

생쥐 난자와 초기배아의 렉틴 결합양상의 변화에 관한 연구

계명찬 · 전용필 · 전진현 · 윤용달 · 김해권* · 김문규

한양대학교 자연과학대학 생물학과, *서울여자대학교 자연과학대학 생물학과

생쥐의 배우자간 인식과 수란관과 난자의 상호작용을 연구하기 위하여 수정 전후의 난자와 배아에 형광으로 표지된 5가지 렉틴(UEA-I, LCA, PNA, RCA-I, GSL-I)을 처리하여 투명대, 위난강 그리고 원형질막에서 렉틴의 결합양상을 관찰하였다. 미수정난자 및 수정란의 투명대에는 UEA-I을 제외한 4가지 렉틴이 결합하였다. PNA, RCA-I, GSL-I은 투명대의 외층보다 내층에 강하게 결합되었고 UEA-I과 LCA는 투명대의 전층에서 미약하지만 고르게 결합하였다. 배란된 난자의 위난강은 LCA와 PNA에 의해 결합되었으며 UEA-I은 수정 이후부터, GSL-I은 2-세포기 이후부터 위난강에 결합하였다. 난구세포를 제거하고 체외성숙을 일으킨 난자의 위난강에는 5가지 렉틴 모두 결합하지 않았다. 난자와 배아의 원형질막은 PNA, RCA-I, GSL-I에 의해 결합되었고, LCA 및 UEA-I은 수정 이후부터 원형질막에 결합하였다.

이상의 결과에서 glucosamine, N-acetylgalactosamine 잔기를 함유한 물질이 난구세포에서 생성되어 위난강에 축적되며 배란 후부터 난자의 위난강내 탄수화물잔기는 수란관 내액의 영향을 받는 것으로 사료된다. 난자 투명대의 탄수화물잔기는 내층에 밀집되어 분포하는데 이는 정자의 투명대 관입 조절과 관련된 것으로 사료된다. 수정 후 난자의 원형질막 표면에 fucose와 mannose 등의 탄수화물 잔기가 새로이 노출되며 초기배아 발생동안 위난강에 존재하는 구조물의 렉틴 결합 특성이 유지되었다.

KEY WORDS: Mouse, Oocyte, Embryo, Extracellular matrix, Lectin

생쥐의 난자를 둘러싼 세포외기질(extracellular matrix, ECM)은 원형질막과 투명대 사이의 위난강(perivitelline space)내 구조물, 투명대(zona pellucida), 방사관세포(corona radiata)와 난구세포(cumulus cell)들 사이의 기질로 구성되며 다량의 탄수화물잔기를 함유하고 있다. 세포외기질내 탄수화물잔기의 조성은 수정시 배우자간의 인식기작과 초기발생, 부화(hatching)와 착상(implantation) 등의 현상에 밀접히 관련되어 있다.

수정시 정자와 난자간의 상호인식은 상대 배우자 세포표면에 존재하는 당단백질간의 상보적인 구조를 갖는 탄수화물잔기에 의해 매개된다(Macek and Shur, 1988; O'Rand, 1988).

생쥐 난자의 투명대는 ZP1, ZP2, ZP3 등 3가지 당단백질로 구성되어 있으며, 이중 ZP3는 정자의 수용체로 침체반응을 유도한다(Wassarman, 1992). 난구세포간 기질에는 배란직전 난구세포들로부터 합성 분비된 hyaluronic acid(Eppig, 1979)가 다량으로 존재하며 chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparin 등의 glycosaminoglycan(GAG)이 존재한다(Yanagishita *et al.*, 1979). GAG 계열의 물질들은 수정능력획득(capacitation)이나 침체반응(acrosome reaction) 등 수정에 필수적인 정자의 형태 및 생리적 변화를 조절한다(Handraw *et al.*, 1982; Lenz *et al.*, 1983; Parrish *et al.*, 1988). 수정 직후 피질반응(cortical reaction)이 일어나면 피질과립이 위난강내로 방출되며 난자의 원형질막은 피질

본 연구는 1992년도 교육부 기초과학육성 연구비 지원(BSRI-92-426)에 의한 것임.

막(cortical granule envelope)으로 전환된다. 이 때 피질과립내의 ovoperoxidase, proteinase 등의 효소는 투명대 당단백질을 변화시켜 정자의 투명대 결합 및 관입을 억제한다(Dandekar and Talbot, 1992). 이와 같은 일련의 변화는 다수정(polyspermy)을 방지하는 주요 기작으로 알려져 있다(Moller and Wassarman, 1989). 위난강은 정자와 난자의 원형질막이 융합하는 미세환경이 된다는 점에서 그 구조 및 물질적 특성이 중요성을 갖지만 최근에 연구되기 시작하여 몇종의 설치류(Dandekar and Talbot, 1992)와 사람(Dandekar *et al.*, 1992)에서 위난강의 미세구조가 보고되었다. 위난강내의 물질 조성은 수란관내액의 영향을 받는 것으로 알려져 있는데, 생쥐에서 WGA(wheat germ agglutinin)에 결합하는 MW 215 kd의 당단백질(Kapur and Johnson, 1985; 1986), 양에서 SOP 92(Gandolfi *et al.*, 1989), 소에서 발정기단백질(estrus-associated protein)(Wegner and Killian, 1991), 원숭이에서 수란관 내 특이단백질(Boice *et al.*, 1990)이 난자의 투명대와 위난강에서 발견되었다. 위난강내의 물질 조성은 제1극체(1st polar body) 방출로 위난강이 확장되는 시기에 난구세포로부터 분비되는 GAG와 난포액, 배란 후 수정전까지는 수란관액(oviducal fluid), 수정 이후에는 피질과립내의 물질들에 의해 변화될 것으로 추측된다. 그러나 이들 요인들에 의하여 난자의 세포외기질내 탄수화물간의 구조적, 생화학적 변화가 일어나는 정확한 시기와 결과에 관하여는 연구가 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 생쥐의 난자에서 성숙과 배란, 수정과 초기발생의 시기에 따른 세포외기질내 탄수화물간의 변화를 5가지 렉틴을 사용하여 조사하였으며, 이러한 변화의 원인 및 수정시 난자의 세포외기질과 정자와의 상호작용에 대하여 논의하였다.

재료 및 방법

난자의 채취

본 실험에서 사용한 동물은 ICR 계통 생쥐의 암컷으로 미성숙 난자를 얻기 위해서는 4주, 수정란 및 2-세포기의 배아를 얻기 위해서는 8주된 것을 각각 사용하였다. 미성숙난자는 PMSG 5iu를 복강내에 주사 후 48시간에 난포를 터트려 방출된 난자를 수확하였다. 체외성숙 난자는 PMSG 주사후 48시간에 난포를 터트려 수확한 난자를 hyaluronidase(0.1% in BWB) 용액에서 3분간 처리하여 난구세포를 제거한 후 배양액(BWB, 0.4% BSA)에 옮긴 후 배양기(95% Air, 5% CO₂, 37°C)에서 24시간 배양하여 성숙을 유도하였다. 배란된 성숙난자는 hCG 주사후 14시간에 수란관의 팽대부에서 난자-난구복합체 상태로 획득하였다. 수정란은 hCG 주사와 동시에 수컷과 동서시켜 18시간 후에, 2-세포기배아는 hCG 주사 후 42시간에 수란관내에서 수확하였다. 배란직전의 난포내 난자와 배란된 난자는 hyaluronidase로 1분간 처리한 후 남아있는 난구세포들은 flushing을 통해 기계적으로 제거하였다.

렉틴표지(lectin labeling)

위와 같이 수확한 난자들은 tetramethylrhodamine isothiocyanate(TRITC)로 표지된 5가지 렉틴(Vector Lab, Table 1)을 PBS에 적정농도(100-200 µg/ml)로 희석한 용액 50 µl에 10개씩 넣어 상온에서 10분간 처리하여 렉틴의 결합을 유발하였다. PBS로 1분씩 5회 세척하여 결합하지 않은 렉틴을 제거한 후 whole mounting하였다. 수분의 증발을 방지하기 위해 파라핀유로 밀봉한 표본을 제작한 후 형광현미경(Dialux 20, Leitz, N2 filter block) 하에서 관찰하였다. 한편 본 실험에 사용한 각각의 렉틴에 대해 특이적으로 결합하는 당류(Table 1)를 0.2 M 농도로 첨가한 용액내에서 난자를 처리하여 비특이적 렉틴결합의 정도

Table 1. Sugar specificity of the lectins used in this experiment

Lectin	Major Sugar Specification	Binding Inhibitor
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I (UEA-I)	α -L-fucose	α -L-fucose
<i>Lens culinaris</i> agglutinin (LCA)	α -D-mannose α -D-glucosamine	methyl α -D-mannopyranoside
<i>Ricinus communis</i> agglutinin-I (RCA-I)	β -D-galactose	β -lactose
Peanut agglutinin (PNA)	Gal β (1,3) GalNAc	β -lactose
<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin-I (GSL-I)	α -D-galactose	β -lactose

Table 2. The binding of TRITC-conjugated lectins, UEA-I, LCA, PNA, GSL-I, and RCA-I to mouse oocytes and early embryos

Lectin	Binding Site	Stage of Eggs				
		Follicular Oocyte	In Vitro Matured Oocyte	Ovulated Oocyte	Fertilized Egg	2-cell Embryo
UEA-I	ZP	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	PVS	X	-	-	+	++
	PM	-	-	-	+	+
LCA	ZP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	PVS	X	-	+++	+++	+++
	PM	+	++	++	+++	+++
PNA	ZP	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
	PVS	X	-	++	++	++
	PM	++	++	++	++	++
GSL-I	ZP	+/++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+
	PVS	X	-	-	-	+++
	PM	+	+	+	+	+
RCA-I	ZP	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+++/+++
	PVS	X	-	-	+	+
	PM	+	++	++	+++	++

ZP, zona pellucida (outer/inner layer); PVS, perivitelline space; PM, plasma membrane. Intensity of fluorescence is given as -, absent; +, faint; ++, moderate; +++, strong.

를 판별하였다.

결 과

각 렉틴에 특이적으로 결합하는 당류를 렉틴 용액에 첨가한 후 난자를 염색한 대조군에서 형광이 거의 나타나지 않는 것을 확인함으로써 렉틴결합이 탄수화물잔기에 대한 결합특이성을 나타낸다는 것을 알았다. 난자의 세포질내에서는

free fluorochrome에 의한 비특이적 염색을 나타내는 형광은 관찰되지 않았다. 난자와 배아에서 나타난 렉틴결합의 양상은 성숙도와 성숙이 일어난 환경 그리고 초기배아 발생시기에 따라 다르게 나타났다(Table 2).

배란된 난자와 수정 이후의 난자와 초기배아의 위난강에는 LCA(Figs. 3, 4, 5 and 11)와 PNA(Figs. 6 and 7)가 결합하였다. UEA-I은 수정 이후부터 위난강에 결합하였고(Fig. 1), GSL-I와 RCA-I는 2-세포기 이후부터 위란

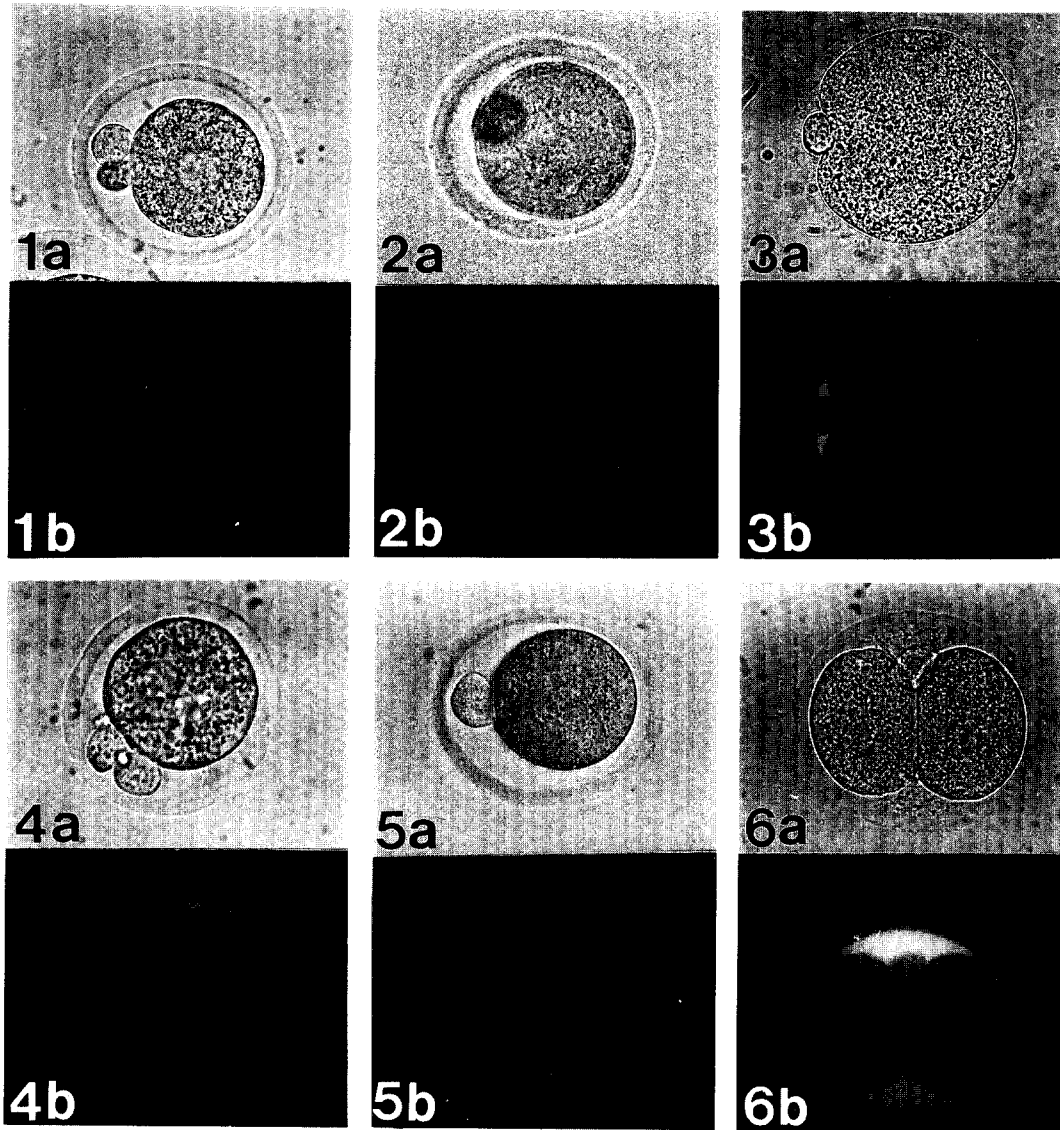


Fig. 1. Photograph of fertilized oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated UEA-I lectin (b). (400x) **Fig. 2.** Photograph of in vitro matured oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated LCA lectin (b). (400x) **Fig. 3.** Photograph of ovulated oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated LCA lectin (b). (400x) **Fig. 4.** Photograph of fertilized oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated LCA lectin (b). (400x) **Fig. 5.** Photograph of 2-cell embryo (a). Fluorescence photograph of the same embryo in (a) stained with TRITC conjugated LCA lectin (b). (400x) **Fig. 6.** Photograph of ovulated oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated PNA lectin (b). (400x)

강에 결합하였다(Fig. 9). 초기발생 중인 배아의 위란강은 렉틴에 의해 모두 결합되었다(Fig. 11). 난포내의 미성숙난자와 난구세포를 제거한 후 체외배양을 통해 성숙을 유도한 난자의 위란

강(Fig. 2)에는 어떤 렉틴도 결합하지 않았다. 배란직전의 난자(hCG 주사 후 11시간)를 hyaluronidase로 처리하여 난구세포를 제거한 후 염색한 경우 렉틴은 위란강내에 결합하지 않

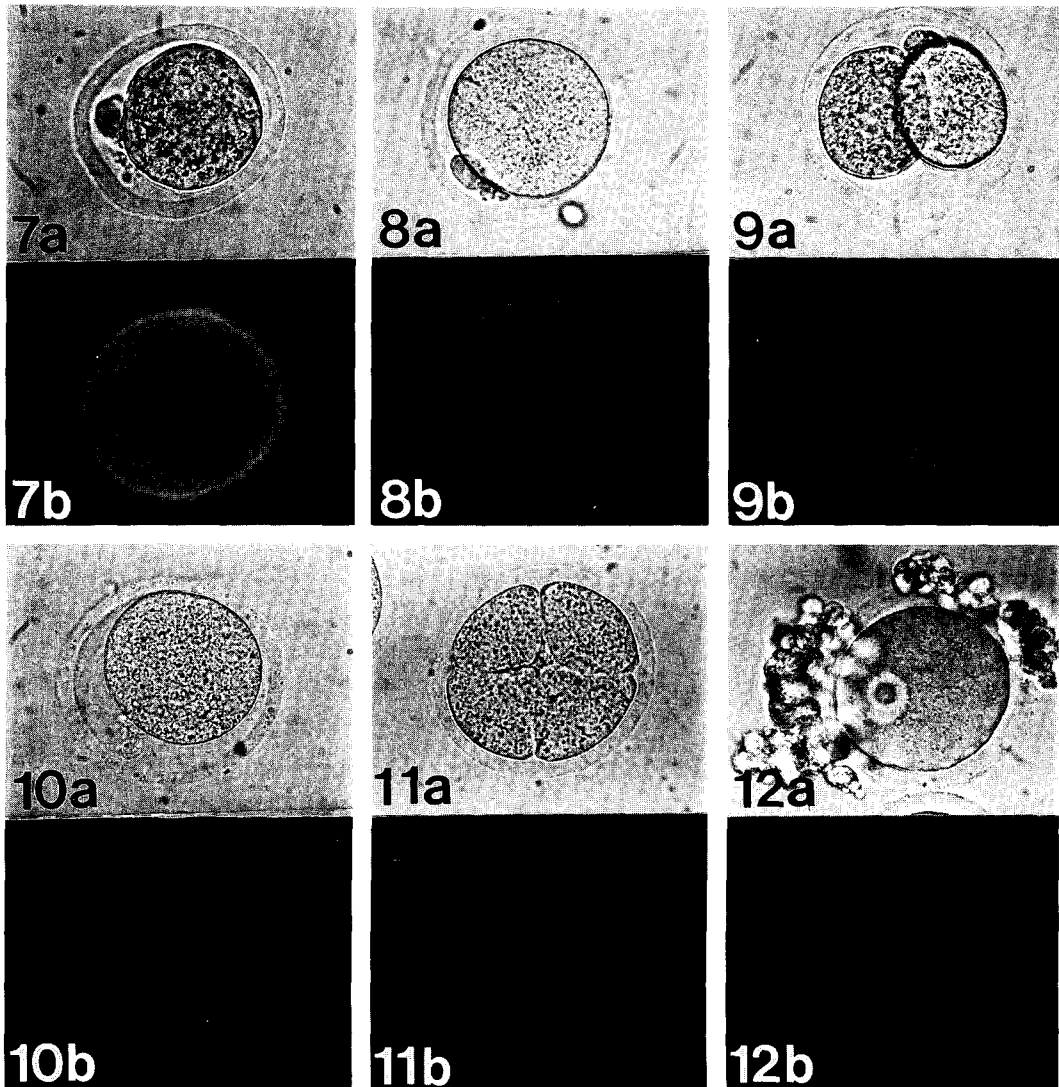


Fig. 7. Photograph of fertilized oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated PNA lectin (b). (400x) **Fig. 8.** Photograph of ovulated oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated GSL-I lectin (b). (400x) **Fig. 9.** Photograph of 2-cell embryo (a). Fluorescence photograph of the same embryo in (a) stained with TRITC conjugated GSL-I lectin (b). (400x) **Fig. 10.** Photograph of ovulated oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated RCA-I lectin (b). (400x) **Fig. 11.** Photograph of 4-cell embryo (a). Fluorescence photograph of the same embryo in 9a) stained with TRITC conjugated LCA lectin (b). (400x) **Fig. 12.** Photograph of immature oocyte (a). Fluorescence photograph of the same oocyte in (a) stained with TRITC conjugated LCA lectin (b). (400x)

았다.

각 시기의 난자와 배아의 투명대는 4종의 렉틴 (LCA, RCA-I, PNA, GSL-I)에 의해 결합되었다. PNA, GSL-I, RCA-I은 투명대의 내층

에 강하게 결합하였다(Figs. 6, 7, 8, 9 and 10). UEA-I과 LCA는 투명대의 내층과 외층에서 미약하지만 고르게 결합하였다(Figs. 1, 2, 3, 4 and 5).

PNA(Figs. 6 and 7), RCA-I(Figs. 10), GSL-I(Figs. 8 and 9)은 난자와 배아의 원형질막에 모두 결합하였다. UEA-I(Fig. 1)와 LCA(Figs. 4, 5 and 11)는 수정 이후부터 배아의 원형질막에 결합하였다(Fig. 1).

난자 주위의 난구세포간기질에는 사용된 렉틴이 모두 강하게 결합하였다(Fig. 12).

고 찰

본 실험 결과로 난자의 원형질막 표면과 세포외기질내 탄수화물의 잔기는 난자의 성숙과 배란, 수정과 초기발생 기간 동안에 변화를 거친다는 것을 알았다. 수란관 내벽에 UEA-I에 의해 결합되는 fucose잔기는 희박한 반면 LCA에 의해 결합되는 mannose잔기는 다량으로 분포하는 것으로 보고되었고(Gye *et al.*, 1993b), 본 실험의 결과 LCA는 배란된 난자의 위난강에서 나타나는 것으로 관찰되었다. 이는 배란된 난자의 위난강내에 확산되어 들어온 수란관내액의 영향으로 위난강내 구조물의 탄수화물잔기에 변화가 일어나는 것으로 사료된다. 난포액에는 여러종의 GAG가 존재하며 난구복합체간 기질에는 hyaluronic acid 이외에도 chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparin 등의 GAG가 존재하여(Yanagishita *et al.*, 1979; Eppig, 1979; Grime *et al.*, 1984) 정자의 수정능력획득과 침체반응을 조절한다(Handraw *et al.*, 1982). 본 실험의 결과 배란된 난자의 위난강내에는 LCA와 결합하는 mannose와 glucosamine, PNA가 결합하는 *N*-acetylgalactosamine(GlcNAc) 등의 탄수화물잔기가 다량 존재하는 것으로 사료된다. 이와 같은 위난강내의 탄수화물조성은 난구세포간기질의 탄수화물 조성과 일치한다. 세포외기질을 보존하기 위해 ruthenium red로 처리하여 고정한 미수정 난자의 위난강에는 과립성 및 섬유상의 물질이 망상구조로 존재하며, 과립성물질은 trypsin 처리에 의해, 섬유상의 구조물은 hyaluronidase 처리에 의해 감소되는 것으로

보고되었다(Dandekar and Talbot, 1992; Dandekar *et al.*, 1992). 본 실험에서 난구세포를 제거한 후 체외배양을 통해 성숙을 유도한 난자의 위난강에는 사용된 렉틴 모두 결합하지 않았다. 이는 난자의 성숙과정 중 난구세포와 방사관세포들로부터 합성되어 위난강내로 분비된 hyaluronic acid를 주로하는 GAG계열의 물질이 위난강내에 축적되는 것으로 사료된다. Hyaluronic acid는 체세포에서 식세포작용, 근세포의 융합등과 같은 원형질막 융합을 조절한다(for review, Laurent and Fraser, 1992). 위난강은 수정시 투명대를 관입해 위난강내로 진입한 정자가 난자의 원형질막과 융합하는 미세환경이 되므로 hyaluronic acid를 함유한 위난강의 물질은 배우자간의 융합에 조절작용을 할 것으로 추측된다. 생쥐의 체외수정시 hyaluronidase inhibitor인 sodium aurothiomalate는 투명대관입 이후 단계에서 수정을 억제하여 배우자간의 원형질막 융합에 정자의 hyaluronidase가 작용하는 것으로 보고되었다(Gye *et al.*, 1993a). 따라서 난자의 성숙과정에서 생성되어 위난강내에 존재하는 다량의 탄수화물잔기를 갖는 물질은 투명대를 관입한 정자가 난자의 원형질막과 융합하는 것을 억제하거나 위난강내에서 정자의 자유로운 이동을 억제하는 물리적 장애물로 작용할 것으로 사료된다.

수정과 초기발생의 환경이 되는 수란관내액은 발정주기 동안 그 양 및 단백질의 조성이 특이하게 변화한다(cow: Killian *et al.*, 1989; sheep: Sutton *et al.*, 1984; Gerena and Killian, 1990). 생쥐의 수란관은 배아의 유무에 관계없이 발정기 특이단백질(estrus specific protein)을 합성 분비한다(Neider and Macon, 1987). 수란관 특이단백질이 난자의 투명대(Wegner and Killian, 1991)와 위난강(Kapur and Johnson, 1985, 1986; Boice *et al.*, 1990)에 결합하는 것으로 보고되었다. 본 실험에서 짧은 시간동안 hyaluronidase를 처리한 후 관찰한 배란직전 난자의 위난강에는 렉틴이 결합하지 않은 반면 배란된 난자의 위난강에서는 LCA, PNA 등의 렉틴이 결합하였다

(Table 2). 이의 원인으로는 첫째, 배란 이후 위난강 구조가 배란전 보다 hyaluronidase 처리에 대한 저항성이 증가되거나, 둘째, 다양한 탄수화물잔기를 갖는 수란관내액의 물질이 투명대를 통해 확산되어 위난강내에 결합하였거나, 셋째, 수란관내액에 존재하는 protease 또는 glycosidase 등의 작용으로 위난강내 구조물의 당단백질과 GAG성분의 탄수화물잔기가 변화된 것으로 사료된다. 한편 수정 이후 8-세포기까지 위난강에 대한 UEA-I, GSL-I 등의 결합 양상은 유지 또는 증가되는 것으로 나타났다. 이 결과는 이 시기의 배아 및 수란관에서 물질분비가 증가되어 일어난 결과로 사료되며 이들 물질에 존재하는 fucose와 galactose 등의 탄수화물잔기는 이 시기의 수란관액과 배아와의 상호작용에 관여할 것으로 사료된다.

햅스터(Oikawa *et al.*, 1988)와 돼지(Hedrick *et al.*, 1987)에서 *N*-acetylglucosamine 잔기에 결합하는 특성을 지닌 *Banderaea simplicifolia* lectin-I이 배란된 난자의 투명대에서 배란전 난자보다 강하게 결합하는 것으로 보고되었다. 양의 수란관내에서 합성된 단백질(SOP 92)(Gandolfi *et al.*, 1989)과 햅스터의 수란관내에 존재하는 특정항원(oviductin)이 배란된 난자의 투명대에서 발견되었으며(Leveille *et al.*, 1987; Kan *et al.*, 1990; Robitaille *et al.*, 1988), 체외에서 수정된 난자의 투명대에서 발견되지 않는 당단백질이 체내에서 수정된 난자의 투명대에서 발견되었다(Brown *et al.*, 1990). 배란된 난자의 투명대에서 배란전에는 발견되지 않던 새로운 당단백질이 발견되었다. WGA와 sWGA(Nicolson *et al.*, 1975) 그리고 PNA, RCA-I, sWGA(Shalgi *et al.*, 1991) 등의 렉틴이 쥐 난자의 투명대에 결합하는 정도에는 투명대 외층과 내층간에 차이가 있는 것으로 보고되었다. 본 실험에서 생쥐 난자의 투명대에 결합하는 PNA, RCA, GSL-I 등의 렉틴은 투명대의 외층보다 내층에 강하게 결합하는 것으로 나타났다. 이들 렉틴은 공통적으로 galactose 잔기에 결합함으로써 galactose 잔기의 분포가 투

명대의 내층에 더 집중되어 있다는 것을 알 수 있었다. 한편 fucose 잔기에 결합하는 특성을 지닌 UEA-I과 mannose 잔기에 결합하는 LCA는 미수정 난자의 원형질막에는 결합하지 않았으나 수정 이후부터 배아의 원형질막에 결합하였다. RCA-I 등의 렉틴도 수정난 이후의 배아의 원형질막에 보다 강하게 결합하였다. 이는 다음과 같은 세가지의 가능성으로 설명할 수 있다. 첫째, 수정 직후 일어난 피질반응으로 인해 난자의 원형질막이 세포질내의 피질과립막과 융합되어 형성된 피질성 모자이크 원형질막(Lee *et al.*, 1988; Dandekar and Talbot, 1992)에 분포하는 피질과립 또는 피질막 기원의 fucose 또는 mannose residue에 렉틴이 결합한 결과로 사료된다. 이는 피질과립내에 fucose 또는 mannose, galactose 등의 잔기를 갖는 물질들이 존재한다는 보고(Lee *et al.*, 1988)와도 일치한다. 둘째, 정자의 원형질막에서 기원한 탄수화물잔기가 수정란의 원형질막의 탄수화물잔기를 변화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 셋째, 초기발생기간 동안 수란관에서 분비된 물질이 난자의 원형질막에 첨가되거나 수란관내액의 glycosidase 등의 효소가 원형질막 표면의 탄수화물잔기를 변화시킨 것으로 사료된다.

초기발생중인 배아표면에 다양한 growth factor와 그 수용체가 발견되었다(Paria and Dey, 1990; Smith *et al.*, 1993). 세포외기질은 원형질막 표면에 존재하는 수용체 또는 결합물질과의 상호작용을 통해 growth factor 수용체의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Martin and Sank, 1990). 성숙과 발생동안 일어나는 난자 또는 배아의 위난강과 원형질막 표면에 존재하는 탄수화물잔기의 변화는 수란관 또는 배아에서 합성된 growth factor와 초기배아와의 상호작용의 변화를 통해 초기발생의 조절(Saito and Niemann, 1991)에 관여할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 위난강의 구조물은 난구세포로부터 만들어지며 배란 이후 위난강, 투명대, 난구세포간기질의 탄수화물잔기의 변화를 통해 배우자간의 상호인식에 필요한 인식물질의

최종적인 성숙이 일어나는 것으로 사료된다. 난자와 배아의 투명대는 외층과 내층의 탄수화물잔기의 분포가 다르며 수정 이후 투명대와 원형질막의 탄수화물잔기의 변화는 배우자간의 인식과 투명대관입을 변화시켜 다수정을 방지하는 것으로 사료된다. 수란관액과 배아의 세포외기질간의 상호작용은 초기배아 발생의 조절에 관여할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Boice, M.L., T.J. McCarthy, P.A. Mavrogianis, A.T. Fazleabas, and H.G. Verhage, 1990. Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in Baboons (*Papio anubis*). *Biol. Reprod.* **43**: 340-346.
- Brown, C.R., N. Clarke, M. Aiken, and B.D. Bavister, 1990. Changes in the composition of the hamster zona pellucida after fertilization *in vivo* but not *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **90**: 447-454.
- Dandekar, P. and P. Talbot, 1992. Perivitelline space of mammalian oocytes: Extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical envelope following fertilization. *Mol. Reprod. Devel.* **31**: 135-143.
- Dandekar, P., J. Aggeler, and P. Talbot, 1992. Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Human Reprod.* **7**: 391-398.
- Eppig, J.J., 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature (London)* **281**: 483-484.
- Gandolfi, F., T.A.L. Brevini, L. Richardson, C.R. Brown, and R.M. Moor, 1989. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* **106**: 303-312.
- Grimek, H.J., M.E. Bellin, and R.L. Ax, 1984. Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* **30**: 397-409.
- Gye, M.C., K.W. Choi, and M.K. Kim, 1993a. Sodium aurothiomalate, a hyaluronidase inhibitor, inhibits sperm penetration of the mouse oocytes *in vitro*. *Proc. 5th Intl. Cong. Androl.* p.83.
- Gye, M.C., S. R. Kim, H.K. Kim, and M.K. Kim, 1993b. Studies on the lectin binding patterns of the oviducts luminal epithelium and oocytes in mouse. *Kor. J. Fertil. Steril.* **21**: 267-276.
- Handrow R.R., R.W. Lenz, and R.L. Ax, 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**: 1326-1332.
- Hedrick, J.L., N.J. Wardrip, and T. Berger, 1987. Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J. Exp. Zool.* **241**: 257-262.
- Kan, F.W.K., E. Roux, S. St.-Jacques, and G. Bleau, 1990. Demonstration by lectin-gold cytochemistry of transfer of glycoconjugates of oviductal origin to the zona pellucida of oocytes after ovulation in hamsters. *Anat. Rec.* **226**: 37-47.
- Kapur, R.P. and L.V. Johnson, 1985. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev. Biol.* **112**: 89-93.
- Kapur, R.P. and L.V. Johnson, 1986. Selective sequestration of an oviduct fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.* **238**: 249-260.
- Kaufman, M.H., R.E. Fowler, E. Barratt, and R.D. McDougall, 1989. Ultrastructural and histochemical changes in the murine zona pellucida during the final stages of oocyte maturation prior to ovulation. *Gamete Res.* **24**: 35-48.
- Killian, G.J., D.A. Chapman, J.F. Kavanaugh, D.R. Deaver, and H.B. Wiggin, 1989. Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* **86**: 419-426.
- Laurent, T.C. and J.R.R. Fraser, 1992. Hyaluronan. *FASEB J.* **6**: 2397-2404.
- Lee, S.H., K.K. Ahuja, D.J. Gilbert, and D.G. Whittingham, 1988. The appearance of glycoconjugates associated with cortical granule release during mouse fertilization. *Development* **102**: 595-604.
- Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, N.L. First, and R.L. Ax, 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* **28**: 683-690.
- Leveille, M.-C., K.D. Roberts, S. Chevalier, A. Chapdelaine, and G. Bleau, 1987. Uptake of an Oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* **36**: 227-238.
- Macek, M.B. and B.D. Shur, 1988. Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. *Gamete Res.* **19**: 1-17.

- Martin, G.R. and A.C. Sank, 1990. Extracellular Matrix, Cells, and Growth Factors, *In: Peptide Growth Factors and Their Receptors* (Sporn M.B. and A.B. Roberts eds.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Vol. 2, pp. 463-477.
- Moller, C.C. and P.M. Wassarman, 1989. Characterization of proteinase that cleaves the zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.* **132**: 103-112.
- Nicolson, G.L., R. Yanagimachi, and H. Yanagimachi, 1975. Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zona pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. *J. Cell Biol.* **66**: 263-274.
- Nieder, G.L. and G.R. Macon, 1987. Uterine and oviducal protein secretion during early pregnancy in the mouse. *J. Reprod. Fert.* **81**: 287-294.
- Oikawa, T., Y. Sendai, S. Kurata, and R. Yanagimachi, 1988. A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Res.* **19**: 113-122.
- O'Rand, M.G., 1988. Sperm-egg recognition and barriers to interspecies fertilization. *Gamete Res.* **19**: 315-327.
- Paria, B.C. and S.K. Dey, 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4756-4760.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.A. Winer, and N.L. First, 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* **38**: 1171-1180.
- Robitaille, G., S. St-Jacques, M. Potier, and G. Bleau, 1988. Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol. Reprod.* **38**: 687-694.
- Saito, S. and H. Niemann, 1991. Effect of extracellular matrices and growth factors in the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* **44**: 927-936.
- Shalgi, R., R. Maymon, B. Bar-shira, D. Amihai, and E. Skutelsky, 1991. Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Mol. Reprod. Devel.* **29**: 365-372.
- Shimizu, J.E., and K. Yamada, 1988. The cytochemistry of glycoconjugates in the zona pellucida of murine ovarian oocytes and two-cell embryos. *Histochemical J.* **18**: 357-363.
- Smith, R.M., W.T. Garside, M. Aghayan, C.-Z. Shi, N. Shah, L. Jarett, and S. Heyner, 1993. Mouse preimplantation embryos exhibit receptor-mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.* **49**: 1-12.
- Sutton, R., C.D. Nancarrow, A.L.C. Wallace, and N.W. Rigby, 1984. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *J. Reprod. Fert.* **72**: 415-422.
- Wassarman, P.M., 1992. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol. Reprod.* **46**: 186-191.
- Wegner, C.C. and G.J. Killian, 1991. *In vitro* and *in vivo* association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol. Reprod. Devel.* **29**: 77-84.
- Yanagishita, M., D. Rodbard, and V.C. Hascall, 1979. Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *J. Biol. Chem.* **254**: 911-920.

(Accepted December 3, 1993)

Changes of Lectin Binding Pattern in Mouse Oocytes and Early Embryos

Myung Chan Gye, Yong Pil Cheun, Jin Hyun Jeon, Yong Dal Yoon, Hae Kwon Kim* and Moon Kyoo Kim (Dept. of Biol., Hanyang Univ., *Dept. of Biol., Seoul Women's Univ.*)

By using various lectins conjugated with TRITC, changes of specific sugar residues were determined in mouse oocytes during maturation *in vivo* and *in vitro*, and in embryos before and after fertilization. *Zona pellucidae* (ZP) of immature and *in vitro* matured oocytes were labeled with LCA, PNA, RCA-I and GSL-I, but not with UEA-I. Within ZP, the inner layer was more strongly labeled than the outer layer when examined with PNA, RCA-I and GSL-I. LCA did not discriminate between the inner and the outer layer. Following ovulation, perivitelline spaces (PVS) of oocytes were distinguished by LCA, UEA-I and PNA. GSL-I gave PVS labeling from 2-cell stage and onwards. There was no PVS labeling in *in vitro* matured oocytes. PNA, RCA-I, and GSL-I gave a labeling on plasma membrane (PM) of both unfertilized and fertilized oocytes, whereas LCA and UEA-I gave a PM labeling only in fertilized oocytes. From these results, it is concluded that mouse oocytes and early embryos undergo cytochemical changes in PM, PVS, and ZP during meiotic maturation, ovulation, fertilization and the subsequent development in oviduct.