

## 돼지 미성숙란의 체외배양시 MAP Kinase의 활성화

장규태 · 박미령\* · 윤창현\*

콜롬비아 의과대학 해부학 및 세포생물학교실

### Activation of MAP Kinase during Maturation in Porcine Oocytes

Chang, K. T., M. R. Park\* and C. H. Yun\*

Department of Anatomy & Cell Biology, College of Physicians & Surgeons,  
University of Columbia, USA

#### SUMMARY

In an attempt to evaluate the function of MAP kinase of porcine oocytes and to develop a method of assessment for kinase activity, we used MBP as a substrate to detect the MAP kinase activity of porcine oocytes matured in *in vitro*. The MAP kinase which had lower activity during the first 20 hours of culture started to show an increased amount of activity at 25 hours at which a collapse in nuclear membrane was induced. Significant ( $P < 0.05$ ) appeared at 30 hours of being cultured. The gel phosphorylation method, MBP which has been known to be a substrate for kinase such as cdc2 kinase, was phosphorylated at two positions corresponding to ERK 1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) which are known as mammalian MAP kinase. The existence of MAPKK and MAP kinase were identified with western blotting at 0 hour culture of immature GV oocytes. The amount of those proteins did not increase during 40 hours of culture, which suggest that the increase of MAP kinase activity was caused by phosphorylation rather than due to change in protein amount. MAPKK and MAP kinase were shown to be dephosphorylated with deactivated at M 1 stage by inhibition of protein synthesis with cycloheximide added at the start following the culture. We have results that indicate the existedence of MAP kinase cascade which was activated simultaneously with start of porcine oocyte maturation (GVBD).

(Key words : Porcine oocyte, Polar body, Western blotting, MAP kinase, Phosphorylation)

#### I. 서 론

MAP kinase는 포유동물에 있어서 ERK (extra-cellular signal-regulated kinase)로서 불려지고 있지만 효모 (yeast)로부터 포유류에 이르기까지 아주 다양한 세포에 있어 세포내 signal 전달계로서 세포증식인자 (mitogen)의 자극에 의하여 공통적으로 활성화하는 kinase로서 cloning되었다 (Hoshi 등, 1988;

Ray와 Sturgill, 1988). 증식 자극 이외의 다양한 signal 전달계에 있어서도 활성화되어지는 것으로서, 예로서 PC<sub>12</sub> 세포에서는 신경성 성장인자 (nerve growth factor : NGF)에 의한 분화자극에 수반되어 활성화되어져 (Gotoh 등, 1990) 세포분화에 MAP kinase가 관여하는 것으로 알려져 있다. 뇌신경에서는 Hippocampus 유래 신경세포에 있어 aspragin acid 수용체 자극에 의하여 활성화 (Bading과 Greenberg, 1991)되며, 최근에는 그들의 (MAP kinase)

\* 경상대학교 축산진흥연구소(Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University)

기능에 주목되어지고 있다. MAP kinase는 signal 전달계에 있어서 상류부분 (5' frame)에 위치하는 kinase MAPKK에 의하여 threonine 및 serine 염기를 인산화 (Kosako 등, 1992; Matsuda 등, 1992, 1993)시켜 활성화 되어진다고 보고되고 있다. MAPKK는 MAP kinase 이외의 기질을 인산화 하는 능력만을 가지고 있을 뿐 MAP kinase를 직접 인산화하는 그 이외의 인자는 아직 알려지지 않고 있는 것으로 미루어 보아, MAP kinase는 항상 MAPKK와 함께 즉, MAPKK /MAP kinase cascade로서 기능을 발휘하고 있는 것으로 알려져 있다. MAPKK 자신은 다시 상류의 MAPKK kinase (MAPKK-K)에 의하여 serine 잔기의 인산화 자극을 받아 활성화 된다고 한다 (Matsuda 등, 1993; Ahn 등, 1993). 최근 MAPKK-K의 protoncogene 산물로 알려져 있는 Kaf (Nebreda와 Hunt, 1993; Posada 등, 1993; Shibuya와 Ruderman, 1993)나 Mos 등이 보고되어져 있다. 세포의 종류나 자극의 종류에 의하여 MAPKK를 인산화하는 기전은 각각 다르게 나타나지만 MAPKK로부터 MAP kinase에의 cascade는 진핵 생물의 세포내 signal 전달계에 있어 보편적으로 기능하고 있는 것으로 알려져 있다. 세포내에 있어서 MAP kinase의 직접적인 표적은 현재까지 잘 알려져 있지 않지만 Elk-1 등의 전사인자(transcription factor), p90 ribosome S6 kinase (p90RSK)(Sturgill 등, 1988), 미소관 결합단백질2 (microtubule associated protein 2: MAP2)(Ray와 Sturgill, 1987; Hoshi 등, 1988), 또는 미소관 결합단백질4 (Hoshi 등, 1992) 등의 세포골격계 단백질 및 핵막을 형성하여 주는 단백질인 lamin 등은 MAP kinase에 의하여 *in vitro*에서 인산화 되어지는 것으로 보고되고 있다 (Peter 등, 1992). *In vitro*의 MAP kinase assay에 있어서는 기질로서 myelin 염기성 단백질 (myelin basic protein: MBP)(Erickson 등, 1990)이 이용되어지고 있다. 현재까지는 MAP kinase가 직접 MPF를 활성화 시킨다는 보고는 전무한 실정이다. 그리하여 MAP kinase의 활성화와 MPF의 활성화와는 각각 독자적으로 인식되어져 왔다. MAP kinase의 활성화가 직접적으로 MPF의 활성화에 영향을 미치는 것으로서 *Xenopus*난에 한정되어 인식되어 왔다.

MAP kinase는 체세포에서의 signal 전달계에서만

생식세포의 분화과정에 있어 활성화 되는 것으로서, 즉 난성숙과정에 있어서 MAP kinase의 활성화에 관하여서는 *Xenopus* (Gotoh 등, 1991b; Posada 등, 1991), mouse (Sobajima 등, 1993; Verlhac 등, 1993, 1994)에서만 보고되어 있다. Mice 이외의 포유 동물에서는 난성숙과정에 있어서 MAP kinase의 활성화를 보고한 사실은 전무하며 그의 존재 및 기능은 거의 불투명한 상태이다. Mice난을 이용한 MAP kinase활성화는 *Xenopus*와는 다르게 GVBD후에 일어나는 것으로 보고되고 있지만 그의 활성화 pattern에 관한 보고는 일치하지 않고 있다 (Sobajima 등, 1993; Verlhac 등 1993, 1994). 체외성숙시킨 mouse난은 배양 개시 후 1시간 이내에 GVBD를 유지하고 단시간 내에 일어나기 때문에 kinase활성을 측정하기는 거의 어렵다고 알려져 있다.

돼지란에 있어서 성숙을 개시시킨 후 MPF활성화가 GVBD를 유지하는 전달경로에 있어서 MAP kinase cascade가 관여하고 있는지를 검토할 목적으로 본 실험을 수행하였으며 MAP kinase가 돼지란 성숙에 있어서 단백질 합성저해제 처리에 의한 난성숙의 저해시 MAP kinase활성에 미치는 영향을 검토하고, 그리고 단백질 합성저해제에 의하여 영향을 받은 인자가 MAP kinase 있는지를 검토할 목적으로 본 실험을 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난의 채취 및 체외성숙

도축장에서 채취한 돼지 난소를 37~39℃의 생리식염수(0.85%)에 담구어 연구실까지 (2 시간 이내) 운반하고 직경 2~5mm의 포상난포로부터 25 guage의 needle로 흡입하여 난자난구 복합체를 회수하였다. 회수한 난자난구복합체는 bovine serum albumin (fraction V : Wako)을 4mg/ml의 농도에서 Modified Krebs-Ringer Bicarbonate solution (mK-RB)(Toyoda 등, 1971)에서 세척하였다. 그 과정에서 2~3중의 균일한 난구세포에 싸여있는 난의 직경이 120 $\mu$ m 정도까지 충분히 성장하고 있는 난자난구 복합체만을 선별하여 배양하였다. 세척 및 배양은 mineral oil로 피복한 IWAKI 멸균 샤알레네의 배지액 중에 옮겨 성숙배지에는 PMSG (Peamex, Sankyo) 1

IU/ml을 포함한 pFF (pFF-PMSG)를 사용하고 37°C 5% CO<sub>2</sub>하에서 각각 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 및 50시간씩 각각 배양하였다. 배양후 mKRB solution에 0.1% Hyaluronidase (Type IV-S, Sigma)를 첨가하고 37°C에서 2~3분 경과한 후 pipetting에 의하여 난구피를 제거한 후, 난 적출액을 조제하고 MAP kinase 활성의 측정, Western blotting 및 gel 내 인산화법에 이용하였고, 또한 일부는 체외성숙의 진행을 경시적으로 해석하기 위하여 whole mount 표본을 작성하여 핵상을 판정하고 GV, PM 1, M 1, AT 1 및 M 2기의 각 시기별로 분류하였다.

## 2. 난적출액의 조제

각 배양시기별로 난을 수집하여 적출한 buffer에서 2회 세척을 실시하고 동일한 buffer내에서 난자가 50 개씩 포함되게 하여 -70°C에서 보존하였다. 이 stock용액을 MAP kinase 활성의 측정, Western blotting 및 gel내의 인산화법 분석에 사용하였다. 일부의 적출액은 난을 핵상에 의하여 분류한 후 stock용액을 작제하였고 난구를 제거한 난은 Hoechst-33342를 포함한 mKRB (10µg/ml)내에서 15~60분간 37°C의 조건하에서 염색한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심하고(Kubota 1700, RA-150) 형광현미경하에서 난성숙의 과정을 핵막 및 염색체의 상태별로 즉, GV, PM 1, M 1, HT 및 M 2기의 5시기별로 각각 분류하였다. 그리고 GV, PM 1 및 M 1기의 난을 배양 28~32시간후 AT 1 및 M 2기의 난은 배양 40~45시간째로 하였다.

## 3. MAP kinase 활성의 측정

Histone H1의 대신 MAP kinase의 기질로서 2mg/ml의 MBP (Sigma)를 이용하고 Histone H1 kinase활성 반응계 (Naito와 Toyoda, 1991)를 이용하였다. 한 vial당 난의 수는 0~20개, MBP의 최종 농도는 0.5mg/ml (21.8µM)로 조절하였다. 반응온도는 30°C, 시간은 0~15분간으로 하였고 반응정지로부터 비활성의 측정까지 방법은 Naito와 Toyoda (1991)의 방법과 동일하게 실시하였다.

## 4. Western blottig에 의한 MAP kinase의 검출

본 실험의 재료 및 방법 2에서 작제한 stock용액 5µ

에 25µl의 sample buffer (65mM Tris-HCl, 25% glycerol, 1mM DTT, 1% SDS, 0.2mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 30µl 되게 하고 100°C에서 3분간 heat denature를 실시하였다. 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 준하였으며 분리용 polyacrylamide gel의 조성은 375mM Tris-HCl, 0.1% TEMED, 10% acrylamide, 0.13% bis-acrylamide, 0.025% ammonium sulfate, 0.1% SDS로서 조제하였다. 농축 gel은 125mM Tris-HCl, 0.2% TEMED, 3% acrylamide, 0.04% bis-acrylamide, 0.025% ammonium sulfate, 0.1% SDS였다. 영동후 단백질을 microcellulose membrane에 blot하고, 5% skim milk를 포함한 TBS(pH 7.6)에서 12시간 4°C에서 blocking 하였다. 1차 항체는 mouse MAP kinase (ERK 1+2) monoclonal 항체 (Zymed Laboratory)를 2,000배 희석하고 4°C에서 12~15시간 동안 반응시켰다. 그리고 biotin화 항 mouse IgG 2차 항체와 Strepto kinase-alkali phosphatase복합체와 반응시켰으며 발색기질로서 BCIP/NBT를 가하여 signal을 검출하였다. 2차 항체 이후의 과정은 시판용 kit(Amersham)을 이용하였다.

## 5. Gel내의 인산화법에 의한 MAP kinase 활성의 검출

재료 및 방법 2)에서 조제한 stock용액 5µl에 PKA inhibitor를 0.5µM 되게 첨가하고, 20µl의 sample buffer (65mM Tris-HCl, 25% glycerol, 1mM DTT, 1% SDS, 0.2mM EDTA, pH 7.0)을 가하여 30µl 되게 조정하였다. 이 sample를 37°C에서 3분간 변성시킨 후 2.5mg/ml의 MBP를 포함한 polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 영동 후 gel을 100ml의 20% Isopropanol, 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 5mM β-mercapethanol에서 4시간동안 4°C에서 4회 세척을 실시하고, 변성된 MAP kinase를 재생시켰다. 인산화 반응액 (40mM HEPES, pH 8.0), 2mM DTT, 0.1mM EGTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5µM[γ-<sup>32</sup>P]dATP(10mCi/ml)에 gel을 침적시켜 1시간동안 28°C에서 반응시켰다. 반응종료 후 free상태의 [γ-<sup>32</sup>P]dATP를 제거하기 위하여 1회에 300ml씩 5% TCA 및 1% pyrophosphate acid Na에서 30분간씩 2시간의 세척과정을 5회 반복하였고 세척액 중의 방사

능 활성이 대부분 없어질 때까지 세척한 후, gel을 3M 여과지 위에서 건조시키고, X-ray film (Kodak)에서 현상하였다.

### 6. 단백질 합성저해제 처리를 실시한 난에 있어서 MAP kinase 및 MAPKK의 Western blotting

Washing작업이 끝난 난자난구 복합체를 30 또는 40시간 pFF-PMMSG에서 배양을 실시한 후 10 $\mu$ g/ml의 CHX를 포함한 배지에서 각각 20 또는 10시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 난적출액을 조제하고 Western blotting에 의한 MAP kinase 및 MAPKK를 검출하였다. 전기영동, blotting, blocking, 항체반응 및 발색의 각 과정은 재료 및 방법 4)의 조건과 동일하게 하였다. MAP kinase의 검출에는 1차 항체로서 rabbit 항 MAP kinase polyclonal항체 (K-23, Santa Cruz)를 500배 희석하여 사용하였고, 2차 항체는 biotin화 항 rabbit IgG항체 (Cappel)를 사용하였다. 그리고 MAPKK의 검출에는 1차 항체로서 항 MAPKK monoclonal 항체(clone 4A5, MBL)를 500배 희석하여 사용하였고, 2차 항체는 biotin화 항 mouse IgG항체 (Cappel)를 각각 사용하였다.

## III. 결 과

### 1. 체외성숙란에 있어서 MAP kinase assay계의 확립

Fig. 1(a)에서 나타난 바와 같이 0, 5, 10 및 20개의 난을 난적출액의 sample로 하고 기질로서 MBP, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]dATP를 가하여 30 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켰을 때  $^{32}$ PO $_4$ 가 MBP에 incorporated한 결과치로서 활성은 난자의 (0, 5, 10 및 20개)수에 비례하여 상승하였다. 한 sample당 난 20개씩 포함한 stock액을 조제하고 활성치 측정 직전에 한 vial당 10개씩 분리하여 각 sample 당 두 vial씩 분리하여 활성을 측정하여 두 vial로부터 얻은 활성치 평균을 구하였으며 1 난자당 1 분간 incorporated한 인산의 mol수로서 나타낸 결과이다. 그리고 (b)는 단 10개분의 적출액에 기질로서 MBP, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]dATP를 가하고 30 $^{\circ}$ C에서 0, 15, 30, 50, 100 및 150분간 반응시켰을때의  $^{32}$ PO $_4$ 가 MBP에의 incorporated한 변화를 나타낸 것으로서 50분까지는 거의 직선상으로 나타났지만 그후는 점차적

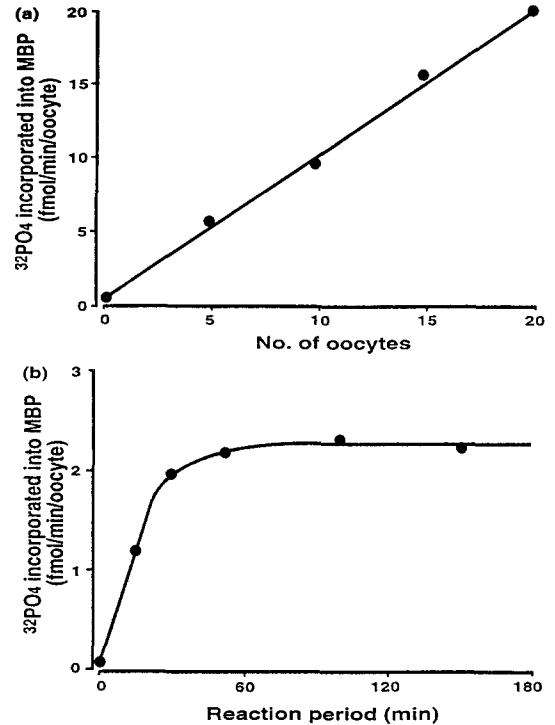
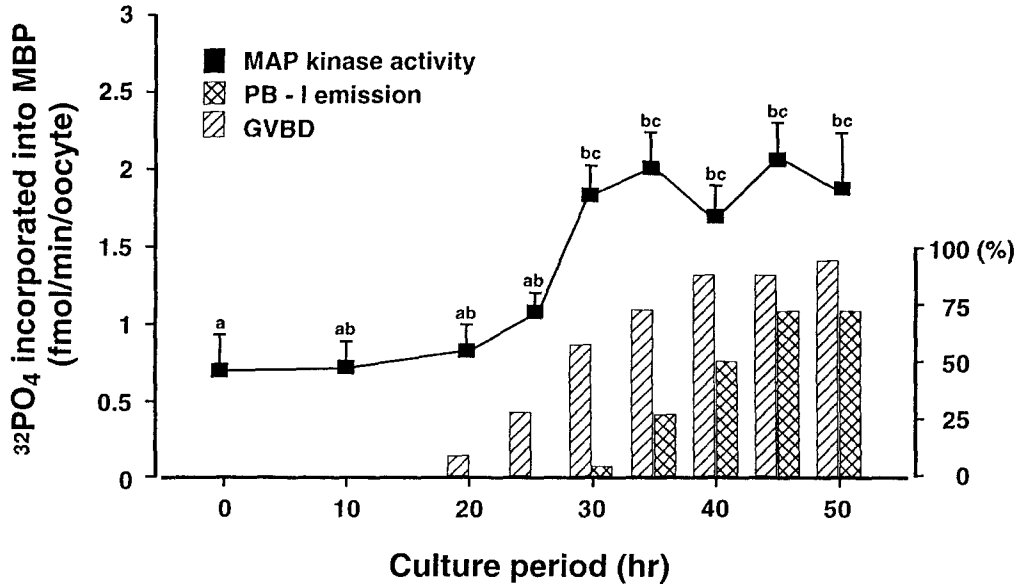


Fig. 1. Characteristics of MAP kinase in porcine oocytes. Cytosol preparations used were obtained from porcine follicular oocytes cultured for 45 hr in pFF-PM-SG. (a) Relationship between the number of oocytes per one assay vial and kinase activity. (b) Time course of MBP phosphorylation at 30 $^{\circ}$ C

으로 감소하는 경향이있기 때문에 본 실험에서는 최고치인 40분에서 결정하였다.

### 2. 난성숙과정에 있어서 MAP kinase 활성의 변동

Fig. 2는 MAP kinase 활성의 경시적 변화를 4회의 반복한 실험평균치로서, bar 그래프는 실선 column이 난포핵 붕괴를 나타낸 난자, 그리고 striped column은 제 1극체를 방출한 난자의 수치를 각각 0%로서 표시하였다. MAP kinase 활성은 난소로부터 채취한 직후의 미성숙란 (배양후 0시간)에서 낮고 그 후 배양 25시간째 MAP kinase 활성 상승은 거의 나타나지 않았다. 많은 난에서 GVBD를 유기하고 M



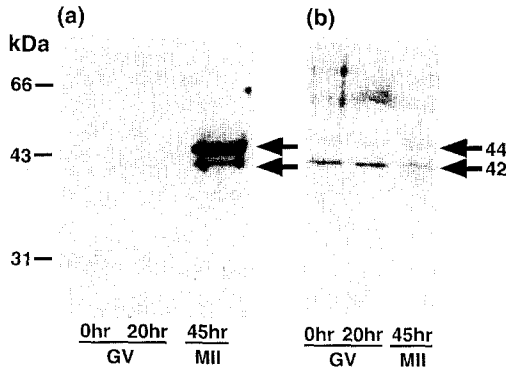
**Fig. 2. Changes in MAP kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes cultured in pFF-PMSG. After each culture, period the oocytes were collected and MAP kinase activity was assayed. Data are shown as mean  $\pm$  SEM of four experiments. Values with the same letters are not significantly different ( $P < 0.05$ ) as evaluated by Student *t*-test. The percentages of oocytes that had lost their germinal vesicles (striped columns) and that had extruded their first polar bodies (closed columns) were determined. GVBD; germinal vesicle breakdown, PB-I; first polar body**

1기로 진행되어질 30시간후에 활성은 급격하게 상승하였으며, 그후 50시간까지 계속되어 유의적 ( $P < 0.05$ )로 지속되는 경향이였다. 또한, 극체 방출시의 40시간 후에는 활성이 다소 감소하는 경향이였지만 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다. 이상의 결과로부터, MAP kinase는 GV기의 난에서 활성이 낮고 GVBD 재개시에 활성화 되어지는 경향으로서 M 1기에서 M 2기에 난성숙이 진행되는 과정중에 높은 활성이 지속되어지는 것으로 나타났다.

### 3. Gel내의 인산화법에 의한 MAP kinase 활성의 검출

Kinase 활성의 측정에 기질로서 이용한 MBP는 cdc2 등, MAP Kinase 이외의 기질로서도 이용되어진다고 보고되고 있다 (Peason과 Kemp, 1991). 또한, assay에 의하여 밝혀진 MAP Kinase 활성의 변

동 pattern은 histone h1 kinase 활성의 변동 (Naito와 Toyoda, 1991)에서와 거의 일치하는 결과였다. 이러한 활성치가 확실히 MAP kinase 활성을 반영하여 주는 것인지를 확인하기 위하여 gel내 인산화법에 의한 분석을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 방법은 기질로서 이용되어진 MBP용액을 SDS-PAGE에 의하여 단백질을 분리하고 분리되어진 변성 protein을 재생함으로써 gel내의 기질을 인산화 시킴으로써 kinase의 분자량과 활성과의 관계를 동시에 측정하는 방법으로써 보고되어지고 있다 (Kameshita와 Fujisawa, 1989; Gotoh 등, 1990, 1991a). Sample은 난소로부터 채취 직후를 배양 0시간 (미성숙란), 배양후 20시간 (난포핵 붕괴직전의 미성숙란) 및 배양후 40시간째의 난 (70%이상이 성숙란으로서 높은 MAP kinase 활성을 가지는 시기)을 각각 한 lane 당 50개씩 사용하였다. MBP는 45시간 후의 M 2 기간에서

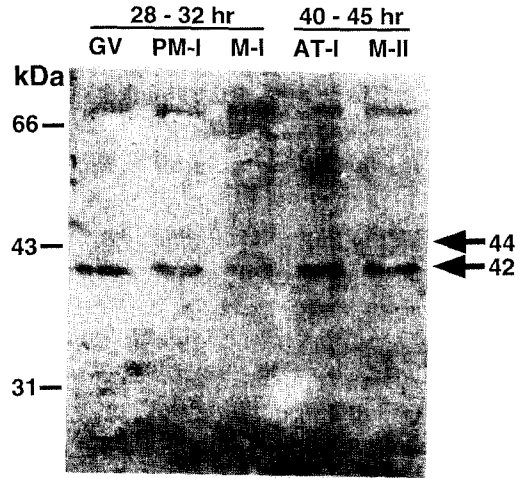


**Fig. 3.** Detection of MAP kinase by in-gel assay (a) and Western blotting (b). (a) Fifty oocytes collected at 0, 20 and 45 hr were subjected to SDS PAGE with MBP-containing gel. The enzymes were renatured, and kinase reaction was performed in the gel with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ . The gel was washed, dried and autoradiographed. (b) Detection of MAP kinase by immunoblotting. The oocytes collected at 0, 20 and 45 hr of culture were subjected to immunoblotting with anti-MAP kinase monoclonal antibody. GV: germinal vesicle, M II: second metaphase

MAP kinase의 분자량과 동일한 44 및 42kDa의 위치에서 인산화 되는 것으로 본 실험 결과 나타났다 (Fig. 3a). MBP의 인산화를 나타내는 band는 배양 0시간의 GV난에서는 전혀 검출되지 않았으며 배양후 20시간째의 난에서도 signal이 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 assay결과와 거의 일치하였으며, 이상의 결과로서 돼지란의 성숙과정에서 MBP를 기질로서 측정할 경우 MBP kinase 활성화만이 측정되어지는 것이 확인되었다.

#### 4. Western blotting에 의한 MAP kinase 단백질량의 분석

Gel내의 인산화법에 이용한 sample, 즉 배양후 0, 20 및 45시간후의 난에 대한 항 MAP kinase 항체를



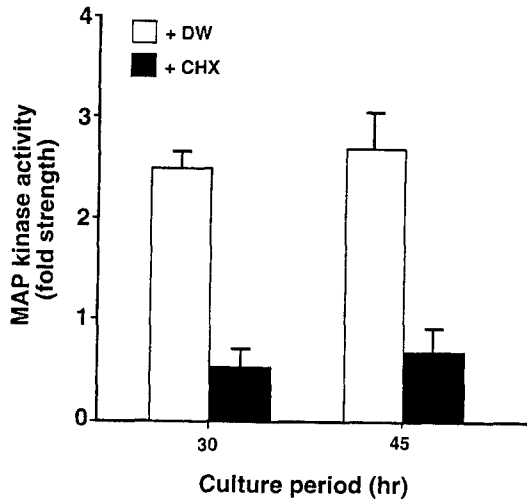
**Fig. 4.** Detection of MAP kinase by immunoblotting. The oocytes collected at 28~32 hr and 40~45 hr of culture were classified according to meiotic maturation stage and subjected to immunoblotting with anti-MAP kinase monoclonal antibody. GV: germinal vesicle, PM I: first prometaphase, M I: first metaphase, AT I: first anaphase-telophase, M II: second metaphase

이용한 Western blotting을 실시한 결과 Fig. 3b에 나타난 바와 같이 42kDa 및 44kDa의 2개의 band가 검출되었다. 이러한 결과는 배양후 0 및 20시간째의 GV난, 그리고 배양후 45시간째의 M 2난에서도 검출되었다. MAP kinase signal 강도는 어떠한 lane에서도 거의 일정하게 나타났으며 배양후 45시간의 난에서 2개의 band가 확실하게 감소되어지는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 MAP kinase가 인산화 되어 활성화 형태로 변화되고 있다는 것으로 시사되어진다. 핵상시기에 따라 분류된 난에 대하여서는 GV난 이외의 전 핵상에서 MAP kinase의 활성화를 나타내는 signal의 강도가 감소되었다(Fig. 4). 이상의 결과로서 돼지에서는 GVBD 직후부터 MAP kinase 단백질량은 배양시간의 경과 및 핵상에 관계없이 일정하였는데 이러한 결과는 MAP kinase활성의 상승이 단백질량의 증가에 의한 것이 아니고 인산화에 의한 것으로 확인되

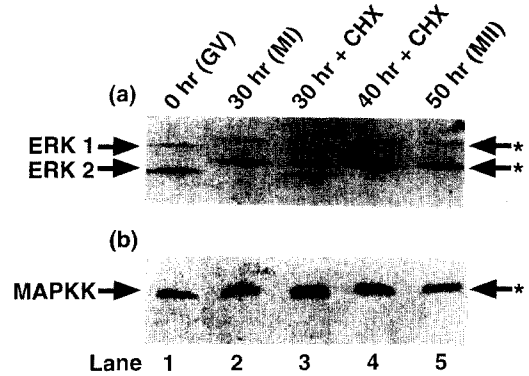
었다.

### 5. 단백질 합성저해제 처리에 의한 MAP kinase 및 MAPKK의 불활성화

배양 0시간째부터 CHX첨가 배지내에서 배양한 난에서는 배양후 30시간 또는 45시간째에 있어서도 MAP kinase의 활성화는 일어나지 않았다 (Fig. 5). Western blotting의 결과 (Fig. 6a), 배양 0시간 (lane 1)의 GV난에 있어서 검출되었던 2종류의 MAP kinase인 ERK 1 (44kDa) 및 ERK 2 (42kDa)는 배양후 30시간 (약 90%가 M 1기: lane 2) 및 50시간(93%가 M 2기: lane 5)의 난에서 인산화 (활성화)를 나타내는 이동도가 감소하는 경향으로 나타났다. M 1기, 즉 배양후 30시간으로부터 CHX 처리를 실시한 난 (lane 3)에서는 활성화 및 불활성화형의 band가 동시에 검출되었으며, 이때 MAP kinase 활성을 측정 한 결과로서는 배양 0시간의 난과 비교하였을 때 유의적 활성의 상승은 검출되지 않았다 (Fig.

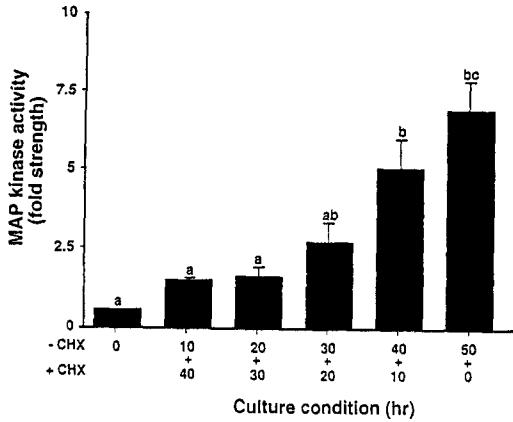


**Fig. 5. Changes in MAP kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes cultured in pFF-PMSG with distilled water (+DW) or with cycloheximide (+CHX, 10 $\mu$ g/ml). Data are expressed as fold strength of control (GV oocytes cultured for 0 hr). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM from three different replicated experiments**



**Fig. 6. Detection of (a) ERK1 (44kDa) and ERK2 (42kDa) and (b) MAPKK by immunoblotting. The oocytes were collected at each culture period, and subjected to immunoblotting with anti-MAP kinase polyclonal antibody (a) or anti-MAPKK antibody (b). Lane 1: GV-stage oocytes cultured for 0 hr, lane 2: M1 oocytes cultured for 30 hr, lane 3: oocytes cultured for 30 hr then treated with CHX for 20 hr, lane 4: oocytes cultured for 40 hr then treated with CHX for 10 hr and lane 5: M2 oocytes cultured for 50 hr. The electrophoretically retarded bands represent the phosphorylated (activated) forms of MAP kinase and MAPKK (arrows with an asterisk)**

7, 30+20의 column). 그리고 M 2기, 배양후 40시간째부터 CHX 처리를 실시한 난에서는 활성화형의 band만 검출되었고 (Fig. 6a, lane 4), MAP kinase도 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 활성화된 결과 (Fig. 7, 40+10 column)로 나타났다. 항 MAPKK 항체를 이용한 Western blotting의 결과 (Fig. 6b)도 배양 30시간 및 50시간째 활성화형의 이동도가 감소하는 결과로 나타나, M 1기 (30시간후)부터 CHX를 처리한 난에서는 불활성형의 band가, M 2기 (40시간후)부터 처리한 난에서는 활성화형의 band가 각각 검출되었다.



**Fig. 7. Changes in MAP kinase activity in porcine oocytes cultured in each condition. Data are expressed as folds strength of control (GV oocytes cultured for 0 hr) and as ANOVA results with different letters indicating a statistical difference ( $P < 0.05$ ) between treatments. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM from three experiments**

#### IV. 고 찰

난 성숙기에 있어서 MAP kinase 활성의 변동은 척추동물의 양생류인 *Xenopus* (Gotoh 등, 1991 b; Posada 등, 1991; Posada와 Cooper, 1992)와 포유동물의 mouse (Sobajima 등, 1993; Verlhac 등, 1993, 1994)에서 각각 보고되어지고 있다. *Xenopus*의 경우 GVBD 직전에, 그리고 mouse의 경우는 MAP kinase가 GVBD후에 활성화되어 감수분열의 전 과정을 통하여 높은 활성이 유지된다고 알려져 있다. 본 연구에 있어서 돼지난의 MAP kinase 활성을 측정할 결과 활성화 pattern은 이미 보고되어진 내용들과 일치하는 경향이었으며 GVBD에서 상승한 kinase 활성이 M 1기부터 M 2기에 이를때까지 계속적으로 높게 나타났다. 이러한 근거로부터 MAP kinase는 종(species)을 초월한 난성숙 과정에 있어 공통적으로 활성화되어지며 난성숙의 초기 발생에 있어 미지의 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 시사되어진다. 포

유동물 세포에서 MAP kinase는 2종류의 isoform이 존재하며 이들의 분자량은 44kDa의 ERK 1과 42kDa의 ERK 2로 알려져 있으며 mouse난 (Sobajima 등, 1993; Verlhac 등, 1993, 1994)에 있어서도 검출되어진 이 두 종류의 MAP kinase는 돼지란에서도 gel내의 인산화법 및 Western blotting에 의하여 검출되었고 (Fig. 3, 4 및 6b) 분자량도 일치하였다. Mouse와 같이 돼지에서도 이러한 두 종류의 kinase는 같은 시기에 같은 역할을 담당하며 활성화되고 있는 것으로 추측되어진다. Gel내의 인산화법에서 배양후 45시간째에 있어서 배양후 0 및 20시간째 나타나지 않았던 강한 signal의 검출은 (Fig. 3a) Western blotting에서는 거의 일정하게 나타났다 (Fig. 3b). 반면, band의 이동도가 45시간째 현저하게 감소되어 있었는데, 이러한 결과는 MAP kinase가 인산화되어 활성화한 상태로서 나타나는 것으로 보고되고 있다 (Posada와 Cooper, 1992; Shibuya 등, 1992a, b). 이러한 결과로부터 돼지란 성숙의 재개시에 수반되어 일어나는 MAP kinase 활성의 상승은 인산화에 의한 것으로 기인되어지며, 또한 MAP kinase 자신의 합성에 의한 양의 증가에 의한 것으로서 고찰되어진다. Verlhac 등 (1993)은 mouse난에 있어서 MAP kinase가 미소관 결합중심(microtubule-organizing center: MTOC)이나 방추체 극(spindle pole)에 국재하고, 감수분열의 진행시에 수반되어 미소관 및 엽체 상태 변화가 MAP kinase활성화에 의하여 일어나는 것으로서 MAP kinase의 활성화가 난성숙에 있어서 M기의 방추체 형성에 관여하고 있을 가능성이 매우 높은 것으로 보고하고 있다. 그리고 *Xenopus*난의 경우에 있어서는 MAP kinase 활성화는 성숙한 난을 M 2기에서 정지시키는 CSF (cytostatic factor)의 기능을 가진다는 사실이 보고되고 있다 (Haccard 등, 1993; Kosako 등, 1994). 반면 성숙의 전 과정을 통하여 MAP kinase의 활성화가 일어나지 않는 c-mos knockout mice 난에서는 M 2기에서 정지는 커녕 오히려 활성화되어지는 것으로 보고되어지고 있으며 (Colledge 등, 1994; Hashimoto 등, 1994) 수정후에 방출되어지는 제 2 극체를 M 2기에서 계속 방출함으로써 결국 M 3기 (Kubiak, 1992)의 상태에서 정지되어진다고 보고하였다 (Verlhac 등, 1996; Araki 등, 1996).



본 연구의 결과 돼지란에 있어서 높은 MAP kinase 활성은 M 1기에 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 상승하여 M 2기에 달하여서도 지속되어지는 결과로 미루어 보아 높은 MAP kinase 활성이 M 2기에 정지하는데, 다시 말하면 CSF의 기능을 발휘하고 있을 가능성이 매우 높은 것으로 사료되어진다. MAP kinase 활성이 정상인 M 1기 난에서 높지만 (Fig. 2) CHX 처리에 의하여 M 1기에서 성숙을 정지시킨 난에서는 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 낮게 나타났다 (Fig. 7). 그리고 Western blotting 결과 활성화의 저하는 단백질량의 감소에 의한 것이라기 보다는 탈인산화에 기인한 것으로 판단되어진다. 이와 같이, MAPKK도 CHX 처리에 의하여 탈인산화 되어짐으로써 활성화가 저하되는 것으로 나타났다 (Fig. 6b) 따라서 CHX 처리에 의한 M 1기에서의 성숙을 저해시킨 난에서는 인산화에 의하여 억제되어졌다는 것을 알수 있으며 배양후 30시간째부터 CHX 처리한 난은 M 1기에서 정지하고 방추체는 형태이상이었다. MAP kinase가 일반적으로 M 기 미소관의 형성에 관여하고 있는 사실과 관련지어 보면, 단백질 합성저해제에 의한 부(negative)의 제어를 받아 MAP kinase가 불활성화되어져 M기의 방추체가 형태 이상으로 나타나는가 하면, 또한 감수분열이 정지되는 것으로 고찰되어진다. 본 실험의 결과로부터 MAP kinase의 기능을 명백히 단정하기는 어렵지만 histone h1 kinase의 활성치에서 나타난 결과들과 종합하여 보면 MAP kinase cascade가 돼지란에서도 존재하고 난성숙에 수반되어져 그 활성도가 단백질합성저해제 처리에 의하여 영향을 받는 것으로 사료되어진다. 그리하여, 돼지란의 체외성숙에서는 첫째, GV난, 즉 미성숙에 있어서 MAPKK와 분자량 42kDa 및 44kDa (ERK 2와 ERK 1)의 2종류의 MAP kinase가 존재하고, 그 단백질량은 성숙의 각 단계를 통하여서는 변화하지 않는다는 점, 둘째, 감수분열의 재개시에 수반되어 MAP kinase cascade가 활성화되고, 성숙란까지 활성화 상태는 지속되어진다는 점, 셋째, MAP kinase cascade의 활성치 상승은 단백질량의 증가에 의한 것이 아닌 인산화에 기인한다는 점, 넷째, M 1기난에 있어서 MAP kinase cascade의 활성화를 유지 또는 지속시키는 기구는 단백질 합성저해제 처리에 의하여 억제되어진다는 사실이 본 실험결과 나타났다.

이상의 결과로부터, 돼지란에 있어 MAP kinase cascade의 존재와 성숙에 활성화가 수반되어진다는 것이 명백하여졌으며 활성 pattern이 다른 종의 보고와 일치하지만 이러한 MAP kinase 활성화의 상승이 *Xenopus*에서와 같이 난성숙을 제어하고 GVBD를 유지하는 것인지에 관하여는 보다 상세하게 검토되어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 적 요

돼지란의 성숙과정에 있어서 MAP kinase의 기능 및 존재 여부를 규명할 목적으로 돼지 체외성숙란에 있어서 MBP를 기질로서 사용하고 또한 MAP kinase assay계를 확립함과 동시에 그의 변동사항을 검토하였다. MAP kinase 활성은 배양후 20시간째까지는 낮게 나타났으나 난핵막 붕괴가 유지되어지는 25시간후부터 상승하기 시작하여 30시간 이후부터 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 활성치를 나타내었다. MBP는 cdc2 kinase 및 MAP kinase 이외의 효소의 기질로서 작용을 가지는지 검토한 결과, gel내의 인산화법에 의한 결과 MBP는 배양 45시간후 포유동물의 MAP kinase로 알려져 있는 ERK 1 (44kDa)과 ERK 2 (42kDa)의 분자량에 일치하는 위치에서 인산화되어 있었고 MBP를 이용한 본 실험계의 assay 결과도 MAP kinase 활성과 일치하였다. 그리고 Western blotting의 결과에서는 MAPKK 및 MAP kinase는 배양 0시간의 미성숙 GV난에서 존재하며, 배양후 45시간째까지 단백질량은 일정하게 유지되며 변동되지 않았다. 본 실험의 결과로부터 MAP kinase 활성의 상승은 인산화에 의한 것으로서 단백질량의 증가에 의한 것이 아니라는 것이 확인되었다. 또한 배양 0시간부터 단백질 합성을 저해하면 MAP kinase는 활성화 되지 못할 뿐 아니라 M1기에서 활성화하고 있는 MAPKK 및 MAP kinase는 단백질 합성 저해제 처리로 인한 탈인산화되어 불활성화 되는 것으로 나타났다.

이상의 결과로서, 돼지란 성숙과정에 있어서 MAP kinase cascade가 존재하고 MAP kinase cascade는 난성숙개시(GVBD)에 수반되어 활성화되며 그 활성화는 단백질저해제 처리에 의하여 영향을 받는 것으로 나타났다.

## VI. 인용문헌

1. Ahn, N. G., R. Seger and E. G. Krebs. 1993. The mitogen-activated protein kinase activator. *Current Opinion in Cell Biology*, 4:992-999.
2. Araki, K., K. Naito, S. Haraguchi, R. Suzuki, M. Yokoyama, M. Inoue, S. Aizawa, Y. Toyoda and E. Sato. 1996. Meiotic abnormalities of *c-mos* knockout mouse oocytes; activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biology of Reproduction*, 55:1315-1324.
3. Bading, H. and M. E. Greenberg. 1991. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science*, 253:912-914.
4. Colledge, W. H., M. B. L. Carlton, G. B. Udy and M. J. Evans. 1994. Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*, 370:65-67.
5. Frickson, A. K., D. M. Payne, P. A. Martino, A. J. Rossomand, J. Shabanowitz, M. J. Weber, D. F. Hunt and T. W. Sturgill. 1990. Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 265:19728-19735.
6. Gotoh, Y., E. Nishida, T. Yamashita, M. Hoshi, M. Kawakami and H. Sakai. 1990. Microtubule-associated protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *European Journal of Biochemistry*, 193:661-669.
7. Gotoh, Y., E. Nishida, S. Matsuda, N. Shiina, H. Kosako, K. S. Hiokawa, T. Akiyama, K. Ohta and H. Sakai. 1991a. *In vitro* effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. *Nature*, 349:251-254.
8. Gotoh, Y., K. Moriyama, S. Matsuda, E. Okumura, T. Kishimoto, H. Kawasaki, K. Suzuki, I. Yahara, H. Sakai and E. Nishida. 1991b. *Xenopus* M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF. *EMBO Journal*, 10:2661-2668.
9. Haccard, O., B. Sarcevic, A. Lewellyn, R. Hartley, L. Roy, T. Izumi, E. Erickson and J. L. Maller. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science*, 262:1262-1264.
10. Hashimoto, N., N. Watanabe, Y. Furuta, H. Tamemoto, N. Sagata, M. Yokoyama, K. Okazaki, M. Nagayoshi, N. Takeda, Y. Ikawa and S. Aizawa. 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in *c-mos*-deficient mice. *Nature*, 370:68-71.
11. Hoshi, M., E. Nishida and H. Sakai. 1988. Activation of a  $Ca^{2+}$ -inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro* by growth factors, phorbol esters and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 263:5396-5401.
12. Hoshi, M., K. Ohta, Y. Gotoh, A. Mori, H. Murofushi, H. Sakai and E. Nishida. 1992. Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *European Journal of Biochemistry*, 203:43-52.
13. Kameshita, I. and H. Fujisawa. 1989. A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, 183:139-143.
14. Kosako, H., Y. Gotoh, S. Matsuda, M. Ishikawa and E. Nishida. 1992. *Xenopus* MAP kin-

- ase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO Journal*, 11:2903-2908.
15. Kosako, H., Y. Gotoh and E. Nishida. 1994. Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the Mos-induced metaphase arrest. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 28354-28358.
  16. Kubiak, J.Z., M. Weber, G. Geraud and B. Maro. 1992. Cell cycle modification during the transition between meiotic M-phase in mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, 102: 457-467.
  17. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
  18. Matsuda, S., H. Kosako, K. Takenaka, K. Moriyama, H. Sakai, T. Akiyama, Y. Gotoh and E. Nishida. 1992. *Xenopus* MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *EMBO Journal*, 11:973-982.
  19. Matsuda, S., Y. Gotoh and E. Nishida. 1993. Phosphorylation of *Xenopus* mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase and MAP kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 268:3277-3281.
  20. Naito, K. and Y. Toyoda. 1991. Fluctuation of histone:467-473.
  21. Nebreda, A. R. and T. Hunt. 1993. The *c-mos* proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO Journal*, 12:1979-1986.
  22. Pearson, R. and B. Kemp. 1991. Protein phosphorylation site sequences and consensus specificity motif: tabulations. *Methods in Enzymology*, 200:62-81.
  23. Peter, M., J. Sanghera, S. Pelech and E. Nigg. 1992. Mitogen-activated protein kinase phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34cdc2. *European Journal of Biochemistry*, 205:287-294.
  24. Posada, J., J. Sanghera, Pelech, R. Aebersold and J. A. Cooper. 1991. Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinase during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 11:2517-2528.
  25. Posada, J., N. Yew, N. G. Ahn, G. F. Vande Woude and J. A. Cooper. 1993. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase *in vitro*. *Molecular and Cellular Biology*, 13:2546-2533.
  26. Posada, J. and J. A. Cooper. 1992. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science*, 255:212-215.
  27. Ray, L. and Sturgill. 1987. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*. *Proceeding of the National Academy Science, USA*, 84:1502-1506.
  28. Ray, L. and Sturgill. 1988. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 263:12721-12727.
  29. Shibuya E. K., T. Boulton, M. Cobb and J. V. Ruderman. 1992a. Activation of p42 MAP kinase the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO Journal*, 11:3963-3975.
  30. Shibuya, E.K., A. J. Polverino, E. Chang, M. Wigler and J. V. Ruderman. 1992b. Oncogenic Ras triggers the activation of 42-kDa mitogen-activated protein kinase in extracts of quiescent *Xenopus* oocytes. *Proceeding of the National Academy Science, USA*, 89:9831-9835.
  31. Shibuya, E. K. and J. V. Ruderman. 1993.

- Mos induces the *in vitro* activation of mitogen-activated protein kinase in lysate of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Molecular Biology of the Cell*, 4:781-790.
32. Sobajima, T., F. Aoki and K. Kohmoto. 1993. Activation of mitogen activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97:389-394.
33. Sturgill, S. W., J. B. Ray, E. Erikson and J. L. Maller. 1988. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 334:715-718.
34. Verlhac, M. H., H. Pennart, B. Maro, M. Cobb and H. Clarke. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, 158:330-340.
35. Verlhac, M. H., J. Z. Kubiak, M. Weber, G. Geraud, W.H. Colledge, M. J. Evans and B. Maro. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*, 122:815-822.
- (접수일자 : 1998. 7. 30. / 채택일자 : 1998. 8. 30.)