

홍바리(*Epinephelus fasciatus*) 난황형성기 난모세포에서의 성 스테로이드 호르몬 대사

김슬기 · 백혜자*

부경대학교 자원생물학과

Steroid Metabolism in the Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus* during Oocyte Vitellogenesis

Seol Ki Kim and Hea Ja Baek*

Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

We studied oocyte steroidogenesis in blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* ovarian follicles during vitellogenesis. Vitellogenic oocytes with average diameters of 0.45, 0.48 and 0.50 mm were incubated *in vitro* in the presence of [³H]17 α -hydroxyprogesterone as a precursor. The steroid metabolites were analyzed using thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The major metabolites in the vitellogenic oocytes were androstenedione (A₄), testosterone (T), estradiol-17 β (E₂), and estrone (E₁). The metabolites of androgen (A₄ and T) were higher in the 0.50-mm oocytes than in the 0.45- and 0.48-mm oocytes, while the estrogen metabolites (E₂ and E₁) were lower in the 0.50-mm oocytes. These results suggest that 0.50-mm oocytes are fully vitellogenic following initiation of the maturation process.

Key words: Blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus* Sex steroid hormones, Vitellogenesis

서 론

경골어류의 번식내분비계는 시상하부-뇌하수체-생식소의 축(Hypothalamus-pituitary-gonad; H-P-G axis)으로 이루어져 있으며, 이들은 서로 상보적인 기능에 의하여 조절된다. 즉, 어류의 난소발달 과정은 빛과 수온 등 외부환경요인에 의하여 개시되며(Goos et al., 1993), 이러한 환경요인들은 감각기관을 거쳐 시상하부에 전달되어 Gonadotropin releasing hormone (GnRH, 생식소자극호르몬방출호르몬)와 뇌하수체의 Gonadotropin (GTH, 생식소자극호르몬) 분비를 순차적으로 자극함으로써 이들이 난소성숙 과정의 매개체 역할을 하고 있다. 난소에 난황이 축적되기 시작하는 난황형성기(vitellogenesis)에는 estradiol-17 β (E₂)가 주요 스테로이드로 작용하며, 난황축적이 종료된 직후부터 배란시기까지는 progesterone의 유도체인 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β P)나 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β 21P) 등이 주요 성 스테로이드 호르몬으로 알려져 있다(Nagahama, 1994;

Yoshizaki et al., 2001; Patino et al., 2003). 난황형성기는 어류의 번식에서 중요한 과정으로 난모세포에서 합성·분비된 E₂에 의해 간에서 난황전구물질(vitellogenin, Vg)이 합성되어 난모세포내에 축적 그리고 난황물질(vitellin)로의 전환과정을 포함한다. 이 기간 동안에 난모세포가 주로 성장하게 되는데, 난모세포 크기가 점점 증가하면서 크기가 최종 난모세포의 98%까지 도달하게 된다(Tyler et al., 1988).

홍바리(*Epinephelus fasciatus*)는 농어목 바리과에 속하는 어류로서 다른 바리과 어류와 마찬가지로 자성선속형 자동동체이고 한번 산란기 동안에 여러번 산란하는 다회산란종(multiple spawner)이다(Kawabe and Kohno, 2009). 바리과 중에서 홍바리는 우리나라 근해에 서식하는 상업적으로 매우 중요한 희귀어종으로 개체수가 적어 자원증강이 시급한 어종이다(Annalie et al., 2000). 최근 홍바리의 인공 번식기술 개발을 위한 연구들이 이루어지고 있으나(Song et al., 2005; Kawabe et al., 2009; Hwang et al., 2012; Kang et al., 2012; Park et al., 2012) 이 종의 번식 특성에 관한 기초 자료는 여전히 부족한 실정이다.

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0882>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(6) 882-887, December 2014

Received 23 September 2014; Revised 13 November 2014; Accepted 9 December 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5924 Fax: +82. 51. 629. 5931

E-mail address: hjbaek@pknu.ac.kr

본 연구에서는 홍바리의 번식기술 개발을 위한 기초자료로 난 황형성기의 홍바리 난모세포를 대상으로(평균난경 0.45, 0.48 그리고 0.50 mm) 이시기에 관여하는 주요 성 스테로이드 호르몬을 분석하였다. 동시에 기존의 연구(Hwang et al., 2012)에서 확인하지 못한 스테로이드를 검정하였다.

재료 및 방법

실험어

실험에 사용된 홍바리는 제주대학교 해양과환경연구소에서 수온과 광주기 조절(25℃, 14L:10D)로 성숙 유도시킨 홍바리 암컷 3개체를 대상으로 하였다. 실험에 사용된 개체의 전장은 31.6-37.0 cm, 체중은 528-851 g 이었다.

난모세포 조직 배양 및 조직학적 관찰

실험어는 0.5 mL/L의 2-phenoxyethanol로 마취시켜 전 체 혈한 후 무균상태에서 난소를 절취하여 ice-cold balanced salt solution (132.96 mM NaCl, 3.09 mM KCl, 0.28 mM MgSO₄·7H₂O, 0.98 mM MgCl₂·6H₂O, 3.40 mM CaCl₂·6H₂O, 3.65 mM HEPES)으로 세척하였다. 절취된 난소는 가는 핀셋을 이용하여 개체별로 난모세포를 조직상태로 분리하였다.

분리된 난모세포는 난경별로 24-well plate에 well당 Leibovitz L-15 (Gibco, USA) 1 mL에 적출한 난소조직 일부(5.1-10.9 mg)를 넣은 후 18℃에서 24시간 배양하였다. Balanced salt solution과 L-15 배양액의 pH는 7.85, 삼투농도는 370 mOsmol kg⁻¹로 조절하였다. 난모세포에서 생성되는 성 스테로이드 호르몬 종류를 분석하기 위해 방사표지된 전구물질인 17 α -hydroxyprogesterone (³H]-17 α P, Amersham Life Science, UK)을 난경별로 각각 55 kBq 첨가하여 배양하였다.

난모세포 발달 단계의 조직학적 관찰을 위해 적출한 난소를 Bouin's solution에 고정하여 파라핀으로 포매한 후 5-6 μ m 두께의 절편을 만들어 Mayer's hematoxylin과 eosin으로 비교 염색하여 광학현미경(U-ND25-2, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다.

스테로이드 호르몬 대사물질 분석 및 동정

배양 후 난모세포와 배양액은 함께 80% ethanol로 균질화하여 원심분리한 후 상등액만을 모아 건조시킨 뒤 증류수 500 μ L에 용해시켜 dichloromethane으로 2번 추출하여 유리 스테로이드만을 얻었다.

스테로이드 추출물은 스테로이드 표준물질과 동시에 실리카겔을 입힌 얇은 막 지지체(TLC plate, 60F²⁵⁴, Merck)에 점적시킨 후 밀폐된 혼합용매(benzene:acetone=80:20와 Benzene:ethylacetate=80:20)속에서 전개시켰으며, 각각의 반점에 해당하는 Retention fraction (Rf) 값은 Table 1과 같다. 전개 후 TLC plate를 건조시킨 뒤 대사물질들의 반점 중 estrone (E₁)과 estradiol-17 β (E₂)는 요오드 증기로, 나머지 반점들은

Table 1. The retention factor (Rf) values of steroid metabolites on the TLC plates

Steroid standard	Migration distance (cm)	Rf values ¹
E1	12.9	0.86
A4	11.4	0.76
E2	10.35	0.69
17 α P	9.15	0.61
T	8.25	0.55
17 α 20 β P	4.8	0.32
17 α 20 α P	3	0.20
17 α 20 β 21P	1.05	0.07

¹Rf, is defined as the distance traveled by the compound divided by the distance traveled by solvent (15 cm). Solvent system of mobile-phase was 3 times of benzene :ethylacetate = 4:1 (V/V) after 2 times of benzene : acetone = 4:1 (V/V). E1, estrone; A4, androstenedione; E2, estradiol-17 β 17 α P, 17 α -hydroxyprogesterone; T, testosterone; 17 α 20 β P, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one; 17 α 20 α P, 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one; 17 α 20 β 21P, 17 α 20 β 21-dihydroxy-4-pregnen-3-one.

254 nm의 자외선 하에서 확인하였다. TLC plate에 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. 용리된 대사물질은 HPLC (Waters)를 이용하여 표준물질의 retention time과 일치하는 분획만을 분리하였다. 분리된 분획은 Liquid Scintillation Counter (PACKARD TR-CARB-2100T, USA)를 이용하여 radioactivity 측정 후 대사물질별로 대사율을 계산하였으며, 분리된 대사물질은 HPLC-radiodetector (β -RAM MODEL 4, USA)로 확인하였다. HPLC 기기분석 조건은 Table 2와 같다. HPLC-radiodetector로 확인된 대사물질은 gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) (GCMS-QP5050A, Shimadzu, Japan) 로 동정하였으며, GC/MS 작동조건은 Table 3과 같다.

Table 2. HPLC instruments and analysis conditions for separation of steroid metabolites

HPLC	Waters Alliance
Column	SunFire C18, 4.6×150 mm
Mobile phase	20% methanol:acetonitrile = 60:40
Flow rate	1 mL/min
UV detector	Waters 2487 Multiwavelength Absorbance Detector
Radio detector	β -RAM Model 4-Radio-HPLC Detector(IN/US system, USA)
Injection volume	20 μ L
Ending time	15 min

Table 3. Analytical conditions of GC/MS for identification of steroid metabolites

Instrument	GC/MS (Agilent 7890AGC/5975C)
Column	DB-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)
Flow rate (gas)	1 mL/min (He, 99.999%)
Injection mode	Splitless mode
Injector temperature	260.00°C
Detector temperature	300.00°C
Oven temperature	60.00°C (2.00 min) → 10.00°C/min, 150.00°C (0 min) → 5.00°C/min, 300.00°C (14 min)

결 과

난모세포의 조직학적 관찰

홍바리의 난소내 난모세포의 조직학적 관찰은 Fig. 1과 같다. 평균 난경 0.45, 0.48 그리고 0.50 mm에 해당하는 난모세포들은 모두 세포질 내에 난황과립(yolk granule, Yg)이 충만하였으며, 다양한 크기의 유구(oil droplet, OD)들이 관찰되었다(Fig. 1A,1B,1C). 난경 0.45과 0.48 mm인 난모세포에서는 핵(nucleus, N)이 대부분 세포질 중앙에 위치 하였으나, 난경 0.50 mm인 난모세포에서는 핵의 이동이 시작되는 난모세포도 관찰되었다(Fig. 1D).

난모세포의 스테로이드 대사물질 추적

평균난경이 약 0.45, 0.48, 그리고 0.50 mm인 난모세포에서 $[^3\text{H}]17\alpha\text{-hydroxyprogesterone}$ 으로부터 생성된 스테로이드 대

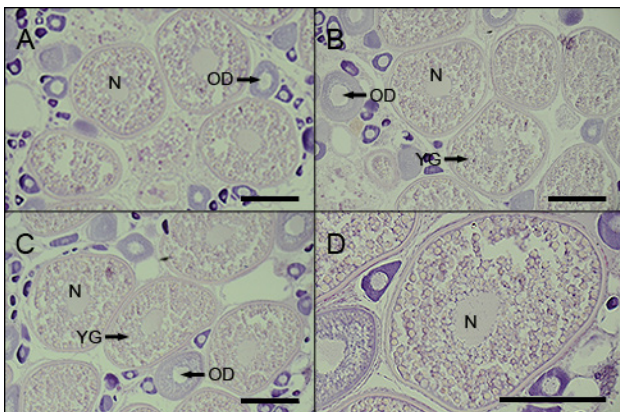


Fig. 1. Histological observation of oocytes in blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*. A, ovary with oocyte of 0.45 mm in average diameter; B, ovary with oocyte of 0.48 mm in average diameter; C, D, ovary with oocyte of 0.50 mm in average diameter; N, nucleus; OD, oil droplet YG, yolk granule. Scale bars indicate 250 μm.

사물질들의 TLC상의 반점은 A_4 , T, E_2 그리고 E_1 등의 표준물질과 일치하였다(Fig. 2). 전구물질로부터 생성된 주요 대사물질들 즉, A_4 , T, E_2 는 HPLC-radiodetector를 거쳐 GC-MS에 의해 최종 동정되었다(Fig. 3). 그리고 E_1 은 대사된 농도가 낮아 radiodetector에서는 검출되지 않았지만 GC-MS에 의해 동정되었다(Fig. 4).

난모세포로부터 생성된 성 스테로이드 대사율

난황형성기 난모세포에서 전구물질, $[^3\text{H}]17\alpha\text{-hydroxyprogesterone}$ 로 전환된 성 스테로이드 대사율은(Fig. 5)과 같다. A_4 의 대사율은 평균난경 0.45, 0.48 mm인 난모세포에서 각각 73.5, 67.2% 였고 0.50 mm인 난모세포에서 80%이상의 높은 대사율을 보였다. T로의 대사율에서는 평균난경 0.45, 0.48 mm인 난모세포에서 각각 6.1, 8% 였고 난경 0.50 mm인 난모세포에서 13.2%로 증가하였다. E_2 의 대사율은 평균난경 0.45, 0.48 mm 난모세포에서 각각 2.9, 2.6% 였고 평균난경 0.50 mm 난모세포에서 0.5%로 낮은 대사율을 나타냈다. E_1 의 대사율도 평균난경 0.50 mm인 난모세포에서 0.3%를 나타냈다.

고 찰

본 연구에 사용된 홍바리(blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*)의 난소 내 난모세포들은(평균난경 0.45, 0.48 그리고 0.50 mm) 모두 세포질 내에 난황과립이 축적 되어 있었으며, 난경 0.50 mm인 난모세포에서는 세포질 내에 유구들이 산재해 있었

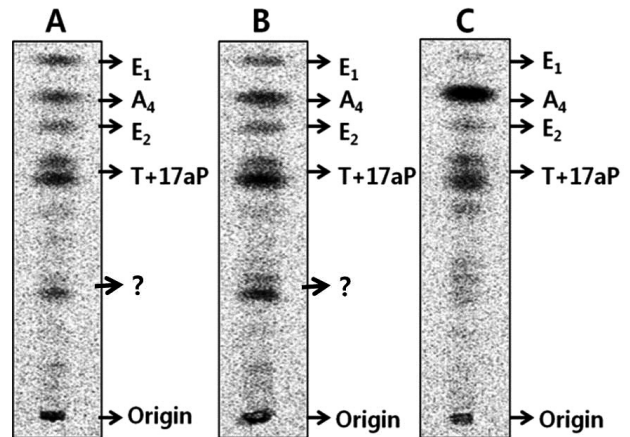


Fig. 2. Autoradiograms of steroid metabolites incubated with $[^3\text{H}]17\alpha\text{-hydroxyprogesterone}$ from blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* ovarian follicles at three different oocyte diameter. Four metabolites were separated by thin layer chromatography developed with a benzene: acetone (4:1) and benzene: ethyl acetate (4:1) solvent system. A, Oocytes of 0.45 mm diameter; B, Oocytes of 0.48 mm diameter; C, Oocytes of 0.50 mm diameter; A_4 , androstenedione; E_1 , estrone; E_2 , estradiol-17β; T, testosterone; ?, unknown.

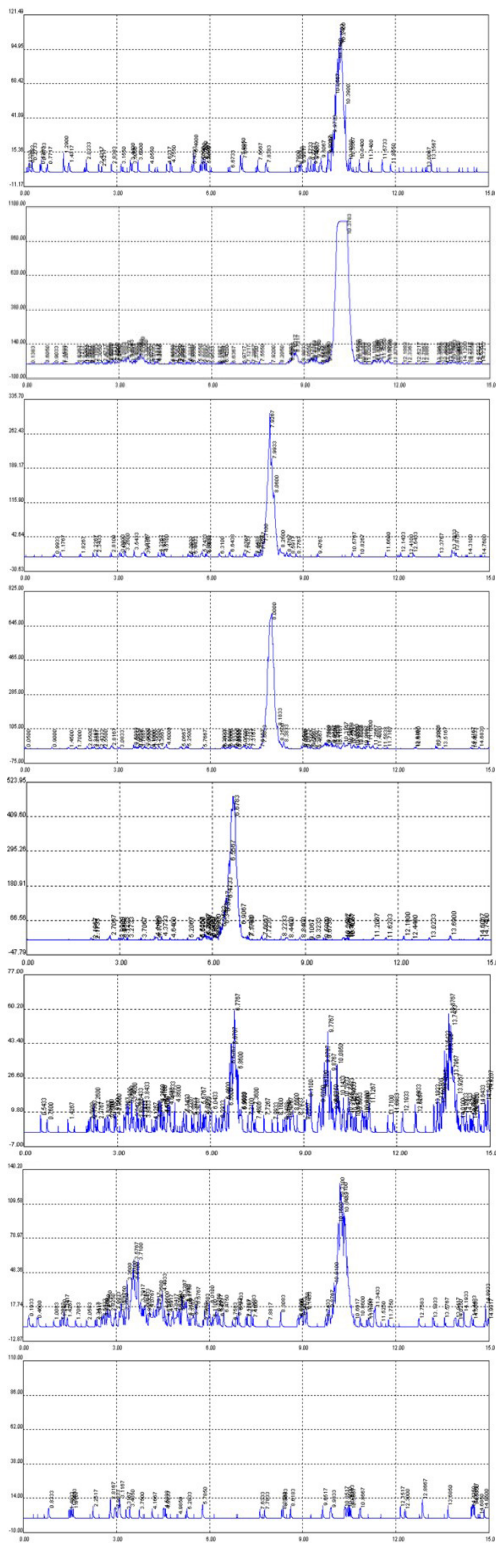


Fig. 3. HPLC elution profile of the radioactive standard steroid and metabolites. A, authentic A_4 ; B, metabolized A_4 ; C, authentic T; D, metabolized T; E, authentic E_2 ; F, metabolized E_2 ; G, authentic E_1 ; H, metabolized E_1 .

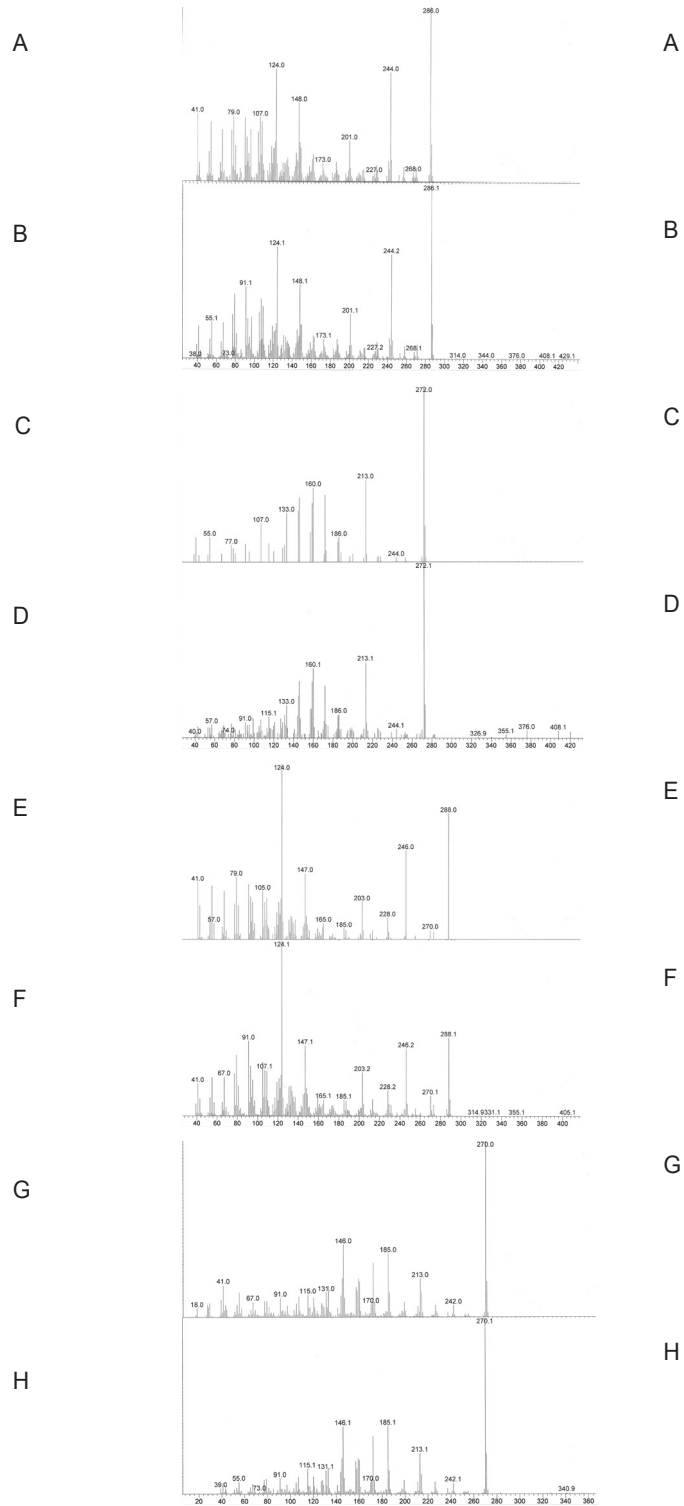


Fig. 4. Mass spectra of steroid metabolized by blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* oocytes identified as androstenedione (A_4), testosterone (T), estradiol-17 β (E_2) and estrone (E_1). A, authentic A_4 ; B, metabolized A_4 ; C, authentic T; D, metabolized T; E, authentic E_2 ; F, metabolized E_2 ; G, authentic E_1 ; H, metabolized E_1 .

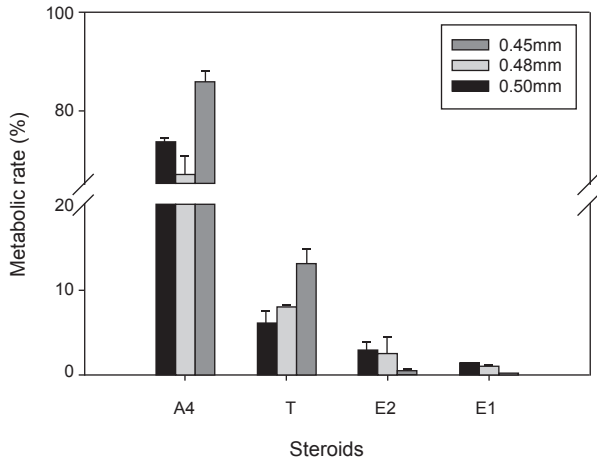


Fig. 5. Radioactivities of steroid metabolites from $[^3\text{H}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone in blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* oocytes. The percentage of radioactivity associated with each isolated steroid was calculated to the percentage of total steroid recovered from HPLC. Values are mean \pm SE.

A₄, androstenedione; E₁, estrone; E₂, estradiol-17 β ; T, testosterone.

고, 핵의 이동이 시작하는 것으로 보아, 이 시기의 난모세포는 난황형성 종료 직후의 발달 단계인 것으로 생각된다.

홍바리의 난황형성기 난모세포에서 합성되는 주요 스테로이드 호르몬은 androgen인 A₄와 T, estrogen인 E₂와 E₁으로 동정되었다. 난경에 따른 주요 스테로이드 호르몬의 대사율 변화를 살펴보면 estrogen인 E₂와 E₁는 난경의 크기가 증가할수록 감소하는 것을 확인하였다. 즉, 난경 0.50 mm 난모세포에서는 난경 0.45, 0.48 mm의 난모세포보다 감소하는 것을 확인하였다. 이와 반대로 androgen의 대사율은 estrogen의 대사율과는 반대로 난경 0.45, 0.48 mm의 난모세포보다 난경 0.50 mm의 난모세포에서 증가 현상을 보였다. 일반적으로 알려진 경골어류의 스테로이드 호르몬 대사과정에 있어서 testosterone (T)은 aromatase에 의해 E₂로 전환되는 전구물질로(Kagawa et al., 1982) 난소내에서 GtH (gonadotropic hormone)의 반응을 높여주는 것으로 보고되어 있다(Fostier et al., 1983). 또한 T는 aromatase에 의해 E₂로의 대사가 충분히 이루어진 후에는 혈중으로 분비 된다고 알려져 있으나(Campbell et al., 1976), 참돔, *Pagrus major*의 난소 스테로이드 대사과정에서는 T가 아닌 E₁이 E₂ 대사의 주요 전구물질로 작용한다고 보고되어 있다(Ohta et al., 2002). 물론 T도 E₂의 전구물질로 작용은 한다고 하였다. 황놀래기, *Pseudolabrus sieboldi*와 쥐노래미, *Hexagrammos otakii*의 E₂ 합성 경로에서도 E₁으로부터 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD)에 의해 E₂가 대사되는 것으로 알려져 있다(Ohta et al., 2001; Hwang et al., 2007). 본 연구결과에서도 $[^3\text{H}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone로부터 4 종류의 대사물질, 즉, A₄, T, E₁, 그리고 E₂이 확인 및 동정되었으며, T \rightarrow E₂와

E₁ \rightarrow E₂의 대사 경로 모두 존재하는 것으로 관찰되었다. 어떤 전구물질이 E₂의 생성에 주요 역할을 하는지는 향후 연구에서 효소 활성 측, 17 β -HSD와 aromatase의 활성을 조사하여 정확한 대사 경로를 밝히는 동시에 난황형성기의 E₁ 역할에 대한 연구도 요구된다.

평균난경 0.50 mm에서 androgen인 A₄와 T의 대사율이 0.45와 0.48 mm 보다 높고, 반면 estrogen인 E₂와 E₁의 대사율은 감소하는 것으로 나타나 0.50 mm 크기의 난모세포가 난황형성 종료후 성숙단계로 넘어가는 과정에서 여러 생리적 기능을 하는 것으로 생각되어진다. Androgen은 시상하부에서 스테로이드 호르몬의 분비 조절과 estrogen 전구물질로 알려져 있다(Montero et al., 1995). 그리고 척추동물에서 androgen은 생식학적으로 여러기능을 할뿐만 아니라, 생식외적인 부분인 뉴런의 성장, 근육과 뼈의 발달, 표피세포의 발달에 중요한 역할을 한다(Staub and Beer, 1997). 어류 난황형성기의 주요 성 스테로이드인 estrogen뿐만 아니라 이들의 전구물질인 androgen의 역할에 대해서 그리고 또 다른 스테로이드의 존재 가능성에 대해서도 계속적인 연구가 필요하다.

사 사

이 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호 : 109197-3, 홍바리 *Epinephelus fasciatus* 양식산업 최적화 기술 개발)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Annalie VM, Roberts CM and Hawkins JP. 2000. The treated status of groupers (Epinephelinae). Biodivers Conserve 9, 919-942.
- Campbell CM, Walsh JM and Idler DR. 1976. Steroids in the plasma of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* Walbaum: a seasonal study and investigation of steroid involvement in oocyte maturation. Gen Comp Endocrinol 29, 14-20.
- Fostier AB, Jalabert R, Billard R, Breton B and Zohar Y. 1983. The gonadal steroids. Fish Physiol 9A, 272-372.
- Goos HJT, Facchinetti F, Henderson IW, Pierantoni R and Polzonetti-Magni AM. 1993. Pubertal development: big questions, small answers. Cell Comm Reprod, 11-20.
- Hwang IJ, Kim SY and Baek HJ. 2007. Activity of sex steroid hormones on ovarian development in the greenling *Hexagrammos otakii*. J Kor Fish Soc 40, 153-159.
- Hwang IJ, Kim SK, Choi SJ, Lee CH, Lee YD, Kim HB and Baek HJ. 2012. Effects of steroid hormones on In vitro GVBD and oocyte steroidogenesis in blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. Dev Reprod 16, 39-45.
- Kagawa H, Young C, Adachi, S and Nagahama Y. 1982. Estradiol-17 β production in amago salmon (*Oncorhynchus*

- rhodurus*) ovarian follicles: Role of the thecal layer and granulose cells. *Gen Comp Endocrinol* 47, 440-448.
- Kawabe K and Kohno H. 2009. Morphological development of larval and juvenile blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. *Fish Sci* 75, 1239-1251.
- Kang HC, Lee CH, Song YB, Baek HJ, Kim HB and Lee YD. 2012. KISS1, KISS2, GPR54 mRNA Expression of the Blacktip Grouper *Epinephelus fasciatus*. *Dev Reprod* 16, 121-128.
- Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP and Dufour S. 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin releasing hormone (mGnRH and cGnRH- II) by sex steroids in the European female silver eel, *Anguilla anguilla*. *Neuroendocrinology* 61, 525-535.
- Nagahama Y. 1994. 17-alpha, 20-beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62, 190-196.
- Ohta K, Mine T, Yamaguchi A and Matsuyama M. 2001. Steroidogenic pathway to estradiol-17 β synthesis in the ovarian follicles of the protogynous wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Zool Sci* 18, 937-945.
- Ohta K, Yamaguchi S, Yamaguchi A, Okuzawa K, Kagawa H and Matsuyama M. 2002. Biosynthesis of estradiol-17 β in the ovarian follicles of the red seabream *Pagrus major* during vitellogenesis. *Fish Sci* 68, 680-687.
- Park YJ, Kang HC, Lee CH, Song YB, Baek HJ, Kim HB, Soyano K and Lee YD. 2012. Isolation and identification of FSH β and LH β subunits in the blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*. *Kor J Fish Aquat Sci* 45, 17-24.
- Patino R, Thomas P and Yoshizaki G. 2003. Ovarian follicle maturation and ovulation: an integrated perspective. *Fish Physiol Biochem* 28, 305-308.
- Song YB, Baek HJ, Kim HB, Lee KJ, Soyano K and Lee YD. 2005. Induced sex reversal of sevenband grouper, *Epinephelus septempasciatus* by 17 α -methyltestosterone. *J Aquacult* 18, 167-172.
- Staub NL and De Beer. 1997. The role of androgens in female vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 108, 1-24.
- Tyler CR, Sumpter JP and Bromage NR. 1988. Selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Exp Zool* 248, 199-206.
- Yoshizaki G, Shusa M, Takeuchi T and Patino R. 2001. The induction of oocyte maturational competence by gonadotropin in Nibe, *Nibebea mitsukurii* (Teleostei, Sciaenidae) requires activation of the protein kinase A pathway, and RNA and protein synthesis. *Fish Physiol Biochem* 25, 201-208.