

생쥐 미성숙난자의 체외성숙에 미치는 Adenosine, Guanosine 및 Azaserine의 영향[†]

전용필 · 김정훈* · 목정은* · 김문규
한양대학교 자연과학대학 생물학과

Effects of Adenosine, Guanosine and Azaserine on Maturation of Mouse Oocytes *In Vitro*

Cheon, Y. P., C. H. Kim*, J. E. Mok* and M. K. Kim

Department of Biology, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

SUMMARY

Normal maturation of the mammalian oocytes is prerequisite for the fertilization and the early embryonic development. We have been tested the effects of purine and its *de novo* synthetic inhibitor, azaserine(Aza) on the maturation of germinal vesicle(GV) and germinal vesicle breakdown(GVBD) mouse oocytes. Denude-immature oocytes were cultivated in the media containing adenosine, guanosine, and/or azaserine, and checked the maturation stage by monitoring the prominent morphological changes. In GV stage oocytes, GV was arrested temporarily by the adenosine(1.0%) and protractedly by the guanosine(65.9%, $P < 0.001$). The regression was increased significantly at the adenosine(90%, $P < 0.001$) but decreased at the guanosine(1.6%, $P < 0.05$). Inhibiting the *de novo* synthesis of purine, nuclear maturation rate was increase(90.4% : 96.7%), but GV arrest was significantly increased by cotreatment with guanosine($P < 0.001$). Polar body extraction significantly was increased at the Aza($P < 0.05$), but not in others. In GVBD oocytes, adenosine itself did not affect GVBD arrest. Guanosine, on the other hand, elevated GVBD arrest rate($P < 0.001$), but co-treated with Aza, decreased GVBD arrest($P < 0.001$). Aza increased GVBD arrest rate(20.2%, $P < 0.05$) compared with control. From those results, we know that guanosine shows more prominent effect on the inhibition of nuclear maturation at the GV stage, and of the 1st polar body extrusion at the GVBD stage. Adenosine showed the cytoplasmic toxicity at GV stage oocyte. Our data speculate that cytoplasmic cAMP level is auto-regulated by endogenous adenylate cyclase while GVBD is inhibited by guanosine, since purine toxicity is not observed in the GVBD stage. And it is showed that purine metabolism is concerned with nuclear maturation, that the amounts of purine metabolism is not even during the oocyte maturation.

(Key words : Maturation, Purine, Adenosine, Guanosine, *de novo* synthetic inhibitor)

[†] 본 연구는 1996년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-96-4437) 및 1996년도 한양대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

* 울산대학교 의과대학 산부인과학교실(Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center, Seoul, Korea)

I. 서 론

포유류의 미성숙난자는 성숙억제요인에 의해 1차성숙분열 초기(dictyate stage)에 머물러 있다(Eppig 등, 1983) 생식소자극호르몬(LH 등)의 영향으로 난자내 유전자 발현물질의 변화를 통해 성숙을 재개하게 된다(Masui와 Clarke, 1979). 또한 난자 성숙은 생식소자극호르몬에 의한 난자내 유전자 발현물질의 변화 이외에 난포액내 구성물의 변화(Racowsky와 McGaughey, 1982), 과립세포/협막세포의 기능 및 합성물의 변화(Kishimoto 등, 1982; Vanderhyden과 Armstrong, 1989) 등 난포내 환경적 요인들에 의해 영향을 받는다. 감수분열(또는 성숙분열) 억제물질로는 cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP, Cho 등, 1974; Schultz 등, 1983; Downs 등, 1989), hypoxancine(Dienhart 등, 1997) 등이 알려져 있다. 성숙유도물질들은 성숙촉진요인으로 밝혀졌고 체세포분열 조절에도 관여하며(Miake-Lye와 Kirschner, 1985; Dunphy 등, 1988), 인산화 반응과 관련되어 활성이 조절된다(Dorée 등, 1983; Meijer 등, 1986).

cAMP, adenosine triphosphate(ATP), cGMP, guanosine triphosphate(GTP)의 진구대사물질인 adenosine과 guanosine은 세포질내에서 ATP, cAMP, cGMP의 양과 직접적으로 관련되어 있다(Glass II와 Moor, Jr, 1979; Brennan 등, 1983; Tornell 등, 1990). 그리고 이들 물질의 대사과정은 세포내 다른 물질대사계에 영향을 주어 세포활성을 조절하며(Haneji 와 Koide, 1989), 핵분열(Yamashita와 Maller, 1990), 세포질분열 그리고 유전자발현 조절 등에 관여한다(Knecht 등, 1984; Downs, 1990; Roberge 등, 1990). 한편 핵성숙 과정에서 inosine monophosphate(IMP)의 dehydrogenase 억제제인 hadacidin(Had), DL-alanosine, 그리고 purine 생합성 억제제인 azaserine (Aza)을 처리하였을 때 감수분열 중지상태를 벗어나 핵막붕괴(GVBD)가 유도됨이 알려져 있다(Downs와 Eppig, 1985).

그러나 adenosine 또는 guanosine이 미성숙 난자에 핵성숙 또는 세포질 성숙에 미치는 영향에 대한 이해가 미진한 상태이다. 또한 난자-난구 복합체일 때와

난구세포를 제거한 미성숙 난자의 경우 체외에서의 성숙 정도가 상이한 것으로 보고되고 있다. 그리고 난자-난구 복합체인 상태의 성숙억제 기작 모델이 제시되기도 하였으나 난구 세포를 제거한 미성숙 난자의 성숙억제 등에 대한 이해는 그리 넓지 않다. 따라서 본 연구에서는 난구세포를 제거한 미성숙난자를 체외에서 배양하면서 성숙 단계에 따라서 adenosine, guanosine, 그리고 Aza를 처리한 배양액에서 체외 성숙을 유도했을 때 핵성숙 및 세포질 성숙에 미치는 이들 물질의 영향을 조사하고자 행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난자의 수획

과배란을 유도하기 위하여 암컷 생쥐(ICR, 3~4 weeks old)에 5IU pregnancy mares' serum gonadotropin(PMSG)를 주사한 후 46시간에 경추파괴로 도살하였다. 난소를 채취한 후 멸균된 바늘로 난포를 찢어 미성숙난자를 얻었고 이후 물리적인 방법으로 과립세포를 제거하였다.

2. 난자의 성숙유도 및 배양

난자의 성숙은 10% fetal calf serum(FCS, GIBCO BRL, USA)을 함유한 BWB(Biggers 등, 1971)를 기본배양액으로 삼고 37°C, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도를 유지하는 배양기에서 유도하였다. 실험군에서의 성숙유도는 10% FCS와 Table 1에서와 같이 purine계 물질인 adenosine, guanosine 및 purine의 생합성 억제제인 Aza를 첨가한 BWB 용액 내에서 유도하였다. 이들 화학물질의 처리는 성숙유도 시간에 따라, 성숙 유도 후 0시간(GV, 실험군 1), 9시간(breakdown; GVBD, 실험군 2)에 각각 처리하였다. 화학물질의 농도는 adenosine과 guanosine은 750 μ M로 하였다. 한편 Aza의 농도 차이에 의한 영향을 알아보기 위하여 0.1, 5, 10, 20 μ M로 처리하였고, adenosine 또는 guanosine과 함께 처리한 군에 있어서는 최종 20 μ M로 하여 처리하였다(Table 1).

대조군은 기본배양액에서 18시간 배양하여 성숙을 유도하였다. 실험군 I: 미성숙난자를 조절된 배양액 내에서 18시간 배양하여 성숙을 유도하였다. 실험군 II: 기본배양액에서 9시간 배양 후 조절된 배양액에서

9시간 배양하여 성숙을 유도하였다.

3. 통 계

관찰 결과의 통계적 유의성 검정은 χ^2 -test로 하였으며 $P < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Purine 생합성 억제제인 Aza의 농도에 따른 미성숙난자의 성숙

Aza를 함유한 배양액에서 미성숙 난자의 성숙을 유도했을 때 핵성숙이 농도에 관계없이 대조군과 유사한 비율로 진행되는 것이 관찰되었다. 특히 20 μ M 농도에서 유의하게 ($P < 0.05$) 증가하였다. 20 μ M과 5 μ M 농도간의 성숙율은 유의한 차이를 보이나 ($P < 0.05$) 이외의 다른 농도간에는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 1). 핵막 붕괴 억제제는 5 μ M에서 유의하게 증가하였으나 ($P < 0.001$) 다른 농도에서는 대조군과 차이가 없었다 (Fig. 1). 한편, 제1극체 방출은 20 μ M에서 90.2%로 대조군의 75.9%에 비해 유의하게 증가하였으며 ($P < 0.001$), 다른 농도에서는 대조군과 차이가 없었다 (Table 1). 농도간 차이를 살펴보면, 20 μ M은 다른 농도군에 비해 극체 방출이 유의하게 ($P < 0.05$) 증가하였다. 한편, 퇴화는 대조군과 유사한 경향을 보였다 (Table 2).

이러한 결과는 purine 물질이 생쥐 미성숙난자의 핵성숙 및 세포질 성숙을 억제하는 기능을 갖는 것을 알 수 있으며, purine 대사 억제제는 난포 환경에서 핵막 붕괴를 촉진한다는 보고 (Downs와 Eppig, 1987)를 통해 확인할 수 있었다. 한편, 미성숙 난자내 purien의 생합성이 성숙하기 전에 많이 진행되어 성숙을

Table 1. Concentration of adenosine, guanosine and/or purine *de novo* synthetic inhibitor, azaserine(Aza)

| Chemicals treated in culture media | Concentration (μ M) |
|------------------------------------|--------------------------|
| Adenosine (A) | 750 |
| Guanosine (G) | 750 |
| Azaserine (Aza) | 20 |
| A or G+Aza | 750 A or G+20 Aza |

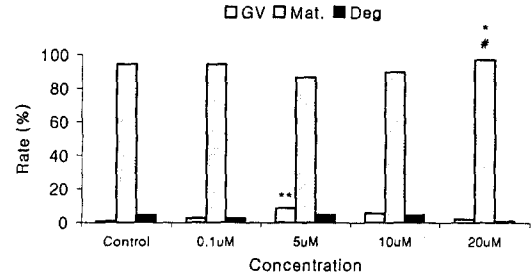


Fig. 1. Effects of azaserine on the maturation (nuclear) of the immature mouse oocytes.

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.001$ versus control

: $P < 0.05$ versus 5 μ M

Table 2. Dosage effects of azaserine(Aza) on *in vitro* maturation and polar body(PB) extrusion of the mouse GV oocytes

| Treat-ment | No. of oocytes | No. of oocytes (%) | | | |
|------------|----------------|--------------------|--------------|------------------|------------|
| | | GV | GVBD | PB | Deg. |
| Control | 108 | 1 (0.9) | 20 (18.5) | 82 (75.9) | 5 (4.6) |
| 0.1 | 73 | 2 (2.7) | 14 (19.2) | 55 (75.3) | 2 (2.7) |
| 5 | 81 | 7** (8.6) | 19 (23.5) | 51 (63.0) | 4 (4.9) |
| 10 | 87 | 5 (5.7) | 11 (12.6) | 67 (77.0) | 4 (4.6) |
| 20 | 92 | 2 (2.1) | 6* (6.5) | 83***# (90.2) | 1 (1.0) |

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$: versus control ; #: $P < 0.05$: versus 0.1, 5 and 10 μ M

준비하고 다른 한편으로는 핵성숙을 억제하는 효과를 갖는 것을 추정할 수 있다.

한편, 위의 결과를 바탕으로 adenosine 또는 guanosine과 함께 처리한 군에서는 극체 방출이 많이 되고 또한 퇴화율이 낮은 20 μ M을 사용하였다.

2. GV단계 난자의 성숙에 미치는 A, G, 그리고 Aza의 영향

배양 조건을 알아보기 위한 대조군의 성숙율은 90~94%로 (Fig. 1, 2, Table 4) Donahue의 보고와

(91%, 1968) 유사하였고, 각각의 화학물이 미성숙난자의 성숙에 미치는 영향은 다음과 같았다. GV 상태 유지는 adenosine과 Aza를 제외한 처리군에서 대조군과 큰 차이를 보였다. A는 핵막 붕괴를 억제하나, 지속적으로 억제를 하지 않는 극복효과를 보여 핵막 붕괴가 대조군과 유사하였다. 그러나 세포 독성(toxicity)을 보여 퇴화가 유의하게 높게($P < 0.001$) 나타났다. Guanosine의 경우에 있어서는 핵막 붕괴 억제 효과가 18시간 이상 장기적으로 나타나 GV 상태로 남아있는 비율이 65.9%로 유의하게 많았으며($P < 0.001$), 결과적으로 핵막붕괴율이 유의하게(24.3%, $P < 0.001$) 낮았다(Fig. 2). 그러나 adenosine과 달리 퇴화율이 유의하게 낮았다. Aza를 처리한 경우 성숙은 96.7%로 앞에서 살펴본 것과 같은 경향을 보였고, guanosine과 동시에 처리할 경우에 성숙이 53.5%로 유의하게($P < 0.001$) 감소하였다. 이러한 결과는 Downs 등 (1985)과 Downs와 Eppig(1987) 등의 보고에 의해 뒷받침된다. 따라서 guanosine이 adenosine 보다 핵막 붕괴 유발 조절에 더 관여하고 있음을 추정할 수 있다. 한편 purine의 독성이 guanosine 쪽의 대사물에 의한 것이라기 보다는 adenosine 쪽의 대사물에 의한 것임을 알 수 있다.

핵막 붕괴 이후 제 1극체 방출은 Table 3에서와 같이 배양액에 따라 다양하게 나타났다. 일반적으로 핵성숙을 핵막 붕괴로 보고 있는데 GV 이후 단계로의 발생은 대조군에 비해 adenosine, guanosine, guanosine + Aza에서 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 GV단계에서부터 처리한 결과에 기인하는 것으로 adenosine의 경우에 있어서는 독성영향으로 인한 퇴화율의 증가, 다른 처리군에서는 guanosine의 영향으로 GVBD가 억제된 것에 기인하는 것으로 사료된다. 한편 Aza를 처리하였을 때는 대조군(79.6%)에 비해 극체 방출율이 유의하게 증가(90.2%, $P < 0.05$)하였다. 그러나 adenosine이나 guanosine을 같이 첨가하여 배양할 경우 유의하게($P < 0.05$) 감소하였다(Table 3). 따라서 미성숙난자내 purine의 생합성이 핵막 붕괴를 억제하는 한 요인으로 작용하는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 *in vitro*나 *in vivo*에서 cAMP와 그 유도체, 그리고 purine 등이 감수분열 중지에 영향을 주는 물질이라는 보고(Miller와 Behrman, 1986)를

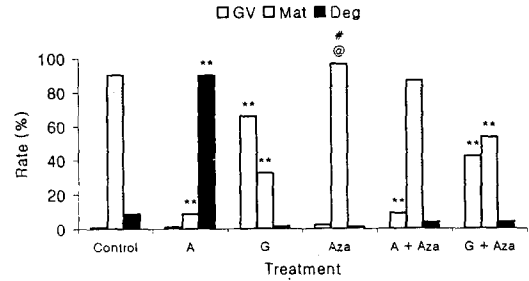


Fig. 2. Effects of adenosine (A), Guanosine (G) and azaserine (Aza) on the maturation of the immature mouse oocytes.

** : $P < 0.001$ versus control

: 0.05 versus A+Aza

@ : $P < 0.001$ versus A, G, G+Aza

Table 3. Effects of adenosine(A), guanosine(G), and azaserine(Aza) on maturation and polar body(PB) extrusion of GV intact oocytes

| Treatment | No. of oocytes | No. of oocytes (%) | | | |
|-----------|----------------|--------------------|-----------|---------------|---------------|
| | | GV | GVBD | PB | Deg. |
| Control | 455 | 4 (0.9) | 49 (10.8) | 362 (79.6) | 40 (8.8) |
| A | 101 | 1 (1.0) | 8 (7.9) | 1** (1.0) | 91**@@ (90.1) |
| G | 123 | 81** (65.9) | 17 (13.8) | 23** (18.7) | 2** (1.6) |
| Aza | 92 | 2 (2.1) | 6 (6.5) | 83* (90.2) | 1* (1.0) |
| A+Aza | 99 | 9** (9.1) | 8 (8.1) | 78 (78.8) | 4 (4.0) |
| G+Aza | 99 | 42** (42.4) | 4 (4.0) | 49**## (49.5) | 4 (4.0) |

*, **: $P < 0.05$, $P < 0.001$ versus control ; ##: $P < 0.001$ versus G and Aza ; @@: $P < 0.001$ versus G, Aza, A+Aza and G+Aza.

재확인할 수 있었다.

Staigmiller와 Moor(1984) 그리고 Vanderhyden과 Armstong(1989)은 핵막 붕괴를 통한 핵성숙 이외에 세포질 성숙의 새로운 개념을 도입하였는데 핵막 붕괴는 MPF, purine 대사물, 2차 전령 그리고 pro-

tein kinase와 단백질 합성(Miake-Ley 등, 1983; Downs와 Eppig, 1987; Baitinger 등, 1990) 등의 영향으로 이루어지며, 핵내 물질의 세포질내 유입 경로이다(Yamamoto, 1985). 이는 본 실험 결과와 Gautier (1987)이 보고를 종합하여 볼 때 유전물질의 발현이나 protein kinase등의 활성 변화로 세포질 성숙을 유도한다고 사료된다. 그리고 난구-난자 복합체 형태가 아니라 난구 세포를 제거한 상태의 본 실험 결과에서 현재까지 제시된 모델들에 비추어 adenosine 또는 guanosine이 난자 막을 통하여 직접 받아들여져 사용되는 것을 추정할 수 있는데 이는 Urner 등 (1983)과 Salustri 등 (1988)의 보고와 마찬가지로 난자 자체적으로 adenylate cyclase의 활성을 가지고 있어 cAMP의 농도를 조절할 수 있음을 나타낸다. 따라서 IMP의 생합성물과 guanosine과 adenosine은 과립 세포를 제거한 생쥐의 미성숙 난자의 성숙을 조절하는 기작으로 작용하는 것으로 사료된다.

3. 핵막 붕괴 단계 난자의 성숙에 미치는 영향

실험군 2를 통해 체외에서 핵막 붕괴를 유도한 난자에 미치는 adenosine, guanosine 그리고 Aza의 효과를 관찰하였다. Guanosine은 핵막 붕괴에서 제 1극체 방출전까지의 유지가 유의하게 증가하여 제 1극체 방출이 유의하게 ($P < 0.001$) 감소하였으며 Aza도 극체 방출을 유의하게 억제하였다($P < 0.001$). Adenosine은 극체 방출에 영향을 미치지 않았고 Aza와 같이 처리하였을 경우에는 오히려 Aza에 비해 유의하게 ($P < 0.001$) 증가하였다. 한편 Aza와 guanosine을 같이 처리한 경우에는 guanosine에 비해 유의하게 ($P < 0.001$) 극체 방출이 증가하였다(Table 4).

이러한 결과에서 IMP의 생합성이 제 1극체 방출에 필요하며 일정량의 adenosine과 guanosine도 필요함을 추정할 수 있다. 실험군 1과 2의 결과를 비교하면 처리 효과가 매우 다른 것을 알 수 있는데 이는 세포질 구성 성분이 GV 난자와 핵막 붕괴 난자가 다르기 때문인 것에 기인하는 것으로 추정되며 세포질 요인에 의한 purine의 생합성이나 guanosine의 영향이 핵막 붕괴를 통하여 변화되었음을 의미한다. 제1극체 방출에 미친 영향은 핵막 붕괴 단계에서 제 1극체 방출 전까지 유지와 관계가 있는데, 결과에서 보듯이 생합성과 상대적으로 많은 adenosine량은 극체 형성 촉진에

Table 4. Effects of adenosine(A), guanosine(G), and azaserine(Aza) on polar body extrusion of GVBD oocytes

| Treatment | No. of oocytes | No. of oocytes (%) | | |
|-----------|----------------|--------------------|------------------------------|---------------|
| | | GVBD | PB | Deg |
| Control | 451 | 49 (10.6) | 362 (80.3) | 40 (8.9) |
| A | 95 | 15 (15.8) | 76 (80.0) | 4 (4.2) |
| G | 86 | 24** (27.9) | 58*** (67.4) | 4 (4.7) |
| Aza | 99 | 20* (20.2) | 67*** [®] (67.7) | 12+ (12.1) |
| A+Aza | 96 | 14 (14.6) | 80 (83.3) | 2* (2.1) |
| G+Aza | 96 | 13 (13.5) | 80 (83.3) | 3 (3.1) |

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$ versus control ; #: $P < 0.05$ versus G+Aza, [®] : $P < 0.05$ versus A+Aza and G+Aza; + : $P < 0.05$: versus A, A+Aza and G+Aza

더욱 효과적이다. 만약 purine의 생합성이 억제제에 의해 억제되면, salvage pathway에 의존적인 것으로 전환되는 것으로 사료된다 실험군 1과는 달리 adenosine은 세포 독성을 보이지 않으며 생존에 필요한 것으로 사료된다. 또한 guanosine도 퇴화율에 있어서 유의하지 않은 것으로 보아 purine 독성은 핵막 붕괴 시기에는 없다는 것을 알 수 있다.

성숙단계에 따라 합성된 단백질은 수정과 이후 조절에 관여하며(Clarke와 Masui, 1986; Luttmere와 Longo, 1988; Howlett와 Bolton, 1985; Howlett, 1986), MPF, cAMP, cGMP, protein kinase 등의 활성은 난자의 성숙단계(Haneji와 Koide, 1989)와 세포주기에 따라 다양하고 주기적으로 나타난다(Richter와 McGaughey, 1981; Howlett, 1986; Roberge 등, 1990). Table 3과 4의 결과는 난자의 성숙시기에 따른 유전자 발현물의 활성에 영향을 주는 2차 진령의 변화와 purine의 대사량의 차이에 의한 것에 기인하는 것으로 사료된다.

이상의 결과는 purine계 물질이 난자성숙 시기에

따라 그 대사량과 유전자발현물 활성이 성숙시기에 따라 다름을 나타내고, 성숙 특정시기에 세포질 성숙에 관여하는 유전자의 발현이 있음을 나타내고 있다. 그리고 성숙시기에 따른 세포질 성숙에 미치는 purine물질의 변화가 있는 것으로 사료되며 핵성숙이후 극체 형성에도 관계하고 있는 것으로 추정된다.

IV. 적 요

본 연구는 난구세포를 제거한 미성숙 생쥐 난자의 성숙에 미치는 adenosine, guanosine, 그리고 purine의 생합성 억제제인 Aza가 성숙에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. GV 단계의 난자에서 adenosine은 핵막 붕괴를 짧은 기간 억제하였고 회복효과를 보여 핵막 붕괴가 대조군과 유사하게 일어났다. 그러나 독성을 나타내 퇴화가 유의하게 많았다.
2. GV 단계의 난자에서 guanosine은 핵막 붕괴를 억제하며, 회복효과를 보이지 않았으나 퇴화율은 유의하게 낮게 나타났다. 이는 GVBD를 유발하는 물질 조절에 adenosine 보다 guanosine이 더 관계하고 있음을 시사한다.
3. GV 단계의 난자에서 Aza와 adenosine 그리고 guanosine을 동시에 처리한 실험군에서 purine의 생합성이 미성숙 난자에서 필요함을 알 수 있었다.
4. 핵막 붕괴 단계의 난자에서 guanosine은 제1극체 방출을 억제하였다.
5. 핵막 붕괴 단계의 난자에서 adenosine은 세포독성을 보이지 않아 purine 독성이 핵막 붕괴 단계의 난자에는 보이지 않음을 알 수 있었다.
6. 실험군 1, 2에서 purine계 물질의 영향이 난자의 성숙단계와 세포주기에 따라 다름을 알 수 있었고 난자의 성숙에 관계된 유전자의 발현과 세포내 조절단백질은 성숙시기의 어느 특정 시기에 나타나며 adenosine 또는 guanosine 계열의 물질에 영향을 받음을 알 수 있었다.

결론적으로 inosien monophosphate의 생합성물과 guanosine과 adenosine은 과립세포를 제거한 생쥐의 미성숙 난자의 성숙을 조절하는 물질로 작용하고, 성숙시기에 따른 세포질 성숙에 미치는 purine물질의 변

화가 있고 핵성숙 이후 극체 형성에도 관계하고 있는 것으로 나타났다.

V. 인용문헌

1. Battinger, C. J., M. Alderton, M. Poenie, H. Schulman and R. A. Steinhardt. 1990. Multifunctional Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.*, 111:1763-1778.
2. Biggers, J. D., W. K. Whitten and D. G. Whittingham. 1971. *The Culture of Mouse Embryos In Vitro*, In: *Methods in Mammalian Embryology*(Daniel, J. C. Jr., ed.). Freeman, San Francisco, pp. 86-116.
3. Brennan, J., R. Ohkawa, S. D. Gore and R. R. Behrman. 1983. Adenine-derived purines increase adenosine triphosphate(ATP) levels in the luteal cell: Evidence that cell levels of ATP may limit the stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation by luteinizing hormone. *Endocrinology*, 112 :499-508.
4. 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.
5. Clarke, H. J. and J. Masui. 1986. Transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in the cytoplasm of maturing oocytes of the mouse. *J. Cell Biol.*, 102:1039-1046.
6. Dienhart, M. K., M. J. O'Brien and S. M. Downs. 1997. Uptake and salvage of hypoxanthine mediates development arrest in preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 56:1-13.
7. Dorée, M., G. Peaucellier and A. Picard. 1983. Activity of the maturation-promoting factor and the extent of protein phosphor-

- ylation oscillate simultaneously during meiotic maturation of starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 99:489-501.
8. Downs, S. M. 1990. Protein synthesis inhibitors prevent both spontaneous and hormone-dependent maturation of isolated mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 27:235-243.
 9. Downs, S. M. and J. J. Eppig. 1985. A follicular fluid component prevents gonadotropin reversal of cyclic adenosine monophosphate-dependent meiotic arrest in murine oocytes. *Gamete Res.*, 11:83-97.
 10. Downs, S. M., D. L. Coleman, D. 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. USA.*, 82e:E454-458.
 11. Downs, S. M. and J. J. Eppig. 1987. Induction of mouse oocyte maturation *in vivo* by perturbants of purine metabolism. *Biol. Reprod.*, 36:431-437.
 12. Downs, S. M., S. A. J. Daniel, E. A. Bornslaeger, D. C. Hoppe and J. J. Eppig. 1989. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purine: Modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Res.*, 23:323-334.
 13. Dunphy, W. G., L. Brizuela, D. Beach and J. Newport. 1988. The xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, 54:423-431.
 14. Eppig, J. J., R. R. Freter, P. F. Ward-Bailey and R. M. Schultz. 1983. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: Participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation inhibitory factor. *Dev. Biol.*, 100:39-49.
 15. Gautier, J. 1987. The role of the germinal vesicle for the appearance of maturation-promoting factor activity in the axolotl oocyte. *Dev. Biol.*, 123:483-486.
 16. Glass II, W. F. and J. B. Moor, Jr. 1979. Inhibition of human lung cyclic GMP and cyclic AMP phosphodiesterases by certain nucleosides, nucleotides, and pharmacological phosphodiesterase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 28:1107-1112
 17. Haneji, T. and S. S. Koide. 1989. Protein phosphorylation during 1-methyladenine-induced maturation of *Asterias* oocytes. *Exp. Cell Res.*, 182:664-667.
 18. Howlett, S. K. 1986. A set of proteins showing cell cycle dependent modification in the early mouse embryo. *Cell*, 45:387-396.
 19. Howlett, S. K. and V. N. Bolton, 1985. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryo genesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 87:175-206.
 20. Kishimoto, T., R. Kuriyama, H. Kondo, and H. Kanatani, 1982. Generality of the action of various maturation promoting factors. *Exp. Cell Res.*, 137:121-126.
 21. Knecht, M., J. M. Darbon, T. Ranta, A. Baukal, and K. J. Catt. 1984. Inhibitory actions of adenosine on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 30:1082-1090.
 22. Luttmner, S. J. and F. J. Longo. 1988. Sperm nuclear transformations consist of enlargement and condensation coordinate with stages of meiotic maturation in fertilized *Spisula solissima* oocytes. *Dev. Biol.*, 128:86-96.
 23. Masui, Y. and H. J. Clarke. 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.*, 57:185-282.
 24. Meijer, L., P. Pondaven, H. Y. L. Tung, P. Cohen, and R. W. Wallace. 1986. Protein phosphorylation and oocyte maturation II. Inhibition of starfish oocyte maturation by intracellular microinjection of protein phosphatase 1 and 2A and alkaline phosphatase.

- Exp. Cell Res., 163:489-499.
25. Miake-Lye, R., J. Newport and M. Kirschner. 1983. Maturation-promoting factor induces nuclear envelope breakdown in cycloheximide-arrested embryos of *Xenopus laevis*. J. Cell Biol., 97:81-91.
 26. Miake-Lye, R. and M. W. Kirschner. 1985. Induction of early mitotic events cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell, 54:423-431.
 27. Miller, J. G. O. and H. R. Behrman. 1986. Oocyte maturation is inhibited by adenosine in the presence of follicle-stimulating hormone. Biol. Reprod., 35:833-837.
 28. Racowsky, C and R. W. McGaughey. 1982. Further studies of the effects of follicular fluid and membrane granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. J. Reprod. Fert., 66:505-512.
 29. Richter, J. D. and W. McGaughey. 1981. Patterns of polypeptide synthesis in mouse oocytes during germinal vesicle breakdown and during maintenance of the germinal vesicle stage by dibutyryl cAMP. Dev. Biol., 83:188-192.
 30. Roberge, M., J. Th'ng, J. Hamaguchi and E. M. Bradbury. 1990. The topoisomerase II inhibitor VM-26 induces marked changes in histone H1 kinase activity, histone H1 and H3 phosphorylation and chromosome condensation in G2 phase and mitotic BHK cell. J. Cell Biol., 111:1753-1762.
 31. Salustri, A., S. Petrungrarom, M. Conti and G. Siracusa. 1988. Adenosine potentiates forskolin-induced delay of meiotic resumption by cumulus denuded oocytes: Evidence for an oocyte surface site of adenosine action. Gamete Res., 21:157-168.
 32. Schultz, R. M., R. R. Montgomery and J. R. Belanoff. 1983. Regulation of mouse oocyte maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. Dev. Biol., 91:264-273.
 33. Staigmiller, R. B. and R. M. Moor. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res., 9:221-229.
 34. Törnell, J., M. Brännström, C. Maghussan and H. Billig. 1990. Effects of follicle stimulating hormone and purines on rat oocyte maturation. Mol. Reprod. Devel., 27:254-260.
 35. Urner, F., W. L. Herrmann, E. E. Baulieu and S. Schorderet-Slatkine. 1983. Inhibition of denuded mouse oocyte meiotic maturation by forskolin, and activator of adenylate cyclase. Endocrinology, 113:1170-1172.
 36. Vanderhyden, B. C. and D. T. Armstrong. 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. Biol. Reprod., 40:720-728.
 37. Yamamoto, K. 1985. Germinal vesicle contents are required for the cytoplasmic cycle during meiotic division of starfish oocytes. Dev. Biol., 107:213-219.
 38. Yamashita, S. and J. L. Maller. 1990. Identification of an activator required for elevation of maturation promoting factor(MPF) activity by r-s-ATP. J. Cell Reprod., 28:717-725.

(접수일자 : 1997. 5. 9. / 채택일자 : 1997. 6. 5.)