

돼지 난포 발달 시 과립막 세포에서 발현되는 단백질의 변화

채인순¹ · 장동민³ · 정희태² · 양부근¹ · 박춘근^{1,†}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의학부대학, ³차의과학대학 줄기세포연구소

Changing Proteins in Granulosa Cells during Follicular Development in Pig

In-Soon Chae¹, Dong-Min Jang³, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,†}

¹College of Animal Life Sciences, ²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³CHA Stem Cell Institute, CHA Hospital, Seoul 463-712, Korea

ABSTRACT

This study analyzed change of proteins in granulosa cells during the porcine follicular development by proteomics techniques. Granulosa cells of the follicles, of which the diameter is 2~4 mm and 6~10 mm, were collected from ovary of slaughtered pig that each follicle of diameter 1~4 mm and 6~10 mm. We extracted granulosa cell proteins by M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent. Proteins were refined by clean-up kit and quantified by Bradford method until total protein was 200 µl. Immobilized pH gradient(IPG) strip used 18 cm, 3~10 NL. SDS-PAGE used 10% acrylamide gel. After silver staining, Melanie 7 and naked eye test were used for spot analyzation. Increasing proteins in granulosa cell of 6~10 mm follicle were 7 spots. This spots were analyzed by MALDI-TOF MS and searched on NCBI. In results, 7 spots were similar to zinc/finger protein 3 precursor (RING finger protein 203), angiomin, heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin) isoform 1 (HSP60), similar to transducin-like enhancer protein 1 (TLE 1), SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A). Those proteins were related with transfer between cells. Increase of proteins has an effect on follicular development.

(Key words : Two-dimensional electrophoresis, MALDI-TOF, Granulosa cell, Protein profiling, Pig follicle)

서 론

포유동물 난소의 난포 내에서 난자의 성숙과 분화는 체세포성 난포세포와 발달 중인 생식세포 사이에 긴밀하게 관련되어 있다(Down, 1995). 난자와 과립막 세포 사이의 정보교환은 상호지향적이며, 난자와 난포의 기능과 발달을 위해 필수적이다(Eppig, 1997). 이전의 많은 연구들에서 난포 발달의 다양한 측면들이 난자의 존재에 의해 영향을 받는다는 것이 증명되었다(Vanderhyden, 1996; Erickson와 Shimasaki, 2001; Eppig 등, 2002; Matzuk 등, 2002). 난자 특이적인 성장인자인 BMP-15(bone morphogenetic protein-15)는 난포 생성 전기간에 걸쳐 랫(Otsuka 등, 2000), 마우스(Dube 등, 1998) 난자에서 발현되는 것으로 보고되고 있다. Otsuka 등(2000)은 BMK-15가 체외에서 FSH-독립성 과립막 세포 분화의 원인임을 보여 주었다. BMK-15는 또한 성장분화인자-9(GDF-9)과 밀접하게 관련이 있으며, 이러한 두 가지 인자들은 난소에 유사한 발현 패턴을 갖고 있다(Dube 등, 1998). 일반적으로

FSH 이외에 난포막 세포나 과립막 세포에 의해 분비된 인접분비인자들이 개별 난포의 발달을 조절할 수 있기는 하지만, 난자가 난포 발달의 조절에 지배적인 역할을 하는 것으로 생각된다(Hsueh 등, 2000). 이외에 줄기세포인자(SCF; stem cell factor)도 난포 발달에 다양한 역할을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다(Yoshida 등, 1997). SCF는 난포 보충과 일차 난포 발달의 초기 진행에 영향을 미치며(Parrott와 Skinner, 1998), SCF mRNA는 태아 및 성체 난소에서 난포성숙의 모든 단계에서 과립막 세포에 국한되어 나타나는 것으로 알려져 있다(Tisdall 등, 1999).

이와 같이 포유동물의 난포 생성은 체세포성 난포세포 또는 성숙중인 생식세포에 의해 분비되는 다양한 단백질 인자들에 의해 조절되고 있는 것으로 알려져 있지만, 수많은 연구에도 불구하고 난소 기능 조절에 관여하는 단백질과 수용체에 대한 상관관계는 완전히 밝혀지지 않았다. 따라서 난포 생성 동안 과립막 세포의 증식, 분화 및 성숙을 조절하는 메커니즘의 이해를 증진시키기 위하여 본 연구에서는 돼지에서 난포 생성에 관여하는 단백질 인자

* 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-313-F00059).

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8627, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

들을 프로테오믹스 기법을 이용하여 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

과립막 세포 단백질의 수집

도축 직후의 돼지에서 난소를 회수하여 37°C의 생리식염수에 침적하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포액은 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 2~4 mm의 중속난포와 6~10 mm의 우세난포로부터 각각 흡입, 회수하였다. 이를 70 µm filter를 이용하여 난자를 제거하고, 10분간 800 g로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그 후 NH₄-Tris buffer[Tris(T1503, Sigma), NH₄Cl, DDW, pH 7.6] 10 ml를 넣고 피펫팅한 후 5분간 800 g로 원심분리하여 상층액을 제거하는 방법을 3~4회 시행함으로써 혈구세포를 파괴, 제거시켰다. 그 후 과립막 세포만 남은 것을 PBS로 2~3회 세척하여, M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo scientific, JG123423, USA) 1ml를 첨가하여 14~16시간 동안 4°C에서 단백질을 용해하여 12,000 g에서 5분간 원심분리 후 상층액을 회수하여 -96°C에 보관하여 사용하였다.

이차원전기영동

Clean-up kit(Amersham Biosciences, 80-6484-51, USA)를 이용해 단백질을 정제하여 Bradford 법을 이용하여 총 단백질량이 200 µg/µl가 되도록 정량하여 Rehydration buffer(GE Healthcare, 71-5025-42AE, Sweden)에 녹여 총 250 µl가 되도록 하였다. 이것을 18 cm인 NL 3~10의 IPG strip(Amersham Biosciences, 17-1234-01, Sweden)을 이용하여 20°C에서 16시간 동안 흡수시켰다. Isoelectric Focusing(IEF)는 Protean IEF cell(Bio-Rad)을 이용하여 250 V에서 2시간, 8,000 V에서 3시간, 8,000 V에서 60,000 Vhr까지 채우는 방법으로 시행하였다. IEF가 끝난 IPG strip을 equilibration buffer[1.5M Tris(pH 8.8), urea, glycerol, SDS, DDW] 5 ml에 DTT 0.08 g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시켜 평형시켰다. SDS-PAGE는 10% acrylamide gel에 IPG strip을 sample로 이용하여 150 V에서 10분간, 30mA에서 10시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 silver staining kit(GE Healthcare, 17-1150-01, Sweden)을 이용하여 염색한 후, 이미지 분석프로그램인 Melanie 7로 spots를 분석하고, 육안으로 검토하였다.

단백질동정

Gel 조각을 destain solution(30 mM potassium ferricyanide, 100 mM sodium thiosulfate, 1:1) 100 µl에 10분간 침지한 후, destain solution을 제거하고 dH₂O로 15분간 세척하여 수용성으로 변한 은을 제거하였다. Gel을 건조시키기 위해 100% acetonitrile(ACN)에 5분간 침지한 후, ACN을 제거하고 20~30분간 speed-vac하였다.

Gel에 cold trypsin solution[NH₄bicarbonate(pH 8.8),

promega sequencing grade modified trypsin 20 µg/ml] 20 µl를 30분간 완전히 흡수시킨 후, 37°C에서 16~24시간 동안 배양하였다. 그 후, Gel 조각을 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) 35 µl에 넣고 60분간 진탕 혼합하여 상층액을 회수하는 작업을 2회 반복하였고, 회수된 두 상층액을 혼합하여 speed-vac으로 완전히 말려 펩타이드를 추출하였다. 그 후, 0.1% TFA를 첨가하여 추출된 펩타이드를 용해하였다.

0.1% TFA, acetonitrile 혼합액과 0.1% TFA, acetonitrile, 물 혼합액으로 Zip-Tip(Zip-Tip C18, millipore)을 세척하였고, 0.1% TFA, 물 혼합액으로 Zip-Tip을 평형시킨 후, 0.1% TFA 10 µl에 녹인 샘플을 피펫팅으로 빠르게 Zip-Tip을 통과시켜 resin으로 샘플이 붙게 하였다. 그 후 0.1% TFA, 물의 혼합액으로 Zip-Tip을 세척하였고, Zip-Tip으로부터 샘플을 alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid(0.3% TFA, 50% acetonitrile) 1.8 µl에 용해하여 MALDI-TOF에 이용하였다.

MALDI-TOF는 applied biosystems voyager system 4372를 이용하였으며, 모든 결과는 matrix로 alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid를 이용해 reflector-positive mode로 얻었다. MALDI-TOF를 통해 얻어진 스펙트럼을 이용하여 MOSCOT program으로 NCBI에서 database 검색을 실시하였다.

결 과

난포의 발달단계에 따른 돼지난포 과립막 세포의 단백질 패턴을 확인하기 위해 이차원 전기영동을 실시한 후 Melanie 7과 육안 검토를 통해 이미지 분석을 하였다(Fig. 1). 그 중 중속난포에서 보다 우세난포에서 많이 발견된 Spots 7개를 선별하여 MALDI-TOF를 이용해 단백질을 동정하였다. 그 결과, similar to zinc/ling finger protein 3 precursor(RING finger protein 203), angiomin, heat shock 60kDa protein 1(chaperonin) isoform 1(HSP60), similar to transducin-like enhancer protein 1(TLE1) 및

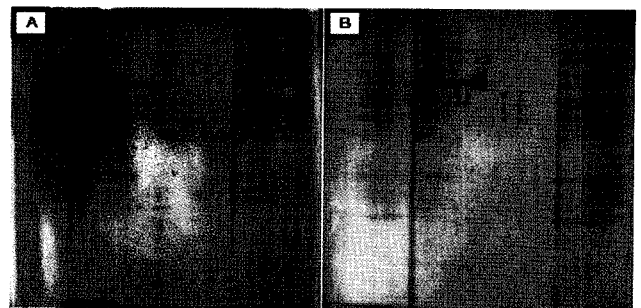
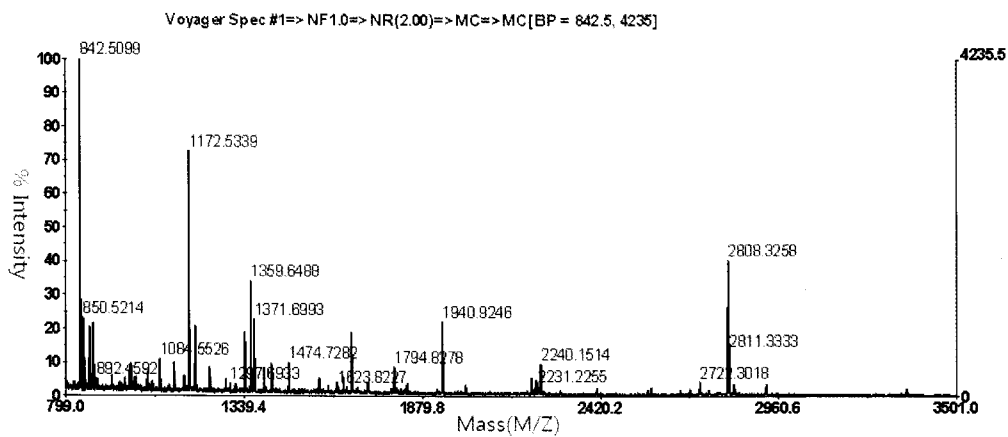


Fig. 1. Two dimensional gel image of protein from granulosa cell within 2~4 mm follicles(A) and granulosa cell within 6~10 mm follicles(B) in pig ovaries. Proteins were isolated from A and B and 200µg of total protein was loaded to the 2-DE gel electrophoresis. First dimension used 18 m, pH 3~10 NL strip and second dimension used 10% acrylamide gel. Loaded gels were visualized by the silver staining. When size of spots of B as contrasted with A spots were selected up-regulated proteins in B.

Table 1. Up-regulated proteins in granulosa cells within 6~10 mm follicles in pig ovary

Spot No.	Protein name	Accession No.	Type of analysis	Score	% Coverage	MW (Da)	pI
1'	Similar to zinc/ling finger protein 3 precursor (RING finger protein 203)	194043168	MALDI-TOF/TOF	512	11.8	88640	6.5
2'	Angiomotin	194044894	MALDI-TOF/TOF	16190	12.1	118326	7.3
3'	Heat shock 60kDa protein 1(chaperonin) isoform 1	194044029M	MALDI-TOF/TOF	2.06e+6	27.2	60907	5.7
4'	Heat shock 60kDa protein 1(chaperonin) isoform 1	194044029M	MALDI-TOF/TOF	437558	31.2	60907	5.7
5'	Heat shock 60kDa protein 1(chaperonin) isoform 1	194044029M	MALDI-TOF/TOF	1.19e+8	31.8	60907	5.7
6'	Similar to transducin-like enhancer protein 1	194034004	MALDI-TOF/TOF	3479	15.9	99687	9.0
7'	SH3 and PX domains 2A	194041971	MALDI-TOF/TOF	74185	15.9	106177	7.5

Spot No. 6'



TLE1
Sequence coverage 15%
(A)

```

1  MRPPFQQCWR WPRRLWEREE LFLFSGPWGH YRPREGGAGG DSDSLAQFST PHQAAGQPFK FTIPESLDRI KEEFQFLQAA
91  YHSLKLECEK LASEKTEMQR HYVMYEMSY GLNIEMHKQT EIAKRLNTIC AQVIPFLSQE HQQVAQAVE RAKQVTMAEL
161  NAIIGQQQLQ AQHLSHGHP FVPLTPHPSG LPPGIPPLG GSAGLLALSS ALSGQSHLAI KDDKHHDAE HHRDREPGTT
241  PHQAAGQPFK FTIPESLDRI KEEFQFLQAA YHRCVSVRAR LKLECGKLAS EKTEMQEALR DGLFQDFQQA SSQIANLQIK
321  AQALPYVYKTA VLHQRRALGI QKNYFNCLSE SETSDPQTIG KHCHRRTRGR RVRWGQWVFV SRLGAAYHCR CRRSSRPRPP
401  SPRFSLSSLP SESARRRPPQ RRRRLRSSV V TCCGGWRRRR WGWSARRSCP RGAPSRRARE VELPEEAVDA GLEASFFSR
481  RFLSIPFSLG EWAGLALGEE GSSTNRDITL NLQGGQNTIN ASPGSKNENL NMAESRALNQ GRDRVIAAAR TVQHEGGPAF
561  CIPSYNAYSF HVTADGQMOP VFFPPDALIG PGIPRHARQI NTLNHGEVVC AVTISNPTRH VYTGGKGVK VWDISHPGNK
641  SFVSQLDCLN RDNYIRSKL LPDGCTLIVG GEASTLSIWD LAAPTPIKA ELTSSAPACY ALAISPKV CFSCCSDGNI
721  AVWDLHNQTL VRQFQHTDG ASCIDISNDG TKLWTGGLDN TVRSWDLREG RQLQHQHDFS QIFSLGYCPT GEWLAVGMES
801  SNVEVLHVNK PDKYQLHLHE SCVLSLK FAY CGKWFVSTGK DNLLNAWRTP YGASIFQSKE SSVLSCDIS VDDKYIVTGS
881  GDKKATVYEV IY
    
```

(B)

Fig. 2. MALDI-TOF MS peptide mass spectrum of spot No. 6' from Fig. 1 (A). The protein corresponding to spot No. 6' in Table 1 by searched database (B). The resulting peptides were then extracted and their masses were measured by MALDI-TOF MS.

SH3와 PX domains 2A(SH3PXD2A)으로 확인되었다(Table 1).

이 가운데 HPS60은 단백질 산화에 의해 3개의 spots로 나뉘어 확인되었는데 6반복에 걸쳐 모두 동일하게 나타났다. 또한 펩타이드 서열을 확인하기 위해 MALDI-TOF에서 나온 스펙트럼을 이용해 Mascot에서 NCBI의 database를 검색하였고, score 값을 통해 spot No. 6'과 가장 상응하는 단백질이 TLE1임을 확인하였다. 이 단백질 spot은 peptide mass mapping을 확인하였을 때 전체 peptide 절편의 15.9%를 덮음으로써 입증되었다(Fig. 2).

고 찰

본 연구는 돼지난소의 난포 발달단계에 따라 과립막 세포에서 발현되는 단백질의 변화를 확인하기 위해 수행되었다. 연구에서 돼지 난소의 난포 직경은 체외성숙 및 수정에 일반적으로 이용되는 미성숙 난자를 포함하는 2~4 mm와 난소 내에서 난포의 발달이 이루어져 배란을 준비하는 6~10 mm로 설정하였다. 각각의 난포에서 채취한 과립막 세포의 단백질을 이차원 전기영동을 통해 분리하고 MALDI-TOF를 이용해 동정하여 NCBI에서 database를 검색한 결과, 우세난포에서 증가하는 경향을 보인 7개 spot들은 similar to zinc/ling finger protein 3 precursor(RING finger protein 203), angiomin, heat shock 60kDa protein 1(chaperonin) isoform 1(HSP60), similar to transducin-like enhancer protein 1(TLE1) 및 SH3와 PX domains 2A(SH3PXD2A) 단백질로 확인되었다. 이 우세난포에서 증가된 단백질들은 대체적으로 세포 이동과 관련되어 있었다.

Similar to zinc/ling finger protein 3 precursor(RING finger protein 203)는 일제히 ubiquitination 효소에 붙어 그들을 기질로 하여 ligase로 기능하는 것으로 보고되었다(Joazeiro와 Weissman, 2000). Angiomin은 혈관 신생에 관련된 단백질로 세포의 이동과 밀접한 관계가 있으며, HSP60은 미토콘드리아 단백질 수송에 관련하여 단백질의 접힘을 촉진하고 소수성 부분은 막을 통해서 생기는 수송에서 단백질의 접히지 않은 형태를 유지하는 원인이 된다(Koll 등, 1992). 또한, DNA 대사에 관여하여 미토콘드리아 DNA의 전사와 복제에 연관되어 있으며(Hansen 등, 2003), 세포막에서의 세포 사멸을 예방하는 역할을 수행하며 열 충격이나 독성, 스트레스 환경 하에서 증가하는 경향을 보이는 것으로 보고되었다(Vargas-Parada 등, 2003; Vittorio Calabrese 등 2007).

한편, TLE1은 Wnt signal에 관여하며 염증유발인자의 발현을 억제하고(Fisher 등, 1998; Parkhurst, 1998; Chen 등, 2000; Buscarlet 등, 2007), 태아의 발달 동안 신경조직의 생성과 관계가 있는 Amino-terminal enhancer of split(AES)에 연관되어 있으며, 스테로이드 호르몬 수용체의 수많은 핵 호르몬 수용체 family인 estrogen-related receptor gamma(ESRRG)의 보조활성인자로서 특별한 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

SH3PXD2A는 효소의 조절, 신호전달물질의 세포 내 이동, multiprotein complex 생성을 조절하는 PxxP motifs를 조절하는 SH3와 세포의 성장, 사멸, 세포이동, 대식

작용, 분화와 같은 다양한 세포의 기능에서 중요한 역할을 수행하는 PX단백질을 붙이는 domains이다.

따라서, 이상의 증가된 단백질들의 난소 내에서 기능에 대한 기존의 보고는 없었지만 연구의 결과로 보아 이 단백질들이 난포의 발육과 연관되어 있는 것으로 생각되며, 앞으로의 연구에서 이 단백질들의 난소 난포 내에서의 기능을 연구해야 할 것이다.

사 사

본 연구를 수행하는데 있어서 단백질 분석에 협력하여 주신 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

인용문헌

1. Buscarlet M, Stifani S (2007): The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends Cell Biol* 17:353-361.
2. Chen G, Courey AJ (2000): Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* 249:1-16.
3. Downs S (1995): The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev Biol* 167:502-512.
4. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM (1998): The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol. Endocrinol.* 12:1809-1817.
5. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y (1997): Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger rionucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56:976-984.
6. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL (2002): The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Science.* 99(5):2890-2894.
7. Erickson CF, shimasaki S (2001): The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil. Steril.* 76(5):943-949.
8. Fisher AL, Caudy M (1998): Groucho proteins: transcriptional co-repressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 12:1931-1940.
9. Hansen TJ, Bross P, Westergaard M, Nielsen MN, Eiberg H, Borglum AD, Mogensen J, Kristiansen K, Bolund L, Niels G (2003): Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localized head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Human Genetics* 112:71-77.
10. Hsueh AJW, McGee EA, Hayashi M, Hsu SY (2000): Hormonal regulation of early follicle development

- in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 163:95-100.
11. Joazeiro CA, Weissman AM (2000): Ring finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102: 549-552.
 12. Koll H, Guiard B, Rassow J, Ostermann J, Horwich A, Neupert W, Hartl FU (1992): Antifolding activity of HSP60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell* 68:1163-1175.
 13. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ (2002): Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178-2180.
 14. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S (2000): Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275(50):39523-39528.
 15. Parkhurst SM (1998): Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor. *Trends Genet* 14:130-132.
 16. Parrott JA, Skinner MK (1998): Thecal cell granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology* 139(5):2240-2245.
 17. Tisdall DJ, Fidler AE, Smith P, Quirke LD, Stent VC, Heath DA, McNatty KP (1999): Stem cell factor and c-kit gene expression and protein localisation in the sheep ovary during fetal development. *J Reprod Dev* 116:227-291.
 18. Vanderhyden BC (1996): Oocyte-secreted factors granulosa cell steroidogenesis. *Zygote*. 4:317-321.
 19. Vargas-Parada L, Solis C (2003): Heat shock and stress response of *Teania solium* and *T. crassiceps*. *Parasitology* 211:583-588.
 20. Vittorio C, Cesare M, Agrippino R, Marzia P, Chiara C, Carlo DM, Allan B, Anna M, Giuffrida S (2007): *In vivo* induction of heat shock proteins in the substantia nigra following L-DOPA administration is associated with increased activity of mitochondrial complex I and nitrosative stress in rat : regulation by glutathione redox state. *Journal of Neurochemistry* 101(3):709-717.
 21. Yoshida H, Takakura H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa S (1997): Step-wise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184:122-137.
- (접수일자: 2009. 9. 2 / 채택일자: 2009. 9. 11)