

RNAi 기법을 이용한 난자 성숙 과정에서의 SEBOX 유전자 역할 규명

김경화 · 김은영 · 이경아

포천중문의과대학교 생명과학전문대학원, 차병원 여성의학연구소

Objective: 본 연구진은 선행 연구에서 skin-embryo-brain-oocyte homeobox (SEBOX) 유전자가 미성숙 난자 (Germinal vesicle; GV)에서 높게 발현하는 것을 발견하였다. 현재까지 SEBOX 유전자의 기능은 밝혀져 있지 않다. 본 연구는 난자에서 발현하는 SEBOX 유전자가 난자 성숙 과정에 어떠한 기능을 갖고 있는지 알아보려고 수행하였다.

Methods: 미성숙 난자는 4주령 암컷 생쥐에 PMSG 유도 48시간 후 cumulus-oocyte complex를 얻은 후 난구 세포를 제거하고 사용하였다. SEBOX mRNA 발현 양상을 생쥐의 여러 조직, 발달단계별 생식소, 난자 및 초기 배아에서 관찰하였다. 미성숙 난자에 SEBOX dsRNA를 제작하여 미세 주입하는 RNAi를 수행한 후 16시간 동안 체외 배양하여 난자 성숙에 미치는 영향을 분석하였다. RNAi 후, RNA 및 단백질의 knock down을 확인하였고, 정상적인 성숙여부를 확인하기 위하여, polscope 현미경으로 방추사를 관찰하고, 염색체 배열은 orcein staining을, 그리고 재확인을 위해 immunofluorescence를 수행하였다. SEBOX 항체는 67~80번째 아미노산을 항원으로 제작하여 사용하였다. 배아발달에 관여하는 지의 여부는 PN배아에서의 RNAi를 통하여 조사하였다.

Results: SEBOX 유전자는 모든 조직에서 발현하며 특히 뇌와 난소, 그 중에서도 2차 난포가 생성되는 시기인 5일령 난소에서 강하게 발현하였다. 난포 안에서는 난구세포, 과립막 세포에서도 약하게 발현하며, 난자에서는 많은 양이 발현하는 것을 관찰하였다. 초기 배아 발달 과정 중 SEBOX 유전자는 미성숙 난자 성숙 난자, PN 배아, 2-세포 배아까지 발현을 하지만 4세포 배아 이후 단계에서는 발현하지 않는 전형적인 maternally expressed gene으로 관찰되었다. 미성숙 난자에서 SEBOX RNAi 결과 RNA가 80% 이상, 단백질이 50% 이상 발현이 모두 감소하는 것을 관찰하였음에도 불구하고 대조군과 차이 없이 metaphase II (MII)로 난자 성숙이 진행되었다 (control: 87.3%, sham: 80.3%, SEBOX RNAi: 82.5%). SEBOX RNAi 후에도 성숙난으로 발달한 난자를 형태학적으로 분석한 결과 방추사가 정상적으로 형성되어 배열되어 있으며 염색체 분리도 정상적으로 일어났음을 관찰하였다. PN배아에서의 RNAi 결과, SEBOX를 knock down시킨 결과, 79%의 배아는 2-세포기에서 발달이 멈추는 것을 확인하였다.

Conclusion: 본 연구 결과 SEBOX 유전자는 난자의 핵 성숙 과정에는 아무런 기능이 없는 것으로 관찰되었다. 초기 배아 발달 시기의 발현양상으로 미루어 SEBOX 유전자는 maternally expressed gene으로 유추되며, PN배아에서의 RNAi 연구결과, SEBOX는 난자 성숙보다는 수정 이후 초기 배아 발달에 영향을 주는 유전자로 확인할 수 있었다.

이 논문은 2006년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2006-311-E00067).