

참개구리(*Rana nigromaculata*) 난자형성 단계에 따른 난황막 구조와 단백질 성분의 변화

이주영 · 이양림

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

참개구리의 난자형성 단계에 따른 난황막의 구조적 변화와 막단백질의 변화에 대하여 연구함으로써 난자형성에 따른 난황막의 기능적 분화의 가능성을 알아보고자 하였다. 난황막의 구조적 변화는 난자형성에 따른 미세융모의 수와 모양의 변화로 확인되었다. 그 수가 초기에는 적으나 중기에 증가하고 말기에 다시 감소하며, 그 모양도 처음에는 길고 가늘지만, 나중에는 짧고 굵어진다.

막단백질은 wheat germ agglutinin에 대해서만 특이하게 반응을 보이는 당단백질로서 작은 난모세포(직경 100-800 μm)와 큰 난모세포(직경 1800 μm)에서 다르게 나타난다. 분자량은 106 KD, 60 KD, 34 KD과 같이 어느 단계에서나 공통적으로 나타나는 단백질이 존재하는 반면에 특히 작은 난모세포의 난황막에서만 찾아 볼 수 있는 130 KD, 125 KD, 90 KD, 28 KD, 26 KD과 같은 단계 특이적으로 나타나는 막단백질도 있다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 난황막 단백질은 난자형성단계에 따라 변화한다는 사실을 알 수 있다.

KEY WORDS: Oocytes, Vitelline envelope, Membrane protein.

양서류의 난모세포는 endocytosis 과정에 의해 혈류로부터 난황 전구체를 받아들여 coated pit과 coated vesicle 그리고 multivesicular body로 이어지는 단계를 거치면서 난황립을 형성한다 (Wallace *et al.*, 1970; Ward, 1978; Wall and Patel, 1987, Kang and Lee, 1991). 이러한 난자형성 과정 동안의 단백질은 단계특이적으로 난황막 표면의 수용체를 매개로 난모세포내에 축적된다 (Opresko *et al.*, 1980; Opresko and Wiley, 1987; Laverdure and Soyez, 1988; Stifani *et al.*, 1988).

난황막은 일반적으로 난자형성 과정에 따라 구조적으로 변화하고 (Grey *et al.*, 1977; Dumont and Brummett 1978; Katagiri *et al.*, 1982; Jang, 1988; Shim and Lee, 1988; Sol, 1990; Han, 1991), 주요 성분은 다양한 분자량의 당단백질이다 (Glabbe and Vacquier, 1977; Lewis *et al.*, 1982; Rosati *et al.*, 1982; Niman *et al.*, 1984; Opresko and Wiley, 1987; Lee, 1988). *Xenopus*에서도 난

황막의 주요성분이 당단백질로서 (Grey *et al.*, 1977; Dumont and Brummett, 1978; Katagiri *et al.*, 1982; Gerton and Hedrick, 1986) 난황막이 Wheat germ agglutinin(WGA)과 Concanavalin A(ConA)에 대한 강한 결합 특이성을 보인다 (Charboneau *et al.*, 1986; Litvin and King, 1989).

막의 기능에 대해서 Jang(1988)과 Kim(1989)은 다모류인 *Schizobranchia*와 *Pseudopotamilla*에서 난자형성기간 동안 난모세포 표면막의 물질투과 기능이 단계 특이적이고 선택적으로 일어난다고 하여 물질 투과에서의 막단백질의 중요성을 직접적으로 시사하였다. 갑각류와 조류에서는 난황전구체의 난모세포에 의한 선택적 투과가 난모세포 표면막에 위치한 난황전구체 수용체와 난황전구체의 특이적인 결합에 의한 것임이 밝혀졌으며 (Laverdure and Soyez, 1988; Stifani *et al.*, 1988), *Salmo*에서는 난황전구체가 bovine serum albumin(BSA)보다 60배 빠르게 난모세포로 투과

되었다(Tyler *et al.*, 1988). *Xenopus*의 경우 난모세포의 표면막은 biotin의 투과를 조절하는 체계를 가지며(Said *et al.*, 1990), glutamine의 투과를 위한 전달체계가 난모세포막에 존재함과 동시에 완전히 성숙한 난모세포의 아미노산 투과능은 감소하였다(Taylor *et al.*, 1989). 또한 난모세포내의 난황단백질 축적이 난모세포 표면의 난황전구체 수용체의 특이적인 결합에 따른 것이며, 혈청 단백질 보다 25-50배 빠르게 난황전구체가 난모세포로 투과된다는 보고가 있다(Wallace and Jared, 1969; Wallace *et al.*, 1970; Opreko *et al.*, 1980).

본 연구에서는 이러한 난황막의 단계 특이적인 기능이 난모세포막의 구조와 성분의 변화에서 비롯되었을 것이라고 생각되어 지금까지 양서류에서는 거의 보고되지 않은 난자형성 단계에 따른 난황막의 구조 및 성분의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험 동물 및 재료

경기도 일대에서 채집한 참개구리(*Rana nigromaculata*)를 8°C의 냉장실에서 산소를 공급하면서 보존하였다. 20분 정도 얼음 상자속에 묻어두어 동면 상태가 된 암컷의 복면을 해부하여 취한 난소를 0.2% collagenase를 포함한 OR용액(90 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 4 mM Tris, pH 8.0)(Jared and Wallace, 1969)에 넣고 2시간 동안 30°C에서 배양하여 난모세포를 둘러싸고 있던 여포세포들을 제거함과 동시에 난모세포들을 낱개로 분리하였다.

난모세포의 크기 및 난황막의 분리

여포세포가 제거된 난모세포를 침강속도의 차이와 900-1000 μm 직경의 gauze를 이용하여 900-1800 μm 직경의 큰 난모세포군과 100-800 μm 직경의 작은 난모세포군으로 분리하였다(Fig. 1a, b). 그 다음 난모세포를 Dounce homogenizer로 분쇄하여 각각 135 μm 직경과 60 μm 직경의 Nitex mesh를 사용하여 OR용액으로 씻어주면서 걸러 mesh 위에 남아 있는 난황막을

모았다. 난황막에 남아 있는 난황립은 원심 분리기를 사용하여 광학현미경으로 난황막에 난황립이 보이지 않을 때까지 씻어주었다(Fig. 1c, d).

투과 전자 현미경

투과 전자 현미경 관찰을 위한 난모세포는 collagenase를 처리하지 않고 난소의 일부를 취해 고정, 포매하였다. 여포세포와 함께 취한 난모세포를 1차 고정액(0.2 M Millonig's phosphate buffer, pH 7.5, 1% O₂O₄)으로 1시간 30분간 전고정을 하고 2차 고정액(0.625% NaHCO₃, 0.1 M Millonig's phosphate buffer, pH 7.5, 1% O₂O₄)으로 1시간 동안 후고정을 하였다. 고정된 끝난 난소를 ethanol series로 탈수한 후 Epon 혼합액(Epon 812 + dodecyl succinic anhydride (DDSA):Epon 812 + methyadic anhydride (MNA) = 3:7, 2% DMP-30)으로 포매한 뒤 중합하였다. 포매된 난소는 ultramicrotome으로 70-80 μm 의 초박 절편을 만들고 lead citrate와 sodium citrate 혼합액으로 이중염색을 하여 관찰하였다.

Lectin 결합

0.2% collagenase를 처리하여 여포세포를 제거한 난모세포를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Fluorescein-isothiocyanate-labeled wheat germ agglutinin (FITC-labeled WGA)과 FITC-labeled Concanavalin A(ConA)를 녹인 OR용액에서 30분간 10°C에서 배양하여, OR용액으로 난모세포를 씻어준 다음 형광현미경(ZEISS III RS)으로 관찰하였다.

난황막 단백질의 분리와 전기 영동

크기별로 분리된 난황막 부피의 10배가 되는 SDS 추출완충액(2% sodium dodecylsulfate (SDS), 5% β -mercaptoethanol, 10 mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA), 50 mM Tris, pH 7.0)을 난황막에 부어 끓는 물에서 중탕하고 미리 차게 준비된 acetone에 첨가한 뒤, -70°C에 보관하여 막단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 수동식 원심 분리기를 사용하여 acetone으로 씻어주고 N₂ gas로 건조시킨 다음 시료 완충

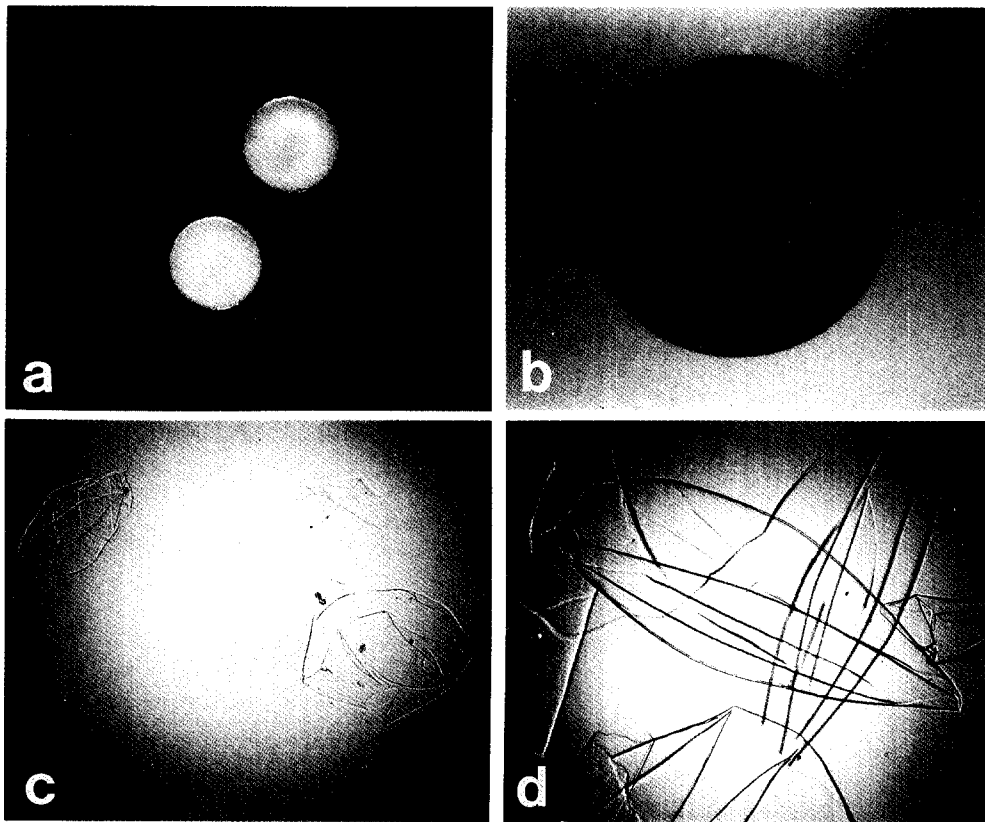


Fig. 1. Vitelline envelopes (c and d) isolated from oocytes of 100 μm - 800 μm (a) and 1800 μm in diameter (b), respectively.

액(2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 50 mM Tris, 15% glycerol, 0.03% bromphenol blue, pH 7.0)을 2 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ 으로 첨가하여 녹였다. 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법으로 시행하였으며, Merrill 등(1981)의 방법에 따라 염색하였다.

난황막 단백질의 ^{125}I 표지 및 자기 방사법

Iodogen(1, 3, 4, 6, -tetrachloro-3 α , 6 α diphenyl glycoluril)으로 coating된 용기에 각각 1.5 ml의 큰 난모세포와 0.5 ml의 작은 난모세포를 넣고 OR용액을 첨가하여 총부피가 3 ml과 1 ml이 되도록 한 후 ^{125}I (Amersham, specific activity 15.6 mCi/ μg)를 600 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 씩 첨가하여 약하게 흔들며 주면서 15°C에서 15분간 배양하였다. 0.25 M NaI를 포함한 OR용액으로 난모세포

들을 씻어주고 난모세포로부터 막 단백질을 추출하였다. 이 난황막 단백질을 전기영동한 다음 gel을 여과지(Whatman filter paper No. 3)에 건조시키고 X-ray film(Agfa curix RP1)에 -70°C에서 120시간 노출시켜 자기 방사하였다.

결 과

계절별 난모세포의 크기 분포

*Rana nigromaculata*의 난모세포의 크기가 난자형성 과정과 관련하여 나타내는 계절적 분포를, 6월에서 11월까지 5회에 걸쳐 각 20여 마리씩의 개체에서 무작위로 얻은 300 여개의 난모세포의 크기를 측정하여 알아보았다. 노란색을 띠며 직경 500 μm 이하의 작은 크기가 대부분인 6월의 난모세

포는 시기가 지날수록 점차 크기가 증가하였다. 9월에 이르면 개체의 차이가 나타나면서 노란색의 성숙하지 않은 난모세포와 회색을 띠는 직경 900 μm 이상의 난모세포를 가지는 경우로 구분되었다. 그 후 10월, 11월이면 동물극과 식물극이 뚜렷이 구분되어 완전히 성숙한 난모세포가 되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

난자형성 과정에 따른 난모세포 표면막 구조의 변화

단계별로 난소를 취하여 난모세포의 표면막을 투과전자 현미경으로 관찰함으로써 난자형성 과정 동안의 막구조 변화를 살펴보았다. 직경 220 μm 인 초기 단계의 난모세포에서는 원형질막으로부터 용기한 미세융모가 약간의 간격을 두고 표면에 분포하면서 일부는 여포세포층으로부터 돌출된 미세융모와 연결하였다(Fig. 3a). 난자형성의 중간 단계라고 생각되는 직경 810 μm 의 난모세포의 표면막은 미세융모가 크게 증가하여 매우 조밀하게 분포하였다. 초기 단계에서는 보이지 않던 filament 층이 뚜렷이 형성되어 방향성 없이

밀도 있게 퍼져 있었고, 미세융모가 이 filament 층을 뚫고 나와 여포 세포층과 연결하고 있었다

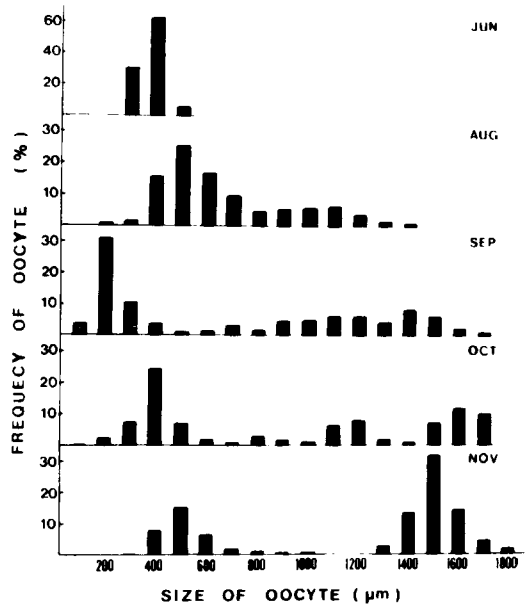
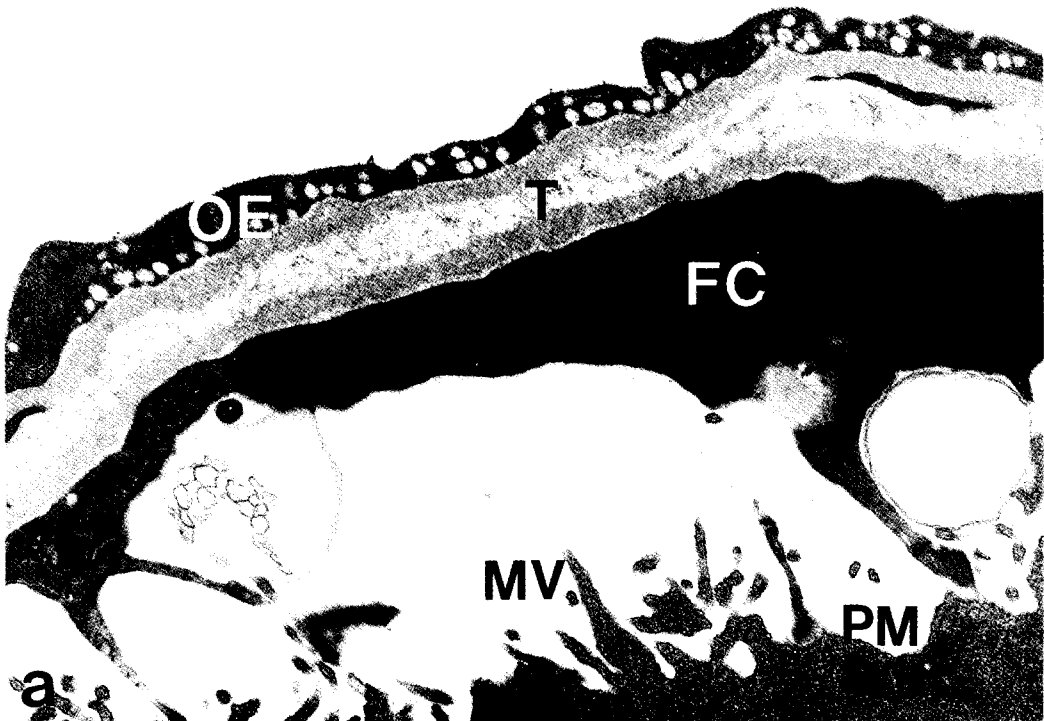


Fig. 2. Seasonal variation of the size distribution of oocytes.



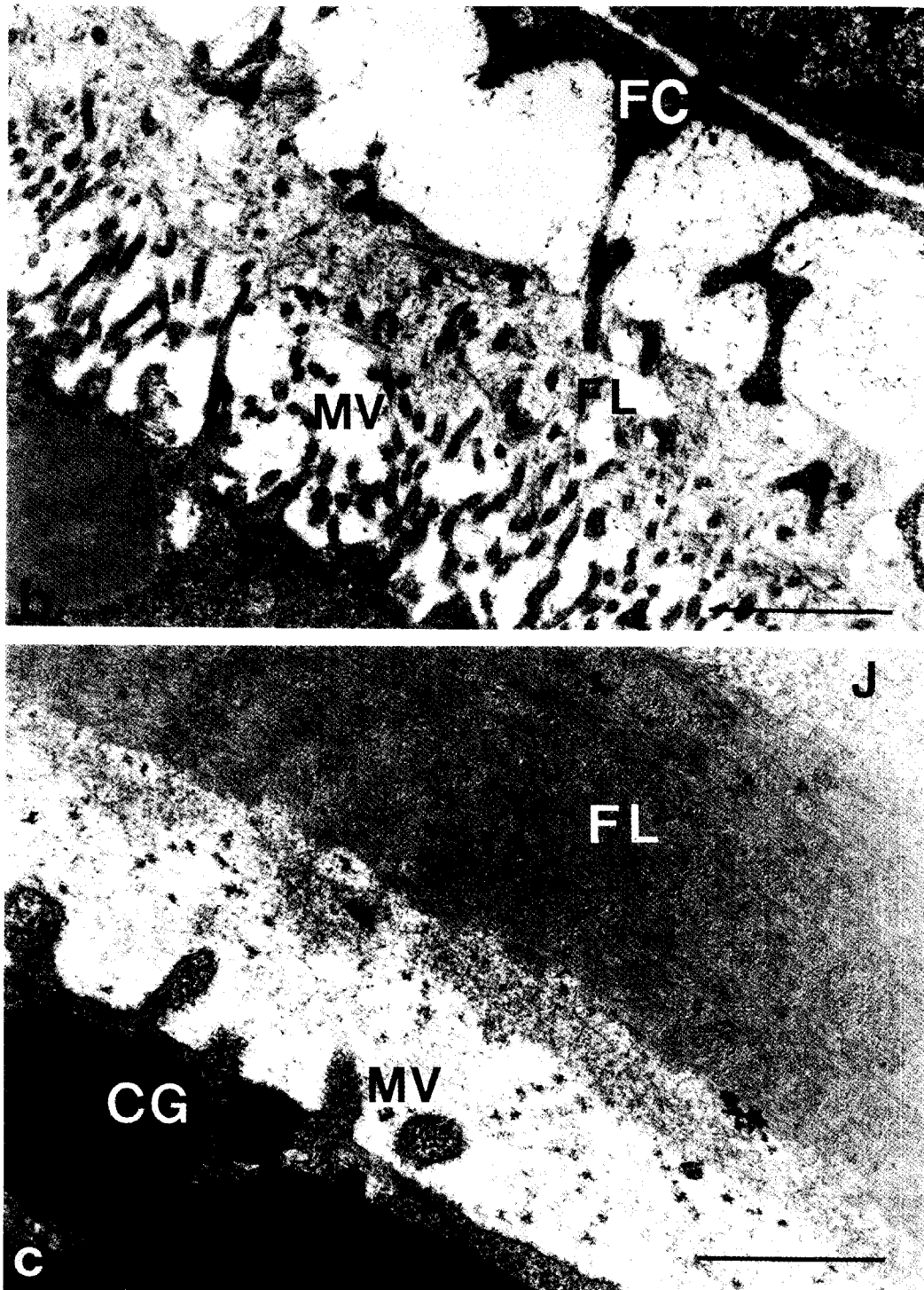


Fig. 3. Transmssion electron micrographs of the surface of the oocytes of 220 μm (a), 810 μm (b) and 1870 μm in diameter (c). OE: ovarian epithelium, PM: plasma membrance, FC: follicle cells, T: theca, FL: filament layer, O: oocyte, MV: microvilli, CG: cortical granule, J: jelly layer. Scale bar indicates 1 μm .

(Fig. 3b). 또한 직경 1870 μm 의 난모세포는 뚜렷하게 짧고 굵어진 미세융모를 가지고 있으며 그 수도 현저하게 감소하였다. Filament 층은 전 단계에 비해 더 넓어지고 훨씬 조밀하게 난모세포의 표면과 평행한 방향으로 배열하고 있어 이 난황막 층은 산란에 임박해서 방향성을 가진다고 판단되었다. 또한 이 단계의 뚜렷한 특징으로 나타난 켈리층이 난모세포의 제일 바깥쪽에 위치하고 있었으며 여포세포층은 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 3c).

난모세포 표면의 lectin에 대한 결합특이성

난자형성 단계에 따라 *Rana nigromaculata*의 난황막이 가지는 탄수화물 잔기와 그 결합의 변화 여부를 알아보려고 0.2% collagenase를 처리한 난모세포를 FITC-labeled WGA와 Con A로 처

리하여 나타나는 형광과 난모세포 크기와와의 관계를 알아보았다. FITC-labeled WGA와 난모세포막과의 결합에서 195 μm 직경의 초기단계 난모세포는 매우 희미한 형광을 나타내었다. 형광의 정도는 난모세포의 크기가 증가할 수록 점차 강해져서 586-617 μm 직경의 난모세포에서 가장 강한 형광을 보이고, 난황단백질이 난모세포내에 축적된 말기 단계에서는 전혀 형광을 나타내지 않았다(Fig. 4). 반면 FITC-labeled ConA로 처리한 난모세포는 전혀 형광을 나타내지 않았다. 이와 같은 난모세포 표면의 WGA에 대한 친화도는 난모세포의 난황막이 난자형성의 중간 단계에서 특이적인 당단백질을 가지며 그 탄수화물 잔기가 N-acetyl- β -D-glucosamine 임을 나타내었다. 또한 난모세포의 크기에 따라 변화하는 친화도의 차이는 난자형성 단계에 따라 표면막의 당단백질

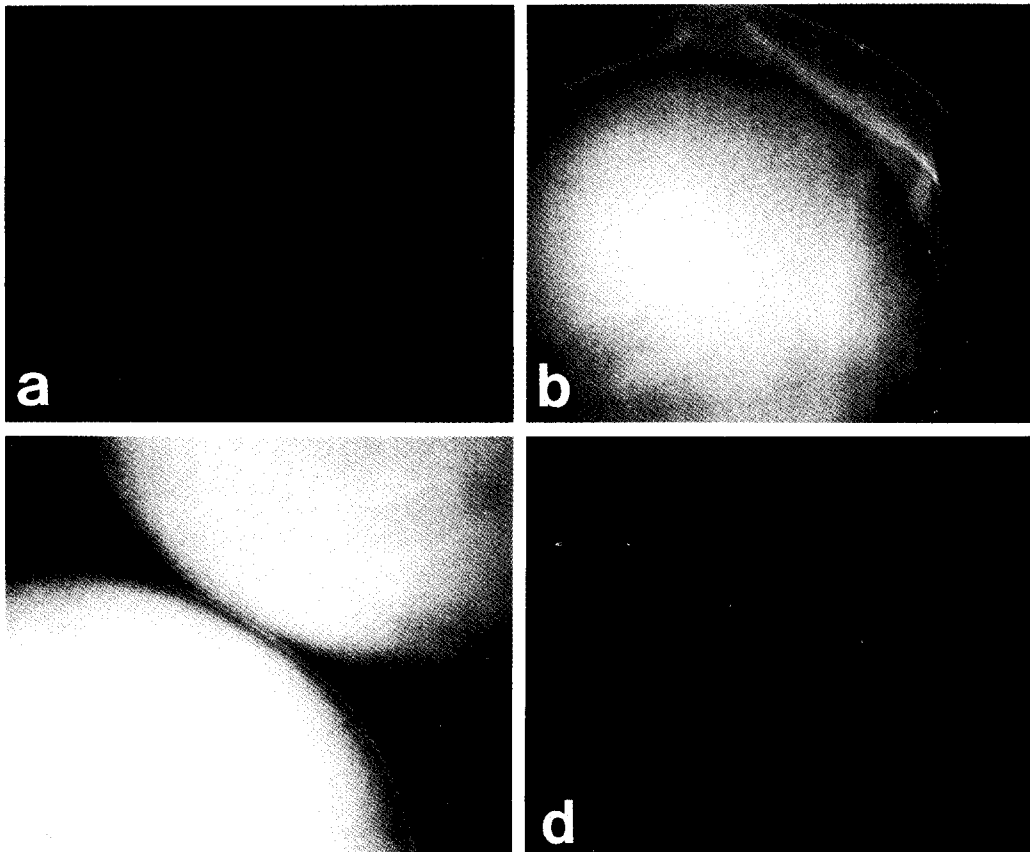


Fig. 4. Changes in the affinity of the oocyte surface of various stage to FITC-labeled WGA. The size of oocyte is 200 μm (a), 400 μm (b), 600 μm (c) and 900 μm in diameter (d).

조성이 변화함을 암시하였다.

난모세포 단백질

Polyacrylamide gel 전기영동으로 작은 난모세포와 큰 난모세포에서 각각 추출한 단백질을 분석하였다. 그 결과 약 25종류의 단백질 띠를 볼 수 있었는데, 일부 단백질은 작은 난모세포와 큰 난모세포에서 일치하였고 몇몇 단백질은 크기에 따라 다르게 나타났다. 작은 난모세포에서만 나타나는 단백질로 67 KD, 44 KD, 42 KD, 39 KD, 32 KD, 28 KD, 26 KD의 단백질이 있었고, 81 KD, 78 KD, 65 KD, 58 KD, 45 KD, 33 KD, 22 KD의 단백질 등은 큰 난모세포에서만 특이하게 나타났다(Fig. 5). 두 크기의 난모세포 단백질을 비교할 때 나타나는 가장 큰 차이는 33 KD 단백질이 작은 난모세포에서는 나타나지 않다가 큰 난모세포에서 다량 나타난다는 것으로, 이 단백질이 난자형성 단계가 진행됨에 따라 난모세포에 새로이 축

적된 난황단백질이라고 생각되었다. 33 KD 단백질의 새로운 축적과 각 크기의 난모세포에서 특이하게 나타나는 단백질, 그리고 두 난모세포에서 공통적으로 나타나더라도 양적인 차이를 보이는 단백질들은 난모세포가 난자형성 단계에 따라 특이한 단백질을 생성하고 축적함을 암시하고 있었다.

난황막 단백질

난모세포에서 나타나는 단백질의 대부분이 막 단백질에서는 나타나지 않았다. 작은 난모세포와 큰 난모세포의 난황막 단백질을 비교하였을 때 공통적으로 나타나는 단백질로는 106 KD, 60 KD, 34 KD 단백질이 있었다. 특히 작은 난모세포의 난황막에서 130 KD, 125 KD, 90 KD, 28 KD와 26 KD 단백질이 단계 특이적으로 나타났다(Fig. 6 ★표).

Polyacrylamide gel 전기영동법에 의한 막단백질 분석에서 분리가 되지 않았거나 소량인 관계로 나타나지 않은 단백질의 유무를 확인해보고,

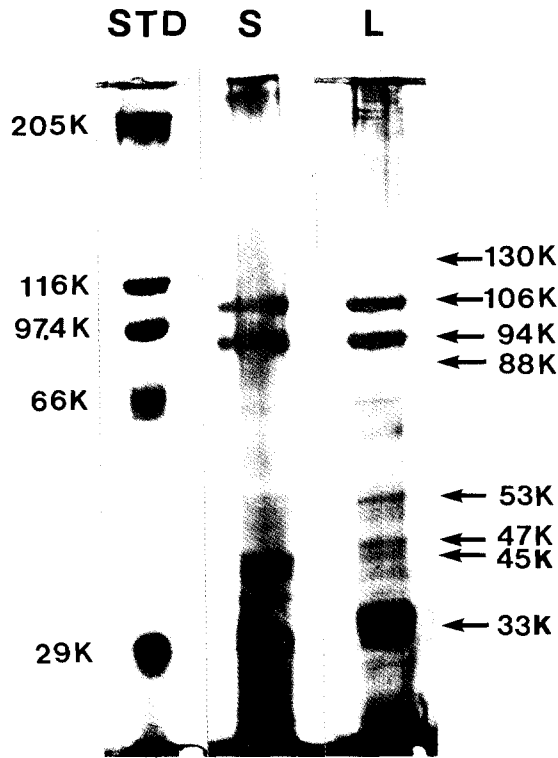


Fig. 5. Electrophoretic patterns of total proteins of small (S, 100-800 μm diameter) and large oocytes (L, 1800 μm diameter).

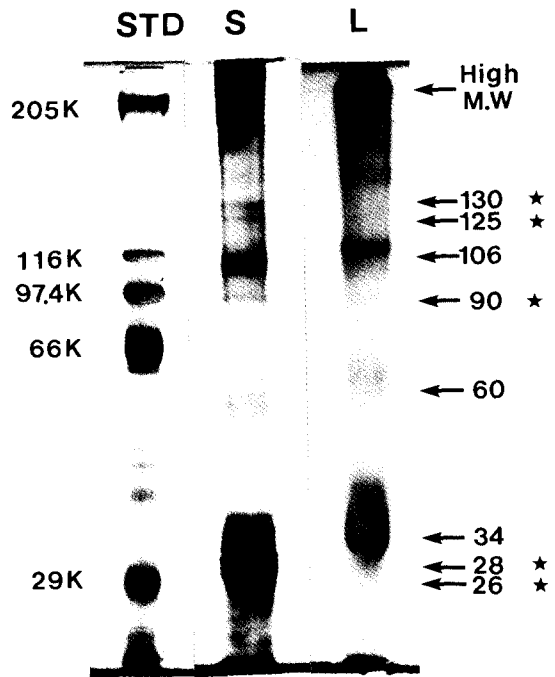


Fig. 6. Electrophoretic patterns of membrane proteins of the vitelline envelopes of small (S) and large oocytes (L). Stars (★) indicate membrane proteins specific to the small oocytes.

또한 순수하게 난황막 단백질이 분류되었는지 알아보기 위해 ^{125}I 로 표지한 난모세포 표면에서 추출된 막단백질을 전기영동한 후 자기방사법을 실시하여 난황막 단백질을 분석하였다. 큰 난모세포의 난황막 단백질은 106 KD, 60 KD, 34 KD의 단백질 띠를 나타내며 표지하지 않은 경우와 일치하였다. 작은 난모세포의 난황막 단백질은 표지된 단백질 양이 소량이었던 관계로 전기영동에 의한 단백질 분리가 잘 이루어지지 못했지만 Fig. 6의 작은 난모세포의 난황막 단백질과 비교할 때 34 KD와 28 KD 단백질이 있는 것은 확실하며, 34 KD부터 26 KD 부분의 띠가 약하긴 하나 34 KD, 28 KD, 26 KD로 분리되어 나타남을 볼 수 있었다. 130 KD, 125 KD, 106 KD와 90 KD 부분은 뚜렷이 분리되어 보이지 않았으나 106 KD 단백질 띠는 희미하게 볼 수 있었고 이를 중심으로 양쪽 부위에도 감광이 된 것으로 볼 때 130 KD-90 KD 부분에 단백질이 있음을 추측할 수 있어 작은 난황막 단백질도 표지하지 않은 단백질과 일치한다고 판단하였다(Fig. 7). 이와 같은 결과로 미루어보아 난황막 단백질은 난자형성 단계에 따라 변화한다는 사실을 알 수 있었다.

고 찰

전자현미경을 이용한 막 구조의 분석과 lectin과의 결합양상 그리고 전기 영동에 의한 막 단백질의 분석 결과는 난자형성 단계에 따라 참개구리의 난황막이 변화함을 보여주었다.

난자형성 과정동안의 막구조의 변화에 대한 연구는 다모류, 불가사리, 모기, 경골어류 및 양서류에서 수행된 바 있다(Grey *et al.*, 1977; Dount and Brummett, 1978; Katagiri *et al.*, 1982; Jang, 1988; Shim and Lee, 1988; Sol, 1990; Han, 1991). 특히 다모류에서는 난모세포 표면막과 미세융모의 구조 및 크기 그리고 숫적인 차이가 난황축적 시기와 관련하여 나타나, 장막(chorion) 층이 중간 단계에 이르면 초기의 3층 구조에서 4층 구조로 변화되고 미세융모의 수도 최대로 증가하면서 미세융모의 끝에 가시구조가 형성되다가 말기 단계에 이르면 수축한다(Jang, 1988; Shim

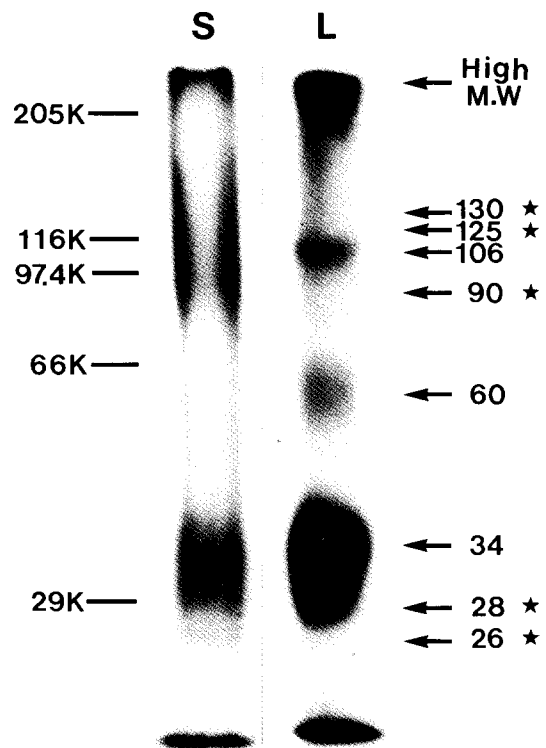


Fig. 7. Autoradiographic patterns of the membrane proteins of the vitelline envelopes in small (S) and large oocytes (L). Membrane proteins were labeled with ^{125}I and analyzed by PAGE. Stars (★) indicate membrane proteins specific to the small oocytes.

and Lee, 1988). 양서류에서는 난모세포막의 구조변화가 수란관을 통과하면서 일어난다. *Xenopus*의 경우, 난황막은 난자형성 제 II 단계의 난모세포 표면과 여포세포 사이에 형성되기 시작하여 VI단계에 이르면 미세융모가 통과하는 구멍이 형성되어 여포세포의 순환계로부터 난모세포의 표면으로 난황진구체를 비롯한 비교적 큰 분자의 통과가 가능해진다. 또한 *Bufo*에서도 *Xenopus*와 유사한 변화가 일어나는 것으로 알려져 있다. *Bufo*의 난황막의 filament 다발은 난모세포 표면과 평행하게 배열한 것과 수직으로 배열한 것이 섞여 있으면서 수란관에서 미립자 물질이 첨가되면 filament 다발이 분산되고 구멍이 사라지면서 더 단단해진다(Grey *et al.*, 1977; Dumont and Brummett, 1978; Katagiri *et al.*, 1982). 이와같은 막구조의 변화와 더불어 보고된, 난황형성 시기의 난모세포 표면에서 나타나는 coated pit과 vesicle의

속적인 증가는 endocytotic mechanism에 의한 난황전구체의 투과가 막의 구조변화와 관련있음을 암시해 주었다.

또한 당단백질이 막의 주요 성분이라는 것은 양서류를 비롯한 다모류, 전복, 성게, 해조류와 포유류 등에서 이미 보고된 바 있다(Glabe and Vacquier, 1977; Lewis *et al.*, 1982; Gerton and Hedrick, 1986; Opresko and Wiley, 1987; Lee, 1988). Lee(1988)는 특히 난황막의 당단백질 조성이 단계에 따라 변화함을 보여 주었다. 양서류의 난황막에서도 단계에 따른 변화는 확인되지 않았으나 당단백질이 존재한다(Charbonneau *et al.*, 1986; Litvin and King, 1989). 막단백질의 주요 구성 성분이 당단백질이라는 이러한 보고들은 난황막에 존재하는 정자수용체와 난황전구체 수용체가 당단백질이라는 보고와도 깊은 연관성을 갖는 것으로 보여진다(Lewis *et al.*, 1982; Yoshida and Aketa, 1983; Ruiz-Bravo *et al.*, 1986). 난황막 구성 성분의 변화에 대한 증거는 해조류와 *Xenopus*의 난모세포에서 chorion층으로 투과된 [³H] fucose의 양이 단계에 따라 달라지는 것과 *Schizobranchia*에서 볼 수 있는 난황막 단백질의 활발한 교체율, 그리고 단계에 따른 특이한 합성물에서도 찾아볼 수 있으며 이는 난황막의 단계에 따른 조성 변화와 기능적 역할 변화를 암시한 것이다(Rosati *et al.*, 1982; Pinto *et al.*, 1985; Lee, 1988).

일반적으로 난황막은 선택적으로 물질 투과를 조절한다. 다모류에서 체강액 단백질은 특정단계에서 선택적으로 투과한다(Jang, 1988; Kim, 1989). *Salmo* 난모세포에서는 BSA 보다 난황전구체의 투과가 60배나 빠르다(Tyler *et al.*, 1988). 또 *Xenopus*에서는 아미노산과 혈청 단백질의 투과에 비해 난황전구체의 투과가 20-50배나 더 빠르다(Wallace and Jared, 1969; Wallace *et al.*, 1970; Taylor *et al.*, 1989). 이러한 선택적인 물질 투과는 막의 특이한 구조나 성분의 존재를 암시해준다. *Schizobranchia*와 *Pseudopotamilla*에서 난황막을 WGA나 혹은 endoglycosidase F로 처리하여 당단백질을 변경시켰을 때 난황단백질의 투과가 저해되는 것으로 보아 난황막의 당단백질이 단백질 투과 조절과 관련이 있음을 알 수 있다(Jang,

1988; Kim, 1989). 이와같은 관찰로 비추어 볼 때 *Rana nigromaculata*의 작은 난모세포의 난황막에서 특이적으로 나타난 5종류의 단백질은 난모세포의 성숙에 따른 외부로부터의 난황단백질 축적과 관련이 있을 가능성이 있다. 즉, 난모세포의 크기가 단백질 투과율의 조절요인이 되는 점과 관련지어 생각해볼 때, 초기 단계의 난모세포가 성숙하여 난황형성 시기에 접어들면 혈류로부터 난황전구체만을 선택적으로 투과 시키는 역할에 대한 가능성을 생각해 볼 수 있다(Wallace *et al.*, 1970). 즉, 난자형성이 진행됨에 따라 난황단백질의 축적이 성취되는 때에 맞추어 난황막 단백질에도 변화가 있는 것으로 추측되었다.

인용문헌

- Charbonneau, M., L. Bufesne-Duble and P. Guerrier, 1986. Inhibition of the activation reaction in *Xenopus laevis* egg by the lectins WGA and SBA. *Dev. Biol.* **114**: 347.
- Domont, J. N. and A. R. Brummett, 1978. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J. Morphol.* **155**: 73-98.
- Gerton, G. L. and J. L. Hedrick, 1986. The vitelline envelope to fertilization envelope conversion in eggs of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **116**: 1-7.
- Glabe, C. G. and V. D. Vacquier, 1977. Isolation and characterization of the vitelline layer of Sea Urchin eggs. *J. Cell Biol.* **75**: 410-421.
- Grey, R. D., P. K. Working and J. L. Hedrick, 1977. Alteration of structure and penetrability of the vitelline envelope after passage of eggs from coelom to oviduct in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* **201**: 73-84.
- Han, J. W., 1991. Ultrastructural changes of oocytes surfaces during oogenesis of the starfish, *Asterina pectinifera* (Müller and Troschel). M. S. Thesis Ewha Womans University, Seoul, Korea. 10-16.
- Jang, J. W., 1988. Ultrastructural and functional changes of the oocytes surfaces related to the formation of yolk granules during oogenesis of *Schizobranchia insignis* Bush. A Dissertation for Ph.D. Ewha Womans University, Seoul, Korea. 26-47, 64-102.
- Jared, D. W. and R. A. Wallace, 1969. Protein uptake in vitro by amphibian oocyte. *Exp. Cell Res.* **57**: 454-458.
- Kang, W. S. and Y. R. Lee, 1991. Ultrastructural changes of cytoplasmic organelles during oogenesis of the

- polychaete, *Pseudopotamilla ocellata* Moore. *Kor. J. Zool.* **34**: 217-227.
- Katagiri, C., Y. Iwao and N. Yoshizaki, 1982. Participation of oviducal pars recta secretions in inducing the acrosome reaction and release of vitelline coat lysin in fertilizing toad sperm. *Dev. Biol.* **94**: 1-10.
- Kim, Y. N., 1989. Selective transport of yolk precursor through the vitelline envelope during oogenesis of *Pseudopotamilla ocellata* Moore. M. S. Thesis, Ewha Womans University, Seoul, Korea. 10-18.
- Laverdure, A. M. and D. Soyez, 1988. Vitellogenin receptors from lobster oocyte membrane: solubilization and characterization by a solid phase binding assay. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* **13**: 251-266.
- Laemi, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, Y. R., 1988. Changes in the protein components of vitelline envelope during oogenesis of a tubiculous polychaete, *Schizobranchia insignis*. *Dev. Cell Differ.* **25**: 23-26.
- Lewis, C. A., C. F. Talbot and V. D. Vacquier, 1982. A protein from abalone sperm dissolves the egg vitelline layer by a nonenzymatic mechanism. *Dev. Biol.* **92**: 227-239.
- Litvin, J. and M. L. King, 1989. Cell surface proteins of whole *Xenopus* embryos identified by radioactivation. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**: 141-147.
- Merrill, C. R., D. Goldman, S. A. Sedman and M. H. Ebert, 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation on cerebrospinal fluid proteins. *Science* **21**: 1437-1438.
- Niman, H. L., B. R. Hough-Evans, V. D. Vacquier, R. J. Britten, R. A. Lerner and E. H. Davidson, 1984. Protein of the Sea Urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) egg vitelline layer. *Dev. Biol.* **102**: 390-481.
- Opresko, L. K., H. S. Wiley and R. A. Wallace, 1980. Differential postendocytotic compartmentation in *Xenopus* oocytes is mediated by a specifically bound ligand. *Cell* **22**: 47-57.
- Opresko, L. K. and H. S. Wiley, 1987. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. I. Characterization of the vitellogenin receptor system. *J. Biol. Chem.* **262**: 4109-4115.
- Pinto, M. R., L. Santiella, G. Casazza, F. Rosati and A. Monroy, 1985. The differentiation of vitelline envelope of *Xenopus* oocytes. *Dev. Growth and Differ.* **27**: 189-200.
- Rosati, F., F. Cotelli, R. De Santis, A. Monroy and M. R. Pinto, 1982. Synthesis of fucosyl-containing glycoproteins of the vitelline coat in oocytes of *Ciona intestinalis* (Ascidia). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 1908-1911.
- Ruis-Bravo, N., D. Earles and W. Lennarz, 1986. Identification and partial characterization of sperm receptor associated with the newly fertilization envelope from Sea Urchin eggs. *Dev. Biol.* **117**: 204-208.
- Said, H. M., L. Polenzani, S. Khorchid, D. Hollander and R. Miledi, 1990. Uptake of biotin by native *Xenopus laevis* oocytes. *Am. J. Physiol.* **259**: C397-C401.
- Sato, M. and K. Osanai, 1983. Sperm reception an egg microvillus in the polychaete, *Tyllorrhynchus heterochaetus*. *J. Exp. Zool.* **227**: 459-469.
- Sato, M. and K. Osanai, 1986. Morphological identification of sperm receptors above egg microvilli in the polychaete, *Neanthes japonica*. *Dev. Biol.* **113**: 263-270.
- Shim, J. K. and Y. R. Lee, 1988. Ultrastructural change at the surface of oocyte in the sabellid polychaete, *Pseudopotamilla ocellata* Moore. *Kor. J. Zool.* **31**: 165-176.
- Sol, T. M., 1990. Ultrastructural change in the egg chamber during oogenesis of *Aedes togoi*. M. S. Thesis. Ewha Womans University, Seoul, Korea. 14-16.
- Stifani, S., R. George and W. J. Schneider, 1988. Solubilization and characterization of the chicken oocyte vitelline receptor. *Biochem. J.* **250**: 467-475.
- Taylor, P. M., H. S. Hundal and M. J. Rennie, 1988. Transport of glutamine in *Xenopus laevis* oocytes: Relationship with transport of other amino acids. *J. Membrane Biol.* **112**: 149-157.
- Tyler, C. R., J. P. Sumpter and N. R. Bromage, 1988. Selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* **248**: 199.
- Wall, D. A. and S. Patel, 1987. Multivesicular bodies play a key role in vitellogenin endocytosis by *Xenopus laevis* oocytes. *Dev. Biol.* **119**: 275-289.
- Wallace, R. A. and D. W. Jared, 1969. Studies on amphibian yolk. III. The estrogen-induced hepatic synthesis of a serum lipophosphoprotein and its selective uptake by the ovary and transformation into yolk platelet proteins in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **19**: 498-526.
- Wallace, R. A., D. W. Jared and B. L. Nelson, 1970. Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. I. Preliminary studies. *J. Exp. Zool.* **175**: 259-270.
- Ward, R. T., 1978. The origin of protein and fatty yolk in *Rana pipiens*. IV. Secondary vesicular yolk formation in frog oocytes. *Tissue and Cell* **10**: 525-534.
- Yoshida, M. and K. Akeda, 1983. A 225K dalton glycoprotein is the active core structure of the sperm binding factor of the Sea Urchin *Anthocidaris crassispina*. *Exp. Cell Res.* **148**: 243-248.

**Changes in Ultrastructure and Protein Components of Vitelline Envelopes
during Oogenesis of *Rana nigromaculata* Hallowell**

Joo-Young Lee and Yang-Rim Lee (Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul
120-750, Korea)

Vitelline envelopes of *Rana nigromaculata* were studied with respect to the changes in structure and membrane proteins in order to see a possibility of functional differentiation of the envelopes during oogenesis. Ultrastructural changes of the envelopes were confirmed by observing variation of the number and shape of microvilli. The number of microvilli is relatively constant at the early stage, but increases at the intermediate and decreases at the late stages. Compositional changes of the vitelline envelopes were confirmed by the difference of glycoproteins of the vitelline envelopes between the small (100-800 μ m in diameter) and the large oocytes (1800 μ m in diameter). Whereas proteins such as 106 KD, 60 KD, 34 KD exist at both stages, proteins of 130 KD, 125 KD, 90 KD, 28 KD and 26 KD are specific to the small size class. The observation suggests that the vitelline envelopes functionally differentiate during oogenesis.