

생쥐 배아의 부화에 관여하는 Trypsin 유사 효소의 발현과 역할

김수경^{1,3} · 강희규¹ · 전진현³ · 최규완² · 김문규^{1†}

¹한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ²바이오메드 연구소
³성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구소

Expression and Role of Trypsin-Like Enzyme Involved in Hatching of Preimplantation Mouse Embryos

Soo Kyung Kim^{1,3}, Hee-Kyoo Kang¹, Jin Hyun Jun³,
Kyoo Wan Choi² and Moon Kyoo Kim^{1†}

¹ Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

²Bio-Med Institute, Suwon 442-380

³Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, Sungkyunkwan University, School of Medicine, Seoul, Korea

요약 : 생쥐 초기배아의 체외배양 시 부화에 관련된 단백질 분해효소의 발현 시기와 존재부위를 알아보고 trypsin 억제제 benzimidine을 배양액에 첨가하여 부화효소의 역할을 살펴보았다. 부화 효소로 제안되고 있는 trypsin 유사효소의 발현부위를 확인하기 위해 rhodamine이 부착되어 있는 trypsin substrate probe를 이용하여 형광염색하였다. 생쥐 배아의 발생과정에서 trypsin 유사효소의 발현은 후기 상질 배아에서부터 관찰되었으며, 포배기 배아에서는 영양배엽 표면에서 전체적으로 관찰되었다. 특히, 부화가 진행되고 있는 배아의 부화 개시 부위 (blebbing)에서 그 염색 정도가 상대적으로 강함을 확인할 수 있었다. 생쥐 4-세포기 배아의 체외배양 시 배양액에 trypsin 억제제인 benzimidine을 1mM 농도로 첨가하였을 때 포배기로의 발생률은 영향을 받지 않았지만, 부화율은 15.8%로 대조군의 83.0%에 비해 유의하게 ($p < 0.02$) 낮게 나타났다. 배아의 발생단계에 따라 5mM의 benzimidine을 12시간 동안 처리한 경우 부화율이 8.7%로 대조군의 83.0%에 비해 유의하게($p < 0.01$) 낮았다. 결론적으로, trypsin 유사효소는 초기 포배기에서부터 발현되기 시작하며 특히, 후기 포배기에서 그 효소의 작용이 부화 과정에 커다란 영향을 미치는 것이 확인되었다. 또한 배양중 부화 과정에서는 배아 자체에서 분비되는 trypsin 유사효소의 역할만으로도 부화할 수는 있지만 생체 내에서는 배아와 자궁내막 상피와의 상승적 상호 작용에 의해 부화과정이 더 활발히 진행되는 것으로 생각된다.

ABSTRACT : This study was conducted to investigate the expression pattern of trypsin-like enzyme and the effect of a trypsin inhibitor (benzimidine) on hatching process during *in-vitro* culture of mouse preimplantation embryos. The trypsin-like enzyme was identified by rhodamine-conjugated trypsin substrate probe. The expression of trypsin-like enzyme was firstly detected at the late morula stage, and the enzyme was uniformly localized in the trophectoderm of late blastocysts. Especially, intense fluorescence was observed in the blebbing area of hatching blastocysts. Bisbenzimidine, contained in culture media, did not alter embryonic development from 4-cell stage to the expanded blastocyst but decrease the hatching rate in 1mM concentration (15.8% vs 89.7%, $p < 0.02$). In the treatment of bisbenzimidine (5mM) for 12 hours according to the embryonic stage of mouse, the hatching rate of control (83.0%) and treatment in late blastocysts (8.7%) were significantly ($p < 0.01$) different. From these results, we suggested that the hatching enzyme having trypsin-like activity was localized from the late morula stage, and the hatching process by this enzyme was activated in the late blastocyst stage of mouse embryos.

Key words : Trypsin-like enzyme, Hatching, Mouse embryo.

서론

일반적으로 포유류의 난자는 당단백질로 구성되어 있는 투명대(zona pellucida)에 싸여 있다. 투명대는 난자의 성장시기 중 제 2난포(secondary follicle)시기에 처음으로 나타나고 난자가 성숙되면서 복잡한 구조로 변화된다. 또한 종에 따라 구성되어 있는 당단백질의 종류와 구조가 다양한데 생쥐의 투명대는 ZP1(200kD), ZP2(120kD), ZP3(83kD)의 3종류 당

본 연구는 한양대학교 1999년 교내 연구비 지원으로 수행되었음.
†교신저자: 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791 (전) 02-2290-0955, (팩) 02-2294-0955, e-mail: kimmk@hanyang.ac.kr

단백질로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다(Wassarman, 1988). 투명대는 수정 후 투명대반응으로 구조가 변화되어 다수정을 방지하고, 난할중 배아를 보호하고 형상을 유지하게 한다(Maro & Johnson, 1985).

포배기에 이르러 배아는 투명대를 뚫고 나오면서 부화과정을 진행한다. 이러한 부화 과정은 배아의 포배강내로 ATP-ase에 의한 능동 수송으로 여러 가지 무기 이온과 용질들이 유입됨에 따라 팽압이 증가하고 (Wiley, 1987) 특정 단백질 분해효소에 의한 투명대 연화에 의해 일어나는 것으로 보고되고 있다 (Gonzales and Bavister, 1995). 포유류의 경우 자궁 내막의 상피세포에서 분비되는 lysin에 의해 투명대가 연화되어 부화를 유도하는 것으로 제안된 바 있으나 (McLaren, 1970) 배아를 체외배양할 때, 시간이 좀 지연되기는 하지만 모체의 영향이 배제되어 부화가 일어나므로 자궁내의 환경이 부화에 필수적인 것은 아니라고 할 수 있다. Perona와 Wassarman (1986)은 생쥐 배아를 이용한 실험에서 trypsin 억제제가 부화에 강한 억제효과가 있음을 발견하였으며, 이러한 trypsin 억제제는 C-terminal aldehyde group이 배아내 trypsin 유사효소의 활성 부위인 serine 잔기에 공유결합을 함으로써 효소의 활성을 방해하는 것으로 알려져 있으며 (Dabich, 1981), 미루어 보아 포배기 배아에서 분비되는 trypsin 유사효소 물질이 부화를 유도하는 것으로 추측된다.

체내에서 발생 중인 배아는 외부 환경에 존재하는 효소나 성장인자의 작용에 의해 투명대가 연화되어 부화과정이 진행되는 것으로 알려져 있지만, 인간의 체외수정 및 배아이식술에서 과배란 유도 및 완벽하지 못한 체외 배양조건에 의해 유발되는 투명대 구조의 비정상적인 변화는 차후 배아의 부화를 억제하여 착상 및 임신을 방해할 수 있다. 따라서 포유류의 배아가 착상 및 임신하기 위하여는 먼저 부화가 일어나야 하며 그 기작을 명확하게 규명하는 것은 부화 그 자체뿐 아니라 응용적 차원에서도 매우 중요한 의미를 가질 것으로 사료된다.

본 연구에서는 형광으로 표지된 trypsin substrate probe를 이용하여 생쥐의 초기 배아의 발생 과정에서 trypsin 유사효소의 발현부위를 관찰하고 배아를 체외배양하는 동안 trypsin 억제제인 benzamidine을 처리한 후 부화율을 조사함으로써 부화 효소의 역할에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 배아의 채취 및 배양

본 실험에 사용한 동물은 광주기 14시간, 암주기 10시간으

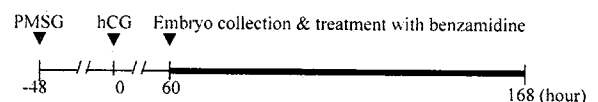
로 조절하고 물과 먹이를 충분히 공급해준 ICR계 생쥐로 생후 6~8주된 암컷과 12주 이상된 수컷을 사용하였다. 배아를 획득하기 위해서 생쥐 암컷의 복강에 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)과 human chorionic gonadotropin (hCG, Organon)을 48시간 간격으로 각각 5IU씩 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 교배시켰다. 다음날 copulation plug가 확인된 생쥐를 선별하여 hCG투여 후 60시간째에 수란관을 적출하여 배양액을 관류하는 방법으로 4-세포기 배아를 수확하였다.

배아의 배양은 60mm 배양 접시에 배양액 HTF (Human Tubal Fluid) drop 30 μ l를 만들고 그 위에 paraffin oil을 덮어서 37°C, 5% CO₂와 100% 습도가 유지되는 배양기내에서 일정기간 배양하였다.

2. Trypsin 억제제 (benzamidine)의 처리

Trypsin 억제제인 benzamidine (Sigma)이 생쥐 배아의 발생과 부화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 hCG 주사 후 60시간째 4-세포기 배아를 수확하여 0, 0.01, 0.1 그리고 1mM 농도의 benzamidine이 포함되어 있는 기본 배양액에서 108시간동안 배양하였으며 benzamidine이 첨가된 배양액은 24시간 간격으로 교체해 주었다 (Fig.1-exp.1). 또한 배아의 발생 단계에 따른 trypsin 억제제의 부화 억제효과를 확인하기 위해, 4-세포기, 상실기, 초기 포배기, 말기 포배기의 배아에 각각 12시간씩 1mM과 5mM의 benzamidine을 처리한 후 신선한 배양액으로 옮겨 배양하였다 (Fig.1-exp.2). 각 군에 따라 hCG

Exp. 1. The exposure of embryos to 0, 0.01, 0.1 and 1mM of benzamidine for 108 hours



Exp 2. The exposure of embryos to 1 and 5mM of benzamidine for 12 hours at different stage.

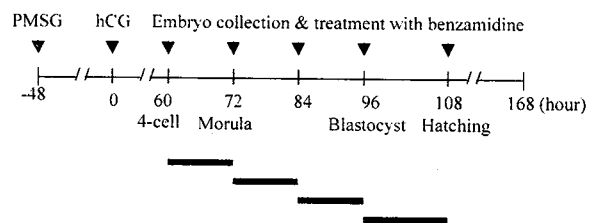


Fig. 1. Experimental scheme of benzamidine treatments (—) during *in vitro* culture of mouse embryos.

주사 시간을 기준으로 168시간이 지난 후에 도립 위상차 현미경하에서 배아의 발생 정도와 부화 여부를 확인하였다. 관찰 결과의 통계적 검정은 χ^2 -test를 사용하였으며 $p < 0.05$ 인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. Trypsin 유사효소 발현부위 관찰을 위한 형광 염색

배아내 trypsin 유사효소의 발현부위를 조사하기 위하여 rhodamine을 부착한 bis-(CBZ-L-isoleucyl-L-tryptyl-L-arginineamide),- dihydrochloride probe (Molecular Probe, USA)를 이용하여 관찰하였다. 이 probe의 작용과정은 다음과 같다. 형광을 나타내지 않는 구조의 rhodamine 110의 유도체인 bisamide가 trypsin에 의해 monoamide와 형광물질인 rhodamine 110으로 전환되므로 형광 현미경을 이용하여 관찰할 수 있다. 생쥐의 초기배아는 발생 단계에 따라 4세포기, 8세포기, 상실기 (morula), 초기 포배기 (early blastocyst), 후기 포배기 (late blastocyst), 부화중인 포배기 (hatching blastocyst), 부화된 포배기(hatched blastocyst) 등으로 구분하여 trypsin 유사효소의 발현 여부와 부위를 관찰하였다.

기본 배양액에 100 μ M의 probe를 첨가하여 배아를 30분간 처리한 후 기본 배양액으로 완전히 세척하였다. 염색된 배아들은 slide에 옮겨 cover slip으로 덮은 후 형광현미경 (Axio-plan, Zeiss)하에서 관찰하였다. Rhodamine 110의 최대 excitation wavelength와 emission wavelength는 각각 498nm와 521 nm이며, 이 probe의 spectral 특성을 조화시키기 위해 band-pass와 long-pass filter set (O-5715 and O-5717)를 사용하였다.

결 과

1. Trypsin 억제제 처리에 따른 생쥐 초기 배아의 발생과 부화

수란관으로부터 수확한 4세포기 배아를 108시간동안 trypsin 억제제인 benzamidine이 첨가된 배양액에서 체외배양하면서 나타난 배아의 발생과 부화에 대한 결과를 Table 1.에 나타내었다. 포배기로의 발생률은 benzamidine에 의해 영향을 받지 않았지만 (Fig. 2-B), 부화율은 1mM의 benzamidine을 처리한 군에서 통계적으로 유의하게 낮았다($p=0.0105$). 배아의 발생 단계에 따라 trypsin 억제제를 12시간 동안만 처리한 경우, 1mM을 처리하였을 때는 각각의 군에서 그 부화율은 차이가 없었지만, 5mM을 처리하였을 때에는 후기 포배기 배아에서 부화율이 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) 낮게 나타났다 (Table 2).

Table 1. The Effect of Trypsin Inhibitor(benzamidine)on the Development and hatching of 4-cell Mouse Embryos *in vitro* Cultured for 108 hours

Treatment of benzamidine(mM)	Embryo development	
	Blastocyst(%)	Hatched BL(%)
0.00	^a 45/53(84.9)	^b 44/53(83.0)
0.01	46/55(83.6)	43/55(78.2)
0.10	47/58(81.0)	42/58(72.4)
1.00	40/57(70.2)	9/57(15.8)*

* Significantly different from control($p < 0.02$).

^a : No. of blastocyst/No. of cultured 4-cell embryos(%)

^b : No. of hatched blastocyst / No. of cultured 4-cell embryos(%)

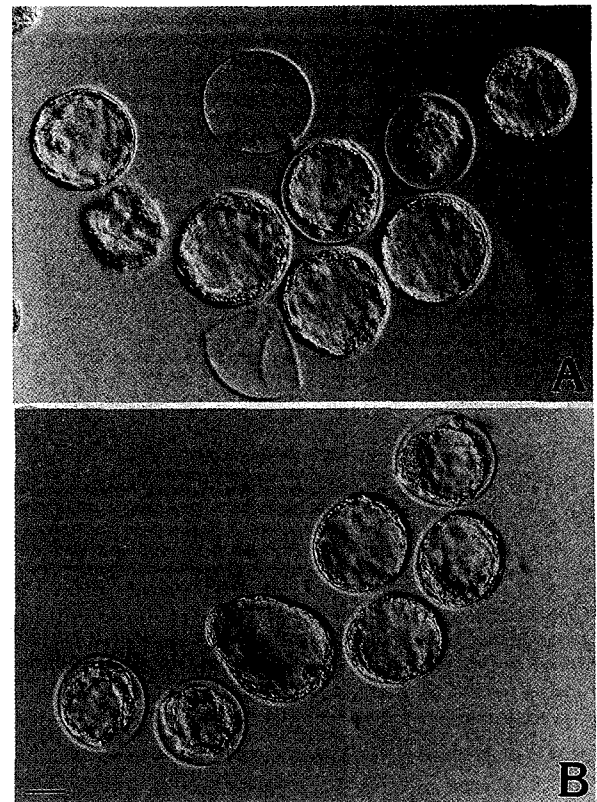


Fig. 2. Photographs of the mouse embryos *in vitro* cultured in media containing 0 mM benzamidine, as control (A), and 1 mM benzamidine (B). Bar = 50 μ m.

2. 생쥐 초기 배아에서 trypsin 유사 효소의 발현

생쥐 배아의 발생 시기별로 trypsin substrate probe로 염색한 결과 morula이전의 초기 배아에서는 trypsin 유사 효소의 발현이 관찰되지 않았지만, 초기 포배기의 배아에서부터 미약하게 그 발현이 관찰되었다. 말기 포배기 배아에서는 전 부위에서 약하게 효소의 발현을 관찰할 수 있었으며, 특히

Table 2. hatching rate of the mouse embryos treated with a trypsin inhibitor(benzamidine) for 12 hours at different stage of the embryos cultured up to 168 hours after hCG injection

Embryonic stage treated with benzamidine	Hatching rate of the embryos treated with benzamidine		
	Control	1mM	5mM
4-cell	^a 59/ 73(80.8)	36/51(70.6)	25/ 42(59.5)
Morula	97/113(85.8)	55/73(75.3)	64/106(60.4)
Early blastocyst	55/ 69(79.7)	55/68(80.8)	35/ 60(58.3)
Late blastocyst	83/100(83.0)	47.67(70.1)	9/103*(8.7)

* Significantly different from control(p<0.01)

^a : No. of hatching embryos / No. of cultured embryos(%)

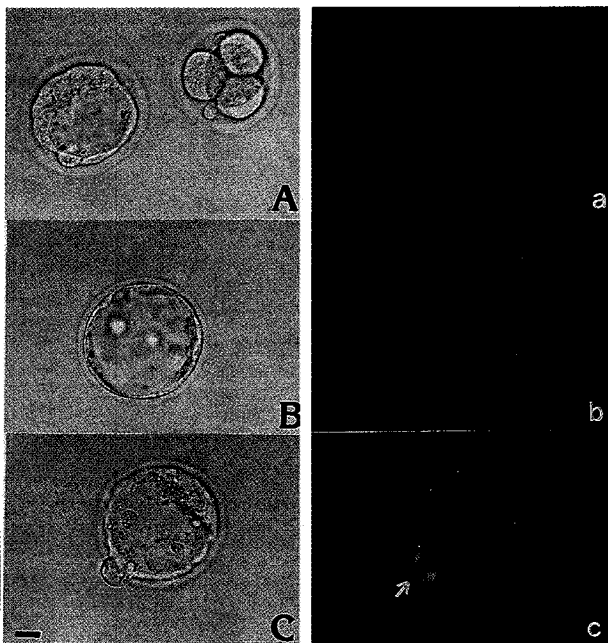


Fig. 3. Photographs of the mouse embryos localized a trypsin-like enzyme with rhodamine conjugated bis-dihydrochloride probe. Phase contrast microphotographs of 4-cell embryo and early blastocyst (A), late blastocyst (B), hatching blastocyst (C), and (a), (b) and (c) are the fluorescent microphotographs of the same as (A), (B) and (C), respectively. Blebbing portion of a blastocyst was intensively stained (arrow). Bar = 20 μ m.

부화가 개시되는 부위(blebbing)에서 상대적으로 강한 염색 정도를 관찰할 수 있었다 (Fig.3-C,c). 동일한 발생 단계를 나타내는 배아간에 염색 정도는 다소 차이를 나타내었지만, 말기 포배기 이후의 배아에서는 trypsin 유사 효소의 강한 발현을 확인할 수 있었다.

논 의

현재까지 알려진 포유류의 부화 과정은 포배강의 형성으로 인한 투명대에 대한 물리적인 압력과, 영양배엽과 자궁내막에서 분비되는 단백질 분해 효소의 용해 작용에 의한 것으로 생각되어지고 있다 (Cole, 1967; Dabich, 1981; Perona & Wassarman, 1986; Yamazaki et al., 1994). 부화에 관계된 위의 두 과정에서 중요한 과정은 일차적으로 단백질 분해 효소에 의해 투명대가 얇아지는 과정 (zona thinning)이며, 이차적으로 포배강 형성과정에서 발생하는 팽압에 의한 투명대의 파열인 것으로 추측되고 있다 (Gordon & Dapunt, 1993). Wassarman 등(1984)은 생쥐 배아의 부화 과정에서 단백질 분해 효소의 역할을 알아보기 위하여 배양액 내에 여러 가지 효소 억제제를 처리한 결과 trypsin 억제제가 강력한 부화 억제제임을 관찰하였고 부화 효소는 trypsin 유사 효소일 것으로 제안한 바 있다. 또한, hamster의 경우 체내에서 부화될 때 자궁내 효소에 의해 위난강의 공간이 증가된 형태를 나타내는데 이와 같은 형태는 체외에서 pronase 또는 proteolytic 효소 처리에 의해 변형된 모습과 유사한 형상을 보이는 것으로 보고되었다 (Gonzales and Bavister, 1995).

본 실험에서는 체외배양 중인 생쥐 배아를 부화 모델로 이용하여, 자궁에서 발현되는 효소의 영향은 배제된 상태에서 배아내 효소의 역할에 관해서 조사하였다. 체외배양 중인 된 배아의 발생 과정 동안 부화 효소가 발현되는 시기를 추적하기 위하여 rhodamine이 부착되어 있는 trypsin substrate probe를 이용하여 체외에서 배아 발생이 진행되는 동안 trypsin의 발현 양상을 관찰하였다. 그 결과 후기 상실기 배아에서부터 그 발현이 관찰되었으며 부화가 진행중인 배아에서는 부화 개시 부위 (blebbing)에서 강한 효소의 활성이 나타났다 (Fig. 2). 그리고 각각의 포배마다 trypsin 활성도가 다른 것으로 미루어 보아 배아에서 발현되는 trypsin 유사 효소의 발현 정도에 따라 부화 과정에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

또한, 부화 개시 부위는 성계의 경우 원시 난축을 따라 특이적인 배열을 하여 극성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 (Lepage, 1992) 포유류에 있어서는 polar 혹은 mural trophoctoderm의 어느 한쪽에 국한되지 않지만 1999년 Cheon등에 의하면 trophoctoderm의 polar region에서 mural region으로 갈수록 감소하는 구배를 형성하고 있고 inner cell mass 쪽에서 용해되는 확률이 높은 경향을 보고하고 있다.

생쥐 배아의 발생 시기별로 trypsin 억제제를 처리한 실험

(Table 3)에서, 후기 포배기 배아에서 부화 억제 효과가 현저하게 나타난 것은 부화 과정에 관련된 효소가 그 시기에 투명대에 직접적으로 작용함을 시사하는 것으로 생각된다. 그러나 최근의 Hwang (2000) 등에 의하면 투명대의 존재 유무가 trypsin-like enzyme의 분비에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 보고하고 있다.

결론적으로, 배아의 부화와 관련되어 있는 trypsin 유사 효소는 후기 상실기 배아에서부터 발현되기 시작하며 특히, 후기 포배기에서 그 효소의 작용이 부화 과정에 커다란 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한, 배아의 부화 과정에 배아 자체의 역할이 중요한 부분을 차지하며, 생체 내에서는 배아와 자궁내막 세포와의 상호 작용에 의해 부화과정이 진행되는 것으로 생각된다.

인용문헌

- Cole RJ (1967) Cinemicrographic observation on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 17: 481-490.
- Cheon YP, Gye MC, Kim CH, Kang BM, Chang YS, Kim SR, Kim MK (1999) Role of actin filament in the hatching process of mouse blastocyst. *Zygote* 7: 123-129.
- Dabich D (1981) Impairment of mouse blastocyst hatching by naturally occurring serine proteinase inhibitors. *Fed Proc* 40: 1808.
- Gonzales DS, Bavister BD (1995) Zona pellucida escape by hamster blastocysts *in vitro* is delayed and morphologically different compared with zona escape *in vitro*. *Biol Reprod* 52: 470-480.
- Gordon JW, Dapunt U (1993) A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 59: 1296-1301.
- Hwang S, Lee E, Chung Y, Yoon BK, Lee JH, Choi D (2000) Intactness of zona pellucida does not affect the secretion of a trypsin-like protease from mouse blastocyst. *J Korean Med Sci* 15: 529-532.
- Lepage T, Sardet C, Gache C (1992) SPatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 150: 23-32.
- Maro B, Johnson NH, Pickering SJ, Flach G (1984) Change in actin distribution during fertilization of the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 81: 211-237.
- Mclaren A (1970) The fate of the zona pellucidain mice. *J Embryol Exp Morphol* 23: 1-19.
- Perona RM, Wassarman PM (1986) Mouse blastocysts hatch *in vitro* by a trypsin-like proteinase associated cells of mural trophoctoderm. *Dev Biol* 114: 42-52.
- Wassarman PM, Greve JM, Perona RM, Roller RJ, Salzmann GS (1984) How mouse eggs put on and take off their extracellular coat. "Molecular Biology of Development" 213-225.
- Wassarman PM (1988) Zona pellucida glycoprotein. *Annu Rev Biochem* 57: 415-442.
- Wiley LM (1984) Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. *Dev Biol* 105: 30-342.
- Yamazaki K, Kato Y (1989) Sites of zona pellucida shedding by mouse embryo other than mural trophoctoderm. *J Exp Zool* 249: 347-349.
- Yamazaki K, Kato Y, Kanioka K, Hoshi M, Sawada H (1994) Trypsin-like hatching enzyme of mouse blastocyst: evidence for its participation in hatching process before zona shedding of embryos. *Develop Growth Differ* 36: 149-154.