Korean J. Zool. 35:37-44, 1992

개구리 난자의 성숙촉진요인에 관한 연구

이원교 · *고선근 · 권혁방

전남대학교 자연과학대학 생물학과, *호남대학교 생물학과

북방산개구리, 참개구리 및 옴개구리를 사용하여 성숙된 난자의 세포질에서 활성을 띠는 성숙촉진요인(maturation promoting factor, MPF)을 미세주입법으로 확인하고 이들의 성질을 조사하였다. 핵붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)된 난자의 세포질을 미성숙 난자(GV 난자)에 주입하고(75-100 nl) 이들을 15-24시간 배양했을 때 대부분의 GV 난자들이 핵붕괴를 일으켰으나(약 80%) 미성숙 난자(GV 난자)의 세포질을 주입했을 때에는 약 20%의 난자들만이 핵붕괴를 일으켰다. 핵붕괴된 난자들의 crude extract를 주입했을 때에도 역시 성숙유도 효과가 있었으며 이종간에도 효과가 있었다. 난자의 성숙을 잘 일으키지 않는 옴개구리의 난자를 사용하여 MPF를 가진 세포질을 계대주입(serial transfer)하였을 때에도 MPF가 계속 활성을 띠는 것을 확인할 수 있었다. 아울러 개구리 난자의 MPF 생성과 증폭과정에 cAMP의 증가나 단백질 합성의 저해가 미치는 영향을 조사한 결과, MPF의 작용이 유의하게 이들에 의해 억제되는 것을 알 수 있었다.

KEY WORDS: Maturation promoting factor, cAMP, Cycloheximide

양서류의 난자가 progesterone의 자극으로 성숙이 재개될 때 난자의 세포질에 성숙촉진요인(maturation promoting factor, MPF)이라는 단백질이 출현하게 되는데 이것이 난자의 핵붕괴(germinal vesicle breakkdown, GVBD)와 염색체의 응축(chromosome condensation)을 유도하는 직접적인 요인이라고 알려져 있다(reviewed by Masui and Clarke, 1979; Maller, 1985). 난자의 성숙에 결정적인 역할을 하는 이 MPF는 범개구리(*Rana pipiens*)의 성숙된 난자(GVBD)의 세포질을 미성숙 난자(GV 난자)에 주입했을 때 미성숙 난자의 성숙이 일어나는 현상으로부터 발견되었다(Masui and Markert, 1971). 근래에 MPF의 성질을 가진 물질이 난자에서 뿐 아니라 양서류와 포유동물의 배아 및 체세포에서는 물론(Kishimoto and Kanatani, 1976; Balakier, 1978; Wasserman and Smith, 1978; Sunkara *et al.*, 1979; Nelkin *et al.*, 1980; Kishimoto *et al.*, 1982; Sorensen *et al.*, 1985) 효모에서도 확인되었다(Tachibana *et al.*, 1987). 따라서 MPF는 일반적으로 세포주기를 조절하는 물질일 것으로 추정된다(Hunt, 1989). MPF의 기본성질에 관한 연구는 주로 제노푸스(*Xenopus*)의 난자를 재료로 하여 이루어 졌으며 성숙된 난자의 세포질을 미성숙 난자에 계대주입(serial transfer)을 하였을 때에도 그 활성을 잃지 않는 것으로 보아 MPF는 자가증폭능력을 가진 것으로 알려져 있다. 또한 MPF의 작용은 cAMP의 영향을 받지 않으며 단백질합성이 필요하지 않는 것으로 알려져 있다(Drury and Schorderet-Slatkine, 1975; Wasserman and Masui, 1975). 그러나 범개구리에서는 MPF의 작용에 단백질의 합성이 필요한 것으로 보고되었다(Schuetz and Samson, 1979). 이제까지 개구리(*Rana*)의 MPF에 관해서는 별로 알려진 바가 없으므로 본 연구는 한국산 개구리를 사용하여 이들 난자의 MPF를 확인하고 이에 대한 기본 조사를 함으로써 이들을 MPF의 연구를 위한 재료로

본연구는 1989년도 과학재단 목적기초 연구비의 지원에 의해 수행된 연구의 일부임.

활용할 수 있는 지의 여부를 알고자 수행하였다. 아울러 개구리(*Rana*) MPF의 작용에 cAMP와 cycloheximide가 어떤 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서 사용한 북방산개구리(*Rana dybowskii*)는 11월 중에 전라남도 일원에서 물속에서 동면 중인 것을 채집하여 10% Amphibian Ringer(AR)가 들어있는 수조에 10-20마리씩 넣어 어두운 저온실(4°C)에서 보관하였으며 일주일에 2회 정도 10% AR을 교환해 주었다. 참개구리(*Rana nigromaculata*)는 1-4월 중에 땅속에서 동면 중인 것을 채집하여 사용했으며 옴개구리(*Rana rugosa*)는 4-5월 중에 채집하여 일주일 이내에 실험에 사용하였다.

호르몬 및 시약

Progesterone은 ethanol과 propylene glycol 혼합액(1 : 1)에 녹여 2 mg/ml stock solution으로 제조하였다. Cycloheximide(Sigma)와 cAMP (Sigma)는 AR에 녹여 각각 2 mg/ml, 10 mM의 stock solution으로 제조하였다. MPF의 추출에 사용한 추출 완충액(extraction buffer)의 조성은 sodium β-glycerophosphate(Sigma) 80 mM, NaF(Fisher) 50 mM, ethylene glycol-bis-N, N, N,'N'-tetraacetic acid(EGTA, Sigma) 20 mM, $MgCl_2$(Merck) 15 mM, Hepes(Sigma) 20 mM, dithiothreitol(DTT, Sigma) 1 mM, Leupeptin (Sigma) 3 μg/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF, Sigma) 0.3 mM, 및 ATP (Sigma) 1 mM이었다(Lohka *et al.*, 1988).

여포난자의 배양 및 *in vivo* 배란유도

개구리를 두부절개로 죽인 후 복강에서 난소를 떼어내어 AR에서 서너번 씻은 다음 실험에 즉시 사용하였다. 해부현미경(Kyowa) 하에서 난소로부터 상피층과 theca층을 미세핀셋으로 제거함과 동시에 여포난자를 분리해 냈다. 난자들을 신선한 AR로 서너번 씻은 후 세포질을 미세주입할 때 수여자(recipient; GV oocyte)로 사용하거나 progesterone을 처리한 후 24시간 배양하여 세포질 공여자(donor; GVBD 난자)로 사용하였다. 분리한 여포난자들을 실험군 수에 따라 무작위로 나눈 다음 각 well당 2 ml의 AR이 들어있는 다공 배양접시(24 wells/dish, Nunc)에 각각 20개씩 넣은 후 22°C의 진탕기(80 회전/min., 국제싸이엔)에서 일정한 시간동안 배양하였다. 배양 후 난자들을 5% trichloroacetic acid(TCA, Janssen)에 30분 처리하여 고정한 다음 해부현미경 하에서 핵의 유무를 조사하였으며 핵붕괴가 일어난 것을 성숙이 일어난 것으로 간주하였다. 다량의 성숙된 난자들이 필요할 때에는 개구리 뇌하수체추출물(frog pituitary homogenate, FPH)을 개구리에 복강주사하여(5 pituitaries/ml) *in vivo*로 배란을 유도한 다음 자궁에서 이들을 채취하였다. 모든 실험 조작은 상온(22-24°C)에서 수행하였으며 FPH의 제조는 전보에 보고한 방법에 따랐다(Kwon *et al.*, 1988).

세포질의 미세주입

MPF의 확인은 성숙된 난자의 세포질 혹은 crude extract를 미성숙 난자에 주입하여 이들이 핵붕괴를 일으키는 현상을 가지고 판정하였다. 성숙된 난자는 progesterone을 *in vitro*에서 처리하여 얻거나 *in vivo*에서 FPH를 주사하여 배란을 유도하여 얻었다. MPF의 crude extract를 얻는 과정은 Lohka 등(1988)의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 배란된 난자의 젤리층을 2% L-cysteine으로 제거하고 10% AR로 10회 세척한 다음, 추출 완충액으로 3-4회 다시 씻은 후 2시간 동안 초원심분리(Sorval)로 원심분리하였다 (180,000 × g). 원심분리 후 얻어지는 세포질의 투명한 층을 취하여 1 ml씩 분주하여 −40°C에서 보관하면서 필요할 때에 사용하였다. 미세주입은 공여자와 수여자 난자들을 2% agar판(plate)에 움직이지 않도록 고정한 후 미세조작장치(micro-manipulator, Leitz)를 사용하여 수행하였다. 미성숙 난자에 주입한 세포질 혹은 추출물의 양은 75-100 nl 정도이었으며, 미세주입 후 Ca^{2+}이 없는 AR에서 30분 정도의 손상 회복 시

간을 주었다. 실험 결과의 유의성 검정은 정규분포를 이루는 두 모비율의 비교방법(Snedecor and Cochram, 1967)과 Student's t-test를 사용하여 행하였다.

결 과

북방산개구리(*Rana dybowskii*) 난자의 MPF 확인 및 MPF 작용에 대한 cAMP와 cycloheximide의 영향

북방산개구리(*R. dybowskii*) 난자에서 MPF의 존재를 확인하기 위하여 progesterone에 의해 성숙된 난자(GVBD 난자) 또는 배란된 난자의 세포질을 75-100 nl씩 미성숙 난자의 세포질에 주입한 후 24시간 배양 후에 이들의 핵붕괴 여부를 조사하여 보았다(Table 1). Table 1에서 보여주듯이 세포질을 주입 받은 미성숙 난자들은 대부분 배양기간 동안에 핵붕괴를 일으키었다(약 80% 이상). 또한 4배로 희석된 배란된 난자의 crude extract를 주입 받은 미성숙 난자들에서도 핵붕괴가 일어났다(약 70% 이상). 그러나 동량의 미성숙 난자의 세포질 혹은 extract를 주입하였을 때에는 거의 성숙이 일어나지 않았다(약 20%). 따라서 GVBD 난자의 세포질 또는 extract에 존재하는 MPF의 작용에 의해 미성숙 난자의 핵붕괴가 유도되었다는 것을 알 수 있었다. MPF의 작용이 과연 cAMP나 단백질합성의 영향을 받는지를 조사하기 위하여 성숙된 난자의 세포질을 미성숙 난자에 주입하고 cAMP(2.5 mM) 혹은 cycloheximide(1 μg/ml)를 포함한 배양액으로 옮겨 일정시간 배양 후 핵붕괴 여부를 조사하였다. 이들 시약이 들어있는 배양액으로 옮긴 난자들은 핵붕괴가 보통배양액으로 옮긴 대조군(약 80%)보다 유

Table 1. Identification of maturation promoting factor (MPF) and effects of cAMP and cycloheximide on the action of MPF in *Rana dybowskii* oocyte *in vitro*.

Donor	Recipient	Culture condition	No. of oocytes GVBD/ No. of oocytes tested	GVBD (%)	No. of animals
Cytoplasm transfer					
GV oocyte	GV oocyte	plain medium	68/309	22.0	14
GVBD oocyte	GV oocyte	plain medium	188/219	85.8	11
		cAMP, 2.5 mM	20/113*	17.7	8
		cycloheximide, 1 μg/ml	20/113*	17.7	7
Ovulated oocyte	GV oocyte	plain medium	126/151	83.4	6
		cAMP, 2.5 mM	15/56*	26.8	3
		cycloheximide, 1 μg/ml	16/50*	32.0	3
Crude extract					
Extraction buffer	GV oocyte	plain medium	5/38	13.2	1
GV oocyte	GV oocyte	Plain medium	11/61	18.0	4
Ovulated oocyte	GV oocyte	Plain medium	187/261	71.6	5
		cAMP, 2.5 mM	15/75*	20.0	3
		cycloheximide, 1 μg/ml	24/70*	34.3	3

Donor oocyte with GV were obtained from the same animal used for recipient oocytes. The progesterone-induced mature oocytes were used for donor of GVBD oocytes. Ovulated oocytes were obtained from a female which was injected with five pituitaries 24 hours before the experiment. The procedure for crude extract preparation were described in Materials and Methods. Cytoplasm of the donor oocytes and crude extract (about 75-100 nl) were microinjected into the recipient GV oocytes using a micromanipulator. After injection, the recipient oocytes were cultured for 24 hours and examined for their maturation (GVBD).

*$P < 0.01$, when compared with the corresponding control.

Table 2. Identification of maturation promoting factor (MPF) and effects of cAMP and cycloheximide on the action of MPF in *Rana nigromaculata* oocytes *in vitro*.

Donor	Recipient	Culture condition	No. of oocytes GVBD/ No. of oocytes tested	GVBD (%)	No. of animals
GV oocyte	GV oocyte	plain medium	10/163	6.1	8
GVBD oocyte	GV oocyte	plain medium	81/107	75.7	8
		cAMP, 2.5 mM	32/110*	29.1	6
		cycloheximide, 1 μg/ml	31/111*	27.9	6

Donor oocytes with GV were obtained from the same animal used for recipient GV oocytes. The progesterone-induced matured oocytes were used for donor GVBD oocytes. Cytoplasm of the donor oocytes (about 75-100 nl) were microinjected into the recipient oocytes with GV using a micromanipulator. After injection, the recipient oocytes were cultured for 24 hours and scored percentage of GVBD.
*$P < 0.01$, when compared with the corresponding control.

Table 3. Induction of GVBD in *Rana nigromaculata* oocytes with the cytoplasm of matured *Rana dybowskii* oocytes *in vitro*.

Donor	Recipient	No. of oocytes GVBC/ No. of oocytes tested	GVBD (%)	No. of animals
GV cytoplasm transfer				
Rana dybowskii	*R. dybowskii*	8/44	16.7	3
R. dybowskii	*R. nigromaculata*	4/55	7.3	3
R. nigromaculata	*R. nigromaculata*	11/79	13.9	4
GVBD cytoplasm transfer				
Rana dybowskii	*R. dybowskii*	73/76	96.1*	3
R. dybowskii	*R. nigromaculata*	48/61	78.7*	3
R. nigromaculata	*R. nigromaculata*	37/%7	64.7*	3

The progesterone induced matured oocytes were used for GVBD donor oocytes. Cytoplasm of the donor oocytes (about 75-100 nl) were micoinjected into the recipient oocytes with GV using a micromanipulator. After injection, the recipient oocytes were cultured for 24 hours and scored percentage of GVBD.
*$P < 0.01$, when compared with the corresponding control.

의하게 낮아지는 것(약 35% 이하)을 알 수 있다 ($P < 0.01$). Crude extract를 주입받은 난자들의 경우에도 보통 배양액에서 배양한 난자들은 72%가 핵붕괴를 일으키었으나 cAMP나 cycloheximide로 옮긴 난자들은 각각 20과 34%로 핵붕괴율이 유의하게 떨어졌다($P < 0.01$).

참개구리(*Rana nigromaculata*) 난자의 MPF 확인 및 MPF의 작용에 대한 cAMP와 cycloheximide의 영향

참개구리(*R. nigromaculata*) 난자를 사용하여 같은 방법으로 MPF의 활성을 조사하여 보았다 (Table 2). 성숙된 난자의 세포질을 주입받은 참개구리의 미성숙 난자들은 역시 대부분 배양기간 동안에 핵붕괴를 일으켰으며(약 70% 이상) 미성숙 난자의 세포질은 효과가 없었다(약 6%, $P < 0.01$). 참개구리의 경우에도 성숙된 난자의 세포질을 주입받은 미성숙 난자들은 cAMP와 cycloheximide를 포함하고 있는 배양액으로 옮기면 핵붕괴율이 유의하게 줄어들었다($P < 0.01$).

북방산개구리 난자 MPF의 참개구리 난자 성숙 유도 효과

북방산개구리 및 참개구리에서 확인된 MPF가 이종간에도 그 효과를 나타낼 수 있는가를 조사하였다(Table 3). 북방산개구리의 성숙된 난자의

세포질을 참개구리 미성숙 난자에 주입했을 때 대부분 미성숙 난자의 핵붕괴가 일어났다(약 80% 정도). 이에 대해 미성숙 난자의 세포질을 주입하였을 때는 거의 성숙이 일어나지 않았다(약 7%). 또한 동종 간에 미성숙 난자의 세포질을 주입하면 거의 성숙이 일어나지 않았으나(약 17% 이하) 성숙된 난자의 세포질을 이식하면 대부분 성숙이 유도되었다(약 65% 이상). 따라서 동종간이나 이종간에 MPF의 작용에는 거의 차이가 없다는 것을 알 수 있었다.

옴개구리(*Rana rugosa*) 난자에서 MPF의 확인 및 MPF 자가증폭에 대한 cAMP와 cycloheximide의 영향

옴개구리에서 MPF 활성을 확인하고 계대주입(serial transfer)으로 이 요인의 자가증폭현상을 조사하였다(Table 4). 배란된 난자의 세포질을 미성숙 난자에 주입한 후 15시간 배양한 다음 일부의 난자는 핵붕괴 여부를 조사하고 나머지는 새로운 미성숙 난자에 계대주입한 공여자로 사용하였다. 배란된 난자의 세포질을 1차적으로 주입하였을 때는 대부분 미성숙 난자의 핵붕괴가 일어났으며(약 80% 정도) 이들의 일부를 공여자로 사용하여 새로운 미성숙 난자에 2차적으로 주입하였을 때도 핵붕괴가 일어났다(약 70% 정도). 그러나 미성숙 난자의 세포질을 동일한 방법으로 계대주입하였을 때는 1차와 2차 어느 경우에도 거의 성숙이 일어나지 않았다(약 20% 이하). 또한 배란된 난자의 세포질을 계대주입할 때 2차 주입 후 난자들을 cAMP 혹은 cycloheximide를 포함한 배양액으로 옮겨 배양하면 보통배양액으로 옮긴 대조군(약 70% 정도)보다 유의하게 핵붕괴율이 낮아지는 것(약 30% 이하)을 알 수 있었다($P < 0.01$). 따라서 옴개구리의 배란된 난자에도 MPF가 존재하고 이들을 계대주입하였을 때 자가증폭 능력이 생겨서 제 2 수여자의 핵붕괴를 유도한다는 것을 알 수 있었다. 아울러 이 자가증폭 과정도 단백질합성이 필요하며 cAMP의 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

본 실험의 결과는 한국산 3종의 개구리에서 모두 MPF를 미세주입법으로 확인할 수 있다는 것

Table 4. Identification of maturation promoting factor (MPF) and effect of cAMP and cycloheximide on the action of autoamplified MPF in *Rana rugosa* oocytes *in vitro*.

Donor	Recipient	Culture condition	GVBD (%)	No. of animals
First transfer				
GV oocyte	GV oocyte	plain medium	24.5 ± 5.6	
Ovulated oocyte	GV oocyte	plain medium	78.2 ± 9.6*	5
Second transfer				
GV oocyte (1st recipient)	GV oocyte	plain medium	21.9 ± 8.5	3
GVBD oocyte (1st recipient)	GV oocyte	plain medium	66.6 ± 9.6	3
		cAMP (2.5 mM)	21.1 ± 6.2*	3
		cycloheximide (1 μg/ml)	26.9 ± 14.6*	3

Defolliculated oocytes of Rana *rugosa* were microinjected with the cytoplasm of GV or GVBD oocytes of the same species. Cytoplasm of the donor oocytes (about 75-100 nl) were microinjected into the recipient oocytes with GV using a micromanipulator. After culture of the recipient oocyte for 15 hours, the cytoplasm of those oocytes were microinjected into the second recipient GV ooocytes. The second recipient oocytes were cultured for 15 hours in plain AR or AR containing cAMP (2.5 mM) or cycloheximide (1 μg/ml). Their GVBD were then examined after culture. The percentage GVBD was calculated using at least 10 oocytes per animal.
*$P < 0.01$, when compared with the corresponding control.

과 성숙 난자의 crude extract에서도 MPF 작용이 있으므로 앞으로 MPF를 부분 분리하여 이들의 성질을 보다 자세하게 규명할 수 있다는 것을 보여준다. 더우기 호르몬 처리로도 생체외 배양에서 성숙을 일으키지 않는 옴개구리의 난자가 MPF에 반응하여 핵붕괴를 일으키고 계대주입에서 보여준 바와 같이 MPF의 자가증폭 능력이 있다는 것은 이 개구리의 난자가 MPF의 확인에 매우 유용하게 이용될 수 있다는 것을 의미한다. 왜냐하면 *Xenopus*의 난자는 미세한 자극에 의해서도 성숙이 일어남으로 MPF의 판정에 많은 주의를 요하기 때문이다.

*Xenopus*에서 성숙된 난자의 세포질을 미성숙 난자에 미세주입한 후 cycloheximide가 포함된 배양액에서 배양하면 핵붕괴가 일어난다는 사실로부터 MPF의 활성에는 단백질 합성이 필요없다고 보고된 바 있으며 이러한 현상이 불가사리에서도 보고되고 있다(Wasserman and Masui, 1975; Drury and Schorderet-Slatkine, 1975; Doree, 1982). 이에 대해 같은 양서류인 범개구리에서와 같이 북방산개구리 및 참개구리의 MPF가 활성화 되어 그 작용을 나타내기 위해서는 단백질합성이 필요하며 또한 옴개구리에서는 MPF가 자가증폭하는 과정에서도 단백질합성이 필요하다는 것을 보여주고 있다(Tables 1, 2와 3). 이러한 결과들로 보아 특이하게 *Rana* 속의 개구리에서는 MPF의 작용에 단백질합성이 필요한 것으로 보여진다. *Xenopus*에서 MPF는 세포주기 간기에는 불활성의 pre-MPF 상태로 있다고 보고된 바 있는데(Dunphy and Newport, 1988), *Rana* 속에서는 이러한 사실이 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 MPF 작용에서 단백질 요구성의 차이가 불활성의 전구체 유무에 따라 나타나는 것으로 추정될 수 있으나 이를 뒷받침 할만한 증거는 아직 없다. Fulka 등(1988)은 포유동물의 난자에서 단백질합성의 저해가 MPF의 자가증폭현상을 억제한다고 보고한 바 있어 이같은 현상이 *Rana* 속에서도 나타나는 것이 아닌가 생각된다.

MPF의 자가증폭은 외부에서 첨가된 cAMP에 의해 아무 영향을 받지 않는 것으로 *Xenopus*에서 뿐아니라 포유동물에서도 알려져 있다(Clarke and Masui, 1985; Kim *et al.*, 1987; Fulka *et al.*, 1988). 본 실험결과를 보면 북방산개구리의 성숙된 난자 또는 배란된 난자의 세포질과 참개구리의 성숙된 난자의 세포질은 미성숙 난자의 성숙을 일으키며 옴개구리의 배란된 난자의 세포질을 계대주입하여도 미성숙 난자의 성숙을 일으키나 cAMP의 농도를 높이면 3종 모두에서 세포질 주입에 의한 성숙을 억제하는 것으로 나타났다(Tables 1, 2와 3). 이러한 결과는 *Xenopus*와 *Rana* 속 개구리의 난자들은 progesterone이라는 동일 호르몬에 의해 성숙이 유도되나 이 과정에서 생성되는 MPF의 생물학적 활성 또는 세포질 환경이 서로 다른 것을 보여주고 있다. 또 다른 가능성으로 개구리(*Rana*) 난자의 MPF는 상대적으로 그 농도가 낮아 cAMP나 cycloheximide에 *Xenopus*의 난자 보다 훨씬 민감하게 반응하였다고 생각할 수 있다. 이러한 세포질 요인들의 상대적인 농도가 난자의 성숙재개 조절에 매우 중요하다는 것이 포유동물을 재료로 이미 밝혀진 바 있다(Fulka *et al.*, 1988; Lee and Kwon, 1988). 따라서 MPF의 작용과 cAMP, 단백질합성과의 관계를 보다 분명히 하기 위해서는 개구리(*Rana*)의 MPF를 가능한 한 농축시키어 이 시료를 미세주입재료로 사용하여 조사하여야 할 것이다. 현재 본 연구실에서는 MPF를 부분 분리하고 이들의 성질을 재확인하는 실험을 진행 중이다.

근래에 MPF에 관한 분자생물학적 연구는 급격한 발전을 하고 있다. *Xenopus*의 MPF가 거의 순수하게 분리되었으며(Lohka *et al.*, 1988), protein kinase의 활성을 가지고 있다는 것도 밝혀졌다(Gautier *et al.*, 1988; Labbe *et al.*, 1988). 그 외에도 MPF와 cyclin의 관계도 정립되어(Murray *et al.*, 1989) 이 두물질의 상호작용이 궁극적으로 세포주기를 조절한다고 믿어지고 있다(Hunt, 1989). 이렇게 MPF는 세포주기조절, 난자의 성숙과 배아의 난할 기작 등에 깊숙히 관여하고 있다(Smith, 1989). 따라서 본 연구의 결과를 토대로 한국산 개구리를 사용하여 MPF 활성을 판정하고 이들을 부분 분리하여 기초적인 화학적 성질의 조사가 진행된다면 앞으로 보다 정밀한 분자생물학적 연구도 가능하리라 생각된다.

인용문헌

Balakier, H., 1978. Induction of maturation in small oocytes from sexually immature mice by fusion with meiotic or mitotic cells. *Exp. Cell Res.* **112:** 137-141.

Clarke, H. J., and Y. Masui, 1985. Inhibition by dibutyryl cyclic AMP of the transition to metaphase of mouse oocyte nuclei and its reversal by cell fusion to metaphase oocytes. *Devel. Biol.* **108:** 32-37.

Doree, M., 1982. Protein synthesis is not involved in initiation or amplification of maturation-promoting factor (MPF) in starfish oocyte. *Exp. Cell Res.* **139:** 127-133.

Drury, K. and S. Schorderet-Slatkine, 1975. Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*. *Cell* **11:** 269-274.

Dunphy, W. G. and J. W. Newport, 1988. Mitosis-inducing factors are present in a latent form during interphase in the *Xenopus* embryo. *J. Cell Biol.* **106:** 2047-2056.

Fulka, J. Jr., J. E. Flechon, J. Motlik, and J. Fulka, 1988. Does autocatalytic amplification of maturation promoting factor (MPF) exist in mammalian oocytes? *Gamete Res.* **21:** 185-192.

Gautier, J., C. Norbury, M. J. Lohka, P. Nurse, and J. L. Maller, 1988. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc^{2+}. *Cell* **54:** 433-439.

Hunt, T. 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr. Opinion Cell Biol.* **1:** 268-274.

Kim, H. K., H. S. Kong, K. K. Lee, and W. K. Cho, 1987. Maturation induction of mouse GV oocytes by fusion with GVBD oocytes in the presence of dbcAMP. *Korean J. Zool.* **30:** 89-97.

Kishimoto, T. and H. Kanatani, 1976. The cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocyte. *Nature* **260:** 321-322.

Kishimoto, T., R. Kuriyma, H. Koide, and H. Kanatani, 1982. Generality of the action of various maturation-promoting factors. *Exp. Cell Res.* **137:** 121-126.

Kwon, H. B., C. H. Cho, and C. G. Choi, 1988. Studies on the induction of oocyte maturation of Korean frogs (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) *in vitro*. *Korean J. Zool.* **31:** 87-94.

Labbe, J. C., M. G. Lee, P. Nurse, A. Picard, and M. Doree, 1988. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by starfish homologue of the cell cycle control gene cdc^{2+}. *Nature* **335:** 251-254.

Lee, W. K. and H. B. Kwon, 1988. Maturation inhibiting activity in growing mouse and pig oocytes. *Korean J. Zool.* **31:** 265-272.

Lohka, M. J., M. K. Hayes, and J. L. Maller, 1988. Purification of maturation promoting factor, an intracellular regulator of early meiotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85:** 3009-3013.

Maller, J.L., 1985. Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Differ.* **16:** 211-221.

Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **37:** 185-282.

Masui, Y. and C. L. Markert, 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177:** 129-146.

Murray, A. W., M. K. Solomon, and M. W. Kirschner, 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339:** 280-286.

Nelkin, B., C. Nicholas, and B. Volgelstein, 1980. Protein factor(s) from meiotic CHO cells induces meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* **109:** 233-238.

Schuetz, A. W. and D. Samson, 1979. Protein synthesis requirement for maturation promoting factor (MPF) initiation of meiotic maturation in *Rana* oocytes. *Devel. Biol.* **68:** 636-642.

Smith, L. D., 1989. The induction of oocyte maturation: Transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development* **107:** 658-699.

Snedecor, G. W. and W. G. Cychran, 1967. Statistical Methods. The Iowa State University, Iowa, pp. 220-221.

Sorensen, R. A., M. S. Cyert, and R. A. Pedersen, 1985. Active maturation promoting factor is present in mature mouse oocytes. *J. Cell Biol.* **100:** 1637-1640.

Sunkara, P. S., D. A. Wright, and P. N. Rao, 1979. Mitotic factors from mammalian cells induced germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76:** 2799-2802.

Tachibana, K., N. Yanagishima, and T. Kishimoto, 1987. Preliminary characterization of maturation promoting factor from yeast *Saccharomyces cerevisae*. *J. Cell Sci.* **88:** 273-282.

Wasserman, W. J. and Y. Masui, 1975. Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.* **91:** 381-388.

Wasserman, W. J. and L. D. Smith, 1978. The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J. Cell Biol.* 78: 15-22.

(Accepted November 30, 1991)

Studies on the Maturation Promoting Factor of Korean Frog Oocyte Cultured *in vitro*

Won Kyo Lee, Sun Kun Ko*, and Hyuk Bang Kwon (Department of Biology, Chonnam National University 500-757, Korea; *Department of Biology, Honam College, Kwangju 502-791, Korea)

Maturation promoting factor (MPF) in the oocyte of *R. dybowskii*, *R. nigromaculata* and *R. rugosa* was identified and characterized by microinjection method. Most of immature GV oocytes (80%) underwent GVBD 15-24 h after culture when microinjected with cytoplasmic fraction (75-100 nl) derived from mature oocytes with GVBD, whereas only 20% of them showed GVBD when microingected with cytoplasmic fractions from GV oocytes. Microinjection of cytoplasmic extract of GVBD oocytes was also effective in inducing maturation. The cytoplasm of GVBD oocytes of *R. dybowskii* was effective in maturation induction of immature *R. nigromaculata* oocytes. Serial transfer of GVBD oocytes cytoplasm into first and second recipient GV oocytes induced GVBD of the second recipient oocytes in *R. rugosa*. When the GV oocytes injected with the cytoplasm of GVBD oocytes were cultured in the presence of cAMP (2.5 mM) or cycloheximide (1 μg/ml), the maturation rate of the recipient oocytes was significantly lower than that of control oocytes which were cultured in plain medium. Thus, MPF activity in *Rana* seems to be suppressed by the presence of cAMP or cycloheximide, during *in vitro* culture.