

P-7 사람의 난관액과 난포액의 Gelatinase의 상호작용

미래와 희망 산부인과 체외수정연구실¹, 서울여자대학교 생명공학과²,
을지대학교 의과대학 산부인과³

이인선^{1,2} · 김지수² · 이승재¹ · 권혁찬³ · 신정환³ · 김해권²

목 적: 포유동물의 난포액 속에는 여러 종류의 단백질 분해효소가 존재하며 이들은 난포의 성장과 난자의 성숙 그리고 성숙한 난자의 배란 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 배란시에는 이들 난포액 성분 중의 일부가 난자와 함께 난관 내로 들어가 난관액과 상호작용하여 수정과 초기 발생에 영향을 미칠 것으로 여겨진다. 본 연구에서는 사람의 난포액과 난자-난구 복합체의 ECM 내에 존재하는 gelatinase들을 조사하고 이들이 난관액과 혼합되었을 때 어떤 변화가 나타나는지를 조사하였다.

대상 및 방법: 난포액은 체외수정 시술시 채취된 난포액을 사용하였다. 난관액은 식염수로 난관을 flushing해서 얻은 난관액 (fhOF), slide glass로 짜낸 난관액 (shOF), 난관조직세포의 추출액 (hOX)으로 구분하여 사용하였다. 난자-난구 복합체의 ECM은 0.05% hyaluronidase로 녹인 후 원심분리하여 상등액을 얻어 사용하였다. Gelatinase 활성은 zymography 방법을 사용하여 조사하였으며, gelatinase의 종류는 western blot으로 확인하였다.

결 과: 난포액 내에는 여러 종류의 gelatinase의 활성이 나타났지만 난관액과 반응시킨 결과 대부분의 gelatinase들은 난관액의 종류에 상관없이 활성이 사라지는 것이 관찰되었다. 특히 110 kDa의 분자량을 가지는 gelatinase의 활성은 현저하게 감소하였으며 62 kDa의 분자량을 가지는 gelatinase 활성도 약간 감소하였다. 이 현상은 난관액과의 반응시간에 비례하여 강하게 나타났다. 세 종류의 난관액 중 shOF가 가장 강한 활성을 보였으며 shOF의 단백질 농도가 증가할수록 난포액 gelatinase의 활성 감소는 더욱 뚜렷하게 나타났다. 난포액의 110 kDa와 62 kDa gelatinase는 western blot 실험 결과 active MMP-2 (62 kDa)와 MMP-2의 isoform (110 kDa)인 것으로 확인되었다. 한편 난자-난구 복합체의 ECM에도 여러 종류의 gelatinase들이 존재하는 것이 관찰되었으며 shOF와 반응시킨 결과 약 180~220 kDa, 90~110 kDa의 분자량을 갖는 gelatinase들의 활성이 사라졌다.

결 론: 난포액과 난자-난구 복합체의 ECM에는 MMP-2의 isoform을 비롯한 여러 종류의 gelatinase들이 존재하며 이들은 난관액과 반응하면 그 활성이 사라진다. 이로 미루어 난관 내로 배란된 난자는 난관액에 의해 그 구성분이 달라질 것으로 여겨진다. 이러한 변화가 어떠한 생리적 의미를 지니는가는 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

P-8 사람 난포액에 존재하는 Matrix Metalloproteinase-2 Isoform의 동정

서울여자대학교 생명공학과 발생학 연구실¹, 미래와 희망 산부인과 체외수정 연구실²,
한양대학교 생명과학과³, 상명대학교 생명과학과⁴

나경아¹ · 이승재² · 윤용달³ · 이성호⁴ · 김해권¹

목 적: 난포액 내에는 여러 가지 matrix metalloproteinase (MMP)와 이들의 isoform이 존재하며 이들

은 난포의 성장과 배란 등의 과정에 중요한 역할을 할 것으로 추측되지만 대부분의 경우 그 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. 최근 본 연구실에서는 난포액 내에 분자량 110 kDa에 달하는 새로운 형태의 MMP (GA110)가 존재하는 것을 발견한 바 있다. 본 연구에서는 이 GA110의 생리적 기능을 규명하기 위해 먼저 GA110을 분리 동정하고자 하였다.

대상 및 방법: 체외수정시술 시에 채취된 난포액을 원심분리하여 얻은 상층액을 얻어 동결보존한 후 혹은 직접 사용하였다. 또한 효소의 분리 전 먼저 난포액에 EDTA를 처리하여 GA110의 활성을 증가시킨 후 사용하였다. 난포액 내의 단백질은 DEAE Sepharose chromatography, ammonium sulfate 침전법, Sephacryl S300-HR chromatography 등의 방법으로 분리하였고 이때 효소의 존재는 zymography 방법으로 확인하였다. Sephacryl로 분리된 단백질들은 zymography로 분리하고 이로부터 GA110 band를 잘라 단백질을 추출한 후 전기 영동 및 western blotting을 실시하였다.

결 과: 난포액의 GA110은 DEAE Sepharose 크로마토그래피의 결과 0.23 M NaCl 분획에서 용출이 되었고 이를 ammonium sulfate 침전법으로 분리하였을 때에는 대부분이 50~60%에서 침전이 되었다. 활성이 나타난 분획들을 모아 이를 SDS가 첨가된 완충액을 사용하여 Sephacryl S300으로 분리한 결과 GA110은 약 155 kDa 분자량의 분획에서 용출되었다. 이 분획들을 zymography로 분리한 후 활성 band를 잘라내어 이로부터 단백질을 전기 용출하였다. Western blotting 결과 이 단백질은 MMP-2의 isoform인 것으로 확인되었다. 환원성 전기 영동 결과 이 단백질은 MMP-2와 unknown protein이 이황화결합으로 결합된 단백질인 것으로 판명되었다.

결 론: 난포액 내에는 EDTA를 처리할 경우 분자량 110 kDa에 달하는 새로운 gelatinase가 존재하는데 이 단백질은 MMP-2의 항체와 반응하는 것으로 미루어 MMP-2의 새로운 isoform인 것으로 여겨진다. 또한 이 단백질은 mercaptoethanol에 의해 분자량이 감소하는 것으로 보아 unknown protein이 MMP-2와 이황화결합으로 연결된 구조를 갖는 것으로 추정된다. 이 단백질의 기능은 앞으로 더 연구가 되어야 할 것이다.

P-9 Maintenance of Human Embryonic Stem Cells Derived from Frozen-thawed Blastocysts on Feeder-free Culture Condition

¹마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소, ²건국대학교, ³마리아 병원

김은영¹ · 이금실¹ · 박은미¹ · 조현정¹ · 민현정¹ · 박세필¹ · 정길생² · 임진호³

Objective: This study was to confirm whether the established human embryonic stem (hES) cell growth can be maintained without mouse embryonic feeder (MEF) cells.

Materials and Methods: The hES cells derived from frozen-thawed blastocysts were subcultured until 10th passage (about 2 month, 40 population doublings) on MEF feeder. And then some of these hES colonies were cultured on feeder-free condition using Matrigel-coated plates with MEF conditioned medium. Characterization of hES cells cultured on feeder or off feeder were taken by alkaline phosphatase staining, karyotyping, surface marker staining, Oct4 gene expression and telomerase activity.

Results: The hES cells cultured on feeder-free condition during subculture indicated stable proliferation rate, normal karyotype, high telomerase activity. Especially, compared with culture on feeder condition, hES cells cultured on feeder-free condition were tended to decrease spontaneous differentiation. Similar