

서라벌대학 임상병리과<sup>1</sup>, 분당제생병원<sup>2</sup>, 동남보건대학 임상병리과<sup>3</sup>

박창은<sup>1</sup> · 김대중<sup>2</sup> · 홍성노<sup>3</sup>

## Expression of mRNAs and Proteins of Cyclin A and LATS Genes in Ovary

Chang-Eun Park<sup>1</sup>, Dae-Jung Kim<sup>2</sup>, and Sung-No Hong<sup>3</sup>

*Department of Clinical Laboratory Science, Sorabol College, Gyeongju 780-711, Korea<sup>1</sup>*

*Department of Laboratory medicine, Dae-Jin Medical Center, Seongnam 463-774, Korea<sup>1</sup>*

*Department of Clinical Laboratory Science, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea<sup>3</sup>*

Despite of the importance of the primordial follicle (PMF) recruitment, factors and mechanisms for process are poorly understood. To evaluate expression and role of the follicular transition from PMF to PMF/primary follicles (PMIF) in the present study, we evaluated expression of *lats1*, *lats2*, *cyclin A1*, and *cyclin A2* mRNA and protein, and elucidated and role of *lats1-cyclin A* in the follicular transition from PMF to PRIF. To analysis of differential expression in PMF and PMIF, each stage follicles were collected by day1 and day5 of immuno-compromised rats (ICR) and analyzed by real-time PCR for the genes. For localization of mRNAs and proteins of the genes, in situ hybridization and immunohistochemistry were performed. We confirmed that the *lats1*, *lats2*, *cyclin A1*, and *cyclin A2* mRNA were more expressed in PMF than PMIF. Localization of the four genes expression were observed in nuclei of oocytes from the arrested primordial, and in the surrounding granulosa cells of the growing follicles. The mRNA expressions were gradually decreased with follicular development. From immunohistochemistry studies, Cyclin A1 protein expression were observed in oocyte cytoplasm of early stage follicles, while observed in granulosa cells and oocyte nucleoli during growing follicles. This study suggested that the presence of *lats* gene family might perform negatively regulation of cell proliferation by modulation of the CDC2/Cyclin A complex activity. *lats-cyclin A* genes in oocytes of the early stage follicles might play a role in the meiotic cell cycle arrest of the primary oocytes at the primordial follicle stage as well as the follicular growth.

**Key Words** : Ovary/oocyte, Folliculogenesis, Meiotic promoting factor, Immunohistochemistry

### I. 서 론

난소안의 난포발달과정(folliculogenesis)은 난소 내외의

여러 가지 인자에 의해 복잡한 과정으로 조절된다. 지금까지 난포발달 과정에 대한 연구에서 후기 난포발달 과정, 즉 강소 형성 난포(antral follicle)의 발달과 분화에 대한 연구는 많은 반면에 초기의 난포발달 과정에 대한 연구는 상대적으로 미약하다(Eppig와 Wigglesworth, 2000). 모든 포유류는 일정한 숫자의 원시난포(primordial follicle, PMF)를 가지고 태어나는데 대부분이 성장을 멈

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

Tel : 031-256-5661

E-mail : snhong@dongnam.ac.kr

춘 상태로 존재한다. 사춘기를 지나면서부터 발달을 멈추던 원시난포들 중 일부분 만이 선택적으로 1차 난포(primary follicle, PMIF)로 자라기 시작한다(Braw-Tal, 2002). 이와 같이 원시난포에서 1차 난포로 성장이 다시 시작되는 기전, 즉 원시난포의 성장이 멈추어 있다가 활성화되는 기전에 대해서는 아직까지 완전히 밝혀져 있지 않았다.

난포의 성장은 난자(oocyte)와 난자 주위를 둘러싸고 있는 과립세포(granulosa cell)와 협막 세포(theca cell)에 의해 좌우되는데, 처음 성장이 정지된 상태인 원시난포의 경우는 몇 개의 편평한 과립세포(flattened granulosa cells)가 난자를 둘러싸고 있으며 난포의 성장이 시작되면 과립세포는 입방형(cuboidal granulosa cells)으로 변화해 난자의 성장이 시작된다(Hirshfield, 1991).

난포발달 후기에는 성선자극 호르몬(gonadotrophin releasing hormone)에 영향을 받는 반면 난포의 초기 발달 과정, 특히 원시난포 성장의 개시는 성선자극 호르몬에 의존하지 않고 난소 내의 성장인자와 같은 국소 조절인자(paracrine factor)에 영향을 받는 것으로 추측되고 있으나 그 기전은 알려져 있지 않았다.

성장이 억제되어 있는 원시 난포의 성장에 관여할 것으로 알려진 대표적인 인자로는 growth differentiation factor-9(Dong 등, 1996), 그리고 insulin(Kezele 등, 2002) 등이 있으나 원시 난포가 어떻게 성장이 억제되어 있는지 또 어떻게 성장이 활성화되는지에 관한 자세한 기전은 아직까지 확실치 않다. 원시난포가 활성화되어 성장하기 시작하는 기전을 연구하는 것은 난소의 생식능력이 시작되는 시기를 조절하거나 혹은 폐경이 시작되는 시기를 뒤로 미룰 수 있는 등, 궁극적으로 여러 가지 난소의 생식기능 조절이 인위적으로 가능하게 될 것이다. 한편 무배란 혹은 조기 폐경 등 난포의 발달과 관련된 여성의 난소 질환에 대한 기전 연구 및 그 치료에도 많은 도움을 줄 것으로 사료된다.

위와 같은 질환들과 연관시켜 난포발달 초기 과정에 관여할 것으로 생각되어지는 세포주기와 관련된 유전자들의 발현양상을 알아보고자 하였다. 이러한 활성화를 조절하는 조절자로는 large tumor suppression(LATS)와 관련된 유전자인, *lats1*, *lats2*, *cyclin A1*, *cyclin A2*가 해당될 것으로 사료되어 본 연구자들은 세포주기와 관련된 조절

인자들을 난포의 성장과 관련하여 분자생물학적인 수준에서 규명하고자 하였다. 따라서 본 연구는 마우스의 초기 난소 성장에서 세포주기 조절인자들인, LATS 관련 유전자들의 전사체와 단백질의 발현양상을 real-time PCR, in situ hybridization, 면역조직화학염색법을 통해 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 마우스 난소 적출 및 RNA 분리

생후 1일자 및 5일자의 ICR 생쥐로부터 난소를 적출하여 해부현미경 하에서 난소 주변의 포낭을 제거하고 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)에 3번 세척을 하였다. 사용 전까지 액화질소에 급속 냉각시키거나 혹은 곧바로 RNA 추출에 사용하였다. 각 시기의 난소는 Trizol(Gibco BRL, Grand Island, NY)을 이용해 조직을 균질화 시킨 후 chloroform과 함께 심하게 진탕 혼합하였다. 그리고 4°C에서 13,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, 상청액을 새로운 튜브에 담았다.

상청액과 함께 isopropanol을 이용해 추출한 후 ethanol 침전을 통해 pellet을 얻었다. 이 pellet을 DEPC(diethyl pyrocarbonate)-treated water에 녹인 후 최종 정제된 total RNA를 얻었다. 이때 genomic DNA를 제거하기 위해 DNase I (Gibco BRL)을 37°C에서 15분 처리하고 RNA의 변성 정도를 확인하기 위해 1~2 µL를 전기 영동하여 확인하였으며, 또한 RNA의 양은 OD값을 측정하여 정량하고 곧 바로 역전사 반응을 진행하였다. 혹은 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

### 2. Real-time PCR 분석

생후 발달단계별 난소의 난포로부터 real-time PCR을 이용하여 *lats1*, *lats2*, *cyclin A1*, 그리고 *cyclin A2*의 mRNA 발현의 차이를 확인하였다. Real-time PCR은 My<sup>iq</sup> single color real-time PCR detection system(BioRad, Hercules, CA)을 사용하여 수행하였다. 조직으로부터 얻은 cDNA 1 µL에 각 유전자의 primer(각 20 pmol/µL,

**Table 1.** Primer sequences and real-time PCR conditions

Genes	Gene Bank Accession No.	Primer sequences	Annealing Temp (°C)	Product Size (bp)	Location
<i>lats1</i>	AF_104414	5'-AGTGGTGACTCTGGGGATAA-3' 3'-CCCATTCGTTACTGAAATCC-5'	58	514	1291-2134
<i>lats2</i>	NM_015771	5'-GAGTTACTCCCCTTATGCCT-3' 3'-ACTTGGAATTGTGAGTCCAC-5'	58	686	1792-2477
<i>cyclin A1</i>	X84311	5'-CTGTAGTTCTTCCCCTGCA-3' 3'-GCAAACAGCAAGTTGTTTATT-5'	58	205	1355-1560
<i>cyclin A2</i>	Z26580	5'-GAGGTGGGAGAAGAATATAA-3' 3'-ACTAGGTGCTCCATTCTCAG-5'	58	216	758-974
<i>G3PDH</i>	38091316	5'-TCCACCACCCGTGTGCTGTA-3' 3'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-5'	58	451	451-902

Table 1) 각 1  $\mu$ L, 2 $\times$  iQ SYBR green supermix 10  $\mu$ L, 그리고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응용액을 20  $\mu$ L로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분을 수행한 뒤, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초 40번 반복하고 95°C에서 1분을 수행한 뒤, PCR 생성물의 melting curve를 분석하고자 55°C부터 95°C까지 0.5°C씩 10초간 온도를 높여가면서 형광발현을 관찰 분석하였다. 사용한 시료간의 유전자 발현 증폭에 관한 정량분석은 Hettinger 등(2001)이 사용한 계산법을 참고하여 semi-log amplification plot의 기하학적 증폭 범위 내에서 검출된 형광을 바탕으로 하여 형광이 두드러지게 증가하는 시점의 cycle 수인 threshold cycle( $C_T$ )로 분석하였다. 상대적인 유전자 발현의 차이는 G3PDH 유전자의 발현으로 정량화한 후 다시 대조군과 비교하여 분석하였다. 결과는 mean $\pm$ SEM으로 나타내었고 실험은 3번 반복 수행하였다. 세포 주기와 관련된 유전자들의 PCR 조건과 primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

### 3. In situ hybridization

생쥐 난소 조직은 조직학적 관찰에서와 같은 동일한 과정으로 파라핀 블록을 제작하였으며, 파라핀 침투조직은 5  $\mu$ m 두께의 연속절편을 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 부착하여 사용 전까지 4°C에서 보관하였다. RNA 오염을 줄이기 위해 장갑 착용 및 DEPC-treated water를 사용하였다. RNA probe는 in vitro

transcription kit(Promega, Madison, WI)을 이용하여 제작하였다. 합성된 RNA probe의 생성 효율을 확인하기 위하여 반응물 1  $\mu$ L를 1% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였다. Probe 반응물을 G-50 Columns(Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ)으로 정제한 후 농도가 100  $\mu$ g/mL이 되도록 hybridization buffer(50% formamide, 5 $\times$  SSC, 1  $\mu$ g/mL Torula yeast RNA, 100  $\mu$ g/mL heparin, 1 $\times$  Denhardt's solution, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 0.5 mM EDTA)로 희석하였다. 파라핀 절편 슬라이드를 xylene에 처리하여 파라핀을 제거하고, 알코올 처리과정과 DPBS 용액에 세척한 후, 4% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 10분간 재고정 하였다. 그리고 0.1 M triethanolamine(TEA) 용액으로 5분간 반응시키고, 0.25% acetic acid가 포함된 0.1 M TEA 용액으로 실온에서 10분간 처리하였다. 알코올 처리 과정을 거쳐 탈수시킨 후 hybridization buffer에 RNA probe를 희석하여 조직 위에 처리하였다. RNA probe를 처리한 후 조직이 마르지 않도록 파라 필름을 덮어서 65°C humid chamber에서 하루 동안 반응시켰다. 이후 65°C로 예열된 2 $\times$  SSC-50% formamide 용액으로 30분간 처리한 후 blocking reagent (20% sheep serum, 2% BMB; Boehringer Mannheim Blocking buffer)가 들어있는 MAB(100 mM maleic acid in 150 mM NaCl, pH 7.5) 용액으로 실온에서 1시간 반응시켰다. 여분의 용액을 제거하고 anti-DIG alkaline phosphatase-conjugated Fab antibody fragments(anti-DIG-AP, Roche, Indianapolis, IN, 1:1000)를 blocking reagent

**Table 2.** Antibodies used for immunohistochemistry

Proteins	Dilution	Antibody name	Source
Cyclin A1	1:200	cyclin A1 (H-432), sc-751	Santa Cruz Biotechnology, Inc
LATS1	1:200	lats1 (G-16), sc-12494	Santa Cruz Biotechnology, Inc

가 포함된 MAB 용액으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. MAB 용액으로 10분씩 4회 수세하고 BCIP-NBT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)로 실온에서 1시간 발색시켰다. 발색 후 PBS로 수세하고, Nuclear Fast Red로 대조염색 후 수용성 봉입제(DAKO, Carpinteria, CA)로 봉입하였다.

4. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

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

조직절편은 탈파라핀 과정을 거친 후, 조직 내에서 endogenous peroxidase activity를 없애기 위해 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가된 methanol에 20분간 처리하였다. 그리고 비특이적인 단백질의 발현을 줄이기 위해 blocking buffer(DAKO, Carpinteria, CA)에 실온에서 15분간 처리하였다. Table 2에 나타난 세포주기에 관련된 단백질의 1차 항체 반응을 4°C에서 overnight 동안 진행하였다.

그 후 조직 슬라이드를 0.05% TBS-T(Tris buffered saline-Tween20)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. 매 번 실험을 수행할 때 음성대조군으로는 1차 항체만을 처리하지 않고 모든 실험과정을 동일하게 진행하였다.

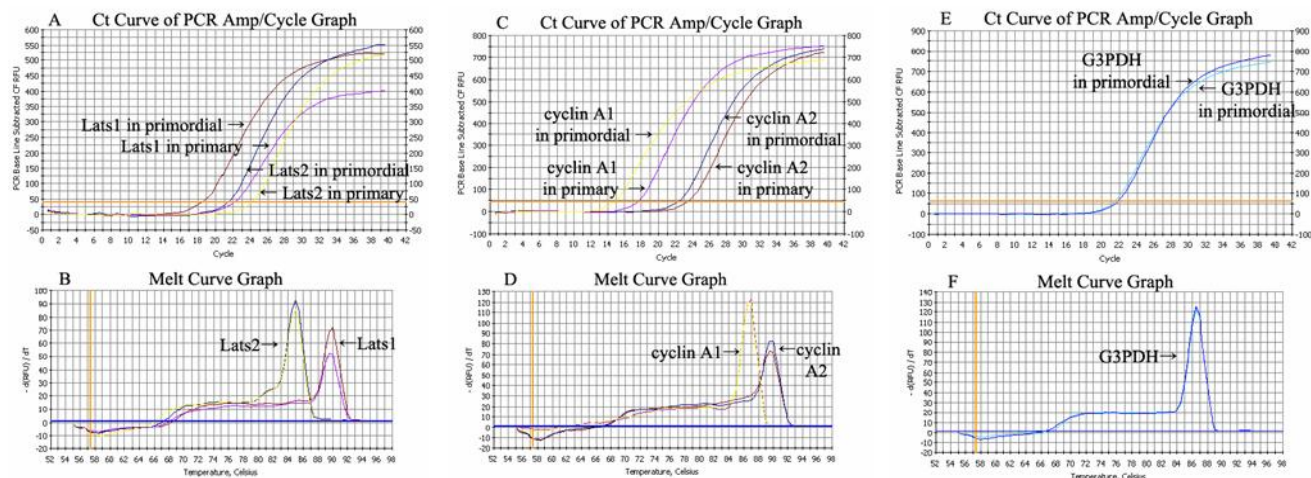
5. 통계분석

결과의 통계분석은 one-way ANOVA방식을 이용하였으며 p값이 0.05이하일 때 통계적인 유의차가 있는 것으로 분석하였다.

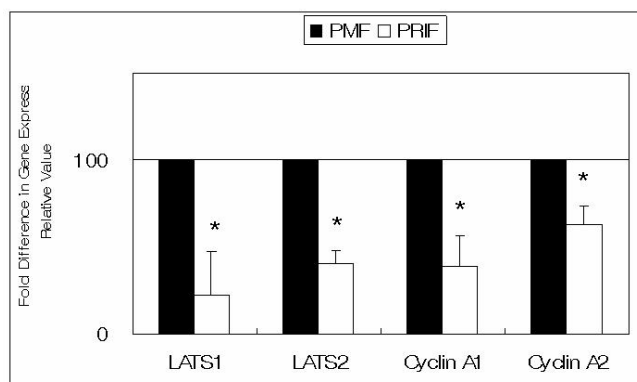
III. 결 과

시기별 전사체(mRNA)의 발현 양상을 관찰하기 위해 생후 1일자와 5일자의 난소를 적출한 후, RNA를 추출하고 역전사 반응을 통해 complementary DNA(cDNA)를 합성한 후 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 수행하였다. Primer의 제작은 미국 NIH의 NCBI Database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank))에서 해당하는 각 유전자를 선택하고, Primer3 Input (primer3 cgi v0.2) program (<http://frodo.wi.mit.edu/>)을 이용해 Table 1의 염기서열을 얻었다.

Real-time PCR의 Ct curve 및 melting curve 분석은 Fig. 1에, 각 유전자의 발현량을 G3PDH 유전자의 발현량을 기준으로 환산하여 생후 1일자 난소 대비해 계산된 fold change 값은 Fig. 2에 나타내었다. 각 유전자에 대한 PCR 반응은 melting curve 분석으로부터 특이적으로 이루어졌으며(Fig. 1B, 1D, 1F), Ct curve 분석(Fig. 1A, 1C)과 G3PDH 유전자를 기준한 발현량 분석(Fig. 2)에서 *lats1*, *lats2*, *cyclin A1*, *cyclin A2* 유전자 모두, 1차 난포보다 원시난포에서 발현량이 높았다. 반면에 대조 유전자로 사용한 G3PDH 유전자에서는 두 난포간의 차이가 없었다(Fig. 1E). 이것은 이 유전자들이 세포성장을 개시하거나 성장을 유도하는데 관여한다는 것을 의미한다고 판단되었다.



**Fig. 1.** Real-time PCR analysis to confirm the differential expression with gene specific primers. A, C, E: Ct curve graph; B, D, F; Melt curve; A, B: *lats1*, *lats2*; C, D: *cyclin A1*, *cyclin A2*; E, F: *G3PDH*.



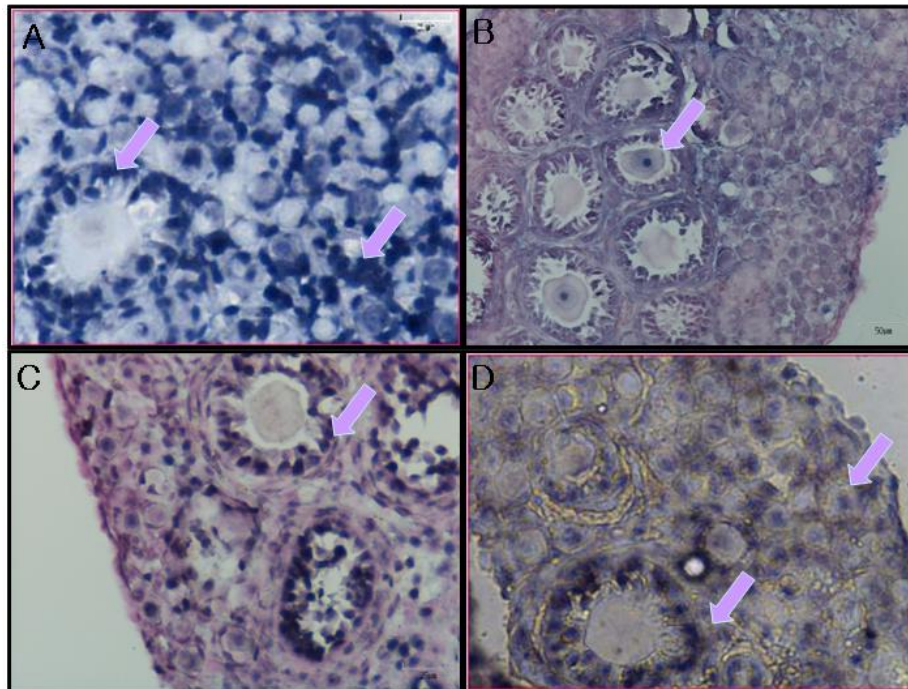
**Fig. 2.** Differential expression of 4 genes related to lats between day 1 ovary (primordial follicle, black bars) and day 5 ovary (primary follicle, white bars) follicles. Expression amount was calculated from CT values and the fold difference of relative abundance of mRNA was calculated against that of day 1 ovary (primordial follicles). Experiments were repeated at least three times and data were expressed as mean SEM. Asterisks represent statistical significance at  $p < 0.05$ .

Fig. 3과 Fig 4는 각 시기의 ICR 생쥐 난소에서 *lats1*, *lats2*, *cyclin A1*, *cyclin A2* 유전자에 대한 전사체가 발달 단계별 난포의 어느 위치에서 발현하는지를 확인하기 위해 in situ hybridization을 통해 확인한 결과이다. 그림에서와 같이 *lats1*과 *cyclin A2*는 원시난포의 난자 핵에서 발현하지만 *lats2*와 *cyclin A1* 유전자는 1차 난포 및 성장난포의 난자 핵에서 발현하는 것이 관찰되었다. 또한 주

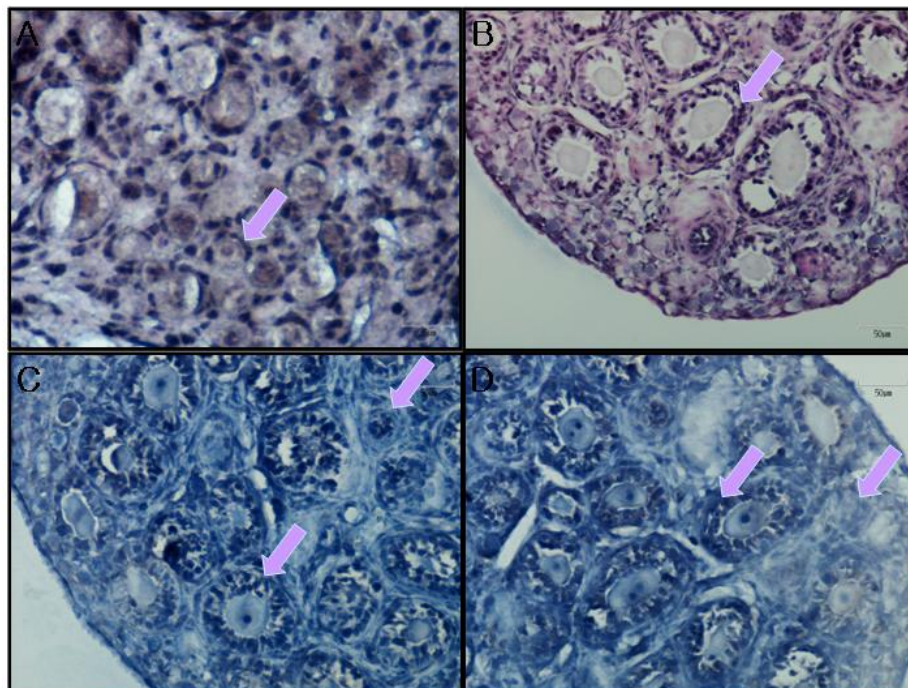
변의 과립세포에서는 대부분 세포질에서 발현하는 것으로 관찰 되었다.

한편 Fig 3에서 보면 *cyclin A1*과 *cyclin A2*가 원시난포에서 다른 양상을 관찰할 수 있었는데 *cyclin A1*은 세포질에 발현하고 *cyclin A2*는 핵에서 발현하는 차이를 관찰할 수 있었다. 성장난포의 경우는 *cyclin A1*이 핵에서 발현을 하였으나 *cyclin A2*는 발현하지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 *cyclin A1*은 후기 난포형성을 위해 핵에서 전사체가 존재하며, *cyclin A2*는 초기 원시 난포의 핵에 존재하면서 개시를 조절하는 것으로 사료된다. 과립세포에서는 원시난포 및 1차 난포, 성장난포의 세포질에서 모두 발현하는 것을 관찰할 수 있었다.

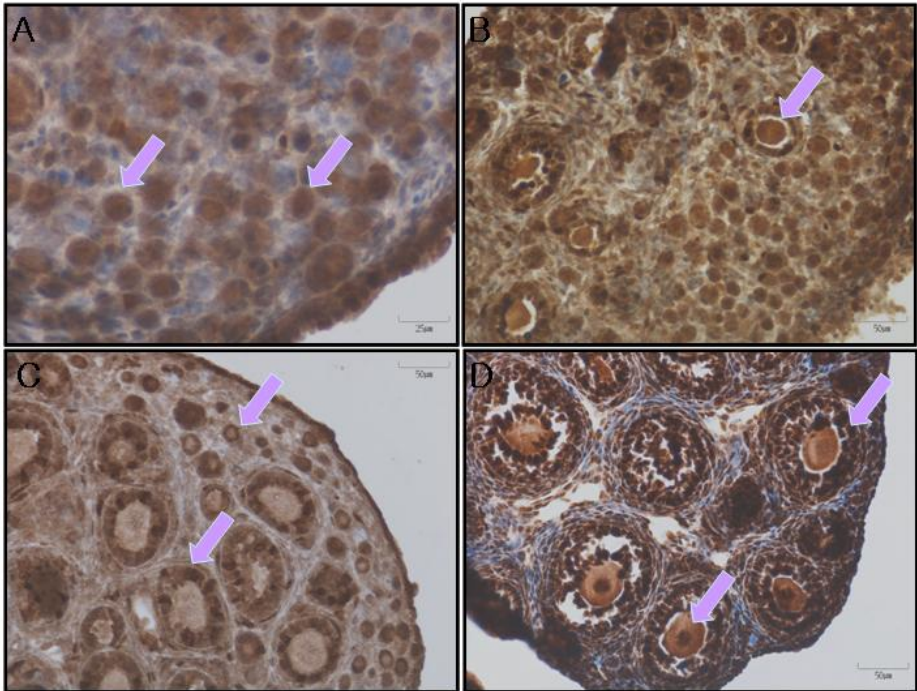
Fig 4에서 보면 *lats1* 전사체는 원시난포와 1차 난포의 난자 핵에서 발현하고 *lats2* 전사체는 원시난포의 난자 세포질과 성장난포의 난자의 핵에서 발현하는 것을 관찰하였다 그러나 과립세포에서는 *lats1* 유전자가 모든 시기의 난포에서 발현하고 *lats2*는 성장하는 난포의 세포질에서 발현하는 확인할 수 있었다. 이 또한 *lats1*은 원시 난포에서 난자 핵에서 발현하여 성장 개시에 관여하는 것으로 사료되고 *lats2*는 성장하는 난포의 핵과 세포질에서 높게 발현하는 것으로 보아 성장에 관여하는 것으로 사료된다.



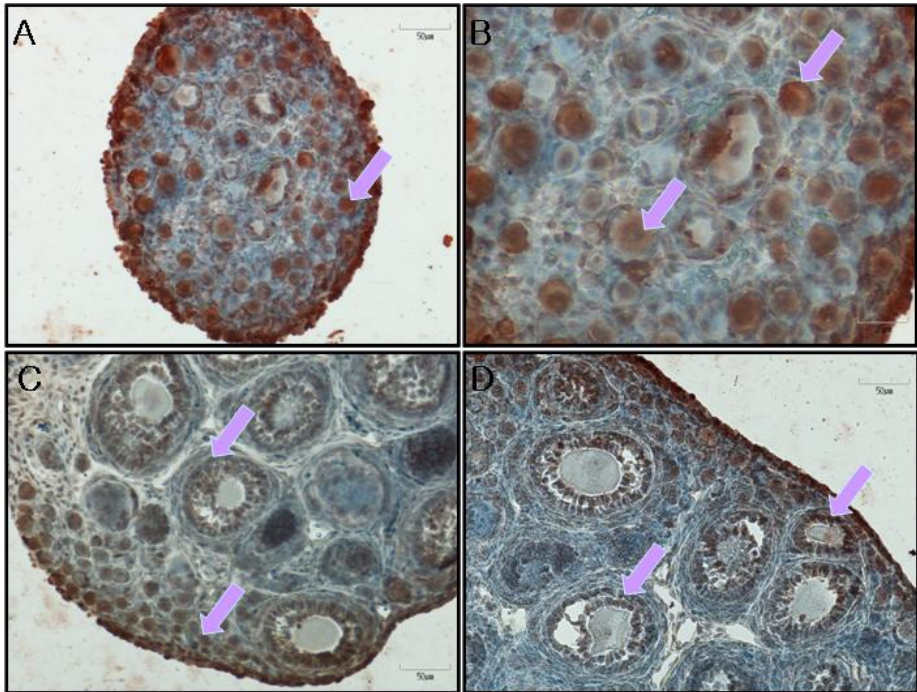
**Fig. 3.** Localization of *cyclin A1* (upper), *cyclin A2* (lower) mRNA in the mouse ovary. Expression of *cyclin A1* transcript in day 5 (A) and day 14 (B). Expression of *cyclin A2* transcript in day 5 (C) and day 14 (D). *Cyclin A1* expressed nucleus in growing follicle with oocyte. *Cyclin A2* expressed nucleus in primordial follicle with oocyte. ( $\times 400$ )



**Fig. 4.** Localization of *lats1* (upper), *lats2* (lower) mRNA in the mouse ovary. Expression of *lats1* transcript in day 5 (A) and day 14 (B). Expression of *lats2* transcript in day 14 (C, D). *lats1* expressed nucleus in primordial follicle with oocyte. *lats2* expressed nucleus in growing follicle with oocyte. ( $\times 400$ )



**Fig. 5.** Expression of Cyclin A1 protein in the day 1 (A), day 7 (B), day 14 (C) and day 21 (D) mouse ovary. Cyclin A1 expressed nucleus in growing follicle with oocyte. Also, expressed cytoplasm in primordial follicle with oocyte. ( $\times 400$ )



**Fig. 6.** Expression of LATS1 protein in the day 1 (A), day 7 (B), day 14 (C) and day 21 (D) mouse ovary. LATS1 expressed nucleus in primordial follicle with oocyte. Also, expressed cytoplasm in growing follicle with granulosa cells. ( $\times 100$ )

#### IV. 고찰

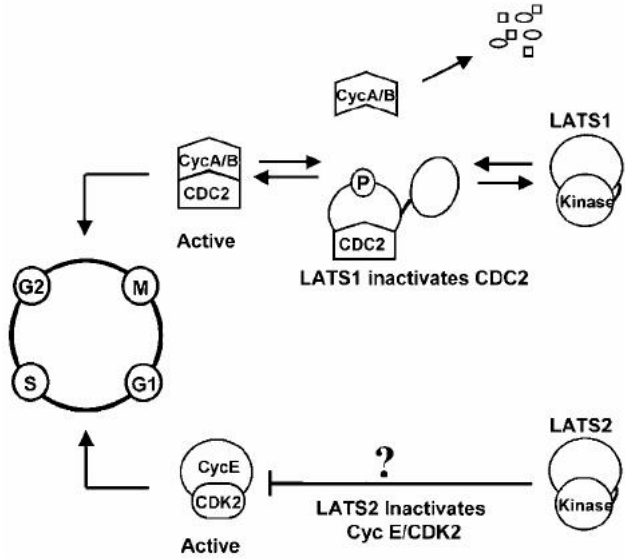


Fig. 7. Lats function in the mitotic cell cycle(G2-M phase). (Li 등, 2003).

각 유전자들의 발현 조절을 anti-Cyclin A1과 anti-LAST1(Table 2)을 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하여 각 단백질들의 발현 위치를 확인 하였다(Fig. 5, 6). Cyclin A2와 LAST2의 발현 위치에 대한 연구는 해당되는 항체 확보가 어려워 수행되지 못하였다.

Fig. 5는 다양한 시기의 난소를 채취하여 다양한 난포의 발달 단계에서 Cyclin A1의 단백질 발현을 관찰한 결과이다. 전사체의 발현위치와 같이 원시난포에서는 난자의 세포질에 발현하며, 일차난포 및 성장 난포에서는 난자의 핵에서 높게 발현하였다. 한편 성장난포의 과립세포 세포질에서도 발현하는 것을 관찰하였다. 따라서 전사체의 발현 위치와 동일한 장소에서 단백질도 발현하는 것을 확인하였으며 성숙난포의 성장에 주로 관여하는 것으로 사료된다.

Fig 6에서 보면, LATS1의 발현 양상은 원시난포와 일차난포의 난자 핵에서 발현하며 성장난포의 난자 핵에서는 발현하지 않았다. 한편 과립세포에서는 성장난포의 세포질에서만 발현하는 것으로 관찰되었다. 이는 전사체의 발현위치와 동일하다.

본 연구는 대부분이 원시난포로 구성되어 있는 생후 1일된 생쥐의 난소와 주로 원시난포와 1차 난포로 구성되어 있는 생후 5일된 생쥐의 난소를 사용하여 mRNA 수준에서 real-time PCR 방법으로 각각의 난소에서 발현하는 *lats1*, *lats2*, *cyclin A1*, *cyclin A2* 유전자들의 양상을 확인하고, 전사체나 단백질의 위치를 in situ hybridization, 면역조직화학염색법을 통해 발달 난포별 발현양상을 관찰한 것이다.

포유동물의 경우, 원시난포의 개시로부터 난자의 크기가 커지게 되고 제1 감수분열의 겹섬유기(diplotene)에 정지되어있다. 이렇게 멈춰진 난자의 성숙은 감수분열 촉진인자(MPF; meiosis promoting factor)의 활성화에 의해 진행된다. 이러한 활성화는 중기 I 시기에 최고조를 이루다가 점차 감소하게 된다. 그런 후 중기 II에서 한 번 더 최고조를 이룬다고 알려져 있다(Hashimoto와 Kishimoto, 1988; Choi 등, 1991). MPF는 CDC2와 Cyclin B1이 이중이합체(heterodimer)를 이룬다고 보고된바 있다(Hunt, 1991; Nurse, 1997; Albertini와 Carabatsos, 1998)

성숙한 난자에서 감수분열 능력은 MPF의 구성 요인인, Cyclin B1과 CDC2 단백질 kinase의 활성화 및 축적, 그리고 합성이 번역 또는 번역 후 시기를 통해 얻어지는 것으로 보고하고 있다(Chesnel과 Eppig, 1995; de Vantery 등, 1997). 또한 MPF는 CDC25C에 의해 촉진되고, Wee1에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다(Millar와 Russell, 1992; Mueller 등, 1995).

본 연구에서와 같이 원시난포에서 *lats1*과 *cyclin A2*는 난자의 핵에서 발현하고 있었으며 그 외에 *lats2*와 *cyclin A1*도 난자의 세포질 내에 발현을 하는 것을 볼 때 상호간에 협조적으로 MPF 활성화도에 관여하여 조절할 것으로 사료된다. 그러나 후기난포 발달에서는 *lats2*와 *cyclin A1*는 난자 내에서 발현하지 않은 것을 볼 수 있었다. 그래서 난자의 감수분열의 meiotic cell cycle에 정지되어 있는 세포주기 조절 인자들의 요인들에 의한 것으로 추측된다. 따라서 Li 등(2003)이 보고한 체세포 분열의 경우에서 LATS 관련 세포주기 조절 인자들이 서로 다른 시기에서 발현하는 결과로 보아 포유동물의 감수분열에서 일어나는 난소에서 관련된 세포주기 조절인자가 발현하는 것으로 보아 감수 분열하는 세포에서도



동일한 결과를 보이는 것으로 사료된다. 이 유전자 역시 초기 난포의 성장 개시를 담당하는 것으로 사료된다. 이렇게 세포주기에 관련된 단백질들이 발현하는 것으로 보아 난자의 성숙과 정지에 관여하는 것으로 생각되어진다.

또한 일차 난포에서 CDC2, Cyclin B1, Wee1이 세포질에 존재하는 것은 난포 환경에서 일차 난포의 난자 내에 존재하는 MPF의 활성화를 억제하기 위한 조절 기전이 있을 것으로 보인다. MPF를 조절하는 데에는 Cyclin과 cyclin-dependent kinase(CDK) 복합체는 subcellular에 존재하면서 핵과 세포질 사이에 격리시켜 주는 역할을 하며 이때에는 전사, 번역, 인산화/탈인산화, 억제제들이 관여하는 것으로 보고하고 있다(Wolgemuth 등, 2002).

Cyclin A2는 배양된 세포들의 핵에서만 발현하지만, Cyclin B1은 세포주기에서 전기(prophase)로 가면서 핵에서 전위(translocation)가 일어나 세포질에 축적이 된다(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 CDK가 보조 역할을 하여 원활한 세포주기를 조절하는 것으로 보고하였다.

감수분열을 하는 난자에서 LATS 관련 유전자들은 서로 다른 농도로 존재하여 발현을 조절할 것으로 생각되어지고, Fig. 7과 같은 세포주기 조절인자에 대한 모델을 설명할 수 있을 것이다. 또한 G2-M시기에 관여하는 조절인자들은 Fig. 7과 같은 기전의 도식화를 보여 줄 수 있을 것으로 사료된다. 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).

결론적으로 본 연구에서는 LATS와 Cyclin A의 MPF의 구성요인이 원시난포의 난자 세포질에 발현을 하고 있었으며, 생후 5일자에 비해 생후 1일자에서는 높게 발현하였다. 그리고 in situ hybridization과 면역조직화학염색법의 결과, 원시난포의 난자 핵에서는 *lats1*과 *cyclin A2*의 전사체와 단백질이 높게 나타났으며, *lats2*와 *cyclin A1*의 발현은 성장한 난포의 난자 핵에서 높게 나타났다. 이 같은 결과로 난자나 과립세포 안에서 다양한 세포주기와 관련된 구성요소들의 발현은 농도의 구배에 따라 시간적(temporal) 혹은 공간적

(spatial)으로 다르게 나타나며 이로 인해 난자 안에서 감수분열 세포주기를 조절하는 것으로 사료된다. 그리고 난포 혹은 난자의 성장과 개시는 과립세포의 체세포 분열의 활성화도(mitotic activity)를 증가시키며, 원시난포에서 난포가 정지되어 있는 것은 난포 내 난자의 감수분열의 정지(meiotic arrest)에 의해 이루어지는 것으로 사료된다.

## 감사의글

본 연구는 2007학년도 교육인적자원부 특성화 프로그램의 국고재정지원 연구비에 의하여 수행된 것임.

## 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. Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol* 187:11-18, 2002.
3. 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.
4. 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.
5. de Vantery C, Stutz A, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. *Dev Biol* 187:43-54, 1997.
6. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth Differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*

- 383:531-535, 1996.
7. Eppig JJ, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. *Biol Reprod* 63:1014-1023, 2000.
  8. Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 11:193-198, 2000.
  9. Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 126:242-252, 1988.
  10. Hettinger AM, Allen MR, Zhang BR, Goad DW, Malayer JR, Geisert RD. Presence of the acute phase protein, bikunin, in the endometrium of gilts during estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 65:507-513, 2001.
  11. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101, 1991.
  12. Hunt T. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 2:213-222, 1991.
  13. 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.
  14. Li Y, Pei J, Xia H, Ke H, Wang H, Tao W. Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition. *Oncogene* 22:4398-4405, 2003.
  15. Matzuk MM. Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 163:61-66, 2000.
  16. Millar JB, Russell P. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 68:407-410, 1992.
  17. Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG. Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* 6:119-134, 1995.
  18. Nurse P. Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer* 33:1002-1004, 1997.
  19. 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* 115:1-17, 1991.
  20. 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.
  21. Yang J, Kornbluth S. All aboard the cyclin train: Subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol* 9:207-210, 1999.