

참전복(*Haliotis discus hannai*)의 난황단백질 분리와 특성

정태항 · 한명숙 · 김대중 · 임상구 · 김명희 · 한창희

동의대학교 생물학과

Purification and Characterization of Yolk Protein in an Abalone (*Haliotis discus hannai*)

Tae-Hang Cheung, Myung-Suk Han, Tae-Jung Kim, Sang-Ku Lim,
Myung-Hee Kim and Chang-Hee Han

Department of Biology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

To clarify characteristics of yolk protein of abalone, yolk protein was purified from the ovarian egg extracts of mature female *Haliotis discus hannai* by a gel chromatography of sepharose CL-4B. From the results of immuno-electrophoresis and Ouchterlony's diffusion test to male and female sera and ovarian egg extracts using antibodies raised against mature female and male sera and ovarian egg extracts, it was identified that the mature female serum had female specific serum protein and its antigenicity shared with ovarian egg extracts. A single type of yolk protein was purified from ovarian egg extracts, and it was composed of two subunits. Their molecular weights were estimated to be approximately 166 KDa and 113 KDa by SDS-PAGE. The antiserum against yolk proteins cross-reacted with a mature female specific serum protein and extracts of hepatopancreas of vitellogenic females, but did not reacted with extracts of hepatopancreas of mature male.

Key words : Abalone, *Haliotis discus hannai*, Yolk protein, Female specific serum protein, Vitellin, Vitellogenin

서 론

난생 동물들은 난소내의 난모세포가 성숙함에 따라 난내에는 여러 가지 물질들이 축적된다. 난내에 축적된 물질들의 조성은 종에 따라 다르지만 어류에서는 수분이 55~75%, 단백질이 20~33%, 지질이 1~25%, 회분이 0.7~2.2%를 차지한다(土屋, 1962). 단백질이 수분을 제외하면 가장 많이 차지하고 있으며, 이 난 단백질은 난막 단백질과 난내 단백질로 나눌 수 있는데 난내 단백질은 주로 난황단백질로 이루어져 있다. 이러한

난황단백질은 난 발생과 배 발생 과정 동안 형태 형성에 이용되는 에너지원으로써 가장 중요한 물질이다. 난황단백질의 생화학적인 특성과 이 물질의 생합성 기구를 밝히는 것은 난 형성의 생리학적인 기구 구명과 함께 양질의 난을 얻는데 중요한 기초 자료가 될 수 있다.

난황단백질의 특성과 생합성 기구에 관해서는 주로 파충류, 조류, 양서류 및 어류등 척추동물들에서 오래 전부터 연구되어져 왔다. 조류나 어류등 척추동물에서 난황단백질은 자성호르몬(estrogen)의 작용으로 간에서 난황단백전구체(vitello-

genin)의 상태로 합성되어 난모세포내에 축적된다고 알려져 있으며(Aida, et al., 1973; Wallace, 1985), 난황단백전구체는 주된 난황단백질인 vitellin과 phosvitin으로 나뉘어져 난황구 등의 형태로 축적된다고 알려져 있다(Wallace and Begovac, 1985; Tyler et al., 1990).

무척추동물들에서는 난황단백질의 특성이나 생합성과 축적에 대한 연구가 주로 곤충류와 갑각류들에서 이루어져 왔으며(Brookes, 1969; Pan et al., 1969; Hagedorn and Judson, 1972; Wolin et al., 1973; Chen et al., 1979; Souty and Picaud, 1981; Meusy et al., 1983; Zhai et al., 1984; Chinzei and Yano, 1985; Han and Bae, 1992; Han et al., 1994), 환형동물에서는 갯지렁이류에 속하는 *Perinereis cultrifera* (Baert et al., 1984)에서 난황단백질의 특성에 대하여 연구되어졌다.

연체동물에서는 난황단백질의 특성이나 그 생합성 부위에 대한 연구는 이매패인 가리비, *Patinopecten yessoensis* (Osada et al., 1992)와 참굴, *Crassostrea gigas* (Suzuki et al., 1992)에 대해서만 보고되어 있을 뿐이며, 복족류에 속하는 전복이나 그 외의 다른 종에 대해서는 거의 찾아보기 어렵다.

전복은 산업적으로 중요한 종으로 생식세포 형성과정 및 생식주기(Lee, 1974), 먹이와 성장(Uki and Kikuchi, 1979), 치패의 산소소비와 생존(Kim, 1997) 등 여러 연구들을 찾아 볼 수 있으나, 난황단백질의 특성이나 그 생합성에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 복족류의 난황형성과 축적기구를 밝히기 위한 연구의 일환으로 우선 참전복을 재료로하여 난황단백질을 분리하고 난황단백질에 대한 면역화학적 특성을 밝히고 지금까지 밝혀진 다른 연체동물과 비교하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1994년 3월부터 1994년 6월까지 전남 여천군

돌산 일대에서 서식하고 있는 성숙중인 암수(평균 각장 8cm, 체중 85g)를 채집하여 실험재료로 사용하였다.

혈액은 1cc 주사기를 사용하여 내장낭의 복측에 있는 상족동맥 부위에서 채혈한 후 혈청을 4°C, 3,000×g에서 30분간 원심분리하여, 사용시까지 -80°C에 보관하였다.

난황단백질 분리를 위하여 위의 일부와 간체장을 따라 발달되어 있는 암컷 생식소를 위와 간체장으로부터 분리시켜 0.9% NaCl 용액으로 충분히 세척한 후 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다. 간체장 추출액은 난을 완전히 제거한 뒤 0.9% NaCl 용액으로 충분히 세척하고 0.15N NaCl이 함유된 20mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액을 넣어 glass homogenizer로 마쇄한 후 원심분리하여 얻었다.

2. 난황단백질의 분리

성숙한 난소난 2.5g을 0.15N NaCl이 함유된 20mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액을 5ml 넣어 glass homogenizer로 마쇄하여 sonication한 후, 저온 원심분리기에서 4°C, 10,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 상등액을 분취하였다. 이 상등액 2ml에 100% 포화시킨 (NH₄)₂SO₄를 6ml 넣어 충분히 혼합한 후, 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 그 침전물을 상기한 완충액에 용해시킨 후, 투석하여 (NH₄)₂SO₄를 제거하여 이를 粗난황단백추출액으로 하였다. 조난황단백추출액 5ml를 sepharose CL-4B gel chromatography column(φ2×80cm)에 적용시켜 상기한 완충용액으로 gel 여과한 후 분획된 각 tube의 용출액은 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 항혈청 제작

성숙한 암수 전복의 혈액과 조난황단백추출물, 그리고 분리된 난황단백질에 대한 항혈청은 Newbould(1965)의 방법을 변형하여 토끼에 면역시켜 얻었다. 항원은 동량의 Freund adjuvant를 혼합한 후 乳化시켜 사용하였다. 1회째의 항원은

암수 혈청, 조난황단백추출물, 그리고 분리된 난황단백질 1ml에 complete adjuvant 1ml를 혼합한 후 유화시켜 토기에 피하주사하였다. 2회째부터의 항원투여는 각각의 항원 1ml에 incomplete adjuvant 1ml씩을 혼합한 후 유화하여 1회째 항원투여 후 1주일 간격으로 4회에 걸쳐 같은 양의 항원을 같은 방법으로 피하에 투여하였으며, 마지막 투여 후 1주일 후에 경동맥을 절단하여 채혈하였다. 채혈한 혈액은 37°C에서 3시간 배양하여 비동화시켜 4°C에서 다음날까지 방치한 후, 그 상등액만을 취하여 3,000×g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 혈청을 항혈청으로 사용하였으며, 이는 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.

4. 전기영동 및 면역전기영동

Native polyacrylamide gel 전기영동(native-PAGE)은 Davis(1964)의 방법을 따라 5%의 분리용 polyacrylamide gel과 5%의 농축용 polyacrylamide gel을 사용하였다. 그리고 SDS polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli(1970)의 방법을 따라 7%의 polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하였다. 단백질의 염색은 coomassie brilliant blue R-250을 45% ethanol과 45% acetic acid에 녹여 0.25%의 농도로 한 염색액을 사용하여 염색하였다.

면역전기영동은 0.1M Tris-HCl(pH 8.6) 완충액에 agarose 농도가 1.2% 되는 용액을 만들어 영동용 gel을 제작하였다. 영동용 완충액은 0.2M Tris-HCl(pH 8.6)을 사용하였으며, 100V에서 2시간 동안 전기영동하였다.

5. 면역확산 test

0.1M phosphate(pH 7.0) 완충액에 1.2% 농도의 agarose 용액을 만들어 Ouchterlony 면역확산용 gel을 제작하여 이미 만들어 놓은 각 항혈청에 대하여 암수 혈청과 조난황단백추출물, 분리된 난황단백질 및 암수 간체장 추출물과의 침강반응을 조사하였다.

결론

1. 암컷 혈청단백질의 특성

성숙중인 암수 전복의 혈청(F, M)과 암컷 전복의 혈청에 대한 항혈청(aF)을 이용한 면역전기영동 양상을 Fig.1A에 나타내었다. 암컷 전복의 항혈청(aF)에 대하여 수컷 전복의 혈청(M)은 시료의 well에서 양(+)-극 쪽으로 여러 개의 긴 침강선이 나타났다. 암컷의 혈청(F)에서는 화살표가 가리키는 바와 같이 시료의 well에서 음극(-)쪽으로 수컷에서는 나타나지 않은 뚜렷한 2개의 침강선이 나타났으며, 그 외에 수컷과 동일한 위치에 양극 쪽으로 긴 침강선들이 나타났다.

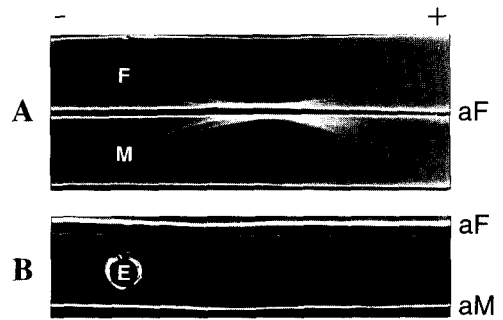


Fig. 1. Immunoelectrophoresis patterns of female and male sera and ovarian egg extracts. A : Reaction of female and male sera to antiserum raised against female serum. Arrow(∇) indicates two precipitin lines of female specific serum proteins. B : Reaction of ovarian egg extracts to antiserum raised against female and male sera. F : female serum, M : male serum, E : crude ovarian egg extracts, aF : antiserum raised against female serum, aM : antiserum raised against male serum.

그리고 암컷 혈청에 대한 항혈청(aF)과 수컷 혈청에 대한 항혈청(aM)에 대하여 조난황단백추출액(E)을 면역전기영동한 양상은 Fig. 1B에 나타내었다. 조난황단백추출액은 수컷 혈청에 대한 항혈청(aM)에 대해서는 침강반응이 나타나지 않았으나, 암컷의 혈청에 대한 항혈청(aF)에 대해

서는 시료의 well 부근에 뚜렷한 1개의 침강선을 형성하였다. 이상의 결과로 암컷 전복의 혈청에는 수컷 전복의 혈청에 없는 암컷 특이 혈청단백질 (female specific serum protein)이 존재함을 알 수 있었다.

그리고 암컷의 혈청에 있는 암컷 특이 혈청단백질과 조난황단백추출물에 존재하는 난황단백질이 공동의 항원성을 가지고 있는가를 알아보기 위하여 이들에 대하여 Ouchterlony 면역확산 실험을 한 결과(Fig. 2), 조난황단백추출물의 항혈청(aE)에 대하여 수컷 혈청(M)은 침강선이 형성되지 않은 반면, 암컷 혈청(F)과 조난황단백추출액(E)에 대해서는 침강선이 형성되었으며, 이들의 침강선은 서로 융합하고 있었다. 이러한 결과로 조난황단백추출물의 난황단백질과 암컷 특이 혈청단백질과는 공동의 항원성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

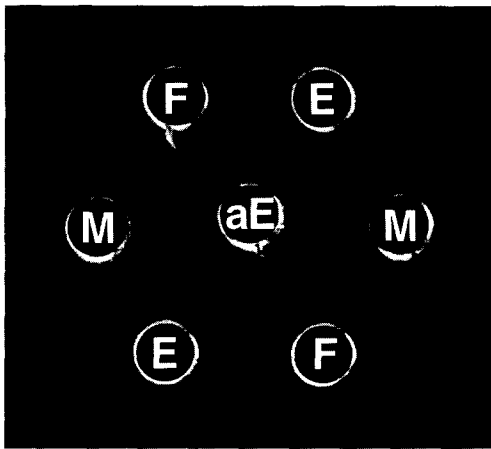


Fig. 2. Ouchterlony's immunodiffusion for female and male sera and ovarian egg extracts against the antisera to crude ovarian egg extracts. F : female serum, M : male serum, E : crude ovarian egg extracts, aE : antiserum raised against crude ovarian egg extracts.

2. 난황단백질의 특성

암컷 특이 혈청단백질과 공동의 항원성을 가지

는 난황단백질을 분리하기 위하여 조난황단백추출물을 sepharose CL-4B gel chromatography column에 적용시켜 용출된 각 fraction을 280 nm에서 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Fraction No. 19에서 22사이에서 첫 번째 peak와 fraction No. 34에서 40사이의 두 번째 peak가 나타났다. 각각의 peak들을 분취하여 native-PAGE를 한 결과, 두 번째 peak에서만 coomassie brilliant blue R-250 염색액에 반응하여 뚜렷한 1개의 band가 나타났다(Fig. 4A). 이 단백질이 분획을 SDS-PAGE한 결과 두 개의 band가 나타났으며 이들 각 subunit의 분자량은 각각 181 kDa과 113 kDa이었다(Fig. 4B).

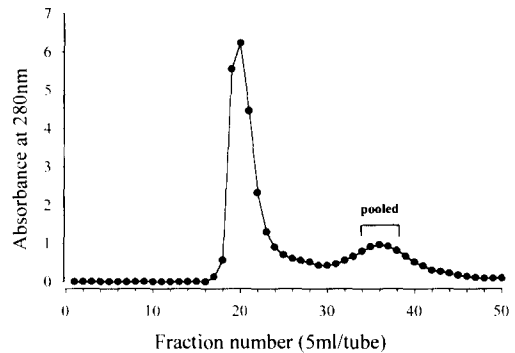


Fig. 3. Elution pattern of crude ovarian egg extracts on a sepharose CL-4B gel chromatography. Second peak were pooled.

분리된 단백질이 암컷 특이 혈청단백질과 서로 공동의 항원성을 가지고 있는지를 알아보기 위하여 분리된 단백질의 항혈청(aYP)에 대하여 암컷 혈청(F)과 수컷 혈청(M), 그리고 조난황단백추출물(E)을 Ouchterlony 면역확산 실험한 결과(Fig. 5A), 암컷 전복의 혈청(F)과 조난황단백추출물(E)에서는 침강선이 생기면서 서로 융합되었지만, 수컷 혈청에서는 반응이 전혀 일어나지 않았다. 이러한 결과로 암컷 혈청에 있는 암컷 특이 혈청단백질과 조난황단백추출물 그리고 분리된 단백질은 서로 공동의 항원성을 가지고 있음을 알 수 있어서 분리된 이 단백질 분획을 난황단백질

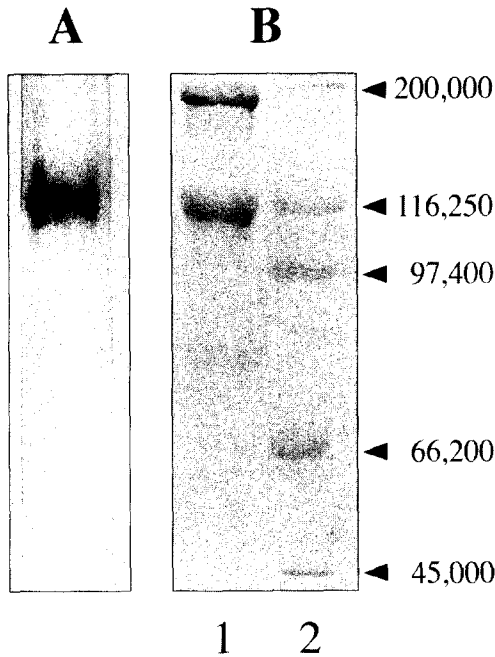


Fig. 4. Native-PAGE in 5% polyacrylamide gel of purified yolk protein that is second peak obtained by gel chromatography(A). SDS-PAGE in 7% polyacrylamide gel of purified yolk protein(B). Lain 1, purified yolk protein; lain 2, standard mark protein.

분획으로 하였다. 분리된 난황단백질의 항혈청(aYP)을 이용하여 난황단백질이 합성될 가능성이 있는 조직들을 알아보기 위하여, 암컷의 혈액(F), 조난황단백추출물(E) 및 암컷과 수컷의 간체장 추출물에 대한 Ouchterlony 면역확산 실험 한 결과(Fig. 5B), 수컷의 간체장 추출액(Mh)에서는 침강반응이 일어나지 않았으나, 암컷의 간체장 추출액(Fh)은 분리된 난황단백질의 항혈청(aYP)에 대하여 침강선이 생기면서 암컷의 혈액(F)과 조난황단백추출물(E)의 침강선과 서로 융합되었다. 따라서 간체장 추출액내에도 난황단백질과 공동의 항원성을 가지는 단백질이 존재하고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

성숙기에 있는 암컷 참전복, *Haliotis discus*

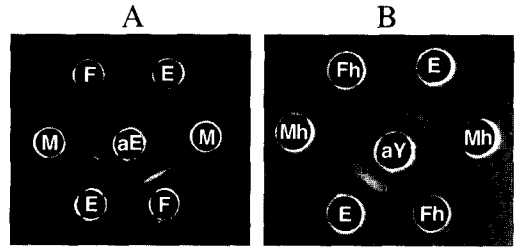


Fig. 5. Ouchterlony's immunodiffusion test for male and female sera and egg extracts against the anti-sera to purified yolk protein(A). Ouchterlony's immunodiffusion test for hepatopancreas extracts of male and female and ovarian egg extracts(B). F : female serum, M : male serum, E : crude ovarian egg extracts, Fh : extracts of female hepatopancreas, Mh : extracts of male hepatopancreas.

*hannai*의 암수 혈액, 조난황단백 추출액에 대하여 면역전기영동과 Ouchterlony 면역확산 test에 대한 실험결과(Fig. 1), 성숙기에 있는 암컷 전복의 혈액에는 수컷 전복의 혈액에 나타나지 않는 난황단백질과 공동의 항원성을 가지는 암컷 특이 혈청단백질이 존재함을 확인 할 수 있었다. 이러한 암컷 특이 혈청단백질의 존재에 대해서는 절족동물에서 Frentz(1960)에 의해 보고되어진 이후 많은 종에 대해 보고되어져 왔으며, 이러한 암컷 특이 혈청 단백질을 절족동물과 어류등에서는 난황단백전구체(vitellogenin)라고 부르고 있다(Pan et al., 1969 ; Aida et al., 1973). 연체동물에서는 암컷 특이 혈청단백질의 존재에 대한 연구보고는 거의 찾아 볼 수가 없을 정도로 빈약한 실정이며, 단지 *Crassostrea gigas* (Suzuki et al., 1992)에서만 암컷 특이 혈청단백질의 존재를 보고하고 있고, 같은 이매패류인 *Patinopecten yessoensis* (Osada et al., 1992)에서는 암컷 특이 혈청단백질이 존재하지 않는다고 보고하고 있다. 본 연구에서 암컷 특이 혈청단백질은 난황단백질과 공동의 항원성을 갖는 것으로 보아 이는 난황단백전구체라고 추정할 수 있었으며 성숙한 암컷 혈액내에는 난황단백전구체가 존재하고 있다고 할 수 있었다.

성숙한 난소난의 조난황단백추출액으로 부터 분리한 난황단백질은 normal-PAGE 에 의해 한

종류의 단백질이 존재하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4A). 그리고 이들의 난황단백질은 전체적으로 2개의 subunit로 되어 있으며, 이들의 분자량은 각각 181kDa과 113kDa으로 측정되었다 (Fig. 4B). 연체동물에서는 난황단백질에 대한 분리와 특성에 대한 연구보고가 이매패류에 속하는 *C. gigas* (Suzuki et al., 1992)에 대한 것밖에 찾아 볼 수 없어서 다른 복족류와 비교할 수는 없으나 이매패류인 *C. gigas*에서 난황단백질은 7개의 subunit로 되어 있으며 이들의 분자량은 각각 105, 85, 66, 64, 60, 45 그리고 41kDa으로 보고되고 있다. 이러한 결과와 비교할 때 복족류에 속하는 참전복의 난황단백질은 분자량의 크기와 그 구성하는 subunit의 수가 이매패류에 속하는 *C. gigas*와는 다름을 알 수 있었다.

암컷이 혈청단백질과 공동의 항원성을 가지는 분리된 난황단백질을 토끼에 면역시켜 얻은 항혈청을 이용하여 암수 간체장 추출액과 암컷의 혈액, 그리고 조난황단백추출물에 대하여 면역확산 실험을 한 결과 (Fig. 9), 암컷의 간체장 추출액에서도 난황단백질에 대한 항체에 대하여 침강반응이 나타났으며, 이 침강선은 암컷 혈액과 조난황단백추출액과 융합하고 있어서 간체장내에도 난황단백질과 동일한 항원성을 가지는 단백질이 존재하고 있음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 간체장이 난황단백질이 합성되는 장소일 것이라는 가능성을 제시해 줄 수 있었다.

간체장에서 난황단백질이 합성된다는 보고는 연체동물에서는 아직 찾아보지 못했으나 절족동물에서는 간체장이 주된 난황단백질인 난황단백전구체가 합성되고 있다는 보고가 많이 있다 (Wolin, 1973; Paulus and Laufer, 1987; Han and Bae, 1992; Han et al., 1994). 어류등의 척추동물들에서는, 난황단백질이 자성호르몬의 작용에 의해 간에서 난황단백전구물질로 합성되어 난소 내의 난모세포에 축적된다는 것은 널리 알려져 있으며 (Wallace, 1985), 무척추동물중 곤충류는 지방체에서 (Brookes, 1969; Pan et al., 1969; Hagedson and Judson, 1972; Chen

et al., 1979; Zhai et al., 1984; Chinzei and Yano, 1985) 난황단백전구체가 합성된다고 알려져 있다.

지금까지 면역조직화학적 방법에 의하여 연체동물에서 난황단백질의 합성 부위가 밝혀진 종은 이매패류인 *C. gigas*와 *P. yessoensis*이다 (Suzuki et al., 1992; Osada et al., 1992). 이들 종에서 난황단백질은 난세포내에서 자가합성된다고 보고하고 있다. 한편 이매패류중 진주담치, *Mytilus edulis*에서 Lowe et al. (1982)은 난소의 생식세포가 발달하면서 외부막의 지방과립세포 (adipogranular cell)도 같이 발달하고 있어서 이들 세포가 난세포가 성숙할 때 영양분을 공급해 주고 있다고 기술하고 있어서 이 지방과립세포에서 난황단백질을 합성하고 있는 장소일 가능성을 제시하고 있다. 그러나 Pipe (1987)는 같은 진주담치에서 난세포에 대한 미세구조 관찰에 의해 난세포가 성장할 때 난황막이 생기고 세포질에는 조면소포체와 golgi complex들이 많이 출현하는 것으로 보아 주된 난황단백질은 난세포 자체에서 합성되어질 것이라고 추정하고 있다. 그러나, 본종은 지금까지 이매패들의 난황형성이 난소내에서 자가합성적으로 이루어진다는 보고와 달리 면역학적 조사에서 암컷 간체장에 난황단백전구물질이 존재하고 있음이 확인되어 간체장이 난황단백전구체의 생합성 장소라고 추정 할 수 있었다.

그러나 간체장 추출액에 대한 면역학적 조사만으로 생합성부위를 추정하는 것은 간체장내의 혈액성분의 존재여부가 확실하지 않아 어려움이 많다. 앞으로 난황단백질의 생합성 부위를 명확히 구명하기 위해서는 난황단백질과 난황단백전구체의 항체를 이용한 면역조직화학적 방법과 난황단백질에 대한 mRNA의 probe를 만들어 이를 이용한 *in situ* hybridization 방법들이 이용되어야 할 것이다.

요 약

전복의 난황단백질의 특성을 조사하기 위하여

성숙한 참전복 암컷의 난소난 추출물로부터 sepharose CL-4B gel chromatography을 사용하여 난황단백질을 분리하였다.

암컷과 수컷의 혈청과 난소난 추출물에 대한 항혈청을 이용하여 암수혈청과 난소난 추출물을 면역전기영동과 Ouchterlony 면역확산을 한 결과, 성숙한 암컷 혈청에는 암컷 특이 혈청 단백질(female specific serum protein)이 존재하였으며, 이것은 난소난 추출물과 동일한 항원성을 가지고 있었다. 한 종류의 난황단백질이 난소난 추출물로부터 분리되었으며, 이 난황단백질은 SDS 전기영동에 의해 분자량이 각각 181kDa과 113kDa이 되는 2개의 subunit로 구성되어 있었다. 이들 난황단백질에 대한 항혈청은 성숙한 암컷 특이 혈청단백질과 간체장 추출액과 침강반응을 보였으며 서로 교차반응이 일어났으나, 성숙한 수컷 간체장 추출물에 대해서는 반응이 일어나지 않았다.

참 고 문 헌

- Aida, K., P. V. Nagam, and T. Hibiya. 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes. I. Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39 : 1091-1106.
- Baert, J.-L., P. Sautiere and M. Porchet. 1984. Purification and characterization of oocyte vitellin from *Perinereis cultrifera* (polychaete annelid). Eur. J. Biochem. 142 : 527-532.
- Brookes, V. J. 1969. The induction of yolk protein synthesis in the fat body of an insect, *Leucophaea madeae*, by an analog of the juvenile hormone. Develop. Biol., 20 : 459-471.
- Chen, T.T., P. Clouble, P. Abu-Hakima and G. R. Wyatt. 1979. Juvenile hormone-controlled vitellogenine synthesis in *Locusta migratoria* fat body. Develop. Biol., 69 : 59-72.
- Chinzei, Y. and I. Yano. 1985. Fat body is site of vitellogenine synthesis in the soft tick, *Ornithodoros moubate*. J. Comp. Physiol. B, 155 : 671-678.
- Davis, B. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121 : 404-427.
- Frentz, R. 1960. Contribution a l'etude biochimique du milieu interieur de *Carcinus maenas*. L. Bull. Sod. Sci. Nancy. nlle serie., 19 : 1-176.
- Hagedon, H. H. and C. L. Judson. 1972. Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk proteins. J. Exp. Zool., 182 : 367-378.
- Han, C. H. and H. H. Bae. 1992. Purification of the protein, and identification of the synthetic site of its precursor in *Eriocheir japonicus*(Decapoda, Brachiura). Bull. Korean Fish. Soc., 25(5) : 432-442.
- Han, C. H., O. Takuji, S. Yuzuru, A. Katsumi and H. Isao. 1994. Immunocytochemical identification of the site of vitellogenin synthesis in the freshwater prawn *Macrobrachim nipponense*. Fisher. Sci., 60(2) : 149-154.
- Lee, T. Y. 1974. Gametogenesis and reproductive cycle of abalones. Publ. Mar. Lab. Busan Fish. Coll., 7 : 21-50.
- Kim, H.-Y. 1997. Toxic effects of phenol on survival and oxygen consumption of the abalone juvenile, *Haliotis discus hannai*. J. Korean Fish. Soc., 30(3) : 496-504.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.
- Lowe, D. M., M. N. Moore and B. L. Bayne. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*. L. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 62 : 133-145.
- Meusy, J. J., C. Zerbib, F. Dacheux and M. P. Dubois. 1983. Subcellular localization of vitellogenin in crustacean adipocytes by the unlabelled antibody enzyme method. Tissue Cell., 15 : 301-310.
- Newbould, B. B. 1965. Production of allergic encephalomyelitis in rats by injections of spinal cord adjuvant into the inguinal lymph nodes. Immunol., 9 : 613-613.
- Osada, M., U. Tatsuya and M. Katsuyoshi. 1992. Purification and characterization of

- a yolk protein from the scallop ovary. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, 58(12) : 2283-2289.
- Pan, M. L., W. J. Bell and W. H. Telfer. 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*, N. Y., 165 : 393-394.
- Paulus, J. E. and H. Laufer. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda brachyura). *Int. J. Invert. Reprod. Dev.*, 11 : 29-44.
- Pipe, R. K. 1987. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* : an ultrastructural study. *Mar. Biol.*, 95 : 405-414.
- Souty, C. and J. L. Picaud. 1981. Vitellogenin synthesis in the fat body of the marine crustacean isopoda, *Idotea balthica basteri*, during vitellogenesis. *Reprod. Nutr. Develop.*, 21 : 95-101.
- Suzuki, T., A. Hara, K. Yamaguchi and K. Mori. 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 113 : 239-245.
- Tyler C. R. and J. P. Sumpter. 1990. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.*, 8 : 111-120.
- Uki, N. and S. Kikuchi. 1979. Food value of six benthic micro-algae on growth of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, 40 : 47-52.
- Wallace, R. A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrate. In *Developmental biology*. Browder, L. W. (ed.), Vol. 1., Plenum Press, New York., 127-177.
- Wallace, R. A. and P. C. Begovac. 1985. Phosphorylation in *Fundulus* oocytes and eggs. *J. Biol. Chem.*, 260 : 11268-11274.
- Wolin, E. M., H. Laufer and D. F. Albertini. 1973. Uptake of the yolk protein, lipovitellin, by developing crustacean oocytes. *Develop. Biol.*, 35 : 160-170.
- Zhai, Q. H., J. H. Postlethwait and J. W. Bodley. 1984. Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.*, 14 : 299-305.
- 土屋靖彦. 1962. 水産化学, 恒星社厚生閣, 234-251.