

pFF-PMSG배지에서 돼지미성숙란의 체외배양시 Histone H1 Kinase 활성

장규태 · 박미령* · 윤창현*

콜롬비아 의과대학 해부학 및 세포생물학교실

Histone H1 Kinase Activity during Meiotic Maturation of Porcine Oocytes Matured in pFF-PMSG

Chang, K. T., M. R. Park* and C. H. Yun*

Department of Anatomy & Cell Biology, College of Physicians & Surgeons,
University of Columbia, USA

SUMMARY

Porcine follicular oocyte, collected from antral follicles (2~5 mm in diameter) of gilt ovaries were matured *in vitro* porcine follicular fluid (pFF) with PMSG (pFF-PMSG) buffer with at 37 °C under 5 % CO₂ in air their ability of maturation promoting factor (MPF), of GV and GVBD formation was examined followed during time after *in vitro* culture. Formation of second meta-phase was observed in 57.6 % and 71.2 % of matured in with pFF-PMSG buffer to 45 and 50 hours after *in vitro*. Porcine oocytes cultured in pFF-PMSG for various periods of up to 30 hours were stained with Hoechst-33342 and classified according to maturation before assaying. Histone H1 kinase (H1K) activity was assayed during meiotic maturation in porcine oocytes matured in pFF-PMSG buffer *in vitro*. In oocytes matured in pFF-PMSG, H1K activity was at the 30 hours after culture and increased about 15 fold than at the germinal vesicle stage with before at the cultured *in vitro*. This pattern is similar to those reported in non-mammalian species and supports the concepts that H1K is ubiquitous in eukaryotes and controls the meiotic cell cycle in mammals. These results suggest that the maturation pFF-PMSG buffer used influences the fluctuation pattern of H1K activity and biological characteristics of porcine oocytes cultured *in vitro*.

(Key words: Porcine oocyte, pFF-PMSG, CHX, H1K)

I. 서 론

본 실험의 목적은 돼지란의 성숙과정에 있어서 제어 기구를 해명하는데 있어서는 먼저 난의 안정적인 체외 성숙 배양체계가 필수불가결하다. 그러한 배양계는 성

숙란의 유기와 자극후 생리적인 시간경과에 따라 MPF가 활성화 되어질 수 있는 배양계가 아니면 거의 불가능한 것으로 보고하고 있다. Naito 등 (1988)은 돼지란의 체외성숙배지로서 돼지의 난포액 (porcine follicular fluid : pFF)에 1 IU/ml의 PMSG를 첨가한 pFF-PMSG에서 배양하면 체내 (*in vivo*) 성숙

*경상대학교 축산진흥연구소(Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University)

에서와 거의 같은 시기에 GVBD가 시작되어지는 (Hunter와 Polge, 1966) 일련의 핵상변화가 정상적으로 유도되어질 뿐 아니라 성숙의 개시시에 수반되어지는 MPF의 활성화가 일어난다고 보고하고 있다 (Naito와 Toyoda, 1991; Naito 등, 1992). 또한 체외성숙란에서는 체내 성숙란과 비교하여 아주 높은 자발적 활성화 (spontaneous activation)를 유발하는 것으로 알려져 있지만 pFF-PMSG에서 성숙시킨 난에 있어서는 이러한 자발적 활성화율이 낮아진다고 보고하고 있다. 그리고, pFF-PMSG에서 성숙시킨 난을 수정시키면 80 % 이상의 난에서 형태적으로 정상적인 응성전핵이 형성되어지고 그 후 2세포기까지도 정상적으로 발생되어진다고 보고하였다 (Naito 등, 1989). 이상과 같이, pFF-PMSG에서의 난성숙은 생리적 조건에 거의 가깝다고 볼 수 있으며 또한 생리적인 난성숙 과정에 있어서의 기구를 재현하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서는 pFF-PMSG를 이용한 체외배양계에 있어서 난성숙 과정의 진행을 경시적으로 확인하는 것을 목적으로 하였고, Kubelka 등 (1988)과 Yamachi 등 (1995)에 의하여 보고되어진 바와 같이 단백질 합성저해제에 의한 난성숙의 저해가 pFF-PMSG를 사용한 본 실험계에서도 일어날 경우 단백질 합성저해제가 MPF의 활성화를 억제하는지, 만약 MPF의 활성화가 억제되어진다면, 새롭게 합성되어진 단백질은 난성숙유기의 자극으로부터 MPF 활성화의 signal cascade에 필요하다는 것을 알 수 있을 것이며 역으로 MPF가 억제되어진다면 signal cascade에 단백질 합성은 불필요하게 된다는 것을 알 수 있을 것으로 기대되어진다. 돼지란의 성숙과정에 있어서 GV란의 단백질 합성저해제에 의한 MPF활성이 저해된다는 것은 Kubelka 등 (1995)에 의하여 보고되어진 바 있으나 이 점에 관하여서도 pFF-PMSG 배양계에 의하여 확인되어질 수 있을 것이며 또한 단백질 합성저해 처리제에 의하여 난성숙의 저해현상이 어떻게 하여 일어나는지, 난 내부에 어떤 변화가 일어나는지를 검토하기 위하여 분열기에 있어서 염색체 및 미소관의 형태에 미치는 영향을 검토하였다. 만약, pFF-PMSG배양계에 이상출현이 확인될 경우 세포골격의 기능을 조절하는 인자가 난성숙 개시 자극으로부터 GVBD까지의 과정에 관여하고 있을 가능성이 매

우 높은 것으로 생각된다. 그리하여 본 실험에서는 MPF 활성화에 미치는 signal cascade를 구성하는 인자는 단백질 합성저해제에 의하여 그 기구가 저해 또는 억제되어지는지를 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난의 채취 및 체외성숙

도축장에서 채취한 돼지 난소를 37~39 °C의 생리식염수(0.85 %)에 담구어 연구실까지 (2 시간 이내) 운반하고 직경 2~5 mm의 포상난포로부터 25 guage의 needle로 흡입하여 난자난구 복합체를 회수하였다. 회수한 난자난구 복합체는 Bovine serum albumin (fraction V : Wako)을 4 mg/ml의 농도에서 Modified Krebs-Ringer Bicarbonate solution (mKRB)(Toyoda 등, 1971)에서 세척하였다. 그 과정에서 2~3중의 균일한 난구세포에 싸여 있는 난의 직경이 120 μ m 정도까지 충분히 성장하고 있는 난자난구 복합체만을 선별하여 배양하였다. 세척 및 배양은 mineral oil로 피복한 IWAKI 멸균 샤알레내의 배지 액중에 옮겨 성숙배지에는 PMSG(Peamex, Sankyo) 1 IU/ml을 포함한 pFF(pFF-PMSG)를 사용하고 37 °C 5 % CO₂하에서 각각 0, 10, 20, 25, 30, 40, 45 및 50 시간 배양후, 난을 slide glass와 cover glass에 압착하고 메탄올과 acetic acid를 3:1의 비율로 혼합한 고정액에서 1~3일간 고정한 후 0.75 % acetic acid에서 염색하였다. 이렇게 작제한 whole mount 표본을 위상차 현미경하에서 관찰하고 핵상으로부터 GV, 제1감수분열전기 (first prometaphase: PM1), 제1감수분열중기 (first metaphase: M 1), 제1감수분열후기~종기 (first anophase-telephase: AT 1) 및 M 2의 각 시기별로 분류하여 조사하였다.

2. 단백질 합성 저해제 cycloheximide(CHX) 첨가의 영향

도축장에서 채취한 돼지난소를 생리식염수에서 세척하고 직경 2~5 mm의 난포로부터 난자난구 복합체를 흡입하는 방법으로 회수하였다. mKRB에서 다시 세척한 후 PMSG 1 IU/ml를 포함한 pFF-PMSG 배지에서 37 °C, 5 % CO₂ 조건하에서 배양하였다. 실험

험 1군으로서는 회수하여 세척한 난자난구복합체를 10 μ g/ml의 cycloheximide (CHX, 35.5 μ mol/l)를 포함한 pFF-PMSG를, 대조군으로서는 중류수 5 μ l/ml를 첨가한 pFF-PMSG에서 각각 0, 30 및 45 시간 동안 각각 배양하였다. 실험 2군으로서는, pFF-PMSG배지에 0, 10, 20, 30 및 40 시간 배양후 10 μ g/ml의 CHX를 함유한 pFF-PMSG에 이동하여 각각 50, 40, 30, 20 및 10 시간씩 총 50 시간 각각 배양하였다. 마지막으로 pFF-PMSG에서 30 시간 배양 후 10 μ g/ml의 CHX를 포함한 pFF-PMSG에 이동하여 5~10 시간동안 배양하였다. 각 실험군은 배양 종료후 mKRB 중에서 0.1% hyaluronidase(실온, 2~3분) 처리 및 pipetting에 의하여 난구를 제거하고 orsellin acetic acid에서 염색하고 whole mount sample을 제작하여 난성숙시 일어나는 핵상을 관찰하였다.

3. 면역형광염색법에 의한 미소관의 검출

각 실험의 배양종료 후 mKRB중에서 0.1% hyaluronidase (실온 2~3분 처리) 처리 및 pipetting에 의하여 난구를 제거한 난들은 10% 포르말린에 침적시키고 천천히 진동하면서 4 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 고정하였다. 0.1% Triton X-100 (Sigma)을 포함한 PBS의 solution의 실온에서 여과처리를 10 분간 실시한 후 0.1% Tween 20 (Sigma)을 포함한 PBS (PBS-T)에서 5 분간씩 3회 세척하였다. 또한 free aldehyde기를 blocking하기 위하여 0.1% glycine을 포함한 PBS-T에 30분간 침적한 후 다시 PBS-T에서 5 분간씩 3회 세척하여 3% BSA를 포함한 PBS-T배지로 20배 희석한 항 α -Tubulin monoclonal 항체 (YL 1/2; Biosys)를 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 그리고 2차 항체로서는 3% BSA를 포함한 PBS-T에서 40배로 희석한 Tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate (TRITC) 결합 goat 항 rat IgG 항체 (organon, Teknika)와 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 다음 PBS-T에서 5분간씩 3회 세척한 후 염색체를 Hoechst-33342 (Sigma)를 10 μ g/ml포함한 PBS에서 15 분간 37 $^{\circ}$ C에서 염색을 실시하였다. 고정 반응의 전과정은 moisture chamber내에서 실시하고 plastic 샤알레에서 반응을 행하였다. 또 2차 항체반응은 차광조건하에서 행하였으며, 염색종료후 mount-

ing medium (VECTASHILD; vector)에 봉입하고 형광현미경 (Olympus, BHS-RFC)하에서 관찰하여 Fujichrome proVIA film(ASA 1600)으로 촬영하였다.

4. 난적출액의 조제

각각의 배양시간에 따라 배양한 난을 함께 모으고 적출 buffer (15 mM EGTA, 60 mM sodium β -glycerophosphate, 30 mM P-nitro-phenyl phosphate, 25 mM MOPS, 15 mM MgCl₂, 0.2 mM Na₃VO₄의 용액에 2 μ g/ml의 leupetin, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 50 μ M P-aminobenzoic acid (PABA), 1 mM dithiothreitol (DTT)를 사용 직전에 첨가한 pH 7.2의 용액 중에 2회 세척 후 동일한 신선한 buffer 5 μ l중에 난자가 50개씩 포함되게 한 후 -70 $^{\circ}$ C에 보존하였다. 그리고 이 stock용액은 kinase 활성 측정시 사용하였다.

5. Histone H1 Kinase 활성의 측정

Histone H1 Kinase 활성의 측정은 Naito와 Toyoda (1991)의 방법에 준하였다. Kinase 활성 측정 용액은 1% nonidet P-40을 가한 후, 적출 buffer로서 희석하고 3회 동결용해를 반복한 sample용액을 사용하였다. 5 μ l의 sample용액에 기질로서 5 mg/ml의 Histone H1(Type III-S; Sigma) 5 μ l, 2.5 μ M의 PKA inhibitor (TTYADFIASGRTGRRNAIHD; Sigma) 5 μ l, 100 μ M [γ -³²P]dATP (0.4 mCi/ml) 5 μ l 및 마지막으로 적출 buffer 5 μ l를 가하여 전량을 25 μ l되게 하여 한 vial당 난의 수는 10개 정도 되게 하였다. 반응온도는 37 $^{\circ}$ C에서 20 분간 실시하였고 20% trichloroacetic acid (TCA) 400 μ l 및 1% BSA 100 μ l를 가하여 반응을 정지시키고 15,000 rpm에서 5 분간 원심을 실시한 후 상층액을 제거한 후 침전물은 같은 TCA용액에서 3회 세척하였다. 최종적으로 1N NaOH용액 200 μ l로 침전물을 용해한 후 2~24 시간 실온에 정치한 후 1 ml의 Scintillation (ACS II; Amersham)을 더한 후 액체 Scintillation Counter (LSC-1000; AROKA)에서 비활성치를 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 돼지 미성숙란의 체외성숙

Table 1에서 보는 바와 같이 난소로부터 채취하여 배양 후 10 시간째의 난은 전부 GV를 함유하고 있는 미성숙란이었으며 난성숙 재개시의 지표가 되는 GVBD를 유기하는 PM 1, 즉 M 1기에 진행하고 있는 난은 배양 후 20 시간째 각각 1.1 및 8.0 %로서 극히 낮은 수치였고, 배양 후 25 시간째는 PM 1기의 난이 11.6 %, M 1기의 난이 18.8 %로 각각 증가하였다. 그리고 30 시간째는 54.1 %의 난에서 M 1기의 핵상이 나타났으며, 반면 AT 1기의 경우는 1.3 %, M 2기의 난에 해당되어지는 경우는 0.6 %였다. 또한 배양 30 시간째 Histone H1 kinase 활성(*in vitro*에 있어서 MPF활성을 나타내는 지표)은 배양 "0" 시간과 비교하였을 때 GV란이 약 15배 정도 증가하였고 (Fig. 1), 이러한 결과는 Naito와 Toyoda(1991)의 보고와 거의 일치하는 경향이었으며 본 실험에서도 성숙개시시에 수반되어지는 MPF의 활성 상승이 확인되었다. 배양 후 40 시간째는 AT 1기의 난이 31.9 %로서 제 1극체 (first polar body : PB1)를 방출하는 난이 많은 것으로 나타났고 배양후 45 및 50 시간째에는 M 2기의 난이 각각 57.6 %와 71.2 %를 나타나 체외성숙은 거의 50 시간째에 완료되어지는 것으로 나타났다.

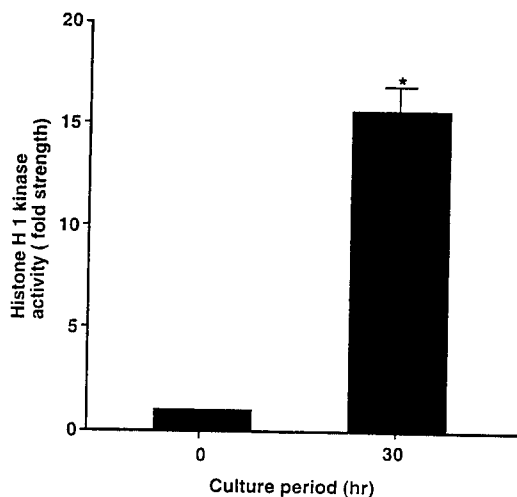


Fig. 1. Changes in histone h1 kinase activity in porcine oocytes cultures in pFF-PMSG for 30 hr. Data are expressed as fold strength of control (GV oocytes cultured for 0 hr) and as ANOVA results with an asterisk indicating a statistical differences ($P < 0.05$) between 0 and 30 hr cultured oocytes. Data are shown as the mean \pm SEM from three experiments

Table 1. Maturation stages of porcine oocytes cultured *in vitro*

Culture period(hr)	Total No. of oocytes	No. of experiments	No. (%) of oocytes at the stage of				
			GV	PM1	M1	AT1	M2
0	50	4	50(100)	0	0	0	0
10	58	3	58(100)	0	0	0	0
20	87	6	79(90.8)	1(1.10)	7(8.00)	0	0
25	69	4	48(69.6)	8(11.6)	13(18.8)	0	0
30	159	6	59(37.1)	12(7.50)	86(54.1)	2(1.30)	1(0.60)
35	85	4	22(25.9)	3(3.50)	41(48.2)	13(15.3)	6(7.10)
40	47	3	7(14.9)	1(2.10)	16(34.0)	15(31.9)	8(17.0)
45	99	6	15(15.2)	0	14(14.1)	13(13.1)	27(57.6)
50	59	4	6(10.2)	1(1.70)	7(11.0)	3(5.10)	42(71.2)

Porcine oocytes were cultured in porcine follicular fluid supplemented with PMSG (1 IU/ml) (pFF-PMSG) for various periods up to 50 hr. GV:germinal vesicle, PM1: first prometaphase, M1: first metaphase, AT1: first anaphase-telophase, M2: second metaphase.

Table 2. Maturation stages of porcine oocytes cultured with cycloheximide for 30 hr or 45 hr

Cultured period and condition	Total No. of oocytes	No. (%) of oocytes at the stage of		
		GV	M1	M2
30 hr (+DW)	31	2 (6.50)	28(90.3)	1 (3.20)
30 hr(+CHX)	38	35 (92.1)*	3 (7.90)*	0
45 hr (+DW)	26	2 (7.70)	0	24(92.3)
45 hr (+CHX)	43	43(100)*	0	0

Porcine oocytes were cultured in pFF-PMSG for 30 or 45 hr, and transferred to pFF-PMSG containing CHX (10 µg/ml) (+CHX) or distilled water (5 µl/ml) (+DW). Values with an asterisk in the same column were significantly different ($P < 0.01$) with χ^2 test. CHX: cycloheximide, GV: germinal vesicle, M1: first metaphase, M2: second metaphase.

2. 단백질 합성저해제 cycloheximide(CHX) 첨가가 난성숙에 미치는 영향

CHX 첨가배지에서 30 및 45 시간 배양하였을 경우 감수분열의 재개가 저해되어지는 것으로 나타났는데 배양 30 시간에서는 92.1 %, 45 시간째에 있어서는 100 %의 난이 GV기에서 정지하는 현상을 보였다 (Table 2).

이러한 결과는 Kubelka 등 (1988) 및 Yamauchi 등 (1995)의 보고와 거의 일치하는 경향이었으며, 반면 대조구로서 distilled water (DW)를 첨가하였을 경우는 정상적으로 난 성숙이 진행되었으며 배양후 30 시간에는 90.3 %가 M 1기, 45 시간에는 92.3 %가 M 2기의 핵상으로 각각 나타났다.

한편, 정상적인 성숙과정의 진행에 필요한 단백질의 합성기를 검토하기 위하여 배양개시 후 10, 20, 30 및 40 시간째에 CHX 첨가 배지에 난을 이동하여 역으로 40, 30, 20 및 10 시간씩 배양을 실시한 합계 총 50 시간씩 배양시킨 결과 Table 3에서 나타난 바와 같이 배양 0, 10 및 20 시간째부터 CHX 처리에 의하여 100 및 86.1 %의 난에서 GVBD가 억제되었다. 배양 후 30 및 20 시간째 CHX 첨가 배지에서 배양을 실시한 결과로서는 18.3 % 및 3.3 %가 각각 정상적인 AT 1, M 2의 핵상을 나타내었지만, 55.1 %의 난이 M 1에서 정지하는 현상을 나타내었다. 이러한 난에서는 M 1기에서 (Fig. 2a, b) 방추체를 형성할 뿐 아니라, 염색체가 밀집하고 cluster상의 구조를 나타내고 있었다 (Fig. 3a). 또한, 미소관도 cluster상이 염색체 주변

Table 3. Maturation stages of porcine oocytes cultured with cycloheximide for various periods

Culture condition	Total No. of oocytes	NO. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	PM1	M1*	AT1	M2
-CHX+CHX						
0 hr	63	63(100) ^a	0	0	0	0
10 hr+40 hr	75	75(100) ^a	0	0	0	0
20 hr+30 hr	36	31(86.1) ^b	1(2.80)	4(11.1)	0	0
30 hr+20 hr	60	14(23.3) ^c	0	33(55.1)	11(18.3)	2 (3.30)
40 hr+10 hr	59	10(16.9) ^c	0	2 (3.40)	3 (5.10)	44(74.6)
50 hr+ 0 hr	45	1 (2.21) ^d	0	0	2 (4.40)	42(93.3)

Porcine oocytes were cultured in pFF-PMSG for 10, 20, 30 or 40 hr, and transferred to pFF-PMSG containing CHX(10µg/ml), then cultured for another 40, 30, 20 or 10 hr, respectively. *: These M1 oocytes contained clustered chromosome, a~d: value with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.05$) with χ^2 test. CHX: cycloheximide, GV: germinal vesicle, PM1: first prometaphase, M1: first metaphase, AT1: first anaphase-telophase, M2: second metaphase.

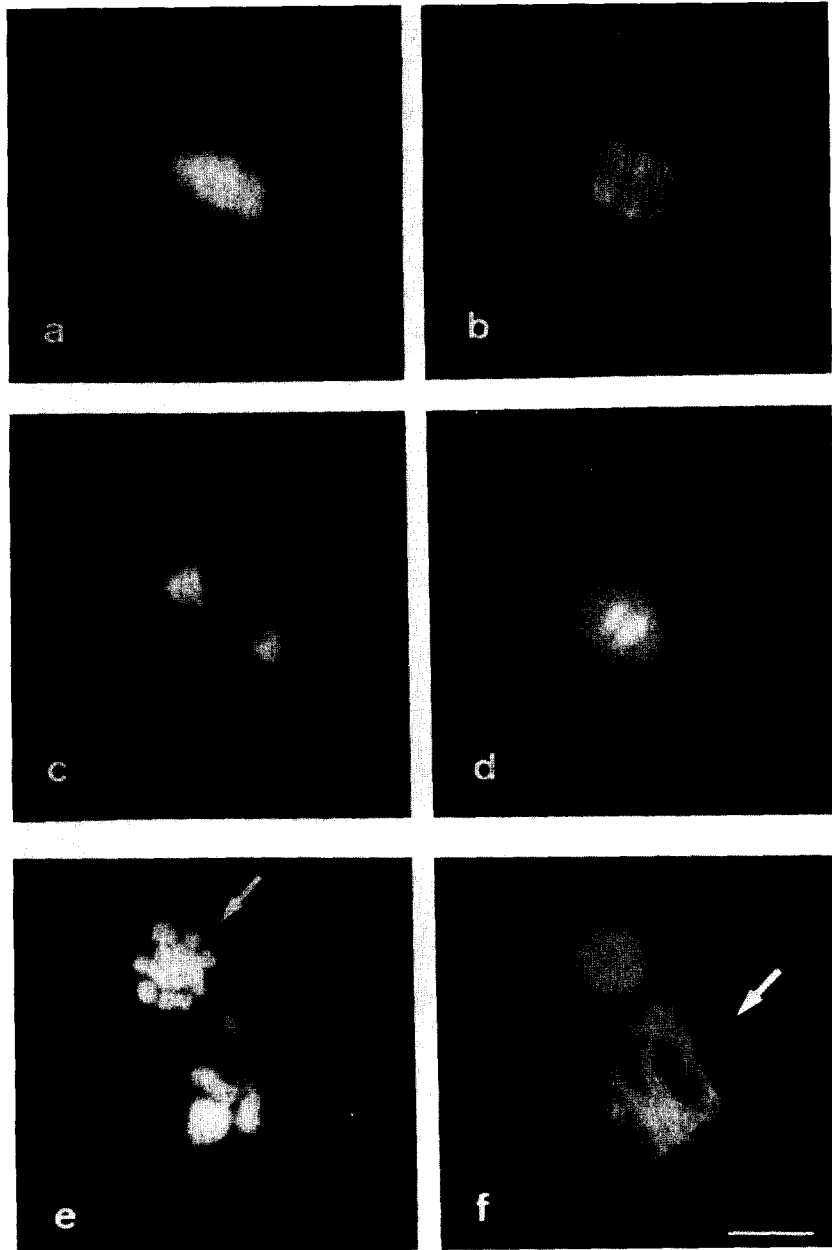


Fig. 2. Nuclear status of porcine oocytes cultured in pFF. Oocytes cultured in pFF were fixed at different stages of maturation and double stained with both Hoechst-33342 for the chromosomes (a, c, e), and indirect immunofluorescence of anti- α -tubulin antibody (b, d, f). (a, b) the first metaphase at 30 hr of culture. As shown in (a), chromosomes were aligned linearly along the equatorial plane. (c, d) the first anaphase/teelophase at 40 hr. (e, f) the second metaphase at 48 hr. Chromosomes in the spindle (arrow in (e)) were arranged on the equatorial plane in a circle. Arrow in (f) shows the microtubules in the excluded first polar body. Each pair of photographs (a-b, c-d, e-f) was taken in a same oocyte. Scale bar represents 5 μ m

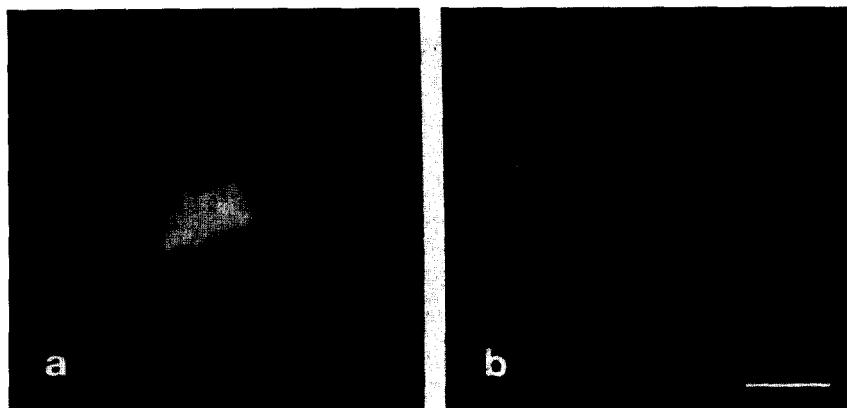


Fig. 3. Morphological abnormalities of chromosomes and spindle in porcine oocytes cultured in cycloheximide-supplemented pFF. Oocytes were cultured in pFF for 30 hr, transferred to cycloheximide-supplemented ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) pFF and cultured for another 20 hr. Double stain was performed as described in figure 2. (a) clustered chromosomes, (b) irregularly gathered microtubules. No clear spindle was seen. Scale bar represents $5\mu\text{m}$

에 불규칙적으로 밀집하여 있는 현상도 볼 수 있었다 (Fig 3b). 배양 40 시간째부터 CHX를 처리한 난에서는 79.7%가 정상인 AT 1 및 M 2의 핵상을 나타내었고 배양 30 시간째부터는 단백질 합성 저해제 처리에서만 나타나는 염색체의 cluster현상이 CHX첨가 후 5 시간 이내에 대부분이 cluster상 염색체상으로 나타났다 (Fig. 4).

이상과 같이 염색체의 형태변화가 장시간 (20 시간) CHX에 노출되어짐에 따라 난의 퇴행이 일어나는 것이 고찰되었으며 배양후 30 시간째 상승하고 있던 (Fig. 1) Histone H1 kinase 활성도 CHX 처리에 의하여 저해되는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 배양개시 후 0, 10, 20, 30 및 40 시간째 CHX를 첨가한 배지에서 배양한 난에서는 0 시간째와 비교 검토한 결과 유의적인 활성치는 나타나는 않았다 (Fig. 5). 이상의 결과로서, 단백질 합성저해제 (CHX) 처리에 의하여 난의 성숙 개시 및 M 1/M 2기의 이행이 저해되어지는 현상을 확인하였으며, 특히 M 1에서 성숙이 저해된 난에 있어서는 염색체가 equatorial plane (적도면)상에 방추체가 정렬되어지는 현상은 전혀 나타나지 않을 뿐 아니라 cluster상도 전혀 나타나지 않았다. 또한 미소관도 이 cluster상의 염색체 주변에 불규칙하게 나타나는가 하면 방추체의 형태가 이상형태적으로

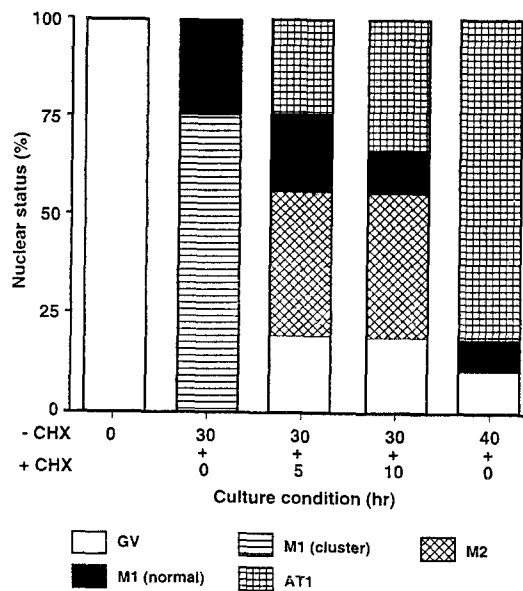


Fig. 4. Nuclear status of porcine oocytes cultured in each condition. Number of examined oocytes are expressed at the top each column. GV : germinal vesicle, M1 : first metaphase, AT1 : first anaphase-telophase, M2 : second metaphase, cluster : clustered chromosome

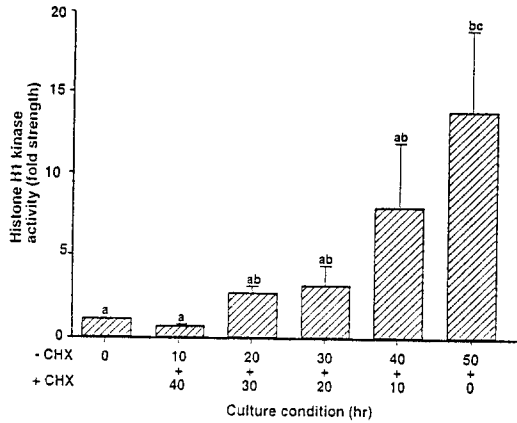


Fig. 5. Changes in histone H1 kinase activity in porcine oocytes cultured in each condition. Data are expressed as fold strength of control (GV oocytes cultured for 0 h) and as ANOVA results with different letters indicating a statistical differences ($P < 0.05$) between treatments. Data are shown as the mean \pm SEM from at least three experiments

나타남과 동시에 난성숙시에 수반되어지는 MPF 활성치 상승도 함께 억제되어지는 것으로 본 실험결과 나타났다.

IV. 고 찰

Table 1에서 나타난 바와 같이 배양개시 후 10 시간째 전체의 난이 GV기란으로 나타났다. GVBD를 유기하고 M 1기에 진행된 난은 배양후 20 시간까지는 8.0 %로서 낮게 나타났지만 배양후 25 시간까지는 M 1기의 난이 18.8 %로 증가하였고 GVBD는 배양후 25 시간째부터 나타나는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 생체 내에서의 난 성숙에 있어서 GVBD 출현시기와 일치하는 것으로 나타났다 (Hunter 및 Polge, 1996). 그리고 배양 후 30 시간째에는 과반수의 난이 M 1기 란으로, 40 시간째는 AT 1의 난이 31.9 %로서, 이 시기에 PB 1을 방출하는 난이 많은 것으로 나타났다. 배양 후 45 시간 및 50 시간째에는 M 2기의 난이 각각 57.6 % 및 71.2 %였는데, 본 실험에서는

체외성숙 도달시간은 거의 50 시간에 완료되어지는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 Naito 등 (1988)의 보고와 거의 일치하는 경향이었고 성숙에 소요되는 시간 및 성숙율도 거의 정상과 큰 차이가 없었으며, 배양 후 30 시간째 Histone H1 kinase활성치도 Naito와 Toyoda (1991)의 보고와 거의 일치하는 것으로서 배양 0 시간째와 비교하였을 때 GV기 난의 약 15배에 달하여 (Fig. 1) GVBD가 유기되어진 난에 있어서 MPF가 정상적으로 활성화하는 것으로 확인되었다. 본 실험계에 있어서 배양개시 후 0 또는 10 시간째부터 CHX를 처리하면 GVBD가 저해되는 현상으로 나타났다 (Table 2, 3). 그리고 GVBD에 수반되어지는 Histone H1 kinase의 활성화도 억제되었는데 (Fig. 5), 이러한 결과는 이미 보고되어진 Kubelka 등 (1995)의 결과와 거의 일치하고 있으며 난성숙 유기 자극으로부터 MPF의 활성화 및 GVBD에 도달하는 signal cascade에 어떤 미지의 물질이 새로운 단백질 합성에 관여하는 것으로 생각되어진다. M 1기에서 CHX 처리로 단백질 합성을 저해시킨 난은 M 1기 이후의 성숙과정이 저해되어져 배양 후 50 시간째에도 M 1기 상태에서 정지하고 있었다. 이러한 난에서는 M기의 구조가 현저하게 이상현상이 발생되어지는 것으로서, 즉 염색체가 밀집하고 cluster상으로 되어지며 (Fig. 3a) 미소관은 방추체를 형성하는 과정에 있어 불규칙하게 염색체 주변에 모여 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3b). 또한 같은 시간대에서 CHX 처리를 실시한 난에서도 Histone H1 kinase 활성이 억제되었다(Fig. 5). 본 실험에서 관찰되어진 cluster상의 염색체는 CHX로 처리한 mouse (Hashimoto와 Kishimoto, 1988) 및 Goat (LeGal 등, 1992)의 난에서도 보고되어지고 있다. 이러한 동물에 있어서도 감수 분열시기에 특징적으로 나타나는 M 1/M 2기의 이행시에 있어서 세포골격계를 유지하는 기구에 CHX 처리에 의한 미지의 어떤 인자가 관여할 것으로 사료되어진다. M기는 염색체의 응집, 핵막의 붕괴, 미소관의 재구축 등 적극적인 세포내 활발현상이 집중되어지는 시기로서 각 현상의 제어는 기본적으로 인산화(phosphorylation)에 의하여 행하여진다고 보고하고 있으며 (Albertini, 1992), Salmon 등 (1984)은 간기 미소관은 길고 안정적인 상태를 유지하고 있다고 하였으며 M기에서는 빈번한 중합, 탈중합 과정을 받

복하면서 짧고 불안정한 미소관으로부터 방추체를 형성하는 것으로 보고하고 있다 (Saxton 등, 1984; McIntosh 등, 1989). 한편 이때의 미소관의 간기형부터 M기형 쪽으로 변환을 유도하는 protein kinase로서 MAP (Mitogen-activated protein) kinase가 관여하는 것으로 알려져 있는데, Africa *Xenopus*의 난 적출액에 MAP kinase를 첨가하면 미소관은 짧게 되어지고 M기형에 변환되어진다는 보고가 있다 (Gotoh 등, 1991a). 비록 *Xenopus*란 뿐만 아니라 rat의 배양세포 M기에 활성화된 MAP kinase가 존재하고 방추체에 국재하고 있다는 사실도 보고되고 있다 (Gotoh 등, 1991b). 이러한 보고들로 미루어 볼 때 MAP kinase는 보편적으로 M기 미소관의 구축에 관여하고 있는 것으로 사료되어지며 돼지란에 있어서도 MAP kinase가 존재하고 난성숙에 있어서 기능을 발휘하고 있다고 가정한다면, CHX 처리에 의한 MAP kinase의 활성화에 영향을 미치는 것으로서, M 1기 방추체 이상형태에 의하여 M 2기 이행에의 과정이 불가능하게 하지 않았나 추측되어진다. 또한 MPF 자신도 미소관을 간기형으로부터 M기로 변환되어질 때 기능을 가지고 있는 것으로 보고한 사실들을 미루어 (Verde 등, 1990), CHX가 MAP kinase이외의 활성화에 작용하고 MPF 활성을 유지하는 기구 자체를 억제함으로써 그 결과 미소관에 형태적 이상을 초래할 가능성이 높은 것으로 생각되어지며, 단백질 합성저해제에 의한 성숙과정의 미소관 형태이상과 성숙체의 signal전달 과정이 돼지란의 경우에 있어서도 MAP kinase가 관련하고 있을 가능성이 매우 높은 것으로 시사된다. 그리고 GV기에서 정지하고 있던 미성숙란이 MPF를 활성화시켜 성숙과정을 개시하게 될 때 새롭게 합성되어지는 단백질로서는 금붕어와 *Xenopus*란에 있어서 그 대표적인 예가 있는데 전자의 경우는 cyclin β 가 MPF의 구성요소로서 cdc2와 결합하고 MPF로서의 활성을 발휘하며 cdc2가 미성숙란에 있어서 단체로서 존재하며 GVBD를 유도하기 위하여 cyclin β 의 합성이 필요하게 된다고 보고하고 있다 (Yamashita 등, 1995). 돼지란의 GV기에 cdc2, cyclin β 가 함께 존재하고 있으나 반면 GV란에서는 cyclin β 의 합성은 일어나지 않았다고 보고하고 있으며 (Naito 등, 1995; Kubelka 등, 1995), 또한 cdc2와 cyclin β 는 결합하고 pre-MPF의 상태로서 존재

하고 있다고 보고하였다. 이상과 같이 돼지란에 있어서 GVBD 유도에 필요한 단백질로서 cyclin β 의 존재 가능성은 매우 낮은 것으로 사료된다. 또 다른 한편, *Xenopus*에서는 progesterone에 의한 MPF의 활성화가 난성숙의 재개시에 protooncogene C-Mos의 유전자 산물 및 C-Mos 단백질 합성이 필요하다고 알려져 있으나, *Xenopus* 미성숙란에서는 Mos의 도입에 의한 progesterone의 자극이 없어도 MPF가 활성화되어 난성숙이 유기되며, 즉 Mos로부터 MPF에서의 signal을 증폭하는 역할로서 MAP kinase cascade로 작용한다고 최근 보고되어지고 있다 (Sagata 등, 1989; Yew 등, 1992). MAP kinase는 상류부분의 MAP kinase kinase (MAPKK)에 의하여 인산화되어 활성화 되어지지만, Mos는 MAPKK을 인산화 시킴으로써 활성화 되어지는 MAPKK-kinase (MAPKK-kinase)로서 기능하는 것으로 알려져 있다 (Nebred와 Hunt, 1993a; Nebred 등, 1993b; Posada 등, 1993; Shibuya 와 Ruderman, 1993).

MAPKK의 활성을 저해하는 중화항체 (Kosako 등, 1994a)인 MAP kinase 특이적 phosphatase CL100의 mRNA (Gotoh 등, 1995)을 *Xenopus*란에 injection하면 MAP kinase는 불활성한 상태로 되어 결국 MPF의 활성화의 역제는 물론 성숙란도 저해되었다고 한다. 이러한 결과들로서, MAP kinase의 활성화가 *Xenopus*란 성숙의 유기에 꼭 필요한 것으로 시사되어진다. 역으로 항상적 활성화형 MAPKK의 mRNA (Gotoh 등, 1995)나 MAP kinase (Haccard 등, 1995)을 *Xenopus*란에 injection하였을 때는 MAP가 활성화되어질 뿐만 아니라 난성숙이 유기되어진다는 사실을 미루어 볼 때 MAP kinase의 활성화가 난성숙의 유기에 꼭 필요하다는 것을 암시하여 준다. 이상과 같이 *Xenopus*에 있어서 난성숙의 유기를 제어하는 경로로서는 Mos가 MAPKK/MAP kinase를 자극시킴으로써 MPF라는 cascade가 기능하는 것으로 사료되어진다. 즉 *Xenopus*란의 외부로부터의 MIH/MIH로서 progesterone의 자극이 결국 MOS/MAP kinase cascade를 증폭함으로써 그 signal이 MPF에 전달되고, 그리하여 성숙란의 경우에 있어서 protooncogene 산물인 Ras단백질의 injection에 의하여 상기의 과정을 유도할 수 있다고 보고하였다 (Birchmeier 등, 1985). 이와 같은 인위적인

성숙유도에 있어서는 MAP kinase가 MPF에 의하여 활성화 되어지는 것으로도 잘 알려져 있다 (Hattori 등, 1992; Nebreda 등, 1993b). 이상의 보고들을 미루어 볼 때, 돼지란에 있어서도 MAP kinase가 이러한 signal 전달매개체로서 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 사료되어지며 포유동물란에 있어서 Mos 와 MAP kinase의 존재 및 난성숙에 미치는 영향에 관한 보고는 mouse에서 일부 보고되어지고 있을 뿐 거의 보고되어 있지 않다. Mouse에서는 C-Mos 유전자를 유전자 공학적 수법에 의하여 생산되어진 C-Mos knockout mice에서는 Mos 단백질이 전혀 발현되지 않을 뿐 아니라 난성숙의 전과정을 통하여 MAP kinase의 유의적인 변동은 전혀 나타나지 않았고 GVBD가 생리적 시간경과에 의하여 자동적으로 출현하는 것으로 보고하고 있다 (Colledge 등, 1994; Hashimoto 등, 1994; Verlhac 등, 1996; Araki 등, 1996). 따라서 mice에서는 Mos /MAP kinase cascade가 난성숙유기의 자극에 MPF의 활성화가 signal 전달에 필요치 않는 것으로 시사되며 이러한 이론은 포유동물에서만 해당되어지는 현상으로서 MAP kinase cascade에 의한 난성숙 유기의 가능성은 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

이상으로서, 돼지에 있어 난성숙 유기의 signal 전달과정에 있어서는 Mouse와 다른 경로를 가질 가능성이 높은 것으로 본 실험결과 나타났으며, 돼지 난성숙에 있어서 MAP kinase에 의한 signal의 전달기구 존재 여부 및 활성 변화에 관하여는 추후 검토할 예정이다.

V. 적 요

직경 2~5 mm의 돼지 포상난포란을 난소로부터 분리하여 난포액 중에 PMSG를 첨가한 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 체외 배양하면서 GV 및 GVBD의 형성과정에 있어서 세포내 정보 전달물질 (MPF)의 관여 여부를 검토하였다. 배양후 45 및 50 시간째 M 2기란이 각각 57.6%와 71.2%로서 난성숙 과정이 체내 배양에 있어서의 시간대와 거의 일치하는 것으로 나타났다. 또한 Histone H1 kinase (H1K) activity를 측정하기 전 pFF-PMSG에서 배양 후 30 시간째 Hoechst-33342로 고정 염색하여 성숙 정도를 각

시기별로 구분하였는데, 배양전 GV기에 비하여 H1K activity는 약 15배 정도 증가하였다. 이러한 결과들은 포유동물의 감수분열시기에 있어서 유핵세포들의 H1K activity가 비포유동물에서 보고되어진 내용과 거의 유사한 기능을 가지는 것으로 사료되어지나, 본 실험에서는 pFF-PMSG 배지에서 체외배양으로 인한 돼지 난포란의 생리적 특징인 H1K의 activity의 활성화에 의한 것으로 사료되어진다.

VI. 인용문헌

1. Albertini, D. 1992. Regulation of meiotic maturation in the mammalian oocyte; interplay between exogenous cues and the microtubule cytoskeleton. *BioEssays*, 14: 97-103.
2. Araki, K., K. Naito, S. Haraguchi, R. Suzuki, M. Yokoyama, M. Inoue, S. Aizawa, Y. Toyoda and E. Sato. 1996. Meiotic abnormalities of *c-mos* knockout mouse oocytes; activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biology of Reproduction*, 55:1315-1324.
3. Birchmeier, C., D. Broek and M. Wigler. 1985. *Ras* proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell*, 43:615-621.
4. Colledge, W. H., M. B. L. Carlton, G. B. Udy and M. J. Evans. 1994. Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*, 370: 65-67.
5. Gotoh, Y., E. Nishida, S. Matsuda, N. Shiina, H. Kosako, K. Shiokawa, T. Akiyama, K. Ohta and H. Sakai. 1991a. *In vitro* effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. *Nature*, 349: 251-254.
6. Gotoh, Y., E. Nishida, M. Hoshi and H. Sakai. 1991b. Activation of microtubule-associated protein kinase by microtubule disruption in quiescent rat 3Y1 cells. *Experimental Cell Research*, 193:161-166.

7. Gotoh, Y., S. Matsuda, K. Dell, K. Shirakabe and E. Nishida. 1995. Initiation of *Xenopus* oocyte maturation by activation of the mitogenactivated protein kinase cascade. Journal of Biological Chemistry, 270:25898-25904.
8. Haccard, O., A. Lewellyn, R. Hartley, E. Erikson and J. L. Maller. 1995. Induction of *Xenopus* oocyte maturation by MAP kinase. Developmental Biology, 168:677-682.
9. Hashimoto, N. and T. Kishimoto. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse oocyte maturation. Developmental Biology, 126:242-252.
10. Hashimoto, N., N. Watanabe, Y. Furuta, H. Tamemoto, N. Sagata, M. Yokoyama, K. Okazaki, M. Nagayoshi, N. Takeda, Y. Ikawa and S. Aizawa 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in *c-mos*-deficient mice. Nature, 370:68-71.
11. Hattori, S., S. Fukuda, T. Yamashita, S. Nakamura, Y. Gotoh and E. Nishida. 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase and its activator by ras in intact cells and in a cell-free system. Journal of Biological Chemistry, 267:20346-20351.
12. Huang, W., D. S. Kessler and R. L. Erikson. 1995. Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. Molecular Biology of the Cell, 6:237-245.
13. Hunte, R. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. Journal of Reproduction and Fertility, 12:525-531.
14. Kosako, H., Y. Gotoh and E. Nishida. 1994a. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. EMBO Journal, 13:2131-2138.
15. Kubelka, M., J. Motlik, Jr. J. Fulka, R. Prochazka, Z. Rimkevicova and J. Fulka. 1988. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. Gamete Research, 19:423-431.
16. Kubelka, M., Z. Rimkevicova, P. Guerrier and J. Motlik. 1995. Inhibition of protein synthesis affects histone H1 kinase, but not chromosome condensation activity, during the first meiotic division of pig oocytes. Molecular Reproduction and Development, 41:63-69.
17. Le gal, F., L. Gall and V. D. Smedt. 1992. Changes in protein synthesis pattern during *in vitro* maturation of goat oocytes. Molecular Reproduction and Development, 32:1-8.
18. McIntosh, J. R. 1989. Mitosis. Science, 246:622-628.
19. Naito, K., Y. Fukuda and Y. Toyoda. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. Developmental Biology, 109:428-435.
20. Naito, K. and Y. Toyoda. 1991. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. Journal of Reproduction and Fertility, 93:467-473.
21. Naito, K., F. P. Daen and Y. Toyoda. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in different media *in vitro*. Biology and Reproduction, 47:43-47.
22. Nebreda, A. R. and T. Hunt. 1993. The *c-mos* proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. EMBO Journal, 12:1979-1986.
23. Nebreda, A. R., C. Hill, N. Gomez, P. Cohen and T. Hunt. 1993a. The protein kinase *mos* activates MAP kinase kinase *in vitro* and stimulates the MAP kinase pathway in mammalian somatic cells *in vivo*. FEBS Letter,

- 333:183-187.
24. Nebreda, A. R., A. Porras and E. Santos. 1993b. P21^{ras}-induced meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in the absence of protein synthesis; MAP activation is preceded by activation of MAP and S6 kinase. *Oncogene*, 8:467-477.
 25. Pearson, R. and B. Kemp. 1991. Protein phosphorylation site sequences and consensus specificity motif: tabulation. *Methods in Enzymology*, 200:62-81.
 26. Posada, J., N. Yew, N. G. Ahn, G. F. Vande Woude and J. A. Cooper. 1993. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase *in vitro*. *Molecular and Cellular Biology*, 13:2546-2533.
 27. Sagata, N. I. Daar, M. Oskarsson, S. D. Showalter and G. F. Vande Woude. 1989. The product of the *mos* proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science*, 245:643-646.
 28. Saxton, W. M., D. L. Stemple, R. J. Leslie, E. D. Salmon, M. Zavortink and J. R. McIntosh. 1984. Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 99:2175-2186.
 29. Shibuya, E. K. and J. V. Ruderman. 1993. Mos induces the *in vitro* activation of mitogen-activated protein kinase in lysate of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Molecular Biology of the Cell*, 4:781-790.
 30. Steven, K. H. and M. Q. Anne. 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in Enzymology*, 200:38-61.
 31. Toyoda, Y., M. Yokoyama and T. Hoshi. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Journal of Animal Reproduction*, 16:147-151.
 32. Verde F., J-C. Labbe, M. Doree and E. Karsenti. 1990. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*, 343:233-238.
 33. Verlhac, M. H., J. Z. Kubiak, M. Weber, G. Geraud, W. H. Colledge, M. J. Evans and B. Maro. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*, 122:815-822.
 34. Yamashita, M., H. Kajiura, T. Tanaka, S. Onoe and Y. Nagahama. 1995. Molecular mechanisms of the activation of maturation-promoting factor during goldfish oocyte maturation. *Developmental Biology*, 168:62-75.
 35. Yamauchi, N., H. Sasada and S. Sugawara. 1995. Protein synthesis in porcine follicular oocytes during *in vitro* meiotic maturation. *Journal of Mammalian Ovary Research*, 12:59-63.
 36. Yew, N., M. Mellini and G. F. Vande Woude. 1992. Meiotic initiation by the *mos* protein in *Xenopus*. *Nature*, 355:649-652.
- (접수일자 : 1998. 7. 30. /채택일자 : 1998. 8. 30.)