

O-2(기초) 난자성숙 동안 Signal Transduction에 관여하는 단백질의 인산화 연구: Bio-Plex Analysis를 이용한 Seven Phosphoproteins의 Multiplex Assay

윤세진 · 정형민 · 최동희 · 윤태기 · 차광렬 · 이경아

차병원 여성의학연구소, 포천중문의대 생명과학전문대학원

Background & Objectives: 단백질 인산화는 세포신호전달에 매우 중요한 현상으로서, 미성숙한 GV 난자가 MII 단계의 성숙한 난자가 되는 과정에서도 MAPK를 포함하는 여러 단백질들이 인산화를 통해 활성화 된다고 알려져 있다. 그러나 난자성숙에 관여하는 수많은 조절인자들 중에서 어떤 단백질이 인산화되어 난자성숙을 조절하는지는 그 외에는 알려진 것이 거의 없다. 따라서 본 연구진은 체세포의 신호전달 과정에서 인산화를 통해 중요한 기능을 한다고 알려져 있는 여러 단백질들이 생쥐의 난자 성숙과정에도 작용하고 있는지 알아보하고자 본 연구를 수행하였다.

Method: ICR 생쥐에 PMSG를 주사하고 46시간 후에 GV 단계의 미성숙 난자를 채취한 후 체외배양 하면서, 배양 2시간 후에 GVBD를, 배양 8시간 후에 MI을, 배양 16시간 후에 MII 단계의 난자를 얻었고 체내에서 배란한 MII 단계의 난자는 수란관에서 얻었다. 각 단계의 난자를 100개씩 모아서 Akt, GSK-3 α/β , I κ B α , STAT3, 그리고 세가지 MAP kinases (ERK1/2, JNK, p38) 등, 일곱 단백질의 인산화를 Bio-Plex System (Bio-Rad)을 이용하여 같은 시료에서 동시에 측정하였다. 본 연구는 세 번의 반복 실험을 통하여 통계처리 하였다.

Results: 생쥐의 난자성숙과정에서 측정된 일곱 가지 단백질 중에서 인산화가 현저히 증가하는 단백질로는 세가지 MAPK와 STAT3로서 미성숙 난자에 비해서 3배에서 20배까지 인산화되는 결과를 보였다. 반면에 GSK-3 α/β , I κ B α 의 인산화는 3배 이하였으며, Akt의 경우에는 변화가 전혀 없었다. 난자성숙과정에서 인산화는 GVBD 단계에서 활성화되기 시작하여 MI에서 현저히 높게 증가하며 MII까지 높게 유지 었다.

Conclusions: 본 연구는 난자성숙 과정에서 일곱 가지 단백질의 인산화를 동시에 측정한 최초의 보고로서 난자와 같이 적은 양의 시료에서 인산화를 측정하는데 많은 한계가 있었던 단점을 극복하였다. 본 연구 결과, MAPK Superfamily에 속하는 세가지 MAP Kinases가 모두 높게 인산화 되었으며 특히 JNK와 p38의 인산화에 대한 연구는 생쥐에서는 처음 보고된 것이다. 인산화 된 JNK 단백질의 양은 Western Blot으로는 측정하기 어려운 적은 양이었다. 또한 각 MAPK의 inhibitor를 첨가하여 체외배양 함으로써 난자성숙 과정 중에 각 MAPK의 인산화가 일어나며 반면에 Akt의 인산화는 관여하지 않음을 다시 한번 확인하였다.

본 연구는 과학재단의 지원에 의하여 연구되었음 (R01-2003-000-10174-0).