

## 사람 난포액의 Caseinolytic Enzyme

심 명 선 · 김 해 권<sup>†</sup>

서울여자대학교 생명공학과

### A Caseinolytic Enzyme in Human Follicular Fluid

Myung-Sun Shim and Haekwon Kim<sup>†</sup>

Department of Biotechnology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

**ABSTRACT** : Follicular fluid(FF) of mammalian Graafian follicles contains various kinds of proteins and proteinases that are believed to play important roles during follicular growth, oocyte maturation and ovulation of mature oocytes. Previous studies of human FF(hFF) demonstrated the presence of many serine/threonine proteinases and matrix metalloproteinases such as gelatinases, however, little is known about the caseinases. Present study was aimed to examine the presence and the property of caseinolytic enzyme in hFF. Using casein zymographic method, it was found that hFF, human adult serum and cord serum exhibited one intense 80 kDa and another weak 78 kDa bands having caseinolytic activity. When inhibitors were added to the zymographic substrate buffer, caseinolytic activity of both 80 kDa and 78 kDa proteins were inhibited by ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA) or soybean trypsin inhibitor(SBTI), but not by E-64, phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) or 1,10-phenanthroline. Thus both enzymes appear to belong to a family of trypsin-like enzyme. Addition of EDTA to the zymographic substrate buffer almost abolished the caseinolytic activity of both enzymes. However, further addition of a divalent metal ion such as CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> or ZnCl<sub>2</sub> to the same buffer fully restored the enzyme activity at 5 mM concentration despite the presence of EDTA. Based upon these observations, 80 kDa and 78 kDa caseinolytic enzymes are present in human follicular fluid and they appear to be trypsin-like enzymes of which caseinolytic activity needs the presence of Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup> or Zn<sup>++</sup>.

**Key words** : hFF, Caseinolytic activity, Zymography.

**요 약** : 포유동물의 성숙한 난포의 난포액 속에는 여러 종류의 단백질 분해효소가 있으며 이들은 난포의 형성과 퇴화 및 난자의 성숙과 배란 등의 다양한 변화에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 난포액 속의 단백질 가수분해효소 중에는 serine proteinase가 비교적 잘 알려져 있으나 다른 효소 특히, caseinolytic enzyme에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 사람의 난포액을 재료로 하여 caseinolytic enzyme의 존재 여부 및 동 효소의 특성을 알아보려 하였다. 사람의 난포액과 혈청 그리고 사람의 제대혈을  $\alpha$ -casein을 기질로 하는 zymography 방법으로 분석한 결과 분자량 80 kDa의 매우 강한 caseinolytic activity를 지니는 효소 단백질과 분자량 78 kDa의 비교적 약한 caseinolytic activity를 갖는 단백질 등 두 개의 caseinolytic enzyme이 관찰되었다. 이 caseinase들의 특성을 알아보기 위해 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), soybean trypsin inhibitor(SBTI), 1,10-phenanthroline, E-64 그리고 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 zymography의 substrate buffer에 처리한 결과 EDTA와 SBTI에 의해서 80 kDa와 78 kDa caseinase의 활성이 억제되었다. 이로 미루어 80 kDa와 78 kDa caseinase는 trypsin-like enzyme인 것으로 추측된다. 한편 사람 난포액의 zymography 수행시에 5 mM의 EDTA가 첨가된 substrate buffer에 CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>를 각각 0에서 10 mM의 농도별로 처리한 결과 모두 5 mM 농도에서 가장 높은 caseinase 활성을 보였다. 금속 이온의 첨가없이 EDTA만 처리한 대조군의 경우 caseinase의 활성은 나타나지 않았다. 이로 미루어 80 kDa 및 78 kDa caseinase는 효소 활성을 위해 이가 금속 양이온을 필요로 하는 것으로 여겨진다.

## 서 론

\*이 연구는 2003년도 서울여자대학교 교내특별학술연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

<sup>†</sup>교신저자: 서울시 노원구 공릉2동 126, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 02-970-5665, (팩) 02-970-5974, E-mail: hwkim@swu.ac.kr

성숙한 포유동물의 난소 내의 난자는 대부분이 한 층의 납작한 난포세포로 둘러싸여져 있는 원시난포의 형태로 있고 이외의 나머지 10% 정도의 난자는 성장 중에 있는 난포나 완전히 성장한 난포의 형태로 존재한다. 난포의 성장은 난자의 성장과 난포세포의 증식 및 분화에 의해 일어난다. 난포세포 중 난자를 직접 둘러싸고 있는 난구세포들은 한 층의 세포층으로 난자를 둘러싸고 있다가 증식하여 여러 층의 난구세포층을 이루게 된다. 난포의 성장이 진행되면 난포 내의 과립

세포층 사이의 한쪽에 공간이 나타나며 혈액 성분이나 난포 세포가 분비한 물질로 채워지게 된다. 이 공간이 아주 크게 된 상태의 성숙한 난포를 그라프씨난포라 한다. 난포세포층이 3~4층으로 증식되면 모세혈관망이 난포 주위의 난포막을 둘러싸고 있는 협막세포층에 형성되며, 이 협막세포들도 난포강 내 난포액의 축적에 관여하고 있다(Hunter, 1988).

포유동물의 난포액은 난자의 성장과 성숙에 필요한 환경을 제공하며 일부의 난포액은 배란시에 난자-난구복합체와 함께 수관관 내로 들어가게 되며(Hunter, 1988; Hansen et al., 1991) 수관관내로 들어간 난포액은 수정시 정자의 기능을 조절한다(Yao et al., 1998). 사람의 난포액은 정자의 수정능력 획득(Langlais et al., 1998), 침체반응(Tesarik, 1985; Fetterolf et al., 1994) 그리고 난자-정자의 융합(Siegel et al., 1990)에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한 사람의 난포액을 정자에 전처리하면 체외수정율을 증가시키며(Giorgetti et al., 1992; Hourani et al., 1995) 사람의 수정란 체외배양액에 처리하면 초기 배발생 과정과 임신율을 향상시켜 주는 것으로 알려져 있다(Fakih & Vijayakumar, 1990).

포유동물의 성숙한 난포의 난포액에는 여러 종류의 단백질이 있으며, 이들은 혈액으로부터 공급되는 것과 난포세포 자체가 만들어낸 것이 함께 있다. 이들 중 일부는 단백질 분해효소로서 그 정체와 기능이 정확하게 알려져 있지 않지만, 생체 내에서 난포의 형성과 퇴화 및 난자의 성숙과 배란 등의 다양한 변화에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 난포액 속에 존재하는 단백질 가수분해효소 중 다양한 기질 특이성을 갖는 일반적인 효소로는 serine proteinase(Murata et al., 1999)가 알려져 있으며 cysteine-, aspartyl-, 혹은 caseinolytic protease 등에 대해서는 알려진 것이 없다. 이외에 세포간기질(extracellular matrix, ECM)의 여러 단백질 성분들을 분해하는 matrix metalloproteinase(MMP)들이 난포액내에 함유되어 있는데 특히 type I 및 type IV collagen과 gelatin에 대해서 강한 기질특이성을 나타내는 MMP-2와 MMP-9이 존재하여 성숙한 난포의 배란과정에 중요한 역할을 한다는 연구 결과가 있다(Kim et al., 2003). 본 연구에서는 사람의 난포액 내의 caseinolytic enzyme의 존재 유무 및 특성을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 준비

사람의 난포액은 체외수정 시술 중에 있는 환자로부터 기증받았으며, 성숙한 난자를 가지고 있는 난포에서 채취하였

다. 얻어진 난포액을 2,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다가 사용 직전에 상온에서 녹인 후 millipore membrane(pore size  $0.8\ \mu\text{m}$ , Millipore, USA)로 여과하여 실험에 사용하였다. 또한 사람의 혈청은 건강한 성인으로부터 항응고제 없이 혈액을 채취한 후, 혈액이 응고되도록 실온에서 20~30분 방치한 뒤 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하였다. 사람의 체대혈은 제왕절개 또는 질식분만 시 태아로부터 체대를 분리한 후, 태반박리 전 항응고제인 Citrate Phosphate Dextrose Adenine-1(CPDA-1)이 들어있는 혈액채취용 백에 부착된 바늘을 사용하여 체대정맥으로부터 채취하였다. 체대혈의 채취는 중력을 이용하였으며 채취해서 실험에 사용하기까지 36시간을 초과하지 않았다.

### 2. Zymography

사람 난포액 내의 caseinase는  $\alpha$ -casein을 기질로 하는 zymography 방법으로 분석하였다. Standard Laemmli acrylamide polymerization mixture(8%)에 1.2 mg/ml의  $\alpha$ -casein을 첨가한 gel을 만든 후 non-reducing 조건으로 전기영동을 시행하였다(Laemmli, 1970). 시료 단백질은 sample buffer(0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue)와 1:1로 섞은 후  $10\ \mu\text{l}$ 의 시료를 loading하였다. 전기영동은 stacking gel에서는 15 mA/gel, resolving gel 동안에는 200 V의 속도로 running시켰다. 전기영동이 끝난 gel은 detergent solution(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5% Triton X-100)에 담가 15분 동안 흔들어 주었으며 이를 2번 반복 시행하였다. 그런 다음 substrate buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.02%  $\text{NaN}_3$ )에 담가  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 활성화시켰다. 활성화가 끝난 gel은 0.3% coomassie brilliant blue R-250 solution(acetic acid : isopropyl alcohol : water = 1 : 5 : 4)에 15분 동안 담가 염색한 후 증류수로 탈색시켰다. 이 때 나타나는 clear zone을 caseinase 효소 단백질이 있는 것으로 간주하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질로는 high range marker를 사용하였다. zymography 실험 결과는 3회 이상 반복하여 매번 같은 결과가 얻어지는 것을 확인하였다.

### 3. Proteinase inhibitor 처리

사람 난포액을 시료로 하여 casein-SDS-polyacrylamide를 기질로 하는 전기영동을 시행한 후 곧바로 caseinase 활성을 전개하거나, 필요한 경우 serine/threonine proteinase에 대한 억제제인 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF, 2 mM), trypsin-

like proteinase에 대한 억제제인 soybean trypsin inhibitor(SBTI, 1  $\mu$ g/ml), metalloproteinase에 대한 억제제인 1,10-phenanthroline(5 mM) 혹은 cysteine protease에 대한 억제제인 trans-epoxysuccinyl-L-leucylamide(4-guanidino)-butane(E-64, 10  $\mu$ M)을 각각 casein zymography용 substrate buffer에 처리한 후 caseinase 활성을 전개하였다. 또한 metal chelator인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA, 5 mM)도 같은 방식으로 substrate buffer에 처리하였다.

#### 4. 이가 금속 이온 처리

Zymography를 수행할 때 전기영동이 끝난 gel을 5 mM의 EDTA와 4종류의 이가 금속양이온( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ) 중의 하나가 농도별로(0.5, 1, 2, 5, 10 mM) 들어 있는 substrate buffer에 넣어 caseinolytic activity가 전개되도록 하였다. 대조군은 금속 이온없이 EDTA만 들어 있는 substrate buffer를 사용하였다.

#### 5. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA, Pierce, USA)을 표준 단백질로 하여 bicinchoninic acid protein assay reagent (BCA, Pierce, USA)로 제조회사의 사용설명서에 따라 측정하였다.

#### 6. 실험기구 및 시약의 준비

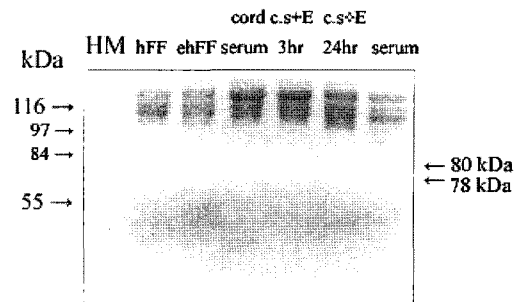
본 실험에 사용된 시약은 특별한 언급이 없는 경우 외에는 Sigma 제품(USA)을 사용하였다. 또한 모든 용액들은 사용 전 멸균하여 사용하였다.

## 결 과

#### 1. 사람의 난포액과 혈청 내의 caseinolytic enzyme

사람의 난포액과 혈청 그리고 사람의 제대혈을 재료로 하여  $\alpha$ -casein을 기질로 하는 zymography 방법을 시행하였다. 그 결과 사람의 난포액에는 매우 강한 caseinolytic activity를 나타내는 80 kDa caseinase와 매우 약한 활성을 나타내는 78 kDa caseinase 등 두개의 caseinase가 나타났으며(Fig. 1, lane hFF) 혈청에서도 같은 형태의 caseinase들이 관찰되었다(lane serum). 이와는 달리 사람의 제대혈에서는 비교적 약한 활성을 갖는 80 kDa caseinase 하나만이 나타났다(lane cord serum).

한편 gelatin을 기질로 하는 zymogram을 시행한 기존의 연구 결과들에서 난포액에 항응고제이며 이가 이온의 chelator인 EDTA를 먼저 처리하면 처리하기 전과 비교해서 서로 다



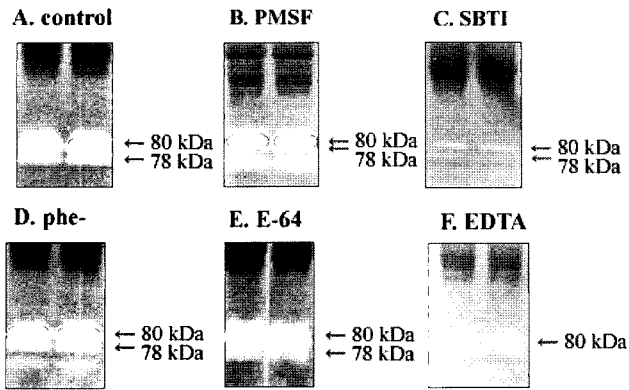
**Fig. 1. Caseinolytic activity of human follicular fluid(hFF), cord blood and serum.** Lane 1, HM; high range molecular weight marker; lane 2, hFF; lane 3, ehFF; hFF treated with 5 mM EDTA for 3 hr; lane 4, cord serum; lane 5, c.s+E 3hr; cord serum treated with 5 mM EDTA for 3 hr; lane 6, c.s+E 24hr; cord serum treated with 5 mM EDTA for 24 hr; lane 7, serum; human adult serum.

른 형태의 gelatinase들이 나타나는 등 이가 이온 chelator에 의해 난포액 내의 gelatinase의 구조가 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2003). 그러나 caseinase의 경우 난포액, 혈청 그리고 제대혈에 먼저 EDTA를 첨가한 후 zymography를 시행한 결과 caseinase 단백질의 효소 활성에는 아무런 변화가 없었다(Fig. 1). 또한 제대혈의 경우 EDTA를 처리한지 24시간이 경과한 후에도 아무런 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1).

#### 2. PMSF, SBTI, 1,10-phenanthroline, E-64 및 EDTA가 사람의 난포액 caseinase의 활성에 미치는 영향

난포액을 시료로 하여 먼저 casein-SDS-acrylamide gel을 이용하는 전기영동법으로 분리한 후 동일한 6개의 gel 조각으로 나누었다. 이들 gel 조각을 각각 zymographic substrate buffer에 넣어 전개하되 잘 알려진 여러 가지 단백질 분해효소들의 억제제를 넣은 후 이들 억제제가 난포액내의 caseinase 단백질의 효소 활성에 미치는 영향을 조사해 보았다.

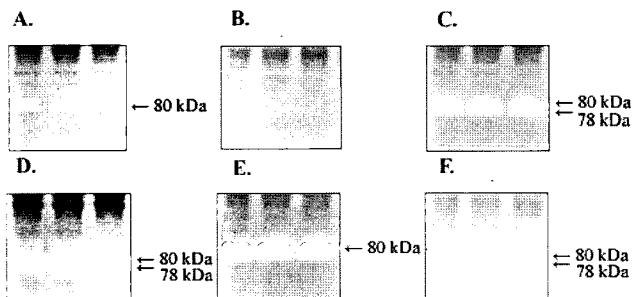
그 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 serine/threonine protease 억제제인 PMSF, trypsin 억제제인 SBTI, MMP 억제제인 1, 10-phenanthroline, cysteine protease 억제제인 E-64 혹은 divalent cation-dependent protease 억제제인 EDTA를 각각 처리한 후 zymography를 시행한 결과, 대조군(A), PMSF(B), phenanthroline(D) 혹은 E-64(E)를 처리한 군에서는 거의 변화가 나타나지 않았다. 이에 비해 SBTI(C)나 EDTA(F)를 처리한 실험군에서는 80 kDa와 78 kDa caseinase의 활성이 현저하게 억제되어 거의 모두 감소하였다.



**Fig. 2.** Effect of various proteinase inhibitors on the caseinolytic activity of hFF during zymography. Inhibitors known to be specific to the different classes of protease were used to determine the nature of caseinase. Inhibitors were added to the substrate buffer during gel incubation. Inhibition of caseinolytic activity was assessed qualitatively after Coomassie blue staining by comparing with control group in the absence of inhibitors. The same samples were loaded on all lanes. A, control; B, PMSF; C, SBTI; D, 1,10-phenanthroline; E, E-64; F, EDTA.

### 3. 이가 금속 양이온이 사람의 난포액 caseinase의 활성에 미치는 영향

Fig. 2의 실험에서와 마찬가지로 난포액을 casein-SDS-acrylamide gel을 사용하여 전기영동을 시행한 후 6 조각의 균으로 나누었다. 그 후 각각의 gel을 5 mM EDTA와 4종류의 이가 금속 양이온 즉  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ , 혹은  $\text{ZnCl}_2$  중 하나가 0에서 10 mM의 농도로 첨가되어 있는 substrate buffer에 넣어 caseinase 효소 활성 반응의 전개를 수행하였다.



**Fig. 3.** Effect of divalent metal ions on the caseinolytic activity of hFF during zymography. Metal ions were added to the substrate buffer during gel incubation. Effect of metal ions were assessed qualitatively after Coomassie blue staining by comparing with control group in the absence of metal ions. The same samples were loaded on all lanes. A, control, no additive; B, 5 mM EDTA; C, 5 mM EDTA and 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; D, 5 mM EDTA and 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; E, 5 mM EDTA and 5 mM  $\text{MnCl}_2$ ; F, 5 mM EDTA and 5 mM  $\text{ZnCl}_2$ .

그 결과 4가지 금속 이온을 각각 substrate buffer에 처리하였을 경우 metal chelator인 EDTA의 영향에도 불구하고 모두 5 mM 농도에서 대조군보다 현저히 좋아진 caseinase 활성을 보였다(Fig. 3). 반면에 금속 이온의 첨가 없이 EDTA만 처리한 대조군의 경우 caseinase의 활성이 사라졌다.

## 고 찰

본 연구의 결과 사람의 난포액 및 제대혈 그리고 혈청에는 각각 80 kDa와 78 kDa의 분자량을 갖는 caseinolytic enzyme이 공통적으로 존재하는 것이 관찰되었다. 사람의 난포액에 들어 있는 caseinase들을 대상으로 조사한 결과 이 효소들은 PMSF, 1,10-phenanthroline, E-64 등의 단백질 가수분해효소 억제제에 대해서는 영향을 받지 않았으나 SBTI 등의 억제제에 의해서는 caseinolytic activity가 현저히 억제되는 것으로 미루어 trypsin-like enzyme인 것으로 추정되며 특히 EDTA에 의해서 활성이 억제되고,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  등의 이가 금속 이온에 의해서 활성이 회복되는 것으로 보아 등 효소들은 metal-dependent trypsin-like enzyme인 것으로 여겨진다. 또한 효소 억제제에 대한 대부분의 실험 결과에서 80 kDa와 78 kDa의 두 효소 모두가 거의 같은 반응 양상을 나타내는 것으로 미루어 두 효소는 서로 isoform일 가능성이 높다.

세포간기질은 조직의 3차원적 구조를 지지해 주며 세포의 증식, 분화, 이동 등에도 관여한다(Matrisian 1992). 따라서 난포의 성장과 분화 및 배란(Ny et al., 1993), 배아의 착상(Strickland & Richards, 1992), 혈관생성과정, 상처의 치료(Romer et al., 1996; Singer & Clark, 1999), 골격의 재구성, 암세포의 침투과정(Price et al., 1997)에는 세포간기질 구조의 조직 재구성이 필요하며 복잡한 세포간기질의 종류 및 성분으로 인해 조직재구성에는 각기 다른 기질 특이성을 갖는 다양한 종류의 효소들이 관여한다. 세포간기질의 조직재구성에 관여하는 단백질 가수분해효소들로는 collagenase, gelatinase, membrane type MMP 등이 있으며 그밖에 tissue type(tPA)과 urokinase type(uPA) plasminogen activator가 알려져 있다(Smith et al., 2002).

포유동물의 성숙한 난포의 난포액은 혈액에서 기원한 성분과 난포세포가 만들어낸 물질들로 구성된다. 이들 중 단백질 분해효소는 그 정체와 기능이 정확하게 알려져 있지 않지만, 난포의 형성과 퇴화 및 난자의 성숙과 배란 등의 다양한 변화에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 이와 관련하여 난포액에 존재하는 단백질 가수분해효소로는 serine protei-

nase(Murata et al., 1999)와 세포간기질의 여러 단백질 성분들을 분해하는 MMP들이 알려져 있는데 특히 type I 및 type IV collagen과 gelatin에 대해서 강한 기질특이성을 나타내는 MMP-2와 MMP-9이 사람과 소의 난포액 내에 존재하며 성숙한 난포의 배란과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 제안된 바 있다(Kim et al., 2001; 2003). 난포의 성장이 이루어지기 위해서는 과립세포와 협막세포의 경계를 이루는 난포막을 포함하여 난포의 3차원적 구조 전체에 걸쳐 조직 재구성이 일어나야 하는데, 특히 영양류의 경우 성장한 난포의 크기는 원시 난포에 비해 약 400배 정도가 된다(Smith et al., 1999). 따라서 type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, fibronectin 등 다양한 성분으로 구성된 난포막(Rodgers et al., 2003)을 갖는 포유동물의 난포가 성장, 배란, 황체화, 퇴화 등의 변화를 일으킬 때에는 서로 다른 기질 특이성을 갖는 여러 가지 효소들이 관여할 것으로 여겨진다. 본 연구의 결과 처음으로 사람의 성체 혈액과 제대혈액을 포함하여 난포액 내에 casein 등의 단백질을 분해하는 활성을 갖는 caseinase가 존재하는 것이 밝혀졌다. 난포의 생성과 소멸 시에 수반되는 극심한 구조 변화를 고려해 볼 때 caseinase는 이 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 추측되며 구체적인 역할은 앞으로 연구되어야 할 과제이다. 또한 본 연구의 결과 난포액 내의 caseinase는 78 kDa 형과 80 kDa 형의 두 가지가 존재하는 것이 관찰되었는데 동일한 형이 제대혈이나 성체의 혈액에서도 나타나는 것으로 미루어 난포액의 caseinase는 난포세포에 의해서 합성되었다기보다는 혈액으로부터 기원하였을 가능성이 큰 것으로 여겨진다.

혈액이나 난포액 이외에 사람의 눈물(Sakata et al., 1998; Sathe et al., 1998), 화상환자의 wound fluid(He et al., 1998), 사람(Wilson et al., 1993a) 혹은 흰쥐(Wilson et al., 1993b)의 전립선 분비액 내에서 caseinolytic activity를 보이는 단백질 가수분해효소의 존재가 보고된 바 있다. 사람과 흰쥐의 전립선 분비액의 caseinolytic protease도 역시 metal chelator인 EGTA나 EDTA에 의해 활성이 감소하나 78 kDa 혹은 80 kDa의 분자량을 갖는 단백질은 관찰되지 않는 것(Wilson et al., 1993a, b)으로 보아 본 연구의 결과 밝혀진 caseinase와는 서로 다른 효소인 것으로 여겨진다. 또한 성계의 미수정란에도 caseinolytic enzyme이 관찰되지만 이 효소는 SBTI에 의해 활성이 저해되나(Alliegro & Schuel, 1985) 분자량의 차이로 미루어 본 연구 결과의 caseinase와는 현저히 다른 단백질인 것으로 보여진다. 체다 치즈에서 분리 동정한 미생물들에도 extracellular caseinolytic enzyme이 분리되며 이들 역시  $Ca^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Sr^{++}$ ,  $Fe^{++}$  이온 등에 의해서 효소 활성이 약간 증가하

는 것(Prasad et al., 1986)으로 보고되는 등 대부분의 caseinase들은 이가 금속 이온 의존적인 효소로서의 특징을 갖는 것으로 사료된다.

난포액 내의 caseinolytic enzyme이 난포의 기능과 관련하여 구체적으로 어떤 역할을 하는지는 앞으로 더 연구되어야 할 필요가 있다.

## 인용문헌

- Alliegro MC, Schuel H (1985) Characterization of soybean trypsin inhibitor sensitive protease from unfertilized sea urchin eggs. *Biochemistry* 24:3926-3931.
- Fakih H, Vijayakumar R (1990) Improved pregnancy rates and outcome with gamete intrafallopian transfer when follicular fluid is used as a sperm capacitation and gamete transfer medium. *Fertil Steril* 53:515-520.
- Fetterolf PM, Sutherland CS, Josephy PD, Casper RF, Tyson JE (1994) Preliminary characterization of a factor in human follicular fluid that stimulates human spermatozoa motion. *Hum Reprod* 9:1505-1511.
- Giorgetti C, Hans E, Spach JL (1992) *In-vitro* fertilization in cases with severe sperm defect: use of a swim-across technique and medium supplemented with follicular fluid. *Hum Reprod* 7:1121-1125.
- Hansen C, Srikandakumar A, Downey BR (1991) Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 30:148-153.
- He Y, Young PK, Grinnell F (1998) Identification of proteinase 3 as the major caseinolytic activity in acute human wound fluid. *J Invest Dermatol* 110:67-71.
- Hourani CL, Check JH, Baker AF (1995) Cumulus removal and addition of follicular fluid possibly improves pregnancy rates with *in vitro* fertilization for male factor. *Arch Androl* 34:47-52.
- Hunter RHF (1988) The fallopian tubes. Springer-Verlag, New York pp 12-29.
- Kim M, Hong M, Kim J, Kim H, Lee SJ, Kang SG, Cho DJ (2001) Bovine follicular fluid and serum share a unique isoform of matrix metalloproteinase-2 that is degraded by the oviductal fluid. *Biol Reprod* 65:1726-1731.
- Kim J, Kim J, Kim H, Lee SJ, Yoon YD, Kwon HC, Kim SK (2003) Selective processing of a follicular matrix metallopro-

- teinase-2 isoform by human oviductal fluid. *Reprod Fertil Dev* 15:141-147.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langlais J, Kan FW, Granger L (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res* 20:185-201.
- Matrisian LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14:455-463.
- Murata M, Ohnishi J, Kudo T, Wada S, Yoshida H, Fujimoto S, Takahashi T (1999) Proteolytic activation of single-chain tissue-type plasminogen activator by protease/a2-macroglobulin complex isolated from human ovarian follicular fluid. *Zool Sci* 16:285-290.
- Ny T, Peng XR, Ohlsson M (1993) Hormonal regulation of the fibrinolytic components in the ovary. *Thromb Res* 71:1-45.
- Prasad R, Malik RK, Mathur DK (1986) Purification and characterization of extracellular caseinolytic enzyme of *Micrococcus* sp. MCC-315 isolated from cheddar cheese. *J Dairy Sci* 69:633-642.
- Price JT, Bonovich MT and Kohn EC (1997) The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 175-253.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL (2003) Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* 126: 415-424.
- Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K (1996) Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 2:287-292.
- Sakata M, Beaton AR, Sathe S, Sack RA (1998) 31-27 kDa caseinolytic protease in human tears. *Adv Exp Med Biol* 438:665-667.
- Sathe S, Sakata M, Beaton AR, Sack RA (1998) Identification, origins and the diurnal role of the principal serine protease inhibitors in human tear fluid. *Curr Eye Res* 17:348-362.
- Siegel MS, Paulson RJ, Graczykowski JW (1990) The influence of human follicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa. *Hum Reprod* 5:975-980.
- Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 341:738-746.
- Smith MF, McIntush EW, Ricke WA, Kojima FN, Smith GW (1999) Regulation of ovarian extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effect on follicular development, ovulation and luteal function. *J Reprod Fertil Suppl* 54:367-381.
- Smith MF, Ricke WA, Bakke LJ, Dow M, Smith GW (2002) Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol Cell Endocrinol* 191:45-56.
- Strickland S, Richards WG (1992) Invasion of the trophoblasts. *Cell* 71:355-357.
- Tesarik J (1985) Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability *in vitro*. *J Reprod Fertil* 74:383-388.
- Wilson MJ, Norris H, Kapoor D, Woodson M, Limas C, Sinha AA (1993a) Gelatinolytic and caseinolytic proteinase activities in human prostatic secretions. *J Urol* 149:653-658.
- Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA (1993b) Gelatinolytic and caseinolytic proteinase activities in the secretion of the ventral, lateral, and dorsal lobes of the rat prostate. *Biol Reprod* 48:1174-1184.
- Yao YQ, Chiu CN, Ip SM, Ho PC, Yeung WS (1998) Glycoproteins present in human follicular fluid that inhibit the zona-binding capacity of spermatozoa. *Hum Reprod* 13:2541-2547.