

综 述

# 硬骨鱼类卵母细胞最后成熟的调控

## THE REGULATION OF FINAL OOCYTE MATURATION IN OSTEICHTHYES

汪小东 林浩然

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

WANG Xiao-Dong, LIN Hao-Ran

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词 硬骨鱼类, 卵母细胞, 成熟

KEYWORDS Osteichthyes, Oocyte, Maturation

硬骨鱼类卵母细胞完成卵黄物质积累后, 必须经过两次有丝分裂才能变成具有受精能力的卵子。从第一次有丝分裂  $G_2$  期末(或 M 期始)至卵子排出(第二次有丝分裂中期), 称为卵母细胞的最后成熟(Final Oocyte Maturation)。这个时期经历的时间虽短, 但卵母细胞发生的变化却很大, 包括胚泡破裂(Germinal vesicle breakdown, GVBD)、染色体融合和第一极体的排出。鱼类卵母细胞最后成熟是在多种因子连续作用下完成的。目前发现调控卵母细胞最后成熟的因子主要有促性腺激素(Gonadotrophin, GtH)、成熟诱导激素(Maturation-inducing hormone, MIH)和成熟启动因子(Maturation-Promoting factor, MPF)。近来还发现生长因子(Growth factor)、神经递质、脑肽等也有重要作用。Goetz[1983]综述了鱼类卵母细胞最后成熟的激素调控。近年来利用建立的离体卵巢孵育系统及生物化学和分子生物学技术, 对鱼类卵母细胞最后成熟的调控机理进行了更为深入的研究。本文综述了这些研究进展。

### 1 促性腺激素(GtH)

GtH 是刺激卵母细胞最后成熟的一种主要的脑垂体激素, 近年来对鱼类 GtH 的种类、分离和纯化的研究取得较大进展。在多种硬骨鱼类已分离纯化出两种 GtH, GtH<sub>iv</sub> 和 GtH $\oplus$ 。这两种 GtH 都是糖蛋白, 但化学结构明显不同。GtH<sub>iv</sub> 和 GtH $\oplus$  在离体情况下都能刺激类固醇生成, 但 GtH $\oplus$  才是卵母细胞最后成熟的主要调节者[Swanson 等 1991, Planas 等 1995]。

硬骨鱼类排卵前 GtH 有一个高峰, 尽管在不同种类高峰的型式不同, 但这个高峰对卵母细胞最后成熟是重要的[黄世蕉等 1987]。离体情况下, 各种 GtH 制剂对滤泡完整的卵具有刺激作用而发生 GVBD。GtH 受体存在于鞘膜层和颗粒层[Kanamori 和 Nagahama 1988a]。Yan 等[1992]证明银大麻哈鱼、Miwa 等[1994]证明马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus rhodurus*)至少存在两种 GtH 受体, iv 型受体和  $\oplus$  型受体, iv 型受体与 GtH<sub>iv</sub> 和 GtH $\oplus$  均能结合, 但同 GtH<sub>iv</sub> 亲和性高; 而  $\oplus$  型受体只与 GtH $\oplus$  特异性地结合。iv 型受体存在于鞘膜层和颗粒层, 而  $\oplus$  型受体只存在于颗粒层。Dittman 等[1995]从银大麻哈鱼卵巢中克隆出 GtH $\oplus$  受体并分析其特性, 结果表明它与哺乳类 FSH 受体有较大的相似性。

GtH 作用于鞘膜细胞层产生  $17\alpha$ - 羟孕酮 ( $17\alpha$ - hydroxyprogesterone,  $17\alpha$ - P) [Nagahama 1987], 它是通过一种或多种受体来传导的依赖于腺苷酸环化酶- cAMP 系统来实现的 [Kanamori 等 1988b], 因此, 能提高细胞内 cAMP 的药物如毛喉素 (forskolin, 一种腺苷酸环化酶的激活剂) 和双丁酰环磷腺苷 (dibutyl cAMP, dbcAMP) 都能剂量依存地提高卵母细胞鞘膜层  $17\alpha$ - P 的生成量。GtH 和 cAMP 诱导的  $17\alpha$ - P 可以为蛋白质合成抑制剂环己烯酮 (cycloheximide) 所抑制, 但不为 RNA 合成抑制剂放线菌素 D (actinomycin D) 所抑制, 因此, GtH 影响鞘膜层  $17\alpha$ - P 的生成过程中要涉及到新的蛋白质的合成, 而 RNA 的合成则不一定是必需的 [Nagahama 1987]。

颗粒细胞层在  $20\beta$ - 羟基类固醇脱氢酶 ( $20\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase,  $20\beta$ - HSD) 的作用下将鞘膜层产生的  $17\alpha$ - P 转变为  $17\alpha, 20\beta$ - 双羟孕酮 ( $17\alpha, 20\beta$ - dihydroxy- 4- pregnen- 3- one,  $17\alpha, 20\beta$ - DHP), GtH 和毛喉素能增加颗粒细胞中  $20\beta$ - HSD 的活性, 这种增加是剂量依存的。GtH 的作用主要通过颗粒细胞层的特异性受体来传导, 此外, Mita 等 [1994] 在马苏大麻哈鱼颗粒细胞层中还发现含有鸟嘌呤核苷酸结合调节蛋白 (G- 蛋白) 和腺苷酸环化酶亦参与了调节过程, G- 蛋白由活性亚基和抑制亚基组成, GtH 受体与 G 蛋白活性亚基结合, 但其活性又受 G- 蛋白抑制亚基活动状态的影响。表明 GtH 是通过受体传导, 并依赖于 G- 蛋白和腺苷酸环化酶- cAMP 来提高颗粒细胞  $20\beta$ - HSD 的活性。在 GtH 和 cAMP 诱导  $20\beta$ - HSD 活性的过程中必须依赖新的 RNA 和蛋白质合成 [Nagahama 1987]。

除 cAMP 外,  $Ca^{2+}$  在 GtH 调节  $20\beta$ - HSD 活性过程中也发挥重要作用 [Van Der Kraak 1991]。钙离子载体 A23187 和蛋白激酶 C 的激活剂佛波酯 (phorbol ester PMA) 能减少 GtH 和毛喉素对  $17\alpha, 20\beta$ - DHP 的生成量 [Van Der Kraak 等 1991]。钙调蛋白 (Calmodulin) 抑制剂如 Trifluoperazine (TFP) 等能剂量依存地抑制 GtH 刺激的  $20\beta$ - HSD 活性 [Nagahama 等 1994], 因而 GtH 调节作用是通过多渠道实现的。

生长期卵母细胞的滤泡主要产生  $17\beta$ - 雌二醇 ( $17\beta$ -  $E_2$ ) 和睾酮, 到最后成熟早期, 滤泡细胞产生类固醇的功能发生转变,  $17\beta$ -  $E_2$  和睾酮生成量下降, 而  $17\alpha, 20\beta$ - DHP 浓度升高 [Nagahama 1987], 这种转变主要是由于颗粒细胞中芳构化酶活性下降,  $20\beta$ - HSD 活性升高的结果。与类固醇生成有关的几种酶类已从虹鳟卵巢构建的 cDNA 文库中克隆出来 [Takahashi 等 1993, Sakai 等 1993]。编码为  $20\beta$ - HSD 的 cDNA 也已从猪精巢的 cDNA 文库中克隆出来 [Tanaka 等 1992]。

GtH 制剂还能提高一些硬骨鱼类卵母细胞的成熟能力 (Maturational competence)。Patino 和 Thomas [1990a] 用 HCG 诱导离体的细须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*) 的卵母细胞发现, 早期 MIH 非敏感性 (MIH-insensitive) 卵母细胞经 HCG 预孵育后能对 MIH 起反应而发生 GVBD。对笨氏背果鼠 (*Repomucenus beniteguri*) [Zhu 等 1989]、真鲷 [Kagawa 等 1994a] 的研究也得到相同结果。RNA 合成抑制剂放线菌素 D 和蛋白质合成抑制剂环己烯酮均能阻抑 GtH 诱导的卵母细胞的成熟能力, 表明卵子成熟能力的提高要涉及到蛋白质和 RNA 的合成 [Kagawa 等 1994a]。而在云纹犬牙石首鱼 (*Cynoscion nebulosus*), GtH 制剂是通过提高卵巢滤泡 MIH 受体浓度起作用的, MIH 的生成量并未提高 [Thomas 和 Patino 1991]。GtH 诱导卵母细胞成熟能力的作用机理目前尚未完全弄清。

## 2 成熟诱导激素 (MIH)

MIH 是传导 GtH 作用的类固醇激素, 离体情况下,  $C_{21}$  类固醇对卵母细胞 GVBD 具有较强的诱导能力, 主要包括  $17\alpha$ - 羟孕酮 ( $17\alpha$ - P)、 $17\alpha, 20\beta$ - DHP、 $17\alpha, 20\beta, 21$ - trihydroxy- 4- pregnen- 3- one ( $20\beta$ - S)、可的松 (cortisol) 和脱氧皮质酮 (deoxycorticosterone, DOC)。它们的一些中间代谢产物也表现出活性, 而睾酮只在高浓度时才有作用,  $17\beta$ -  $E_2$  及其它 C 类固醇对鱼类卵母细胞最后成熟一般没有作用。由于在不同种类类固醇作用存在差异, 因而对鱼类自然的 MIH 一直有争议 [Goetz 1983]。近年来研究基本确定硬骨鱼类自然的 MIH 有两种, 一种是  $17\alpha, 20\beta$ - DHP, 另一种是  $20\beta$ - S。

### 2.1 $17\alpha, 20\beta$ - 双羟孕酮 ( $17\alpha, 20\beta$ - DHP)

在鲑鳟鱼类, 用生长完全的马苏大麻哈鱼卵母细胞与 GtH 一起孵育, 将孵育介质用 HPLC 分离, 只有与

标准  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 有相同滞留时间的那个组分具有诱导卵母细胞 GVBD 能力, 对这一组分进一步用薄层层析(TLC)和光谱进行分析, 其特性与标准品相同[Nagahama 和 Adachi 1985]。在体情况下, 卵黄发生时  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 含量很低, 而在最后成熟时显著升高, 并与 GtH 剧增相符。因此在马苏大麻哈鱼,  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 是最有效的 MIH。用大致相同的方法, Patrino 等[1993]证明在底 (*F. heteroclitus*)、Fukada 等[1994]证明在青  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 也是最主要的 MIH。鲤科鱼类的 MIH 也是  $17\alpha, 20\beta$ -DHP [赵维信等 1988]。实际上, 大多数硬骨鱼类的 MIH 都是  $17\alpha, 20\beta$ -DHP [Scott 和 Canario 1987]。对鲟的 MIH 曾一度认为是由 GtH 刺激肾上腺产生的可的松和脱氧皮质酮[Sundararaj 和 Goswami 1977], 但进一步的研究表明多种鲟的 MIH 都是  $17\alpha, 20\beta$ -DHP [Sundararaj 等 1985, Haider 和 Rao 1992]。

## 2.2 $20\beta$ -S ( $17\alpha, 20\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one)

在一些鲈形目石首鱼科鱼类,  $20\beta$ -S 被鉴定为自然的 MIH [Trant 等 1986, Patino 和 Thomas 1990b]。用 HCG 孵育正在成熟的卵母细胞 8 小时, 再用 HPLC 和 TLC 从孵育介质中分离出各种类固醇, 发现  $20\beta$ -S 是细须石首鱼卵巢产生的主要 MIH。Thomas 和 Trant [1989]、King 等 [1995] 等分别证明在云纹犬牙石首鱼和条纹狼鲈 (*Morone saxatilis*)  $20\beta$ -S 也同样是主要的 MIH。

## 2.3 MIH 受体

早先的研究表明, 鱼类 MIH 刺激 GVBD 与类固醇一般的作用机制不同。MIH 诱导的成熟能被翻译抑制剂所抑制, 但不为转录抑制剂所抑制 [DeManno 和 Goetz 1987], 表明 MIH 的诱导机制是非基因调节的 (nongenomic)。毛喉素等提高细胞内 cAMP 的物质, 离体时能影响 MIH 刺激 GVBD [DeManno 和 Goetz 1987], cAMP 参与了调节过程。Nagahama [1987] 将  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 显微注入金鱼未成熟的卵母细胞中, 结果不能诱导成熟, 但用  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 孵育时则有效, 表明鱼类 MIH 诱导成熟的作用位点接近细胞表面。在两栖类已经弄清 MIH 是通过胞膜受体而不是胞质受体起作用。Yoshikuni 等 [1993] 用  $^3\text{H}$  标志的  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 与虹鳟去滤泡膜的卵母细胞胞膜制备物结合, 30 分钟内很快达到平衡, 并且  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 竞争性地强烈抑制  $^3\text{H}$  标志的  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 的结合, Scatchard 分析表明有两个不同的结合位点: 一个为高亲和力低容量,  $K_d = 18 \text{ nM}$ , 最大结合容量  $B_{\text{max}} = 0.2 \text{ pM/mg 蛋白}$ ; 另一个为低亲和力高容量,  $K_d = 0.5 \text{ uM}$ ,  $B_{\text{max}} = 1 \text{ pM/mg 蛋白}$ , 表明鱼类 MIH 的受体存在于胞膜上。

Patino 和 Thomas [1990c] 证明云纹犬牙石首鱼卵巢  $20\beta$ -S 的特异结合部位存在于卵母细胞质膜上, 其结合非常迅速,  $0^\circ\text{C}$  下 5 分钟即能达到饱和,  $K_d = 1 \text{ nM}$ ,  $B_{\text{max}} = 10^{-13} \sim 10^{-12} \text{ M/g 卵巢}$ 。正在成熟的卵母细胞的质膜  $20\beta$ -S 受体浓度显著升高, 注射 LHRH-A 诱导成熟的鱼也有同样现象, 因而在卵母细胞成熟期间 MIH 受体浓度的升高可能具有很重要的生理意义。King 等 [1995] 证明条纹狼鲈的 MIH 受体也存在于卵细胞膜上。

## 3 成熟启动因子 (MPF)

MIH 受体既然存在卵膜表面, 则必然有一种胞质因子来传递 MIH 的最后成熟诱导作用, 这种因子定义为 MPF, 它首次在两栖类未受精的卵母细胞胞质中证明存在。Yamashita 等 [1992a] 从注射 HCG 和自然成熟金鱼的卵母细胞中提取出 MPF 活性物质, 并将其注入两栖类未成熟的卵母细胞中能引起最后成熟。MPF 引起的成熟比  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 诱导的成熟快得多, 核未偏位时即发生 GVBD。Yamashita [1992b] 还测定了  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 离体诱导成熟过程中 MPF 的活性, 其变化规律是: GVBD 前升高; 至第一次有丝分裂中期时达到高峰; 第一极体排出时慢慢降低; 然后再次上升并保持在较高水平一直维持到受精。

从脊椎动物和无脊椎动物中分离的 MPF 都具有相同的活性, 无丝分裂的体细胞中也发现 MPF 活性物质, 它没有种的特异性 [Kishimoto 1988]。因此, MPF 不仅是成熟启动因子, 它可能广泛存在于各种细胞中, 是一种普遍的启动核膜破裂和细胞有丝和无丝分裂的因子。

Labbe 等[1989]从海星成熟卵中提纯出分子量约为 200- KDa 的 MPF 复合物,其中包括 32- 和 45- KDa 蛋白质。MPF 由催化亚基和调节亚基两部分组成[Gautier 等 1988、1990],催化亚基为色氨酸或苏氨酸蛋白激酶的同系物,可为裂变酵母(fission yeast) *cdc2<sup>+</sup>* 基因(*cdc2* 蛋白激酶)编码;调节亚基为细胞周期蛋白(Cyclin)[Gautier 等 1990]。

Yamashita 等[1992a]用四种层析柱(Q-sepharose Fast Flow, p13<sup>suc1</sup>- affinity, Sepharose, Mono S and Superose 12)从鲤卵中分离出 MPF。将经过 Mono S 柱后的收集物用 SDS-PAGE 分析,活性最大的部分包括分子量分别为 33- , 34- , 36- 和 48- KDa 的四种蛋白,其中 34- KDa 蛋白与两栖类 MPF 的 *cdc2* 激酶相似;36- 和 48- KDa 蛋白与两栖类细胞周期蛋白 B(Cyclin B)相似。从金鱼中已分离出编码为鱼类 *cdc2* 激酶和 cyclin B 的 cDNA 克隆。*cdc2* 激酶的 cDNA 克隆有一个 1284bp 的插入片段,其中包含一个由 302 个氨基酸编码的可译框架(open reading frame)组成的聚腺苷酸尾(poly(A)<sup>+</sup> tail),Northern 杂交表明在 1.3-kb 位置有杂交信号,由此基因编码的蛋白质分子量约为 34499[Nagahama 等 1994]。金鱼的 Cyclin B 的 cDNA 克隆与两栖类相同,由此基因编码的蛋白质分子量约为 44763。Kajiura 等[1993]、Katsu 等[1993]分别培养出 *cdc2* 激酶和 Cyclin B 的单克隆抗体。应用这些单克隆抗体检测发现,纯化的鲤 MPF 是一个由 *cdc2* 激酶(34- KDa)和 Cyclin B(46- 和 48- KDa)组成的复合物[Yamashita 等 1992a, Katsu 等 1993]。

在两栖类和海星未成熟的卵母细胞中,*cdc2* 激酶与 cyclin B 形成 MPF 前体(pre-MPF)复合物,但在金鱼未成熟的卵母细胞中检测不到 Cyclin B,研究表明 *cdc2* 激酶在未成熟卵中是以 35- KDa 无活性的单体形式存在,当卵母细胞成熟时,启动 cyclin B 的合成[Hirai 等 1992],同时一部分 *cdc2* 激酶由 35- KDa 无活性的形式变成有活性的 34- KDa 形式,同新生成的 cyclin B 形成活性 MPF 复合物[Nagahama 等 1994]。

将 *E-coli* 表达的金鱼全长的 cyclin B 注入到未成熟的卵母细胞中,即使有蛋白质合成抑制剂的存在,也能剂量依存地在 1h 内引起卵母细胞成熟,1 ng cyclin B 足以使成熟卵发生 GVBD,测得成熟卵中 cyclin B 的浓度约为 2 μg/mL [Nagahama 等 1994]。将 cyclin B 加入到未成熟卵的抽提液(含有 35- KDa *cdc2* 激酶)中,能以“全或无”的方式诱导 MPF 的活性,cyclin B 的阈值约为 2 μg/mL。

## 4 生长因子和神经递质

在哺乳类,多种生长因子如转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)、类胰岛素生长因子(Insulin-like growth factor iv, IGF-iv)、血管紧张素(⊖)(Angiotensin ⊖)、胰岛素(Insulin)等都能通过旁分泌机制影响滤泡发育和卵母细胞成熟。Lessman[1985]报道胰岛素单独或与孕酮结合使用均能诱导金鱼卵母细胞成熟,Kagawa 等[1994b]研究了多种生长因子离体情况下对真鲷卵母细胞最后成熟的影响,发现 IGF-iv 诱导 GVBD 最为有效,IGF-iv 还诱导卵母细胞成熟的能力,在雄虹鲷 IGF-iv 能诱导离体精巢精子的生成[Loir 1994]。Duan 等[1993]发现卵巢滤泡 IGF-iv 的 mRNA 含量很高,是产生 IGF-iv 的主要部位。用免疫细胞化学的方法证明在真鲷中也是如此[Kagawa 等 1995]。

对真鲷离体卵巢研究表明,IGF-iv 诱导的 GVBD 能为放线菌酮所抑制,但不为放线菌素 D 所抑制,说明 IGF-iv 与 GtH 有不同的作用机制,它是直接作用于卵母细胞,而不是通过影响 MIH 的生成起作用的,但其作用可能要涉及到 MPF[Kagawa 等 1994b]。因此鱼类生长因子可能通过 IGF-iv 受体起作用,Gutierrez 等[1993]从鲤卵巢中纯化出 IGF-iv 和胰岛素受体,IGF-iv 受体的数量和亲和性都比胰岛素受体高,并且 IGF-iv 受体在生殖周期中始终存在。Maestro 等[1995]调查了鲤、鲮和银大麻哈鱼的 IGF 在卵巢中的作用和 IGF 受体,也得到相似的结果。目前对 IGF 在鱼类卵母细胞最后成熟中的作用引起很大重视,对其作用机制的研究正在深入进行。

在哺乳类,一些神经递质通过旁分泌直接影响 GtH 分泌和卵巢功能,5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)是一种单胺类神经递质,它能影响 LH 的分泌和颗粒细胞层类固醇的生成。5-HT 能刺激金鱼 GtH ⊕ 的分泌,它对鱼类卵母细胞最后成熟也有作用,Iwamatsu 等[1993]报道 5-HT 能刺激颗粒细胞 E<sub>2</sub> 和 17α, 20β-DHP 的生成。但最近 Cerda 等[1995]发现 5-HT 对细须石首鱼卵母细胞的最后成熟没有刺激作用,相反,它明显地抑制 GtH 和 17α, 20β-DHP 诱导的最后成熟,这种抑制是可逆的,而对类固醇生成则没

有影响。5-HT 对鱼类卵母细胞最后成熟的作用及机理也正在深入进行研究。

## 参 考 文 献

- 赵维信, 谭玉钧, 姜仁良等. 1988. 诱导鲢鱼排卵时性类固醇激素含量的变化. 水生生物学报, 12(3): 212~ 218.
- 黄世蕉, 姜仁良, 赵维信等. 1987. 鲤鱼血清中促性腺激素、1 $\beta$ -雌二醇含量的周年变化. 水产学报, 11(1): 75~ 80.
- Cerda J, Petrino R, Lin Y W, et al. 1995. Inhibition of *Fundulus heterilitus* oocyte maturation *in vitro* by serotonin (5-hydroxytryptamine). The J Exp Zool, 273: 224~ 233.
- DeManno D A, Goetz F W. 1987. Steroid-induced final maturation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) oocyte *in vitro*: The effects of forskolin and phosphodiesterase inhibitors. Biol Reprod, 36: 1321~ 1332.
- Dittman A H, Yan L, Swanson P. 1995. Cloning and functional expression of the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) type  $\text{G}_{\text{S}}$  gonadotropin receptor. In: Goetz, F W, Thomas P, eds. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. 2- 8 July 1995, pp. 307.
- Duan C, Duguay S J, Plisetskaya E M. 1993. Insulin-like growth factor iv (IGF iv) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family proteins. Fish Physiol Biochem, 11: 371~ 379.
- Fudaka S, Sakai N, Adachi S. 1994. Steroidogenesis in the ovarian follicle of medaka (*Oryzias latipes*), a daily spawner during oocyte maturation. Dev Growth Differ, 36: 81~ 88.
- Gautier L, Norbuty S, Lohka M. 1988. Purified maturation-promoting factor control gene *cdc2+*. Cell, 54: 433~ 439.
- Gautier L, Mingsgull J, Lohka M. 1990. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. Cell, 60: 487~ 494.
- Goetz F W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation in fishes. In: Hoar W S, Randall D J, Donaldson E M, eds. Fish Physiology. New York: Academic Press. Vol. 3A. 117~ 170.
- Gutierrez J, Parrizas M, Carneiro N. 1993. Insulin and IGF-iv receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive cycle. Fish Physiol Biochem, 11: 247~ 254.
- Haider S, Rao N V. 1992. Oocyte maturation in *Clarias batrachus*. ④ Purification and characterization of maturation-inducing steroid. Fish Physiol Biochem, 9: 505~ 512.
- Hirai T, Yamashita M, Yoshikuni, et al. 1992. Cyclin B in fish oocytes: Its cDNA and amino acid sequences, appearance during maturation, and induction of p34<sup>cdc2</sup> activation. Mol Reprod Dev, 33: 131~ 140.
- Iwatatsu T Y, Toya H N, Sakai Y, et al. 1993. Effect of 5-hydroxytryptamine on steroidogenesis and oocyte maturation in preovulatory follicles of the medaka, *Oryzias latipes*. Dev Growth Differ, 35: 625~ 630.
- Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, et al. 1994a. Development of maturational competence of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, after human chorionic gonadotropin treatment *in vitro* requires RNA and protein synthesis. Gen Comp Endocrinol, 94: 199~ 206.
- Kagawa H, Kobayashi M, Hasegawa Y, et al. 1994b. Insulin and insulin-like growth factors iv and  $\text{G}_{\text{S}}$  induce final maturation of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, *in vitro*. Gen Comp Endocrinol, 95: 293~ 300.
- Kagawa H, Moriyama S, Kawachi H, et al. 1995. Immunocytochemical localization of IGF-iv in the ovary of the red seabream, *Pagrus major*. Gen Comp Endocrinol, 99: 307~ 315.
- Kajiura H, Yamashita M, Katsu Y, et al. 1993. Isolation and characterization of goldfish *cdc2*, a catalytic component of maturation-promoting factor. Dev Growth Differ, 35: 647~ 654.
- Kanamori A, Nagahama Y. 1988a. Developmental changes in the properties of gonadotropin receptors in the ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. Gen Comp Endocrinol, 72: 25~ 38.
- Kanamori A, Nagahama Y. 1988b. Involvement of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate in the control of follicular steroidogenesis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Gen Comp Endocrinol, 72: 39~ 53.
- Katsu Y, Yamashita M, Kajiura H, et al. 1993. Behavior of the components of maturation-promoting factor, *cdc2* kinase and cyclin B, during oocyte maturation of goldfish. Dev Biol, 160: 99~ 107.
- King W, Ghosh S, Thomas P, et al. 1995. Ovarian receptors for 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 $\beta$ -S) in striped bass. In: Goetz F W, Thomas P, eds. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. 2- 8 July 1995, pp. 307.
- Kishimoto T. 1988. Regulation of metaphase by a maturation-promoting factor. Dev Growth Differ, 30: 105~ 115.
- Labbe J C, Capony J P, Caput D, et al. 1989. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of *cdc2* and one molecule of cyclin B. EMBO J, 8: 3053~ 3058.
- Lessman C A. 1985. Effect of insulin on meiosis reinitiation induced *in vitro* by three progestogens in oocytes of the goldfish (*Carassius auratus*). Dev Biol, 107: 259~ 263.
- Loir M. 1994. *In vitro* approach to the control of spermatogonia proliferation in the trout. Mol Cell Endocrinol, 102: 141~ 150.
- Maestro M A, Planas J V, Swanson P, et al. 1995. Insulin-like growth factor iv (IGF-iv) in the fish ovary. In: Goetz F W, Thomas P, eds. Proceedings of the Fifth International Symposium in the Reproductive Physiology of Fish, 2- 8 July 1995, pp. 279~ 282.
- Mita M, Yoshikuni M, Nagahama Y. 1994. G-proteins and adenyl cyclase in ovarian granulosa cells of amago salmon

- (*Oncorhynchus rhodurus*). *Cell Mol Endocrinol*, 102: 78~ 85.
- Miwa S, Yan L, Swanson P. 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biol Reprod*, 50: 629~ 642.
- Nagahama Y, Adachi S. 1985. Identification of maturation-inducing steroid in teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev Biol*, 109: 428~ 435.
- Nagahama Y. 1987.  $17\alpha, 20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: A teleost maturation-inducing hormone. *Dev Growth Differ*, 29: 1~ 12.
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, et al. 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. In: Sherwood N M, Hew C L, eds. *Fish Physiology*. New York: Academic Press. Vol. (II), pp. 393~ 439.
- Patino R, Thomas P. 1990a. Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: Evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocyte maturation. *Biol. Reprod*, 43: 818~ 827.
- Patino R, Thomas P. 1990b. Induction of maturation of Atlantic croaker oocytes by  $17\alpha, 20\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one in vitro: Consideration of some biological and experimental variables. *J Exp Zool*, 255: 97~ 109.
- Patino R, Thomas P. 1990c. Characterization of membrane receptor activity for  $17\alpha, 20\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gen, Comp Endocrinol*, 78: 204~ 217.
- Patrino T R, Lin Y - W P, Netherton J C, et al. 1993. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. (ii). Purification, characterization and metabolism of  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one by intact follicles and its role in oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol*, 92: 1~ 15.
- Planas J V, Athos J, Swanson P. 1995. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by gonadotropins during sexual maturation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Goetz F W, Thomas P, eds. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, 2- 8 July 1995. pp. 296~ 298.
- Sakai N, Tanaka M, TAlahashi M, et al. 1993. Isolation and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian cDNA encoding  $3\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase/  $\Delta^4$ - $5\alpha$  isomerase. *Fish Physiol Biochem*, 11: 273~ 279.
- Scott A, Canario A V M. 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. In: Idler D R, Crim L W, Walsh J M, eds. *Reproductive Physiology of Fish*. St. John's, Canada: Memorial Univ. Press. pp. 224~ 234.
- Sundararaj B I, Goswami S V. 1977. Hormonal regulation of *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen Comp Endocrinol*, 32: 17~ 28.
- Sundararaj B I, Goswami S V, Lamba V. 1985. Some aspects of oocyte maturation in catfish, *J Steroid Biochem* 11: 701~ 707.
- Swanson P, Suzuki, Kuwauchi H, et al. 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GtH IV and GtH V. *Biol Reprod*, 44: 29~ 38.
- Takahashi M, Tanka M, Sakai N, et al. 1993. Rainbow trout ovarian cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450<sub>scc</sub>): cDNA cloning and mRNA expression during oogenesis. *FEBS Lett*, 319: 45~ 48.
- Tanaka M, Ohno S, Adachi S, et al. 1992. Pig testicular  $20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase exhibits carbonyl reductase-like structure and activity: cDNA cloning of pig testicular  $20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, 267: 13451 ~ 13455.
- Thomas P, Patino R. 1991. Changes in  $17\alpha, 20\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one membrane receptor concentrations in ovaries of spotted seatrout during final maturation. In: Scott A P, Sumpter J P, Rolf M S, et al, eds. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of fish*. *Fish Symp* 91, pp. 122~ 124. Sheffield.
- Thomas P, Trant J K. 1989. Evidence that  $17\alpha, 20\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation-inducing steroid in spotted seatrout. *Fish Physiol Biochem*, 7: 185~ 191.
- Trant J M, Tomas P, Shackleton C H L. 1986. Identification of  $17\alpha, 20\beta$ -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one as the major ovarian steroid produced by the teleost *Micropogonias undulatus* during final oocyte maturation. *Steroids*, 46: 89~ 99.
- Van Der Kraak G. 1991. Role of calcium in the control of steroidogenesis in preovulatory ovarian follicles of the goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, 81: 268~ 275.
- Yamashita M, Fukada S, Yoshikuni M, et al. 1992a. Purification and characterization of maturation-promoting factor in fish. *Dev Biol*, 149: 8~ 15.
- Yamashita M, Fukada S, Yoshikuni M, et al. 1992b. M-phase-specific histone H1 kinase in fish oocyte: Purification, components and biochemical properties. *Eur J Biochem*, 205: 537~ 543.
- Yan L, Swanson P, Dickhoff W W. 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GtH IV and GtH V). *Biol Reprod*, 47: 418~ 427.
- Yoshikuni M, Shibata N, Nagahama Y. 1993. Specific binding of [ $^3$ H]  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one to oocyte cortices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem*, 11: 15~ 24.
- Zhu Y, Aida K, Furukawa K, et al. 1989. Development of sensitivity to maturation-inducing steroids and gonadotropins in the oocytes of the tobinumeri-dragonet, *Repomucenus beniteguri*, Callionymidae (Teleost). *Gen Comp Endocrinol*, 76: 250~ 260.