

## 생쥐 배아에서 단백질 합성과 인산화에 의한 밀집현상의 조절

이동률<sup>1,2</sup> · 이정은<sup>2</sup> · 윤현수<sup>2</sup> · 노성일<sup>2</sup> · 김문규<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한양대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>2</sup>영동제일병원 불임의학연구소

## Regulation of Compaction by Synthesis and Phosphorylation of Protein in Preimplantation Mouse Embryo

Dong Ryul Lee<sup>1,2</sup>, Jeoung Eun Lee<sup>2</sup>, Hyun Soo Yoon<sup>2</sup>, Sung Il Roh<sup>2</sup> and Moon Kyoo Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

<sup>2</sup>Infertility Research Center, Jeil Women's Hospital, Seoul 135-280, Korea

**요 약 :** 생쥐 초기 배아의 형태형성에 영향을 주는 세포질내 인자의 기원과 작용기작을 연구하기 위해 단백질 합성과 단백질 활성화 효소 (protein kinase)의 억제제를 처리한 배아의 세포질로 재조합된 배아에서 발생과 RNA합성, 단백질 인산화를 조사하였다. 단백질 합성 억제제인 cycloheximide (CHX)가 함유된 배양액에서 24시간 배양한 1-세포 배아의 제핵된 세포질을 두 개의 전핵을 모두 가진 절반의 1-세포 배아와 재조합한 P+P-CHX군의 배아 발생과 유전자의 활성화는 P+P군의 배아와 유사하였으나, 밀집형성과 밀집형성이 일어나는 세포 시기는 빨라져서 P+2군과 유사하였다. 또한 초기 배아의 발생 시 1-세포기에서 2-세포기 사이에 일어나는 단백질 인산화가 형태형성과정에 미치는 영향을 알아보기 위해, tyrosine protein kinase와 serine-threonine protein kinase의 억제제인 genistein (Gen)과 6-dimethylaminopurine (6-DMAP)이 처리된 배아의 제핵된 세포질과 2개의 전핵을 가진 절반의 1-세포 배아를 융합시킨 P+2-Gen과 P+2-DMAP군 배아의 발생과 밀집현상을 대조군인 P+P와 P+2군과 비교하였다. P+2-Gen과 P+2-DMAP군 배아의 발생은 대조군에 비해 빨랐으며, 특히 P+2-Gen군 배아는 밀집이 4-세포기에 일어나 8-세포기에 일어나는 P+2-DMAP군의 배아에 비해 일어나는 시간과 세포 시기가 빨라졌다. SDS-PAGE 방법으로 분석한 재조합 3시간째 P+2-Gen과 P+2-DMAP군의 단백질 인산화량은 대조군인 P+P와 P+2군에 비해 증가하였으나 종류의 변화는 없었다. 한편 2차원 전기영동법을 이용하여 P+2-DMAP군의 배아에서 P+2-Gen에 비해 80KD와 110KD 단백질의 인산화가 억제된다는 결과를 얻었다. 이상의 결과들은 생쥐의 초기 배아에서 형태형성의 조절은 유전자 활성화 또는 난자내 모계 mRNA에 의해 수정 후 합성되는 새로운 단백질에 의한 것이 아니고, 난자내에 존재하는 인자에 의해 조절됨을 시사한다. 이 인자들 중 단백질의 인산화는 배아 발생과 형태형성에 밀접한 관계가 있으며, 특히 초기 1~2 세포기 사이에 serine-threonine protein kinase에 의해 인산화되는 단백질이 밀집현상을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

**ABSTRACT :** To investigate the origin and action mechanism of cytoplasmic factors as regulators of morphogenesis, the embryonic development, RNA synthesis and protein phosphorylation were examined in reconstituted embryos. A half of 1-cell mouse embryo with both pronuclei was electrofused with the enucleated cytoplasm of 1- or 2-cell embryos which were cultured for 24 hrs from post 20 hrs hCG in CZB with or without cycloheximide (CHX, an inhibitor of protein synthesis; P+P-CHX group), genistein (Gen, an inhibitor of tyrosine protein kinase; P+2-Gen group) and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP, an inhibitor of serine-threonine protein kinase; P+2-DMAP group), and co-cultured with Vero cells for 5 days. And their development, cell numbers at compaction, [5, 6-<sup>3</sup>H]-uridine incorporation into RNA and the pattern of protein phosphorylation after labeling of [<sup>32</sup>P] orthophosphate were compared with that of the reconstituted embryos such as P+2 or P+P (control group). Embryonic development and the time of RNA synthesis in P+P-CHX were similar to those in P+P. But the time and the cell stages of embryonic compaction in P+P-CHX were similar to those in P+2. The compaction was initiated at 4-cell in P+2 and P+2-Gen, but at 8-cell in P+P and P+2-DMAP. On a two-dimensional gel electrophoresis, phosphorylation of 80KD and 110KD proteins were inhibited after 3 hrs of reconstruction in the embryo of P+2-DMAP when compared with that of P+2 and P+2-Gen. These results suggest that protein synthesis between 1- and 2-cell stage affects the timing of embryonic genome activation, and that cytoplasmic factors derived from oocyte or their modification regulates the time schedule of embryonic compaction in mouse. Also, serine-threonine protein kinase has an important role on the regulation of compaction.

**Key words :** Compaction, Protein phosphorylation, Cytoplasm transfer, Electrophoresis, Mouse embryo.

## 서론

포유류의 난자는 첫번째 감수분열 전기 (prophase I)의 diplotene에서 성숙 (maturation)이 정지되나, 이후 성장과정에서 많은 유전자들의 전사 (transcription)와 단백질 합성이 일어난다. 또한 이 시기에 만들어진 각 단백질들이 배아의 초기 배아 발생을 조절하게 된다 (Schultz & Heyner, 1992). 감수분열이 재개된 난자는 제 2차 감수분열 중기 (metaphase II)에 다시 핵분열이 정지되며, 수정 후 배아 유전자의 활성화가 이루어질 때까지 유전자의 전사는 멈추고 단백질 합성능이 감소한다 (Bachvarova, 1992). 수정 이후 배아 유전자 활성화 (zygotic genome activation)에 의해 모계 유전자로부터 배아 유전자로의 전이 (transition)가 일어나며, 배아의 초기 발생과정은 난자 형성 및 성숙과정에서 일어난 모계 유전자와 배아 유전자의 활성화에 의해 조절이 이루어진다 (Piko & Clegg, 1982; Schultz, 1993).

배아의 유전자 활성화가 일어난 할구의 핵을 제핵된 난자 내에 이식하였을 때 정상적인 배아의 발생과 산자의 생산이 보고되었으며 (Stice & Robl, 1988), 최근에는 분화가 완전히 끝난 체세포의 핵치환을 통하여 완전한 개체발생이 이루어짐이 보고되고 있다 (Wilmut et al., 1997). 특히 Kanka 등 (1996)은 32-세포 토끼 배아의 핵을 제핵된 난자의 세포질에 치환을 했을 경우 유전자의 발현은 단계적으로 감소하였다가 첫번째 난할 직전에 완전히 중지되고, 이들의 발현은 정상적인 배아의 발생과정과 같이 2-와 4-세포 사이에 재개되어 32-세포에 도달하였을 때 원래의 양을 회복함을 보고하였다. 또한 생쥐에서 2-세포의 핵을 1-세포 전기의 세포질과 후기의 세포질로 각각 이식하였을 때, 발생단계에서 특이하게 발현하는 단백질의 합성이 1-세포 후기의 세포질에 치환한 경우에만 가능한 것으로 보고된 바 있다 (Latham et al., 1992). 따라서 핵의 활성화와는 독립적으로 난자와 배아의 세포질 내에는 초기 배아의 발생과정을 조절하는 인자의 존재가 제시되고 있다.

수정 이후 약 90%이상의 모계 mRNA가 감소함에도 불구하고 생쥐 배아에서 모계 단백질의 합성은 착상전 배아 발생의 전시기에 걸쳐 일어나나 (Taylor & Piko, 1987), 이들의 조절기작에 대한 연구는 미진하다. 그런데 정상적인 생쥐와 다른 strain의 수컷과 교배했을 때 포배 형성률이 극히 저조한 mutant strain인 DDK 생쥐를 이용한 이종간 배아의 세포질 융합 실험을 통해 모계 유전자로부터 유래된 물질들이 초기 배아의 형태형성과정을 조절하는 것으로 제안되었다

(Renard et al., 1994).

배아의 발생과정에서 밀집현상 (compaction)은 uvomorulin으로 알려진 cell adhesion molecule인 E-cadherin (Hyafil et al., 1980)과 세포 구성요소들에 의해 일어난다. 할구 연결의 정단부 (apical domain)에 endosome의 cytoplasmic pole (Reeve & Ziomek, 1981)과 microfilament (Johnson & Maro., 1986), microtubule (Houliston et al., 1987)이 형성되고, 기저부 (basal domain)에 기능적인 gap junction이 나타난다 (Lo & Gilula, 1979). Microvilli가 세포 표면의 apical pole에 나타나며 (Reeve & Ziomek, 1981), tight junction이 형성된다 (Ducibella et al., 1975; Fleming et al., 1989). 이러한 밀집현상은 배아의 체외배양시 단백질 합성 억제제를 처리한 경우에도 정상적으로 일어나는 것이 관찰되어, 이미 존재하는 단백질이 post-translational modification에 의하여 억제기작의 해리에 의해 조절될 것으로 보고되었다 (Levy et al., 1986). 또 밀집과정 중에 단백질의 발현은 변하지 않고, 특정 단백질의 인산화 수준에서 변화가 일어남이 관찰되었다 (Bloom & McConnell, 1990; Bloom, 1991). 실제로 cell adhesion molecule인 E-cadherin은 밀집 직전에 인산화되어진다 (Sefton et al., 1992). 그러나 이러한 밀집현상의 조절기작에 관한 연구는 아직 미진하다.

본 연구에서는 단백질 합성이나 단백질 활성화효소 (protein kinase)의 억제제를 처리한 후 제핵된 세포질로 재구성한 배아에서 배아의 발생과 유전자 발현을 조사하여 형태형성과정의 time schedule을 조절하는 물질의 기원과 이들의 작용기작을 밝혀보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배아의 수확

본 연구에서 사용된 1-세포 배아는 각각 5 i.u.의 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Sigma)과 7.5 i.u. human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 46~48시간 간격으로 주사하여 과배란된 암컷 F1 hybrid (C57BL/6NCrj x CBA/JNCrj, Charles River Japan Inc., Japan) 생쥐와 수컷 생쥐의 교배를 통해 hCG 주사 후 20시간에 난관으로부터 수확하였다. 1-세포 배아의 난구세포들은 hyaluronidase (1 mg/ml, Sigma)를 3분간 처리하여 제거하였다. 배아 발달의 동시화 (synchronization)를 위해 수확한 후 전핵이 형성된 배아는 제거하였고, 2시간동안 *in vitro* 환경인 37°C와 5% CO<sub>2</sub>, 95%의 공기가 유지되는 배양기 (CO<sub>2</sub> incubator, Queue Systems, Western Virginia, USA)내의 0.5% bovine

serum albumin (BSA, Gibco)이 포함된 CZB 배양액 (Chatot et al., 1989)으로 배양하여 전핵을 형성한 배아만을 사용하였다 (Aoki et al., 1997).

## 2. 단백질 합성과 단백질 활성화효소의 억제제 처리

수획된 1-세포 배아를 단백질 합성 억제제, 단백질 활성화효소의 억제제와 0.5% BSA가 포함된 CZB 배양액에서 24시간 배양하여 세포질 공여체로 사용하였다. 단백질 합성의 억제제로는 cycloheximide (CHX, 20 g/ml, Sigma, Wang & Latham, 1997)를 사용하였고, 단백질 활성화효소의 억제제로는 cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibitor인 N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinoline-sulfonamide (H8, 100 M, Sigma, Lee et al., 1995)와 Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase (PKC) inhibitor인 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7, 50 M, Sigma, Lee et al., 1995), tyrosine protein kinase inhibitor인 genistein (Gen, 75 M, Sigma, Lee et al., 1995), serine-threonine protein kinase inhibitor인 6-dimethylaminopurine (6-DMAP, 1.2 mM, Sigma, Aghion et al., 1994)을 사용하였다.

## 3. 배아의 세포질 재조합

1-세포에서 2-세포로의 발생과정에서 배아내에서 일어나는 세포질 인자의 변화에 의한 초기 배아의 형태형성과정의 조절 기작을 조사하기 위해, 단백질 합성과 단백질 활성화효소의 억제제가 처리된 배아에서 제핵된 절반의 세포질을 두 개의 전핵을 모두 가지고 있는 절반의 1-세포 배아와 융합시켜 배아의 발생과 형태형성에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 1). 본 실험에서는 differential interference contrast optic system이 부착된 도립위상차간섭현미경 (Diaphot 300, Nikon, Tokyo, Japan)에 장착된 미세조작기 (NT-188, Narishige, Toyko, Japan)를 이용하여 배아의 세포질을 조작하고 재조합하였다.

세포질 공여체로 사용될 제핵된 세포질을 얻기 위해, 각각의 억제제가 처리된 1-과 2-세포 배아의 투명대를 5 mg/ml pronase (P-5147, Sigma)에 3분간 처리하여 제거하였고, 2-세포 배아의 경우 각각의 할구를 분리하기 위해 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free CZB 배양액으로 옮겨 10분간 배양하였다. Mouth-controlled pipette을 이용하여 할구를 분리하고 실험에 사용하기 전까지 0.5% BSA가 들어있는 CZB 배양액으로 옮겨 배양하였다. 분리된 할구들은 5 g/ml cytochalasin B가 들어있는 HEPES-buffered CZB 배양액으로 옮겨 10분간 배양한 후 insertion pipette을 이용하여 핵이 있는 부분과 없

는 부분으로 절반을 나누었다. 이때 사용된 insertion pipette은 직경이 35~45  $\mu$ m이었으며, microglinder (EG-6, Narishige)를 이용하여 45°의 각도로 갈고, microforge (MF-9, Narishige)를 이용하여 polishing 하였다. 단백질 합성과 단백질 활성화효소 억제제가 처리된 1-과 2-세포 배아의 제핵된 세포질을 2개의 전핵과 절반의 세포질을 가지고 있는 1-세포 배아의 절개된 투명대의 틈으로 삽입하였다. 전핵을 모두 가지면서 절반의 세포질을 가지고 있는 수용체 배아는 micropuller에서 뽑은 날카로운 피펫을 이용하여 투명대의 일부를 절개하고, 끝이 뚱뚱한 피펫과 holding pipette을 이용하여 전핵의 제거 없이 절반의 세포질을 제거하였다. 전기 융합은 0.3 M mannitol과, 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>의 융합용액이 채워져있는 chamber내의 0.5 mm의 간극 사이에 융합할 배아를 놓고 electro cell manipulator (BTX 2001, BTX, USA)에서 만들어진 1.5 KV/cm의 DC pulse를 70 sec의 속도로 3회 통전하여 시행하였다.

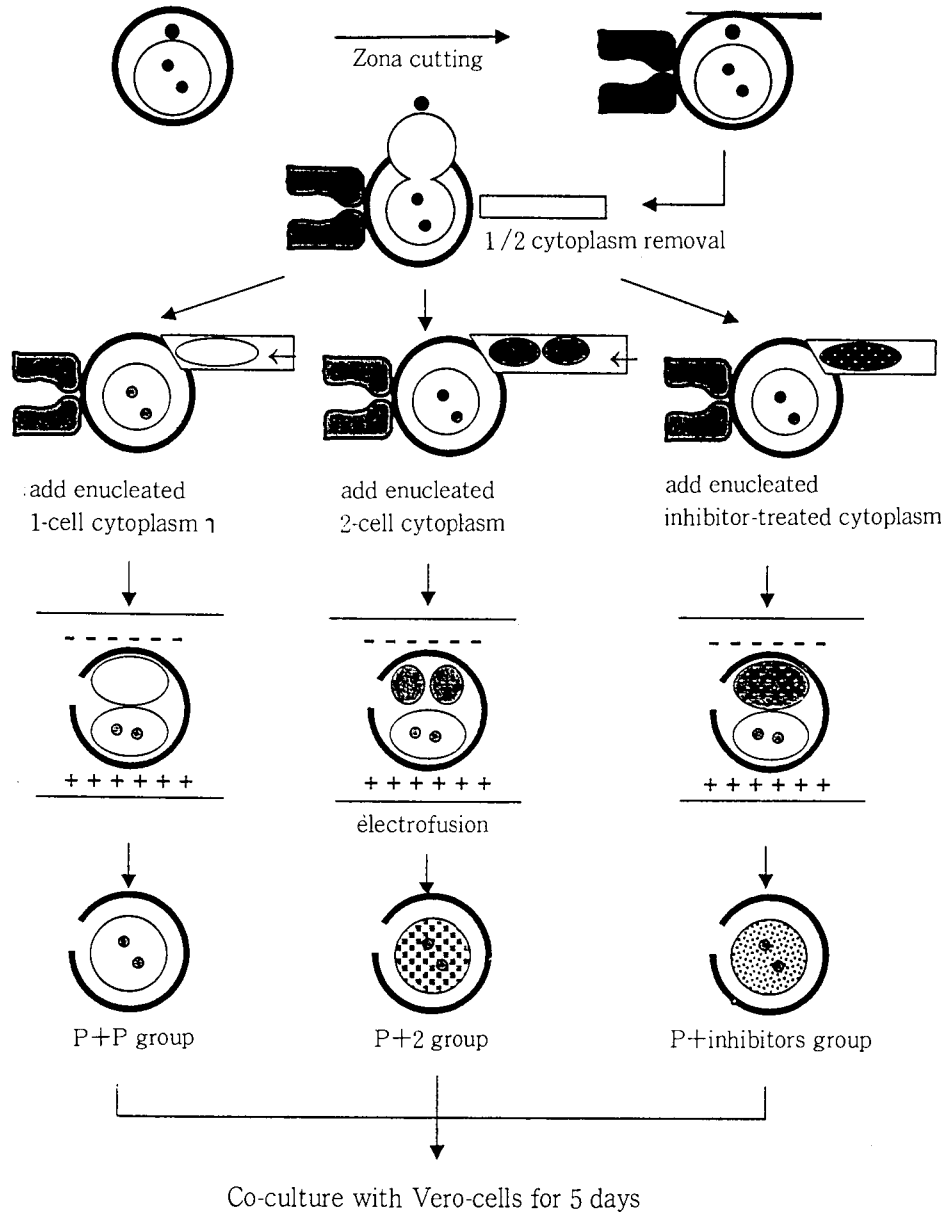
CHX의 처리 후 1-세포에서 발생이 정지된 배아의 제핵된 세포질이 치환되어 재조합된 배아를 P+P-CHX군이라 하였고, 단백질 활성화효소 억제제가 처리되어 2-세포에서 발생이 정지된 세포질과 재조합된 배아를 각각 P+2-H7과 P+2-H8, P+2-Gen, P+2-DMAP군이라 하였다. 이 실험의 대조군으로 억제제를 처리하지 않은 1-과 2-세포 세포질로 재조합된 배아를 P+P와 P+2군이라 하였다.

## 4. 세포질 재조합 배아의 배양

재조합된 각 군의 배아는 Van Blerkom (1993)의 방법을 변용하여 0.5×10<sup>6</sup> cell/ml의 Vero cell (F-12313, ATCC, Rockville, MD, USA)이 들어있는 modified Ham's F10 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) 배양액으로 옮겨 5일간 공배양 하였으며, 배아의 발생과 밀집현상을 12시간 간격으로 비교 관찰하여 분석하였다. 도립위상차간섭현미경 하에서 할구의 윤곽선이 보이지 않는 경우를 밀집으로 간주하였다. 또한 밀집이 관찰되는 순간 각 군의 배아를 0.5% glutaraldehyde (Merck, Darmstadt, Germany)가 포함된 0.1M cacodylate 완충용액 (pH 7.2, Sigma)에 고정한 후, 10 g/ml bis benzimide (Hoechst 33342, Sigma)가 들어있는 phosphate buffered saline (PBS, Gibco BRL)에 30분간 배양한 후 형광현미경 (Optiphot-2, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하여 핵의 수를 계수하여 할구 수를 측정하였다.

## 5. 배아의 total RNA 합성 측정

단백질 합성 억제제를 처리한 세포질로 재조합된 P+P-



**Fig. 1. Experimental scheme showing the reconstruction of embryo by the transfer of untreated and inhibitor-treated cytoplasm.**

CHX군의 배아들과 이들이 처리되지 않은 1-과 2-세포 배아의 세포질로 재조합된 P+P와 P+2군의 배아에서 total RNA의 합성을 비교하기 위해,  $^3\text{H}$  표지된 uridine의 incorporation을 Heyner 등 (1990)의 방법을 변용하여 측정하였다. 각 군의 배아 5개씩을 각각 hCG 주사 후 28, 40, 52 시간에 [5, 6- $^3\text{H}$ ]-uridine (Code TRK.410, Batch 314, specific activity 37 Ci/mmol, Amersham Life Sci., UK)이 50 Ci/ml의 농도로 첨가된 CZB 배양액 내에서 3시간 동안 표지 하였다. 표지 후 각 군의 배아들은 ice-cold PBS로 충분히 세척한 후

0.5% BSA가 들어있는 25  $\mu\text{l}$ 의 CZB 배양액이 들어있는 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮기고, 25 l의 10% trichloroacetic acid (TCA, Sigma)를 첨가한 후, 얼음 위에서 15-20 분간 침전시켰다. Tube를 20,000  $\times$  g로 20분간 원심분리하여 TCA-soluble한 상층액을 제거하였고, 다시 100  $\mu\text{l}$ 의 10% TCA로 두 번 세척하여 각각의 상층액들을 모았다. 이들 TCA-soluble 상층액들의 radioactivity는 20 ml의 scintillation liquid (Packard, Meriden, CT, USA)를 첨가한 후 scintillation counter (TRI-CARB A4530, Packard)를 이용하

여 측정하였다. TCA-insoluble pellet (nucleic acid fraction)은 30 l의 1N NaOH로 녹인 후 55  $\mu$ l의 1N HCl로 acidify하여 측정하였다. TCA-insoluble pellet의 dpm값을 RNA로의 incorporation 양으로, TCA-soluble한 상층액의 dpm값과 TCA-insoluble pellet의 dpm 값을 합쳐 배아 내로의 uptake 양으로 하여 각 군의 배아에서 비교하였다.

## 6. 배아의 단백질 인산화 분석

생쥐의 초기 배아에서 단백질의 인산화가 형태형성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 단백질 활성화효소 억제제인 Gen과 6-DMAP을 처리하여 24시간 동안 배양한 절반의 세포질과 재조합된 P+2-Gen과 P+2-DMAP군의 배아와 대조군으로 P+P와 P+2군의 배아를 융합 후 3시간 (hCG 주사 후 28시간)과 2일 (hCG 주사 후 76시간) 후에 1 mCi/ml [ $^{32}$ P] orthophosphate (PBS 13, Amersham)가 포함된 25  $\mu$ l의 phosphate-free CZB배양액에서 3시간 동안 배양하여 인산화 단백질을 방사능으로 표지하였다. 방사능 표지 후 배아는 3% PVP (polyvinylpyrrolidone, Sigma)가 포함된 CZB 배양액으로 여러번 세척하고, SDS-PAGE 분석을 위해서는 20  $\mu$ l SDS-sample buffer (Laemmli, 1970)에 각각 12개씩, 2차원 전기영동 분석을 위해서는 20  $\mu$ l lysis buffer (O'Farrell, 1975)에 각각 50개씩 넣어 분석 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli (1970)의 방법을 변용하여 1.0 mm 두께의 4 % stacking gel과 7.5 % separating gel을 사용하였다. 준비된 gel에 시료를 loading한 뒤 10 mA로 stacking 하고, 20 mA로 separating 시켰다.

이차원 전기영동은 O'Farrell (1975)의 방법을 변용하였다. 1차원 전기영동시 gel은 5.5 g urea (Sigma), 1.33 ml acrylamide stock (28.38 % acrylamide : 1.62 % bis-acrylamide, w/v), 10% Nonidet P-40 (Sigma) 2 ml, 0.4 ml Ampholine (pH 5-7, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), 0.1 ml Ampholine (pH 3.5-10), 1.97 ml 증류수, 10%의 ammonium sulfate 10  $\mu$ l, 7  $\mu$ l의 TEMED를 섞어 만들었다. Gel 위에 overlay solution (8 M urea)을 넣고 1~2시간 후에 이를 제거하고 lysis buffer 20  $\mu$ l를 넣어 1~2시간 정치하였다. Lysis buffer를 제거한 후 upper reservoir에는 0.02 M NaOH를 채우고 lower reservoir에는 0.01 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 를 채워준 뒤, 200 V에서 15분, 300 V에서 30분, 400 V에서 30분간 pre-running 시켰다. 전원을 끈 후 시료를 loading 하고 그 위에 10  $\mu$ l의 sample overlay solution (9 M urea, 0.8 % Ampholine, pH

5~7, 0.2 % Ampholine, pH 3.5~10)을 넣고 400 V에서 12시간, 800 V에서 1시간 동안 running 시켰다. 유리판에서 분리한 1차원 전기영동 gel은 SDS-sample buffer에서 30분간 equilibration 시킨 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 SDS-PAGE 분석까지 보관하였다. SDS-PAGE는 위와 같이 Laemmli (1970)의 방법을 변용하였다.

전기영동이 끝난 후 gel은 Merril 등 (1981)의 방법에 따라 silver staining하였고 gel dryer에서 건조시켰다. 건조시킨 gel은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 intensifying screen을 사용하여 hyper film MP (Amersham)에 3일 (일차원) 또는 2주 (2차원 전기영동)간 노출시켰다.

## 7. 통계적 분석

본 실험은 별도로 명기하지 않은 한 3회 이상 반복하였다. 배아의 발생과 형태형성의 결과는  $\chi^2$ -test를, total RNA의 incorporation은 Student's t-test를 이용하여 분석한 후, p값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 세포질 재조합 배아의 발생과 형태형성 비교

초기 배아의 형태형성과 관련하여 1-세포기에서 2-세포기 사이에 일어나는 단백질 합성과 단백질 인산화의 영향을 알아보기 위해 단백질 합성과 활성화효소 억제제가 처리된 배아의 절반의 세포질과 전핵을 모두 가진 절반의 1-세포 배아를 융합시킨 후 발생과 형태형성을 비교하였다. 본 실험에서 억제제의 농도와 효과는 예비실험을 시행하여 결정하였다. 단백질 합성 억제제인 CHX를 첨가한 배양액에 1-세포 배아를 배양하였을 때 모든 배아는 1-세포기에서 발생이 정지되었고, 단백질 활성화효소 억제제인 H7, H8, Gen을 처리한 배양액에서는 2-세포기에서, 6-DMAP를 처리한 군에서는 8-에서 16-세포기 사이에서 발생이 정지되고 퇴화되었다. P+P-CHX군의 배아 발생은 P+P군과 비슷하였으나, hCG 주사 후 76시간에 관찰한 밀집 형성률이 P+2군과 유사하게 증가하였다 (Table 1). P+P-CHX군에서 밀집현상이 일어나는 시기에 관찰된 할구의 수는  $3.8 \pm 0.1$ 로 P+2군의  $4.2 \pm 0.2$ 와 비슷하였다 (Fig. 2).

P+2-H7과 P+2-H8군의 배아는 융합 후 한번의 난할 이후 발생을 정지하여 일련의 실험을 진행하지 않았다 (Data not shown). P+2-Gen군의 배아는 P+2군과 같은 빠른 발생을 보였고, 76시간째에 관찰하였을 때 밀집 형성률이 P+2군과 유사하게 증가하였다 (Table 2). P+2!-Gen군에서 밀집

**Table 1. Compaction and blastocoel formation of cultured mouse embryos (P+P, P+2 and P+P-CHX group) after reconstitution of cytoplasm at 76 and 100 hours post hCG injection**

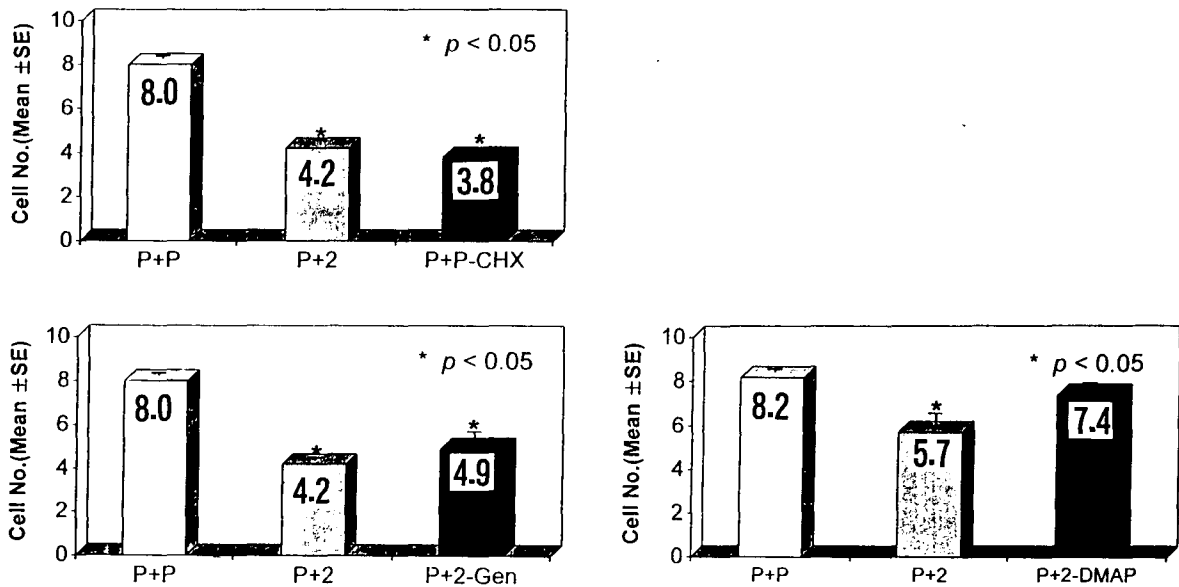
Group	No. of Exp.	No. of reconstructed embryos	No. of developed embryos	76 hrs post hCG			100 hrs post hCG		
				<4	5-8-cell	Comp <sup>1</sup>	Deg <sup>2</sup> +<8	Mo <sup>3</sup>	Bl <sup>4</sup>
P+P <sup>a</sup>	5	35	35	21 (60.0)	12 (34.3)	2 ( 5.7)	4 (11.4)	30 (85.7)	1 (2.9)
P+2 <sup>b</sup>	5	46	41	12 (29.3)	*1 ( 2.4)	*28 (68.3)	5 (12.2)	35 (85.4)	1 (2.4)
P+P-CHX <sup>c</sup>	5	42	37	32 (73.0)	*0 ( 0)	*10 (27.0)	*21 (56.8)	*16 (43.2)	0 ( 0)

Comp<sup>1</sup>: Compaction Deg<sup>2</sup>: Degeneration Mo<sup>3</sup>: Morula Bl<sup>4</sup>: Blastocyst, \*p < 0.05

P+P<sup>a</sup> group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with the half enucleated cytoplasm of 1-cell embryos.

P+2<sup>b</sup> group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with the half enucleated cytoplasm of 2-cell embryo.

P+P-CHX<sup>c</sup> group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with half enucleated cytoplasm of 1-cell embryos which were cultured for 24hrs in the presence of 20 µg/ml cycloheximide (CHX).



**Fig. 2. The number of blastomeres of the reconstituted embryo at the time of early sign of compaction.**

현상이 일어나는 시기에 관찰된 할구의 수는  $4.9 \pm 0.6$ 로 P+2군의  $4.2 \pm 0.1$ 과 유사하였다 (Fig. 2). 그러나 P+2-DMAP군의 배아 발생은 P+2군과 비슷하게 빠른 발생을 보였으나 76시간에 관찰하였을 때 밀집 형성률이 P+P군과 유사하게 낮았으며 (Table 2), 밀집현상이 일어나는 시기에 관찰된 할구의 수는  $7.4 \pm 0.3$ 으로 P+P군의  $8.2 \pm 0.1$ 과 유사하였다 (Fig. 2).

## 2. 세포질 재조합 배아의 total RNA 합성 비교

1-에서 2-세포기 사이에 합성되는 단백질이 초기 배아의 유전자 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해, 3H 표지된 uridine을 배양액에 첨가한 후 이들의 RNA로의 incorporation 양을 측정하여 total RNA 합성량과 시기를 비교하였다. 실험군인 P+P-CHX군의 incorporation 양은 hCG 주

사 후 30시간에는 대조군인 P+P, P+2군과 차이가 없었으나 hCG 주사 후 42시간에 대조군인 P+2군에서 incorporation이 급격히 증가하였고, P+P군과 P+P-CHX군에서는 유사하여 변화가 없었다 (Table 3).

## 3. 세포질 재조합 배아의 단백질 인산화 분석

재조합된 초기 배아의 단백질 인산화 변화를 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. P+2-Gen과 P+2-DMAP군의 배아에서 인산화된 단백질의 양은 대조군인 P+P나 P+2군의 배아에 비해 증가하였으며, P+2-Gen군에서 P+2-DMAP군에 비해 인산화된 단백질의 양이 증가하였다. 융합 후 2일간 배양하여 8-세포나 밀집시기에 도달한 실험군과 대조군 배아에서 단백질 인산화의 변화를 비교하였다. 발생과 밀집현상이 빨리 일어나는 P+2, P+2-Gen, P+2-DMAP군에서는 P+P

**Table 2. Compaction and blastocoel formation of cultured mouse embryos (P+P, P+2, P+2-Gen group and P+2-DMAP group) after reconstruction of cytoplasm at 76 and 100 hours post hCG injection**

Group No. Exp	No. reconstructed embryos	No. developed embryos	post hCG 76			post hCG 100			
			<4	5-8-cell	Comp <sup>1</sup> (%)	Deg <sup>2</sup> +<8	Mo <sup>3</sup>	Bl <sup>4</sup> (%)	
P+P <sup>a</sup>	5	37	36	12(33.3)	12(33.3)	12(33.3)	12(33.3)	24(67.7)	0(0)
P+2 <sup>b</sup>	5	43	39	5(12.8)	1*(2.6)	33*(84.6)	15(38.5)	24(61.5)	0(0)
P+2-Gen <sup>c</sup>	5	39	37	2*(5.4)	0*(0)	35*(94.6)	1(2.7)	35(94.6)	1(2.7)
P+P <sup>a</sup>	5	54	52	20(38.5)	17(32.7)	15(28.8)	4(7.7)	48(92.3)	0(0)
P+2 <sup>b</sup>	5	42	34	1(2.9)	0(0)	33*(97.1)	14(41.2)	20(58.8)	0(0)
P+2-DMAP <sup>d</sup>	5	65	57	9(15.8)	24(42.1)	24(42.1)	17(29.8)	40(70.2)	0(0)

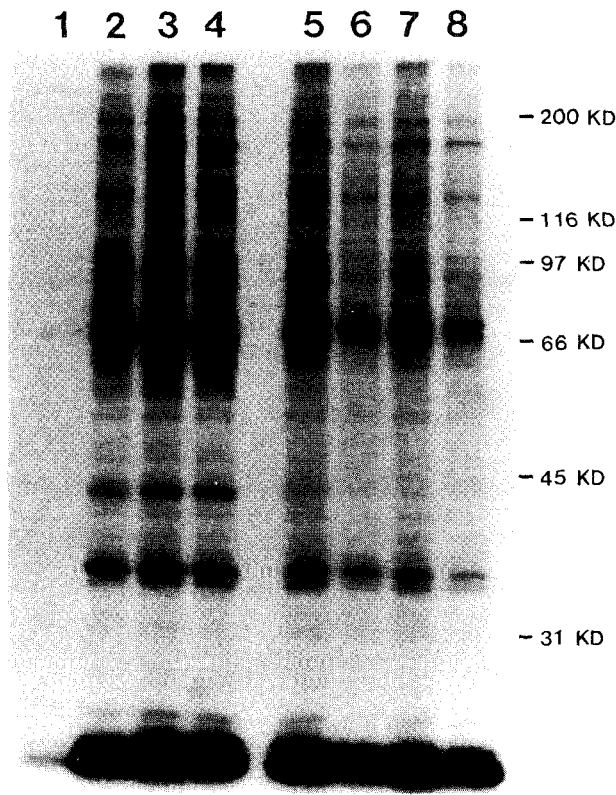
1 Comp: Compaction 2 Deg: Degeneration 3 Mo: Morula 4 Bl: Blastocyst \* p < 0.05

<sup>a</sup> P+P group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with the half enucleated cytoplasm of 1-cell embryos.

<sup>b</sup> P+2 group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with the half enucleated cytoplasm of 2-cell embryo.

<sup>c</sup> P+2-Gen group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with half enucleated cytoplasm of 2-cell embryo which was cultured for 24h in the presence of 20 M genistein(Gen).

<sup>d</sup> P+2-DMAP group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with half enucleated cytoplasm of 2-cell embryo which was cultured for 24h in the presence of 20mM 6-DMAP.



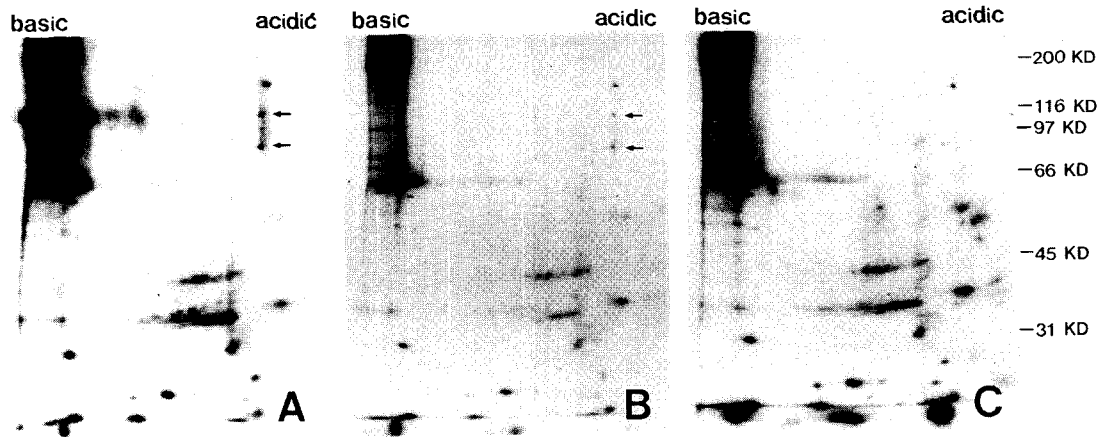
**Fig. 3. Autoradiograph of [<sup>32</sup>P] orthophosphate labeled protein phosphorylation in cytoplasm reconstituted mouse embryos of P+P, P+2, P+2-Gen and P+2-DMAP group.** Reconstituted embryos were co-cultured with Vero cells and radiolabelled for 2 hours starting at 28 hours (lanes 1-4) or 76 hours (lanes 5-8) after hCG injection. Lanes 1 and 5, P+P group; Lanes 2 and 6, P+2 group; Lanes 3 and 7, P+2-Gen group; Lanes 4 and 8, P+2-DMAP group.

군에 비해 인산화된 단백질의 양이 감소하였으나 이들에서 polypeptide 상으로 특이한 변화는 없었다(Fig. 3).

SDS-PAGE와는 달리 2차원 전기영동법을 이용하여 분석 하였을 때, P+2와 P+2-Gen군 사이에는 차이가 관찰되지 않았으나 P+2-DMAP군에서 spot 상의 변화가 관찰되었다. 특히 P+2-DMAP군의 배아에서는 P+2와 P+2-Gen군에 비해 분자량 80KD와 110KD인 단백질의 인산화가 억제된 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

**고 찰**

일차 감수분열 전기(prophase I)의 diplotene에서 성숙 (maturation)이 정지된 포유류의 난자는 이후 성장과정에서 그들이 가지고 있는 많은 유전자의 전사(transcription)와 단백질 합성(translation)이 활성화되고, 이 시기에 만들어진 각 단백질들이 초기 배아 발생과정에서 중요한 역할을 하게 된다(Schultz & Heyner, 1992). 두 개의 전핵을 모두 가지고 있는 절반의 1-세포 배아에 2- 또는 4-세포 배아의 세포질을 재 조합한 배아는 1-세포 세포질만을 가진 배아에 비해 빠른 발생뿐만 아니라 빠른 형태형성을 보여준다. 또한 2-세포기의 할구를 제거하고 여기에 1-세포 배아의 제핵된 세포질을 재 조합하여 만든 배아의 발생과 형태형성은 2-세포의 세포질만을 가진 배아에 비해 늦어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 세포질내에 초기 배아의 발생을 조절하는 물질이 존재하고 이들의 농도에 의한 작용기작이 포유류의 배아에 존재함을 제안할 수 있다(unpublished data). 따라서 초기 배아의 발생 과정을 조절하는 이러한 요인들의 기원과 작용 기작에 관한 연구는 매우 중요하다.



**Fig. 4. Two-dimensional polyacrylamide gel autoradiograph of [ $^{32}$ P] orthophosphate labelled protein phosphorylation in cytoplasm reconstituted mouse embryos of P+2, P+2-Gen and P+2-DMAP groups.** Reconstituted embryos were radiolabelled for 2 hours starting at 28 hours after hCG injection. A, Embryos of P+2 group; B, Embryos of P+2-Gen group; C, Embryos of P+2-DMAP group. Arrows indicate proteins which disappeared in P+2-DMAP group when compared to P+2 and P+2-Gen group.

단백질 합성 억제제가 들어있는 배양액에서 24시간 배양된 1-세포 배아의 세포질만을 전핵을 모두 가지고 있는 절반의 1-세포 배아와 재조합한 P+P-CHX군의 배아 발생과 유전자 활성화 및 형태형성을 P+P, P+2군의 배아와 비교하였다. P+P-CHX군의 배아 발생과 유전자의 활성화는 P+P군의 배아와 비슷하였으나 밀집과 밀집형성시 세포 시기는 빨라져 P+2군과 유사하였다. 본 실험의 예비실험에서 1-세포기에서 2-세포기 사이에 단백질 합성억제제인 CHX를 처리한 세포질에서는 배아 유전자의 활성화나 모계에서 유래된 mRNA에 의한 새로운 단백질의 합성은 없지만 소수의 단백질의 인산화는 관찰되었다(Data not shown). 따라서 형태형성과정의 time schedule은 배아의 유전자 활성화나 난자로부터 유래된 mRNA에 의해 합성된 단백질이 아닌 난자 내에 존재하는 단백질의 인산화 변화에 의해 조절됨을 추측할 수 있다. 이러한 결과는 단백질 합성 억제제를 처리한 배양액에서 배아를 배양했을 때도 밀집현상이 변함없이 일정한 시기에 일어나고(Levy et al., 1986), 또한 밀집과정 중에 단백질의 합성은 변하지 않으나, 특정 단백질의 인산화가 변화된다는 것(Bloom & McConnell, 1990; Bloom, 1991)을 볼 때 배아 내 단백질 인산화가 초기 발생을 조절하는 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다.

생쥐의 초기 배아 1-세포에서 2-세포 사이에 단백질 활성화효소의 억제제를 처리한 배아의 세포질 절반과 전핵을 모두 가진 절반의 1-세포 배아를 융합시킨 후 발생시켰을 때, P+2-Gen군에서 배아의 발생속도가 대조군인 P+P군에 비

해 빨랐다. 그리고 P+2-DMAP군 배아의 발생은 빠른 경향을 보였으나 유의하지는 않았다. 그러나 P+2-Gen군 배아의 밀집은 P+2군과 같이 동일하게 4-세포기에 일어나, 8-세포기에 일어나는 P+P군과 P+2-DMAP군에 비해 형태형성의 세포시기가 빨라졌다. 따라서 이 시기 단백질 인산화가 형태형성의 중요한 조절인자로 여겨지며, 이를 SDS-PAGE로 분석하였다.

재조합 후 3시간이 경과하였을 때 P+2-Gen과 P+2-DMAP군의 인산화된 단백질의 양은 대조군인 P+P, P+2군에 비해 증가하였고, 2일 후에는 P+P군에 비해 감소하였으나 polypeptide 종류의 특이한 변화는 없었다. 실험군인 P+2-Gen과 P+2-DMAP군의 발생 속도와 밀집은 대조군에 비해 빨리 일어났고 인산화된 단백질의 양도 증가하였다. 따라서 초기 배아의 발생과정에서 Gen과 6-DMAP에 의해 인산화가 억제되는 단백질은 배아 발생을 조절하는 인자로 사료된다. 그러나 P+2와 P+2-Gen군 배아의 밀집은 4-세포기에 일어나고, P+2-DMAP군 배아에서는 8-세포기에 일어났다. 따라서 밀집과 관련된 두군간의 단백질 인산화를 비교하기 위해 2차원 전기영동을 이용하여 분석하였다. 2차원 전기영동 결과 80KD와 110KD의 단백질은 P+2와 P+2-Gen군에서 인산화 되나 P+2-DMAP군에서는 인산화가 되지 않았다. 따라서 이들 단백질의 동정과 기능, 그리고 이들의 인산화에 의한 형태형성의 조절 가능성에 관한 추가의 연구가 필요하다.

한편, 본 실험에서 1-세포에 단백질 인산화의 억제제인



**Table 3. Comparison of the [5,6-<sup>3</sup>H]-uridine uptake into the cytoplasm and the incorporation(dpm/5 embryos) into RNA among reconstructed embryos(P+P, P+2 and P+P-CHX group)**

Group	30 hrs post hCG		42 hrs post hCG		54 hrs post hCG	
	Uptake	Incorporation	Uptake	Incorporation	Uptake	Incorporation
P+P <sup>a</sup>	58.98± 10.03	1.44±1.28	110.45± 12.87	2.63±1.79	1479.55±277.60	67.90±13.24
P+2 <sup>b</sup>	705.28±189.17	9.46±3.28	1567.46±196.81*	53.54±9.26*	2112.14±340.23*	119.48±20.56*
P+P-CHX <sup>c</sup>	34.19± 10.81	2.99±2.24	102.93± 22.25	2.99±1.49	1360.34±201.39	52.24± 7.77

<sup>a</sup> P+P group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with the half enucleated cytoplasm of 1-cell embryos.

<sup>b</sup> P+2 group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with the half enucleated cytoplasm of 2-cell embryo.

<sup>c</sup> P+P-CHX group: A half 1-cell embryos with both pronuclei were reconstituted with half enucleated cytoplasm of 1-cell embryos which was cultured for 24 hrs in the presence of 20 µg/ml cycloheximide(CHX)

Values are represented by mean±SE, and obtained from three different experiments.

\*p< 0.05

Gen과 6-DMAP를 24시간 처리하여 2-세포로 발생한 배아에서는 대조군에 비해 인산화된 단백질의 양이 감소하였다(Data not shown). 그러나 이들 세포질의 절반을 치환한 1-세포 배아에서 일어나는 단백질 인산화의 양상은 변화가 없었고 그 양은 오히려 증가하였다. 이러한 결과에 대한 원인은 두가지의 가능성이 제시된다. 첫번째는 치환된 세포질내 인산화가 활성화되면서 기존의 인산화와 합쳐져서 증가할 것으로 제안되어지고, 또다른 가능성은 이들 억제제에 의해 영향을 받는 물질이 세포질내에서 다른 단백질들의 인산화 억제작용에 관여하고 치환되었을 때 세포질내의 억제인자의 상대적 농도가 감소하여 인산화가 증가하는 것으로 제안할 수 있다.

Levy 등(1986)은 초기 배아에서 밀집현상이 기존에 존재하는 단백질의 post-translational modification에 의한 억제 기작의 해리에 의해 조절될 것으로 제안했다. PKC의 활성물질의 하나로 phorbol ester인 myristate acetate는 밀집시 일어나는 세포의 polarity와 flattening과 같은 변화를 억제한다고 보고한 바 있으나(Bloom, 1989), 4-세포기에 PKC의 또다른 activator인 diacylglycerol과 phorbol ester를 처리하였을 때는 조기에 밀집이 유발되었다(Winkel et al., 1990)는 상반된 연구 결과를 보고하고 있어 이를 밝히기 위한 연구가 필요하다. 또한 Aghion 등(1994)은 serine-threonine protein kinase의 억제제인 6-DMAP는 밀집현상시 일어나는 세포의 flattening과 gap junction 형성을 촉진한다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 PKA와 PKC에 의한 밀집현상의 조절 가능성을 연구하기 위해 H8과 H7을 처리한 세포질로 재조합된 배아의 형태형성과정을 조사하고자 하였으나, 배아의 발생이 한번의 난할 후 모두 억제되어 형태형성을 조사할 수 없었다. 이는 H7과 H8이 배아발생에 비가역적인 억제제로 작용하기 때문인 것으로 여겨진다. 그러나 tyrosine protein kinase의 억제제인 Gen이 처리된 배아의 세포질을 치환한

P+2-Gen군의 배아는 포배까지 정상적인 발생이 가능했고, serine-threonine protein kinase의 억제제인 6-DMAP를 처리한 배아의 세포질을 치환한 P+2-DMAP군의 배아는 발생이 4일째까지 진행되었다. 이들을 이용한 실험에서 밀집현상은 P+2-Gen군에서 P+2군과 유사하게 4-세포기에서 일어났으나, P+2-DMAP군에서는 8-세포기에 일어났다. 따라서 6-DMAP를 처리한 배아에서 밀집이 빨라진다는 기존의 연구와는 다른 결과를 얻었으나(Aghion et al., 1994), 밀집현상의 조절에 serine-threonine protein kinase에 의해 인산화되는 단백질이 작용함을 확인할 수 있었다.

Fulka 등(1996)은 metaphase(maturation) promoting factor(MPF)의 활성이 높은 1-세포 배아의 세포질에 8-세포 배아의 핵을 치환하였을 때 핵이 1-세포의 상태로 reprogram되나, MPF의 활성이 낮은 세포질에서는 이런 현상이 관찰되지 않아 MPF에 의한 배아 발생의 조절 가능성이 제시되었다. 6-DMAP는 maturation 또는 MPF의 catalytic subunit인 p34cdc2의 탈인산화에 관여하여(Rime et al., 1989), MPF를 불활성화 시키고, G2/M phase의 전이를 억제하여 세포분열을 억제한다(Neant & Guerrier, 1988; Rime et al., 1989). 본 실험에서 6-DMAP가 처리된 배아의 세포질과 절반의 1-세포 배아와 융합한 P+2-DMAP군의 배아는 밀집이 8-세포기에 일어나 P+2와 P+2-Gen군의 배아에 비해 늦어졌다. 따라서 serine-threonine protein kinase에 의한 인산화는 형태형성과정의 조절에 중요한 역할을 할 것으로 제안된다.

또한 기존의 연구에서는 세포 또는 배아의 배양시에 직접적으로 단백질 활성화효소 억제제나 활성물질을 처리하여 단기적인 효과를 조사하였으나 배아의 발생에 치명적인 영향을 주게 되므로, 배아의 발생과정에서 단계별로 나타나는 연속적인 효과를 알 수 없다. 본 실험은 이러한 억제제를 처리한 세포질을 정상 배아에 치환하여 발생과정의 각 단계에

미치는 영향을 연구할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 이런 차이에 의해 기존의 연구자들과 다른 결과를 얻게 된 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 배아의 초기 형태형성 조절은 배아 시기에 합성되는 단백질보다는 수정 후 1-에서 2-세포기 사이에 일어나는 단백질 인산화 또는 이들에 의해 영향을 받는 세포질내 물질에 의해 조절되며, 이 과정에서 특히 serine-threonine protein kinase가 중요한 역할을 할 것으로 제안된다.

### 인용문헌

- Aghion J, Gueth-Hallonet C, Antony C, Gross D, Maro B (1994) Cell adhesion and gap junction in the early mouse embryo are induced prematurely by 6-DMAP in the absence of E-cadherin phosphorylation. *J Cell Sci* 107:1369-1379.
- Aoki F, Worrall DM, Schultz RM (1997) Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181:296-307.
- Bachvarova R (1992) A maternal tail of poly(A) : the long and the short of it. *Cell* 69:895-897.
- Bloom T, McConnell J (1990) Changes in protein phosphorylation associated with compaction of the mouse preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 26:199-210.
- Bloom T (1991) Experimental manipulation of compaction of mouse embryo alters patterns of protein phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 28:230-244.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I (1989) An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* 86:679-688.
- Ducibella T, Albertini DF, Anderson E, Bigger JD (1975) The preimplantation mammalian embryo : characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev Biol* 45:231-250.
- Fleming TP, McConnell J, Johnson MH, Stevenson BR (1989) Development of tight junctions de novo mouse early embryo : control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. *J Cell Biol* 108:1407-1418.
- Fulka J Jr, Frist ML, Moore RM (1996) Nuclear transplantation in mammals : remodeling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. *BioEssay* 18:835-840.
- Heyner S, Abraham V, Wikarczuk ML, Ziskin MC (1990) Effects of ultrasound on DNA and RNA synthesis in preimplantation mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 25:209-214.
- Houliston E, Pickering SJ, Maro B (1987) Redistribution of microtubules and peri-centriolar material during compaction in mouse blastomeres. *J Cell Biol* 104:1299-1308.
- Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21:927-934.
- Johnson MH, Maro B (1986) Time and space in the mouse early embryo : a cell biological approach to cell diversification. In : Rossant J and Pedersen RA (ed) *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*, Cambridge University Press, New York, pp 35-66.
- Kanka J, Hozak P, Heyman Y, Chesne P, Degrolard J, Renard JP, Flechon JE (1996) Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev* 43:135-144.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Latham KE, Solter D, Schultz RM (1992) Acquisition of a transcriptionally permissive state during the 1-cell stage of mouse embryogenesis. *Dev Biol* 149:457-462.
- Lee JE, Chai YG, Bae IH, Yoon Y-D, Kim MK (1995) Effects of protein kinase inhibitors on gene activation of early embryos in mouse. *Korean J Fertil Steril* 22:191-201.
- Levy JB, Johnson MH, Goodall H, Maro B (1986) Control of the timing of compaction : a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J Embryol Exp Morph* 95:213-237.

- Lo CW, Gilula NB (1979) Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* 18:399-409.
- Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211:1437-1438.
- Neant I, Guerrier P (1988) 6-Demethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp Cell Res* 176:68-79.
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
- Piko L, Cregg KB (1982) Quantitative changes in total RNA, total poly(A) and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol* 89:362-378.
- Reeve WJD, Ziomek CA (1981) Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *J Embryol Exp Morph* 62:339-350.
- Renard JP, Baldacci P, Richouze-Duranthon V, Pournin S, Babinet C (1994) A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. *Development* 120:797-802.
- Rime H, Neant I, Guerrier P, Ozon R (1989) 6-Dimethylaminopurine(6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Dev Biol* 133:169-179.
- Schultz GA, Heyner S (1992) Gene expression in preimplantation mammalian embryos. *Mutat Res* 296:17-31.
- Schultz RM (1993) Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 15:531-538.
- Sefton M, Johnson MH, Clayton C (1992) Synthesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development. *Development* 115:313-318.
- Stice SL, Robl JM (1988) Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 39:657-664.
- Taylor KD, Piko L (1987) Patterns of mRNA prevalence and expression of B1 and B2 transcripts in early mouse embryos. *Development* 101:877-892.
- Van Blerkom J (1993) Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cells. *Hum Reprod* 8:1525-1539.
- Wang Q, Latham KE (1997) Requirement for protein synthesis during embryonic genome activation in mice. *Mol Reprod Dev* 47:265-270.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell K (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Winkel GK, Ferguson JE, Takeichi M, Nuccitelli R (1990) Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Dev Biol* 138:1-15.