

생쥐 초기 2-세포 배의 세포내 칼슘 증가에 미치는 Acetylcholine의 영향

윤숙영[†] · 강다원¹ · 배인하
성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

The Effect of Acetylcholine on the Intracellular Ca²⁺ Increase of the Mouse Early 2-cell Embryos

S. Y. Yoon[†], D. W. Kang¹ and I. H. Bae

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University

SUMMARY

Many studies have shown that the development of mouse early 2-cell embryos *in vitro* is related with the intracellular Ca²⁺ changes. In ICR strain mouse, the development of embryos arrests at early 2-cell stage, but the arrested early 2-cell embryos can be rescued by the addition of Ca²⁺-related materials. Acetylcholine (ACh) increases intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) via the mAChR-PLC-IP3 pathway in mouse oocytes. We examined whether ACh rescues 2-cell block in mouse. In early 2-cell embryos, ACh increased [Ca²⁺]_i in a dose-dependent manner (p<0.001), and had an effect on rescue of 2-cell block and embryonic development. To identify the signal pathway involved in ACh-induced rescue of 2-cell block, we first applied an agonist of ACh receptor (AChR). Like ACh, carbachol increased intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and atropine, an antagonist of ACh receptor, blocked the ACh-induced Ca²⁺ increase. In Ca²⁺-free medium, ACh also increased [Ca²⁺]_i, indicating that Ca²⁺ increased by ACh is mainly released from the intracellular Ca²⁺ store. The ACh-induced Ca²⁺ increase was blocked by PLC inhibitor (U73122), ryanodine receptor (RyR) antagonist (dantrolene), and CaM KII inhibitor (KN-93), but not by IP3R antagonists (xestospongine C). These results show that ACh increases intracellular Ca²⁺ concentration via mAChR/PLC/RyR, and this contributes to the rescue of 2-cell block.

(Key words : mouse 2-cell block, acetylcholine, IP3R, RyR, CaM KII)

서 론

포유동물의 초기 배를 체외에서 배양할 때 나타나는 발생정지현상(*in vitro* culture block)은 생쥐의 경우 초기 2세포 배에서 나타나므로 '*in vitro*

2-cell block' 이라 한다. 이 현상은 난자로부터 유도된 모계 유전 조절(maternal genomic control)에서 배아 유전 조절(embryonic genomic control)로의 전환 과정을 체외 배양 조건이 충족시켜 주지 못하는데 있다(Goddard, 1983). Chatot 등(1989)에

* 이 논문은 2003년도 이세웅 박사 학술진흥연구비 지원에 의하여 연구되었음.

¹ 경상대학교 의과대학 생리학교실(Dept. of Physiology, College of Medicine, Gyeongsang National University)

[†] Correspondence : E-mail : dawon@gsnu.ac.kr

의해 시작된 CZB 배양액, SOM, KSOM(Erbach 등, 1994)등과 같이 배양액의 성분 조절로 발생징지현상이 어느 정도 극복되고 있다. Abramczuk 등(1977)은 배양액에 2가 이온 저해제인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 첨가하여 생쥐 수정란을 포배로의 발생에 성공했으며, Bac 등(1995)은 M16 배양액에 Ni^{2+} 이온을 첨가하여 포배로 발달시켰다. 이는 초기 2세포 배의 세포내 칼슘 이온을 증가시킴으로써 제 2 신호 전달물질인 칼슘 이온이 세포 대사에 필요한 여러 가지 반응을 활성화시킨 것으로 보인다(Yoon 등, 2003). 세포내 칼슘 농도의 반복적인 증가 현상(Ca^{2+} -oscillation)은 세포대사, 세포분열(cell division) 및 분화(differentiation) 과정에 중요한 조절 인자로 작용한다(Santella, 1998; Miyazaki, 1992). 세포 내 칼슘 이온의 증가는 세포막에 있는 수용체가 활성화되면서, 세포내로 신호가 전달되는 가장 대표적인 현상이다. 이러한 세포내에 증가되는 칼슘은 소포체(endoplasmic reticulum, ER)로부터 inositol triphosphate receptor (IP3R, ER의 Ca^{2+} release channel) 혹은 ryanodine receptor를 통해 분비된다(Yue 등, 1995).

한편 세포막의 수용체를 통해 세포내 신호전달을 유도하는 신경전달물질(neurotransmitter)인 acetylcholine(ACh)은 Choline계 신경전달체계를 통해 세포내로 정보를 전달한다(Harrison 등, 2002). ACh을 성계 미수정란과 수정란에 처리하면 세포내 칼슘 농도가 증가하였으며, 이때 ACh의 antagonist인 atropine을 전 처리하면 칼슘 농도 증가 현상이 저해되었다(Harrison 등, 2002). ACh에 대한 반응은 nicotinic ACh receptor(nAChRs)와 muscarinic ACh receptor(mAChR)를 통해 일어난다. nAChRs는 주로 ligand-gated Na^+ channel을 통해 세포내로 신호를 전달하지만 mAChR은 G-protein 통해 신호를 전달한다(Rathouz 등, 1995; Stehno-Bittel 등, 1995). 포유동물의 난자에서는 외부에서 주입된 muscarinic ACh receptor, m1의 유전자 발현이 성숙난자의 초기 활성화(Kim 등, 1998; Moore 등, 1993; Williams 등, 1992)와 척추동물의 초기 발생을 조절하고 있다(Oettling 등, 1989). 생쥐 미성숙 난자에 ACh을 처리하면 세포내 칼슘 농도가 증가되어 세포 활성화 현상을 유발할 수 있으며,

이 과정은 IP3 수용체를 통한 세포내 칼슘 저장고로부터의 칼슘 분비에 의한 것이다(Kang 등, 2003).

본 실험에서는 공초점현미경(Confocal Laser Scanning Microscop, Olympus, Japan)을 사용하여 생쥐 초기 2-세포 배에서 ACh과 세포내 칼슘 농도($[Ca^{2+}]_i$)간의 관련성을 조사하고, ACh 처리로 인한 세포질 내 Ca^{2+} 농도 증가가 어떤 경로를 통하여 이루어지는지를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 배의 수집

6~8주령의 ICR계 암컷 생쥐를 5 IU PMSG와 hCG로 과배란을 유도하여 수컷과 교배시킨 후 hCG 주사 30~33 시간에 난관으로부터 두 개의 전핵(2PN)과 극체를 가진 전핵배와 건강하게 보이는 초기 2세포 배를 수집하였으며 필요에 따라 0.1% hyaluronidase를 사용하여 배의 mucin 성분과 난구세포를 제거하였다.

2. 배양 방법

수집된 배는 M16 배양액을 mineral oil(Sigma)로 덮고 이를 37°C가 유지되고 5%의 CO_2 와 95% 공기, 100%의 습도가 유지되는 배양기에 넣어 4시간 이상 평형시킨 후 배양에 사용하였다.

3. 배양액과 처리 물질

모든 실험에 사용된 기본 배양액은 M2 배양액으로 하며 pH는 7.30~7.40, 삼투압은 290~310 mOsm로 조절하였다. 실험에 사용된 시약은 특별한 언급이 없는 경우 Sigma 제품을 사용하였다. ACh, carbachol, nicotine tartrate는 증류수(Milli-Q water, Millipore, USA)에 녹여 사용하였다. Inositol-triphosphate receptor (IP3R) antagonist인 xestospongin C (XeC, Calbiochem)는 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 희석하여 사용하였다. 또 다른 IP3R antagonist로 사용된 heparin (MW 4,000)은 증류수에 녹여 4.5 mg/ml 농도로 난자내에 미세주입한 후 30분간 배양하여 사용하였다. Dantrolene(Dan; alomone labs, Israel)은 1 mM로 20분간 전 배양한 후 사용하였다.

4. 난자 내 Ca²⁺ 농도 측정

난자의 움직임을 막기 위해 Cell-Tak (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)을 사용하였으며, 세포내 Ca²⁺-indicator로 5 μM fluo 3-AM (Molecular probe)을 사용하였다. 공초점현미경은 IX 70 형광 도립현미경에 laser가 부착된 Fluoview (Olympus, Japan)로 488 nm excitation argon laser, 510 nm long pass emission filter(BA 510F)를 사용하였다. FV 200(Olympus, Japan) program으로 XYT series scan을 실행하였다. 각 난자의 단위 면적 당 relative fluorescence intensity를 image analysis (series analysis; FV 200, Olympus, Japan)를 실행한 후 Microsoft Excel 프로그램을 이용하여 이미지 분석값을 평균값(average, SD)으로 나타내었다.

5. 미세 주입(Microinjection)

Intracellular Ca²⁺ modulator 중에서 세포막의 투과가 불가능한 heparin은 도립 현미경(IX70, Olympus)에 부착된 micromanipulator(Narishige, Japan)와 picoinjector인 IM-300(Narishige)을 사용하여 2-세포 배내에 주입하였다. Micropipette은 borociliated glass tube(P-2174, Sigma)를 micropuller(P-97, Sutter instrument)와 microforge(MF-90, Narishige), 그리고 microbeveller (RI)를 사용하여 제작하였다.

6. 통계처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성 검정은 SPSS/PC⁺(version 8.0)을 이용하여 mean ± SEM을 구해 Student's *t*-test를 하였다.

결 과

1. ACh이 생쥐 2-세포 배의 체외 배양에 미치는 영향

hCG 주사 30~33 시간에 초기 2-세포 배를 수집하여 체외에서 배양하면서 ACh을 농도별로 처리하여 72 시간 동안 배양한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군은 전체 142개 배 중에서 상실배(morula, MO)가 34개(24%), 포배기(blastocyst, BL)가 2개(1.4%)인 반면, ACh 1 μM을 처리한 군은 146개 배 중에서 상실배, 포배가 각각 66개(45.2%), 2개(1.4%)로 대

조군에 비해 유의하게 높은 발생율을 보였다(*p*<0.001). ACh 10 μM 처리군에서는 145개 배 중에서 59개(40.7%)가 상실배로 5개(3.4%)가 포배기로 발생하였다. ACh 100 μM 역시 144개 배 중 77개(53.3%)의 상실배와 11개(7.7%)의 포배를 형성하였다(*p*<0.001). 이는 양성 대조군으로 처리된 EDTA 100 μM 처리군(상실배:40/136 (29.4%), 포배:64/136(47.1%))과 비슷한 발생률을 보였다. 이들 배는 96시간 동안 연장하여 배양한 결과 모두 부화 배반포로 발생하였다. 따라서 ACh은 배 발생을 정상적으로 유도할 수 있는 것으로 보여진다.

2. ACh이 생쥐 2-세포 배의 세포내 Ca²⁺ 농도 변화에 미치는 영향

hCG 주사 후 30~33 시간에 수집된 초기 2-세포 배를 공초점현미경을 이용하여 세포내 Ca²⁺ 농도 변화를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. ACh의 농도가 증가할수록 세포질 내 Ca²⁺의 농도가 증가하였다. 대조군(ACh, 0 μM)은 ACh 처리 양과 동량의 배양액을 첨가하였다. ACh 10 μM 처리군에서는 전체 36개 중 30개(83.3%)가 세포질내 Ca²⁺ 농도를 증가시켰으며, 100 μM 처리군은 23개 중에서 23개 모두가 증가된 Ca²⁺ 농도를 보였다. 이와

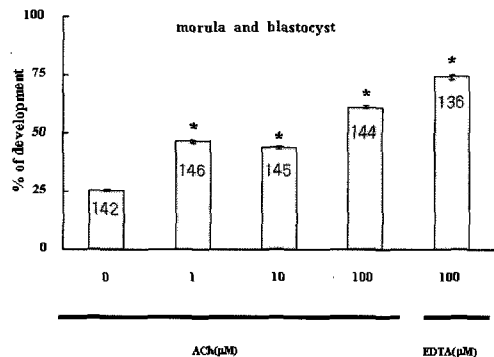


Fig. 1. Effect of ACh on the development of mouse early 2-cells *in vitro*. Morula and blastocysts formation were assessed at 72 and 96hr after culture. Results were obtained by pooling embryos per each treatment (mean±SEM). The numbers on the bar indicate the total number of embryos *Significantly differ from the control, *p*<0.001.

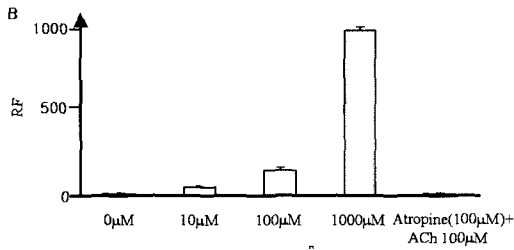
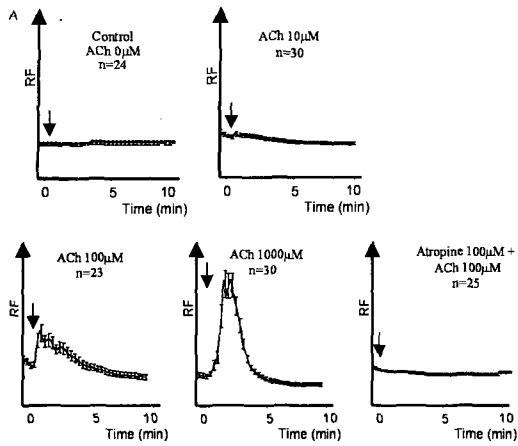


Fig. 2. Effect of ACh concentration on the $[Ca^{2+}]_i$ of mouse early 2-cell embryos (A). Arrows indicate addition of 0~1,000 μM ACh. Results were obtained by pooling the total embryos per each treatment (mean \pm SEM). RF, relative fluorescence intensity. B shows the ratio of the RF of $[Ca^{2+}]_i$ increase after ACh addition.

같은 결과는 ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 변화가 ACh 농도에 의존적임을 나타낸다($p < 0.001$). 또 AChR의 antagonist인 atropine을 10분간 전처리하여 사용한 경우 25개 배 모두에서 ACh의 효과가 저해되어 ACh이 AChR을 통해 반응하고 있음을 보여주었다. Fig. 2B는 ACh 처리 후 증가된 Ca^{2+} 농도를 기본농도(basal level)로 뺀 값을 보여준다.

3. Carbachol과 Nicotine Tartrate가 생쥐 2-세포 배의 세포내 Ca^{2+} 농도 변화에 미치는 영향

동일한 시기의 배에 비 선택적인 AChR의 agonist인 carbachol 1 mM을 ACh과 동일한 방법으로 처리한 후 초기 2-세포 배의 Ca^{2+} 농도를 측정하였다. 전체 39개 중 29개(74%)의 배에서 Ca^{2+} 농도가 증가하였으며, 상대적인 형광 발현률을 비교하였을

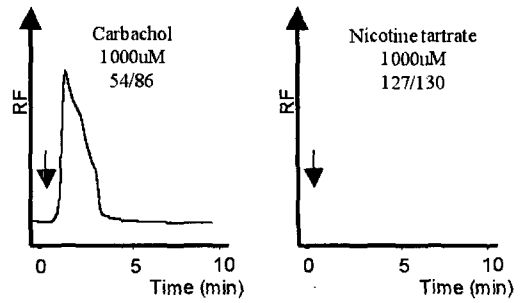


Fig. 3. Effect of carbachol and nicotine tartrate on the $[Ca^{2+}]_i$ of mouse early 2-cell embryos. Arrows indicate addition of drugs. RF, relative fluorescence intensity.

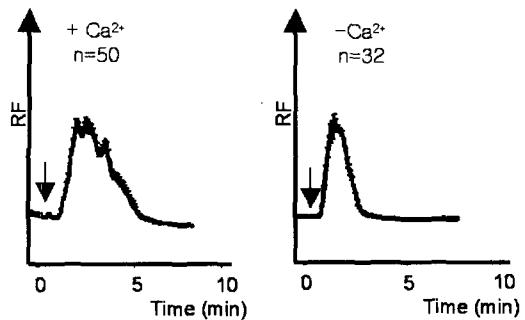


Fig. 4. Effect of ACh on the $[Ca^{2+}]_i$ of mouse early 2-cell embryos in Ca^{2+} contained(+) or Ca^{2+} -free(-) medium. Arrows indicate addition of 100 μM ACh. Results were obtained by pooling the embryos per each treatment (mean \pm SEM).

때 1 mM ACh에 의한 반응과 비슷한 결과를 보였다(Fig. 3). 그러나 AChR의 또 다른 형태인 nicotinic AChR의 agonist인 nicotine tartrate 1 mM은 초기 2-세포 배 130개 중에서 127개(97%)가 Ca^{2+} 의 농도 변화를 보이지 않았다.

4. ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가의 기원

2-세포 배에서 ACh에 의해 증가되는 세포질 내 Ca^{2+} 이 세포내로부터의 분비인지 세포외로부터의 유입인지를 알아보기 위해 배양액내의 Ca^{2+} 를 제거한 후 ACh 100 μM 을 처리하였다(Fig. 4). 배양액내(세포외) Ca^{2+} 의 존재 유무에 상관없이 2-세포 배에서 Ca^{2+} 이 증가되었다. 이상의 결과로부터 ACh에 의한 세포질 내 Ca^{2+} 농도 증가는 세포 내

에서 분비되고 있음을 알 수 있다.

세포내 Ca^{2+} 의 분비는 주로 소포체(endoplasmic reticulum) 막에 존재하는 IP3R 혹은 ryanodine receptor(RyR)를 통해 이루어진다. 본 실험에서는 세포외에 Ca^{2+} 을 제거한 후 IP3R의 저해제인 XeC와 heparine으로 2-세포 배를 전 처리하고 100 μ M ACh을 처리하였다(Fig. 5). XeC 처리군은 전체 26개 중 14개가 ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가를 보였으며, heparin 1 mg/ml을 미리 미세 주입하여 IP3R을 저해한 후 ACh을 처리한 실험에서도 전체 27개의 배 모두에서 Ca^{2+} 농도가 증가하였다. 그러나 RyR의 저해제인 dantrolene을 전처리한 실험군에서는 32개중 30개가 ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 변화를 보이지 않았다.

한편 CKII의 저해제인 40 μ M의 KN-93를 전처리한 후 ACh를 처리한 실험군에서 Ca^{2+} 농도 변화가 관찰되지 않았으며, KN-93의 negative control인 KN-92 처리군에서는 Ca^{2+} 농도가 증가하여 ACh

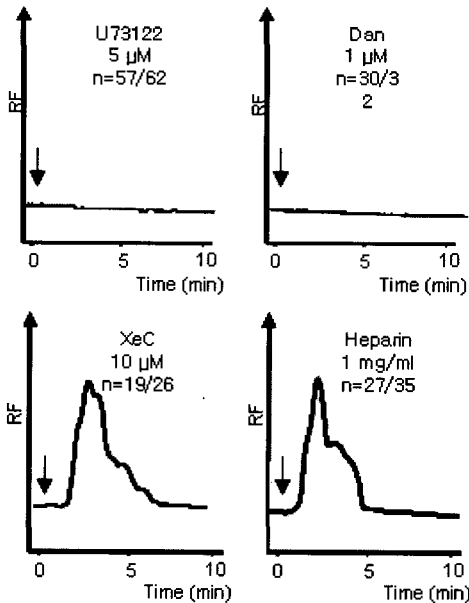


Fig. 5. Effect of ACh on the $[Ca^{2+}]_i$ of mouse early 2-cell embryos in Ca^{2+} -free(-) medium, following drug treatments. Arrows indicate addition of 100 μ M ACh. Results were obtained by pooling the embryos per each treatment.

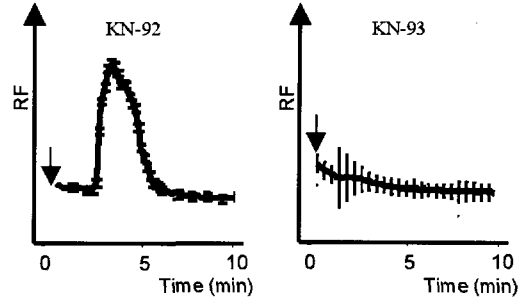


Fig. 6. Effect of ACh on the $[Ca^{2+}]_i$ of mouse early 2-cell embryos pretreated with 30 μ M KN- 93, CaM KII inhibitor. Control group was incubated in KN-92, inactive analogue of KN- 93 for 20 min. Arrows indicate addition of 100 μ M ACh.

에 의한 Ca^{2+} 분비에 CaM KII가 관여함을 시사하였다(Fig. 6).

고찰

본 실험에서는 신경전달물질인 ACh이 초기 2-세포 생쥐 배의 세포내 Ca^{2+} 농도 증가를 유도하여 체외 발생 중에 나타나는 2-cell block 현상을 극복하는 것을 확인하였다. 생쥐 초기 2세포 배를 체외 배양할 때 나타나는 "in vitro 2-cell block"의 원인은 정확히 알려져 있지 않다. 그러나 초기 2-세포 배가 배양액내 Ca^{2+} 이온이 완전히 제거된 배양액 내에서는 12 시간의 생존이 어렵지만 후기 2-세포 배를 배양하는 경우에는 48 시간 동안 생존은 물론 분열 및 분화가 이루어진다(Bac과 Yoon, 1995). 또 Ca^{2+} channel blocker인 Ni^{2+} 을 배양액에 소량 첨가하였을 때 세포내 Ca^{2+} 의 농도가 증가되어 "2-cell block" 현상이 극복되었다. 이는 이 시기의 배가 세포질 내 Ca^{2+} 농도 증가로 인한 신호 전달이 요구됨이라 할 수 있다(Yoon 등, 2003). 본 실험에서 초기 2-세포 배의 체외 배양액에 ACh을 농도별로 처리하여 배양한 결과 2-cell block이 극복되었다(Fig. 1). 이는 "2-cell block" 극복을 위해 일반적으로 첨가하는 EDTA(Abramczuk 등, 1977) 처리군과 비슷한 극복율을 보였다. ACh은 성체의 제 1 세포 분열 동안 mAChR를 경유하여 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가를 유도한다(Harrison 등, 2002). ACh은 G

protein-coupled 수용체를 경유하여 나타나는 신호 전달체계에 관여함으로써 세포내 반응을 조절한다 (Rathouz 등, 1995; Stehno-Bittel 등, 1995). 성계 미성숙 난자의 경우 수정 전에는 ACh 혹은 carbachol에 대한 세포내 Ca^{2+} 농도 변화를 보이지 않다가 제1세포 주기의 수정란은 nicotine 혹은 ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가를 보였다(Harrison, 2002). 본 실험에서는 ACh의 농도가 증가할수록 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화량이 증가하였다. 그러나 ACh의 antagonist인 atropine을 전 처리하면 Ca^{2+} 농도 변화가 나타나지 않았다. mAChR antagonist인 atropine은 생쥐 난자에 전 처리한 결과 ACh를 통한 ZP2 전환이 저해되었으며(Williams, 1992), Moore 등(1993)은 human m1 mAChR이 over-expression된 생쥐 난자에 ACh를 처리하여 난자의 활성화를 유도하였다. 난자의 활성화는 PLC 저해제인 U73122나 D609를 전 처리하였을 때 그 활성이 억제되는 결과를 보여 ACh가 G protein-coupled receptor를 경유하여 나타나는 것으로 보고하였다. 돼지 난자에 있어서도 ACh에 의한 반응이 G protein-coupled receptor를 통하여 나타남을 보고하였다(Kim 등, 1998).

약리학적 결과와 RT-PCR 분석 결과 생쥐 미성숙 난자는 m3/m4 mAChR을 통해 Ca^{2+} oscillation이 일어나고 있다(Kang 등, 2003). 그러나 생쥐 초기 2-세포 배에서 ACh가 mAChR을 경유하는지 혹은 nAChR을 경유하는지를 알아보려고 carbachol과 nicotine tartrate를 처리하여 세포내 Ca^{2+} 농도 변화를 확인하였다(Fig. 3). 체외 연구 중 쥐의 Sertoli cell 증식을 유발하는 carbachol(Lucas 등, 2004)을 처리하였을 때 초기 2-세포 배 내의 Ca^{2+} 농도는 변화를 보였지만 nicotine tartrate 처리군에서는 Ca^{2+} 농도 변화를 보이지 않아 생쥐 초기 2-세포에 mAChR이 존재함을 알 수 있다.

체외 자극에 대한 세포의 신호 전달의 대표적인 현상이 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가이며 이때 증가된 Ca^{2+} 의 기원은 세포막에 존재하는 Ca^{2+} 통로를 통한 세포 밖으로부터의 유입(Ca^{2+} -influx)과 세포내 소기관인 소포체(endoplasmic reticulum) 등에 존재하는 IP3R 혹은 RyR을 통한 분비(Ca^{2+} -release)로 이루어진다. 생쥐 미성숙 난자의 감수 분열의 재개 시에 양서류와 포유류의 난자에서는 $[Ca^{2+}]_i$ 급

격하게 증가되고 세포막의 막전위가 함께 증가함으로써(Mattioli, 1998; Powers, 1982; Yoshida, 1982; 1985), 이 시기 난자의 세포막에 Ca^{2+} 통로가 작용함을 보고하였다(Miyazaki 등, 1993). 생쥐 초기 2-세포의 경우에도 세포막에 존재하는 L-type channel의 저해제인 Bay K 8644를 전처리하면 Ni^{2+} 에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도가 저해되는 결과로 보아 voltage dependent L-type Ca^{2+} -channel이 존재함을 간접적으로 보여주었다(Yoon 등, 2003). 생쥐 미성숙 난자에서 보이는 Ca^{2+} oscillation은 세포내 저장고인 소포체 등에서 IP3R를 통해 분비되고 있다(Jellerette, 2004; Fissore 1999; Kline과 Kline, 1994; Miyazaki 1993). 본 실험에서도 ACh에 의한 Ca^{2+} 의 증가가 세포내에서부터 분비되고 있음을 확인하였다(Fig. 4). 그러나 순간적인 증가는 Ca^{2+} 이 함유된 처리군과 제거된 처리군 사이에 큰 차이가 없었으나 Ca^{2+} 이 제거된 처리군에서는 대조군보다 Ca^{2+} 분비되는 기간이 짧다. 이와 같은 연구 결과는 Kang 등(2003)의 연구 결과와 동일한 결과를 보였다. 즉, ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가는 내부 소기관으로부터의 분비와 외부로부터의 유입에 의한 것으로 볼 수 있다.

세포 내부로부터 Ca^{2+} 분비 경로를 조사하기 위해 세포내 신호 전달 과정의 저해제를 처리하였다(Fig. 5). ACh에 의한 Ca^{2+} 증가는 PLC 저해제인 U73122에 의해 완전히 저해되었다. U73122는 세포막에 존재하는 PLC 저해제로 생쥐 성숙난자를 활성화하는 sperm factor의 작용을 저해하여 정자에 의한 난자의 활성화에 PLC가 관여하고 있음을 보여준다(Wu, 2001; Dupont, 1996). 또 초기 2-세포 생쥐 배 실험에서 autocrine growth factor에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 U73122 처리로 저해되었으며(Emerson, 2000), 생쥐 난자를 U73122로 전처리한 후 ACh를 처리하였을 때 Ca^{2+} 농도 증가가 저해되는 것을 알 수 있다(Kang 등, 2003; Dupont, 1996). 따라서 생쥐 난자의 활성화 과정과 초기 2-세포 배의 배발생에 PLC의 활성이 요구된다고 볼 수 있다. 세포내 신호 전달 과정 중 PLC의 하위 단계인 IP3R와 RyR의 참여 여부를 IP3R 저해제인 XeC와 dantrolene을 이용하여 알아보았다. 생쥐 성숙난자의 수정이나 인공적인 활성화가 XeC

의 전처리로 저해되는 것으로 보아 성숙난자에서 나타나는 Ca^{2+} 농도 증가는 IP3R을 통한 IICR (IP3-induced Ca^{2+} -release)임을 보여주었다(Kang 등, 2003). 소 난자에 250 nM의 heparin을 미세 주입한 후 같은 농도의 IP3를 미세 주입하면 IP3에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가가 완전히 저해되었으나, RyR의 activator인 ryanodine이나 caffeine을 처리하면 Ca^{2+} 농도의 증가가 관찰되어 소 난자에 IP3R와 RyR가 독립적으로 존재하여 Ca^{2+} 대사를 조절함이 보고된 바 있다(Yue 등, 1995). 본 실험에서는 1 mg/ml의 heparin 미세 주입 후 ACh를 처리한 결과 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가를 보이지 않았다(Fig. 5). 이 결과는 초기 2-세포 배에서 ACh에 의해 증가되는 Ca^{2+} 이 IP3R에는 독립적임을 알 수 있다. Heparin과 같은 결과를 보여준 XeC는 생쥐난자(Kang 등, 2003) 혹은 생쥐 초기 2-세포 배에서(Emerson 등, 2000) 세포 내 Ca^{2+} 을 저해하여 이들 Ca^{2+} 의 변화가 IP3R를 경유하고 있음을 보여준 시약이다.

한편 RyR의 저해제인 dantrolene(Dan)은 direct photoaffinity labeling 방법으로 실험한 결과 근육세포에서는 RyR 1의 아미노산 590~609 부위에 결합하였다. 또 심장근육세포에서는 RyR 2의 601~620 아미노산에 결합하여 소포체로부터 Ca^{2+} 분비를 저해하였다(Paul-Pletzer 등, 2002). 현재까지 포유동물의 난자나 수정란에 어떤 종류의 RyR가 존재하는지는 밝혀지지 않았다. 성계의 경우 미 수정란의 수정시 나타나는 Ca^{2+} 의 증가는 RyR에 의한 것이라는 보고(Arnolt, 1997)와 IP3R (Miyazaki 등, 1993)에 의한 것 또는 이 두 가지 수용체 모두 관련된다고 알려져 있다(Kuroda 등, 2001). 포유동물의 경우 소의 미수정란이 수정과정을 거치는 동안 RyR가 작용하는 것으로 알려져 있다. 그리고 RyR의 난자내 분포도는 난자가 성숙하는 동안 변화를 보인다(Yue, 1995). 생쥐의 경우 RyR agonist인 ryanodine이나 cyclic ADP ribose를 미성숙 난자에 처리하면 수정 시에 일어나는 투명대 경화 (zona hardening)가 나타나며, 이때 세포질 내 Ca^{2+} 농도가 증가함을 확인함으로써 RyR의 존재와 기능을 보고하였다(Albrieux 등, 1997; Ayabe 등, 1995). 또 돼지 난자의 경우에는 RyR와 IP3R

가 모두 수정에 관여하고 있음이 보고되었다(Petr 등, 2002). 본 실험에서는 생쥐 초기 2-세포 배의 ACh에 유발되는 Ca^{2+} 농도 증가가 RyR의 저해제인 dantrolene에 의해 저해되었다(Fig. 5). 본 실험에 사용된 배는 체외에서 발생 정지가 일어나는 초기 2-세포 배이다. 현재까지 "2-cell block" 현상의 원인이 정확하게 밝혀지지 않았으나 ACh 처리로 세포질 내 Ca^{2+} 의 농도가 증가되면서 세포질 내 여러 가지 대사가 활성화되어 정지 현상이 극복된 것으로 볼 수 있다(Fig. 1과 2). 본 실험에서는 ACh 처리로 증가된 Ca^{2+} 의 경로를 찾기 위해 RyR의 저해제인 Dan을 처리한 결과 ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가가 저해되었다(Fig. 5). 이 결과는 ACh에 의해 증가되는 Ca^{2+} 이 세포 내의 Ca^{2+} 저장고로부터 분비되고 있으며, 이러한 분비는 RyR를 통해 이루어짐을 알 수 있다.

세포내의 Ca^{2+} 결합 단백질인 calmodulin에 의존적으로 활성화되는 CaM KII는 세포 내 Ca^{2+} oscillation의 decoder로써 작용한다(De Koninck와 Schulman, 1998; Putney, 1998; Dupont와 Goldbeter, 1998). Astrocytes에서 CaM KII의 기질인 vimentin에 대한 phosphorylation-specific antibody를 사용하면서 Ca^{2+} 의 변화를 조사하였을 때 지역적인 Ca^{2+} 이 증가된 부분에서 CaM KII에 의한 인산화된 vimentin이 관찰되었다(Inagaki 등, 1997). 또 세포 전체에서 $[Ca^{2+}]_i$ 증가가 일정기간 동안 지속되었을 때는 인산화된 vimentin이 세포 전체에 퍼져 나타나므로 Ca^{2+} 이 CaM KII의 활성화에 필수적임을 보고하였다. 또 CaM KII가 심장세포 RyR의 인산화를 유도하며 활성화된 RyR로부터 Ca^{2+} 이 분비되어, 심장세포의 수축 이완이 조절된다(Wehrens 등, 2004). 본 실험에서는 CaM KII의 저해제인 KN-93로 ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가가 저해되어, ACh이 CaM KII를 통해 RyR을 활성화 하고 그 결과 ER의 RyR을 통해 Ca^{2+} 이 분비된 것으로 보인다.

본 실험 결과를 종합해 볼 때 생쥐 초기 2-세포 배를 체외 배양할 때 나타나는 "2-cell block" 현상은 배양액에 ACh를 처리하여 극복할 수 있으며, 이는 ACh의 처리로 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하면서 여러 가지 세포 대사를 촉진한 것으로 볼 수 있다. 또 ACh에 의해 증가된 Ca^{2+} 농도는 세포막에

존재하는 mAChR를 통해 PLC를 경유하며, 세포내 Ca^{2+} 저장고인 ER의 RyR을 통해 분비된 것이라 생각된다.

적 요

체의 배양 과정 중에 나타나는 생쥐 초기 2-세포 배의 "in vitro 2-cell block" 현상은 세포내 Ca^{2+} 농도 변화와 밀접한 관련이 있다. 다양한 종류의 세포에서 acetylcholine은 세포막에 존재하는 muscarnic acetylcholine receptor를 통해 세포내 Ca^{2+} 농도 증가를 유도한다. 본 실험에서는 생쥐 "in vitro 2-cell block" 현상에 있어서 ACh의 영향을 알아보기 위해 세포 내 Ca^{2+} 농도 조절 물질을 처리한 후, 공초점 현미경을 이용하여 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화를 기록하였다. ACh은 세포 내에서 농도 의존적으로 Ca^{2+} 농도 증가를 유도하며, "in vitro 2-cell block" 현상을 극복하여 포배기로 발생을 유도하였다. ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가가 세포막에 존재하는 ACh receptor를 경유하여 나타나는 반응 인지를 알아보기 위해 ACh receptor의 저해제인 atropine을 전처리한 결과, ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가가 완전히 저해되었다. 초기 2-세포 배에서 ACh이 결합하는 receptor의 종류를 확인하기 위하여 carbachol과 nicotin tartrate를 처리하였다. Nicotinic AChR의 agonist인 nicotine tartrate 1 mM은 세포내 Ca^{2+} 농도 증가를 보이지 않았다. 따라서 초기 2-세포 배의 세포막에는 muscarnic AChR가 기능적으로 작용함을 알 수 있다. ACh에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가가 Ca^{2+} 이 제거된 배양액에서도 나타나는 것으로 보아 ACh에 의한 세포내 Ca^{2+} 변화는 주로 소포체와 같은 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터 분비됨을 알 수 있었다. 이러한 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터의 Ca^{2+} 분비가 어떤 신호전달체계를 통해 나타나는 지를 조사하였다. 세포막의 PLC 저해제인 U73122를 전처리한 배는 ACh에 의한 Ca^{2+} 농도 증가가 나타나지 않았으며, 세포 내 Ca^{2+} 통로인 IP3R와 RyR의 저해제인 xestospongine과 heparin 혹은 dantrolene을 전처리한 결과 dantrolene에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도 증가가 억제되었다. 그리고 세포내 반복적인 Ca^{2+} 농도 증가에 의해 활성

도가 변화는 CaMKII의 작용을 확인하기 위하여 CaMKII의 저해제인 KN-93을 전 처리한 결과 Ca^{2+} 농도 증가가 억제되는 것을 확인하였다. 이상의 결과로부터 ACh은 생쥐 초기 2-세포 배에서 ryanodine receptor를 통하여 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터 Ca^{2+} 분비를 유도하며, CaM KII에 의해서도 영향을 받는 것으로 보여진다. 생쥐 초기 2-세포 배에서 "in vitro 2-cell block"의 극복은 ACh에 의해 유도된 신호전달체계를 통해 세포내에 증가하는 Ca^{2+} 농도 및 이에 따른 세포내 대사 작용의 활성화에 의하여 나타나는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Abramczuk J, Solter D and Koprowski H. 1977. The beneficial effect EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Dev. Biol., 61(2):378-383.
- Albrieux M, Sardet C and Villaz M. 1997. The two intracellular Ca^{2+} release channels, ryanodine receptor and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, play different roles during fertilization in ascidians. Dev. Biol., 189(2):174-85.
- Arnoult C, Albrieux M, Antoine AF, Grunwald D, Marty I and Villaz M. 1997. A ryanodine-sensitive calcium store in ascidian eggs monitored by whole-cell patch-clamp recordings. Cell Calcium., 21(2):93-101.
- Ayabe T, Kopf GS and Schultz RM. 1995. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uninseminated and inseminated eggs. Development, 121(7):2233-44.
- Bae IH and Yoon SY. 1995. The effect of Ca^{2+} inhibitor on the in vitro 2-cell block of the mouse. Kor. J. Fert. Steril., 22:1-10.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. J. Reprod. Fertil., 86(2):679-688.

- De Koninck P and Schulman H. 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science*, 279:227-30.
- Dupont G and Goldbeter A. 1998. CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations. *Bioessays*, 20:607-610.
- Dupont G, McGuinness OM, Johnson MH, Berridge MJ and Borgese F. 1996. Phospholipase C in mouse oocytes: characterization of beta and gamma isoforms and their possible involvement in sperm-induced Ca²⁺ spiking. *Biochem. J.*, 316(Pt 2): 583-91.
- Emerson M, Travis AR, Bathgate R, Stojanov T, Cook DI, Harding E, Lu DP and O'Neill C. 2000. Characterization and functional significance of calcium transients in the 2-cell mouse embryo induced by an autocrine growth factor. *J. Biol. Chem.*, 275(29): 21905-21913.
- Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE and Biggers JD. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol. Reprod.*, 50(5):1027-1033.
- Fissore RA, Reis MM and Palermo GD. 1999. Isolation of the Ca²⁺ releasing component(s) of mammalian sperm extracts: the search continues. *Mol. Hum. Reprod.*, 5(3):189-92.
- Goddard MJ and Pratt HP. 1983 Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 73:111-133.
- Harrison PK, Falugi C, Angelini C and Whitaker MJ. 2002. Muscarinic signalling affects intracellular calcium concentration during the first cell cycle of sea urchin embryos. *Cell Calcium*, 31(6): 289-297.
- Inagaki N, Goto H, Ogawara M, Nishi Y, Ando S, and Inagaki M. 1997. Spatial patterns of Ca²⁺ signals define intracellular distribution of a signaling by Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.*, 272:25195-9.
- Jellerette T, Kurokawa M, Lee B, Malcuit C, Yoon SY, Smyth J, Vermassen E, De Smedt H, Parys JB and Fissore RA. 2004. Cell cycle-coupled [Ca²⁺]_i oscillations in mouse zygotes and function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1. *Dev. Biol.*, 274(1):94-109.
- Kang D, Park JY, Han J, Bae IH, Yoon SY, Kang SS, Choi WS and Hong SG 2003. Acetylcholine induces Ca²⁺ oscillations via m3/m4 muscarinic receptors in the mouse oocyte. *Pflugers Arch.*, 447(3):321-7.
- Kim JH, Machaty Z, Cabot RA, Han YM, Do HJ and Prather RS. 1998. Development of pig oocytes activated by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Biol. Reprod.*, 59(3):655-60.
- Kim JY and Saffen D. 2005. Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J. Biol. Chem.*, 280(36):32035-32047.
- Kline JT and Kline D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: evidence for inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. *Biol. Reprod.*, 50:193-203.
- Kuroda R, Kontani K, Kanda Y, Katada T, Nakano T, Satoh Y, Suzuki N and Kuroda H. 2001. Increase of cGMP, cADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate preceding Ca²⁺ transients in fertilization of sea urchin eggs. *Development*, 128(22): 4405-4414.
- Lucas TF, Avellar MC and Porto CS. 2004. Effects of carbachol on rat Sertoli cell proliferation and muscarinic acetylcholine receptors regulation: an *in vitro* study. *Life Sci.*, 75(14):1761-73.
- Mattioli M, Barboni B and Gioia L. 1998. Membrane depolarization triggers maturation in meiotically arrested pig oocytes by activating P-type Ca²⁺-channels on the oolemma. *J. Reprod. Fert.* (abstract series 21), # 27.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K and Honda Y.

1993. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.*, 158(1):62-78.
- Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S and Mikoshiba K. 1992. Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, 257(5067):251-255.
- Moore GD, Kopf GS and Schultz RM 1993. Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Dev. Biol.*, 159(2):669-78.
- Oettling G, Schmidt H and Drews U. 1989. An embryonic Ca^{2+} mobilising muscarinic system in the chick embryo heart. *J. Dev. Physiol.*, 112: 85-94.
- Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Bhat MB, Ma J, Ikemoto N, Jimenez LS, Morimoto H, Williams PG and Parness J. 2002. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, 277(38):34918-23.
- Petr J, Urbankova D, Tomanek M, Rozinek J and Jilek F. 2002. Activation of *in vitro* matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Anim. Reprod. Sci.*, 15: 70(3-4):235-249.
- Powers RD. 1982. Changes in mouse oocyte membrane potential and permeability during meiotic maturation. *J. Exp. Zool.*, 221:365-371.
- Putney Jr JW. 1998. Calcium signaling: up, down, up, down...what's the point? *Science*, 279:191-192.
- Rathouz MM, Vijayaraghavan S and Berg DK. 1995. Acetylcholine differentially affects intracellular calcium via nicotinic and muscarinic receptors on the same population of neurons. *J. Biol. Chem.*, 270(24):14366-75.
- Santella L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244(2):317-324.
- Stehno-Bittel L, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Perez-Terzic C and Clapham DE. 1995. The G protein beta gamma subunit transduces the muscarinic receptor signal for Ca^{2+} release in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 270(50): 30068-30074.
- Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR and Marks AR. 2004. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.*, 94(6):e61-70.
- Williams CJ, Schultz RM and Kopf GS. 1992. Role of G proteins in mouse egg activation: stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP2f conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. *Dev. Biol.*, 151(1):288-96.
- Wu H, Smyth J, Luzzi V, Fukami K, Takenawa T, Black SL, Allbritton NL and Fissore RA. 2001. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol. Reprod.*, 64(5):1338-49.
- Yoon SY, Lee EM and Bae IH. 2003. The effect of Ni^{2+} on the intracellular Ca^{2+} increase of the mouse early 2-cell embryos. *Kor. J. Fert. Steril.*, 30: 269-280.
- Yoshida M, Sensui N, Inoue T, Morisawa M and Mikoshiba K. 1998. Role of two series of Ca^{2+} oscillations in activation of ascidian eggs. *Dev. Biol.*, 203(1):122-133.
- Yoshida S. 1982. Na^+ and Ca^{2+} spike produced by ions passing through calcium channels in mouse ovarian oocytes. *Pflugers Arch.*, 395:84-86.
- Yue C, White KL, Reed WA and Bunch TD. 1995. The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development*, 121(8):2645-2654.

(접수일: 2005. 9. 12 / 채택일: 2005. 11. 15)