

한국산개구리(북방산개구리와 참개구리) 난자의 생체외 배양에 의한 성숙유도에 관하여

권혁방 · 조장현 · 최충길

전남대학교 자연과학대학 생물학과

전라남도 일대에서 서식하는 북방산개구리(*R. dybowskii*)와 참개구리(*R. nigromaculata*)를 채집하여 생체외배양에 의한 여포난자의 성숙을 유도하였다. 북방산개구리의 여포난자는 배양액 (amphibian Ringer's solution, AR)에 첨가한 progesterone, 0.1 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$ 에 의해 난자의 성숙(핵붕괴)이 유도 되었으며 참개구리의 난자는 1 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$ 의 농도에서 성숙이 일어났다. 개구리의 뇌하수체추출물 (frog pituitary homogenate, FPH)을 얻어서 그 효과를 조사해본 결과 북방산개구리에서는 0.01 pituitary equivalent/2 ml에서, 참개구리는 0.1 pit. equiv./2 ml에서 부터 여포난자의 성숙이 일어났다. 난자의 성숙에 요하는 시간은 두 개구리에서 모두 9-15시간이었으며 호르몬에 대한 반응성, 성숙기간 등은 개구리 재료로 가장 많이 사용되는 범개구리(*R. pipiens*)와 거의 일치하였다.

특이하게 2월 이후에 사용한 북방산개구리의 여포난자는 호르몬의 도움없이도 성숙이 일어났으며 성숙기간도 3시간으로 매우 빨라졌다. 난소 조각을 배양했을 때 자발적 성숙을 일으키는 여포들은 자발적인 배란까지도 일으키는 것을 발견하였다.

KEY WORDS: Oocyte maturation, *R. dybowskii*, *R. nigromaculata*

양서류의 여포난자는 대부분의 척추동물에서처럼 감수분열의 전기에서 분열이 정지되어 있다가 생식기에 도달하면 뇌하수체호르몬의 자극으로 분열이 재개되고 동시에 배란이 일어나게 된다. 이 때 여포난자를 둘러싸고 있던 여포세포들이 뇌하수체호르몬의 표적이 되며 이들이 성숙유도 물질인 스테로이드 (주로, progesterone)를 분비함으로써 난자의 성숙이 유발되는 것이다 (reviewed by Schuetz, 1974, 1985; Masui and Clarke, 1979; Maller, 1985). 양서류의 난자들은 비교적 크기가 크고 배양이 간단하며 조작하기가 용이하므로 난자의 성숙기작을 밝히는 데 좋은 자료로 사용되어 왔다. 특히 개구리 (*Rana*)의 여포들은 성장이 동시에 일어나므로 일정한 성장단계의 여포를 한 개구리에서 쉽게 얻을 수가 있으며 특히 동면 중인 것에서는 성장이 완료된 여포들을 대량으로 얻을 수 있는 (약

2000개/마리) 장점이 있다. 이러한 여포난자들은 일정한 세포주기(G2 phase)에 정지되어 있다가 호르몬에 의해 주기가 재개되므로 세포주기의 조절 문제를 연구하는 데 좋은 모델을 제공해주고 있다. 범개구리(*Rana pipiens*) 난자의 세포질에서 처음 발견된 성숙촉진요인 (maturation promoting factor, MPF)(Masui and Markert, 1971; Masui, 1982)은 이제 일반적인 세포조절 물질일 가능성이 큰 것으로 알려지고 있으며 (Sunkara *et al.*, 1979; Gerhart *et al.*, 1984), 배란된 난자에서 발견되는 난할억제요인 (cytostatic factor, CSF)(Masui, 1974; Meyerhof and Masui, 1979)도 또한 일반적인 세포주기의 조절에 관여할 것으로 추정되고 있다 (Newport and Kirschner, 1984).

본 연구는 개구리 발생체의 이러한 중요성에 비추어 우선 본 실험실에서 개구리 난자의 배양체를 확립하고 처음으로 한국산 개구리를 사용하여 생체외배양을 통한 여포난자의 성숙을 유도하였다. 본 실험을 통하여 북방산개구리(*R.*

본 연구는 1987년도 문교부 학술연구조성비에 의해 수행된 연구의 일부임.

dybowskii)와 참개구리(*R. nigromaculata*)의 제반 성숙현상의 기초 자료를 구하였고 아울러 2월 이후에 실험한 북방산개구리는 양서류에서는 매우 드문 자발적 성숙과 자발적인 배란까지도 일으키는 것을 발견하였으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물: 본 실험에 사용된 개구리들은 모두 전라남도 일대에서 직접 채집하였다. 북방산개구리(*R. dybowskii*)는 물속에서 동면하는 것을 11월부터 채집하여 4°C를 유지하는 저온실에서 가동면 상태를 유지시키었고 참개구리(*R. nigromaculata*)는 3월에 동면에서 깨어난 것을 채집하여 역시 저온실에 보관하며 필요할 때 실험에 사용하였다.

여포(난자) 및 난소조각 배양: 개구리를 두부절개로 죽인 후 복강에서 난소를 떼어내어 배양액에 넣고 세척을 하였다. 배양액으로는 amphibian Ringer's 용액 (AR; 6.6 g NaCl/l; 0.15 g CaCl₂/l; 0.15 g KCl/l)에 Penicillin G(30 mg/l; Sigma), streptomycin sulfate (50 mg/l; Sigma) 및 sodium bicarbonate 완충용액 (200 mg NaHCO₃/l)을 사용 직전에 첨가한 것을 사용하였다. 배양액의 pH는 0.1N HCl을 사용하여 7.4로 맞추었다. 해부현미경 하에서 난소조각으로부터 여포를 예리한 핀셋을 사용하여 개개로 분리해낸 다음 petri dish로 옮겨서 모았다. 개구리의 여포는 여포강이 없고 단 한층의 여포세포와 thecal layer 및 표피세포로 덮여 있으므로 난자를 이들 세포층으로부터 분리해 내기가 쉽지 않다. 따라서 여포를 직접 배양하였다. 모아 놓은 여포들을 실험군의 수에 따라 무작위로 나눈 다음 다공배양 접시 (multiwell culture plate, CoStar)의 각 well에 2 ml의 AR 용액을 붓고 이곳에 20개씩의 여포를 넣어 배양하였다. 난소조각의 배양은 난소를 작은 조각 (약 20-50여개의 여포 포함)으로 나눈 다음 각 조각을 20 ml의 AR이 들어있는 삼각플라스크(50 ml용)에 넣

어 배양하였다. 위의 배양접시나 플라스크들을 항온실(22°C)에 있는 진탕기에 옮긴 후 진탕을 시키면서 (80 회전/분) 24시간 배양하였다. 배양 후 여포들을 끊어서 고정을 시킨 다음 해부현미경 하에서 여포들을 쪼개서 난자의 germinal vesicle (GV, 핵)의 유무를 조사하였으며 핵붕괴 (germinal vesicle breakdown, GVBD)가 일어난 것을 감수분열이 재개된 것으로 간주하였다 (Kwon and Schuetz, 1985).

호르몬: Progesterone (Sigma)은 에탄올(Merck, GR)에 녹여 2 mg/ml의 농도로 만들어 사용하였다. 개구리의 뇌하수체호르몬은 순수하게 정제되어 나온 것이 없으므로 다음과 같이 뇌하수체 추출물 (frog pituitary homogenate, FPH)을 만들어 사용하였다. 개구리를 죽일 때마다 두부에서 뇌하수체를 떼어내어 작은 병에 넣어 냉동실에 보관하다가 약 50개 정도가 모이면 이들을 4°C의 AR 용액이 든 시험관으로 옮긴 후 유리분쇄기로 부수었다. 분쇄된 혼합물들을 4°C에서 20분간 원심분리하여 (10,000 rpm) 찌꺼기를 제거한 다음 AR을 사용하여 1 pituitary equivalent/ml이 되도록 농도를 조절한 후 소량씩 (0.5 ml) 분주하여 냉동실에 보관하였다. 한번 녹인 FPH는 당일에 사용하였다.

결 과

Progesterone의 성숙유도 효과

개구리의 난소로부터 여포들을 분리해낸 다음 한 개체에서 나온 여포들을 무작위로 나누어 2 ml의 AR을 포함한 well에 20 개씩 넣었다. 실험계획에 따라 서로 다른 농도의 progesterone (0-1 µg/well)을 각 well에 첨가한 후 여포들을 24시간 배양하였으며 배양기간이 끝난 다음 핵붕괴 여부를 조사함으로써 난자의 성숙을 관찰하였다. 그림 1에서 보는 바와같이 북방산개구리의 난자는 progesterone, 0.01 µg/well에서부터 부분적인 성숙이 일어나기 시작하여 (28%), 0.1 µg/well에서는 대부분의 난자들이 성숙을 일으키었다 (87%) (Fig. 1A). 이에 대해 참개구리

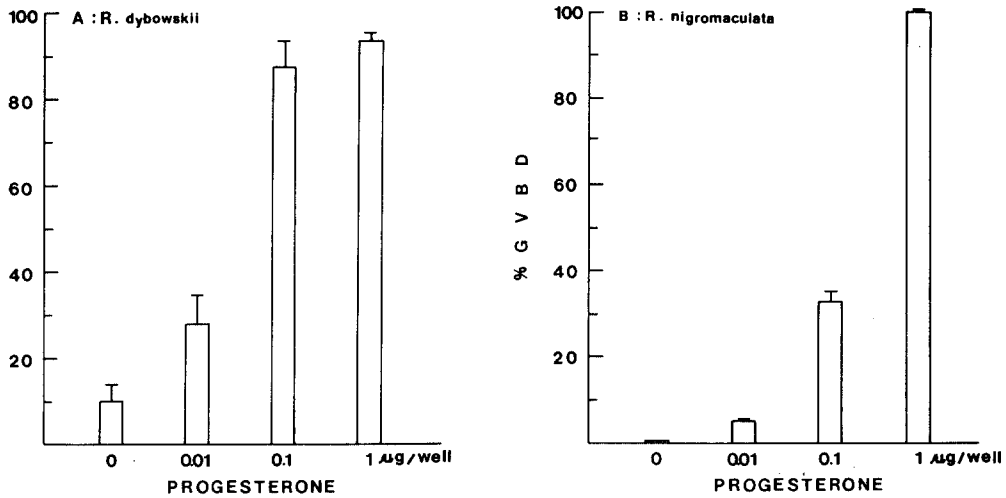


Fig. 1. Dose response of progesterone to induce GVBD of frog (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) oocytes *in vitro*. Intact follicles were cultured for 24 hr in wells containing 2 ml of AR in the presence of various concentrations of progesterone (0-0.1 µg/well). GVBD was examined after culture. Each bar in the figure represents % GVBD (mean ± SEM) of 240 follicles in (A)(6 animals) and 40 follicles in (B)(1 animal).

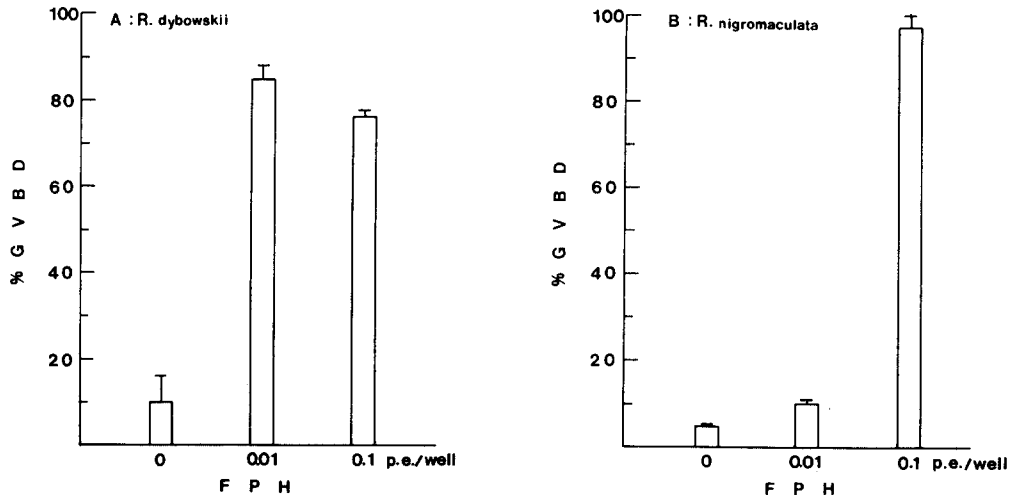


Fig. 2. Dose response of frog pituitary homogenate (FPH) to induce GVBD of frog (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) oocytes *in vitro*. Follicles were cultured in the presence of various doses of FPH (0-0.1 pituitary equivalent/well). Oocyte GVBD was checked after 24 hr culture. Each bar in the figure represents % GVBD (mean ± SEM) of 80 follicles in (A)(2 animals) and 40 follicles in (B)(1 animal).

의 난자는 0.1 µg/well의 progesterone농도에서 일부의 난자들만 (33%) 성숙을 일으키었는데 1 µg/well의 농도에서 비로소 완전한 성숙을 일으키었다 (Fig. 1B). 이 결과로부터 북방산개구리와 참개구리의 난자들은 progesterone에 의하여 생체외에서 성숙이 유도됨을 확인할 수 있었

으며 북방산개구리가 progesterone에 더 민감하게 반응한다는 것을 알았다.

Frog pituitary homogenate(FPH)의 성숙유도 효과

뇌하수체의 crude extract인 FPH를 사용하여

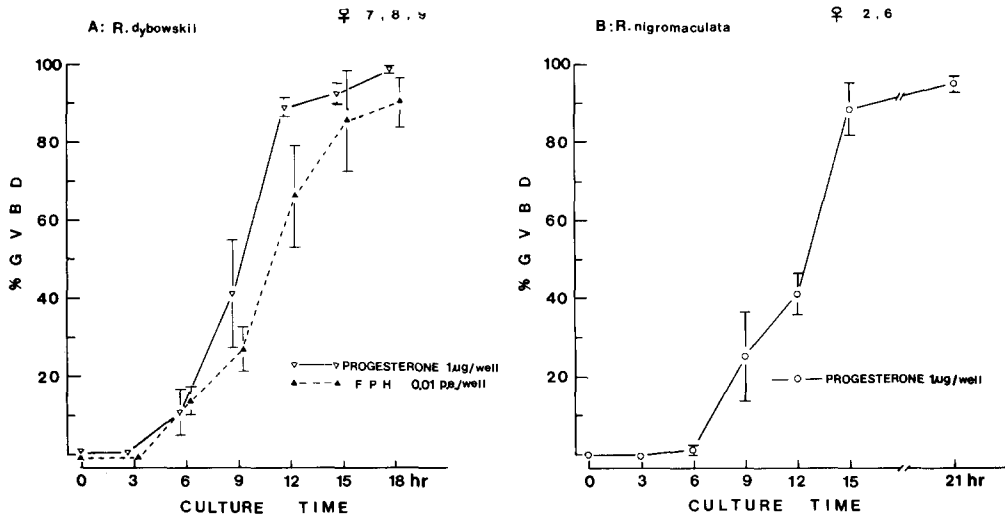


Fig. 3. Time course for GVBD of frog oocytes (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) following treatment of hormones (progesterone or FPH) *in vitro*. Follicles were cultured for up to 18 or 21 hr in the presence of hormones and checked for GVBD at designated time point. Each value represents % GVBD (mean \pm SEM) of 120 follicles (2 well replicates, 3 animals) in (A) and 80 follicles (2 well replicates, 2 animals) in (B).

한국산개구리의 성숙을 유도하여 보았다. 분리해낸 여포들을 각 well에 넣은 다음 동일한 종에서 추출한 FPH를 배양액에 첨가한 후 (0-0.1 pituitary equivalent/well) 24시간 배양하여 그 효과를 관찰하였다. 북방산개구리의 여포들은 0.01 pit. equiv./well의 농도에서도 이 호르몬에 의해 효율적으로 성숙이 유도되었으나 (78%) (Fig. 2A), 참개구리의 여포는 0.01 pit. equiv./well에서는 난자의 성숙이 일어나지 않다가 0.1 pit. equiv./well에서 비로소 완전한 성숙을 일으켰다 (Fig. 2B). 이로부터 북방산개구리의 여포가 참개구리의 것보다 FPH에 보다 민감하게 반응한다는 것을 알았다.

호르몬에 의해 유도된 난자의 성숙 기간

여포난자들이 성숙에 요하는 시간을 조사하기 위하여 호르몬 (progesterone, 1 μ g/well 혹은 FPH, 0.01 pit. equiv./well)을 첨가한 배양액에서 여포들을 배양하면서 일정 시간마다 여포들을 고정하여 난자의 성숙 여부를 조사하여 보았다 (Fig. 3). 북방산개구리의 여포들은 배양 시작 후 9시간에서부터 progesterone에 의해 일부

의 난자들이 성숙을 일으키기 시작하여 (약 41%) 15시간에는 대부분의 난자들이 성숙을 일으켰다 (약 99%). FPH에 자극을 받은 여포들의 난자성숙이 progesterone에 의한 것보다 약간 지연되는 경향을 보여주고 있었다 (Fig. 3A). 참개구리의 여포들도 비슷한 양상을 나타내서 배양 후 15시간이 지나면 대부분의 난자들이 성숙을 일으켰다 (Fig. 3B). 그러나 progesterone에 자극을 받았을 때 북방산개구리의 여포들은 12시간에 약 89%의 난자들이 성숙을 일으킨 데 대해서 참개구리의 여포들은 약 41%의 난자들이 성숙을 일으킨 것으로 보아 북방산개구리의 난자 성숙이 조금 빨리 일어난다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3).

자발적 성숙을 일으키는 난자의 성숙 기간

2월 이후에 북방산개구리를 사용하여 실험을 하던 중 여포들을 24시간 배양했을 때 호르몬 처리를 하지 않은 대조군에서도 난자의 성숙이 일어난 것을 발견하였다. 여러 마리의 개체를 조사한 결과 대부분 이러한 현상이 일어난다는 것을 발견하고 2월말에 이 난자들의 성숙에 요하는

Table 1. Spontaneous maturation and ovulation of frog (*Rana dybowskii*) oocytes in ovarian fragment culture.

Animal No.	Ovulation rate		GVBD rate of not ovulated oocytes	
	FPH treated	No hormone	FPH treated	No hormone
+17	40/43*(93)	22/27(81)	3/ 3**	5/ 5
+18	20/23(87)	17/27(81)	0/ 3	10/10
+19	40/47(85)	20/39(51)	7/ 7	19/19
+20	38/53(72)	1/42(2)	5/15	21/41

Ovarian fragments from each animal were cultured in Earlenmayer flasks containing 20 ml of AR in the presence or absence of FPH (0.01 pit. equiv./ml). No. of oocytes ovulated was counted and FVBD of the unovulated oocytes in the fragment was examined after 24 hr culture. None of the oocytes ovulated had GV after culture.

* No. of oocytes ovulated/No. of follicles in the fragment

**No. of oocytes GVBD/No. of oocytes examined

시간을 조사하여 보았다. 각 동물에서 여포들을 분리해낸 후 일부의 여포를 고정하여 핵의 존재를 확인한 다음 실험을 시작하였다. 여포들을 FPH (0.01 pit. equiv./well) 처리군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 배양을 시작한 다음 일정

기간마다 여포들을 취하여 난자의 성숙을 조사하였다. 호르몬이 없는 배양액에서 배양한 여포들은 역시 자발적인 성숙을 일으키었는데 정상적인 성숙기간보다 훨씬 빠른 3시간내에 이미 대부분의 난자들의 핵붕괴가 일어난 것을 발견하였다 (Fig. 4). 이 기간은 호르몬(FPH)의 유무에 영향을 받지 않았다. 어떤 개구리 (No. 18)의 여포는 자발적인 성숙을 일으키면서도 성숙기간은 정상적인 것들처럼 (Fig. 3A) 6시간에서 12시간이 걸리는 것도 있었다 (Fig. 4).

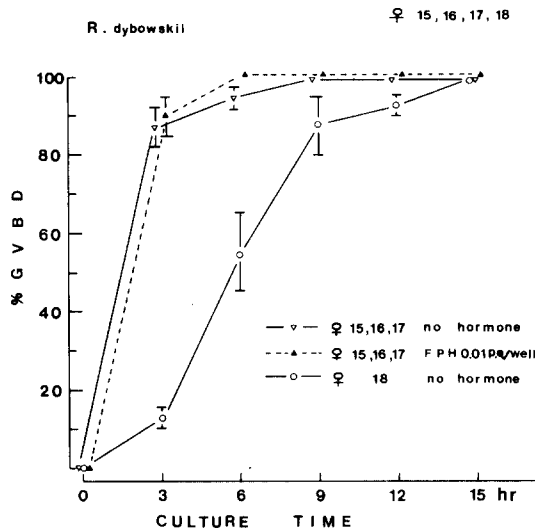


Fig. 4. Time course for GVBD of spontaneously matured frog (*R. dybowskii*) oocytes *in vitro*. Follicles were cultured in the presence or absence of hormone (FPH) for up to 15 hr and checked for GVBD at designated time point. Each value represents % GVBD (mean \pm SEM) of 120 follicles in one group (animal No. 15, 16 and 17) and 40 follicles in another group (animal No. 18).

자발적 성숙과 자발적 배란

자발적 성숙을 일으키는 개구리의 여포들이 호르몬의 도움없이도 배란을 일으킬 수 있는지를 보기위하여 난소조각 배양을 시행하여 배란율과 난자들의 성숙율을 조사하여 보았다. 도표 1에서 볼 수 있듯이 2월 이후에 실험한 *R. dybowskii*의 난소조각들은 호르몬의 도움없이도 생체 외에서 배란을 일으키었다. 그러나 개체 차이가 있어서 animal No. 17과 No. 18은 호르몬(FPH)을 처리한 것과 거의 차이없이 배란이 일어났으나 No. 19는 배란율이 호르몬 처리군보다 (85%) 대조군이 약간 떨어지며 (51%), No. 20 개구리의 난소조각은 호르몬 처리군에서는 72%의 배란율을 보였으나 대조군에서는 거의 자발적 배란을 일으키지 않았다. 배란된 난자들은 예외없이 핵붕괴가 일어났으며 여포세포들이

붙어있지 않은 denude 상태이었다 (결과 표시하지 않음). 아직 난소조각에 남아 있는 여포들의 난자의 성숙상태를 알기 위하여 핵의 유무를 조사해본 결과 대부분 핵붕괴를 일으키었다. 호르몬 처리를 하지 않은 대조군에서도 No. 17, 18과 19는 모두 핵붕괴를 일으키었다. 그러나 자발적 배란을 일으키지 않은 No. 20에서는 50% 정도만 자발적 성숙을 일으키고 나머지는 핵(GV)을 간직하고 있었다 (Table 1). 따라서 난자의 성숙이 배란의 필요조건은 되나 충분조건은 되지 않는다는 것을 알았다.

고 찰

본 실험을 통하여 우리는 한국산개구리인 북방산개구리와 참개구리의 여포배양계를 확립하고 난자들의 성숙조건을 구하였으며 특히 일부의 개구리(북방산개구리)에서 여포들이 자발적인 성숙과 배란을 일으키는 현상을 발견하였다. 양서류를 사용하여 난자의 성숙 혹은 초기 발생 과정을 연구할 때 가장 많이 쓰이는 것으로 제노푸스(*Xenopus laevis*)와 범개구리(*Rana pipiens*)를 들 수 있겠다. 그러나 이러한 재료들은 우리나라에서 구할 수 없는 것들이므로 실험재료 확보에 어려움이 많다. 본 연구는 한국산개구리들의 생식계에 대한 기초자료를 제공함으로써 앞으로 이 분야에 대한 연구를 진행하는 데 도움을 줄 수 있다고 생각된다. 실험결과에서 보는 바와 같이 북방산개구리와 참개구리의 여포난자들은 progesterone과 뇌하수체 추출물(FPH)에 의해 성숙이 유도되었는데 전자의 난자들이 후자의 것보다 이들 호르몬에 더 민감하게 반응하는 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 1과 2). 본 실험에서 성숙유도에 사용한 호르몬들의 농도범위 (progesterone, 0.1-1 $\mu\text{g}/\text{well}$; FPH, 0.01-0.1 pit. equiv./well)은 범개구리에서 통상 사용되는 것과 일치하므로 (Smith and Ecker, 1971; Schuetz, 1967) 개구리(*Rana*)들의 종간에는 호르몬에 대한 감수성이 큰 차이가 없는 것처럼 보였다. 특히 개구리의 생식계는 개체의 차이나 계절적 요인에 의해 변하는 경우가 많으므로

(Masui and Clarke, 1979; Kwon and Schuetz, 1985) 한국산개구리들 사이의 차이도 큰 의미는 없다고 본다. 단지 북방산개구리의 성숙반응이 참개구리보다 더 안정적으로 일어나는 것을 알 수 있었다. 북방산개구리나 참개구리의 여포난자들은 대략 9-15시간 사이에서 난자의 성숙(핵붕괴)을 일으키었는데 (Fig. 3) 이 기간도 또한 범개구리의 경우와 거의 일치하는 것이다 (Schuetz and Samson, 1979).

2월 이후에 사용한 대부분의 북방산개구리에서 여포난자들이 *in vitro*에서 호르몬의 도움 없이도 성숙을 일으킨 것(자발적 성숙)은 매우 흥미로운 사실이었다. 본래 정상적인 양서류의 여포난자들은 호르몬의 자극 (progesterone 혹은 FPH)을 주어야만 성숙이 시작되며 (Masui and Clarke, 1979) 본 실험에서도 1월말까지 시행한 대부분의 실험에서 호르몬을 처리하지 않은 대조군에서는 거의 핵붕괴가 일어나지 않았다 (Figs. 1 & 2). 여포난자의 자발적 성숙현상은 포유동물에서는 전형적으로 볼 수 있는 것이나 양서류에서는 매우 드문 경우로서 제노푸스와 범개구리에서 그 예가 보고된 바 있다 (Vilain *et al.*, 1980; Lin and Schuetz, 1985). Lin과 Schuetz (1985)는 범개구리에서 특히 자연적인 번식기 (breeding season), 혹은 그 이후까지 저온실에 보관되었던 개구리들에서 간혹 (10%) 일어나는 것을 보고한 바 있다. 북방산개구리는 생식기가 참개구리나 옴개구리보다 일찍 와서 2월이면 흔히 산란된 알을 야외에서 관찰할 수 있으므로 역시 번식기와 자발적 성숙과 주요한 관련이 있을 것으로 추정된다. 그러나 범개구리와 다른 점은 번식기 이후라도 범개구리에서는 일부에서만 일어나나 북방산개구리는 거의 대부분의 개구리에서 자발적 성숙이 일어난다는 점이다. 2월말경에 실험한 개구리에서 자발적 성숙을 일으키는 난자들의 대부분이 3시간 동안에 핵붕괴를 일으킨 것과 이 기간이 호르몬(FPH)에 영향을 받지 않는다는 것 (Fig. 4)은 범개구리와 전혀 다른 점이다. 자발적 성숙을 일으킨 범개구리 난자의 성숙 기간은 정상적인 것과 같으며 호르몬(FPH) 처리에 의해 기간이 단축된다고 알려져 있기 때문이다 (Lin and Schuetz,

1985).

여포난자들이 자발적 성숙을 일으키는 원인에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나 다음 두가지 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째, 번식기(산란기)에 도달하면 호르몬에 대한 난자들의 감수성이 크게 증가하므로 (Lin and Schuetz, 1985), 정상적인 뇌하수체호르몬의 peak가 없어도 물리적 자극 혹은 어떤 환경변화에 의해 progesterone 수준이 약간 증가하면 성숙이 일어날 수 있다는 것이다. 뱀개구리의 경우 자발적 성숙을 일으키는 여포(난자)에서 progesterone의 작은 peak가 항상 핵붕괴에 앞서 일어난다는 사실 (Lin and Schuetz, 1985)은 이를 뒷받침하는 것 같다. 그러나 본 실험실에서 progesterone을 측정해본 결과 북방산개구리의 여포에서는 이러한 작은 peak가 나타나지 않았다 (Kwon *et al.*, 1988). 둘째, 번식기에 이르면 이러한 난자들의 세포질이 이미 성숙여건이 충족되어 성숙유도호르몬에 관계없이 생체에서 난소를 떼어 배양하는 물리적인 자극에 의해서도 스스로 성숙이 유도될 가능성을 들 수 있겠다. 본 결과에서 자발적 성숙을 일으킬 수 있는 여포들은 자발적 배란 까지도 일으킬 수 있다는 것은 (Table 1) 물리적인 자극의 중요성과 난자의 성숙여건이 충족되었다는 것을 보여주는 것으로 해석되었다. 앞으로 이 북방산개구리의 자발적성숙 기작에 대해서 더 많은 연구가 있어야 할 것이며 포유동물의 난자성숙 조절기작을 밝히는 데 응용이 될 수 있으므로 매우 흥미로운 과제라고 생각된다.

인용문헌

- Gerhart, J., M. Wu, M. W. and Kirschner, 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* **98**:1247-1255.
- Kwon, H. B. and A. W. Schuetz, 1985. Dichotomous effects of forskolin on somatic and germ cell components of the ovarian follicle; Evidence of cAMP involvement in steroid production and action. *J. Exp. Zool.* **236**:219-228.
- Kwon, H. B., J. Y. Kim, Y. S. Ahn, and Y. D. Yoon, 1988. Role of cAMP in the regulation of progesterone production and secretion by frog (*R. dybowskii*) follicles *in vitro*. (in preparation)
- Lin, Y.-W. and A. W. Schuetz, 1985. Spontaneous oocyte maturation in *Rana pipiens*: Estrogen and follicle wall involvement. *Gamete Res.* **12**:11-28.
- Maller, J. L., 1985. Oocyte maturation in amphibians. In: *Developmental Biology*, Vol. 1, Oogenesis (Browder, L., ed.). Plenum Press, New York and London, pp. 289-311.
- Masui, Y., 1974. A cytostatic factor in amphibian oocytes: Its extraction and partial characterization. *J. Exp. Zool.* **187**:141-147.
- Masui, Y., 1982. Oscillatory activity of maturation promoting factor (MPF) in extracts of *Rana pipiens* eggs. *J. Exp. Zool.* **224**:389-399.
- Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**:185-282.
- Masui, Y. and C. L. Markert, 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**:129-145.
- Meyerhof, P. and Y. Masui, 1979. Properties of a cytostatic factor from *Xenopus laevis* eggs. *Dev. Biol.* **72**:182-187.
- Newport, J. W. and M. W. Kirschner, 1984. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell* **37**:731-742.
- Schuetz, A. W., 1967. Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. *J. Exp. zool.* **166**:347-354.
- Schuetz, A. Q., 1974. Role of hormones in oocyte maturation. *Biol. Reprod.* **10**:150-178.
- Schuetz, A. W., 1985. Local control mechanisms during oogenesis and folliculogenesis. In: *Developmental Biology*, Vol. 1, Oogenesis (Browder L., ed.). Plenum Press, New York and London, pp. 3-83.
- Schuetz, A. W. and D. Samson, 1979. Nuclear requirement for post-maturational cortical differentiation of amphibian oocytes: Effects of cycloheximide. *J. Exp. Zool.* **210**:307-320.
- 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.
- Sunkara, P. S., D. A. Write, and P. N. Rao, 1979. Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:2799-2802.
- ValVilain, J. P., M. Moreau, and P. Guerrier, 1980. Uncoupling of oocyte-follicle cells triggers reinitiation of meiosis in amphibian oocytes. *Dev. Growth Diff.* **22**:687-691.

(Accepted March 11, 1988)

Studies on the Induction of Oocyte Maturation of Korean Frogs (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) *in vitro*.

Hyuk Bang Kwon, Chang Heun Cho, and Chung Gil Choi (Dept. of Biology, Chönnam National University Kwangju 500-757, Korea)

Korean frogs (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) were collected from chonnam area and their oocyte maturation was induced by using *in vitro* follicle culture system. Follicles were isolated from the frog ovary and cultured for 24 hr in amphibian Ringer's solution (AR) at 22 C in the presence or absence of hormones. Follicular oocytes of *R. dybowskii* were induced to mature (germinal vesicle breakdown, GVBD) by the presence of progesterone, 0.1 g/2 ml and that of *R. nigromaculata* by 1 g/2 ml of progesterone. Follicles of the frogs were also responded to frog pituitary homogenate (FPH) in terms of their oocyte maturation. Follicular oocytes of *R. dybowskii* were induced to mature by FPH at concentration of 0.01 pituitary equivalent/2 ml and that of *R. nigromaculata* at 0.1 pit. equiv./2 ml. The culture time required for the maturation of both frog follicles was 915 hr. The responsiveness of the follicles of korean frogs to hormones (progesterone or FPH) was nearly the same as that of *R. pipiens* which are most commonly used amphibians.

Particularly, follicular oocytes of *R. dybowskii* used from February matured spontaneously without stimulation of hormones during *in vitro* culture. Furthermore, those oocytes were spontaneously ovulated when the ovarian fragments were cultured in a flask.