

소 난구복합체의 체외성숙시 Okadaic Acid (OA)가 핵성숙 및 Mitochondria 활성화에 미치는 영향

최선호[†] · 한만희 · 조상래 · 김현종 · 최창용 · 손동수 · 김영근 · 이명현¹ · 정연길² · 정영호³
축산연구소 가축유전자원시험장

Effects of Okadaic Acids (OA) on Nuclear Maturation and Mitochondrial Activity of Hanwoo COCs during *in vitro* Maturation

S. H. Choi[†], M. H. Han, S. R. Cho, H. J. Kim, C. Y. Choe, D. S. Son,
Y. K. Kim, M. H. Lee¹, Y. G. Jeoung² and Y. H. Chung³
Animal Genetic Resources Station, NLRI, RDA

SUMMARY

This study was conducted to examine the effects of OA on metaphase of meiosis II and the mitochondrial activity of cytoplasm in bovine cumulus oocytes complexes(COCs) during *in vitro* maturation. Hanwoo COCs were collected from the slaughterhouse cow ovaries and matured in TCM199 supplemented with 0.1% PVA, 0.2 uM, 2 uM, 20 uM OA for the maturation rate of OA concentration. For the maturation effects between OA and cycloheximide(CX), COCs were matured in TCM199 with 25 ug/mL CX, 25 ug/mL CX (6 hrs culture) plus 2 uM OA or 2 uM OA only at a atmosphere 5% CO₂, 95% air 39°C for 6, 12, 24 hrs. To evaluate the nuclear types of matured COCs, cumulus cells were removed by 0.5% hyaluronidase sol. and oocytes were fixed in 1:3 acetic acid ethyl alcohol for 30 sec. and then stained with 0.1% basic Fuchsin sol. For the detection of fluorescent intensity (FI) of matures oocytes, cumulus cells were removed same as performed above and were stained with 20 nM mito tracker for 20 min. at 39°C. Mitochondrial activity of FI in matured oocytes was imaged by laser confocal microscopy (Fluoview, Olympus, Japan) and were measured scanned face on 5 um from median to endpoint of oocytes. Statical analysis of nuclear types observed the three replicates was carried out with ANOVA and Fisher's protected least significant difference test using the STATVIEW program. FI of matures oocytes was compared the multiples of the least intensity among the measured oocytes. Maturing in TCM199 supplemented with 0.1% PVA, 0.2 uM, 2 uM, 20 uM OA, metaphase II were showed 72.0, 50.0, 70.0, 68.8%, respectively and there were different significant($p < 0.05$). In the case of treatment with OA and CX, metaphase were 73.8%, 8.2%, 45.5%, 73.7% in 0.1% PVA-TCM199, 25 ug/mL CX, 25 ug/mL CX plus OA or 2uM OA only, respec-

¹ 국립수의과학검역원(National Veterinary Research and Quarantine Service)

² ET 바이오텍(ET Biotech)

³ 중부대학교(JoongBu University)

[†] Correspondence : E-mail : sunho@rda.go.kr

tively. FI was revealed the increasing tendency during the process of maturation. Whereas FI in CX was decreased about 3 times compared to the other treatments of 6 hrs maturation. We conclude that OA regulates bovine COCs maturation and induces the mitochondrial activity during the process of maturation.

(Key words : COCs, *in vitro* maturation, okadaic acid, mitochondrial activity)

서 론

대부분의 포유류에서는 G2 단계에서 다 자란 난포가 정지된 상태로 머물러 있다가, 난포의 환경적 변화 특히 호르몬의 자극 등에 의해 감수분열이 재개된다. 그 이후 난핵포 붕괴(GVBD)가 일어나며, 염색질이 응축되고 제1감수분열 중기의 방추사가 작용을 한다. 그리고 제1극체가 방출되며, 다시 제2감수분열 중기에서 수정이 이루어질 때까지 머물게 되는 일련의 과정을 거치게 된다.

Okadaic acid (OA)는 inorganic 유도체로서 protein phosphatase 1과 2A를 억제하는 것으로 알려져 있으나(Vandre와 Wills, 1992), tyrosine phosphatase 등은 억제하지 않으며, 암세포의 활성을 촉진하는 것으로 일반적으로 알려져 있다(Bialojan과 Takai, 1998; Cohen 등, 1990; Jesus 등, 1991). 따라서 세포주기, apoptosis, nitric oxide 대사와 Ca 대사 등의 연구에 널리 이용되고 있다(Schonthal 1992; Susko-Parrish 등, 1994). 세포주기의 연구에 있어서, OA는 세포주기 중 유사 및 감수분열의 주요 조절물질로 알려진 성숙촉진인자(MPF)의 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 생쥐의 1세포기의 난자는 OA의 농도에 따라 핵막 붕괴가 조기에 발생하며, 이는 감수분열 및 유사분열에서 G2 및 M 단계의 변이에 protein phosphatase가 깊게 관여하고 있음을 입증한다고 보고하였다(Schwartz와 Schultz, 1991). 또한 OA로 처리된 생쥐의 난자는 전자현미경 관찰에 의하면 microtubule과 동원체 사이의 상호작용이 파괴되며, 이에 따라 방추사의 연장으로 세포분열을 촉진한다고 하였다(Gavin 등, 1991; de Pennart 등, 1993; Mailhes 등, 2003.). 돼지에 있어서 GV 상태의 돼지 미성숙 난포란을 OA에 노출하면 MAP kinase 인산화가 기민하게 야기된다고 하였으나, 장기간(20시간) 노출시 오히려 인산화는 억제한다고 하였고, 수정관에 처리시

MAP kinase의 인산화를 촉진하며, 아울러 전핵 주변의 microtubule을 해체하고 chromatin이 응축되게 하는 등의 세포분열을 촉진하는 것으로 보고하였다(Sun 등, 2002). Rat의 난자에서도 OA가 매개가 되어 MAP kinase 인산화 억제 작용에 의해 protein kinase C가 전핵 형성에 주요 요인임을 입증하여 수정시에도 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었다(Grocholova 등, 1997; Liu 등, 1998; Lu 등, 2002). 한편 높은 농도의 OA (25 nM)는 돼지 난구 복합체에서 plasminogen activator의 활성을 촉진하나, 핵성숙 분열 중기의 과정만을 억제하는 것으로 알려져 있다(Kim과 Menino, 1995).

따라서 본 연구는 소 난구 복합체의 체외성숙시 OA가 Met II의 형성에 미치는 영향과 그와 함께 체외성숙 중 세포질 내의 미토콘드리아 활성화에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 한우 난구 복합체의 체외성숙 및 핵형의 관찰
한우 도축 암소의 난소로부터 난포 직경 2~6 mm의 난포로부터 난포액과 함께 20 gauge 주사침이 부착된 10 mL의 주사기를 이용하여 흡입 방법으로 난포액과 함께 한우 난구 복합체를 채취하였다. 한우 난구 복합체의 체외성숙은 TCM199를 기본배양액으로 0.1% PVA, 0.2 uM, 2 uM, 20 uM OA를 첨가하여 OA에 의한 체외 성숙율을 조사하였으며, OA와 CX가 한우 난구 복합체의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 한우 난구 복합체를 TCM199를 기본 배양액으로 0.1% PVA, 25 ug/mL cycloheximide (CX), 6시간 동량의 CX 처리 후 2 uM OA 처리 또는 2 uM OA 단독으로 5% CO₂, 39°C에서 6, 12, 24시간 동안 체외성숙을 시도하였다.

소 난구 복합체의 핵형의 검사는 급속 염색법을 이용하였으며, 체외성숙된 소 난구복합체는 0.5%

hyaluronidase 용액으로 난구세포를 제거하고, 난자는 1:3 acetic acid, ethanol 용액에 30초간 고정하였고, 3% basic Fuchsin을 염색하여 200배의 광학현미경으로 핵형을 관찰하였다.

2. 체외성숙 한우 난구 복합체의 FI 측정

체외성숙시킨 난자에서 성숙에 따른 미토콘드리아의 fluorescent intensity (FI)를 측정하기 위하여, 핵형 관찰시와 동일한 방법으로 난구세포를 제거한 후, 신선한 TCM199 배양액으로 3회 이상 세정하였고, 20 nM mito tracker-TCM199로 20분간 염색하였다. 염색을 실시한 후 신선한 TCM199 배양액으로 3회 이상 세정하여 미토콘드리아 이외의 부분에서 확인되는 FI를 억제하였다. 난자의 미토콘드리아 FI는 laser confocal 현미경(Fluoview, Olympus, Japan)을 이용하여 측정하였고, 난자 전체의 미토콘드리아 FI를 측정하기 위해 중앙부에서 정점까지를 5 um의 두께로 측정하였으며, 각각의 측정치에 대한 평균치를 그 난자의 FI로 간주하였다.

3. 통계처리

체외성숙된 난자의 핵형에 대한 통계분석은 3반복을 하여 얻어진 결과를 ANOVA로 분석하였고, 체외성숙된 난자의 FI는 Fisher의 LSD를 이용한 다중검정법을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. OA 첨가에 의한 한우 난구 복합체의 체외 성숙을

한우 난구 복합체의 체외성숙시 OA의 농도가 핵성숙에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

0.1% PVA를 첨가하여 24시간 체외성숙 후의 핵 성숙율은 72.0%였으며, OA의 첨가농도에 따라 증가하는 경향을 나타내어 0.2, 2, 20 uM 첨가시 핵 성숙율은 각각 50.0, 70.9, 68.8%로 나타났다. 이러한 결과는 단백질 인산화효소 억제제인 OA는 생쥐의 방추사의 작용을 촉진한다고 한 것(de Penart 등, 1993; Zermicka-Goetz와 Maro, 1993)과 유사한 경향이며, 랫트에서도 OA와 유사물질인 PKC 억제제에 의해 PKC의 활성화가 억제되며, 그에 따라 전핵 형성을 유도할 수 있다고 하였다(Lu 등, 2002). 돼지에 있어서도 GV 상태의 난자에 10분의 OA의 처리에 의해 MAP kinase의 인산화가 가속화됨으로서 충분히 활성화 시킬 수 있었으나, 20시간 이상의 장기간의 처리에서는 오히려 억제된다고 하였다(Sun 등, 2002). 소와 돼지에 있어서 단백질 합성 억제제는 GVBD기의 반 정도의 기간에만 억제하는 것으로 보고된 바 있다(Fulka 등, 1986; Motlik 등, 1991). 이와 같이 OA는 단백질인산화의 억제제로서 MAP kinase의 인산화를 조절하여 핵의 형태적 변화를 유도하며, microtubule을 모이게 하여 핵성숙을 촉진한다는 것을 알 수 있다.

2. OA와 CX의 첨가가 한우 난구 복합체의 체외성숙에 미치는 영향

한우 난구 복합체를 CX 혹은 CX와 OA의 첨가에 의해 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. TCM199를 기본 배양액으로 0.1% PVA, 25 ug/mL cycloheximide (CX), 6시간 동량의 CX 처

Table 1. Nuclear types of COCs matures in TCM199 supplemented with OA

Supplements	No. of COCs examined	No. of COCs (% , Mean±SEM) at		
		GV	M I	M II
0.1% PVA	75	2	19	54(72.0± 8.6) ^a
0.2 uM OA	74	21	16	37(50.0±16.5) ^b
2 uM OA	79	12	11	56(70.9± 3.4) ^a
20 uM OA	77	8	16	53(68.8±12.3) ^a

^{a,b} in the same column mean significant different within $p < 0.05$.

콘드리아의 활성화에 미치는 영향은 Fig. 1과 같다.

핵성숙시킨 난자를 mito tracker로 염색하여 난자의 중심부에서 가장 바깥쪽까지 5 μ m씩 나눠서 분석한 결과 0.1% PVA, CX+OA, OA 단독처리 등으로 체외성숙 후 FI는 체외성숙 시간에 따라 증가하는 경향을 나타냈으나, CX 단독처리시 다른 처리구의 배양시간 6시간의 FI 3배가 감소하는 것으로 나타났다. 이는 CX의 처리에 의해 MPF의 활성화로 microtubule의 활성화가 억제됨으로 미토콘드리아도 함께 억제되며, OA의 첨가에 의해 핵분열이 활성화됨으로서 미토콘드리아의 활성화도 증가하는 것으로 여겨진다. 이러한 현상은 Sun 등(2002)이 체외성숙 44시간 된 돼지 난자에 OA 처리시 microtubule의 작용이 급격히 활성화되어 핵분열이 진행되며, 극체의 방출을 유도한다는 것과 유사한 결과이다. 또 수정된 돼지 난자에서도 제2극체를 방출하도록 유도하는 것으로 보아 microtubule의 작용을 활성화하여 방추사의 형성을 촉진하는 것으로 미루어 미토콘드리아의 활성화가 증가한다고 하겠다. 따라서 OA는 소 난구 복합체의 체외성숙을 조절하는 인자임을 확인할 수 있으며, 미토콘드리아에 직접적인 작용에 대하여 더 연구하여야 할 것이다.

적 요

본 연구는 한우 난구 복합체의 체외성숙에서 OA가 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 도축 한우 암소의 난소로부터 난구 복합체를 채취하여 0.1% PVA-TCM199로 3회 이상 세정 후 0.1% PVA-TCM 199, 0.2 uM, 2 uM, 20 uM OA를 각각 첨가하여 5% CO₂, 95% 공기, 39°C에서 6, 12, 24시간 동안 체외성숙을 실시하였다. 또한 체외성숙시 cycloheximide(CX)와 OA와 체외성숙 효과를 확인하기 위하여 0.1M-PVA TCM199, CX 25 ug/mL, 동량의 CX를 6시간 처리한 후 2uM의 OA로 체외성숙을 실시하거나, 0.2 uM OA 단독으로 체외성숙시켰다. 체외성숙된 한우 난구 복합체의 핵형을 조사하기 위하여 0.5% hyaluronidase 용액으로 난구세포를 용해하고, 난자는 1:3 acetic acid, ethanol 용액에 30초간 고정하였으며, 3% basic Fuchsin을 염색

하여 핵형을 관찰하였다. 체외성숙된 난자의 핵형 및 체외발달율에 대한 통계분석은 3반복을 하여 얻어진 결과를 ANOVA test로 분석하였다.

한우 난구 복합체의 체외성숙율은 0.1% PVA-TCM199, 0.2 uM, 2 uM, 20 uM OA를 첨가시, 각각 72.0, 50.0, 70.9, 68.8%를 나타내어 유의적인 차이를 보였으며($p < 0.05$), CX와 OA가 한우 난구 복합체에 미치는 영향을 조사한 결과, 0.1M-PVA, CX 25 ug/mL, 동량의 CX를 6시간 처리한 후 2uM의 OA로 체외성숙을 실시, 0.2 uM OA 단독처리시의 체외성숙율은 각각 73.8, 7.2, 45.5, 73.7%를 나타냈어 극도의 유의적인 차이를 보였다($p < 0.01$). 미토콘드리아의 활성화는 0.1M-PVA, CX 25 ug/mL, 동량의 CX를 6시간 처리한 후 2uM의 OA로 체외성숙을 실시, 0.2 uM OA 단독 처리시, 핵성숙기간 동안 증가하는 경향을 보였고, CX 처리시 다른 처리와 비교하였을 때, 성숙 6시간에 1/3의 FI를 나타내었다. 이상의 결과를 미루어 OA는 한우 난구 복합체의 체외성숙에 중요한 조절물질이며, 핵성숙과정 중 미토콘드리아의 활성화에도 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Alexandre H, Delsinne V, Goval JJ and Van Cauwenberge A. 2003. Effects of taxol and okadaic acid on microtubule dynamics in thimerosal-arrested primary mouse oocytes: A confocal study. *Bio. Cell.*, 95(6):407-414.
- Bialojan C and Takai A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid on protein phosphatases. *Bioche. J.*, 156:283-290.
- Cohen P, Holmes CF and Tsukitani Y. 1990. Okadaic acid: A newprobe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.*, 15(3): 98-102.
- de Pennart H, Verlhac MH, Cibert C, Santa Maria A and Maro B. 1993. Okadaic acid induces spindle lengthening and disrupts the interaction of microtubules with the kinetochores in metaphase II-arrested mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 157(1): 170-181.

- Fulka J Jr, Flechon JE, Motlik J, Fulka J and Jilek F. 1986. Effects of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 77:281-285.
- Gavin AC, Tsukitani Y and Schorderet-Slatkine S. 1991. Induction of M-phase entry of prophase-blocked mouse oocytes through micro injection of okadaic acid, a specific phosphatase inhibitor. *Exp. Cell Res.*, 192:75-81.
- Goris J, Hermann J, Hendrix P, Ozon R and Merlevede W. 1989. Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.*, 245: 91-94.
- Grocholova R, Petr J, Rozinek J and Jilek F. 1997. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid inhibits exit from metaphase II in parthenogenetically activated pig oocytes. *J. Exp. Zool.*, 277:49-56.
- Jessus C, Rime H, Haccard O, Van Lint J, Goris J, Merlevede W and Ozon R. 1991. Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes : Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. *Development*, 111:813-820.
- Kalous J, Kubelka M, Rimkevicova Z, Guerrier P and Motlik J. 1993. Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcome cycloheximide and 6-dimethylaminopurine block in cattle and pig oocytes. *Dev. Biol.*, 157:448-454.
- Kim NH and Menino AR. 1995. Effects of stimulators of protein kinase A and C and modulators of phosphorylation on plasminogen activator activity in porcine oocytes-cumulus cell complexes during *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:364-370.
- Liu L, Ju JC and Yang X. 1998. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matures bovine oocytes following chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 49:298-307.
- Lu Q, Smith GD, Chen DY, Han ZM and Sun QY. 2002. Activation of protein kinase C induces mitogen-activated protein kinase dephosphorylation and pronucleus formation in rat oocytes. *Biol. Reprod.*, 67:64-69.
- Mailhes JB, Hilliard C, Fuseler JW and London SN. 2003. Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes *in vitro*. *Chromosome Research*, 11: 619-631.
- Motlik J, Nagai T and Kikuchi K. 1991. Resumption of meiosis in pig oocytes cultured with cumulus and parietal granulosa cells: The effect of protein synthesis inhibition. *J Exp. Zool.*, 259:386-391.
- Presicce GA and Yang X. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matures *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:61-68.
- Rime H and Ozon R. 1990. Protein phosphatase are involved in the *in vivo* activation of histone H1 kinase in mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 141:115-122.
- Schonthal A. 1992. Okadaic acid-a valuable new tool for the study of signal transduction and cell cycle regulation? *New Biol.*, 4(1):16-21.
- Schwartz DA and Schultz RM. 1991. Stimulatory effect of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases, on nuclear envelope breakdown and protein phosphorylation in mouse oocytes and one-cell embryos. *Dev. Biol.*, 145(1):119-127.
- Srsen V, Kalous J, Nagyova E, Sutovsky P, King WA and Motlik J. 1998. Effects of follicle-stimulating hormones bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. *Zygote*, 6(4):299-309.
- Sun QY, Wu GM, Lai LL, Bonk A, Cabt R, Park KW, Day BN, Prather RS and Scatten H. 2002. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior and cell cycle progression by protein phos-

phatases during pig oocytes maturation and fertilization *in vitro*. Biol. Reprod., 66:580-588.

Susko-Parrish JL, Liebfried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V and First NL. 1994. Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. Dev. Biol., 166:729-739.

Vandre DD and Wills VL. 1992. Inhibition of mi-

tosis by okadaic acid : Possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase. J. Cell Sci., 101:79-91.

Zernicka-Goetz M and Maro B. 1993, Okadaic acid affects spindle organization in metaphase II-arrest rat oocytes. Exp. Cell Res., 207(1):189-193.

(접수일: 2005. 10. 22 / 채택일: 2005. 12. 17)