

단백질분해효소들의 양서류 난자에 대한 성숙유도와 억제작용에 관하여

권혁방 · 고선근* · 박현정

전남대학교 자연과학대학 생물학과, 호남대학교 생물학과*

양서류의 여포난자를 생체외에서 배양하면서 호르몬을 처리하면 난자의 성숙(핵붕괴)을 일으킨다. 본 연구는 북방산개구리의 여포난자를 배양하면서 난자내 단백질 분해효소들의 활성변화를 유도하여 이것이 난자의 성숙에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. Chymotrypsin의 저해제로 알려진 $N\alpha$ -tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl-ketone (TPCK)을 배양액에 처리하면 비교적 낮은 농도(0.001-1 μ M)에서는 호르몬의 도움없이도 난자의 성숙을 유도하나 높은 농도(100 μ M)에서는 호르몬에 의한 난자의 성숙까지도 억제하는 이중적인 효과를 나타내었다. Trypsin의 저해제인 $N\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)은 성숙유도능력이 없을 뿐 아니라 progesterone에 의한 난자의 성숙을 억제하였다. Trypsin을 직접 처리했을 때에는 농도에 의존하여 (0.001-1 μ g/2ml) 호르몬의 도움없이도 난자의 성숙을 유도함을 발견하였다. TLCK나 TPCK의 억제효과는 성숙 초기에만 나타났다.

본 결과는 양서류 난자의 성숙조절 과정에 몇종의 단백질 분해효소들이 참여한다는 것을 시사해 주고 있다.

KEY WORDS: Oocyte maturation, Amphibia

동면 중에 있는 암컷 개구리의 난소에는 성장이 끝난 여포들로 가득차 있다. 이들 여포난자들은 감수분열 전기에서 분열이 억제되어 있다가 번식기에 뇌하수체 호르몬의 도움으로 감수분열의 재개와 더불어 배란을 일으킨다. 이 때 뇌하수체 호르몬은 여포세포를 자극하여 성숙유도호르몬인 progesterone을 분비하도록 하며 이 호르몬이 직접 난자막에 작용하여 감수분열재개를 유도하게 된다(Masui and Clarke, 1979; Schuetz, 1985). 양서류의 여포난자를 생체외에서 배양하면 포유동물에서와는 달리 자발적 성숙을 일으키지 않으며 progesterone의 자극이 있어야만 성숙을 일으킨다. Progesterone이 난자막에 작용하며 막에 있는 adenylate cyclase를 부분적으로 억제하면

세포내 cAMP의 농도저하를 유발하게 되고 이것이 복잡한 일련의 생화학적 경로를 자극하여 성숙촉진요인(maturation promoting factor, MPF)을 생성 내지 활성화 시키고 궁극적으로 핵붕괴를 유도한다고 알려져 있다(Maller, 1983). 그러나 성숙조절의 핵심이 되는 이 중간 반응 경로에 대해서는 아직 많이 알려져 있지 않다. 근래에 protein kinase C(PKC)가 여러 종의 동물에서 호르몬의 도움없이도 배양중인 난자의 성숙을 유도할 수 있다는 사실이 발견됨에 따라(Stith and Maller, 1987; Eckberg *et al.*, 1987; Kleis-San Francisco and Schuetz, 1989) 중간경로의 하나로 calcium ion이 관련된 정보전달체계(signal transduction pathway), 즉 phosphatidyl inositol turnover system(PI system) (Nishizuka, 1984)이 난자에서도 작용할 가능성이 커지게 되었다(Eckberg, 1988). 이는 난자의 성숙과정에서 일부

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것임.

단백질의 인산화-탈인산화가 중요하다는 사실과 여러 protein kinase가 관련되어 있다는 사실들에 의해 뒷받침 되고 있다(Maller, 1983; Eckberg, 1988). 이러한 반응과정에 단백질 분해효소들이 참여할 가능성도 점점 커지게 되었다. 일부 저해제를 사용하여 난자내의 단백질 분해효소의 활성을 억제하면 호르몬에 의한 난자의 성숙이 억제된다는 사실이 불가사리, 多毛類(Polychaeta) 및 포유류에서 밝혀진 바 있다(Peaucellier, 1977; Kishimoto *et al.*, 1982; Sano and Kanatani, 1983; Hashimoto *et al.*, 1988). 더우기 최근에는 양서류에서 chymotrypsin의 저해제인 TPCK를 적절히 조절함에 따라 난자의 성숙을 유도할 수도 있고 억제할 수도 있다는 사실이 알려지게 되었다(Ishikawa *et al.*, 1989).

본 연구는 몇종의 단백질 분해효소 및 그 저해제를 사용하여 북방산개구리(*Rana dybowskii*)의 여포를 배양하면서 이들 효소들이 과연 난자의 성숙조절에 참여하는지를 조사하여 보았다. 북방산개구리의 여포난자들은 특이하게 생체외배양에서 자발적 성숙을 일으키는 것들이 많이 나타나므로(Kwon *et al.*, 1989b) 상기 효소들이 정상적인 여포난자들과 자발적 성숙을 일으키는 것들과 어떻게 작용하는지 아울러 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서 사용한 개구리는 북방산개구리(*Rana dybowskii*)로서 11월부터 2월 사이에 물속에서 동면하는 것을 채집하였으며 채집 즉시 4°C를 유지하는 저온실에서 가동면 상태로 보관하였다. 채집장소는 전남 일원이었으며 보관기간동안 10% amphibian Ringer's (AR)용액이 들은 상자에 10마리정도 넣어 보존하였고 3-4일에 한번씩 용액을 갈아주었다. 배양한 개구리의 난자들중 자발적성숙을 일으킨 것들은 따로 명시하였다.

여포배양

개구리를 두부절개로 죽인 후 복강에서 난소를 떼어낸 다음 AR 용액이 든 petri dish에 넣고 해

부현미경하에서 예리한 핀셋으로 여포를 분리해 내었다. 분리해낸 여포를 신선한 AR용액으로 서너번 씻은 다음 실험군의 수에 따라 무작위로 여포들을 나누었다. 여포들을 spoid를 사용하여 2 ml의 AR용액을 포함한 다공배양접시(24 well multidish, Nunclon)의 각 well에 20개씩 넣은 다음 실험군에는 필요한 시약 내지 호르몬을 미세피펫으로 해당농도가 되도록 첨가하였다. 이들 배양접시를 22-24°C를 유지하며 일분에 80회전올하는 진탕배양기(국제싸이엔)에 옮긴 후 24시간동안 배양하였다. 배양기간이 지난 후 여포들을 가열하여 고정을 시킨 다음 해부현미경하에서 미세핀셋으로 쪼개어 핵의 유무를 조사하였으며 핵붕괴가 일어난 것을 성숙을 일으킨 것으로 간주하였다. 뇌하수체추출물(frog pituitary homogenate, FPH)의 제조 및 기타 자세한 실험과정은 이미 전보에 기술한 바와 같다(Kwon *et al.*, 1988; 1989a, b).

호르몬 및 시약

Progesterone과 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin은 ethanol과 propylene glycol이 1 : 1로 섞인 용액을 vehicle로 사용하여 각각 2 mg/ml과 10 mM이 되도록 stock solution을 만들었다. Chymotrypsin의 저해제인 TPCK와 trypsin의 저해제인 TLCK는 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 40 mM이 되도록 조절한 것을 stock solution으로 하였다. 이들 시약을 실험군의 배양액에 해당농도가 되도록 적절히 넣었으며 이때 vehicle의 농도는 0.25%를 넘지않도록 하였다. 이 농도의 vehicle은 난자의 상태에 아무 영향을 미치지 않는다는 것을 예비실험에서 확인하였다. Trypsin은 AR용액에 직접 녹여 400 μ g/ml을 만든 다음 차례로 희석하여(0.04-400 μ g/ml) 분주해 놓은 후 -40°C에 보관하면서 필요에 따라 직접 배양액에 해당농도가 되도록 첨가하였다. 위의 모든 시약은 Sigma로부터 구입하였다.

Progesterone radioimmunoassay (RIA)

여포에 축적된 progesterone을 측정하기 위하여 radioimmunoassay법을 사용하였다. 일정기간 배양이 끝난 여포에서 methanol로 steroid를 추출한

다음 통상적인 방법에 따라 steroid RIA를 수행하였다(Lin and Schuetz, 1985). Progesterone의 antiserum은 한양대 윤용달 교수로부터 기증을 받았으며 개구리 여포의 steroid assay에 대한 제반 조건과 효용성(validation)등의 확인은 진보에 자세히 기술한 바 있다(Kwon and Schuetz, 1986; Kwon *et al.*, 1988; Kwon *et al.*, 1989a, b). 호르몬 농도의 계산은 SecuRIA program (Packard)을 사용하여 개인용 Computer로 구하였으며, 본 방법에 의한 실험내(intraassay)와 실험간(interassay)의 변이계수는 각각 7.4%와 11.7%이었다.

통계처리

실험군의 핵붕괴율을 대조군과 비교할 때에는 개체당 평균 붕괴율값을 angular transformation으로 전환한 후 Student's t-test로 유의성을 검정하였으며 50%의 붕괴율을 나타내는 시간을 구할 때에는 probit analysis를 사용하였다.

결과

TPCK의 성숙유도효과

Chymotrypsin의 저해제인 TPCK가 범개구리(*Rana pipiens*)의 난자성숙을 유도한다는 보고가 있었으므로(Ishikawa *et al.*, 1989) 먼저 북방산개구리의 여포난자들도 이 시약에 반응하는지를 조사하였다. 여포들을 여러농도($10^{-5} - 10^2 \mu M$)의 TPCK를 포함한 배양액에서 24시간 배양한 후 성숙율(핵붕괴율)을 조사하였다(Fig. 1). 배양액내의 TPCK는 매우 광범위한 농도구간에서($10^{-4} - 10 \mu M$) 호르몬(progesterone)의 도움없이도 난자의 핵붕괴를 유도하였다. 이는 아무 처리를 하지 않은 대조군의 여포난자들이 11%만이 핵붕괴를 일으킨 것과 비교하여 매우 유의하게($p < 0.01$) 성숙을 촉진했다는 것을 의미한다. 그러나 TPCK에 의한 성숙율(약 60%)은 양성대조군인 progesterone의 자극에 의한 것(96%)보다는 매우 낮았다.

난자의 성숙유도과정의 첫단계가 cAMP의 농

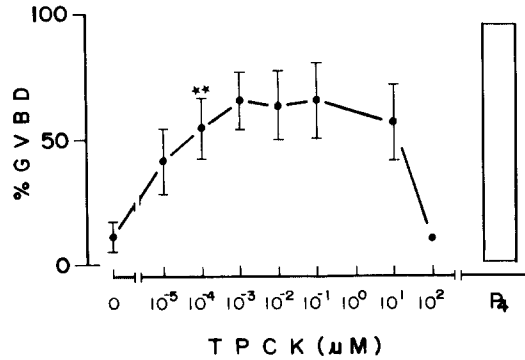


Fig. 1. Dose response of TPCK to induce oocyte maturation of *R. dybowskii* *in vitro*. Isolated follicles were cultured in the continuous presence of TPCK at various concentrations and their GVBD were examined after 24 hour of culture. Each point in the figure represents average % GVBD(mean ± SEM) of 160-200 follicles(well duplicate/animal, 4-5 animals). ** $p < 0.01$.

도저하이므로(Finidori-Lepicard *et al.*, 1983) TPCK에 의한 성숙유도가 cAMP와 관계가 있는지를 조사하였다. Fig. 2에서 보여주듯이 TPCK(1 nM)에 의해 유도된 난자의 성숙은 forskolin(9 μM)에 의해 억제 되었으며($p < 0.01$) 그 억제작용이 호르몬(progesterone)에 의해 유도된 것과 거의 같았다(Fig. 2). 따라서 TPCK의 유도과정은 cAMP 농도의 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

TPCK의 자극에 의한 핵붕괴가 배양 후 몇 시간에 일어나는지를 조사하였다. 본 실험을 시행한 시기는 대부분의 여포난자들이 자발적성숙을 일으키는 시기였으므로 TPCK가 자발적성숙을 일으키는 난자의 핵붕괴 시간경로에 미치는 영향을 조사하였다. 아무 처리를 받지 않은 대조군의 난자들이 50%의 핵붕괴를 일으키는데 요하는 시간이 약 22시간(ED50, 22시간)인데 대해 TPCK(1 nM)를 처리받은 난자들은 약 18시간에 난자의 반이 핵붕괴를 일으키었다(ED50, 18시간). 이에 대해 progesterone을 처리받은 난자들의 ED50는 약 12시간이었다(결과 표시하지 않음). 본 결과로부터 TPCK처리가 자발적 성숙을 일으키는 난자의 성숙기간을 단축시킨다는 것을 알 수 있었다.

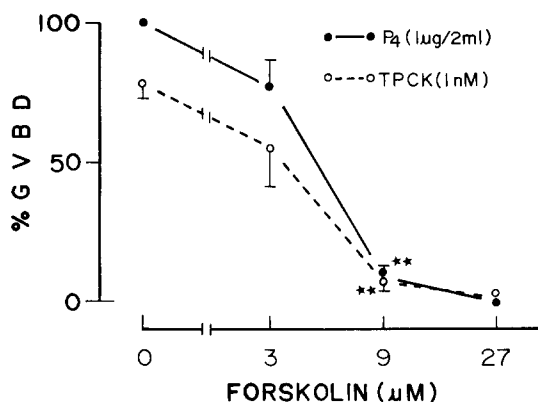


Fig. 2. Inhibitory effect of forskolin on the TPCK induced oocyte maturation of *R. dybowskii* *in vitro*. Follicles were cultured in the continuous presence of TPCK (1 nM) or progesterone (P₄) (1 μg/2 ml) and various concentrations of forskolin (0-27 μM) for 24 hour. After culture, their oocyte GVBD were examined. Each point in the figure represents average % GVBD (mean ± SEM) of 120 follicles (3 animals). ** p < 0.01.

TPCK의 성숙억제 효과

대부분의 경우 단백질 분해효소들의 활성을 억제하면 난자의 성숙이 역시 억제되는 것으로 알려져 있다 (Sano and Kanatani, 1983; Hashimoto *et al.*, 1988). 본 실험은 난자의 성숙을 유도하지 않는 비교적 높은 농도의 (> 10 μM) TPCK가 호르몬에 의해 유도된 난자의 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. 배양액내에 TPCK의 농도가 50 μM 이상이 되면 progesterone에 의한 난자의 성숙을 오히려 억제하는 것을 알 수 있었다 (p < 0.01) (Fig. 3). 자발적 성숙을 일으키는 난자를 사용하여 TPCK의 효과를 같은 방법으로 조사하여 보았다. 아무처리를 하지 않은 대조군에서도 90%에 가까운 난자들이 핵붕괴를 일으킨 것은 자발적 성숙을 일으킨 것을 의미한다 (Fig. 4). 이곳에 비교적 높은 농도의 TPCK (50-100 μM)를 처리하면 이 성숙율이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 더욱이 이들 여포난자들에 progesterone이나 FPH를 첨가해 주어도 TPCK의 억제작용으로부터 벗어나지 못하고 거의 같은 억제폭선을 보여 주고 있다 (Fig. 4).

이러한 결과들을 종합해보면 TPCK는 낮은 농

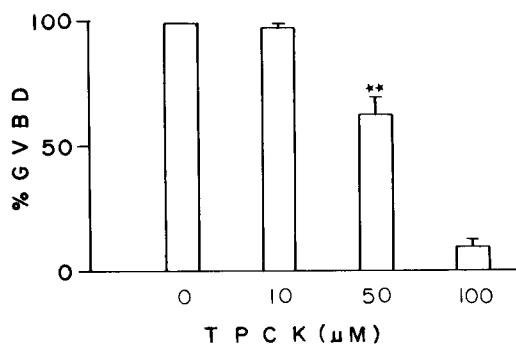


Fig. 3. Inhibitory effect of TPCK on the spontaneous maturation of *R. dybowskii* oocytes *in vitro*. Follicles exhibiting spontaneous maturation were cultured in the presence or absence of various doses of TPCK without hormone stimulation and examined for their GVBD after 24 hour of culture. Each bar in the figure represents average (mean ± SEM) % GVBD of 160 follicles (4 animals).

** p < 0.01

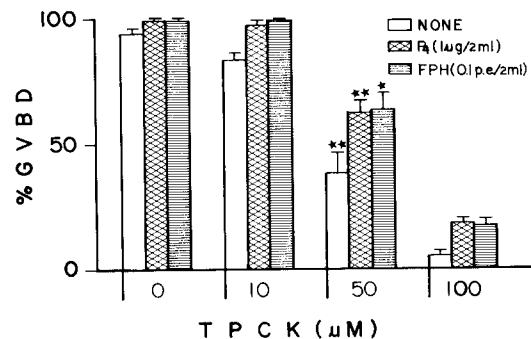


Fig. 4. Effect of hormone addition on the inhibitory action of TPCK on spontaneous maturation. Follicles exhibiting spontaneous maturation were cultured in the medium containing TPCK (10-100 μM) with or without supplement of hormone (progesterone or FPH) and examined for their GVBD after 24 hour of culture. Each bar in the figure represents average (mean ± SEM) % GVBD of 120 follicles (3 animals).

* p < 0.05.

** p < 0.01.

도에서는 난자의 성숙을 유도할 수 있고 높은 농도에서는 이 효과가 없을 뿐 아니라 오히려 호르몬에 의해 유도된 난자의 성숙을 억제하는 이중적인 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

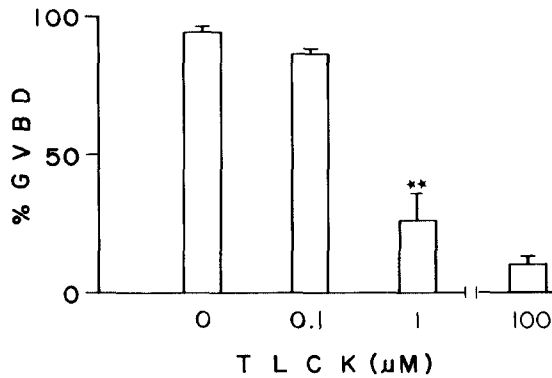


Fig. 5. Inhibitory effect of TLCK on the progesterone induced oocyte maturation of *R. dybowskii* *in vitro*. Isolated follicles were cultured in the medium containing progesterone (1 μg/2 ml) and various concentration of TLCK (0-100 μM) for 24 hours. After culture their GVBD were examined. Each bar in the figure represents average % GVBD of 120 follicles(3 animals). ** p < 0.01.

TLCK의 성숙 억제효과

Trypsin의 저해제인 TLCK가 난자의 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. 예비실험에서 TLCK를 단독으로 처리했을 경우 난자의 성숙유도를 전혀 알 수 없음을 알았다. 따라서 TLCK가 호르몬에 의해 유도된 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. 배양액의 TLCK는 1 μM의 농도에서부터 유의하게(p < 0.01) progesterone에 의해 유도된 난자의 성숙을 억제하였다(Fig. 5). TLCK의 억제효과를 자발적인 성숙을 일으키는 여포난자들을 재료로 역시 조사하여 보았다. 자발적 성숙을 일으키는 난자들도 TLCK에 의해 억제되었으나 정상적인 것이 1 μM에서 억제되는데 반하여 100 μM 이상에서야 유의한 억제효과가 나타났다(Fig. 6). 더우기 이 농도에서는 호르몬을 처리한 구간에서는 부분적으로 억제에서 풀리는 경향을 보여주고 있다. 그러나 500 μM에서는 전혀 호르몬의 영향을 받지 않았다(Fig. 6).

Trypsin의 성숙유도효과

Trypsin의 저해제인 TLCK가 난자의 성숙을 억제한다면 이 효소를 직접 처리하여 활성을 높이면 성숙유도를 할 가능성이 있다고 판단되었다. 이를 조사하기 위하여 배양액에 여러 농도(0.001

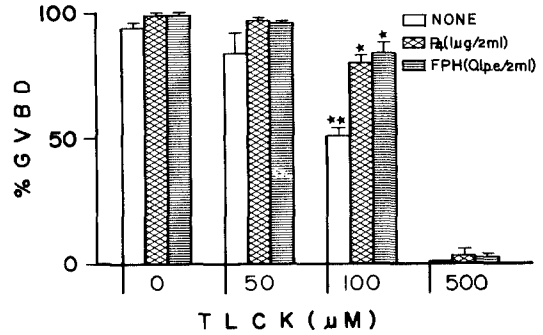


Fig. 6. Inhibitory effect of TLCK on the spontaneous maturation of *R. dybowskii* oocytes *in vitro*. Follicles exhibiting spontaneous maturation were cultured in the presence of various doses of TLCK(0-500 μM) with or without supplement of hormones (progesterone or FPH) and examined for their GVBD after 24 hour of culture. Each bar in the figure represents average % GVBD of 120 follicles (3 animals). * p < 0.05 ** p < 0.01.

–1 μg/2 ml)의 trypsin을 처리한 후 여포난자들을 배양하여 보았다. Fig. 7에서 보여주듯이 trypsin은 농도에 의존하여 호르몬의 도움없이도 0.01 μg/2 ml에서부터 유의하게 난자의 성숙을 유도할 수 있었다(p < 0.01). 이와 같이 외부에서 첨가된 trypsin이 난자의 성숙재개를 유도할 수 있다는 것은 난자막과 작용하여 신호전달체계(signal transduction pathway)를 활성화시켰다는 것을 시사해주고 있다.

TPCK와 TLCK의 억제효과기간

TPCK와 TLCK가 난자들의 성숙과정에서 어느기간에 억제효과를 나타내는지를 조사하기 위하여 난자들을 배양시작 후 일정시간 간격으로 TPCK(100 μM)와 TLCK(500 μM)를 첨가한 후 24시간 까지 배양하여 보았다. 본 실험에 사용된 여포들은 자발적 성숙을 일으키는 것들로서 50%의 핵붕괴를 일으키는데 아무 처리를 하지 않은 대조군에서는 약 16시간 걸리었다. 그림 8에서 보여 주듯이 TLCK는 배양 개시후 약 5시간 후에 첨가했을 때 50%의 난자가 억제효과에서 풀리는데 대하여 TPCK는 약 7시간이 지난 후에야 같은 정도로(50%) 풀리었다(Fig. 8). 이 결과는 두 억

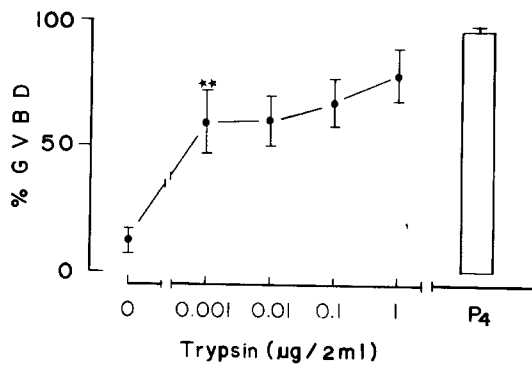


Fig. 7. Induction of oocyte maturation of *R. dybowskii* by trypsin *in vitro*. Isolated follicles were cultured in the continuous presence of trypsin at various concentrations (0-1 μ g/2 ml) and examined for their GVBD after 24 hour of culture. Each point in the figure represents average % GVBD of 240 follicles(6 animals).
** $p < 0.01$.

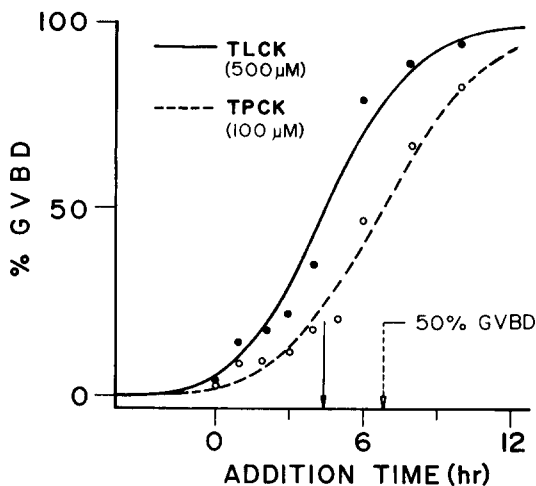


Fig. 8. Time course of TPCK and TLCK action on the spontaneous maturation of *R. dybowskii* oocytes *in vitro*. Follicles were cultured without exogenous hormone and TPCK or TLCK were added at designated time point and cultured for up 24 hours. Oocyte GVBD were examined after culture. Each point in the figure represents average % GVBD of 120 follicles (3 animals).

제제의 효과기간이 난자성숙의 비교적 초기단계에 있다는 것을 보여주고 있다. Progesterone에 의해 유도된 난자성숙의 경우에도 같은 경향을 보여주고 있다. 즉 progesterone에 의해 성숙된 난자들의 ED50가 9시간인 경우 TLCK를 첨가한 시

간이 배양시작 후 3시간 후에 50% 이상의 난자들이 억제에서 벗어나며 TPCK의 경우 6시간에서 같은 정도로 풀려났다(결과 표시하지 않음). 이것도 역시 TLCK의 효과기간이 TPCK의 효과기간 보다 빠르며 성숙의 초기단계에 그 효과가 있음을 보여주고 있다. 이 결과들은 단백질 분해효소들이 난자성숙과정에서 MPF의 합성과 밀접한 관계가 있다는 것을 시사해주고 있다.

TPCK와 TLCK가 여포의 progesterone 생성에 미치는 효과

비하수체호르몬의 자극을 받은 여포의 progesterone 생성에 효소저해제들이 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. 예비실험에서 이 저해제들 단독으로는 호르몬의 생성을 촉진하지 못한다는 것을 확인한 바 있으므로 성숙을 억제하는 농도의 TPCK(100 μ M) 혹은 TLCK(500 μ M)를 FPH (0.1 pituitary equivalent / 2 ml)와 동시에 첨가한 후 4시간 까지 배양하여 보았다. 배양 후 2시간과 4시간에 여포내 축적된 progesterone을 추출하여 농도를 측정할 결과 TLCK나 TPCK 모두 유의하게 ($p < 0.05$) FPH에 의해 자극된 progesterone의 생성을 억제함을 알았다(Table 1). 이 결과는 단백질 분해효소들이 여포세포에도 존재하며 호르몬의 생성조절에 관여할 가능성이 있다는 것을 보여주고 있다. 그러나 상대적으로 매우 높은 농도의 progesterone(1 μ g / 2 ml)에 의해 유도된 난자의 성숙을 이들 시약들이 억제하는 것으로 보아 이들이 호르몬의 생성을 통하여 난자의 성숙을 억제했다고는 볼 수 없겠다.

고 찰

본 실험의 결과들은 양서류에서 난자에 내재해 있는 chymotrypsin이나 trypsin 같은 단백질 분해효소들이 난자의 성숙조절(억제기작 혹은 개시시작)에 참여한다는 것을 보여주고 있다. 특히 chymotrypsin의 저해제인 TPCK가 사용한 농도에 따라 난자의 성숙을 촉진하기도 하고 억제하기도 하는 이중적인 작용을 하는 것은 이 효소의 활성 정도가 난자내 정교한 조절기구와 밀접한 연관이

Table 1. Effect of TPCK and TLCK on the progesterone accumulation by the ovarian follicles stimulated with FPH *in vitro*.

Inhibitor	FPH (0.05 pit. equiv./ml)	concentration of progesterone (pg/follicle)		
		culture hour		
		0	2	4
none	+	147 ± 6	786 ± 42	523 ± 6
TPCK(100 μM)	+	〃	90 ± 8*	70 ± 17*
TLCK(500 μM)	+	〃	256 ± 70*	143 ± 10*

Isolated follicles were divided into three groups and cultured for 2 or 4 hours in the simultaneous presence of FPH and TPCK or TLCK. After culture, intrafollicular progesterone level was measured by steroid RIA. The data represent pg progesterone per follicle (mean ± SEM) (n = 4, well duplicate, assay duplicate).

* p < 0.05.

있음을 보여주고 있다. Trypsin을 여포난자에 직접 처리했을 때 난자의 성숙을 유도한 사실은 (Fig. 7) 우리가 아는 한 양서류에서는 처음으로 보고되는 것으로 세포막에 존재하는 신호전달체계를 단백질 분해효소가 자극할 수 있다는 것을 보여주고 있다. Chymotrypsin을 광범위한 농도 구간을 사용해 조사했어도 이러한 유도능력이 없었다는 것(결과표시하지 않음)과 trypsin의 저해제인 TLCK가 강한 성숙억제효과를 나타냈다는 것을 고려하면 trypsin의 성숙유도작용은 특이성 (specificity)을 지니고 있는 것으로 보여진다.

본 실험에 사용한 북방산개구리의 여포는 다른 양서류와 달리 생체의 배양에서 자발적 성숙을 일으키는 빈도가 매우 크며 계절에 따라 성숙에 요하는 배양기간 까지 변하는 특이한 성질을 가지고 있다(Kwon *et al.*, 1989b). 따라서 본 연구에서는 모든 실험계획을 자발적 성숙을 일으키는 것과 정상적으로 호르몬의 자극을 요하는 여포난자들로 구분하여 시행하였다. 그러나 근본적으로 효소의 억제제들에 대한 반응은 같은 것으로 나타났다 (Figs. 4, 6). 즉 자발적 성숙도 호르몬에 의한 것처럼 TPCK나 TLCK에 의해 성숙이 억제되고 이것이 호르몬의 첨가로 억제가 풀리지도 않았다. 이러한 결과는 자발적 성숙을 일으키는 난자들이 정상적인 것에 비해 성숙유도자극(호르몬 등에 의한)에 보다 민감하나 근본적인 성숙기작은 같

다는 것(Kwon *et al.*, 1989b)을 뒷받침하는 것이다. 또한 근래에 본 실험실에서 난자 내, 외에 단 순히 cAMP 농도를 조절함으로써 북방산개구리의 난자성숙을 유도한 바 있는데 이 사실 또한 다른 종에 비해 이들 여포난자들이 외부자극에 보다 민감하다는 것을 보여주는 것이다(Kwon *et al.*, 1989a). 따라서 북방산개구리의 여포는 난자의 성숙조절과정을 밝히는데 좋은 재료로 사용될 수 있음을 다시한번 확인할 수 있었다.

TLCK의 억제작용이 TPCK의 작용보다 2-3시간 일찍 풀리는 현상(Figs. 8, 9) 두 종류의 단백질 분해효소들의(chymotrypsin과 trypsin) 작용시간이 다르다는 것을 보여주는 것이며 비교적 성숙초기에 영향을 미치므로 MPF의 생성이나 활성화과정과 관련이 있다는 것을 시사하는 것 같다. 단백질 분해효소들이 난자의 성숙과 관련이 있을 것이라는 추측은 척추동물은 물론 일부의 무척추동물에서 이미 오래전에 시사된 바 있다 (Peaucellier, 1977; Kishimoto *et al.*, 1982; Sano and Kanatani, 1983). 양서류의 난자에서는 이러한 효소들과 이들의 억제제들이 실제 존재함이 밝혀진 바도 있다(Slaughter and Triplett, 1975; 1976). 근래에는 포유동물의 난자성숙을 TLCK가 억제한다는 보고도 있었다(Hashimoto *et al.*, 1988). Ishikawa 등은 (1989) TPCK가 개구리난자의 성숙을 유도할 수 있음을 처음으로 보

고한 바 있는데 그들은 난자들을 단시간 동안 이 시약에 노출시킬 때에만 효과가 있었다고 주장하였다. 본 실험에서는 낮은 농도의 TPCK에 계속 노출시켰을 때에도 효율적으로 성숙유도를 시킬 수 있었는데(Fig. 1), 이는 아마도 종간의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 이제까지 단백질 분해효소가 난자의 성숙조절기작에 참여한다는 간접적인 증거는 많이 제시된 바 있으나 실제 이러한 효소들이 세포질내의 반응경로에 어떻게 참여하는 지에 대해서는 거의 알려진 바 없다.

양서류에서 난자의 성숙개시는 progesterone이 난자막의 수용체와 결합하면서 부터 시작된다. 이 결합은 난자막에 존재하는 adenylate cyclase의 활성을 억제하며 cAMP의 농도를 낮추게 되고 동시에 Ca^{2+} ion의 농도를 증가시키며 이것들이 인접한 효소계를 활성화시켜 MPF의 생성으로 연결이 된다. MPF의 생성과 활성화가 이루어지면 이것이 결국 난자의 핵붕괴를 유도하게 되고 극체의 방출에 이르는 성숙과정을 완료시키게 된다(Maller, 1983; Schuetz, 1985; Morrill and Kostellow, 1986; Eckberg, 1988).

근래에 이러한 호르몬의 신호전달체계에 phosphatidyl inositol turnover system(PI system)이 참여한다는 증거가 많이 제시되고 있다. 세포내 Ca^{2+} ion과 연관된 이 system은 외부 자극에 의해 막성인 phosphoinositide가 분해가 되면 이 분해산물이 제 2 전달자로 작용하여 일련의 생화학적 경로를 활성화시킨다는 것이다(Nishizuka, 1984). 이 분해산물의 하나가 diacylglycerol(DAG)이며 이것이 calcium에 의존하는 protein kinase C(PKC)를 자극하고 PKC는 어떤 단백질들을 인산화시키며 인산화된 단백질의 일부가 MPF의 생성에 결정적인 역할을 한다고 믿어지고 있다(Eckberg, 1988). 이 경로는 PKC를 간접적으로 활성화시키면 난자의 성숙을 유도할 수 있다는 많은 보고들에 의해 뒷받침되고 있다(Stith and Maller, 1987; Kleis-San Francisco and Schuetz, 1989). 호르몬에 의해 유도된 난자의 성숙과정에 adenylate cyclase system과 PI system이 중요한 경로 역할을 할 것으로 보여 짐으로, 단백질 분해효소들이 위의 어느 한 효소계의 작용과 밀접한 관계가 있을 가능성이 크다고

보겠다. Hanoune 등은 (1983) 여러 종류의 세포에서 단백질 분해효소들이 adenylate cyclase의 활성을 촉진한다는 것을 발견한 바 있다. 이는 난자내 cAMP의 농도가 단백질 분해효소에 의해 영향을 받을 수도 있음을 말해주는 것이다. 이러한 사실을 고려하면 본 실험에서 난자의 성숙을 유도한 TPCK나 trypsin 이 세포막의 adenylate cyclase를 통하여 성숙을 유발했을 가능성도 있다고 보겠다. 또 다른 가능성으로 단백질 분해효소들이 PI system에 연관되어 단백질들의 인산화-탈인산화 반응 등에 참여하는 것을 들 수 있겠다. 그러나 현재로서는 위의 가정을 뒷받침할만한 증거가 없다. 현재 본 실험에서는 단백질 분해효소에 의해 유도된 난자의 성숙과 호르몬에 의한 것을 여러 측면에서 비교하고 있으며 반응 경로에서 나타나는 세반 생화학적 변화를 추구하고 있다. 이러한 정보가 축적되면 단백질 분해효소들의 성숙유도기작과 그 생물학적 의미를 밝히는데 크게 도움이 되리라 생각된다.

인용문헌

- Eckberg, W. R., E. Z. Szuts, and A. G. Carroll, 1987. Protein kinase C activity, protein phosphorylation and germinal vesicle breakdown in spisula oocytes. *Dev. Biol.* **124**: 57-64.
- Eckberg, W. R., 1988. Intracellular signal transduction and amplification mechanisms in the regulation of oocyte maturation. *Biol. Bull.* **174**: 95-108.
- Finidori-Lepicard, J., S. Schorderet-Slatkine, J. Hanoune, and E. -E. Baulieu, 1983. Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **292**: 255-257.
- Hanoune, J., D. Stengel, and M. L. Lacombe, 1983. Proteolytic activation and solubilization of adenylate and guanylate cyclase. *Mol. Cell Endocrinol.* **31**: 21-41.
- Hashimoto, N., T. Kishimoto, and Y. Nagahama, 1988. Inhibition of LH induced and spontaneous meiotic maturation in mouse oocytes by N α -tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone. *J. Exp. Zool.* **247**: 177-182.
- Ishikawa, K., A. W. Schuetz, and S. K. San Francisco, 1989. Induction and inhibition of amphibian(*Rana pipiens*) oocyte maturation by protease inhibitor(TPCK). *Gamete Res.* **22**: 339-354.

- Kidhimoto, T., T. G. Clarke, H. K. Kondo, H. Shirai, and H. Kanatani, 1982. Inhibition of starfish oocyte maturation by some inhibitors of proteolytic enzymes. *Gamete Res* **5**: 11-18.
- Kleis-San Francisco, S. and A. W. Schuetz, 1989. Role of protein kinase C activation in oocyte maturation and steroidogenesis in ovarian follicles of *Rana pipiens*: Studies with phorbol 12-myristate 13 acetate. *Gamete Res* **21**: 323-334.
- Kwon, H. B. and A. W. Schuetz, 1986. Role of cAMP in modulating intrafollicular progesterone levels and oocyte maturation in amphibians (*Rana pipiens*). *Dev. Biol.* **117**: 354-364.
- Kwon, H. B., R. S. Ahn, J. Y. Kim, and Y. D. Yoon, 1988. Role of cAMP in the regulation of progesterone production and secretion of frog (*Rana dybowskii*) follicles *in vitro*, *Korean J. Zool.* **31**: 177-184.
- Kwon, H. B., H. J. Park, and A. W. Schuetz, 1989a. Induction and inhibition of meiotic maturation of amphibian (*Rana dybowskii*) follicular oocytes by forskolin and cAMP *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* (in press)
- Kwon, H. B., Y. K. Lim, M. J. Choi, and R. S. Ahn, 1989b. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* *in vitro*: Seasonal influences, progesterone production and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.* **252**: 190-199.
- Lin, Y-W. P. and A. W. Schuetz, 1985. Intrafollicular action of estrogen in regulating pituitary-induced ovarian progesterone synthesis and oocyte maturation in *Rana pipiens*: Temporal relationship and locus of action. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 421-435.
- Maller, J. L., 1983. Interaction of steroids with cyclic nucleotide system in amphibian oocytes. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**: 295-336.
- Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**: 185-281.
- Morrill, G. A. and A. B. Kostellow, 1986. The Role of Calcium in Meiosis. *In: Calcium and Cell Function* (Cheung, W. Y. ed.) Academic Science. New York Vol. 6., pp. 209-252.
- Nishizuka, Y., 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- Peaucellier, G., 1977. Inhibition of meiotic maturation by specific proteases in oocytes of the polychaete annelid *Sabellaria alveolata*. *Exp. Cell Res.* **106**: 1-4.
- Sano, K. and H. Kanatani, 1983. Effects of various protease inhibitors on starfish oocyte maturation. *Biomed. Res.* **4**: 139-146.
- Schuetz, A. W., 1985. Local Control Mechanisms During Oogenesis and Folliculogenesis. *In: Developmental Biology, Oogenesis* (Browder, L. W. ed.) Plenum Press, New York, Vol. 1. pp. 3-83.
- Slaughter, D. and Triplett, 1975. Amphibian embryo protease inhibitor. I. Isolation, purification and characterization. *Cell Differ.* **4**: 11-21.
- Slaughter, D. and Triplett, 1976. Amphibian embryo protease inhibitor. III. Binding studies on the trypsin inhibitor and properties of its yolk-bound form. *Cell Differ.* **4**: 429-440.
- Stith, B. J. and J. L. Maller, 1987. Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes by 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Exp. Cell Res.* **169**: 514-523.

(Accepted November 25, 1989)

**Induction and Inhibition of Amphibian(*Rana dybowskii*) Oocyte
Maturation by Proteolytic Enzymes *In Vitro*.**

Hyuk Bang Kwon, Sun Kun Ko* and Hyun Jeong Park (Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757; *Dept. of Biology, College of Honam.)

Fully grown amphibian oocytes undergo their maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD) during *in vitro* follicle culture when they are stimulated with frog pituitary homogenate (FPH) or progesterone. Present experiments were designed to determine whether proteolytic enzymes are involved in the regulation of the maturation process. Treatment of a α -chymotrypsin inhibitor, N α -tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl-ketone (TPCK) to the oocytes exhibited a biphasic phenomenon, the induction of the maturation without added hormone at relatively low doses (0.001-1 μ M) and inhibition of the hormone induced oocyte maturation at a high dose (100 μ M). Treatment of a trypsin inhibitor, N α -tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone (TLCK) to the oocytes did not induce the maturation, but rather suppressed the hormone induced oocyte maturation in a high dose (100 μ M). Treatment of exogenous trypsin to the oocyte induced their maturation without added hormone in a dose dependent manner (0.001-1 μ M).

The data presented here indicate that some proteolytic enzymes play a role in the regulation of the maturation (meiotic arrest or reinitiation) in amphibians.