

노랑초파리의 난자형성에 따른 난실 내의 단백질 합성에 대한 자기방사적 연구

박성순 · 이양림

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

노랑초파리의 난실에서의 단백질 합성을 난자형성과정의 단계별로 자기방사법을 이용하여 관찰하였다. 단백질은 영양세포에서 난자형성 초기에 미약한 정도로 합성되는 것으로 나타나지만, 가장 활발하게 합성되는 세포는 여포세포이다. 난모세포와 영양세포에서는 단백질이 거의 합성되지 않고 있다. 여포세포에서 합성된 단백질은 stage 10 이후의 단계에서만 난모세포로 이동하는 것으로 관찰되었다. 난모세포에 편만하게 분포된 은입자는 난자형성을 위한 다양한 목적을 위해 여포세포로부터 이입된 단백질로 집적된다. 특히 난황립의 형성에 여포세포의 단백질이 최소한도 부분적으로 관여한다는 사실을 알 수 있었다.

KEY WORDS: *D. melanogaster*, Oogenesis, Protein Synthesis

노랑초파리의 난자형성은 다른 동물에 비해 대단히 빠른 속도로 진행되는데, 이에 대한 가장 근본적인 이유는 아마도 초파리의 경우, 난모세포의 성장과 성숙에 필요한 물질이 난실(egg chamber) 밖에서 이입됨과 함께(King, 1970; Wyman, 1979), 난실을 이루는 영양세포(nurse cell)와 여포세포(follicle cell)로부터의 이입에 의한 결과로 보인다(Sirlin & Jacob, 1960; Zalokar, 1960). 지방체나 난소의 다른 세포에서 합성된 난황단백질이 난모세포 내로 이입되는 물론(Barnet and Wensink, 1981; Bownes and Hames, 1977; Gelti-Douka, *et al.*, 1974), 여포세포에서도 난자의 보호막인 난황막과 난각의 전구물질 외에도 난황단백질이 합성되어 난모세포 내로 이동하는 것이 보고된 바 있다(Bishop and King, 1984; Brennan *et al.*, 1982; Loyd *et al.*, 1981). 또한 난실의 미세구조적 변화의 관찰을 통해서도, 여포세포와 영양세포에서 난모세포의 완성에 관여하는 물질이 합성되어 난모세포로 이동되는 것을 알 수 있다(Lee and Park, 1988).

Park and Lee(1987)는 노랑초파리의 난실

을 단계별로 분리한 다음 ^3H -leucine으로 표지한 후 새로 합성된 단백질을 이차원 전기영동법으로 분석한 바 있는데, 독립된 난실 모든 단계에서 최소한 300내지 400종의 단백질이 합성될 뿐 아니라, 일부 단백질 합성은 단계 특이적(stage-specific)이라는 점을 보고하였다. 이러한 사실을 통해, 노랑초파리의 난모세포의 단백질 조성이 단순히 난실 이외의 다른 조직으로부터의 유입에 만 의존하는 것이 아니고, 난실 자체를 구성하는 영양세포, 여포세포, 난모세포의 전부 또는 어느 특정 세포로부터의 합성 및 유입에도 의존할 것이라는 점을 짐작할 수 있다. 이러한 생각에 따라, 본 연구실에서는 난실 내의 단백질 합성의 시기 및 위치, 난황립 형성에 대한 기여 등을 난실 생성 단계별로 추적하므로써 난자형성과 단백질 합성의 관계를 좀더 심도있게 규명코자 하였다.

재료 및 방법

난자형성 단계에 따른 난소의 분리

표준배지를 이용하여 25°C에서 사육한

Oregon-R 계통의 노랑초파리 (*Drosophila melanogaster*)의 암컷으로부터 난소를 해부현미경 하에서 분리하여 실험에 사용하였다.

³H-leucine으로의 표지

난소를 채취한 다음 난소 이외의 조직을 제거시키고 방사능 동위원소가 투과하기 적합하게 watchmarker's forcep으로 해쳐서 ³H-leucine으로 표지하였다. *Drosophila* Ringer액 250 μ l에 0.4 mCi/ml의 ³H-leucine을 첨가한 다음 20쌍의 난소를 넣어 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간에 걸쳐 표지하였다. 표지시간이 끝날 때마다 4쌍의 난소를 꺼내어 Ringer액으로 3번 세척한 후 Ringer액에 10분간 방치해 두었다가 5% trichloroacetic acid로 15분간 씻어내었다.

자기방사를 위한 시료준비

³H-leucine으로 표지된 난소를 0.1M Na-cacodylate buffer(pH 7.2)로 각각 준비한 5% glutaraldehyde와 5% formalin을 동일한 양으로 섞은 고정액으로 4°C에서 전고정하였다. 전고정된 난소를 0.1 M Na-cacodylate Buffer로 3번 씻어준 후 1% OsO₄로 2시간동안 후고정하였다. 고정이 끝난 시료를 ethanol series로 탈수시키고 propylene oxide로 치환한 다음 epon 혼합액에 포매하여 60°C에서 96시간동안 중합시켰다.

자기방사

epon에 포매된 시료를 1 μ m의 두께로 절편을 만든 후 slide glass에 부착시 40°C에서 emulsion(Sakura NR-H₂)으로 coat시킨 다음 암상자에 넣어 4°C에 방치 하였다. 15일간의 노출이 끝난 다음 현상하고 0.1%의 toluidine blue로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

결과

난실을 구성하는 여포세포, 영양세포 및 난모

세포에서 모든 단계에 걸쳐 지속적으로 그리고 활발하게 단백질을 합성하는 세포는 여포세포이다. King(1970)에 의해 제시된 stage 1에서 stage 14에 이르기까지 모든 단계에서 여포세포는 ³H-leucine에 의해 강하게 표지된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1, 2, 3). 30분의 표지기간에는 물론 10분간의 짧은 기간에도 은입자는 주로 여포세포에서 발견되었다.

난소소관(ovariole)의 상단부에서 하나의 egg chamber를 구성하기 시작하는 배선(germarium)의 끝부분에서 은입자가 발견되고 있는데, 이는 이미 stage 1에서도 단백질합성이 되고 있음을 보여 주는 것으로 생각되며(Fig. 1A). 2시간의 비교적 긴 표지기간 동안, 난황이 형성되기 이전인 stage 4에서도 단백질 합성이 활발히 일어남을 알 수 있다(Fig. 1B). 30분 동안 표지했을 때, 여포세포 내의 은입자 밀도가 가장 높게 나타나는 단계는 stage 9이고, 그 이후에는 여포세포의 은입자 밀도는 점차 감소하는 경향을 보인다(Fig. 1C, D, Fig. 2B, D, Fig. 3A, C, D). Stage 8의 여포세포에서도 상당량의 은입자가 발견되고 있으나, stage 9과 비슷한 은입자를 나타내는데 4배의 표지기간이 걸리는것으로 보아 stage 9의 여포세포에서 가장 활발한 단백질 합성이 일어나는 것으로 보인다(Fig. 2A, B).

반면, 영양세포에서는 여포세포에 비해 은입자를 거의 찾아 볼 수 없었지만, stage 4의 영양세포에서는 2시간 동안 표지하였을 경우 은입자가 다소 발견되었으며(Fig. 1B). 이보다 짧은 30분간 표지한 stage 6와 stage 7에서도 여포세포에 비해 극소수이기는 하지만 소량의 은입자가 영양세포에 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 1C, D). 그러나 stage 8에서는 2시간 동안 표지하였을지라도 은입자가 영양세포에서 전혀 나타나지 않았을 뿐 만 아니라(Fig. 2A), stage 9와 stage 10에서도 영양세포에서는 은입자가 관찰되지 않았다(Fig. 2B, C, D). 그러나 영양세포 사이의 간극에서는 은입자가 보이고 있는데, 이 은입자들은 여포세포에 위치한 은입자와 연결되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 2C, Fig.

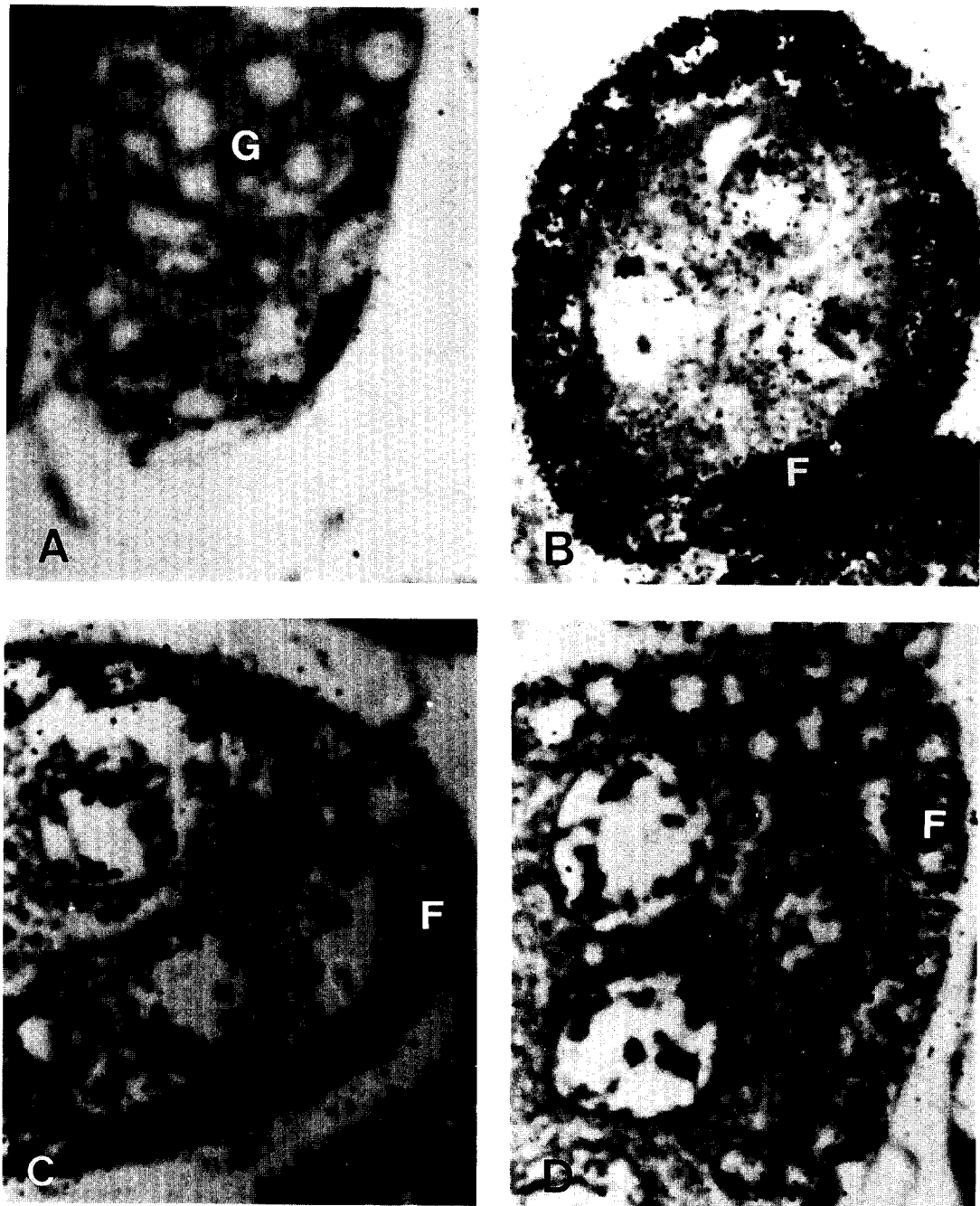


Fig. 1. Autoradiograms of egg chamber of stage 1 labeled for 10 minutes (A), stage 4 labeled for 2 hours (B), stage 6 (C) and stage 7 (D) labeled for 30 minutes with ^3H -leucine. G: germarium, F: follicle cell. All pictures were taken at $\times 1,000$.

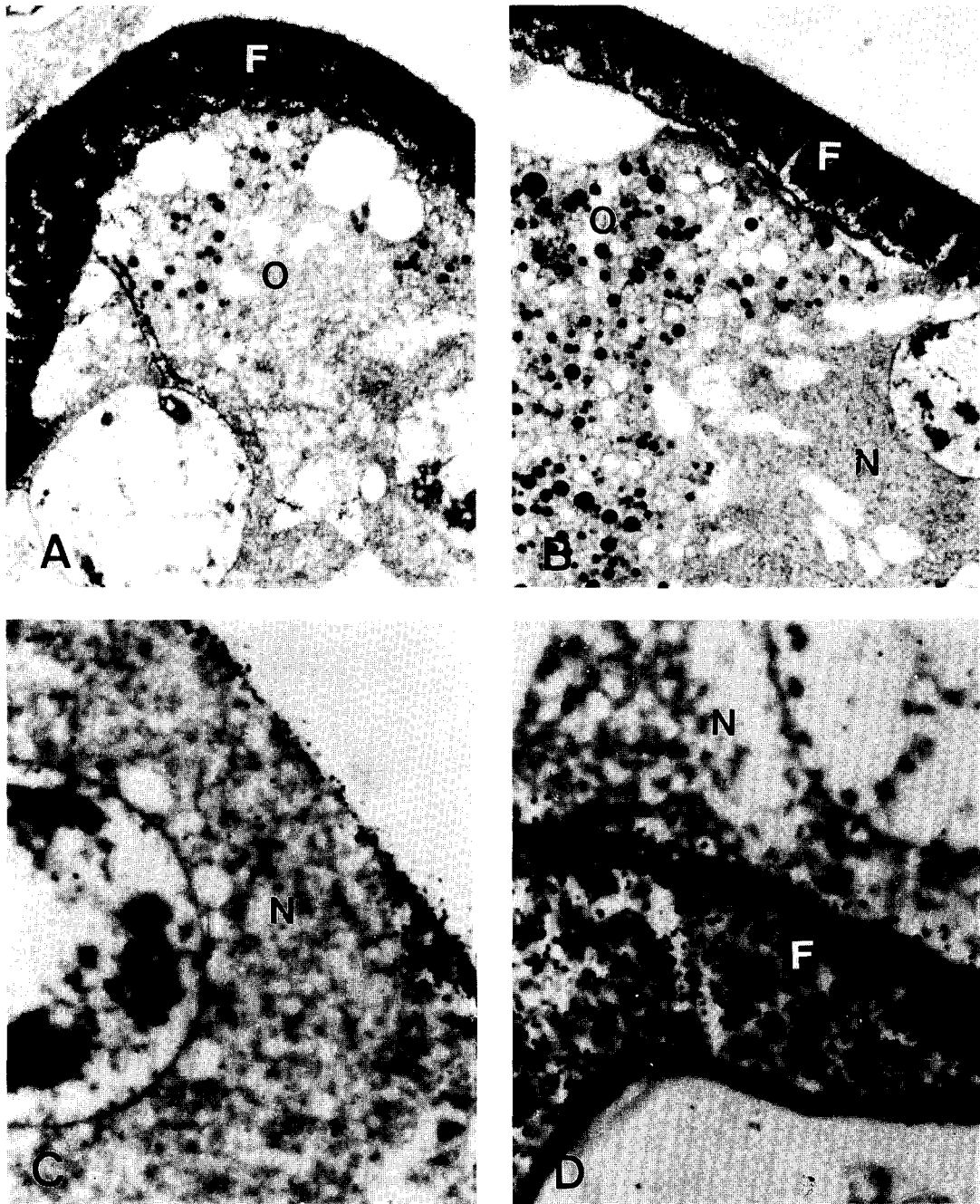


Fig. 2. Autoradiograms of egg chambers of stage 8 labeled for 2 hours (A), and stage 9 labeled for 30 minutes (B) with ^3H -leucine. Autoradiograms of the nurse cells and the follicle cells of stage 9 labeled for 30 minutes (C) and the follicle cells of stage 10 labeled for 10 minutes (D) with ^3H -leucine. F: follicle cells, N; nurse cell, O; oocyte. All pictures were taken at $\times 1,000$ except (C) which was taken at $\times 400$.

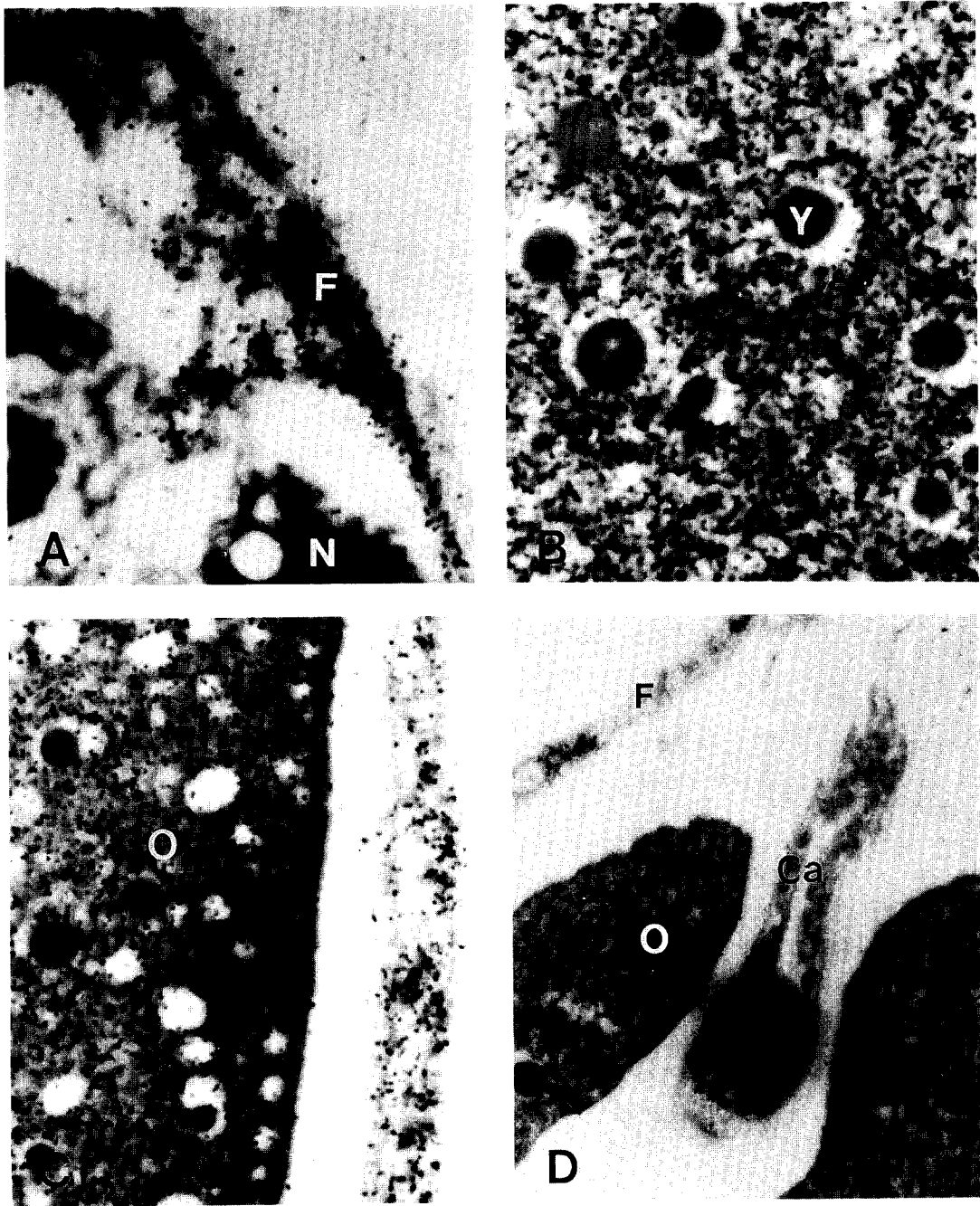


Fig. 3. Autoradiograms of the nurse cells and follicle cells of stage 10 (A), of the oocyte of stage 11 (B), the oocyte and follicle cells of stage 12 (C) and of the basal region of the chorionic appendage at stage 14 (D). All were labeled for 30 minutes with ^3H -leucine. F; follicle cell, N; nurse cell, O; oocyte, Y; yolk granules, Ca; chorionic appendage. All pictures were taken at $\times 1,000$ except (D) which was taken at $\times 400$.

3A).

난모세포가 난실 내에서 차지하는 비율은 난자 형성이 진행되면서 점차 증가하는데, 특히 stage 9 이후에 급격히 증가하면서, 상대적으로 영양세포가 차지하는 부위가 급격히 감소한다. 난모세포의 이같은 부피의 증가에도 불구하고, 최소한도 stage 9에 이르기까지 난모세포에서는 은입자를 찾아 볼 수 없었다(Fig. 2A, B). 그러나 stage 11과 12의 난모세포에서 다량의 은입자를 찾아 볼 수 있었는데(Fig. 3B, C). 이중 많은 수는 아니지만 소량의 은입자가 난황립에 위치함으로써, 새로 합성된 단백질의 일부가 난황립 형성에 밀접하게 연관되어 있음을 관찰할 수 있었다. Stage 14에는 여포세포의 은입자 밀도는 상당히 약화되는 반면 난모세포에 편만하게 은입자가 분포되어 있었으며, 특히 chorionic appendage의 기부에 상당수의 은입자가 발견되었다(Fig. 3D).

고찰

일반적으로 노랑초파리의 난모세포에 축적되는 단백질은 다른세포로부터 합성된 단백질의 이입에 의존하는 것으로 알려져 있는데, 그 예로 난모세포 성장에 기본적으로 필요한 난황단백질의 경우 주로 지방체에서 합성되어 혈림프로 방출된 후 난모세포에 유입되는 것으로 알려졌다(Barnett and Wensink, 1981; Bownes & Hames, 1977; Gelti-Douka *et al.*, 1974).

그러나 난실구성세포로서 난모세포와 밀착된 여포세포에서도 난황단백질이 합성되고 있음이 밝혀진바 있다(Brennan *et al.*, 1982). 이 같은 보고는 난소를 성체로 부터 분리하여 단백질 전구 물질로 표지함으로써 혈림프 등 다른 성체 조직의 영향을 배제한 상태에서의 단백질 합성 양상을 관찰한 본 연구의 결과를 뒷받침하는 것이라 생각할 수 있다.

한 가지 특기할 사항은, 난실을 구성하는 영양세포 및 여포세포에서 일어나는 단백질 합성 양상이 세포종류에 따라, 또한 난실의 성숙 단계에

따라 다르며 난모세포에서는 전혀 합성되지 않는다는 점이다.

일반적으로 난모세포는 탄수화물과 RNA등 많은 물질을 영양세포로부터 이입받는 것으로 알려져 있는데(Gutzeit *et al.*, 1994; Sirline and Jacob, 1960; Xue and Cooley, 1993; Zalokar, 1960). 본 연구결과를 통해, 영양세포 내에서는 stage 7이후 단백질 합성이 거의 일어나지 않는것으로 나타났으며, stage 4-6에서 합성된 소량의 단백질도 난모세포로 이입되기 위한 것이라기 보다는 영양세포로부터 난모세포로의 물질이입을 위한 조절물질의 발현이라고 생각된다(Hedge and Stephenson, 1993; MacDonald and *et al.*, 1991).

영양세포와는 달리, 이미 보고된 바와같이(Fargnoli and Waring, 1982) 여포세포에서는 모든 단계(stage1-14)에 걸쳐 활발히 단백질 합성이 일어나고 있는 것으로 나타났는데, 이는 생식세포 형성에 관여하는 tudor단백질(Golumbeski *et al.*, 1991), 난모세포에만 발견되는 2종류의 alpha-tubulin isotype(Theurkauf, 1992), perivitelline space에서 발견되는 torso-like 단백질(Stevens *et al.*, 1990) 등 난모세포에 축적되는 여러물질이 바로 이 여포세포에서 합성되어 난모세포로 유입되는 것으로 보인다.

이러한 여포세포에서 합성된 단백질이 난모세포에 기여하는 것은 난모세포의 성숙단계에 따라 다른것으로 보인다. 이는 난황이 축적되기 시작할 때 여포세포로부터 난황물질이 합성되어 난모세포로 이입된다는 보고를 감안할 때(Brennan *et al.*, 1982) 본 연구에서 보는 바와 같이 stage 9까지는 난모세포에서 은입자를 전혀 찾아볼 수 없었으나 stage 11에서 갑자기 은입자가 난모세포의 세포질을 편만하게 채우고 있으며, 그 중 일부는 난황립에 밀접하게 연계되어 있다는 점에서 난황립은 최소한도 부분적으로 여포세포에서 합성된 단백질의 기여에 의해서 형성된다는 것을 생각할 수 있다. 물론 표지기간을 연장시키면 stage 11 이전 단계에서도 난모세포 내의 은입자를 관찰할 가능성을 배제할 수 없으

나(Montell *et al.*, 1991), 최소한도 2시간의 표지기간 내에서는 그러한 난모세포 자체의 단백질 합성이든, 여포세포로부터의 단백질이입은 stage 9 이전 단계에서는 관찰할 수 없었다.

이같은 단계특이적 단백질이입에 대하여 관찰된 바는 없지만 stage 10-11을 기점으로 하여 난실에서 단백질 합성 양상이 크게 달라지는 점은 보고된 바 있으며(Park and Lee, 1987), 난황막과 난각이 형성되는 난모세포 성숙 단계의 후기-말기에서 이들 보호막에 필요한 전구물질이 합성, 분비된다는 보고들은(Fargnoli and Waring, 1982; Gutzeit and Arendt, 1994; Higgins *et al.*, 1984; Lee and Park, 1988; Petri *et al.*, 1976; Romano *et al.*, 1991) 거의 완숙단계에 있는 여포세포에서도 단백질 합성이 진행되고 있는 본 연구결과를 뒷받침하는 것으로 사료된다.

감사

본 연구는 1994년도 이화여자대학교 교내연구비 지원으로 수행된 것임.

인용문헌

- Barnett, T. and P. Wensink, 1981. Transcription and translation of yolk protein mRNA in the fat bodies of *Drosophila*. *ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biol.* **23**: 97-116.
- Bishop, D.L. and R.C. King, 1984. An ultrastructural study of ovarian development in the *otu7* mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Science.* **67**: 87-120.
- Bowen, M. and B. Hames (1977). Accumulation and degradation of three major yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* **200**: 149-156.
- Brennan, M.D., A.J. Weiner, T.J. Goralski, and A.P. Mahowald, 1982. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **89**: 225-236.
- Fargnoli, J. and G.L. Waring, 1982. Identification of vitelline membrane proteins in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **92**: 306-314.
- Gelti-Douka, H., T.R. Gingeras, and M.P. Kambysseli, 1974. Yolk proteins in *Drosophila*: Identification and site of synthesis. *J. Exp. Zool.* **187**: 167-172.
- Golumbeski, G.S., A. Bardsley, F. Tax, and R.E. Boswell, 1991. *tudor*, a posterior-group gene of *Drosophila melanogaster*, encodes a novel protein and an mRNA localized during mid-oogenesis. *Genes and Dev.* **5**: 2060-2070.
- Gutzeit, H.O. and D. Arendt, 1994. Blocked endocytotic uptake by the oocyte causes accumulation of vitellogenins in the haemolymph of the female-sterile mutants *quitPX61* and *stand stillPS34* of *Drosophila*. *Cell and Tissue Res.* **275**: 291-298.
- Gutzeit, H.O., D. Zissler, V. Grau, M. Liphard, and U.R. Heinrich, 1994. Glycogen stores in mature ovarian follicles and young embryos of *Drosophila*: ultrastructural changes and some biochemical correlates. *Eur. J. Cell Biol.* **63**: 52-60.
- Hedge J. and E.C. Stephenson, 1993. Distribution of swallow protein in egg chambers and embryos of *Drosophila melanogaster*. *Development* **119**: 457-470.
- Higgins, M.J., V.K. Walker, J.J.A. Holden and B.N. White, 1984. Isolation of two *Drosophila melanogaster* genes abundantly expressed in the ovary during vitelline membrane synthesis. *Dev. Biol.* **105**: 155-165.
- King, R.C., 1970. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. A.P. New York.
- Lee, Y.R. and S. Park, 1988. Studies on oogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Ultrastructural changes in the process of transport of yolk protein within the egg chamber during oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Korean J. Zool.* **31**: 318-326.
- Loyd, J.E., E.C. Raff, and R.A. Raff, 1981. Site and timing of synthesis of tubulin and other proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **86**: 272-284.
- MacDonald, P.M., S.K. Luk, and M. Kilpatrick, 1991. Protein encoded by the *exuperantia* gene is concentrated at sites of bicoid mRNA accumulation in *Drosophila* nurse cells but not in oocytes or embryos. *Genes & Dev.* **5**: 2455-2466.
- Montell, D.J., H. Keshishian, and A.C. Spradling, 1991. Laser ablation studies of the role of the *Drosophila* oocyte nucleus in pattern formation. *Science* **254**: 290-293.
- Park, S. and Y.R. Lee, 1987. Changes of protein synthesis during oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Korean J. Zool.* **30**: 10-28.
- Petri, W.H., A.R. Wyman, and F.C. Kafatos, 1976.

- Specific protein synthesis in cellular differentiation. III. The egg shell proteins of *Drosophila melanogaster* and their program of synthesis. *Dev. Biol.* **49**: 185-199.
- Romano, C.P., J.C. Martinez-Cruzado, and F.C. Kafatos, 1991. The relative importance of transcriptional and post transcriptional regulation of *Drosophila* chorion gene expression during oogenesis. *Dev. Genet.* **12**: 196-205.
- Sirlin, J.L. and J. Jacob, 1960. Cell function in the ovary of *Drosophila*. II. Behavior of RNA. *Exp. Cell Res.* **20**: 283-293.
- Stevens, L.M., H.G. Frohnhof, M. Klingler, and C. Nusslein-Volhard, 1990. Localized requirement for *torso-like* expression in follicle cells for development of terminal Anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature* **346**: 660-663.
- Theurkauf, W.E., 1992. Behavior of structurally divergent alpha-tubulin isotypes during *Drosophila* embryogenesis: evidence for post-translational regulation of isotype abundance. *Dev. Biol.* **154**: 205-217.
- Wyman, R., 1979. The temporal stability of the *Drosophila* oocyte. *J. Embryol. Exp. Morph.* **50**: 137-144.
- Xue, F. and L. Cooley, 1993. *Kelch* encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* **72**: 681-693.
- Zalokar, M., 1960. Sites of ribonucleic acid and proteins synthesis in *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* **19**: 184-186.

(Accepted January 27, 1995)

Autoradiographic Studies on the Protein Synthesis in the Egg Chamber during Oogenesis of *Drosophila melanogaster*

Sungsoon Park and Yang Rim Lee (Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea)

Protein synthesis in the egg chamber of *Drosophila melanogaster* was studied by autoradiographic techniques. Proteins are most actively synthesized in the follicle cells throughout the whole process of oogenesis, while silver grains could hardly be detected in oocytes and nurse cells, even though a few grains were seen in the nurse cells at the early stages.

Proteins synthesized in the follicle cells are transported specifically at stages later than stage 10. These proteins seem to contribute to the various activities during oogenesis and particularly to the formation of yolk granules and protective membranes like vitelline membrane and chorion.