

## 성장중인 포유동물 여포난자 세포질의 난할억제효과에 관하여

이원교 · 권혁방

전남대학교 자연과학대학 생물학과

성장중인 포유동물의 난자에 존재하는 성숙억제요인(maturation inhibiting activity, MIA)이 배아의 난할에 미치는 효과를 세포융합방법을 사용하여 조사하였다. 생쥐에서 성장중인 난자와 간기에 있는 2세포기 할구와 1:1로 융합하여 배양했을 때(24시간) 60% 이상의 융합체들이 두 개의 핵을 간직하고 있었으며 4세포기의 할구와 융합했을 때에는 90% 이상이 두 개의 핵을 간직하고 있었다. 같은 조건으로 배양한 융합되지 않은 할구들이나 단독으로 배양한 할구들은 한 주기의 난할을 일으키었다. 이에대해 이미 유사분열기로 들어간 후기 2 세포기 할구와 성장중인 난자와 융합을 했을 때에는 오히려 난자의 핵붕괴와 함께 염색체의 응축이 일어났다. 쥐(rat)의 성장중인 난자와 간기에 있는 생쥐(mouse) 2세포기 할구와 1:1로 융합했을 때에도 역시 거의 모든 융합체들이(약 88%) 핵을 간직하고 있어서 분열이 정지되어 있었다. 이러한 결과는 생쥐나 쥐의 성장중인 난자에는 배아의 난할을 억제하는 성질이 있음을 보여주는 것이며 이미 분열기로 들어간 배아의 세포질에는 효과를 나타내지 못한다는 것을 보여주고 있다.

**KEY WORDS: Maturation inhibiting activity, Mitosis**

포유동물에서 성장이 끝난 그라프씨 여포(Graafian follicle)에서 취한 여포난자는 생체외에서 적당한 조건으로 배양하면 호르몬의 도움없이도 자발적 성숙이 일어난다(Pincus and Enzmann, 1935; reviewed by Masui and Clarke, 1979). 그러나 성장중에 있는 작은 여포난자(growing follicular oocytes)는 일정한 크기에 이르기까지는 생체외배양에서 성숙이 일어나지 않는다(Sorensen and Wasserman, 1976; Bar-Ami and Tsafiriri, 1981). 일반적으로 핵의 행동이 세포질의 조절을 받는다고 알려져 있으므로 성장중인 난자의 세포질은 성장이 끝난 난자의 그것과 다르다는 것을 짐작할 수 있다. 난자의 성숙은 핵붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)에 앞서 세포질에서 생성되는 성숙촉진요인(maturation promoting factor, MPF)의 출현 여부에 의하여 거의 결정된다(Masui and Markert,

1971). 일단 MPF가 생성되면 극체의 방출에 이르는 성숙과정이 진행되기 때문이다. 따라서 성장중인 난자의 세포질은 MPF의 생성이나 활성화를 일으킬 능력이 없거나 혹은 MPF의 작용을 억제하는 또다른 요인이 있을 가능성이 있다고 보겠다. 성장중인 난자의 핵이 분열(핵붕괴)을 일으킬 능력이 있다는 것은 세포융합실험으로 알 수 있다. 즉, 생쥐에서 성장중인 난자와 핵붕괴가 이미 일어난 난자(GVBD oocyte)를 융합하여 배양하면 성장중인 난자의 핵붕괴와 염색체의 조기응축(premature chromosome condensation, PCC)이 일어나는 것이 관찰되었기 때문이다(Balakier, 1978; Balakier and Masui, 1986; Lee and Kwon, 1988). 근래에 성장중인 난자의 세포질에 MPF의 작용을 방해하는 성질이 있음을 알게되었다. 어린 생쥐에서 취한 성장중인 난자와 그라프씨 여포에서 취한 미성숙 난자를 융합하여 배양하면 미성숙난자의 핵붕괴가 오히려 억제되는 것이 발견되었기 때문이다(Fulka, 1985; Fulka *et al.*, 1985; Lee and Kwon, 1988). 본인 등은 생쥐와

본 연구는 한국과학재단 (1987)의 지원에 의해 수행된 것임.

돼지의 성장중인 난자에서 이러한 성숙억제요인 (maturation inhibiting activity, MIA)을 확인한 바 있으며 MPF와의 관계를 조사한 바 있다(Lee and Kwon, 1988). 그러나 난자내의 MIA가 배아의 세포주기에도 그 억제효과를 나타내는 지에 대해서는 아직 조사된 바 없다.

본 연구는 성장중인 난자의 MIA가 초기배아의 난할에 미치는 영향을 조사하기 위하여 간기에 있는 배아 (핵을 간직한)와 이미 유사분열기에 들어가 있는 배아들을 성장중인 난자와 융합시킨 다음 이들 융합체들의 핵상을 조사하여 보았다. 아울러 이종간에도 그 효과가 있는지를 보기 위하여 흰쥐의 난자와 생쥐의 배아를 사용하여 조사하여 보았다.

## 재료 및 방법

실험재료로는 본 과에서 사육하는 생쥐(ICR mouse)와 흰쥐(rat, Sprague Dawley)를 사용하였다.

### 재료의 채취

생쥐와 흰쥐의 성장중인 난자(growing oocyte)는 각각 생 후 10일과 15일 된 암컷의 난소에서 얻었다. 난소 조각을 0.5% pronase(from *streptomyces*, Calbiochem, )를 포함한 PBS(phosphate buffered saline) 용액에서 두 시간 정도 처리하여 난소 조각을 부분적으로 분해시킨 후 작은 여포내에 들어있던 성장중인 난자들을 입으로 조절하는 미세피펫으로 채취하였다. 이 때 얻어지는 난자는 투명대(zona pellucida)가 이미 제거된 상태이었다. 생쥐의 성장한 난자(immature large oocyte)는 생 후 3주된 것의 난소에서 그래프씨 여포를 터뜨려 채취하였다. 생쥐의 후기 2세포기 배아와 4세포기 배아는 생 후 2개월 된 것의 복강에 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin)와 HCG(human chorionic gonadotropin, Sigma)를 각각 5 I. U. 씩을 48시간 간격으로 주사한 후 숫컷과 합사시켜 교배가 확인된 것(copulation plug 관찰)으로부터 얻었다. 이들 배아들은 HCG 주사후 48-52시간 경과된 암컷의 수란관에서 채

취할 수 있었다.

### 세포융합 및 배양

난자와 배아의 융합은 Spindle(1981)의 방법에 따라 수행하였으며 기본배양액으로는 0.4% bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 포함된 standard egg culture medium(SECM)을 사용하였다(Biggers *et al.*, 1971). 생쥐의 성장한 난자와 배아는 0.5% pronase로 3-5분 처리하여 투명대를 제거한 후 기본배양액으로 서너번 세척하였다. 투명대가 제거된 배아를 calcium이 없는 SECM에서 30분간 배양함으로써 개개의 할구로 분리해 내었다. 이렇게 하여 얻은 난자와 할구들을 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 phytohemagglutinin(PHA, Sigma)이 들어있는 배양액으로 옮겨서 정해진 쌍들로 혼합시킨 후 45% polyethylene glycol(PEG 1000, Sigma)이 함유된 SECM에서 1분 30-40초 동안 처리하여 융합을 유도하였다. 융합과정에서 성장한 난자의 자발적 핵붕괴를 억제하기 위하여 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 dbcAMP(dibutyryl cyclic AMP, Sigma)나 200  $\mu\text{M}$ 의 isobutyl methyl xanthine (IBMX, Sigma)를 첨가한 배양액에서 난자들을 조작하였다. 융합된 난자-할구의 쌍들을 기본배양액으로 옮겨 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 습기찬 정온기(Forma scientific)내에서 24시간 동안 통상적인 방법으로 배양하였다(Kwon *et al.*, 1987). 배양 후 융합체들을 2% glutaraldehyde(Sigma)에서 10분 동안 전고정 한 다음 Normarskii interference microscope(Nikon)로 핵붕괴 여부를 조사하였다. 이 때 핵붕괴가 일어난 것들은 acetic alcohol로 후고정 시킨 후 염색과정을 거친 다음 위상차 현미경으로 핵상을 관찰하였다.

## 결 과

### 할구세포와 성숙된 난자와의 융합

먼저 본 실험에서 사용하는 2세포기나 4세포기의 할구세포들이(1/2혹은 1/4) 난할을 계속할 수 있는지를 조사하고 아울러 융합과정중에 어떤 손상이 있는지를 보기 위하여 성숙한(핵붕괴를 일으킨) 난자와 상기 할구세포들을 융합시킨 후

**Table 1.** Fusion of mouse GVBD oocytes with 2 or 4 cell blastomeres.

Type of pairing	No. of blastomeres fused/ No. of blastomeres unfused	Nuclear phase of fused blastomeres		Stage of unfused blastomeres		
		2NU	ND	2C	4C	8C
2C-blastomere alone(1/2)		—	—	9	36	—
4C-blastomere alone(1/4)		—	—		1	11
GVBD oocyte + 2C-blastomere(1/2)	12/4	—	12		4	—
GVBD oocyte + 4C-blastomere(1/4)	17/4	—	17		1	3

Two cell or 4 cell embryos were collected from female mice 48-52 hours after injection of HCG. GVBD oocytes were obtained by culturing the follicular oocytes from Graafian follicles for 4 hours. The procedures for the isolation of the blastomeres and fusion with GVBD oocytes were described in Materials and Methods. After fusion, those giant fused cells were cultured for 24 hours in SECM and examined for their nuclear development with Normarskii interference microscope.

NU; Nucleus, ND; Nuclear disintegration, 2C, 4C, 8C; 2 cell, 4 cell, 8 cell respectively.

**Table 2.** Fusion of mouse growing oocytes with 2 or 4 cell blastomeres.

Type of pairing	No. of blastomeres fused/ No. of blastomeres unfused	Nuclear phase of fused blastomeres		Stage of unfused blastomeres		
		2NU	ND	2C	4C	8C
Growing oocyte + 2C-blastomeres(1/2) (interphase)	45/7	27	18	—	7	—
Growing oocyte + 4C-blastomeres(1/4) (interphase)	16/6	15	1	—	—	6
Growing oocyte + 2C-blastomeres(1/2) (mitosis)	13/2	—	13	—	2	—

Growing oocytes were isolated from ovaries of 10 day old mice by partial digestion and puncturing of the small follicles. The procedure for isolation of the blastomere and fusion with the oocytes were described in Materials and Methods. Those fused giant cells were cultured for 24 hours and examined for their nuclear development under the microscope.

NU; Nucleus, Nd; Nuclear disintegration. 2C, 4C, 8C; 2 cell, 4 cell, 8 cell respectively.

융합체의 행동을 관찰하였다. 분리해낸 2세포기나 4세포기의 할구들을 24시간 배양했을 때 최소한도 한 주기의 세포분열을 일으킨 것을 관찰할 수 있었다. 이로 보아 투명대제거와 할구분리과정 이들에 어떤 손상을 준것같지는 않았다 (Table 1). 핵붕괴를 일으킨 난자와 이들 할구세포들(간기에 있는)과 세포융합을 시켰을 때 융합체의 핵들은 붕괴를 일으키었으며 융합과정을 거쳤으나 융합이 되지 않은 할구들도 역시 한번의 난할을 일으킨 다음 간기상태에 있었다 (Table 1). 또한 할구나 융합체들의 형태에 특별한 변화가 없었다. 핵붕괴를 일으킨 난자들이 할구세포의 핵붕괴를 유도했다는 것은 전자의 세포질에서 생성된 MPF가 배아세포에 작용하여 핵붕괴를 일으키고 염색체의 응축을 유도했다는 것을 의미하는 것으로 해석되었다. 이런 결과로부터 본 실험에 사용한 배양과 융합과정이 배아들의 발생에 어떤 손상을 주지 않았다고 판단되었다.

#### 생쥐의 성장중인 난자와 후기 2세포기 및 4세포기 할구와의 융합

생쥐의 성장중에 있는 난자(growing oocyte)에 존재하는 것으로 알려진 MIA가 배아세포의 난할에도 영향을 미칠 것인가를 조사하여 보았다. 성장중인 난자와 간기에 있는(핵을 간직한) 2세포기의 할구(1/2)와 1:1로 융합시켜 배양했을 때 45개의 융합체중 27개(60%)는 두 개의 핵을 간직하고 있었으며 (Fig. 1), 나머지 18개는 핵붕괴를 일으키었다 (Table 2; Fig. 1). 이에 대해 융합이 되지 않은 7개의 할구들은 한 주기의 난할을 일으켜서 4세포기 할구로 되었다. 성장중인 난자와 4세포기의 할구(1/4)를 융합했을 때에도 비슷한 결과가 나타나서 대부분의 융합체들이 2개의 핵을 간직하고 있었다 (Table 2). 성장중인 난자와 할구들의 융합체가 두개의 핵을 가지고 있다는 것은 전자의 세포질이 후자의 핵붕괴 즉 난할의 시작을 억제했다는 것을 의미한다. 성숙된 난자와 융합했을 때에는 비록 세포질 분열까지는 일어나지 않더라도 할구의 핵붕괴가 일어나서 유사분열에 들어간다는 사실 (Table 1)과 비교하면 곧 알 수 있다. 그러나 이 억제효과는 할구가 세포주기의 어느 상태에 있느냐에 따라 달라진다. 성장중

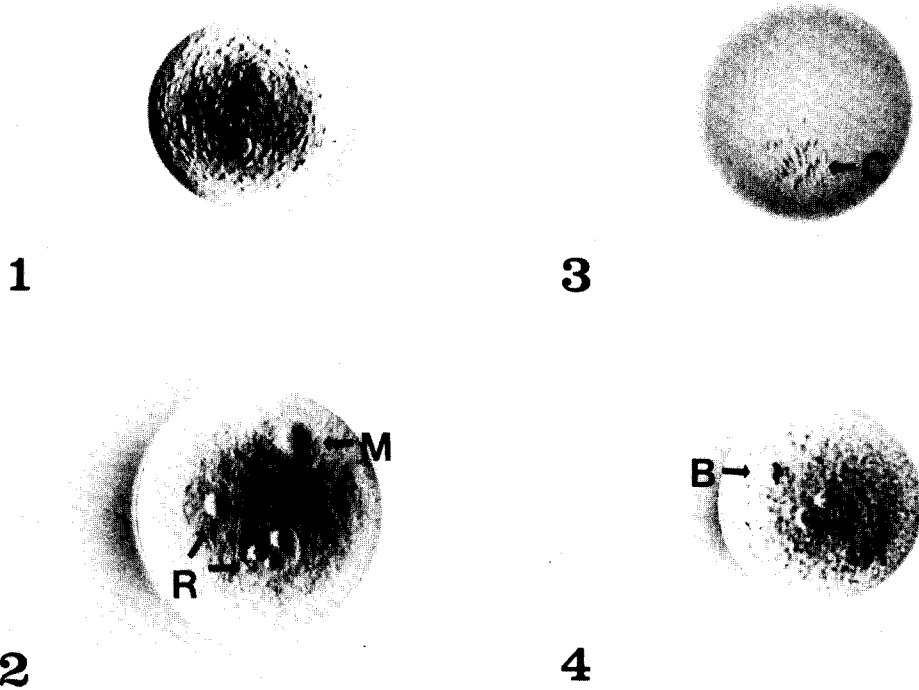
인 난자와 이미 세포분열로 들어간 후기 2세포기 할구(핵붕괴가 일어난)와 융합한 다음 배양한 융합체에서는 핵붕괴가 일어나고 염색체를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 성장중인 난자는 배양에서 결코 성숙 즉 핵붕괴를 일으키지 못한다는 사실을 고려하면 융합체에서 할구의 세포질이 오히려 성장중인 난자의 핵붕괴를 유도했다는 것을 의미한다.

#### 흰쥐(rat)의 성장중인 난자와 생쥐의 성장한 난자와의 융합

흰쥐의 성장중인 난자에도 생쥐나 돼지의 그것처럼 MIA 성질을 가지고 있는지를 확인하기 위하여 성장한 생쥐의 난자와 융합한 후 배양하여 보았다. 전보에서 밝힌 생쥐의 경우처럼 (Lee and Kwon, 1988) 흰쥐에서도 성장중인 난자끼리 융합한 것이나 융합에 실패한 성장중인 난자들은 24시간 배양에도 결코 핵붕괴를 일으키지 않았다 (Table 3). 또한 핵붕괴를 일으킨 생쥐난자와 성장중인 흰쥐 난자와 결합했을 때에는 붕괴를 이미 일으킨 생쥐난자의 영향으로 오히려 흰쥐의 성장중인 난자의 핵붕괴가 일어났다 (Table 3). 이에 대해 성장중인 난자와 성장한 생쥐난자를 융합하여 배양했을 때 그 융합비율이 1:1일 때에는 대부분의 융합체가 핵붕괴를 일으키었지만 2:1로 했을 때에는 18개의 융합체중 11개가 분명히 3개의 핵을 간직하고 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Table 3; Fig. 3). 이는 성장중인 흰쥐의 난자가 성장이 끝난 생쥐 난자의 핵붕괴를 억제했다는 것을 의미하며 이러한 억제효과는 종간의 특이성이 없다는 것을 시사해주고 있다.

#### 흰쥐의 성장중인 난자와 생쥐 2세포기 할구와의 융합

흰쥐의 성장중에 있는 난자가 생쥐의 배아 난할에 억제효과를 미칠 것인가를 조사하였다. 생쥐의 2세포기 배아에서 각 할구(1/2)를 분리해낸 후 독립적으로 배양을 했을 때에는 대부분의 할구들이 (80%) 난할을 하여 4세포기 할구로 되었다 (Table 4). 이에 대해 흰쥐의 성장중인 난자와 이들 할구들(간기에 있는) 융합했을 때에는 같은 배양기간에 융합체들의 핵붕괴가 억제되어 대부분



**Fig. 1.** Fusion of growing mouse oocyte and 2 cell blastomere in interphase(with nucleus) after 24 hour culture. Two nuclei(N) are visible (arrow). x 400

**Fig. 2.** Fusion of growing mouse oocyte and 2 cell blastomere in mitosis(nucleus disintegrated). Condensed chromosomes of both cells are visible (arrow) x 400

**Fig. 3.** Fusion of two growing rat oocytes and one large mouse oocyte after 24 hour culture. Two small GVs(R) from rat and one large GV(M) from mouse are visible. x 400

**Fig. 4.** Fusion of growing rat oocyte and 2 cell mouse blastomere in interphase after 24 hour of culture. Nuclei of both cells are visible (B-mouse blastomere, R - growing rat oocyte). x 400

두개의 핵을 그대로 보여주고 있었다(Table 4; Fig. 4). 이 때에도 역시 융합이 되지않은 할구들은 대부분 한번 분열을 일으키었다. 이러한 결과는 흰쥐 난자의 세포질에 있는 어떤 요인이 생쥐 배아의 난할을 억제한 것으로 해석되었다.

### 논 의

본 연구의 결과로 생쥐(mouse)나 흰쥐(rat)의 성장중인 여포난자(growing follicular oocyte)의 세포질에는 배아의 핵분열 즉 난할의 시작을 억제하는 요인이 있음을 보여주고 있다. 이 요인은 이

미 전보에서(Lee and Kwon, 1988) 확인한 성장중인 난자의 세포질에 존재하는 성숙억제요인(MIA)과 같은 것으로 추정되며 따라서 배우체(gamete)의 세포질에 나타나는 감수분열 억제요인이 배아의 분열에도 영향을 미친다는 것을 보여주고 있다.

난자의 세포질에 핵의 행동을 제어하는 요인들이 있다는 것이 양서류에서 처음 밝혀진 이래(Masui and Markert, 1971) 이러한 요인들에 대해 많은 연구가 있어왔다(reviewed by Masui, 1985). 그 중에 가장 많은 연구가 이루어진 것이 성숙된 난자의 세포질에 나타나는 MPF로서 이 요인은 난자의 성숙조절 뿐 아니라 일반적인 세포

**Table 3.** Fusion of rat growing oocyte with mouse immature or GVBD oocytes

Type of pairing	No. of oocytes fused/ No. of oocytes unfused	Nuclear phase of fused oocytes			Nuclear phase of unfused oocytes	
		2GVs	3GVs	GVBD	1GV	GVBD
Growing oocyte(R) + Growing oocyte(R)	15/11	15	—	—	11	—
Growing oocyte(R) + Large oocyte(M)	20/ 1	2	—	18	1(G)	1(L)
Growing oocyte(R) + GVBD oocyte(M)	7/ 2	—	—	7	2(G)	2(L)
2 growing oocyte(R) + Large oocyte(M)	18/ 0	1	11	6	—	—

Growing rat oocytes were isolated from ovaries of 15 day old rats by partial digestion and puncturing of the small follicles. The procedures for fusion and culture were the same as described in Table 2.

GV; germinal vesicle, GVBD; germinal vesicle breakdown (R); rat, (M); mouse, (G); growing oocyte, (L); large oocyte.

**Table 4.** Fusion of rat growing oocytes with mouse 2 cell blastomeres.

Type of pairing	No. of blastomeres fused/ No. of blastomeres unfused	Nuclear phase of fused blastomeres		Stage of unfused blastomeres	
		2NU	3NU	2C	4C
2C-blastomere(1/2) alone		—	—	9	36
Growing oocyte(R)+ 2C-blastomere(M, 1/2) (interphase)	17/3	15	2	1	2

Two cell blastomeres were obtained and divided into two groups. The blastomeres in one group were cultured alone in SECM for 24 hours and examined for their development into 4 cell blastomere. Those in another group were fused with rat growing oocytes and after culture, examined for the nuclear phase of the giant cells. NU; Nucleus, 2C, 4C; 2 cell or 4 cell, (R); rat, (M); mouse.

주기 조절에 참여할 것으로 추정되고 있다 (Gerhart *et al.*, 1984; Newport and Kirshner, 1984; Lohka *et al.*, 1988). 포유동물의 난자에서도 세포융합 방법을 사용하여 이들의 존재가 확인되고 있는데 난자의 MPF가 배아에 영향을 미쳐 배아의 핵붕괴를 유도할 수 있다는 것과 반대로 유사분열기에 있는 배아의 세포질이 성장중인 난자의 핵붕괴를 유도하는 것으로보아 배아의 세포질에도 핵붕괴가 일어나기전에 MPF의 성질이

나타난다는 것을 알 수 있게 되었다(Balakier, 1978, 1979; Balakier and Masui, 1986). 본 실험에서도 이 사실들이 확인되었으며 (Table 1, Table 2), 따라서 포유동물의 난화과정에서도 MPF가 중요한 역할을 한다는 것을 알았다.

세포질에서 분열을 억제하는 요인으로 알려진 것 중 포유동물에서 발견된 것으로 MIA를 들 수 있다. Fulka(1985)에 의해 처음 보고된 이 요인의 존재는 성장중에 있는 생쥐난자의 세포질이 자