

마우스 난 성숙과정에서의 Thymeleatoxin의 영향

임은아 · 신지현 · 최태생[†]

단국대학교 의과대학 미생물학교실

초 록

PKC는 그들의 cofactor-requirements에 따라 cPKC, nPKC 그리고 aPKC, 3그룹으로 나어진다. 마우스 난 성숙과정에 있어서 cPKC 및 nPKC의 activators인 PMA의 영향에 대한 많은 결과가 보고되었다. 그러나 각각의 그룹에 대한 차별화된 영향에 대하여는 밝혀져 있지 않다. Mezelein의 analog인 thymeleatoxin은 cPKC의 특이적인 activator로 보고되어져 있다. 본 연구에서는 specific cPKC activator인 thymeleatoxin의 마우스 난 성숙과정에서의 영향을 제1감수분열 재개 능(germinal vesicle break down, GVBD)과 제1 극체 형성 능(1st polar body extrusion)을 조사하여 cPKC 및 nPKC activator인 PMA와 비교 검토하였다. 그 결과 GVBD IC50는 thymeleatoxin에서 ~400nM, PMA에서는 ~50nM이었으며, 제1극체 방출의 IC50는 thymeleatoxin에서 ~200nM, PMA에서는 ~20nM이었다. 이들 결과는 Thymeleatoxin의 GVBD나 1st polar body extrusion 저해효과가 PMA에 비하여 1/8~1/10인 것으로 나타났다. 이들 결과는 GVBD나 제1극체 형성을 포함하는 난 성숙과정에서 cPKC보다 상대적으로 nPKC의 관여가 깊음을 보여 준다.

(주제어 : Thymeleatoxin, Mouse oocyte maturation, PKC, GVBD, PB extrusion)

서 론

대부분의 포유류에 있어서 성숙난포에 존재하는 난포란은 생체 내에서 lutemizing hormone(LH)의 자극이나 인위적으로 난포로부터 난을 유리시킴으로 제1 감수분열 전기에 정지로부터 난 성숙이 재개된다. 이들 난성숙의 정지와 재개 과정에는 다양한 단백질 인산화/탈 인산화 효소 등이 관여하고 있다(Voronina와 Wessel, 2003). 이들 가운데 세포내의 cAMP의 농도 감소와 이에 따른 cAMP 의존 PKA의 불활성화는 이들 난성숙의 재개와 밀접한 관계가 있음이 밝혀져 있다(Schultz 등, 1983; Bornslaeger 등 1986).

최근의 연구에 따르면 분열기 조절에 핵심분자이며 또한 난 성숙 과정에서도 중요한 역할을 하는 cdk1 단백질 인산화 효소를 활성화 하는 cdc25 단백질 탈인산화 효소의 활성이 PKA와 관련되어 있음이 밝혀졌다(Duckworth 등, 2002).

Serine/threonine kinase인 PKC는 세포 증식, 분화, apoptosis 등 다양한 세포 활동에 관여하고 있으며, 적어도 10종류 이상의 isotype이 확인되고 있다(Black, 2000; Deckker와 Parker, 1994; Nishizuka, 1992). 이들은 칼슘과 diacylglycerol(DAG)에 의하여 조절되는 conventional PKCs(α , β I, β II, γ), 칼슘에는 비 의존적이나 DAG에 의존적인 novel PKCs(δ , ϵ , η , θ), 칼슘이나 DAG 모두에 비 의존적인 atypical PKCs(λ , i , ζ) 등으로 구분된다(Deckker 등, 1995).

이들 protein kinase C(PKC) 또한 PKA와 함께 마우스 난에서의 발현과 이들의 성숙 재개 등에 밀접한 관련이 있음이 보고되어지고 있다(Downs 등, 2001; Pauken 등, 2000; Viveiros 등, 2001). 이 같은 난 자체 내에서의 PKC의 발현과 활성의 변화에 관한 연구뿐만 아니라 인위적으로 PKC activator를 배양액 중에 첨가함으로써 난의 성숙 재개에 유도되는 변화에 대한 많은 연구가 수행되어졌다(Bornslaeger 등, 1986; Sun 등, 1999).

일반적으로 PKC activator로 사용되는 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)는 atypical PKCs를 제외한 대부분의 conventional PKCs와 novel PKCs를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다(Nishizuka, 1992). 이들 PKC의 활성물질로 사용되는 PMA의 마우스 난 성숙과정에 대한 연구 결과는 이들이 제1 감수 분열 개시의 특징적인 표현형으로 보여지는 germinal vesicle breakdown(GVBD) 및 제1 극체의 형성을 억제하는 것이 보고되어졌다(Quan 등, 2003; Sun 등, 1999; Viveiros 등, 2001). 반면에 난포에 싸여있는 소나 랫의 난자의 경우 오히려 GVBD를 촉진하는 효과가 보고되어 있다(Aberdam과 Dekel, 1985; Rose-Hellekant와 Bavister, 1996). 배란란의 경우에는 PMA는 분열 중기에서 간기로 난의 세포주기를 진행시키는 효과가 있는데 이는 배란 후 시간의 경과에 따라 다른 결과가 보고되고 있으며, 각각의 실험실에 따라 차이 나는 결과가 보고되고 있다(Sun 등, 1999). 이들 일치되지 않는 결과들은 PMA에 의하여 활성화되는 다양한 PKC로 인하여 추적이 쉽지 않으며, 많은 신호 전달 체계가 함께 연결되어 있어 해석이 쉽지 않다.

* 본 연구는 2003년도 단국대학교 대학 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

[†] Corresponding author : Dept. of Microbiology, College of Medicine, Dankook University, 330-714, Korea, TEL: 82-41-550-3872/3878, E-mail: tschoi@dankook.ac.kr

팔꽃나무과 식물 *Daphne mezereum*에서 분리된 meze-rein의 analog인 thymeatoxin(Tx)은 PMA와는 다르게 특이적으로 conventional PKCs 만을 활성화 시킨다(Ryves 등, 1991). 이 같은 PKC isotype에 따른 차별화 되는 PKC activator를 사용하여 마우스 난 성숙과정에서의 영향을 조사하였다. 본 연구에서는 난 성숙과정에 있어서 Tx의 GVBD 및 제1 극체 형성에 대한 영향을 PMA와 비교하여 조사하였다. 또한 튜브린 항체를 이용한 면역 염색을 통하여 제1 극체 형성이 저해된 난자들의 세포내의 상태를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 난포 난 채취

실험에 사용한 동물은 ICR 마우스 (대한 실험동물 센터)로서 일반적인 사양조건 12시간 절동과 12시간 소동의 조건하에서 사육하였으며, 물과 일반 사료 (할란사)를 무제한 급식하였다. 난포란 채취를 위하여 3-4 주령의 ICR 암컷 마우스에 임마혈청 호르몬(Pregnant mare's serum gonadotrophin, MSG, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)을 5 I.U./100 μ l 씩 복강 주사 후 45~48 시간에 마우스를 경추탈골법으로 도살 후 채취한 난소를 배양액에 넣은 후 26G의 주사바늘로 난포를 파열시켜 채취하였다. 실험에 사용한 난포 난은 난구세포가 전체적으로 잘 부착된 cumulus-oocyte-complex(COC)를 선별하여 사용하였다(Choi 등, 1991).

난포란 배양 및 약물 처리

난포란의 배양에 사용한 배양액은 M16 media(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)에 0.4% 소 혈청 알부민(BSA, Fraction V; Gibco BRL Life Technologies, Grand Island NY, USA)을 첨가하여 사용하였으며, 난포란의 채취 시에는 자연적인 난 성숙과정을 억제하기 위하여 0.1 M의 IBMX(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)를 첨가한 배양액을 사용하였다. 10-15 마리의 생쥐에서 난포란을 채취하여 모은 후 IBMX가 포함되지 않은 배양액에서 IBMX를 3회 세정한 후 각각의 PKC activator가 첨가된 배지에 지속적으로 배양하였다. PMA(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)와 Thymeatoxin(Tx, LC Laboratory)는 DMSO에 녹인 후 지정한 농도로 배양액에 첨가하였다.

GVBD, 제1극체 형성 판정

GVBD의 판정은 난포란을 각각의 PKC-activator가 첨가된 배지에서 6시간 배양 후 1.8% 포르마린 용액에서 1시간 고정 후 DNA 염색을 위하여 0.1 μ g/ml 농도의 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) 용액으로 실온에서 30분 염색 후 형광현미경 하에서 판정하였다. 제1 극체 형성의 판정은 채취한 난포란을 IBMX를 포함하지 않는 M16 배지에서 2시간 배양 후 실체 현미경하에서 GVBD가 일어난 난을 회수하여 각각의 PKC-activator를 포함하는 배지에서 12시간 배양 후 실체 현미경 하에서 제1 극체의 형성을 판정하였다. GVBD나 제

1극체 형성 억제 효과는 총 실험에 사용한 난자의 50%를 저해하는 효과 (inhibition concentration 50%, IC50)를 농도 변화와 저해효과를 그래프 상에서 계산하여 표시하였다.

면역 염색

제1 극체 형성을 판정한 난들은 산성 타이로드 용액, pH 2.5(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)에서 투명대를 제거하고, 1.8 % 포름 알데하이드를 포함하는 PBS 용액에서 고정시켰다. 이 고정된 난들은 0.1% Tween 20을 포함하는 PBS에서 3회 세정 후 1% Triton X-100를 포함하는 PBS(세정 용액)에서 20분간 permeabilization 후, 3% BSA를 포함하는 PBS 용액에서 1시간 blocking을 하였다. 1차 항체로는 항 튜브린 항체(YL1/2, Accurate Chemicals)를 1:40으로 세정 용액으로 희석하여 실온에서 1시간 반응 후, 3회 세정 후, 1:100으로 세정 용액으로 희석한 FITC-결합된 2차 항체(Anti-rat IgG-FITC conjugated antibody, Sigma)를 실온에서 1시간 반응 후, slide glass에 3 μ l의 mounting 용액 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)으로 소적을 만든 후 그곳에 난을 넣고 cover glass를 덮고 형광 현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Tx의 GVBD에 대한 영향

마우스 난포란을 IBMX를 포함하는 배양액에서 채취하여 모은 후 이들을 각각의 농도의 Tx와 PMA를 포함하는 배양접시에서 배양하였다. 배양 후 6시간에 난자를 고정하고 DAPI 염색 후 형광 현미경 하에서 GVBD를 확인하였다. PMA와 Tx 모두 농도 의존적으로 GVBD가 억제되는 것이 보여졌으나 Tx에 비하여 PMA의 경우가 보다 저 농도에서 효과적으로 GVBD를 억제하였다. PMA의 경우에는 IC50가 ~40 nM 로 나타났으며, 반면에 Tx의 경우에는 800 nM 에서 IC50가 확인되었다(Table 1). 본 실험의 결과 PMA의 난포란의 GVBD를 저해하는 효과는 Tx의 경우와 비교할 때 약 20배 강한 것으로 확인되었다. 이전의 배양세포를 사용한 연구 결과는 cPKC의 활성화 측면에서 PMA와 Tx의 동일한 농도에서 배양세포에 유사한 효과를 나타

Table 1. Effects of PKC activators on GVBD in mouse oocytes

Treatment (nM)	GVBD / total oocytes (% , mean \pm SD)
Control	88/88 (100)
PMA 12.5	53/57 (92.9 \pm 2.7)
PMA 25	50/62 (80.6 \pm 8.1)
PMA 50	32/68 (47.0 \pm 5.8)
PMA 100	7/67 (10.4 \pm 4.9)
Tx 200	59/63 (93.6 \pm 3.1)
Tx 400	52/61 (85.2 \pm 11.0)
Tx 800	31/60 (51.6 \pm 15.3)
Tx 1600	9/66 (13.6 \pm 3.0)

내었다. Glioma cell의 세포분열과 관련한 효과를 확인한 것으로부터 cPKC의 활성화에는 PMA나 Tx 모두 동일농도에서 유사한 결과로 보고되었으며(Besson과 Yong, 2000), HepG2 세포에서 cholestasis 유도실험에서도 동일한 효과가 확인되었다(Kubitz 등, 2004). 따라서 본 연구의 결과 또한 PMA의 마우스 난포란의 GVBD 억제 효능이 Tx에 비하여 상대적으로 효과적인 것은 cPKC의 활성화의 차이가 아닌 nPKC의 활성화에 기인하는 것으로 해석되어질 수 있다.

Tx의 제1극체 형성에 대한 영향

이상의 실험에서 GVBD에 대한 Tx 및 PMA의 영향에 대하여 조사하였다. 제1극체의 형성에 관한 이들의 영향을 조사하기 위하여 마우스 난포란을 IBMX 무 첨가 배지에서 2시간 배양하여 GVBD를 일으킨 난들을 모아 각각 농도의 Tx와 PMA를 포함하는 배양접시에서 10시간 배양하였다. 배양 후 실체 현미경 하에서 제1극체의 방출란을 확인하고, 난자를 고정 후 항-튜부린 항체와 DAPI 염색 후 형광 현미경 하에서 관찰하였다. GVBD의 실험에서와 동일하게 PMA와 Tx 모두 농도 의존적으로 제 1극체 형성이 억제되는 것이 관찰되어졌으며, 또한 Tx에 비하여 PMA의 경우가 보다 저 농도에서 효과적으로 제 1극체 형성을 억제하였다. PMA의 경우에는 제1극체 방출에 있어서의 IC50가 ~20 nM로 나타났으며, 반면에 Tx의 경우에는 200 nM에서 IC50가 확인되었다. 본 실험의 결과에서는 PMA의 마우스 난의 제1극체 방출을 억제하는 효과는 Tx의 경우와 비교할 때 약 10배 강한 것으로 확인되었다(Table 2). 또한 제1극체 형성이 억제된 모든 난들은 튜부린 항체를 사용한 면역 염색 결과 모두 제 1 감수분열 중기에 정지되어 있었다 (Fig. 1). 이전의 연구에서 제 2 감수분열 중기에 정지되어 있는 배란란에서 PKC activator의 효과는 분열 기에서 세포 간기로 진행시키는 효과가 보고되어져 있다 (Colona 등, 1997; Gallicano 등, 1997). 본 연구의 결과는 제 1 감수 분열의 난포란에서는 PKC activator가 오히려 분열기에 정지시키는 효과가 있음을 나타내고 있다. 이는 이들 신호전달 과정에 제1 감수분열과 제 2 감수분열 시에 일반적으로 제시되는 Mos, MAP-kinase 등의 분자 이외에 차별화 되는 분자의 관여가 시사되어진다(Tunquist와 Maller, 2003). 이상의 결과로부터 마우스 난자의 PKC- activator에 의한 GVBD나 제 1극체 방출 저해 효과는 상대적으로 cPKC보다는 nPKC

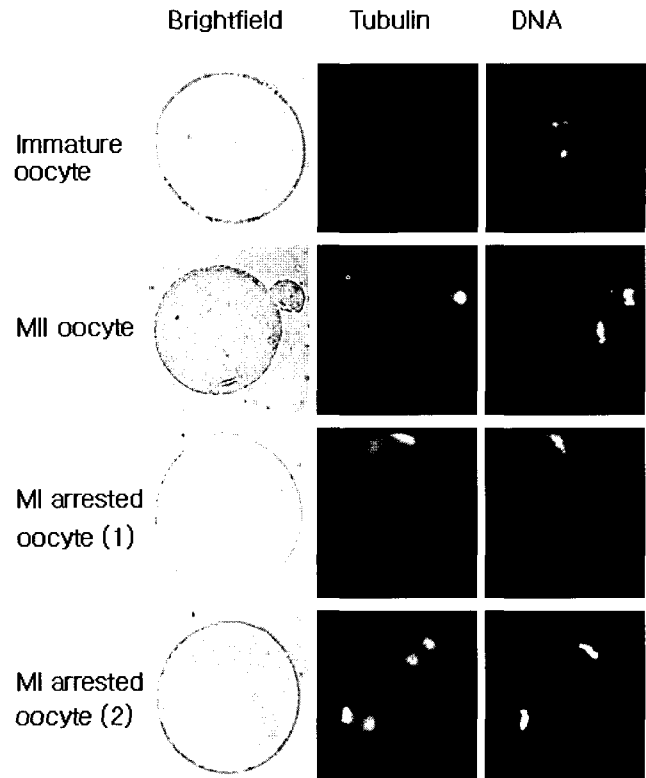


Fig. 1. Metaphase I arrested.oocyte by the treatment of PKC-activators. Oocytes were stained with anti-tubulin YL1/2 antibody and DAPI. Microtubules and chromosomes of oocytes after incubation for 12 h with PKC-activators were observed under the fluorescence microscope. A normal immature oocyte shows a germinal vesicle and dispersed chromatin and MII oocyte shows a first polar body and metaphase II spindle. All oocytes inhibited 1st PB extrusion by the treatment of PMA or Tx shows Metaphase I arrest (1). Some oocytes shows a phenotype of double spindle (2).

에 더 의존하는 것으로 보이며, 이들에 의한 제 1 극체 방출이 억제된 난들은 모두 제 1 감수분열 중기에 정지됨을 알 수 있었다.

Effect of Thymeleatoxin on Mouse Oocyte Maturation

Lim, E. A., J. H. Shin and T. S. Choi
 Dept. of Microbiology, College of Medicine,
 Dankook University

ABSTRACT

Protein kinase C exists as a family of serine/threonine kinases which are broadly classified into three groups as cPKC, nPKC and aPKC, depending on their cofactor requirements. Previous studies have shown that the role of PKC in the process of mouse oocyte maturation. For example, phorbol 12-myristate 13-acetate which is known as an activator of cPKC and nPKC inhibits germinal vesicle break down and 1st polar body

Table 2. Effects of PKC activators on 1st polar body extrusion in mouse oocytes

Treatment (nM)	1st PB (+) / total oocyte (% , mean±SD)
Control	69/81 (85.2± 8.0)
PMA 12.5	52/69 (75.4± 12.4)
PMA 25	11/59 (18.6± 12.4)
PMA 50	10/65 (15.4± 5.0)
PMA 100	6/56 (10.7± 7.0)
Tx 100	55/68 (80.9± 9.6)
Tx 200	28/57 (49.1± 9.4)
Tx 400	25/67 (37.3± 2.5)
Tx 800	10/71 (14.1± 5.1)

extrusion in maturing oocytes. In this study, the effect of thymeleatoxin, a specific activator of cPKC not nPKC, was tested comparing with PMA to address the roles of cPKC and nPKC during mouse oocyte maturation. Cumulus-oocyte complex were cultured in M16 medium for 6 or 12 hr with each of these PKC activators to investigate the effect of germinal vesicle breakdown (GVBD) or the extrusion of 1st polar body. IC50 of GVBD were at concentrations of 50nM in PMA and 400nM in thymeleatoxin and of 1st polar body extrusion were 20nM in PMA and 200nM in thymeleatoxin. The results suggest that activation of nPKC is more closely related to the inhibition of GVBD and 1st polar body extrusion than activation of cPKC. Additionally, we found that the oocytes inhibited 1st polar body extrusion with PMA or thymeleatoxin were arrested in metaphase I of first meiosis.

(Key words : Thymeleatoxin, Mouse oocyte maturation, PKC, GVBD, PB extrusion)

인용문헌

1. Aberdam E, Dekel N (1985): Activators of protein kinase C stimulate meiotic maturation of rat oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 132:570-574.
2. Besson A, Yong VW (2000): Involvement of p21^{Waf1/Cip1} in protein kinase C Alpha-induced cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 4580-4590.
3. Black JD (2000): Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci* 5:406-423.
4. Bornslaeger EA, Wilde MA, Schultz RM (1986): Effects of protein kinase C activators on germinal vesicle breakdown and polar body emission of mouse oocytes. *Exp Cell Res* 165:507-517.
5. Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K (1991): Activation of p34^{cdc2} protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 113:789-795.
6. Colonna R, Tatone C, Francione A, Rosati F, Callaini G, Corda D, Di Francesco L (1997): Protein kinase C is required for the disappearance of MPF upon artificial activation in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 48:292-299.
7. Dekker LV, Palmer RH, Parker PJ (1995): The protein kinase C And protein kinase C related gene families. *Curr Biol* 5:396-402.
8. Downs SM, Cottom J, Hunzicker-Dunn M(1997): Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 48:101-115.
9. Duckworth BC, Weaver JS, Ruderman JV (2002): G2 arrest in xenopus oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16794-16799.
10. Gallicano GI, McGaughey RW, Capco DG (1997): Activation of protein kinase C after fertilization is required for remodeling the mouse egg into the zygote. *Mol Reprod Dev* 46:587-601.
11. Kubitz R, Saha N, Kuhlkamp T, Dutta S, vom Dahl S, Wettstein Haussinger D (2004): Ca²⁺- dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* 279:10323-30.
12. Nishizuka Y (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.
13. Pauken CM, Capco DG (2000): The expression of stagespecific localization of protein kinase C isoforms during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 223:441-421.
14. Quan HM, Fan HY, Meng XQ, Huo LJ, Chen DY, Schatten H, Yang PM, Sun QY (2003): Effects of PKC activation on the meiotic maturation, fertilization and early embryonic development of mouse oocytes. *Zygote* 11:329-37.
15. Rose-Hellekant TA, Bavister RD (1996): Roles of protein kinase A and C in spontaneous maturation and in forskolin or 3-isobutyl-1methylxanthine maintained meiotic arrest of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 44:241-249.
16. Ryves WJ, Evans AT, Olivier AR, Parker PJ, Evans FJ (1991): Activation of the PKC-isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different biological activities. *FEBS Lett* 288:5-9.
17. Schultz RM, Montgomery RR, Belanoff JR (1983): Regulation of mouse oocyte meiotic maturation : Implication of a decrease in oocyte CAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev Biol* 97:264-273.
18. Sun Q-Y, Rubinstein S, Breitbart H (1999): MAP kinase activity is downregulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg activation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 52:310-318.
19. Tunquist BJ, Maller JL (2003): Under arrest : cytostatic factor(CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* 17:683-710.
20. Viveiros MM, Hirao Y, Eppig JJ (2001): Evidence that protein kinase C (PKC) Participates in the meiosis I to Meiosis II transition in mouse oocytes. *Dev Biol* 235:330-342.
21. Voronina E, Wessel GM (2003): The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* 58:53-110.

(접수일자: 2004. 8. 23. / 채택일자: 2004. 9. 15.)