

## 동물학논단

### 포유류의 난소 및 수정의 과정에서 당쇄연구의 현황과 전망



추 영 국

- 1982~1989 대구대학교 생물학과 (이학사)
- 1989~1991 대구대학교 대학원 발생공학전공 (공학석사)
- 1992~1995 일본 동경공업대학(T.I.T) 대학원 분자발생학전공 (이학박사)
- 1995~1996 일본 이화학연구소(RIKEN) 당생물학연구실 연구원
- 1997~현재 일본 이화학연구소(RIKEN) 국제 공동연구원
- 1996~현재 원광대학교 자연과학대학 생명과학부 조교수

20세기 생명공학의 주류를 이루고 있는 단백질과 핵산의 그늘에 가려 그동안 관심의 대상에서 조금 벗어나 있었던 당쇄(Gn, Carbohydrate chain)가 20세기 후반부터 그 생물학적 기능이 하나 들씩 밝혀 지면서 단백질과 핵산만으로는 해결할 수 없는 생명현상을 명확하게 밝힐 수 있는 물질로서 그 모습을 드러내기 시작하였고, 당쇄의 기능을 연구하는 당쇄생물학(glycobiology)과 이를 응용하고자 하는 당쇄공학(glycotechnology)은 21세기에 있어서 생명과학의 중요한 한분야가 될 것으로 인식되고 있다. 세포와 세포가 만나는 곳에는 필히 당쇄가 관여하고 있다고 알려진다. 보다 분명히 말하자면, 생물의 정보를 축적하고 있는 핵산은 주로 세포의 핵에 존재하지만, 당쇄는 세포와 세포와의 정보전달과 접착에 관계하고 있기 때문에 주로 세포의 바깥쪽에 존재한다(Hakomori, 1981). 현재 분자세포학에서 말하는 당쇄는 종래 복합다당이라고 불렀던 당과 타의 분자와의 복합체에서 당의 부분을 가리키고, 동물세포에 의해서 만들어지는 복합다당에는 당단백질(glycoprotein), 당지

질(glycolipid), 프로테오글리칸(proteoglycan)이라고 하는 3종류가 알려지고 있다. 그리고 이들 당쇄는 현재 발생, 형태형성, 항상성의 유지, 감염, 병태라고 하는 다세포생물에 특이적인 세포기능에 깊게 관여하고 있다는 것이 보다 분명해지고 있다(Okada *et al.*, 1985; Bremer *et al.*, 1986; Hanada *et al.*, 1992). 당쇄를 중재하고 있는 인식기구는, 생체내에서 특정세포의 특이적정보전달과 세포들간의 특이적인 인식에 중요한 역할을 담당하고 있다(Huang, 1978; Blackburn and Schnaar, 1983). 특히 최근 10년동안 스펅고당지질은 암면역연구자의 강한 관심을 불러모아 상세히 조사되어지게 되었다(Hakomori, 1984, 1991; Irimura *et al.*, 1993). 그리고 현재는 암과 기타의 질병에서 이들이 담당하는 역할뿐만 아니라, 세포의 통상의 생명과정에서도 이들의 기능이 하나 둘 밝혀지고 있다. 여기에서는 그동안 관심의 대상이었으나 최근에 주목을 받고 있는 난소와 수정에 있어서의 당쇄에 관한 최근의 연구결과들을 중심으로 소개하고자 한다.

#### 1. 난소에서의 당쇄

근년 당쇄연구에서 특히 암의 연구와 관련하여 주목을 받고 있는 스펅고당지질에 대해 간단히 살펴보자면, 이것은 이전부터 알려져 왔지만 최근까지만 해도 이들 분자에 관심을 기울이는 연구자는 많지 않았다. 그 이유중 하나는 지금까지 이들의 생물학적 기능이 분명하게 알려지지 않았기 때문이었다. 그러나 최근 10년동안 행해졌던 많은 당쇄연구에 의해서, 악성 종양이 발생할 때에는 혈액형물질과 기타의 항원의 내부는 무엇인가에 의해 수식을 받기도 하고, 또 부적절하게 표현되기도 하는데 바로 이것이 스펅고당지질인 것으로 밝혀지면서 현재는 세포의 통상의 생명과정에서 이들의 기능이 세계도처에서 관심의 대상

으로 떠오르고 있다.

그 한 예로서, 포유류의 생식기관중 난소는 스펅고당지질이 풍부하고, 특히 배란에서 이들은 중요한 역할을 담당할것이라는 것이 현재 시사되어지고 있다(Choo et al., 1995). 즉, 저자의 최근의 연구에서 배란주기가 진행되는 동안 난자를 함유하고 있는 난포는 시알산(sialic acid)을 함유하고 있는 스펅고당지질인 gangliosides가 풍부하고, 또한 이들의 분포 및 양은 배란주기에 따라 변화한다는 것을 알았다. 그리고 이어진 연구에서 난포의 세포죽음이 진행되는 동안 ganglioside GM3가 난포의 과립막세포에서 공간적, 시간적으로 특이하게 발현된다는 사실 또한 발견하였다(Choo, 1996). 이러한 사실은 당지질중 ganglioside는 세포분화, 세포접착, 그리고 세포의 죽음에 중요한 역할을 담당하고 있을것이라는 사실을 강하게 시사해 준다. 현재는 이들 결과들을 토대로 난소에서 당쇄의 기능을 좀더 구체적으로 밝히기 위해 FSH와 LH에 의해 유도되는 난소세포들에서 ganglioside의 효과에 대한 연구를 계획하고 있다. 또한 이외에 암화와 직접적으로 관련된 당쇄전이효소를 이용 이 당전이효소의 조직내에서의 mRNA분포에 관한연구도 병행하고 있는데 이러한 연구가 성공적으로 이루어 진다면 스펅고당지질 중에서 특히 최근 암의 전이 및 세포간 정보전달에 중요한 gangliosides의 좀더 자세한 기작이 밝혀지리라 기대해 본다.

## 2. 수정에 있어서의 당쇄

포유류에서 난자는 배란주기에 따라 배란된후 난소에서 난관으로 이동하여 수정이 일어나는데, 수정은 난자와 정자가 만나서 자웅전핵이 융합할 때까지의 일련의 과정이다. 수정은 ① 정자가 난자로 접근, ② 정자와 난자의 접합, ③ 정자와 난자의 세포막 융합, ④ 정자가 난자로 침입, ⑤ 자웅전핵의 융합이라는 5개의 과정으로 분류된다. 이 중에서 ②에서 ③의 과정에는 당쇄를 중재하고 있는 인식기구가 분명히 존재하고 있다고 생각된다.

포유류 난자의 외측에는 투명대라고 불리는 당단백질로 이루어진 층이 있다. 정자는 먼저, 이 투명대와 특이적으로 결합해, 이 결합을 신호로

하여 침체반응이 일어난다. 침체반응은, 정자의 전단부에 있는 침체막이 세포막과 융합해 열려져서 그 내용물들이 바깥으로 방출되는 반응이고, 정자는 이 방출물의 작용에 의해 투명대를 관통하여 세포막에 도달하게 된다. 또한 침체반응에 의해 노출된 침체내막이 난자의 세포막과 융합하기 때문에, 침체반응은 난세포막과 융합하는 정자세포막을 노출시키는 과정이기도 하다. 이와같은 일련의 과정에서, 난자와 정자의 특이적인 인식의 제 일보는 정자와 투명대의 결합이다.

생쥐의 투명대는 ZP1, ZP2, ZP3라고 불리는, 분자량이 각각 20만, 12만, 8만 달톤의 3종류의 당단백질로 이루어져 있다. 이 중에서, 정자와의 결합과 침체반응의 유도에는 ZP3가 관여하고 있다는 것은 분명한 것 같다. 생쥐에 있어서 정자와 ZP3와의 상호 작용에 관해서는 두가지가 시사되어지고 있다. 하나는 ZP3분자중의  $\alpha$ -갈락토스를 비환원 말단에 포함하는 분자량 약 3900의 mucin형당쇄와 정자측의 분자량 56kDa의 단순단백질(SP 56)의 상호작용에 따라서 결합이 일어난다는 것이다(Wassarman, 1994).

또 하나는 Shur 등에 의한 것인데, 이것은 정자두부의  $\beta$ 1-4갈락토스 전이효소(60 kDa)가 투명대의 갈락토사미노글리칸 당쇄말단의 N-아세틸글루코사민을 인식한다는 것이다. 그러나 생쥐의 투명대에 관해서는 얻을 수 있는 당단백질의 양이 소량이고, 또한 ZP3중의 비환원말단에 N-아세틸글루코사민을 갖는 Asn결합형 또는 mucin결합형당쇄가 있다라고 하는 실제적인 증거는 아직 없다.

Mori 등은 돼지를 재료로해서 투명대의 Asn결합형당쇄의 분석을 행한 결과, 돼지의 투명대는 90K, 55K  $\alpha$ , 55K  $\beta$ 라고 불리는 3종류의 당단백질로 이루어져 있고, Asn결합형당쇄는 어느것에도 포함되지만, mucin형 당쇄는 55K  $\alpha$ , 55K  $\beta$ 만이 포함된다는 것을 알았다(Mori et al., 1992). 이어서 Mori 등은 Asn결합형당쇄의 중성획분을 렉틴친화성겔럼, Bio-Gel P-4겔럼에 의해 분획해서, 당쇄구조를 해석했다. 그 결과, 중성당쇄획분에는 31종류의 당쇄가 함유되어져 있는 것을 알았다. Mori등은 이들 당쇄의 특징을 아래와 같이 정리하고 있다.

- 1) 높은 만노스형 당쇄는 포함되어 있지 않고 모두는 복합형당쇄이다.
- 2) 모든 당쇄는  $\alpha$  fucose를 포함하는 트리만노실코아 (Man3-GlcNAc-Fuc-GlcNAc)를 골격으로 한다.
- 3) 복합형2본쇄, 2, 4-분지3본쇄, 2, 6-분지3본쇄, 4본쇄의 존재비는 4:2:1:1이다.
- 4) 중성당쇄의 26%는 N-아세틸락토사민의 반복 구조를 함유한다.
- 5) 39%의 당쇄는 비환원말단가락토스를 잃고, 노출한 N-아세틸글루코사민을 갖는다. 또한 산성당쇄는 Fig. 2의 당쇄에 시알산과 유산이 결합한 것으로 추정되었다.

Mori 등은 노출한 N-아세틸글루코사민잔기 때 높은 비율로 존재하기 때문에, 정자의 가락토스전이효소에 이 당쇄가 인식되어, 정자와 투명대의 최초의 결합이 일어난다는 것을 확인하기 위해서, 돼지의 정자에 가락토스 전이효소가 존재하는지 여부를 조사했다. 그 결과 돼지정자에도 이 효소가 존재한다는 것과, 또 이 효소가 투명대 당단백질에 락토스를 전이한다는 것을 확인했다. 또 락토스 전이효소의 N-아세틸글루코사민잔기로의 친화성을 잃게 하는 저해제가 정자와 난자의 결합을 저해한다는 것을 확인했다.

이상의 결과는 정자와 난자투명대와의 결합에 대해서는, 정자의 표면에 발현하고 있는 가락토스전이효소와 투명대의 Asn결합형당쇄와의 특이적인 인식이 관여한다는 가능성을 강하게 시사하고 있다. 실제 정자와 난외피 당쇄와의 결합에 관여하는 정자측의 인식분자가, 효소인 예는 멧게에서도 나타나고 있다. 돼지의 정자에는 fucose에 친화성을 갖는 분자량 53 kDa의 단백질이 존재하고, 이 물질은 침체로부터 유리되는 투명대를 녹이는 단백질분해효소, 즉 acrosin의 전구체인 proacrosin인 것으로 드러났다. 또한, 이 물질의 천연 ligand는 아직 불분명하지만, 텍스트란유산과 결합하는 것으로 보아 유산화 당쇄 또는 fucose함유당쇄를 인식하고 있다고 생각되어진다.

이상으로부터 포유류의 수정이 진행되는 동안, 정자와 난자의 결합에서 세포막의 융합에 이르는 과정에서는, 정자가 갖는 당쇄인식효소가 난자의

투명대의 당쇄를 차례차례로 인식하고 있다고 생각된다.

생쥐에 있어서 정자와 난자의 인식에 O결합의 당이 관계하고 있다는 최근의 발견은 척추동물 뿐만 아니라 무척추동물과 식물에 있어서도 배우자 인식의 상호작용에 당이 중요하다는 지금까지의 결과들을 더욱더 신빙성 있게 해주고 있다. 실제로, 해산무척추동물의 난자에서, 당은 정자의 종특이적결합에 관여하고, 침체반응을 일으키는 데 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 해산무척추동물의 *Ciona intestinalis*와 갈조류의 *Fucus serratus*에서는 당이 배우자 상호반응에서 중요한 역할을 담당하고 있다는 사실도 있다.

### 3. 피임과 불임치료에로의 응용 가능성

최근에, 포유류의 수정에 관한 분자수준에서의 많은 의문이 해명되어 지고 있지만, 아직 몇 개 인간의 문제가 생물학자들을 바쁘게 만들고 있다. 이들 미해결의 문제를 해결하기 위한 유효한 기술도 진보되어지고 있다. 예를 들면, Kinloch와 Dean의 그룹은 ZP3를 코딩하는 유전자를 크론화했다. 이와 같은 크론을 이용하면, 난자의 형성시에 정자 수용체의 생산을 조절하는 세포인자와 DNA의 배열을 밝혀 낼 수 있을 것이다. 또한 최근 Wassarman과 Dean의 공동연구에 의해 ZP3폴리펩티드쇄의 모든 아미노산 배열이 결정되었다 (Wassarman, 1994).

이 정보는 ZP3의 정자 수용체-활성, 침체반응의 유기, 투명대의 필라멘트의 구성에 관계하고 있는 특이적인 부위를 밝히는데 매우 용이할 것이다. 현재 이들은 투명대반응을 촉매하는 것으로 생각되는 표층립효소를 단리하는 연구를 하고 있다. 그리고 또한, ZP3의 O결합올리고당을 인식하는 정자의 난결합단백질을 단리하는 것과, 이것에 정자가 인식하는 ZP3상의 O결합올리고당의 3900Da의 당배열을 결정하고자 시도하고 있다. 그리고 최후에는 생쥐의 수정에서 해명된 분자적인 연구를 인간의 수정에까지 넓히려고 하고 있다.

인간에 있어서 수정의 분자적인 연구는 정자수용체와 난자결합단백질의 결합을 저지한다고 하는 새로운 피임법에 초점을 맞추고 있다. 또한

이 연구는 난자와 정자의 분자적 이상의 원인으로 발생하는 불임의 치료에도 응용가능할것으로 기대된다. 생쥐와 다른 동물에 있어서 당쇄와 관련된 수정의 연구는 보다 폭넓은 지식을 산출해 낼 것임에 틀림이 없을 것이다. 그리고 또한 정자와 난자사이에 일어나는 초기의 상호작용에서 당쇄의 지속적인 연구를 해나간다는 것은 가까운 미래에 세포간의 상호작용 일반의 연구에 신선하고 중요한 지식을 전달하리라 보아진다.

### 참 고 문 헌

- Blackburn, C.C. and Schnaar, R.L. 1983. Carbohydrate-specific cell adhesion is mediated by immobilized glycolipid. *J. Biol. Chem.*, 258: 1180-1188.
- Bremer, E.G., Schlessinger, J. and Hakomori, S. 1986. Ganglioside-mediated modulation of cell growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, 261: 2434-2440.
- Choo, Y.K., Chiba, K., Tai, T., Ogiso, M. and Hoshi, M. 1995. Differential distribution of gangliosides in adult rat ovary during the oestrous cycle. *Glycobiology*, 5: 299-309.
- Choo, Y.K. 1996. The differential distribution of ganglioside GM3 in atretic follicles during follicular development of adult rat ovary. *Korean J. Zool.* 39: 410-418.
- Florman, H.M. and Wassarman, P.M. 1987. O-Linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Science*, 235: 553-560.
- Hakomori, S. 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 733-764.
- Hakomori, S. 1984. Tumor-associated carbohydrate antigens. *Annual Rev. Immun.*, 2: 103-126.
- Hakomori, S. 1991. Possible functions of tumor-associated carbohydrate antigens. *Current Opinion in Immunology*, 3: 646-653.
- Hoshi M., De Santis R., Pinto, M.R., Cotelli, F. and Rosati, F. 1985. Sperm glycosidases as mediator of sperm-egg binding in the ascidians. *Zool. Sci.*, 2: 65-69.
- Hoshi, M., Takizawa, S and Hirohashi, N. 1994. Glycosidases and ascidian fertilization. *Dev. Biol.*, 5: 201-208.
- Irimura, T., Nakamori, S., Matsushita, Y., Taniuchi, Y., Tsuji, T., Izumi, Y., Kawamura, Y., Hoff, S. D., Cleary, K.R and Ota, D.M. 1993. Colorectal cancer metastasis determined by carbohydrate-mediated cell adhesion: Role of sialyl-Le<sup>x</sup> antigens. *Seminars in Cancer Biology*, 319-323.
- Hanada, K., Nishijima, M., Kiso, M., Hasegawa, A., Fujita, S., Ogaea, T. and Akamatsu, Y. 1992. Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster. *J. Biol. Chem.*, 267: 23527-23533.
- Huang, R.T.C. 1978. Cell adhesion mediated by glycolipids. *Nature*, 276: 624-626.
- Jeffrey, D.B and Wassarman, P.M. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20: 873-882.
- Miller, D.J. and Shur, B.D. 1994. Molecular basis of fertilization in the mouse. *Semin. Dev. Biol.*, 5: 255-264.
- Mori, E., Takasaki, S., Hedrick, J. L., et al. 1992. *Biochemistry*, 30: 2078-2087
- Okada, Y., Matsuura, H. and Hakomori, S. 1985. Inhibition of tumor cell growth by aggregation of a tumor-associated glycolipid antigen: a close functional association between gangliotriaosylceramide and transferrin receptor in mouse lymphoma L-5178Y. *Cancer Res.*, 45: 2793-2801.
- Sawada, H. 1990. Sperm penetration through the vitelline coat in ascidian, in *Advances in Invertebrate Reproduction 5* (Hoshi M, Yamashita O, eds), pp 111-116. *Elsevier, Amsterdam*
- Wassarman, P.M. 1994. Fertilization in mammals. *Sci. Amer.*, (일본어판), 52-60.
- 의약품부작용 피해구제. 연구진흥기금, 당쇄공학과 의약품 개발, 1996. pp 32-90. 약업시보사, Tokyo.