

북방산개구리 난자의 자발적 성숙에 관한 연구

안련섭 · 최한호 · 권혁방 · 배동규

전남대학교 자연과학대학 생물학과

본연구는 북방산개구리 여포난자의 자발적 성숙과 관련된 몇가지 요인들에 대해 조사하였다. 자발적 성숙을 일으키는 여포에서 여포조직을 제거하여 denuded 난자를 만든다음 배양했을 때에는 자발적 성숙을 일으키지 않았다. 이들 denuded 난자에 frog pituitary homogenate (FPH, 0.05 gland/ml)를 처리하여도 역시 성숙이 일어나지 않았으나 progesterone (P_4 , 0.5 $\mu\text{g/ml}$)을 처리하였을 때에는 성숙이 일어났다. 동면기간에 여포들이 생성하는 P_4 와 testosterone (T)의 양을 측정해본 결과 동면초에는 비슷한 양의 P_4 와 T를 생성하였으나 후기에는 P_4 만 생성하고 T는 거의 생성하지 않았다. 배양액에 estradiol을 첨가하면 농도에 의존하여 FPH에 의해 촉진된 P_4 의 생성을 억제할 뿐 아니라 성숙도 비가역적으로 억제하였다. 배양액에 첨가한 hypoxanthine은 cAMP와 항진적으로 난자의 성숙을 억제하였다. 이러한 결과들은 자발적 성숙과정에 여포세포와 P_4 /T 비율의 증가가 중요한 요인이 된다는 것과 일반적인 난자성숙억제제는 자발적 성숙을 역시 억제한다는 것을 보여준다.

KEY WORDS: Spontaneous maturation, Amphibia, *Rana dybowskii*

대부분의 척추동물에서 여포난자는 성장이 완료된 후에도 감수분열 전기에 머물러 있다가 번식기 혹은 발정기에 이르러 뇌하수체 호르몬의 자극이 있을 때 분열이 재개된다 (Masui and Clarke, 1979). 그러나 이러한 난자의 성숙재개작은 동물의 종에 따라 다르다. 양서류에서는 뇌하수체호르몬의 자극으로 여포세포가 생성한 progesterone (P_4)이 성숙을 유도한다고 알려져 있다 (Schuetz, 1985). 그러나 포유동물에서는 난자를 생체외에서 배양하면 자발적으로 성숙을 일으키기 때문에 성숙유도요인을 찾아내기가 매우 어렵다 (Eppig, 1985).

본인 등은 한국산 개구리를 재료로 난자의 성숙과정을 조사하던 중 북방산개구리의 여포난자들은 다른 개구리와 달리 생체외 배양에서 자발적 성숙을 일으키는 것을 발견하였다

(Kwon *et al.*, 1988). 자발적 성숙을 일으키는 빈도는 동면 초기에는 매우 낮고 중기에는 약간 높아지다가 후기인 번식기에 급격히 높아졌다 (Kwon *et al.*, 1989). 더우기 동면 후기에 이들 개구리의 난소조직을 배양하면 성숙뿐 아니라 배란도 호르몬의 도움없이 자발적으로 일으키는 것을 발견하였다 (Kwon *et al.*, 1992). 그러나 자발적 성숙을 일으키는 원인에 대해서는 이제까지 별로 알려진 바 없다. 범개구리 (*Rana pipiens*) 난자의 경우에도 자발적 성숙을 일으킨다는 보고가 있었으나 (Lin and Schuetz, 1985a) 이는 극히 드문 현상으로 번식기에는 거의 예외없이 이 현상을 일으키는 북방산개구리의 경우와는 근본적으로 다르다고 보겠다.

본 연구는 이러한 자발적 성숙과정에, 1) 여포조직들이 관여하는 지의 여부, 2) 동면기간에 여포들에 의해 생성된 P_4 /T 비율의 변화와 성숙빈도와의 관계 및, 3) 일반적인 성숙억제제가 자발적 성숙에 미치는 효과 등을 밝히는

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

데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용한 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)는 전라남도 일원에서 물속에 동면 중인 것을 11월에서 2월에 걸쳐 채집하였다. 채집한 개구리들을 물이 담긴 플라스틱 상자에 넣어 저온실에서 (4°C) 보관하였으며 일주일에 2-3번 물을 갈아주었다.

여포배양 및 스테로이드 측정

개구리의 난소로부터 미세편셀을 사용하여 여포들을 분리해 낸 후 2ml의 amphibian Ringer (AR) 용액을 포함한 다공배양접시의 각 well 에 여포들을 20 개씩 넣었다. 실험군의 종류에 따라 해당 호르몬 혹은 시약들을 well 에 넣은 다음 배양접시를 진탕배양기에 옮겨 일정시간 진탕을 시키면서 배양하였다. 여포에서 denuded 난자를 얻을 때에는 먼저 미세편셀으로 theca 층을 제거한 다음, 여포세포들이 둘러싸인 난자들을 calcium free배양액에서 2 시간 동안 진탕을 하여 여포세포들을 떼어내었다. 진탕 후 trichloroacetic acid (TCA, 5% in AR)로 고정시킨 후 해부현미경 하에서 여포세포들이 난자에 남아있는지를 확인하였다. Frog pituitary homogenate (FPH)의 제조방법 및 구체적 배양법 등은 앞서 자세히 기술한 바 있다 (Kwon *et al.*, 1990). 실험에 사용한 각 종 steroid 및 hypoxanthine, cAMP 등은 Sigma 회사에서 구입하였으며 steroid 는 에탄올 (2 mg/ml)에 녹여, hypoxanthine(125 mM)과 cAMP (10 mM)는 AR에 녹여 stock solution 으로 만든 다음 해당농도가 되도록 각 well에 직접 첨가하였다. 이 때 최종 에탄올의 농도는 0.02%를 넘지 않도록 하였다. 배양이 끝난 다음 난자들을 TCA 로 고정시킨 후 이들을 쪼개어 핵붕괴 (germinal vesicle break down,

GVBD) 여부를 조사하였으며 핵붕괴가 일어난 것을 성숙된 것으로 판정하였다.

Steroid radioimmunoassays (RIAs)

여포들이 배양기간 동안에 배양액으로 분비한 P₄와 T의 농도를 RIA방법으로 측정하였다. 이미 앞서의 실험에서 이 종의 개구리는 여포내에 간직한 스테로이드의 양과 배양액에 분비한 양이 일정 비율 (6:4)을 나타낸다는 것을 알았기 때문에 배양액내의 스테로이드만 측정하였다 (Kwon *et al.*, 1990). 배양이 끝난 다음 배양액을 회수하여 40°C의 냉동기에 저장하였다가 필요에 따라 녹여서 추출과정 없이 직접 시료로 사용하였다. P₄와 T의 RIA에 관한 구체적인 방법과 추적자의 종류, 항혈청, 교차반응도 등은 앞서 자세히 기술하였다 (Kwon *et al.*, 1991). 실험간 (interassay) 과 실험내 (intraassay) 의 변이계수는 P₄가 각 9.4%와 9.2%이었으며 T가 각 10.0%와 9.2%이었다.

통계처리

난자의 성숙율을 비교할 때에는 각 동물에서 얻은 핵붕괴율 (% GVBD)을 arcsin-square root transformation으로 전환한 후 Student's t-test로 검정하였으며 호르몬의 측정치를 비교할 때에도 t-test를 사용하였다.

결과

자발적 성숙에 관여하는 여포조직세포들의 역할과 스테로이드 생성양상의 변화

북방산개구리 여포난자의 자발적 성숙과정에서 여포조직세포 (theca 와 follicle cells)들이 관여하는 지를 조사하기 위하여 이 조직들을 제거한 다음 denuded 난자들을 24시간 배양하여 보았다. 대조군으로 온전한 여포들 (intact follicles) 배양했을 때에는 약 78%의 여포난자들이 자발적 성숙을 일으키었으며 배양액에 P₄나 FPH를 첨가했을 때에는 성숙율이 약간

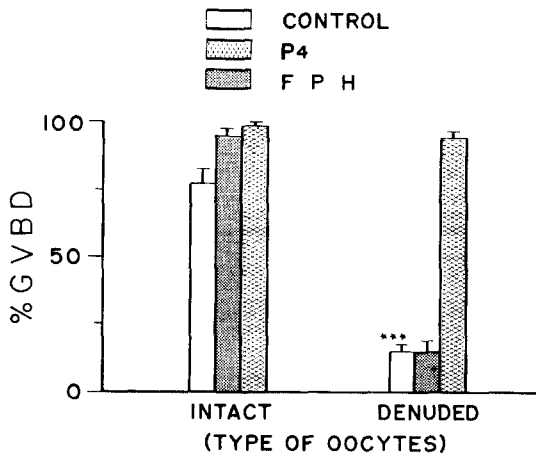


Fig. 1. Effect of removal of follicular tissues on the spontaneous maturation of *R. dybowskii* oocytes *in vitro*. Intact follicles and denuded oocytes obtained from each animal were cultured in the presence or absence of hormones and examined for GVBD after 24hr of culture. Each bar in the figure represents average (mean \pm SEM) % GVBD of 400 follicles (well duplicates/animal, 10 animals). ****P* < 0.001, when compared with intact follicles in the control.

높아졌다(< 90%) (Fig. 1). 그러나 여포조직들을 떼어낸 난자들은 거의 자발적 성숙을 일으키지 않았으며(약 15%), FPH의 처리도 효과가 없었다(약 15%). 이들 denuded 난자에 P₄를 처리했을 때에는 그러나 대조군의 그것처럼 성숙을 일으키었다(Fig. 1).

우리는 참개구리(*Rana nigromaculata*)에서 번식기(5월)가 가까와 올 때 배양중인 여포들이 생성하는 P₄/T의 비율이 급격히 높아지는 것과 동시에 난자의 성숙율이 증가하는 것을 관찰한 바 있다(Kwon *et al.*, 1991). 북방산개구리의 여포난자들의 자발적 성숙을 일으키는 빈도도 역시 이 개구리의 번식기가(2월) 가까와 올 때 증가함으로(Kwon *et al.*, 1989) 동면기간에 일어나는 이러한 호르몬 생성양상의 변화가 자발적 성숙의 조절과 관계가 있을 가능성이 높았다. 본 실험에서는 이를 확인하기 위하여 동면 초, 중, 후기의 각 시기에 북방산개구리의 여포들을 배양하면서 이들이 생성하는 P₄/T비율을 조사하여 보았다.

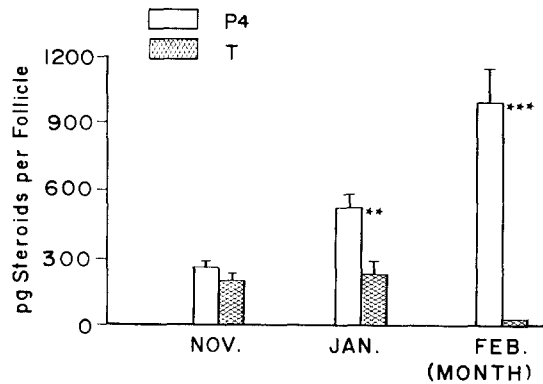


Fig. 2. Changes in P₄ and T levels secreted from follicles with FPH stimulation during culture in different hibernation period. Isolated follicles at different period were cultured with FPH (0.05 gland/ml) for 6hr and steroid levels accumulated in medium were measured by steroid RIAs. Each bar in the figure represents average (mean \pm SEM) pg steroids of 180 follicles (triplicate incubations/animal, 3 animals). ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001, when compared with corresponding T levels.

Fig. 2에서 보여주듯이 동면초기인 11월에는 여포들이 생성한 P₄와 T의 양이 거의 비슷하였으나(P₄, 266 pg/follicle; T, 207 pg/follicle) 동면 중기에 가까운 1월에는 P₄의 양이 T보다 약 2배로 증가하였다(P₄, 526 pg/follicle; T, 238 pg/follicle). 더위가 번식이 시작되는 동면 후기인 2월에는 P₄의 양이 급격히 증가하는 대신 T의 양은 거의 바닥수준으로 떨어졌다(P₄, 995 pg/follicle; T, 32.8 pg/follicle). 따라서 번식기에 P₄/T의 비율이 증가하는 것은 개구리에 공통적인 현상이라는 것을 알았다. 동물에 따라 여포들이 생성하는 호르몬들의 절대량(P₄ + T)은 많은 차이가 있었다(결과 표시하지 않음).

성숙억제제들이 자발적 성숙에 미치는 효과

외부에서 첨가된 estradiol(E₂)이 호르몬에 의해 유도된 범개구리 난자의 성숙을 억제한다는 보고가 있었다(Lin and Schuetz, 1983, 1985b). 본 실험에서는 이 스테로이드가 자발적 성숙을 일으키는 난자들에 미치는 효과를 조사하였다. 배양액내의 E₂는 0.05 μ g/ml에

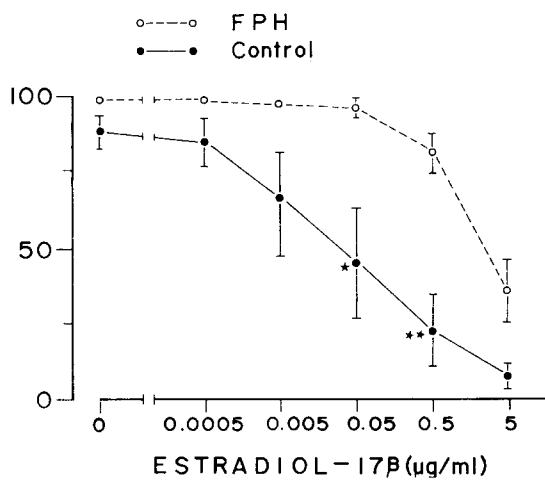


Fig. 3. Effect of estradiol on the spontaneous or FPH induced oocyte maturation of *R. dybowskii* *in vitro*. Isolated oocytes were cultured in the presence or absence of FPH (0.05 gland/ml) and various concentrations of estradiol (0-5 μg/ml) for 24hr and examined for oocyte GVBD. Each bar represents average (mean ± SEM) % GVBD of 240 follicles (well duplicates/animal, 6 animals). **P* < 0.05, and ***P* < 0.01, when compared with estradiol 0 group in the control.

서 부터 농도에 의존하여 난자의 자발적 성숙을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이 억제효과는 FPH(0.05 gland/ml)를 첨가하였을 때에 부분적으로 풀리었으나 가장 높은 농도(5 μg/ml)에서는 이 효과가 풀리지 않았다(Fig. 3). E₂의 이러한 억제효과가 가역성이 있는지를 조사한 결과 6시간 동안 E₂에 노출시킨 후 보통배양액으로 옮기어 24 시간 배양했어도 난자들의 자발적 성숙은 일어나지 않았다(Fig. 4). 6시간 노출 후 FPH를 포함한 배양액으로 옮기어 계속 배양했을 때에도 역시 이 억제효과는 풀리지 않았다(Fig. 4). 따라서 E₂는 비가역적으로 난자의 성숙을 억제한다는 것을 알았다.

E₂가 자발적 성숙을 일으키는 여포의 P₄ 생성에 어떤 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 배양액에 E₂와 FPH를 동시에 첨가한 후 6 시간 배양 후에 배양액의 P₄의 농도를 측정하여 보았다(Fig. 5). FPH를 단독으로 처리했을

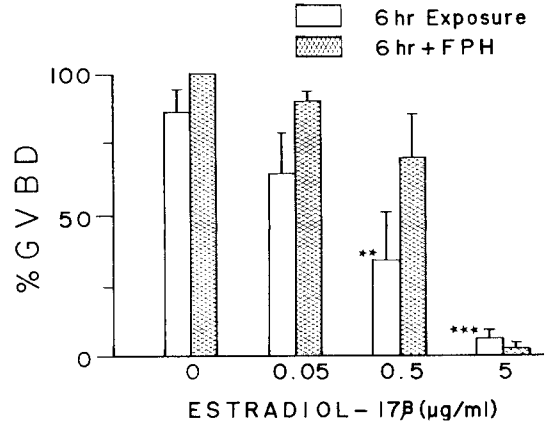


Fig. 4. Irreversible inhibition of estradiol on the spontaneous or FPH induced oocyte maturation *in vitro*. Isolated oocytes were preincubated for 6hr in the presence of various concentrations of estradiol (0-5 μg/ml) and cultured further (for 18hr) in the plain (6hr Exposure) or FPH containing medium (6hr + FPH). After culture, the oocytes were examined for GVBD. Each bar in the figure represents average (mean ± SEM) % GVBD of 160 follicles well duplicates/animal, 4 animals) in the control (spontaneous) and of 80 follicles (2 animals) in FPH-treated oocytes. ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001, when compared with the control group (estradiol 0).

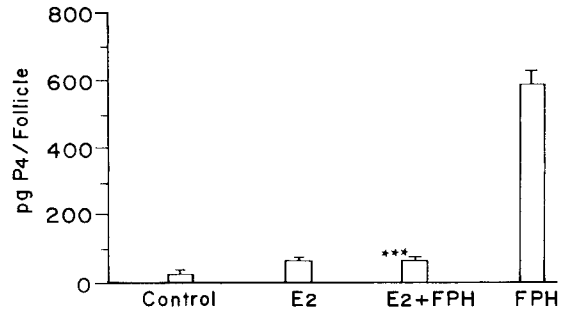


Fig. 5. Inhibiting effect of estradiol on the progesterone production by follicles during *in vitro* culture. Isolated follicles were cultured in the presence or absence of FPH and/or estradiol (5 μg/ml) for 6hr, and P₄ levels in medium were measured by RIA. Each bar in the figure represents average (mean ± SEM) pg P₄ of 120 follicles (triplicate incubations/animal, 2 animals). ****P* < 0.001, when compared with FPH group.

때에는 배양기간 동안에 높은 농도의 P₄가 생성되었으나(586 pg/follicle), E₂를 동시에 첨가했을 때에는 P₄의 농도가 현저히 낮아졌다

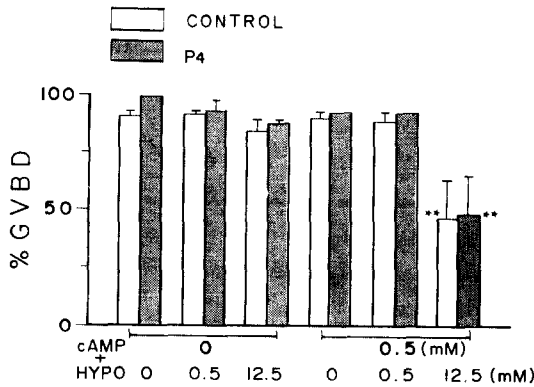


Fig. 6. Effect of hypoxanthine on the spontaneous or P₄ induced oocyte maturation of *R. dybowskii* *in vitro*. Isolated follicles were cultured in the presence or absence of hypoxanthine (HYPO; 0.5 and 12.5 mM) with or without supplement of cAMP (0.5 mM) and examined for GVBD after 24hr of culture. Each bar represents average (mean ± SEM) % GVBD of 200 follicles (well duplicates/animal, 5 animals).

**P < 0.01, when compared with the other groups.

(62.5 pg/follicle). E₂를 단독으로 처리했을 때에도 P₄의 농도는 극히 낮았다(Fig. 5).

포유동물의 여포액내에서 난자의 성숙분열을 억제하는 요인이라고 알려져 있는 hypoxanthine(Downs *et al.*, 1985; Eppig *et al.*, 1985)과 cAMP(Cho *et al.*, 1974)가 개구리 난자의 자발적 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. 배양액에 hypoxanthine(0.5-12.5 mM)을 단독으로 혹은 cAMP(0.5 mM)와 함께 첨가한 후 여포난자들을 배양하여 보았다(Fig. 6). 이미 cAMP는 2.5 mM 이상에서는 북방산개구리 난자의 성숙을 억제한다는 것을 알고 있으므로(Kwon *et al.*, 1990) 이보다 낮은 0.5 mM 을 첨가하였다. Fig. 6에서 보여주듯이 hypoxanthine은 12.5 mM을 단독으로 처리하였을 때에도 전혀 난자의 성숙을 억제하지 못하였다. 그러나 0.5 mM의 cAMP와 함께 첨가했을 때에는 유의하게 난자의 성숙을 억제하였다(Fig. 6). 더욱이 이러한 억제효과는 P₄를 배양액에 첨가했을 때에도 풀리지 않았다. 따라서 hypoxanthine은 cAMP와 함께 항진적으로 개구리 난자의 자발적 성숙을 억제한다는 것을 알았다.

고찰

본 연구의 결과로 부터 북방산개구리의 여포 난자가 생체의 배양에서 자발적 성숙을 일으키는데에는 여포세포들이 관여하며 여포들이 생성하는 P₄와 T의 상대적인 양의 변화가 자발적 성숙을 유도하는데 중요한 요인이 된다는 것을 알았다. 아울러 포유동물의 자발적 성숙을 억제하는 몇몇 요인들이 개구리 난자의 자발적 성숙을 또한 억제한다는 것을 알았다.

여포에서 theca 층과 여포세포들을 제거하였을 때 이들 denuded 난자들이 자발적 성숙을 일으키지 않는 현상은 여포세포들이 분비하는 P₄가 이 성숙에도 관여한다는 것을 시사해주고 있다(Fig. 1). 본인 등은 이미 자발적 성숙을 일으킬 때 성숙이 일어나기 전에 FPH의 처리 없이도 여포세포에서 유래한 것으로 생각되는 작은 P₄의 peak가 생긴다는 것을 보고한 바 있다(Kwon *et al.*, 1989). 본 결과는 이를 뒷바침해주는 것이며 더우기 P₄와 달리 FPH를 처리했을 때에도 성숙이 일어나지 않는다는 것은 이들 여포세포들이 P₄를 생성한다는 것을 또한 확인해주는 것이다. 유사한 결과가 범개구리의 경우에도 보고된 바 있다(Lin and Schuetz, 1985a). 그러나 자발적 성숙이 반드시 여포세포에만 의존한다고 볼수는 없다. 왜냐하면 여포난자들의 성숙능 즉, meiotic competence가 동면기간에 따라 변하기 때문이다. 이미 오래전 부터 늦가을인 동면초에 얻은 개구리의 난자들은 호르몬의 처리에 의해서도 성숙을 잘 일으키지 않다가 동면 중기에서 후기에 이르는 동안 호르몬에 대한 반응성이 크게 증가한다는 것이 경험적으로 잘 알려져 있었다. 즉, 난자의 호르몬에 대한 반응성이 번식기에 가까와 올 수록 커진다는 것이다. 본인 등은 참개구리에서 이러한 사실을 실험적으로 확인한 바 있다. 흥미있는 사실은 참개구리의 여포들이 동면기간 동안에 생체의 배양에서 생성하는 P₄/T의 비율이 동면기간이 지남

에 따라 점차 높아지다가 번식기에 급격히 높아진다는 것이다(Kwon *et al.*, 1991). 본 실험에서 북방산개구리의 여포들을 사용하여 조사해본 결과 거의 같은 양상을 나타낸다는 것을 알았다(Fig. 2). 따라서 이러한 결과들은 P_4/T 비율의 증가가 개구리 난자의 성숙능 획득에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 확인해 주고 있다. 참개구리 보다도 북방산개구리의 경우에 번식기에 P_4/T 비율의 증가가 더 뚜렷하였다. 따라서 자발적 성숙을 일으키는 기작에는 난자의 성숙능 증가가 또한 주요 요인이라는 것을 알 수 있었다.

범개구리에서 E_2 가 난자의 성숙을 억제한다는 보고가 있었다(Lin and Schuetz, 1983, 1985b). 이 현상을 북방산개구리에서 조사해본 결과 역시 여포난자의 자발적 성숙을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 E_2 의 억제효과는 비가역적이었으며 FPH를 처리하였어도 이 억제가 풀리지 않았다(Fig. 4). E_2 가 그들의 전구체인 P_4 의 생성을 억제하는 것으로 보아(Fig. 5) 이러한 P_4 의 생성저해가 자발적 성숙을 억제하는 요인이라고 볼 수 있으나, E_2 가 난자자체에 영향을 미칠 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. E_2 의 이러한 생리적 현상에 대해 그 의미성을 아직 명확하게 설명하지 못하고 있다(Lin and Schuetz, 1985b). 아마도 일부의 스테로이드는 높은 농도에서 난자의 성숙을 저해하는 약리적 효과를 가진 것으로 생각된다.

포유동물의 난자성숙을 억제하는 요인들이 개구리의 자발적 성숙을 또한 억제한다는 사실은 매우 흥미로운 일이다. Fig. 6는 hypoxanthine과 cAMP가 항진적으로 난자의 자발적 성숙을 억제하는 것을 분명히 보여주고 있다. 개구리의 여포는 여포액이 없고 따라서 포유동물처럼 hypoxanthine에 노출될 가능성이 매우 적은데도 불구하고 cAMP의 존재하에 억제현상을 나타낸다는 것은 포유동물과 개구리 난자의 성숙기작에 어떤 공통점이 있다는 것을 보여준다. 개구리 난자의 자발적 성숙에 대한 연구는 앞으로 포유동물에도 적용되는 많은 정

보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

- Cho, W.K., S. Stern, and J.D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **187**: 383-386.
- Downs, S.M., D.L. Coleman, P.F. Ward-Bailey, and J.J. Eppig, 1985. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 454-458.
- Eppig, J.J., 1985. Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. In: *Developmental Biology* (Browder, L.W., ed), Plenum Press, New York, Vol. 1, pp. 313-347.
- Eppig, J.J., P.F. Ward-Bailey, and D.L. Coleman. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.* **33**: 1041-1049.
- 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., 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.
- Kwon, H.B., H.J. Park, and A.W. Schuetz, 1990. Induction and inhibition of meiotic maturation of amphibian (*Rana dybowskii*) follicular oocytes by forskolin and cAMP *in vitro*. *Mol. Reprod. Develop.* **25**: 147-154.
- Kwon, H.B., H.H. Choi, R.S. Ahn, and Y.D. Yoon, 1991. Steroid production by amphibian (*Rana nigromaculata*) ovarian follicles at different developmental stages. *J. Exp. Zool.* **260**: 66-73.
- 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.
- Lin, Y.-W.P. and A.W. Schuetz, 1983. *In-vitro* estrogen modulation of pituitary and progesterone-induced oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*

- 226:** 281-291.
- Lin, Y.-W.P. and A.W. Schuetz, 1985a. Spontaneous oocyte maturation in *Rana pipiens*: estrogen and follicle wall involvement. *Gamete Res.* **12**: 11-28.
- Lin, Y.-W.P. and A.W. Schuetz, 1985b. Intrafollicular action of estrogen and regulating pituitary-induced ovarian progesterone synthesis and oocyte maturation in *Rana pipiens*: temporal relationship and locus of action. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 421-435.
- Masui, Y. and H.J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**: 185-281.
- Schuetz, A.W. 1985. Local control mechanisms during oogenesis and folliculogenesis. In: *Developmental Biology* (Browder, L.W. ed.) Plenum Press, New York. Vol. 1, pp. 3-83.

(Accepted December 30, 1992)

Studies on the spontaneous maturation of follicular oocytes of *Rana dybowskii* *in vitro*

Ryun Sup Ahn, Han Ho Choi, Hyuk Bang Kwon, Dong Gyu Bai (Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

Previously, we have shown that follicular oocytes of *Rana dybowskii* exhibited the spontaneous maturation following *in vitro* follicle culture. The present study was carried out to assess the role of several factors involved in the spontaneous maturation. Denuded oocytes, which were devoid of somatic tissues, did not exhibit the spontaneous maturation. Treatment of frog pituitary homogenate (FPH, 0.05 gland/ml) to denuded oocytes did not induce the maturation, while progesterone did. The relative amount of progesterone (P_4) produced by the follicles in culture increased while that of testosterone (T) decreased when breeding season approached. In breeding season (late February), P_4 was exclusively produced by the follicles. Addition of estradiol to culture medium suppressed the spontaneous maturation of the follicular oocytes in a dose-dependent manner and also suppressed FPH action in stimulating P_4 production by the follicles. Hypoxanthine (12.5 mM) suppressed the spontaneous maturation in the presence of 0.5 mM of cAMP. Taken together, the data suggest that 1) follicular tissues play an important role in the spontaneous maturation, 2) the increase in P_4/T ratio produced by the follicles may be involved in the regulation of spontaneous maturation, and 3) the spontaneous maturation is inhibited by estrogen and hypoxanthine.