

세포주기와 관련된 유전자들의 난소 내 mRNA 및 단백질 발현

서라벌대학 임상병리과¹, 동남보건대학 임상병리과²

박창은¹ · 홍성노²

Expression Patterns of Cell Cycle Related Genes mRNA and Proteins in the Mouse Ovary

Chang-Eun Park¹ and Sung-No Hong²

Department of Clinical Laboratory Science, Sorabol College, Kyungjoo 780-711, Korea¹

Department of Clinical Laboratory Science, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea²

Wee1 is a kinase regulator of the M-phase promoting factor (MPF; a complex of cdc2 and cyclin B1). The present study was undertaken to determine the role(s) of wee1 in the early stages of mouse ovarian follicles. The expression of wee1 and the correlated cell-cycle components, namely cdc2, cyclin B1, and cdc25C, were evaluated by immunohistochemistry. In addition, the expression of Tyr15-phosphorylated cdc2 (cdc2-p) was also examined to determine whether wee1 kinase phosphorylates cdc2 existed. Each component except cdc25C was found cytoplasmic in the oocytes at all stages of follicles, while cdc25C was not detected in primordial follicles. It was found primarily in ovarian somatic cells and to a small extent in granulosa cells of the growing follicles. To further confirm the expression of cell-cycle components in the primordial follicular oocytes, day1 ovaries were enzymatically and mechanically dissociated, then oocytes were isolated from somatic including pre-granulosa cells, and we confirmed that cdc2-p was expressed in oocytes of primordial follicles. From the results of the present study, we concluded wee1, without the counteracting cdc25C, would cause meiotic arrest of oocytes by the inhibitory phosphorylation of cdc2. The expression of all these proteins in the granulosa cells of growing follicles may regulate their mitosis concurrently with the growth of oocytes and follicles.

Key Words : Ovary/oocyte, Folliculogenesis, Granulosa cell, Meiotic prompting factor, immunohistochemistry

I. 서 론

여성은 태어날 때에 약 2~4백만 개의 원시난포(primordial follicle)를 갖고 태어나는데, 원시난포 안에는 여성의 생식세포인 난자가 제 1차 감수분열 전기에 멈추

어서 더 이상의 분열을 하지 않고 있다. 분열이 멈춰진 난자를 갖고 있는 원시난포는 대부분이 휴면시기(resting stage)로 평생 발달을 멈춘 채로 존재하며, 사춘기가 지나면서 이 중에서 매 달 약 20~30개의 원시난포가 선택되어 발달을 시작하면서 그 중에 오직 한 개의 난포만이 우성(dominant)으로 자라고 그 안의 건강한 난자만이 배란을 하게 되는 것이 여성의 생리주기이다.

따라서 태어날 때 약 200~400만개 존재하는 원시난포

교신저자 : 홍성노, (우)440-714 경기도 수원시 장안구 정자동 937 동남보건대학, 임상병리과.

Tel : 031-256-5661

E-mail : snhong@dongnam.ac.kr

는 성장을 멈춘 채로 이 중에서 오직 400~500개 정도의 난포만이 여성이 생식 가능한 기간 동안 선택 되어 정상적인 성장과정과 배란과정을 거치게 되고, 나머지 거의 99%는 일생동안 폐쇄(atresia)라고 하는 과정을 거쳐 퇴화하게 된다. 따라서 평생(사춘기~80세) 생식능력을 갖고 있는 남성과는 달리 여성은 사춘기 이후 30세 후반까지만 생식능력을 갖고, 그 이후 생식능력은 급격히 떨어져서 47세~55세를 전후해서 폐경기를 맞이하게 된다.

즉, 폐경기란 난소에 갖고 있던 난포를 다 써버림으로 난소의 기능이 소실됨에 따라 월경이 영구히 중단되는 시기를 지칭한다. 포유류의 경우, 사춘기를 지나면서 발달을 멈추고 있던 원시난포가 자라기 시작한다. 난포의 성장이 일어나는 동안, 난포 안에 존재하는 과립세포, 난구세포 등의 세포분열, 성장과 분화가 일어나며, 동시에 난자의 성장이 일어난다.

포유류의 난포발달 과정(folliculogenesis)은 난소 내외의 여러 가지 요인에 의해 복잡한 과정으로 조절된다. 지금까지 난포발달 과정의 연구에서 후기 난포발달 과정, 즉 강소 형성 난포(antral follicle)의 발달과 분화에 대한 연구는 많은 반면 초기 난포발달 과정에 대한 연구는 상대적으로 미약하다(Eppig와 Wigglesworth, 2000; Fortune 등, 2000; McGee와 Hsueh, 2000; Richards, 2001). 모든 포유류는 일정한 숫자의 원시난포를 가지고 태어나는데 대부분이 성장을 멈추고 있다. 특정시기를 지나면서부터 발달을 멈추고 있던 원시난포 중 일부만이 선택적으로 1차 난포로 자라기 시작한다(Braw-Tal, 2002). 이와 같이 원시난포에서 1차 난포로 성장이 다시 시작되는 기전, 즉 원시난포의 성장이 멈추어 있다가 활성화되는 기전에 대해서는 아직까지 완전히 알려져 있지 않다.

성장에 필요한 여러 가지 요인들이 난소 밖으로부터 과립세포 및 난구세포를 통하여 난자에 공급되며, 난자로부터도 여러 가지 요인이 난구세포 및 과립세포에 전달되어 난포의 발달을 조절한다. 따라서 난자와 난포세포 사이의 연결 상태는 난자성숙 및 난포발달에 매우 중요하다. 포유류의 난소에서 일어나는 난포발달과정은 여러 가지의 호르몬과 성장 인자들이 난자와 과립세포(granulosa cells), 그리고 험막 세포(theca cells) 등의 성장과 분화를 조절하는 매우 복잡한 과정이다.

난포의 성장은 난자와 난자 주위를 둘러싸고 있는 과립세포와 험막 세포에 의해 좌우되는데, 처음 성장이 정지된 상태인 원시난포의 경우는 몇 개의 편평 과립세포(flattened granulosa cells)가 난자를 둘러싸고 있으며 난

포의 성장이 시작되면 과립세포는 입방형(cuboidal granulosa cells)으로 변화하며, 난자의 성장도 시작된다(Hirshfield, 1991).

난포발달 후기에는 성선자극 호르몬에 영향을 받는 반면 난포의 초기 발달과정, 특히 성장의 개시는 성선자극 호르몬에 의존하지 않고 난소 내의 성장인자와 같은 국소 조절인자(paracrine factor)에 영향을 받는 것으로 추측되고 있으나 그 기전이 알려져 있지 않다(Kol과 Adashi, 1995).

성장이 억제되어 있는 원시 난포의 성장에 관여할 것으로 알려진 몇 가지 대표적인 인자로는 kit ligand(KL; Parrott와 Skinner, 1999), growth differentiation factor-9 (Dong 등, 1996), basic fibroblast growth factor (bFGF; Nilsson 과 Skinner, 2004), leukemia inhibitory factor(LIF; Nilsson 등, 2002), 그리고 insulin(Kezele 등, 2002) 등이 있으나 원시 난포가 어떻게 성장이 억제되어 있는지 또 어떻게 성장이 활성화되는 지에 관한 자세한 기작은 아직까지 확실하지 않다.

원시난포가 활성화되어 다시 성장하기 시작하는 과정을 이해함으로써 여성의 생식능력이 시작되는 시기를 조절하거나 혹은 폐경이 시작되는 시기를 뒤로 미룰 수 있는 등 궁극적으로는 여러 가지 조절이 인위적으로 가능하게 될 것이다. 또한 배란이 되지 않거나 조기 폐경 등 난포발달과 관련된 여성의 난소질병에 대한 기전 연구 및 그 치료도 가능할 것이다.

이러한 궁극적인 목표를 염두에 두고 초기 난포발달 과정에 관여하는 세포주기와 관련된 유전자의 발현양상을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 포유동물의 경우, 원시난포의 개시로부터 난자의 크기가 커지게 되고 제1 감수분열의 겹섬유기(diplotene)에 정지되어있게 된다. 이렇게 멈춰진 난자의 성숙은 감수분열 촉진인자(MPF; meiosis promoting factor)의 활성화에 의해 진행된다. 이러한 활성화는 유사분열 중기(metaphase I) 시기에 최고조를 이루다가 점차 감소하게 된다(Albertini와 Carabatsos, 1998; Barral 등, 1999).

그러다가 다시 중기(metaphase II)에 최고조를 이룬다고 알려져 있다(Choi 등, 1991; Hashimoto와 Kishimoto, 1988). MPF는 cdc2와 cyclin B1이 이종이합체(heterodimer)를 이룬다고 보고된바 있으며(Hunt, 1991; Nurse, 1997), 이러한 활성화를 조절하는 조절자로는 cdc25C와 wee1이 여기에 해당된다. Cdc25C는 MPF의 인산화를 활성화시키는데 반해 wee1은 인산화(phosphorylation)를 통해

MPF를 불활성화시키는 억제제로 작용을 한다. 이때 MPF는 cdc2의 tyrosine 15번 잔기가 인산화를 일으킨다고 보고되어 있다(cdc2-p; Millar와 Russell, 1992; Mueller 등, 1995).

본 연구자들은 세포주기 관련 조절인자들을 난자의 감수분열 단계에서 활성화 및 난포의 성장과 관련하여 분자생물학적인 수준에서 관찰하고자 하였다. 따라서 본 연구는 마우스의 초기 난소에서 세포주기 조절인자들인, wee1, cdc2, cyclin B1, cdc25C, cdc2-p의 mRNA와 protein의 발현양상을 알아보았다.

II. 연구재료 및 실험방법

1. 마우스 난소 적출 및 RNA 분리

생후 1일자와 5일자의 ICR 생쥐로부터 난소를 적출하여 해부현미경하에서 난소 주변의 포낭을 제거하고 Dulbecco phosphate buffered saline(DPBS)에 3번 세척을 하였다. 사용전까지 액화질소에 급속 냉각시키거나 혹은 곧바로 RNA 추출 및 protein 추출에 사용하였다. 각 시기의 난소는 Trizol(Gibco BRL, Grand Island, NY)을 이용해 조직을 균질화 시킨 후 chloroform과 함께 심하게 혼합(vortexing)을 하였다. 그리고 4°C에서 13,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, 상층액을 새로운 튜브에 담는다.

상층액과 함께 isopropanol을 이용해 추출한 후 ethanol 침전을 통해 pellet을 얻었다. 이 pellet을 DEPC(diethyl pyrocarbonate)-nuclease water에 녹인 후 최종 정제된 total RNA를 얻었다. 이때 genomic DNA를 제거하기 위해 DNase I(Gibco BRL)을 37°C에서 15분 처리하고 RNA의 degradation 정도를 확인하기 위해 1~2 µL를 전

기영동하여 확인하였으며, 또한 RNA의 양은 OD값을 측정하여 정량하고 곧 바로 역전사 반응을 진행하였다. 혹은 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

2. 반정량적 중합효소연쇄반응(semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)

난소 조직에서 mRNA의 발현을 알아보기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 역전사반응(reverse transcription))은 총 반응용액을 20 µL로 하여 Superscript II RTase 200 U(GIBCO BRL), 10 mM dNTP, oligo(dT) primer 0.5 µg, 25 mM MgCl₂을 사용하고 42°C에서 60분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)은 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20, 0.2 mM dNTP 그리고 0.625 U Taq DNA polymerase가 포함된 PCR master mixture(ABgene, Survey, UK)를 사용하여 시행하였다.

PCR의 조건과 primer 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 이렇게 얻어진 증폭된 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동한 후, Image Analyzer(Vilber Lourmat, France)를 이용하여 각 유전자의 발현양을 G3PDH의 발현에 대하여 환산하였다. 그리고 1일자와 5일자의 차이는 1일자 결과를 기준으로 fold change로 산출하였고 3-4회 반복 실험의 결과를 평균값±SEM으로 나타내었다.

3. Western Blot 분석

각 시기의 난소에서 세포주기와 관련된 단백질의 발현을 관찰하기 위해 웨스턴블롯(western blot)을 수행하였다. 각 단백질에 목록과 조건은 Table 2에 나타내었다. 조

Table 1. Primer sequences and RT-PCR conditions

Gene	GI number	Primer sequence	Annealing Temp(°C)	Product size (bp)
wee1	11342590	For AACTAAAGGCGCCCTACCAT	55	537
		Rev AGAGGTTCCGTTACCCGACT		
cdc2	1575289	For GGAACAAGAACAACCTTTC	55	261
		Rev ACGGAAGAGAGCCAACGGTA		
cyclin B1	28195397	For GGAAATCTTGACAACGGTG	55	239
		Rev TGCCTTTGTACGGCCTTAG		
cdc25C	882119	For GGAACAAGAACAACCTTTC	55	305
		Rev ACGGAAGAGAGCCAACGGTA		
G3PDH	20828350	For TCCACCACCCTGTTGCTGTA	60	451
		Rev ACCACAGTCCATGCCATCAC		

Table 2. Antibodies used for immunohistochemistry

Proteins	Dilution	Antibody name	Source
wee1	1:200	Wee1 (C-20), sc-325,	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
cdc2	1:200	Cdc2 p34(17), sc-54	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
cyclin B1	1:50	clone CB169 (mouse monoclonal IgG2b)	Upstate biotechnology
cdc25C	1:200	Cdc25C (C-20), sc-327	Santa Cruz Biotechnology, Inc
cdc2-p	1:50	p-cdc2 (Tyr 15)-R, sc-7989-R	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

우선 각 시기의 난소 조직을 lysis buffer(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 5 mM EDTA)와 1 mM phenylmethylsulphonyl-fluoride(PMSF, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)가 첨가된 RIPA buffer 200 μ L에 넣고 homogenizer를 이용해 균질화 시켰다. 그런 후 얼음 안에 30분간 방치 한 후 다시 혼합과정을 수행하였다. 위와 같이 얼음 방치과정과 혼합과정을 3번 이상 반복하여 용해물(lysate)을 4°C에서 13,000 rpm, 15분간 원심분리 하였다.

그리고 상층액을 새로운 튜브에 담고 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다. 이렇게 얻어진 단백질의 농도를 측정하기 위해서 Bradford 분석법(Bio-Rad, Hercules, CA)을 정량화 하였다. 각 시기의 난소에서 얻어진 총 단백질(20 μ g)을 10% polyacrylamide가 첨가된 SDS-PAGE(sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel)에 loading 하여 100 V로 2시간 동안 전기영동을 진행하였다. 전기영동을 통해서 분자량에 따라 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 극성을 띠고 있는 PROTRAN membrane(Schleicher & Schuell Inc, Keene, NH, USA)에 전기영동(50 V/hrs)을 통해 옮겼다.

이렇게 옮겨진 membrane에 비특이적인 단백질을 제거하기 위해 5% non-fat dry milk가 포함된 TBST(0.2 M NaCl, 0.1% Tween-20, and 10 mM Tris pH 7.4)에 1시간 동안 교반을 진행시켰다. 그리고 wee1 항체(1:100, C-20, sc-325, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)를 4°C에서 하룻밤 동안 교반을 진행하였다. 그런 후 이차 항체인 HRP가 conjugate된 goat anti-rabbit IgG (1:1,000; sc-2030, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)를 실온에서 1시간동안 교반을 진행하였다. 최종적으로 membrane에 붙어있는 wee1 protein을 탐지하기 위해 ECL(enhanced chemiluminiscence, sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)을 이용해 발광시킨 후 film에 노출시켜 단백질의 발현을 확인하였다.

4. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

마우스 난소를 적출하여 포낭을 제거하고 DPBS에 세척한 후, 고정은 4% paraformaldehyde에 4°C에서 하루 동안 방치하였다. 그리고 파라핀 조직 블록을 제작하고 5 μ m의 두께로 절편 슬라이드를 제작하였다. 이때의 조직 절편은 극성을 띠는 슬라이드(ProbeOn Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 올렸다.

조직절편은 탈파라핀 과정을 거친 후, 조직내에서 endogenous peroxidase activity를 없애기 위해 3% H₂O₂가 첨가된 methanol에 20분간 처리하였다. 그리고 비특이적인 단백질의 발현을 줄이기 위해 blocking buffer(DAKO, Carpinteria, CA)에 실온에서 15분간 처리하였다. Table 1에 나타난 세포주기에 관련된 단백질의 1차 항체 반응을 4°C에서 하룻밤 동안 진행하였다.

그 후 조직 슬라이드를 0.05% TBS-T(Tris buffered saline-tween 20)에 세척을 한 후 바로 biotinylated mouse/rabbit/goat/ 2차 항체를 실온에서 20분간 처리하였다. 그리고 streptavidin HRP conjugated 된 substrate를 실온에서 15분간 처리하였다. 최종적으로 streptavidin-biotin-peroxidase complex를 AEC+ (DAKO)를 통해 발현양상을 탐지하였다. Hematoxylin을 이용해 대조염색을 하였다. 매번 실험을 수행할 때 음성(negative) 대조군으로는 1차 항체만을 처리하지 않고 모든 실험과정을 동일하게 진행하였다.

III. 결 과

1. 마우스 생후 1일자, 5일자의 조직학적인 분석

Fig. 1은 마우스 생후 1일자, 5일자 난소의 조직학적인 모습을 보여주고 있다. 생후 1일에는 주로 원시난포로 구

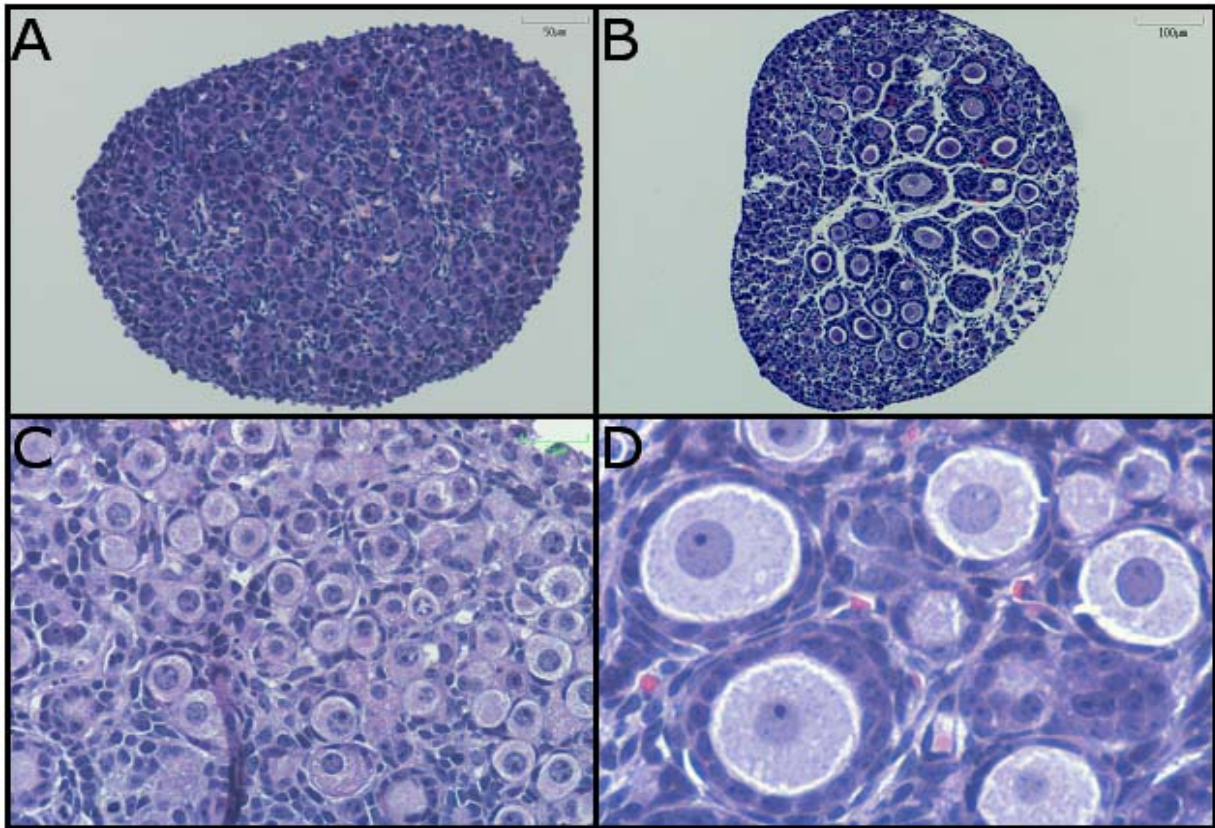


Fig. 1. Microphotographs of Day1, Day5 mouse ovarian tissues with harris hematoxylin-Eosin stain. A; Histology of Day1 mouse whole ovary($\times 100$). B; Histology of Day5 mouse whole ovary and most primordial follicles in the field are stained($\times 100$). C; Magnification of Day 1 mouse ovary($\times 400$). D; Magnification of Day 5 ovary and Most primary follicles in the field are stained($\times 400$).

성되어 있으며(Fig. 1A, 1C), 난자 주변에 flatten한 pre-granulosa cell로 둘러싸여 있으며, 이 상태의 난포가 성장을 개시하면서 과립세포가 입방형을 띄게 된다. 그래서 생후 5일자에는 일차난포의 대부분과 소수의 원시난포로 이루어져 있다. 이시기의 일차 난포는 입방형의 과립세포가 한 층으로 둘러싸고 있다. 이 시기부터 성장의 개시가 일어나게 된다(Fig. 1B, 1D). 원시난포로 평생을 멈추고 있다가 아직까지 밝혀지지 않은 요인으로 인해 선택적으로 1차 난포로 성장을 개시하는 일련의 난포 발달과정을 진행하게 된다. 그래서 1일자와 5일자의 난소를 선택해 세포주기 조절인자들의 mRNA와 단백질의 발현이 어떠한 차이를 보이는지 관찰하였다.

mRNA의 발현양을 관찰하기 위해 생후 1일자와 5일자의 난소를 적출한 후, RNA를 추출하고 역전사 반응을 통해 complementary DNA를 합성한 후 PCR을 수행하였다. 세포 주기와 관련된 유전자들의 PCR 조건과 primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었다. Primer의 제작은 미국 NIH의 NCBI Database(www.ncbi.nlm.nih.gov/genebank)

에서 해당하는 각 유전자를 선택하고, Primer3 Input (primer3 cgi v0.2) program(<http://frodo.wi.mit.edu/>)을 이용해 Table 1의 염기서열을 얻었다.

RT-PCR을 수행한 후 최종산물을 전기영동을 진행한 결과, 각 유전자들의 band density를 얻을 수 있었다(Fig. 2A). 각각의 유전자들에 대해 band density를 수치화한 후, house keeping 유전자인 G3PDH로 normalization하여 생후 1일자와 5일자의 난소에서 상대적인 양을 수치화 하였다 그런 후 생후 1일자 난소를 기준으로 fold change 값을 그래프로 나타내었다(Fig. 2B).

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *wee1*이라는 유전자는 상대적으로 생후 1일자에서 높게 나타났으며, 나머지 유전자들은 생후 5일자에서 높게 발현하는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 현상으로 보아 *wee1* 유전자는 세포주기를 정지 시키거나, 성장을 억제하는 데 관여하는 요인이라고 생각된다. Fig. 3은 각 시기의 난소에서 단백질을 추출한 후, 세포주기와 관련된 단백질의 발현양상을 관찰한 결과이다. Western blot은 Table 2에 나타난 조건으로 단백질

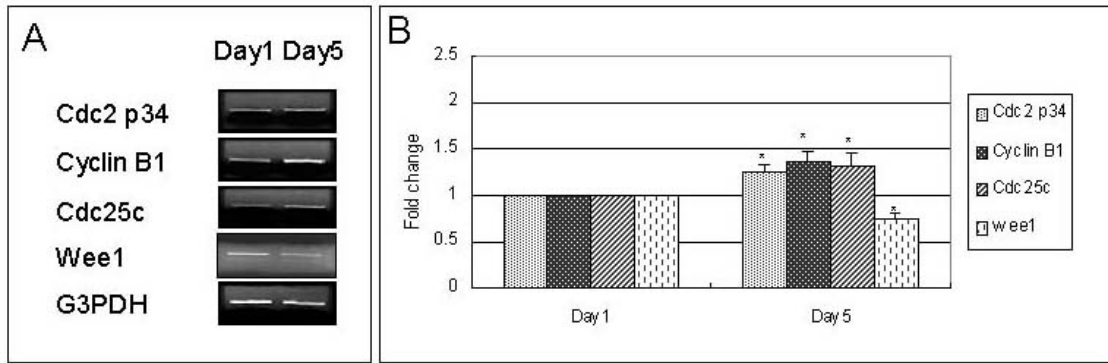


Fig. 2. Results of mRNA expression in cell cycle related 4 genes after semi-quantitative expression analysis. A; Each band density after RT-PCR was normalized against the level of G3PDH mRNA, and fold change was calculated against to that of day1 ovary. B; Comparison between day1 and day5 whole ovaries. Asterisks depict a value of $p < 0.05$ that considered as statistically significant. Experiments were repeated 3-4 times and the data were expressed as mean \pm SEM.

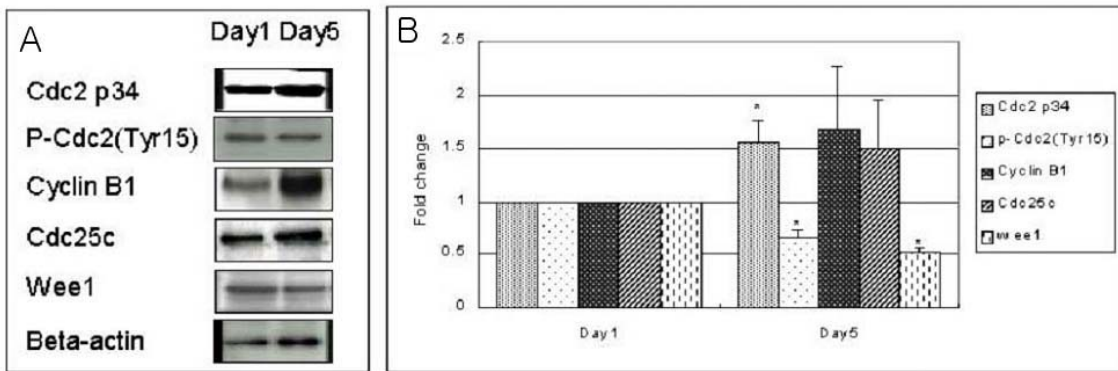


Fig. 3. Results of protein expression in cell cycle related 5 genes after semi-quantitative expression analysis. A; Each band density after western blot analysis was normalized against the level of β -actin protein, and fold change was calculated against to that of day1 ovary. B; Comparison between day1 and day5 whole ovaries. Asterisks depict a value of $p < 0.05$ that considered as statistically significant. Experiments were repeated 3-4 times and the data were expressed as mean \pm SEM.

의 발현을 탐지하였으며, Fig. 3A와 같은 band density를 얻었으며, 발현양을 수치화 한 후 house keeping 단백질인 β -actin을 이용해 normalization을 하여 1일자를 기준으로 fold change값을 얻어 시기별 차이를 그래프로 나타내었다(Fig. 3B).

Fig. 3에서 보는바와 같이 cdc2-p(Tyr15), wee1의 단백질 발현은 생후 1일자에서 높게 발현하였으며, 또한 cdc2-p34는 생후 5일자 난소에서 유의적인 차이를 관찰하였다. 이러한 결과로 보아 cdc2-p(Tyr15)의 인산화와 wee1은 세포주기의 정지와 억제에 관여하는 것으로 생각되며 cdc2-p34는 세포의 증식에 관여할 것으로 생각되어진다.

생쥐 난소에서 세포주기에 관련된 단백질이 어디에 localization 하고 있는지를 면역 조직 화학법을 통해 알아

보았다(Fig. 4). 특히 1일자에 주로 존재하는 원시난포에서 발현하는지, 혹은 5일자에 주로 존재하는 일차난포에서 발현하는지 확인하였다. 보시는 바와 같이 원시난포에서 발현은 왼쪽 사진에서 나타내어져 있고(Fig. 4A, 4B, 4C, 4D), 일차난포에서 발현은 오른쪽 사진들에서 볼 수 있다(Fig. 4E, 4F, 4G, 4H).

또한 wee1의 발현 양상은 원시난포와 일차난포의 난자 세포질에서 발현하며(Fig. 4A, 4E), 원시난포의 난자에서 발현 수준이 pre-granulosa cell, 과립세포에 비해 높은 것으로 나타났다. 그리고 나머지 세 가지의 cdc2(Fig. 4B, 4F), cyclin B1(Fig. 4C, 4G), cdc2-p (Fig. 4D, 4H)의 단백질 발현은 난자에서 높게 발현하는 것을 알 수 있었다. 이렇게 세포주기에 관련된 단백질들이 발현하는 것으로

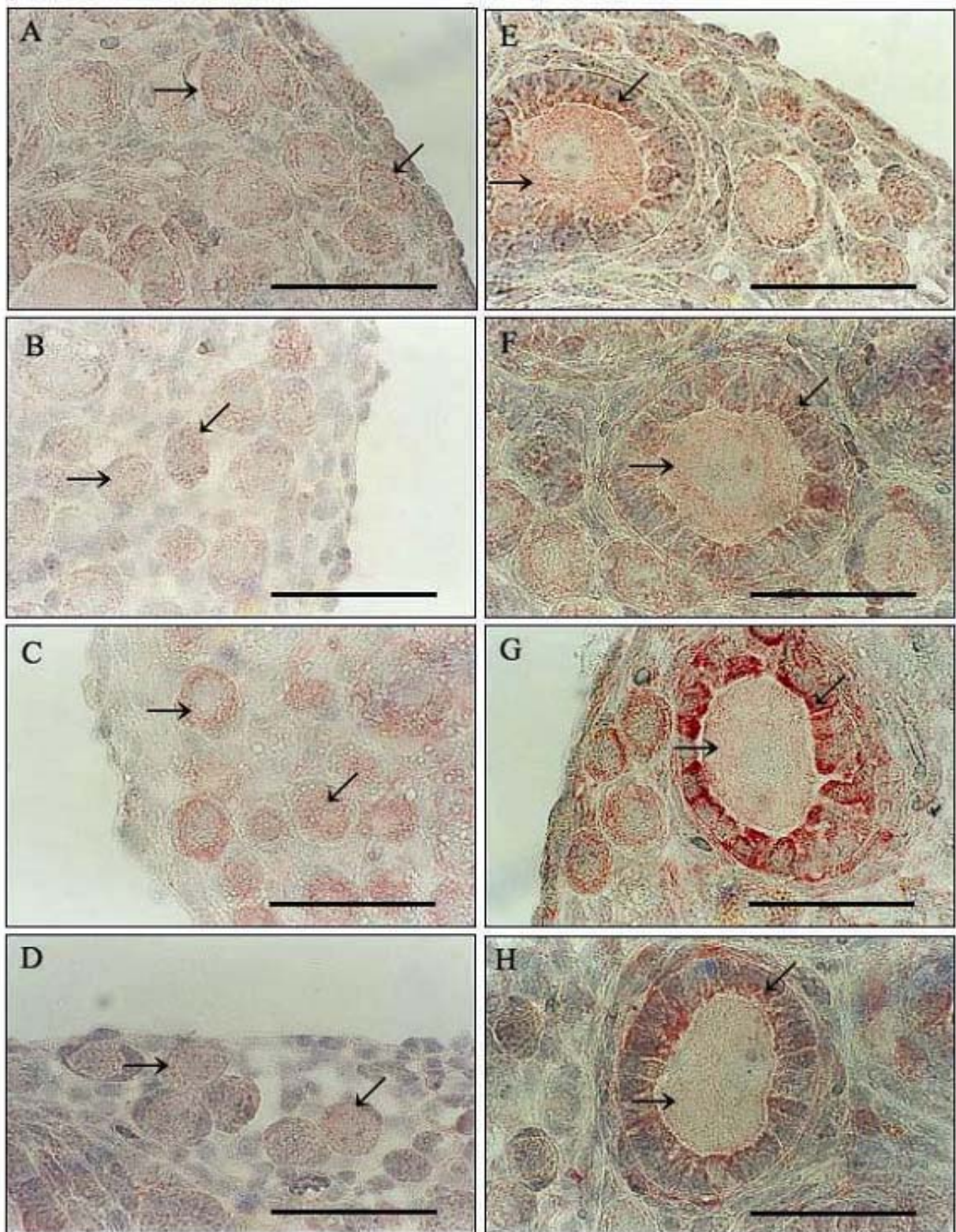


Fig. 4. Immunohistochemistry for wee1(A, E), cdc2 (B, F), cyclin B1 (C, G), and cdc2-p (D, H) expression in the day7 ovary. Micrographs in the left column (A, B, C, and D; $\times 400$) illustrate the each protein in primordial follicles in the ovarian cortex, while micrographs in the right column (E, F, G, and H; $\times 400$) depict their protein expression in growing secondary follicles. Scale bar represents $50\mu\text{m}$. Most primordial follicles in the field is stained positively and arrows indicating representative cytoplasmic expression of oocytes and granulosa cells (E, F, G, and H).

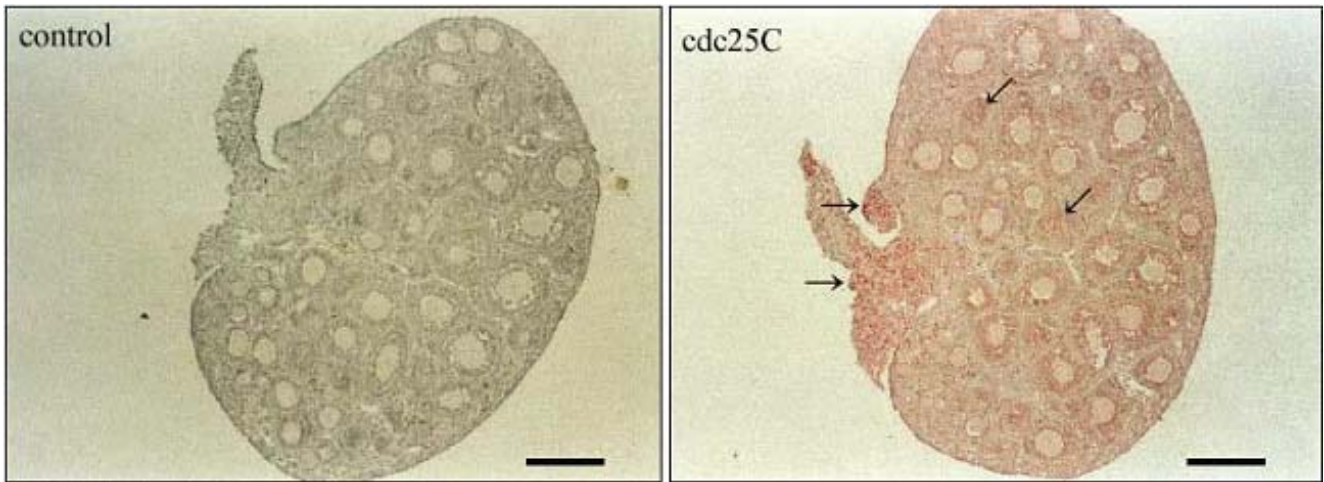


Fig. 5. Immunohistochemistry for *cdc25C* in the day7 ovary. Arrows indicating relatively low expression in granulose cells in growing follicle. High expression was observed in the ovarian somatic cells, especially in the hilum region. Scale bar represents 200 μ m (\times 100).

보아 난자의 성숙과 정지에 관여하는 것으로 생각되어진다.

그런데 *cdc25c*는 난소 중 somatic cell에서 높게 발현하였으며, 원시난포나 일차난포의 난자에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 5).

IV. 고 찰

난자의 발달과정 동안에 포유동물의 원시난포안에 존재하는 난자는 제1 감수분열 전기의 겹세포기에 멈추어 있다가 사춘기가 지나면서 발달과 성숙이 일어나게 된다.

생쥐에서 성숙한 난자에서 감수분열능(meiotic competence)은 MPF의 구성 요인인, cyclin B1과 *cdc2* 단백질 kinase의 활성화 및 축적, 그리고 합성이 번역(translation) 또는 후기번역(posttranslation)시기를 통해 얻어지는 것으로 보고하고 있다(Chesnel과 Eppig, 1995; de Vantery 등, 1997). 또한 MPF는 *cdc25C*에 의해 촉진되고, *wee1*에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다(Millar와 Russell, 1992; Mueller 등, 1995).

본 연구에서와 같이 *wee1* kinase는 난자의 세포질에서 발현하고 있었으며 그 외에 *cdc2*, cyclin B1도 난자의 세포질 내에 발현을 하는 것을 볼 때 MPF 활성화도에 관여하여 조절할 것으로 사료된다. 그러나 *cdc25c*는 전혀 난자 내에서 발현하지 않은 것을 볼 수 있었다. 그래서 난자의 감수분열의 세포주기(meiotic cell cycle)에 정지(arrest)되어있는 이유는 *wee1*의 기능이나 세포주기 조절 인자들의 요인들에 의한 것으로 추측된다. 따라서 본 연구는 *cdc2-p*의 단백질 위치와 발현양을 확인하여 *wee1*의 기능

을 확인시켜 줬으며 포유동물의 초기 난소에서 *wee1*과 그와 관련된 세포주기 조절인자를 확인한 처음의 보고이다.

생후 10~12일 경과된 마우스 난소로부터 무능력(incompetent)한 난자와 28일 이상 경과된 난자에서 *cdc2*, cyclin B1, *cdc25c*, *wee1*의 발현양과 발현 위치를 비교하여 보고한 결과가 있다(Mitra와 Schultz, 1996; Kanatsu-Shinohara 등, 2000). 감수분열단계에서 불능(incompetent)과 전능(competent)한 난자 모두 *wee1*의 발현이 감소하고 *cdc25c*의 발현은 증가한 것으로 나타났다.

그러나 본 연구에서는 원시 난포 뿐만 아니라 성장한 난포안의 난자에서는 *cdc25C* 발현을 관찰할 수 없었으며, *cdc25C*의 transcript와 단백질의 발현은 매우 낮게 발현 하는 것을 알 수 있었다. 이전의 연구자들은 면역형광(immunofluorescence) 염색과 웨스턴 블롯 분석을 통해 *cdc25C*는 성장한 난포의 과립세포 안에서 높게 발현하였고 난포 밖의 somatic cell은 발현하지 않는 것으로 보고하였다(Mitra와Schultz, 1996; Kanatsu-Shinohara 등, 2000). 이 같이 다른 결과를 보이는 것은 가능한 일이라고 생각된다. 왜냐하면 10~12일경에 난자에서 *cdc25c* 단백질이 점차적으로 유도되거나, 난포가 존재하는 환경에서는 난자는 *cdc25c* 단백질이 발현하지 않을 것으로 생각된다.

이 같은 두 연구의 차이를 설명하기 위해서는 앞으로 이 분야의 연구가 더욱더 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 일차 난포에서 *cdc2*, cyclin B1, *wee1*이 세포질에 존재하는 것은 난포 환경에서 일차 난포의 난자내에 존재하는 MPF의 활성화를 억제하기 위한 조절 기전(mechanism)이 있을 것으로 보인다. MPF를 조절하는 데

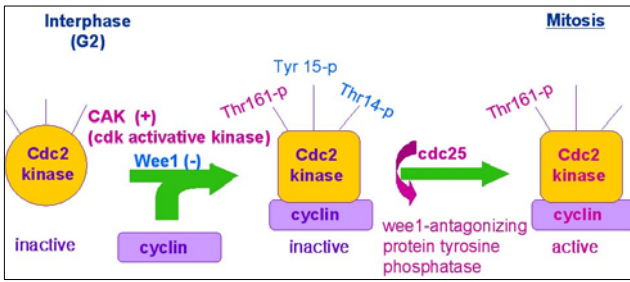


Fig. 6. Function of cdc2, cyclin B1, wee1, cdc25c, cdc2-p (Tyr15) in mitotic cell cycle

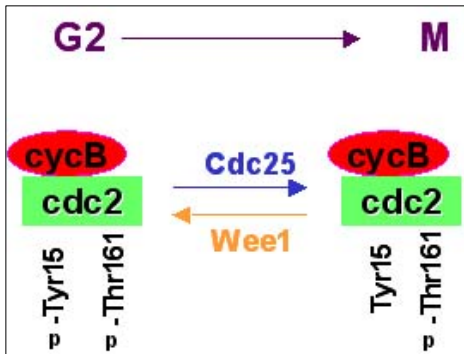


Fig. 7. Wee1 function in the mitotic cell cycle (G2-M phase).

에는 cyclin과 cyclin-dependent kinase(cdk) 복합체는 subcellular에 존재하면서 핵과 세포질 사이에 격리시켜 주는 역할을 하며 이때에는 전사(transcription), 번역(translation), 인산화(phosphorylation)/탈인산화(dephosphorylation), 억제제(inhibitors)들이 관여하는 것으로 보고하고 있다(Wolgemuth 등, 2002).

예를 들면 cyclin A2는 배양된 세포들의 핵에서만 발현하지만, cyclin B1은 세포주기에서 전기(prophase)로 가면서 핵에서 전위(translocation)가 일어나 세포질에 축적되는 일들이다(Pines와 Hunter, 1991). 핵 내에 축적되는 cdk1-cyclin B의 복합체는 mitosis를 위해서는 필요한 요소로 보이고, Hunt(1991) 또는 Yang과 Kornbluth(1999)는 cyclin은 mitosis를 진행하기 위해 subcellular에 위치하는 방향자 역할을 하며 그와 함께 cyclin dependent kinase가 보조역할을 하여 원활한 세포주기를 조절하는 것으로 보고하였다.

감수분열능을 지닌 난자에서 wee1이 핵 안에서 높은 농도로 존재하는 것으로 보고하였는데(Mitra와 Schultz, 1996), 본 연구에서는 정지된 무능력한 난자의 세포질에서 높게 발현하는 것으로 관찰되었다. 그래서 Fig. 6과 같은 세포주기 조절인자에 대한 모델을 설명할 수 있을 것이다. 또한 G2-M시기에 관여하는 조절자들은 Fig. 7과

같은 기전의 도식화를 보여 줄 수 있다. 여러 연구자들도 원활한 난포발달과정을 진행하기 위해 꼭 필요한 난자의 요인을 찾아내는 Loss-of-function에 대한 연구를 앞으로 더 진행해야 할 것이라 한다(Dong 등, 1996; Erickson과 Shimasaki, 2000; Matzuk, 2000).

참 고 문 헌

1. Albertini DF, Carabatsos MJ. Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *J Mol Med* 76:795-799, 1998
2. Barral Y, Parra M, Bidlingmaier S, Snyder M. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* 13:176-187, 1999
3. Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells. *Mol Cell Endocrinol* 187: 11-18, 2002
4. Chesnel F, Eppig JJ. Induction of precocious germinal vesicle breakdown (GVB) by GVB-incompetent mouse oocytes: possible role of mitogen-activated protein kinases rather than p34cdc2 kinase. *Biol Reprod* 52:895-902, 1995
5. Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell-cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 113:789-795, 1991
6. de Vantery C, Stutz A, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and post-translational levels. *Dev Biol* 187:43-54, 1997
7. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth Differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:521-535, 1996
8. Eppig JJ, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggreated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. *Biol Reprod* 63:1014-1023, 2000
9. Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 11:193-198,

2000

10. Fortune JE, Cushman RA, Kito WS. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163:53-60, 2000
11. Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 126:242-252, 1988
12. Hirshfield AN. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol Reprod* 44(6):1157-62, 1991
13. Hunt T. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 2:213-222, 1991
14. Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol Reprod* 63:1610-1616, 2000
15. Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 192:37-43, 2002
16. Kol S, Adashi EY. Intraovarian factors regulating ovarian function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 7(3):209-13, 1995
17. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Rev* 21:200-214, 2000
18. Matzuk MM. Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 163:61-66, 2000
19. Mitra J, Schultz RM. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J Cell Sci* 109:2407-2415, 1996
20. Millar JB, Russell P. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 68:407-410, 1992
21. Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG. Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* 6:119-134, 1995
22. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 188:65-73, 2002
23. Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 214:19-25, 2004
24. Nurse P. Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer* 33:1002-1004, 1997
25. Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 140:4262-71, 1999
26. Pines J, Hunter T. Human cyclin A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115:11-17, 1991
27. Richards JS. Perspective: the ovarian follicle-A perspective in 2001. *Endocrinology* 142:2184-2193, 2001
28. Wolgemuth DJ, Laurion E, Lele KM. Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line. *Recent Prog Horm Res* 57:75-101, 2002
29. Yang J, Kornbluth S. All aboard the cyclin train: Subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol* 9:207-210, 1999