

Mass Spectrometry를 이용한 난자 특이적인 Diva와 상호작용하는 단백질의 동정

차병원 여성의학연구소¹, 중앙대학교 자연과학대학 생명과학과²,
보건복지부 지정 생식의학 및 불임 유전체 연구센터³, 포천중문 의과대학교 생명과학대학원⁴

윤세진¹ · 김정웅² · 최경희² · 이숙환^{1,3,4} · 이경아^{1,4}

Identification of Oocyte-Specific Diva-Associated Proteins using Mass Spectrometry

Se-Jin Yoon¹, Jung-Woong Kim², Kyung-Hee Choi², Sook-Hwan Lee^{1,3,4}, Kyung-Ah Lee^{1,4}

¹CHA Research Institute, Fertility Center, CHA General Hospital, ²Laboratory of Molecular Biology,
Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Chung-Ang University, Seoul,

³Genome Research Center for Reproductive Medicine and Infertility of Korea Ministry of Health and
Welfare, Seoul, ⁴Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Objective: We previously described that Diva is highly expressed in matured metaphase II (MII) oocytes compared to immature germinal vesicle (GV) oocytes in mouse.¹ We report here that the expression of Diva transcript as well as protein is oocyte-specific. To elucidate its physiological role in oocyte, the binding partner(s) of Diva has been identified by using immunoprecipitation (IP) followed by Mass Spectrometry.

Methods: NIH/3T3 cells were transiently transfected for 24 h with either empty vector for control or FLAG-tagged mouse Diva construct, and IP was performed with anti-FLAG antibody. The immuno-isolated complexes were resolved by SDS-PAGE on a 12% gel followed by Coomassie Blue staining. For in-gel digestion, 15 bands of interest were excised manually and digested with trypsin. All mass spectra were acquired at a positive reflector mode by a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA). Proteins were identified by searching the NCBI nonredundant database using MASCOT Peptide Mass Fingerprint software (Matrixscience, London).

Results: Diva-associated complexes were formed in FLAG-tagged mouse Diva-overexpressed NIH/3T3 cells via IP using anti-FLAG-conjugated beads. Among the excised 15 bands, actin and actin-binding proteins such as tropomyosin, tropomodulin 3, and α -actinin were identified. Binding between Diva and actin or tropomyosin was confirmed by IP followed by Western blot analysis. Both bindings were also detected endogenously in mouse ovaries, indicating that Diva works with actin and tropomyosin.

Conclusions: This is the first report that immuno-isolated Diva-associated complexes are related to actin filament of the cytoskeletal system. When we consider the association of Diva with actin and tropomyosin, oocyte-specific Diva may play a role in modulating the cytoskeletal system during oocyte maturation.

Key Words: Diva, Oocyte-specific, Immunoprecipitation, Mass spectrometry, Oocyte maturation

포유류의 난소 안에 존재하는 대부분의 난자는 로 난포 안에 존재하다가 난자의 성장과 난포세포 제1 감수분열 전기 (prophase I)에 멈추어 있는 상태 의 증식으로 배란 직전의 난포 (preovulatory follicle)

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-13, 포천중문의과대학교 차병원
Tel: (02) 3468-3441, Fax: (02) 563-2028, e-mail: leeka@ovary.co.kr

*본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

까지 자라면 뇌하수체에서 분비되는 급격한 LH의 증가 (LH surge)에 의해서 배란이 일어난다. 난포 안의 미성숙의 Germinal vesicle (GV) 난자는 배란과 함께, 멈추어 있던 제1 감수분열을 재개하여 제2 감수분열 중기 (metaphase II, MII)까지 진행하게 되고 이처럼 성숙된 MII 난자가 정자와 만나 수정이 이루어지면서 제2 감수분열을 마친다.²³ 난자의 감수분열이 완성되어 제1극체가 방출되는 핵성숙과 더불어 세포질 성숙도 이루어져야만 정상적인 수정과 함께 착상전 초기배로의 발달이 이루어지는데, 이와 같은 일련의 과정을 난자성숙이라고 한다. 본 연구진은 현재까지도 확실히 밝혀져 있지 않은 난자성숙 과정의 조절 기작을 규명하기 위하여 Annealing Control Primer (ACP) System을 이용하여 생쥐의 GV 난자와 MII 난자에서 차이 나게 발현하는 유전자의 목록을 얻은 바 있다.¹ 이들 유전자 중에서 Bcl-2 homolog인 Diva를 성숙한 난자에서 높게 발현하는 유전자 중의 하나로 동정하였다.

척추동물의 Bcl-2계 단백질은 세포사멸을 억제하는 antiapoptotic 인자 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1)와 세포사멸을 유도하는 proapoptotic 인자 (Bax, Bad, Bak, Bcl-xS, Bid, Bik, Bok)로 나뉘어진다.⁴⁵ Bcl-2계 단백질들은 네 군데의 염기서열에 있어서 보존된 부위가 존재하는데 이를 Bcl-2 homology domains (BH1, BH2, BH3, and BH4)라 부른다. Diva는 구조적으로는 anti-apoptotic 인자에 포함되며 Boo (Bcl-2 homologue of ovary)로도 불리는데 이를 동정한 최초의 연구에서 Diva 유전자의 발현양상은 난소의 과립세포와 정소의 정세포 (spermatid)에서 매우 높게 발현한 반면,⁶ 또 다른 연구에서는 생쥐의 여러 조직 중에서도 난소에 특이적으로 발현하는 유전자로 새롭게 동정되었다.⁷ 특별히, Diva는 그 기능에 대해서도 서로 다르게 보고되었는데, 이는 세포사멸을 촉진하는 proapoptotic 기능을 갖는다는 보고와,⁶⁸ 이와는 달리 세포사멸을 억제하는 antiapoptotic 기능을 갖는다는 연구보고다.⁷⁹

Diva 유전자가 결여된 Diva-null 생쥐에 대한 연구에서는, Diva를 만들지 못하는 생쥐와 정상 생쥐 간의 난포발달을 비롯한 일련의 표현형 (phenotype)에는 전혀 차이가 없으므로써, Diva가 정상적인 난소의 발달을 위해서 필수적이지는 않다는 것과 Diva

가 결여되었더라도 다른 단백질이 이의 기능을 대신해 줄 수 있을 것이라 보고되었다.¹⁰ 이처럼 그 발현양상과 기능에 있어서 상반되게 보고된 Diva에 대해서 본 연구자들은 먼저 그 유전자와 단백질의 발현분포를 조사하고자 하였고, 또한 난자성숙 과정에 관여하는 Diva의 기능을 밝혀내기 위하여 Diva와 결합하여 상호작용하는 단백질을 동정하고자 본 연구를 수행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

생후 1일, 5일, 4주령 된 ICR 생쥐의 암컷으로부터 각각의 난소를 분리하고, 4주령 된 ICR 생쥐로부터 여러 조직을 적출하여 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 용액을 넣고 균질화 시킨 후 total RNA를 분리하여 Northern blot analysis에 이용하였고, *in situ* hybridization을 위해 생후 2주령과 4주령의 난소를 각각 적출하여 슬라이드를 제작하였다. Diva 유전자와 단백질의 발현양상을 관찰하기 위하여 4주령 생쥐에 PMSG (5 IU/ml)를 주사하여 48시간째에 배란 전 난포를 얻어 이로부터 과립세포, 난구세포, 난자를 각각 분리하였다.

2. Northern blot analysis

생쥐의 난소를 포함하는 다양한 조직으로부터 얻어진 20 µg의 total RNA를 1% agarose-formaldehyde gel에 전기영동한 후 nylon membrane으로 이동시켰다. 생쥐의 난소로부터 얻어진 cDNA로 Diva 특이적인 primer: forward, 5'-CTCTGTGACTAGGCAGATCC-3'; reverse, 5'-GTCTCTAGGCTGGAGGACTT-3'로 PCR을 수행하여 얻어진 551 bp의 Diva cDNA를 Megaprime DNA labeling kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)를 사용하여 [³²P]-dCTP로 radiolabeling한 후 이를 probe로 사용하였다. Rapid-hyb 완충액 (Amersham Pharmacia)에 방사선 동위원소가 표지된 Diva probe을 희석시켜 65°C, overnight hybridize 시킨 후에, 2X SSC-0.1% SDS에 membrane을 세척하고 -70°C에서 48시간 동안 X-ray film에 감광시켜 유전자 발현을 분석하였다.

3. *In situ* hybridization

생쥐의 난소 조직을 4% paraformaldehyde에서 하루 동안 고정시킨 후 paraffin block을 제작하였으며, 5 µm 두께의 연속절편을 코팅 처리된 ProbeOn 슬라이드 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 부착하였다. 실험에 사용할 Diva RNA probe는 위에서 설명된 Diva 특이적인 primer로 PCR하여 pGEM-T vector (Promega, Madison, WI)에 subclone한 후 *in vitro* transcription kit (Promega)를 이용하여 제작하였다. Subclone된 Diva cDNA는 Sal I 제한효소로 절단하여 T7 또는 SP6 RNA polymerase로 전사시켜 anti-sense probe와 control로 사용할 sense probe를 각각 얻었다. 이때 DNA template (1 µg/µl; 1 µl), 5X Trans buffer (4 µl), RNasin (2 µl), RNA polymerase (2 µl), DIG RNA labeling mix (2 µl; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 100 mM DTT (2 µl) 및 DEPC-dH₂O를 전체 20 µl가 되도록 첨가하여 37°C에서 6시간 합성한 후, RNase-free DNase I (Invitrogen)을 처리하였다. Probe 반응물을 G-50 Columns (Amersham Pharmacia)으로 정제한 후 농도가 100 µg/ml이 되도록 Hybe buffer (50% formamide, 5X SSC, 1 µg/ml Torula yeast RNA, 100 µg/ml heparin, 1X Denhardt's solution, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 0.5 mM EDTA)로 희석하였다. 준비된 조직 슬라이드를 파라핀 제거 과정을 거쳐 4% paraformaldehyde에 실온에서 10분간 고정시키고 0.1 M triethanolamine (TEA) 용액으로 5분간 반응시켜서 0.25% acetic acid가 포함된 0.1 M TEA 용액으로 실온에서 10분간 처리하였다. RNA probe를 처리한 후 조직이 마르지 않도록 파라 필름을 덮어서 65°C humid chamber에서 overnight hybridize 시켰다. 이후 65°C로 예열된 2X 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 reagent가 포함된 MAB 용액으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. MAB 용액으로 세척 후

BCIP-NBT (Sigma St. Louis, MO)로 실온에서 발색 후 PBS로 세척하고, Nuclear Fast Red로 대조 염색 후 수용성 mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA)으로 봉입하였다.

4. RT-PCR 및 Western blotting

분리된 과립세포, 난구세포, 난자로부터 Dynabeads mRNA Direct Kit (Dyna, Oslo, Norway)를 이용하여 mRNA를 분리하고 MMLV reverse transcriptase (Promega)와 oligo (dT) primer를 사용하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성한 후 위에 설명된 Diva 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Gdf-9 유전자 발현을 난자 특이적인 control로 사용하였고 과립세포와 난구세포에서는 발현하면서 난자에서는 발현하지 않는 FSH receptor (FSHR)의 유전자 발현과 internal control로서 GAPDH 발현을 비교하였다. Diva의 단백질 발현을 알아보기 위해서 위에서 분리된 각각의 세포에 lysis 완충용액 (50 µM Tris-HCl, 150 µM NaCl, 0.02% Sodium-Azide, 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF)을 이용하여 단백질을 추출한 뒤 12% SDS-polyacrylamide gel 상에 전기영동한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF; Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA) membrane에 transfer 하였다. 이를 5% skim milk를 포함한 TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.6) 완충용액과 1시간 동안 반응시킨 후 goat anti-Diva polyclonal 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)로 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이후에 horseradish peroxidase가 부착된 이차항체와 실온에서 1시간 동안 처리하여 Enhanced chemiluminescence (ECL; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 방법으로 단백질 발현을 확인하였다.

5. 세포 배양과 Transfection

NIH/3T3 세포를 10% FBS와 항생제 용액 (100 U/ml of penicillin G, 100 µg/ml of streptomycin)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. FLAG-tagged Diva protein을 만들기 위하여 full length mouse Diva 유전자를 encoding하는 DNA fragment를 제한효소 처리하여 pCMV-FLAG eukaryotic

expression vector에 cloning 하고 염기서열 분석을 통해 확인하였다. Lipofectamine (Invitrogen)을 이용하여 실험군으로는 pCMV-FLAG-Diva를 대조군으로는 유전자가 없는 pCMV-FLAG empty vector를 transfection하였고, 24시간 후에 세포를 모아 Diva의 과발현을 확인한 후 IP를 수행하였다.

6. IP를 통한 Mass Spectrometry (MS) 분석

Transfection 된 NIH/3T3 세포로부터 lysis 완충용액을 이용하여 단백질을 추출한 뒤 500 µg의 total protein extracts에 anti-FLAG 항체를 섞어 4°C에서 3시간 동안 반응시키고, 세척단계를 거쳐 면역추출물을 얻었다. 이를 12% SDS-polyacrylamide gel 상에 전기영동 하였고 Coomassie Blue 염색을 통해 단백질 발현양상을 관찰하였다. 대조군에서는 관찰되지 않으면서 Diva 유전자가 발현하는 실험군에서만 확인되는 밴드를 오려내어 trypsin을 사용하여 in-gel digestion 한 후 MS 분석을 시행하였다. MS는 한국 기초과학지원연구원 (KBSI, Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행되었는데 그 방법을 간략히 기술하면, 모든 mass spectra는 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA)에 의해 positive reflector mode에서 얻어졌다. 이렇게 얻어진 단백질들은 MASCOT Peptide Mass Fingerprint software (Matrix-science, London)을 이용하여 NCBI nonredundant database를 찾아서 동정하였다. MS/MS search를 위해서는, 선택된 펩티드 분자의 ion peak의 fragmentation을 이용하여 NCBI database search를 통해 단백질을 동정하였다.

7. 난소에서 Diva-interacting 단백질의 확인

MS를 통해 분석된 Diva-interacting 단백질 중에서 actin과 tropomyosin이 난소에서 Diva와 binding 하는지 확인하기 위해 생후 4주령의 ICR 생쥐로부터 난소를 적출하여 lysis 완충용액을 이용하여 단백질을 추출하였고, 난소 특이적인 Diva 발현에 대한 대조군으로 생후 8주령의 정소를 이용하였다. 난소와 정소로부터 얻어진 500 µg의 total protein extracts에 anti-Diva polyclonal 항체를 섞어 4°C에서 3시간 동안 반응시키고, 세척단계를 거쳐 면역추출물을 얻었다. 12% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동한

후 PVDF membrane에 transfer 한 후 5% skim milk를 포함한 TBS-T 완충용액으로 1시간 처리한 후 mouse anti-actin 또는 rabbit anti-tropomyosin 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)로 실온에서 1~3시간 동안 반응시켰다. 이후에 horseradish peroxidase가 부착된 이차항체와 실온에서 1시간 동안 반응시키고 ECL 방법으로 Diva와의 interaction을 확인하였다.

결 과

1. Diva 유전자 및 단백질의 발현양상

생쥐의 다양한 조직에서 Diva 유전자의 발현양상을 Northern blot을 통해 알아보았는데, 흥미롭게도 Diva는 난소 조직에서만 특이적으로 발현함을 알 수 있었다 (Figure 1). 생후 1일, 5일, 4주령의 발달단계별 난소에서 Diva 유전자는 원시난포만 존재하는 출생직후의 1일자에서는 발현하지 않고 원시난포들이 성장을 시작하여 일차난포로의 발달이 활발한 생후 5일자와 모든 발달단계의 난포들이 존재하는 4주령의 난소에서 매우 높게 발현하였다. 이처럼 난소 특이적으로 발현하는 Diva의 난소내 발현위치를 알아보기 위하여, 성장하는 난포의 발달이 활발한 생후 2주령 난소와 Northern blot을 통해 높은 발현이 관찰된 4주령 난소를 이용하여 *in situ* hybridization을 시행하였다. 생후 2주령의 난소에서 피질 (cortex) 부분에 대부분 존재하는 원시난포에서 Diva는 발현하지 않으며 원시난포를 제외한 왕성하게 성장하고 있는 preantral 단계의 난포의 난자에서만 특이적으로 발현하였고 (Figure 2A), 생후 4주령 난소에서는 antrum이 형성된 난포에서도 난자에 특이적이며 핵을 제외한 세포질 부분에서 특이적으로 발현하였다 (Figure 2B).

In situ hybridization을 통해 관찰된 난자 특이적인 Diva 유전자의 발현을 다시 한번 확인하고자 배란전 난포로부터 과립세포, 난구세포, 난자를 각각 분리하여 RT-PCR을 시행하였다 (Figure 3A). 하나의 배란전 난포에서 얻어진 난자와 난구세포에 해당하는 cDNA와 난구세포와 동량의 cDNA를 이용한 과립세포를 PCR에 사용하였다. GAPDH 유전자 발현은 모든 세포에서 발현한 반면 Diva 유전자는 난자에서만 발현하는 양상을 보였는데 이는 난자 특이

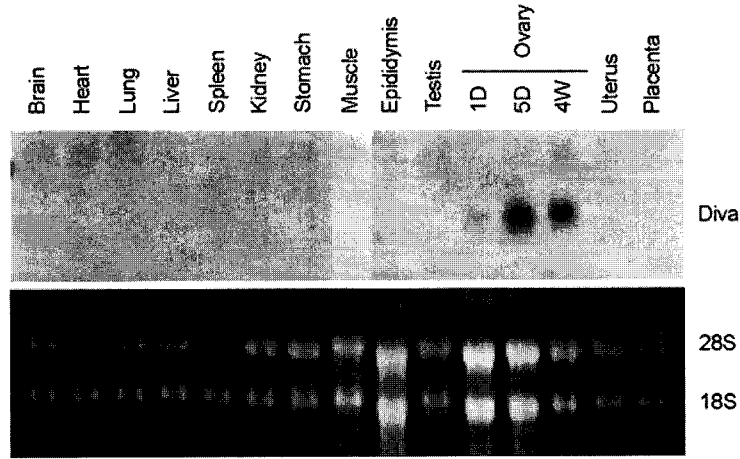


Figure 1. Northern blot analysis of mouse Diva mRNA in various tissues. Total RNA was extracted from multiple mouse tissues (20 μ g/lane) as indicated with 18S and 28S. In the case of ovary, postnatal 1-day (1D), 5-day (5D), and 4-week (4W) mouse ovaries were used.

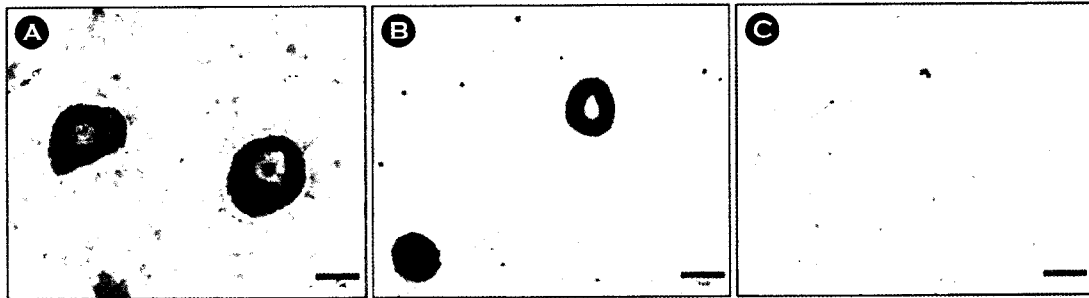


Figure 2. *In situ* hybridization of Diva mRNA. Mouse ovaries of 2-week-old (A and C) and 4-week-old (B) were used. The mRNA expression pattern of Diva is oocyte-specific with antisense probe reaction (A and B) but negative with sense probe reaction (C). Scale bars represent 25 μ m (A), 50 μ m (B) and 200 μ m (C).

적인 유전자로 잘 알려져 있는 Gdf-9의 발현양상과 동일하였다.¹¹ 반면에 FSHR의 유전자는 난자에서는 발현하지 않고 과립세포와 난구세포에서만 발현하는 양상을 보였다. 이처럼 난자에 특이적인 유전자인 Diva의 단백질 발현을 알아보기 위해 Western blot을 수행하였다 (Figure 3B). 난소에서 분리한 50개의 배란전 난포에 해당하는 과립세포와 100개의 난자-난구세포 복합체에서 분리된 난구세포, 그리고 200개에 해당하는 난자를 각각 실험에 사용하였다. 대조군으로서 β -Tubulin의 발현은 과립세포, 난구세포, 난자에서 모두 높게 발현한 반면, Diva는 난자에서만 발현함으로써 난자 특이적인 단백질 발현양상을 나타내었다.

2. MS를 이용한 Diva와 상호작용하는 단백질의 동정

난자에 특이적으로 발현하는 Diva의 기능을 유추하기 위하여 Diva와 결합하여 상호작용하는 단백질을 분석하였다. 대조군으로는 유전자 없는 pCMV-FLAG empty vector를, 실험군으로는 Diva를 encoding하는 pCMV-FLAG-Diva를 과발현 시킨 NIH/3T3 세포주를 각각 얻어서, anti-FLAG 항체를 이용한 IP를 통해 Diva와 결합하는 면역복합체를 형성하게 하였다. 이를 12% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였고 Coomassie Blue 염색을 통해 단백질 발현양상을 관찰하였다 (Figure 4). 두 군에

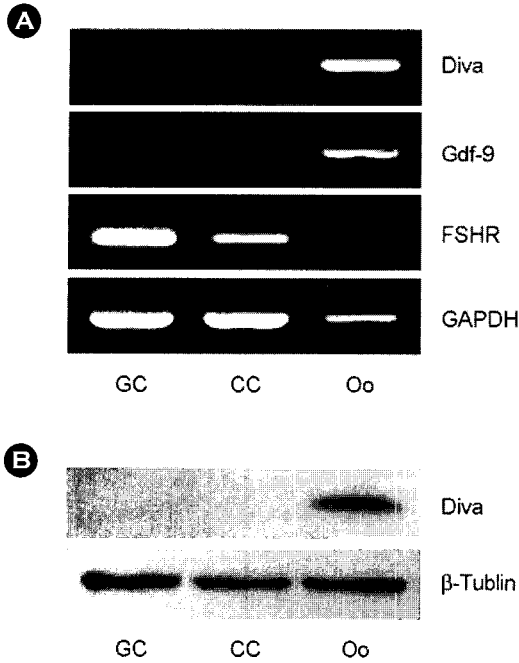


Figure 3. Confirmation of oocyte-specific Diva mRNA and protein using RT-PCR (A) and Western blot analysis (B). Mural granulosa cells (GC) and cumulus-oocyte complexes (COCs) from preovulatory follicles were collected by needling the ovaries of 4-week-old mice that had been injected 48 h previously with 5 IU PMSG. Full grown GV oocytes (Oo) and cumulus cells (CC) were dissociated from COCs using a fine-bored glass micropipette. (A) RT-PCR analysis of Diva transcripts from mRNA isolated from GC, CC, and oocytes. For the PCR reaction, cDNA of single oocyte equivalent was used as templates for amplification. The expression of Gdf-9 mRNA was used as an oocyte-specific marker, FSHR was used as a positive control for granulosa and cumulus cells but negative for oocyte, and GAPDH was used as an internal control. (B) Western blot analysis of Diva protein. Protein lysates of 200 oocytes, cumulus cells from 100 COCs, and mural granulosa cells from 50 preovulatory follicles were loaded into each lane. β -Tublin was used for loading control.

서 모두 관찰되는 IgG를 통해 면역복합체가 잘 형성되었음을 확인할 수 있었고 (open arrowheads) MS 분석을 위해 Diva를 과발현하는 세포주에서만 관찰되는 밴드 15개를 오려내어 in-gel digestion 하였다. MS/MS 분석을 통한 단백질 동정 결과, Diva가 과발현된 세포주에서만 관찰된 21 kDa 크기의 단백질은 Diva임이 확인하였고 (solid arrowhead), Diva와 결합하는 단백질로서는 대표적으로 actin (open arrow, between 40 and 55 kDa)과 그 외에 α -actinin, tropo-

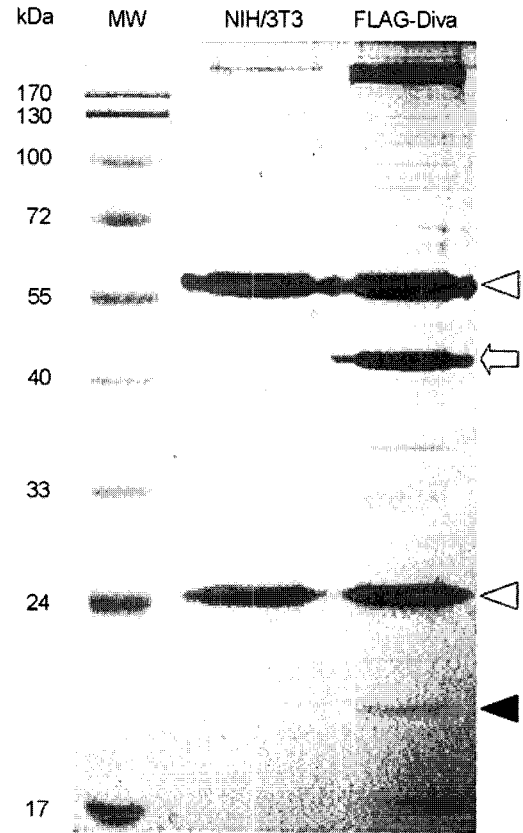


Figure 4. Anti-FLAG-agarose purification of Diva-associated proteins. Total protein extracts were prepared from NIH/3T3 cells transiently transfected for 24 h with empty vector or FLAG-Diva expressing vector. Protein extracts were incubated with anti-FLAG-agarose beads. Anti-FLAG-agarose elutes from equivalent amount of transfected cells (500 μ g) were analyzed by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and proteins were visualized by Coomassie Blue staining. The positions and relative molecular masses in kilodaltons (kDa) of protein size markers are indicated on the left. Protein-containing bands were excised, and proteins present in gel slices were identified by mass spectrometry. MW, the protein size markers; NIH/3T3, anti-FLAG-agarose elutes from NIH/3T3 cells transfected with pCMV-FLAG empty vector; FLAG-Diva, NIH/3T3 cells transfected with pCMV-FLAG-Diva vector. Open arrowheads, heavy and light chain of immunoglobulin G (IgG); solid arrowhead, FLAG-tagged Diva. Open arrow between 40 and 55 kDa was identified as β - and γ -actin.

myosin, tropomodulin 3 등의 Actin-binding 단백질을 동정할 수 있었다.

Diva를 과발현하는 NIH/3T3 세포주에서 면역복합체를 형성하는 actin과 tropomyosin이 실제 난소 조

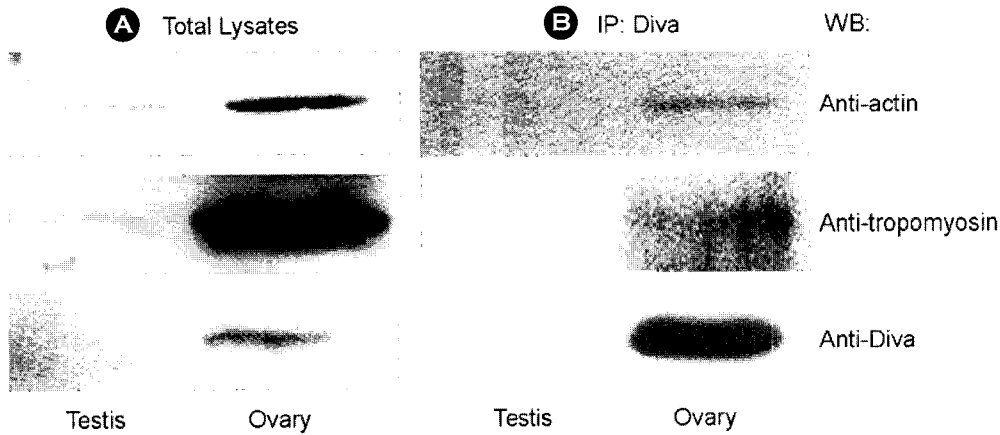


Figure 5. Identification of Diva-associating protein candidates using immunoprecipitation (IP) followed by Western blot analysis (WB). **(A)** Western blot analysis. Total protein lysates (20 μ g) from mouse testis and ovary were electrophoresed on 12% SDS-PAGE and probed with anti-actin, -tropomyosin, or -Diva antibody for Western blot analysis of each protein. Testis was used as control for the negative expression of Diva protein. **(B)** IP-Western blot analysis. For IP, 500 μ g of total protein lysates from ovaries and testes were immuno-isolated with anti-Diva antibody. Anti-Diva-agarose elutes were electrophoresed on 12% SDS-PAGE and probed with anti-actin, -tropomyosin, or -Diva antibody for the confirmation of Diva-associated proteins.

직에서도 Diva와 결합하는지 알아보았다 (Figure 5). Diva는 난소 조직에서만 특이적으로 발현하기 때문에 정소 조직을 대조군으로 사용하여 20 μ g의 동량의 단백질을 추출물로 Western blot을 시행한 결과, actin과 tropomyosin 모두 정소보다 난소에서 매우 높게 발현하였고 Diva는 난소에서만 발현하였다 (Figure 5A). Diva와의 결합여부를 확인하고자 정소와 난소로부터 500 μ g의 동량의 단백질을 추출물을 얻어 anti-Diva 항체와 반응시켜 면역복합체를 형성한 후 각각의 항체로 Western blot을 시행한 결과, actin과 tropomyosin 모두 Diva와 결합함을 확인함으로써 Diva는 이 두 단백질과 난소에서 상호작용함을 알 수 있었다 (Figure 5B).

고 찰

본 연구는 Diva 유전자가 생쥐의 여러 조직 중에서도 난소에 특이적임을 Northern blot을 통해 새롭게 규명하였고 또한 Diva 유전자와 단백질의 발현 양상이 난자에 특이적임을 처음으로 관찰하였다. 현재까지 보고된 대부분의 Bcl-2 family에 속하는 유전자들이 난소를 포함하는 다양한 조직에 분포하는 것과는 달리, Bcl-2 homolog인 Diva만이 유일하게 생

쥐의 여러 조직 중에서도 난소에서 특이적으로 발현하며 정소에서는 전혀 발현하지 않았다. 반면에 지금까지의 연구보고에 의하면, Diva 아미노산 서열과 47%의 상동성을 가지는 Bcl-B (Bcl-2 family protein resembling Boo) 유전자는 난소와 정소를 포함하는 인간의 다양한 조직에서 발현하며,¹² Bcl-2는 흰쥐의 난소, 정소, 자궁 등의 생식기관에서 매우 높게 발현하며 Bcl-x와 Bax 모두 난소와 정소를 포함하는 다양한 조직에서 발현한다.¹³ Proapoptotic family에 속하는 Bad는 난소와 정소를 포함하는 흰쥐의 다양한 조직에서 발현하며, Bok은 난소, 정소, 자궁과 같은 생식기관에 특이적으로 발현하며 난소의 과립 세포에 매우 높게 존재한다.^{14,15} Antiapoptotic한 Mcl-1의 유전자 발현은 난소와 정소를 포함하는 흰쥐의 대부분의 조직에서 높게 발현하며 난소에서는 주로 협막세포에 분포하고 있다.¹⁶ 더욱 흥미로운 것은 *in situ* hybridization을 통한 연구에서 Diva 유전자가 난소의 난자에만 특이적으로 발현한 것은 Diva 유전자가 과립세포에서 높게 분포함을 보고한 이전의 연구와는 상반되는 결과이다.⁶

정상적인 난소의 발달 과정에서 일어나는 난포세포의 퇴화 즉 폐쇄 (atresia)은 세포사멸 (apoptosis) 기작을 통해 일어난다고 알려져 있는데,^{17,18} 난자의

사멸은 난포의 폐쇄를 거쳐 간접적으로 소멸된다고 알려져 있으나 그 기전은 아직 불명확하다. 지금까지 알려진 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 특징은 난소에서는 주로 과립세포 또는 협막세포에 존재하면서 세포사멸을 조절한다.^{15,16} 그러나 본 연구자들에 의해 새롭게 규명된 난자에 특이적으로 발현하는 Diva의 세포사멸에의 기능은 아직까지 알려져 있지 않으므로 연구되어야 할 영역으로 사료된다.

방사선을 통한 세포사멸 유도 실험에서, p53-null mutant는 방사선에 자극되지 않은 반면, Diva-null mutant 생쥐의 난소는 wild type과 동일하게 방사선에 의해 난포세포의 사멸 결과를 보였다.¹⁰ 이는 Diva가 난포세포의 사멸을 직접적으로 조절하지는 않는다는 것을 시사한다. 그러나 세포를 이용하여 Diva 유전자를 과발현 시킨 여러 연구보고에 따르면 Diva는 세포사멸을 유도하기도 하고 억제하기도 한다는 여러 가지 연구 결과가 보고되어 있다. Diva를 최초로 동정한 연구에서 Diva를 과발현 시킨 293T, Ramsey, T47D 세포는 모두 세포사멸이 유도되었다.⁶ 반면, interleukin-3 (IL-3) 의존적인 FL5.12와 Baf-3 세포에서 모두 IL-3를 제거하고 배양하였을 때와 방사선에 의해 유도되는 세포사멸은 Diva를 과발현 시킴으로써 억제되었고, 인간 glioma 세포에서 유도된 세포사멸 또한 Diva의 과발현으로 억제되었다.^{7,9}

이처럼 Diva에 대한 지금까지의 연구보고들은 그 발현양상은 물론 기능에 있어서도 상반되는데, 본 연구자들은 Diva의 기능을 규명하기 위해 이와 결합하는 상호작용 단백질을 동정하고자 본 연구를 수행하였다. 기능을 모르는 목표 단백질에 대하여 많은 연구자들은 이와 상호결합하는 단백질을 찾아내어 기능을 예측하는데, 이처럼 단백질-단백질 상호결합을 찾는 것으로 가장 널리 이용되는 방법은 yeast two-hybrid로서 이는 1989년 처음 제안되었다.¹⁹ 그러나 본 연구에서는 단백질 상호결합을 알아내는 방법으로서 yeast를 통하지 않고 mammalian 세포에서 바로 찾아내는 방법으로 IP를 통한 MS 분석을 이용하였다. 첫 시도로 Diva가 난소 특이적인 것을 생각하여 생쥐 난소로부터 단백질을 추출한 후 직접 Diva에 대한 항체로 결합 단백질을 찾아내기 위하여 시중에 판매되는 Diva에 대한 항체 (Santa Cruz

Biotechnology Inc.)로 IP를 수행하였는데, 불행히도 Diva와 결합하는 다양한 단백질을 성공적으로 분리하지 못하였다 (data not shown). 따라서 endogenously 발현되는 단백질이 아닌, 다른 연구를 통해 보고된 바와 같이 target 단백질을 과발현 시킴으로써 발현이 유도되는 다양한 상호결합 단백질을 동정하고자 하였다.^{20,21} NIH/3T3 세포에 FLAG-tagged Diva를 transfection 시키고 FLAG에 대한 항체로 면역복합체를 형성하게 한 후 MS 분석을 통해 Diva와 결합한 단백질들을 동정하였는데 결과에서 보여지는 것과 같이 Diva를 과발현 시킨 세포주에서만 나타나는 단백질을 gel 상에서 확인할 수 있었으며 우리는 15개의 밴드를 성공적으로 오려내고 이들을 MS를 통해 동정할 수 있었다.

Div와 결합하는 단백질로 actin, tropomyosin, tropomodulin 3, α -actinin 등이 동정되었는데 뒤의 세 가지는 모두 actin과 결합하여 actin filaments (microfilaments)를 구성하고 이를 안정화 시키는 것으로 알려져 있다. 난자의 성숙 동안에 actin filaments는 염색체 이동, 상동 염색체 분리, cortex 발달과 유지, polarity 형성, peripheral cortical granule 이동, 제1극체 방출 등에 관련되어 있다.²² Actin과 tropomyosin이 Div와 결합함을 생쥐의 난소 조직에서도 확인함으로써 이 두 단백질 모두 난소 특이적인 Div와 상호작용함을 규명하였다. 결론적으로, 난소 특이적이며 난자 특이적인 유전자로 동정된 Div는 난소의 발달 과정에서 actin-binding 단백질들과 결합하여 상호작용하면서 난자의 성장, 배란 후 난자성숙, 그리고 그 이후 수정 및 배아발달 등 일련의 dynamic events를 조절하는 중요한 역할을 하고 있을 것으로 추측할 수 있으며 본 연구진은 이에 대한 심층적인 후속 연구를 진행 중에 있다.

참 고 문 헌

1. Yoon SJ, Chung HM, Cha KY, Kim NH, Lee KA. Identification of differential gene expression in germinal vesicle vs. metaphase II mouse oocytes by using annealing control primers. *Fertil Steril* 2005; 83 Suppl 1: 1293-6.
2. Barnes FL, Sirard MA. Oocyte maturation. *Semin*

- Reprod Med 2000; 18: 123-31.
3. Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1241-54.
 4. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
 5. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 61-6.
 6. Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, et al. Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 1998; 273: 32479-86.
 7. Song Q, Kuang Y, Dixit VM, Vincenz C. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 1999; 18: 167-78.
 8. Lee R, Chen J, Matthews CP, McDougall JK, Neiman PE. Characterization of NR13-related human cell death regulator, Boo/Divia, in normal and cancer tissues. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1520: 187-94.
 9. Naumann U, Weit S, Wischhusen J, Weller M. Diva/Boo is a negative regulator of cell death in human glioma cells. *FEBS Lett* 2001; 505: 23-6.
 10. Russell HR, Lee Y, Miller HL, Zhao J, McKinnon PJ. Murine ovarian development is not affected by inactivation of the bcl-2 family member diva. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6866-70.
 11. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 131-6.
 12. Ke N, Godzik A, Reed JC. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 2001; 276: 12481-4.
 13. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1995; 136: 232-41.
 14. Kaipia A, Hsu SY, Hsueh AJ. Expression and function of a proapoptotic Bcl-2 family member Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter (BAD) in rat ovary. *Endocrinology* 1997; 138: 5497-504.
 15. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12401-6.
 16. Leo CP, Hsu SY, Chun SY, Bae HW, Hsueh AJ. Characterization of the antiapoptotic Bcl-2 family member myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) and the stimulation of its message by gonadotropins in the rat ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5469-77.
 17. Hsueh AJ, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 1994; 15: 707-24.
 18. Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiol Rev* 2000; 80: 593-614.
 19. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340: 245-6.
 20. Cai Y, Jin J, Tomomori-Sato C, Sato S, Sorokina I, Parmely TJ, et al. Identification of new subunits of the multiprotein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex. *J Biol Chem* 2003; 278: 42733-6.
 21. Hayano T, Yanagida M, Yamauchi Y, Shinkawa T, Isobe T, Takahashi N. Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* 2003; 278: 34309-19.
 22. Sun QY, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization *Reproduction*. 2006; 131: 193-205.

= 국문초록 =

목 적: 본 연구진은 난자성숙 과정의 조절 기작을 규명하기 위하여 생쥐의 미성숙 난자와 성숙 난자에서 차이 나게 발현하는 유전자의 목록을 얻은 바 있다.¹ 이들 유전자 중에서 Bcl-2 homolog인 Diva 유전자가 난자에 특이적으로 발현함을 본 연구를 통해 규명하였는데 이러한 Diva의 기능을 밝혀내기 위하여 immunoprecipitation (IP)과 Mass Spectrometry (MS)를 이용하여 Diva와 결합하여 상호작용하는 단백질을 동정하고자 하였다.

연구방법: NIH/3T3 세포주에 Diva를 encoding하는 pCMV-FLAG-Diva를 24시간 동안 과발현 시키고 대조군으로는 유전자 없는 pCMV-FLAG empty vector를 transfection 하였다. FLAG에 특이적인 항체로 IP하여 Diva와 결합하는 면역복합체를 형성하게 한 후 이를 12% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였고 Coomassie Blue 염색을 통해 단백질 발현양상을 관찰하였다. 대조군에서는 관찰되지 않으면서 Diva 유전자가 발현하는 실험군에서만 확인되는 밴드를 오려내어 trypsin을 사용하여 in-gel digestion 한 후 MS 분석을 시행하였다. 모든 mass spectra는 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA)에 의해 positive reflector mode에서 얻어졌다. 이렇게 얻어진 단백질들은 MASCOT Peptide Mass Fingerprint software (Matrixscience, London)을 이용하여 NCBI nonredundant database를 찾아서 동정하였다.

결 과: Diva를 과발현하는 세포주에서만 관찰되는 15개 밴드에 대한 MS/MS 분석 결과, Diva와 결합하는 단백질로서 actin과 그 외에 α -actinin, tropomyosin, tropomodulin 3 등의 actin-binding 단백질을 동정하였다. Diva를 과발현하는 NIH/3T3 세포주에서 면역복합체를 형성하는 actin과 tropomyosin이 실제 난소 조직에서도 Diva와 결합하는지 IP와 Western blot을 통해 확인한 결과, actin과 tropomyosin 모두 Diva와 결합함을 확인함으로써, Diva는 이 두 단백질과 난소에서 상호작용함을 알 수 있었다.

결 론: 본 연구는 Diva와 결합하여 상호작용하는 단백질들이 cytoskeletal system의 actin filament와 관계 있음을 규명한 최초의 보고이다. Diva가 actin과 tropomyosin과 결합하는 것을 고려해볼 때, 난자 특이적인 Diva는 아마도 난자성숙 동안에 cytoskeletal system을 조절하는 역할을 할 것으로 사료된다.

중심단어: Diva, 난자 특이적, Immunoprecipitation, Mass spectrometry, 난자성숙