

## 생쥐 난소의 발생단계에 따른 Growth Differentiation Factor-9의 유전자 발현

윤세진<sup>1</sup> · 이경아<sup>1,2</sup> · 고정재<sup>1,2</sup> · 차광열<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>차병원 여성의학연구소, <sup>2</sup>포천중문의과대학교

### Expression of Growth Differentiation Factor-9 in the Mouse Ovaries at Different Developmental Stages

Se-Jin Yoon<sup>1</sup>, Kyung-Ah Lee<sup>1,2</sup>, Jung-Jae Ko<sup>1,2</sup> and Kwang-Yul Cha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul 135-081, Korea

<sup>2</sup>College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

**요 약 :** Growth/differentiation factor-9 (GDF-9)은 transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily의 member로서 난소의 난자에서만 특이적으로 발현되며 정상적인 난포발달에 있어 필수적인 성숙인자로 최근에 알려졌다. 본 연구는 RT-PCR을 통해 생쥐의 원시난포에서의 GDF-9 mRNA의 발현 여부와 함께 난포의 발달단계에 따른 상대적인 발현량을 분석하고자 실시하였다. 본 실험에는 ICR 생쥐를 사용하여 질전 (vaginal plug)이 확인된 날을 1일로 하여 임신 19일의 태아와 태어난 날을 1일로 하여 생후 1일, 10일, 21일, 28일된 생쥐 난소를 실험에 사용하였다. 각 발달단계의 난소조직으로부터 total RNA를 추출하여 GDF-9 유전자 발현 여부를 확인하였으며 이들을  $\beta$ -actin에 대해 상대적인 정량분석을 하였다. GDF-9 유전자 발현은 아직은 성장을 시작하지 않은 임신 19일의 태아의 난소, 대부분이 원시난포로 이루어진 태어난 날의 생쥐 난소에서도 확인되었으며, 성장이 왕성하게 진행되고 있는 난포 즉, antrum 형성 이전의 growing follicles이 주를 이루는 생후 10일째의 난소에서 가장 높은 GDF-9 유전자 발현이 관찰되었다. 나머지 단계의 난소에서는 거의 비슷한 정도로 발현함을 관찰할 수 있었다. 본 연구의 결과는 생쥐의 원시난포에도 GDF-9 transcript가 존재한다는 것을 확실하게 증명하였으며, GDF-9이 생쥐의 초기 난포발달에 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 시사한다.

**ABSTRACT :** Growth differentiation factor-9 (GDF-9) is a member of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily. It has been known that GDF-9 is a growth factor having a crucial role in normal folliculogenesis and its expression is oocyte-specific. The present study was aimed to elucidate the expression of GDF-9 mRNA in the mouse primordial follicles as well as in the other developmental stages. The semiquantitative analysis of GDF-9 mRNA expression was conducted. Total RNA was extracted from the ICR mice ovaries at gestational day 19, postnatal day 1, day 10, day 21, and day 28, and RT-PCR was performed to measure GDF-9 and  $\beta$ -actin mRNA levels. Level of GDF-9 mRNA were normalized against the level of  $\beta$ -actin mRNA, and compared among different stages. GDF-9 mRNA was detected in all samples including the fetal ovaries that mainly consists of primordial follicles. The highest level of mRNA was observed in ovaries obtained at day 10 that mainly consists of growing follicles. The present result suggests that GDF-9 may play an important role in the early stage of folliculogenesis.

**Key words :** Mouse, Ovary, GDF-9, Developmental stages, RT-PCR.

## 서 론

포유류의 난소에서 일어나는 난포발달과정 (folliculogenesis)은 여러 가지의 호르몬과 성장인자들이 서로 작용하여 난자나 과립세포 (granulosa cells), 그리고 협막세포 (theca cells) 등의 성장과 분화를 조절하는 매우 복잡한 과정이다. 난포의 성장은 몇 개의 편평 과립세포 (flattened granulosa cells)로 둘러싸여 있으며 성장이 정지된 상태인 원시난포

(primordial follicles)에서부터 시작되는데, 난포의 성장이 시작되면 과립세포는 입방형 (cuboidal granulosa cells)으로 변화하며, 난자의 성장도 시작된다 (Hirshfield, 1991). 난포의 초기 발달과정, 특히 성장의 개시 (initiation)는 어떻게 조절되는지 아직 잘 알려져 있지 않은 반면 난포발달 후기에는 성선자극 호르몬이 필요하다는 것은 잘 알려져 있다 (Richards, 1980; Fortune, 1994). 난포의 초기발달에는 성선자극 호르몬보다는 난소내의 성장인자와 같은 국소 조절인자의 작용이 중요하리라는 견해가 지배적이다. 실제로 이제까지의 개념은 과립세포나 협막세포에서 분비되는 성장인자가 난자의 성장을 조절하는 것으로 알려져 왔는데 최근에 난

본 연구는 보건복지부 보건과학기술연구개발사업 (HMP-98-M-5-0054)의 지원으로 수행되었음.

자로부터 생성·분비되어 주위의 난포세포들의 성장과 분화를 조절하는 성장인자가 발견되어 반대 방향으로의 조절과 정도 존재할 것으로 사료되고 있다. 난자로부터 분비되는 성장인자로서 최초로 밝혀진 것이 바로 growth differentiation factor-9 (GDF-9)으로서 TGF- $\beta$  계열의 성장인자이다. McPherron과 Lee에 의하면, GDF-9 유전자는 생쥐의 난소에서만 특이적으로 발현되며 정소를 포함하는 다른 조직에서는 존재하지 않음을 northern analysis를 통해 관찰하였다 (McPherron and Lee, 1993). 그러나 최근의 연구보고에 따르면 생쥐, 흰쥐, 그리고 인간의 여러 조직으로부터 GDF-9 유전자 발현을 관찰한 결과, 난소에서는 물론 정소를 포함한 다른 여러 조직에서도 GDF-9 transcripts가 존재함을 northern analysis를 통해 확인하였고 특히 생쥐의 정소에서는 large pachytene spermatocytes와 round spermatids에서 특이적으로 발현됨을 in situ hybridization을 통해 조직적으로 관찰되었다 (Fitspatrick et al., 1998).

지금까지의 보고에 있어서 GDF-9 유전자 구조는 인간 (McGrath et al., 1995), 생쥐 (Incerti et al., 1994), 양 (Bodensteiner et al., 1999)에 있어서 모두 single intron에 의해 분리된 두 개의 exon으로 이루어져 있으며 생쥐의 경우 2.9kb의 single intron과 exon1은 397bp, exon2는 926bp의 protein-coding region으로 이루어져 있다.

1996년 Dong 등은 GDF-9이 결핍된 생쥐의 난소는 한 층 이상의 과립세포를 가진 난포 이후로의 발달이 일어나지 않아 원시난포 또는 한 층의 과립세포를 가진 primary follicles 만으로 이루어져 있음을 관찰하였고 이러한 난포는 GDF-9 결핍으로 인한 비정상적인 구조를 갖고 있음을 보고하였다 (Dong et al., 1996; Carabatsos et al., 1998). 또한 Hayashi 등은 rat의 preantral follicle을 체외배양 하는데 있어서 recombinant GDF-9을 첨가함으로써 대조군에 비하여 난포 발달이 향상되며 GDF-9과 FSH를 함께 첨가하였을 때 난포 발달에 더 좋은 영향을 주었음을 보고하였다 (Hayashi et al., 1999). 이러한 사실들로부터 GDF-9이 정상적인 난포발달과정에, 특히 난포 및 난자의 초기성장 발달에 있어 매우 중요한 역할을 하리라 생각된다. 그런데 GDF-9의 발현이 시작되는 시기에 관한 이제까지의 연구결과들이 서로 일치되지 않고 있다. 생쥐 (McGrath et al., 1995)나 흰쥐 (Hayashi et al., 1999) 등의 GDF-9의 localization에 관한 연구에서는 원시난포를 제외한 모든 발달단계의 난포에서 GDF-9 mRNA와 단백질을 각각 관찰하였다고 보고하고 있다. 반면, Laitinen 등이나 Bodensteiner 등은 생쥐 및 양과 소의 원시난포에서도 GDF-9 mRNA를 관찰하였다고 보고하고 있다

(Laitine et al., 1998; Bodensteiner et al., 1999). 난포의 초기 발달, 특히 initiation에 관한 GDF-9의 역할을 규명하기 위해서는 자세한 GDF-9의 발현여부를 연구할 필요가 있다. 따라서 본 저자들은 RT-PCR을 사용하여 생쥐의 원시난포에서의 GDF-9 발현 및 발달단계별 난포에서의 상대적인 GDF-9 mRNA 발현정도를 비교 분석하고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에서는 ICR 생쥐를 사용하였으며 질전 (vaginal plug)이 확인된 날을 1일로 하여 임신 19일의 태아와 태어난 날을 1일로 하여 생후 1일, 10일, 21일, 그리고 28일된 생쥐의 난소를 실험에 사용하였다. 태아의 경우 임신 19일자의 어미를 경추 도살하여 자궁을 적출 하여 태아를 획득하였고, 적출 한 태아를 4°C의 phosphate buffered saline (PBS)에서 난소를 적출 한 후 PBS로 세척하여 액체질소에 급속 냉동시켜 사용 전까지 -70°C의 저온냉동기에 보관하였다.

### 2. 조직학적 관찰

각 시기별 난소의 발달과정을 형태학적으로 관찰하기 위해 조직화학적 준비를 하였다. 10% neutral-buffered formalin solution (NBF)에 고정된 생식소를 알콜처리과정을 거쳐 탈수시키고 xylene에 투명화 시킨 후 paraffin을 침투시켜 포매하였다. 그런 후 박편절단기 (Microtome, Leica)를 사용하여 5 $\mu$ m 두께로 절편하였다. Xylene 처리과정을 통해 절편으로부터 paraffin을 제거하고, 알코올 처리과정을 거쳐 물로 세척한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하였다.

### 3. RNA 분리

준비된 각 시기별 조직을 single-step RNA isolation 방법 (Chomczynski and Sacchi, 1987)을 기초로 제작된 TRIzol (Gibco BRL) 용액을 넣고 균질화 시킨 후 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 전체부피의 1/5에 해당하는 chloroform을 넣고 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심 분리하였다. RNA를 포함하는 무색의 상층액을 취한 후 동일한 양의 isopropanol을 첨가하고 상온에서 10분간 방치한 후 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라버린 후 75% ethanol을 넣고 4°C에서 5분간 7,500 g로 원심 분리하였다. RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -70°C 저

온냉동기에 보관하였다.

#### 4. 역전사 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응에는 분리된 total RNA를 2 $\mu$ g 사용하여 SuperScript Preamplification System (Gibco BRL)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 총 반응 용액을 20 $\mu$ l로 하여 SuperScript II RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase 200U, oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer 0.5 $\mu$ g을 사용하여 cDNA를 합성하였고 negative control로는 reverse transcriptase 없이 반응한 것을 cDNA 대신 사용하였다. 증합효소 연쇄반응 (PCR)에 사용된 GDF-9 primer는 GDF-9 mouse cDNA full sequence (Incerti et al., 1994)를 기초로 하여 exon1 상의 forward primer 5'-GGTTCTATCTGATAGG-CGAGG-3'와 exon2 상의 reverse primer 5'-GGGGCT-GAAGGAGGGAGG-3'를 제작하여 실험에 사용하였고 예상되는 결과는 446bp였다. PCR은 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 1 $\mu$ M의 각각의 primer, 2.5U Taq DNA polymerase (Promega)를 전체 50 $\mu$ l 반응으로 하여 시행하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation 반응한 후에 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 67 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 30회 반복하였고 postelongation 반응을 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 실시하였다. 이를 통해 얻어진 PCR product는 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후에 ethidium bromide로 염색하여 transilluminator로 확인하였다. PCR reaction에서 cDNA의 존재를 확인하고 동량의 RNA로부터의 RT-PCR을 통한 상대적인 양을 비교하고자  $\beta$ -actin 발현을 positive control로 사용하였다. 상대적인 GDF-9 발현정도를 알아보기 위하여 전기영동 한 결과를 Image Analyzer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 정량분석하고,  $\beta$ -actin의 발현에 대한 GDF-9 발현정도를 arbitrary unit (AU)로 환산하였다.

#### 5. Subcloning 및 DNA 염기서열 결정 (sequencing)

RT-PCR을 통해 얻어진 product가 GDF-9의 염기서열임을 확인하기 위하여 sequencing을 실시하였다. PCR 산물을 gel extraction kit (Qiagen)를 사용하여 정제하고 정제된 DNA 단편을 pT7Blue T-vector에 ligation한 후 형질전환 시키고, ampicillin이 포함된 agar 배지에서 X-gal selection을 수행하였다. 이 중 white colony를 선택하여 ampicillin이 포함된 LB 배양액에서 37 $^{\circ}$ C, overnight 배양하였다. 이렇게 해서 얻어진 plasmid는 alkaline-SDS 법으로 추출한 후 음이온 교환수지로 정제하였다. DNA 염기서열 결정은 BigDye™

termination cycle sequencing Ready Reaction kit (Takara)를 사용하여 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서의 4분간 반응을 25회 실시하였으며 이 반응물을 5% Long Ranger™ gel에 전기영동 하였다.

#### 6. 통계분석

통계학적 유의성 검증은 one-way ANOVA 및 log linear model을 이용하여 수행하였으며 p값이 0.05 보다 작은 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

#### 1. 생쥐의 발달단계에 따른 난소의 조직학적 관찰

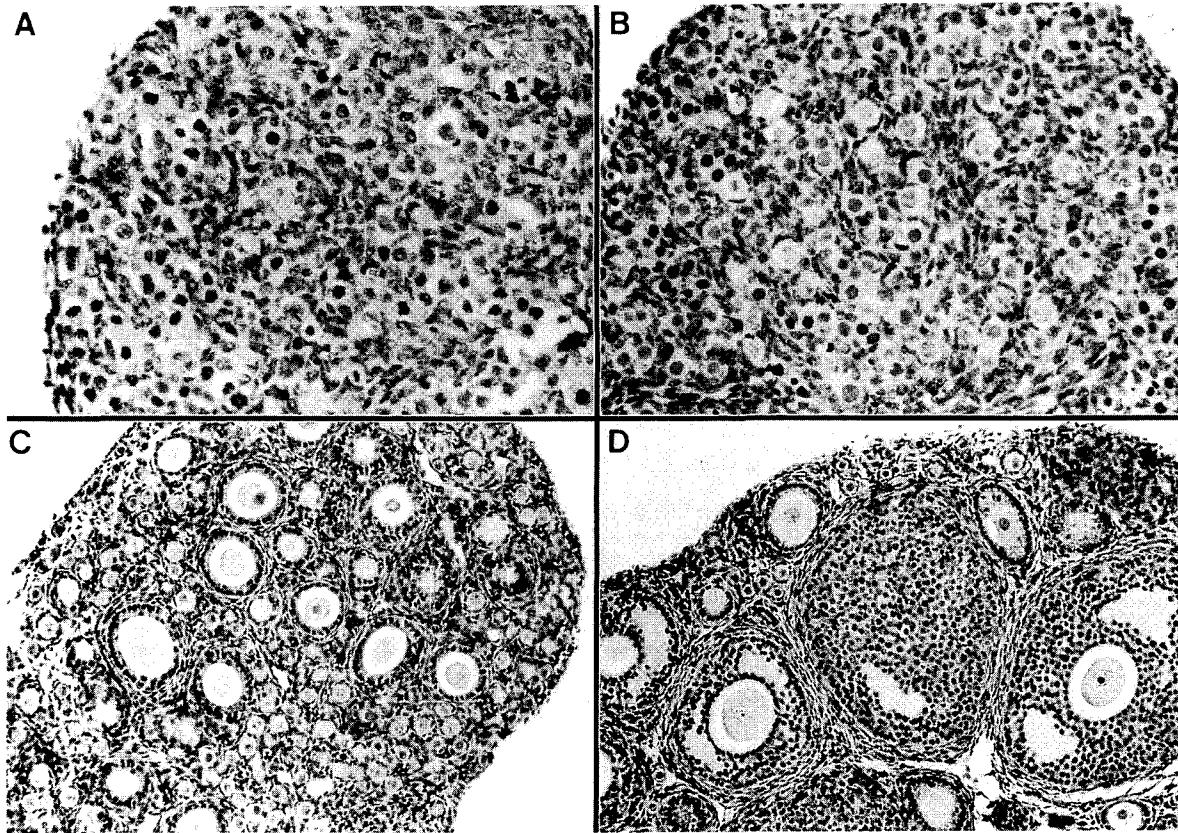
생쥐 난소의 발달과정을 조직학적 방법으로 비교하였다. 임신 19일째 태아의 난소에서는 핵응축이 일어난 난자를 난포세포들이 둘러싸고 있는 원시난포가 관찰되었고 (Fig. 1A), 출생 직후의 난소에서는 대부분의 생식세포들이 원시난포의 전형적인 형태인 한층의 편평한 과립세포 (flattened granulosa cells)에 의해 난자가 싸여있으며, 극히 일부 원시난포에서는 이미 성장을 시작하여 과립세포 중 몇 개는 입방형 (cuboidal granulosa cells)을 띄고 있으나 대부분의 원시난포들은 성장을 시작하지 않은 상태에 머물러 있는 것을 관찰하였다 (Fig. 1B). 생후 10일째의 난소에서는 대부분이 성장중인 난포들로서 antrum 형성 이전의 난포들로 구성되어 있으며 (Fig. 1C), 생후 21일째의 성숙이 시작된 시기의 난소에서는 표면쪽에 관찰되는 원시난포로부터 antrum을 형성한 난포까지 모든 종류의 난포들이 존재한다 (Fig. 1D).

#### 2. GDF-9 RT-PCR product의 염기서열 결정

PCR 산물이 mouse GDF-9 유전자임을 확인하기 위하여 sequencing을 실시하였다. 먼저 X-gal selection을 통해 형질전환 된 colony를 선택한 후, NdeI과 BamHI 제한효소를 사용하여 원하는 길이의 DNA가 삽입된 colony를 screening한 후 sequencing한 결과, GDF-9 PCR 단편의 염기서열이 이미 보고된 생쥐의 GDF-9 유전자의 염기서열 (Incerti et al., 1994)과 정확히 일치함을 확인하였고 그 결과를 생쥐의 GDF-9 구조 및 본 실험에 사용한 primer의 위치와 함께 Fig. 2에 나타내었다.

#### 3. GDF-9 유전자의 발현 양상

생쥐의 난소의 발달단계에 따른 GDF-9 유전자의 발현양상을 알아보기 위하여 임신 19일째의 생쥐 태아와 생후 1일,



**Fig. 1.** Representative microphotographs of ovarian tissues at different developmental stages. A, gestational day 19; B, postnatal day 1; C, postnatal day 10; D, postnatal day 21 mouse ovarian tissue. Magnification  $\times 400$  (A,B) and  $\times 200$  (C,D).

10일, 21일, 그리고 28일째의 생쥐로부터 난소를 분리하여 total RNA를 추출한 후 RT-PCR 방법으로 GDF-9 유전자의 발현을 조사하였다 (Fig. 3A). Positive control로 사용된  $\beta$ -ac-

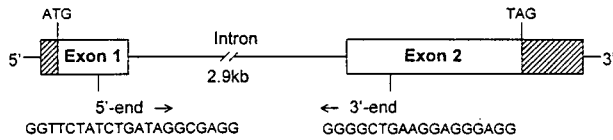
tin 발현량은 동일한 양의 total RNA를 가지고 RT-PCR을 수행했을 때 모든 발달단계의 난소에서 상대적으로 동일한 발현을 보였다. GDF-9 발현은 오직 원시난포 뿐인 임신 19일째의 태아의 난소에서도 관찰되었고 그 이후의 난소에서도 모두 GDF-9 유전자의 발현을 관찰할 수 있었다.

RT-PCR에 의한 GDF-9 transcript의 발현정도를  $\beta$ -actin의 발현정도에 대한 상대적인 양으로 분석한 후 그 결과를 그래프로 나타내었다 (Fig. 3B). 역전사 반응을 통해 얻어진 동일한 cDNA로 GDF-9과  $\beta$ -actin에 대한 PCR을 3번 반복 수행한 후 각 발현량의 평균치를 구했을 때  $\beta$ -actin에 대한 GDF-9 mRNA 발현은 유의적인 차이는 없었으나 생후 10일의 생쥐 난소에서 상대적으로 가장 높은 발현을 보였다.

## 고 찰

GDF-9은 TGF- $\beta$  family의 member이며 난자에서 생성 분비되는 성장인자로서 정상적인 난포발달에 있어 필수적이다 (Dong et al., 1996; Matzuk et al., 1998). 다른 성장인자들과는 달리 난자에서 만들어져 난포세포 및 과립세포의 발달과 성숙을 조절한다고 알려져 있다 (McGrath et al., 1995; Gosden, 1996). TGF- $\beta$  superfamily의 성숙인자들은 serine/threonine 수용체에 결합하여 수많은 분화의 과정에 영향을 주며 이들 중 inhibin, activin, Mullerian inhibitory substance (MIS) 등은 생식소에서의 성장과 분화를 조절하는 중요한 역할을 한다. 새로운 TGF- $\beta$  superfamily의 member로 밝혀진 GDF-9은 GDF-9 유전자가 결여된 암컷 생쥐에서의 난포발달 연구를 통하여 정상적인 난포발달에 필수적인 성장인자로 규명되었다 (Dong et al., 1996; Carabatsos et al., 1998). 이러한 난포에서의 미세구조적 특징을 관찰한 결과 난자의 경우 핵주변의 소기관들이 모여있고 비정상적인 골지복합체가 관찰되었으며 피질과립 (cortical granule)은 형성되지 않았다. 또한 과립세포와 난자간의 구조를 전자 현미경 및 공초점 현미경 (confocal microscope)를 통해 관찰하였을 때 정상 생쥐에 있어서는 난자표면과 투명대 바깥표

A. Structure of the mouse GDF-9 gene



B. Sequence of PCR product

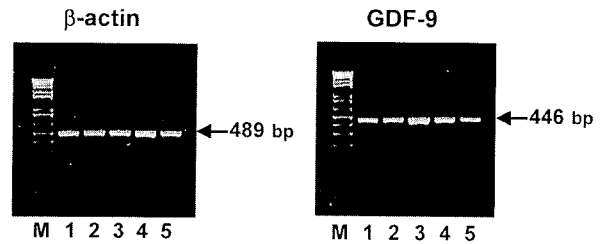
5' GGGTCTATCTGATAGGCGAGGAGGAGCCCTAAGCTGCAGCCTGACTCCAGA  
 GCACCTACTACATGAAAAAGCTCTATAAGACGTATGCTACCAAGAGGGGGTTC  
 CCAAACCCAGCAGAAGTCACTCTACAATACCGTCCGGCTCTCAGTCCCTGTGC  
 CCAGCAAGAGCAGGCACCCAGCAACCAAGGTGACAGGACCGCTGCCGATGGTGG  
 ACCTGCTTTAACCTGGACCGGGTGACTGCCATGGAACACTTGTCAAATCGGT  
 CTTGCTATACACTGAAACAACCTCTCCCTCTCCCTCCACTGTGACCTGTATGT  
 GTGACCTTGTGGTAAAGGAGGCCATGTCTTCTGGCAGGGCACCCCAAGAGCAC  
 CGTACTCATTCACCCCTGAAGAAACACAGATGGATTGAGATTGATGTGACCTCCCT  
 CCTTACGCCCC-3'

**Fig. 2. A representative diagram to illustrate the position of designed mouse GDF-9 primer binding sites and a nucleotide sequence of PCR product.** (A) The primers were designed to cross the exon and intron regions. Open regions denote protein-coding portions and the hatched regions denote the untranslated portions. (B) The DNA sequence of PCR product matched exactly with the mouse GDF-9 sequence that has been reported previously (Incerti et al., 1994).

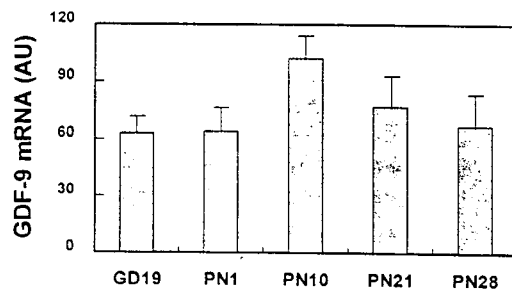
면에 actin이 많이 분포하는 actin-rich zone을 이룬 반면 GDF-9이 결핍된 생쥐에서는 actin 분포가 그 보다 훨씬 적었고 transzonal projection에 있어서도 변화가 있음이 보고되었다. 이처럼 GDF-9 결핍으로 인한 세포간 (cell-cell)의 비정상적 구조의 관찰을 통해서 정상적인 난포발달 과정에서, 특히 초기의 preantral follicles의 성장과 발달에 있어서 GDF-9이 중요한 역할을 하리라고 추측되었다 (Carabatsos et al., 1998).

1995년 McGrath 등은 생쥐의 난포발달 과정 중 GDF-9 유전자는 원시난포를 제외한 primary follicle 이후의 단계에 있는 난자에서만 mRNA transcript가 발현됨을 in situ hybridization 방법을 통하여 조직적으로 확인하였고 (McGrath et al., 1995), rat의 난소에서도 Hayashi 등이 면역화학분석을 통해 GDF-9 발현을 관찰한 결과 원시난포를 제외한 이후의 모든 단계의 난자에서 GDF-9 단백질이 발현됨을 관찰하였다 (Hayashi et al., 1999). 그러나 본 연구의 저자들은 대부분이 원시난포로 이루어진 neonatal 생쥐의 난소나, 또는 이보다 더 이전 단계 즉, 원시난포 이후로의 난포발달은 전혀 관찰되지 않는 임신 19일의 태아의 난소에서도

A



B



**Fig. 3. GDF-9 mRNA expression at various developmental stages of mouse ovaries.** (A) RT-PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. M, DNA marker; 1, gestational day 19; 2, postnatal day 1; 3, postnatal day 10; 4, postnatal day 21; 5, postnatal day 28 mouse ovarian tissue. (B) Relative amount of GDF-9 mRNA was normalized with the level of  $\beta$ -actin mRNA. The RT-PCR product was scanned and analyzed by image analyzer. Data were expressed in arbitrary unit, and represented mean  $\pm$  SEM from 3 repeated experiments. GD19, gestational day 19; PN1, postnatal day 1; PN10, postnatal day 10; PN21, postnatal day 21; PN28, postnatal day 28 mouse ovarian tissue.

GDF-9 transcript를 RT-PCR 방법으로 확인하였으며 이때의 PCR product가 이미 보고된 생쥐의 GDF-9 염기서열과 정확히 일치함을 확인하였다. 이것은 GDF-9이 원시난포에서부터의 난포발달에 역할을 할 가능성을 시사한다.

최근의 연구보고에 따르면 생쥐의 난포발달 과정에서 GDF-9과 co-expression 되는 난자 특이적인 새로운 인자가 있음을 보고하였으며 이를 GDF-9B라고 명명하였다 (Laitinen et al., 1998). 이들의 연구에 의하면 태어난 날의 newborn 생쥐의 난소에서 GDF-9과 GDF-9B의 mRNA 발현을 본 결과 GDF-9B의 경우는 원시난포의 난자에 있어서 background 이상의 발현을 볼 수 없었던 반면, GDF-9의 경우는 GDF-9B보다는 뚜렷하게 발현된다고 보고하였다. 또한 최근

에 ovine과 bovine에 있어서도 GDF-9 mRNA가 원시난포의 난자에서 발견되는 것이 in situ hybridization 방법을 통해 조직적으로 관찰되었다 (Bodensteiner et al., 1999). 이들 최근의 연구보고들이 McGrath 등의 연구결과와 상반된 이유는 아마도 난포를 분류하는 criteria가 달랐거나 in situ hybridization 방법의 sensitivity에 차이가 있었거나 또는 종 특이성 때문일 수 있을 것이다.

본 연구결과, GDF-9 mRNA는 원시난포 단계에서부터 존재하며 특히 주로 primary 또는 secondary 단계의 난포로 이루어진 생후 10일 쯤의 난소에 가장 많이 존재하는 것으로 미루어 이 시기의 난포발달에 중요한 역할을 할 것으로 추측할 수 있다. 이는 실제로 GDF-9 결핍 생쥐의 난소에서도 관찰된 결과, 즉 GDF-9 없이는 secondary 난포 단계 이상의 발달이 정상적으로 이루어지지 않았다는 사실과도 일치한다고 볼 수 있겠다 (Dong et al., 1996).

본 연구는 생쥐의 원시난포에도 GDF-9 mRNA가 존재한다는 것과 생쥐난소의 발달단계에 따른 상대적인 GDF-9 유전자 발현을 RT-PCR을 이용해 비교한 최초의 보고이다. 그러나 mRNA의 존재만으로는 기능을 이야기 할 수 없으므로 GDF-9 단백질 단계에서의 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR (1999) Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 60:381-386.
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF (1998) Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 204:373-384.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of mRNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Rajendra Kumar T, Lu N, Matzuk MM (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535.
- Fitzpatrick SL, Sindoni DM, Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler IJ, Frail DE (1998) Expression of growth factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology* 139:2571-2578.
- Fortune JE (1994) Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225-232.
- Gosden R (1996) The vocabulary of the egg. *Nature* 383:485-486.
- Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140:1236-1244.
- Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
- Incerti B, Dong J, Borsani G, Matzuk MM (1994) Structure of the mouse growth/differentiation factor 9 gene. *Biochim Biophys Acta* 1222:125-128.
- Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O (1998) A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 78:135-140.
- Matzuk MM (1998) Transgenic models in the study of reproduction. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB (ed), *Fertility and Reproductive Medicine*, Elsevier, Amsterdam, pp17-25.
- McGrath SA, Esqueda AF, Lee S-J (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9:131-136.
- McPherron AC, Lee S-J (1993) GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268:3444-3449.
- Richards JS (1980) Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60:51-89.