

MAP Kinase에 의한 돼지 난성숙의 유기

장규태 · 박미령* · 윤창현*

콜롬비아 의과대학 해부학 및 세포생물학교실

Induction of Porcine Oocytes Maturation by MAP Kinase

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

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

SUMMARY

The effect of MAP kinase activity on maturation of porcine oocytes was investigated. MAP kinase was detected by immunofluorescence staining in nucleus of oocytes just before entering GVBD (germinal vesicle breakdown) stage. In a Western blot with GV (germinal vesicle) from these oocytes (cultured for 25 hours), a shift of MAP kinase band appeared, suggesting an activated state of the kinase. No activity was shown in the blot with GV isolated from, oocytes cultured for 0 hour. To confirm that activation of MAP kinase induce GVBD, we microinjected MAP kinase purified from matured oocytes starfish into the cytoplasm of oocytes in GV stage (cultured for 0 hour). The injected MAP kinase did not cause early appearance of GVBD. No oocytes showed GVBD state until 20 hours of culture. GVBD appeared only in 5 % of oocytes at 30 and 40 hours of culture and 10 % at 50 hours of culture. Activity of MAP kinase did not increase significantly after the injection. When the exogenous MAP kinase was injected into GV, GVBD was induced in about 20 % of oocytes cultured for 5 to 10 hours. These results suggest that MAP kinase is translocated to nucleus and function as a factor inducing GVBD.

(Key words: Porcine oocyte, Injection, Anti-MAP kinase, GVBD, Western blotting)

I. 서 론

돼지란에 있어서 MAP kinase는 GVBD에 의하여 활성화되어 난성숙의 재개시를 유도하는지 아니면 mouse란에서와 같이, MAP kinase의 활성화가 GVBD후에 일어나는지를 검토한 결과 돼지란의 경우 현저한 활성 상승은 GVBD후의 M 1기에서 검출되어 졌다.

한편, 체세포에 있어서 MAP kinase의 세포내 국

재변화에 관한 다수의 보고가 있는데 그들의 보고에 의하면 MAP kinase는 정상시는 불활성화형으로서, 세포질에 존재하고 있지만 외부로부터의 자극이 주어지면 활성화형으로 되어 일부가 핵내로 이동한다고 한다 (Chen 등, 1992; Seth 등, 1992; Lenormand 등, 1993; Gonzalez 등, 1993). 난세포에 있어서 MAP kinase의 핵내 이행에 관하여는 현재까지 보고되어진 바는 없지만, 만약 MAP kinase cascade가 난의 외측으로부터 성숙유기 signal을 MPF에, 그리고 GV기에 전달하는 경로로서 기능하고 있다면 그 signal을

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

전달하는 과정에서 세포질로부터 핵으로 이행하고 있을 가능성이 높을 것으로 추측된다. 본 실험에서는 항 (anti) MAP kinase 항체를 이용한 면역형광염색법에 의한 배양개시 직후의 미성숙란 및 GVBD 직전의 난에 있어서 MAP kinase의 국재변화를 검토함과 동시에 각각의 난으로부터 GV기란만을 분리하여 Western blotting을 실시하고, GVBD 유기시에 MAP kinase가 핵내에 국재하고 있는 것을 명백히 하기 위하여 전기영동상에서의 이동 변화를 조사하여, MAP kinase의 활성화 상태를 Shibuya 등 (1992 a, b)과 Posada와 Cooper (1992)의 보고들과 비교 검토하였다. 그리고 MAP kinase가 GVBD 직전의 시기에 핵내로 특이적으로 이행하고 활성화 상태라면 난성숙개시 signal을 핵에 전달하고 기능을 발휘하고 있을 가능성이 대단히 높을 것으로 예상되어진다. 또한 GV기의 난에 MAP kinase를 injection하여 인위적으로 MAP kinase 활성을 상승시킨 경우에 GVBD가 유도되어질 수 있는가를 검토하였으며, 이때 GVBD가 유기되어진다면 MAP kinase가 난성숙개시의 signal 전달에 있어서 매우 중요한 중개역할을 담당하고 있을 것으로 사료되어 본 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난의 채취 및 체외성숙

난의 채취 및 체외성숙배양은 도축장에서 채취한 돼지 난소를 37~39℃의 생리식염수 (0.85%)에 담구어 연구실까지 (2 시간 이내) 운반하고 직경 2~5 mm의 포상난포로부터 25 gauge의 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 2~3종의 균일한 난구세포에 싸여있는 난의 직경이 120 μ m 정도까지 충분히 성장하고 있는 난자난구 복합체만을 선별하여 배양하였다. 세척 및 배양은 mineral oil로 피복한 IWAKI 멸균 샤알레내의 배지액 중에 옮겨 성숙배지에는 PMSG (Peamex, Sankyo) 1 IU/ml을 포함한 pFF (pFF-PMSG)를 사용하고 37℃ 5% CO₂하에서 각각 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 및 50 시간씩

각각 배양하였다. 배양후 mKRB solution에 0.1% hyaluronidase (Type IV-S, Sigma)를 첨가하고 37℃에서 2~3분 경과한 후 pipetting에 의하여 난구괴를 제거하였다.

2. 면역형광염색법에 의한 MAP kinase의 검출

0.1% hyaluronidase 처리 및 pipetting에 의하여 난구세포를 제거한 난을 slide glass위에 옮긴 후 cover glass로서 압착하였다. -20℃로 냉각시킨 ethanol을 사용하여 상기의 slide glass를 2~3회 washing한 후 다시 -20℃의 냉각되어진 100% ethanol에서 15분 침적하여 고정하였다. 5% BSA (bovine serum albumin, fraction V; BSA, WAKO)를 포함한 38℃의 PBS에서 1시간 동안 blocking한 후, 항 MAP kinase 항체 (Santa Cruz)를 20배 또는 40배 희석하여 2시간 동안 37℃에서 반응시켰다. PBS에서 washing한 후 2차 항체로서 TRITC-결합 Goat anti rabbit IgG항체 (Organan Teknika)를 20배 또는 40배 희석하여 37℃에서 반응시켰다. 염색체는 Hoechst-33342 (Sigma)를 10 μ g/ml 포함된 37℃의 PBS에서 15분간 염색하였다. 전 실험과정의 반응은 충분한 양의 반응액으로서, moisture chamber 내에서 정치하여 실시하였으며, 2차 항체 이후의 반응은 차광조건하에서 실시하였다. 염색종료후에는 mounting medium의 VECTASHIELD (Vector)로서 봉입하고 형광현미경 (Olympus, BHS-RFC)하에서 관찰하였으며, 사진은 Fujichrome PROVIA film (ASA 1600)으로 촬영하였다.

3. 난 핵포의 분리

0.1% hyaluronidase 처리 및 pipetting에 의하여 난구세포를 제거한 난을 강산성 Tyrode's액 (pH 2.5)중에 3~5초간 침적하여 투명대를 제거하였다. 실체현미경하에서 투명대가 제거된 난을 Wang 등 (1996)이 보고한 방법을 기초로 한 0.04% trypan blue를 포함한 lysis buffer (10mM HEPES (pH 7.9), 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.2mM PMSF, 0.5mM DTT, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin, 0.5% Triton X-100)의 액중에 이동하고, 실체현미경 하에서 직경이 약 5~10 μ m의 glass pipette으로 pipetting함으로써 투명대가 제거

된 난을 파괴하고 GV만을 회수하였다. 회수한 GV는 -80°C 에서 보존하였고, Western blotting에 이용하였다.

4. Western blotting에 의한 MAP kinase의 검출

전기영동 및 Western blotting은 stock용액 $5\ \mu\text{l}$ 에 $25\ \mu\text{l}$ 의 sample buffer (65mM Tris-HCl, 25 % glycerol, 1mM DTT, 1 % SDS, 0.2mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 $30\ \mu\text{l}$ 되게 하고 100°C 에서 3분간 heat denature를 실시하였다. 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 준하였으며 분리용 polyacrylamide gel의 조성은 375mM Tris-HCl, 0.1 % TEMED, 10 % acrylamide, 0.13 % bis-acrylamide, 0.025 % ammonium sulfate, 0.1 % SDS로서 조제하였다. 농축 gel은 125mM Tris-HCl, 0.2 % TEMED, 3 % acrylamide, 0.04 % bis-acrylamide, 0.025 % ammonium sulfate, 0.1 % SDS였다. 영동후 단백질을 microcellulose membrane에 blot하고, 5 % skim milk를 포함한 TBS (pH 7.6)에서 12시간, 4°C 에서 blocking 하였다. 반면 1차 항체는 rabbit 항 MAP kinase polyclonal 항체 (K-23, Santa Cruz)를 500 배 희석하여 사용하였으며, 2차 항체는 biotin화 항 rabbit IgG 항체 (Sigma)를 각각 사용하였다.

5. MAP kinase의 microinjection

돼지 난소로부터 분리, 회수한 난자/난구 복합체를 mKRB액 (modified Krebs-Ringer Bicarbonate Solution, Toyoda 등, 1971)에서 3회 washing한 후, BSA 4 mg/ml이 포함된 PBS액의 drop에 10개씩 넣었고 세포질에 주입액을 한 난자당 100 pl 정도 injection하였다. 일부는 pipetting을 통하여 난구세포를 제거하고 Effendorf tube에 mKRB액과 함께 넣어 38°C 에서 5분간, 15,000 rpm으로 원심하고 (Kubota 1700, RA-150) 난자내의 지방적을 편축으로 모아 GV가 잘 보이게 한 후, 한개의 GV당 20 pl정도씩 injection하였다. Injection은 micromanipulator를 장착한 위상차 도립 현미경 (Zeiss)하에서 행하였다. Injection 량은 Effendorf의 microinjector-5242 (Germany)에서 조절하였고 주입한 MAP kinase는 1-methyladenin처리에 의하여 성숙시킨 starfish(성게)란으로부터 Sanghera 등 (1991)의 방법에 의하

여 정제되어진 것을 UBI 제조회사로부터 구입하여 사용하였으며 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 MAP kinase액을 사용 직전에 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 농축하였고 용매로서는 PBS를 사용하였다.

III. 결 과

1. GV기 란에 있어서 MAP kinase의 국재적 변화

항 MAP kinase 항체를 이용한 면역형광염색의 결과, MAP kinase는 난포로부터 분리후인 배양 0 시간째의 난에서는 세포질에 국재하고 있었다 (Fig. 1a). 배양후 25 시간째 (GVBD 직전)의 난에서는 반응결과가 강한 양성으로 나타났고 (Fig. 1c), 대조구로서는 1차 항체 대신 rabbit의 정상혈청을 이용하고 2차 항체 이후의 과정을 동일하게 처리한 구에서는 양성반응이 나타나지 않았다 (Fig. 1e). 이러한 결과로부터 MAP kinase는 돼지 체외성숙란에 있어서 GVBD기 출현 전에 핵내에 이행하는 것으로 나타났다.

2. 핵내로 이행한 MAP kinase의 Western blotting에 의한 검출

MAP kinase가 핵내로 이행하는 그 활성화에 대하여 보다 상세하게 검토하기 위하여 난소로부터 분리후 (배양 0 시간) 및 GVBD 직전의 배양 25 시간째의 난으로부터 GV를 분리하고 항 MAP kinase항체를 이용한 Western blotting을 실시하였다. 한 lane당 150 개를 sample로 하고 Western blotting을 행한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 돼지의 경우에서도 다른 포유동물 세포에서와 같이 2종류의 MAP kinase, 즉 ERK 1 (44 kDa) 및 ERK 2 (42 kDa)가 각각 존재하였다. 배양 0시간째의 난 (lane 1)에서는 2개의 band가 검출되었지만, 분리한 GV (lane 2)에서는 검출되지 않았다. 한편, 배양후 25 시간째의 란 (lane 3)에서는 2종류의 MAP kinase가 각각 인산화되어 활성화형으로서 전기영동상의 이동도의 감소가 일어났으며 전부 4개의 band가 검출되었다. 대부분의 난이 성숙을 완료하고 M 2기에서 정지하며, 높은 MAP kinase 활성을 가지는 배양후 50 시간째 난 (lane 5)의 영동 band와 비교하여 보면, 25시간째 4개의 band는 위로부터 각각 활성화한 ERK 1(*), 활

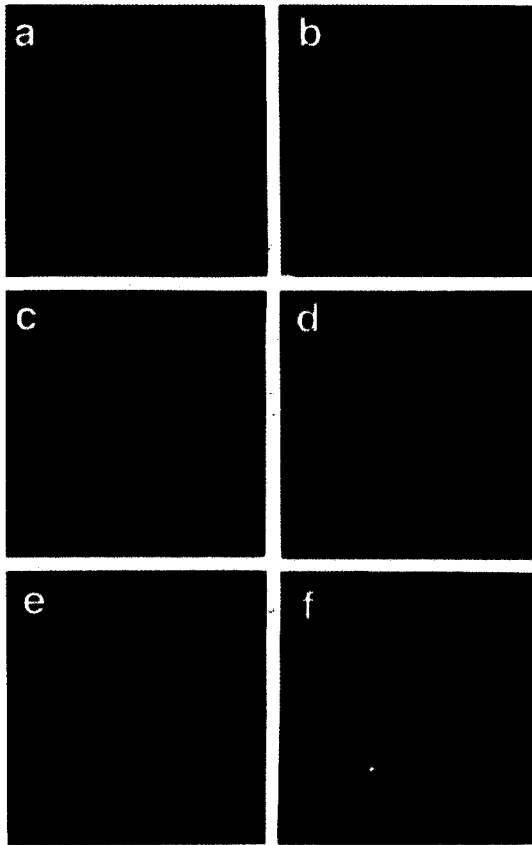


Fig. 1. Translocalization of MAP kinase in GV oocytes. Porcine oocytes were double stained with both indirect immunofluorescence of anti-MAP kinase polyclonal antibody (a, c) and with Hoechst-33342 for the chromosomes (b, d, f). The oocyte shown in (e) was stained with normal rabbit serum as a control. Each pair of photographs (a-b, c-d, e-f) were taken in the same oocytes. (a-b) 0 hr cultured oocytes, (c-d, e-f) 25 hrs cultured oocytes

성화하지 않은 ERK 1, 활성화한 ERK 2(*) 및 활성화하지 않은 ERK 2로 각각 나타났다. 배양후 25 시간째 난으로부터 분리한 GV (lane 4)에서는 활성화한 ERK 1 및 ERK 2의 band가 검출되었지만, 불활성형의 band는 검출되지 않았다.

이상과 같이 배양 0 시간에서는 MAP kinase가 불활성 상태로서 GV내에 존재하는 것과는 달리 세포질에 국재하고 있었으며, 반면, 25 시간 배양후 즉 GVBD 직전의 난에서는 MAP kinase가 세포질로부터 핵내로 이행하고 있는 것은 물론, 핵내의 MAP kinase가 활성화 상태였다는 것이 본 실험결과 나타났다.

3. MAP kinase의 injection에 의한 GVBD의 유도

면역형광염색 및 Western blotting의 결과로서, MAP kinase는 GVBD전에 활성화하고 핵내에 이행하는 것으로 나타났다. 이러한 MAP kinase의 상태 변화는 직접 GVBD에 영향을 미치는 것으로서, 즉 GVBD전의 활성화된 MAP kinase가 GVBD를 유도하는 것으로 사료되어진다. 본 실험에서는 starfish (성게)의 성숙란으로부터 정제한 활성화 된 MAP kinase를 배양 0 시간째 GV기란에 injection하였다. 이때 사용된 MAP kinase 1 g은 1분간에 약 3.7 mmol의 인산기질로서 MBP에 incorporate되는 활성을 가진다 (Sanghera 등, 1991). 그러나 돼지 성숙란에 있어서 MAP kinase는 한 개의 난자당 1분에 약 2~2.5 fmol의 인산을 MBP에 incorporate되어지는 활성을 가지는 것으로 본 실험결과 나타났다 (data not shown). 정제된 starfish MAP kinase는 난자 한개당 1 pg injection에 의하여 성숙란에서 검출되어진 MAP kinase활성을 상회하는 활성을 GV기의 난에서 나타낼 수 있을 것으로 계산하여 injection하였다. 따라서 injection에 사용한 MAP kinase를 10 μ g/ml 되게 농축하였고 한 개의 난자당 100 pl씩 injection을 실시하였는데, 예상한 결과와는 달리 GVBD가 유도되어지지 않았으며 배양후 10 및 20 시간째에도 100 %의 난에서 GV기 상태 그대로였다 (Table 1). GVBD가 촉진되어지는 것은 배양후 30 시간에서도 10~20 %의 난밖에 GVBD가 발생되지 않았다. 이러한 결과는 일반적인 배양시의 62.9 %의 난에서 GVBD가 유기되어지는 결과와는 다소 차이가 있었고 본래대로라면 80~90 %의 난이 GVBD를 유기하는 40 및 50 시간 후에도 10 % 정도의 난에서만 GVBD가 관찰되었다. 대조구로서 PBS를 injection한 난에서는 배양후 50 시간째 48.7 %가 정상인 M 2기에 성숙하고 있었으나, MAP kinase를 injection한 후 배양

Table 1. Effect of MAP kinase injection into the cytoplasm on porcine oocyte maturation

Injection	Culture period(Hr)	Total No. of oocytes	No. (%) of oocytes at the stage of				
			GV	PM1	M1	AT1	M2
MAPK	10	43	43(100)	0	0	0	0
	20	40	40(100)	1(1.1)	0	0	0
	30	38	34(89.6)	2(5.2)	2(5.2)	0	0
	40	33	30(90.9)	1(3.0)	2(6.1)	0	0
	50	30	26(86.7)	1(3.3)	3(10.0)	0	0
PBS	50	76	39(86.7)	39(51.3)	0	0	0

MAP kinase from starfish oocytes (MAPK) or phosphate buffered saline (PBS) were injected into the cytoplasm of porcine oocytes (100 p1/oocyte). The oocytes were cultured in pFF-PMMSG for 10, 20, 30, 40 and 50 hours. a-c: Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.05$). χ^2 test. GV: germinal vesicle, PM1: first prometaphase, M1: first metaphase, AT1: first anaphase-telophase and M2: second metaphase.

0, 10, 20, 30 및 50 시간째의 난에서 MAP kinase 활성을 측정 한 결과 어느 시간대에서도 유의적 ($P < 0.05$) 활성의 상승은 없었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 외부로부터 도입되어진 MAP kinase가 세포질내에서 급격히 불활성화되어질 뿐만 아니라 성숙의 재개시를 억제하는 영향을 미침과 동시에 내인성 MAP kinase

활성을 억제시키는 것으로 생각되어진다. GV란의 세포질에서는 MAP kinase를 활성화시키는 어떤 미지의 기구가 존재하는지 아니면 핵막에 의해서 세포질로부터 핵내 MAP kinase 활성을 지속시키는 것인지를 검토하기 위하여 Western blotting을 실시한 결과 (Fig. 2) 배양 25시간 후의 GV란에서는 활성화형의 MAP kinase가 존재하는 것으로 나타났으며 정제되어진 starfish MAP kinase를 GV내에 injection한 결과 배양후 5~10시간의 단시간에서 약 20%의 난에서 GVBD가 유도되었다 (Table 2). 대조구로서 PBS를 injection한 난에서는 배양후 10 시간째에도 GVBD 현상은 전혀 나타나지 않았다. 이상의 결과로부터 활성화형 MAP kinase는 GV내에서만 그 활성을 가질 뿐만 아니라 난성숙을 유도하는 것으로 본 실험결과 나타났다.

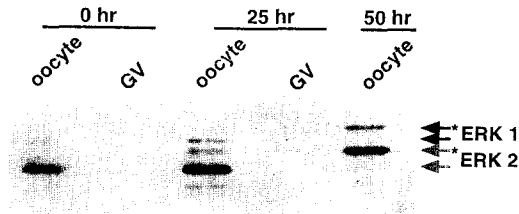


Fig. 2. Detection of ERK 1 (Black arrows) and ERK 2 (gray arrows) by immunoblotting. The oocytes collected at 0, 25 and 50 hour of culture were subjected to immunoblotting with anti-MAP kinase polyclonal antibody. Lane 1 : fifty oocytes cultured for 0 hour, lane 2 : 150 GVs separated from oocytes cultured for 0 hour, lane 3 : fifty oocytes cultured for 25 hours, lane 4 : 150 GVs separated from oocytes cultured for 25 hours, lane 5 : fifty oocytes cultured for 50 hours. Arrows with an asterisk shows phosphorylated and activated forms of MAP kinase. GV : germinal vesicle

IV. 고 찰

돼지란에서는 MAP kinase cascade의 존재는 성숙에 수반되어 활성화 되어지는 것으로 확인되었고, 그리하여 본 실험에서는 그 활성화에 의하여 난성숙 개시를 유도하는 것인지에 대하여 상세하게 검토하였다. 돼지란에서 MAP kinase의 현저한 활성 상승은 GVBD 후의 M 1기란에서 검출되었다. 한편, *in vitro*의 assay에서는 10~20 개의 난에 대한 평균치로서 MAP kinase의 활성화가 GVBD기 전에 일어나는지 아니면 후에 일어나는지에 대한 전후 관계를 명백히

Table 2. Effect of MAP kinase injection into the nucleus on porcine oocyte maturation

Injection	Cultured period(hr)	Total No. of oocytes	No. (%) of oocytes at the stage of		
			GV	M1	M2
MAPK	5	24	18(75.0)*	1(4.2)	5(20.8)
	10	27	21(77.8)*	1(3.7)	5(18.5)
PBS	10	22	22(100)	0	0

MAP kinase from starfish oocytes (MAPK) or phosphate buffered saline (PBS) was injected into the germinal vesicle of porcine oocytes (20 p1 /oocyte). The oocytes were cultured in pFF-PMSG for 5 or 10 hours. *: Values with an asterisk in the same column were significantly different from the control (PBS). ($P < 0.05$). χ^2 test. GV:germinal vesicle, PM1:first prometaphase and M1:first metaphase.

하기에는 불가능하였다. 그리고 MAP kinase 활성의 변화 즉, 난 내부에서의 MAP kinase 상태 변화를 상세히 설명하기에는 다소 어렵고 활성이 상승하고 있는 것은 검출되었지만 그 활성이 직접 GV에 영향을 미치고 GVBD를 유도하는지 아니면 GVBD 현상에 부수적으로 일어나는지, 다시 말하면 GV 및 GVBD 이외의 세포내 변화에 의해서 일어나는가에 대하여서는 판단하기 어렵다. 체세포에서는 MAP kinase 활성화에 수반되어 세포질로부터 핵내에 이행하는 것으로 보고 되어지고 있다 (Chen 등, 1992; Seth 등, 1992; Lenormand 등, 1993; Gonzalez 등, 1993). 그래서 본 실험에서는 항 MAP kinase 항체를 이용한 면역형광염색법으로부터 각각 다른 시기의 GV란에 있어서 MAP kinase의 국재변화(세포질로부터 핵내에 이행)를 상세히 검토한 결과, 세포질로부터 채취한 직후의 배양개시전 GV란에서 MAP kinase는 주로 세포질에 국재하고 있었으며 핵내의 GV에 있어서는 강한 양성 반응이 나타나지 않았다 (Fig. 1a). 한편, 배양 후 25 시간째의 GV란, 즉 GVBD 직전의 GV란에서는 난성숙유기 signal이 이미 핵에 이행되어졌을 것으로 생각하였지만 이 시기의 GV란에서는 세포질보다는 GV내에 강한 양성반응이 나타났다 (Fig. 1c). 이러한 면역형광염색의 결과로부터 난표면으로부터의 난성숙개시를 유도하는 signal이 세포질에서 핵으로 이행하는 그 시기와 같았으며 MAP kinase도 세포질로부터 핵쪽으로 변화시킨다는 것을 알 수 있었다. 이러한 점으로 미루어 보아, MAP kinase cascade가 난성숙 개시를 유기하는 signal을 전달하고 있을 가능성이 매우 높은 것으로 예측할 수 있다. 한편, GVBD 직전의 핵내에 이행한 MAP kinase가 기능을 발휘하

고 있는 것을 검토하기 위하여서는 이행한 MAP kinase가 활성화 상태로 존재하는지를 상세히 검토하기로 하였다. 이러한 이유로서는 체세포에 관한 보고로는 핵에 이행한 MAP kinase는 활성화하고 (Chen 등, 1992; Seth 등, 1992; Gonzalez 등, 1993) 있다고 하는 반면, 불활성화 상태로 존재하고 있다는 보고 (Wang 등, 1996) 및 인산화를 받은 부위에 변위를 일으킨 불활성형의 MAP kinase도 핵내에 이행한다는 보고 (Lenormand 등, 1993)들이 있기 때문이다. 이러한 보고들을 미루어 볼 때, 면역염색 결과로서는 MAP kinase가 핵에 국재하고 있지 않은 배양 0 시간 및 핵내에 강한 양성 반응이 검출되어졌던 배양 후 25 시간째의 난으로부터 각각 GV만을 분리하고 분리한 GV를 sample로서 Western blotting을 행한 결과 배양 0 시간인 GV에서는 MAP kinase의 존재를 나타내는 band는 검출되지 않았다 (Fig. 2, lane 2). 이러한 결과는 돼지 미성숙란에 있어서 불활성인 MAP kinase가 세포질에는 국재하고 핵내에는 존재하지 않는다는 것으로 본 실험결과 나타났다. 그리고 배양 후 25 시간째 란의 GV에서는 42 kDa 및 44 kDa의 위치에서 band가 검출되어 명백히 GVBD 직전에 MAP kinase가 GV내에 존재 한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2, lane 4). 상기의 결과와 면역형광염색 결과를 종합하여 보면, 미성숙란의 세포질에 국재하고 있는 불활성형의 MAP kinase는 난성숙 개시 signal이 GV내에 전달되어지고 같은 시기에 활성화하여 핵내로 이행하지만 핵내에서의 GVBD 유도에는 다른 미지의 요소가 관여되어질 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다. 상기의 내용에서 MAP kinase 활성이 실제로 GVBD를 유도하는지에 대하여 보다 상세히 검

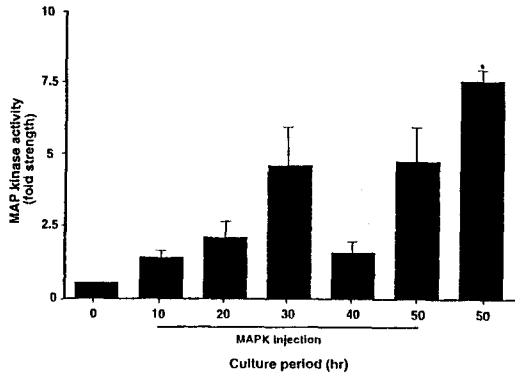


Fig. 3. Effects of MAP kinase injection into the cytoplasm. MAP kinase was injected into the cytoplasm of porcine oocytes. Oocytes were cultured in pFF-PMSG for various periods up to 50 hours. After each culture period, the oocytes were collected and MAP kinase activity was assayed. Data are expressed as fold strength of control (GV oocytes cultured for 0 hour) and as ANOVA results with an asterisk indicating a statistical difference ($P < 0.05$) from the control. Data are shown as the mean \pm SEM from three different replicated experiments

토하기 위하여 내인성 MAP kinase 활성이 상승하기 전의 GV기의 난에 MAP kinase를 injection하고 인위적으로 활성을 상승시켰을 경우에 성숙과정이 유도되어지는가를 보다 상세하게 조사한 결과, 배양 0 시간의 난세포질내에 MAP kinase를 injection 하여도 GVBD 조기출현은 나타나지 않았다 (Table 1). 활성화형 MAP kinase 또는 활성화형 MAPKK의 injection에 의하여 GVBD를 유도한 일례로서 *Xenopus*에서 그 보고가 있지만 Haccard 등 (1995)은 탈인산화된 MAP kinase를 이용한 결과로서 활성화된 MAP kinase는 세포내에서 탈인산화 되기 어려울 뿐만 아니라, 세포질 중에서 활성화 상태가 지속된다고 하였다. 그리고 Huang 등 (1995)은 활성화 되기 위하여 인산화에 꼭 필요한 serine을 glutamine acid로 치환하는 것에 의하여 인산화된 상태를 항상적 활성화형인 MAPKK를 이용한 보고도 있다. MAP kinase가 활성화되기 위해서는 serine 및 threonine 양쪽 모두가 인산화되어야 하고 어느 한쪽이 탈인산화되면 불활성화된다고 하였다 (Anderson 등, 1990). 현재까지 MAP kinase를 불활성화 시키는 효소로서는 CL100/MKP-1 (Keyse와 Ernsly, 1992; Keyse, 1995; Charles 등, 1993), PTP 2 (Maeda 등, 1994), PP2A (Aless 등, 1995)가 보고되고 있다. 이들중 CL100/MKP-1은 핵내에서 발현 및 기능하고 있으

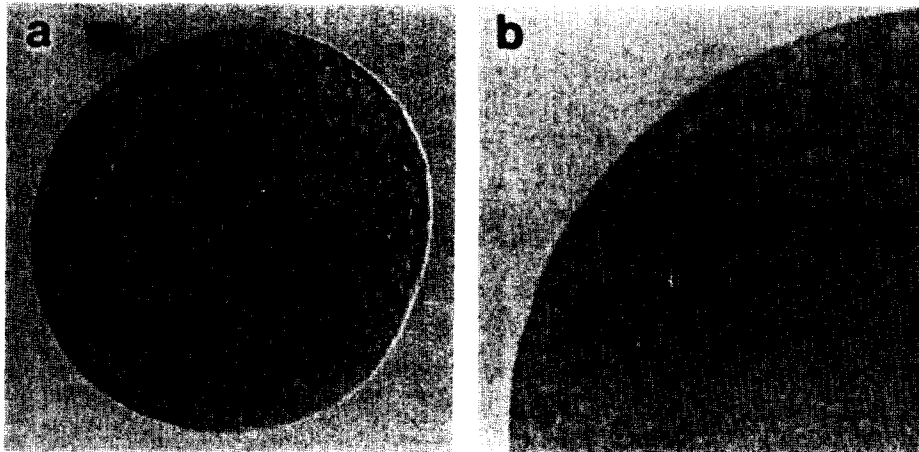


Fig. 4. The oocyte induced GVBD and progressed to M1 by MAP kinase injection into the germinal vesicle. A porcine oocyte cultured for 0 hour was injected with MAP kinase into the vesicle, then cultured in pFF-PMSG for 5 hour. a: $\times 150$, b: $\times 300$

며, PTP 2는 효모의 MAP kinase인 HOG 1에 특이적으로 나타난다고 보고되고 있다. 돼지란의 세포질에 기능하고 있는 것은 양자 모두 생각하기 어렵고, PP2A일 가능성이 매우 높은 것으로 사료되어진다. 그 이유로서는 PP2A의 저해제인 okadaic acid 처리에 의하여, MAP kinase활성이 상승한다는 사실이 mouse에서 보고되어진 바 있다 (Sobajima 등, 1993; Chesnel과 Eppig, 1995). 그리고 돼지란에서도 okadaic acid 처리에 의하여 GVBD가 촉진되어진다는 보고가 있기 때문이다 (Kalous 등, 1993). 이러한 보고로서는 미성숙란에 있어서 PP2A가 MAP kinase를 불활성화 하기 때문에 GVBD가 억제되어지고, 또한 PP2A가 MAP kinase만을 특이적으로 탈인산화시킴으로써, 그리고 okadaic acid는 농도 의존적으로 PP2A 이외에 PP 1을 저해함으로써 미성숙란의 세포질에 있어 MAP kinase를 불활성화 시키는 요인으로서 보고되고 있기 때문이다.

배양 0 시간째 난의 GV내 MAP kinase을 injection한 결과 배양 개시후 5시간이라는 단시간내 25%의 난에서 GVBD가 유도되어졌는데 (Table 2), 이러한 사실로 미루어 보아 MAP kinase는 미성숙란에 있어서도 핵내에서 그 활성을 유지하고 GVBD를 직접 유기하는 것으로 본 실험결과 나타났다. *In vitro*에 있어서 MAP kinase는 핵막의 내막을 기점으로 lamin을 인산화시키는 것으로 보고하고 있지만 (Peter 등, 1992), 본 실험결과에서는 MAP kinase가 직접 핵막 붕괴에 관여하고 있을 가능성이 매우 높은 것으로 본 실험결과 시사되어진다.

이상의 결과를 종합하여 보면, MAP kinase cascade가 난의 외부로부터 난성숙 개시시에 signal이 핵에 전달되는 과정에 있어 세포질로부터 핵에 전달을 유도하는 것으로 나타났으며, MAP kinase는 핵내에 이행하고 GVBD를 직접 유기하는 인자로서 기능하고 있는 것으로 사료되어진다.

V. 적 요

본 실험에서는 MAP kinase 활성화가 돼지 난성숙 유도에 어떤 영향을 미치는지를 검토하였다. 항 MAP kinase 항체를 이용한 면역형광염색 및 난으로부터 분리한 GV를 Western blotting에 의하여 난성숙 재개

시에 MAP kinase의 핵내 이행과 활성화 상태를 검토하였다. 또한 MAP kinase 활성이 상승하기전의 GV기 란에 MAP kinase를 injection하고 인위적으로 활성화 시켰을 경우, 난성숙유기에 직접적으로 영향을 미치는지를 조사하였다.

면역형광염색 결과, MAP kinase는 GVBD 직전에 핵내에서 검출되었고 Western blotting의 결과 배양 0시간째의 난으로부터 분리한 GV에서는 MAP kinase의 band가 나타나지 않았다. 그러나, GVBD 직전의 배양후 25 시간째의 난으로부터 분리한 GV에서는 MAP kinase band가 검출되었고 그 활성화 상태를 나타내는 이동도의 감소가 나타났다. 이상의 결과로부터 배양 0 시간째 GV란에 있어서 불활성인 MAP kinase는 GV내에 존재할 뿐 아니라 세포질내에 국재하고 있고 배양후 25 시간째에 있어서는 일부의 MAP kinase가 세포질로부터 핵내에 이행하고 그 MAP kinase는 활성화 상태였다. 이와 같이 GVBD 전의 MAP kinase 활성화가 GVBD를 유도하는지를 검토하기 위하여 starfish(성게) 성숙란으로부터 정제한 활성화형 MAP kinase를 배양 0 시간째 GV란의 세포질내에 microinjection을 실시한 결과, 기대치와는 달리 GVBD의 조기출현 현상은 나타나지 않았고 배양후 10 및 20 시간째까지도 100%난에서 GV기 상태 그대로였으며 30 시간째 있어도 약 5%의 난에서, 배양후 40~50 시간후에도 10%정도의 난에서만 GVBD 현상이 나타났다. 그리고 injection 후 유의적인 MAP kinase 활성의 상승도 나타나지 않았다.

이상의 결과로서, 외부로부터 도입되어진 MAP kinase는 세포질내에서 급격히 불활성화되고 성숙의 재개시를 유도하지 못하는 것으로 나타났다. 한편, GV내에 injection한 란의 경우에 있어서는 배양 5~10 시간째의 단시간내 약 20%의 난에서 GVBD가 유도되어짐으로써, 활성화형 MAP kinase는 GV내에서 그 활성을 가지고 난성숙을 유도하는 것으로 미루어 MAP kinase 자신이 핵내에 이행하고 GVBD를 유도하는 인자로서 기능하고 있는 것으로 본 실험결과 나타났다.

VI. 인용문헌

1. Alessi, D. R., N. Gomez, G. Moorhead, T. Lewis and S. M. Keyse. 1995. Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A, a protein tyrosine phosphatase, but not CL 100, in various cell lines. *Current Biology*, 5:283-295.
2. Anderson, N., J. L. Maller, N. Tonks and T. Sturgill. 1990. Requirement for integration of signals from two pathway for activation of MAP kinase. *Nature*, 343:651-653.
3. Charles C. H., H. Sun, L. F. Lau and N. K. Tonks. 1993. The growth factor-inducible immediate-early gene 3CH134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase. *Proceeding of the National Academy Science. USA*, 90:5292-5296.
4. Chen, R-H., C. Sarenecki and J. Blenis. 1992. Nuclear localization and regulation of erk-and rsk-encoded protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 12:915-927.
5. Chesnel, F. and J. J. Eppig. 1995. Induction of precocious germinal vesicle breakdown (GVB) by GVB-incompetent mouse oocytes: possible role of mitogen-activated protein kinase rather than p^{34cdc2} kinase. *Biology Reproduction*, 52:895-902.
6. Gonzalez, F. A., A. Seth, D. L. Raden, D. S. Bowman, F. S. Fay and R. J. Davis. 1993. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *The Journal of Cell Biology*, 122:1089-1101.
7. 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.
8. 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.
9. Kalous, J., M. Kubelka, Z. Rimekevicova, P. Guerrier and J. Motlik. 1993. Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcome cycloheximide-and 6-dimethylaminopurine block in cattle and pig oocytes. *Developmental Biology*, 157:448-454.
10. Keyse, S. M. 1995. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatase. *Biochemistry and Biophysics Acta.*, 1265:152-160.
11. Keyse, S. M. and E. Emslie. 1992. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature*, 359:644-647.
12. Leonormand, P., C. Sardet, G. Pages, G. L'Allemain, A. Brunet and J. Pouyssegur. 1993. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinase (p42^{mapk}, p44^{mapk}) but not of their activator MAP kinase kinase (p45^{mapkk}) in fibroblast. *The Journal of Cell Biology*, 122:1079-1088.
13. Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy and H. Saito. 1994. A two-components system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369:242-245.
14. Peter, M., J. Sanghera, S. Pelech and E. Nigg. 1992. Mitogen-activated protein kinase phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p^{34cdc2}. *European Journal of Biochemistry*, 295:287-294.
15. Posada, J. and J. A. Cooper. 1992. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science*, 255:212-215.
16. Sanghera, J., C. McNabb, N. Tonks and S. Pelech. 1991. Tyrosyl phosphorylation and activation of the myelin basic protein kinase p44mpk during sea star oocyte maturation.

- Biochemistry and Biophysics. Acta., 1095: 153-160.
17. Seth, A., F. A. Gonzalez, S. Gupta, D. L. Reden and R. J. Davis. 1992. Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 267:24796-24804.
 18. Shibuya, E. K., T. Boulton, M. Cobb and J. V. Ruderman. 1992a. Activation of p42 MAP kinase, the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO Journal*, 11:3963-3975.
 19. Shibuya, E. K., A. J. Polverino, E. Chang, M. Wigler and J.V. Ruderman. 1992b. Oncogenic ras triggers the activation of 42-kDa mitogen-activated protein kinase in extracts of quiescent *Xenopus* oocytes. *Proceeding of the National Academy Science*, USA, 89:9831-9835.
 20. Sobajima, T., F. Aoki and K. Kohmoto. 1993. Activation of mitogen activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97:389-394.
 21. 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.
 22. Wang, Y., H. Schramek and M. J. Dunn. 1996. Cytosolic and nuclear mitogen-activated protein kinase are regulated by distinct mechanisms. *Experimental Cell Research*, 225:382-388.
- (접수일자 : 1998. 7. 30. /채택일자 : 1998. 8. 30.)