

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 배양 간세포에서 Vitellogenin 합성에 미치는 Calcium ionophore의 영향

여인규

북해도대학 종식학과

Effects of Calcium Ionophore on Vitellogenin Production in the Culture of Hepatocytes in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

In-Kyu Yeo

Laboratory of Comparative Physiology, Faculty of Fisheries,
Hokkaido University, 3-1-1 Minato, Hakodate 041-8611, Japan

Present address : Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Effects of A23187 on estradiol- 17β -induced vitellogenin (VTG) induction were electrophoretically examined in primary hepatocyte cultures in rainbow trout. Hepatocytes were precultured for 2 days and then estradiol- 17β (E_2 , 2×10^{-6} M) and calcium ionophore (A23187, 10^{-7} ~ 10^{-5} M) were added to the incubation medium. The hepatocytes were cultured for 7 more days. In addition, effects of A23187 on E_2 -primed VTG production were investigated for 7 days. The addition of A23187 (10^{-7} ~ 10^{-5} M) to the incubation medium specifically reduced VTG production by hepatocytes in a concentration-dependent way. The addition of A23187 significantly reduced the rate of E_2 -primed VTG production to 18% of the control (E_2 only) on Day 7. However, E_2 -primed VTG production was reduced to 47% of the control by withdrawal of E_2 from the incubation medium. Therefore, these results suggest that intracellular sequestered calcium could regulate VTG synthesis at the translational and/or post-translational stage.

Key words : Vitellogenin production, A23187, Intracellular sequestered calcium, Rainbow trout

서 론

Vitellogenin(VTG)은 난생동물의 난황전구체로, 에스트로겐의 자극에 의해 간장에서 합성되어 혈액으로 분비된다(Wallace, 1985). 분비된 VTG는 lipovitellin, phosvitin 및 β -components로 분해되어 난에 축적된 후 난을 성장시키는 영양소의 역할을 가진다(Hiramatsu and Hara, 1996).

VTG는 calcium(Ca)과 결합된 인산단백질로, 무지개송어의 VTG에는 Ca이 약 0.7% 함유되

어 있다(Fremont and Riazi, 1988). VTG 결합 Ca의 대부분은 phosvitin에 결합되어져 있으며 (Montorzi et al., 1995), phosvitin은 10%의 인을 포함하는 것으로 알려져 있다(Matsubara and Sawano, 1995).

Ca은 rat의 간세포를 포함한 다양한 진핵세포에 있어서 단백질 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Brostrom et al., 1983; Brostrom et al., 1986; Chin et al., 1988). 간세포에서의 아미노산 합성은 EGTA로 Ca을 제거함으로써 5 배 이상 늦어지는 것이 보고되어져 있다(Brost-

rom et al., 1983). 또한 Chin et al.(1987)도 GH₃ 하수체 세포를 이용하여 세포외 Ca이 아미노산 합성율에 관여한다고 보고하였다. 최근 Yeo and Mugiyama (1997)는 무지개송어의 배양 간세포에 있어서의 VTG 합성은 세포외 Ca에 의존하며, 간세포에서 합성되는 다른 단백질보다 Ca의 영향을 크게 받는다는 것을 밝혀냈다.

Brostrom et al. (1989)은 포유류의 진핵세포에 있어서 A23187에 의한 세포내 저장 Ca의 동원이 단백질 합성의 Ca 의존성 단계를 억제한다고 추정하였다. 그리고, rat 간세포의 단백질 합성도 세포내 저장 Ca의 차단으로 억제된다고 보고되어져 있다(Altin and Bygrave, 1985). Fawell et al. (1989)은 A23187에 의한 단백질 합성의 억제는 세포내의 탈 인산에 의한 것이라고 보고하였다. 단백질의 인산화 및 탈 인산화는 다양한 protein kinase에 의해 일어난다(Cohen, 1985). 이러한 효소들은 세포내 저장 Ca 및 세포외 Ca의 동원에 의해 활성화된다. VTG는 인산화된 분자이므로, 합성에 있어서 세포내 저장 Ca에 의존할 가능성이 크다. 최근 Yeo and Mugiyama (1998)는 소포체의 저장 Ca이 VTG 합성을 조절하는 것을 보고하였다. 그러나, 세포내 저장 Ca이 VTG의 어떤 단계에 영향을 미치는가에 대해서는 아직 보고되어지지 않고 있다.

본 연구에서는 세포내 저장 Ca이 VTG 합성에 미치는 영향을 보다 자세히 밝히기 위해 A23187 농도에 따른 VTG 합성의 변화 및 VTG 합성 유도 후의 A23187의 영향에 대하여 실험을 행하였다.

재료 및 방법

1. 실험어

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 북해도 대학 수산학부내 옥외 사육수조에서 사육한 체중 150~250 g인 것을 사용하였다. 무지개송어는 실험 3 일전에 먹이 급여를 중지하여, 간장을 휴식시킨 후 사용하였다.

2. 간세포의 분리 및 배양

간세포는 Kwon et al. (1993)에 의해 수정된 Hayashi and Ooshiro (1986)의 방법에 의해 분리하였다. 간세포는 collagenase(0.5 mg/ml; Wako Pure Chemicals) 및 소 혈청 일부분(0.98 mg/ml; Sigma)이 포함된 판류용 buffer에 의해 분리시켰다.

분리된 간세포는 positive-charge (Falcon)를 행한 플라스틱 배양접시에 3×10^5 개를 넣어 배양하였다. 배양에는 0.2 μM bovine insulin (Sigma), streptomycin (100 μg/ml), penicillin (70 μg/ml), 및 NaHCO₃ (23 mM)를 첨가한 William's medium(Ca 1.8 mM, Life Technol. Inc.)을 이용하였다. 간세포의 배양은 배양액 3 ml를 첨가하여 15°C, 5% CO₂ 조건하에서 행하였다. 사전 배양은 2일간 행하였고, 배양액은 매일 교환하였다.

3. 호르몬 및 A23187의 첨가

간세포는 2일간 사전 배양을 한 후, 95% 에탄올로 용해한 estradiol-17β(E₂, 2×10^{-6} M; Sigma) 및 A23187을 첨가하여 실험을 행하였다. A23187는 10^{-7} ~ 10^{-5} M의 농도를 이용하였다. 일반적으로 A23187은 세포외 Ca 및 세포내 저장 Ca을 동원하여 세포내의 Ca 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 사용한 농도는 다양한 세포에 있어서 세포내 저장 Ca을 동원하여 고갈시키는 것으로 확인되었다(Brostrom et al., 1989). VTG 합성에 미치는 A23187의 영향은 첨가 후 7일간의 실험으로 조사하였다. 대조군은 첨가물의 용매인 에탄올을 같은 양으로 첨가하였다.

4. E₂에 의한 VTG 합성에 A23187이 미치는 영향

실험조건은 다음과 같은 세 가지로 설정하여 실험을 행하였다. 1) A23187(10^{-5} M)을 E₂와 함께 실험 기간 중 연속적으로 첨가하여 3일, 5 일 및 7 일째의 배양액을 회수하여 VTG 합성율을 조사하였다. 2) E₂를 5일간 첨가한 후, A23187

(10^{-5} M)과 E₂를 5일과 6일째에 첨가하여 7일째의 VTG 합성률을 조사하였다. 3) E₂를 5일간 첨가하여 VTG를 합성시킨 후, E₂를 제거하여 7일째의 배양액을 회수하여 조사하였다.

5. SDS-PAGE 및 VTG 합성 양의 분석

배양 간세포의 배양액을 회수하여 원심분리(3000 rpm, 20 min.)를 행한 후, 10% trichloroacetic acid에 의해 단백질을 침전시켜 sample buffer(0.175 M Tris-HCl, 8 M Urea, 1% SDS, 0.5% Mercaptoethanol, pH 7.4)로 용해시켰다. 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE로 분리하여, Coomassie brilliant blue R-250으로 30분간 염색하였다. VTG

의 판별은 Kwon et al. (1993)에 의해 분리된 무지개송어 VTG (분자량 175 kDa)의 결과를 따랐다.

VTG의 밴드 (175 kDa)는 Bio Image (Millipore)를 이용하여 총 단백질에 대한 VTG의 Integrated optocal density (IOD)치를 퍼센트로 나타내었다. 이러한 퍼센트의 표현은 배양세포의 수 및 전기영동시의 각 lane의 단백질 양에서 생길 수 있는 오차를 제거하기 위해 사용하였다.

6. 통계분석

실험결과는 One-way ANOVA-test를 실시하여 Scheffe's F-test를 행하였다. 통계적 유의성은 P<0.01로 판단하였다. 그리고 퍼센트 결과는

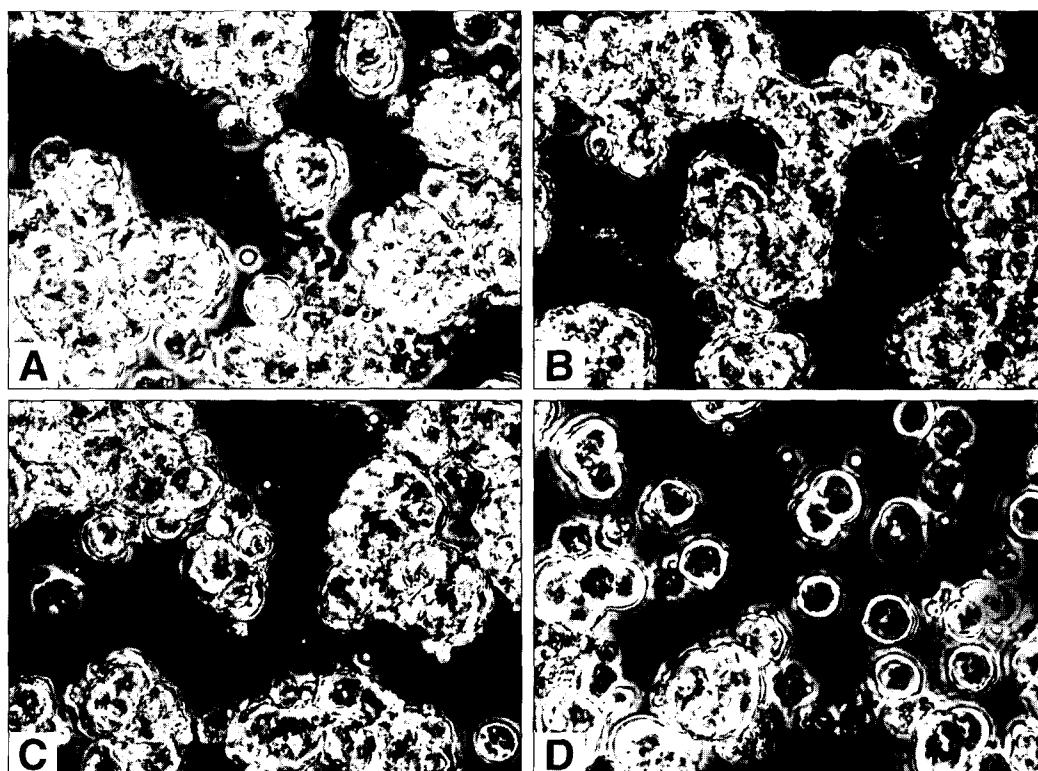


Fig. 1. Phase contrast micrographs of hepatocytes cultured in media containing E₂ and various concentrations of A23187 for 7 days. A : E₂(2×10^{-6} M) alone, B : E₂ + 10^{-7} M A23187, C : E₂ + 10^{-6} M A23187, D : E₂ + 10^{-5} M A23187. ($\times 300$).

arcsine의 수치로 전환 후 통계분석을 행하였다.

결과

무지개송어의 간세포는 배양접시에서 7일간의 배양으로 다헥세포와 같은 세포군을 형성하였다. A23187의 10^{-7} 및 10^{-6} M의 첨가군에서는 E_2 만을 첨가하여 배양한 간세포와는 차이를 나타내지 않았으나, 10^{-5} M의 첨가군에서는 세포군을 형성하지 못하고, 분리된 직후의 단일 간세포 형태를 유지하였다(Fig. 1).

1. A23187의 농도별 효과

무지개송어의 간세포는 혈청이 첨가되지 않은 배양액에 E_2 를 첨가하여 7일간 배양한 후 SDS-PAGE를 행하였다. E_2 의 첨가로 새로운 밴드가 175 kDa의 위치에 형성되었다(Fig. 2). 이 단백질은 Kwon et al. (1993)에 의해 VTG라는 것

이 판명되어졌으며, 본 연구에서도 그들의 결과에 따랐고, E_2 를 첨가하지 않은 군에서는 새로운 밴드가 형성되지 않았다.

A23187의 농도 10^{-7} 및 10^{-6} M의 첨가 시에는 VTG 밴드의 감소가 유효으로 구별되지 않았으나, 10^{-5} M의 첨가 시에는 VTG 밴드가 거의 형성되지 않았다(Fig. 2).

E_2 첨가로 총 단백질에 대한 VTG 합성을 9.1 %로 나타났으며, Figure 3은 E_2 첨가군에 대한 A23187의 각 첨가 농도에 따른 VTG 합성을 퍼센트로 나타내었다. A23187 10^{-7} M의 첨가 시는 E_2 첨가군의 약 87 %를, 10^{-6} M의 첨가 시는 81 %를 나타내어 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의한 차이는 나타내지 않았다. 그러나, A23187 10^{-5} M의 첨가에는 E_2 첨가군의 약 37 %의 수치로 유의한 감소를 나타내었다($P < 0.01$). 이때, 간세포에서의 총 단백질 합성량은 전 실험군에 있어서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과로 보아, VTG 합성은 A23187 농도의 증가에 의존하여 감소하는 것으로 여겨진다.

2. E_2 에 의한 VTG 합성시 A23187이 미치는 영향

E_2 에 의한 배양 간세포에서의 VTG 합성에 미치는 A23187의 전기영동의 결과를 Figure 4에 나타내었다. A23187의 농도는 Figure 3의 결과에서 VTG 합성을 유의하게 감소시킨 10^{-5} M의 농도를 이용하였다. E_2 를 첨가해 7일간 배양함으로써, VTG 밴드의 염색성이 강하게 나타났으나, 5일째부터 E_2 의 제거로, 그 염색성은 약해졌다. 그리고, 매일 E_2 와 함께 A23187을 첨가한 경우에는, VTG 밴드의 염색성은 5일째부터 E_2 를 제거한 것에 비해 더욱 약해졌다. E_2 를 첨가해 5일간 배양한 후 A23187을 첨가해 2일간 배양한 경우에는, 전 단백질에 있어서 염색성이 강하게 나타났으나, VTG는 명확한 밴드로 확인할 수 없었다. 이러한 VTG 합성 후 고농도 A23187 첨가 시에 나타나는 효과에 대해서는 아직 명확하지 않으나, 배양 간세포의 활성 및 단백질 구조의 형성에 영향을 미치는 것으로 추정된다.

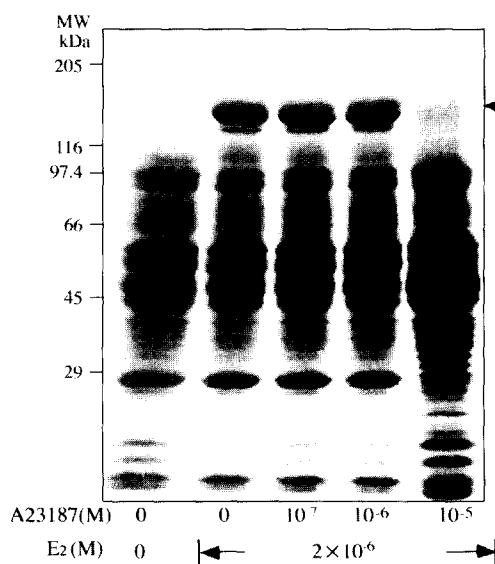


Fig. 2. Effects of A23187 on the E_2 -induced production of VTG (arrowhead) in hepatocyte cultures with E_2 . Spent media were analyzed on day 7 in culture by gradient SDS-PAGE. MW : molecular weight. CBB stain.

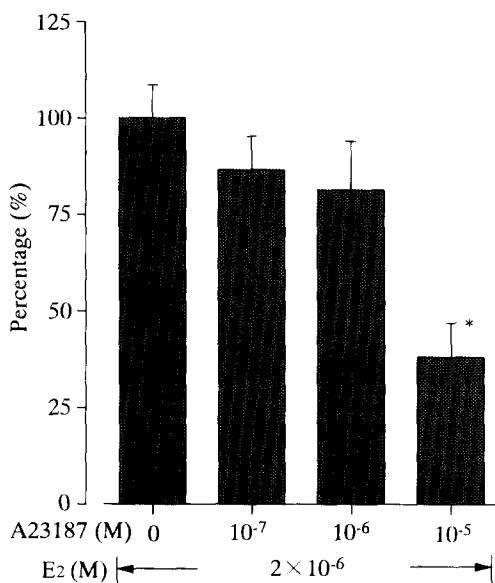


Fig. 3. Effects of A23187 on the E₂-induction of VTG. Hepatocytes were cultured in the media containing E₂ and A23187 for 7 days. The relative optical density of VTG to total protein was determined after SDS-PAGE on day 7 after A23187 addition and was expressed as the percentage of the experimental to control (E₂ only) values. Vertical bars represent the average (mean±SE) percentage of 8~13 experiments. *P<0.01 for E₂ alone.

VTG 합성시의 E₂ 및 A23187 첨가에 의한 효과의 경시적 변화를 Figure 5에 나타내었다. 총 단백질에 대한 VTG의 비율은 5일 및 7일째에 각각 9.4%, 12.1%를 나타내었다. 그러나, 5일째부터 E₂를 제거함으로써, VTG의 비율은 5일째에 비해서는 약 61%로, 7일간 E₂의 첨가(대조군)에 비해서는 약 53%로 유의하게 감소하였다(P<0.01). 그리고, 5일째부터 A23187을 첨가해 2일간 배양한 경우에는, 대조군의 약 18%의 VTG 만이 합성되어 유의하게 감소하였다(P<0.01). E₂ 및 A23187을 계속하여 첨가한 경우 역시, 5일 및 7일째에 각각 대조군의 17%, 28%로 유의하게 낮은 VTG 합성을 나타내었다(P<0.01). 이러한 수치는 E₂를 첨가하지 않은 군과 거의 같은 수치였다. 이러한 결과로 보아, A23187에 의한

세포내 저장 Ca의 고갈은 VTG 합성 시에 특이적인 억제 작용을 가진다는 것으로 판단된다. 그리고, 이러한 억제 작용이 배양액에서 E₂를 제거했을 때보다 급속한 반응을 나타내는 것으로 보아, 세포내 저장 Ca은 VTG 합성의 최종 단계에 관여하는 것으로 추정된다.

고 찰

무지개송어에 있어서 VTG 합성 및 분비는 세포외 Ca이 중요한 역할을 가지며(Yeo and Mugiyia, 1997), 또한, 세포내 저장 Ca도 VTG 합성을 조절하는 것으로 추정된다(Yeo and Mugiyia, 1998). 일반적으로, 세포내 저장 Ca은 아미노산 합성에 관여하며(Chin et al., 1988), 단백질 합성의 Ca 의존성 단계를 조절하는 것으로 추정되어지고 있다(Brostrom et al., 1989). 본 연구는 VTG 합성 시에 A23187을 이용하여 세포내 저장 Ca과 VTG 합성의 관계

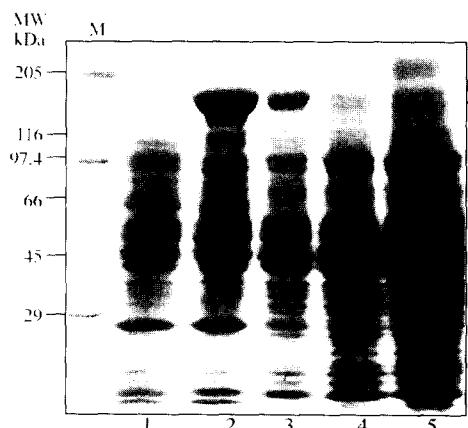


Fig. 4. Effects of A23187 (10^{-5} M) addition or removal of E₂ on E₂-primed VTG (arrowhead) production in hepatocyte cultures. Spent media were analyzed on day 7 in culture by gradient SDS-PAGE. M : molecular weight (MW) marker. CBB stain. Lanes : 1, vehicle ; 2, E₂(2×10^{-6} M)(for 7 days) ; 3, No E₂ (days 5 and 6 only) ; 4, E₂ + A23187 (for 7 days) ; 5, E₂ + A23187 (days 5 and 6 only).

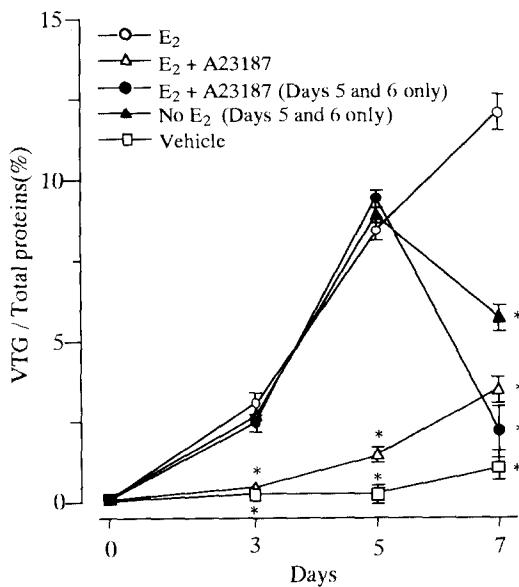


Fig. 5. Effects of A23187 (10^{-5} M) on E₂-primed VTG production. Vertical bars represent the average (mean \pm SE) percentage of four experiments.
* $P < 0.01$ for E₂ alone.

를 보다 상세히 조사하는 것을 목적으로 행하였다. 본 연구에서는, A23187의 첨가에 의해 간세포의 접착상태가 약해졌다. A23187이 배양 세포의 생존에 미치는 기작에 대해서는 불분명하지만, 이러한 세포의 상태는 배양액의 Ca을 제거했을 때와 유사한 결과를 나타내고 있다(Yeo and Mugiyama, 1997). Ca은 세포간의 접착인자로 알려져 있으므로, 고농도의 A23187 투여에 의해 세포외 Ca에 영향을 미친 결과로 인해 배양 간세포의 접착상태가 약해지는 것으로 추정된다. 이러한 생존상태의 차이에서 생기는 단백질 합성정도의 오차를 줄이기 위해 본 연구의 결과는 총 단백질에 대한 VTG의 비율을 산출하여 나타내었다. 본 연구에서는 A23187 농도 의존적으로 VTG 합성이 억제되었다. 이러한 단백질합성의 억제 효과는 Rat의 간세포에서도 유사한 결과가 보고되어져 있다(Brostrom et al., 1986; Chin et al., 1988). 그러나, 이러한 단백질 합성의 억제에 미치는 세포내 저장 Ca의 기작은 아직 확실하게 해명되어져

있지 않다. Fawell et al.(1989)은 A23187에 의한 세포내 저장 Ca의 동원이 세포내 단백질의 탈인산을 유발시켜 단백질 합성을 억제하는 것이라고 보고하였다. 단백질 합성에는 ribosomal protein S6 (Traugh and Pendergast, 1986), initiation factors eIF-2 (Pain, 1986) 및 cap-binding protein eIF-4E (Duncan et al., 1987)와 같은 인자의 인산화가 관련되어있는 것으로 알려져 있다. Kimball and Jefferson (1992)도 initiation factors eIF-2의 α -subunit의 인산화가 peptide-chain의 연장을 억제하는 것이라고 보고하였다. 이러한 결과로, 일반적으로 단백질 합성의 억제효과는 Ca 의존성 단백질의 인산화에 의한 것으로 여겨지고 있다. VTG의 경우에는, 그 자체가 Ca을 다량 함유하고 있을 뿐만 아니라, 인산화된 분자이므로 세포내의 저장 Ca에 특이적으로 의존하고 있는 것으로 추정된다.

E₂에 의해 합성된 VTG는 A23187 첨가 후 2일간 배양함에 따라 급속하게 감소하여, E₂를 첨가하지 않은 군과 같은 수치를 나타내었다. E₂의 제거로도 대조군의 약 53%가 감소하였으나, A23187 첨가에 따른 약 82%의 감소에는 미치지 못하였다. 이러한 결과는 E₂가 직접 관여하는 VTG의 mRNA 합성 단계(E₂ 와 수용체와의 결합 단계)보다 더 늦은 단계(VTG 분비에 가까운 번역 또는 번역 후 단계)를 조절하기 때문이라고 여겨된다. 또한, A23187은 세포내의 저장 Ca을 급속히 방출하여 세포내의 Ca 저장기관의 Ca을 고갈시켜(Albert and Tashjian, 1986), 단백질 합성의 Ca 의존성 번역 단계를 억제한다고 보고되어져 있다(Brostrom et al., 1989). 이러한 결과로 보아, 세포내 저장 Ca은 간에서 합성되는 다른 단백질 보다 VTG 합성에 관여하고 있으며, 그 조절 단계는 합성의 번역 단계 또는 번역 후 단계인 것으로 추정된다.

요약

Vitellogenin(VTG) 합성에 미치는 A23187

의 영향을 무지개송어의 배양 간세포를 이용하여 실험을 행하였다. 간세포는 2일간 배양한 후, Estradiol-17 β (E_2 , 2×10^{-6} M) 및 A23187 (10^{-7} ~ 10^{-5} M)을 첨가하여 7일간 배양하였다. 그리고, E_2 에 의한 VTG 합성시의 A23187이 미치는 영향에 대해서도 조사하였다. A23187 (10^{-7} ~ 10^{-5} M)의 첨가에 의해 간세포에서의 VTG 합성은 농도의 증가에 따라 감소하였다. E_2 에 의해 합성된 VTG는 A23187 (10^{-5} M)의 첨가에 의해 대조군(E_2 만의 첨가)의 약 18%로 유의하게 감소하였다. 그러나, E_2 에 의해 합성된 VTG는 배양액에서의 E_2 제거로는 대조군의 약 47% 밖에 감소되지 않았다. 이러한 결과로 보아, 세포내의 저장 Ca은 번역 단계 또는 번역 후 단계를 조절함으로써, VTG 합성을 조절하는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- Albert, P. R. and A. H. Tashjian Jr. 1986. Ionomycin acts as an ionophore to release TRH-regulated Ca^{2+} stores from GH₄C₁ cells. Am. J. Physiol., 251 : C887~C891.
- Altin, J. G. and F. L. Bygrave. 1985. The Ca^{2+} -mobilizing actions of vasopressin and antiotensin differ from those of the α -adrenergic agonist phenylephrine in the perfused rat liver. Biochem. J., 232 : 911~917.
- Brostrom, C. O., S. B. Bocckino, and M. A. Brostrom. 1983. Identification of a Ca^{2+} requirement for protein synthesis in eukaryotic cells. J. Biol. Chem., 258(23) : 14390~14399.
- Brostrom, C. O., S. B. Bocckino, M. A. Brostrom, and E. M. Galuska. 1986. Regulation of protein synthesis in isolated hepatocytes by calcium-mobilizing hormones. Mol. Pharmacol., 29 : 104~111.
- Brostrom, C. O., K. V. Chin, W. L. Wong, C. Cade, and M. A. Brostrom. 1989. Inhibition of translational initiation in eukaryotic cells by calcium ionophore. J. Biol. Chem., 264 : 1644~1649.
- Chin, K. - V., C. Cade, C. O. Brostrom, E. M. Galuska, and M. A. Brostrom. 1987. Calcium-dependent regulation of protein synthesis at translational initiation in eukaryotic cells. J. Biol. Chem., 262 : 16509~16514.
- Chin, K. - V., C. Cade, M. A. Brostrom, and C. O. Brostrom. 1988. Regulation of protein synthesis in intact rat liver by calcium mobilizing agents. Int. J. Biochem., 20 : 1313~1319.
- Cohen, P. 1985. The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. Eur. J. Biochem., 151 : 439~448.
- Duncan, R., S. C. Milburn, and J. W. B. Hershey. 1987. Regulated phosphorylation and low abundance of hera cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. J. Biol. Chem., 262 : 380~388.
- Fawell, E. H., I. J. Boyer, M. A. Brostrom, and C. O. Brostrom. 1989. A novel calcium-dependent phosphorylation of a ribosome-associated protein. J. Biol. Chem., 264 : 1650~1655.
- Fremont, L. and A. Riazi. 1988. Biochemical analysis of vitellogenin from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) : Fatty acid composition of phospholipids. Reprod. Nutr. Develop., 28(4A) : 939~952.
- Haider, S. and S. K. Chaube. 1996. The in vitro effects of forskolin, IBMX and cyanoketone on meiotic maturation in follicle-enclosed catfish (*Clarias batrachus*) oocytes. Comp. Biochem. Physiol., 115C : 117~123.
- Hayashi, S. and Z. Ooshiro. 1986. Primary culture of the eel hepatocytes in the serum free medium. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 52 : 1641~1651.
- Hiramatsu, N. and A. Hara. 1996. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in sakhalin taimen (*Hucho perryi*). Comp. Biochem. Physiol., 115A : 243~251.
- Kimball, S. R. and L. S. Jefferson. 1992. Regulation of protein synthesis by modulation of intracellular calcium in rat liver. Am. J. Physiol., 263 : E958~E964.
- Kwon, H. C., S. Hayashi, and Y. Mugiyama. 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow

- trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol., 104B : 381-396.
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.
- Matsubara, T. and K. Sawano. 1995. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder(*Verasper moseri*). J. Exp. Zool., 272 : 34-45.
- Montorzi, M., K. H. Falchuk, and B. L. Vallee. 1995. Vitellogenin and lipovitellin : Zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. Biochemistry, 34 : 10851-10858.
- Pain, V. M. 1986. Initiation of protein synthesis in mammalian cells. Biochem. J., 235 : 625-637.
- Traugh, J. A. and A. M. Pendergast. 1986. Regulation of protein synthesis by phosphorylation of ribosomal protein S6 and aminoacyl-tRNA synthesis. Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol., 33 : 195-230.
- Wallace, R. A. 1985. Vitellogenin and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In Developmental Biology (Edited by L. Brodwater) 1 : 127-177.
- Yeo, I.-K. and Y. Mugiya. 1997. Effects of extracellular calcium concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol., 105 : 294-301.
- Yeo, I. K. and Y. Mugiya. 1998. Effects of calcium agonists on vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish. Sci., 64(3) : 443-447.