

한우 난포란의 체외성숙 배지와 세포질 내의 단백질 변화

박용수[†] · 박현정¹

경상북도 축산기술연구소

초 록

본 연구는 한우 난포란이 체외성숙된 환경의 변화를 단백질 측면으로부터 검토하기 위하여 체외성숙 배지와 세포질내 단백질 변화와 종류를 검토하였다. 그 결과 배지 내의 단백질 발현량은 배양 4.5시간째까지 감소하였고, 배양 13.5시간째까지는 변화가 없었다. 그러나 배양 13.5~18시간 사이에 증가한 후 배양 18시간 이후에 다시 감소하는 경향이였다. 세포질 내의 단백질 발현량은 배양 4.5시간째까지 증가하였고 배양 9시간째까지 급격히 감소하였다. 배양 9시간째부터 18시간째까지는 단백질 발현량이 유사한 경향이였으나 배양 18시간째부터 24시간째까지 다시 증가하였다. 한편 체외성숙한 배지와 세포질을 2차원 전기영동하여 각각 298개 및 35개의 단백질 spot을 확인하였고, 그 중 배지에서는 28개, 세포질에서는 5개의 spot이 유의적인 변화를 확인하였다. 이들 spot에 대한 MALDI-TOP 분석으로 배지와 세포질에서 각각 8개 및 1개의 단백질을 동정하였다. 그 종류는 aldose reductase, alpha enolase, apolipoprotein A-1 precursor, 43kDa collectin precursor, heat shock 27kDa protein, plasminogen activator inhibitor-1 precursor, thrombospondin 1 transitional endoplasmic reticulum ATPase 및 β -tubulin이었다.

(주제어 : Bovine, *In vitro* maturation, Protein, 2-D electrophoresis)

서 론

포유동물의 난자의 핵은 태아기에 meiosis에 접어들고 성숙 전까지 1st meiotic division의 late prophase에 정지하고 있다가, 체내에서는 성선호르몬의 자극, 체외에서는 난포로부터 분리될 때 감수분열이 시작되어 germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase I, anaphase I 그리고 telophase I 을 거쳐서 제1극체가 출현하고 metaphase II 단계에 정지한다(Motlik, 1989). 이러한 핵상의 변화에 수반하여 세포질 내에서도 세포골격의 재정비(Penny 등, 1995)와 새로운 단백질 합성이 일어난다(Tatemoto와 Horiuchi, 1995).

난포란의 성숙이라는 것은 단백질 합성에 의한 세포질 내에 새로운 물질이 축적되어야 하며(Kastrop 등, 1990) 체외성숙 시작부터 6시간 동안 단백질 합성이 억제되면 GVBD가 일어나지 않는다는 것에 의해서도 증명되었다(Khatir 등, 1996). 따라서 단백질 합성 억제에 대한 난자의 높은 감수성은 GVBD와 이후 배 발달에 필요한 특정 단백질들이 미성숙 난포란의 세포질에는 존재하지 않고 외부로부터 유입된다는 것을 의미하기 때문에 체외성숙 배지 내의 여러 조건과 난포란의 세포질내 단백질 변화와는 밀접한 관계가 있을 것이다.

한편 난포란의 성숙에 있어서 핵성숙은 주로 현미경적 관찰이 가능한 제1극체의 방출을 의미하는 것이지만(Shuntaro 등, 2000), 난포란의 성숙은 핵성숙과 더불어 세포질 성숙이 함께 일어나야 한다(Sirard 등, 1989). 그러

나 실제 난포란의 세포질 성숙이라는 것은 어떤 확실한 지표가 있는 것이 아니기 때문에 현재 통상적으로 사용되고 있는 체외성숙 체계는 이와 같은 세포질 성숙에 관한 지식들을 바탕으로 개발된 것이 아니라, 단지 경험적으로 개발된 것이다. 따라서 체외수정란 생산 기술의 향상은 체외수정 및 체외배양 방법의 조건 설정뿐만 아니라, 먼저 체외에서 난포란의 성숙과 관련된 제반 요인에 대한 정립이 선행되어야 한다.

따라서 본 연구는 한우 난포란이 체외성숙된 환경의 변화를 단백질 측면으로부터 검토하기 위하여 체외성숙 배지와 세포질 내에서 단백질의 변화와 종류를 검토하였다.

재료 및 방법

체외성숙

도축된 한우로부터 난소를 적출하여 25 μ g/mL gentamicin(Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(25°C ~ 28°C)가 들어있는 보온병에 담아, 6시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 penicillin G(Sigma, P3032)가 첨가된 0.9% 생리식염수로 3회~4회 세척하여 난소에 존재하는 혈액 및 이물질을 제거한 후, 18G 주사침이 부착된 10mL 주사기를 이용하여 직경 2~8mm의 가시난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 25mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-

¹ 제주대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Cheju National University)

[†] Corresponding author : Dr. Yong-Soo Park, Kyoungbuk Livestock Research Institute, TEL : +82-54-638-6012, E-mail: pys0112@chollian.net

ethanesulfonic acid(Hepes, Sigma, H3375)와 3mg/mL Bovine Serum Albumin(BSA, Sigma, A6003)이 첨가된 Hepes-buffered TALP 용액으로 2~3회 세척한 후 실체 현미경(Olympus, Japan) 하에서 난구세포의 부착 상태가 치밀한 것만을 선별하였다. 선별된 난포란 15개씩을 0.2 mg/mL pyruvate(Sigma, P3662), 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Sigma, F0643), 1 μ g/mL Follicle Stimulating Hormone(FSH, Sigma, F8174), 10 μ g/mL Luteinizing Hormone(LH, Sigma, L9773), 1 μ g/mL estradiol-17 β (Sigma, E2758)가 각각 첨가된 TCM-199 용액 50 μ L의 미세소적에 넣고, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 체외성숙을 유도하였다.

배지 및 세포질의 준비

1) 배지

체외성숙 0, 4.5, 9, 13.5, 18 및 24시간째에 각각 배지를 회수하여 분석 시까지 -20°C에서 보존하였다.

2) 세포질

한우 난포란은 각각 0, 4.5, 9, 13.5, 18 및 24시간 동안 체외성숙을 행하였다. 각각의 시간에 회수한 난포란은 0.3% hyaluronidase에서 난구세포를 제거한 후 500 μ L 멸균중류수에 50개씩을 넣어서 배지와 동일한 조건에서 보존하였다.

체외성숙 단계의 단백질 분석

1) 시약

단백질 분석에 사용된 시약은 acetonitrile(Sigma, A6914), acrylamide(Sigma, A4508), benzamidine(Sigma, B6506), bradford reagent(Sigma, B8916), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate(CHAPS, Sigma, C9426), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid(Sigma, C2020), dithiothreitol(DTT, Sigma, D9163), immobilized pH gradient(IPG) dry strips(pH4-10NL, 23cm, Genomine), iodoacetamide(Sigma, A3221), modified porcine trypsin (sequencing grade, Promega), pharmalyte(pH3.5~10, Amersham Bio.), sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma, S4509), thiourea(Sigma, T8656), trifluoroacetic acid(Sigma, L6508) 및 urea(Sigma, U6504)이다.

2) 단백질 추출

(1) 배지의 단백질

난포란의 체외성숙 후 체외성숙용 배지로부터 단백질 추출은 acetone 침전법을 이용하였다. 준비된 배지의 양보다 5배의 acetone을 첨가하여 -20°C에서 2시간 동안 단백질을 침전시킨 다음, 원심분리 하여 침전된 단백질을 회수하였다. 침전된 단백질은 7M urea, 2M thiourea, 4%(w/v) CHAPS, 1%(w/v) DTT, 2%(v/v) pharmalyte, 1mM benzamidine으로 조제된 용액으로 용해하였다. 단백질의 농도 측정은 준비된 샘플 5 μ L에 Bradford 용액 250 μ L를 첨가하여 595nm의 흡

광도에서 측정하였다.

(2) 세포질 내의 단백질

난포란의 세포질로부터 단백질 추출은 acetone 침전법을 이용하였다. 난구세포가 제거된 난자 50개가 들어 있는 500 μ L 멸균중류수에 4.5mL의 acetone을 첨가하여, -20°C에서 2시간 방치하여 단백질을 침전시킨 다음, 원심분리하여 침전된 단백질을 회수 하였다.

3) 2차원 전기영동(2DE)

1st isoelectric focusing(IEF)을 위하여 IPG strips은 7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pharmalyte 용액으로 상온에 16시간 reswelling 하였다. Strip용 시료는 각각 200 μ g 씩을 사용하였으며, multiphore II system(Amersham Bio., USA)을 이용하여 IEF를 행하였다. 한편 IEF 조건은 150V에서 3,500V까지 소요되는 시간은 3시간이었으며, 3,500V에서는 26시간 유지시킨 후 최종적으로 96kVh가 되도록 설정하였다.

2D SDS-polyacrylamidegelelectrophoresis(PAGE)를 수행하기 전에 IPG strips을 1% DTT를 함유한 완충용액(50mM Tris-Cl, pH 6.8, 6M urea, 2% SDS, 30% glycerol)으로 10분간 평형하였다. 평형 직후 2.5% iodoacetamide를 함유한 완충용액으로 다시 10분간 평형하였다. 평형이 완료된 strips을 SDS-PAGE gels(20~24cm, 10~16%) 위에 배열시키고, hoefer DALT 2D system(Amersham Bio., USA)을 이용하여 20°C에서 최종적으로 1.7kVh가 되게 전개하였다. 2차원 전기영동이 완료된 2차원 gel의 단백질은 silver 염색을 행하였으며, 질량분석기에 의한 단백질 동정을 위하여 glutaraldehyde 처리는 생략하였다. Silver 염색된 2차원 gel은 AGFA 사의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝하여 확장자가 TIFF인 이미지 파일의 형태로 컴퓨터에 저장하였다 (Fig. 1).

4) 이미지 분석

스캐닝된 이미지로부터 spots의 정량적인 분석은 PD-Quest software (version 7.0, BioRad)를 이용하여 행하였다. 각 spot의 양은 total valid spots의 intensity로 normalization하였으며, 대조군에 비해 2배 이상의 발현 변화가 나타나는 spots을 선정하였다.

5) 질량 분석을 위한 단백질 절편화

선정된 spots은 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편 조각을 분해한 후, 50% acetonitrile로 세척하였다. 다시 10ng/ μ L trypsin 용액으로 swelling 하여 37°C에서 8~10시간 배양하였다. 단백질 분해반응은 5 μ L 0.5% trifluoroacetic acid의 첨가로 종결하였다. Trypsin에 의해 절단된 각각 단백질 단편들을 회수하여, C18ZipTips (Millipore)을 이용하여 탈염 및 농축하였다. 각각 단백질 농축액은 등량의 50% aqueous acetonitrile에 포화된 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합하였고, 질량분석은 Ettan MALDI-TOF(Amersham Bio., USA)를 이용하였다.

6) 단백질의 동정

Target plate 상에 적하된 단백질 단편 조각들은 337nm의 N₂ laser 조사로서 기화시킨 후, 20kV injection pulse에 의해

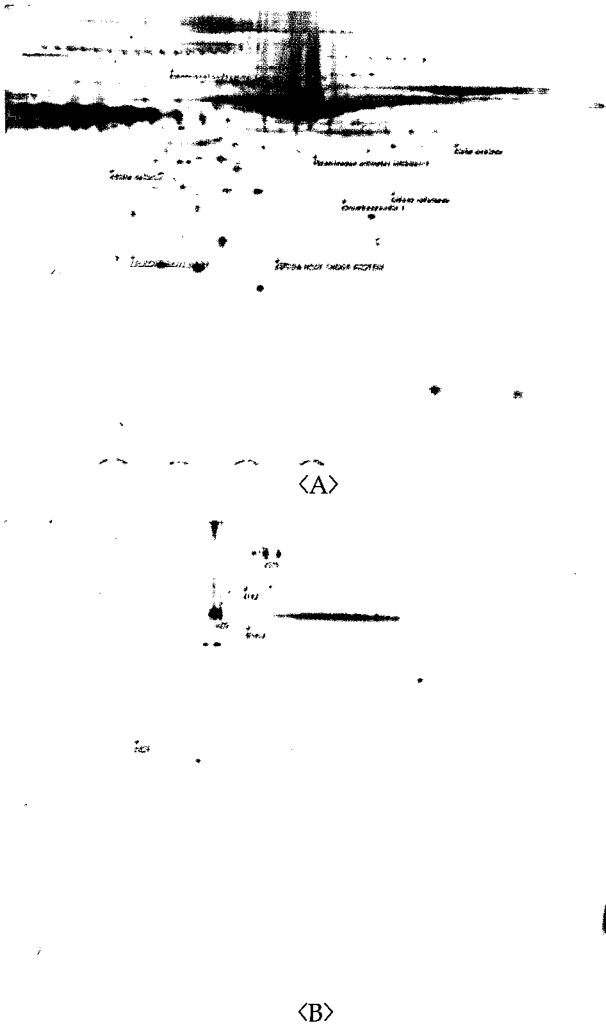


Fig. 1. 2D SDS-PAGE gel images of medium(A) and oocyte cytoplasm(B). Red colored spots were identified from MALDI-TOF.

가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. Mass spectrum의 분석을 위해서 trypsin의 자가분해에 의해 생성된 peptide의 ion peak m/z(842.510, 2211.1046)를 표준 peaks로 이용하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정은 ProFound 검색엔진(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)을 이용하였다.

통계학적 분석

2배 이상 변화가 인정된 spot에 대한 유의성 검정은 t-test를 이용하였다.

결 과

서로 다른 체외성숙 시간에 동안 한우 난포란을 배양한 체외성숙용 배지와 세포질 내의 단백질 총량을 검토한

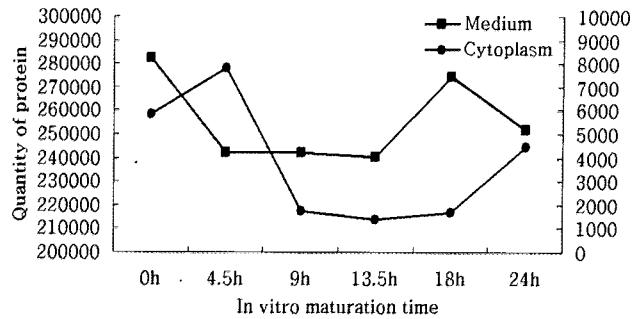


Fig. 2. Total protein quantity changes in medium and cytoplasm during *in vitro* maturation of Korean Native Cow oocytes.

결과는 Fig. 2와 같다. 배지내의 단백질 발현량이 배양 4.5시간째까지 감소하였고, 배양 13.5 시간째까지는 변화가 없었다. 그러나 배양 13.5~18시간 사이에 증가한 후 배양 18시간 이후에 다시 감소하는 경향이였다. 한편 세포질내의 단백질 발현량이 배양 4.5시간째까지 증가하였고 배양 9시간째까지 급격히 감소하였다. 배양 9시간째부터 18시간째까지는 단백질 발현량이 유사한 경향이였으나 배양 18시간째부터 24시간째까지 다시 증가하였다.

한우 난포란의 체외성숙시 배양 형태 및 체외성숙 시간에 따른 배지 및 세포질내의 단백질 종류를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 그 결과 배지를 2차원 전기영동한 gel에서 총 298개의 spot을 확인하였고, 이중 28개의 spot이 2배 이상의 발현과 더불어 유의차가 인정되었다($p < 0.05$). 그리고 상기 spot에 대한 PMF 분석을 통하여 8개의 spot을 동정할 수 있었으며, 그 종류는 aldose reductase, alpha enolase, apolipoprotein A-1 precursor 43kDa collectin precursor, heat shock 27kDa protein, plasminogen activator inhibitor-1 precursor, thrombospondin 1 그리고 transitional endoplasmic reticulum ATPase이었다. 한편 난자의 세포질을 2차원 전기영동한 gel에서 총 35개의 spot을 확인하였고, 이 중에서 spot 4616만이 β -tubulin으로 밝혀졌다.

고 찰

본 연구는 한우 난포란이 체외성숙된 환경의 변화를 단백질 측면으로부터 검토하기 위하여 체외성숙 배지와 세포질 내에서 단백질의 변화와 종류를 검토하였다.

대가축의 난포란은 mouse와 rat와는 반대로 감수분열의 재개에 단백질 합성이 필요하다(Schultz와 Wasserman, 1977; Tatemoto와 Horiuchi, 1995; Sirard 등, 1989; Moor와 Crosby, 1986). 그리고 단백질 합성은 난포란 핵의 GVBD, metaphase I, metaphase II 단계로의 진행 그리고 metaphase II 유지 등과 같이 발생하는 4단계에서 변화가 있다(Sirard 등, 1989). 또한 체외성숙 초기에 합성되는 단백질은 난포란의 GVBD와 이후 성숙에 중요한 역할을 하고(Moor와 Torunson, 1977), 체외성숙 후기에 합성되는 단백질은 배발달 능력 획득과 관련이 있다고 보고되었다(Sirard 등, 1989; Bornslaeger과 Schultz, 1985). 본 연구에서(Fig. 2) 체외성숙 4.5시간 이전까지 체외성숙용

Table 1. Identification of proteins in *in vitro* maturation medium and cytoplasm by peptide mass fingerprinting

Spot ID	Source	Identification	%	pI	kDa
7117	Meidum	Aldose reductase	25	5.8	36.30
8323	Meidum	Alpha enolase	14	6.4	47.60
2113	Meidum	Apolipoprotein A-1 precursor	14	5.7	30.26
2202	Meidum	43kDa collectin precursor	19	5.0	33.94
6111	Meidum	Heat shock 27kDa protein	18	8.1	22.42
6218	Meidum	Plasminogen activator inhibitor- 1 precursor	19	6.0	45.41
7119	Meidum	Thrombospondin 1	27	8.1	25.11
3611	Meidum	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	11	5.1	89.97
4616	Cytoplasm	Beta tubulin	20	4.7	38.95

배지에서 단백질 발현량이 감소하였고, 세포질 내에는 증가하여, 소 난포란의 GVBD의 유도에는 배지로부터 특정 단백질이 세포질내로 유입되어야 한다고 생각된다. 또한 배지내의 총 단백질 발현량은 배양 18시간째까지 증가한 후 배양 24시간까지 감소하였으나, 세포질 내에서는 18시간 이후에 증가하였다. 이것은 체외성숙 후기에도 배지의 단백질이 세포질내로 유입되거나 세포질 내에서 새로운 종류의 단백질이 합성되는 것으로 판단된다. 이전의 체외성숙과 관련된 연구에서 체외성숙 18시간이 24시간에 비하여 배반포 도달율이 높았고, 세포수 및 수태율이 높다고 하였다(Park 등, 2005). 이와 같은 결과와 비교하면 체외성숙 18시간 이후에 배지 내에서 유입되거나 합성된 세포질내의 단백질은 이후 배발달에 유해하게 작용하는 것으로 생각된다.

최근 단백질을 대상으로 유전자의 기능을 연구하는 proteomics 분야의 기술적인 발전으로 각종 세포기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서 대량 발굴 탐색이 가능한 2차원 전기영동 분석법을 이용하여 체외성숙용 배지와 난포란의 세포질내 단백질을 분석하였으며, MALDI-TOF에 의한 자동화된 단백질 분자 구조 분석 기술을 이용하여 관련 단백질들의 동정을 시도하였다. 체외성숙용 배지의 28개와 세포질내의 25개 spot에 대한 PMF 분석에서 체외성숙용 배지에서 8개와 세포질 내에서 1개의 단백질이 동정되었다. 그 종류는 체외성숙용 배지에서는 aldose reductase, alpha enolase, apolipoprotein A-1 precursor, 43kDa collectin precursor, heat shock 27kDa protein, plasminogen activator inhibitor-1 precursor, thrombospondin 1 및 transitional endoplasmic reticulum ATPase이고, 난포란의 세포질에서 단백질은 β -tubulin이 확인되었다. 한편 확인한 spots에 비하여 낮은 동정율은 아직 대부분 단백질 sequence가 gene bank (NCBI 또는 SWISS-port)에 등재되지 않았기 때문이며, 등재된 단백질들도 배 발생과 관련된 보고는 거의 없었다. 상기 단백질들의 배 발생과 관련된 기능은 향후 세포내에서 과다 발현시키거나, 해당 유전자의 knock-out 동물을 이용하여 그 유전자의 기능을 생체 내에서 검정하게 되면 보다 정확한 기능을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

The Changes of Quantity and Quality of Proteins in Medium and Cytoplasm during *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes

Y. S. Park and H. J. Park

Kyongbuk Livestock Research Institute,
College of Veterinary Medicine, Cheju National University

ABSTRACT

This study was designed to investigate the changes of quantity and quality of proteins in medium and cytoplasm during *in vitro* maturation of bovine oocytes. The total quantity of proteins in medium decreased from 0 to 4.5 hr, but increased from 13.5 to 18 hr after the onset of *in vitro* maturation. The total quantity of protein in cytoplasm increased from 0 to 4.5 hr, decreased from 4.5 to 9 hr, and increased after 18 hr after the onset of *in vitro* maturation. A total of 298 protein spots was detected on a gel of 2D SDS-PAGE from maturation medium. Among 28 protein spots expressed significant differences in their quantity, 8 proteins were identified by peptide mass fingerprinting (aldose reductase, alpha enolase, apolipoprotein A-1 precursor, 43kDa collectin precursor, heat shock 27kDa protein, plasminogen activator inhibitor-1 precursor, thrombospondin 1, transitional endoplasmic reticulum ATPase). Among total of 35 protein spots detected on gel of 2D SDS-PAGE from oocytes cytoplasm, β -tubulin was identified by peptide mass fingerprinting.

(Key words : Bovine, *In vitro* maturation, Protein, 2-D electrophoresis)

인용문헌

1. Bornslaeger EA, Schultz RM (1985): Regulation of

- mouse oocyte maturation: Effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol Reprod* 33:698-704.
2. Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ, Kruij TAM (1990): Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. *J Reprod Fertil* 90:305-310.
 3. Khatir H, Lonergan P, Carolan C, Mermillod P (1996): Prepubertal bovine oocyte: A negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol Reprod Dev* 45:231-239.
 4. Moor RM, Crosby IM (1986): Protein requirements for germinal vesical breakdown in bovine oocytes. *J Embryol Exp Morphol* 94:207-220.
 5. Moor RM, Torunson AO (1977): Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 49:101-109.
 6. Motlik J (1989): Cytoplasmic aspects of oocytes growth and maturation in mammals. *J Reprod Fert* 38: 17-25.
 7. Park YS, Kim SS, Kim JM, Park HD, Byun MD (2005): The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* 64:123-134.
 8. Penny CD, Lowman BG, Scott NA, Scott PR, Voelkel S, Davies DAR (1995): Management aspects of induced twinning in beef suckler cows using *in vitro* fertilized embryos. *Vet Rec* 136:506-510.
 9. Schultz RM, Wassarman PM (1977): Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci* 24:167-194.
 10. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL (1989): Timing for nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40:1257-1263.
 11. Shuntaro I, Keiko IT, Tohru A, Takashi M, Masayasu Y (2000): Effects of midkine during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Biol Reprod* 63:1067- 1074.
 12. Tatemoto H, Horiuchi T (1995): Requirement for protein synthesis during the onset of meiosis in bovine oocytes and its involvement in the autocatalytic amplification of maturation promoting factor. *Mol Reprod Dev* 41:47-53.
- (접수일자: 2005. 9. 2. / 채택일자: 2005. 9. 15.)