

## 옴개구리의 생식주기와 난자의 성숙유도

유명식 · 나철호 · \*김지열 · \*\*강성구 · 권혁방

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

본 연구는 옴개구리(*Rana rugosa*)의 생식주기를 파악하고 이들 난자들의 체외 성숙조건을 구하기 위하여 수행하였다. 개구리들의 gonadosomatic index(GSI)는 4월에서 8월 사이에는 비교적 낮았고 9월에서 이듬해 3월까지의 높았다. 여포들의 성장은 주로 6월에서 9월 사이에 이루어지는데 난소내에서도 여포들의 성장 속도는 일부 다른 것으로 나타났다. 야외 관찰에서 이 개구리들은 서식지의 온도에 따라 4월에서 7월 사이에 산란을 한다는 것과 10월에서 이듬해 3월까지 동면을 한다는 것을 알았다. 산란기에 취한 여포 난자들은 생체의 배양에서 progesterone에 성숙반응(germinal vesicle breakdown(GVBD))을 일으키지 않았다. 그러나 protein kinase C(PKC)의 촉진제인 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA) 혹은  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase의 저해제인 ouabain을 progesterone과 동시에 처리했을 때에는 성숙반응을 일으켰다(각각 86%와 80%). TPA로 핵붕괴를 일으킨 난자의 세포질을 미성숙 난자에 주입하면 미성숙 난자의 핵붕괴를 유도하였으며 성숙된 다른 종의 난자들의 세포질도 이와 같은 효과를 나타내었다. TPA의 성숙유도 효과는 5분의 노출 기간으로도 충분하였으며 PKC의 저해제인 H-7을 처리하면 그 효과가 없어졌다. 이러한 결과들은 옴개구리의 난자는 호르몬에 성숙반응을 일으키지 않으나 PKC 활성화 이후 단계는 정상이라는 것을 의미한다.

**KEY WORDS:** *Rana rugosa*, Reproductive Cycle, Oocyte Maturation

무미 양서류인 개구리들은 일반적으로 여름에서 가을을 지나는 동안 여포들의 성장이 이루어지며 성장이 거의 끝난 늦가을(대략 10월)에 동면에 들어가 그 이듬해 봄에 산란을 한다(Masui and Clarke, 1979; Schuetz, 1985). 겨울에 동면중인 개구리의 여포를 생체의 배양을 하면서 뇌하수체 추출물(frog pituitary homogenate, FPH) 혹은 progesterone을 처리하면 억제되어 있던 난자의 성숙(핵붕괴)이 재개된다. 따라서 난자의 배양계는 세포 주기를 연구하는 모델로 많이 이용되고 있다(Eckberg, 1988; Smith, 1989). 본인 등은 한국산 개구리인 북방산개구리(*Rana dybowskii*)와 참개구리(*Rana nigromaculata*)에서도 여포난자를 일반적인 방법으로 배양을 하면 성숙이 유도된다는 것을 보고한 바 있다(Kwon *et al.*, 1988, 1990). 또한 이들 개구

리 여포의 배양계를 사용하여 난자의 성숙 과정에서는 물론 배란 과정에서도 protein kinase C(PKC)가 능동적인 역할을 한다는 것을 처음으로 보고한 바 있다(Kwon and Lee, 1991; Kwon *et al.*, 1992). 그러나 옴개구리의 난자는 다른 개구리와 달리 생체의 배양에서 기존의 방법으로(FPH나 progesterone의 처리) 난자의 성숙을 유도할 수 없었다. 흥미롭게도 이들 옴개구리의 난자에 TPA를 처리하여 PKC를 활성화시키면 MPF의 생성과 함께 난자의 핵붕괴를 일으킬 수 있었다(Yoo *et al.*, 1992).

본 연구에서는 이제까지 보고되지 않은 옴개구리의 생식주기와 난자들의 성장 과정에 대해 먼저 조사하고 다음 성장이 완료된 난자를 대상으로 PKC의 활성화제인 TPA가 과연 옴개구리의 난자 성숙을 정상적으로 유도할 수 있는지를 체계적으로 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

옴개구리(*Rana rugosa*)들을 광주 근교의 여러 장소에서 연중 매달 두번씩(약 2주 간격) 채집을 하였으며 성체라고 생각되는 암컷 개구리(10-20 g)를 실험 재료로 삼았다. 봄에서 가을 사이에는 개천가에서 활동 중인 것을, 겨울에는 물 속에서 동면중인 것을 채집하였으며 활동기에 채집한 개구리들은 채집 후 일주일 이내에 실험에 사용하였다.

### 생식 주기의 분석

실험전에 개구리의 무게를 미리 잰 후 복강을 절개하여 난소를 떼어 낸 다음 난소의 무게를 정밀 저울로 재었다(wet weight). 개구리의 gonadosomatic index(GSI)는 난소 무게를 그 개체의 무게로 나눈 값에 100을 곱하여 구하였다. 분리해 낸 난소를 amphibian Ringer (AR) 용액이 담긴 petri dish에 옮긴 다음 해부현미경 하에서 난소를 구성하고 있는 여포들의 성장 단계를 구분하였다. 여포의 성장 단계는 본 실험실에서 참개구리를 대상으로 구분한 전례(Kwon *et al.*, 1991)와 *Xenopus*에서 수행한 방법에 따라 여포의 크기, 모양, 피질의 색소 등을 기준으로 구분하였다(Dumont, 1972). 개구리들이 산란기 혹은 번식기에 있다는 것은 GSI의 변화 이외에 서식지에서 포집중인 개구리들이 자주 발견되고 또한 개구리의 알이나 올챙이를 관찰할 수 있는 것 등으로 확인하였다.

### 여포(난자)의 배양

AR을 포함하고 있는 접시에서 난소를 작은 조각으로 나눈 다음 난소 조각으로부터 개개의 여포를 미세핀셋(watch maker's forcep)으로 분리해 내었다. 이 때 성장이 완료된 Class V에 해당하는 여포들을 골라내어 배양의 재료로 삼았다. 분리해낸 여포들을 2 ml의 AR을 포함하고 있는 다공배양접시(24 well culture dish,

Nunc)에 20개씩 넣고 해당 시약을 처리한 다음 진탕배양기(24°C, 80 oscillation)에서 일정 시간 배양을 하였다. Denude 난자가 필요할 때에는 여포에서 미세핀셋으로 협막세포층을 제거한 다음 calcium이 없는 배양액에서 진탕을 하여 난자로부터 여포세포(granulosa cell)를 완전히 제거하였다(Lin and Schuetz, 1985). 배양이 끝난 여포난자들을 trichloroacetic acid (TCA, 5%)에 고정시킨 다음 해부현미경 하에서 핵붕괴 여부를 조사하였다. 감수분열이 재개되어 핵붕괴를 일으킨 난자(GVBD 난자)를 성숙된 것으로 간주하였다(Kwon *et al.*, 1988).

### 호르몬 및 시약

뇌하수체추출물(frog pituitary homogenate, FPH)은 실험 때마다 개구리의 뇌하수체를 분리해 낸 후 일정 수 이상 모이면 전보에 기술한 방법에 따라 제조하였다(Kwon *et al.*, 1989, 1991). PKC의 활성화제인 TPA와 불활성 phorbol ester인 4 $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate(4 $\alpha$ -PDD) 및 PKC의 불활성제인 1-(5-isoquinolinylnylsulfonyl)-2-methylperazine(H-7)은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 각 4 mM, 12.8 mM, 40 mM의 stock solution 으로 만들어 사용하였다(Kwon and Lee, 1991). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 억제제인 ouabain은 AR에 녹여 1 mM로 제조하여 사용하였다.

### MPF를 포함한 세포질의 추출 및 미세주입

GV 혹은 GVBD 난자의 세포질을 직접 미성숙 난자에 주입하거나 이들 세포질에서 MPF 성분을 추출하여 주입하였다. 세포질의 추출 과정은 Lohka 등(1988)이 수행한 방법에 따랐다. MPF를 포함할 것으로 예상되는 난자 혹은 대조군의 난자들을 homogenizer로 파쇄한 후 원심 분리 과정(100,000 g, 2 hr)을 거쳐서 세포질을 추출하였다. 이들 세포질 추출물에 과연 MPF의 활성이 있는지를 조사하기 위하여 미세 조작장치를 사용하여 75-100 nl의 추출물을 미성숙 난자에 주입한 후 24시간 배양한 다음 난자

의 성숙 여부를 조사하였다. 미세주입의 구체적인 과정은 전보에 자세히 기술한 바 있다(Yoo *et al.*, 1992).

#### 통계 처리

핵붕괴율(% GVBD)을 비교할 때에는 이 수치를 먼저 angular transformation으로 전환한 다음 Student's t-test를 하여 유의성을 검정하였다.

### 결과

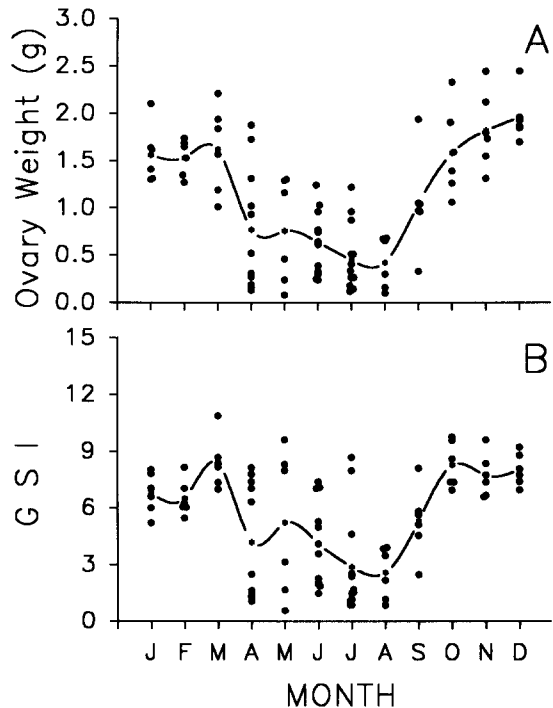
#### 옴개구리의 연중 GSI와 난소 무게의 변화

이제까지 옴개구리의 생식에 관한 보고가 거의 없으므로 먼저 연중 GSI의 변화를 조사하고 야외 관찰을 통하여 이들의 생식주기를 파악하고자 하였다. GSI의 결과를 보완하기 위하여 난소 무게의 변화도 아울러 조사하였다. 매달 6-12 마리의 암컷 개구리를 채집하여 GSI와 난소의 무게를 구하여 Fig. 1에 표시하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 4월에서 8월까지 GSI(4 이하)와 난소의 무게가(1g 이하) 매우 낮은 개체들이 많이 나타났다. 이들 값이 낮은 것은 여포에서 큰 난자들이 배란한 후 작은 여포들만이 남아 있기 때문이었다. 그러나 4월에서 7월에도 여전히 GSI 값이 매우 높은(약 8) 개체들이 상당 수 나타남을 알 수 있다(전체 개체 수의 약 30%). 이들의 난소를 조사해 본 결과 아직도 성장이 완료된 큰 난자들을 그대로 간직하고 있어서 이 개체들은 배란을 하지 않았음을 알 수 있었다(Table 1). 난소의 무게 변화도 GSI의 변화와 거의 일치 하였다. 이러한 결과들은 옴개구리의 배란 시기가 4월에 시작하여 거의 7월까지 계속 된다는 것을 보여준다. 야외 관찰 결과에 의하면 이 개구리들은 생활의 행동 범위가 제한되어 있어서 비교적 좁은 장소 내에서 서식을 하며 일정한 서식지에서는 거의 일정한 시기에 번식을 한다는 것을 알았다. 즉 대체로 일찍 따뜻해지는 하류의 하천에서 서식하는 개구리들은 4-5월에 산란을 하고 온도가 낮은 산간 계곡에 서식을 하

는 개구리들은 6-7월에 산란을 하였다. 따라서 서식 장소에 따라 이들의 번식기가 4월에서 7월 까지 이어진다고 보겠다.

#### 옴개구리 여포의 성장 과정

난소내 여포들의 성장 양상을 조사하기 위하여 상기 실험에 사용한 난소들을 해부현미경 하에서 검경하면서 여포들의 성장 상태를 조사하였다. 여포들의 성장 단계를 피질 색소, 여포의 크기(직경) 및 채집 기간을 고려하여 다섯 단계로 분류하였다(Table 1). 옴개구리 여포의 피질 색소의 변화는 참개구리의 그것(Kwon *et al.*, 1991)과 거의 같았으며 여포들의 크기는 상대적으로 작은 편이었다. 각 성장 단계의 여포들이 난소내에서 발견되는 시기를 조사한 결과 Class I과 II에 해당하는 작은 여포들은 일년 내내 난소내에 존재하였으며 Class III, IV, V의 여포



**Fig. 1.** Seasonal changes in ovarian weight and GSI of *Rana rugosa*. Frogs were collected twice per month throughout the year. Ovarian weight (A) and GSI (B) of individual frogs were plotted in the figure. The solid line represents the average weight or GSI of 6 - 12 frogs collected in each month.

**Table 1.** Classification of *R. rugosa* follicles depending on their size, character and seasons collected

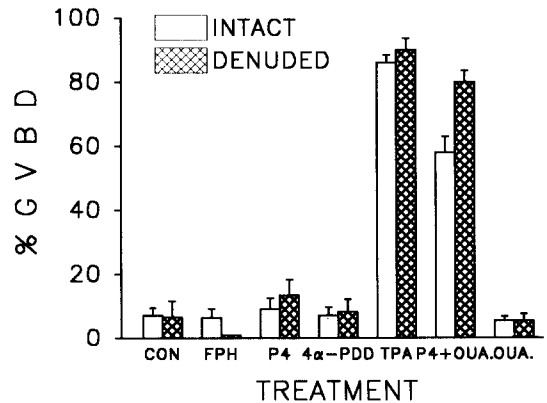
Class	Size range (average size) (mm in diameter)	Characters	Seasons collected	No. of animals
I	0.36 - 0.52 (0.46)	Previtellogenic, clear oocyte	year round	12
II	0.54 - 0.69 (0.64)	Vitellogenesis, yellow oocyte with yolk	year round	14
III	0.74 - 0.97 (0.86)	Fast growing oocyte with partial brown pigmentation	Jun. - Sep.	9
IV	1.05 - 1.39 (1.30)	Oocyte with clear animal and vegetal pole	Aug. - Apr.	20
V	1.40 - 1.50 (1.44)	Full grown oocytes later or after hibernation	Mar. - Jul.	10

들은 발견되는 시기가 일부 중복되었다. 즉 Class III 여포는 6월-9월, Class IV 여포는 8월-이듬해 3월, Class V 여포는 3월-7월 사이에 발견되었다. 이는 개구리의 개체 차이에 연유하기도 하지만 대부분 난소내에 성장 단계가 다른 여포들이 동시에 존재하기 때문이었다. 따라서 이 개구리에서는 난소내 여포들의 성장이 동시적(synchronized)으로 일어나지 않고 여포 개체에 따라 성장 속도가 다른 것처럼 보였다.

**움개구리 난자의 성숙 유도**

예비 실험에서 동면중인 여포난자들은 progesterone을 처리하여도 난자의 성숙을 일으키지 않는다는 것을 알았다. 본 실험에서는 특정 서식지에 있는 개구리들이 현재 산란기에 있다는 것을 확인한 다음(이 경우 5월) 아직 배란을 하지 않은 개구리를 채집하여 성숙유도 실험을 하였다. 먼저 *Xenopus*에서나 다른 개구리에서 난자의 성숙을 유도하는 것으로 알려진 여러 요인들이 과연 생체의 배양에서 움개구리 난자의 성숙을 유도할 수 있는지를 조사하였다. 이 때 여포세포를 제거한 denude 난자에 대해서도 함께 조사하였다(Fig. 2).

번식기에 취한 여포난자들도 동면기에 수행한 예비 실험에서와 같이 FPH(0.05 gland/ml)나 progesterone(0.5 µg/ml)의 처리에 거의 성숙 반응을 일으키지 않았다(성숙율 20% 이하). 그러나 PKC의 활성화제인 TPA(10 µM)를 처리하



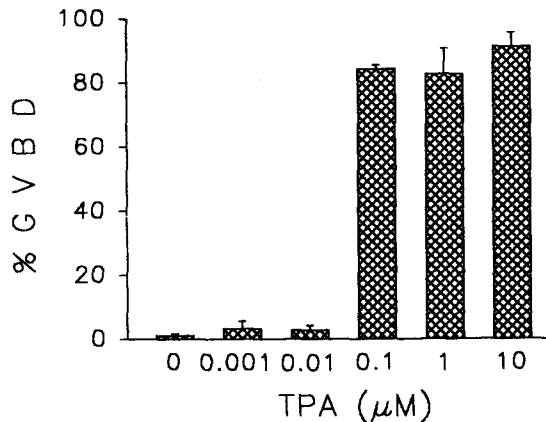
**Fig. 2.** Effect of hormones and other agents on the oocyte maturation of *Rana rugosa* in vitro. Intact follicles or denuded oocytes obtained from frogs collected in May were cultured for 24 hr in the presence or absence of FPH (0.05 gland/ml), progesterone (0.5 µg/ml), 4α-PDD (1.6 µM), TPA (10 µM), ouabain (1 mM), or progesterone + ouabain. After culture, oocyte GVBD was examined. Each bar in the figure represents average (mean ± SEM) % GVBD of 120 follicles or 60 denuded oocytes (3 animals). Con, control; P4, progesterone; Oua, ouabain.

면 이들 난자들은 성숙반응을 일으켰다(85% 이상,  $P < 0.01$ , 대조군과 비교했을 때). 활성이 없는 phorbol ester인 4α-PDD는 핵붕괴 유도 능력이 거의 없었다. 또한 *Xenopus*에서 핵붕괴를 유도한다고 알려진 ouabain(1 mM)은 (Penna and Wasserman, 1987) 단독으로는 효과가 없지만 progesterone과 동시에 처리를

하면 난자의 핵붕괴를 유도하는 것으로 나타났다 (Fig. 2) ( $P < 0.01$ , 대조군과 비교했을 때). 이러한 현상은 denude 난자에서도 똑같이 나타나서 여포 세포들은 TPA나 ouabain의 성숙유도 작용에 관여하지 않음을 알 수 있었다.

#### TPA에 의한 성숙유도

앞 실험에서 사용한 TPA의 농도는 다른 종의



**Fig. 3.** Effect of TPA on the oocyte maturation of *R. rugosa*: dose-response study. Follicular oocytes obtained from frogs collected in April were cultured for 24 hr in the presence of various doses of TPA (0.001 - 10  $\mu\text{M}$ ). After culture, oocyte GVBD was examined. Each bar in the figure represents average (mean  $\pm$  SEM) % GVBD of 180 follicles (3 animals).

개구리에서 사용한 농도를 참고한 것이었다. 본 실험에서는 옴개구리의 핵붕괴를 유도하는 TPA의 효과 농도를 구하고 핵붕괴를 유도하는데 필요한 TPA에 대한 노출 시간을 조사하였다. 산란기에 있는 것으로 확인된 개구리에서(이 경우 4월) 여포를 취하여 여러 농도의 TPA(0.001-10  $\mu\text{M}$ )를 포함한 배양액에서 24시간 배양 후 핵붕괴 여부를 조사한 결과 0.1  $\mu\text{M}$ 에서부터 효율적으로 난자의 핵붕괴를 유도한다는 것을 알았다(Fig. 3). 난자의 성숙을 유도하는데 필요한 TPA의 노출 시간을 조사하기 위하여 TPA(10  $\mu\text{M}$ )를 포함한 배양액에서 5분에서 30분까지 배양한 다음 AR로 옮겨 15시간까지 배양한 결과 5분에서도 효율적으로 난자의 핵붕괴를 유도함을 알았다(Table 2). 역시 4 $\alpha$ -PDD는 노출 시간에 관계없이 유도 효과가 없었다(결과 표시하지 않음). 30분 동안 TPA에 노출시켜 자극을 준 다음 PKC의 억제제인 H-7을 포함한 배양액으로 옮겨서 배양을 했을 때에는 난자의 핵붕괴가 현저히 억제되었다( $P < 0.05$ , AR로 옮겨졌을 때와 비교). 또한 TPA 자극 후 cycloheximide(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 포함한 배양액에 옮겨도 난자의 핵붕괴가 일어나지 않았다( $P < 0.01$ , AR로 옮겨졌을 때와 비교)(Table 2).

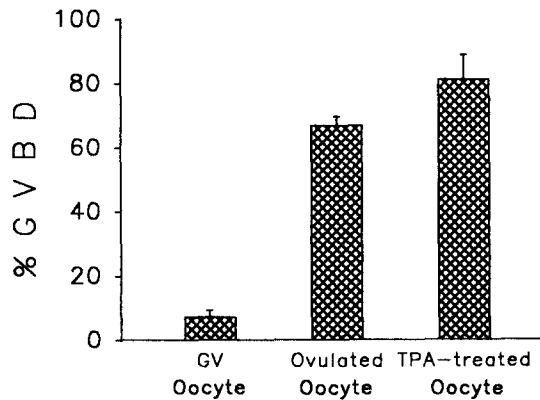
**Table 2.** Induction of oocyte GVBD with TPA under various conditions

Group	Preincubation	Incubation	% GVBD (mean $\pm$ SEM)	No. of animals examined
A	TPA, 5 min	AR, 15 hr	71 $\pm$ 4	3
	TPA, 10 min	AR, 15 hr	80 $\pm$ 3	3
	TPA, 30 min	AR, 14.5 hr	88 $\pm$ 1	3
	TPA, 15 hr	0	93 $\pm$ 2	3
B	TPA, 30 min	AR, 14.5 hr	78 $\pm$ 3	5
	TPA, 30 min	W-7, 14.5 hr	4 $\pm$ 2	5
	TPA, 30 min	H-7, 14.5 hr	1 $\pm$ 1	5
	TPA, 30 min	CHX, 14.5 hr	17 $\pm$ 6	5
	TPA, 15 hr	0	94 $\pm$ 3	5

TPA, 10  $\mu\text{M}$ ; W-7, 200  $\mu\text{M}$ ; H-7, 100  $\mu\text{M}$ ; CHX, cycloheximide, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Group A, experiments were carried out in June. Group B, experiments were carried out in April.

세포질의 미세주입에 의한 옴개구리 난자의 성숙 유도

TPA에 의한 난자의 핵붕괴는 *Xenopus*에서나 개구리에서 모두 progesterone에 의한 것과는 달리 세포질의 섞임과 색소체의 불규칙한 이동 현상이 일어난다(Bement and Capco, 1989; Vanold and Smith, 1990; Kwon and Lee, 1991). 따라서 현재에도 이 핵붕괴를 난자의 성숙으로 받아들이는 데에는 많은 논란이 있다(Smith, 1989). 본인 등은 전보에서 옴개구리에 TPA를 처리하면 난자의 세포질에 MPF가 생성된다는 것을 보여준 바 있다(Yoo et al., 1992). 본 실험에서는 이를 확인함과 아울러 옴개구리의 난자가 다른 개구리의 세포질 추출물에도 반응하여 핵붕괴를 일으키는지, 이 개구리의 난자에서 MPF를 포함한 세포질의 계대주입이 성숙유도 효과를 유지하는지를 조사하였다(Fig. 4, Table 3). Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 TPA를 처리한 난자의 세포질을 다른



**Fig. 4.** Maturation induction of *R. rugosa* oocytes by microinjection of TPA stimulated- or ovulated-oocyte cytoplasm. Follicular oocytes were obtained from frogs collected in June. Recipient GV oocytes were defolliculated and microinjected with cytoplasm of intact oocyte, ovulated oocytes, or oocytes stimulated with TPA (Oocytes were exposed to TPA for 30 min and cultured further for 6 hr in plain medium). After injection, the recipient oocytes were cultured for 24 hr in AR and examined for GVBD after culture. Each bar in the figure represents average % GVBD (mean  $\pm$  SEM) of 80 oocytes (10 oocytes per animal, 8 animals).

미성숙 난자에 주입하면 정상적으로 배란된 난자의 세포질을 주입했을 때처럼 난자의 핵붕괴를 일으켰다( $P < 0.01$ , GV 난자의 세포질과 비교). 또한 FPH의 주사에 의해 배란된 옴개구리 난자의 세포질을 미성숙 난자에 주입하면 핵붕괴가 유도되었으며(first transfer)( $P < 0.01$ , GV 난자의 세포질과 비교), 후자의 세포질을 다시 새로운 미성숙 난자에 계대주입을 했을 때에도(second transfer) 핵을 가진 세포질을 계대주입했을 때(22%)보다 유의하게 핵붕괴율이 높았다(67%)( $P < 0.01$ ). 옴개구리의 난자는 참개

**Table 3.** Maturation induction of *R. rugosa* oocyte by microinjection of cytoplasm or cytoplasmic extract of GVBD oocyte *in vitro*.

Treatment	% GVBD (mean SEM)	No. of animals examined
<i>R. rugosa</i>		
First transfer		
GV cytoplasm	25 $\pm$ 6	5
GVBD cytoplasm	78 $\pm$ 10	5
Second transfer		
GV cytoplasm	22 $\pm$ 9	3
GVBD cytoplasm	67 $\pm$ 10	3
<i>R. nigromaculata</i>		
GV extract	15 $\pm$ 4	7
GVBD extract	52 $\pm$ 12	7
<i>R. dybowskii</i>		
GV extract	12 $\pm$ 6	7
GVBD extract	72 $\pm$ 6	7

Cytoplasm or cytoplasmic extracts of GV or GVBD oocyte obtained from different frogs were microinjected into immature GV oocytes of *R. rugosa* and cultured for 24 hr. After culture, recipient oocytes were fixed and their maturation (GVBD) were examined. More than ten oocytes per animal were used for this experiment. In first transfer experiments, ovulated oocytes (GVBD) and intact GV oocytes were used as donor oocyte. In second transfer experiment, recipient oocytes from first transfer experiment were utilized as donor oocytes after 24 hr of culture. Oocytes of *R. nigromaculata* or *R. dybowskii* were induced to mature (GVBD) by culturing in the presence of progesterone (0.5  $\mu$ g/ml).

구리(*Rana nigromaculata*)나 북방산개구리(*Rana dybowskii*)의 성숙된(핵붕괴된) 난자에서 추출한 세포질에 의해서 역시 핵붕괴가 유도되었다(Table 3). 즉 참개구리의 핵을 가진 난자(GV oocyte)의 세포질을 미세 주입했을 때에는 핵붕괴가 일어나지 않았으나(15%) 핵붕괴된(GVBD oocyte) 난자의 세포질을 주입했을 때에는 핵붕괴율이 크게 높아졌다(52%)( $P < 0.01$ ). 북방산개구리에서도 핵붕괴된 난자의 세포질 추출물을 미성숙난자에 미세주입했을 때 미성숙 난자의 그것을 주입했을 때보다 유의하게 난자의 핵붕괴를 유도하였다(72%, 12%)( $P < 0.01$ ).

### 논의

본 실험의 결과로부터 옴개구리의 생식은 다른 개구리들에 비해 다음과 같이 다른 특성을 가지고 있다는 것을 알았다. 첫째, 옴개구리는 번식기가 4월에서 7월까지 비교적 오랜 기간 동안 지속되는데 이는 서식지의 조건에 따라 산란기가 다르기 때문이었다. 둘째, 옴개구리의 난소내에는 성장 초기 단계인 Class I, II의 여포들이 연중 존재하며 활동기에는 여러 성장 단계의 여포들이 자주 관찰되었다. 이는 여포(난자)들의 성장 속도가 일부 다르다는 것을 보여준다. 셋째, 동면중에 취한 난자는 물론 번식기에 취한 난자들도 생체의 배양에서 호르몬(progesterone, FPH)에 성숙반응을 일으키지 않았다. 그러나 이들에 TPA를 처리하면 성숙이 유도되었다. 이는 난자들이 아직 호르몬에 반응하는 meiotic competence를 얻지 못했으나 PKC 이후의 성숙 단계는 정상이라는 것을 보여준다.

옴개구리의 연중 GSI와 난소무게의 변화를 보면 다른 개구리의 그것과는 달리 이 값들이 급격히 낮아지는 시기(번식기로 보이는 시기)가 존재하지 않는다(Fig. 1). 단지 이 개구리에서는 4월부터 8월 사이에 비교적 낮은 GSI 값(대략 4 이하)을 가진 개구리들이 많이 나타나는 것을 알 수 있다. 흥미롭게도 4월에서 7월 사이에는 동면

기에서처럼 GSI 값이 큰(약 8) 개구리들이 상당히 관찰되는 것을 알 수 있다. 이 현상은 이 4개월 동안에는 산란한 개구리와 아직 산란을 하지 않은 개구리들이 동시에 존재한다는 것을 의미하며 따라서 번식기가 매우 길다는 것을 알 수 있다. 참개구리의 경우에는 5월에 GSI의 값이 뚜렷이 낮아지며 또한 5월 이외에는 산란을 한 것과 하지 않은 것이 동시에 관찰되는 경우가 거의 없었다(Kwon *et al.*, 1991). 그러나 옴개구리들도 일정한 서식지에서 사는 개구리들의 번식기는 매우 짧다는 것을 야외 관찰로서 알 수 있었다. 즉 번식기가 긴 것처럼 보인 것은 여러 서식지에서 개구리를 채집했기 때문이다. 옴개구리는 서식지가 극히 제한되어 있어서 멀리 퍼지지 않으며 대체로 하천 하류 지역으로 물의 온도가 일찍 올라가는 장소에서는 일찍(4-5월) 산란을 하고 상류 계곡의 비교적 물의 온도가 늦게 올라가는 지역에서는 늦게(6-7월) 산란을 하였다. 그러나 특정 지역에서는 일정 시기에 산란을 하였다. 8월에는 어떤 서식지에서도 큰 난자를 지닌 산란을 하지 않은 개구리들을 발견할 수 없는 것으로 보아 산란기가 끝났다는 것을 알 수 있었다.

옴개구리 난자의 성장 양상은 기존에 알려진 다른 개구리들의 그것과 약간 달랐다. 일반적으로 개구리 여포들의 성장은 일시적으로 일어나서 계절에 관계없이 난소내에는 크기와 색소가 같은 종류의 여포들로 차 있는 것으로 알려져 있다(Schuetz, 1985). 북방산개구리나 참개구리도 이러한 양상을 보여준다(Kwon *et al.*, 1988; 1990; 1991). 그러나 옴개구리에서는 동면 기간을 제외하고는 난소내에서 발견되는 여포들의 성장 상태가 매우 다양하였다. 이러한 여포의 성장 단계를 Class I에서 Class V 까지 체계적으로 구분하여(Table 1) 여포의 성장을 조사한 결과 8-9월에는 거의 모든 성장 단계의 여포들이 한 난소내에서 관찰된다는 것을 알았다. 또한 Class I과 II에 속하는 노란 여포들은 연중 계속 관찰되는 것도 특이한 현상이었다. 그러나 이러한 여포의 성장 양상은 전형적인 개구리(*Rana*)의 것을 크게 벗어나지 않는다. 왜냐하면 여포의

성장이 거의 끝난 가을부터 이듬해 산란기까지는 대체로 동질성의 여포들이 난소를 채우고 있기 때문이다.

옴개구리의 난자가 번식기에도 생체의 배양에서 호르몬에 성숙반응을 일으키지 않는다는 사실은 매우 흥미로운 일이다. 일반적으로 개구리의 난자는 생체의 배양에서 동면 초에는 호르몬에 잘 반응을 하지 않다가 동면이 지남에 따라 반응성이 커져서 궁극적으로 산란기에 가까워지면 성숙반응을 매우 잘 일으킨다. 이러한 호르몬에 대한 반응도는 개구리의 종류에 따라서도 약간 다르다. 북방산개구리는 동면 초에 역시 반응을 잘 일으키지 않다가 12월부터 반응을 잘 일으키며 산란기인 2월에는 호르몬이 없이도 생체의 배양에서 성숙(자발적 성숙)을 일으킨다(Kwon *et al.*, 1989). 범개구리(*Rana pipiens*)는 동면 중기부터 성숙반응을 일으키고 후기에는 더 잘 일으키나 번식기에서 자발적 성숙을 일으키는 경우는 극히 드물다(Kwon and Schuetz, 1985; Lin and Schuetz, 1985). 참개구리는 동면 중기는 물론 후기에 가까이 올 때 까지(3월) 호르몬에 반응을 하지 않다가 4월부터 호르몬에 성숙반응을 일으킨다(Ahn *et al.*, 1994). 옴개구리의 난자는 번식기에서조차 생체의 배양에서 호르몬에 반응을 하지 않으므로 위에 기술한 개구리들 보다 반응성이 매우 낮다고 보겠다. 아마도 이들 난자들은 포접에 의해 호르몬에 대한 반응성이 커질 가능성이 크며 또한 반응성이 생긴다 해도 극히 짧은 기간에만 이를 유지할 것으로 추정된다. 난자가 호르몬에 반응하여 성숙을 일으키지 못하는 것은 세포질 숙성이 아직 덜 되었기 때문이다. 이들 난자들이 TPA에 반응하여 핵붕괴를 일으키거나 MPF를 생성할 수 있다는 것은 PKC의 활성화 이후의 성숙단계는 정상이라는 것을 의미한다. 따라서 옴개구리의 난자는 호르몬의 자극에서 PKC에 이르는 어떤 과정이 작동을 하지 못하는 것 같다. Ouabain이 progesterone과 함께 항진적으로 난자의 성숙을 유도하는 것은 매우 흥미로운 일이다(Fig. 1). 이는 난자 성숙의 개시 단계에서  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ion의 투과성 변화가 어떤 역할을 한다는 것을

시사해주고 있다. 그러나 그 자세한 기구에 대해서는 아직 알 수 없다.

*Xenopus*에서는 여포의 성장을 여섯 단계로(Class I-VI) 나누는데 Class V의 난자들은 호르몬에 반응을 하지 않다가 Class VI에 도달하면 비로소 성숙반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Wasserman *et al.*, 1984; Tayler and Smith, 1987). 그러나 Class V 난자에 MPF를 주입하거나 TPA를 처리하면 난자의 성숙을 일으킨다고 보고되었다(Stith and Maller, 1987). 따라서 *Xenopus*의 Class V 난자들은 세포질 숙성 단계에서 아직 meiotic competence를 얻지 못한 미숙성 난자라고 보겠다. 이러한 관점에서 보면 옴개구리의 난자들이 생리적으로 *Xenopus*의 Class V의 난자들과 매우 유사하다고 보겠다. 번식기에 FPH를 옴개구리의 복강에 주사하면 효율은 낮지만 때때로 이 개구리의 배란을 유도할 수 있는 것으로 보아 이 개구리에서도 뇌하수체 호르몬이 난소내 여포에 작용하여 난자의 성숙과 배란을 유도한다는 것은 확실하다. 그러나 옴개구리의 난자가 언제, 어떤 과정을 통하여 meiotic competence를 획득하여 호르몬에 성숙반응을 일으키게 되는지는 아직 알 수 없다.

실용적인 면에서 옴개구리의 난자는 세포질의 숙성 과정을 연구하는데 긴요하게 이용될 수 있다. 왜냐하면 성장이 거의 끝난 큰 난자들을 채집 지역을 달리하면 거의 일년 내내 얻을 수 있기 때문이다. 또한 이들 난자들은 MPF를 주입하면 성숙이 유도됨으로 MPF 활성화의 bioassay system으로도 활용이 될 수 있기 때문이다. 이러한 옴개구리 실험 모델의 장점을 살리기 위해서는 앞으로 보다 많은 연구가 있어야 할 것이다.

## 감사

본 연구는 교육부 기초과학 육성 연구비(BSRI-93-412)의 지원에 의한 것임



## 인용문헌

- Ahn, R.S., Y.T. Lee, C.H. Ra, J.Y. Kim, S.G. Kang, and H.B. Kwon, 1994. Steroidogenic shift and acquisition of meiotic competence by cultured ovarian follicles of *Rana* at breeding season. *Korean J. Zool.* **37**: 174-181.
- Bement, W.M. and D.G. Capco, 1989. Intracellular signals trigger ultrastructural events characteristic of meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* **255**: 83-191.
- Dumont, J.N., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory-maintained animals. *J. Morphol.* **136**: 153-180.
- Eckberg, W.R., 1988. Intracellular signal transduction and amplification mechanisms in the regulation of oocyte maturation. *Biol. Bull.* **174**: 95-108.
- Kwon, H.B., and A.W. Schuetz, 1985. Dichotomous effects of forskolin on somatic and germ cell components of the ovarian follicle: Evidence of cAMP involvement in steroid production and action. *J. Exp. Zool.* **236**: 219-228.
- Kwon, H.B., C.H. Cho., C.G. Choi, 1988. 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., and W.K. Lee, 1991. Involvement of protein kinase C in the regulation of oocyte maturation in amphibians (*Rana dybowskii*). *J. Exp. Zool.* **257**: 115-123.
- 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, 1985. Spontaneous oocyte maturation in *Rana pipiens* oocyte: estrogen and follicle wall involvement. *Gamete Res.* **12**: 11-28.
- Lohka, M.J. M.K. Hayes, and J.L. Maller, 1988. Purification of maturation promoting factor, an intracellular regulator of early meiotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3009-3013.
- Masui, Y., and H.J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Intl. Rev. Cytol.* **57**: 186-281.
- Penna, M.J., and W.J. Wasserman, 1987. Effect of ouabain on the meiotic maturation of stage IV - V *Xenopus laevis* oocytes. *J. Exp. Zool.* **241**: 61-69.
- 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.
- Smith, L.L., 1989. The induction of oocyte maturation: Transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development* **107**: 658-699.
- Stith, B.J., and J.L. Maller, 1987. Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocyte by 12-0-tetradecanoylphorbol 13 acetate. *Exp. Cell Res.* **169**: 541-523.
- Taylor, M.A., and L.D. Smith, 1987. Induction of maturation in small *Xenopus laevis* oocytes. *Dev. Biol.* **121**: 111-118
- Vanold, R.L., and L.D. Smith, 1990. Protein kinase C and progesterone induced maturation in *Xenopus* oocytes. *Development* **109**: 597-604.
- 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 December 5, 1994)

---

**Reproductive Cycle and Maturation Induction of Oocytes in *Rana rugosa***

Myung Sik Yoo, 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)

The present experiments were carried out to investigate the reproductive cycle of *Rana rugosa* and to induce maturation of oocytes *in vitro*. Reproductive cycle was investigated by examining seasonal changes in GSI and field observations. Frog GSIs were lower in April-August than in other seasons. From field observation, breeding of this frog appeared to occur during April-July. Follicular oocytes obtained in breeding season did not undergo germinal vesicle breakdown (GVBD) in response to progesterone or frog pituitary homogenates (FPH), but underwent GVBD *in vitro* in response to 12-0-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA), a protein kinase C (PKC) activator or to ouabain (a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitor) with progesterone. Those oocytes also underwent GVBD when they were microinjected with cytoplasm of TPA-stimulated oocytes or matured oocytes of other species of frogs. TPA-induced oocyte GVBD was suppressed by the presence of H-7(1-[5-isoquinolinesulfonyl]-2-methyl-piperazine), a PKC inactivator. Taken together, data presented here suggested that follicular oocytes of *R. rugosa*, regardless of their size, are not ready for maturation at some steps upstream to PKC activation.