

## 개구리 난자에서 Protein Kinase C의 활성화에 의한 Maturation Promoting Factor의 생성유도

유영란 · 임옥빈 · 나철호 · \*김지열 · 권혁방

전남대학교 자연과학대학 생물학과, \*의과대학 핵의학교실

개구리의 난자로 부터 maturation promoting factor(MPF)를 추출, 부분 분리하여 이들의 활성을 조사하고 이 물질의 생성과 protein kinase C(PKC)와의 관계를 조사하였다. 성숙된 난자를 분쇄한 후 초원심분리과정을 거쳐 MPF의 crude extract(CE)를 얻은 다음 ultrafiltration(UF)과 고속액체크로마토그래피를 거쳐서 3종류의 분획(peak I, II, and III)을 얻었다. 이들 분획을 *in vitro* assay와 autoradiography를 사용하여 확인한 결과 분획 II에서 MPF 활성이 있는 것을 알았다. 분리 단계에 따라 MPF의 정제도를 H1 histone kinase assay로 조사한 결과 UF를 거친 것은 CE보다 약 3배로, 분획 II에서는 약 117배로 증가한 것을 확인하였다. 또한 MPF 분획의 인산화를 autoradiography로 조사한 결과 45 KD 단백질을 포함한 수종의 난자 단백질이 강하게 인산화되었음을 알 수 있었다. PKC의 활성화가 난자내 MPF의 생성을 유도하는가를 보기 위하여 PKC의 활성화제인 12-O-tetradecanoyl phorbol 13 acetate(TPA)를 처리한 난자의 세포질 추출물을 미세주입법으로 조사한 결과 TPA 처리 후 6시간부터 난자내 MPF의 활성이 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 PKC의 활성화가 MPF의 생성을 유도하고, MPF의 활성화와 함께 일부 단백질들의 인산화를 통하여 궁극적으로 난자 성숙을 촉진했음을 시사한다.

**KEY WORDS:** Protein kinase C, Maturation promoting factor, Frog oocyte, H1 histone kinase, Microinjection

성장이 완료된 양서류의 난자는 제 1 감수분열 전기에 분열이 정지되어 있다가 번식기에 이르러 여포세포가 분비한 progesterone에 의해 감수분열이 재개된다(Masui and Clarke, 1979). Progesterone이 난자막을 자극하면 난자내 cAMP의 농도가 낮아지고 이를 시발점으로 일부 효소들의 활성화와 함께 단백질들의 인산화, 탈인산화 등이 일어나며 결국 maturation promoting factor(MPF)라는 단백질을 생성하게 된다(Maller, 1985, Smith, 1989). MPF는 핵붕괴와 염색체의 형성(난자성숙)을 유도하는 직접적인 요인이라고 알려져 있다(Masui and Clarke, 1979; Maller,

1985). 범개구리(*Rana pipiens*) 난자의 세포질에서 처음 발견된 이 MPF(Masui and Markert, 1971)는 근래에 난자에서 뿐 아니라 일반세포의 세포질에도 존재한다는 것이 알려지게 되었고(Kishimoto *et al.*, 1984; Tachibana *et al.*, 1987) 점차 세포주기의 주요 조절인자로 인식이 되어가고 있다(Gerhart *et al.*, 1984; Newport and Kirschner, 1984; Gerhart *et al.*, 1985; Hunt, 1989). 특히 MPF의 생성은 신호전달체계의 하나인 phosphatidylinositol turnover system(PI system)과 연계되어 있다고 알려져 있다(Eckberg 1988; Smith, 1989).

본인 등은 개구리 난자를 사용하여 PI system의 한 구성요소인 PKC를 12-O-tetradecanoyl phorbol 13 acetate(TPA)로 자극을 하면 난자의 성숙을 일으킨다는 것을 보고한 바 있다(Kwon

본 연구는 1990년도 한국과학재단과 교육부 기초과학 육성연구비(BSRI-'90-412)의 지원에 의해 수행되었음.

and Lee, 1991). 이 결과는 PKC가 progesterone의 자극과 MPF 생성과정의 중간경로에 존재한다는 것을 의미한다. 이미 제노푸스, 범개구리 및 *Spisula*에서 PKC의 활성화가 난자의 성숙을 유도한다는 보고가 있었다(Stith and Maller, 1987; Eckberg, 1988). 그러나 일부의 학자들은 제노푸스에서 TPA로 PKC를 활성화시키면 핵붕괴가 억제되고 staurosporine으로 PKC의 활성을 억제하면 오히려 난자의 성숙이 일어난다고 보고하였다(Bement and Capco, 1989; Smith, 1989). 따라서 난자 성숙 과정에서의 PKC의 역할은 아직 확실하게 정립되지 않고 있다. 이는 TPA의 처리를 받은 난자의 세포질이 급격히 쪼개어 핵붕괴 여부를 판정하는데 모호한 점이 많기 때문이다.

본 연구에서는 TPA를 처리한 난자에 정상적인 경우처럼 핵붕괴 이전에 과연 MPF가 생성되는지의 여부를 조사하고자 하였다. 개구리(*Rana*)를 사용하여 MPF를 추출, 분리한 경우가 보고되지 않았으므로 제노푸스에서 사용한 방법을 준용하여 이를 부분 분리하고 이들의 활성을 *in vitro*와 *in vivo* assay로 확인하였다. 다음 TPA를 처리한 난자에서 과연 MPF가 나타나는지의 여부를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 난자배양

국내에 서식하는 북방산개구리(*R. dybowskii*), 참개구리(*R. nigromaculata*) 및 옴개구리(*R. rugosa*) 성체를 사용하였다. 권 등(Kwon *et al.*, 1988, 1989)이 이미 기술한 방법에 따라 개구리를 채집하고 이들로부터 여포난자들을 취하여 생체외 배양을 수행하였다. PKC를 활성화시키기 위하여 TPA를 사용하였으며 대조군으로 유사한 phorbol ester이면서 이 효소를 활성화시키지 못하는 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate(4 $\alpha$ -PDD)를 사용하였다. 이들의 농도는 전보에서(Kwon and Lee, 1991) 얻은 결과에 의거하여 정하였다.

### MPF의 추출 및 부분 분리

#### 1단계. MPF의 추출

MPF의 추출물(crude extract, CE)을 얻는 과정은 Lohka 등(1988)의 방법을 준용하였다. 추출 재료로는 주로 frog pituitary homogenate(FPH)를 복강주사하여 얻은 북방산개구리의 배란된 난자를 사용하였다. 배란된 난자의 쥬리층을 2% L-cystein(pH 7.8)으로 제거하고, 10% amphibian Ringer(AR)로 10회 정도 세척한 다음, MPF 추출 용액(80 mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate, 50 mM NaF, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 300  $\mu$ M phenylmethylsulfonylfluoride)으로 다시 세척한 후 다음 추출과정으로 들어갔다. 세척한 난자를 150,000 g에서 2시간 동안 원심분리한 다음 지방층과 침전층 사이에 있는 투명한 부분을 취하여 ATP와 cytochalasin B가 각각 1 mM과 10  $\mu$ g/ml이 되도록 넣어준 후, 다시 초원심분리기(Beckman, SW 55 rotor)를 사용하여 250,000 g에서 2시간 동안 원심분리하여 상층액을 추출물로 취하였다.

#### 2단계. 미세여과에 의한 농축

1단계의 MPF 추출물을 ultrafiltration(Amicon, cut off 10,000)으로 탈염한 후 동결건조법으로 농축시켰다.

#### 3단계. DEAE column 고속액체크로마토그래피(HPLC)

추출 완충액으로 미리 평형시킨 고속액체크로마토그래피용(high performance liquid chromatography) DEAE column(Protein Pak Glass DEAE-5PW, 0.8  $\times$  7.5 cm, Waters)에 2단계에서 여과, 농축된 MPF 추출물을 주입한 다음 KCl 농도구배(0.0~0.5 M)를 이용하여 1 ml/min 유속으로 용출시키면서 1 ml씩 분획을 얻었다. 이들 분획을 액체질소로 얼려 -70°C에 보관하였다.

### MPF 활성 측정

본 실험에서는 *in vivo* assay와 함께 *in vitro* assay를 병용하여 MPF의 활성을 확실하게 확인하고자 하였다.

#### 1) 미세주입법에 의한 MPF의 확인

배란된 난자 혹은 progesterone이나 TPA의 처

리를 받은 난자로부터 부분 분리한 시료를 가지고 다음과 같은 방법으로 MPF의 존재를 확인하였다. 각 추출 단계별로 얻은 시료들(CE, ultrafiltrated, fractions obtained by DEAE HPLC)을 100 nl씩을 취하여 cycloheximide(10  $\mu\text{g/ml}$ )를 포함한 AR에서 30분간 전처리한 참깨구리의 미성숙 난자에 micromanipulator(Leitz)를 사용하여 미세주입한 후에, 30분간 손상 회복 시간을 주고 난 다음 AR 용액으로 옮겨 20시간 동안 계속 배양하였다. 배양이 끝난 후 난자들을 10% trichloroacetic acid에 고정한 후 해부현미경 아래에서 이들을 미세핀셋으로 쪼개어 핵의 유무를 조사하였다. 주입된 양은 oil에 증류수 방울을 만들어 이의 직경을 micrometer(Nicon)로 측정하여 계산하였으며, MPF의 작용은  $\text{Ca}^{2+}$  ion에 매우 민감하게 억제됨으로(Gerhart *et al.*, 1984) 미세주입과 회복 과정은  $\text{Ca}^{2+}$ -free AR에서 수행하였다. 대조군에는 추출 완충액 혹은 미성숙난자로부터 얻은 시료를 동량 주입하였다. 각 단계별로 분리한 재료들은 동일개체로부터 얻은 것이었으며 각 시료당 15-20개의 미성숙 난자에 주입하였다.

## 2) 체외 인산화에 의한 MPF의 활성 측정

각 분리과정에서 MPF의 활성이 증가하는 정도를 알기 위하여 단계별로 시료의 histone kinase 활성도를 Labbe 등(1988)의 방법을 준용하여 측정하였다. Histone H1 kinase의 활성이 MPF의 활성에 의해 증가된다고 알려져 있으므로(Labbe *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1988) 시료에 첨가된 histone이 인산화되는 정도를 조사하였다. 각 시료를 25  $\mu\text{l}$ 씩 취하여 1 mg/ml Histone H1(type III S)과 10 mM  $\text{MgCl}_2$  및  $3 \times 10^5$  cm<sup>2</sup>/pmol의  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP를 포함한 용액에 넣어 최종부피가 60  $\mu\text{l}$ 이 되도록 조절한 후 25°C에서 10분 동안 인산화반응을 시켰다. Whatman P81 phosphocellulose 여과지에 반응액을 점적하여 인산화 반응을 종결시킨 뒤, 180 mM phosphoric acid로 5회 여과지를 세척한 다음 histone에 결합된 <sup>32</sup>P의 방사선량을 scintillation counter로 측정하였다. 이때의 방사선량은 인산화된 양 즉 histone kinase의 활성을 의미한다.

## 자기방사법에 의한 MPF의 활성 확인

시료내 MPF의 활성을 자기방사법(autoradiography)으로도 조사하였다. 미세주입법과 histone kinase 활성도 측정으로 추정되는 MPF 활성 분획의 단백질 인산화 양상을 SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis(SDS-PAGE:Laemmli, 1970)와 자기방사법으로 조사하였다. 시료 25  $\mu\text{l}$ 에  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP가 10<sup>7</sup> cpm이 되도록 넣어 25°C에서 10분간 인산화 반응을 시킨 뒤 시료들을 SDS-PAGE를 사용하여 분리하였다. 전기영동을 수행한 polyacrylamide gel을 건조시킨 다음 Kodak X-Omat AR film과 intensifying screen(Dupont)으로 덮은 후 -70°C에서 1주간 동안 노출시킨 후 현상하여 autoradiogram을 얻었다.

## 전기영동

자기방사법을 시행하기 전에 시료들을 Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하여 단백질을 먼저 분리하였다. Separation gel로는 9~12% linear gradient gel을 사용하였으며, stacking gel의 acrylamide 농도는 4.5%이었다. 전기영동이 끝난 gel을 Coomassie blue R-250으로 염색한 후 단백질의 분리 양상을 조사하였다. 이때 표준단백질로는 bovine serum albumin(MW 66 KD), egg albumin(MW 54 KD), trypsinogen(MW 24 KD),  $\beta$ -lactoglobulin(MW 18.4 KD) 및 lysozyme(MW 14.3 KD)을 사용하였다.

## 단백질의 농도 측정

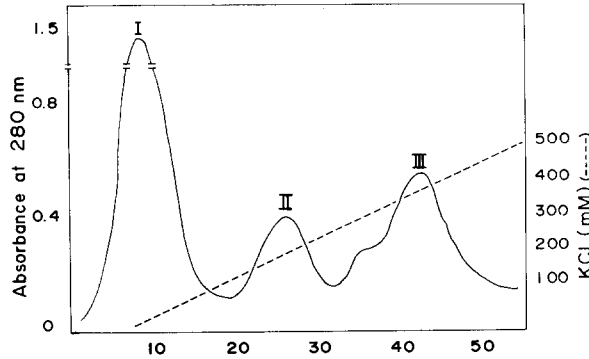
단백질의 농도는 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 표준단백질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량하였다.

## 결 과

### MPF 분획의 분리 및 활성 확인

먼저 MPF를 포함하고 있는 배란된 난자를 재료로 하여 MPF의 분리과정에 들어가서 분리단

계별로 MPF의 활성을 조사하여 보았다. Fig. 1은 DEAE-HPLC 과정을 거친 결과를 크로마토그램으로 나타낸 것이다. 이런 과정을 두번 반복한 결과 거의 같은 양상을 보여주었으므로 그 한 예를 나타낸 것이다. 크로마토그램 전개상에서 보여주듯이 3단계를 거친 시료는 세개의 큰 분획으로 분리되었다(peak I, II and III)(Fig. 1).



**Fig. 1.** Elution profile of ultrafiltrated samples through HPLC-DEAE ion exchange chromatography. Crude extracts of oocytes were ultrafiltrated and applied to HPLC DEAE column pre-equilibrated with MPF extraction buffer and then eluted with KCl gradient (0.0~0.5 M).

위에서 얻은 분획 중 어느 것에서 MPF의 활성이 나타나는지를 *in vitro* assay와 자기방사법의 두가지 방법을 사용하여 조사하였다. 첫째 *in vitro* assay로 시료에  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP를 첨가한 후 인산화된 단백질의 양을 조사하고(histone minus group) 아울러 기질로 histone을 첨가하여(histone plus group) H1 histone kinase 활성도가 증가하는지의 여부를 조사하여 보았다(Table 1). 그 결과 분획 II에서 인산화된 단백질의 양이 다른 분획에 비하여 6배 이상 강하게 나타났고 histone의 존재하에서는 20배에 가까운 인산화의 증가가 일어난다는 것을 알았다. 분획 II에서 전반적으로 인산화가 증가한 것과 첨가된 histone의 인산화가 강하게 일어난 것은(H1 histone kinase 활성의 증가) 이 분획에 MPF의 활성이 있다는 것을 보여주는 것이다.

두번째로 자기방사법을 사용하였다. 이는 제노푸스 난자에서 MPF의 활성화가 45 KD 단백질을 인산화시킨다는 보고를 근거로(Gautier *et al.*, 1989)한 것이다. 상기 각 시료를 전기영동으로 분

**Table 1.** MPF activity of the fractions obtained from HPLC-DEAE ion chromatography in the ovulated oocytes of *R. dybowskii*.

	Control	Peak I	Peak II	Peak III
Histone -	220	580	4,099	690
Histone +	156	609	15,119	758

MPF activities in the fractions were estimated by measuring H1 histone kinase activity as described in Materials and Methods. Radioactivity was measured in the samples which was incubated without (Histone -) or with addition of exogenous histone (Histone +). Numbers represent the cpm of  $^{32}\text{P}$  incorporated into proteins in the fraction. Experiments were repeated twice. The relative amounts of radioactivity was very similar between experiments and an example of the data was presented in the Table.

\*Total counting: 267,333 cpm.

리한 후 histone의 첨가 없이 단백질의 인산화 양상을 자기방사법으로 조사하여 보았다. Fig. 2에서 보듯이 각 실험군에 동량의 시료를 전기영동에 loading 시켰을 때 분획 II(IIa, fraction No. 23 plus 24; IIb, fraction No. 25 plus 26)에 몇가지 단백질이 강하게 인산화됨을 볼 수 있었으며 여기에 45 KD 단백질도 포함됨을 알 수 있었다. 이에 대해 crude extract(CE)나 ultrafiltration(UF)을 거친 시료 혹은 HPLC를 거친 다른 분획에서는(분획 III) 인산화된 단백질을 거의 확인할 수 없었다(Fig. 2). 이 결과는 자기방사법으로도 분획 II에서 MPF가 존재한다는 것을 분명히 보여주는 것이다.

#### 분리단계에 따른 MPF의 정제도

분리 단계에 따라 어느 정도로 MPF가 정제되어 가는지를 보기 위하여 각 분리단계의 시료내에 histone을 첨가한 다음 상기한 바와 같이 시료에 인산화된 방사선량을 측정된 다음 이 수치를 Labbe 등(1988)의 방법에 의거하여 MPF의 정제도(purification fold)로 환산하여 보았다(Table 2). Crude extract(CE)를 기준으로하여 볼 때 ultrafiltration 과정을 거친 분획은 약 3배로, HPLC로 분리과정을 거친 분획 II에서는 약 117배로 활성이 증가한 것을 알 수 있었다(Table 2). 또한 이 활성분획을 전기영동하여 인산화정도를



**Fig. 2.** Phosphorylation pattern of MPF fractions after HPLC chromatography. Sample fractions were electrophoresed after preincubation with  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP as described in Materials and Methods. IIa represents the autoradiogram of 23 + 24 fraction and IIb represents that of 25 + 26 fraction. The phosphorylating activity of crude extract (CE) or ultrafiltrated samples (UF) was very low and did not appear as the band. The arrow indicates the phosphorylation of 45 KD protein.

자기방사법으로 확인한 결과 CE나 ultrafiltration을 거친 시료(UF)보다 HPLC로 분리를 거친 분획이 훨씬 많은 양의 histone을 인산화시켰음을 전기영동상으로 확인할 수 있었다(Fig. 3). 역시

이 방법으로도 MPF의 존재를 확인할 수 없었던 분획 III에서는 첨가된 histone을 인산화시키는 능력은 매우 미약하였다(Fig. 3).

#### PKC의 활성화에 의한 MPF의 생성유도

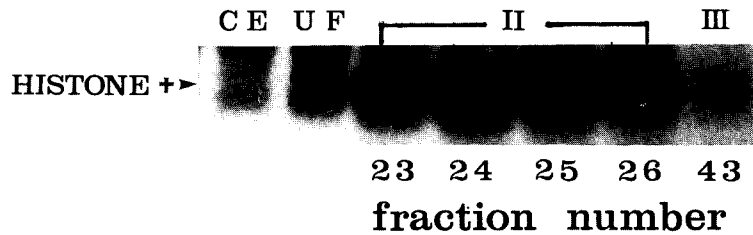
TPA를 처리하여 간접적으로 PKC를 활성화시키면 양서류 난자의 성숙을 유도한다는 사실은 서론에서 기술한 바와 같이 핵붕괴 여부의 판정에 모호성이 있으므로 아직도 불확실하다. 본 실험에서는 TPA의 처리가 과연 progesterone처럼 난자의 핵붕괴 이전에 MPF의 생성을 유도하는지를 조사하여 보았다. 통상적으로 호르몬 자극 후 핵붕괴는 9-12시간에 일어남으로(Kwon and Lee, 1991) TPA 혹은 progesterone을 6시간 처리한 후 이들로부터 CE와 UF를 얻어서 분석시료로 삼았다. HPLC 분획을 얻기 위해서는 많은 재료가 필요함으로서 이 분획에 대한 조사는 생략하였다. 대조군으로 배란된 난자 및 미성숙 난자에서 같은 방법으로 얻은 재료를 사용하였다. 이때 시료내 MPF의 유무에 대한 판정은 미세주입법을 사용하여 얻었다. MPF는 이종간에도 그 효과가 나타남으로(Masui and Clarke, 1979) 배란된 난자는 북방산개구리의 것을 사용하였으며 나머지 실험군은 참개구리의 난자를 사용하였다. 이들 시료를 참개구리의 미성숙 난자에 주입한 결과를 Fig. 4에 표시하였다. 그림에서 보여 주듯이 배란된 난자 및 progesterone을 처리한 난자의 세포질에서 추출한 시료는 물론 TPA의 처리를 받은 난자에서 추출한 시료도 매우 효율적으로(약 70% 이상) 난자의 성숙을 유도함을 알 수 있었다. 이에 대해 미성숙난자로부터 얻은 시료는 거

**Table 2.** Partial purification of MPF and change of MPF activity as estimated by the level of their H1 histone kinase activity in *R. dybowskii* oocytes.

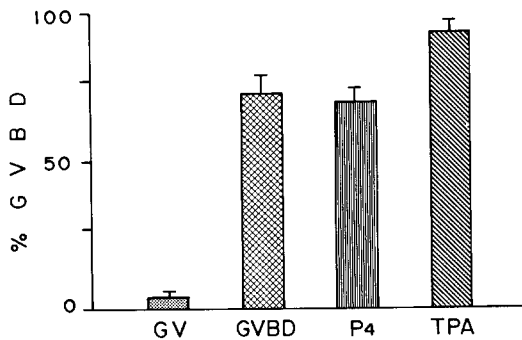
Steps	Total protein mg	Total activity unit	Specific Activity unit/mg	Recovery %	Purification fold
Crude extract	301	21.8	0.072	100	1.0
Ultrafiltration	110	20.7	0.188	95	2.6
DEAE HPLC	1.76	14.8	8.409	68	116.8

\*1 unit: 1  $\mu$  mol of  $^{32}\text{P}$  transferred per min at 25°C ( $\mu$ mol/min/ $\mu$ l).

\*\*The enzyme activity was calculated by the method of Labbe et al., 1988.



**Fig. 3.** H1 kinase activity of partially purified MPF. Peak II fractions (No. 23, 24, 25 and 26) obtained from the HPLC-DEAE chromatography were assayed for H1 kinase activity by autoradiography as described in Materials and Methods. The density of the band represents the activity of H1 kinase. The data indicate that specific activity of H1 histone kinase increased markedly during their purification procedure. CE; curde extract, UF; ultrafiltrate.



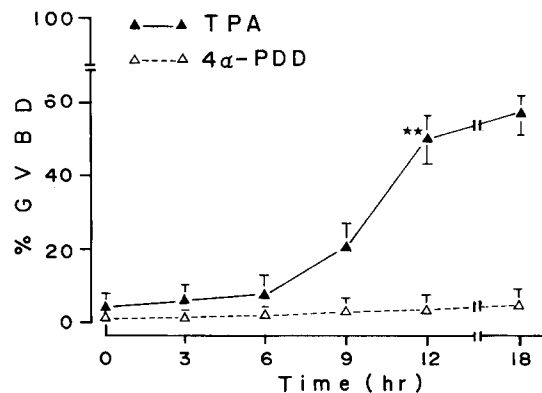
**Fig. 4.** MPF assay by microinjection of partially purified MPF from the ovulated, immature and matured oocytes with stimulation by progesterone or TPA. Immature oocytes (with GV) of *R. nigromaculata* were used for recipient of the MPF materials. After the oocytes were microinjected with the materials and cultured for about 20 hours in AR solution, their maturation was examined. Donor matured oocytes were obtained from *R. dybowskii*. Those donor oocytes were cultured for 6 hours in the presence of progesterone (0.5  $\mu$ g/ml) or TPA 10  $\mu$ M) and MPF was extracted. MPF extract was prepared from the ovulated oocytes with the same procedure except culture. Crude extracts were ultrafiltrated as described in Methods. Each bar in the figure represents the average (mean  $\pm$  SEM) % GVBD of 80 oocytes (10 per incubation, 8 incubations). GV, immature GV oocytes; GVBD, ovulated oocytes; P4, progesterone-stimulated oocytes; TPA, TPA-stimulated oocytes.

의 성숙을 유도하지 않았다(약 7%). 이 결과는 TPA를 처리하여 PKC를 활성화시키면 6시간 내에 참개구리 난자의 세포질에 MPF가 생성된다는 것을 보여주고 있다.

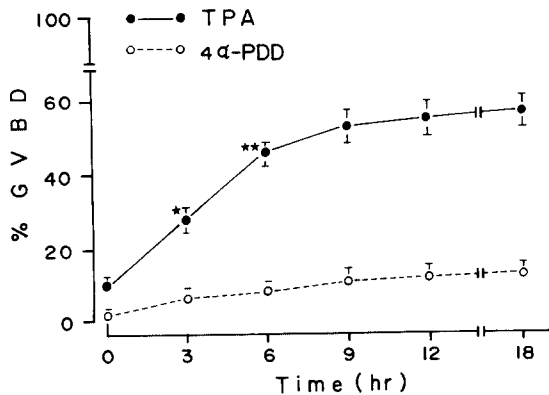
**PKC의 활성화에 의한 옴개구리 난자의 성숙유도**

옴개구리 난자들은 다른 개구리의 것과는 달리 생체의 배양에서 호르몬(FPH, progesterone) 자

극을 주어도 정상적인 난자성숙을 일으키지 않으나 TPA를 처리하면 핵붕괴(성숙)을 일으킨다는 사실을 예비실험에서 확인한 바 있다(미발표 결과). 본 실험에서는 옴개구리의 난자를 MPF 판단을 위한 수여자(receptient)로 사용할 수 있는지의 여부를 조사하기 위하여 우선 TPA에 의한 성숙유도 시기를 조사하였다. 배양액에 TPA를 처리한 후 일정시간 마다 핵붕괴 여부를 조사한 결과 배양 9시간 후 부터 핵붕괴를 일으키기 시작하여 12시간내에 50% 이상의 난자들이 핵붕괴를 일으키었다(Fig. 5). 비록 성숙율은 다른 개구리의 그것보다 낮지만 성숙을 일으키는 시기는 근본적으로 다른 개구리의 난자와 같았다(Kwon and



**Fig. 5.** Time course of TPA-induced oocyte maturation of *R. rugosa* *in vitro*. Isolated follicles from each animals were cultured in AR medium containing 10  $\mu$ M of TPA or 1.6  $\mu$ M of 4 $\alpha$ -PDD and examined for their GVBD at designated time point during culture period. Each point represents average (mean  $\pm$  SEM) % GVBD of 80 oocytes (20 per incubation, 4 incubations). \*\*P < 0.01, when compared with control by Student's t-test.



**Fig. 6.** Oocyte GVBD after injection of MPF extract to immature oocytes. MPF extract was produced from oocytes exposed to TPA or 4 $\alpha$ -PDD. Donor and recipient oocytes were obtained from *R. rugosa*. Donor oocytes were cultured in the presence of TPA (10  $\mu$ M) or 4 $\alpha$ -PDD (1.6  $\mu$ M) for various incubation time and then oocytes were collected and MPF were extracted by ultrafiltration. Extract of donor oocytes (about 70-100 nl) were microinjected into the recipient GV oocytes. After injection, the recipient oocytes were cultured for 18 hours and examined for their maturation (GVBD). Each point in the figure represents average (mean  $\pm$  SEM) % GVBD of 40 oocytes (10/incubation, 4 incubations). TPA, cytoplasmic extract from TPA treated oocytes; 4 $\alpha$ -PDD, cytoplasmic extract from 4 $\alpha$ -PDD treated oocytes. \*P < 0.05, when compared with control by Student's t-test. \*\*P < 0.01.

Lee, 1991). 따라서 TPA의 처리는 다른 개구리에서처럼 옴개구리의 난자성숙을 유도한다는 것을 재확인 할 수 있었다.

#### 옴개구리에서 PKC의 활성화에 의한 MPF의 생성 시기

상기 실험에서 옴개구리의 난자가 TPA에 의하여 핵붕괴를 일으킴으로 다른 개구리처럼 MPF를 생성한다는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서는 TPA의 자극 후 몇시간에 MPF가 생성되는지를 옴개구리를 사용하여 조사하였다. 옴개구리 난자에 TPA를 처리한 후 일정시간 마다(3-16시간) 난자로부터 MPF를 추출하여 제 2 단계 (ultrafiltration)까지 분리한 후 각 시료를 미성숙 난자에 미세주입하였다. 주입 후 이들을 18시간 배양한 후 난자의 성숙여부를 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서 보여주듯이 TPA 처리후 3시간이 지난 난자의 세포질에서 부터 미

성숙 수여 난자(receipient)의 핵붕괴를 유도하기 시작하여(약 27%) 6시간 처리한 난자에서는 50% 이상의 핵붕괴를 유도하였다. 이에 대해 PKC를 활성화시키지 못하는 4 $\alpha$ -PDD를 처리한 대조군에서는 거의 성숙을 유도하지 않았다(Fig. 6).

## 고 찰

본 실험의 결과로 TPA를 처리한 난자의 세포질에 MPF가 존재한다는 것을 알았다. 이는 개구리 난자의 성숙과정에 protein kinase C가 능동적으로 참여하며 이 효소의 활성화가 난자성숙에 필수적인 MPF의 생성을 유도했다는 것을 시사한다. 아울러 개구리(*Rana*) 난자로부터 MPF를 추출, 부분분리하는 과정에서 이들의 활성이 증가하는 것을 *in vivo*와 *in vitro* assay를 통하여 보여 주었다.

양서류에서 MPF에 관한 연구는 주로 제노푸스를 사용하여 수행되어 왔다. 그러나 제노푸스는 국내에서 구하기가 어렵기 때문에 MPF의 생물학적 중요성에 비하여 국내에서는 이에 관한 연구가 거의 이루어지지 않았다(Lee *et al.*, 1992). 본 연구에서는 초원심분리, 미세여과 및 고속액체크로마토그래피를 이용하여 북방산개구리의 배란된 난자의 세포질에서 MPF를 부분 분리하여 crude extract(CE)보다 약 117배 정도로 MPF 활성이 증가된 분획을 얻었다(Table 1). 비록 이러한 정제도는 제노푸스나(Lohka *et al.*, 1988) 어류에서(Yamashita *et al.*, 1992) 정제한 것에 비하면(1000-3000배 농축) 매우 빈약한 결과이지만 본 연구의 목적인 MPF의 정확한 확인방법 수립과 PKC와의 관계를 조사하는 데에는 긴요하게 이용될 수 있었다. MPF의 활성을 보다 정확히 확인하기 위하여 고전적인 방법이면서도 현재도 가장 신빙성이 있는 방법중의 하나인 미세주입법(*in vivo* assay)과 아울러 단백질의 인산화반응을 이용한 자기방사법 및 H1 histone kinase assay로 측정하는 *in vitro* assay 방법도 사용하였다. 이러한 모든 방법에서 시료의 분리단계에 따라 MPF의 활성이 공히 증가하는 것을 확인할 수 있었다

(Tables 1, 2 and Figs. 2, 3).

호르몬이 난자의 성숙을 유도하는 신호전달체계에서 PKC의 역할이 아직도 불분명하다. 일부의 학자들은 PKC의 활성화가(Stith and Maller, 1987; Kwon and Lee, 1991), 일부의 학자들은 PKC의 불활성화가 난자의 성숙유도에 필요하다고 주장하고 있다(Smith, 1989; Varnold and Smith, 1990). 이러한 논란은 전술한 바와 같이 양서류 난자에 TPA를 처리하면 세포질의 심한 섞임(cytoplasmic mixing)이 일어나서 핵붕괴를 성숙판단의 기준으로 삼을 때에 애매한 점이 많기 때문이다. 본 연구에서는 이 문제를 해결하기 위하여 핵붕괴 이전에 생성되는 MPF가 TPA를 처리한 난자에서 생성되는지를 조사하였다. 이의 근거는 비록 핵붕괴는 비정상적일지라도 MPF가 생성된다는 증거가 있으면 PKC의 능동적 역할에 대한 보완적인 증거를 제시하는 것이기 때문이다.

TPA의 효과를 조사할 때에는 자발적 성숙을 일으키는 북방산개구리는 제외하고 참개구리와 옴개구리의 난자를 사용하여 조사하였다. 이 시약을 처리한 참개구리 난자로부터 세포질을 추출(CE), 미세여과 과정을 거친 후 이 시료를 참개구리 미성숙 난자에 주입했을 때 매우 효율적으로 난자의 핵붕괴를 유도할 수 있었다. 이 효율은 배란된 난자나 progesterone을 처리한 것에서 추출한 시료와 거의 같은 것이었다(Fig. 4). 특히 TPA를 외부에서 처리한 것 처럼 세포질의 섞임 현상도 전혀 나타나지 않고 정상적인 핵붕괴를 일으킨 것이 관찰되었다(결과 표시하지 않음). 따라서 이 결과는 TPA에 의한 PKC의 활성화가 난자내 MPF의 생성을 유발했다는 것을 분명히 보여주고 있다.

미세주입법을 사용하여 MPF의 존재를 확인할 때에는 수여 난자(receptient)의 상태가 매우 중요하다. 왜냐하면 물리적인 자극 자체가 난자를 활성화시켜(activation) 비정상적인 핵붕괴를 일으킬 가능성이 있기 때문이다(Masui and Clarke, 1979). 본 연구에서는 이 점을 보완하기 위하여 난자의 성숙을 잘 일으키지 않는 옴개구리를 수여자로 사용하기도 하였다. 이 개구리의 난자는 호르몬에 의해서도 성숙을 일으키지 않는 독특한 성

질을 가졌다. 그러나 TPA를 처리하면 핵붕괴를 일으키고 핵붕괴를 일으키는 시기도 정상적인 다른 개구리의 그것과 거의 같았다(Fig. 5). 옴개구리의 난자를 TPA로 자극한 후 일정시간마다 세포질을 추출하여 미세여과를 거친 다음 미성숙 옴개구리의 난자에 주입 한 후 핵붕괴 여부를 조사한 결과 Fig. 6에서 보여 주듯이 3시간에서부터 수여난자(receptient oocyte)의 성숙을 부분적으로 유도하기 시작하여 6시간부터 효율적으로 난자의 성숙을 유도하였다. 이에 대해  $4\alpha$ -PDD에 노출되었던 난자의 세포질은 성숙유도 능력이 거의 없었다(Fig. 6). 이러한 time course는 외부에서 TPA를 처리하여 성숙을 유도시킨 것에 비하면 약 3시간 정도 빨리 진행된 것이다(Figs. 5 and 6). 이 결과는 옴개구리에서도 제노푸스처럼 난자의 핵붕괴에 앞서 MPF가 생성되었다는 것을 보여주는 것이다.

본 실험에서 부분 분리된 MPF 분획이 기질로 넣어준 histone을 인산화시킬 뿐만 아니라(Fig. 3), 세포질 내의 여러 단백질 특히 45 KD 단백질을 인산화시킨다는 것을 알았다(Fig. 2). 이 결과는 MPF에 의한 난자 성숙 과정에서 34 KD 단백질이 탈인산화되고 45 KD 단백질이 인산화된다는 Gautier 등(1989)의 보고와 일치하는 것이다. 이러한 결과들은 TPA가 난자의 PKC를 활성화시키고, PKC의 활성화는 MPF를 인산화하고, 인산화된 MPF가 아직 밝혀지지 않은 경로를 통하여 난자의 핵붕괴를 유도하는 것을 뜻하며, 정상적인 난자의 성숙이나 프로제스테론에 의한 난자의 성숙도 PKC 활성화-MPF 생성을 매개로하여 이루어짐을 시사한다. 난자의 성숙과정에서 PKC의 활성화가 어떤 경로를 통하여 MPF의 생성을 유도하게 되는지는 앞으로 연구해야 할 중요한 과제라고 생각된다.

## 인용문헌

- Bement, W. M. and D. G. Capco, 1989. Intracellular signals trigger ultrastructural events characteristic of meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* **255**: 83-191.
- Eckberg, W. R., 1988. Intracellular signal transduction



- and amplification mechanisms in the regulation of oocyte maturation. *Biol. Bull.* **174**: 95-108.
- Gautier, J., C. Norbury, M. J. Lohka, P. Nurse, and J. L. Maller, 1988. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc<sup>2+</sup>*. *Cell* **54**: 433-439.
- Gautier, J., T. Matsukawa, P. Nurse, and J. Maller, 1989. Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34 *cdc2* protein kinase during the cell cycle. *Nature* **339**: 626-629.
- Gerhart, T., M. Wu, and M. Kirschner, 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* **98**: 1247-1255.
- Gerhart, J., M. Wu, M. Cyert, and M. Kirschner, 1985. M-phase promoting factors from eggs of *Xenopus laevis*. *Cytobios* **43**: 335-347.
- Hunt, T., 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**: 268-274.
- Kishimoto, T., K. Yamazaki, Y. Kato, S. S. Koide, and H. Kanatani, 1984. Induction of starfish oocyte maturation by maturation promoting factor of the mouse surf clam oocytes. *J. Exp. Zool.* **231**: 293-295.
- Kwon, H. B., C. H. Cho, and C. G. Choi, 1988. Studies on the induction of oocyte maturation of Korean frogs (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) *in vitro*. *Korean J. Zool.* **31**: 87-94.
- Kwon, H. B., Y. K. Lim, M. J. Choi, and R. S. Ahn, 1989. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* *in vitro*: Seasonal influence, progesterone production and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.* **252**: 190-199.
- Kwon, H. B. and W. K. Lee, 1991. Involvement of protein kinase C in the regulation of oocyte maturation in amphibian (*Rana dybowskii*). *J. Exp. Zool.* **257**: 115-123.
- Labbe, J. C., M. G. Lee, P. Nurse, A. Picard, and M. Doree, 1988. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc<sup>2+</sup>*. *Nature* **335**: 251-254.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, W. K., S. K. Ko, and H. B. Kwon, 1992. Studies on the maturation promoting factor of Korean frog oocytes cultured *in vitro*. *Korean J. Zool.* **35**: 37-44.
- Lohka, M. J., M. K. Hayes, and J. L. Maller, 1988. Purification of maturation promoting factor, an intracellular regulator of early meiotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3009-3013.
- Lowry, O. H. and N. J. Roserbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Maller, J. L., 1985. Regulation of amphibian oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **37**: 185-221.
- Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979. Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **37**: 185-282.
- Masui, Y. and C. L. Markert, 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**: 129-146.
- Newport, J. W., and M. W. Kirschner, 1984. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell* **37**: 731-742.
- Smith, L. D., 1989. The induction of oocyte maturation: Transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development* **107**: 658-699.
- Stiith, B. J. and J. L. Maller, 1987. Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocyte by 12-O-tetradecanoylphorbol 13 acetate. *Exp. Cell Res.* **169**: 514-523.
- Tachibana, K., N. Yanagishima, and T. Kishimoto, 1987. Preliminary characterization of maturation promoting factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **88**: 273-282.
- Vamold, R. L. and L. D. Smith, 1990. Protein kinase C and progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes. *Development* **109**: 597-604.
- Yamashita, M., S. Fukada, M. Yoshikuni, P. Bulet, T. Hirai, A. Yamaguchi, Y.-U. Lou, Z. Zhao, and Y. Nagahama, 1992. Purification and characterization of maturation-promoting factor in fish. *Dev. Biol.* **149**: 8-15.

(Accepted April 30, 1992)

---

**Induction of Maturation Promoting Factor in *Rana* Oocytes by Protein Kinase C Activation  
*in vitro*.**

Young Ran Yoo, Work-Bin Im, Chul Ho Ra, \*Ji Yeul Kim, and Hyuk Bang Kwon  
(Department of Biology, \*Department of Nuclear Medicine,  
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

Maturation promoting factor (MPF)-enriched cytoplasm was prepared from the matured oocytes of Korean frogs and partially purified. After the crude extract (CE) of MPF was prepared from matured oocytes by ultracentrifugation, CE was applied to ultrafiltration and HPLC-DEAE ion chromatography. MPF activity of the fractions obtained during purification steps were characterized by H1 histone kinase activity assay and microinjection assay. MPF was purified about 117 fold over the starting homogenate on the basis of histone kinase activity. Several proteins including 45 KD protein appeared to be phosphorylated by endogenous protein kinase with the addition of  $^{32}\text{P}$ -ATP to the partially purified cytoplasm. When immature oocytes were microinjected with the cytoplasmic extract of the oocytes which were stimulated with TPA, MPF activity clearly appeared from 6 hours of TPA treatment. Thus these results suggest that the MPF was activated and oocyte maturation was followed by the exposure of the immature oocytes to TPA.