

O-6 생쥐 초기배아에서 세포질내 요인에 의한 유전자 발현과 형태형성의 조절

이동률^{1,2}, 이정은², 윤현수², 노성일², 김문규¹
한양대학교 생물학과¹, 영동제일병원 불임의학연구소²

서 론

포유류에서 초기 배아의 발생은 각 단계별로 특정한 유전자가 발현되며 다양한 형태형성이 이루어지는 특징이 있다. 동물에 따라 다르지만 생쥐의 경우, 초기발생과정에서 transcription은 난자가 meiotic maturation에 들어가면서 중지되었다가 후기 전핵시기에 재개되고, translation은 2-세포기 중기에 시작된다. 이러한 zygotic gene의 activation과 expression이 진행되는 time schedule의 조절기작은 알려져 있지 않으나, 난자와 전핵시기에는 존재하지 않고 2-세포기에 나타나는 enhancer specific cofactor activity에 의한 조절기작과 (Majumder et al., 1997), oocyte에서 기원된 mRNA로부터의 합성된 단백질에 의해 조절되는 transcription factor에 의한 조절기작들이 제안되고 있다(Wang and Latham, 1997).

또한 생쥐 배아의 할구들은 8세포기에 각각의 독립성을 잃고 interblastomeric contact를 증가시켜 세포의 polarity를 가지게 되는 배아의 최초 형태 분화인 compaction현상이 일어나며, 32-세포기에 blastocoel을 형성하고 trophectoderm과 inner cell mass의 두 가지의 embryonic cell type으로 분화하게 된다. 이러한 초기발생시 특정분화과정의 time schedules은 수정란을 반으로 절단하였을 때 enucleated egg part에서 cortical activity가 nucleated egg part와 동일하게 관찰되는 것으로 보아 cytoplasmic clock에 의해 조절되는 것으로 추측되고 있다. 이 세포질내 시계는 DNA 복제의 횟수, 또는 nucleus/cytoplasm ratio 등 여러 가지 program에 의해 조절되는 것으로 제안되었다. Blastocyst의 형성은 일정한 복제횟수에 의해 조절되는 것으로 보고된 바 있으나, DNA polymerase- α 의 inhibitor인 aphidicolin의 처리로 DNA의 복제를 1-2회 억제시켰을 때도 compaction과 blastocyst 형성 시간은 변화하지 않아 DNA의 복제 횟수와 형태형성의 조절과는 관계가 없는 것으로 보고되었다. 한편 또다른 조절인자로 여겨지는 nucleus/cytoplasm ratio는 *Xenopus laevis* 배아에서 midblastula transition과 embryonic genome의 activation의 필수적인 요인으로 보고되고 있으나, 생쥐의 경우에는 명백히 밝혀져 있지 않다. 생쥐 배아에서 nucleus/cytoplasmic ratio의 증가는 각각

의 발생 단계에서 stage-specific한 protein의 합성 과정에 영향을 주지 않으나(Petzoldt and Muggleton-Harris, 1987), compaction과 blastocoel formation의 cell stage와 시간을 촉진하는 것으로 보고되어(Evsikov et al., 1990; Feng and Gordon, 1997) 그 조절기작에 대한 추가의 연구가 필요하다.

한편 최근 zygotic gene activation 이후 배아와 체세포에서 유래된 세포의 핵을 제핵된 난자내에 치환하였을 때 정상적인 배아의 발생과 산자의 생산이 보고되었으며, Kanka 등(1996)은 32세포기의 토끼의 핵을 제핵된 난자의 cytoplasm에 치환을 했을 경우 transcription은 단계적으로 감소하였다가 첫번째 난할 직전에 완전히 중지되고, 이들의 transcription은 정상적인 배아의 발생과정과 같이 2-와 4-세포기 사이에 재개되어 진행되는 것을 관찰하였다. 따라서 핵과는 상관없이 난자와 배아의 cytoplasm내에 초기배아의 발생과정을 조절하는 인자가 존재할 수 있음을 알 수 있다.

따라서 본 연구는 초기 배아의 발생과정에서 nucleus/ cytoplasm ratio 또는 cytoplasm factor에 의한 gene expression과 형태형성의 조절 기작을 밝혀보고자 시행하였다.

재료 및 방법

전핵시기의 배아와 2-, 4-세포기 배아의 수확

본 연구에서 사용된 전핵시기와 2-, 4-세포기 배아는 과배란된 암컷 F1 hybrid(C57BL x CBA) 생쥐와 수컷 생쥐의 교잡을 통해 hCG 주사 후 20, 44, 56 시간째에 난관으로부터 수확하였다. 교잡후 vaginal plug가 관찰된 날을 Day 1으로 간주하였다.

전핵시기 배아의 세포질 조작에 의한 배아의 발생과 형태형성

세포질의 양이 배아의 발생, gene expression 및 형태형성에 미치는 영향을 조사하기 위해 미세조작기를 이용하여 전핵시기 배아의 투명대를 일부 절개한 후 세포질을 각각 1/2, 1/3 제거(HP, TP group)하고, 10% fetal bovine serum(FBS)이 들어있는 Ham's F10 배양액 내에서 Vero cell과 5일간 공배양하여 이들의 발생과 형태형성을

sham-operated 배아(SP group)와 비교하였다.

세포질 치환에 의해 재조합된 배아의 발생과 형태형성

2-, 4-세포기 배아의 투명대를 5mg/ml pronase로 3분간 처리하여 제거한 후, 각각의 할구를 Ca^{++} , Mg^{++} -free CZB 배양액에서 10분간 처리하여 분리하였다. 각각의 할구를 cytochalasin B가 5 μ g/ml 함유된 HEPES-buffered CZB 배양액에 10분간 처리한 후 핵을 가진 부분과 가지지 않은 부분으로 절단하여, 절반의 세포질을 가진 전핵시기의 배아의 투명대 내에 핵을 가지지 않은 2- 또는 4-세포기 배아의 세포질을 주입하였다. 이들을 전기자극을 이용하여 세포질 융합으로 재조합된 배아(P+2, P+4 group)를 만들어서, 전핵시기 배아의 세포질을 절반의 세포질을 가진 전핵시기 배아에 융합시켜 재조합된 대조군(P+P group)과 발생 및 형태형성을 비교하였다.

세포질 조작군과 재조합군의 total RNA 합성과 stage specific한 유전자의 발현 비교

Total RNA의 합성을 비교하기 위해, 각 group의 5개의 배아를 각각 hCG 주사 후 28, 40, 52 시간째에 [5, 6- 3H]-uridine이 50 μ Ci/ml의 농도로 첨가된 CZB 배양액 내에서 3시간 동안 labeling 하였다. 10% trichloroacetic acid(TCA)로 침전시킨 후, TCA-soluble과 TCA-insoluble activity를 각각 측정하였다.

16-세포기에 specific하게 발현하는 것으로 알려진 ZO-1 α^+ isoform gene(Sheth et al., 1997)의 expression pattern을 각 실험군의 hCG 주사 후 28(Day 1), 76(Day 3), 100(Day 4), 115(Day 5) 시간째에 얻은 배아에서 RT-PCR 방법을 이용하여 분석하였다. 각 실험군에서 얻은 20개의 배아에서 RNA를 추출하고, AMV reverse transcriptase를 이용하여 reverse transcription하여 cDNA를 합성하였다. 이 중 3개 분량의 cDNA를 이용하여 PCR을 수행하였다.

통계적 분석

결과는 mean \pm standard deviation(SD)으로 표현하였고, Student's t-test로 분석하여 $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의 하다고 판정하였다.

결과 및 논의

Nucleus/cytoplasm ratio에 의한 초기 배아의 gene expression과 형태형성과정의 조절 가능성을 연구하기 위해 세포질의 양을 1/2 또는 1/3 제거한 HP, TP군의 배아의 발생을 sham-operation한 SP군과 비교하였다. HP, TP군의 배아 발생은 SP군에 비해 차이가 없었다. 그러나 HP, TP군의 compaction과 blastocoel이 형성되는 시간은 SP군에 비해 빨라졌고, 이 둘 현상이 4-세포기와 16-세포기에 일어나 8-세포기와 32-세포기에 일어나는 SP군에 비해 빨라졌다. 그러나 이들 3군간

의 total RNA 합성과 stage specific한 ZO-1 α^+ isoform gene의 expression pattern에는 차이가 없었다. 이상의 결과는 nucleus/cytoplasm ratio를 증가시켰을 때 compaction과 blastocoel의 시간과 cell stage가 촉진된다는 다른 연구자들의 결과와 동일하였다(Evsikov et al., 1990; Feng and Gordon, 1996). 또한 이들 HP, TP군에서 형태형성은 촉진되었지만 total RNA의 synthesis와 stage specific한 유전자의 발현에는 차이가 없어, 이러한 결과는 배아내 특정시기에 발현되는 단백질을 분석한 다른 연구자들의 결과와 유사하다(Petzolt and Muggleton-Harris, 1987). 따라서 nucleus/cytoplasm ratio는 초기 배아의 gene expression에 영향을 주지 않으며, 형태형성의 조절은 transcription 이외의 다른 기작에 의해 이루어지는 것으로 사료된다.

초기배아의 gene expression과 형태형성과정에서 cytoplasmic factor의 영향을 알아보기 위해 nucleus/cytoplasm ratio의 변화없이 세포질의 조성을 바꾸는 실험을 수행하였다. 절반의 세포질을 가진 전핵시기의 배아의 투명대 내에 핵을 가지지 않은 2- 또는 4-세포기 배아의 세포질을 주입한 후 전기융합을 통해 재조합된 P+2, P+4군의 배아의 발생은 절반의 세포질을 가진 전핵시기의 배아와 절반의 전핵시기 배아의 세포질로 재조합된 P+P군에 비해 빨라졌으며, compaction의 시간과 cell stage도 빨라졌다. 또한 total RNA 합성과 stage specific한 ZO-1 α^+ isoform의 expression도 촉진되었다. 이는 2-와 4-세포기의 세포질은 전핵시기의 세포질과 다른 조성을 가지고 있으며 이들에 의해 gene expression과 형태형성이 변화한 것으로 사료된다. 이 실험의 결과로 2-세포기 이후 합성되는 물질이 초기배아의 gene expression을 조절하고 이에 의해 합성되는 물질에 의해 형태형성이 조절된다고 제안할 수 있다. 이 가설은 난자와 전핵시기에는 존재하지 않고 2-세포기에 나타나는 enhancer specific cofactor activity에 의해 이러한 zygotc gene의 activation이 조절된다는 보고(Majumder et al., 1997)와 유사하다. 그러나 gene expression과는 달리 형태형성은 2, 4-세포기 배아의 세포질 치환 이외에도 세포질의 제거에 의한 nucleus/cytoplasm ratio의 변화에 의해서 형태형성과정에서 변한 것으로 보아 다른 기작에 의해 조절되는 것으로 여겨진다. 그런데 전핵시기의 배아에 단백질 합성의 inhibitor인 cycloheximide의 처리에 의한 연구에서도 maternal factor에 의한 배아발생 과정의 조절 가능성이 제안되었다(Wang and Latham, 1997). 그리고 핵치환 기술을 이용하여 핵을 난자 내에 치환하였을 경우, 재조합된 배아의 gene expression과 형태형성과정은 핵의 상태와는 상관없이 세포질에 의해 지배받게 된다. 또 치환된 핵의 모든 transcription은 중지되는 것으로 보아(Kanka et al.,

1996), 난자 내에는 핵의 gene expression을 repression하는 물질이 존재하고, 이들의 변화에 의한 배아발생이 조절될 수 있다. 세포질의 치환은 이러한 repressor의 감소 또는 변화를 유도하고 이에 따라 gene expression과 형태형성을 조절하는 것으로 제안할 수 있다. 그리고 본 실험의 HP, TP군에서 gene expression의 변화 없이 형태형성이 촉진되는 것은 repressor의 변화 없이 동일한 gene expression에도 불구하고 세포질의 제거로 인해 합성되는 물질의 상대적인 농도의 변화에 의해 조절되는 것으로 사료되며, gene expression과 형태형성에 관여하는 cytoplasmic factor의 기원과 작용기작에 관한 추가 연구가 필요하다.

요 약

생쥐의 초기발생과정에서 배아 세포질의 제거로 nucleus/cytoplasm ratio를 증가 시켰을 경우, 발생과 gene expression에는 영향을 미치지 않았으나 형태형성은 촉진되었다. 또, nucleus/cytoplasm ratio의 변화 없이 발생후기의 cytoplasm으로 일부 치환된 배아에서 발생과 gene expression, 형태형성은 모두 촉진되었다. 이상의 결과로 보아 초기배아의 gene expression과 형태형성과정에서 일어나는 time schedule의 조절은 nucleus/cytoplasm ratio가 직접적으로 영향을 미치지 않고 난자와 배아 내에 존재하는 cytoplasm factor에 의해 조절 받으며, 특히 형태형성의 time schedule은 cytoplasmic factor와 이들에 의해 조절되는 물질의 상대적인 농도에 의해 조절될 것으로 여겨진다.

참고문헌

Evsikov SV, Morozova LM, and Solomko AP (1990) *Development* 109: 323-328.
 Feng Y-L and Gordon JW (1997) *J Exp Zool* 277: 345-352.
 Ho Y, Doherty AS, and Schultz RM (1994) *Mol Reprod Dev* 38: 131-141.
 Kanka J, Hozak P, Heyman Y, Chesne P, Degrolard J, Renard J-P, and Flechon J-E (1996) *Mol Reprod Dev* 43: 135-144.
 Majumder S, Zhao Z, Kaneko K, and DePamphilis M (1997) *EMBO J* 16: 1721-1731.
 Petzoldt U and Muggleton-Harris A (1987) *Development* 99: 481-491.
 Sheth B, Fesenko I, Collins JE, Moran B, Wild AE, Anderson JM, and Fleming TP (1997) *Development* 124: 2027-2037.
 Wang Q and Latham KE (1997) *Mol Reprod Dev* 47: 265-270.