

생쥐 난자 성숙시 일어나는 칼슘 저장고의 분포 변화에 관한 연구

최수완 · 장준근* · 배인하

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과, *서울대학교 의공학연구소

Redistribution of Intracellular Ca²⁺ Stores during Mouse Oocyte Maturation

Su-Wan Choi, Jun-Keun Chang, and In-Ha Bae

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University

* Institute of Biomedical Engineering, Seoul National University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Before fertilization, mammalian oocytes undergo meiotic maturation, which consists of nuclear and cytoplasmic differentiation. In this study, changes of Ca²⁺ stores in mouse oocytes were examined during meiotic maturation and the role of Ca²⁺ in the regulation of the maturation was investigated by using monoclonal antibodies against smooth endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase(SERCA-ATPase) and calreticulin. Observations were made under epifluorescence microscope and /or confocal laser scanning microscope.

In immature oocytes which did not resume meiotic maturation, SERCA-ATPases were mostly localized in the vicinity of the germinal vesicle and calreticulins were distributed evenly throughout the cytoplasm. In mature oocytes, SERCA-ATPases were observed throughout the cytoplasm, but were absent from the nuclear region. In contrast, calreticulins were localized mostly in the cortex of the oocyte and were absent from the cytoplasm. However, bright fluorescence stainings were observed in the perimeiotic spindle region of mature oocyte when labeled with antibodies against calreticulin.

These results indicate that mouse oocytes undergo distinct rearrangement of the localization of Ca²⁺-ATPases and calreticulins during meiotic maturation. Thus it can be suggested that redistribution of the Ca²⁺ stores, as revealed by differential fluorescence stainings, is deeply involved in the regulatory mechanism of mammalian oocyte maturation.

Key words: Oocyte maturation, SERCA-ATPase, Calreticulin.

서 론

동물세포에서 세포질내의 free calcium 농도는 일정 수준으로 유지되고 있다가 세포내 변화가 일어날 때 급

격히 상승하는 현상을 수반하고 있으며 이와 같은 세포 질내 칼슘농도의 상승현상은 난자의 성숙 및 수정후 활성화 과정에도 필수적인 것으로 알려져 있다(Cuthbertson *et al.*, 1981; Busa & Nuccitelli, 1985; Kline & Kline, 1992).

정자의 융합에 의한 수정시 난자는 일시적인 난자내 free calcium의 증가(Ca^{2+} transient)를 주기적으로 나타내는 Ca^{2+} oscillation 현상을 나타내며 이는 수정후 일어나는 난자의 피질과립 분비반응(cortical granule exocytosis), 감수분열 재개, 제 2 극체 형성, 제 2차 난할시의 핵막 붕괴 등의 활성화 반응을 유도하게 된다 (Kline & Kline, 1992; Miyazaki *et al.*, 1993; Shiina *et al.*, 1993).

일반적으로 비홍분성 세포에서 세포질내 칼슘농도 증가는 어떤 자극(신호)을 받아 칼슘 저장고내의 칼슘이 세포질로 방출됨으로써 시작되는데 세포질내 칼슘 저장고는 2nd messenger인 inositol 1,4,5-triphosphate ($InsP_3$)에 sensitive한 $InsP_3$ -sensitive calcium store (ISCS)와 $InsP_3$ 에는 insensitive하며 calcium, ryanodine 혹은 caffeine에 sensitive한 $InsP_3$ -insensitive calcium store (IICS)의 두 종류가 있는 것으로 생각되고 있으며 포유류 난자에서 수정시 일어나는 칼슘의 분비는 주로 $InsP_3$ 가 매개하는 분비기작에 의하여 ISCS로부터 기원하여 난자 활성화 반응을 유도되는 것으로 보고 있다 (Miyazaki *et al.*, 1992; Kline & Kline, 1994; Clapham, 1995).

난자 활성화 반응의 하나인 피질과립 분비반응은 난자의 세포막 부근에 존재하던 피질과립이 피질과립 내용물을 방출함으로써 난자의 투명대 변화를 유도, 다정자 수정을 방지하는 기작으로서 (Stewart-Savage & Bavister, 1988; Ducibella, 1996) 세포내 free calcium 증가에 의존적이며 특히 수정후 일어나는 first Ca^{2+} transient의 크기와 밀접한 연관을 가지는 것으로 보고되어 있다 (Kline & Kline, 1992; Kline & Stewart-Savage, 1994). 이 같은 다정자 수정 방지작은 배의 정상적인 발생을 위하여 필수적인데 미성숙한 난자는 성숙 난자에서와 같은 피질과립 반응이 제대로 일어나지 않아 다정자 수정의 비율이 매우 높은 것으로 알려져 있다 (Iwamatsu & Chang, 1972; Sathanathan & Trounson, 1982). 한편 Ducibella 등 (1990)은 calcium ionophore A23187 처리로 생쥐 난자의 피질과

립 분비능을 평가해 본 결과 이는 난자의 성숙 정도에 비례하여 증가하여 제 2 감수분열 중기에 이르러 극대가 됨을 보고하였으며 미성숙 난자와 성숙 난자는 $InsP_3$ 에 대한 반응성, 수정시 유도되는 Ca^{2+} transient의 크기, 방출하는 칼슘의 양 등에 있어서 큰 차이를 나타낸다는 것이 여러 학자들에 의해 보고되었다 (Fujiwara *et al.*, 1993; Mehlmann & Kline, 1994).

이들을 종합해 볼 때 난자의 정상적인 수정반응을 위하여 난자 성숙이 일어나는 동안 세포질내 칼슘저장고에 어떤 변화가 일어남을 추측해 볼 수 있다.

수정반응에 관여하는 칼슘저장고인 ISCS에 대해서는 아직 논의가 진행중에 있는데 소포체(endoplasmic reticulum, ER)의 일부 (Han & Nuccitelli, 1990), 혹은 소포체의 특정 부분으로부터 유래한 특수화된 소기관 'calciosome' (Volp *et al.*, 1988; Rossier & Putney, 1991)이 그 기능을 담당하는 것으로 생각되고 있다.

현재까지는 난자의 세포질내 칼슘 저장고의 분포를 보기 위하여 주로 소포체의 분포가 관찰되었다. 그러나 소포체에서 칼슘 저장고로서 기능하는 부분은 극히 일부분임을 생각해 볼 때 이들의 전체 구조변화를 관찰하기 보다 칼슘 저장고로서 기능하는 부분으로 범위를 축소하여 관찰하는 것이 보다 효율적으로 칼슘 저장고의 분포 변화를 관찰하는 방법이 될 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 생쥐의 미성숙 난자와 성숙난자에서 ISCS에 존재하는 칼슘 결합 단백질인 calreticulin과 smooth endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA-ATPase)의 분포를 간접 면역형광염색을 통하여 비교 관찰함으로써 난자 성숙과정 동안 일어나는 ISCS의 변화 양상을 관찰하고 이를 피질과립 분비반응을 포함한 수정후 난자의 활성화 반응 수행능(activation competence)의 획득과 연관시켜 정상적인 수정반응을 위한 난자의 세포질 성숙의 중요성을 인식하고 효율적인 세포내 칼슘 조절기전에 대한 이해를 돕고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에는 성신여자대학교 생물학과에서 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 Swiss Albino인 ICR계통의 3~4주령된 생쥐 암컷을 사용하였다.

2. 난자의 준비

1) 미성숙 난자 (Prophase I stage, GV oocyte)

생쥐를 경추골 파열로 도살 후 난소를 적출하여 난소강막을 제거한 후 난자의 자발적 성숙을 억제하기 위하여 dbcAMP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cho *et al.*, 1974)을 포함한 M2 배양액으로 옮겨 3회 세척후 해부현미경 (stereozoom 7, Bausch & Lomb, U.S.A.) 하에서 성장한 여포를 예리한 바늘로 터뜨려 난자를 여포로부터 분리하였다. 분리된 난자의 난구세포는 필요에 따라 mouth-controlled micropipette을 이용하여 여러번 흡입과 배출을 반복하여 제거하였으며 핵막과 인이 뚜렷한 정상 미성숙 난자만을 수집하여 본 실험에 사용하였다.

2) 성숙 난자 (Metaphase II stage, oocyte with a polar body)

성숙 난자는 생쥐 암컷의 복강에 5 IU(international units)의 pregnant mare's serum gonadotropin(Folligon, Intervet, Holland)과 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma Chem Co., U.S.A.)을 47시간 간격으로 주사하고 hCG 주사 후 14~16시간에 생쥐를 경추파열로 도살하여 수란관을 적출한 뒤 배양액으로 3회 세척한 후 해부현미경 하에서 핀셋으로 수란관 팽대부위(infundibulum)를 찢는 방법으로 배란된 난자를 얻었다. 얻어진 난자는 난자 주위의 mucin 성분과 난구세포 제거를 위해 0.1% hyaluronidase를

약 3분간 처리한 후 배양액에 3회 세척하고 제 1 극체가 형성된 건강한 난자만을 골라 실험에 사용하였다.

3. 배양액과 처리물질

난자의 수집에는 M2 배양액을 사용하였다. 난자의 고정액으로는 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 3% paraformaldehyde 용액을 사용하였으며 세포막의 투과성을 높이기 위해 HEPES-0.1% Triton X-100 buffer(20mM HEPES, 300mM sucrose, 50mM NaCl, 3mM $MgCl_2$, 1 0.1% Triton X-100)를 만들어 사용하였다. 한편 비특이적 반응 억제를 위해 1% BSA와 5% normal horse serum (Vector Laboratories Inc., U.S.A.)을 포함한 PBS를 사용하였고 세척 용액으로는 0.2% BSA를 포함한 PBS (PBS-0.2% BSA) 및 3% BSA와 0.1% Tween 20을 포함한 PBS 용액 (PBS-3% BSA-0.1% Tween 20)을 만들어 사용하였다. 모든 배양액과 처리 물질은 사용전 0.45 μm millipore membrane 으로 여과멸균하였으며 실험에 사용될 모든 초자기구는 건열멸균(160 $^{\circ}\text{C}$, 90분) 또는 고압멸균(120 $^{\circ}\text{C}$, 15Lb/inch 2 , 15분) 하였다.

모든 배양액의 조성 성분과 처리 물질은 특별한 언급이 없는 한 Sigma 제품을 사용하였다.

4. 항체의 준비

일차 항체로는 polyclonal (rabbit) anti-calreticulin antibody(Affinity Bioreagent Inc., U.S.A.)와 monoclonal (mouse) anti-SERCA ATPase antibody (Biomol Research Laboratories Inc., U.S.A.)를 0.2% BSA를 포함한 PBS 용액에 1:100 및 1:500 으로 각각 희석하여 사용하였다. 형광물질로 표지한 이차 항체로는 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG(Sigma) 및 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma)를 0.2% BSA를 포함한 PBS 용액에 1:100 및 1:20 으로 각각 희석하여 사용하였다.

5. 난자의 면역형광염색(Immunofluorescence staining)

수집한 미성숙 난자 혹은 성숙 난자는 배양액에 3회 세척후 acid Tyrode's solution을 잠깐 처리하여 투명대를 제거하고 PBS-0.2% BSA 용액에서 조심스럽게 3회 세척하여 3% paraformaldehyde 용액으로 옮겨 실온에서 45분간 고정시켰다. 고정이 끝난 후 PBS-0.2% BSA 용액으로 옮겨 3회 세척 후 세포막의 투과성을 높이기 위해 HEPES-0.1% Triton X-100 buffer solution을 10분간 처리하였고 PBS-0.2% BSA 용액에서 3회 세척을 마친 다음 1% BSA와 5% normal horse serum을 포함한 PBS 용액에서 1시간 동안 37°C, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 반응시켜 비특이적 결합을 억제하였다. 1시간 동안 반응시킨 난자는 회수하여 PBS-0.2% BSA 용액에 3회 세척하여 Cell-Tak (Collaborative Research Inc., U.S.A.) 으로 코팅된 슬라이드 글라스 위에 난자를 고르게 분산시켜 부착시켰다. 슬라이드 위에 준비된 난자는 일차 항체 희석액 50 μ l를 처리하여 1시간 동안 37°C, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 반응시키고 PBS-3% BSA-0.1% Tween 20 용액에서 10분씩 3회 세척하여 비특이적 결합을 제거하고 다시 이차 항체 희석액에서 45분간 반응시켰다. 항체 처리가 끝난 난자는 PBS-3% BSA-0.1% Tween 20에서 10분간 세척하여 포매제인 Permount (Sigma)로 포매, 커버글라스를 덮어 관찰하였다. 한편 커버글라스 양끝을 커버글라스 조각으로 지지하여 난자의 3차원적 구조를 유지하게 하였다.

6. 관 찰

난자의 whole mount는 conventional epifluorescence microscope (Zeiss Axiophot photomicroscope D-7082, Germany)로 관찰, 사진촬영하였으며 난자의 단면은 argon laser를 사용한 laser scanning confocal microscope(Zeiss LSM410, Germany)로 관찰, 컴퓨터 영상을 출력하였고, 난자의 3차원 구조는

각각의 단면 정보를 재구성하여 얻었다.

결 과

1. 생쥐 미성숙 난자의 calreticulin 분포

GV Stage에 있는 생쥐 미성숙 난자에서 conventional epifluorescence microscope 및 confocal microscope로 calreticulin의 분포를 관찰한 결과 calreticulin은 난자의 핵 주위와 세포질 전체에 걸쳐 특별한 양상을 나타내지 않고 약간씩 고르게 분포하였으며 핵 내에서는 관찰되지 않았다 (Figs. 1 & 2).

2. 생쥐 성숙 난자의 calreticulin 분포

Conventional epifluorescence microscope를 사용하여 관찰한 결과 성숙한 생쥐 난자에서 calreticulin은 meiotic spindle(MS) 부분에서 뚜렷이 나타났고 나머지는 세포질 전체에 고르게 분포하는 것처럼 보였으나 (Fig. 3) confocal microscope로 0.8 μ m 두께의 단면을 관찰해본 결과 원형질막 바로 아래쪽 피질과 meiotic spindle 주위에 집중적으로 분포하며 그외의 세포질에는 거의 분포하지 않음을 관찰 하였다(Fig. 4).

3. 생쥐 미성숙 난자의 SERCA-ATPase 분포

Conventional epifluorescence microscope로 관찰한 결과 핵을 제외하고 세포질 전체적으로 분포하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5). 한편 confocal microscope를 사용하여 1 μ m 두께로 laser scanning 하여 단면을 관찰해 본 결과 핵을 중심으로 하여 이를 둘러싸고 세포질 안쪽에 집중하여 분포하며 핵 내에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 6).

4. 생쥐 성숙 난자의 SERCA-ATPase 분포

Conventional epifluorescence microscope를 통한 관찰 결과 meiotic spindle이 위치할 것으로 생각되는 부분에 염색되지 않은 작은 공간을 제외하고는 세포질 내에 전체적으로 분포하는 것으로 관찰되었으나 (Fig.

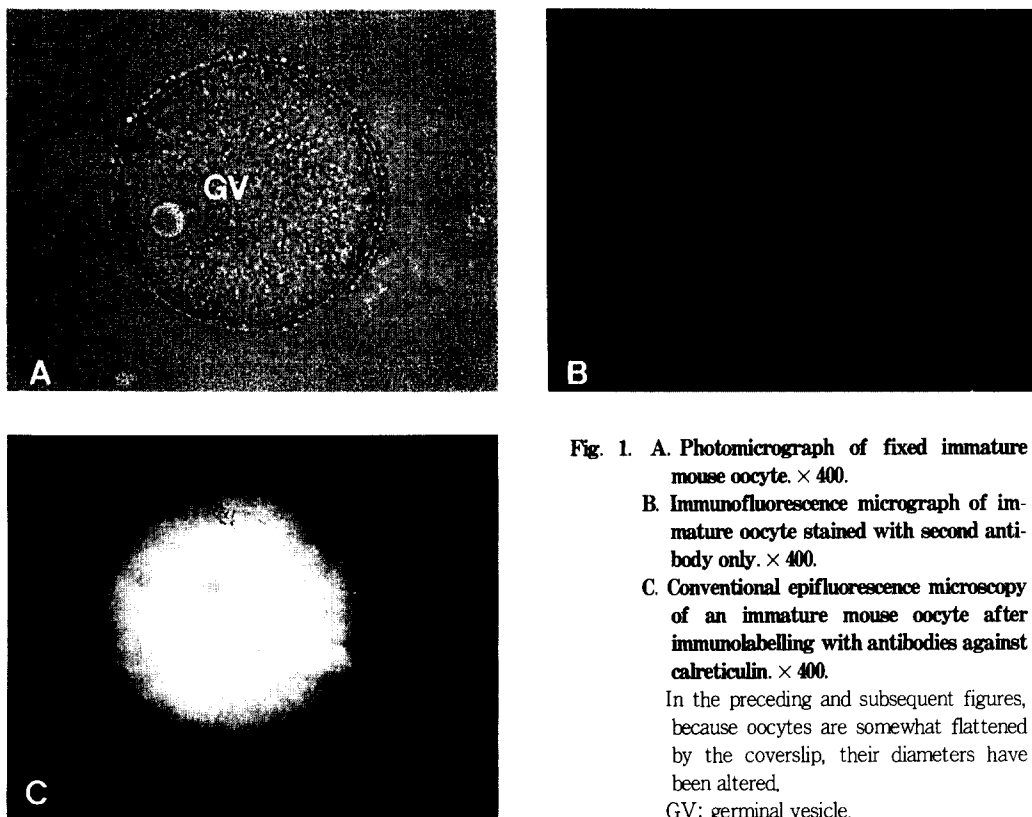


Fig. 1. A. Photomicrograph of fixed immature mouse oocyte. $\times 400$.

B. Immunofluorescence micrograph of immature oocyte stained with second antibody only. $\times 400$.

C. Conventional epifluorescence microscopy of an immature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against calreticulin. $\times 400$.

In the preceding and subsequent figures, because oocytes are somewhat flattened by the coverslip, their diameters have been altered.

GV: germinal vesicle.

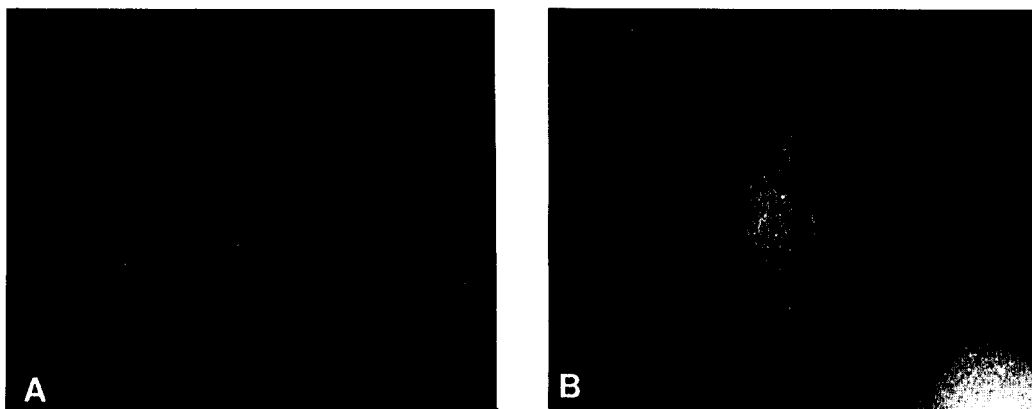


Fig. 2. Confocal laser scanning microscopy of an immature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against calreticulin.

A. One micrometer-thick optical section through the center of oocyte.

Calreticulin was barely seen except at the peri-nuclear region. $\times 400$.

B. Three-dimensional construction from confocal microscopic images. $\times 400$.

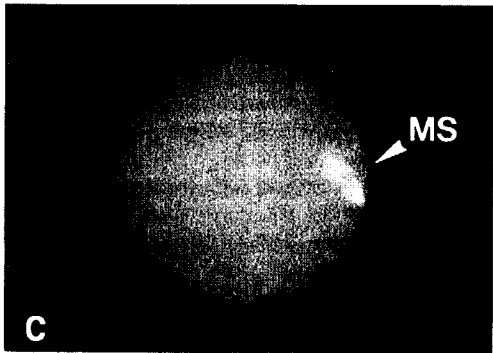
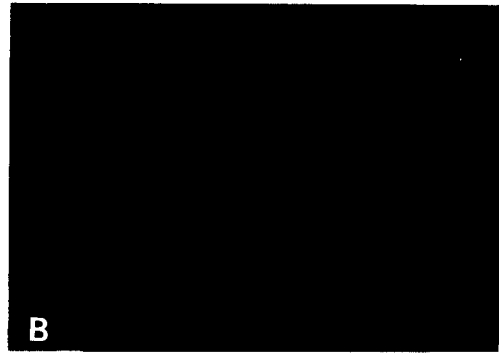
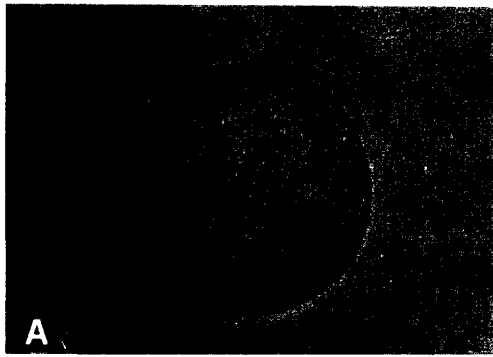


Fig. 3. A. Photomicrograph of fixed mature mouse oocyte. $\times 400$.

B. Immunofluorescence micrograph of mature oocyte stained with the secondary antibody only. $\times 400$.

C. Conventional epifluorescence microscopy of an mature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against calreticulin. $\times 400$.

MS: meiotic spindle

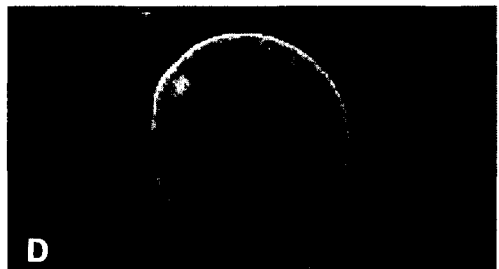
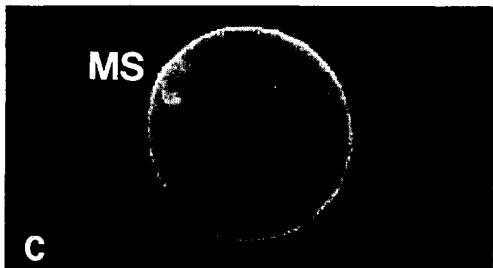
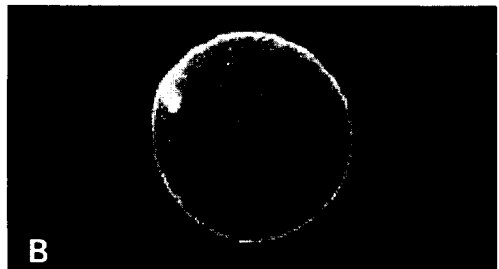
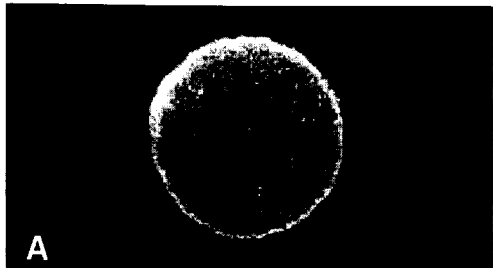


Fig. 4. Confocal laser scanning microscopy of a mature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against calreticulin.

Four $0.8\mu\text{m}$ -thick optical serial sections of the same oocyte(A, B, C, D): Note bright clusters of calreticulin present in the cortex immediately beneath the plasma membrane and the meiotic spindle. $\times 400$.

MS: meiotic spindle.

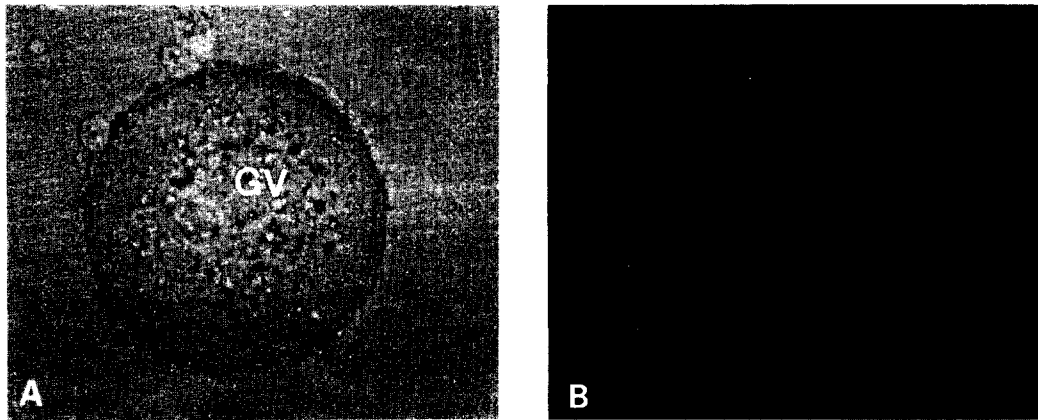


Fig. 5. A. Photomicrograph of fixed immature mouse oocyte. $\times 400$.

B. Immunofluorescence micrograph of immature oocyte stained with second antibody only. $\times 400$.

C. Conventional epifluorescence microscopy of an immature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against SERCA-ATPase. $\times 400$. GV: germinal vesicle.

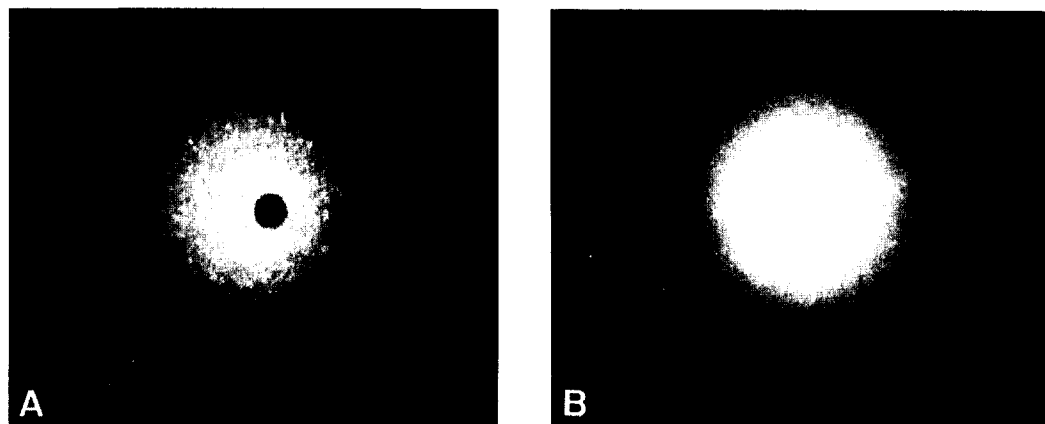
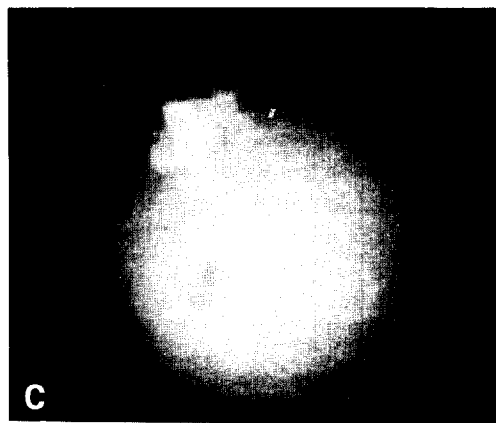


Fig. 6. Confocal laser scanning microscopy of an immature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against SERCA-ATPase.

A. One micrometer-thick confocal section through the center of oocyte; The germinal vesicle is visible as a dark area and is surrounded by a bright cluster of staining. $\times 400$.

B. Three-dimensional reconstruction from confocal microscopic images. $\times 400$.

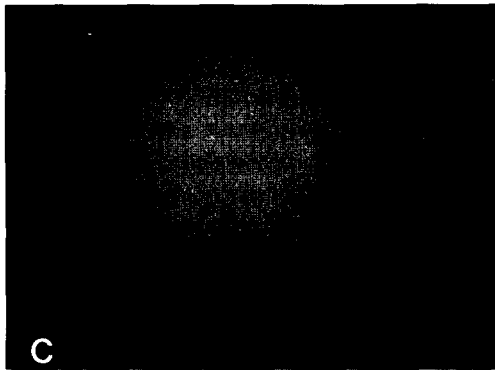
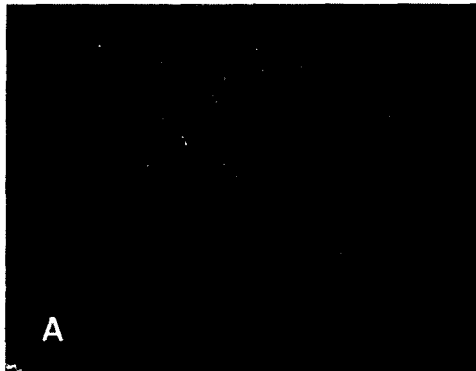


Fig. 7. A. Photomicrograph of fixed mature mouse oocyte. $\times 400$.
 B. Immunofluorescence micrograph of mature oocyte stained with second antibody only. $\times 400$.
 C. Conventional epifluorescence microscopy of a mature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against SERCA-ATPase. $\times 400$.

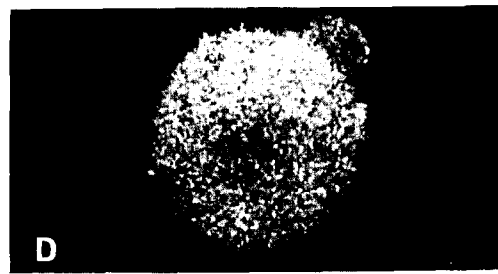


Fig. 8. Confocal laser scanning microscopy of a mature mouse oocyte after immunolabelling with antibodies against SERCA-ATPase. $\times 400$.

One micrometer-thick optical section through the center of oocyte(A, B, C, D). The cortex is more brightly stained than the deeper cytoplasm.

7) confocal microscope로 관찰한 결과 성숙 난자의 SERCA-ATPase는 세포질 안쪽에 비하여 피질(cortex)쪽에 보다 밀집하여 분포함이 관찰되었다 (Fig. 8). 그러나 성숙 난자에서 막의 바로 아래 쪽에 집중한 calreticulin의 분포와 비교하여 볼 때 SERCA-ATPase는 calreticulin에 비해 넓은 지역에 걸쳐 분산되어 분포하는 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구에서는 생쥐의 난자 성숙과정에서 일어나는 세포질적 변화 중에서 수정후 칼슘이 관여하는 활성화 반응을 유도하는 칼슘의 주 원천인 난자 내 ISCS의 분포 양상 변화를 관찰하기 위하여 ISCS에 위치하는 칼슘 결합 단백질인 calreticulin과 칼슘 저장고 내로 칼슘을 능동적으로 퍼들이는 Ca²⁺ pump인 SERCA-ATPase의 분포를 관찰하였다.

Calreticulin과 SERCA-ATPase에 대한 항체를 처리하여 면역형광염색패턴을 conventional epifluorescence microscope 및 confocal laser scanning microscope로 관찰해 본 결과 생쥐 미성숙 난자에서는 calreticulin이 핵 주위에 약간 분포함이 관찰되었고 핵 내에서는 관찰되지 않았으며 세포질에는 특별한 양상 없이 적은 양 분포하였다 (Figs. 1 & 2). 반면에 성숙 난자에서는 세포막 바로 아래쪽으로 calreticulin이 뚜렷하게 분포하였고 meiotic spindle을 따라 분포함이 관찰되었으며 그 외의 세포질에는 적은 양 고르게 분포하였다 (Figs. 3 & 4). 이와 같이 세포막 바로 아래쪽 피질에 나타나는 분포 양상은 metaphase II 시기에 있는 성숙한 생쥐 난자의 피질과립 분포(Ducibella *et al.*, 1994)와 일치하고 있어 ISCS와 수정후 난자 활성화 반응 초기에 일어나는 피질과립 분비반응과의 밀접한 연관성을 찾아볼 수 있다. 또한 제 2 감수분열 중기 (metaphase II) 시기 난자의 meiotic spindle을 둘러싸고 분포하는 calreticulin은 감수분열 말기(anaphase)의 시작과 세포질 분열이 칼슘 유동 및 spindle

과 관계되는 칼슘 결합 단백질들에 의존하여 일어난다는 보고(Kao *et al.*, 1990)와 관련이 있는 것으로 생각된다. 즉 생쥐 성숙 난자에서 calreticulin은 염색체 이동을 위한 감수분열 장치에 어떤 역할을 수행하고 있는 것으로 추측되며 성숙 난자에서 meiotic spindle 부근에서 일어나는 국부적인 칼슘 농도 증가에 따른 피질과립 부재지역(cortical granule-free domain; CGFD)의 형성시 meiotic spindle 부근에 위치한 calreticulin 등의 칼슘 결합 단백질들로 부터의 순간적인 칼슘방출과도 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한 미성숙 난자에서는 거의 나타나지 않았던 calreticulin이 성숙 난자에서 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아 난자의 성숙이 일어나는 동안 난자의 칼슘 저장고 내에 칼슘 결합 단백질들의 증가가 일어남을 추측해 볼 수 있다.

한편 SERCA-ATPase는 GV 시기의 미성숙 난자에서는 핵 주위를 둘러싸고 분포하는 양상을 보였으나 (Figs. 5 & 6) 성숙 난자에서는 피질(cortex)쪽으로는 극성이 생김이 관찰되었다(Figs. 7 & 8). 즉 세포질 안쪽에 비하여 피질쪽에 더 많이 분포하는 양상을 보이고 있는데 이는 막 근처에서 생성되는 InsP₃에 대해 보다 신속하게 반응, 칼슘을 방출함으로써 순간적으로 난자 피질쪽에 부분적인 칼슘 농도 증가를 야기하여 효율적인 피질과립 분비를 유도하기 위한 것으로 생각된다. 본 실험결과에서 ISCS의 marker로서 사용한 calreticulin과 SERCA-ATPase는 생쥐 난자 성숙이 일어나는 동안 세포 중심부에서부터 세포 바깥쪽, 즉 피질쪽으로 축적되는 양상을 공통적으로 나타내고 있으며 다만 SERCA-ATPase는 칼슘 농도 증가가 필요한 위치에 집중적으로 분포한 calreticulin에 비해 광범위하게 분포하는 것으로 나타났다. 난자내 칼슘 저장고의 이 같은 분포 양상은 성숙 동안 일어나는 피질쪽 membrane vesicle 수의 증가(Ducibella *et al.*, 1988a), cortical ER의 양적 증가와 피질과립 주위로의 ER 이동(Mehlmann *et al.*, 1995; Shiraishi *et al.*, 1995) 등과 연관지을 수 있는 것으로, 이들은 모두 성숙시 일어나는 칼슘 저장고의 피질쪽 이동을 시사하고 있다.

한편 여러 종의 난자를 재료로 한 실험 결과에서 미성숙 난자와 성숙 난자는 수정시 야기되는 Ca^{2+} transient의 peak 크기, 지속 시간 및 빈도와 방출하는 칼슘의 양 등에 있어서 매우 큰 차이를 나타내고 있는데 (Mehlmann & Kline, 1994), 동일한 자극에 대해 미성숙 난자와 성숙 난자가 나타내는 이 같은 칼슘 분비 양상의 차이는 미성숙 난자와 성숙 난자의 $InsP_3$ receptor 수의 차이, $InsP_3$ receptor의 sensitivity 차이, 칼슘 저장고에 저장된 칼슘의 양적 차이, 칼슘 저장고의 세포 내 위치 차이 등 몇 가지 가능성을 생각해 볼 수 있으며 이와 같은 조건들이 난자의 세포질 성숙이 일어나는 동안 갖추어짐으로써 난자가 정상적인 수정후 활성화 반응을 수행할 수 있는 능력을 갖추게 되는 것으로 생각된다. 특히 세포질내 칼슘 함량의 변화는 분비(exocytosis)를 조절하는 protein kinase C의 활성화에 연관된다는 것이 생쥐에서 보고되었으며(Colonna *et al.*, 1989) protein kinase C activator를 처리함으로써 미성숙 난자에서도 피질과립 분비를 자극할 수 있음이 관찰되어 난자의 칼슘 신호전달계의 발달과 피질과립 분비반응과의 밀접한 연관성을 시사하고 있다. 한편 Ducibella 등(1988b)은 성장한 배란전 여포에서 꺼낸 생쥐 GV 시기의 난자가 피질과립의 수나 위치에 있어서 배란된 metaphase II 난자와 비교하여 부족함이 없음을 확인함으로써 미성숙 난자에서 피질과립 반응이 제대로 일어나지 못하는 것은 피질과립 자체의 문제보다도 미성숙 난자에서의 칼슘 분비 기작의 미성숙(immaturity)에 그 원인을 둘 수 있다고 하였다. 즉 난자 성숙과 관련한 칼슘 분비기작의 발달은 난자가 피질과립 반응을 수행할 수 있는지의 여부를 결정하는 가장 중요한 요인으로 생각되고 있다.

본 연구에서 관찰한 칼슘 저장고의 피질쪽 축적 현상은 난자가 수정에 의한 활성화 반응 중에서 초기에 일어나는 피질과립 분비반응에 대비하여 순간적인 칼슘농도 증가가 필요한 곳에 칼슘 저장고를 밀집시키게 되는 것으로서, 성숙시 일어나는 칼슘 분비기작의 발달에 포함되는 것으로 생각된다. 즉, phospholipase C(PLC)가

원형질막에 집중하여 분포함(Berridge, 1993)을 감안해 볼 때 칼슘 저장고가 난자의 피질쪽으로 분포하는 것은 수정시 정자의 자극으로 생기는 $InsP_3$ 에 대해 효과적으로 보다 신속하게 반응하기 위한 방법이 될 수 있으며 이는 성숙시 필수적으로 일어나야 하는 난자의 세포질적 변화인 것으로 보인다.

이 같은 변화는 피질과립 분비반응을 포함하여 수정 후 칼슘이 유도하는 활성화 반응의 수행능(activation competence)에 있어 큰 변화를 가져다 줄 것으로 생각되며 이에 따라 세포질내 칼슘 저장고의 분포 양상은 정상적인 수정 반응을 수행할 수 있는 난자의 세포질 성숙도를 평가할 수 있는 하나의 척도로서도 의미를 가질 것으로 사료된다.

요 약

포유동물에서 난자의 성숙은 제 1 감수분열 전기에 정지하여 있던 난자가 감수분열을 재개하여 제 2 감수분열 중기에 이르는 핵성숙과 더불어 수정 및 배 발생에 필수적인 세포질적 변화인 세포질 성숙을 포함한 복잡한 과정이며 이는 정상적인 수정을 위한 필수적인 조건이다.

본 연구에서는 난자의 세포질 성숙시 일어나는 변화 중 난자내 칼슘신호전달계의 발달을 이해하기 위하여 생쥐 미성숙 난자와 성숙 난자에서 세포질내 칼슘 저장고의 분포 양상을 비교 관찰하였다.

세포질 내에 위치한 칼슘 저장고 중에서 특히 수정시의 칼슘 분비에 관여하는 $InsP_3$ -sensitive Ca^{2+} store (ISCS)에 위치한 Ca^{2+} ATPase 및 calreticulin에 대한 항체를 사용하여 간접 면역형광염색법으로 ISCS의 분포를 관찰한 결과 calreticulin은 미성숙 난자에서 특별한 양상없이 약간씩 고르게 분포하다가 성숙후 원형질막 아래쪽 피질과 방추사를 둘러싸고 뚜렷하게 축적되었으며 Ca^{2+} -ATPase 역시 미성숙 난자의 핵을 중심으로 세포질 가운데 집중하여 분포하던 것이 성숙 난자에서 피질쪽으로 축적된 분포 양상을 나타내었다.

난자의 성숙과정 동안 일어나는 이 같은 칼슘 저장고의 분포 변화는 난자 성숙시 필수적으로 일어나야 하는 세포질적 변화중 하나인 것으로 생각되며 이는 피질과립 분비반응을 포함하여 수정시 칼슘 분비에 의해 유도되는 활성화 반응의 효과적인 수행능과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

인용문헌

- Busa WB, Nuccitelli R (1985): An elevated free cytosolic Ca²⁺ wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus laevis*. J Cell Biol 100:1325-1329.
- Berridge M-J (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361:315-325.
- Cho WK, Stern S, Biggers JD (1974): Inhibitory effect of dibutyl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. J Exp Zool 187:383-386.
- Clapham DE (1995): Calcium signalling. Cell 80:259-268.
- Colonna R, Tatone C, Malgaroli A, Eusebi F, Mangia F (1989): Effects of protein kinase C stimulation and free Ca²⁺ rise in mammalian egg activation. Gamete Res 24:171-183.
- Cuthbertson KSR., Whittingham DG, Cobbold PH (1981): Free calcium increase in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature 294:754-757.
- Ducibella T (1996): The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. Human Reprod Update 2:29-42.
- Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Albers J, Rangarajan S (1988a): Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. Dev Biol 30:184-197.
- Ducibella T, Duffy P, Buetow J (1994): Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. Biol Reprod 50:467-473.
- Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B (1990): Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. Biol Reprod 43:870-876.
- Ducibella T, Rangarajan S, Anderson E(1988b): The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. Dev Biol 130:789-792.
- Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H, Miyazaki S (1993): Development of inositol triphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. Dev Biol 156:69-79.
- Han JK, Nuccitelli R (1990): Inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release in the organelle layers of the stratified, intact egg of *Xenopus laevis*. J Cell Biol 110:1103-1110.
- Iwamatsu T, Chang MC (1972): Sperm penetration in mouse oocytes at various times during maturation. J Reprod Fert 31:237-247.
- Kao JP, Alderton JM, Tsien RY, Steinhardt RA (1990): Active involvement of Ca²⁺ in mitotic progression of swiss 3T3 fibroblasts. J Cell Biol 111:183-196.
- Kline JT, Kline D (1994): Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Evidence for inositol triphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. Biol

- Reprod 50:193-203.
- Kline D, Kline J (1992): Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 149:80-89.
- Kline D, Stewart-Savage J (1994): The timing of cortical granule fusion, content dispersal, and endocytosis during fertilization of the hamster egg: An electrophysiological and histochemical study. *Dev Biol* 162:277-287.
- Mehlmann LM, Kline D (1994): Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Calcium release in response to sperm or inositol triphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol Reprod* 51:1088-1098.
- Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA, Kline D (1995): Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 170:607-615.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y (1993): Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158:62-78.
- Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, Mikoshiba K (1992): Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the Inositol 1,4,5-tri-phosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 257:251-254.
- Rossier MF, Putney JW (1991): The identity of the calcium-storing, inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive organelle in non-muscle cells: calciosome, endoplasmic reticulum or both? *Trends in neuroscience* 14:310-314.
- Sathanathan AH, Trounson AO (1982): Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized *in vitro*. *Gamete Res* 6:225-234.
- Shiina Y, Kaneda M, Matsuyama K, Tanaka K, Hiroi M, Doi K (1993): Role of the extracellular Ca^{2+} on the intracellular Ca^{2+} changes in fertilized and activated mouse oocytes. *J Reprod Fert* 97:143-150.
- Shiraishi K, Okada A, Shirakawa H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Miyazaki S (1995): Development changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial patterns of Ca^{2+} release during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 170:591-606.
- Stewart-Savage J, Bavister BD (1988): A cell surface block to polyspermy occurs in golden hamster eggs. *Dev Biol* 128:150-157.
- Volp Pompeo, Krause K-H, Hashimoto S, Zorzato F, Pozzan T, Meldolesi J, Lew DP (1988): "Calciosome", a cytoplasmic organelle: The inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store of nonmuscle cells? *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85:1091-1095.