랫드 난소에서 난포 발달에 따른 DNA 결합 단백질 억제인자 (Inhibitor of DNA Binding Protein) Id1과 Id2 mRNA 발현

황성수[1,*], 김평희[1], 고응규[1], 양병철[1], 성환후[1], 민관식[2], 윤종택[3]
[1]농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과, [2]한경대학교 생물환경·정보통신전문대학원, [3]한경대학교 동물자원과학과

Inhibitor of DNA Binding Protein (Id)1 and Id2 mRNA Expression on Folliculogenesis in Rat Ovary

Seongsoo Hwang[1,*], Pyunghee Lee[1], Yeoung-Gyu Ko[1], Byoung-Chul Yang[1], Hwan-Hoo Seong[1], Kwan-Sik Min[2] and Jong-Taek Yoon[3]

[1]National Institute of Animal Science, RDA, Suwon, Gyeonggi-do 441-706, Korea
[2]Graduate School of Bio-& Information Technology, Hankyong University, Anseong, Gyeonggi-do 456-749, Korea
[3]Dept. of Animal Life & Resources, Hankyong University, Anseong, Gyeonggi-do 456-749, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to analyze the expression pattern of inhibitor of DNA binding proteins (Id)1 and Id2 mRNA on folliculogenesis in rat ovary. The ovaries were obtained from 27 days old Sprague-Dawley rat, fixed, dehydrated, and paraffin embedded. For *in situ* hybridization, anti-sense and sense Id1 and Id2 cRNA probes were prepared and applied to the ovarian section. The ovarian sections were coated with NTB-2 emulsion. After that, the slides were developed and counterstained with hematoxylin and eosin staining. In oocytes, the hybridizational signals of Id1 mRNA were strong in primordial and primary follicles, however, there were no signals in that of atretic or preovulatory follicles. The Id2 mRNA signals were also strong in the oocytes of primordial, primary and secondary follicles. Interestingly, the Id2 mRNA was expressed specifically granulosa cells, but nor in oocyte or theca cells in dominant and preovulatory follicles. Based on these results, Id1 and Id2 mRNA was expressed specifically at follicle stages and follicular tissue and might be closely related with follicle development.

(Key words : inhibitor of DNA binding protein (Id)1 and Id2, ovary, folliculogenesis, rat, *in situ* hybridization)

서 론

각 생리주기 동안에 난포세포는 증식(proliferation), 분화(differentiation) 및 퇴행(atresia: apoptotic cell death)의 주기를 거치게 된다. 포유동물에서 난소 내 난포 발달은 태아 발생, 성성숙 및 성숙 개체 동안에 형태적 또는 기능적으로 극적인 변화를 겪게 되는데, 이러한 난소 내 조직들의 메커니즘을 이해하는 것은 자축의 번식 분야 연구에서 매우 중요하다고 할 수 있다(Hourvitz 등, 2002; Matsui 등, 2004).

체외 또는 체내 수정란(Lee 등, 2007; Son 등, 2008), 복제란(Hwang 등, 2006; Im 등, 2006) 및 형질전환수정란(Park 등, 2006; Yang 등, 2008) 생산 등 첨단생명공학 연구에 있어서 양질의 난자 공급이 매우 중요하다고 할 수 있다. 이를 위해서는 난포의 발달과 관련된 유전자 발현 억제 또는 활성화 등의 현상 변화에 대한 이해가 필수적이다. 최근 분자생물학의 발달로 인하여 난포의 발달과 관련된 유전자들이 특정 시기에 증가 또는 감소하는 조절기전이나 관련 유전자들의 발굴에 대한 연구가 꾸준히 진행되어오고 있지만(McGee and Hsueh, 2000; Fortune, 2003; Shimasaki 등, 2004), 여전히 많은 부분에서 충분히 이해되지 못하고 있다고 할 수 있다.

DNA 결합 단백질 억제인자(Inhibitor of DNA binding proteins)로 알려진 Id 유전자는 목표 유전자의 프로모터 내에서 E-box DNA 염기서열에 결합하는 것을 억제하는 염기성 helix-loop-helix(HLH)와 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Massari와 Murre, 2000; Norton, 2000; Howe 등, 2001). 또한, 세포 증식, 종양 및 혈관 형성 등과도 밀접한 연관이 있다고 밝혀지고 있다(Benezra 등, 2001; Lasorella 등, 2001). 한편, 최근에는 닭에서 과립막세포의 분화에도 Id 유전자가 역할을 한다고 보고되었다(Johnson 등, 2008). 하지만 아직까지 포유동물의 난소에서 난포 발달과 관련하여 Id 유전자들의 발현이나 역할과 관련하여 발표된 논문은 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 랫드 난소 내에서 난포의 발달 단계

* Correspondence : E-mail : hwangss@rda.go.kr

및 난포세포에 따른 Id1 및 Id2 mRNA의 발현 양상에 대하여 살펴보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 파라핀 블록 제작

생후 27일된 암컷 랫드(Sprague-Dawley rat)를 CO_2 가스를 이용하여 희생시킨 후 난소를 적출하였다. 적출된 난소는 10% formalin(Neutral buffered, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 고정 후, 세척, 탈수 및 파라핀 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록으로 제작하였다. 하나의 파라핀 블록에는 최소 3개 이상의 각기 다른 개체의 난소를 함께 공시하였다.

2. Plasmid 제작과 Riboprobes 합성

In situ hybridization을 실시하기 위한 탐침자(probe)는 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 제작하였다. 랫드 난소에서 total RNA를 추출한 다음 cDNA를 합성하였다. 각 유전자를 위한 primer는 #51~#70과 #471~#490(Id1; 440 bp, NM_012797)(Springhorn 등, 1994); #51~#70 and #414~#433(Id2; 383 bp, NM_013060)(Matsumura 등, 2002) 영역을 선택하였다. 모든 PCR 생산물은 pGEM-T Easy Vector(Promega Corp. Madison, WI, USA)를 이용하여 클로닝(cloning)하였다.

3. *In Situ* Hybridization

조직 내 mRNA의 발현을 확인하기 위한 접합보인법(*in situ* hybridization)은 Matsui 등(2004)의 방법에 준하여 실시하였다. 6 μm 두께의 파라핀 조직 절편은 xylene에 5분씩 3회 처리하여 탈파라핀을 실시하였고, 수분 재흡수를 위하여 100% 에탄올에 5분간 2회, 95% 에탄올에 5분간 1회, 70% 에탄올에 5분간 1회 및 50% 에탄올에 5분간 1회 처리하였다. 0.1 % diethyl ester pyrocarbonic acid(DEPC) 처리된 증류수로 세정 후, proteinase K(10 μg/ml) 처리를 하였다. Anti-sense와 sense cRNA 탐침자는 Sp6 or T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription을 실시하여 제작하였다. Hybridization은 ^{35}S 처리된 RNA 탐침자(1×10^7 cpm/ml)가 함유된 용액에 50%(v/v) deionized formamide, 0.3 M NaCl, 10 mM Tris(pH 8.2), 1 mM EDTA, 0.05% yeast tRNA, 10 mM dithiothreitol, 1×Denhardt's solution 및 10% dextran sulfate 등을 첨가하여 제작하였다. Hybridization 용액(75 μl/slide)을 각 조직에 도포한 후 커버 슬라이드를 덮고 liquid DPX로 밀봉하였다. 조직은 18시간 동안 60℃로 조정된 습윤 배양기에서 반응을 유도하였다. Hybridization 처리가 끝난 조직은 세정 후 ribonuclease A로 37℃에서 30분간 처리한 다음, 탈염 과정(2×SSC, 1×SSC 및 0.5×SSC, 각 5분씩)을 실시하였다. 50% 에탄올 1회, 70% 에탄올 1회, 95% 에탄올 2회 및 100% 에탄올 3회씩(각 5분) 단계적 탈수를 실시하였다. 탈수가 끝난 슬라이드를 1시간 동안 건조시킨 다음 Hyperfilm-β max(Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA)에 3일 동안 노출시켰다.

4. Autoradiography

자가방사기록법(autoradiograph)은 난소 조직을 탈지방(defatting), 탈수 및 NTB-2 감광유제(emulsion; Kodak Co., Rochester, NY, USA)에 침지를 실시한 후 4℃에서 3주 동안 노출을 시켜 실시하였다. 노출이 끝난 슬라이드는 현상액(Kodak D19)과 고정액에 침지시킨 후 45분 동안 증류수로 세정한 다음 hematoxylin과 eosin(H&E) 염색을 실시하였다.

5. 난포의 발달 단계별 분류

처리가 끝난 조직은 광학현미경 하에서 분석하였다. 모든 실험은 최소 3회 이상 반복적으로 실시하였다. 난포의 발달 단계에 따른 분류는 난자 또는 난자와 한 층의 편평한 과립막세포로 구성된 원시 난포(primordial follicle), 난자와 한 층의 구형 과립막세포로 둘러싸인 제1차 난포(primary follicle), 난포강(antrum)이 형성되기 전 여러 층의 과립막세포로 둘러싸인 제2차 난포(secondary follicle), 난포강이 형성된 우성 난포(dominant follicle), 우성 난포로 발달하지 못하고 사멸되는 퇴행 난포(atretic follicle) 및 배란 전 난포(preovulatory follicle)로 구분하였다(황 등, 2007). 슬라이드는 두 명의 연구자가 각각 발현 부위와 감도를 분석한 다음 그 결과를 서로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 랫드에서 난포의 발달 과정에서 Id1과 Id2 mRNA의 발현 양상에 대하여 살펴보고자 실시하였다. 난자에서의 Id1과 Id2 유전자의 발현 양상은 비슷한 결과를 나타냈으나, 과립막세포에서의 두 유전자의 발현은 약간 다르게 나타나는 것을 확인하였다.

DNA 결합 단백질 억제인자(Inhibitor of DNA binding proteins)로 알려진 Id 유전자는 조류의 과립막세포 분화에도 중요한 역할을 한다고 보고하였으며(Johnson 등, 2008), 포유동물에서는 각종 세포의 증식과 분화, 혈관 형성, 암 발생 및 자가세포사멸(apoptosis) 등과 밀접한 연관이 있다고 보고하였다(Norton 등, 2000; Benezra 등, 2001; Yokota, 2001; Yang 등, 2008). 이렇듯 Id 유전자는 다양한 기능이 있는 것으로 보고되고 있으나, 아직까지 포유류의 번식 관련 기관이나 생식세포 등에서의 연구는 많이 부족한 것이 사실이다.

27일령 랫드 난소에서 Id1과 Id2 mRNA 발현 양상은 Fig. 1과 같다. Fig. 1A와 1B는 H&E 염색을 실시한 전체 난소의 모

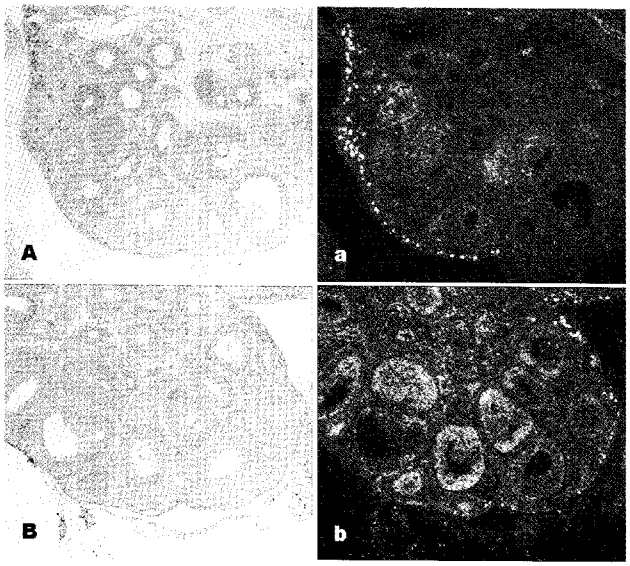

Fig. 1. The hybridization signals of Id1 and Id2 mRNA in whole ovaries from 27 days old rat. A & B: H&E stain (bright field), a & b: Autoradiography (dark field).

습이다. Anti-sense cRNA 탐침자(probe)에 의한 자가방사기록법 결과에서 Id1 mRNA의 경우 Fig. 1a에서 보는 것과 같이, 원시난포 또는 제1차 난포와 같은 미성숙 난포에서 상대적으로 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, Id2의 경우는 Id1과는 약간 다른 발현 양상을 보였다(Fig. 1b). 미성숙 난포에서는 Id1의 발현 양상과 비슷한 경향을 나타내었으나, 성숙한 난포들의 난포세포에서도 부분적으로 mRNA가 발현함을 확인할 수 있었다.

각 난포발단단계에 따른 Id proteins 유전자들의 발현 양상을 살펴본 결과는 Fig. 2(Id1) 및 Fig. 3(Id2)과 같다. Id1 유전자는 원시 난포(↑)와 제1차 난포(△)의 난자에서 강하게 발현하는 것을 확인하였으나(Fig 2A, a), 퇴행난포(*, Fig. 2B, b) 또는 배란 전 난포(Fig 2C, c)에서는 난자, 과립막세포 및 협막세포 모두에서 거의 발현하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Id2 유전자는 원시 난포(↑)와 제1차 난포(△)의 난자뿐만 아니라 제2차 난포의 난자(†)에서도 발현하는 것을 확인하였다(Fig 3A, a). 하지만 성숙 난포에서는 다소 다른 발현 양상을 나타내었다. 즉, 우성난포나 배란 전 난포의 난자에서는 Id2 유전자가 발현하지 않고 과립막세포에서만 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다. 특히 과립막세포의 주변에 있는 협막세포(theca cell)에서도 전혀 발현하지 않았다(Fig 3B, b). 하지만 퇴행난포에서는 주변의 기질들과 비슷한 강도로 발현하는 것으로 보아 발현이 아주 약하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3C, c).

난포는 난자, 난구세포, 과립막세포 및 협막세포 등으로 구성되어 있으며, 이들 난포세포들은 특정 시기에 특정 유전자

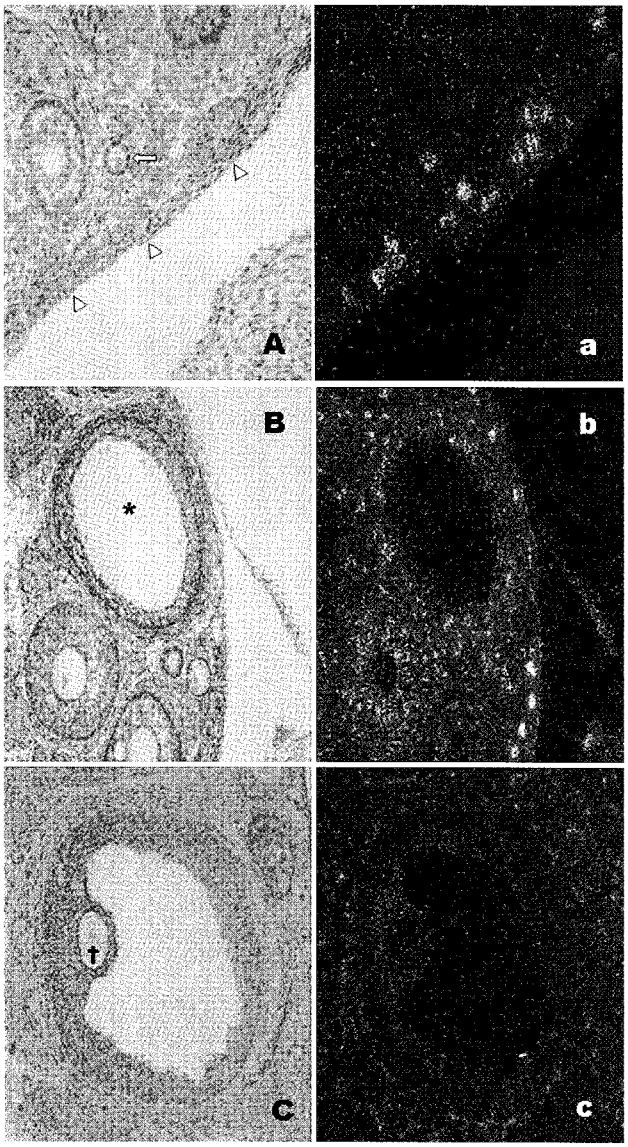

Fig. 2. The hybridization signals of Id1 and Id2 mRNA in whole ovaries from 27 days old rat. A~C: H&E stain (bright field), a~c: Autoradiography (dark field). Primordial follicle (arrow head), primary follicle (arrow), atretic follicle (asterisk), oocyte (cross).

들의 발현에 의해 분화 및 증식이 조절되는 것으로 알려져 있다(Gougeon, 1996; Erickson과 Shimasaki, 2000). Knight와 Glister(2006)은 난포 발달 관련 총설에서 난자에서 growth/differentiation factor(GDF)-9과 bone morphogenetic protein(BMP)-6 및 -15 등이 발현하여 과립막세포를 활성화 시키면, 다시 과립막세포가 activin, inhibin 및 BMP-2, -5, -6를 분비하여 협막세포를 활성화 시킨다고 보고하였다. 또한, FSH와 LH 등의 호르몬에 의해 이들 난포세포들이 여러 성장 호르몬이나 기타 유전자들을 분비하여 난포 발달이 이루어진다고 하였다. 하지

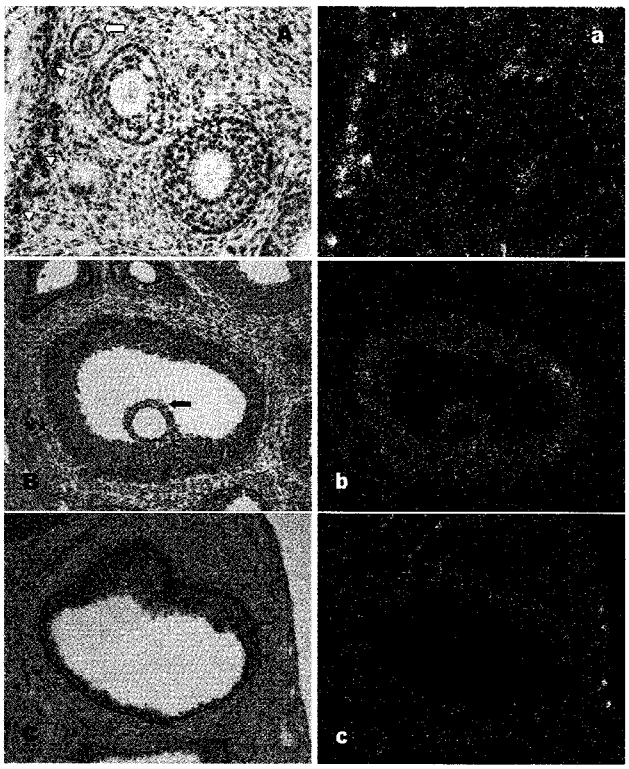

Fig. 3. The hybridization signals of Id1 and Id2 mRNA in whole ovaries from 27 days old rat. A~C: H&E stain (bright field), a~c: Autoradiography (dark field). Primordial follicle (white arrow head), primary follicle (white arrow), granulosa cells (asterisk), theca cells (double asterisks), cumulus cells (black arrow) in preovulatory follicle.

만 아직 난소 내 난포에서 이들 Id 유전자들의 발현에 대하여는 보고된 바가 거의 없다고 해도 과언이 아니다.

일반적으로 Id 유전자들은 염기성-helix-loop-helix(bHLH) 전사요소 및 세포 분화 억제 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있으나, 세포 증식을 촉진시키는 작용을 한다고 보고되고 있다(Miyazono와 Miyazawa, 2002). 한 가지 흥미로운 점은 이들 Id 유전자들의 발현이 BMP 유전자들에 의해 유도된다는 것이다(Hollnagel 등, 1999; Nakashima 등, 2001). 따라서 향후 이들 유전자들의 상호 연관성에 대하여 조사하는 것이 난포의 발달 과정에서 난포세포들의 역할을 이해하는데 중요하리라 사료된다.

본 연구 결과에서 살펴본 바와 같이, Id1과 Id2 유전자는 Id3 유전자(황 등, 2007)와 발현 양상은 다소 차이가 나지만, 난포 세포의 발달 및 퇴행, 즉, 증식, 분화 및 사멸에 모두 관여하고 있다는 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있겠다.

이상의 결과를 종합하여 보면, Id1과 Id2 mRNA는 랫드 난소에서 난포의 발달 단계에 따라 조직특이적 발현 양상을 보여 난포의 발달과 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다.

결 론

본 연구는 랫드 난소에서 난포의 발달에 따른 난포세포 내 Id1과 Id2 mRNA의 발현 양상을 살펴보고자 실시하였다. 생후 27일 된 랫드(SD rat)로부터 난소를 회수하여 고정, 탈수 및 파라핀 포매를 실시하였다. *In situ* hybridization 실험을 위하여 anti-sense와 sense Id1과 Id2 cRNA 탐침자(probe)를 제작한 다음 난소 절편에 반응시켰다. 반응이 끝난 난소 절편은 NTB-2 유광제에 노출시킨 후 현상액에 반응시켰다. 모든 처리가 끝난 슬라이드는 hematoxylin and eosin 염색을 실시한 다음 현미경하에서 hybridization 감도를 평가하였다. Id1 mRNA의 경우, 원시 난포와 제1차 난포의 난자에서 강하게 발현하는 것을 확인하였으나, 퇴행 난포 또는 배란 전 난포에서는 거의 발현하지 않았다. Id2의 경우는 원시 난포와 제1차 난포의 난자뿐만 아니라 제2차 난포의 난자에서도 발현하는 것을 확인하였다. 하지만 우성난포나 배란 전 난포의 난자에서는 발현하지 않고 과립막세포에서만 특이적으로 발현하였다. 특히 과립막세포의 주변에 있는 협막세포(theca cell)에서도 전혀 발현하지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 보면, Id1과 Id2 mRNA는 난포의 발단 단계 또는 난포세포에 따라 특이적으로 발현하는 것으로 보아 난포의 발달과 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

Benezra R, Rafii S and Lyden D. 2001. The Id proteins and angiogenesis. Oncogene 20:8334-41.

Erickson GF and Shimasaki S. 2000. The role of the oocyte in folliculogenesis. Trends Endocrinol. Metab. 11:193-198.

Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim. Reprod. Sci. 78:135-163.

Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr. Rev. 17: 121-155.

Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Rüther U and Nordheim A. 1999. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. J. Biol. Chem. 274:19838-19845.

Hourvitz A, Kuwahara A, Hennebold JD, Tavares AB, Negishi H, Lee TH, Erickson GF and Adashi EY. 2002. The regulated expression of the pregnancy-associated plasma protein-A in the rodent ovary: a proposed role in the development of dominant follicles and of corpora lutea. Endocrinology 143:1833-1844.

Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG and Edwards BK. 2001. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. J. Natl. Cancer Inst. 93: 824-842.

Hwang SS, Choi EJ, You SK, Choi YJ, Min KS and Yoon JT. 2006. Development of bovine nuclear transfer embryos using life-span extended donor cells transfected with foreign gene. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19:1574-1579.

Im GS, Seo JS, Hwang IS, Kim DH, Kim SW, Yang BC, Yang BS, Lai L and Prather RS. 2006. Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. Mol. Reprod. Dev. 73:1094-1101.

Johnson AL, Haugen MJ and Woods DC. 2008. Role for inhibitor of differentiation/deoxyribonucleic acid-binding (Id) proteins in granulosa cell differentiation. Endocrinology 149: 3187-3195.

Knight PG and Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction 132: 191-206.

Lasorella A, Uo T and Iavarone A. 2001. Id proteins at the cross-road of development and cancer. Oncogene 20:8326-8333.

Lee HJ, Hwang SS and Yoon JT. 2007. Effects of bovine somatotropin (bST) administration combined with controlled internal drug release (CIDR) on embryo quality and pregnancy of Hanwoo (Korean native beef cattle) during commercial embryo transfer program. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20:194-199.

Massari ME and Murre C. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. Mol. Cell Biol. 20:429-440.

Matsui M, Sonntag B, Hwang SS, Byerly T, Hourvitz A, Adashi EY, Shimasaki S and Erickson GF. 2004. Pregnancy-associated plasma protein-a production in rat granulosa cells: stimulation by follicle-stimulating hormone and inhibition by the oocyte-derived bone morphogenetic protein-15. Endocrinology 145:3686-3695.

Matsumura ME, Lobe DR and McNamara CA. 2002. Contribution of the helix-loop-helix factor Id2 to regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. J. Biol. Chem. 277: 7293-7297.

McGee EA and Hsueh AJ. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr. Rev. 21(2):200-14.

Miyazono K and Miyazawa K. 2002. Id: A Target of BMP Signaling. Sci. STKE. 151. pe40.

Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R and Taga T. 2001. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:5868-5873.

Norton JD. 2000. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. J. Cell Sci. 113:3897-3905.

Park JK, Lee YK, Lee PY, Chung HJ, Kim SW, Lee HG, Seo MK, Han JH, Park CG, Kim HT, Kim YK, Min KS, Kim JH, Lee HT and Chang WK. 2006. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. J. Biotech. 122:362-371.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F and Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. Endocr. Rev. 25:72-101.

Son DS, Choe CY, Cho SR, Choi SH, Kim HJ, Lee JI and Kim IH. 2008. Timed artificial insemination or embryo transfer using CIDR, estradiol benzoate, and prostaglandin F_2 for the rebreeding of Korean native donor cettle. J. Emb. Trans. 23:81-86.

Springhorn JP, Singh K, Kelly RA and Smith TW. 1994. Posttranscriptional regulation of Id1 activity in cardiac muscle. Alternative splicing of novel Id1 transcript permits homodimerization. J. Biol. Chem. 269:5132-5136.

Yang BC, Im GS, Kim DH, Yang BS, Oh HJ, Park HS, Seong HH, Kim SW, Ka HH and Lee CK. 2008. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. Anim. Reprod. Sci. 103: 25-37.

Yang Y, Wang HC, Sun XH. 2008. Id1 induces apoptosis through inhibition of ROR gammat expression. BMC Immunol. 9: 20.

Yokota Y. 2001. Id and development. Oncogene. 20:8290-8298.

황성수, 고응규, 임현주, 성환후, 윤종택, 민관식. 2007. 랫드 난소에서 난포 발달에 따른 Id3 mRNA의 발현. 한국동물번식학회지 31:181-186.

(접수일: 2008. 9. 16 / 채택일: 2008. 9. 23)