

수핵란의 전 활성화가 토끼 핵이식 수정란의 핵 재구성에 미치는 효과[†]

전병균 · 김윤연 · 정기화* · 광대오** · 이효종*** · 최상용*** · 박충생
경상대학교 축산학과

Effect of Electrical Preactivation of Recipient Cytoplasm on Nuclear Remodelling in Nuclear Transplant Rabbit Embryos

Jeon, B. G., Y. Y. Kim, K. H. Chung*, D. O. Kwack**,
H. J. Lee***, S. Y. Choe*** and C. S. Park

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

Chromosome condensation and swelling of the donor nucleus have been known as the early morphological indicators of chromatin remodelling after injection of a foreign nucleus into an enucleated recipient cytoplasm. The effects of non-preactivation and electrical preactivation of recipient cytoplasm, prior to fusing a donor nucleus, on the profile of nuclear remodelling in the nuclear transplant rabbit embryos were evaluated. The embryos of 16-cell stage were collected and synchronized to G₁ phase of 32-cell stage. The recipient cytoplasm was obtained by removing the first polar body and chromosome mass by non-disruptive microsurgical procedure. The separated G₁ phase blastomeres of 32-cell stage were injected into non-preactivated recipient cytoplasm. Otherwise, the enucleated recipient cytoplasm was preactivated by electrical stimulation and the separated G₁ phase blastomeres of 32-cell stage were injected. After culture until 20h post-hCG injection, the nuclear transplant oocytes were electrofused by electrical stimulation. The nuclei of nuclear transplant embryos fused into non-preactivated and/or preactivated recipient cytoplasm were stained by Hoechst 33342 at 0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10 hrs post-fusion and were observed under a fluorescence microscopy. Accurate measurements of nuclear diameter were revealed with an ocular micrometer at 200×.

Upon blastomere fusion into non-preactivated recipient cytoplasm, a prematurely chromosome condensation at 1.5 hrs post-fusion and nuclear swelling at 8 hrs post-fusion were occurred as 91.6% and 86.1%, respectively. But the nuclei of nuclear transplant embryos fused into preactivated recipient cytoplasm, as opposed to non-preactivated recipient cytoplasm, were not occurred chromosome condensation and extensive nuclear swelling. Nuclear diameter fused into

[†] 본 연구는 교육부에서 1995년도에 지원한 유전공학 학술연구조성비로 수행되었음.

* 축산기술연구소 사천지소(Sacheon Branch Institute, Korean National Livestock Research Institute)

** 경상대학교 사범대학 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University).

*** 경상대학교 수의과대학 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University).

non-preactivated and preactivated recipient cytoplasm at 8 hrs post-fusion was 30.2 ± 0.74 and $15.2 \pm 1.32 \mu\text{m}$, respectively.

These results indicated that onset of nuclear condensation and swelling which was associated with oocytes activation were critical steps in the process of chromatin swelling. Furthermore, complete reprogramming seemed only possible after remodelling of the donor nucleus by chromosome condensation and nuclear swelling.

(Key words : Rabbit nuclear transfer, Preactivation, Nuclear remodelling, Recipient cytoplasm)

I. 서 론

핵이식 기법에서 세포질 속으로 주입된 핵의 형태적이고 생리적인 변화는 많은 연구자들에게 세포학적으로 많은 흥미를 끌어 왔다. 제2감수분열 중기에 정지하고 있는 성숙한 난자를 핵이식 기법에서 수핵란으로 많이 사용하여 왔다. 이러한 난자는 전핵 단계의 난자보다 탈핵이 쉬우며 핵이식 수정란의 발달률을 높일 수 있다고 알려져 있다. 체세포에서 간기와 분열기의 전이는 maturation promoting factor(MPF)라 불리는 물질에 의해서 유도되는데(Masui와 Markert, 1971; Newport와 Kirschner, 1984; Gerhart 등, 1984; Christmann 등, 1994) MPF는 각각의 세포분열 중기에 최고 수준에 이르고 세포분열 동안 일정하게 유지하므로 제2감수분열의 중기(metaphase II, M II)에 정지하고 있는 성숙된 M II 난자 역시 높은 수준의 MPF를 유지하고 있다. MPF는 두 종류의 대소 기본 단위로 구성되어 있는데 소 기본 단위는 분자량이 34 kDa인 cdc2와 대 기본 단위는 분자량이 56 kDa 정도가 되는 cyclin으로 구성되어 있다(Lee와 Nurse, 1987; Dunphy와 Newport, 1988; Dunphy 등, 1988; Draetta 등, 1989; Labbe 등, 1989; Parrish 등, 1992). P34^{cdc2}라고도 불리는 cdc2는 활성화 되었을 때 다양한 단백질을 인산화(phosphorylation)시킬 수 있는 단백질 전이효소(protein kinase)의 성질을 가지고 있어, 이것은 DNA에 연결되어 있는 histone H1 단백질을 인산화시키고 이 결과로서 염색체의 응축이 일어난다(Johnson과 Rao, 1970; Murray와 Kirschner, 1989). 그러나 최근에는 P34^{cdc2}는 난자 내의 histone H1에는 영향을 미치지만 염색체 응축에는 다른 기작이 있을 것이라고 보고하고 있다

(Kubelka 등, 1995). 또 다른 작용은 핵막의 단백질(lamin)을 인산화시킬 수 있는 lamin kinase로서의 작용으로 이러한 원인에 의하여 핵막이 핵중합되어서 세포분열의 전기에 핵막이 소실되며(Miake-Lye와 Kirschner, 1985; Arion 등, 1988), 난자에서 핵막의 소실이 수정의 과정 및 난자의 대사에 필요한 Ca^{2+} 의 흐름에 필수적이라고 보고하였다(Kono 등, 1995). 또한 RNA 중합효소(RNA polymerase)를 인산화시켜 세포분열 동안 전사 활동이 억제되며(Cisek과 Corden, 1989), 또한 초기 세포분열 동안 myosin의 저해는 염색체가 양쪽으로 분리되어 핵분열(karyokinesis)이 완성될 때까지 세포질분열(cytokinesis)을 막는 것이다(Satterwhite 등, 1982). 대 기본단위인 cyclin은 주기적으로 S기에서는 축적되고 세포분열 동안 점차 감소하며(Evans 등, 1983; Swenson 등, 1986), MPF의 비활성화는 P34^{cdc2}의 인산화(Doree 등, 1989)와 cyclin의 분해(Murray와 Kirschner, 1989)로 이루어진다고 한다. 그리하여 MPF는 세포분열을 시작할 때 nuclear envelope breakdown(NEBD), 염색체의 응축, 방추사의 응집을 유도하고, 또한 성숙한 난자 내로 할구를 융합하였을 경우 할구의 핵은 일련의 과정을 거친다. 즉, nuclear envelope breakdown(NEBD), prematurely chromosome condensation(PCC), nucloli의 분산, 핵막의 재형성 및 전핵의 형성, 핵의 팽화(nuclear swelling) 등이 순서적으로 일어난다(Murray와 Kirschner, 1989; Collas와 Robl, 1991; Campbell 등, 1993). 이러한 일련의 과정은 핵이식 수정란의 발달 능력을 증가시킬 수 있는 주입된 핵의 재구성(nuclear remodelling)이라고 보고하였다(Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1991). 핵의 재구성은 핵이식된 수정란이 전핵 배부터 새로운 발달의 단계를 위한 주입된 핵의 rep-

rogramming이라고 하였다(Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1991; Collas 등, 1992a; Pinto-correia 등, 1995). Szollosi 등(1988)은 할구가 제2감수분열의 중기와 말기 사이의 세포주기에 난자와 융합되었을 때 핵의 재구성이 가능하다고 하였으나, 난자가 활성화되어 세포주기가 제2감수분열의 말기 이후에 할구가 융합되었을 때 핵의 팽화는 제한되고 정상적인 전핵의 발달이 없다고 하였으며, 생쥐에서 난자가 활성화되고 세포주기가 S기인 난자에 수정시켰을 때 정자의 핵은 팽화가 일어나지 않고 정상적인 응성 전핵을 형성하지 못하였다고 한다(Maleszewski, 1992). 유전자의 발현은 세포질에 존재하는 특별한 단백질이 DNA에 결합됨으로써 유도되고 수정란의 발달 단계에서도 발달 단계에 따라 특별한 유전자가 발현되며, 어떤 단계에 특정한 유전자의 발현은 배의 발달과 발생에 중요한 인자이다. Gilbert (1994)는 발현되어지지 않은 유전자는 다시 활성화될 수 있다고 하나, 만약 분화된 할구 세포를 핵이식하였을 경우 발현되어진 유전자가 다시 발현되지 않는다면 역시 배의 발생이 영향을 미칠 수 있다. DiBerardino(1987), Modlinski와 Smorag (1991) 및 Barnes 등(1987) 및 Collas와 Barnes (1994)는 핵이식 수정란에서 공핵란이 분화된 핵의 비가역적인 변화와 부적당한 reprogramming은 배의 발달에 장애를 준다고 하며 핵의 재구성에 의한 핵이식 수정란의 reprogramming은 핵이식 수정란의 발달에 유익하다고 한다. 수핵란의 측면에서 성숙한 M II 난자 내로 융합된 핵은 전핵 단계의 수핵란보다 핵의 재구성에 의하여 좀 더 기능적인 전핵으로 염색질을 변화시킨다고 한다(DiBerardino, 1992). 또한 Smith와 Wilmut(1989)는 전핵 단계의 수정란보다 성숙된 M II 난자가 reprogramming 능력이 우수하다고 보고하였다.

이에 본 연구는 토끼를 사용하여서 세포주기를 조절한 32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하여 탈핵된 난자를 전기적 방법으로 활성화를 유도한 후 공핵란의 할구를 주입하고 융합한 다음 핵이식 수정란을 생산하여 수핵란 세포질 상태에 따른 핵의 재구성을 조사하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 동물

본 실험에 사용된 공시 동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원예축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용 전에 개체별 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵란의 준비

토끼의 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 30mg FSH(Foltropin®, Australia)를 3일 동안 하루에 두 번씩 분할하여 근육주사하였고, 마지막 주사 12시간 후 hCG(Puberogen®, Japan) 100IU를 정맥주사하였다. hCG 주사 후 13~15시간에 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신 마취한 다음 개복 수술하여 난관으로부터 성숙 난자를 10% fetal calf serum(FCS, Gibco Co., U.S.A.)이 함유된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Sigma Co., U.S.A.)으로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml hyaluronidase(Sigma Co., U.S.A.)용액에서 39℃, 5% CO₂ 조건으로 7분간 방치한 다음, 150μm fire-polished pipette으로 반복 pipetting하여 난구세포를 제거하고 제1극체가 명확하고 세포질이 균일하며 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다.

3. 공핵란의 준비 및 세포주기의 조절

토끼의 과배란 유기는 수핵란 준비와 같은 방법으로 실시하였으며, hCG주사 직후 성숙된 수토끼와 교미시켰다. 16-세포기의 수정란은 hCG 주사 후 48시간에 채란하였고, 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 조절하였다. 할구 세포를 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 동기화하는 방법은 Collas 등(1992a)의 방법으로, 간단히 요약하면, 채란된 16-세포기의 수정란을 0.5μg/ml microtubules 중합 억제제인 colcemid(Gibco Co., U.S.A.) 및 10% FCS가 포함된 M-199(Earl's salt, Sigma Co., U.S.A.) 배양액에서 10시간 배양하여 16-세포기 단계에서 32-세포기 단계로 넘어가는 세포분열의 중기에 정지시킨 할구를 0.5% pronase(Sigma Co., U.S.A.)에서 8분간 배양하여 mucin coat 및 투명대를 제거한 다음, 50μm 정도의 pipette으로 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 결여된 PBS에서 할구를 분리하였다. 이를 세척 후 DNA 합성 억제제인 0.1μg/ml aphidicolin(Sigma Co., U.S.A.) 및 10% FCS를 포함한

M-199 배양액에서 1.5~2시간 동안 배양하여 세포분열 완성 후 32-세포기의 G₁기로 동기화된 할구를 공핵란으로 사용하였다.

4. 핵이식을 위한 미세조작

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl (1988)과 Collas 등(1989)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵란과 공핵란으로부터 분리된 할구 세포를 7.5 μ g/ml cytochalasin B(Sigma Co., U.S.A.), 0.1 μ g/ml aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma Co., U.S.A.)에서 15분간 방치한 다음 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan)에 장착된 micromanipulators(Narishige Co., Japan)에서 미세조작을 실시하였다. 미세조작은 동일한 EBSS용액에서 McGrath와 Solter(1983)의 non-disruptive 방법에 의하여 탈핵을 실시하였는데, 성숙된 M II 난자를 한편에 직경 150 μ m 정도의 미세 pipette으로 고정시키고 다른 한편에 직경 30 μ m의 연마된 미세 pipette를 투명대 내로 진입시켜 제1극체와 그 주위에 위치하는 제2감수분열 중기의 염색체를 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 탈핵된 난자는 hCG 주사 후 18시간까지 배양한 다음 세포 융합과 같은 조건의 전기자극으로 난자의 전활성화를 유도하였다. 이러한 난자를 Ozil (1990)의 방법에 따라 난자 세포질의 형태에 의하여 난자의 활성화 여부를 판단하여 난자가 활성화된 것을 골라 수핵란으로 사용하였고, 세포주기가 조절된 G₁기의 공란할구를 주입하였다. 할구가 주입된 핵이식 난자는 0.1 μ g/ml aphidicolin 및 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 난자의 세포질과 할구의 융합 때까지 배양하였다.

5. 세포 융합 및 난자의 활성화

난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 hCG 주입 후 20시간에 이 등(1993)의 방법에 따라 1.25 kV/cm, 60 μ sec로 3회 전기자극으로 유도하였다. 세포 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 μ M CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 비전해질 0.28 M mannitol 용액으로 25 $^{\circ}$ C의 실온에서 2시간 동안 평형시킨 후 사용하였다. 할구가 이식된 난자는 이 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 할구가 주입

된 난자를 배열하여 electro cell fusion manipulator(Eyela Co., Japan)로 할구와 세포질의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였다.

6. 핵이식 수정란의 염색

핵이식 수정란의 핵 재구성을 관찰하기 위하여 Purseel 등(1985)의 방법에 따라 bisbenzamide로 형광 염색을 실시하였다. 간단히 요약하면, 우선 10 μ l Hoechst(1mg/ml, Sigma Co., U.S.A.), 750 μ l 2.3% NaCit 및 250 μ l ethanol을 희석하여 working solution을 만들고 10~20 μ l 0.1% trypan blue를 실리콘 처리된 slide glass에 소적을 만들어 해부 현미경 하에서 수정란을 이 소적속에 이전하였다. 이를 30초 동안 실온에서 방치하였고 trypan blue를 제거한 다음 10~20 μ l working solution을 떨어뜨리고 3~5분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하고 다시 working solution을 제거하였다. 즉시 Permount를 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 다음 암실에서 보관하여, 이를 형광현미경(Nikon Co., Japan) 하에서 관찰하였다. 난자의 활성화 자극을 주지 않은 non-preactivated 수핵란 및 활성화 자극을 준 preactivated 수핵란을 사용한 핵이식 수정란을 할구 융합 후 0, 1, 5, 2, 4, 6, 8, 10시간 쯤에 각각 형광 염색하여 핵의 상태를 조사하였고, 핵의 직경은 형광 현미경에 부착된 접안 micrometer로써 200배의 배율 하에서 측정하여 핵의 팽화 정도를 관찰하였다.

7. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 Chi-square test로서 처리군간의 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 핵이식 수정란에서 핵의 응축 및 팽화

Non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용하고 32-세포기의 G₁기 할구를 주입한 다음 세포 융합을 실시한 후 핵이식 수정란을 Hoechst 33342로써 핵을 형광 염색하여 Collas와 Robl(1991)의 의견에 따라 세포 융합 후 1.5~2시간대 및 8시간대에 염색체의 응축 및 핵의 팽화를 각각 관찰한 결과

는 Table 1과 같다(Fig. 1, 2). Adenot 등(1992)의 의견에 따라 융합되기 전 할구 핵의 직경보다 적어도 1.5배 이상 큰 것을 핵이 팽화된 것으로 판단하였다.

Non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우에는 세포 융합 후 1.5~2시간대에 염색체의 응축이 91.6%(33/36)이었고, 8시간대에 핵의 팽화는 86.1%(35/40)를 각각 나타내었다. 그러나 preactivated된 난자를 수핵란으로 사용한 경우에는 염색체의

Table 1. Effects of electrical preactivation of recipient cytoplasm on prematurely chromosome condensation and extent nuclear swelling in nuclear transplant rabbit embryos

Recipient cytoplasm	No. (%) of embryos with condensed chromosome	No. (%) of embryos with swollen embryos
Non-preactivated*	33/36(91.6)	35/40(87.5)
Preactivated**	0/20(0.0)	0/20(0.0)

* The M II oocytes were fused and activated by electrical pulses at 20 hrs post-hCG.

** After enucleation, the oocytes were preactivated with electrical pulses at 18 hrs post-hCG, and followed by electrical fusion at 20 hrs post-hCG.

응축 및 핵의 팽화가 일어나지 않았다. Czolowska 등(1984)은 흉선세포(thymocyte)를 non-activated 난자에 융합하였을 경우 핵이 모두 응축되었고, activated 난자에서는 핵막이 소실되지 않고 핵막이 그대로 존재한다고 하였다. 또한, 난자를 인위적인 활성화 자극 후 60분 안에 융합된 핵들은 핵의 팽화가 일어났고, 60분 이상이 경과된 경우에는 자성 전핵만이 팽화되었다고 한다. 또한 토끼에서 할구를 non-activated 난자에 융합 후 Collas와 Robl(1991)은 융합 2시간에 90%가 핵의 응축이 일어났다고 하며, Adenot 등(1992)은 5~6시간에 84%가 팽화가 일어났다고 한다.

2. 핵이식 수정란 핵의 직경 변화

세포 융합 후 0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10시간대에 핵이식 수정란 핵의 직경을 측정하여 본 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같다. Non-preactivated를 수핵란으로 사용한 경우에는 난자의 세포질과 할구를 융합하기 전 할구 핵의 직경은 $10.8 \pm 0.74 \mu\text{m}$ 이었고, 세포 융합 후 1.5시간대에는 $9.0 \pm 0.63 \mu\text{m}$ 를 나타내었다. 이러한 결과는 세포 융합 후 핵막이 소실되고 난 다음 일시적으로 염색질의 응축이 되었음을 보여 준다. 또한 세포 융합 후 2시간대에는 $9.6 \pm 1.01 \mu\text{m}$, 4시간대에는 $15.2 \pm 0.97 \mu\text{m}$, 6시간대에는 $24.2 \pm 0.74 \mu\text{m}$, 8시간대에는 $29.0 \pm 0.63 \mu\text{m}$ 를 나타내어 핵의 직경이 세포 융합 전

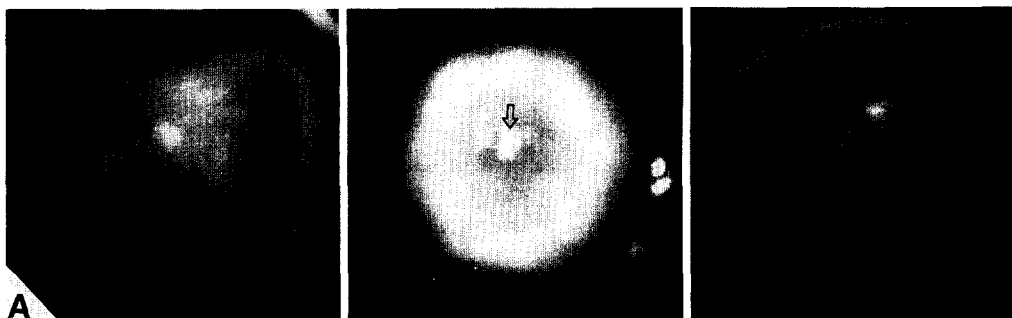


Fig. 1. Profile of prematurely chromosome condensation in the transplant rabbit embryos. (A) Interphase 32-cell satge donor nucleus, prior to fusion to enucleated recipient cytoplasm. Prematurely condensed donor chromatin(B, arrow) and non prematurely condensed donor chromatin(C) at 1.5 h after fusion of donor nucleus to non-preactivated recipient cytoplasm, respectively. Bar represents $10 \mu\text{m}$.

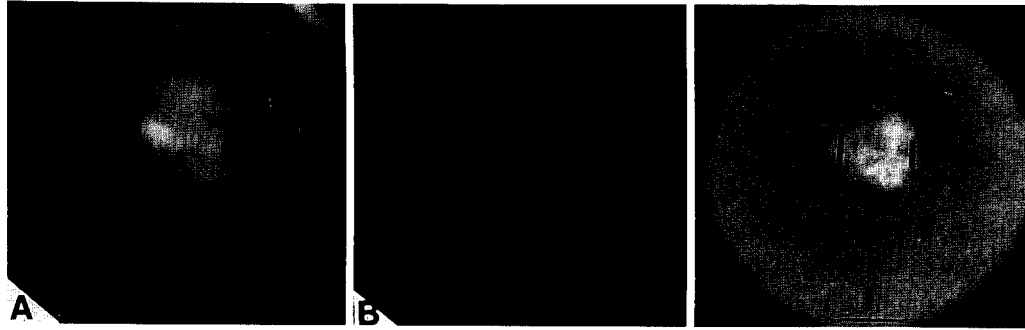


Fig. 2. Profile of nuclear swelling in the transplant rabbit embryos. (A) Interphase 32-cell satge donor nucleus, prior to fusion to enucleated recipient cytoplasm. Swelled, remodlled nucleus(B, arrow) and the limited swelling of nucleus(C) at 8 h after fusion of donor nucleus to non-preactivated recipient cytoplasm, respectively. Bar represents 10 μ m.

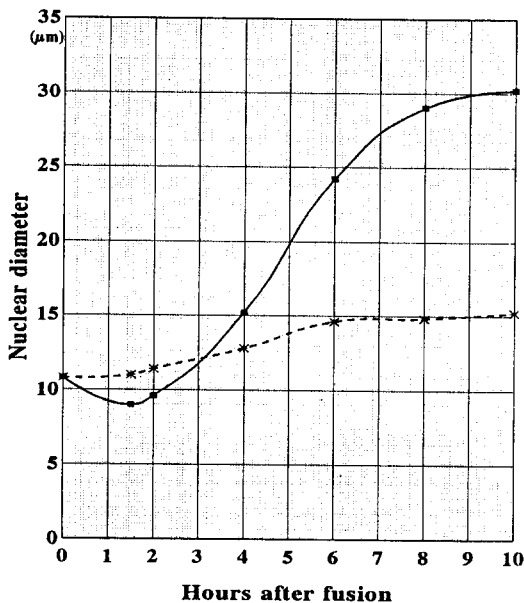


Fig. 3. Nuclear diameter fused into non-preactivated(■) and preactivated(×) recipient cytoplasm in the nuclear transplant rabbit embryos.

보다 268% 정도 증가하였다. 또한, 10시간대에는 30.2 \pm 0.74 μ m의 직경을 나타내어 초기 핵의 직경보다 302% 정도 핵의 직경이 증가됨을 나타내었다. Non-

preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우 세포 융합 후 4시간에 전핵이 형성된다고 보고하였는데 (Collas와 Robl, 1991) 본 실험에서도 핵의 직경이 4 시간대에서 8시간대 사이에서 많이 증가됨을 나타내었다. 그러나 preactivated를 수핵란으로 사용한 경우에는 세포 융합하기 전의 할구 핵의 직경은 10.8 \pm 0.74 μ m이었지만, 세포 융합 후 1.5시간대에는 10.8 \pm 0.8 μ m, 2시간대에는 11.4 \pm 1.41 μ m, 4시간대에는 12.8 \pm 0.73 μ m, 6시간대에는 14.6 \pm 0.4 μ m, 8시간대에는 14.8 \pm 0.48 μ m를 나타내어 핵의 직경이 세포 융합 전의 초기 핵보다 137% 정도 증가하였다. 또한, 10시간대에는 15.2 \pm 0.32 μ m의 직경을 나타내어 초기 핵의 직경보다 140% 정도 핵의 직경이 증가되어 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우 핵의 직경에 큰 변화를 주지 않았으며 염색체의 응축이 일어나지 않았다. 토끼에서 할구를 non-activated 난자에 융합 후 Adenot 등(1992)은 5~6시간에 핵이 팽화된 크기가 초기의 91.7 \pm 23.6 μ m²에서 261.2 \pm 48.7 μ m²로 늘어났고, Collas와 Robl(1991)은 융합 후 8시간에 핵의 직경은 29 \pm 0.8 μ m로 처음 할구의 직경보다 176% 늘어났으며, activated 난자에 할구가 융합된 경우는 15 \pm 0.7 μ m로 단지 처음보다 42%만이 늘어났다고 한다. 이러한 결과로 보아 할구가 주입된 후 핵이식 수정란의 핵의 재구성은 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우 일어남을 알 수 있었다. 높은 MPF의 활성을 가지고 있는 non-preactivated 난자 즉,

M II 난자는 주입된 핵을 재구성할 수 있고 공핵란의 할구 핵의 reprogramming은 발달률을 향상시킬 수 있다고 사려된다. Smith 등(1994)은 소에서 핵의 reprogramming을 나타내는 가장 중요한 요소는 핵의 재구성이고, Smith와 Wilmut(1989)는 전핵 단계보다 M II 난자가 reprogramming의 능력이 좋다고 하였다.

본 실험의 결과에서 토끼에서는 수핵란으로서 전핵 단계 혹은 인위적인 방법으로 활성화된 난자를 수핵란으로 사용하여서 공핵란의 할구를 융합한 다음 핵이식 수정란을 생산하는 것보다 활성화되지 않은 난자 즉, M II 난자를 수핵란으로 이용하여 공핵란의 할구를 융합하였을 때 핵의 재구성이 일어나고, 이러한 핵의 재구성에 의하여 핵이식 수정란의 reprogramming이 일어남을 알 수 있었다.

IV. 적 요

본 연구는 토끼를 사용하여서 공핵란으로 세포주기를 조절한 32-세포기의 G₁기 할구를 사용하여 수핵란 세포질 상태에 따른 핵의 재구성을 조사하고, 이를 토대로 핵이식 수정란의 reprogramming을 알아보려고 하였다.

과배란시킨 토끼의 난관으로부터 hCG 주사로부터 16-세포기의 수정란을 채란하고 16-세포기의 수정란은 할구의 세포주기를 32-세포기의 G₁기로 조절한 다음 분리하여 공핵란으로 사용하였다. 수핵란은 과배란시킨 토끼로부터 hCG 주사로부터 13~15시간에 채란하여 미세조작으로 제1극체와 인접한 세포질을 제거하여 제2감수분열 중기의 염색체를 탈핵한 후 수핵란으로 사용하였다. 한편, 채란된 수핵란을 탈핵을 한 다음 hCG 주입 18시간까지 배양한 다음 전기자극으로 난자의 활성화를 유도하였고, 분리된 32-세포기 G₁기의 할구 세포를 탈핵한 non-preactivated 및 preactivated 난자의 위관강에 각각 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로부터 20시간 후 직류 전류로서 세포의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였고, 융합이 확인된 핵이식 수정란은 체외배양을 실시하였다.

수핵란 세포질의 상태에 따른 주입된 핵의 재구성을 조사하기 위하여 32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로

로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란을 세포 융합 후 0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10시간대에 그들의 핵을 Hoechst 33342로써 형광 염색하여 형광현미경 하에서 관찰하였다. Non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란은 세포 융합 후 1.5시간대에 91.6%(33/36)가 염색체의 응축이 일어났고 8시간대에 핵의 팽화는 87.5%(35/40)를 나타내었다. 그러나 preactivated된 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란은 염색체의 응축 및 핵의 팽화가 일어나지 않았다. 또한 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 융합 후 10시간대에 핵의 직경은 $30.2 \pm 0.74 \mu\text{m}$ 이어서 핵의 팽화가 나타났으나 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란은 핵의 직경이 $15.2 \pm 1.32 \mu\text{m}$ 를 나타내어 핵이 팽화되지 않았고, non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 핵의 재구성이 일어났음을 알 수 있었다.

이러한 결과를 종합해 보면 핵이식 수정란의 발달률을 개선하기 위해서는 non-preactivated 난자 즉, M II 난자를 수핵란으로 사용하는 것이 주입된 핵의 재구성에 의한 핵이식 수정란의 핵 reprogramming이 일어났음을 알 수 있었다.

V. 인용문헌

1. Adenot, P. G., T. Heyman, P. Chesn, V. H. Rao and J. P. Renard. 1992. Relationship between kinetics of nuclear swelling and subsequent *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos. *Theriogenology*, 37: 185(Abstr.).
2. Arion, D., L. Meijer, L. Brizuela and D. Beach. 1988. cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: Evidence for identify with MPF. *Cell*, 55:371-378.
3. Campbell, K. H. S., W. A. Pitchie and I. Wilmut. 1993. Nuclear cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid repli-

- cation and development. *Biol. Reprod.*, 49: 933-942.
4. Christmann, L., T. Jung and R. M. Moor. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:85-90.
 5. Cisek, L. J. and J. L. Corden. 1989. Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein *cdc2*. *Nature*, 339:679-684.
 6. Collas, P., and J. M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 45:455-465.
 7. Collas, P., C. Pinto-Correia, F. A. Ponce De Lean and J. M. Robl. 1992b. Effect of donor cell stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:501-511.
 8. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology*, 32:835-844.
 9. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.
 10. Collas, P and F. L. Barnes. 1994. Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. *Mol Reprod. Dev.*, 38:264-267.
 11. Czolowska, R. J., A. Modlinski and A. K. Tarkowski. 1984. Behavior of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.*, 69:19-34.
 12. Diberardino, M. A. 1987. Genetic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Am. Zool.*, 27:623-644.
 13. Diberardino, M. A. 1992. Nuclear reprogramming of amphibian differentiated cell. Symposium on cloning mammals by nuclear transplant (Fort Collins). pp. 5-7.
 14. Doree, M., J. C. Labbe and A. Picard. 1989. M phase promoting factor: Its identification as the M phase specific histone H1 kinase and its activation by phosphorylation. *J. Cell Sci.*, 12(suppl.):39-51.
 15. Draetta, G., F. Luca, J. Westendorf, L. Brizuela, J. Ruberman and D. Beach. 1989. *Cdc2* protein kinase is complexed with both cyclin A and B : Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*, 56:829-838.
 16. Dunphy, W. G., L. Brizuela, D. Beach and J. W. Newport. 1988. The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, 54:423-431.
 17. Dunphy, W. G. and J. W. Newport. 1988. Unravelling of meiotic control mechanisms. *Cell*, 55:925-928.
 18. Evans, T., E. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt. 1983. Cyclin A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33:389-396.
 19. Gerhart, J., M. Wu, and N. W. Kirschner. 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.*, 98:1247-1255.
 20. Gibert, S. F. 1994. "Developmental Biology (forth ed.)". Sinauer Associate Inc., Sunderland, pp. 44-52.
 21. Johnson, R. T. and P. N. Rao. 1970. Mammalian cell fusion induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, 226:717-722.
 22. Kono, T., J. Carroll, K. Swann and D. G. Whittibgham. 1995. Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium rearing activity. *Development*, 121:1123-1128.
 23. Kubelka, M., Z. Rinkevicsova, P. Guerrier and J. Motlik. 1995. Inhibition of protein

- synthesis affects histone H1 kinase, but not chromosome condensation activity, during the first meiotic division of pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:63-69.
24. Labbe, J., A. Picard, G. Paucellier, J. C. Cavadore, P. Nurse and M. Doree. 1989. Purification of MPF from starfish: Identification as the histone kinase p34^{cdc2} and a possible role for its periodic activation. *Cell*, 57:253-263.
 25. Lee, M. and P. Nurse. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327:31-35.
 26. Maleszewski, M. 1992. Behavior of sperm nuclei incorporated into parthenogenetic mouse eggs prior to the first cleavage division. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:215-221.
 27. Masui, Y. and C. Market. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177:129-146.
 28. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.*, 228:355-362.
 29. Miake-Lye, R., J. Newport and M. W. Kirschner. 1983. Maturation promoting factor induces nuclear breakdown in cyclohexamide-arrested embryos of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.*, 97:81-91.
 30. Miake-Lye, R. and M. Kirschner. 1985. Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell*, 41:165-175.
 31. Modlinski, J. A. and Z. A. Smorag. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:361-372.
 32. Murray, A. W. and M. W. Kirschner. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 339:275-280.
 33. Newport, J. and M. Kirschner. 1984. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell*, 30:675-686.
 34. Ozil, J. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109:117-127.
 35. Parrish, J. J., C. I. Kim and I. H. Bae. 1992. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 38:277-296.
 36. Pinto-correia, C., C. R. Long, T. Chang and J. M. Robl. 1995. Factors involved in nuclear reprogramming during early development in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:292-304.
 37. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad Jr, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24:687-691.
 38. Satterwhite, L. L., M. J. Lohka, K. L. Wilson, T. Y. Scherson, L. J. Cisek and T. D. Pollard. 1982. Phosphorylation of myosin-II light chain by cyclin-p34^{cdc2}: A mechanism for the timing of cytokinesis. *J. Cell Biol.*, 118:595-605.
 39. Smith, L. C. and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40:1027-1035.
 40. Smith, S. D., E. Soloy, B. Avery, P. Holm, H. Callesen and T. Greve. 1994. Nucleus remodelling in reconstructed cattle embryos. *Theriogenology*, 41:298(Abstr.).
 41. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
 42. Szollosi, D., R. Czolowska, M. S. Szollosi

- and A. K. Tarkowski. 1988. Remodelling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J. Cell Sci.*, 91:603-613.
43. Swenson, K. L., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The calm embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell*, 47:861-870.
44. Webb, M., S. K. Howlett and B. Marot. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 95:131-145.
45. 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. *한국수정란이식학회지*, 8(2):151-154.
(접수일자 : 1997. 8. 4. / 채택일자 : 1997. 9. 10.)