

돼지의 난포액 내 단백질인자의 탐색과 변화에 관한 연구

지미란¹ · 정희태² · 양부근¹ · 이채식³ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학, ³세화병원불임연구소

Studies on Investigation and Change of Protein Factors in Porcine Follicular Fluids

Mi-Ran Ji¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹, Chae-Sik Lee³ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³Saewha Infertility Institute, Busan 607-842, Korea

ABSTRACT

When fully grown oocytes are removed from their follicles, they can resume meiosis and mature spontaneously under *in vitro* conditions. However, nuclear maturation under *in vitro* condition is not accompanied by complete cytoplasmic maturation, which is essential for successful fertilization and the initiation of zygotic development. This study analyzed change of proteins in follicular fluids during the porcine follicular development. Follicular fluids were collected from follicles of diameter 1~2 mm, 2~6 mm and 6~10 mm in ovary of slaughtered pigs. Total proteins were extracted from follicular fluids by M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent. We confirmed totally 27 same spots, 1 spot from follicle fluid of 2~6 mm follicle and 5 spots from follicle fluid of 6~10 mm in diameter were analyzed by MALDI mass spectrometry and searched on NCBI. In results, spot No. 28 from 2~6 mm follicle was Ig lambda chain C region, and spot No.32 and 33 from 6~10 mm was Apolipoprotein A-(APOA4). Spot No.29 and 31 were failed to analyze. These results indicate that the porcine oocyte during *in vitro* maturation depend on specific different expressed proteins may play an important roles in the sequence of molecular events in porcine oocyte maturation and follicular development.

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

서 론

포유동물의 번식에 있어서 배란율(ovulation rate)은 번식효율을 결정짓는 가장 중요한 결정인자 중 하나이다. 특히 난소 내에서 난포의 보충(recruitment)과 선택(selection)의 과정은 특정한 종과 품종에서 특이적으로 배란난포의 발달을 일어나게 한다. 우선, 난포 보충은 하나 또는 그 이상의 배란난포가 선택되어지는 난포의 풀(pool)을 만들고, 일단 선택된 난포는 우세난포가 되어 종속난포들이 난포폐쇄를 겪는 동안 배란을 위한 발달을 계속하게 된다. 이와 같은 난포보충과 선택은 수많은 성장인자와 국지적으로 생산되는 다른 인자들을 포함하는 내분비 및 인접 분비 조절과 밀접한 관계가 있다. 비록 난소난포의 숫자가 특정한 종과 품종 내에서 엄격하게 조절되기는 하지만, 거기에는 다양한 유전자 변이(Juengel 등, 2004)

또는 배란율을 증가시킬 수 있는 다른 생리적인 시스템(Driancourt 등, 1986; Miller 등, 1998)이 존재한다. 배란율은 호르몬 투여 또는 난포 성숙의 중요한 단계에서의 식이 조절에 의해서 조절될 수 있다. 비록 배란 전 난포의 절대적 숫자가 반추동물과 돼지 사이에서 상당히 다르기는 하지만, 배란율을 조절하고 변화시키는 전략에는 유의성이 있다.

포유동물 난소의 난자와 과립세포 사이의 정보 교환은 상호 지향적이며, 난자와 난포의 기능과 발달을 위해 필수적이다(Eppig 등, 1997). 이전의 많은 연구에서 난포 발달의 다양한 측면들이 난자의 존재에 의해서 영향을 받는다는 사실이 증명되었다(Vanderhyden, 1996; Erickson과 Shiimasaki, 2001; Matzuk 등, 2002; Eppig 등, 2002). 난자에서만 발현되는 유전자인 GDF-9 좌위에서 변이가 유도된 생쥐의 경우 난포 발달이 주요 단계에서 정지되는데(Dong 등, 1996; McGrath 등, 1995), 이것은 난자에서

* 이 논문은 2009년 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2009-0071610).

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

분비된 인자들이 개별 난포의 발달을 조절하는 메카니즘을 갖고 있다는 것을 의미한다. 비록, FSH 이외에 난포막 세포나 과립세포에 의해 분비된 인접 분비 인자들이 개별 난포의 발달을 조절할 수 있기는 하지만, 난자가 난포 발달 조절에 지배적인 역할을 하는 것으로 보인다(Hsueh 등, 2000). 이외에 줄기세포인자(SCF; stem cell factor) 또한 난포 발달에 다양한 역할을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다(Yoshida 등, 1997). SCF는 전이 증식과 연속된 생존 및 양의 태아에서의 생식세포 성숙을 위해 필수적이다(Gentry 등, 1996). SCF는 또한 난포보충과 1차 난포 발달의 초기 진행에도 영향을 미친다(Parrott과 Skinner, 1998).

본 연구에서는 돼지난소의 난포 발달 동안 난포액으로부터 발견되는 새로운 단백질 인자들에 관하여 연구되었다. 서로 다른 발달 단계를 가진 난포로부터의 난포액에서 발견되는 단백질 윤곽(protein profiles)을 고해상도 2차원 전기영동과 다양한 분석 장비를 이용해 비교 분석하였다.

재료 및 방법

난포로부터 난포액의 수집

도축장에서 회수한 임의의 발정주기를 가진 돼지의 난소를 생리식염수(NaCl, 0.9% w/v; penicillin 100U/ml; streptomycin 100 µg/ml 및 Amphotericin B 2.5 µg/ml) 내에서 25~30°C로 유지하여 실험실로 운반하였다. 생리식염수로 수 차례 세척한 후, 선택된 난소들은 70% (v/v) ethanol에서 세척한 다음 수집배양액(collection medium; penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, amphotericin B 2.5 µg/ml을 함유한 DMEM-F12 배양액) 내로 옮겼다. 난포의 구분은 발정주기의 단계에 따라 Ireland 등(1980)에 의해 제시된 것처럼 형태적으로 구분하였다. 난포는 크기에 따라 1~2 mm, 2~6 mm, 6~10 mm로 나누었으며, 18-gage 주사침이 장착된 일회용 주사기를 이용해 난포액을 흡입하는 방법으로 난자를 회수하여 샘플을 제작하였다. 난포액은 37°C water bath에서 10분간 침지하여 상층액을 회수한 뒤 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다.

이차원전기영동

Clean-up kit(Amersham Biosciences, 80-6484-51, USA)를 이용해 단백질을 정제하여 Bradford법을 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 3-11의 IPG strip(A, ersham 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 equalization buffer[1.5 M Tris(pH 8.8), urea, glycerol, SDS, DDW] 5 ml에 DTT 0.08 g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시킨 후, equalization buffer 5 ml에 Iodoacetamide(IAA) 0.1 g을 섞은 용액에

침지하여 실온에서 15분간 반응시켜 평형시켰다. SDS-PAGE는 12% acrylamide gel에 IPG strip을 sample로 이용하여 150 V에서 10분간, 50 mA에서 6시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 CBB 염색법을 이용하여 염색한 후 이미지 분석 프로그램인 Melanie 7로 spots를 분석하고 육안으로 검토하였다.

단백질 동정

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%(ACN)에 5분간 침지한 후, ACN을 제거하고 20~30분간 speed-vac하였다.

Gel에 cold trypsin solution[NH₄ bicarbonate(pH 8.8), promega equencing grade modified trypsin 20 µg/ml] 20 µl을 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 NBCInr에서 database 검색을 실시하였다.

결 과

난포의 발달 단계에 따른 난포액 내의 단백질 패턴을 확인하기 위해 이차원 전기영동을 실시하였다. 난포의 직경을 1~2 mm, 2~6 mm 및 6~10 mm 난포 크기 별 난포액을 각각 채취하여 동결건조를 통해 농축 후 단백질 양을 200 µg/µl로 정량하여 18cm, NL 3~11 IPG strips을 이용해 등전점 전기영동을 실시하였고, 12% acrylamide gel로 SDS-PAGE를 수행하여 Coomassie blue staining 하였다. 이미지 분석은 Melanie 7과 육안 검토를 통해 spots를 분석하였다.

그 중 난포의 직경 별 재현성을 보이는 spot을 선별 각각의 난포직경 별 재현성을 보인 spot을 비교하여 Fig. 1에서와 같이 동일 spot 27개를 확인하였고, 2~6 mm에서만 나타난 spot 1개와 6~10 mm에서만 나타난 spot 5개

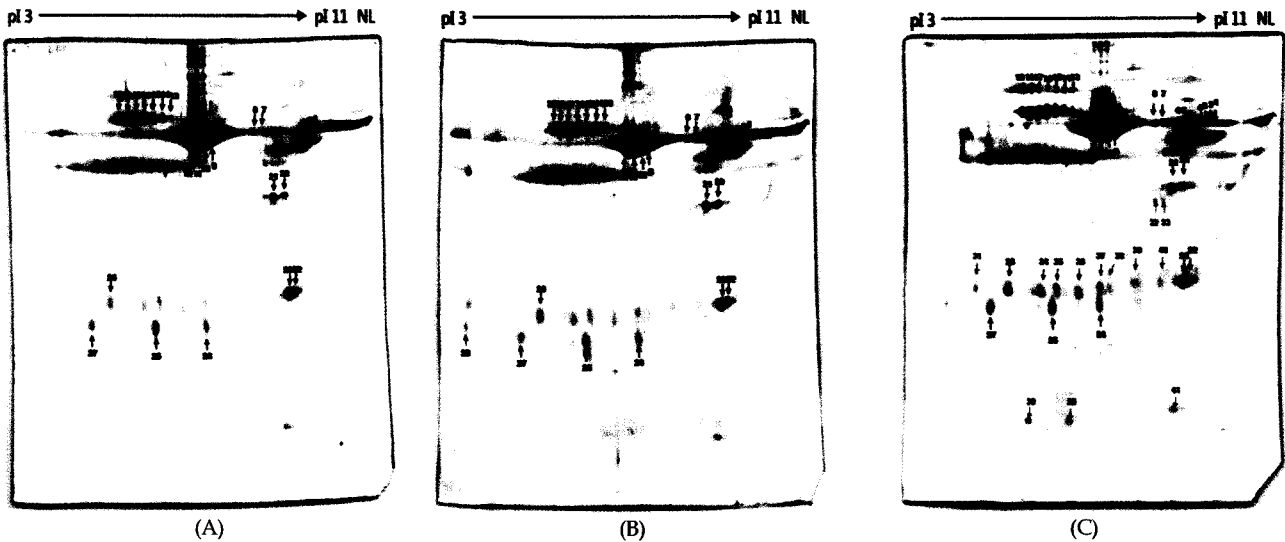


Fig. 1. Two dimensional gel image of protein from follicular fluid in pig ovaries. Proteins were isolated from each follicle size; 1~2 mm(A), 2~6 mm(B) and 6~10 mm(C), and 200 µg of total protein was loaded to the 2-DE gel electrophoresis. First dimension used 18 cm, pI 3~11 NL strip and second dimension used 12% acrylamide gel. loaded gels were visualized by the coomassie blue staining.

Table 1. Dissimilar protein from follicle fluid by follicle size in porcine ovary

Spot No.	Protein name	Accession No.	Type of analysis	Score	Coverage (%)	MW (Da)	pI
28	Ig lambda chain C region	P01846	MALDI-TOF/TOF	235793	87.6	11003	6.8
32	Apolipoprotein A-IV	O46409	MALDI-TOF/TOF	2.28e+10	44.2	432941	5.7
33	Apolipoprotein A-IV	O46409	MALDI-TOF/TOF	2.28e+10	44.2	432941	5.7

를 선별하였다. 6~10 mm에서 발견된 spot 8개는 다른 난포 직경에서 나타났으나 재현성을 보이지 않고 오로지 6~10 mm 직경의 난포에서만 재현성을 보였다. 그 중 2~6 mm에서만 나타난 1개의 28 spot과 6~10 mm에서만 나타난 5개의 29, 30, 31, 32 및 33 spot을 MALDI-TOF를 이용해 단백질을 동정하였다.

그 결과, 2~6 mm 난포에서만 나타난 28번 spot은 MALDI-TOF 분석 결과, 면역 단백질 Ig lambda chain C region로 확인되었다(Table 1). 6~10 mm 크기의 난포에서 채취한 난포액 내 단백질에만 존재했었던 spot인 29, 30, 31, 32 및 33 등은 32와 33이 동일한 단백질로 Apolipoprotein A-IV(APOA4)으로 확인되었으며, 나머지 29에서 31번의 단백질은 MALDI-TOF 분석 과정에서 추출된 peptide의 양이 부족하여 분석에 실패하였다.

이와 같은 확인은 3반복에 걸쳐 모두 동일하게 나타났다. 또한, 펩타이드 서열을 확인하기 위해 MALDI-TOF에서 나온 스펙트럼을 이용해 Mascot에서 NCBI의 Database를 검색하였다(Fig. 2).

고찰

본 연구는 돼지난소의 난포 발달 단계에 따라 난포액의 크기 별로 난포액의 단백질의 변화를 확인하기 위하

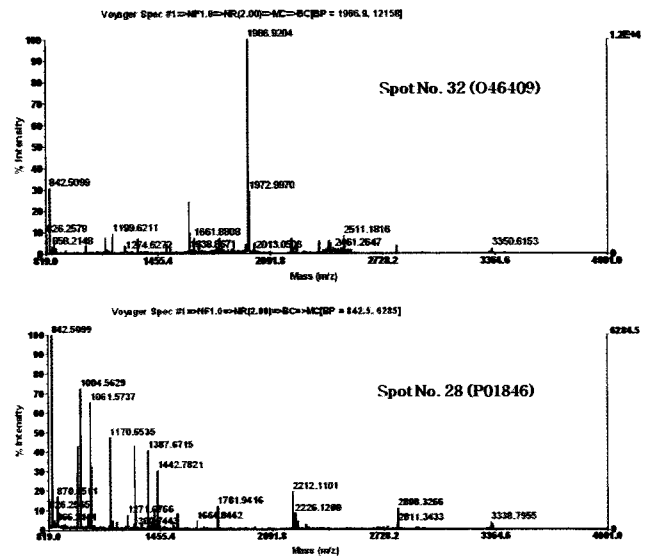


Fig. 2. MALDI-TOF MS peptide mass fingerprint spectrum of spot No. 28(P01846) and 32(O46409).

여 수행되었다. 연구에서 돼지난소의 난포 직경은 크기 별로 1~2 mm, 2~6 mm 및 6~10 mm로 설정하였다. 난포 크기 별 난포액 내 단백질의 변화를 이차원 전기영동을 통해 단백질을 분리하고 MALDI-TOF를 이용해 동

정한 결과 1~2 mm 크기의 난포액 내의 단백질 spot들은 다른 크기의 난포액에서도 모두 존재하였으며, 2~6 mm 크기에서는 면역 도메인 단백질로 알려진 Ig lambda chain C region이 분비되는 것을 확인하였고, 6~10 mm 난포액에서는 APOA4가 발견되었다. Table 1에서와 같이 Ig lambda chain C region, Apolipoprotein A-IV 단백질 등이 난포 크기가 증가함에 따라 새롭게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그 중 6~10 mm 난포에서 발견되었던 APOA4 단백질은 HDL과 Triglyceride-Rich Lipoprotein 입자의 주요한 구성 성분이며(M. Ilyas Kamboh 등, 1994), Apolipoprotein 계통으로써 HDL의 메카니즘 및 콜레스테롤 운반과 관련이 있다(Nippon Rinsho, 1994). Lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT) 효소를 활성화시키고(Armin SteinmetzSg과 Gerd Utermann S, 1984), 인간 APOA4 단백질은 혈청이 고갈된 지방단백질로부터 정제되며(J. Lipid Res, 1983), 지방질의 섭취로 합성과 분비가 증가되어 생기는 포만감 인자의 제공 및 위 배출을 억제하고, anti-inflammatory와 antiatherogenic properties를 가지고 있다(Culnan DM 등, 2009). 이와 같은 사실은 난포 크기 성장과 배란에 있어서 난소에서 분비되는 스테로이드 호르몬 분비에 있어서 전구체인 콜레스테롤 분비자극과 연관이 있을 것으로 생각된다. 본 연구를 통하여 난포 크기 별 난포액 내 단백질의 변화로 보면 난포 크기가 커짐에 따라 난포액 내 단백질 종류가 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 난포인자의 중요성과 세포 외 기질의 중요성이 부분적으로 연구되었다. 또한, 포유동물에서의 난포형성 과정에서 나타나는 변화가 분자적, 세포적 수준에서 검토되어, 이 연구를 통해서 (1) 난포액 내의 단백질의 확인, (2) 난포 크기 별 단백질의 변화, (3) 난포 성장의 세포 외 또는 세포 내 조절에 관련된 인자에 대한 정보를 얻을 수 있었다. 한편, 연구를 통해 얻어진 정보는 난포 성장을 동기화시키거나 과배란 반응을 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 연구결과는 인간을 포함한 다양한 포유동물에서 무배란성 불임(anovulatory infertility)을 이해하고 극복할 수 있게 할 것이며, 배란을 촉진시키는 더욱 생리적이고 효과적인 방법을 디자인하는데 도움을 줄 것으로 예상되며, 포유동물의 난포 및 난자의 발달과 배란을 조절할 수 있는 전략적 메카니즘을 규명하는데 기초자료로 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구의 수행 시 단백질 분석을 위한 강원대학교 공동실험실습관의 협조에 감사드리며, 난포액의 채취와 보존을 위한 강원대학교 동물자원공동연구소의 협조에 감사드립니다.

인용문헌

- Brussow KP, Schneider F, Ratky J (1994): The influence of long-time active GnRH-agonist on hormonal level and follicular development in cyclic gilts. *Reprod Domest Anim* 29:358-361.
- Culnan Dm, Cooney RN, Stanley B, Lynch CJ (2009): Apolipoprotein A-IV, a putative satiety/antiatherogenic factor, rises after gastric bypass. *Obesity* 17:46-52
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM (1996): Growth differentiating factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 38:531-535.
- 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.
- Driancourt MA, Gauld IK, Terqui M, Webb R (1986): Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J Reprod Fertil* 78:565-575.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM (1988): The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12:1809-1817.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL (2002): The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Science* 99:2890-2894.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y (1997): Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56: 976-984.
- Erickson CF, Shimasaki S (2001): The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 76:943-949.
- Gentry PC, Smith GW, Anthony RV, Zhang Z, Long DK, Smith MF (1996): Characterisation of ovine stem cell factor messenger ribonucleic acid and protein in the corpus luteum throughout the luteal phase. *Biol Reprod* 54:970-979.
- Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R (1996): Suppression in the secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 55:68-74.
- Hsueh AJW, McGee EA, Hayashi M, Hsu SY (2000): Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cellular Endocrinol* 163:95-100.
- Ireland JJ, Murphee RL, Coulson PB (1980): Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycles by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* 63:155-160.
- Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR, McNatty KP (2004): Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim Reprod Sci* 82-83:447-460.

15. Kamboh M, Friedlaender S, Ahn YI, Ferrell E (1994): A common deletion polymorphism in the apolipoprotein A4 gene and its significance in lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14:656-662
16. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ (2002): Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178-2180.
17. McGrath SA, Esqueda AF, Lee SJ (1995): Oocyte specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mole Endocrinol* 9:131-136.
18. Miller AT, Picton HM, Craigon J, Hunter MG (1998): Follicle dynamics and aromatase activity in high-ovulating Meishan sows and in Large-White hybrid contemporaries. *Biol Reprod* 58:1372-1378.
19. 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* 275:39523-39528.
20. 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* 139:2240-2245.
21. Picton HM, Miller AT, Hunter MG (1999): Effect of FSH infusion on follicle development in GnRH-agonist-treated gilts. *J Reprod Fertil* 117:249-257.
22. Picton HM, Tsonis CG, McNeilly AS (1990): FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically-treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J Endocrinol* 126:297-307.
23. Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Driancourt M (2000): Effects of kit ligand and anti-kit antibody on growth of cultured mouse. 56:483-494.
24. 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* 116:277-291.
25. Vanderhyden BC (1996): Oocyte-secreted factors regulate granulosa cell. *Steroidogenesis Zygote* 4:317-321.
26. Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG (1999): Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Supple* 54:33-48.
27. Webber MM, Spottl G, Gossl C, Engelhardt D (1999): Characterization of human insulin-like growth factor binding proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and western ligand blot analysis. *J Clinical Endocrinol Metabol* 84:1679-1684.
28. Yoshida H, Takakura N, Kataoka 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: 2010. 9. 9 / 채택일자: 2010. 9. 16)