

생쥐의 난자와 초기배아의 칼슘이온 대사에 미치는 Ruthenium Red와 Ryanodine의 영향

이준영[†] · 홍순갑 · 김태식 · 민병열¹ · 김해권² · 윤용달³

충북대학교 생명과학부, ¹민병열산부인과, ²서울여자대학교 생명공학과, ³한양대학교 생명과학과

Effect of Ruthenium Red and Ryanodine on Calcium Ion Metabolism in Oocyte and Early Embryo of Mouse

Joon Yeong Lee[†], Soon Gap Hong, Tae Sik Kim, Byeong Yeol Min¹, Haekwon Kim² and Yong-Dal Yoon³

Department of Life Science, ChungBuk National University, ChoengJu 361-763, Korea

¹Min's Obstetrics and Gynecology, ChoengJu 361-831, Korea

²Department of Biotechnology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

³Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT : Intracellular calcium is an important physiological factor in most cells, and ruthenium red and ryanodine play an important role as calcium modulators. Ruthenium red inhibits calcium-induced calcium release(CICR) from the intracellular calcium store. Ryanodine activates calcium release through ryanodine channel. The present experiment was performed to investigate the effects of two modulators on calcium ion metabolism and to determine their dose-dependency in oocyte and early embryo of mouse. Intracellular calcium ion concentration was measured in realtime by using confocal laser scanning microscope(CLSM) after loading of Fluo-3/AM in mouse oocytes and early embryos. Ruthenium red decreased intracellular calcium ion concentration in oocytes and early embryos at its high concentration(30, 300 μ M). Ryanodine increased intracellular calcium ion concentration in oocytes and early embryos in low concentration(0.01 μ M) but decreased that at higher concentrations(1, 10 μ M). These results indicate that two modulators affected calcium ion metabolism in oocyte and early embryo of mouse, and their dose-dependency was different from somatic cell including myocytes.

Key words : Ruthenium red, Ryanodine, Oocyte, Early embryo, Intracellular calcium ion.

요약 : 세포내 칼슘은 다양한 세포에서 중요한 생리적 반응을 일으키며, ruthenium red와 ryanodine은 중요한 칼슘 조절자로 작용한다. Ruthenium red는 세포내 칼슘 저장고에서의 calcium induced calcium release(CICR)를 저해한다. Ryanodine은 ryanodine 통로를 통한 칼슘 방출을 촉진한다. 본 실험은 두 조절자가 생쥐 난자와 초기배아의 세포내 칼슘이온 농도에 영향을 미치는지 여부와 그 유효농도를 알아보고자 수행하였다. 난자 및 초기배아내 칼슘이온 함량 변화는 Fluo-3/AM을 이용하여 공초점 레이저주사 현미경을 사용하여 실시간으로 측정하였다. Ruthenium red는 고농도(30 μ M, 300 μ M)에서 난자와 초기배아의 세포내 칼슘이온 농도를 저하시켰고, ryandoine은 저농도(0.01 μ M)에서 세포내 칼슘이온 농도를 증가시켰지만 고농도(10 μ M)에서는 세포내 칼슘이온 농도를 감소시켰다. 본 실험결과를 보면, ruthenium red와 ryanodine은 생쥐의 난자 및 초기배아에서도 세포내 칼슘이온 농도에 영향을 미쳤고, 그 유효농도는 근세포를 포함한 체세포와는 차이가 있었다.

서론

세포내 칼슘이온의 방출은 수정(Runft et al., 2002), 배아발생(Wallingford et al., 2001), 세포주기(Groigno & Whitaker,

1998) 그리고 분화된 세포의 활성화(Berridge et al., 2000)에서 신호전달에 매우 중요하다고 보고되었다.

포유류 난자에서 세포내 칼슘 저장고는 Inositol triphosphate(IP₃) 수용체와 ryanodine 수용체를 포함하는 소포체(endoplasmic reticulum, ER)라고 보고되었다(Parrington et al., 1998). IP₃ 수용체와 ryanodine 수용체는 모든 세포에서 소포체에 위치하는 칼슘방출통로를 구성한다. 이 통로는 근수축(Catterall, 1991), 난자수정(Runft et al., 2002), 호르몬 분비(Berridge, 1993), 세포자연사(apoptosis)(Gordo et al., 2002)와 같은 과정을 조절하는 세포내 칼슘이온의 방출을 조절한다.

* 이 연구는 2002년도 충북대학교 기초과학연구소 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

[†]교신저자: 충북 청주시 흥덕구 개신동 산48번지, 충북대학교 자연과학대학 생명과학부. (우) 361-763, (전) 043-261-2294, E-mail: leejy@cbucc.chungbuk.ac.kr

Ryanodine, caffeine 또는 cyclic ADP-ribose(cADPri)는 ryanodine 수용체를 활성화시키고, procaine이나 ruthenium red는 ryanodine 수용체의 활성을 저해한다고 보고되었다(Ayabe et al., 1995).

Ruthenium red는 칼슘방출통로 차단제이고, 세포막의 칼슘 펌프를 저해하고(Netticadan et al., 1996), 미토콘드리아 내부로의 칼슘이온 흡수를 저해한다고 보고되었다(Matlib et al., 1998). 또한, ruthenium red는 myosin light chain kinase 활성화에 필요한 Ca^{2+} -calmodulin의 결합(Sasaki et al., 1992)과 cyclic nucleotide phosphodiesterase와 같은 Ca^{2+} -dependent enzyme의 결합(Masuoka et al., 1990)을 저해하고, 근세포에서 칼슘이온의 방출을 저해한다고 보고되었다(de Meis, 1991). Ruthenium red는 ryanodine과 ryanodine 수용체의 결합을 저해하고, ryanodine 수용체/통로를 통한 CICR을 저해한다고 보고되었다(Morgan & Gillespie, 1995).

Ryanodine은 근세포에서 칼슘 항상성에 관여하고, 조건에 따라서 CICR을 활성화시키거나 저해시킨다고 보고되었다(Meissner, 1986; Collier et al., 2000). 생쥐 난자에 ryanodine을 미세주입하면 세포내 칼슘이온의 농도가 증가한다고 보고된(Swann, 1992; Ayabe et al., 1995) 반면에 다른 연구에서는 이런 증가가 나타나지 않다고 보고되었고(Kline & Kline, 1994), 근세포나 심근세포에서는 세포내 칼슘이온 농도를 저해한다는 보고도 있다(Liu et al., 2002).

이에 본 실험에서는 칼슘방출통로 차단제인 ruthenium red와 칼슘방출통로 활성화제인 ryanodine이 생쥐 난자 및 초기배아에서도 세포내 칼슘이온 농도에 영향을 미치는지 여부와 영향을 미친다면 두 조절자의 유효농도(dose-dependency)는 어떻게 되는지 알아보려고 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙난자 획득과 배양

생후 6주된 ICR-계열 생쥐 암컷을 경추과열로 도살 후 복강을 절개하여 난소 강막을 제거하여 난소를 분리했다. 분리한 난소를 M2배양액이 있는 watch glass로 옮겨 넣은 후 해부현미경하에서 예리한 핀셋을 사용해서 난포를 터뜨려 난자를 분리해 내었다. 분리된 핵낭시기의 난자를 유리피펫을 사용해 난구세포를 제거하였고, 다시 M16 배양액으로 세척 후 5% CO_2 가 공급되는 습기로 포화된 37°C 항온 배양기에서 배양을 하였다. 배양액 40 μ l를 35mm 플라스틱 배양접시(Falcon, Franklin Lakes, USA)에 넣고, 약 2ml의 mineral oil(Sigma, St. Louis, USA)로 덮은 후 5% CO_2 가 첨가된 습기로

포화된 공기가 공급되는 37°C 배양기에서 12시간 이상 방치한 후 난자의 체외배양에 사용하였다.

난자를 배양하여 0~0.5시간(핵낭시기), 2.5~3시간(핵막붕괴시기), 8~9시간(1차 감수분열 중기~후기), 13시간(극체형성시기)에 해당하는 난자를 채취하여 사용하였다.

2. 과배란 유도 및 초기배아 수집

생후 6주된 ICR-계열 생쥐 암컷에 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma, St. Louis, USA)과 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma, St. Louis, USA)을 48시간 간격으로 각각 5 IU씩 복강주사하여 배란을 유도하였고, hCG 주사후 수컷과 교배시키고, 이후 12시간을 배란 및 수정시점으로 계산하여, 수정후 24시간(2세포기), 36시간(4세포기), 48시간(8세포기), 60시간(상실배시기), 72시간(포배기)에 해당되는 시기의 배아를 M2 배양액으로 수란관 수세를 통해 수집하여 사용하였다.

3. 배양액 및 시약조성

난자 및 배아의 채취, 세척에 사용한 배양액은 M2 배양액이고, 난자의 체외배양은 M16 배양액을 사용하였다. Ca^{2+} 지시약인 Fluo-3/AM(Molecular Probes, Eugene, USA)은 최종농도가 5 μ M, Pluronic F-127(Molecular Probes, Eugene, USA)은 0.02%가 되도록 M2 배양액에 희석하여 사용하였다. Ruthenium red(Sigma, St. Louis, USA)는 최종농도가 10 μ M, 30 μ M, 300 μ M이 되도록 M2 배양액으로 희석하여 사용하였고, ryanodine(Sigma, St. Louis, USA)은 최종농도가 0.01 μ M, 1 μ M, 10 μ M이 되도록 M2 배양액으로 희석하여 사용하였다.

모든 배양액은 사용하기 전에 pore size 0.22 μ m Millipore filter(Millipore, Bedford, USA)로 여과하여 멸균하였고, 초자기구 및 수술기구는 121°C, 15lb에서 20분간 고압 멸균하거나 180°C에서 20분간 건열멸균하여 사용하였다.

4. 난자 및 배아내 칼슘이온 농도 측정

Fluo-3/AM으로 20분간 처리된 난자와 배아는 M2배양액에서 3~4회 세척 후, Cell-Tak™(BD Science, Franklin Lakes, USA)으로 코팅된 슬라이드 글라스 위에 옮겼다. 이때 슬라이드 글라스 위의 배양액은 BSA가 없는 M2 배양액을 사용하였다. 슬라이드글라스 위의 난자와 배아는 공초점 레이저 주사현미경(CLSM, Bio-Rad MRC-1024, USA)를 사용해서 난자와 배아내의 상대적인 형광량(fluorescence intensity)을 측정하였다. 형광량 측정시 60초~100초 사이에 각 농도별 ruthenium red와 ryanodine을 첨가하여 두 조절자에 의한 변화를

실시간으로 측정하였다. Fluo-3/AM의 여기(excitation) 파장은 488nm이고, 방출(emission) 파장은 515nm이기 때문에 522±32nm filter(green filter)를 사용하여 형광량을 측정하였다. 측정시 CLSM의 레이저 주사 간격은 3초로 하여 20분 동안 측정하였다. 위의 모든 실험은 암상태(dark condition)하에서 진행하였다. 측정에 사용한 난자와 배아는 각 시기별로 60개 이상을 사용하였다.

5. 통계처리

실험은 3회 이상 반복하였으며, 대조군과 실험군의 통계적 유의성은 SPSS를 이용하여 Student *t*-test로 검정하였다.

결 과

1. Ruthenium red가 난자와 초기배아에 미치는 영향

1) 난자에 미치는 영향

핵낭시기의 난자에 ruthenium red 10μM, 30μM을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(28.35±0.26, 36.04±0.99)보다 낮았고(16.98±0.26, 23.89±1.09), 300μM을 처리한 실험군에서는 급격히 감소하여 상당히 낮게(19.82±0.39) 나타났다(Fig. 1A). 핵막붕괴시기의 난자에 ruthenium red 10μM, 30μM을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(53.37±1.32, 45.86±1.74)보다 낮았고(44.65±1.13, 22.26±0.86), 300μM을 처리한 실험군에서는 급격히 감소하여 매우 낮게(31.77±0.84) 나타났다(Fig. 1B). 제1차 감수분열 중기~후기시기의 난자에 ruthenium red 10μM을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(46.13±1.43)보다 높았고(53.99±1.39), 30μM을 처리한 실험군에서는 낮게(41.20±1.13) 나타났다. Ruthenium red 300μM을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(37.15±1.42)보다 낮았고(15.54±0.33), 감소폭이 가장 컸다(Fig. 1C). 극체형성시기의 난자에 ruthenium red 10μM을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(78.89±0.32)과 차이

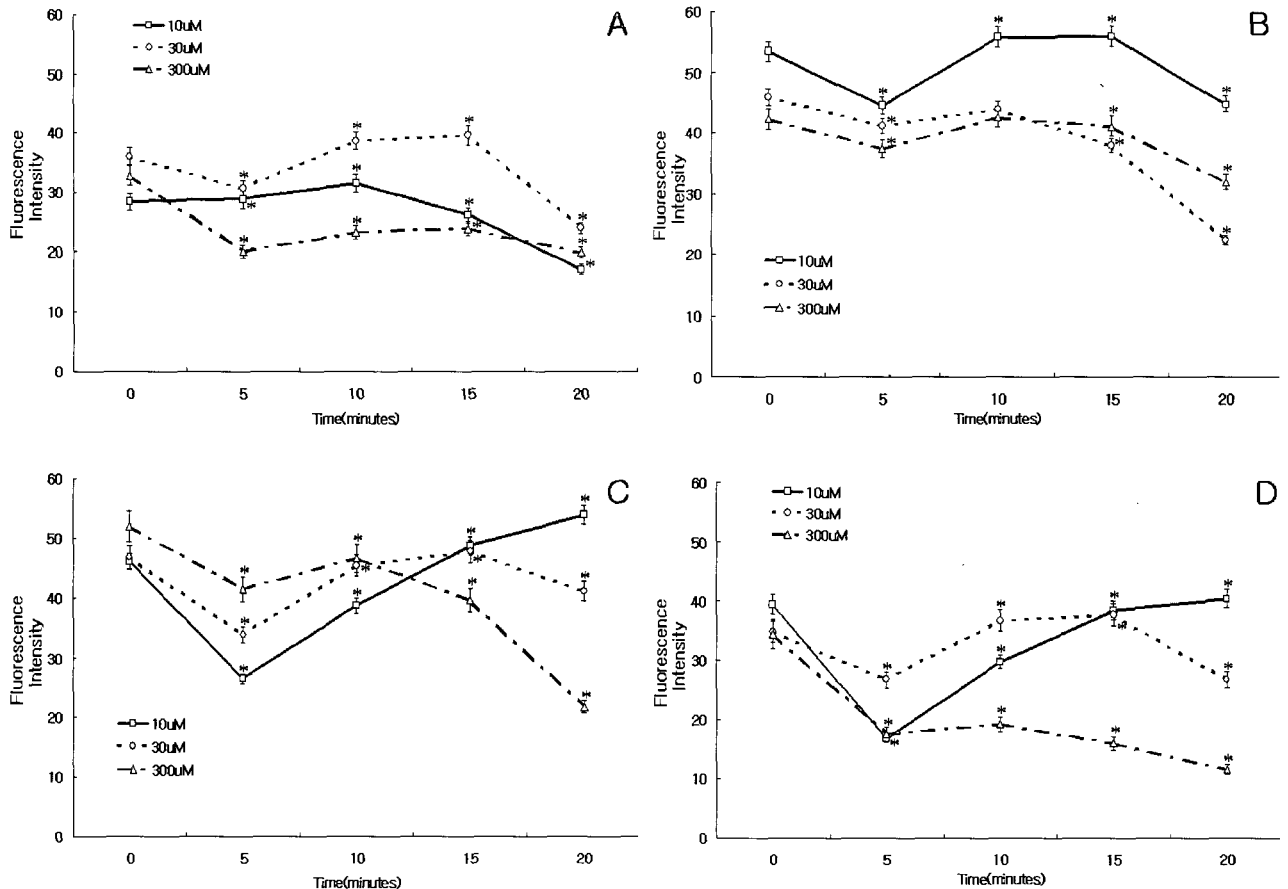


Fig. 1. Effect of ruthenium red on intracellular calcium ion concentration in germinal vesicle(A), germinal vesicle breakdown(B), metaphase I~anaphase I(C), and polar body formation(D) stage oocyte of mouse. Oocytes were loaded with Fluo-3/AM. Fluorescence intensity is arbitrary unit. Values represent the mean±SEM. **p*<0.05.

가 없었고(80.94 ± 0.96), $30 \mu\text{M}$ 에서는 낮게(26.72 ± 0.75) 나타났다. Ruthenium red $300 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 처리하기 전(34.39 ± 0.78)보다 현저히 낮게(11.62 ± 0.11) 나타났다(Fig. 1D).

2) 초기배아에 미치는 영향

2세포기배아에 ruthenium red $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 처리전(10.93 ± 0.35 , 57.42 ± 3.78)보다 약간 낮게(6.24 ± 0.42 , 53.05 ± 4.91) 나타났고, $300 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 매우 낮게(3.61 ± 0.01) 나타났다(Fig. 2A). 4세포기배아에 ruthenium red $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 모두 처리전(15.08 ± 0.28 , 15.63 ± 0.27 , 11.26 ± 0.22)보다 약간 낮게(8.65 ± 0.01 , 12.92 ± 0.29 , 7.83 ± 0.01) 나타났(Fig. 2B). 8세포기배아에 ruthenium red $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 처리전(14.74 ± 0.41 , 14.69 ± 0.32)보다 낮게(8.44 ± 0.63 , 8.19 ± 0.74) 나타났고, $300 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 급격히 감소하여 매우 낮게(3.29 ± 0.27) 나타났(Fig. 2C). 상실배시기의 배아에 ruthenium red $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 모두 처리전(15.24 ± 0.38 , 20.88 ± 0.35 , 18.22 ± 0.38)보다 낮게(9.99 ± 0.55 , 13.25 ± 0.22 , 12.36 ± 0.32) 나타났(Fig. 3A). 포배기의 배아에 ruthenium red $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 처리후 20분된 배아내 칼슘이온 농도는 모두 처리전(19.79 ± 0.17 , 61.69 ± 0.93 , 44.94 ± 1.49)보다 상당히 낮게(18.98 ± 0.36 , 24.08 ± 1.39 , 23.99 ± 0.94) 나타났(Fig. 3B).

2. Rynaodine이 난자와 초기배아에 미치는 영향

1) 난자에 미치는 영향

해당시기의 난자에 ryanodine $0.01 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(60.56 ± 2.26)보다 높게(84.03 ± 1.65) 나타났고, $1 \mu\text{M}$ 과 $10 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 낮게(21.27 ± 0.51 , 17.45 ± 0.61) 나타났(Fig. 4A). 핵막붕괴시기의 난자에 ryanodine $0.01 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(83.01 ± 4.90)보다 높게(111.20 ± 4.44) 나타났고, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 낮게(38.55 ± 1.17 , 17.37 ± 0.31) 나타났다. 특히, ryanodine $10 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(46.28 ± 1.18)보다 매우 낮게(17.37 ± 0.31) 나타났(Fig. 4B). 제1차 감수분열 중기~후기시기 난자에 ryanodine $0.01 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리전(53.15 ± 0.42)

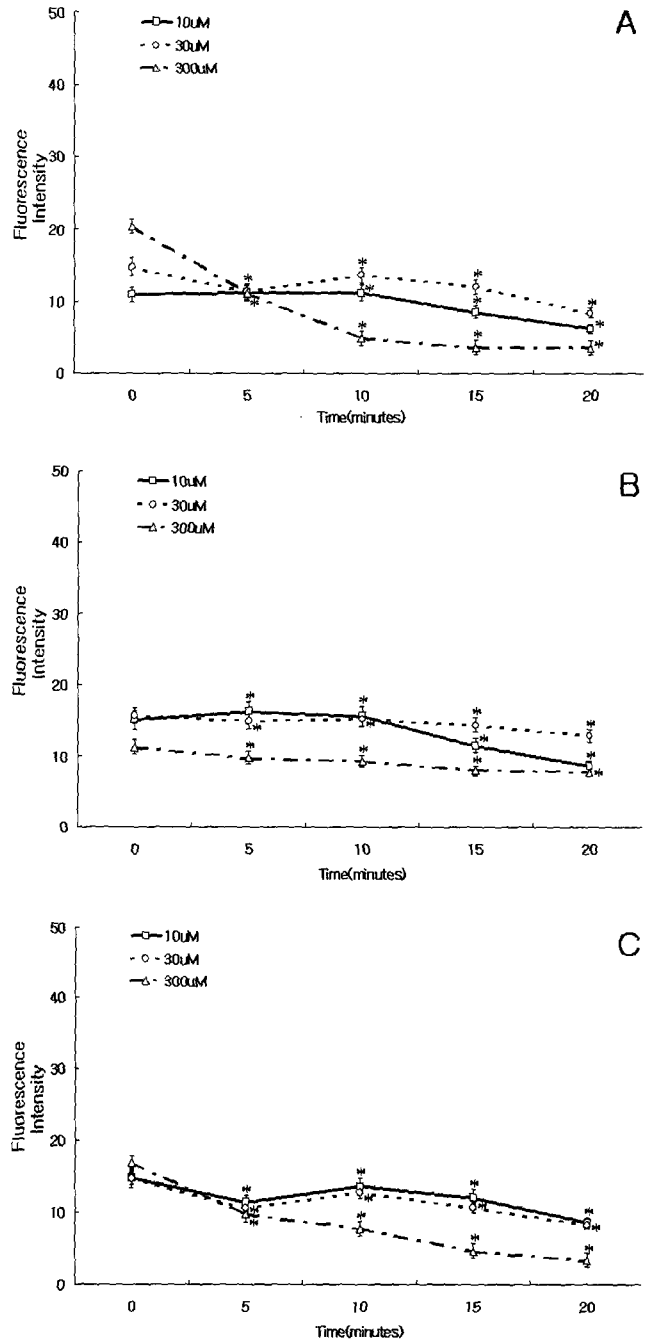


Fig. 2. Effect of ruthenium red on intracellular calcium ion concentration in 2-cell(A), 4-cell(B), and 8-cell(C) embryo of mouse. Embryos were loaded with Fluo-3/AM. Fluorescence intensity is arbitrary unit. Values represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

보다 매우 높게(81.72 ± 3.67) 나타났고, $1 \mu\text{M}$ 과 $10 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 낮게(29.02 ± 2.25 , 24.64 ± 1.12) 나타났(Fig. 4C). 극체형성시기의 난자에 ryanodine $0.01 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리하기 전(83.66 ± 4.49)보다 상당히 높게(93.15 ± 4.28) 나타났고, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ 을

처리한 실험군에서는 낮게(28.23 ± 2.61 , 12.65 ± 0.12) 나타났다. 특히, ryanodine $10 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 난자내 칼슘이온 농도는 처리하기 전(24.65 ± 0.83)보다 상당히 낮게(12.65 ± 0.12) 나타났다(Fig. 4D).

2) 초기배아에 미치는 영향

2세포기 배아에 ryanodine $0.01 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 처리전(31.17 ± 2.39)보다 높게(41.91 ± 2.63) 나타났고, $1 \mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 별차이가 없

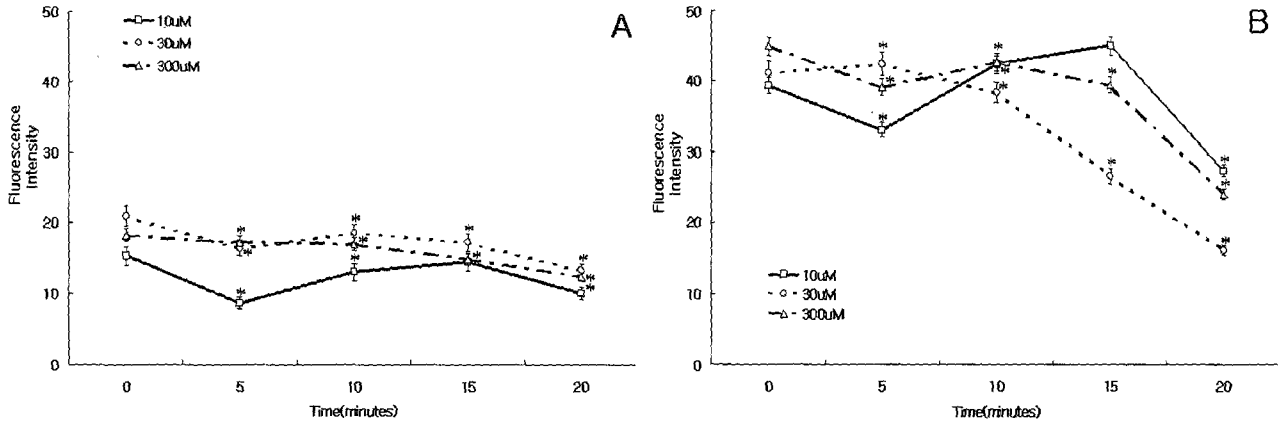


Fig. 3. Effect of ruthenium red on intracellular calcium ion concentration in morula(A) and blastula(B) embryo of mouse. Embryos were loaded with Fluo-3/AM. Fluorescence intensity is arbitrary unit. Values represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

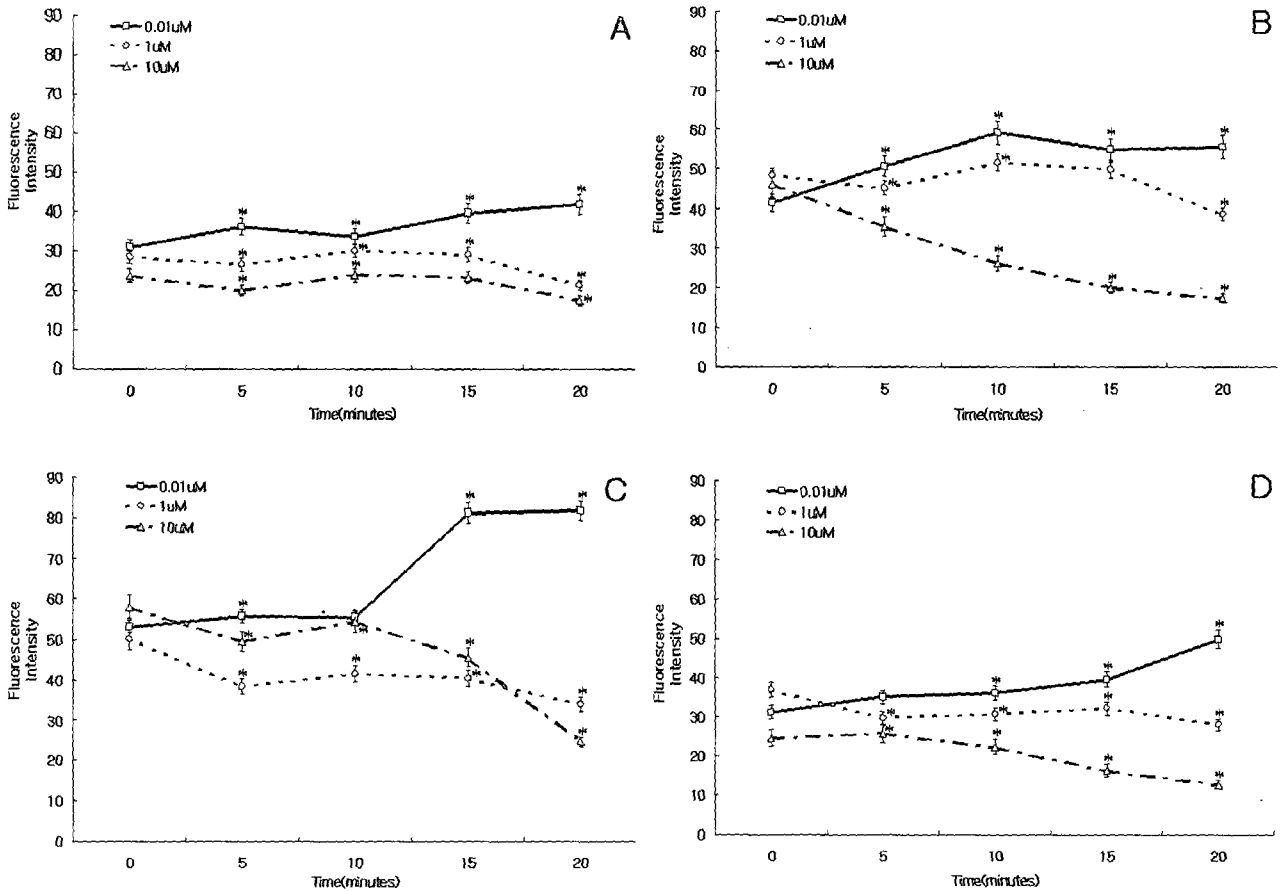


Fig. 4. Effect of ryanodine on intracellular calcium ion concentration in germinal vesicle(A), germinal vesicle breakdown(B), metaphase I ~ anaphase I (C), and polar body formation(D) stage oocyte of mouse. Oocytes were loaded with Fluo-3/AM. Fluorescence intensity is arbitrary unit. Values represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

었으며, 10 μ M을 처리한 실험군에서는 약간 낮게(6.72 \pm 0.44) 나타났다가(Fig. 5A). 4세포기배아에 ryanodine 0.01 μ M을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 처리하기 전(15.29 \pm 0.29)보다 매우 높게(24.86 \pm 0.53) 나타났고, 1 μ M을 처리한

실험군에서는 약간 낮게(7.49 \pm 0.01) 나타났다가(Fig. 5B). 8세포기배아에 ryanodine 0.01 μ M을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 처리하기 전(39.40 \pm 0.74)보다 약간 높게(48.03 \pm 1.74) 나타났고, 1 μ M을 처리한 실험군에서는 약간 낮게(13.84 \pm 0.82) 나타났다가. Ryanodine 10 μ M을 처리한 실험군에서는 처리전(13.60 \pm 0.22)보다 상당히 낮게(7.22 \pm 0.75) 나타났다가(Fig. 5C). 상실배시기의 배아에 ryanodine 0.01 μ M 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 처리하기 전(40.75 \pm 1.79)보다 상당히 높게(61.61 \pm 2.46) 나타났고, 1 μ M, 10 μ M을 처리한 실험군에서는 약간 낮게(13.28 \pm 0.42, 20.98 \pm 0.10) 나타났다가(Fig. 6A). 포배기의 배아에 ryanodine 0.01 μ M을 처리한 실험군에서 배아내 칼슘이온 농도는 처리전(111.25 \pm 2.13)과 비슷하게(117.38 \pm 2.42) 나타났고, 1 μ M을 처리한 실험군에서는 별차이가 없었다. Ryanodine 10 μ M을 처리한 실험군에서는 처리하기 전(40.36 \pm 1.46)보다 상당히

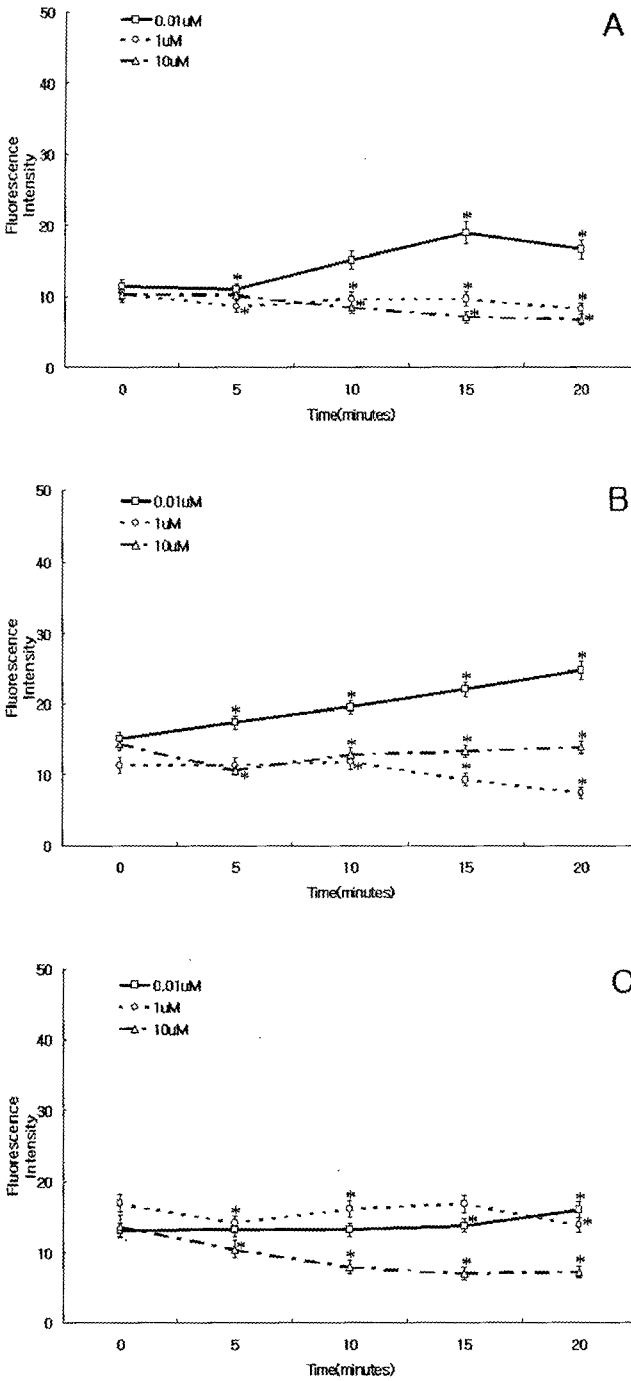


Fig. 5. Effect of ryanodine on intracellular calcium ion concentration in 2-cell(A), 4-cell(B), and 8-cell(C) embryo of mouse. Embryos were loaded with Fluo-3/AM. Fluorescence intensity is arbitrary unit. Values represent the mean \pm SEM. * p <0.05.

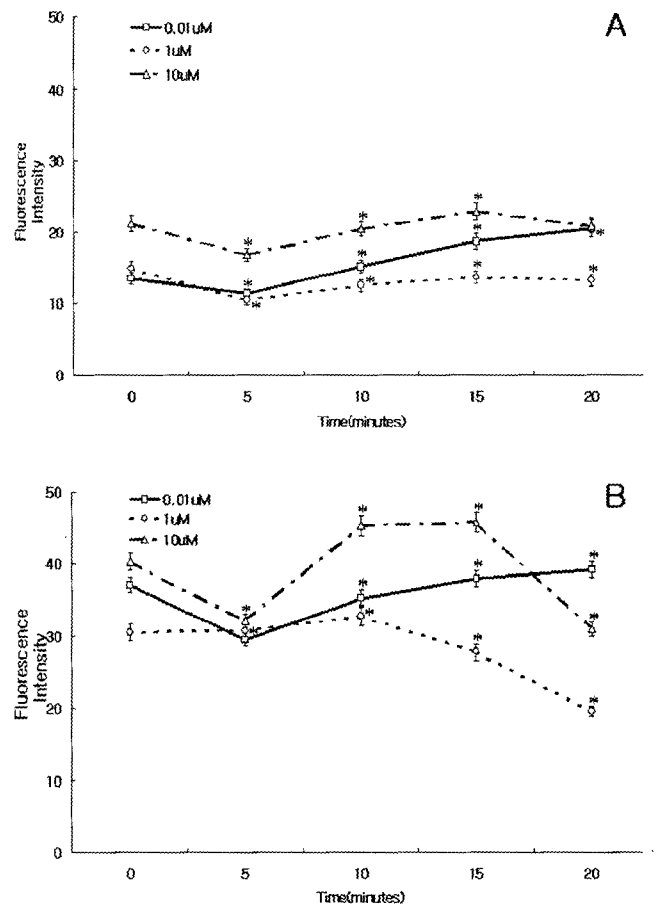


Fig. 6. Effect of ryanodine on intracellular calcium ion concentration in morula(A), and blastula(B) embryo of mouse. Embryos were loaded with Fluo-3/AM. Fluorescence intensity is arbitrary unit. Values represent the mean \pm SEM. * p <0.05.

낮게(30.96 ± 2.10) 나타났다(Fig. 6B).

고 찰

Ruthenium red는 평활근을 포함한 몇몇 형태의 근소포체(sarcoplasmic reticulum)에 있는 ryanodine 수용체/통로를 억제해서 calcium induced calcium release(CICR)를 저해하는 약리학 적 제제로서 사용되어왔다(Chen et al., 1997). 근세포에서 ruthenium red가 칼슘 방출을 저해하는데는 $20\mu\text{M}$ 이상의 농도가 요구된다고 보고되었고(Phillippe & Basa, 1996), 흰쥐의 간에서 추출한 미토콘드리아에서도 $20\mu\text{M}$ 농도에서 칼슘이온 방출이 저해된다고 보고되었다(Meinicke et al., 1996). 반면에, 생쥐의 심근세포에서는 $30\mu\text{M}$ 에서 칼슘통로와 칼슘펌프가 저해된다고 보고되었다(Netticadan et al., 1996). 본 실험에서 핵막붕괴시기의 난자에 ruthenium red $30\mu\text{M}$ 을 처리했을 때, 처리전보다 세포내 칼슘이온 농도가 감소하였으며(Fig. 1B), 모든 난자 및 배아에서 유사한 결과가 나타났다. 또한, ruthenium red $300\mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서도 세포내 칼슘이온 농도의 감소가 일어났으며 $30\mu\text{M}$ 에서보다 현저히 감소하였다(Fig. 1, 2, 3). 본 실험결과로 볼때, ruthenium red $10\mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서는 세포내 칼슘이온 대사에 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되고, $30\mu\text{M}$ 이상에서 세포내 칼슘이온 대사에 영향을 미치는 칼슘방출통로 차단제로서 작용한다고 생각된다. 근세포를 포함한 체세포에서 ruthenium red가 세포내 칼슘이온대사에 작용하는 농도($20\mu\text{M}$)와 난자와 초기배아를 사용하여 수행한 본 실험에서 세포내 칼슘이온 대사에 작용하는 농도($30\mu\text{M}$)에 차이가 있었다. 이는 세포마다 대사에 작용하는 유효농도가 다르기 때문이라고 사료된다.

Ryanodine은 근세포에서 칼슘 항상성에 관여하고, 조건에 따라서 CICR을 활성화시키거나 저해시킨다고 보고되었으며(Meissner, 1986; Collier et al., 2000), 몇몇 분비세포, 간세포, 성체 난자에서 칼슘 방출에 영향을 미친다고 보고되었다(Malgaroli et al., 1990; Shoshan-Barmatz, 1990; Foskett & Wong, 1991; Galione et al., 1991). 근세포에 존재하는 ryanodine 수용체는 ryanodine의 농도가 $0.01\mu\text{M}$ 과 $0.1\mu\text{M}$ 일 때 칼슘이온의 방출을 촉진한다고 보고된(Meissner, 1986) 반면, 생쥐 난자내로 $0.5\mu\text{M}$ 과 $1\mu\text{M}$ 을 미세주입했을 때 난자내 칼슘이온 농도가 증가된다고 보고되었다(Ayabe et al., 1995). 그러나, 본 실험에서 제1차 감수분열 중기~후기시기의 난자에 ryanodine $0.01\mu\text{M}$ 을 처리했을 때, 처리전보다 난자내 칼슘이온 농도가 현저히 증가하였고(Fig. 4C), 모든 난자 및 배아에

서 유사한 결과가 나타났다. 또한, 근세포에 존재하는 ryanodine 수용체는 ryanodine의 농도가 $10\mu\text{M}$ 보다 높게 되면 칼슘이온의 방출이 저해받는다고 보고된(Meissner, 1986) 반면, 심근세포에서 ryanodine $5\mu\text{M}$ 이 칼슘통로를 저해한다는 보고도 있다(Liu et al., 2002). 그러나, 본 실험에서 제1차 감수분열 중기~후기시기의 난자에 ryanodine $1\mu\text{M}$ 을 처리했을 때, 처리전보다 난자내 칼슘이온 농도가 감소하였으며(Fig. 4C), $10\mu\text{M}$ 을 처리한 실험군에서도 유사한 결과가 나타났다(Fig. 4, 5, 6). 본 실험의 결과를 볼 때, ryanodine $0.01\mu\text{M}$ 은 세포내 칼슘 저장고에 존재하는 ryanodine 수용체와 결합하여 저장고로부터 칼슘이온의 방출을 촉진하여 세포내 칼슘이온 농도를 증가시키는 칼슘방출통로 활성화제로서 작용을 하고, ryanodine $1, 10\mu\text{M}$ 에서는 오히려 칼슘방출통로의 활성을 저해시키는 작용을 한다고 생각된다. 이는 ryanodine이 유효농도보다 높은 경우, 전반적인 세포의 대사를 저해시키는 것으로 사료된다.

본 실험결과들을 종합해 볼 때, 근세포를 포함한 체세포의 세포내 칼슘이온 대사에 작용하는 ruthenium red와 ryanodine이 난자와 초기배아의 세포내 칼슘이온 대사에도 작용함을 알 수 있었다. 또한, 생쥐 난자와 초기배아에서 ruthenium red가 세포내 칼슘이온 농도를 감소시키는 칼슘방출통로 차단제로서 작용하기 위해서는 근소포체에 작용하는 농도($20\mu\text{M}$)보다 높은 $30\mu\text{M}$ 이상의 농도가 요구되는 것으로 생각된다. Ryanodine이 생쥐 난자와 초기배아의 세포내 칼슘이온 농도를 증가시키는 칼슘방출통로 활성화제로서 작용하기 위해서는 $0.01\mu\text{M}$ 이하의 농도가 요구된다고 생각되며, $1\mu\text{M}$ 이상의 농도에서는 전반적인 세포의 대사를 저해함으로써 세포내 칼슘이온 농도가 저하되는 것으로 생각된다. 이는 체세포와 생식세포간에 세포내 칼슘이온 대사에 작용하는 생리적 농도가 다른 것으로 사료된다.

본 실험은 난자와 초기배아의 외부에 칼슘조절자를 처리하여 수행하였지만, 이 방법 이외에 난자와 초기배아의 세포질내에 직접주입하는 미세주입법을 사용하여 실험을 수행하면 조절자의 좀 더 정확한 작용농도를 알 수 있을 것으로 사료되고, 위의 두 조절자 이외에 세포내 칼슘이온 대사에 영향을 미치는 다른 조절자에 대한 실험도 필요하다고 사료된다. 또한, ruthenium red와 ryanodine이 난자 성숙률과 배아 발생 등에 미치는 생리적인 영향을 규명하기 위한 실험도 필요하다.

인용문헌

Ayabe T, Kopf GS, Schultz RM (1995) Regulation of mouse

- egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uninseminated and inseminated eggs. *Development* 121:2233-2244.
- Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
- Catterall WA (1991) Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: A tale of two calcium channels. *Cell* 64:871-874.
- Chen SRW, Li X, Ebisawa K, Zhang L (1997) Functional characterization of the recombinant type III Ca^{2+} release channel(ryanodine receptor) expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* 272:24234-24246.
- Collier ML, Ji G, Wang Y, Kotlikoff MI (2000) Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. *J Gen Physiol* 115:653-662.
- de Meis L (1991) Fast efflux of Ca^{2+} mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* 266:5736-5742.
- Foskett JK, Wong D (1991) Free cytoplasmic Ca^{2+} concentration oscillations in thapsigargin-treated parotid acinar cells are caffeine-and ryanodine-sensitive. *J Biol Chem* 266:14535-14538.
- Gallione A, Lee HC, Busa WB (1991) Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 253:1143-1146.
- Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M, Jellerett T, Exley GE, Warner C, Fissore R (2002) Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in *in vitro* aged mouse eggs. *Biol Reprod* 66:1828-1837.
- Groigno L, Whitaker M (1998) An anaphase calcium signal controls chromosome disjunction in early sea urchin embryos. *Cell* 92:193-204.
- Kline JT, Kline D (1994) Regulation of intracellular calcium in the mouse: evidence for inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. *Biol Reprod* 50:193-203.
- Liu W, Yasui K, Ophhof T, Ishiki R, Lee JK, Kamiya K, Yokota M, Kodama I (2002) Developmental changes of Ca^{2+} handling in mouse ventricular cells from early embryo to adulthood. *Life Sci* 71:1279-1292.
- Malgalroli A, Fesce R, Meldolesi J (1990) Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuation in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5-trisphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem* 265:3005-3008.
- Masuoka H, Masooki J, Nakano T, Naka M, Tanaka T (1990) Effect of ruthenium red on activation of Ca^{2+} -dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 169:315-322.
- Matlib AM, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, Phillips R, Altschuld R, Katsube Y, Sperelakis N, Bers DM (1998) Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca^{2+} uptake into mitochondria *in vitro* and *in situ* in single cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273:10223-10231.
- Meinicke AR, Zavan SS, Ferreira AM, Vercesi AE, Bechara EJ (1996) The calcium sensor ruthenium red can act as a fenton-type reagent. *Arch Biochem Biophys* 328:239-244.
- Meissner G (1986) Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:6300-6306.
- Morgan JM, Gillespie JI (1995) The modulation and characterization of the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism in cultured human myometrial smooth muscle cells. *FEBS Letters* 369:295-300.
- Netticadan T, Xu A, Narayanan N (1996) Divergent effect of ruthenium red and ryanodine on Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of the Ca^{2+} release channel(ryanodine receptor) in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 333:368-376.
- Parrington J, Brind S, De Smedt H, Gangeswaran R, Lai FA, Wojcikeiwicz R, Carroll J (1998) Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in mouse oocytes and early embryos: the type I isoform is upregulated in oocyte and downregulated after fertilization. *Dev Biol* 203:451-456.
- Phillippe M, Basa A (1996) The effects of ruthenium red, an inhibitor of calcium-induced calcium release, on phasic myometrial contractions. *Biochem Biophys Res Commun* 221:656-661.

- Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM (2002) Egg activation at fertilization: Where it all begins. *Dev Biol* 245:237-254.
- Sasaki T, Naka M, Nakamura F, Tanaka T (1992) Ruthenium red inhibits the binding of calcium to calmodulin required for enzyme activation. *J Biol Chem* 267:21518-21523.
- Shoshan-Barmatz V (1990) High affinity ryanodine binding sites in rat liver endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 263:317-320.
- Swann K (1992) Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine-sensitive calcium store. *Biochem J* 287:79-84.
- Wallingford JB, Ewald AJ, Harland RM, Fraser SE (2001) Calcium signaling during convergent extension *in Xenopus*. *Curr Biol* 170:350-352.