

번식기에 개구리 여포의 스테로이드 생성변화와 난자의 성숙능 획득

안련섭 · 이용탁 · 나철호 · 김지열* · 강성구** · 권혁방

전남대학교 자연대 생물학과, *의대 핵의학실, **인제대학교 자연대 생물학과

3 종의 한국산개구리를 사용하여 여포들이 생성하는 스테로이드와 난자의 성숙능이 번식기 근처에서 어떻게 변하는가를 조사하였다. 개구리의 여포를 생체의 배양하면서 이들이 뇌하수체추출물(frog pituitary homogenate, FPH) 혹은 cAMP의 자극으로 생성하는 progesterone(P_4)과 testosterone(T)의 양을 측정하여 이로부터 P_4/T 의 비율을 구하였으며 여포난자들이 FPH, P_4 혹은 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate(TPA)에 반응하여 성숙을 일으키는 시기를 조사하였다. 북방산개구리의 여포난자는 11월 부터 호르몬에 반응하여 성숙을 일으켰으며 2월에 P_4/T 의 비율이 급격히 증가하였다. 참개구리는 5월에 가서야 P_4/T 의 비율이 현저히 증가하고 FPH에 반응하여 성숙을 일으켰다. 그러나 P_4 에 의한 난자성숙은 3월부터 시작하였다. 옴개구리는 7월에 P_4/T 비율의 증가가 있었으며 이때부터 또한 TPA에 반응하여 난자의 성숙을 일으켰다. 따라서 3종의 개구리에서 모두 각각의 번식기 근처에서 P_4/T 의 비가 급격히 증가하고 또한 성숙능이 생긴다는 것을 알 수 있었다.

KEY WORDS: Amphibia, Breeding season, Steroidogenic shift, Oocyte maturation

성장이 완료된 양서류의 난자는 뇌하수체호르몬의 자극으로 난자를 둘러싸고 있는 여포세포에서 생성된 progesterone(P_4)에 의하여 감수분열이 재개된다(Masui and Clarke, 1979; Schuetz, 1985). *Xenopus*의 경우 성장중인 작은 여포들(stage IV, V)은 생체의 배양에서 호르몬에 의하여 난자성숙이 유도되지 못하며(Taylor and Smith, 1976; Wasserman *et al.*, 1984), 포유동물의 경우에도 일정 크기 이하의 작은 난자들은 생체의 배양에서 성숙을 일으키지 못한다(Sorensen and Wasserman, 1976; Motlik *et al.*, 1984). 이러한 사실은 난자의 성장이 감수분열 재개능력(meiotic competence)의 획득과 밀접한 관계가 있다는 것을 말해준다. 개구리는 대개 겨울에 동면을 하

고 봄에 산란을 한다. 그러나 동면에 들어갈 때 이미 난자의 성장이 끝나서 크기가 거의 변하지 않는다. 그럼에도 경험적으로 보면 동면초에 취한 개구리의 여포난자는 생체의 배양에서 성숙을 잘 일으키지 않는다. 한국산 개구리에서도 이러한 경향이 나타나서 대체적으로 개구리의 난자들은 동면후기 혹은 산란기에 가까이 와서야 외부에서 첨가된 호르몬에 의해 성숙을 잘 일으킨다(Kwon *et al.*, 1991; Ahn *et al.*, 1993). 흥미롭게도 일부의 개구리에서 보면 동면초에 취한 여포들은 FPH의 자극에 주로 testosterone(T)을 생성하고 동면후기의 것들은 progesterone(P_4)을 주로 생성하는 것으로 나타났다(Kwon *et al.*, 1991; Ahn *et al.*, 1993). 즉 여포에서 주로 생성되는 스테로이드가 T에서 P_4 로 변하는 시기와 난자가 성숙능을 획득하는 시기가 비슷하게 일치하는 경향을 보이었다. 그러나 우리가 조사한 개체수가 많지 않고 개체에

본 연구는 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-92-412)와 과학재단 세포분화센터 연구비(92-2-3)의 지원에 의한 것임.

따른 변이가 많으므로 이 사실을 일반화할 수가 없었다.

본 연구에서는 각각 번식기가 다른 3 종의 개구리를 대상으로 많은 개체수를 사용하여 체계적으로 이 현상을 조사함으로써 T에서 P₄로의 스테로이드 생성양상의 변화가 난자의 성숙능 획득과 긴밀한 관계가 있다는 것을 보여주고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구에 사용한 개구리는 북방산개구리 (*Rana dybowskii*), 참개구리 (*Rana nigromaculata*), 및 음개구리 (*Rana rugosa*) 이었다. 북방산개구리는 10월-2월, 참개구리는 2월-5월 음개구리는 2월-7월 사이에 광주근교 및 전남일원에서 채집하여 사용하였다.

여포배양

개구리를 두부절개하여 죽인 후 복강으로부터 난소를 떼어낸 다음 amphibian Ringer(AR) 용액이 든 petri dish에 넣고 해부현미경 하에서 예리한 핀셋으로 여포를 분리하였다. 분리한 여포를 신선한 AR로 3-4회 씻은 후 실험군의 수에 따라 무작위로 나누어 AR 용액이 포함된 다공배양접시(multiwell petridish, Nunclon)에 넣었다(20개/2 ml/well). 여포가 들어 있는 각 well에 실험군에 따라 필요한 시약 및 호르몬을 미세피펫으로 해당농도가 되도록 첨가한 다음 이들 배양접시를 22-24°C를 유지되는 진탕배양기(국제 싸이엔, 80 oscillation/min)로 옮겨 6 혹은 24시간 배양하였다. 배양액내의 스테로이드를 정량하기 위하여 6시간 배양한 후 배양액중 일부를 취하여 -20°C를 유지하는 냉동기에 보관 하였으며, 24시간 까지 배양한 여포들을 10% trichloroacetic acid(TCA)로 고정시킨 다음 난자의 성숙여부를 조사하였다. 고정된 여포난자를 해부현미경하에서 쪼개어 보았을 때 핵이 없는 것(핵붕괴, germinal vesicle breakdown, GVBD)을 성숙을 일으킨 것으로

간주하였다. 기타 자세한 사항은 전보에 기술한 바 있다(Kwon *et al.*, 1988a, b).

호르몬 및 시약

뇌하수체 추출물(FPH)은 개구리를 잡을 때마다 뇌하수체를 분리하여 냉동기에 보관하다가 50여개가 모이면 이들을 AR용액에서 분쇄, 원심분리(10,000 g, 10 min)한 다음, 상층액을 취하여 얻었다. 이 때 추출물들을 ml 당 하나의 뇌하수체 분량(1 pituitary equivalent; pit. equiv./ml)이 되도록 조절한 후 0.5 ml씩 분주하여 냉동기에 보관하였다. P₄는 에탄올(GR, Merck)에 녹여 2 mg/ml의 농도로 만들어 사용하였으며 cAMP와 phosphodiesterase의 억제제인 isobutylmethyl xanthine(IBMx)은 AR에 녹여 각각 25 mM과 1.8 mM의 stock solution으로 만든 다음 필요할 때 AR로 희석하여 사용하였다. Protein kinase C의 활성화제인 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate(TPA)는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 4 mM stock solution으로 만든 다음 해당 농도가 되도록 희석하여 사용하였다. 각종 스테로이드, cAMP, TPA, 및 IBMx는 Sigma로부터 구입 하였다.

Steroid radioimmunoassay(RIA)

시료로 사용한 배양액은 추출과정없이 직접 P₄와 T를 정량하는데 사용하였으며 스테로이드 RIA는 전보에 기술한 과정대로 수행하였다(Lin and Schuetz, 1985; Kwon *et al.*, 1991). 추적자로 1,2,6,7-³H-progesterone(99 Ci/mmol)과 1,2,6,7-³H-testosterone(98 Ci/mmol)을 사용하였으며, P₄와 T의 항체와 다른 스테로이드들과 교차반응도등은 전보에 기술한 바 있다(Kwon *et al.*, 1991). Scintillation cocktail로는 aquasol(NEN)을 사용하였고 Packard Tri-Carb 1500 counter로 방사선 양을 측정하였다. 통상 두 조의 표준시료를 정량과정에 포함시켜 표준곡선을 구하였으며 Packard의 SecuRIA program을 사용하여 개인용 computer로 steroid 농도를 계산하

였다. 이 방법에 의한 측정 가능치는 P_4 가 12.5 pg 이었고 T는 5 pg 이었다. 실험내(intra-assay)와 실험간(interassay)의 변이 계수는 P_4 가 각각 7.4%와 11.7% 이었고 T가 7.4%와 9.4% 이었다.

통계처리

실험결과에 P_4/T 의 비율의 변화는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 사용하여 유의성을 검정하였으며 핵붕괴율(% GVBD)은 이 값을 먼저 angular transformation을 한 다음 ANOVA 혹은 Student's t-test를 하여 유의성 검정을 하였다.

결과

북방산개구리

북방산개구리는 10월 말부터 동면에 들어가며 2월 말경에 산란을 한다(Kwon *et al.*, 1989). 이 기간 동안에 여포들이 생성하는 스테로이드들의 변화와 난자들이 성숙능을 획득하게되는 시기를 조사하였다. Fig. 1A에서는 개구리 여포들이 FPH(0.1 pit. equiv./2 ml)의 자극으로 생성한 P_4 와 T의 양을 개구리의 개체별로 보여 주고 동시에 P_4/T 비율의 평균을 시기별로 보여 주고 있다. Fig. 1B에서는 개구리의 여포가 FPH 혹은 P_4 에 반응하여 난자의 성숙을 일으키는 시기(달)를 보여주고 있다. 난자의 성숙율도 개체에 따라 큰 차이를 보이므로 개체당 성숙율과 개구리들의 평균 성숙율을 동시에 표시하였다(Fig. 1B). 그림에서 보는 바와 같이 동면전(10월)에 취한 여포에서 보면 FPH의 자극에 의해 생성된 T의 양이 P_4 보다 약간 높은 경향을 보였으며 따라서 P_4/T 의 비가 1 보다 낮았다. 동면중기(12월) 까지의 여포는 T와 P_4 의 생성량이 거의 비슷하여 P_4/T 비율에 큰 변화는 없었다(0.8-1.3). 그러나 1월 부터 P_4 생성이 증가하였고 번식기인 2월에 이르면 P_4 의 수준은 평균 약 1400 pg/follicle로 매우 높은 수준을 유지하였다. 그러나 T의 수준은 급격히 감소하

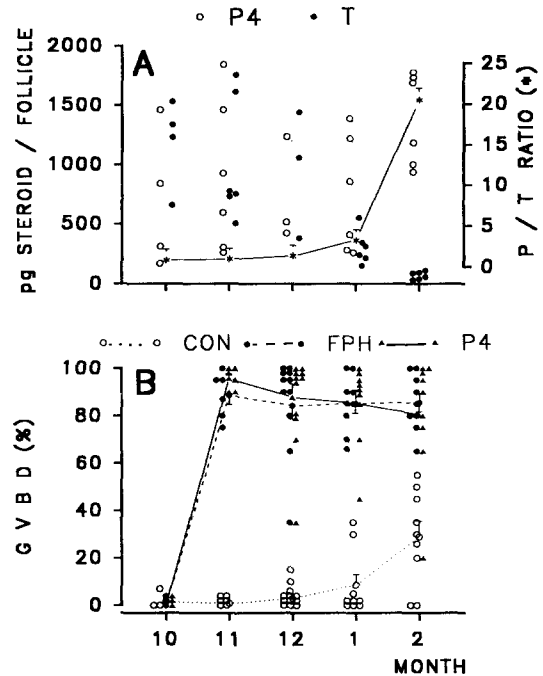


Fig. 1. Changes in the steroidogenic pattern and oocyte responsiveness to exogenous hormone for maturation by cultured ovarian follicles of *R. dybowskii*. Isolated follicles from frogs obtained at each month were cultured for 6 hr in the presence of FPH (0.1 pit. equiv./2 ml), and levels of P_4 or T secreted into the medium by the follicles were measured by RIA. Sister follicles from the same animal were cultured for 24 hr in the presence or absence of FPH or P_4 and examined for maturation (GVBD). Each point in the figure (A) represents the mean levels of P_4 or T (triplicates) per individual animal, and the value in the line graph represents the average value of P_4/T ratio (mean \pm SEM) of animals tested (more than 4 animals). Each point in the figure (B) represents % GVBD of individual animal and the value in line graph represents the average % GVBD (mean \pm SEM) of animals tested (more than 4 animals).

여 거의 바닥수준(40-80 pg/follicle)으로 떨어졌다. 따라서 P_4/T 의 비율이 약 20으로 급격하게 증가하였다($P < 0.01$, 2월과 다른 달과 비교하였을 때). 그림1A에서 보는 바와 같이 여포에서 생성하는 전체 스테로이드의 양은 큰 차이가 없었다.

동면 직전 혹은 동면초(10월)에 취한 북방산개구리 난자들(여포들)은 생체의 배양에서 역시 FPH 나 P_4 에 의하여 성숙이 유도되지 않았다.

그러나 11월에 이르러서는 이들 호르몬에 대하여 거의 모든 개체의 여포들이 반응하여 80% 이상의 여포난자들이(개체당) 성숙을 일으켰다 ($P < 0.01$, 10월과 비교하였을 때). 즉, 11월에 들어서서 대부분의 난자들이 이미 성숙능을 획득하였다는 것을 알 수 있었다.

참개구리

참개구리는 10월에 동면에 들어가 5월경에 산란을 한다. 참개구리를 사용하여 여포들이 생성하는 P₄와 T의 양의 변화와 난자의 성숙능 획득 시기를 조사하였다. 예비실험에서 참개구리 여포는 10월에서 1월까지도 난자의 성숙이 일어나지 않는다는 것을 알았다. 따라서 2월부터 5월 사이의 여포를 사용하여 체계적인 조사를 하였다 (Fig. 2). Fig. 2A에서는 북방산개구리의 경우와 같이 여포들이 생성하는 스테로이드 양을 개체별로 표시하였고 동시에 P₄/T 비율의 평균을 표시하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 동면 후기인 3월까지도 참개구리 여포는 T를 P₄보다 더 많이 혹은 비슷하게 생성하여 P₄/T의 비율이 대략 1에 가까웠다.

그러나 4월에 들어서면 T보다 P₄의 증가가 더욱 뚜렷하여 P₄/T의 비율이 대략 3 가까이로 높아졌다 ($P < 0.01$). 동면에서 깨어나 산란을 시작하는 5월에 이르면 이 현상이 더욱 두드러져서 P₄의 수준은 급격히 증가하고(평균 1800 pg/follicle) 반면에 T의 수준은 극히 낮아졌다(평균 200 pg/follicle). 따라서 5월에 P₄/T의 비가 10 가까이로 현저히 증가하였다 ($P < 0.01$, 다른 달과 비교하였을 때).

2월에 취한 참개구리 여포는 P₄나 FPH에 의하여 난자성숙이 전혀 유도되지 않았다(Fig. 2B). 3월에는 조사한 마리수 중 절반 이상의 개체에서 얻은 난자들이 P₄에 의하여 난자의 성숙이 유도되었고(80% 이상) 나머지의 개체들의 일부에서도 부분적인 성숙을 일으켰다(40% 이하, $P < 0.01$, 2월과 비교하였을 때). 그러나 FPH에 대해서는 거의 성숙을 일으키지 않았다. 4월에 취한 개구리에서는 FPH에 미미한 반응을 보였으나, P₄에 대해서는 거의 모든 개체들이 반응

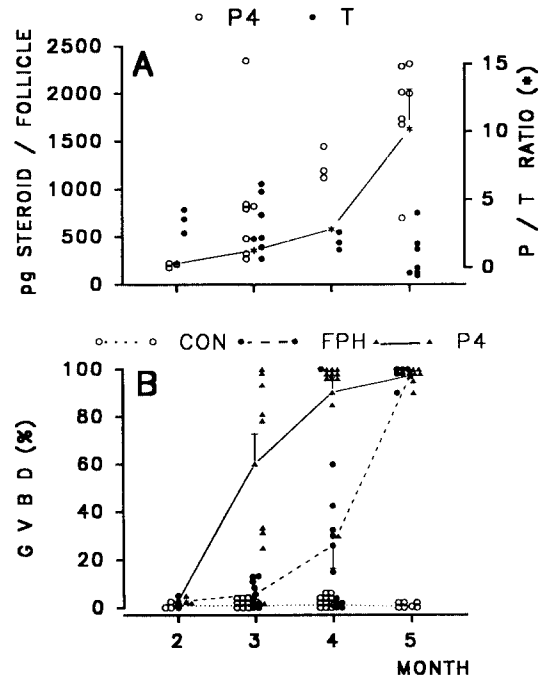


Fig. 2. Changes in the steroidogenic pattern and oocyte responsiveness to exogenous hormone by *R. nigromaculata* follicles. Follicles from frogs obtained at each month were cultured for 6 hr in the presence of FPH (0.1 pit. equiv./2 ml), and levels of P₄ or T in the medium were measured. Sister follicles from the same animal were cultured for 24 hr in the presence or absence of FPH or P₄ and examined for maturation (GVBD). Each point in the figure (A) represents the mean levels of P₄ or T (triplicates) per individual animal, and the value in the line graph represents the average value of P₄/T ratio (mean ± SEM) of animals tested (more than 4 animals). Each point in the figure (B) represents % GVBD of individual animal and the value in line graph represents the average % GVBD (mean ± SEM) of animals tested (more than 4 animals).

하여 성숙을 일으켰다 ($P < 0.01$, P₄와 FPH 처리군을 비교하였을 때). 5월에 이르러서야 FPH나 P₄에 의해서 거의 모든 개체에서 취한 여포들이 완전한 난자성숙을 일으켰다(Fig. 2B).

옴개구리

옴개구리는 다른 개구리들처럼 10월경에 동면에 들어가지만, 동면에서 깨어난 후 5-7월 사이의 비교적 긴 기간 동안에 번식을 한다. 그러나

일정한 서식지에서는 비교적 단기간에 산란을 하는 것으로 보인다. 이 개구리는 특이하게 번식에 이르러서도 생체의 배양에서 FPH나 P₄에 의하여 난자성숙이 유도되지 않으며, FPH의 자극으로도 스테로이드의 생성이 일관성있게 촉진되지 않는다(Kwon *et al.*, 1990). 그러나 이러한 옴개구리의 여포난자들에 protein kinase C(PKC)의 활성제인 TPA를 처리하면 난자의 핵붕괴(성숙)를 유도할 수 있다(Yoo *et al.*, 1992). 또한 배양액내에 cAMP(2.5 mM)와 cAMP의 분해를 억제하는 IBMX(0.27 mM)를 동시에 처리하면 스테로이드의 생성이 일관성있게 촉진된다는 것을 알았다(Kwon *et al.*, 1990). 따라서 옴개구리의 경우 스테로이드 생성을 촉진하기 위하여 FPH 대신 cAMP와 IBMX를 사용하였으며 호르몬 대신 TPA를 사용하여 난자의 성숙을 유도하였다. 예비실험에서 10월 부터 1월 사이의 여포 난자들은 성숙을 일으키지 않는다는 것을 알았다. 그러므로 2월에서 7월 사이의 개구리를 본 연구에서는 사용하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 2월에서 6월까지 여포들이 생성하는 P₄와 T의 생성량은 개체간에 많은 차이를 나타내었으며 전체적으로 보면 큰 변화가 없었다. 따라서 P₄/T의 비율도 1.5-2.6 사이에 존재하였다. 그러나 7월에 들어서면 역시 P₄의 양이 높은 개체들이 많이 나타나고 T의 양은 상대적으로 낮아져서 P₄/T의 비율이 약 6까지 높아졌다(P < 0.01, 다른 달과 비교하였을 때). 동시에 난자의 성숙능 획득 시기도 매우 뚜렷한 변화가 있었다. 즉 6월까지는 TPA의 처리에 핵붕괴를 일으키는 난자들이 나타나지 않았으나 7월에 취한 개구리의 난자들은 대부분 TPA에 반응하여 핵붕괴를 일으켰다. 그러나 여전히 FPH에 의해서는 난자의 성숙이 거의 유도되지 않았다.

고찰

본 연구의 결과로 3종의 개구리에서 모두 그 종의 번식기가 가까워짐에 따라 생체의 배양에서

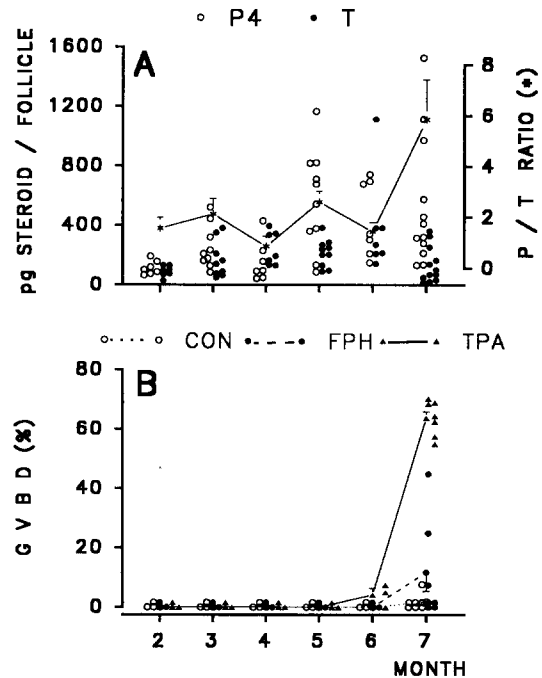


Fig. 3. Changes in the steroidogenic pattern and oocyte responsiveness to cAMP+IBMX or TPA by *R. rugosa* follicles. Isolated follicles at each month were cultured for 6 hr in the presence of cAMP+IBMX and levels of P₄ or T in the medium were measured. Sister follicles from the same animal were cultured for 24 hr in the presence or absence of TPA and examined for maturation (GVBD). Each point in the figure (A) represents the mean levels of P₄ or T (triplicates) per individual animal, and the value in the line graph represents the average value of P₄/T ratio (mean ± SEM) of animals tested (more than 4 animals). Each point in the figure (B) represents the average % GVBD (replicates) per individual animal and the value in line graph represents the average % GVBD (mean ± SEM) of animals tested (more than 4 animals).

여포들이 생성하는 스테로이드가 주로 T에서 P₄으로 바뀌며 이와 함께 대체적으로 난자들의 호르몬에 대한 반응성이 증가하여 감수분열 재개능력(meiotic competence)을 얻게된다는 것을 알았다. 이 사실은 감수분열 재개능력, 즉 성숙능을 난자의 크기로부터 판단하던 관점에서 여포의 생리적인 변화(스테로이드 생성양상)도 고려해야 된다는 것을 처음으로 보여주는 것이다.

동면초(10월)의 북방산개구리 여포는 생체의

배양에서 T를 P_4 보다 더 많이 생성하였으며 (Fig. 1A) 이들의 난자는 FPH나 P_4 에 의하여 난자성숙이 유도되지 않았다(Fig. 1B). 그러나 P_4 와 T의 생성량이 비슷해지는 11월부터 난자들은 성숙을 일으키기 시작하였다. P_4 의 양이 T보다 유의하게 높아지는 것은 1월부터였으며 2월에는 이 현상이 더욱 뚜렷해졌다(Fig. 1). 즉, P_4 /T의 비율이 2월에는 약 20으로 극도로 증가하였다. 흥미롭게도 이때의 난자들은 생체의 배양에서 전보에 기술한 것처럼(Kwon *et al.*, 1989) 자발적성숙을 일으켰다. 따라서 북방산개구리의 여포난자는 다른 두 개구리의 것에 비하여 steroidogenic shift도 빨리 일어나고(2월) 난자의 성숙능도 일찍(11월) 획득한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B).

이에 대해 참개구리의 여포는 2월까지도 T가 P_4 보다 훨씬 많이 생성되었고 3월에도 유사한 양상을 보이다가 4월에 가서야 유의하게 P_4 가 T보다 높아졌으며 5월에 비로서 P_4 의 급격한 증가가 있었다(Fig. 2A). 즉 P_4 /T의 현저한 증가가 5월에야 나타났다. 이는 북방산개구리의 것에(2월) 비해 3개월이나 늦게 일어난 것이다(Fig. 2A). 난자의 성숙능 획득도 북방산개구리 보다 매우 늦게 일어났다. 즉 참개구리의 난자들은 2월까지도 전혀 성숙을 일으키지 않다가 3월부터 P_4 에 반응하기 시작하였으며 FPH에 대해서는 5월에 가서야 비로서 반응하기 시작하였다. 이는 *in vivo*에서도 5월이 되어야 뇌하수체호르몬의 surge에 난소 여포들이 반응을 할 수 있다는 것을 의미한다.

옴개구리의 경우는 다른 개구리와 달리 정상적인 FPH의 처리에 스테로이드 증가도 잘 일어나지 않고 난자의 성숙도 일으킬 수 없다. 그러나 인위적인 방법으로 cAMP나 TPA를 사용하면 FPH의 작용을 흉내낼 수 있다. Fig. 3에서 보는 것처럼 옴개구리에서는 2월에서 6월까지 스테로이드 생성에 거의 차이가 없다가 7월에 가서 P_4 /T의 비가 급격히 증가하였고 동시에 이 시기에만 TPA에 반응하여 난자의 핵붕괴를 일으켰다. 이로부터 이 지역에 서식하는 옴개구리는 번식기가 7월이라고 예상할 수 있었다. 따라서 옴

개구리는 다른 개구리에 비해 가장 늦게 steroidogenic shift가 일어나고 성숙능도 늦게 획득된다고 보겠다.

이러한 3종의 개구리의 결과를 종합해보면 개구리에서 대체로 P_4 의 생성량이 T와 비슷하거나 높을 때 여포내의 난자들이 성숙능을 획득한다는 것을 알았다. 또한 P_4 /T의 비율이 크게 증가할 시기에는 난자의 반응성이 크게 증가하여 성숙이 보다 쉽게 일어난다는 것을 알았다. 그러나 난자의 호르몬에 대한 반응성은 개구리의 종류에 따라 달라서 북방산개구리의 난자가 가장 일찍 성숙능을 획득함과 동시에 가장 용이하게 성숙을 일으키고 반대로 옴개구리의 난자는 성숙능도 늦게 획득하며 성숙을 일으키기기도 가장 어렵다는 것을 알 수 있었다. 이에 대해 참개구리는 두 개구리의 중간에 해당하는 성질을 가지고 있었다. 3종의 개구리에서 모두 상대적으로 T가 P_4 보다 높을 때 난자들이 성숙을 일으키지 않는다는 사실은 T가 난자내 세포질의 숙성에 어떤 영향을 미칠 가능성을 보여주고 있다. 그러나 이를 확인하기 위하여서는 보다 체계적인 연구가 있어야 할 것이다. 본 결과로부터 얻을 수 있는 또 다른 사실은 옴개구리의 경우처럼 개구리 여포의 스테로이드 생성 양상을 분석함으로써 역으로 개구리 여포의 크기에 관계없이 그 개구리의 번식기를 예측할 수 있다는 점이다. 즉, P_4 /T의 비가 적을수록 번식기에서 멀고 이 비가 클수록 번식기에 가깝다는 것을 예측할 수 있게 된다는 점이다.

번식기 근처에서 여포들의 스테로이드 생성양상이 크게 변하는 것은 다른 동물에서도 일부 나타나는 현상이다. 즉, 일정한 번식기를 갖는 어류에서 산란기가 되면 androgen 생성에서 progestogen 생성으로 여포의 스테로이드 생성양상의 변화가 일어나는 것이 보고된 바 있다(Nagahama and Adachi, 1985; Nagahama *et al.*, 1986). 또한 이러한 변화는 스테로이드의 대사와 관련된 일부 효소의 불활성화에 기인한다는 것이 알려졌다(reviewed by Nagahama, 1987). 개구리의 경우에도 번식기가 가까워짐에 따라 북방산개구리와 참개구리의 여포에서 P_4 의

대사와 관련된 효소들의 활성이 낮아짐을 발견한 바 있다(Ahn *et al.*, 1993; Kwon *et al.*, 1993). 조류에서도 이와 유사한 현상이 발견되어 배란이 가까와 온 큰 여포들은 T에서 P₄를 주로 생성하는 여포로 변한다는 보고가 있었다(Huang and Nalbandov, 1979; Bahr *et al.*, 1983). 이러한 사실들은 여포들이 생성하는 스테로이드들의 변화가 동물의 생식주기를 조절하는 중요한 요인이라는 것을 말해준다.

요약하면 본 연구로부터 개구리의 여포들이 뇌하수체호르몬의 자극으로 생성하는 P₄와 T의 비율이 그 개구리의 번식기 근처에서 급격히 증가하고 동시에 난자들의 외부 호르몬에 대한 성숙능이 증가하는 것으로 보아 스테로이드 호르몬의 변화가 난자의 성숙능 획득에 영향을 미칠 가능성이 있고 이러한 요인들이 개구리의 번식기 조절에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Ahn, R.S., S.K. Ko, D.G. Bae, Y.D. Yoon, and H.B. Kwon, 1993. Steroidogenic shift by cultured ovarian follicles of *Rana dybowskii* at breeding season. *J. Exp. Zool.*, **267**: 265-282.
- Bahr, J.M., S.-C. Wang, M.Y. Huang, and F.O. Calvo, 1983. Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of domestic hen. *Biol. Reprod.*, **29**: 326-334.
- Huang, E.S.-R., and A.V. Nalbandov. 1979. Steroidogenesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol. Reprod.*, **20**: 454-461.
- Kwon, H.B., R.S. Ahn, J.Y. Kim, and Y.D. Yoon. 1988a. Role of cAMP in the regulation of progesterone production and secretion by frog (*Rana dybowskii*) follicles *in vitro*. *Korean J. Zool.*, **31**: 177-184
- Kwon H.B., C.H. Cho., C.G. Choi, 1888b. Studies on the induction of oocyte maturation of Korean frogs (*Rana dybowskii* and *Rana 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 oocyte in *Rana dybowskii* *in vitro*: Seasonal influences, progesterone production, and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.*, **252**: 190-199.
- Kwon, H.B., J.Y. Kim and S.K. Ko, 1990. Progesterone production and oocyte maturation of frog (*Rana nigromaculata* and *Rana rugosa*) follicles *in vitro*. *Korean J. Zool.*, **33**: 175-182.
- 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., R.S. Ahn, W.K. Lee, W.B. Im, C.C. Lee, and K. Kim, 1993. Changes in the activities of steroidogenic enzymes during the development of ovarian follicles in *Rana nigromaculata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **92**: 225-232.
- Lin, Y.-W. P., and A.W. Schuetz, 1985. Spontaneous oocyte maturation in *Rana pipiens* oocyte: estrogen and follicle wall involvement. *Gamete Res.*, **12**: 11-28.
- Masui, Y., and H.J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Intl. Rev. Cytol.*, **57**: 186-281.
- Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka, 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.*, **72**: 323-328.
- Nagahama, Y., 1987. 17 α , 20 β -dihydro-4-pregnen-3-one; A teleost maturation-inducing hormone. *Dev. Growth Differ.*, **29**: 1-12.
- Nagahama, Y. and S. Adachi, 1985. Identification of maturation-inducing steroid in teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Biol.*, **109**: 428-435.
- Nagahama, Y., F.W. Goetz, and J.D. Tan, 1986. Shift in the ovarian follicles of the goldfish (*Carassius auratus*) during gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev. Growth Differ.*, **28**: 555-561.
- Schuetz, A.W., 1985. Local control mechanism during oogenesis and folliculogenesis In: *Developmental Biology*. (L. Browder, ed.) Plenum Press, New York, Vol 1, pp. 3-83.
- Sorensen, R.A., and P.M. Wassarman, 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of mouse oocyte. *Dev. Biol.*, **50**: 531-536.
- Taylor, M.A., and L.D. Smith, 1987. Induction of maturation in small *Xenopus laevis* oocytes. *Dev. Biol.*, **121**: 111-118
- Wasserman, W.J., J.G. Houle and D. Samuel, 1984. The maturation response of stage IV, V, and VI *Xenopus* oocytes to progesterone stimulation *in vitro*. *Dev. Biol.*, **105**: 315-324.
- Yoo, Y.R., W.B. Lim, 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 February 19, 1994)

**Steroidogenic Shift and Acquisition of Meiotic Competence by Cultured Ovarian
Follicles of *Rana* at Breeding Season**

Ryun Sup Ahn, Yong Tak Lee, Chul Ho Ra, Ji Yeul Kim*, Sung Gu Kang**, and Hyuk Bang
Kwon (Dept. of Biology, *Dept. of Nuclear Medicine, Chonnam National University, Kwangju
500-757, **Dept. of Biology, Inje University, Kimhae

Experiments were carried out to elucidate the relevance of the steroidogenic shift by cultured ovarian follicles to the acquisition of meiotic competence of the oocytes at breeding season in *Rana*. Three different species of *Rana* having different breeding seasons were utilized for this experiment. Isolated follicles were cultured for 6 hr in the presence of frog pituitary homogenate (FPH) or cAMP, and levels of progesterone (P_4) and testosterone (T) secreted by the follicles were measured. Maturation of the follicular oocytes was also examined 24 hr after culture in the presence of FPH, P_4 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA). Follicular oocytes of *R. dybowskii* collected in October did not mature in response to FPH or P_4 , but matured in November. P_4/T ratio produced by the follicles increased markedly in February. In contrast, oocytes of *R. nigromaculata* collected in February did not mature in response to exogenous hormone, but matured in March in response to P_4 . However, the oocytes did not mature in response to FPH until May, when P_4/T ratio produced by the follicles increased markedly. Oocytes of *R. rugosa* did not mature in response to TPA until June, however, they matured in July. P_4/T ratio produced by *R. rugosa* follicles increased markedly in July.

These data demonstrated that there were parallel increases in P_4/T ratio and oocyte maturity in 3 different species of *Rana*, when their breeding season approached. This implies that the ratio of steroids produced by the follicles may be involved in the process for obtaining meiotic competence in *Rana*.