡선을 구하였으며 Packard의 SecuRIA program을 사용하여 개인용 컴퓨터로 P<sub>4</sub>의 농도를 계산하였다. 이 방법에 의한 측정 가능치는 5 pg이었으며 실험내(intraassay)와 실험간(interassay)의 변이계수는 각각 7.4와 11.7%이었다.

### 결 과

#### FPH의 자극에 의한 참개구리 여포의 P<sub>4</sub> 생성과 난자의 성숙

먼저 FPH의 처리 농도에 따라 여포의 P<sub>4</sub> 생성이 어떻게 변하는가를 조사하기 위하여 배양액에 여러 농도의 FPH(0.001-0.1 pituitary equivalent/well)를 첨가한 후 8시간과 24시간 배양 후에 여포내에 축적된 P<sub>4</sub>의 농도를 측정하였다(Fig. 1). 그림1에서 보여주듯이 여포내에 축적된 P<sub>4</sub>의 농도는 FPH의 농도에 의존하여 증가하였으



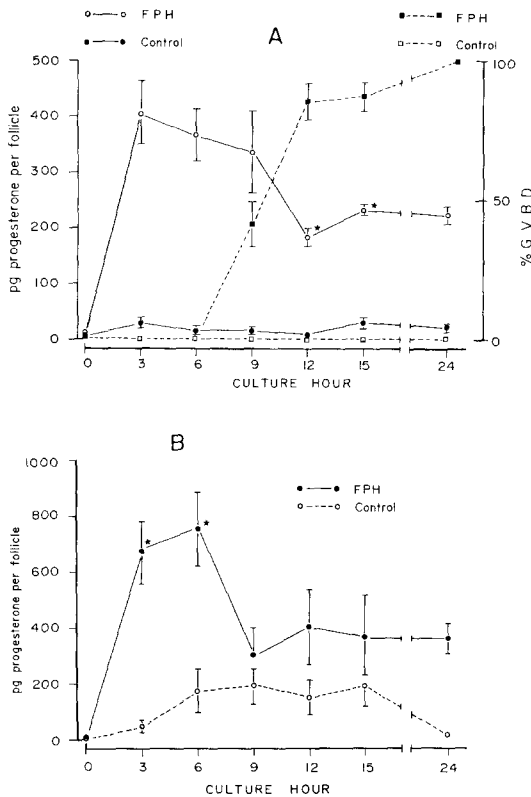
**Fig. 1.** Effect of various doses of FPH on the P<sub>4</sub> accumulation by the follicles of *R. nigromaculata* in vitro. Isolated ovarian follicles were cultured in the absence or presence of various doses (0.001-0.1 pit. equiv./well) of FPH for 8 or 24 hours. After culture the follicles were extracted with methanol for P<sub>4</sub> assay. P<sub>4</sub> levels of the follicle extract were determined by steroid RIA. Each point in the figure represents pg (mean ± SEM) progesterone per follicle (n = 6, triplicate incubations, 2 animals). \*P < 0.05, when compared to control by Student's t-test.

며 배양 후 8 시간에 생성된 P<sub>4</sub>가 0.1 pit. equiv.에서 최고치에 도달한 후 (491 pg/여포) 24 시간에는 약간 낮아지는 경향을 보여주었다. 이에 대해 0.01 pit. equiv.의 농도에서는 최고치의 약 반 정도가(254 pg/여포) 생성되었다. 배양전에 여포들에 내재해 있는 P<sub>4</sub>는 60 pg/여포이었으며

(배양시간, 0) 아무 처리를 하지 않았을 경우 8 시간까지 변화가 없다가 24시간에는 154 pg/여포로 증가하였다. 같은 개구리에서 채취한 자매여포들을 24 시간 배양한 후 그들의 핵붕괴율을 조사한 결과 FPH, 0.01 pit. equiv.에서는 11.4%의 난자들이, 0.1 pit. equiv.에서는 88%의 난자들이 핵붕괴를 일으키었고 아무 처리를 하지 않은 대조군에서는 전혀 핵붕괴가 일어나지 않았다(결과 표시하지 않음).

#### 배양시간 경과에 따른 P<sub>4</sub>의 생성 및 분비양상

참개구리의 여포가 FPH(0.1 pit. equiv./well)의 자극을 받은 후 P<sub>4</sub>를 생성하고 난자의 성숙을 일으키게 하는 시간을 조사하기 위하여 각 개구리에서 분리해낸 여포들을 4군으로 나눈 다음 FPH 처리군과 아무 처리를 하지 않은 대조군으로 나누고 다시 난자의 성숙과 P<sub>4</sub>의 생성을 조사하는 군으로 제차 구분하여 여포들을 배양하면서 3시간 간격으로 스테로이드를 추출하고 동시에 핵붕괴를 조사하였다. 그림 2a는 여포내에 축적된 P<sub>4</sub> 양의 시간에 따른 변화와 난자의 성숙을 보여주는 것으로 P<sub>4</sub>양이 배양 3시간에 급격히 증가하여 9시간까지 상당히 높은 수준(약 400 pg/여포)을 유지하는 것을 볼 수 있다. 그러나 그 이후에는 다시 낮아져서 24 시간까지 약 200 pg/여포의 수준으로 유지되었다. 이때 난자의 핵붕괴는 9시간에서 12 시간 사이에 거의 다 일어났다(Fig. 2a). 한편 대조군에서는 호르몬의 농도가 매우 낮은 상태로(30 pg/여포 이하) 계속 머물러 있었으며 난자의 성숙도 전혀 일어나지 않았다(Fig. 2a). 이들 여포들의 P<sub>4</sub> 분비양상을 조사하기 위하여 배양액의 호르몬을 측정할 결과를 그림 2b에 표시하였다. 그림 2b에서 보여주듯이 P<sub>4</sub>의 분비양상은 근본적으로 여포내의 그것과 거의 같았다. 그러나 여포당 제산한 농도는 여포내의 그것보다 훨씬 높아 전반적으로 대략 두배에 가까운 수준을 나타냈다. 대조군에서도 6 시간에서 15시간 사이에 200 pg/여포에 가까운 수준을 나타냈음을 볼 수 있어서 소량의 P<sub>4</sub>가 계속 분비되었음을 알 수 있었다(Fig. 2b). 따라서 9시간 이후에는 대조군과 실험군 사이에 분비량에 유의한 차이가 없었다.

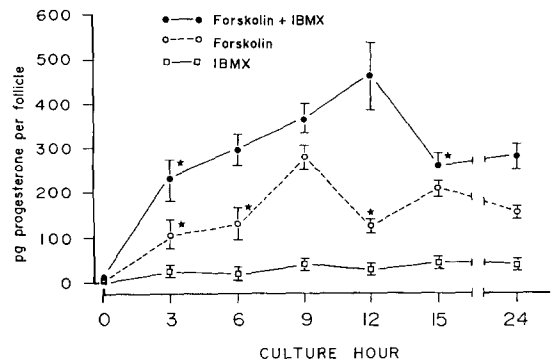


**Fig. 2.** Time course of FPH-induced P<sub>4</sub> accumulation and secretion by the follicles and oocyte maturation in *R. nigromaculata* in vitro. Follicles were cultured in the presence or absence of FPH (0.1 pit. equiv./well). At each designated time point, intrafollicular P<sub>4</sub> levels and oocyte GVBD in the same set of follicles were determined (depicted in A). At the same time P<sub>4</sub> levels in the culture medium secreted by the follicles were determined (depicted in B). Each point in the solid line represents pg (mean ± SEM) P<sub>4</sub> per follicle (n = 6, triplicate incubations, 2 animals) and that in the dotted line of the figure represents average % GVBD (mean ± SEM) of 120 follicles (triplicate incubations, 2 animals) in figure A. Each point in the figure B represents pg (mean ± SEM) P<sub>4</sub> per follicle (or per 0.1 ml of culture medium) (n = 6).

\*P < 0.05, when compared to control by Student's t-test.

#### 참깨구리어포의 P<sub>4</sub> 생성과 cAMP의 조절작용

전보에서 북방산개구리의 여포에서 P<sub>4</sub>의 생성 조절에 cAMP가 뇌하수체의 중개작용을 한다는 것을 밝힌 바 있으며 이때 adenylyate cyclase 뿐



**Fig. 3.** Time course of P<sub>4</sub> accumulation by the follicles stimulated with forskolin and/or IBMX in vitro. Sister follicles from the animals used in Fig. 2. were cultured in the presence of forskolin (9 μM) and/or IBMX (0.27 mM). At each designated time point, intrafollicular progesterone levels were determined. Each point in the figure represents pg (mean ± SEM) P<sub>4</sub> per follicle (n = 6, triplicate incubations, 2 animals).

\*P < 0.05, when compared to control.

아니라 phosphodiesterase도 기여를 한다는 것을 보고한 바 있다(Kwon *et al.*, 1988a). 본 실험에서는 참깨구리에서도 이러한 현상이 일어나는지를 조사하였다. 전향에서 실험한 같은 개체의 개구리에서 여포들을 취하여 이들 자매여포들이 adenylyate cyclase의 촉진제인 forskolin과 phosphodiesterase의 억제제인 IBMX의 처리에 어떻게 반응하는가를 조사하였다(Fig. 3). 이를 위하여 전향과 같은 실험계획으로 여포들을 배양하면서 forskolin (9 μM)과 IBMX (0.27 mM)를 각각 혹은 함께 첨가한 후 여포내에 축적된 P<sub>4</sub>양을 측정하였다. 그림3에서 보여주듯이 배양액에 첨가된 forskolin은 배양 3시간에서부터 P<sub>4</sub>의 생성을 촉진하여 계속 상당한 수준으로 유지토록 하였다. IBMX의 단독처리로는 전향의 대조군에 비하여 전혀 P<sub>4</sub>의 생성을 촉진하지 못하였다. 그러나 forskolin과 함께 IBMX를 첨가한 군의 여포들은 forskolin군 보다 더 많은 양의 P<sub>4</sub>를 축적하고 있어서 이들 두 시약이 항진적으로 작용한 것을 알 수 있었으며 이 때 P<sub>4</sub>는 전향의 FPH에 의한 것 (Fig. 2a)과 거의 같은 수준임을 알 수 있었다 (Fig. 3). 배양액내에 분비한 P<sub>4</sub>의 양도 비슷한 양상을 보여주었다. 그러나 난자의 성숙은 전혀 일어나지 않았다(결과 표시하지 않음).

다는 것(Kwon and Schuetz, 1986)과 비교하면 상당히 많은 양을 분비한다는 것을 알 수 있었다. 여포세포내에 cAMP를 높이는 과정보다 두 종류의 개구리는 북방산개구리나 표범개구리와 달랐다. 즉 두 종류의 여포에서 모두 IBMX를 단독으로 처리하면 거의  $P_4$ 의 생성을 촉진할 수 없었으나(Figs. 3, 4, 5) forskolin 단독으로 높은 수준의  $P_4$ 를 생성할 수 있었다(Figs. 3, 4, 5) 이러한 결과는 여포세포내 phosphodiesterase를 억제하여 cAMP의 분해를 막는 것만 가지고는  $P_4$ 의 생성을 촉진할만한 수준으로 cAMP를 높이지 못한다는 것과 adenylate cyclase의 활성이 cAMP의 농도를 높이는데 결정적인 기여를 한다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 두 종류의 시약(forskolin과 IBMX)이 모두  $P_4$ 의 생성을 충분히 자극할 수 있었던 북방산개구리의 경우(Kwon et al., 1988a)와 어떤 것도 단독으로 전혀  $P_4$ 의 생성을 촉진시킬 수 없었던 표범개구리의 그것과(Kwon and Schuetz, 1985, 1986) 매우 다르다는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과와 전보(Kwon et al., 1988a, b)로부터 생체의 배양에서 한국산개구리 여포들이  $P_4$ 를 생성하게 되는 과정과 난자의 성숙을 일으키는 조건 등 개구리 생식에 관한 기초적인 지식을 얻을 수 있었다. 이러한 결과들을 종합해보면 한국산개구리의 3종은 각각 독특한 특징을 가지고 있으면서도 근본적으로는 실험동물로 흔히 쓰이는 양서류(제노푸스와 표범개구리)와 같은 생식 양상을 보여주고 있다는 것을 의미한다. 따라서 이들을 우리 고유의 실험동물로 정착시키면 앞으로 양서류를 이용한 생식과 발생에 대한 연구에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

### 인용문헌

- Fortune, J. E., 1983. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages. *Dev. Biol.* **99**:502-509.
- Fortune, J. E. and P. C. Tsang, 1981. Production of androgen and estradiol-17  $\beta$  by *Xenopus* ovaries treated with gonadotropins *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**:234-242.
- Kleis-San Francisco, S. and A. W. Schuetz, 1988. Role of protein kinase C activation in oocyte maturation and steroidogenesis in ovarian follicles of *Rana pipiens*: Studies with phorbol 12-myristate 13 acetate. *Gamete Res.* **21**:323-334.
- Kwon, H. B., R. S. Ahn, J. Y. Kim, and Y. D. Yoon, 1988a. Role of cAMP in the regulation of progesterone production and secretion of frog (*Rana dybowskii*) follicles *in vitro*. *Korean J. Zool.* **31**:177-184.
- Kwon, H. B., C. H. Cho, and C. G. Choi, 1988b. Studies on the induction of oocyte maturation of Korean frogs (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) *in vitro*. *Korean J. Zool.* **31**:87-94.
- Kwon, H. B. and W. K. Lee, 1990. Involvement of protein kinase C in the regulation of oocyte maturation in amphibians (*Rana dybowskii*) *J. Exp. Zool. (under revision)*
- Kwon, H. B., Y. K. Lim, M. J. Choi, and R. S. Ahn, 1989. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii in vitro*: Seasonal influences, progesterone production and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.* **252**:190-199.
- Kwon H. B., H. J. Park, and A. W. Schuetz, 1990. Induction and inhibition of meiotic maturation of amphibian (*Rana dybowskii*) follicular oocytes by forskolin and cAMP *in vitro*. *Mol. Reprod. Develop.* **25**:147-154.
- Kwon, H. B. and A. W. Schuetz, 1985. Dichotomous effects of forskolin on somatic and germ cell components of the ovarian follicle: Evidence of cAMP involvement in steroid production and action. *J. Exp. Zool.* **236**:219-228.
- Kwon, H. B. and A. W. Schuetz, 1986. Role of cAMP in modulation intrafollicular progesterone levels and oocyte maturation in amphibians (*Rana pipiens*). *Dev. Biol.* **117**:354-364.
- Lin, Y-W., H. B. Kwon, T. R. Petrino and A. W. Schuetz, 1988. Studies on the mechanism of action of estradiol in regulation follicular progesterone levels: Effects on cAMP mediated events and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase *Develop. Growth & Differ.* **30**:611-618.
- Lin, Y-W. and A. W. Schuetz, 1985. Intrafollicular action of estrogen in regulating pituitary-induced ovarian progesterone synthesis and oocyte maturation in *Rana pipiens*: Temporal relationship and locus of action. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**:421-435.
- Masui, Y. 1967. Relative role of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* **166**:365-376.
- Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**:185-281.
- Schuetz, A. W. 1974. Role of hormones in oocyte

maturation. *Biol. Reprod.* **10**:150-178.  
Schuetz, A. W., 1985. Local control mechanisms during oogenesis and folliculogenesis. In: *Developmental Biology*, Vol. 1. Oogenesis. (Browder, L. W. ed.) Ple-

num Press, New York and London, pp. 3-83.

(Accepted February 28, 1990)

---

**Progesterone Production and Oocyte Maturation of Frog  
(*Rana nigromaculata* and *Rana rugosa*) Follicles *in vitro***

Hyuk Bang Kwon, Ji Yeul Kim\* and Sun Kun Ko\*\* (Dept. of Biology, \*Dept. of Nuclear Medicine, Chonnam National University, Kwangju 500-757; \*\*Dept. of Biology, Honam College, Kwangju 502-791, Korea)

Progesterone production and oocyte maturation in ovarian follicles of *Rana nigromaculata* and *Rana rugosa* were investigated. Addition of frog pituitary homogenate (FPH) to the *in vitro* cultured follicles of *R. nigromaculata* stimulated a marked increase in the accumulation and secretion of progesterone ( $P_4$ ) by the follicles and induced their oocyte maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD) in a dose dependent manner. The FPH (0.1 pituitary equivalent/2 ml)-induced  $P_4$  peak appeared in 3-6 hours and followed by the oocyte GVBD in 9-12 hours after the hormone stimulation. Increase of intrafollicular cAMP levels with forskolin (an adenylate cyclase stimulator) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, a phosphodiesterase inhibitor) mimic the FPH action in the stimulation of  $P_4$  production but not in the induction of oocyte maturation. The *in vitro* cultured follicles of *R. rugosa* behaved very differently from other amphibian follicles. Addition of FPH-(0.1 pit. equiv./2 ml) to the culture medium neither stimulated  $P_4$  production by the follicles nor induced the oocyte GVBD. However, treatment of the follicles with forskolin and IBMX drastically stimulated both the intrafollicular accumulation (800 pg/follicle) and secretion (1700 pg/follicle) of  $P_4$  by the follicles during culture period. Thus, the data suggest that the follicles are ready to respond to cAMP increase but not to the FPH stimulation in terms of  $P_4$  production.