

생쥐 난자와 배아 및 난소와 수란관의 Membrane-Type Matrix Metalloproteinase 1 및 2의 유전자 발현

김지영 · 이희진 · 김소라 · 김해권[†] · 강성구¹ · 이승재² · 조동제³

서울여자대학교 자연과학대학 생물학과, ¹인제대학교 생물학과,
²미래와 희망 산부인과, ³연세대학교 의과대학 산부인과

Expression of Membrane-Type Matrix Metalloproteinase 1 and 2 in Mouse Oocytes, Embryos, Ovary and Oviduct

Jiyoung Kim, Heejin Lee, Sora Kim, Haekwon Kim[†], Sung Goo Kang¹,
Seung Jae Lee² and Dong Jae Cho³

Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Seoul Women's Univ, Seoul 139-774, Korea

¹*Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Inje Univ, Kimhae 621-749, Korea*

²*Mirae & Heemang Ob & Gyn Clinic, Seoul, 135-120, Korea*

³*Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Yonsei Univ, Seoul, 135-270, Korea*

요 약: Membrane-type matrix metalloproteinase(MT-MMP)는 세포막에 부착된 채로 작용하는 단백질 가수분해효소로서 최근 들어 정상 및 암세포 등 각종 조직세포의 재구성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서는 RT-PCR 방법을 사용하여 생쥐 난자와 초기배아에서의 MT1-MMP와 MT2-MMP 유전자 발현 양상을 조사하였다. 생후 3주 및 8주된 생쥐의 난소로부터 얻은 미성숙난자와 체외 및 체내에서 성숙시킨 난자에서의 MT1-MMP와 MT2-MMP mRNA의 발현을 조사하였다. 그 결과 미성숙난자와 체외 및 체내에서 성숙시킨 난자 모두에서 MT1-MMP 및 MT2-MMP의 mRNA가 발현되었으나 미성숙난자에서는 매우 약하게 발현되는 것이 관찰되었다. 2세포기 배아, 4세포기 배아, 상실배, 포배 및 탈각한 포배를 대상으로 MT2-MMP mRNA의 발현양상을 조사한 결과 2세포기에서는 발현이 일어나지 않았고 4세포기에 이르러서야 뚜렷한 발현이 관찰되었다. 상실배와 포배에서는 현저히 강한 발현이 관찰되었다. 생쥐의 난소조직에서도 MT1-과 MT2-MMP 모두 발현되는 것이 관찰되었는데 각각은 배란을 전후로 한 시기에 상관없이 항상 같은 정도의 mRNA 발현을 나타내었다. 생쥐의 수란관조직도 난소조직과 유사하게 배란시기에 상관없이 같은 수준의 MT1-과 MT2-MMP mRNA 발현양상을 보여주었다. 이러한 결과들로 미루어 생쥐 배아에서 발현되는 MT2-MMP는 초기배아의 분화과정에서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 난소와 수란관의 조직재구성과 관련한 MT1-과 MT2-MMP의 역할은 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

ABSTRACT: Membrane type matrix metalloproteinases(MT-MMPs) have been suggested to play an important role during structural remodeling of various tissue. Expression patterns of MT1-MMP and MT2-MMP mRNAs were investigated in oocytes, embryos, ovary and oviduct of mouse during their differentiation or periovulatory period using RT-PCR technique. Both cDNA products of MT1- and MT2-MMP of immature oocytes were barely discernable with a minimum amount but the expressions were distinct in mature oocytes regardless that they were matured in vivo or in vitro. MT2-MMP was not expressed by 2-cell embryos but was expressed by 4-cell stage embryos. From the morula stage until hatched blastocyst stage, embryos showed intense expression of MT2-MMP with a sudden increase at blastocyst stage. While mouse ovarian tissues showed both expression of MT1- and MT2-MMP, there was no stage-specific difference throughout the estrous cycle. Mouse oviducts also exhibit constant amount of both MT1- and MT2-MMP expressions throughout periovulatory period, i.e., before or after ovulation. These observations lead to suggest that the differential expressions of maternal MT1- and MT2-MMP during meiotic resumption of mouse oocytes and embryonic expression of MT2-MMP particularly at blastocyst stage might play a role in the differentiation of mouse oocytes and/or embryos. The precise function of MT1- and MT2-MMP with regards to their participation in the remodeling of ovarian and oviductal tissues remains in a question.

Key words: MT-MMP, Oocytes, Embryos, Ovary, Oviduct.

서론

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 calcium과 zinc 등에 의해서 활성화되는 endopeptidase로서 이들의 대표적인 기능은 세포간기질 (extracellular matrix, ECM)의 주성분인 collagen이나 gelatin 등을 가수분해하는 것이다. ECM을 분해하는 MMP들은 기질 특이성에 기초하여 collagenases (MMP1-, MMP8, MMP-13), gelatinase A (MMP-2)와 gelatinase B (MMP-9), matrilysin (MMP-7)과 metalloelastase (MMP012) 및 stromelysins (MMP-3, MMP-10, MMP-11) 등의 분비형 MMP (secretory MMP) (Matrisian, 1992)와 이들과 구조적으로는 유사하나 세포내에서 합성된 후 세포밖으로 분비되지 않고 세포막에 부착하여 활동을 하는 세포막형 MMP (membrane-type matrix metalloproteinases, MT-MMPs)가 있다. MT-MMP를 포함한 모든 MMP들은 공통적으로 pre-, pro-, catalytic 과 hemopexin-like domain을 가지는데 MT-MMP는 이 외에 세가지 insertion unique를 갖는다 (Tanaka et al., 1997). 첫 번째 unique는 pro-peptide 와 catalytic domain 사에 삽입되어 있는 11개의 아미노산 부위로 이 부위는 세포내 furin에 의해 인식되어져 propeptide 부위가 잘려 활성화된다. 두번째 unique는 catalytic domain 에 삽입되어 있는 8 amino acid이고, 세번째 unique는 C-terminal 부위에 있는 transmembrane domain이다. MT-MMP 는 이 domain이 있기 때문에 세포막에 부착되어 세포의 바깥표면에서 기능을 수행한다. 현재까지 대략 6종류가 알려져 있는 MT-MMP들 (Llano et al., 1999; Pei, 1999) 중 MT1-, MT2-, 및 MT3-MMP는 progelatinase A에 대한 기질 특이성을 보이는데 특히 MT1-MMP는 생체내에서 MMP-2 즉 progelatinase A를 활성화시키는 효소로 제안되고 있다. 즉 대부분의 MMP는 inactive proenzyme이나 zymogen 형태로 합성되며 세포밖으로 분비된 후 트립신이나 plasmin 등에 의해 활성화된다(Murphy et al., 1994). 그러나 MMP 중 type IV collagen과 laminin을 녹이는 gelatinase A는 plasmin이나 트립신에 의해서는 활성화되지 않고 MT1-MMP에 의해서는 활성화된다. 따라서 MT1-MMP는 gelatinase A의 physiological activator로 여겨지고 있다 (Kinoshita et al., 1998). 이외에도 MT1-MMP는 type I, type III collagen, fibronectin 등의 ECM 성분을 분해하는 효소의 기능도 함께 갖고 있다 (Ohuchi et al., 1997). 한편 transmembrane domain이 결여된 분비형으로 합성 분비된 MT2-MMP도 progelatinase를 활성화시킬 수 있으며 fib-

ronectin과 tenasin, laminin 등을 분해하는 능력을 갖추고 있다 (d'Ortho et al., 1997; Miyamori et al., 2000). 그러나 MT1-MMP와는 달리 MT2-MMP의 생체내에서의 역할은 물론 동 효소의 기질에 관해서도 알려져 있지 않다.

포유류의 난소 내 난포는 난포자극호르몬에 반응하여 난포 자신과 난포 내 미성숙난자를 성숙시키고, 황체형성 호르몬에 의해 미성숙난자는 감수분열을 재개하여 성숙 난자가 되고 난포의 파열에 따라 배란된다. 배란 후 남은 난포는 황체로 전환되어 일정기간 동안 에스트로젠과 프로게스테론 호르몬을 합성 분비하다가 결국은 퇴화 (luteolysis)한다. 난자의 성장, 성숙, 배란에 따른 난소 조직의 재구성은 난포세포와 조직세포 각각 및 서로간의 ECM과 난포막 (basement membrane)성분의 재배열 및 분해를 의미하는데, 이에는 serine-proteinase나 plasmin 그리고 matrix metalloproteinase (MMP)같은 ECM의 단백질 성분을 가수분해하는 효소에 의해 주도된다 (Lipner, 1994). 특히 ECM의 다양한 성분에 대해 기질 특이성을 갖는 여러 MMP들이 난소의 조직재구성과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (Tsafirri, 1995), 흰쥐를 재료로 한 최근의 연구에 의하면 난포의 형성 및 퇴화 과정에는 MMP뿐만 아니라 MMP-2를 기질로 하는 MT1-MMP도 관여하는 것으로 추측되고 있다 (Goto et al., 1999; Liu et al., 1999). 또한 수정 후 9일째에서 17일째까지 생쥐 배발생이 진행됨에 따라 MT-MMP의 mRNA 발현이 점차 증가하며 출생한 생쥐의 폐, 사지 골격, 심장, 신장 등의 분화에 따라 다양한 발현 양상을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Kinoh et al., 1996). 이외에도 여러가지 조직세포의 정상 및 암 조직세포의 분화과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 제안되고 있다 (Polette & Birembaut, 1998; Seiki, 1999). 그러나 이들 대부분의 연구는 MT1-MMP의 역할에 관한 것으로서 MT2-MMP의 생리적 기능에 관해서는 별로 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 포유동물 난자의 성숙과 초기배아의 분화, 그리고 이들의 생리적 환경인 난소와 수란관을 대상으로 이들 조직에서의 MT1-과 MT2-MMP가 하는 역할을 알아보기 위하여 유전자의 발현 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙 난자, 체외 및 체내성숙난자의 수집

본 실험에 사용한 실험동물은 중앙실험동물 사육장에서 사육된 ICR strain 생쥐로 생후 3주된 것과 6주 이상된

생식능력이 있는 암컷을 사용하였다.

난자는 세가지 방법으로 얻었다. 미성숙 난자는 생후 3주된 생쥐를 경추탈골로 도살한 후 난소를 꺼내어 0.4% BSA가 첨가된 Minimum essential medium (0.4% BSA-MEM, Gibco)으로 옮겨 해부현미경 (SZH, Olympus) 아래서 예리한 편셋으로 난포를 터뜨려 얻었다. 체외성숙난자는 위의 방법으로 미성숙난자를 모아서 mineral oil로 덮은 0.4% BSA-MEM 30 μ l 방울 배양접시에 놓고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 17시간 배양하여 얻었다. 체내성숙난자는 다음과 같은 방법으로 얻었다. 즉 생후 3주 및 8주된 생쥐에 48시간 간격으로 PMSG(Folligon, Intervet)와 hCG를 주사하고 hCG 주사 후 15시간째에 수란관을 적출하였다. 이를 D-PBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)에 옮기고 수란관의 팽대부를 찢어 난구세포에 쌓인 난자를 수집하여 여기에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거한 후 제1극체가 형성된 체내성숙난자만을 모았다. 모든 난자는 100개씩 Tri-reagent 200 μ l에 모아서 RNA를 추출할 때까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

2. 생쥐의 배아의 수집

임신한 생쥐의 배아를 얻기 위하여 PMSG와 hCG를 48시간 간격으로 각각 5 i.u.씩 복강에 주사하여 과배란을 유도하고 수컷과 합사시켰다. 다음 날 아침 질전이 확인된 것만을 골라 따로 분리, 사육하였으며 수정 후 1, 2, 3일째에는 수란관을 그리고 4일째에는 자궁조직을 적출, flushing하여 각각 2세포기 및 4~8세포기 배아, 상실배, 포배를 얻었으며 이 중 2세포기 배아의 일부를 체외에서 3일간 배양하여 투명대로부터 탈각된 배아를 얻었다. 이렇게 얻은 배아는 배아 50개당 300 μ l의 Tri-reagent를 첨가하여 RNA 추출을 위한 시료로 사용하였다.

3. 생쥐의 난소와 수란관 조직의 수집

난소는 생후 3주된 생쥐에 PMSG를 주사한지 48시간, hCG를 주사한지 10시간, 15시간 그리고 48시간이 경과한 후에 도살한 각각의 생쥐로부터 난소 10개씩을 얻어 Tri-reagent 1ml에 넣어 RNA를 추출할 때까지 -20°C에 냉동보관하였다. 수란관은 생후 8주된 생쥐를 같은 방법으로 처리하여 수란관을 적출하되 48시간 처리군의 경우에는 수컷과 합사시킨 후 임신이 확인된 생쥐로부터 수란관을 적출하여 D-PBS로 수란관의 내용물을 씻어 내린 후 -20°C에서 냉동 보관한 후 사용하였다.

4. mRNA의 추출

난자는 100개씩 그리고 배아는 각 50개씩 모아 Tri-reagent 200 μ l를 첨가한 후 -20°C 냉동고에 보관한 후 사용하였다. RNA를 분리하기 위하여 40 μ l의 chloroform을 넣고 잘 섞어서 15분간 방치시킨 후 12,000 g로 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 이로부터 맨 윗층을 취하여 동량의 isopropanol을 넣고 잘 섞어서 10분간 실온에서 방치시켰다. 그 후 12,000 g로 4°C에서 10분간 원심분리한 후 침전물에 1 ml의 75% ethanol을 넣고 12,000 g로 5분간 원심분리 하였다. 얻어진 침전물을 대기 중에서 건조시키고 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 3차 증류수 (DEPC-DW) 9.75 μ l에 녹여 RT-PCR을 위한 시료로 사용하였다.

난소와 수란관은 조직 10개당 1 ml의 Tri-reagent에 담아 homogenization을 한 후 12,000 g로 4°C에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액에 200 μ l의 chloroform을 넣고 잘 섞어서 15분간 방치시킨 후 위와 같은 방법으로 처리하여 얻어진 침전물에 30 μ l의 DEPC-DW를 첨가하여 RT-PCR의 재료로 사용하였다. 난소 및 수란관조직의 경우, 추출된 RNA시료를 spectrophotometer로 측정하여 UV 260nm에서 RNA를 정량하였고 시료의 260nm/280nm 값이 1.7 이상일 경우 순수하게 분리된 것으로 판단하였다. 시료는 전체 RNA 농도가 1 μ g/ μ l이 되도록 희석한 후 이 중 3 μ l를 취하여 RT-PCR을 시행하였다.

5. 역전사-중합 효소 연쇄 반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

역전사 반응은 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer)을 이용하여 행하였다.

난자와 배아의 경우, 9.75 μ l의 DEPC-DW에 녹아있는 total RNA에 4 μ l의 25mM MgCl₂, 2 μ l의 10x PCR buffer, 2 μ l의 10mM dNTP, 0.25 μ l의 40 unit RNase inhibitor, 0.75 μ l의 Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT, 20U/ μ l, Promega) 그리고 1 μ l Oligo d(T)¹⁵ (0.5mg/ml)를 넣고 nuclease-free water로 최종 부피를 20 μ l로 맞추었다. 역전사 반응은 42°C에서 60분, 99°C에서 5분 동안 수행하였다. 반응이 끝난 시료는 중합효소 연쇄반응의 재료로 사용하였다.

중합효소 연쇄반응은 1 μ l의 25mM MgCl₂, 2 μ l의 10x PCR buffer, 0.25 μ l의 2.5 unit Taq polymerase(Takara) 그리고 각각 Table 1에 나타낸 바와 같은 0.25 μ l의 upstream 및

Table 1. Mouse cDNA primer pairs used in the study

Gene	Primer pairs	Primer Sequence	Size
β -actin	5'-primer	5'-GTGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'	539bp
	3'-primer	5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTC-3'	
MT1-MMP	5'-primer	5'-GGTGAGGAATAACCAAGTGATGG-3'	452bp
	3'-primer	5'-CTACCTTCAGCTTCTGGTTGTTG-3'	
MT2-MMP	5'-primer	5'-AGGCTCACACCTCTGGAAGA-3'	402bp
	3'-primer	5'-GAGACCTATGGGGCACTGAA-3'	

down stream primer(100 pmol)을 넣고 RT 생성물 5 μ l를 넣은 후 nuclease-free water로 최종부피 25 μ l를 맞추었다. 중합효소 연쇄반응은 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 35 cycles를 진행시킨 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 heating하여 반응을 멈추었다. 난소 조직의 경우 28 cycles를 진행시켰다. 반응이 끝난 시료에는 6x loading buffer (0.25% bromophenol blue, 40% sucrose를 섞은 후 2% agarose gel로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 D.W. 100ml에 10 μ g/ μ l의 ethidium bromide 17 μ l를 섞은 염색 시료에 넣고 10분간 염색하고 흐르는 물에 20분 동안 탈염색하였다. 염색된 gel은 UV light로 관찰하고 image analyzer (Bio-rad)를 이용하여 합성된 cDNA 양상을 사진 찍었다. 본 연구는 세번씩 반복된 실험으로 이루어졌으며 매 번의 실험에서 같은 결과를 얻었다.

6. 실험기구 및 시약의 준비

본 실험에 사용된 시약들은 특별히 언급한 경우 이외에는 Sigma에서 제공되는 것을 사용하였다. 실험에 사용된 기구 중 embryological watch glass 등 초자기구는 180 $^{\circ}$ C에서 30분간 건열멸균하여 사용하였으며 이외의 기구는 120 $^{\circ}$ C에서, 15lbs의 압력으로 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 배양액은 사용하기 전에 millipore membrane(pore size ; 0.22 μ m)으로 여과멸균하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 생쥐 난자의 MT1-과 MT2-MMP 유전자 발현

생후 3주된 생쥐의 난소로부터 얻은 미성숙난자(oocytes with germinal vesicle)와 이를 배양하여 얻은 체외 성숙난자(in vitro matured oocytes with a polar body) 그리고 생후 8주된 생쥐로부터 얻은 체내성숙난자(in vivo matured oocytes with a polar body)의 MT1-(452bp) 및

MT2-MMP(402bp) 유전자의 발현양상을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 것처럼 난자의 성숙여부와 상관없이 모든 난자에서 MT1-과 MT2-MMP mRNA가 모두 존재하는 것이 관찰되었다. 그러나 성숙난자의 mRNA량은 미성숙난자에 비해 상대적으로 많은 것으로 여겨진다. 즉 β -actin의 cDNA 합성량은 미성숙난자가 성숙난자보다 같거나 더 많은데도 불구하고 MT-1과 MT2-MMP의 cDNA 양은 미성숙난자가 성숙난자보다 현저히 적은 것으로 나타났다. 그러나 체외 및 체내에서 성숙한 난자간의 MT1-과 MT2-MMP의 cDNA량의 차이는 명확하지 않았다. 이로 미루어 MT1-과 MT2-MMP 유전자는 생쥐 난자의 경우 성숙에 따라 발현이 증가하는 것으로 추측된다.

생쥐를 비롯한 대부분의 포유동물의 난자는 성숙이 진행됨에 따라 여러 가지 구조적인 변화를 일으키는데 이는 난자를 둘러싸고 있는 난구세포의 확장(Nagyova et al., 1999; Prochazka, 2000), 체외배양에 따른 투명대의 경화현상(Kalab et al., 1993) 등에서 잘 나타난다. 특히 배양액 내 혈청성분이나 난포액성분이 결여될 때 나타나는 투명대의 경화는 난자의 성숙 시 분비되는 단백질 가수분해효소의 작용에 의한 것으로 알려져 있다(Moller et al., 1989). 또한 난구세포의 확장현상은 생쥐의 경우 난자로부터 분비되는 요인에 의해 주도된다(Eppig et al., 1993). 따라서 MT-MMP는 세포막에 위치하여 세포로부터 분비되는 불활성형태의 단백질을 분해하여 활성화시킨다는(Pei & Weiss, 1996; Ohuchi et al., 1997) 점에서 볼 때 난자의 성숙에 따른 구조변화에 동 유전자가 관여할 가능성이 있다.

생쥐의 초기배아를 대상으로 MT1-MMP 유전자 발현양상을 연구한 근래의 결과에 의하면 수정란에서는 동 유전자의 mRNA가 나타나지만 2세포기에서는 나타나지 않았다가 4세포기에 이르러 다시 유전자의 발현이 이루어지기 시작하여 상실배를 거쳐 포배에서는 현저히 많은 발

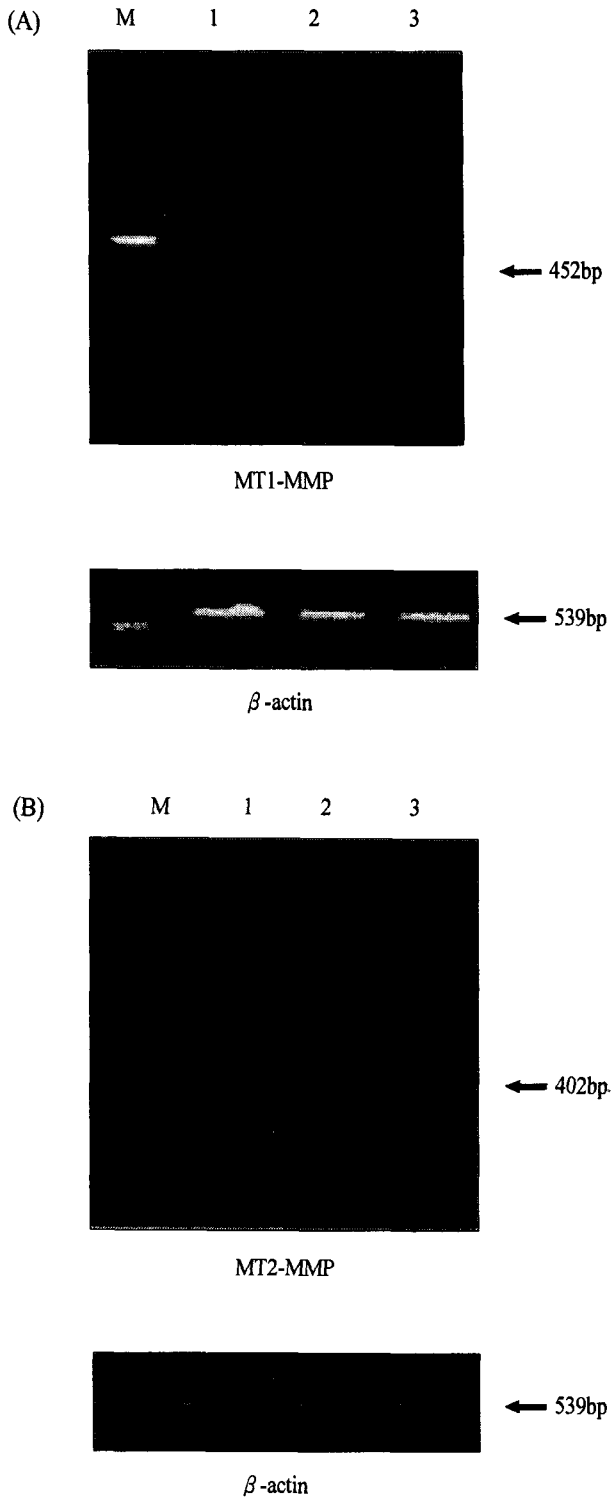


Fig. 1. Expression of MT1-MMP and MT2-MMP mRNAs in mouse oocytes during meiotic maturation *in vivo* or *in vitro*. Arrows indicate bands of MT1-MMP(452bp), MT2-MMP(402bp) and β -actin(539bp). (A) MT1-MMP; (B) MT2-MMP; M, 100bp ladder; Lane 1, GV oocytes; Lane 2, *in vivo* matured PB oocytes; Lane 3, *in vitro* matured PB oocytes.

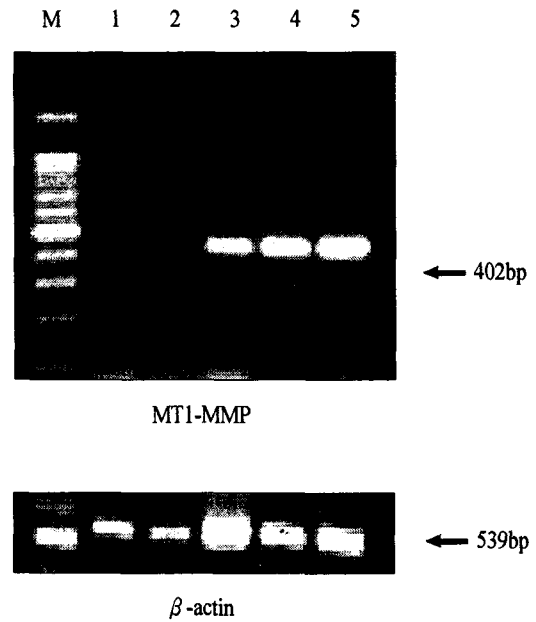


Fig. 2. Expression of MT2-MMP mRNAs in mouse preimplantation embryos. Arrows indicate bands of MT2-MMP(402bp) and β -actin(539bp). M, 100bp ladder; Lane 1, 2cell embryos; Lane 2, 4~8cell embryos; Lane 3, morulae; Lane 4, early blastocysts; Lane 5, hatched blastocysts.

현정도를 나타낸다(Tanaka et al., 1998). MT2-MMP 유전자의 발현양상을 조사한 본 연구의 결과도 이와 매우 유사하게 2세포기에서는 mRNA가 검출되지 않았다가 4~8세포기에서부터 나타나기 시작하여 포배에 이르러서는 매우 많은 발현양상을 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 MT1- 및 MT2-MMP 유전자 모두 난자의 성숙시기에 maternal gene으로부터 발현된 후 수정란 혹은 2세포기에 이르러 발현이 중지되었다가 4세포기에 다시 embryonic gene으로부터 발현을 재개하고 이후 포배가 되면서 많은 양의 발현을 일으킨다는 것을 의미한다.

배발생 과정 중 포유동물의 포배는 자궁에 착상을 하기 위해 투명대의 탈각(hatching)을 일으키는 구조적 변화가 일어나는 시기이다. 대부분의 포유동물의 배아의 투명대는 3 혹은 4종류의 당단백질로 구성되어 있으며 착상을 위한 탈각은 투명대단백질 분해효소의 작용에 의해 이루어지는 것으로 여겨지고 있다. 아직까지 이 효소의 정체는 물론이고 그 기원이 자궁내액에서 분비되는 것인지(Gonzales & Bavister, 1995) 혹은 포배 자신이 발현하는 것인지(Perona & Wassarman, 1986)에 대해서는 밝혀지지 않고 있으나 체외발생 중인 대부분의 동물의 포배가 스스로 탈각을 일으키는 것으로 미루어 포배 자신이 체외에서

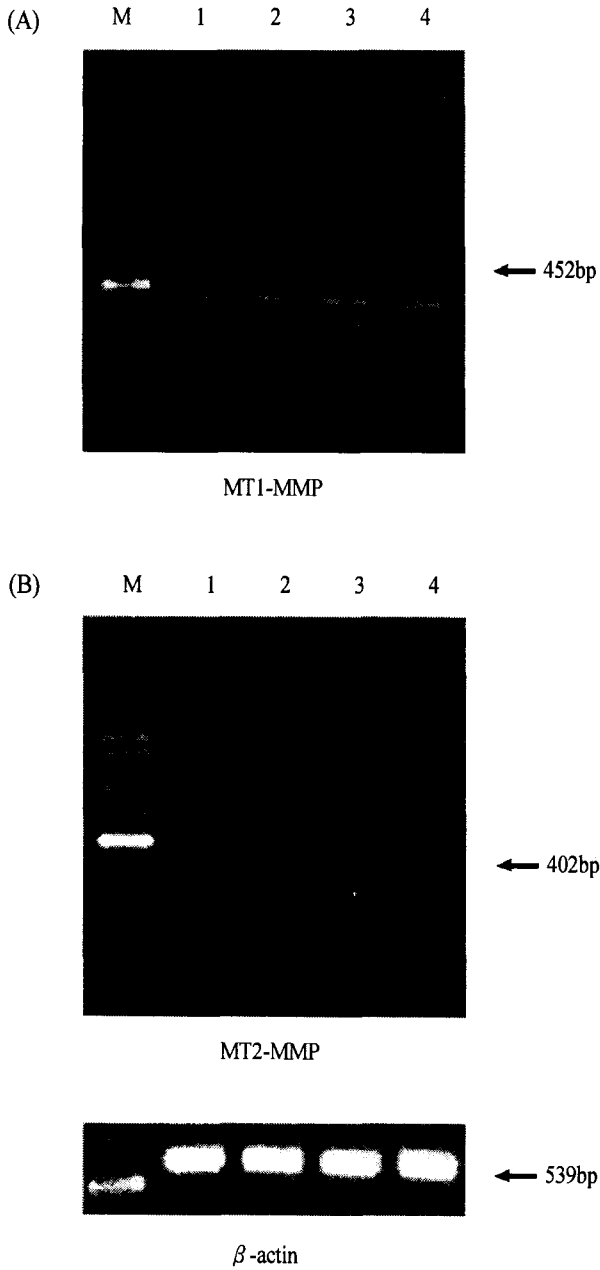


Fig. 3. Expression of MT1-MMP and MT2-MMP mRNAs in mouse ovaries during periovulatory period. Arrows indicate bands of MT1-MMP(452bp), and β -actin(539bp). (A) MT1-MMP; (B) MT2-MMP; M, 100bp ladder; Lane 1, unstimulated ovaries; Lane 2, 48h post PMSG ovaries; Lane 3, 10h post hCG ovaries; Lane 4, 15h post hCG ovaries.

탈각효소를 합성하는 것은 분명하다. 생쥐 포배에서 발견되는 MT-MMP가 할구의 세포막에 위치하여 탈각효소로 작용하는 지는 더 연구가 이루어져야 할 것이다.

생쥐를 재료로 한 본 실험의 결과 MT1- 및 MT2-MMP가 난소 (Fig. 3) 및 수란관 (Fig. 4)조직에서도 뚜렷하게

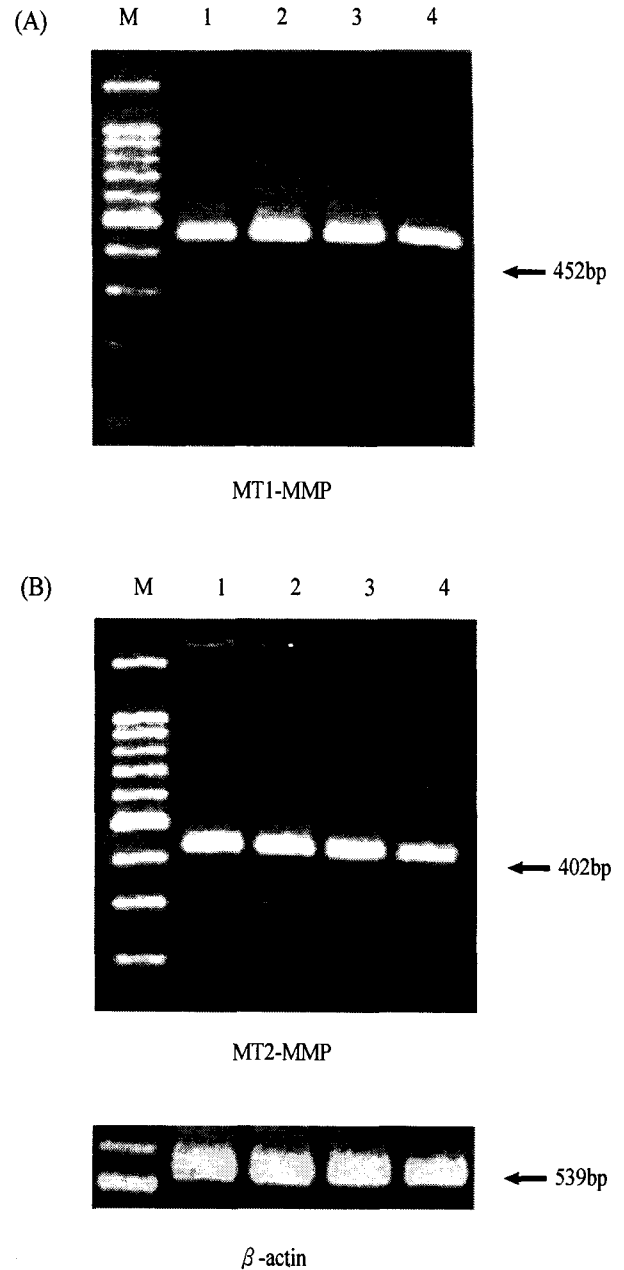


Fig. 4. Expression of MT1-MMP and MT2-MMP mRNAs in mouse oviducts during periovulatory period. Arrows indicate bands of MT1-MMP(452bp), MT2-MMP(402bp) and β -actin (539bp). (A) MT1-MMP; (B) MT2-MMP; M, 100bp ladder; Lane 1, unstimulated oviducts; Lane 2, 48h post PMSG oviducts; Lane 3, 10h post hCG oviducts; Lane 4, 15h post hCG oviducts.

발현되는 것이 관찰되었다. 또한 각 조직에서 배란시기를 전후로 하여 양적인 변화가 없는 것으로 나타났는데 이는 생쥐난소의 MT1-MMP만을 대상으로 한 최근의 연구결과 (Hagglund et al., 1999)와 유사하다. 그러나 흰쥐의 배란 전 난소의 경우 MT1-MMP는 난포세포에서는 감소하지만

난포 주위의 theca cell에서는 오히려 증가하는 것으로 알려져 있고 (Liu et al., 1998), 배란 후 황체의 형성 및 퇴화 시에는 전체적으로 변화가 없거나 (Liu et al., 1999) 퇴화를 유도할 때에는 증가한다는 (Goto et al., 1999) 보고로 미루어 생쥐의 난소조직 내 MT1-MMP의 발현은 세포의 종류에 따라 발현양상이 달라지는 것으로 여겨지며 그 결과 조직 전체의 MT1-MMP의 발현 양상은 차이가 나지 않는 것으로 추측된다. 한편 본 실험에서는 처음으로 MT2-MMP도 난소 조직에서 발현되는 것이 관찰되었고 그 양상은 MT1-MMP와 유사하게 나타났다. 포유동물의 난소 내 MMP는 배란시 난포의 구조변화에 중요한 역할을 담당한다는 점(Tabibzadeh, 1996)과 MT-MMP의 기능은 MMP의 활성화 및 세포간기질(ECM)의 분해라는 점을 고려할 때 이러한 결과는 결국 난포의 성장, 배란, 황체의 형성과 퇴화 등 난소의 조직재구성에 MT1-MMP는 물론이고 MT2-MMP도 중요한 역할을 수행할 것이라는 점을 시사한다.

포유동물의 수란관 조직도 생식주기에 따라 구조적 변화를 일으키며 이에 여러 가지 요인들이 작용할 것으로 추측되나 (Hunter, 1994) 조직 재구성과 관련된 MMP의 발현에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 다만 Kim 등 (Kim et al., 1998)에 의하면 적어도 4종류의 MMP가 생쥐 수란관 조직에서 합성되며 햄스터를 재료로 한 최근의 연구에 의하면 수란관의 분비물 및 수란관 조직의 추출물에서도 단백질 분해효소의 활성이 나타나는 (Jimenez Diaz et al., 2000) 사실로 미루어 수란관에서 발현되는 MT1- 및 MT2-MMP는 생식주기 및 배란에 따른 수란관의 MMP의 활성화 혹은 ECM의 분해 등을 통해 조직의 재구성에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 사람의 자궁 조직의 MT1-MMP는 progesterone에 의해 발현이 조절된다는 보고 (Zhang et al., 2000)는 이처럼 생식과 관련한 MT-MMP의 역할을 뒷받침해준다.

인용문헌

- d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Garrilovic J, Smith B, Timpl R, Zzard L and Murphy G (1997) Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250: 751-757.
- Emonard H and Grimaud JA (1990) Matrix metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol* 36: 131-153.
- Eppig JJ, Peters AHFM, Telfer EE, Wigglesworth K (1993) Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown *in vitro*: preliminary characterization of the factor. *Mol Reprod Dev* 34: 450-456.
- Gonzales DS, Bavister BD (1995) Zona pellucida escape by hamster blastocysts *in vitro* is delayed and morphologically different compared with zona escape *in vivo*. *Biol Reprod* 52: 470-480.
- Goto T, Endo T, Henmi H, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Sato H, Kudo R (1999) Gonadotropin-releasing hormone agonist has the ability to induce increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane type 1-MMP expression in corpora lutea, and structural luteolysis in rats. *J Endocrinol* 161: 393-402.
- Hagglund A, Ny A, Leonardsson G and Ny T (1999) Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology* 140: 4351-4358.
- Hunter R (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 39: 176-181.
- Jimenez Diaz M, Giunta S, Valz-Gianinet J, Pereyra-Alfonso S, Flores V, Miceli D (2000) Proteases with plasminogen activator activity in hamster oviduct. *Mol Reprod Dev* 55: 47-54.
- Kalab P, Schultz RM, Kopf GS (1993) Modifications of the mouse zona pellucida during oocyte maturation: inhibitory effects of follicular fluid, fetuin, and alpha 2HS-glycoprotein. *Biol Reprod* 49: 561-7.
- Kim M, Lee K, Kim H, Kim MK and Cho DJ (1998) Protein expression of matrix metalloproteinases of mouse reproductive organs during estrous cycle. *Kor J Fertil Steril* 25: 161-170.
- Lipner H (1994) Mechanism of mammalian ovulation. In : Knobil E & Neil J (eds), *The Physiology of Reproduction*. vol 1, Raven Press, New York, pp 447-488.
- Liu K, Olofsson JI, Wahlberg P, Ny T (1999) Distinct expression of gelatinase A [matrix metalloproteinase (MMP)-2], collagenase-3 (MMP-13), membrane type MMP 1 (MMP-14), and tissue inhibitor of MMPs type 1

- mediated by physiological signals during formation and regression of the rat corpus luteum. *Endocrinology* 140: 5330-5338.
- Liu K, Wahlberg P, Ny T (1998) Coordinated and cell-specific regulation of membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and its substrate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation. *Endocrinology* 139: 4735-4738.
- Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 59: 2570-2576.
- Matrisian LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463.
- Miyamori H, Takino T, Seiki M, Sato H (2000) Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 796-800.
- Moller CC, Wassarman PM (1989) Characterization of the proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse egg. *Dev Biol* 132: 103-112.
- Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, Docherty A (1994) Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci* 732: 31-41.
- Nagyova E, Prochazka R, Vanderhyden BC (1999) Oocyte-tectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium. *Biol Reprod* 61(3): 569-74.
- Ohuchi E, Lamai K, Fujil Y, Sato H, Seiki M and Okada Y (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests *interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules*. *J Biol Chem* 272: 2446-2451.
- Pei D (1999) Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res* 9: 291-303.
- Pei D, Weiss SJ (1996) Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 271: 9135-9140.
- Perona RM, Wassarman PM (1986) Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. *Dev Biol* 114: 42-52.
- Polette M, Birembaut P (1998) Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1195-1202.
- Prochazka R, Srsen V, Nagyova E, Miyano T, Flechon JE (2000) Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol Reprod Dev* 56: 63-73.
- Seiki M (1999) Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 107: 137-143.
- Tabibzadeh S (1996) The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 2: 77-92.
- Tanaka M, Sato H, Takino T, Iwata K, Inoue M, Seiki M (1997) Isolation of a mouse MT2-MMP gene from a lung cDNA library and identification of its product. *FEBS Letters*. 402: 219-222.
- Tanaka SS, Togooka Y, Sato H, Seiki M, Tojo H, Tachi C (1998) Expression and localization of membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in trophoblast cells of cultured mouse blastocysts and ectoplacental cones. *Placenta* 19: 41-48.
- Tsafiriri A (1995) Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* 377: 121-140.
- Zhang J, Hampton AL, Nie G, Salamonsen LA (2000) Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzyme coordinately expressed in human endometrium. *Biol Reprod* 62: 85-94.