

Forskolin과 Cholera Toxin이 배양중인 생쥐 난자의 성숙에 미치는 영향

김 찬 성 · 조 완 규

(서울대 자연대 동물학과)

Effects of Forskolin and Cholera Toxin on the
Maturation of Mouse Oocytes *In Vitro*

Chan Sung Kim and Wan Kyoo Cho

(Dept. of Zoology, Seoul National University)

(1986. 2. 10. 접수)

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate whether the known adenylate cyclase activators, forskolin and cholera toxin, would affect the germinal vesicle breakdown (GVBD) and the production of cAMP in mouse oocytes *in vitro*. To do this, *in vitro* oocyte culture method and adenylate cyclase assay were employed.

In response to different concentrations of forskolin (20 to 80 $\mu\text{g/ml}$) added to a culture medium, the percentage of GVBD significantly decreased (56 to 31%) in a dose-dependent manner as compared to that of control (63%). This inhibitory phenomenon by forskolin was reversible since the rate of GVBD was returned to the control level when the oocytes were transferred to a control medium following exposure to forskolin (80 $\mu\text{g/ml}$). Treatment of cholera toxin (10 to 1,000 ng/ml) was, however, ineffective in suppressing GVBD. When forskolin (10 to 80 $\mu\text{g/ml}$) was added to the mouse oocyte extracts, cAMP production significantly increased by 5 to 18 fold, whereas cholera toxin (10 to 1,000 ng/ml) was no longer effective. In addition, treatment of guanidyl-imidodiphosphate (GppNHp, 100 μM), which is an activator of the regulatory unit of adenylate cyclase, with forskolin did not exhibit any changes in cAMP production as compared to that induced by forskolin alone. Neither cholera toxin nor cholera toxin plus GppNHp (100 μM) exhibited any differences in mouse oocytes.

From the above results, the suppression of GVBD by forskolin may be mediated by a high level of intracellular cAMP in mouse oocytes. It appears that

본 연구는 1985년도 문교부 학술연구 조성비의 지원을 받아 행해진 것임.

the changes in intracellular cAMP level may an important role in the mouse oocyte maturation.

서 론

대부분의 포유류의 난자는 태아시기에 감수분열을 시작하여 출생을 진후하여 제 1 감수분열의 이증기에 멈추게 된다. 그 이후 사춘기가 지나 각 생식주기마다 생식소 자극 호르몬 분비에 의하여 몇개의 난자만이 감수분열이 재개되어 제 2 감수 분열중기까지 진행된 후 배란된다. 체내에서는 이와 같은 일련의 난자성숙과정이 진행되는 반면, 성숙한 여포에서 난자를 꺼내어 적당한 배양액내에서 배양하면 호르몬의 자극이 없어도 자발적인 난자성숙이 진행됨이 잘 알려져있다(Pincus and Enzmann, 1935). 따라서 체내에서의 난자의 성숙조절 기작을 밝히기 위하여 많은 연구가 진행되었고, 여포내에서 난자가 어떠한 기작에 의해 미성숙상태로 유지되는가는 아직 밝혀지지 않았으나 cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP)가 난자성숙의 생리적 억제제로서의 작용을 나타낸다고 제안되어 왔다(Cho *et al.*, 1974; Dekel and Beers, 1978, 1980; Schultz *et al.*, 1983a, b).

양서류에서는 progesterone이 난자 세포막에 존재하는 adenylate cyclase [ATP pyrophosphate-lyase(cyclizing), E.C. 4.6.1.1.]의 활성을 저해함으로써(Sadler and Maller, 1981) 난자내의 cAMP농도를 낮추고 (Maller *et al.*, 1979; Kostellow *et al.*, 1980), 이에 따라 난자성숙이 진행됨이 잘 알려져 있다. 또한 이러한 progesterone의 성숙유도효과는 adenylate cyclase의 활성제인 cholera toxin이나 forskolin 등에 의하여 억제된다고 보고(Schorderet-Slatkin *et al.*, 1982)되어, 양서류 난자의 성숙과정에 cAMP가 관여하고 있음을 시사해주고 있다.

한편, 포유류의 경우 cAMP의 유도체인 N⁶,O²-dibutyryl cyclic AMP dbcAMP나 phosphodiesterase (PDE)의 억제제들이 배양중인 난자의 자가 성숙을 억제한다는 보고들(Cho *et al.*, 1974; Dekel and Beers, 1978; Schultz *et al.*, 1983b)로부터 난자내의 cAMP 농도가 일정수준을 유지하는 한 미성숙상태가 유지되고, cAMP농도가 낮아져야만 성숙이 진행된다고 추측을 할 수 있다. 또한, 성숙초기에 난자내의 cAMP농도가 낮아지며 PDE억제제가 존재할 경우에는 난자내의 cAMP농도가 낮아지지 않는다는 보고(Schultz *et al.*, 1983b; Vivarelli *et al.*, 1983)와 생쥐난자가 PDE활성도를 갖는다는 보고(Bornslaeger *et al.*, 1984; Jung and Cho, 1986)등이 포유류도 양서류의 경우(Maller *et al.*, 1979)와 같이 cAMP가 난자 성숙과정에 관여한다는 가설을 뒷받침 해주고 있다.

본 연구는 세포내에서 adenylate cyclase의 활성을 촉진하는 것으로 알려진 forskolin과 cholera toxin(Seamon and Daly, 1981; Moss and Vaughan, 1979)이 생쥐난자의 성숙과 난자의 cAMP 합성에 미치는 영향을 관찰함으로써 생쥐난자의 성숙과 난자내 cAMP의 합량 변화와의 상호관계를 규명하고자 했다.

재료 및 방법

1. 난자 채취

본 실험에는 서울대학교 실험동물사육장에서 사육된 생후 20~22일 되는 ICR-strain의 암

컷생쥐가 사용되었다. 생쥐를 도살한 후 기복하여 난소를 얻었으며, 이를 0.2 mM의 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX: Sigma)이 포함된 배양액에 옮긴 뒤 해부현미경 아래에서 예리한 바늘로 성숙한 여포만을 티뜨려 난자를 적출해 내었다. 적출된 난자를 mouth-controlled micropipette으로 반복하여 흡입 배출함으로써 난자로부터 난구세포를 완전히 제거하였으며 난핵(GV)이 뚜렷하고 세포질이 균질한 난자를 골라 실험에 사용하였다. 실험목적에 따라 채취된 난자를 기본배양액에서 두번 씻은 뒤 배양하거나, 세척용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM dithiothreitol)에서 두번 씻은 뒤 cAMP합성을 측정할 때까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다.

2. 난자 배양

난자배양방법은 paraffin oil-drop method (Brinster, 1963) 또는 open culture method를 이용하였다. 즉, petri dish (35×10 mm: Falcon Plastic Co.)에 light paraffin oil (Merck)을 붓고 petri dish 바닥에 80 μl 씩의 배양액 방울을 정착시킨 뒤 그속에 일정수의 난자를 넣어 배양하거나, multi-well plate (Miles Lab.)에 80 μl 의 배양액을 넣은 뒤 일정수의 난자를 넣어 배양하였다. 배양액은 각각 standard egg culture medium (SECM: Biggers, 1971)이나 modified Hank's balanced salt solution (MHBSS: Bae and Channing, 1985)에 0.4% bovine serum albumin을 첨가한 뒤 pH를 7.3으로 조절하여 사용하였다. 배양액은 5% CO_2 와 함께 습기찬 공기가 공급되는 37°C 의 배양기에 먼저 2~3시간 두어 평형을 얻은 뒤에 사용되었으며, 그 뒤 이 배양액에 난자를 넣고 같은 조건에서 4~6시간 배양하였다. 배양이 끝난 난자는 acetic acid-alcohol로 고정하고 0.5% lacmoid용액으로 염색한 후 위상차 현미경(Wild)으로 핵상을 관찰하였다. Forskolin (Calbiochem.)은 100% ethanol에 10 mg/ml의 농도로, cholera toxin (Schwartz/Mann)은 SECM에 1 mg/ml의 농도로 저장용액을 만든 후 이를 소량으로 나누어 -20°C 에서 냉동보관하였으며 실험 직전 녹여 사용하였다. 실험에 사용한 모든 기구는 건열 혹은 고압멸균 하였으며 배양액은 사용직전에 Millipore membrane (pore size 0.45 μm : Millipore Co.)으로 여과 멸균하였다.

3. cAMP 합성 측정

생쥐난자내의 cAMP 합성은 Braun and Dods (1975)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 먼저 냉동보관 했던 난자(단일 측정치당 50개 난자를 사용)를 3번의 freezing-thawing 방법으로 부순 뒤 반응혼합액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM dithiothreitol, 1 mM IBMX, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 10 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 , 20 mM phosphokinase, 그리고 1 mg/ml creatine-phosphokinase)을 섞고 0.35 μM 의 ^3H -ATP (47.8 Ci/mmol: New England Nuclear Co.)를 첨가하여 37°C 에서 20분간 반응시킨 후, trichloro-acetic acid (10%)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 반응혼합액 (40 μl)을 Eppendorf microfuge에서 1분간 원심분리한 뒤 상층액에서 10 μl 를 취하여 실리카겔로 도말된 박막판(두께 0.2mm: Merck)에 스포트한 뒤 전개용기에서 10 cm 전개하여 ^3H -cATP와 ^3H -ATP를 분리하였다. 전개용매로는 95% ethanol과 1 M ammonium acetate를 75:30(V/V)으로 섞어 사용하였다(Khandelwal and Hamilton, 1971). 전개가 끝난 박막판을 건조시킨 후 일정한 길이로 잘라 방사능 계수기(Packard)로 방사능을 측정하였다. 이때 계수기의 측정효율은 67%였다. 이와 같은 방법에 의한 cAMP 측정의 민감도는 측정치당 0.1 pmol이었으며, cAMP 측정량은 난자당 fmole 단위로 환산, 표시하였다. 각 실험은 4번씩 반복하였으며, 실험결과는 Students'

t-test를 이용하여 통계적인 유의성 검정을 하였다.

결 과

1. Forskolin과 cholera toxin이 생쥐난자의 성숙에 미치는 영향

Adenylate cyclase의 catalytic unit의 활성제인 forskolin은 체외 배양중인 생쥐 난자의 성숙을 농도에 따라 유의성 있게 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 대조군, 즉 forskolin이 함유되지 않은 배양액에서 생쥐난자를 4시간 배양했을 때의 핵막붕괴율은 93%인데 반해서 forskolin을 20, 40 그리고 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서의 핵막붕괴율은 각각 56, 43 그리고 31%로서 난자 성숙이 forskolin의 농도에 비례하여 현저히 억제되었다($p < 0.01$). 이러한 forskolin의 핵막붕괴 억제효과가 가역적인 현상인가를 알아보기 위하여 forskolin이 함유된 배양액에서 난자를 3시간 배양하고 이를 forskolin이 포함되지 않은 배양액으로 옮겨 다시 3시간 배양한 후 난자의 핵막붕괴율을 조사하였다(Fig. 2). Forskolin (80 $\mu\text{g/ml}$)을 6시간동안 계속 처리한 난자의 핵막붕괴율은 44%, 그리고 사전에 3시간 동안 forskolin (80 $\mu\text{g/ml}$)이 함유된 배양액에서 배양되었던 난자의 핵막붕괴율은 82%로서 대조군(87%)과 비슷한 정도를 나타내고 있어 결국 이로 보아 forskolin의 핵막붕괴 억제효과는 가역적이었다.

Cholera toxin이 효과를 나타내기까지 난자의 자가성숙을 억제하기 위하여 cholera toxin이 효과를 나타내는데 필요하다고 알려진 한시간 동안(Moss and Vaughan, 1979) PDE 억제제인 IBMX (0.2 mM)와 cholera toxin이 함유된 배양액에서 난자를 전 배양한 뒤, 난자

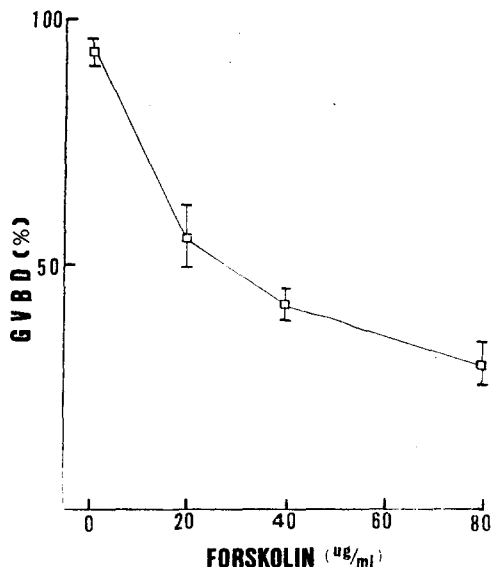


Fig. 1. Effect of forskolin on the maturation of mouse oocytes. Oocytes were cultured in MHBSS for 4 hrs and each point represents the mean \pm S.E. ($n=4$).

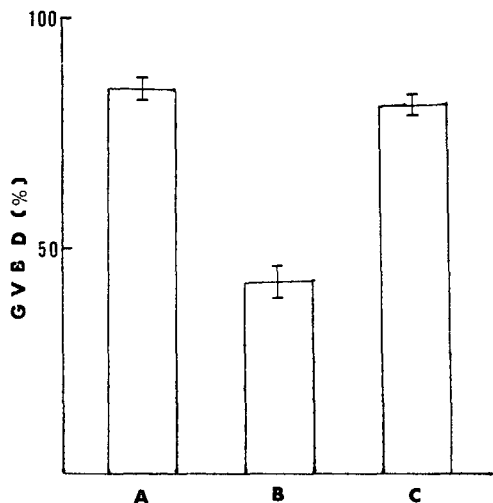


Fig. 2. Reversibility of forskolin effect on the oocyte maturation. Each bar represents mean \pm S.E. ($n=4$). (A), oocytes incubated in control medium (MHBSS) for 6 hrs; (B), incubated with forskolin (80 $\mu\text{g/ml}$) for 6 hrs; and (C), initially exposed to forskolin (80 $\mu\text{g/ml}$) for 3 hrs, then transferred to control medium for the next 3 hr culture.

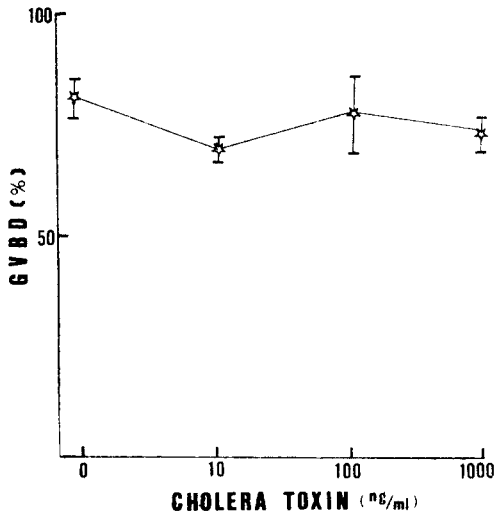


Fig. 3. Effect of cholera toxin on the oocyte maturation. The oocytes were initially incubated for 1 hr in SECM containing only IBMX (control) or IBMX and different concentrations of cholera toxin. After incubation, oocytes were transferred to IBMX-free SECM containing the appropriations of cholera toxin for the next 3 hr culture. Each point represents the mean \pm S.E. (n=4)

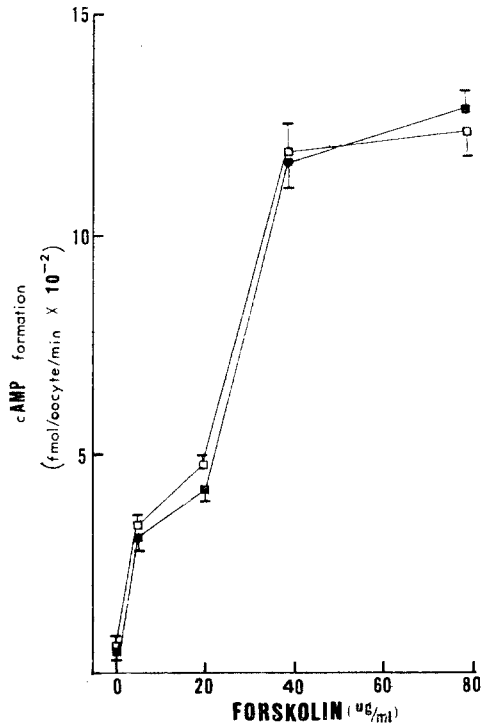


Fig. 4. Effect of forskolin on the production of cAMP in the mouse oocytes. Oocytes were collected in MHBSS and each point represents mean \pm S.E. (n=4). \circ — \circ , treated with forskolin only; and \bullet — \bullet , treated with forskolin and GppNHp (100 μ M).

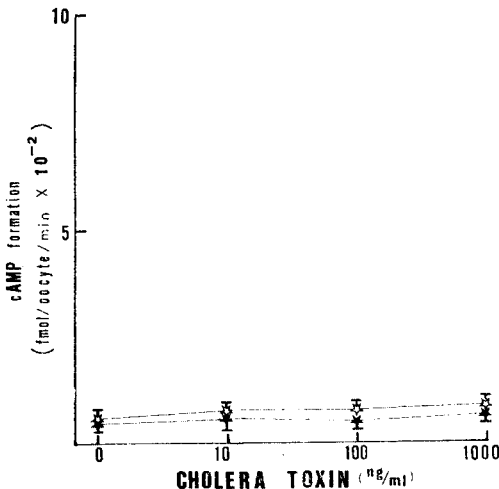


Fig. 5. Effect of cholera toxin on the production of cAMP in the mouse oocytes. Oocytes were collected in SECM and each point represents mean \pm S.E. (n=4). \square — \square , treated with cholera toxin only; and \blacksquare — \blacksquare treated with cholera toxin and GppNHp (100 μ M).

를 cholera toxin만 함유한 배양액으로 옮겨 3시간 더 배양하였다(Fig. 3). 그 결과 cholera toxin을 10~1,000 ng/ml의 농도로 처리한 난자의 핵막붕괴율이 70~80%로써 대조군(82%)과 유의한 차이를 나타내지 않고 있어 cholera toxin은 생쥐난자의 성숙 억제효과가 없음을 보였다.

2. Forskolin과 cholera toxin이 생쥐난자의 cAMP합성에 미치는 영향

난자내의 cAMP 함량변화가 생쥐난자의 성숙에 영향을 주게 되는가를 결정하기 위하여, 생쥐난자 추출물에 adenylate cyclase의 활성제인 forskolin과 cholera toxin을 처리한 뒤 난자의 cAMP합성상태를 측정된 결과를 Fig. 4, 5에 실었다. Forskolin을 10~80 µg/ml의 농도로 처리할 경우 생쥐난자의 cAMP 합성정도는 대조군에 비해서 5~18배 증가되었으며, adenylate cyclase의 regulatory unit의 활성제인 100 µM guanidyl-imidodiphosphate (GppNHp; Sigma Chemical Co.)를함께 첨가한 경우라 하더라도 forskolin만 처리한 실험군과의 cAMP합성에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 4). 한편, cholera toxin (10~1,000 ng/ml)을 처리한 실험군에서는 cAMP 합성의 증가를 볼수 없었고, GppNHp (100 µM)를 함께 처리하여도 cAMP 합성은 여전히 증가하지 않았다.

고 찰

DbcAMP, theophylline, IBMX 등, cAMP 대사과정에 영향을 미치는 물질들이 체외배양 중인 난자의 자가성숙을 억제함(Cho *et al.*, 1974; Dekel and Beers, 1978; Vivarelli *et al.*, 1983)을 근거로 포유류 난자의 성숙과정초기에 양서류의 경우(Maller *et al.*, 1978; Schorderet-Slatkin *et al.*, 1982)와 같이 cAMP가 관여할 것이라고 제안(Schultz *et al.*, 1983 a, b; Eppig and Downs, 1984)되어 왔다.

Dekel and Beers (1978, 1980)는 adenylate cyclase의 활성제인 cholera toxin이 난구세포로 둘러싸인 난자의 성숙을 억제하지만 난구세포가 제거된 난자의 성숙을 억제하지 못함을 관찰한 후, 그들은 난자내에 adenylate cyclase system이 존재하지 않고 난구세포에서 생성된 cAMP가 난구세포와 난자사이에 존재하는 gap junction (Gilula *et al.*, 1978)을 통하여 난자세포질 내로 전해진 것이라고 주장하였다. 그러나, 본 실험에서 adenylate cyclase의 활성제인 forskolin이 생쥐난자의 성숙을 가역적으로 억제하고 또한 난자의 cAMP합성을 증가시키는 것을 밝힘으로써, 생쥐난자가 adenylate cyclase활성을 갖고 있으며 난자내의 cAMP함량의 변화가 난자성숙 조절에 중요한 역할을 할 것이라고 사료된다.

한편, 대부분의 생체조직에서 발견되는 adenylate cyclase는 regulatory unit와 catalytic unit로 이루어져 있으나, 흰쥐정소를 포함한 몇종류의 조직에서는 regulatory unit이 없는 불완전한 adenylate cyclase활성을 갖고 있어 forskolin에 의해서는 촉진되나 cholera toxin은 영향을 나타내지 못함이 알려져 있다(Braun and Dods, 1975). 따라서, 본 실험에서 보는바와 같이 forskolin의 경우와 달리 cholera toxin이 난자내 cAMP 합성에 영향을 주지못한 결과를 두가지 관점에서 고찰해 볼 수 있다. 첫째, adenylate cyclase가 N_s와 N_i의 두 종류의 regulatory unit으로 이루어져 있고, 이들은 서로 길항작용을 하며(Rodbell, 1980), cholera toxin은 그중 한가지 만을(N_s) 활성화하기 (Schleifer *et al.*, 1982)에 생쥐난자의 adenylate cyclase의 regulatory unit의 활성화에 이상이 있음을 추측할 수 있다. 둘째, Hunzicker-Dunn

and Labarbera(1986)는 최근에 cell-free system에서는 cholera toxin이 adenylate cyclase를 활성화 시키지 못한다고 보고한 바, 이처럼 실험 방법상의 문제때문일 가능성도 있다. Regulatory unit의 또 다른 활성화제인 GppNHp를 함께 처리했을 경우에도 난자의 cAMP 합성이 증가되지 않은 결과로 보아 전자의 가정이 타당한 것으로 생각되어지나, 이를 검증하기 위해서는 좀더 많은 연구가 요구된다.

양서류의 경우 성숙 유도물질인 progesterone (Maller *et al.*, 1979; Kostellow *et al.*, 1980)에 의해 난자내의 cAMP 농도감소와 더불어 Ca^{2+} 의 분포 및 단백질 인산화 양상의 변화가 수반됨이 보고되었다(Bae and Cho, 1982). 한편, 포유류의 경우, 보고된 연구결과가 많지 않아 확실하게는 알 수 없지만 난자가 성숙할때 난구세포—난자내의 Ca^{2+} 농도가 증가하고 (Batta and Knudsen, 1980), 배양액내의 Ca^{2+} 농도를 높임으로써 dbcAMP에 의한 난자 성숙억제효과를 극복할 수 있으며 (Powers and Paleos, 1982) 정상적인 난자성숙이 진행되려면 배양액 내에 Ca^{2+} 이 필요하다는 보고(Bae and Channing, 1985)가 있어, 포유류 난자 성숙 과정에 양서류의 경우와 같이 cAMP와 함께 Ca^{2+} 이 작용할 것이라고 추측할 수 있다. 또한, 최근 포유류 난자가 성숙할 때에도 단백질 인산화 양상이 변한다는 보고(Schultz *et al.*, 1983b; Crosby *et al.*, 1984)가 있어, 포유류 난자의 성숙조절기작을 밝히기 위해서는 cAMP, Ca^{2+} , 단백질 인산화 그리고 그 외에 난자성숙에 관여한다고 생각되는 요인들의 상호작용에 관한 연구가 진행되어야 할 것이다.

적 요

본 연구는 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin과 cholera toxin이 생쥐난자의 핵막붕괴 및 cAMP 합성에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었다. 체외난자 배양방법과 adenylate cyclase assay 방법을 이용한 연구의 결과는 아래와 같다.

생쥐난자를 4시간 배양한 결과대조군의 핵막붕괴율은 93%인데 반해서 forskolin (20~40 $\mu\text{g/ml}$)이 함유된 배양액에서 배양한 난자의 핵막붕괴율은 56~36%로써, forskolin의 농도에 비례하여 생쥐난자의 핵막붕괴가 현저하게 억제되었다. Forskolin (80 $\mu\text{g/ml}$)을 3시간 처리한 후, 난자를 forskolin이 제거된 배양액으로 옮겼을 때 난자의 핵막붕괴율이 대조군과 비슷한 정도를 나타내고 있어 forskolin에 의한 핵막붕괴 억제현상은 가역적이었다. 한편, cholera toxin (10 ~ 1,000 ng/ml)은 생쥐난자의 핵막붕괴를 억제시키지 못했다.

Forskolin (10 ~ 80 $\mu\text{g/ml}$)을 생쥐난자 추출물에 첨가할 경우 cAMP합성이 5~18배 증가되었으나, cholera toxin (10~1,000 ng/ml)은 효과가 없었다. 덧붙여, adenylate cyclase의 regulatory unit의 촉진제인 guanidylimido-diphosphate (100 μM)를 forskolin과 함께 처리하여도 forskolin만 처리한 실험군에 비하여 cAMP합성정도에 변화가 없었다. 또한, cholera toxin과 guanidylimido-diphosphate(100 μM)를 함께 처리하여도 생쥐난자의 cAMP합성은 증가되지 않았다.

이상의 결과에서 forskolin에 의한 생쥐난자의 핵막붕괴 억제 현상은 난자내의 cAMP농도가 높아짐으로써 야기된 것이라 추측되며, 난자내의 cAMP 농도의 변화가 생쥐난자 성숙에 중요한 역할을 수행할 것이라고 사료된다.

인 용 문 헌

- Bae, I.H. and W.K. Cho, 1982. Oocyte maturation in some vertebrate animals and mammals. *Kor. J. Fert. Ster.*, 9: 1-28.
- Bae, I.H. and C. P. Channing, 1985. Effects of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized Graafian follicles. *Biol. Reprod.*, 33: 79-87.
- Batta, S.K. and J.F. Knudsen, 1980. Calcium concentration in cumulus-enclosed oocytes of rats after treatment with Pregnant Mares Serum. *Biol. Reprod.*, 22: 243-246.
- Biggers, J.D., 1971. New observation on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. *In: The biology of the blastocyst* (Blandeau, R.J., ed.). Univ. of Chicago Press, Chicago, pp. 319-322.
- Bornslaeger, E.A., M.W. Wilde and R.M. Schultz, 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev. Biol.*, 105: 488-499.
- Braun, T. and R.F. Dods, 1975. Development of a Mn^{2+} sensitive "soluble" adenylate cyclase in rat testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 1097-1101.
- Brinster, R.L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two cell embryo to blastocyst. *Exp. Cell Res.*, 32: 305-308.
- Cho, W.K., S. Stern and J.D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 198: 383-386.
- Crosby, I.M., J.C. Osborn and R.M. Moor, 1984. Changes in protein phosphorylation during the maturation of mammalian oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 229: 459-466.
- Dekel, N. and W.H. Beers, 1978. Rat oocyte maturation *in vitro*: Relief of cAMP inhibition by gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 4369-4373.
- Dekel, N. and W.H. Beers, 1980. Development of the rat oocyte *in vitro*: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.*, 75: 247-254.
- Eppig, J.J. and S.M. Downs, 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, 30: 1-11.
- Gilula, N.B., M.L. Epstein and W.H. Beers, 1978. Cell-to-cell communication and ovulation: A study of the cumulus oocyte complex. *J. Cell. Biol.*, 78: 58-75.
- Hunzicker-Dunn, M. and A.R. Labarbera, 1986. Unique properties of the follicle-stimulating hormone and cholera toxin sensitive adenyl cyclase of immature granulosa cells. *Endocrinology*, 118: 302-311.
- Jung, M.W. and W.K. Cho, 1986. Effects of inhibitors on the activity of cAMP phosphodiesterase in the mouse oocytes. *Kor. J. Zool.*, 29: 79-85.
- Khandelwal, R.L. and J.R. Hamilton, 1973. Purification and properties of adenylate cyclase from *Streptococcus salivarius*. *J. Biol. Chem.*, 246: 3297-3304.
- Kostellow, A.B., D. Ziegler and G.A. Morill, 1980. Regulation of Ca^{++} and cyclic AMP during the first meiotic division in amphibian oocyte by progesterone. *J. Cycl. Nucl. Res.*, 6: 347-358.
- Maller, J.L., F.R. Butcher and E.G. Krebs, 1979. Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 254: 579-582.
- Moss, J. and M. Vaughan, 1979. Activation of adenylate cyclase by cholera toxin. *Ann. Rev. Biochem.*,

- 48: 581-600.
- Pincus, G. and E.V. Enzmann, 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro* and *in vivo*: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, **62**: 665-675.
- Powers, R.D. and G.A. Paleos, 1982. Combined effect of calcium and dbcAMP on GVBD in the mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, **66**: 1-8.
- Rodbell, M., 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature (London)*, **284**: 17-22.
- Sadler, S.E. and J.L. Maller, 1981. Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes: Activation of the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.*, **256**: 6368-6373.
- Schleifer, L.S., R.A. Kahn, E. Hanski, J.K. Northup, P.C. Sternweis and A. G. Gilman, 1982. Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, **257**: 20-23.
- Schroderet-Slatkin, S., M. Schroderet and E.E. Baulieu, 1982. Cyclic AMP-mediated control of meiosis: Effect of progesterone, cholera toxin, and membrane-active drugs in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 850-854.
- Schultz, R.M., R.R. Montgomery, P.F. Ward-Bailey and J.J.Eppig, 1983a. Regulation of oocyte maturation in the mouse: Possible roles of intracellular communication, cAMP, and testosterone. *Dev. Biol.*, **95**: 294-304.
- Schultz, R.M., R.R. Montgomery and J.R. Belanoff, 1983b. Regulation of mouse meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, **97**: 264-273.
- Seamon, K.B. and J.W. Daly, 1981. Forskolin: A unique diterpene activator of cyclic AMP-generating system. *J. Cycl. Nucl. Res.*, **7**: 201-224.
- Vivarelli, E., M. Conti, M. de Felici and G. Siracusa, 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differen.*, **12**: 271-276.