

생쥐의 난소와 난자에서의 Obox4의 동정과 RNAi를 이용한 기능연구

포천중문의과대학교 생명과학전문대학원¹, 차병원 여성의학연구소²

이 현 서¹ · 이 경 아^{1,2*}

Characterization and Functional Analysis of Obox4 during Oocyte Maturation by RNA Interference

Hyun-Seo Lee¹, Kyung-Ah Lee^{1,2*}

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine,

²CHA Research Institute, Fertility Center, CHA General Hospital, Seoul, Korea

Objective: Previously, we identified differentially expressed genes between GV and MII stage mouse oocytes using ACP technology.¹ When we study one of GV selective genes, Obox family, we found Obox4 mRNA expression in ovaries that has been reported as expressed exclusively in testis. Therefore, this study was conducted for characterization and functional analysis for Obox4.

Methods: Expression of Obox4 mRNA was examined in gonads and oocytes by RT-PCR. To determine the role of Obox4 in oocyte maturation, Obox4 dsRNA was microinjected into the cytoplasm of GV oocytes followed by 16 h of incubation in the plain medium or by 24 h of incubation in the medium containing IBMX. After RNAi, phenotypes and maturation rates were observed, change in mRNA expression was evaluated, and chromosomal status was confirmed by orcein staining.

Results: Obox4 has minimal expression in the ovary compared to that of the other family members. When oocytes were cultured for 16 h in M16 medium after RNAi, maturation rate was not changed significantly, compared with that of non-injected or buffer-injected control oocytes. Surprisingly, however, when oocytes were cultured for 24 h in M16 containing IBMX, in which oocytes were supposed to arrest at GV stage, Obox4 RNAi oocytes were advanced to MI and MII. Spindle structure was disappeared and the chromosomes were condensed in the oocytes after Obox4 RNAi.

Conclusions: This is the first report on the expression of Obox4 in the ovary and oocytes. Results of the study suggest that Obox4 plays a crucial role in spindle formation and chromosome segregation during meiosis in oocytes. In addition, Obox4 may play an important role in cAMP-dependent signal cascades of GV-arrest in mouse oocytes.

[Korean. J. Reprod. Med. 2007; 34(4): 293-303.]

Key Words: ACP-PCR, Obox family, Mouse, Oocyte maturation, RNAi

포유류의 난소에 존재하는 원시난포들은 태어날 때 성장이 정지되어 있는 상태로 존재하며, 이때 난자는 제1감수분열 전기에 정지되어 있다. 난자

성숙이 재개되면 GV 단계에 정지되어 있는 미성숙 난자가 핵막이 소실되는 germinal vesicle breakdown (GVBD) 단계, metaphase I (MI) 단계를 거쳐 metaphase II (MII) 단계에 이르러 다시 정지되는 과정을 거치게 되는데, 이 모든 과정을 일컬어 난자 성숙이라 한다. 난자 성숙과정 동안에 미성숙 난자는 제1 극체가 방출되기 위한 핵 성숙과 세포질

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울시 강남구 역삼1동 606-13, 포천중문의과대학교 생명과학전문대학원
Tel: (02) 3468-3440, Fax: (02) 563-2028
e-mail: leeka@ovary.co.kr

*This work was supported by Korea Research Foundation Grant (KRF-2004-041-E00189).

성숙을 위한 준비를 하게 되며, 그 결과로 형성되는 성숙 난자는 정상적인 수정과 배아발달을 위한 충분한 능력을 갖추게 된다.^{2,3}

본 연구진은 선행연구를 통하여 난자 성숙과정의 조절 기작을 규명하기 위하여 Annealing Control Primer (ACP)-PCR System을 이용하여 생쥐의 GV 난자와 MII 난자에서 차이 나게 발현하는 유전자의 목록을 보유하고 있다.¹ 이들 유전자 중에서 Obox family의 member인 Obox1, 3, 5가 존재함을 관찰하여 본 연구를 시작하게 되었다. 이들 Obox family 유전자는 1번부터 6번까지 존재하는데, 모두 생쥐의 염색체 7번 상에 위치하고 있으며, mRNA 발현 양상을 확인하였을 때 Obox4만을 제외하고 모두 난소에서 선택적으로 높게 발현한다고 보고되어 있다.⁴ Obox1, 6의 mRNA 발현 양상을 *in situ* hybridization을 이용하여 난소 조직 내에서 확인하였을 때 원시난포에서는 발현하지 않았으며 일차난포 (primary follicle)부터 난포강 난포 (antral follicle)까지 발현하고 있음을 확인하였다.⁴ 이 발현 양상은 난포 발달과정과 난자 발생과정 동안에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있는 growth differentiation factor-9 (GDF9)와 bone morphogenetic protein-15 (BMP15)의 발현 양상과 비슷하다.⁵ 이와 같은 결과를 바탕으로 Obox family는 난포 발달과정과 난자 발생과정 동안에 중요한 역할을 할 것으로 생각되어지고 있다.⁴ 그러나 Obox6에 대한 돌연변이 생쥐에서는 정상적인 난자의 성숙과 수정 능력, 더 나아가 정상적인 배아발달이 진행됨으로 인해 Obox6는 난자 성숙과 배아발달에 중요한 역할을 하지 않고 있다고 보고되어 있고, 이때 Obox6의 mRNA 발현이 사라지면서 다른 Obox member들의 발현이 증가됨을 확인함으로써 Obox family 유전자들의 상호보완적인 기능을 예측하였다.⁶

본 연구에서 Obox family의 mRNA의 발현 양상을 생쥐 난소의 발달 단계별로 확인하는 과정에서 Obox4의 발현을 2주령의 난소에서 확인할 수 있었고, 또한 정소와 난자 성숙과정 동안에 Obox4를 동정할 수 있었기에, 난자 성숙 동안에 Obox4의 기능

이 무엇인지 알아보기 위해 본 연구를 수행하였다.

RNAi는 특정 유전자와 서열이 같은 dsRNA (double-stranded RNA)를 제작하여 세포에 주입했을 때에 세포 내에 존재하는 해당 유전자의 mRNA를 분해하여, 단백질로 번역되는 과정을 억제 또는 방해함으로써 유전정보의 발현을 억제하는 것을 말한다.⁷ 세포 내로 삽입된 dsRNA는 dicer라 불리는 ribonuclease에 의해 21 bp에서 25 bp 정도의 small interfering RNA (siRNA)로 잘려지게 된다.^{8,9} 이렇게 만들어진 siRNA는 RNA-induced silencing complex (RISC)와 결합하게 되며, 이 결합은 서열이 같은 특정 mRNA를 인식하고, 결합하여 목적하는 특정 mRNA를 절단시키게 된다.^{10,11}

RNAi 기법은 난자와 초기 배아에 관련된 유전자의 기능을 연구함에 있어 매우 유용한 실험적 방법이다. 첫째, 난자와 초기 배아에서는 PKR (dsRNA activated protein kinase R)에 의해 유도되는 interferon과 2', 5'-oligoadenylate synthetase (2', 5-OAS)의 경로 활성이 나타나지 않는다.^{12,13} 그러나, 대부분의 포유류 세포에서는, 30 bp 이상의 긴 dsRNA가 PKR, interferon과 2', 5'-AS 경로를 활성화 시키게 되고, 이들의 활성은 세포의 죽음을 초래한다.¹⁴ 두 번째, 미세 주입법은 난자 내로 유전자를 운반하는 매우 유용한 방법이며, 특히 200~300 bp의 dsRNA를 넣어 주는 것은 많은 수의 siRNA가 만들어지는 유리한 조건이 된다. 마지막으로, 유전자가 미세 주입된 난자와 초기 배아는 체외 배양하면서 유전자의 기능을 유관적으로 확인할 수 있다. 본 연구는 이와 같이 유용한 RNAi 기작을 이용하여 난자 내의 Obox4의 활성을 효과적으로 억제함으로써, 난자 성숙 동안에 Obox4가 어떠한 역할을 하고 있는지 알아보고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 total RNA분리

Total RNA는 생쥐의 발달 단계별 난소 (생후 1, 5, 14, 21, 28, 49일자)와 발달 단계별 정소 (생후 1, 5,

14, 21, 42, 49일자)에 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 용액을 넣고 균질화 시킨 후 상온에서 5분간 두었다가 15분 후 4°C에서 12,000 g로 20분간 원심분리한 뒤, RNA를 포함하는 무색의 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 여기에 동일한 양의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 두었다가 4°C에서 10분간 8,000 g로 원심분리하여, RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

2. 생쥐의 난자 회수

생후 3주령된 ICR 생쥐에 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Folligon, Intervet) 5 IU/ml를 주사하여 44~48시간째에 생쥐를 도살하고 난소만을 떼어냈다. Germinal vesicle breakdown (GVBD)를 억제하는 0.2 mM IBMX (I7018, Sigma)가 첨가된 M2 (M7167, Sigma) 배양액에 난소를 모은 후 인슐린 주사기를 이용하여 난소를 터뜨려 GV 난자-난구세포 복합체 (cumulus-enclosed oocyte complexes, COCs)를 모았다. 난자 크기에 맞는 미세유리관 파이프를 통해 난자 주위에 둘러 쌓여있는 난구세포를 물리적으로 제거하여 난자만을 얻었다. MII 난자를 얻기 위해서는 5 IU의 PMSG를 주사한 후, 48시간에 human chorionic gonadotrophin (hCG; Chorulon, Intervet) 주사하여 16시간 후 수란관으로부터 MII 난자를 얻었다.

3. mRNA 분리

같은 개수의 GV 난자와 MII 난자로부터 Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dyna, Oslo, Norway)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. 먼저 난자들이 있는 각 튜브에 300 µl lysis/binding buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM DTT)를 첨가한 뒤 5분간 실온에 두었다. 그 후, 보존액을 제거한 Dynabeads oligo(dT)₂₅에 넣고 vortexing한 뒤 실온에서 5분간 반응시켰다. mRNA를 잡고 있는 bead는 Dynal MPC-S magnetic bar를 이용하여 분리해 내고, 10 µl of Tris-HCl (10 mM Tris-

HCl, pH 7.5)를 첨가하여 65°C에서 2분간 반응시킴으로써 bead에 붙어있는 mRNA를 떨어뜨렸다. 다시 Dynal MPC-S magnetic bar를 이용하여 bead에서 mRNA만을 분리하였다.

4. RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dyna)를 이용하여 회수한 mRNA로부터의 cDNA 합성은 mRNA에 0.5 µg oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer를 넣고 70°C에서 10분간 가열한 후 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP mix를 포함하는 10 mM DTT를 최종 양이 20 µl이 되게 첨가한 후 42°C에서 5분간 데웠다. 그 후 200 U의 역전사효소 (MMLV reverse transcriptase, Promega)를 넣고 42°C에서 60분, 94°C에서 2분간 반응시켜 cDNA를 준비하였다. 조직에서 Trizol (Invitrogen)를 이용하여 회수한 total RNA로부터의 cDNA 합성에는 DNaseI이 첨가된다. PCR은 0.2 mM dNTPs, 25 pM의 각 primer, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Promega)와 함께 3차 증류수를 이용하여 전체 반응 용액이 20 µl가 되도록 하여 수행하여 각 유전자의 발현 양상을 확인하였다. glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 Internal control로 사용되었으며, globin을 spike로 사용하여 난자로부터의 적은 양의 mRNA 회수가 정확히 되었는지를 확인하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 Table 1과 Figure 2에 정리하였다.

5. dsRNA 준비와 난자에로의 미세주입

생쥐 2주령 난소로부터 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 추출하고, MMLV reverse transcriptase (Promega)으로 역전사 반응을 수행하였다. 사용된 primer와 결과물의 위치 및 크기는 Table 1과 Figure 2에 나타내었다. 합성된 cDNA를 가지고 Obox4 primer를 이용해 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 40초, 60°C에서 40초, 72°C에서 40초로 35 cycle을 수행하여 최종산물은 240 bp이었다. Obox4의 증폭산물을 pGEM T-easy vector (Pro-

mega)에 삽입하고 DH5α competent cell에 형질 전환시켜 다량의 재조합 된 clone을 얻었다. 그런 후 삽입된 유전자가 antisense 또는 sense로 삽입되었는지를 PCR을 통해 확인하고 *in vitro* transcription을 위해 T7 또는 SP6를 promotor로 반응할 수 있게 Spe I으로 linearization시키고, MEGascript RNAi Kit (Ambion, Austin, TX)의 T7 RNA polymerase를 이용하여 single stranded RNA를 합성하였다. 이렇게 합성된 각 complementary RNAs는 75°C에서 5분간

반응한 후 실온에서 3시간 식혔다. dsRNA sample 내에 single-strand cRNAs의 오염을 피하기 위해 1 µg/mL RNase A (Ambion)를 첨가해 37°C에서 30분 처리하였다. Phenol-chloroform 추출법으로 dsRNA를 준비하였고 Gel 전기영동으로 확인하였다.

본 연구에서는 dsRNA를 용해한 Elution buffer를 대조군으로 사용하였다. 유전자에 대한 primer를 두 set 작성하여 한 set는 dsRNA를 제작하는데 사용하였으며, 또 다른 set는 RNAi 후, mRNA 발현 차이

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this study and their annealing temperature (AT) and expected RT-PCR product sizes

Genes	Accession No.	Primer sequence	AT (°C)	Size (bp)
Obox1*	NM 027802	F - CCTAAACTGAATTTCAAACAATCGC R - CCCAGAGGATGCTCACAATTCAG	60°C	275 bp
Obox2*	NM 145708	F - CCTAAACTGAATTTCAAACAATCGC R - CCCAGAGGATGCTCACAATTCAG	60°C	275 bp
Obox3	NM 145707	F - TCCTGGTTCCATACCTGTTGTT R - GCAGGTATTCTTGGTATTCTTGG	60°C	179 bp
Obox4-1	AF 461109	F - CCCTCATTGATCAACCCTTGG R - AGTTTTGGGTCATACTTGGAG	60°C	240 bp
Obox4-2	AF461109	F - CCAACGTTCTTTGCTCACCT R - TGCACCGTGTCTTCTCTGT	60°C	295 bp
Obox5	NM 145709	F - ATCAGACTGACATAGCAGTAG R - ATGAAAGACCTGAAAGGTGTC	60°C	174 bp
Obox6	NM 145710	F - CACAGCAAATGAGATCCAGAT R - ATACCTGGCACTATCACAGGC	60°C	274 bp
G3PDH	NM 001001978	F - ACCACAGTCCATGCCATCAC R - TCCACCACCCTGTTGCTGTA	60°C	433 bp
Globin	V00875	F - GCAGCCACGGTGGCGAGTAT R - GTGGGACAGGAGCTTGAAAT	60°C	257 bp
Histone H1	NM 138311	F - GCGAAACCGAAAGAGGTCAGAA R - TGGAGGAGGTCTTGGGAAGTAA	60°C	378 bp

F and R in the primer codes indicate forward and reverse

*Same primer sequence used for Obox1, 2

Obox4-1 primer used for RT-PCR and design of dsRNA

Obox4-2 primer used to confirm the knock-down of Obox4 after RNAi

를 확인하기 위해 RT-PCR에 이용하였다 (Table 1).

Obox4 dsRNA를 미세주입한 후, 3% BSA (Sigma)가 첨가된 M16 배지에서 배양하거나, 또는 3% BSA가 첨가된 M16 배지에 0.2 mM의 IBMX를 첨가한 배지에서 배양하였다. 배양 조건은 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 16시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 극체가 방출된 난자를 MII 난자로 공시하였으며, 핵이 보이지 않으며 극체 또한 보이지 않는 난자는 MI 난자로 공시하였다.

6. Orcein 염색

난자들은 aceto-metahanol (acetic acid : methanol = 1 : 3)에 24시간 동안 고정하였다. 고정이 된 난자들은 얇게 뽑은 pasteur pipette을 이용하여 slide 중앙에 얹은 후 난자가 마르지 않게 바로 cover glass로 덮었다. Aceto-orcein (1% orcein, 45% acetic acid)를 slide와 cover glass 틈새로 흘려주어 5분간 염색 후, 현미경 (Coolscope, Nikon, Japan)을 이용하여 염색체

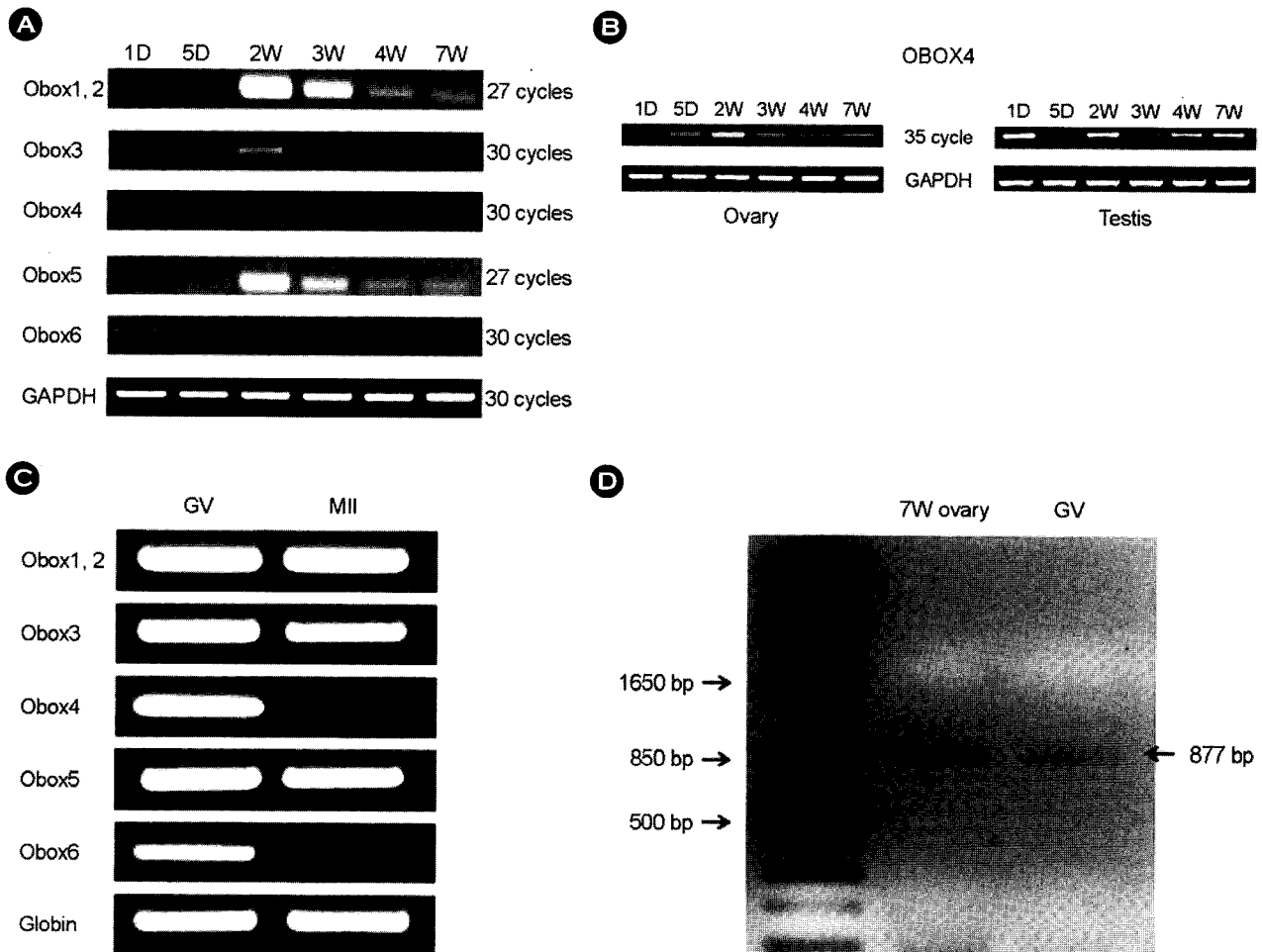


Figure 1. Differential expression of Obox family mRNA according to the ovarian, testicular developmental stages and oocytes. Total RNA from the ovaries and testes at different developmental stages were reverse transcribed and amplified by PCR. **A**, Expression of all 6 Obox genes according to the ovarian developmental stages. **B**, Expression Obox4 mRNA according to the differential developmental stages in the ovary and testis. Messenger RNA from 20 oocytes were reverse transcribed in a final volume of 20 μ l, and 1 μ l cDNA was used for RT-PCR for confirming expression one gene **C**, Differential expression of Obox family mRNA in oocytes according to the oocyte maturation stage **D**, cDNA samples by testing for genomic DNA contamination. GAPDH was used as an internal control. Globin spike was added as an external control.

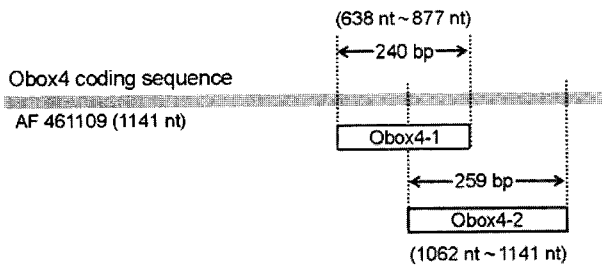


Figure 2. Obox4 primers design. primers were designed from Obox4 coding sequence. Obox4-1 primer used for RT-PCR and dsRNA preparation. Obox4-2 primer used for confirming knock down after RNAi.

를 관찰하였다.

결 과

1. 발달 단계별 난소와 정소, 난자에서의 Obox family의 mRNA 발현 양상

6개의 Obox 유전자를 대상으로 RT-PCR을 수행하였고, GAPDH 유전자 발현에 대한 상대적인 발현 양상을 보정하여 관찰하였을 때, Obox6을 제외하고 모든 Obox 유전자가 2주령의 생쥐의 난소에서 상대적으로 높게 발현하며 이후 점차 감소하는 양상을 보였다. 또한, 정소에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 Obox4에 대해서도 2주령 난소에서의 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 1A). 이것은 현재까지 알려져 있는 정보와 상반되는 현상이기에, Obox4의 mRNA 발현 양상을 좀더 확실하게 확인하기 위해 PCR cycle 수를 35 cycle로 조정하여 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, Obox4의 mRNA는, 생후 1일자 난소에서 처음으로 발현이 확인되며, 점차 증가하여 2주령의 난소에서 가장 높게 발현하고 이후 점차 줄어드는 양상을 확인하였다. 또한, 정소의 모든 발달과정에서 발현하고 있으며 특히 생후 1일자와 2주령의 정소에서 높게 발현하고 있었다 (Figure 1B).

GV 난자와 MII 난자에서의 Obox family의 mRNA의 발현 양상을 보여주고 있다. Obox family의 mRNA는 전체적으로 MII 난자보다 GV 난자에서 높게 발현하고 있었다. 특히, Obox1, 2, 3, 5와 비

교하여 Obox4, 6의 mRNA의 발현 양은 GV 난자에서 높게 발현하다가 MII 난자에서 현저하게 감소하는 것을 관찰하였다 (Figure 1C).

시료 내의 genomic DNA의 오염을 확인하기 위하여, Obox4에 대하여 intron 부분을 포함하도록 primer를 디자인하여, Intron을 포함하는 결과물은 1454 bp, exon만을 포함하는 결과물은 877 bp 위치에 band가 나타나도록 제작하여 RT-PCR을 수행한 결과, 877 bp 외의 다른 band가 나타나지 않았으므로, 시료 내에 genomic DNA의 오염이 없었음을 확인할 수 있었다 (Figure 1D).

2. Obox4 dsRNA를 이용한 선택적 Obox4 유전자의 knock-down

Obox4 dsRNA를 이용하여 RNAi를 한 후 histone H1 유전자 발현 양에 대한 상대적인 발현 양을 확인하였다. Obox4의 knock-down 확인을 위한 primer와 결과물의 위치 및 크기는 Table 1과 Figure 2에 나타내었다. 대조군의 난자들은 *in vitro* 성숙에 의해 얻어진 난자들이며, 배양을 위한 난자들의 회수 직후의 GV 난자 (0 h)와 8시간 동안 배양한 MI 난자, 16시간 동안 배양한 MII 난자가 사용되었다. 대조군과 비교하여, Obox4 RNAi 후 난자 성숙이 진행된 MI 난자와 MII 난자에서 Obox4의 발현이 확인되지 않았으며 GV 상태에 정지되어 있는 Obox4 RNAi군에서도 Obox4의 발현 양이 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 그러나 Obox family 중 Obox4와 염기서열의 유사성이 높은 Obox3, 5의 발현 양은 Obox4 RNAi에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3).

3. Obox4 RNAi 결과

대조군은 아무것도 처리하지 않은 난자들이며, 비교군은 Obox4 dsRNA를 녹였던 elution buffer만을 미세주입한 난자, Obox4 RNAi군은 Obox4 dsRNA를 미세주입한 난자들이다. Plain M16에서 배지에서 배양할 경우, 대조군 (100%), 비교군 (96.5%)에서의 난자 성숙율과 Obox4 RNAi군에서의 난자 성

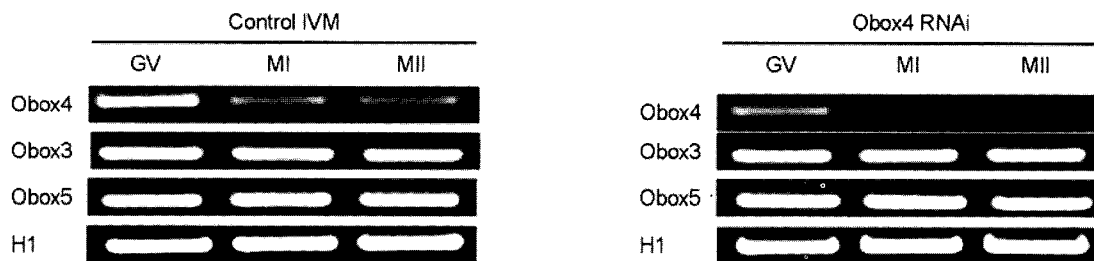


Figure 3. Specific suppression of Obox4 mRNA expression by Obox4 RNAi. Injection of Obox4 dsRNA into the GV oocytes markedly suppressed Obox4 mRNA expression, but not Obox3 or Obox5, of which coding sequences are highly homolog with the Obox4 coding sequence. The mRNA equivalent to a single oocyte was used for RT-PCR. Oocytes at GV (0 h), MI (8 h), and MII (16 h) stages were used as control for IVM. Histone H1 was used as an internal control.

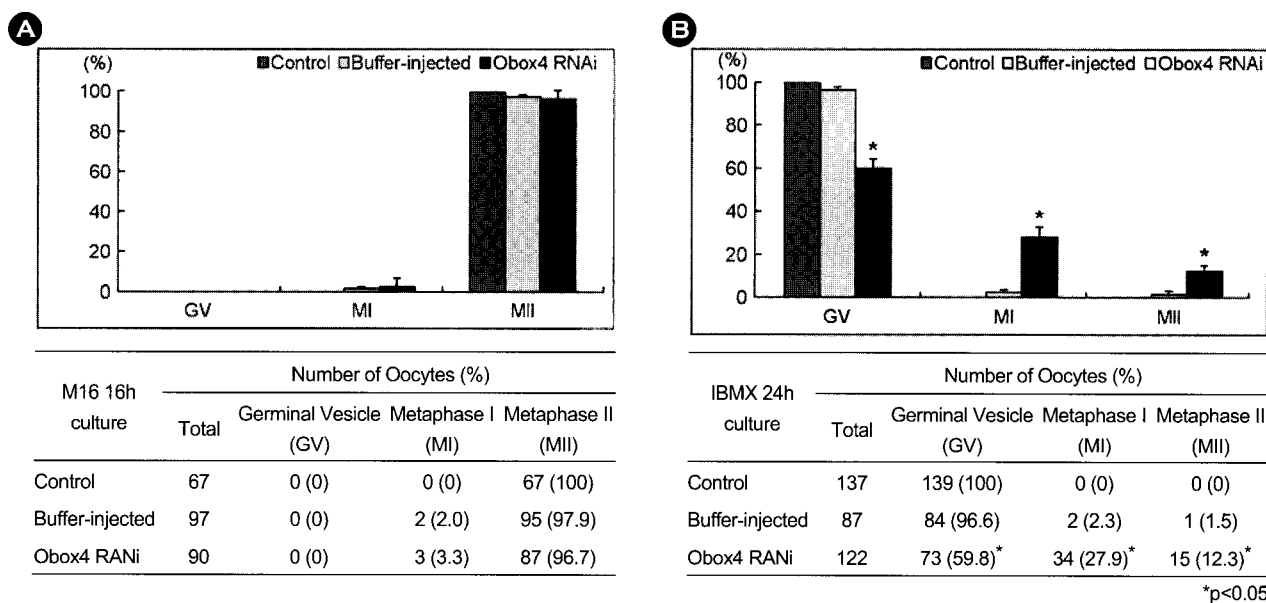


Figure 4. Maturation rates of the mouse oocytes after Obox4 RNAi followed by *in vitro* maturation. **A.** Cultured for 16 h in the plain M16 medium after Obox4 RNAi. **B.** Cultured for 24 h in M16 medium supplemented with 0.2 mM IBMX after Obox4 RNAi. Asterisks represent statistical significance at p<0.05.

숙을 (96.7%)은 차이가 없었다 (Figure 4A). 그러나, 0.2 mM의 IBMX가 첨가된 M16 배지에 24시간 동안 배양할 경우, 대조군과 비교군에서는 IBMX의 영향으로 난자 성숙이 일어나지 않았으나 Obox4 RNAi군에서는 IBMX가 존재함에도 불구하고 MI (27.9%), MII (12.3%)로의 난자 성숙이 관찰되었다 (Figure 4B).

Figure 5A는 *in vitro* 성숙을 통해 얻어진 난자를 orcein 염색하였을 때 일반적인 염색체 형태를 보여주고 있다. Obox4 RNAi군은 plain M16 배지에서

16시간 동안 배양하거나 0.2 mM의 IBMX가 첨가된 M16 배지에서 24시간 동안 배양한 후 얻어진 난자들이다 (Figure 5B, 5C). Obox4 RNAi 후 16시간 동안 M16 배지에서 배양한 후 극체가 방출된 MII 난자에서는 약간의 염색체 응축현상이 관찰되었다 (Figure 5B). 응축된 염색체가 방출된 극체에만 존재하는 경우와 (Figure 5Ba), 세포질과 극체에 각각 존재하는 경우 (Figure 5Bb), 또는 일반적인 정상 MII 난자의 염색체의 형태를 보이는 경우도 있었다 (Figure 5Bc). 0.2 mM의 IBMX가 첨가된 M16

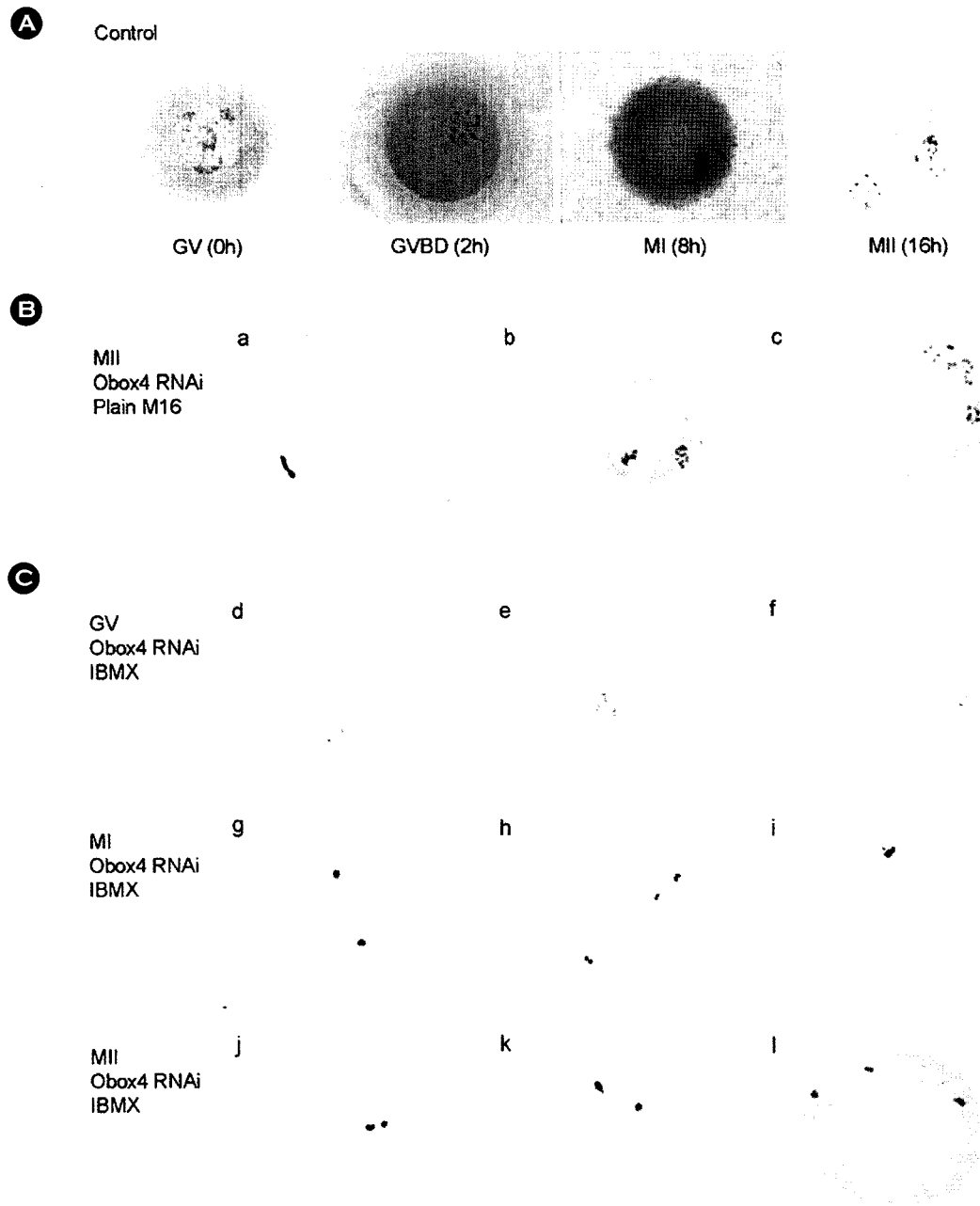


Figure 5. Chromosomal configuration by orcein staining after Obox4 RNAi with 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dsRNA followed by *in vitro* maturation. **A.** Control oocytes showing typical chromosomal configuration during *in vitro* maturation. **B.** MII oocytes cultured in plain M16 medium for 16 h after Obox4 RNAi. **C.** Oocytes cultured in M16 medium supplemented with 0.2 mM IBMX for 24 h after Obox4 RNAi. (d)-(f), GV; (g)-(i), MI; (j)-(l), MII.

배지에 24시간 동안 배양한 Obox4 RNAi군에서는 전체적으로 M16 배지에서 16시간 동안 배양한 난자에서 보다 더 강한 염색체 응축현상을 확인할 수 있었다 (Figure 5Cd-l). 현미경 하에서 인과 핵막

의 존재를 확인한 GV 난자에서도 일반적인 GV 난자의 염색체와 비교하여 응축현상이 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 5Cd-f). 성숙된 MI, MII 난자에서는 거의 모든 염색체가 한 개 또는 몇 개의

점의 형태로 완벽하게 응축된 염색체로 존재하는 것을 확인하였다. MII 난자에서는 응축된 염색체가 세포질에만 존재하는 난자도 관찰되었다 (Figure 5Cj).

고 찰

발달 단계별 난소에서 Obox6을 제외한 Obox family의 mRNA는 생쥐 난소의 발달 단계 중 2주령의 난소에서 가장 높게 발현하였으며, Obox family가 활발하게 기능을 수행할 것으로 생각되는 2주령의 난소에서 Obox4의 발현 또한 확인할 수 있었다. 정소에서 특이적으로 발현한다고 알려져 있는 Obox4의 난소에서의 발현은 매우 흥미로운 결과였다. Obox family의 mRNA가 높게 발현하는 2주령의 난소는 많은 난포가 자라나는 시기로서 Obox family가 난포 성숙에 관여하고 있음을 생각할 수 있다. 또한, Obox family의 mRNA는 난자 성숙과정 동안 발현 양에 차이를 보였다. 본 연구로 Obox family가 난포생성뿐만 아니라 난자 성숙에도 관여하고 있을 것이라 생각하였으며, Obox family 중 Obox4에 초점을 맞추어 실험을 수행하게 되었다. Obox4의 기능을 알고자 시행한 RNAi 기술은 dsRNA를 이용하여 특정 유전자만을 억제하는 방법이다. 이와 같은 기술은 난자 성숙 동안에 유전자의 기능을 알기 위한 매우 적합한 기술이다.¹² 2006년 Obox6 mutant mouse에서 Obox6 유전자의 발현이 억제되면서 초기 배아 발생 단계에서 Obox-1, 2, 3, 5 유전자의 발현이 증가했다고 보고된 바 있다.⁶ 다시 말해, Obox6의 사라진 기능을 보충하기 위해 다른 유전자들의 기능이 증가한 것이다.⁶ 그러나, 본 연구에서는 Obox4가 knock-down 되었음에도, 난자 성숙 단계에서 대조군과 Obox4 RNAi군에서 Obox3, 5의 발현 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 Obox4가 다른 Obox family들과의 관계에서 단독 기능을 할 가능성과, 난자 성숙단계에서와 초기 배아 발생단계에서의 Obox family들의 상관관계에 차이가 있을 것이라 생각한다. Obox4 RNAi 실험

결과에서는, Obox4와 IBMX의 연관성을 생각할 수 있었다. 16시간 동안 M16배지에서 배양하였을 때의 Obox4 RNAi군의 난자 성숙률은 대조군, 비교군과 비교했을 때 차이를 보이지 않았다. 그러나 매우 흥미롭게도, 난자 성숙 억제를 위한 0.2 mM의 IBMX가 첨가된 M16 배지에서의 GV 상태의 대조군과 비교군과 비교하여 Obox4 RNAi군에서는 MI, MII 시기로의 난자 성숙을 확인할 수 있었다. 정상적인 난자 성숙은 PED (phosphodiesterases) 억제제와 cAMP 등에 의해 억제된다.¹⁵ IBMX는 PDE 억제제이며 PDE 구성요소는 오직 cAMP를 억제하는 메커니즘에 관련되어 있다.¹⁶ cAMP는 포유동물에서 난자의 감수분열 재개를 조절하는 중심적인 역할을 한다.¹⁷ 다시 말해, 난자에서 높은 농도의 cAMP는 감수분열을 정지하는 환경을 조성하며, cAMP의 감소는 난자의 감수분열을 촉진하는 환경을 조성하게 되는 것이다.¹⁵ 실험에 사용된 0.2 mM의 IBMX가 첨가된 M16 배지에는 난자 성숙을 억제하기 위한 충분한 cAMP가 존재하게 된다. 높은 cAMP가 존재함에도 불구하고 Obox4 RNAi군에서의 난자 성숙은, Obox4가 cAMP dependent한 유전자일 가능성을 보여준다. 난자 성숙률을 확인한 후 orcein 염색법을 통해 염색체들을 확인할 결과, 성숙된 난자들에서는 하나 이상의 응축된 염색체를 확인할 수 있었다. 더욱이 MII 난자에서는 세포질과 극체로 분리되어지지 못하고 응축되어 한쪽에만 존재하는 염색체를 확인할 수 있었다. 염색체 분리에 관여하는 대표적 인자로는 cohesion complex 등이 있으며, metaphase 동안 염색 분체가 정상적인 방추사에 결합될 때까지 분체가 나뉘지 않도록 하는 인자이다.^{18,19} 이 상태가 유지되기 위해서는 Separase의 활성이 억제되어야 한다. Metaphase에서 anaphase로 진행되면서 Separase의 활성이 시작되게 되며, cohesion complex의 절단이 유도되어 염색체가 분리되어지게 된다.^{18,19} 본 연구에서 Obox4 RNAi 후 응축되어진 염색체들에서 Obox4와 cohesin complex와 관련성을 생각해 볼 수 있었으며 추후 실험이 진행되어야 할 것이다.

본 연구에서, 7주령에서의 난소와 정소의 Obox4의 발현을 살펴보면 정소에서 더 높게 발현하는 것을 확인할 수 있고, 앞서 Obox family에 대하여 보고된 논문에서 7주령 난소와 정소에서 30 cycle을 기준으로 발현 양상을 본 것을 감안하면,⁴ 지금까지 Obox4의 발현이 정소 특이적이라고 한 이유를 설명할 수 있을 것이다.

Obox family는 homeo domain을 포함하고 있다.⁴ Homeo domain은 여러 전사인자의 특징이다. 생식세포에서의 전사인자는 난소의 형성과 난포 발생, 난자 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁴ Homeo domain을 포함하며 난자 성숙과 난포 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 newborn ovary homeobox gene (Nobox; current nomenclature: OG2 homeobox 또는 Og2x)과 같이 Obox family 또한 난자 성숙과 난포 발생에 중요한 역할을 하고 있을 것이라 생각되어진다.²⁰

본 연구결과, Obox4의 난자에서의 기능적 연구는 최초로 보고되는 것이며, 매우 흥미로운 결과를 보여주고 있다. Obox4의 하위 유전자를 알기 위한 DNA chip 실험과, RNAi를 통한 knock-down이 아닌 과발현 방법 및 단백질 단계에서의 실험 등이 추후 진행된다면, 본 연구에서 보고한 결과에 따른 예측과 함께 좀더 확실한 Obox4의 기능을 알 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Yoon SJ, Chung HM, Cha KY, Kim NH, Lee KA. Identification of differential gene expression in germinal vesicle vs. metaphase II mouse oocytes by using annealing control primers. *Fertil Steril* 2005; 83: 1293-6.
2. Barnes FL, Sirad MA. Oocyte maturation. *Semin Reprod Med* 2000; 18: 123-31.
3. Siard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1241-54.
4. Rajkovic A, Yan C, Yan W, Klysik M, Matzuk MM. Obox, a family of homeobox genes preferentially expressed in germ cells. *Genomics* 2002; 79: 711-7.
5. Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Bio Endocrinol* 2006; 4: 19.
6. Cheng WC, Li H, Yeh TJ, Li H. Mice lacking the obox6 homeobox gene undergo normal early embryonic development and are fertile. *Dev Dyn* 2007; 236: 2636-42.
7. Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 1999; 15: 358-63.
8. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200.
9. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.
10. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-6.
11. Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genetics Dev* 2002; 12: 225-32.
12. Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Bio* 2000; 2: 70-5.
13. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNA in mouse oocytes by RNA interference. *Dev* 2002; 127: 4147-56.
14. Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 2000; 5: 107-14.
15. Richard FJ, Tsafiriri A, Conti M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod* 2001; 65: 1444-51.
16. Mongillo M, Zaccolo M. A complex phosphodiesterase system controls β -adrenoreceptor signaling in cardiomyocytes. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 510-11.
17. Chen J, Hudson E, Chi MM, Chang AS, Moley KH, Hardie DG, et al. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. *Dev Biol* 2006; 291: 227-38.
18. Jones S, Sgouros J. The cohesion complex: sequence homologies, interaction networks and shared motifs. *Genome Biol* 2001; 2: 0009.1-0009.12.
19. Michaelis C, Ciosk R, Kim N. Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids.

Cell 1997; 91: 35-45.

20. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM.

NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. Science 2004; 30: 1157-9.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 정소에서만 발현한다고 알려져 있는 Obox4에 대한 난소 및 난자에서의 동정과 난자 성숙에 미치는 영향을 알아보고자 수행하였다.

연구방법: RT-PCR을 이용하여 발달 단계별 난소와 정소, 난자에서의 Obox4의 mRNA 발현을 확인하였다. 난자 성숙 동안에 Obox4의 기능을 알아보기 위해 GV 난자의 세포질에 Obox4의 dsRNA를 미세 주입하는 RNAi 방법을 사용하였다. Obox4 dsRNA를 미세주입한 후, M16 배지에서 16시간 동안 배양하거나, IBMX가 첨가된 M16 배지에서 24시간 동안 배양하면서 난자 성숙을 및 spindle, 염색체의 배치와 형상의 변화를 관찰하였다. Obox4 RNAi 후 여러 유전자들의 발현 양의 변화를 RT-PCR을 이용하여 확인하였다.

결과: Obox4의 mRNA는 난소에서 다른 Obox family들과 비교하여 낮게 발현함을 관찰하였다. Obox4 RNAi를 위해 합성된 dsRNA가 Obox4의 발현만을 특정적으로 감소시켰다. Obox4 RNAi 후에 M16 배지에서 16시간 배양한 군에서의 난자 성숙률은 대조군의 난자 성숙률과 별다른 차이를 보이지 않았다. 흥미롭게도, IBMX가 첨가된 M16 배지에서 24시간 동안 배양한 군에서는 대조군의 난자들이 GV 상태에 정지되어 있는데 반해, Obox4 RNAi군에서는 IBMX에 존재함에도 불구하고, MI과 MII로의 난자 성숙이 진행되었다. 또한 Obox4 RNAi 난자의 spindle 구조는 완전히 사라지고 매우 응축되어 있는 염색체를 확인하였다.

결론: 본 연구에서는, 생쥐의 난소 및 난자에서 Obox4의 발현을 처음으로 밝혔으며, 난자 성숙 동안에 Obox4가 염색체 분리 및 spindle 형성에 관여되어 있는 유전자임을 확인하였다. 또한, cAMP에 의해 조절되는 GV-arrest mechanism에 Obox4가 매우 밀접하게 연관되어 있을 것임을 알게 되었다.

중심단어: ACP-PCR, Obox 유전자, 생쥐, 난자성숙, RNA 간섭