

소 체세포 핵이식란의 화학적 처리에 의한 MPF 활성화 및 핵의 Remodeling 조절

최용락¹, 이유미¹, 김호정¹, 박주희¹, 권대진¹, 박춘근², 양부근³, 정희태^{1,*}

¹강원대학교 수의학부대학, ²강원대학교 동물생명공학과, ³강원대학교 동물자원학부

Control of MPF Activity and Nuclear Remodeling of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos by Chemical Treatments

Yong-Lak Choi¹, Yu-Mi Lee¹, Ho-Jeong Kim¹, Joo-Hee Park¹, Dae-Jin Kwon¹,
Choon-Keun Park², Boo-Keun Yang³ and Hee-Tae Cheong^{1,*}

¹School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Department of Animal Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³Division of Animal Resource Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

We attempted to control the maturation promoting factors (MPF) activity and nuclear remodeling of somatic cell nuclear transfer (NT) bovine embryos. Bovine ear skin fibroblasts were fused to enucleated oocytes treated with either 5 mM caffeine for 2.5 h or 0.5 mM vanadate for 0.5 h and activated. The nuclear remodeling type of the reconstituted embryos was evaluated 1.5 h after activation. MPF activity was assessed in enucleated and chemical treated oocytes before the injection of a donor cell. Effect of chemicals on the embryonic development was evaluated with parthenogenetic embryos. MPF activity increased significantly by caffeine treatment, but decreased by vanadate treatment ($p < 0.05$). Caffeine or vanadate had no deleterious effect on the parthenogenetic embryo development. In caffeine treated group, premature chromosome condensation (PCC) was occurred in 72.2% of NT embryos ($p < 0.05$). In contrast, vanadate induced the formation of a pronucleus-like structure (PN) in a high frequency (68.9%, $p < 0.05$) without PCC (NPCC). Blastocyst development of NT embryos increased by treating with caffeine (30.3%), whereas decreased by treating with vanadate (11.4%) compared to control (22.1%, $p < 0.05$). The results indicate that caffeine or vanadate can control of MPF activity and remodeling type of NT embryos, resulting in the increased or decreased *in vitro* development.

(Key words : somatic cell nuclear transfer, remodeling control, chemical treatment, MPF, bovine)

서 론

포유동물 핵이식란의 발육에 영향을 미치는 요인들은 핵이식 전 과정에 산재되어 있으나, 이식된 핵의 remodeling 형태가 핵이식란의 발육능에 영향을 미쳐 핵이식란의 초기화 이전에 중요한 인자로 작용하는 것으로 사료되고 있다(Collas와 Robl, 1991; Cheong 등, 1993). 많은 연구에도 불구하고 아직까지 이식된 핵의 remodeling과 난자의 초기화와의 상관관계가 명확히 규명되지 않고 있다.

수핵란 세포질에 이식된 세포의 핵은 세포와 수핵란 세포질의 세포주기에 따라 다양한 형태로 remodeling 된다. 공여 핵이 MPF(maturation promoting factor) 활성이 높은 수핵란 세포질에 노출되면, 이식된 핵은 핵막 붕괴(nuclear envelop break-

down; NEBD)를 거쳐 미성숙 염색체 응축(premature chromosome condensation; PCC)이 일어난다. 이와는 반대로 MPF 활성이 낮은 세포질에 노출된다면 NEBD와 PCC가 일어나지 않으며, 전핵과 같은 형태(pronucleus-like structures; PN)로 remodeling 된다(Collas와 Robl, 1991; Cheong 등, 1994). 이 두 경우로 생산된 복제란은 정상적인 난자와 같은 형태적 변화와 초기배 및 산자로까지 발달될 수 있다(Baguisi 등, 1999). 그러나 거의 모든 연구에서 수핵란의 MPF 활성을 낮추기 위한 방법으로 난자의 활성화를 유도(Campbell 등, 1996)하거나 성숙배양 후 장시간 배양하여 난자의 노화를 유도(Tani 등, 2001)하는 방법을 사용하여 수핵란의 상태에 따른 발육율을 검토하였기 때문에 핵의 remodeling 형태에 따른 핵의 초기화가 어떻게 일어나는지는 알 수 없다.

* 이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-311-F00018).

* Correspondence : E-mail : htcheong@kangwon.ac.kr

이식된 핵을 MPF가 높은 세포질에 노출시키는 것이 핵이 식란의 발육을 향상시키기 위한 핵의 초기화에 중요한 작용하는 것으로 알려져 있어(Wakayama 등, 2000; Tani 등, 2001), 체세포를 이용한 핵이식 연구에서 대부분 MPF 활성이 높은 제2감수분열중기(MII기) 난자를 수핵란 세포질로 이용하고 있다. 그러나 MII기 난자라 할지라도 실험 조건에 따라서 이식된 핵은 NEBD를 거치지 않고 전핵으로 발달될 수 있는 것으로 보고되었다(Cheong 등, 2002). 따라서 MPF 활성을 인위적으로 조절하게 되면 그에 따른 핵의 remodeling 형태를 조절할 수 있어 초기화 기전을 구명하는데 도움이 될 것으로 판단된다.

MPF는 cyclin B와 P34^{cdc2}라는 단백질 복합체로 알려져 있으며(Matsui와 Markert, 1971), MPF의 활성은 P34^{cdc2}의 tyrosine-15(Y15)와 threonine-14(T14) 부위의 인산화에 의해 조절된다(Norbury와 Nurse, 1992; Kikuchi 등, 2000). Cdc25는 T14와 Y15의 탈인산화를 촉진하여 MPF의 활성화를 촉진하고, Myt1/Wee1은 두 부위의 인산화를 촉진하여 MPF의 불활성화를 촉진한다. Caffeine은 Myt1/Wee1의 활성을 억제하여 MPF의 활성을 높게 유지시키고, vanadate는 cdc25의 활성을 억제하여 MPF의 활성을 낮게 유지시킨다.

본 연구는 수핵란 세포질에 이식된 소 체세포 핵의 remodeling 형태를 인위적으로 조절하는 방법을 검토하며, remodeling 형태에 따른 소 체세포 핵이식란의 발육능을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 체세포 분리 및 배양

한우 암소의 귀 피부 조직으로부터 체세포를 회수하여 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 µg/ml gentamicin이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)액 내에서 배양하여 4~6회 passage 후 동결 보존하였다가 핵이식에 사용하였다. 용해된 세포는 핵이식 전에 4-well dish에서 2~3일간 배양 후 0.5% FBS의 DMEM액으로 교체하여 3~5일간 추가로 배양하여 G0/G1기에 동조시켰다. 배양된 세포의 G0/G1기 동조 여부는 본 실험에서는 검토하지 않았으나, 별도의 실험에서 90% 이상의 세포가 G0/G1기에 동조되는 것으로 확인되었다(Choi 등, 2004).

2. 난포란의 채취 및 성숙 배양

도축장에서 도살된 암소의 난소를 회수하여 30~35°C의 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경 2~7 mm의 난포로부터 18 gauge 주사 바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실제 현미경하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별

하여 난자 성숙용 배양액으로 수회 세척 후 성숙 배양에 이용하였다. 난포란의 성숙 배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 IU/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/ml gentamicin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙 배양액을 50 µl의 소적으로 만들어 paraffin oil로 피복하고 성숙 배양 2~3시간 전에 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 평형시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 22시간 배양하였다.

3. 난자의 탈핵

체외에서 22시간 체외 성숙시킨 난포란을 1 ml의 TCM-199액과 1 ml hyaluronidase(300 IU/ml)가 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 3분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자를 핵이식에 이용하였다. 난구세포가 제거된 난자는 0.4 µg/ml demecolcine으로 40분간 처리하고, 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop으로 옮겨 15분간 정치시킨 후 chromosome mass의 돌출이 확인된 난자를 실험에 이용하였다(Yin 등, 2002).

모든 미세 조작은 실온에서 DIC 장치와 Narishige 미세 조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 5 µg/ml cytochalasin B가 함유된 HEPES-buffered TCM-199 + 3 mg/ml BSA액의 배양 소적(50 µl) 내에서 실시하였다. Demecolcine을 처리한 난자는 chromosome mass의 돌출을 확인하고, 돌출된 chromosome mass와 제 1극체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 이 방법으로 95% 이상의 탈핵율을 얻을 수 있었다(백 등, 2005).

4. 화학적 처리 및 핵이식

핵이식 전, 탈핵된 난자는 5 mM caffeine(Sigma)과 3 mg/ml BSA가 첨가된 TCM-199에 2.5시간 동안 배양하거나 0.5 mM sodium orthovanadate와 3 mg/ml BSA가 첨가된 TCM-199에 30분간 배양하여 MPF를 조절하였다. 화학적 처리 후 일부 난자는 MPF kinase assay에 공시하였다. 배양된 체세포는 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 1~3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양 접시의 저면에서 분리하였다. 분리된 체세포는 200 µg에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. 공여 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위란강 내로 주입하였다.

5. 전기 융합, 활성화 및 배양

제구축배는 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂ 및 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber (1 mm 폭)에서 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 BTX 200 세포

융합 장치(BTX, San Diego, CA USA)를 이용하여 30 μ sec 간 1회 통전하여 융합을 유도하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 1시간 배양 후에 세포의 융합 여부를 관찰하였다. 융합란 및 단위 발생의 활성화 처리는 난자를 10 μ M Ca^{2+} -ionophore(A23187; Sigma)를 첨가한 TCM-199에 5분 동안 처리한 후 2 mM 6-dimethylaminopurine(6-DMAP)에 4시간 동안 배양하여 유도하였다. 활성화처리 후 일부 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μ l drop으로 옮겨 5% CO_2 및 39 $^{\circ}C$ 의 조건하에서 48시간 배양하여 분할을 검사하였다. 분할된 핵이식란을 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 7일간 추가 배양하여 배반포 형성을 유도하였다.

6. 핵이식란의 Remodeling 형태의 검사

핵이식란의 PCC 여부 및 핵상을 검사하기 위하여 활성화 후 1.5시간에 whole-mount 표본을 제작하였다. 핵이식란을 vaseline과 paraffin 혼합물(9:1)로 사각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨놓고 cover glass로 가볍게 압착하였다. 그 후 ethanol과 acetic acid를 3:1로 혼합한 고정액으로 24~72시간 고정 후 aceto-orcein으로 5분간 염색하고 25% aceto-glycerol로 세척하여 위상차 현미경($\times 400$)으로 핵의 형태를 관찰하였다. 핵이식란의 핵의 형태에 따라 유사분열 중기염색체 또는 염색질괴를 형성하거나 핵막이 붕괴된 난자는 미성숙 염색체 응축(PCC)이 일어난 것으로 판단하였으며, 핵막이 붕괴되지 않은 채 전핵 형태를 유지한 난자는 염색체 응축이 일어나지 않은 난자(NPCC)로 판단하였다.

7. MPF Kinase Assay

MPF kinase assay는 Anas 등(2000)의 방법에 따라 MESACUP cdc2 kinase assay kit(MBL, Nagoya, Japan)으로 catalytic subunit인 cdc2 kinase의 활성을 측정하였다. 요약하면, MII기 난자를 활성화 전 후 및 caffeine과 vanadate 처리 전후에 각각 20 개씩 cdc2 kinase sample buffer(50 mM Tris HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.01% Brij 35, 1 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride, 0.05 mg/ml leupeptin, 50 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM β -glycerophosphate 및 1 mM Na-orthovanadate, MBL)에서 두 번 세척한 다음 5 μ l buffer의 microtube에 옮겨 -80 $^{\circ}C$ 에서 동결 저장하였다가 용해하여 측정하였다. 난자 추출액(5 μ l)은 25 mM Hepes buffer(MBL), 10 mM $MgCl_2$ (MBL), 0.1 mM ATP 및 10% biotinylated MV 펩티드(Ser-Lue-Tyr-Ser-Ser-Ser-Pro-Gly-Gly-Ala-Tyr-Cys; MBL)가 함유된 45 μ l kinase assay buffer와 혼합하여, 30 $^{\circ}C$ 에서 30분 동안 배양하였다. 인산화 반응은 200 μ l의 stop reagent(50 mM EDTA를 포함하는 PBS; MBL)로 정지시켜 13,000 \times g에서 15초 동안 원심분리하였다. Cdc2 kinase 활성은 ELISA법에 의해 측정하였는데, 각각 100 μ l의 반응액을 biotinylated MV peptide

의 인산화 형태를 인식하는 monoclonal antibody가 깔린 각각의 microwell로 옮겨 25 $^{\circ}C$ 에서 60분 동안 배양하여 PBS로 5번 세척하였다. 그 후 100 μ l의 horseradish peroxidase conjugated streptavidin solution을 각각 첨가하여 25 $^{\circ}C$ 에서 30분을 동안 배양한 후 세척하여 100 μ l의 POD substrate solution을 넣어 추가적으로 5분 동안 배양하였다. 최종적으로 100 μ l의 stop solution(20% H_3PO_4)을 각각의 well에 넣고, microplate를 이용하여 492 nm로 흡광도를 측정하였다.

8. 통계 분석

MPF 활성, 핵의 remodeling 형태 및 체외 발육율은 Duncan의 다중 검정을 통해 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 난자의 MPF 활성

탈핵 후 chemical 처리에 따른 MPF 수준은 무처리구인 대조구를 100으로 하였을 때 caffeine 처리구는 127.2, vanadate 처리구는 76.0으로 나타나, caffeine 처리에 의해 MPF 수준이 유의적($p < 0.05$)으로 증가되었으나, vanadate 처리에 의해서는 유의적으로 감소하였다(Fig. 1).

2. 화학적 처리가 배 발육에 미치는 영향

체의 성숙된 소 난자를 활성화 처리하여 7일 동안 배양하여 배의 발육에 미치는 caffeine 및 vanadate의 영향을 검토한 결과, 분할율 및 배반포 발육율은 caffeine이 각각 87.7 및 24.1%로 가장 높게 나타났으나, 대조구의 83.8% 및 21.6%, vanadate구의 83.5 및 20.3%와 유의적 차이는 없었다(Table 1).

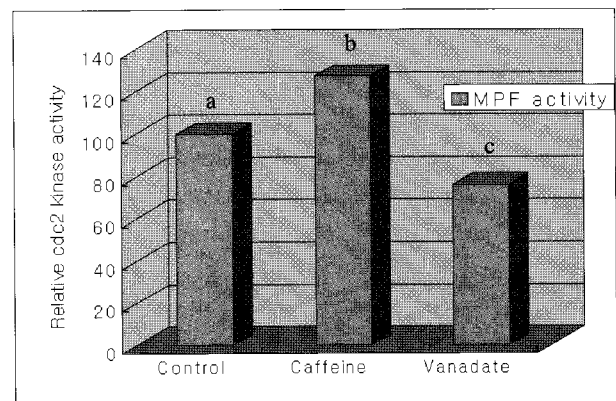


Fig. 1. The MPF activity of bovine oocytes following chemical treatment. The level of the activity in enucleated oocytes is defined as 100. Data are expressed as relative level of p34^{cdc2} activity in enucleated oocytes.

^{a-c} Differ significantly ($p < 0.05$).

3. 화학적 MPF 조절에 의한 핵이식란의 Remodeling 형태

핵이식란을 caffeine과 vanadate에 의한 화학적 MPF 활성 조절 후 이식된 핵의 remodeling 형태를 분석한 결과, 대조구에서 51.0%(50/98)가 PCC가 유기된 반면, caffeine 처리구에서는 72.2%(78/108)의 난자에서 PCC가 유기되어 유의적으로 ($p < 0.05$) 높게 나타났다(Table 2). 반면, vanadate 처리구에서는 PCC가 유기되지 않은 난자의 비율이 68.9%(62/90)로 대조구 및 caffeine 처리구에 비하여 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하였다. 한편, PCC가 일어난 난자의 경우 1개의 염색질괴 (1C)를 가진 난자의 비율은 대조구에서 37.8%(37/98), caffeine 처리구 56.5%(61/108) 및 vanadate 처리구 24.4%(22/90)로 유의적인 차이가 있었으나, PCC 유기 난자를 기준으로 할 경우 활성화에 따른 1C 구조를 가진 난자의 비율은 각 처리구 간 차이가 없었다.

4. Remodeling 조절에 따른 핵이식란의 발육

화학적 처리에 의한 remodeling 조절에 따른 핵이식란의 발육능을 검토한 결과, 분할율에는 차이가 없었으나, 상실배기 발육율은 caffeine 처리구가 40.2%(33/82)로 타 구에 비하여 유의적 ($p < 0.05$)으로 높았다(Table 3). 또한, 배반포 발육율도 caffeine 처리구에서 30.5%(25/82)로 대조구(21.8%)와는 유의적

인 차이가 없었으나 비교적 높게 나타났고, vanadate 처리구 (11.4%)에 비해서는 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$).

고찰

수핵란 세포질에 이식된 핵의 remodeling 형태는 재구축란의 발육에 많은 영향을 미칠 수 있으며, 수핵란 세포질 내 MPF 활성 정도에 따라 크게 좌우된다. 활성화되지 않은 난자에 이식된 핵은 수핵란 세포질의 높은 MPF 활성에 의하여 핵막 붕괴(NEBD) 및 미성숙 염색체 응축(PCC)이 일어난다. 반면에 활성화된 난자를 수핵란으로 이용할 경우, NEBD와 PCC는 일어나지 않고, 이식된 핵은 팽창되어 바로 전핵으로 발달한다(Czolowska 등, 1984).

Kawahara 등(2005)은 돼지 난자에 2.5 mM의 caffeine을 3 시간 이상 처리하였을 경우, 수핵란 세포질의 MPF 활성 및 이식된 핵의 PCC 발현율이 유의적으로 증가하였으며, 이후 배반포까지의 발육율도 증가하였다고 보고하였다. 또한, 체외수정란에 caffeine을 처리하여 배양한 결과, caffeine이 체외수정란의 발육에 아무런 영향을 주지 않아 재구축배의 발육율

Table 1. Effect of caffeine and vanadate treatments on the development of bovine parthenotes

Treatments	No. of oocytes	No. of embryos (%)		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
Control	167	140 (83.8)	42 (25.1)	36 (21.6)
Caffeine	162	142 (87.7)	45 (27.8)	39 (24.1)
Vanadate	158	132 (83.5)	38 (24.1)	32 (20.3)

Table 3. Effect of caffeine and vanadate treatments on the development of bovine nuclear transfer embryos

Treatments	No. of cultured	No. of embryos (%)		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
Control	104	88 (84.6)	28 (26.9) ^a	23 (22.1) ^a
Caffeine	110	87 (79.1)	44 (40.0) ^b	33 (30.0) ^b
Vanadate	105	90 (85.7)	18 (17.1) ^c	12 (11.4) ^c

^{a-c} Values with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

Table 2. Nuclear remodeling type of bovine somatic cell nuclear transfer embryos following chemical treatment*

Treatment	No. of embryos fused	Nuclear remodeling types (%)					
		PCC					NPCC/1PN
		M-plate	1C	2C	≥3C	Total	
Control	98	2 (2.0)	37 (37.8) ^a	8 (8.2)	3 (3.1)	50 (51.0) ^a	48 (49.0) ^a
Caffeine	108	3 (2.8)	61 (56.5) ^b	9 (8.3)	5 (4.6)	7 (7.2) ^b	30 (27.8) ^b
Vanadate	90	0 (0.0)	22 (24.4) ^c	4 (4.4)	2 (2.2)	28 (31.1) ^c	62 (68.9) ^c

* Embryos were fixed at 1.5 h after initial activation (A23187 treatment).

PCC, premature chromosome condensation; NPCC, non-PCC; M-plate, metaphase-plate; C, chromatin clump; PN, pronucleus-like nucleus.

^{a-c} Values with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

이 caffeine 처리보다는 이식된 핵의 remodeling 형태에 따라 영향 받을 수 있음을 시사하였다. 본 연구의 결과도 용합 전 caffeine 및 vanadate 처리에 의해 난자의 MPF 활성을 조절할 수 있음을 보여 주었으며, 본 연구에서 사용한 caffeine 및 vanadate는 핵이식란의 발육에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나, Kawahara 등(2005)의 결과와 일정 부분 일치하였다. MPF 활성이 높은 MII기 난자를 수핵란으로 이용하였을 경우, 이식된 핵은 NEBD가 일어나 간기의 염색질이 수핵란 세포질내로 노출됨으로써 세포질 내 reprogramming과 관련된 요인들과 쉽게 접하게 되어 이식된 핵의 초기화가 용이한 것으로 사료되고 있다(Kim 등, 2002).

본 연구에서는 vanadate 처리에 의해 인위적으로 PCC 유기를 억제한 핵이식란의 경우, PCC가 높게 유기된 caffeine 처리구에 비하여 배반포 발육율이 유의적으로 낮아 PCC유기가 핵이식란의 발육에 이로울 수 있음이 시사되었다. 반면, vanadate 처리에 의해 MPF 활성의 억제 효과뿐만 아니라 세포질 내 칼슘의 유출 및 과립세포의 방출과 같은 세포질 활성화도 일어날 수 있으며(Kim 등, 1999), 미세소관과 관련된 단백질에 영향을 미쳐 비정상적인 방추사 형성을 야기할 수 있는 것으로 보고되었다(Aquino 등, 1995). 그러나 본 연구에서 5 mM vanadate를 소의 성숙난자에 30분간 처리하였을 때 제2 성숙분열 및 전핵 형성과 같은 난자의 활성화 양상은 나타나지 않았으며(미제시), 단위발생란의 발육에도 나쁜 영향을 미치지 않은 것으로 보아 caffeine 및 vanadate를 핵이식 난자에 처리하였을 경우 나타날 수 있는 발육율의 차이는 약품에 의한 것이 아니라 화학적 처리에 의해 유기된 핵의 remodeling 형태에 의한 것으로 판단된다. 본 연구진에 의하여 비슷한 연구 결과가 최근 caffeine과 vanadate 처리에 의한 돼지 핵이식란의 remodeling 조절 연구에서도 보고되었다(Kwon 등, 2008).

본 실험의 결과에서, caffeine 처리에 의한 PCC 유기가 핵이식란의 발육에 이로울 수 있다는 것이 시사되었지만 활성화처리에 따른 다양한 핵형 변화도 핵이식란의 발육에 영향을 미칠 것으로 사료된다(Cheong 등, 1993). 즉, PCC가 유기되었어도 1개의 염색질괴(IC)를 가지는 것이 50% 수준에 불과하여(Table 2 참조), 정상적인 발육을 유도할 수 있을 것으로 판단되는 IC의 출현을 높일 필요가 있을 것으로 판단된다. 활성화 이후 염색질괴의 다양한 형태 변화로 인하여 핵의 remodeling 형태와 핵이식란의 발육을 직접적으로 연관시키기 곤란한 점은 추후 연구가 필요한 부분이다.

결 론

본 연구는 소 체세포 핵이식란의 화학적 처리에 의한 MPF 활성과 핵의 remodeling 조절 및 핵이식란의 체외 발육능을 검토하였다. 화학적 방법에 의한 핵이식란의 MPF 활성을 검토

한 결과, 대조구를 100으로 하였을 때 caffeine 처리구는 127.2, vanadate 처리구는 76.0으로 나타났다. 단위발생란을 이용하여 화학적 처리가 배의 발육에 미치는 영향을 검토한 결과, caffeine 및 vanadate는 소 단위발생란의 발육에 영향을 미치지 않았다. 화학적 처리에 의한 핵의 remodeling 형태를 검토한 결과, caffeine 처리구에서 72.2%가 PCC가 유기된 반면, vanadate 처리구에서는 PCC가 유기되지 않은 난자의 비율이 68.9%로 높았다. 핵이식란의 배반포 발육율은 caffeine 처리구에서 30.3%(33.109)로 대조구(22.1%)에 비해 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), vanadate 처리구는 11.4%(12/105)로 대조구에 비해 낮았다. 이상의 결과는 화학적 방법에 의해 MPF 활성 및 핵의 remodeling을 조절할 수 있으며, 그 결과 핵이식란의 체외 발육에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- Anas M-KI, Shoho A, Shimada M and Terada T. 2000. Effects of wortmannin on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 53:1797-1806.
- Aquino FP, Naito K, Cruz LC, Sato E and Toyoda Y. 1995. Effects of vanadate on meiotic maturation of porcine oocyte *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 41:271-276.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW and Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech.* 17:456-461.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
- Cheong HT, Park KW, Im GS, Lai L, Sun QY, Day BN and Prather RS. 2002. Effect of elevated Ca^{2+} concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 61:488-492.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48:958-963.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated

- oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37:138-145.
- Choi JB, Kim CI, Park CK, Yang BK and Cheong HT. 2004. Effect of activation time on the nuclear remodeling and *in vitro* development of nuclear transfer embryos derived from bovine somatic cells. *Mol. Reprod. Dev.* 69:289-295.
- Collas P and Robl JM. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45:455-465.
- Czolowska R, Modlinski JA and Tarkowski AK. 1984. Behavior of thymocyte nuclei in nonactivated and activated mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 69:19-34.
- Kawahara M, Wakai T, Yamanaka KI, Kobayashi J, Sugimura S, Shimizu T, Matsumoto H, Kim JH, Sasada H and Sato E. 2005. Caffeine promotes premature chromosome condensation formation and *in vitro* development in porcine reconstructed embryos via a high level of maturation promoting factor activity during nuclear transfer. *Reproduction* 130:351-357.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yanashita M, Aoki F, Tojo H and Toyoda Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: A regulation of aging in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 63:715-722.
- Kim JH, Do HJ, Wang WH, Machaty Z, Han YM, Day BN and Prather RS. 1999. A protein tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate, causes parthenogenetic activation of pig oocytes via an increase in protein tyrosine kinase activity. *Biol. Reprod.* 61:900-905.
- Kim JM, Ogura A, Nagata M and Aoki F. 2002. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstituted by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 67:760-766.
- Kwon DJ, Park CK, Yang BK and Cheong HT. 2008. Control of nuclear remodelling and subsequent *in vitro* development and methylation status of porcine nuclear transfer embryos. *Reproduction* (in press).
- Matsui Y and Markert CL. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zoo.* 177:129-145.
- Norbury C and Nurse P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61:441-70.
- Tani T, Kato Y and Tsunoda Y. 2001. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.* 64:324-330.
- Wakayama T, Tateno H, Mombaerts P and Yanagimachi R. 2000. Nuclear transfer into mouse zygote. *Nat. Genet.* 24:108-109.
- Yin Xj, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y and Tsunoda Y. 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67:442-446.
- 백진주, 박춘근, 양부근, 김정익, 정희태. 2005. Demecolcine 처리에 의한 탈핵과 수핵란 세포질의 세포주기가 소 핵이식란의 발육에 미치는 영향. *Reprod. Dev. Biol.* 29:175-180.

(접수일: 2008. 3. 12 / 채택일: 2008. 3. 17)