

감수분열 재개 동기화가 소 미성숙 난자의 체외 성숙에 미치는 영향

박종임[†] · 장유니
건국대학교 수의과대학 산과학교실

Effect of the Synchronization of Meiotic Resumption in Bovine Oocytes Matured *In Vitro*

J. I. Park[†] and Y. Jang

Department of Theriogenology, College of Veterinary Medicine,
Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

SUMMARY

This study was carried out to test the efficacy of pharmacological inhibitors of the cell cycle transition in keeping bovine oocytes at the germinal vesicle (GV) stage and the reversibility of this inhibition. Bovine oocytes were incubated for 22~24 hrs in the presence of various inhibitors: cycloheximide (2 $\mu\text{g/ml}$), 6-DMAP (2 mM), and roscovitine (50 μM). Bovine oocytes cultured with any of the inhibitors were significantly blocked at the GV stage. Reversibility of pharmacological inhibitors was assessed by culturing oocytes an additional 22~24 hours in inhibitor-free medium. Examination of oocytes revealed that the inhibitory effect was fully reversible and the effect of resuming meiotic progression on nuclear maturation varied according to the various inhibitors. This study suggests that cycloheximide, 6-DMAP and roscovitine can be applied to control meiotic arrest and resumption in maturation culture of bovine oocytes *in vitro*. More investigations are needed to better understand how the cell cycle of oocyte is blocked without problems to future developmental competence.

(Key words : bovine, oocytes, *in vitro* maturation, meiotic arrest, meiotic resumption)

서론

포유류의 난자는 체내에서 1차 감수분열 전기에 정지된 상태이며 이를 germinal vesicle (GV)시기라고 한다(Motlik과 Kubelka, 1990). 이 시기에는 농축된 genome의 활발한 전사과정이 일어나 추후의 난자 성숙과 embryo 발달 과정에 요구되는 RNA가 농축된다. 체내에서의 배란 전 LH peak 후 난자는 감수분열을 재개하게 되는데, 난포벽을 구

성하는 세포 및 난포액은 감수분열의 진행을 억제하는 성분을 함유하고 있으며 난포에서 난자를 분리하여 적절한 배양 환경에서 체외 배양하면 자발적으로 감수분열을 재개하여 metaphase II기에 도달한다(Sirard, 2001; Richard와 Sirard, 1996). 이 시기에 감수분열은 다시 정지되고 정상적인 수정과정이 일어나면 제2감수분열이 완료된다(Sirard, 2001).

소의 난자는 체내에서 성숙되고 배란된 것에 비

본 연구는 2003년 농촌진흥청 바이오그린 21사업(1000520030100000)의 지원에 의해 수행되었음.

[†] Correspondence : E-mail : jipark84@konkuk.ac.kr

해 체외에서 성숙한 난자의 초기 발생능이 낮은 것으로 알려져 있다. 이러한 소 미성숙 난자의 발생능을 증진하기 위해 다양한 방법이 연구되어 왔는데 이중 인위적으로 감수분열 과정을 GV 기에 holding하여 이 기간 중 후속 발생에 필요한 능력을 획득하게 하고자 하는 의도로 세포주기의 이행을 조절하는 약제를 성숙 배지에 첨가하는 방법이 소와 돼지 등에서 시도되어 왔다 (le Beaux 등, 2003; Ponderato 등, 2002; Lonergan 등, 2000; Mermillod 등, 2000; Sirard 등, 1998; Lonergan 등, 1997; Saeki 등 1997). 또한 체세포 핵이식, 미세정자 주입법 및 형질전환동물 생산 등 다양한 생물공학적인 기법에 이용되는 embryo의 체외 생산을 극대화하기 위하여서는 난자의 질에 영향을 주지 않고 핵성숙 완료 및 채취 난자의 감수분열 재개를 동기화를 유도하는 가역적인 세포주기 조절 약제가 요구되는 것으로 알려져 있다 (Alberio 등, 2001; Sirard 등, 1998).

이들 세포주기 조절 약제는 다양한 작용 기전에 의해 난자의 GV breakdown (GVBD)를 저해를 유도하는 작용이 있는데 (Alberio 등, 2001; Sirard 등, 1998) 본 연구에서는 cycloheximide (CHX), 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), roscovitine를 이용하여 소 미성숙 난자에 있어서 가역적인 감수분열 저해가 핵성숙에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 난자의 회수

도축우의 난소의 직경 3~8 mm 난포에서 18 gauge 주사침으로 미성숙 난자를 흡인 채취하였다. 실체 현미경 하에서 난구세포층이 치밀하고 난세포질이 균질하며 동등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2. In Vitro Maturation

회수한 난자는 5 % (w/v) bovine serum albumin (BSA; Life Technologies), 10 μ g/ml penicillin-streptomycin solution (Sigma-Aldrich Co.)이 첨가된 HEPES-buffered tissue culture medium-199 (TCM 199; Life Technologies)로 3회 세정 후 체외

성숙 배양에 공시하였다. 세포주기 조절 약제 비처리 난자군은 난자 세정 후 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Hyclone), 1 mM Na-pyruvate, 5 IU follicular stimulating hormone (FSH, Intervet), 10 μ g/ml estradiol (Sigma-Aldrich Co.), 10 μ g/ml penicillin-streptomycin solution (Sigma-Aldrich Co.)이 첨가된 성숙 배양 배지에서 39°C, 5% CO₂, 20% O₂, 기상조건인 포화 습도 배양기에서 22~24시간 배양하였다.

3. Meiotic Arrest and Resumption

Cycloheximide (CHX; Sigma-Aldrich Co.), 6-dimethylaminopurine (6-DMAP; Sigma-Aldrich Co.), Roscovitine (Sigma-Aldrich Co.)를 배지에 각각 2 μ g/ml, 2 mM, 50 μ M를 상기의 체외 성숙 배지에 첨가하여 5% CO₂, 20% O₂의 기상 조건으로 포화 습도 배양기에서 22~24시간 배양을 실시하였다. 이후 난자를 수 회 세정하여 상기 약제를 제거한 체외 성숙 배지에서 다시 22시간 배양하였다.

4. 체외 성숙 난자의 핵성숙 평가

체외 성숙 및 감수분열 정지와 재개 후의 핵상 관찰은 세포주기 저해제를 첨가하지 않은 난자는 배양 후 22~24시간 후, 세포주기 저해제 처리 난자는 약제 제거 후 22시간 체외 성숙 배양 이후에 실시하였다. 0.2 % (w/v) hyaluronidase (Sigma-Aldrich Co.)와 신속한 pipetting으로 난구세포를 제거한 후 1% aceto-orcein 염색액으로 염색하여 도립 현미경하에서 관찰하였다. 핵상에 따라 GV, GVBD, metaphase I, metaphase II로 분류하였다 (Ponderato 등, 2002).

5. 통계학적 분석

각 실험군 간의 핵상에 관한 유의성 검정은 SAS 8.12 program을 이용한 general linear model (PROC-GLM)로 실시하였다.

결과 및 고찰

소 미성숙 난자를 cycloheximide (CHX), 6-DMAP, roscovitine을 첨가하여 22~24시간 체외 성

숙 배양을 실시한 결과 이들 약제를 첨가하지 않고 배양한 난자에 비해 핵성숙 과정이 저해되어 높은 비율의 germinal vesicle (GV)상태를 유지하고 있음을 알 수 있었다 ($P < 0.05$)(Table 1). 이는 CHX, 6-DMAP처리한 소 난자, (Saeki et al., 1997), roscovitine을 처리한 소 난자(Ponderato et al, 2001; Vigneron et al., 2003)와, CHX, 6-DMAP, roscovitine을 첨가하여 배양한 돼지 난자 (le Beux et al, 2003)의 결과와도 유사하였다.

CHX, 6-DMAP 및 roscovitine을 배지에서 제거한 후 다시 22~24시간 배양하여 핵상을 관찰하여 약제에 의한 감수분열 저해가 가역적으로 해제되었는지 알아본 결과 약제 비첨가 성숙 배양군과

유사한 핵 성숙율을 나타냄을 알 수 있었다 (Table 2). CHX와 6-DMAP의 경우 roscovitine에 비해 MII로 이행한 성숙 난자의 비율이 유의적으로 높았으며 ($P < 0.05$), GV 상태로 정지된 후 세포주기가 다시 진행되었을 때 GV 상태에서 정지된 비율은 CHX로 처리한 난자에서 가장 낮게 나타났다. GVBD로의 이행도 CHX와 6-DMAP 처리 시 높게 나타났으며, MI 기로의 이행은 약제를 처리하지 않은 난자와 CHX, roscovitine처리 난자에서 높게 나타났다. 이는 CHX, 6-DMAP 및 roscovitine이 가역적인 감수분열 저해 작용이 있음을 나타낸다고 할 수 있다(Ponderato 등 2002; Sirard, 2002; Saeki 등 1997).

감수분열의 재개는 M-phase promoting factor (MPF)의 활성화를 유도하는 phosphorylation과 dephosphorylation 과정의 복합적인 상호 작용에 의해 조절된다. MPF는 catalytic subunit (P34cdc2)와 regulatory subunit (cyclin B)로 이루어져 있으며 세포주기 중 S 기와 G2기로 이행하며 이 두 subunits가 결합하여 MPF의 불활성화 형태인 pre-MPF를 형성하면 phosphorylation과 dephosphorylation 과정에 의해 활성형 MPF로 전환하게 된다(Alberio et al, 2001; Sirard et al., 1998). Cycloheximide(CHX)는 glutaramid antibiotic이며 진핵세포의 단백질 합성 저해제이며 GVBD를 저해한다. Puromycin analog인 6-dimethylaminopurine (6D-MAP)은 대부분의 동물종의 난자의 성숙을 저해

Table 1. Pharmacological Inhibition of meiotic resumption in bovine oocytes by CHX, 6-DMAP or roscovitine for 22~24 hrs

	No. of oocytes cultured	GV(%)
Control	87	6 (6.9) ^a
CHX	95	78 (82.1) ^b
6-DMAP	90	73 (81.1) ^b
Roscovitine	105	81 (77.1) ^b

^{ab} Values differ significantly ($P < 0.05$).

Control: no supplement of CHX, 6-DMAP or roscovitine. GV: germinal vesicle.

Table 2. Reversibility of pharmacological inhibition on the nuclear maturation stage of bovine oocytes after removal of CHX, 6-DMAP or roscovitine with subsequent 22~24 hrs culture

	No. of oocytes culture	GV(%)	GVBD(%)	MI(%)	MII(%)
Control	302	26(8.7) ^b	32(10.6) ^b	44(14.6) ^a	200(66.2) ^{ab}
CHX	479	15(3.1) ^c	85(17.7) ^a	61(12.7) ^{ab}	318(66.4) ^{ab}
6-DMAP	445	28(6.3) ^b	66(14.8) ^{ab}	49(11.0) ^b	302(67.9) ^a
Roscovitine	480	69(14.3) ^a	54(11.3) ^b	62(12.9) ^{ab}	295(61.5) ^b

^{abc} Values differ significantly ($P < 0.05$).

Control: no supplement of CHX, 6-DMAP or roscovitine in 22-24 hrs culture.

GV: germinal vesicle / GVBD: germinal vesicle breakdown.

MI: metaphase I / MII: metaphase II.

하며 단백질 합성에 영향을 주지 않고 GVBD로의 이행을 가역적으로 방지한다(Kalous et al., 1993). Roscovitine은 C2, N6, N9-substituted adenine family로서 역시 purine analog이다. 그러나 roscovitine은 다른 약제와는 달리 MPF의 활성 및 세포 주기에 관여하는 cdk family의 선택적인 저해제로서 세포 내의 전체적인 단백질 합성에 거의 영향을 미치지 않은 것으로 알려져 있다(Alberio et al., 2001; Faerge et al., 2001). 본 연구에서는 GV기 상태에서 동시에 인위적인 감수분열 정지를 해제하였을 때 처리한 약제의 종류에 따라 세포 주기 진행 정도에 차이가 있음을 핵상 분석을 통해 알 수 있었으며, 이는 향후 발달 정도가 다른 난포에서 서로 다른 세포 주기 상태인 난자를 채취하여 이용하고자 할 때 감수분열 억제 작용이 있는 약제의 선별이 중요함을 나타내는 것이라고 할 수 있다. 포유류의 난자는 GnRH surge가 일어나고 감수분열 재개가 일어날 때까지 diplotene 시기에 정지되어 있으며, 난포에서 채취한 난자는 자발적으로 감수분열을 재개하고 대형 난포에서 채취한 난자일수록 작은 난포 유래의 난자에 비해 발생능이 높은 것으로 알려져 있다(Lonergan et al., 1994). 인위적으로 GV기에서 정지를 유도한 후 동시에 감수분열을 완료할 수 있도록 난자의 세포 주기를 동기화 할 수 있다면 보다 균질한 성숙 정도의 소 난자를 이용할 수 있을 것이다. 본 연구의 결과로는 핵상 관찰만으로 서로 다른 작용으로 난자의 세포 주기를 저해하는 약제에 의한 성숙 효율을 검증할 수는 없었으나 범용 단백질 합성 저해제인 CHX와 6-DMAP에 비해 선택적인 단백질 합성 저해 작용을 나타내는 roscovitine의 가역적인 감수분열 정지 효과가 난자의 후속 발생능에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다 (Mermillod 등, 2000). 추후 소 난자의 감수 분열의 정확한 진행 기전 및 이에 관여하는 인자에 대한 규명과 함께 세포주기 조절 약제가 난자의 초기 embryo 발생에 미치는 영향이 함께 연구되어야 할 것이다.

적 요

본 연구에서 소 미성숙 난자의 성숙 배양 시 세

포주기 억제제인 cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine를 첨가하였을 때 난자의 감수분열이 억제제 비 첨가난자에 비해 높은 비율로 germinal vesicle기에 정지된 것이 관찰되었다. 또한 cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine을 배지에서 제거한 후 다시 추가적인 체외 성숙 배양을 실시하여 germinal vesicle기에 정지된 세포주기의 진행이 재개되어 난자의 감수분열 완료 및 성숙이 세포주기 억제제 비 첨가난자와 거의 동등하게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine의 소 미성숙 난자의 세포주기 조절작용이 가역적임을 알 수 있었으며 난자의 세포 주기 동기화에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J and Wolf E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.*, 45:797-809.
- Faerge I, Mayes M, Hyttel P and Sirard MA. 2001. Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. *Mol. Reprod. Dev.*, 59:459-467.
- le Beux G, Richard F and Sirard MA. 2003. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology*, 60:1049-1058.
- Kalous J, Kubelka M, Rimkevics Z, Guerrier P and Motlik J. 1993. Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcomes cycloheximide- and 6-dimethylaminopurine block in cattle. *Dev. Biol.*, 157:448-54.
- Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X and Boland M. 2000. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol. Reprod. Dev.*, 57:204-209.
- Lonergan P, Khatir H, Carolan C and Mermillod P. 1997. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for

- 24 h. J. Reprod. Fertil., 109:355-365.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP and Gordon I. 1994. Effect of follicles size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 37:48-53.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. 2000. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture specific inhibition MPF kinase activity. Mol. Reprod. Dev., 55:89-95.
- Motlik J and Kubelka M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. Mol. Reprod. Dev., 27:366-375.
- Ponderato N, Crotti G, Turini P, Duchi R, Galli C and Lazzari G. 2002. Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. Mol. Reprod. Dev., 62:513-518.
- Ponderato N, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Galli C and Lazzari G. 2002. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. Mol. Reprod. Dev., 60:579-585.
- Richard FJ and Sirard MA. 1996. Effects of follicular cells on oocytes maturation II: thecal cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. Biol. Reprod., 54:22-28.
- Saeki K, Nagao Y, Kishi M and Nagai M. 1997. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. Theriogenology, 48:1161-1172.
- Sirard MA. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. Theriogenology, 55:1241-1254.
- Sirard MA, Richard F and Mayes M. 1998. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. Theriogenology, 49:483-497.
- Vigneron C, Nuttinck F, Perreau C, Reinaud P, Charpigny G and Mermillod P. 2003. Effect of Roscovitine, a cdk1 inhibitor, and of the presence of oocyte on bovine cumulus cell expansion and cyclooxygenase-2 expression. Mol. Reprod. Dev., 65:114-121.
-
- (접수일: 2003. 11. 27/ 채택일: 2003. 12. 15)