

Okadaic acid에 의한 한국산 개구리 난자의 성숙유도

김안나 · 최한호 · 나철호 · 김지열* · 강성구** · 권혁방

전남대학교 자연대 생물학과, *의과대학 핵의학실, **인제대학교 생물학과

Phosphatase의 저해제로 알려진 okadaic acid(OA)가 한국산 개구리(북방산개구리, 참개구리) 난자의 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. 북방산개구리 난자에 약 50 nl의 okadaic acid(0.5-500 μ M)를 미세주입한 후 18시간 배양한 결과 0.5 μ M의 농도에서부터 난자의 핵붕괴를 일으키기 시작하였다. 동면초기에 처리한 progesterone에 반응하지 않는 난자들도 OA에 의하여 성숙을 일으켰으며, 이 성숙은 배양액에 첨가한 cycloheximide(10 μ g/ml)에 영향을 받지 않았다. 또한 OA의 처리를 받고 일정시간 배양한 난자의 세포질에는 미성숙 난자의 성숙을 유도하는 maturation promoting factor(MPF)의 활성이 생겼다. 참개구리의 난자도 역시 OA에 의해 성숙이 유도되었으며, 주입 후 6시간에서부터 핵붕괴가 일어나기 시작하였다. 참개구리에서도 OA의 처리가 MPF의 활성을 촉진하는 것을 세포질내에 H₁ histone kinase의 활성도가 증가하는 것으로 확인할 수 있었다. 참개구리에서도 OA에 의한 성숙은 cycloheximide나 cAMP에 의해 영향을 받지 않았다. 이러한 결과들은 개구리 난자의 MPF 활성화와 성숙과정에 phosphatase가 관여함을 보여주는 것이다.

KEY WORDS: Okadaic acid, Oocyte maturation, Rana, MPF

양서류의 여포 난자는 제1감수분열 전기에 분열이 정지되어 있다가 번식기에 이르러 뇌하수체 호르몬의 자극으로 여포세포가 분비한 progesterone에 의해 분열이 재개된다(Schuetz, 1967; Smith and Ecker, 1971). Progesterone의 자극을 받은 난자의 세포질에는 성숙촉진요인(maturation promoting factor, MPF)이라는 단백질이 출현하게 되는데, 이것이 난자의 핵붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)와 염색체의 응축(chromosome condensation)을 유도하는 요인이라고 알려져 있다(Masui and Clarke, 1979; Maller, 1985). 범개구리(*R. pipiens*) 난자의 세포질에서 처음 발견된 MPF(Masui and Makert, 1971)는 근래에 난자에서 뿐만 아니라 일반세포의 세포질에도 존재한다는 것이

알려지게 되었다(Kishimoto *et al.*, 1984; Tachibana *et al.*, 1987). MPF의 활성판정은 고전적으로 양서류 난자의 성숙계를 이용한 미세주입법을 활용하여 왔다. 그러나 근래에는 H₁ histone kinase의 활성 증가로 이 단백질의 활성을 판정하기도 한다(Gautier *et al.*, 1988; Labbe *et al.*, 1988).

Phosphatase의 강력한 억제제인 okadaic acid(OA)(Bialojan and Takai, 1988; Haystead *et al.*, 1989)를 *Xenopus* 난자에 미세주입하면 MPF의 생성은 물론 난자의 핵붕괴(난자성숙)를 유도한다는 보고가 있었다(Goris *et al.*, 1989). 또한 생쥐 난자에서도 OA의 처리는 MPF의 생성을 유도하는 것으로 알려졌다(Rime and Ozon, 1990). 이러한 연구들은 난자의 성숙기작, 혹은 MPF의 활성기작을 연구하는 데 유익한 정보를 제공하고 있다.

본 연구에서는 한국산 개구리(*R. dybowskii*, *R. nigromaculata*)를 사용하여 배양중인 개구

본 연구는 1991년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-91-412)의 지원에 의해 수행되었음.

리 난자가 과연 OA의 미세주입에 의해 성숙이 유도되는지와 OA에 의한 성숙과 단백질 합성 및 cAMP와의 관계를 조사하였다. 아울러 OA의 처리가 MPF의 활성을 촉진하는지를 생물학적 검정방법과 생화학적 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 난자배양

전라남도 일원에 서식하는 북방산개구리(*R. dybowskii*)와 참개구리(*R. nigromaculata*)를 실험에 사용하였다. 여포난자의 생체외 배양법, 뇌하수체 추출물(frog pituitary homogenates: FPH, 0.05 gland/ml)의 제조 방법 등은 이미 전보에 기술한 바 있다(Kwon et al., 1988, 1989). Progesterone (P_4 , 0.5 μ g/ml) 및 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA, 10 μ M)를 처리하여 성숙을 일으킨 난자들 혹은 배란된 난자들을 양성 대조군으로, amphibian Ringer(AR) 혹은 vehicle에서 배양한 미성숙 난자들을 음성 대조군으로 사용하였다. Okadaic acid(OA)는 10% dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 stock solution(500 μ M)을 만든 다음 필요에 따라 10 mM HEPES buffer(pH 7.4)로 희석시켜 사용하였다.

미세주입

여포에서 협막세포층을 미세핀셋으로 제거한 난자를 미세주입용 시료로 사용하였다. Micro manipulator(Leitz)를 사용하여 50 nl의 OA를 미세주입한 후에, 30분간 손상 회복 시간을 준 다음, 기본 배양액인 AR로 옮기었다. AR용액에서 일정시간 배양시킨 다음 난자들을 10% trichloroacetic acid(TCA)로 30분간 고정된 후 해부현미경 하에서 미세핀셋으로 쪼개어 핵의 유무를 조사하였다. MPF의 작용은 Ca^{2+} 에 매우 민감하게 억제되므로(Wasserman and Masui, 1976) 미세주입과 회복과정은 Ca^{2+} -free AR 내에서 수행하였다. OA 혹은 세포질

을 미세주입할 때에는 각각의 대조군으로 vehicle과 미성숙 난자의 세포질을 동량 주입하였다.

MPF의 활성확인

배양한 난자들의 세포질에 MPF의 활성이 존재하는지를 보기 위하여 먼저 전보에 기술한 바와 같이 두가지 방법을 사용하였다(Yoo et al., 1992). 첫째는 배양이 끝난 난자들의 세포질을 미성숙 난자에 주입하여 후자의 난자들이 성숙을 일으키는지의 여부로써, 둘째는 세포질에서 MPF를 포함한 단백질을 추출한 다음 시료 단백질을 총에서 H_1 histone kinase의 활성도를 측정함으로써 간접적으로 MPF의 활성을 확인하였다(Yoo et al., 1992).

H_1 histone kinase 활성 측정

배양이 끝난 난자에서 MPF를 포함한 단백질을 추출해낸 후 이 시료들이 첨가한 histone을 인산화시키는 능력을 다음과 같이 조사하였다. Yasuda등(1991)이 수행한 방법에 따라 시료단백질을 인산화시킨 다음 이 시료들을 전기영동하여 여러 단백질들로 분리하였다. 전기영동의 방법은 이미 전보에 기술한 바 있다(Yoo et al., 1992). 전기영동을 수행한 gel을 Kodak X-Omat AR film과 intensifying screen(Dupont)으로 덮은 후 $-70^\circ C$ 에서 노출시킨 후 현상하여 autoradiogram을 얻었다. 전기영동상에서 첨가한 histone이 나타나는 band에 인산화된 양의 증감을 비교함으로써 H_1 histone kinase의 활성을 판정하였다.

통계처리

실험 결과의 유의성 검정은 정규분포를 이루는 두 모비율의 비교방법을 사용하였다(Snedecor and Cochran, 1967).

결 과

OA의 미세주입에 의한 북방산개구리(*R. dybowskii*) 난자의 성숙유도

북방산개구리를 이용하여 OA의 난자 성숙 유도 효과를 알아보았다. 개구리의 여포에서 협막 세포층을 제거한 난자에 여러 농도의 OA(0.5-500 μ M)를 미세주입한 후 AR에 옮겨 18시간 배양한 다음 핵붕괴 여부를 조사하였다(Table 1). 도표 1에서 보여주는 바와 같이 11월 5일 이전에 취한 난자들은 FPH, 혹은 progesterone의 처리에도 불구하고 난자의 성숙이 유도되지 않았다. 그러나 이들 난자에 TPA나 OA를 처리하면 난자의 성숙이 유의하게 유도됨을 관찰할 수 있었다. 11월 15일 이후에 취한 난자들은 호르몬에 반응하여 난자의 성숙을 일으

Table 1. Induction of oocyte maturation by okadaic acid in *Rana dybowskii* in vitro

Treatment	No. of oocytes GVBD/ No. of oocytes tested (% GVBD)	No. of animals used
<Nov. 3-Nov. 5> Non-responsive to P₄		
Control	3/99(3.0)	4
FPH (0.05 gland/ml)	6/76(7.9)	4
P ₄ (0.5 μ g/ml)	5/78(6.0)	4
TPA (10 μ M)	35/74(47.3)*	4
OA (50 μ M)	12/48(25.0)*	4
OA (500 μ M)	32/60(53.3)*	6
<Nov. 15-Dec. 7> Responsive to P₄		
Control	8/257(3.1)	9
FPH (0.05 gland/ml)	114/179(63.7)*	5
P ₄ (0.5 μ g/ml)	91/97(93.8)*	3
TPA (10 μ M)	172/278(61.9)*	9
OA (0.5 μ M)	16/36(44.4)*	5
OA (5 μ M)	18/40(45.0)*	5
OA (50 μ M)	35/57(61.4)*	5
OA (500 μ M)	16/23(69.6)*	2

Various doses of OA (0.5-500 μ M, 50 nl) were microinjected into oocytes while other reagents were directly added to culture medium. The oocytes were cultured for 18 hrs and examined for GVBD after culture. *P < 0.01 when compared with the control.

키었으며, 역시 TPA나 OA의 주입에 의해 난자의 성숙이 유도되었다. 그러나 아무런 처리를 하지 않은 난자는 거의 성숙을 일으키지 않았다.

단백질의 합성 저해제와 cAMP가 OA에 의한 성숙에 어떤 영향을 미치는 지를 알아 보기 위하여 OA를 미성숙 난자에 주입한 후 cycloheximide(10 μ g/ml), 혹은 cAMP(2.5 mM)를 포함한 배양액으로 옮겨 일정시간 배양한 후 핵붕괴 여부를 조사하였다. 그 결과 OA에 의한 난자성숙은 cycloheximide의 존재 하에서도 일어남을 알 수 있었다. 그러나 외부에서 첨가된 cAMP에 의해서는 난자들의 성숙이 일부 억제됨을 관찰할 수 있었다(Table 2).

북방산개구리(*R. dybowskii*) 난자에서 OA에 의한 MPF 활성 확인

북방산개구리의 난자들을 progesterone(0.5 μ g/ml) 혹은 TPA(10 μ M)를 포함한 배양액에서 6시간 배양을 하거나, 또는 OA(500 μ M)를 주입한 난자를 AR에서 6시간 배양한 다음, 이들 난자의 세포질을 약 75-100 nl씩 취하여 미성숙 난자의 세포질에 주입하였다. 세포질을 이식받은 미성숙 난자들을 호르몬의 처리없이 AR에서 18시간 배양한 후에 핵붕괴 여부를 조사한 결과 도표 3과 같았다. 도표 3에서 보여주는 바와 같이 P₄나 TPA의 자극을 받은 난자의 세포질을 미성숙 난자에 주입하였을 때 핵붕괴가 유도되었다(75%). 따라서 P₄나 TPA의 자극이 6시간에 MPF의 생성, 혹은 활성을 촉진했다고

Table 2. Effect of cycloheximide and cAMP on the okadaic acid induced oocyte maturation in *R. dybowskii*

Treatment	No. of oocytes GVBD/ No. of oocytes tested (% GVBD)	No. of animals used
Control	16/23(69.6)	3
Cycloheximide (10 μ g/ml)	25/34(73.5)	3
cAMP (2.5 mM)	11/32(34.4)*	3

After OA (500 μ M, 50 nl) injection, the oocytes were cultured for 18 hrs in the presence or absence of cycloheximide or cAMP. *P < 0.01, when compared with the control. Experiments were carried out from Nov. 15 to Dec. 7.

Table 3. Identification of MPF activity in *R. dybowskii* oocytes stimulated with okadaic acid, P₄ or TPA *in vitro*

Treatment	No. of oocytes GVBD/ No. of oocytes tested (% GVBD)	No. of animals used
Control	2/13(15.4)	3
P ₄ (0.5 µg/ml)	15/20(75.0)*	3
TPA (10 µM)	15/20(75.0)*	3
OA (250 µM)	17/21(81.0)*	3

Cytoplasm of donor oocytes which were microinjected with okadaic acid, exposed to exogenous P₄ (0.5 µg/ml) or TPA (10 µM) or cultured in plain medium for 6 hrs, were microinjected into immature oocytes and cultured for 18 hrs. After culture, GVBD of recipient oocytes were examined.

*P < 0.01 when compared with the control. Experiments were carried out from Nov. 27 to Dec. 7.

보여진다. 같은 방법으로 OA에 의해 성숙이 유도된 난자의 세포질을 미세주입한 결과 역시 이들의 핵붕괴가 일어난 것을(81%) 확인할 수 있었다(Table 3). 이에 대해 미성숙 난자의 세포질을 동량 주입하였을 때에는 거의 성숙이 일어나지 않았다(약 15%). 따라서 OA의 처리가 난자의 세포질에 MPF의 생성, 혹은 활성을 유도했다는 것을 알 수 있었다.

OA의 미세주입에 의한 참개구리(*R. nigromaculata*) 난자의 성숙유도

참개구리를 이용하여 okadaic acid(OA)의 성숙 유도 효과를 알아 보았다. 북방산개구리를 사용한 것과 같은 방법으로 OA의 효과를 조사한 결과 도표 4와 같았다(Table 4). 도표 4에서 보여주는 바와 같이 호르몬(FPH, P₄)에 비교적 잘 반응하지 않는 3월에 취한 난자들도 농도에 의존하여 OA에 의해 핵붕괴를 일으키었다. 또한 OA에 의한 난자의 핵붕괴 시간을 알아 보자 OA(500 µM) 처리 후 일정시간 간격으로 난자의 핵붕괴율을 조사해 본 결과 도표 5에서 보여 주듯이 3시간에서 부터 일부의 난자들이 핵붕괴를 일으키기 시작하여(36%) 18시간까지 점차로 핵붕괴율이 증가하였다. 대략 6시간 근처에서 50% 이상의 난자들이 핵붕괴를 일으켰으며,

Table 4. Induction of oocyte maturation by okadaic acid in *R. nigromaculata* *in vitro*

Treatment	No. of oocytes GVBD/ No. of oocytes tested (% GVBD)	No. of animals used
Control	0/100(0.0)	5
FPH (0.05 gland/ml)	9/62(14.5)*	3
P ₄ (0.5 µg/ml)	55/100(55.0)*	5
TPA (10 µM)	70/77(90.9)*	4
Vehicle (10% DMSO)	0/53(0.0)	5
OA (10 µM)	8/54(14.3)*	3
OA (50 µM)	38/38(100.0)*	2
OA (100 µM)	43/50(86.0)*	3

Various doses of OA(10-100 µM) were microinjected into oocytes and other reagents were added to culture medium. The oocytes were cultured for 18 hrs and examined for GVBD. *P < 0.01 when compared with the control. Experiments were carried out on March.

Table 5. Time course of oocyte maturation(GVBD) in *R. nigromaculata* induced by okadaic acid *in vitro*

Treatment	No. of oocytes GVBD/ No. of oocytes tested (% GVBD)		No. of animals used
	Vehicle	OA	
3	0/54(0)	25/70(35.7)*	6
6	0/59(0)	40/73(54.8)*	6
9	0/41(0)	45/65(73.0)*	4
18	0/40(0)	34/38(89.5)*	4

Okadaic acid(500 µM, 50 nl) or vehicle(10% DMSO) were microinjected into immature oocytes and examined for GVBD after various duration of culture. Experiments were carried out on April and May. *P < 0.01 when compared with the control.

대조군으로 vehicle을 주입받은 난자들은 전혀 핵붕괴를 일으키지 않음을 확인할 수 있었다 (Table 5).

참개구리 난자를 사용하여 OA에 의해 유도된 난자의 성숙이 cycloheximide(10 µg/ml)나 cAMP(2.5 mM)의 영향을 받는지를 조사하였다(Table 6). 도표 6에서 보는 바와 같이 OA에 의한 난자성숙은 cycloheximide나 cAMP에 아무 영향을 받지 않았다.

Table 6. Effects of cycloheximide and cAMP on the oocyte maturation in *R. nigromaculata* induced by okadaic acid

Treatment	No. of oocytes tested (% GVBD)	No. of oocytes GVBD/ No. of animals used
Control	18/21(85.7)	3
Cycloheximide (10 μ g/ml)	22/24(91.7)	3
cAMP (2.5 mM)	21/23(91.3)	3

Defolliculated oocytes of *R. nigromaculata* were injected with OA (500 μ M) and cultured in the presence or absence of cycloheximide or cAMP for 18 hours. After culture, oocyte GVBD was examined. Experiments were carried out on April and May.

참개구리(*R. nigromaculata*) 난자에서 OA에 의한 MPF 생성 확인

참개구리의 난자를 사용하여 OA가 MPF의 활성을 촉진하는지를 조사하였다. 이 경우에는 MPF의 활성을 H₁ histone kinase assay 방법으로 확인하여 보았다(Fig. 1). 음성대조군으로 GV난자를, 양성대조군으로 배란된 북방산 개구리의 난자(GVBD)를 사용하였다. 그림 1A는 추출한 단백질들의 분리양상을 보여주는 것으로 화살표는 첨가된 histone의 band를 표시해 주고 있다. 그림 1B는 이들 단백질의 인산화 양상을 보여주고 있다. 그림에서 보듯이 histone이 첨가된 실험군에서 강한 인산화 band를 볼 수 있었다. OA 주입후 여섯 시간 지난 난자의 세포질에 histone을 첨가한 실험군에서 histone이 매우 강하게 인산화됨을 볼 수 있었다(Figs. 1B, lane D). 인산화 정도는 배란된 난자(GVBD)의 그것(lane F) 보다 약간 약했지만 미성숙 난자(GV)의 그것(lane B)보다 훨씬 강하게 나타났다. Histone을 첨가하지 않았을 때는 대조군과 실험군에서 모두 인산화가 매우 약하게 나타났다(Figs. 1B, lane A, C, and E). 이로 보아 OA의 처리는 H₁ histone kinase의 활성을 매우 촉진함을 알 수 있었다.

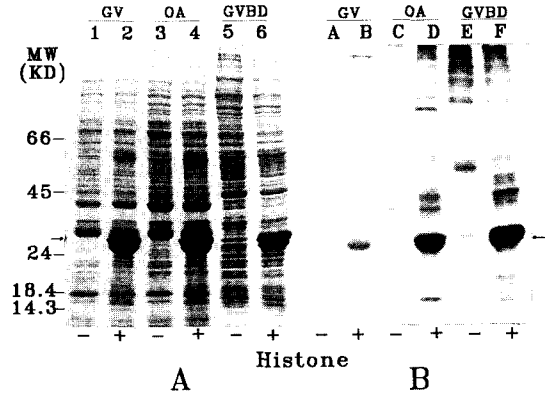


Fig. 1. H₁ histone kinase activity in GV, GVBD, and OA-treated oocyte in *Rana*. Oocytes of *R. nigromaculata* were micro-injected with OA (OA) or vehicle (GV) and cultured for 6 hrs. GVBD oocytes were obtained from ovulated oocytes of *R. dybowskii*. H₁ histone kinase activity in the cytoplasm was assayed as described in Materials and Methods. Arrow indicates the band of added histone.

고 찰

본 실험의 결과로 OA는 생체의 배양에서 세포질 내 MPF의 활성을 촉진함으로써 개구리 난자의 핵붕괴를 유도한다는 것을 알았다. 이는 MPF의 활성화 과정에 phosphatase가 관여함을 보여주고 있다.

OA를 *Xenopus* 난자에 미세주입하면 매우 짧은 시간(30분)내에 MPF 활성이 유도되고 여러 단백질의 인산화와 H₁ histone kinase의 활성이 증가하며, 이러한 모든 과정은 단백질의 합성 없이 일어난다는 보고가 있었다(Rime *et al.*, 1990). 본 실험의 결과에서도 OA에 의한 성숙은 단백질의 합성없이도 일어났으며, 외부에서 첨가된 cAMP에도 참개구리에서는 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다(Table 6). 이러한 결과는 progesterone이나 TPA의 자극에 의해 일어나는 난자의 성숙과는 매우 다르다는 것을 의미한다. 왜냐하면 P₄나 TPA에 의한 성숙은 cycloheximide나 cAMP에 강하게 억제되기 때문이다(Wasserman and Masui,

1975; O'Connor and Smith, 1976; Morrill et al., 1977; Kwon et al., 1992).

*Xenopus*에서 성숙된 난자의 세포질을 미성숙 난자(GV)에 이식한 후 cycloheximide가 포함된 배양액에서 배양하여도 핵붕괴가 일어난다는 사실로부터 성숙된 난자의 세포질 내에 있는 MPF가 GV 난자에 불활성 상태로 존재하는 MPF의 전구체를 활성화 시켰다고 믿어지고 있다(Drury and Schorderet-Slatkine, 1975; Wasserman and Masui, 1975). 따라서 MPF의 생성과 MPF의 활성화에는 뚜렷한 차이가 있다고 보겠다. 왜냐하면 MPF의 생성에는 단백질의 합성이 필요하기 때문이다. 이러한 사실을 종합해 보면, 본 실험에서 OA의 주입에 의해 유도된 난자의 핵붕괴가 cycloheximide의 영향을 받지 않았다는 사실은 OA가 난자내 MPF의 생성 보다는 활성화를 촉진했다고 보여진다. 배양액의 cAMP도 *Xenopus* 처럼 개구리 난자의 MPF의 활성화에는 큰 영향을 미치지 않은 것처럼 보였다. 그러나 북방산개구리에서 OA에 의한 성숙이 cAMP에 의해 억제된 현상은 더 조사를 해 보아야 할 문제로 보여진다. 흥미롭게도 호르몬에 반응을 하지 않는 시기의 난자들도 OA에 의해 성숙이 일어났다(Tables 1 and 4). 이는 동면 초기의 난자들은 이미 MPF의 전구체를 가지고 있다는 것을 의미한다. 따라서 이 시기의 난자들은 호르몬에 대한 수용체 기작이 아직 작동하지 않아서 성숙개시 반응을 일으킬 수 없는 것으로 보인다. 본 실험의 결과에서 보듯이 TPA도 OA처럼 호르몬에 반응하기 전에 난자의 성숙을 유도할 수 있다(Tables 1 and 4). 그러나 TPA로 protein kinase C를 활성화 시켜서 난자의 성숙을 유도하는 경우에는 외부에서 첨가된 cycloheximide나 forskolin에 억제가 된다(Kwon et al., 1992). 따라서 TPA의 성숙효과는 progesterone에 의한 것 처럼 MPF의 생성을 유도하기 때문인 것으로 믿어진다. 즉 TPA와 OA의 작용에는 뚜렷한 차이가 있음을 알 수 있다. 또한 이 차이는 난자의 성숙과정에서 protein kinase C가 phosphatase의 이전 단계에서 작용한다는 것을 시사해주고 있다.

Progesterone의 난자막 자극으로 부터 MPF의 활성화에 이르는 반응경로를 알아 내려면 앞으로 보다 정밀한 분자생물학적 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Bialojan, C. and A. Takai, 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatase. *Biochem. J.* **256**: 283-290.
- Drury, K. and S. Schorderet-Slatkine, 1975. Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of maturation promoting factor (MPF) in oocyte of *Xenopus laevis*. *Cell* **11**: 269-274.
- Gautier J., C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse, and J. Maller, 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54**: 433-439.
- Goris J., J. Hermann, P. Hendrix, R. Ozon, and W. Merlevede, 1989. Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS.* **245**: 91-94.
- Haystead, T.A.J., A.T.R. Sim, D.C. Carling, R.Y.C. Honnor, Y. Tsukitami, P. Cohen, and D.G. Hardie, 1989. Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature (London)* **337**: 78-81.
- Kishimoto, T., K. Yamazaki, Y. Kato, S.S. Koide, and H. Kanatani, 1984. Induction of starfish oocyte maturation by maturation-promoting factor of the mouse and surf clam oocytes. *J. Exp. Zool.* **231**: 293-295.
- 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.
- Kwon H.B., K.J. Chang, Y.R. Yoo, C.C. Lee, and A.W. Schuetz, 1992. Induction of ovulation and oocyte maturation of amphibian (*Rana dybowskii*) ovarian follicles by protein kinase C activation *in vitro*. *Biol. Reprod.* **47**: 169-176.
- 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.
- 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 *cdc2*. *Nature* **335**: 251-254.
- Maller, J.L., 1985. Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell. Diff.* **16**: 211-221.
- Masui, Y. and C.L. Markert, 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**: 129-146.
- Masui, Y. and H.J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**: 185-281.
- Morrill, G.A., F. Schatz, A.B. Kostellow, and J.M. Poupko, 1977. Changes in cyclic AMP levels in the amphibian ovarian follicle following progesterone induction of meiotic maturation. *Differentiation*. **8**: 97-104.
- O'Connor, C.M., and L.D. Smith, 1976. Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev. Biol.* **52**: 318-322.
- Rime H., D. Huchon, C. Jesus, J. Goris, N. Merlevede, and R. Ozon, 1990. Characterization of MPF activation by okadaic acid in *Xenopus* oocytes. *Cell Differ. Devel.* **29**: 47-58.
- Rime, H. and R. Ozon, 1990. Protein phosphatases are involved in the *in vivo* activation of Histone H₁ kinase in mouse oocyte. *Dev. Biol.* **141**: 115-122.
- Schuetz A.W., 1967. Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. *J. Exp. Zool.* **166**: 347-354.
- Smith L.D., and R. E. Ecker, 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* **25**: 232-247.
- Snedecor, G. W., and W. G. Cochran, 1967. Statistical methods, The Iowa State University Press, Iowa, pp. 220-221.
- Tachibana, K., N. Yanagishima, and T. Kishimoto, 1987. Preliminary characterization of maturation promoting factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **88**: 273-281.
- 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 Y. Masui, 1976. A cytoplasmic factor promoting oocyte maturation; Its extraction and preliminary characterization. *Science* **191**: 1266-1268.
- Yasuda H., M. Kamizo R. Honda, M. Nakamura, F. Hanaoka, and Y. Ohba, 1991. A point mutation in C-terminal region of *cdc2* kinase causes a G₂-phase arrest in a mouse temperature-sensitive FM3A cell mutant. *Cell Struct. Funct.* **16**: 105-112.
- Yoo, Y.R., W.B. Im, C.H. Ra, J.Y. Kim, and H.B. Kwon, 1992. Induction of maturation promoting factor in *Rana* oocytes by protein kinase C activation *in vitro*. *Korean J. Zool.* **35**: 277-286.

(Accepted November 20, 1993)

Induction of Oocyte Maturation of Korean Frogs by Okadaic Acid *in vitro*

An Na Kim, Han Ho Choi, Chul Ho Ra, Ji Yeul Kim*, Sung Gu Kang**, and Hyuk Bang Kwon
(Department of Biology, *Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University,
Kwangju, 500-757, Korea. **Department of Biology, Inje University, Kimhae, Kyongnam, 621-
749, Korea)

We investigated the effect of okadaic acid (OA), a phosphatase inhibitor, on oocyte maturation of *Rana dybowskii* and *Rana nigromaculata in vitro*. Defolliculated oocytes which were microinjected with various doses of OA (0.5-500 μM , 50 nl), were cultured for up to 18 hrs without any hormone treatment. The oocytes were fixed in trichloro-acetic acid (TCA, 10%) and examined for germinal vesicle breakdown (GVBD) after culture. OA began to induce oocyte GVBD of *R. dybowskii* from the concentration of 0.5 μM , and exhibited maximum induction (\approx 70%) at 500 μM . *R. dybowskii* oocytes, collected on the early November, did not mature in response to progesterone. However, OA injection induced the maturation of such oocytes following *in vitro* culture. OA-induced oocyte maturation was not suppressed by exogenous cycloheximide (10 $\mu\text{g/ml}$). In *R. nigromaculata*, oocyte GVBD began to occur in 6 hrs after OA injection, and H_1 histone kinase activity also increased by OA injection. OA-induced oocyte maturation was not suppressed by cycloheximide or cAMP in this frog. Taken together, the data suggest that phosphatase in the cytoplasm is involved in the regulation of MPF activation and oocyte maturation in *Rana* oocytes.