

Lanthanum 이온에 의한 북방산개구리(*Rana dybowskii*) 여포난자의 성숙유도

유영란 · 임옥빈 · 권혁방

전남대학교 자연과학대학 생물학과

북방산개구리 여포난자의 배양계를 이용하여 calcium의 이동과 관련이 있는 것으로 알려진 lanthanum ion(La^{3+})이 난자의 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. La^{3+} 을 배양액에 처리하면 (0.01~1.0 mM) 농도에 의존하여 난자의 성숙이 유도되었으며, 배양후 9~12시간내에 핵붕괴가 일어났다. La^{3+} 처리는 자발적 성숙을 일으키는 난자의 성숙을 촉진하였으며, 3시간 동안의 처리로도 성숙 유도 효과가 있었다. La^{3+} 에 노출된 여포들의 progesterone 수준을 RIA로 측정하여 본 결과 이 이온의 효과가 호르몬의 생성과는 무관하다는 것을 알았다. La^{3+} 에 의한 난자의 핵붕괴는 forskolin(9 μM)이나 cycloheximide(0.01~10 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$)에 의하여 억제되었다. La^{3+} 에 의한 성숙과정에 나타나는 단백질 양상 및 인산화 양상의 변화는 progesterone에 의한 것과 같았다.

이로부터 La^{3+} 의 자극에 의한 성숙과정이 progesterone에 의한 것과 같은 경로를 거치는 것으로 보이며 따라서 Ca^{2+} 이 난자의 성숙 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

KEY WORDS: Oocyte maturation, Amphibia, La^{3+} , Phosphorylation

양서류의 여포난자는 제 1 감수분열 전기에 분열이 정지되어 있다가 생식기에 뇌하수체 호르몬의 자극으로 여포세포에 의해 생성된 progesterone에 의해 성숙(핵붕괴: germinal vesicle breakdown, GVBD)이 유도된다고 알려져 있다 (Masui and Clark, 1979; Schuetz, 1985). 그러나 progesterone이 난자의 성숙을 유도하는 과정은 매우 복잡하여 아직 완전히 규명이 되지 않고 있다. 최근 세포 신호 전달체계의 하나인 phosphatidyl inositol turnover pathway(PIT)가 성숙 재개 과정에 포함되어 있다고 알려짐에 따라 Ca^{2+} 의 역할에 대한 연구가 더욱 관심을 갖게 되었다. *Xenopus*에서 Ca^{2+} 을 직접 배양액에 첨가하거나, Ca^{2+} 의 유입을 촉진시키는 ionophore A23187을 동시에 처리했을 때 난자의 성숙이 유도됨이 알려졌고(Wasserman and Masui, 1975),

calmodulin을 세포내에 주입하면 핵붕괴가 일어난다는 보고(Wasserman and Smith, 1981)도 있어서 Ca^{2+} 이 난자의 성숙에 능동적인 역할을 한다고 생각된다. 그러나 범개구리에서는 Ca^{2+} 이 없는 조건에서도 핵붕괴가 일어났으며(Ecker and Smith, 1971), calmodulin의 성숙유도효과가 없다는 보고가 있었다(Cicirelli and Smith, 1987). 또한 *Xenopus*에서 IP_3 (inositol 1, 4, 5-triphosphate)는 세포내 Ca^{2+} 의 방출효과는 있으나 난자의 성숙유도효과가 없다는 보고도 있었다(Picard *et al.*, 1985). 이렇듯 Ca^{2+} 의 역할에 대한 논란이 계속되고 있으므로 난자성숙과정에서 이 이온의 역할을 아직 잘 모르고 있다. Ca^{2+} 의 능동적인 역할을 지지하는 보고중에 La^{3+} 의 효과에 관한 것이 있다. Lanthanum ion은 세포막에 있는 Ca^{2+} 결합부위에 작용하여 Ca^{2+} 의 치환을 가져옴으로써 세포안에 저장되어 있던 Ca^{2+} 이 방출되고 결국 세포내 Ca^{2+} 의 이동을 가져오는 것으로 알려졌는데 이 이온이 *Xenopus*와 범개구리

본 연구는 한국과학재단의 지원에 의해 수행된 것임 (1989).

에서 난자의 성숙유도효과가 있다는 것이 알려져 있다(Schorderet-Slatkine *et al.*, 1976; Schuetz and Samson, 1979). 그러나 La^{3+} 의 난자성숙유도 효과에 대한 세밀한 분석은 아직 없었다.

본 실험에서는 북방산개구리(*Rana dybowskii*)를 재료로 하여, 1) La^{3+} 이온이 난자의 성숙을 유도할 수 있는지의 여부를 조사하고, 2) 호르몬과 protein kinase C 활성화에 의한 난자성숙과 La^{3+} 에 의한 것과 어떠한 차이를 보이는가를 비교하며, 3) 호르몬과 La^{3+} 에 의한 성숙과정에 일어나는 단백질 및 인산화 양상을 비교하여 보았다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용된 북방산개구리(*Rana dybowskii*)는 11월부터 1월 사이에 전라남도 일원에서 동면중인 것을 채집하여 4°C를 유지하는 저온실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

여포난자의 배양

개구리를 두부절개로 죽인 후 복강에서 난소를 빼내어 해부현미경하에서 여포들을 분리해 낸 후 amphibian Ringer(AR) 용액이 채워진 다공배양접시에 넣고 필요에 따라 시약이나 호르몬을 해당 농도가 되도록 첨가한 다음, 배양접시를 일분에 80회전하는 진탕배양기(22°C)에 옮겨 일정시간 배양하였다. 난자의 성숙 여부는 배양 후 여포들을 가열하거나, 5% trichloroacetic acid(TCA)에 고정한 다음 해부현미경하에서 미세포셉으로 찢개어 핵의 유무로 판정하였다. 즉, 핵붕괴가 일어난 것은 성숙을 일으킨 것으로 간주하였다(Kwon and Schuetz, 1986).

뇌하수체 호르몬 및 시약

Progesterone과 forskolin은 ethanol과 propylene glycol이 1:1로 섞인 용액에 녹여 각각 2 mg/ml과 9 mM의 stock solution을 만들었다. Lanthanum($LaCl_3$)을 사용할 때에는 침전을 막기 위해 $NaHCO_3$ 가 없는 AR을 사용하였다. La^{3+}

과 cycloheximide는 AR에 직접 녹여 6.6 mM과 2 mg/l이 되도록 stock을 만들었으며, 모든 stock 용액을 점차적으로 희석하여 사용하였다. AR과 frog pituitary homogenate(FPH)의 제조 및 기타 자세한 실험 과정은 전보에 기술한 바 있다(Kwon *et al.*, 1988, 1989).

Progesterone radioimmunoassay(RIA)

여포에서 생성된 스테로이드를 methanol로 추출한 다음 통상적인 방법에 따라 RIA를 실시하였다(Lin and Schuetz, 1985; Kwon *et al.*, 1988). 개구리 여포의 스테로이드 정량과정에 대한 제반 조건과 효용성 등은 이미 전보에서 자세히 기술한 바 있다(Kwon and Schuetz, 1986; Kwon *et al.*, 1989). Progesterone의 농도 계산은 Secu RIA program을 사용하여 개인용 컴퓨터로 구하였으며 본 방법에 의한 실험내(intrassay)와 실험간(interassay)의 변이 계수는 각각 7.5%와 11.7%이었다.

단백질의 농도 측정

단백질의 농도는 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 표준단백질로 하여 Lowry 방법(1951)으로 정량하였다.

전기영동

1차원 SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 시행하였다. Separation gel로는 9~12% linear gradient gel을 사용하였으며 stacking gel의 acrylamide 농도는 4.5%이었다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie blue R-250으로 염색하여 단백질 양상을 분석하였다. 이때 표준단백질로는 bovine serum albumin(MW 66 KD), egg albumin(MW 54 KD), trypsinogen(MW 24 KD), β -lactoglobulin(MW 18.4 KD) 및 lysozyme(MW 14.3 KD)을 사용하였다.

자기방사법(Autoradiography)

난소로부터 분리해 낸 여포들을 500 μ Ci/ml의 ^{32}P -orthophosphate(carrier free, Amersham)가

포함된 AR에서 6시간 전배양(preincubation)한 후(400 follicles/8 ml) AR로 재척한 다음 호르몬과 시약이 첨가된 기본 배양액에 옮겨서 배양하였다. 배양이 끝난 후 일부의 여포들을 4°C에서 추출완충액(extraction buffer)을 넣고 조음과 분쇄기로 분쇄한 다음, microcentrifuge로 15,000 g에서 2시간 동안 원심분리하여 투명층을 취하여 전기영동에 사용하였고, 나머지의 난자는 핵상을 조사하는데 사용하였다. 전기영동을 수행한 gel을 건조시킨 다음 Kodak X-Omat AR film과 intensifying screen(Dupont)으로 빛을 후 -70°C에서 1~3주간 동안 노출시켰다.

통계처리

핵붕괴율(% GVBD)에 관한 통계처리는 개체당 한 실험군에 두 조로 반복한 실험의 평균값을 구하여 이들을 angular transformation으로 전환한 후 대조군과 비교하여 Student's t-test를 시행하였다.

결 과

Lanthanum의 성숙유도 효과

먼저 Lanthanum ion이 *Xenopus laevis*에서처럼 (Schorderet-Slatkine *et al.*, 1976) 북방산개구리의 난자들의 성숙을 유도하는지를 조사하였다. 배양액에 여러 농도(0.01~1.0 mM)의 La^{3+} 을 첨가한 다음 24시간 배양 한 후 성숙율(핵붕괴율)을 조사하여 보았다. 배양액의 La^{3+} 은 난자의 성숙을 유도하였으며, 0.33 mM에서부터 그 효과가 뚜렷이 나타났다($P < 0.01$)(Fig. 1).

La^{3+} 에 의한 난자성숙이 배양 후 몇 시간에 일어났는지를 조사하기 위하여 여포난자들을 La^{3+} (0.33 mM)이 첨가된 배양액에 배양하면서 일정 시간 간격으로 고정하여 난자의 성숙정도를 조사하였다. Fig. 2는 La^{3+} 자극 후 약 9.2 시간에서 절반의 난자가 핵붕괴를 일으킨다는 것을 보여주고 있다. 자매 난자들을 같은 조건으로 배양하면서 progesterone을 처리했을 때 절반의 난자들이

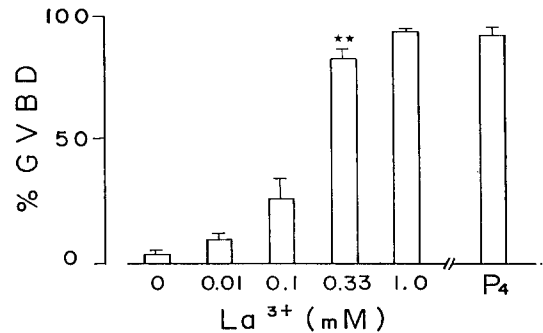


Fig. 1. Dose response to La^{3+} for inducing meiotic maturation of *R. dybowskii* oocytes *in vitro*. Follicles were cultured for 24 hours in sodium bicarbonate free AR medium containing different concentrations of $LaCl_3$ (0.01~1.0 mM). Each bar in the figure represents % GVBD (mean \pm SEM) of 200 follicles (well duplicates, 5 animals). P₄: progesterone (1 μ g/2 ml). ** $P < 0.01$, when compared with control.

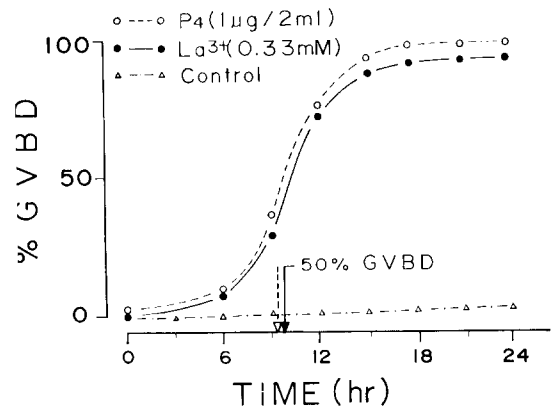


Fig. 2. Time course of La^{3+} -induced oocyte maturation (GVBD) of *R. dybowskii* *in vitro*. Isolated follicles from each animal were cultured in AR medium containing 1 μ g/2 ml of progesterone or 0.33 mM of La^{3+} and examined for their GVBD at designated time points during culture period. Each point in the figure represents average % GVBD of 160 follicles (well duplicates, 4 animals). 50% GVBD occurred at 9.2 hours in La^{3+} and at 9 hours in progesterone-treated oocytes (indicated by arrows).

성숙을 일으키는 시간은 9시간 이었다(Fig. 2). 또한 La^{3+} (0.33 mM)의 첨가가 자발적인 성숙을 일으키는 난자의 성숙시간을 progesterone처럼 단축시키는 현상도 발견하였다(결과 표시하지 않

Table 1. The progesterone accumulation by *R. dybowskii* ovarian follicles stimulated with La^{3+} and FPH *in vitro*.

	concentration of progesterone (pg/follicle)
none	9 ± 6
La^{3+} (0.33 mM)	28 ± 8**
FPH (0.1 p.e./2 ml)	113 ± 17

Isolated follicles were cultured for 6 hours in the presence of La^{3+} (0.33 mM) or FPH (0.1 pituitary equivalent/2 ml). After culture, intrafollicular progesterone level was measured by steroid RIA. The data represent pg progesterone per follicle (mean ± SEM) (n = 6, triplicate incubations, 2 animals). **P < 0.01, when compared with control.

음).

Lanthanum의 작용과 여포의 progesterone 생성

양서류 난자는 progesterone에 의해 성숙이 되므로(Kwon and Schuetz, 1986) La^{3+} 이 여포세포의 progesterone 생성을 통하여 난자의 성숙을 유도할 가능성이 있다. 이를 조사하기 위하여 0.33 mM의 La^{3+} 을 포함한 배양액에서 여포들을 6시간 배양한 후 여포내 축적된 progesterone의 농도변화를 조사한 결과 개구리 뇌하수체 추출물(FPH, 0.1 p.e./well)은 여포에 다량의 progesterone을 축적시켰지만 La^{3+} 은 호르몬의 생성을 약간만 촉진시켰었다(Table 1). 그러나 이 농도(27.6 pg/follicle)는 기본 농도의 두 배 정도로서 난자의 성숙을 유도할 수 없는 낮은 농도이었다(Kwon *et al.*, 1989). 이 결과는 La^{3+} 이 여포세포를 경유하지 않고 난자에 직접 작용하여 난자의 성숙을 일으켰다는 것을 보여 주고 있다.

Lanthanum의 작용에 대한 cAMP와 cycloheximide의 영향

호르몬에 의한 난자성숙에서 그 첫단계로 cAMP의 농도저하가 일어난다고 알려져 있으므로(Finidori-Lepicard *et al.*, 1983) La^{3+} 에 의한 성숙에서도 cAMP가 관여하는지를 조사하여 보았다. Fig. 3에서 보여주듯이 La^{3+} (0.33 mM)에

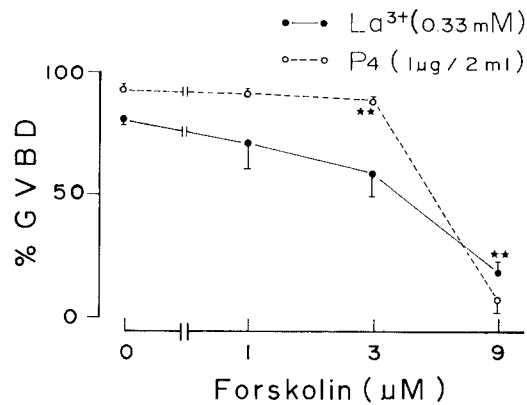


Fig. 3. Inhibitory effect of forskolin on the La^{3+} or progesterone induced oocyte maturation of *R. dybowskii* *in vitro*. Follicles were cultured in the absence or presence of different doses of forskolin (1~9 μM) plus La^{3+} (0.33 mM) or progesterone (1 μg/2 ml) and examined for their GVBD after 24 hours of culture. Each point in the figure represents average % GVBD (mean ± SEM) of 80 follicles (well duplicates, 2 animals). **P < 0.01, when compared with control.

의한 성숙이 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin(9 μM)에 의해 뚜렷이 억제되었다. 아울러 progesterone의 경우와 같이 La^{3+} 자극 후 4시간 이후에 forskolin을 처리했을 때는 이 억제 효과가 나타나지 않았다(결과 표시하지 않음).

La^{3+} 에 의한 성숙과정에 단백질 합성이 필요한지를 조사하기 위하여 cycloheximide를 처리한 결과 progesterone의 경우와 같이 1 μg/2 ml의 농도에서 난자성숙이 현저히 억제되었다(Fig. 4). 이와 같이 La^{3+} 이나 호르몬에 의한 성숙에서 모두 cAMP의 농도저하와 단백질의 합성이 필요하다는 것을 알 수 있었다.

Lanthanum에 의한 난자의 성숙과 단백질 양상의 변화

Lanthanum ion, progesterone 및 protein kinase C(PKC)의 활성화에 의한 난자의 성숙과정에서 일어나는 단백질의 변화양상을 조사하였다. 9~12%의 SDS-PAGE gradient gel을 사용한 결과 La^{3+} 에 의해 성숙된 난자의 단백질 양상은 아무 것도 처리하지 않은 미성숙 난자와 prog-

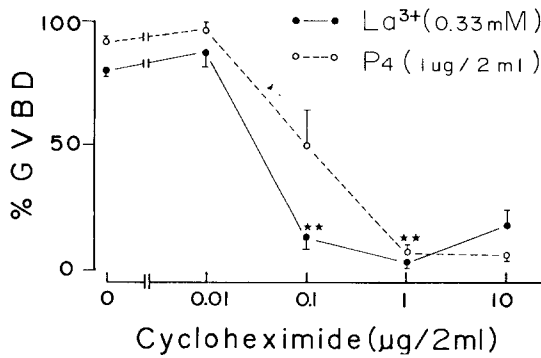


Fig. 4. Inhibitory effect of cycloheximide on the La³⁺ or progesterone induced oocyte maturation of *R. dybowskii* in vitro. Follicles were cultured in the absence or presence of various doses of cycloheximide (0.01~1.0 µg/2 ml) plus La³⁺ (0.33 mM) or progesterone (1 µg/2 ml) and examined for their GVBD after 24 hours of culture. Each point in the figure represents average % GVBD (mean ± SEM) of 80 follicles (well duplicates, 2 animals). ** P < 0.01, when compared with control.

esterone 및 PKC의 활성화제인 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetates(TPA) 처리에 의해 성숙된 난자의 그것과 거의 차이가 없었다(Fig. 5). 또한 이차원 전기영동을 실시하여 미성숙(GV) 난자와 성숙된 GVBD 난자간에 나타난 단백질 양상을 비교하여 본 결과에서도 특이한 변화가 없었다(결과 표시하지 않음).

Lanthanum에 의한 난자성숙과 단백질 인산화 양상

양서류 여포난자의 성숙과정에서 특정 단백질들의 인산화와 탈인산화 반응이 일어난다는 것은 이미 잘 알려져 있다(Maller, 1985). Protein kinase C의 활성화에 의한 난자성숙에도 같은 현상이 나타나는 것을 본 실험실에서 발견한 바 있다(미 발표결과). 본 실험에서는 La³⁺에 의한 난자성숙에서도 단백질들의 인산화와 탈인산화 과정이 같은 양상으로 변하는지를 조사하였다. 난자들을 6시간 동안 ³²PO₄(0.5 mCi/ml)로 표지한 후 기본배양액으로 옮겨 La³⁺, progesterone 혹은 TPA를 첨가한 실험군과 아무것도 처리하지 않은 대조군으로 나누어 18시간 배양한 후 자기방사법으로 단백질 인산화양상을 조사하였다.

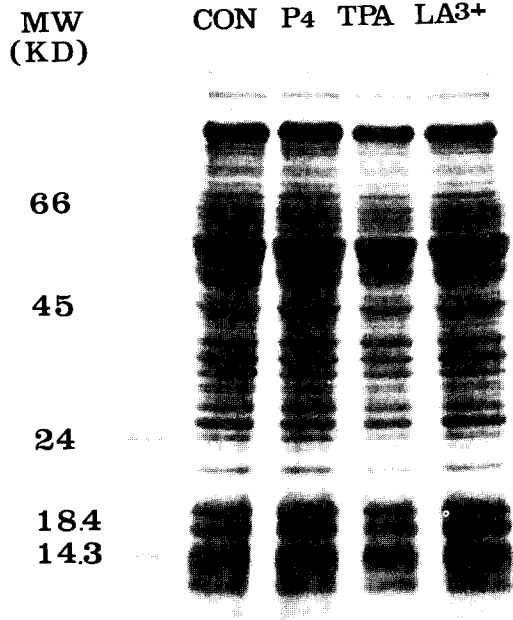


Fig. 5. Electrophoregram of one dimensional gradient gel electrophoresis (9~12%, SDS-PAGE) of the proteins in *R. dybowskii* oocytes. CON, immature GV oocyte; P₄, matured oocyte with progesterone; TPA, matured oocyte with TPA; La³⁺, matured oocyte with La³⁺. The numbers in the left panel represent the molecular weight; 66 KD, bovine serum albumin; 45 KD, ovalbumin; 24 KD, trypsinogen; 18.4 KD, β-lactoglobulin and 14.3 KD, lysozyme. Detailed experimental procedures were described in materials and methods.

Fig. 6은 성숙된 난자들(GVBD 난자)이 미성숙난자(GV 난자)들에 비하여 많은 단백질들이 인산화 되었다는 것을 보여 주고 있다. 즉, 대조군에 비하여 112, 31, 22.5, 22, 17 KD 및 15.5 KD의 단백질들이 강하게 인산화되었으며 특이하게 16.5 KD의 단백질은 탈인산화가 되었음을 알 수 있었다(Fig. 6). 그러나 성숙된 난자들의 이 인산화양상의 변화는 자극의 종류에는 전혀 차이가 없었다. 이 결과는 La³⁺, progesterone 및 PKC의 활성화에 의한 성숙과정에서 일어나는 단백질의 인산화, 탈인산화가 꼭 같다는 것을 의미한다.

위의 결과들은 어떤 종류의 자극에 의해서건 난자의 성숙이 개시되면 그 후의 과정이 같다는 것

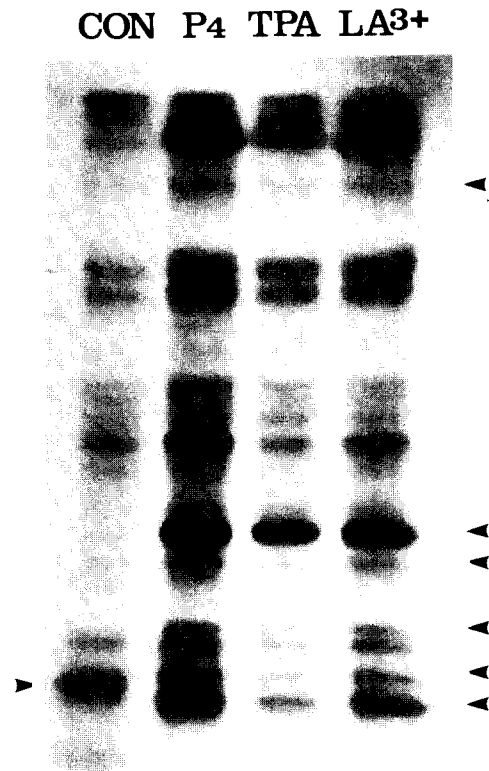


Fig. 6. The patterns of protein phosphorylation during maturation of *R. dybowskii* oocytes *in vitro*. The oocytes were labeled with [³²PO₄]-orthophosphate for 6 hours, and after thorough washing, transferred to plain media containing progesterone, TPA or La³⁺, respectively and cultured for 18 hours. The left arrows indicated dephosphorylated protein (16.5 KD) during oocyte maturation. The right arrows indicated newly phosphorylated protein during oocyte maturation (112 KD, 31 KD, 22.5 KD, 20 KD, 17 KD and 15.5 KD). CON, GV oocyte; P₄, progesterone induced GVBD oocyte; TPA, TPA induced GVBD oocyte; La³⁺, La³⁺ induced GVBD oocyte.

을 보여주고 있다. 이는 La³⁺에 의한 난자의 성숙이 호르몬에 의한 것과 같은 경로를 거친다는 것을 의미한다. 따라서 간접적으로 세포내 Ca²⁺의 이동을 촉진하면 난자의 성숙이 일어난다는 것을 본 결과는 보여주고 있다.

고 찰

본 실험의 결과는 Lanthanum ion이 북방산개구리 여포난자의 성숙을 유도할 수 있다는 것과 이 성숙이 호르몬에 의한 것과 거의 같다는 것을 보여주고 있다. 즉 Lanthanum ion에 의해 50% 난자가 성숙을 일으키는 데 요구되는 시간이 호르몬과 PKC의 활성화(TPA로 자극)에 의해 유도된 성숙의 그것과 거의 같았으며 시간경과에 따른 핵붕괴율의 빈도도 거의 같은 것으로 나타났다 (Fig. 2). 아울러 La³⁺은 progesterone처럼 자발적 성숙을 일으키는 북방산개구리의 난자에 성숙 촉진효과도 나타내었다.

이러한 현상학적 증거 이외에 다음과 같은 점에서 La³⁺의 의한 난자성숙이 정상적인 성숙경로를 따른다는 것을 보여 주고 있다. 첫째, La³⁺에 의한 성숙이 호르몬에 의한 것처럼 세포내의 cAMP에 의해 억제된다는 점이다(Fig. 3). 범개구리의 경우에도 이러한 현상이 발견되었는데 이는 adenylate cyclase의 활성이 감소됨과 동시에 세포내에 저장되어 있던 calcium이 방출되어 감소 분열을 재개한다는 Morrill 등(1981)의 주장을 뒷받침해 주고 있다. 둘째 La³⁺에 의한 난자성숙과정에서 일어나는 일련의 생화학적 변화가 호르몬에 의한 것과 같다는 점이다. 즉, 이 과정이 단백질 합성 저해제인 cycloheximide에 의해 억제되었으며(Fig. 4), 단백질 양상의 변화가 progesterone에 의한 난자성숙에서 나타난 것과 다름이 없었다(Fig. 5). 이는 La³⁺에 의하여 어떤 특이 단백질이 생성되거나 없어지지 않는다는 것을 의미한다. 셋째, La³⁺에 의해 일어나는 단백질의 인산화 양상이 호르몬이나 PKC의 활성화에 의한 것과 거의 같다는 점이다. 어떤 단백질의 인산화, 탈인산화 반응이 난자내에서 MPF의 형성에 중요한 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있으므로 이러한 인산화의 양상이 같다는 것은 이들이 동일한 반응경로를 사용할 가능성이 크다는 것을 의미한다. 넷째, 범개구리에서 La³⁺의 의해 활성화된 MPF를 미성숙 난자에 미세주입하면 호르몬을

처리한 것 처럼 난자의 핵붕괴가 일어난다는 점이 다(Schuetz and Samson, 1979). 이러한 점들은 La^{3+} 에 의한 핵붕괴가 호르몬에 의한 것과 같다는 것을 여러가지 측면에서 보여주고 있다.

난자의 성숙과정을 설명하는데 근래에 가장 주목을 받고 있는 설은 신호전달체계(signal transduction pathway)의 일종인 phosphatidyl inositol turnover pathway(PIT)(Nishizuka, 1984)가 난자내에 존재하며 호르몬의 자극이 있을 때 이 경로가 작동한다는 것이다. 이 설에 의하면 외부 자극에 의해 막성인 phosphoinositide가 분해되어 생긴 산물의 하나인 IP_3 가 세포내에서 Ca^{2+} 의 이동을 촉진시키고 또 다른 산물인 diacylglycerol(DAG)은 Ca^{2+} 에 의존하는 PKC를 자극한다는 것이다. 활성화된 PKC는 다시 어떤 단백질의 인산화, 탈인산화를 유도하고 결국 MPF를 활성화시켜 난자의 성숙을 일으킨다는 것이다(Eckberg, 1988). 양서류의 난자의 PKC를 TPA로 활성화시키면 *Xenopus*(Stith and Maller, 1987; Eckberg, 1988), 범게구리(Kleis-San Francisco and Schuetz, 1988) 및 북방산개구리(Kwon and Lee, 1991)에서 난자의 성숙을 유도할 수 있다는 보고들은 이 설을 뒷받침해 주고 있다. Lanthanum ion이 난자의 성숙을 유도한 과정에서도 이러한 경로를 통하여 이루어졌을 가능성이 크다. 즉, La^{3+} 이 난자내의 Ca^{2+} 의 이동(mobilization)을 촉진시키고 또한 PKC를 활성화시켜 궁극적으로 난자의 핵붕괴를 유도했다고 추정할 수 있다. 그러나 현재로서는 La^{3+} 이 난자내 PIT 경로에서 Ca^{2+} 의 역할을 촉진했다는 직접적인 증거가 없다. 따라서 La^{3+} 의 성숙유도 효과가 이 이온 고유의 약리적인 작용에 의한 것일 가능성을 완전히 배제할 수는 없다고 보겠다. 과연 La^{3+} 의 작용이 이러한 신호전달 체계의 반응 경로와 직접적인 연관이 있는지는 앞으로 더 연구를 해야할 과제이다.

인용문헌

- Cicirelli, M. and L. D. Smith, 1987. Do calcium and calmodulin trigger maturation in amphibian oocytes? *Dev. Biol.* **121**: 48-57.
- Eckberg, W. R., 1988. Intracellular signal transduction and amplification mechanisms in the regulation of oocyte maturation. *Biol. Bull.* **174**: 95-108.
- Ecker, R. E. and L. D. Smith, 1971. Influence of exogenous ions on the events of maturation in *Rana pipiens* oocytes. *J. Cell Bull.* **77**: 61-70.
- Finidori-Lepicard, J., S. Schorderet-Slatkine, J. Hanoune, and E. E. Baulieu, 1983. Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* (London) **292**: 255-257.
- Kleis-San Francisco, S. and A. W. Schuetz, 1988. Role of protein kinase C activation in oocyte maturation and steroidogenesis in ovarian follicles of *Rana pipiens*: Studies with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Gamete Res.* **21**: 323-334.
- Kwon, H. B. and A. W. Schuetz, 1986. Role of cAMP in modulating intrafollicular progesterone levels and oocyte maturation in amphibians (*Rana pipiens*). *Dev. Biol.* **117**: 354-364.
- 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 influence, progesterone production and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.* **252**: 190-199.
- Kwon, H. B. and W. K. Lee, 1991. Involvement of protein kinase C in the regulation of oocyte maturation in amphibian (*Rana dybowskii*). *J. Exp. Zool.* **257**: 115-123.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structure protein during the assemble of the head of bacteriophage T₄. *Nature* (London) **227**: 680-685.
- Lin, Y.-P. and A. W. Schuetz, 1985. Intrafollicular action of estrogen in regulating pituitary-induced ovarian progesterone synthesis and oocyte maturation in *Rana pipiens*: Temporal relationship and locus of action. *Gen. comp. Endocrinol.*, **58**: 421-435.
- Lowry, O. H. and N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Maller, J. L., 1985. Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Differ.* **16**: 211-221.

- Masui, Y. and H. J. Clark, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.*, **57**: 185-282.
- Morrill, G. A., D. Ziegler, and A. B. Kostellow, 1981. The role of Ca^{2+} and cyclic nucleotides in progesterone initiation of the meiotic divisions in amphibian oocytes. *Life Sci.*, **29**: 1821-1835.
- Nishizuka, Y., 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature (London)* **308**: 693-698.
- Picard, A., F. Giraud, F. LeBouffant, F. Sladeczek, C. LePeuch, and M. Doree, 1985. Inositol 1, 4, 5-triphosphate microinjection triggers activation, but not meiosis maturation in amphibian and starfish oocytes. *FEBS Lett.* **182**: 446-450.
- Schorderet-Slatkine, S., M. Schorderet, and E. E. Baulieu, 1976. Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by lanthanum. *Nature (London)* **262**: 289-290.
- Schuetz, A. W., 1985. Local control mechanisms during oogenesis and folliculogenesis. *In: Developmental Biology*, Vol. 1. (L. W. Browder, ed.) Plenum press, New York, pp. 3-83.
- Schuetz, A. W. and D. Samson, 1979. Protein synthesis requirement for maturation promoting factor (MPF) initiation of meiotic maturation in *Rana* oocytes. *Dev. Biol.* **68**: 636-642.
- Stith, B. J. and J. L. Maller, 1987. Induction of meiotic maturation in *Xenopus laevis* by 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate. *Exp. Cell Res.* **169**: 514-523.
- Wasserman, W. J. and L. D. Smith, 1981. Calmodulin triggers the resumption of meiosis in amphibian oocytes. *J. Cell Biol.* **89**: 389-394.
- Wasserman, W. J. and Y. Masui, 1975. Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. *J. Exp. Zool.* **193**: 359-375.

(Accepted January 31, 1991)

Maturation Induction *in vitro* of *Rana dybowskii* Oocyte by Lanthanum Ion

Yung-Ran Yu, Wook-Bin Im, and Hyuk Bang Kwon (Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

The effect of lanthanum ion (La^{3+}), which is associated with the mobilization of internal calcium, on the regulation of oocyte maturation was investigated with *Rana dybowskii* follicles. Follicular oocytes matured (germinal vesicle breakdown, GVBD) dose dependently when they were exposed to La^{3+} (0.01~1.0 mM) and the maturation occurred in 9~12 hours after the La^{3+} (0.33 mM) stimulation. Lanthanum also accelerated the onset of maturation of the follicular oocytes exhibiting spontaneous maturation. Three hours of exposure to La^{3+} was enough to induce the maturation. The La^{3+} -induced maturation was not associated with progesterone production by follicle cells, and the maturation was inhibited by forskolin (9 μM), and cycloheximide (0.01~1.0 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$) in the medium. The La^{3+} and hormone stimulated maturation showed the same patterns of protein phosphorylation and dephosphorylation during the maturation. The data suggest that the oocyte maturation by La^{3+} stimulation is very similar to that by progesterone. Thus, it seems that internal mobilization of Ca^{2+} plays a key role in the initiation of oocyte maturation in amphibia.