

생쥐 생식소의 발달 단계에 따른 일주기성 유전자 발현에 관한 연구

정미경¹ · 최윤정¹ · 정경화 · 김은아 · 정형민¹ · 이숙환¹ · 윤태기¹ · 채영규[†]

한양대학교 생화학과, ¹포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

Expression of the Circadian Clock Genes in the Mouse Gonad

Mi-Kyung Chung¹, Yoon-Jeong Choi¹, Kyoung-Hwa Jung, Eun-Ah Kim, Hyung-Min Chung¹,
Sook-Hwan Lee¹, Tae-Ki Yoon¹ and Young-Gyu Chai[†]

Department of Biochemistry, Hanyang University

¹Infertility Medical Center, Pochon Cha University

ABSTRACT : This study was carried out to examine the expression of the circadian clock genes in the mouse ovary and testis at different developmental stages. Expression of *Period1(Per1)*, *Period2(Per2)*, *Period3(Per3)*, *Cryptochrome1(Cry1)*, *Cryptochrome2(Cry2)*, *Clock*, *Bmal1* and *Prokineticin1* and *Prokineticin2 receptor(Prok1r, Prok2r)* genes in mouse ovary was explored by semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) according to the developmental stage(post partum day; ppd 1, 7, 10, 21 and 35). Immunohistochemistry using PER1 antibody was also analyzed. The differential expression pattern of clock genes was presented according to stages of the mouse ovarian development (ppd 1, 7, 10, 21 and 35). In the cases of ovaries, at the starting point of follicle growth, at ppd 7 and 10, the clock gene expression patterns were changed vastly. According to the developmental stages, the clock genes were highly expressed at ppd 7 and 10 in mouse testis also. Receptors for *Prok2*, the circadian output molecule of SCN, were also expressed in ovary at ppd 7 and in testis at ppd 1 and 7, respectively. Immunohistochemical analysis of PER1 showed positive signals in the cytoplasm of oocytes and granulosa cells. The level of PER1 expression was increased in cells at the spermatogonia and the condensing spermatids. The expression pattern of *Per1* and localization of PER1 were showed similar patterns according to the developmental stages in ovary and testis. Taken together, it could be observed that the expression of clock genes was highly correlated with gonadal development and germ cell differentiation in mice. Therefore, in this study, circadian programming of the genes in the ovary and testis is strongly imposed across a wide range of core reproductive cycles and normal development of gametes. Although the existence of circadian genes is clearly investigated, further studies on the direct evidence is required for the understanding of the relationship between circadian genes and regulation of gonadal differentiation and germ cell development.

Key words : Circadian genes, Gene expression, Immunohistochemistry, Ovary, Testis.

요약 : 본 연구는 생쥐의 난소 및 정소 조직에서 발달 단계에 따라 나타나는 일주기성 clock 유전자의 발현과 단백질의 발현 양상을 알아보고자 하였다. 생쥐의 난소 및 정소에서 일주기성 변화와 연관된 유전자(*Period1(Per1)*, *Period2(Per2)*, *Period3(Per3)*, *Cryptochrome1(Cry1)*, *Cryptochrome2(Cry2)*, *Clock*, *Bmal1*)와 시교차 상핵에서 분비되어 표적 조직 또는 기관으로 전달되는 물질로 알려진 *Prokineticin(Prok2)*에 대한 수용체들(*Prok1r*과 *Prok2r*), PER1 단백질의 발현 양상을 발달 단계에 따라 (post partum day; ppd 1, 7, 10, 21, 35) 확인하였다. 주요 clock 유전자들은 생후 발달 단계에 따라 각각 다양한 발현 양상을 보였다. 난소의 경우 많은 난포가 성장을 시작하는 시기인 생후 7일과 10일을 전후하여 발현량이 대부분 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 정소의 경우에도 발달 단계에 따라 7일에서 발현이 증가하는 양상을 보였다. 특히 clock 유전자들은 생후 7일과 10일에서 상대적으로 높은 발현 양상을 보였다. 시교차 상핵에서 분비되어 표적기관으로 분비되는 것으로 알려진 *Prok2*의 수용체의 경우에도 주요 주기성 유전자들의 발현이 증가하는 것과 같은 시기에 발현이 높아지는 것을 확인할 수 있었고, 생식소 발달 초기에 강하게 발현되나 차후 점진적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 PER1의 발현 양상을 면역조직화학적 방법으로 확인한 결과, 난포의 각 발달 단계에서 난소 내 정상적인 난포의 과립세포와 난자에서 높게 발현되는 것을 알 수 있었고, 상기의 결과는 *Per1* 유전자의 발현 양상과 일치함을 확인할 수 있었다. 또한 정소 내 *Per1* 유전자와 PER1 단백질의 발현은 모두 생후 10일과 21일에서 감소하는 경향을 보이거나 성적으로 성숙됨에 따라 다시 증가하는 것을 확인할 수 있어, PER1 단백질은 생식소의 발생 단계별로 다양한 발현 양상의 차이를 보이며, 정자와

난자의 정상적인 발달에 밀접한 연관이 있음을 추론할 수 있었다. 본 연구의 결과, 일주기성 clock 유전자들 중 특히 *Per1*이 생식소의 정상 발달에 중요하게 작용할 수 있음을 시사하여 차후 이에 대한 다양한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

[†]교신저자: 경기도 안산시 사1동 1271, 한양대학교 생화학과. (우) 425-791, (전) 031-400-5513, (팩) 031-406-6316, E-mail: ygchai@hanyang.ac.kr

서 론

다양한 생물 중에 있어서 생리작용은 일정한 주기를 가지고 조절되고 있음이 일찍부터 알려져 왔다. 이러한 생리현상의 주기적인 변화에 영향을 주는 것으로 알려진 것에는 대표적으로 광주기, 기온의 변화, 계절의 변화 등의 거시적인 것에서부터 생체 내에서 특정 시간을 단위로 주기적으로 발현되는 일주기성 특정 유전자까지 다양하게 존재함이 알려지고 있다(Okamura et al., 2002; Dunlap, 1999).

생체 시계는 일주기성과 같은 생체 리듬의 주기성을 나타내는 생체에 내재되어 있는 생물학적 시계를 의미하는 것으로, 모든 생물체는 고유의 생체 시계를 가지고 있어 이 생체 시계가 각종 생리적 조건은 물론 행동학적 변화를 관장한다(Pittendrigh, 1993). 일주기는 약 24시간의 주기성을 의미하며, 이러한 역할을 하는 중추 생체 시계는 뇌 시상하부에 있는 시교차상핵(suprachiasmatic nucleus; SCN)에 있는 것으로 밝혀져 있다(Reppert & Weaver, 2001). 시교차상핵이 파괴되면 생체 시계에 이상이 생겨 생체 리듬이 깨어지고 다양한 질환이 발생하며, 이러한 리듬의 부조화는 노화와도 연관이 있는 것으로 보고되어 있다(Lamberts et al., 1997).

최근 이러한 일주기성 리듬에 중요한 역할을 담당하는 생체시계와 연관된 clock 유전자들의 존재와 기능이 밝혀지기 시작하였으며(Reppert & Weaver, 2001; Williams & Sehgal, 2001) 이들 유전자의 발현은 생체내의 다양한 조직과 기관에서도 중요하게 작용(Allada et al., 2001; Balsalobre, 2002; Cermakian & Sassone-Corsi, 2000; Dunlap, 1999; Reppert & Weaver, 2001)하고 있는 것으로 생각되고 있으나 아직은 연구가 미진하다.

생식 분야는 일주기성에 의해 영향을 받는 기관으로 알려져 있다(Goldman, 1999; Turek, 1992; 1984). 그러나 일주기성 clock 유전자의 난소 내 발현에 관한 연구는 일부의 연구자들에 의해 밝혀지고 있으나(Edwards, 2002; Johnson, 2002) 아직까지 연구가 미흡하며, 정소의 경우에 있어서는 일부의 clock 유전자들의 정소 내 발현에 관한 연구가 진행되고 있으나 아직까지 서로 일치하지 않는 결과들을 보이고 있다(Fu et al., 2002; Miyamoto & Sancar 1999; Zylka et al., 1998). 특히 생쥐의 난소와 정소의 발달 단계와 일주기성 clock 유전자들의 연관성에 관한 연구는 거의 논의된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 생쥐의 난소와 정소의 조직에서 일주기성 변화에 연관된 주요 clock 유전자들이 정소와 난소 조직의 발달과 정자 발생 과정 및 난자 형성 과정 전반에 걸쳐 어떻게 작용하는지를 알아보고 이들 유전자의 발현 양상 변

화가 정자 및 난자의 발달과 성숙에 미치는 영향을 추측하고자 하여 다음과 같은 연구를 수행하였다. 1) 생쥐 정소 및 난소의 발달과 성숙의 각 단계에서 일주기성 변화에 연관된 clock 유전자(*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*)의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하고자 하였고, 2) 정소 및 난소의 발달과 성숙의 각 단계에서 나타나는 일주기성 유전자들의 발현 정도와 *Per1* 유전자의 발현 결과물인 PER1 단백질의 발현 양상을 확인하여 일주기성 유전자들의 발현과 정소 및 난소의 발달과의 연관관계를 알아보려고 하였으며, 3) 난소와 정소의 발달단계에 따라 SCN에서 분비되어 표적조직 또는 기관으로 전달되는 물질로 알려진 *Prok2*(Cheng et al., 2002)에 대한 수용체들(*Prok1r*과 *Prok2r*)이 주요 clock 유전자들과 어떠한 연관 관계를 가지고 발현되는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 생후 1, 7, 10, 21, 35일령의 ICR 암컷과 수컷 생쥐(Sam: TacHa(ICR), fBR)의 난소와 정소를 일정한 시간(점등 6시간 후, CT6)에 회수하여 실험에 사용하였다. 난소를 적출한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 Phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하여 액체질소에 급속 냉동시켜 사용 전까지 -80°C 의 저온냉동기에 보관하였다.

2. RNA 분리

준비된 각 시기별 조직을 1mL TRIZOL®(Gibco BRL) 용액을 이용하여 균질화시킨 후 상온에서 5분간 방치하여 핵단백 복합체를 완전히 분해하였다. 여기에 전체 부피의 0.2mL의 chloroform을 넣고 혼합한 후 15분간 상온에서 방치시킨 후 12,000 g로 15분간 원심 분리하였으며, RNA를 포함하는 무색의 상층액을 취한 후 동일한 양의 isopropanol을 첨가하고 상온에서 10분간 방치한 후 4°C 에서 12,000 g로 10분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액 제거 후 75% ethanol을 첨가하여 4°C 에서 5분간 7,500 g로 원심 분리하였다. RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -80°C 저온냉동기에 보관하였으며 총 RNA의 양은 260nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

3. 역전사 종합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응에는 분리된 total RNA를 $2\mu\text{g}$ 사용하여 SuperScript Preamplification System(Invitrogen, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 총 반응 용액을 $20\mu\text{L}$

로 하여 SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase 200U, oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer 0.5 μ g을 사용하여 cDNA를 합성하였고 negative control로는 reverse transcriptase 없이 반응한 것을 cDNA 대신 사용하였다. 증합효소 연쇄반응(PCR)에 사용된 primer와 예상되는 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. PCR 은 7.5mM Tris-HCl(pH 8.3), 5mM KCl, 0.2mM MgCl₂, 2mM (NH₄)₂SO₄, 0.2mM dNTP, 10pmol의 각각의 primer와 1pmol의 GAPDH의 primer와, 2.5U Taq DNA polymerase(Biotoools, Spain)를 전체 50 μ L 반응으로 하여 시행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 predenaturation 후 94°C에서 1분간 denaturation, 각각의 annealing 온도에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 각각 30회 반복하였고, postelongation 반응을 72°C에서 10분간 실시하였다. 이를 통해 얻어진 PCR product 는 2.0% agarose gel에서 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하여 transilluminator상에서 형광 정도를 확인하였다.

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and their RT-PCR product sizes

Names of Genes	Oligonucleotide Sequences	Size of RT-PCR products
<i>Per1</i>	5'-ATGAGTGGTCCCCTAGAAGG-3' 5'-GATGGGCTCTGTGAGTTTGTAC-3'	296bp
<i>Per2</i>	5'-AATGGATACGTGGACTTCTC-3' 5'-TGGCTCTCACTGGACATTAG-3'	482bp
<i>Per3</i>	5'-TGCTGAGGAGAAAAGTGCC-3' 5'-AGACATTCTGTTTCGGTCTTCG-3'	291bp
<i>Clock</i>	5'-CTTCTGGTAACGCGAGAAA-3' 5'-TTTCCAGCAGATGAGTAGAG-3'	349bp
<i>Cry1</i>	5'-GAGAGAAATGTCGGAGTTGT-3' 5'-TTACTGCTCTGCCGCTGGAC-3'	262bp
<i>Cry2</i>	5'-GAGGTGGTGACTGAGAAC-3' 5'-CAAGTCCCACAGGCGGTAGT-3'	450bp
<i>Bmal1</i>	5'-CGAAGACAATGAGCCAGAC-3' 5'-CGTAGCGTGATAAAAGAACC-3'	356bp
<i>GAPDH</i>	5'-GTCGTGGAGTCTACTGGTGT-3' 5'-CAAAGTTGTCATTGAGAGCA-3'	650bp
<i>Prok1r</i>	5'- ATGAGTGGTCCCCTAGAAGG- 3' 5'-GATGGGCTCTGTGAGTTTGTAC-3'	726bp
<i>Prok2r</i>	5'-AATGGATACGTGGACTTCTC-3' 5'-TGGCTCTCACTGGACATTAG-3'	548bp
β -actin	5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3' 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'	243bp

PCR reaction에서 cDNA의 존재를 확인하고 동량의 RNA로부터의 역전사 증합효소 연쇄 반응을 통한 상대적인 양을 비교하고자 GAPDH 발현을 positive control로 사용하였다. 상대적인 발현 정도를 알아보기 위하여 전기영동한 결과를 Image Analyzer(Bio-1D, version 99.01, Vilber Lourmat, France)를 이용하여 정량분석하고, GAPDH의 발현에 대한 각각의 clock 유전자들의 발현 정도를 arbitrary unit(AU)로 환산하였다.

4. 면역조직화학적 분석법

각 단계별로 회수된 난소 조직을 4% paraformaldehyde에 12~24시간 고정된 후 수세과정을 거쳐 순차적으로 ethyl alcohol(50, 70, 85, 95, 100%)을 사용하여 각각 30분씩 탈수하였고, xylene으로 30분씩 2번 치환하였으며, paraffin에 포매하여 block을 만들었다. 포매 후 박편절단기(Microtome, Leica)를 사용하여 5 μ m 두께로 절편하였으며 각 10절편마다 1절편씩 선택하여 Plus 슬라이드(Fisher, USA)에 절편을 부착시킨 후 xylene에 5분씩 2번 paraffin을 제거한 후, 점진적 방법으로 ethanol(100, 90, 85, 75, 50%)로 각각 3분씩 수화시켰다. PBS로 수세 후 citric acid 용액 속에 넣고 멸균한 후 다시 PBS로 세척 하였다. 2% H₂O₂를 10분간 처리하여 조직 내 효소들을 불활성화 시킨 후 슬라이드를 다시 PBS 용액으로 옮겨 5분간 방치 후, 1차 항체(1:100 anti-PER1 antibody, Alpha Science, USA)를 처리하여 4°C에서 18시간 반응시킨 후 PBS로 5분간 2회 반복 세척하였다. 세척 후 2차 항체(1:500, biotin conjugated goat anti-rabbit-IgG)에 15분간 상온에서 반응시킨 후, PBS로 3분간 3회 세척 후 stable AEC(DAKO, USA)에 10분간 발색시킨 후 탈수하여 balsam으로 봉입하였다. 대조군의 경우에는 PER1 1차 항체를 처리하지 않았다. 슬라이드는 또한 난소와 정소의 발달 과정을 형태학적으로 확인하기 위해 위와 같은 방법으로 paraffin을 제거하고, 알코올 처리과정을 거쳐 증류수로 세척한 후 hematoxyline-eosin으로 염색한 후 각각의 조직 표본들을 광학현미경(Leitz) 하에서 관찰하였다.

결 과

1. 생쥐 난소 내 일주기성 Clock 유전자의 발현

출생 후 생쥐 난소의 발달 단계에 따라 일주기성 clock 유전자들의 발현을 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. *Per1* 유전자의 발현은 생후 1일과 7일 사이에 높았는데 생후 10일 이후부터 21일까지 점차적으로 감소함을 확인할 수 있었고 생후 35일에 다시 증가함을 확인할 수 있었다. *Per2* 유전자는 생후 1일부터 성체인 생후 35일까지 점차적으로 증가함을 확인할 수

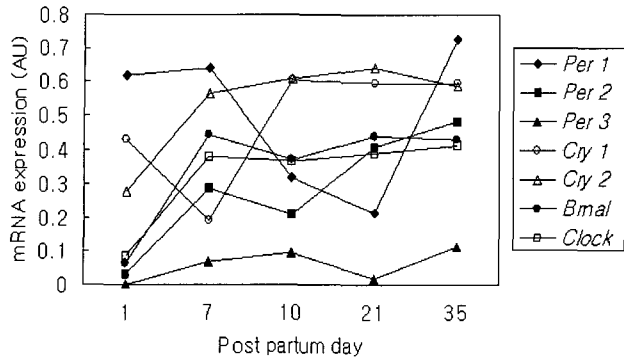


Fig. 1. Analysis of circadian clock genes according to the different developmental stages. At CT 6, ovary samples were obtained from 1, 7, 10, 21, and 35 day old female ICR mice. Total RNA samples prepared from ovaries were analysed by RT-PCR. Relative amount of each mRNA was normalized with GAPDH mRNA levels. The RT-PCR product was scanned and analyzed by image analyzer. Data were expressed in arbitrary unit (AU).

있었다. *Per3* 유전자의 발현은 성체가 되기까지 매우 낮게 발현되었고, *Cry1* 유전자의 경우는 생후 7일에 감소하였다가 10일부터 성숙이 완료될 때까지 발현량이 유지되는 양상을

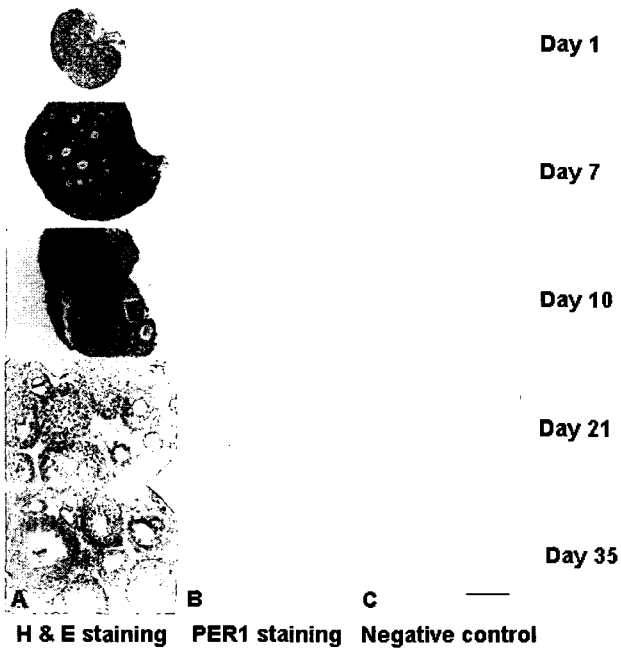


Fig. 2. Expression of PER1 in oocyte and granulosa cells at different developmental stages. 1-, 7-, 10-, 21-, and 35-days-old mouse ovarian samples were presented, respectively. A, Sections stained with Hematoxylin & Eosin. B, Immunohistochemical staining of ovaries for PER1. Staining was visualized using AEC. C, Negative controls showed. Bar represents 100 μ m.

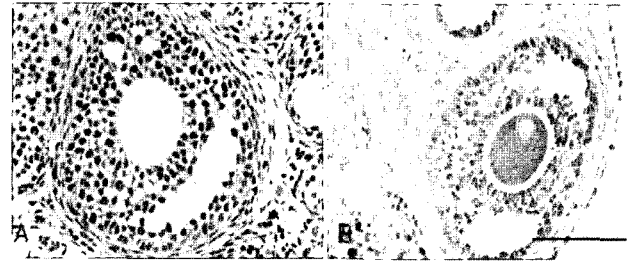


Fig. 3. Expression of PER1 in oocytes and granulosa cells in the secondary follicles. Cytoplasm of oocytes and granulosa cells were stained positively. Perioocyte region of follicles were stained strongly in the large antral follicles. A, Staining of ovary with Hematoxylin & Eosin. B, Immunohistochemical staining for PER1. Staining was visualized using AEC. Bar represents 100 μ m.

나타내었다. *Bmal1*, *Clock* 및 *Cry2* 유전자의 발현은 생후 7일에 높게 발현되어 성체까지 유지되는 것을 알 수 있었다.

난소에서 PER1 단백질의 발현 양상을 면역조직화학적 방법으로 확인한 결과 난포의 모든 발달단계(원시난포, 일차난포, 이차난포, 강소 형성전 난포 및 강소 형성 난포)에 걸쳐 PER1 단백질이 발현되었다(Fig. 2, 3). 난자 난구세포 복합체에서는 난자의 세포질과 난구세포에서 발현이 확인되었다. 날짜별 발달 단계에 따라 PER1의 발현은 생후 1일과 7일에 증가하나, 생후 10일에서부터 21일 사이에 다소 감소하였으며, 생후 35일에 다시 증가하는 경향을 보였으며, 이는 *Per1* 유전자의 발현 양상과 일치하는 결과를 보였다.

시교차상핵에서 분비되어 표적조직 또는 기관으로 전달되는 물질로 알려진 *Prokineticin 2*의 수용체인 *Prok1r*과 *Prok2r* 유전자 또한 생후 7일에 강한 발현을 나타내었으며 *Prok1r*의 경우는 생후 21일에서도 강한 발현을 보였다(Fig. 4).

2. 생쥐 정소내 일주기성 Clock 유전자의 발현

출생 후 생쥐의 정소 발달 단계에 따른 일주기성 유전자들

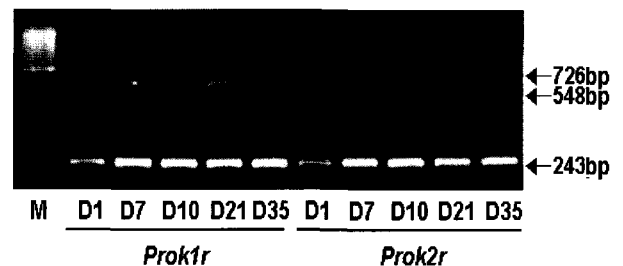


Fig. 4. Analysis of receptors for circadian output molecule(*Prok1r* and *Prok2r*) according to the different developmental stages of mouse ovaries. M, 100bp DNA ladder marker.

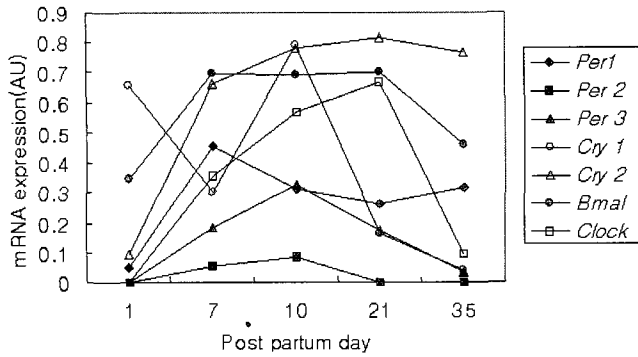


Fig. 5. Analysis of circadian clock genes at different developmental stages. At CT6, testis samples were obtained from 1, 7, 10, 21, and 35 day old male ICR mice. Total RNA samples prepared from testis were analyzed by RT-PCR. Relative amount of each mRNA was normalized with GAPDH mRNA levels. The RT-PCR product was scanned and analyzed by image analyzer. Data were expressed in arbitrary unit(AU).

의 발현은 Fig. 5와 같았다. 대부분의 일주기 유전자들은 생후 1일에 비해 7일째에 증가하였으며, 생후 10일 이후에는 대체로 감소하는 경향을 보였다. 그러나 *Cry1*의 경우에는 다른 유전자의 발현과는 달리 생후 7일에서 감소하는 경향을 나타내

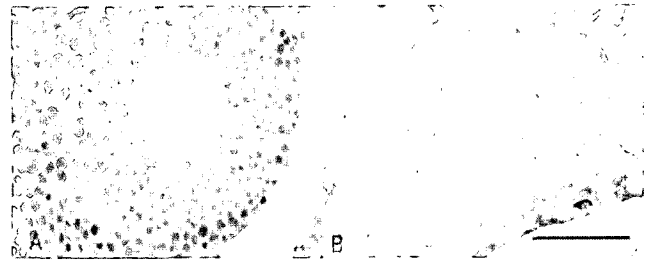


Fig. 7. Expression of PER1 in spermatogonia and condensing spermatids. A, Staining of testis with Hematoxylin & Eosin. B, Immunohistochemical staining of testis for PER1. Staining was visualized using AEC. Bar presents 100 μm.

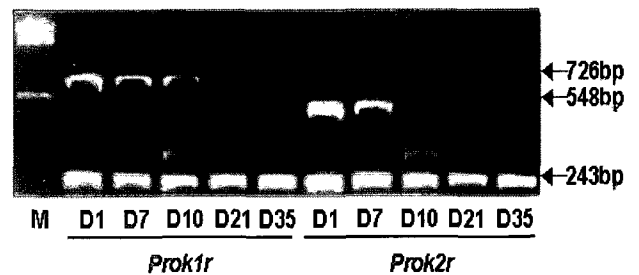


Fig. 8. Analysis of receptor of circadian output molecule(*Prok1r* and *Prok2r*) according to the different developmental stages of testis. M, 100bp DNA ladder marker.

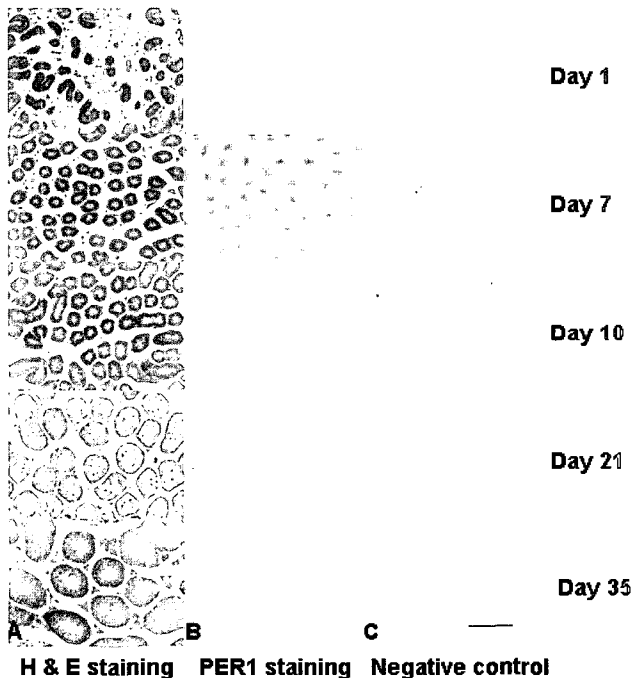


Fig. 6. Expression of PER1 at different developmental stages. 1, 7, 10, 21, and 35 day old mouse testicular samples were presented respectively. A, Staining of testis with Hematoxylin & Eosin. B, Immunohistochemical staining of testis for PER1. Staining was visualized using AEC. C, Negative controls showed. Bar presents 100 μm.

었다. *Per1* 유전자의 경우에는 35일에 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

면역조직화학적 방법으로 PER1 단백질의 발현을 확인한 결과 생후 1일과 7일 정소의 Type A 정원세포와 응축정세포에서 PER1의 발현(Fig. 6, 7)을 확인할 수 있었다. 생후 10일과 21일의 Type A 정원세포에서는 상대적으로 PER1의 발현이 적음을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 *Per1* 유전자의 발현 양상과 일치하였다.

시교차상핵에서 분비되어 표적조직 또는 기관으로 전달되는 물질로 알려진 *Prok2r*에 대한 수용체인 *Prok1r*과 *Prok2r* 유전자의 경우 *Prok1r*은 생후 1일 이후 지속적으로 발현이 감소하여 성체인 35일에서는 발현되지 않음이 관찰되었으며, *Prok2r*은 1일과 7일에 높게 발현되었으나 그 이후에는 발현되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

포유류에 있어서 생식 체계는 여러 리듬들이 조화가 되어 조절된다. 그 중 대표적인 것이 일주기성 리듬이다(Henderson & Edwards, 1968). 최근 몇몇 연구들에 의해 일주기 관련 유전자들이 난소의 리듬이나(Edwards, 2002; Johnson, 2002; Ko

et al., 2000) 정소의 생식 리듬 및 발달 등과 연관되어 있음(Fu et al., 2002; Miyamoto & Sancar 1999; Zylka et al., 1998)이 보고되고 있으나 일주기성 clock 유전자의 생식기관 내 발현에 관한 직접적인 연구는 극히 적으며, 더욱이 정소의 경우에는 몇몇 연구자들의 보고가 서로 일치하지 않는다. 특히 발생단계와 다양한 일주기성 clock 유전자의 발현과의 연관성에 관한 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

일주기성을 나타내는 주요 유전자들과 난소와 정소의 발달 단계(생후 1, 7, 10, 21, 35일)에 따른 연관성을 추론하고자 한 본 연구의 결과, 각각의 일주기성 유전자들의 발현 양상은 난소의 발달 단계에 따라 서로 다르게 나타나며(Fig. 1), 많은 난포가 성장을 시작하는 시기인 생후 7일과 10일을 전후하여 발현 양상이 변화함을 알 수 있었다. 생후 7일의 *Cry2*, *Bmal1* 과 *Clock* 유전자의 발현 양상은 생후 1일에 비해 증가하였고, 성체가 되는 35일까지 점차적으로 증가함을 나타내었다. 특히 *Clock* 유전자의 발현은 많은 난포가 성장을 시작하는 생후 7일에 매우 높게 발현됨을 알 수 있었다. *Per1* 유전자의 발현은 생후 1일과 7일 사이에 증가하다가 생후 10일 이후부터 21일까지 점차적으로 감소하나 생후 35일에 다시 증가함을 확인할 수 있었다. 이것은 성장 중인 중간 크기의 난포가 높은 비율로 폐쇄되는 현상이 나타나는 시기가 생후 10일부터 35일이라는 점과 연관되어 낮게 발현된 것으로 추정할 수 있었으며, 따라서 *Per1* 유전자는 난포의 성장 및 발달과 연관되어 있음을 추측할 수 있다. 그러나 *Per3* 나 *Cry1* 유전자의 경우 난포 발달의 대부분 단계에서 발현되는 것으로 보아 난포의 성장과 성숙에 관여하지 않을 것으로 추정되었다.

PER1의 발현 양상을 면역조직화학적 방법으로 비교한 결과, 생쥐 난포의 모든 발달 단계에서 난소 내 건강한 난자와 과립세포(granulosa cell)에서 높게 발현되며, 헤파세포(theca cell)나 간충세포(stromal cell)에서는 발현되지 않음을 알 수 있었고, 발달 주기에 따라 *Per1* 유전자와 유사한 발현 시기를 보임을 확인할 수 있었다. 또한 난포 내 PER1의 발현 양상에서 난자에서 먼 기저막쪽의 과립세포에서 보다 난자에 가까운 과립세포에서, 또 폐쇄중인 난포(apoptotic follicle)에서보다 건강한 난포에서 더욱 많이 발현되는 것을 확인할 수 있어, 난포 발달의 각 단계 동안 난자의 정상적인 발달과 밀접한 연관이 있을 것을 추측할 수 있었다(Fig. 2, 3). 상기 결과는 일주기성 유전자들이 유사분열의 조절에 관여하는 *Wee1* 유전자의 전사조절에 관여한다는 보고와도 일치하는 결과를 보였다(Matsuo et al., 2003).

생쥐 정자발생과정은 정원세포, 정모세포와 정세포 등을 거치는 긴 시간 동안 매우 다양한 발달 단계를 거친다(Sa-

ssone et al., 1997). 포유류의 정소 내 일주기성 유전자들의 발현에 대한 보고들은 현재까지 각 연구자들의 보고가 서로 일치하지 않고 있다. 즉, 일주기성 리듬은 곤충의 정자 발생 과정 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으나 포유류의 정자 발생 과정에서는 그 역할이 명확히 알려져 있지 않다. Zylka 등은 Northern blot 결과 *Per1*과 *Per3*가 주기성을 갖고 발현된다고 보고하였고(Zylka et al., 1998), Fu 등과 Miyamoto와 Sancar는 *Per1*이나 *Cry1*이 주기성을 나타내지 않는다고 보고하였다(Fu et al., 2002; Miyamoto & Sancar, 1999).

그러나 본 연구의 결과 정소의 경우 발달의 단계에 따라 일주기성 유전자의 발현이 서로 다른 양상을 보였으며, 특히 생후 7일과 10일에서 상대적으로 높은 발현 양상을 보임이 관찰되었다. 정세포 형성 과정에 따른 *Per1*의 발현 양상 변화의 이유는 명확하지 않으나 성체 생쥐에서 *Per1*의 발현이 다시 나타나는 것으로 보아 *Per1*은 정세포 발달 및 성숙의 특정 단계와 연관된 것으로 사료된다. 비록 일주기성 유전자들이 결손된 동물들이 생식능력이 있다 하더라도(Bae et al., 2001; Bunker et al., 2000; Cermakian et al., 2000; Kume et al., 1999; van der Horst et al., 1999; Zheng et al., 2001) 본 실험의 결과에서 이러한 유전자들이 발생의 각 단계에 참여하는 것으로 보여 정자 발생 과정의 특정 단계에 관여하거나 또는 단계별 전이에 참여할 가능성을 추론해 볼 수 있으며, 또한 정자의 질이나 양과 관여 가능성도 생각해 볼 수 있어 추후 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

또한 시교차상핵에서 분비되어 표적 조직 또는 기관으로 전달되는 물질로 알려진 *Prokineticin 2*의 수용체인 *Prok1r*과 *Prok2r* 유전자의 생식소 발달 단계별 발현 양상 변화는 *Prok1r*의 경우 생후 7과 21일에, *Prok2*의 경우 7일에 난소에서 각각 강한 발현을 나타내었으며, 정소에서는 *Prok1r*이 1, 7, 10일에서, *Prok2r*이 1일과 7일에서 각각 발현이 관찰되었으나, 시간이 지남에 따라 점차로 그 발현 양상이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4, 8). 그러나 난소의 발달에 있어서 시교차상핵에서 분비되는 물질인 *Prok2*에 대한 수용체인 *Prok2r*은 생후 7일에 발현되며, 이 시기 본 연구에서 확인한 일주기성 유전자들 중 *Cry1*을 제외한 모든 유전자들의 발현이 증가한 점에서 볼 때 중추신경계에서의 중앙 조절이 말초 조직의 주기성에 관여할 수 있을 것이라는 것을 추론해 볼 수 있었다.

이상의 연구들을 종합한 결과, 난소와 정소에서의 일주기성 clock 유전자의 발현은, 발생 단계별, 정상적인 난자와 폐쇄되는 난자에서 다양하면서도 뚜렷한 발현 양상의 차이를 보임으로서 난소와 정소 내에서 정자와 난자의 정상적인 발달과 밀접한 연관이 있음을 추론할 수 있었으며, 또한 난소나

정소에서 발현되는 일주기성 clock 유전자들은 정자와 난자 발달의 각 단계에서 발달의 조절에 중요한 영향을 미칠 수 있을 것으로 보였다. 현재까지 생식주기의 조절이나 발생 단계에서 성호르몬이 연관된 시상하부-뇌하수체-생식소의 중심축에 관한 연구가 매우 활발히 이루어져 왔으나, 이들 호르몬과 시상하부, 뇌하수체에 의한 조절의 상위 개념인 외부로부터의 자극의 수용과, 스스로의 주기를 가지고 이들에 영향을 주는 일주기성 clock 유전자들에 의한 생식주기의 조절에 관한 연구는 아직까지 미흡한 단계이다. 본 연구의 결과, 일주기성 clock 유전자들도 생물의 생식주기 및 생식세포의 발달에 큰 영향을 미칠 수 있음을 강력하게 시사하여 차후 이에 대한 다양한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Allada R, Emery P, Takahashi JS, Rosbash M (2001) Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu Rev Neurosci* 24:1091-1119.
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR (2001) Differential functions of *Per1*, *Per2*, and *Per3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525-536.
- Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309:47-56.
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA (2000) *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103:1009-1017.
- Cermakian N, Sassone-Corsi P (2000) Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:59-67.
- Cheng, MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY (2002) Prokineticin2 transmits the behavioral circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417:405-410.
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271-290.
- Edwards RG (2002) Aspects of the molecular regulation of early mammalian development. *Repro Biomed Online* 6(Suppl 1): 97-113.
- Fu Z, Inaba M, Noguchi T, Kato H (2002) Molecular cloning and circadian regulation of *cryptochrome* genes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Biol Rhythms* 17:14-27.
- Goldman BD (1999) The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids* 64:679-685.
- Henderson SA, Edwards RG (1968) Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218:22-28.
- Johnson MH (2002) Time and development. *Reprod Biomed Online* 4 (suppl 1):39-45.
- Ko MSH, Kitchen JR, Wang X (2000) Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development* 127:1737-1749.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM (1999) *Cry1* and *Cry2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193-205.
- Lamberts SWJ, van den Beld AW, van der Lely AJ (1997) The endocrinology of aging. *Science* 278:419-424.
- Matsuo M, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*. *Science* 302:255-259.
- Miyamoto Y, Sancar A (1999) Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 71: 238-243.
- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K (2002) Molecular machinery of circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 309: 47-56.
- Pittendrigh, CS (1993) Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55:16-54.
- Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647-676.
- Sassone Corsi P (1997) Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells. *Cell* 88:163-166.
- Turek FW (1992) Biological rhythms in reproductive processes. *Horm Res* 37 Suppl 3:93-98.
- Turek FW, Swann J, Earnest DJ (1984) Role of the circadian system in reproductive phenomena. *Recent Prog Horm Res* 40:143-183.
- van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398:627-630.
- Williams JA, Sehgal A (2001) Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* 63:

729-755.

Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC (2001) Nonredundant roles of the *Per1* and *Per2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105:683-694.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three *period* homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20:1103-1110.