

소 난포란의 체외성숙시 Plasminogen Activator의 생산에 관한 연구

최 선 호

축산기술연구소

1. Plasminogen activators의 연구적 배경

정상적인 모든 세포의 homeostasis(항상성유지)는 세포외부의 단백질분해의 조절에 의해 유지되며 세포의 성장을 위해 중요한 역할을 한다. 정상적인 조절기구의 불균형은 연속적인 질병발생을 야기시킨다. 세포는 특이단백질 분해 효소의 분비나, 특이 또는 비특이 단백질인 inhibitor의 분비에 의해 조절될 수 있다. 즉 이러한 기구를 통하여 세포에서 전효소가 효소로 전환하거나 또는 세포외부의 signal을 불활성화시켜 효소의 활성을 변성시키고, 세포표면의 단백질의 변성 등, 세포외부기질과의 상호작용을 조절할 수 있다. 여기서 여러 가지 생물학적 과정중 중심적 역할을 하는 것이 plasminogen activators(PAs)와 그 inhibitor(PAI)이다. 그것들의 역할에 있어서, 세포의 정상적인 과정중에는 혈관의 섬유소 분해작용(fibrinolysis), 배란, 세포의 성장과 분화 등의 작용이 있고, 또는 질병적 과정중에는 암, 염증성질환에 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. PA는 외부자극조건에 따라 과립막세포, 헤파세포, 맥관내막세포, 난자, 혈청 그리고 암세포 등을 이용하여 분비 또는 억제에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔다. 특히 소, 돼지의 미성숙 난포란의 체외성숙시 protein kinase A(PKA)와 protein kinase C(PKC)에 의해 변화를 하는 것으로 보고되고 있으며, mouse에서는 체외성숙 과정중 생산되는 것으로 보고되었고, rat에서는 호르몬의 자극에 의해 생산이 증가되는 것으로 보고되었다. 최근에는 복제 염소의 유즙에서 인간의 혈액 단백질인-항체와 용혈에 영향을 미치는- PAs의 생산을 시도하고 있다. PAs는 그 분자량, 분자생물학적인 성질과 fibrin과의 친화도에 의해 urokinase type plasminogen activator(uPA)와 tissue type plasminogen activator(tPA)로 나뉜다.

tPA는 혈관에서 섬유소분해작용이 일어날 때, 주요 매개물로서의 역할을 하는 것으로 명확히 밝혀졌으며, 종양세포의 내피세포에 의해 합성되거나 분비

되는 것으로 알려져있다. 사람의 경우, 이 효소는 8번 염색체에 있는 유전자의 전사에 의해 단쇄상 단백질로서 합성된다. tPA는 분자량 70,000의 전효소로서 합성하고, 효소의 단쇄상은 성숙 tPA로 전환하기 위해 수차례의 변위가 이루어진다. 이 분자는 disulfide bond에 의해 연결되어 있고, polypeptide chain의 수급에 따라 단백질 분해적 변성이 가능하며, small chain (Mr=30,000)은 촉매 부를 가지고 있으며, heavy chain (Mr= 40,000)은 이 효소가 가지고 있는 그 밖의 활성 영역이 포함되어 있다.

uPA는 PA 중 두 번째로 중요한 물질이며, 그 이름은 최초 뇨(urine)에서 발견되어 그렇게 불려지기 시작했으며, 사람의 경우 염색체 6번과 10번에 위치한다고 보고되고 있다. 이 효소는 단쇄상으로 합성되고, 단쇄상의 당단백으로 분비된다. tPA와는 달리 단쇄상 uPA는 활성이 약하기 때문에 높은 활성을 가지는 disulfide-link의 이중쇄분자를 얻기 위해 단백질분해효소에 의해 분할되어야 한다. 분자량이 큰 형태는 약 54,000으로 serine계 단백질분해효소와 동일 물질을 가지고 있다. 그 밖에 PA의 조절기전에 관한 연구는 아직 미흡하며, zymograph를 이용하여 분자량의 크기에 따른 차이 등에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 혈청에서는 분자량 110,000인 PA가 발견되었으며, tPA와 상호작용을 하는 것으로 보고되었고, rat와 hamster에서는 분자량 105,000의 PA가 보고되었다.

그밖에 다른 PA도 보고되었으나 많이 연구되지 않았다. 혈청은 분자량 110,000의 PA의 inhibitor로서 tPA와 상호작용이 일어난다. 그리고 rat와 hamster의 흉선세포에서는 분자량 105,000의 PA가 관찰되었다. 이 효소는 SDS처리에 의해 비활성화되고, SDS를 제거하여도 관찰될 수 있는 정도의 수준까지 활성화되지는 않는다. 이 PA의 activity는 효소-inhibitor의 복합체일 경우 안정되는 것으로 여겨지며, PA와의 다른 관계는 밝혀지지 않았다. tPA와 uPA에 대응되는 복합clone 항체와 단일clone항체를 생산되고 있으며, 또한 tPA와 uPA의 특수시약이 조직과 세포의 면역학의 연구에 사용되고 있다.

Plasma 단백질의 10%가 단백질분해효소의 inhibitor이다. 조절은 같은 inhibitor의 특이성과 효소-inhibitor의 친화도에 의해 유지된다. Plasma 섬유소 분해작용과 조직 remodelling과 같은 생물학적으로 중요한 기능으로 PA의 관련작용을 보면 PA의 특수한 inhibitor는 그 효소를 조절하기 위해 진화하였음을 알 수 있다. 최근 다수의 과학자들이 PA의 inhibitor(PAI)의 존재를 보고

하였다. 그중 몇 가지는 그 기능이 잘 알려졌으나, 그 밖의 것들은 아직 연구 중에 있다.

2. 소 난포란의 체외성숙시 plasminogen activator의 생산에 관한 연구

본 연구는 체외성숙시 소 난구세포 복합체(cumulus oocyte complexes, COCs)가 PAs를 생산하는가를 조사하였으며, 또한 나화난자와 난구세포가 PAs의 생산에 있어서, protein kinase A(PKA)와 C(PKC)의 inhibitor인 H89와 H7 및 EGF가 미치는 영향에 관하여 조사하였다. 난구세포 복합체를 0.1% PVA 및 50uM H89와 H7 농도에서 24시간 체외성숙 하였을 때 각각 73.8%, 0%, 69.2%의 체외성숙을(Met II)을 나타냈다. 난구세포 결합체를 0.1% PVA로 체외성숙시 3가지의 PA의존성 band가 관찰되었으며, 분자량 51-53 kD의 uPA, 분자량 81-83 kD의 tPA 그리고 분자량 103-113 kD의 tPA-PAI를 확인할 수 있었고, tPA 및 tPA-PAI는 체외성숙 24시간에 관찰되었으며, uPA는 체외성숙 12시간에 생산되는 것을 확인할 수 있었다. 미성숙 난포란의 주변세포(난구세포 및 과립막세포)에서는 COCs와 같은 경향이었으나, 동일 시간대의 분비량 및 체외성숙시간대에 따른 PA의 생산에 있어서는 다소의 차이를 보였다. 50 uM H89 및 H7으로 24시간 체외성숙시 H89는 band를 확인할 수 없었으며, H7은 0.1% PVA에서 보다 증가되었다. 난구세포복합체를 30 ng/ml EGF의 농도에서 체외성숙시 3종류의 PA의존성 band(58 kD, 79 kD, 113 kD)를 확인하였으며, uPA의 경쟁적 억제제인 amilloride의 첨가시 58.5 kD의 band영역이 제거되어, 이 band가 uPA임을 확인할 수 있었다. 반면에 나머지 두 개의 band는 제거되지 않았다. 즉 79 kD의 band는 tPA, 113 kD는 tPA-PAI임을 확인할 수 있었다. 또한 난구세포 복합체는 미성숙시는 아무런 band도 관찰되지 않았다. 체외성숙 6시간에는 EGF의 첨가 유무에 관계없이 동일한 수준의 uPA가 관찰되었다. uPA는 체외성숙 12시간에 증가하였으나, EGF 첨가에서의 수준이 무첨가보다는 높았고, 24시간에서는 더 이상의 증가는 관찰되지 않았다. tPA와 tPA-PAI는 체외성숙 24시간, EGF의 무첨가 상태에서 최초로 관찰되었다. 또한 EGF의 첨가시 체외성숙 12시간에 다소의 tPA-PAI가 관찰되었다. 체외성숙 24시간에서 난구세포는 모든 PAs가 관찰되었으며, 나화난자에서는 EGF의 무첨가보다는 첨가에서 더 높은 수준의 PAs의

band를 확인하였다. 난구세포가 제거된 나화난자는 EGF의 첨가에 관계없이 uPA를 관찰할 수 없었다. EGF의 영향이 난구세포의 팽화에 영향을 미치나, 난구세포 복합체의 PAs의 생산과 직접적으로 연관되지는 않는 것으로 여겨진다. 이상의 결과에 따라 체외성숙시 uPA, tPA 그리고 tPA-PAI는 난구세포 복합체에 의해 모두 생산되며, 나화난자에서는 uPA만이 생산되었다. 또한 난구세포는 uPA생산에 주요하거나, 나화난자의 uPA생산에 중요한 역할을 한다. 따라서 소난구세포 복합체는 호르몬 등의 자극이 없어도 체외성숙에 의해 PA를 생산하였으며, protein kinase A에 의해 직접적인 영향을 받는 것으로 사료되며, EGF는 난구세포의 작용을 향상시킨다.

REFERENCE

1. Liu YX, Hsueh AJW. 1987. Plasminogen activator activity in cumulus-oocytes complexes of gonadotropin-treated rat during the periovulatory period. *Biol. Reprod.*, 36:1055-1062
2. Yamada M, Haorouchi T, Oribe T, Yamamoto S, Matsushita H, gentry PA. 1996. Plasminogen activator activity in the bovine oocytes-cumulus complex and early embryos. *J. Vet. Med. Sci.*, 58(4): 317-322
3. Kim NH, Mennino AR Jr. 1995. Effects of protein kinase A and C modulators of phosphorylation on plasminogen activator activity in porcine oocytes-cumulus cell complex during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 40(3):364-370
4. Hart DA, Rehemtulla A. 1988. Plasminogen activator and their inhibitors: regulation of extracellular proteolysis and cell function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B(4) : 691-780
5. Gerard RD, Chien KR, Meidell RS. 1986. Molecular biology of tissue plasminogen activator and endogenous inhibitor. *Mol. Biol. Med.*, 3:449-457
6. Dano K, Andeasen PA, Grondhl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skiriver L. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res.*, 44:139-266