

난자-난구세포 복합체에서 발현하는 Rpia 유전자의 종 특이적 발현

포천중문 의과대학교 생명과학전문대학원¹, 차병원 여성의학연구소²

김윤선¹ · 윤세진^{2,3} · 김은영² · 이경아^{1,2}

Species-specific Expression of Rpia Transcript in Cumulus-oocyte-complex

Yun-Sun Kim¹, Se-Jin Yoon^{2,3}, Eun-Young Kim², Kyung-Ah Lee^{1,2}

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine, Seoul, Korea,

²CHA Research Institute, Fertility Center, CHA General Hospital, Seoul, Korea

Objective: We previously identified differentially expressed genes (DEGs) between germinal vesicle (GV) and metaphase II (MII) mouse oocyte.¹ The present study was accomplished as a preliminary study to elucidate the role of ribose 5-phosphate isomerase A (Rpia), the essential enzyme of the pentose phosphate pathway (PPP), in oocyte maturation. We observed expression of Rpia in the mouse and porcine oocytes.

Methods: Expression pattern of the 11 MII-selective DEGs in various tissues was evaluated using RT-PCR and selected 4 genes highly expressed in the ovary. According to the oocyte-selective expression profile, we selected Rpia as a target for this study. We identified the porcine Rpia sequence using EST clustering technique, since it is not yet registered in public databases.

Results: The extended porcine Rpia nucleotide sequence was submitted and registered to GenBank (accession number EF213106). We prepared primers for porcine Rpia according to this sequence. In contrast to the oocyte-specific expression in the mouse, Rpia was expressed in porcine cumulus and granulosa cells as well as in oocytes.

Conclusion: This is the first report on the characterization of the Rpia gene in the mouse and porcine ovarian cells. Results of the present study suggest that the mouse and porcine COCs employ different mechanism of glucose metabolism. Therefore, the different metabolic pathways during in vitro oocyte maturation (IVM) in different species may lead different maturation rates. It is required to study further regarding the role of Rpia in glucose metabolism of oocytes and follicular cell fore exploring the regulatory mechanism of oocyte maturation as well as for finding the finest culture conditions for in vitro maturation.

[Korean. J. Reprod. Med. 2007; 34(2): 95-106.]

Key Words: EST clustering, in vitro maturation, Pentose phosphate pathway (PPP), Ribose 5-phosphate isomerase A (Rpia)

여성의 생식세포인 난자는 태어날 때부터 제1 감수분열 전기에 세포주기가 정지하여 성장이 멈

춰진 채로 난포 안에 존재하고 있다. 사춘기를 지나면서 여러 가지 난소 및 난소 외적인 요인에 의해 난자의 성장과 성숙을 재개하게 되는데 이때 난자의 성숙은 핵 성숙 (nuclear maturation)과 세포질 성숙 (cytoplasmic maturation)으로 나뉘어 일어나며, 두 과정이 긴밀하게 연결되어 있다.^{2,3}

³윤세진 현) Stantford University School of Medicine, Department of OB/GYN, 300 Pasteur Drive, Room S385, Stanford, CA 94305, USA
주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-13, 포천중문 의과대학교 생명과학전문대학원
Tel: (02) 3468-3440, Fax: (02) 563-2028,
e-mail: leeka@ovary.co.kr

*This work was supported by the Research Project on the Production of Bio-organs, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

본 연구진은 난자 성숙의 분자 생물학적 조절기전을 규명하기 위해 생쥐의 미성숙 난자 (GV)와

성숙 난자 (MII) 사이에서 차이 나게 발현하는 유전자 (DEGs)의 목록을 발굴하여 보유하고 있으며, 이들 유전자 중에서 목표유전자로 차례로 선택하여 각 유전자의 발현양상과 더불어 난자 성숙에 관련된 유전자의 기능을 알아보기 위한 연구를 꾸준히 수행해 오고 있다.^{1,4} 목록에 있는 여러 가지 유전자 중에서 연구를 위한 목표유전자를 정하는 것은 여러 가지 방법이 있겠으나, 본 연구의 경우에는 120개의 Annealing Control Primer를 이용하여 PCR해서 얻은 DEGs 목록 중, 성숙 난자에서 더 많이 발현하는 유전자 11개에 대하여 발현양상을 확인하는 과정 중에 특별히 난소에서 높게 발현하는 유전자 Ribose 5-phosphate isomerase A (Rpia)를 선택하게 되었다.

우리는 선행연구에서 RNAi (RNA interference)를 이용하여 난자의 에너지 대사에 관여하는 효소 중의 하나인 malate dehydrogenase의 기능을 분석한 결과, 난자의 에너지 대사 상태가 난자 성숙에 매우 밀접하게 관계되어 있다는 것을 보고하였다.⁴ 따라서, 우리가 보유하고 있는 유전자 목록 중에서 포도당 대사에 관여하는 또 다른 유전자이면서 난소에서 특히 높게 발현하고 있는 유전자인 Rpia의 기능을 알아보는 것이 매우 흥미로울 것으로 사료되었다.

포도당 대사는 모든 세포에서 에너지를 확보하기 위해 필수적인 과정이다. 포도당은 hexokinase에 의해 glucose-6-phosphate (G-6-P)로 전환되고 G-6-P는 glycolysis (해당 과정)과 pentose phosphate pathway (PPP) 두 가지 방법에 의해 대사 과정을 거치게 된다 (Figure 1). 이때 어떤 과정에 의해 포도당 대사가 일어날 것인지를 여부는 세포 내 NADP+의 농도에 의해 G-6-P의 운명이 결정된다.^{3,4} 이들 두 가지 대사 중에 PPP를 통한 포도당 대사는 생쥐와 돼지 난자에서 핵 성숙을 증진 시키는 것으로 보고되어 있다.^{3,5-7} PPP는 G-6-P가 Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)에 의해 NADP+를 NADPH로 산화시켜 lactone을 형성하고, 탈수소 효소인 lactonase에 의해 6-phosphogluconate (6-

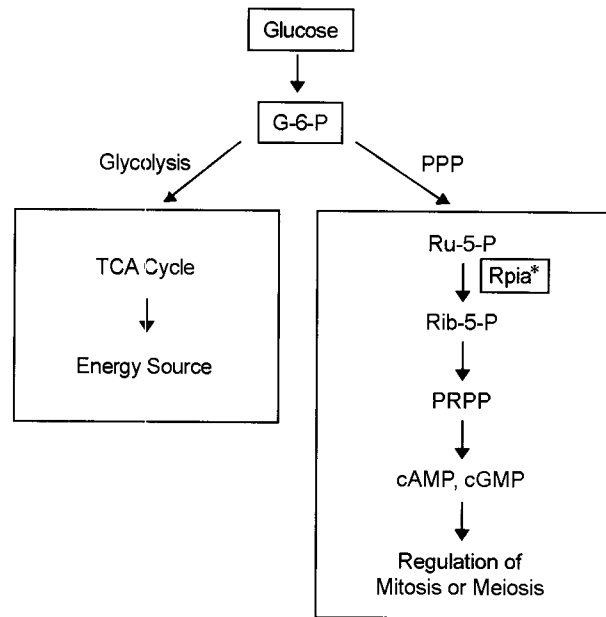


Figure 1. Schematic diagram of the metabolic pathway for glucose. PPP, pentose phosphate pathway; Ru-5-P, ribulose 5-phosphate; Rpia, Ribose 5-phosphate isomerase A; Rib-5-P, ribose 5-phosphate; PRPP, 5-phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphate.

PG)로 전환되고 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)에 의해 또다시 NADP+를 NADPH로 산화시켜 ribulose 5-phosphate (Ru-5-P)를 생성하게 함으로써 시작된다. Ru-5-P는 phosphopentose isomerase에 의해 ribose 5-phosphate (Rib-5-P)를 형성하게 되어 마지막 산물인 5-phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphate (PRPP)로 전환된다. PRPP는 purine이나 pyrimidine의 합성을 위한 전구체로 이용된다. 이렇게 PRPP에 의해 생성된 cAMP는 난소 내 과립세포에서 생식소 호르몬을 활성화시키고 GVBD를 활성화시킨다는 보고도 있다.³ 본 연구에서 선택한 유전자 Rpia는 Ru-5-P가 Rib-5-P로 전환될 때 사용되는 필수적인 효소다 (Figure 1).

돼지의 경우, 유전적 개량 기술과 생산성과 번식의 효율을 향상, 바이오 장기 생산 등을 위한 연구를 위해서는 성숙란 혹은 체외 수정란의 이용이 필수불가결한데, 이들의 이용효율을 향상시키기 위해서는 분자 생물학 기술을 토대로 수정 전후 돼지의 난자 및 배아의 성숙과 발달에 관한 유전자

발현을 연구하는 일은 매우 중요하다. 따라서 본 연구진은 생쥐에서 얻어진 연구결과를 돼지에 접목하여 두 종간의 유전자 발현 및 난자 성숙의 기전을 비교분석 연구해 오고 있다. 그러나, Rpia에 대한 정보가 생쥐에서는 GenBank에 등록이 되어 있는 반면 돼지의 Rpia에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 따라서, 본 연구는 EST Clustering 기법을 통해 Rpia 상동성을 이용하여 돼지의 Rpia를 동정하고, 이를 이용하여 Rpia 유전자의 발현을 생쥐 및 돼지의 난자 및 난포 내 세포에서 비교분석하기 위하여 진행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물 및 난자 회수

유전자 발현양상을 관찰하기 위해서는 생후 4주령 된 ICR 생쥐의 암컷으로부터 각 조직을 적출하여 total RNA를 뽑아 RT-PCR을 수행하였다. 난자를 모으기 위해서는 생후 4주령 된 ICR 생쥐에 PMSG (Folligon, Intervet, Holland) 5 IU/ml를 주사하여 48시간째에 배란 전 난포를 얻어 이로부터 GVBD를 방지하기 위해 0.2 mM IBMX를 처리한 M2 (Sigma) 배양액에서 GV 난자와 난구세포 복합체, 과립세포를 모은 후 난자 크기에 맞는 미세 유리관 파이펫을 통해 난자 주위에 둘러 쌓여 있는 난구세포를 물리적으로 제거하여 난자만을 얻었고 난구세포와 과립세포는 따로 튜브에 넣어 4°C에서 8,000 g로 5분간 원심분리하고 PBS로 세척하여 사용하였다.

돼지의 난포를 채취하기 위해서는 도축 직후의 난소를 32~35°C의 생리식염수 (0.9% NaCl)에 넣어 2시간 내에 실험실로 운반하여 사용하였다. 실험실에서 약 39°C 생리식염수로 난소를 3회 이상 세척한 뒤 직경 2~6 mm 내외의 난포에서 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 흡인한 후 흡입된 난포 난을 TL-HEPES로 3회 세척하여 실제 현미경하에 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질이 균질한 난자만을 선별하여 실험에 공시하였다. GV 난자-난구세포-과립세포가 같이 붙어 있는

복합체를 골라내어 GV 난자-난구세포에 붙어 있는 과립세포만을 따로 모으고 생쥐에서와 같은 방법으로 난자 크기에 맞는 미세 유리관을 이용하여 난자와 난구세포를 분리하여, 따로 튜브에 모은 후 4°C에서 8,000 g로 5분간 원심분리하고 PBS로 세척하여 사용하였다. 한 번 실험을 위해서 10~20개의 난자를 사용하였고, 이때에 함께 나온 난구세포와 과립세포를 공시하였고, 모든 실험은 3~4번 반복하였다.

2. RNA 분리 및 RT-PCR

생쥐의 각 조직은 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 사용하여 균질화 시킨 후 상온에서 5분간 두었다가 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심분리한 뒤, RNA를 포함한 무색의 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 여기에서 동일한 양의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 둔 후 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심분리하여 RNA를 침전 시켰다. 상층액을 버린 후 75% ethanol을 넣고 4°C에서 10분간 8,000 g로 원심분리하여 RNA 침전물을 공기 중에서 건조 시킨 후 DEPC 처리된 물에 녹여 RNA를 분리하였다. 난자, 난구세포, 과립세포는 PicoPure™ RNA Isolation Kit (ARCTURUS, KIT0202)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 이렇게 각각 뽑은 동량의 RNA를 사용하여 전체 반응 용액이 20 µl가 되도록 DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1 U/µl을 처리한 후, MMLV reverse transcriptase (Promega)와 oligo (dT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 세포 내 존재하는 mRNA의 polyadenylation 상태를 알아보기 위해서는 각각 oligo (dT)와 hexamer를 이용하여 cDNA를 합성한 후 각 유전자의 발현양상을 PCR로 확인하였다. 난자와 난구세포, 과립세포가 완전히 분리되었음을 증명하기 위해서, 생쥐의 난자 특이적 발현유전자로 GDF-9,⁸ 돼지의 난자 특이적 발현유전자로는 Has-3의 유전자 발현을 확인하였고,⁹ 난구 및 과립세포 특이적 유전자 발현은 생쥐는 FSH receptor, 돼지는 Has-2의 유전자 발현을 확인하였다.⁹ 또한 internal control로는 주로 사용하는 GAPDH와 β-actin

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers with GenBank accession numbers, annealing temperature (AT), and expected RT-PCR product size for various genes

Genes	Accession No.	Oligonucleotide Sequences	AT (°C)	Size (bp)
mβ-actin	NM_007393	F-GGGTGTGATGGTGGGAATGGG R-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTAG	60	314
BC067074	BC067074	F-ACCTGCCACTCTGTAAAGAA R-AGTTTGCCCTGTAATCTGAA	60	290
mBtg4	NM_019493	F-AAACCTTTGCACTAAAGCTG R-TGCTTTTTCTCACCATACCT	60	246
mGAPDH	BC093598	F-ACCACAGTCCATGCCATCAC R-TCCACCACCCTGTTGCTGTA	60	512
mGDF-9	NM_008110	F-GGTTCTATCTGATAGGCGAGG R-GGGGCTGAAGGAGGGAGG	60	472
mH3f3b	NM_008211	F-GACTTGAGGTTTCAAAGTGC R-CAGTCACTCTTCCCATTTCAT	60	319
mOas1d	NM_133893	F-GTTCAACGGACAGGTAGTGT R-GGGCGTAGACTTTGTTGTAG	60	304
mKctd5	NM_027008	F-AGCTCACACAGATGGTATCC R-AAAGCAGGTTTCTTCTCACA	60	350
mRent1	NM_030680	F-AGCCAATGTGGAGAAGATAA R-GCAGGACAGAATGATGAAGT	60	214
mRpia	NM_009075	F-CAGTATGGCTTAACCCTCAG R-CAAACCTCCAGTCCAGGATA	60	367
mSiah2	NM_009274	F-CCATACAGAGAAACCAGAGC R-AACTCCAGTCTGTAGGCAAA	60	401
1110006I15Rik	NM_134142	F-CTGGTCAACAGAAGAAGGAG R-ACAGCAACCAGTAGATGACC	60	312
2010007H12Rik	AK008184	F-GTAGAGGAGCAGCTGAGAAA R-TTCCAGACTTATGAGGGCTA	60	392
9530068E07Rik	BC034829	F-GGAGGATAGCCATTTCTTTT R-TCTCGGCTAAGTACCTCTTG	60	315
pHas2	U52524	F-GAATTACCCAGTCCTGGCTT R-GGATAAACTGGTAGCCAACA	60	581

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers with GenBank accession numbers, annealing temperature (AT), and expected RT-PCR product size for various genes

Genes	Accession No.	Oligonucleotide Sequences	AT (°C)	Size (bp)
pHas3	U86408	F-CCTACTTTGGCTGTGTGCAA	60	525
		R-AGGCTGGACATATAGAGAAG		
pβ-actin	X03672	F-GACCCAGATCATGTTTGAGACC	60	593
		R-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCAG		
pRpia	EF213106	F_ACCGACACCCAGAGATTGA	60	263
		R_AATTACGCCCCCAAACCTTCT		

두 가지를 사용하였는데, 이는 GAPDH가 대사에 관련된 유전자이기 때문에 본 연구 시스템에서 발현 양의 변화를 보일 수도 있는 가능성 때문이었다. 각 유전자의 primer 서열에 대한 정보는 Table 1에 정리하였다.

3. EST clustering

생쥐의 Rpia에 대한 정보는 MGI (<http://www.informatics.jax.org/>)를 통해 확인하였고, Rpia 유전자 서열은 Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>)에서 얻었다. 생쥐의 Rpia 서열을 돼지의 EST 데이터 베이스를 통해 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 검색하여 상동성이 있는 돼지의 EST를 찾은 후 각각의 EST를 연결하였다. 연결한 돼지의 Rpia의 ORF과 단백질 서열을 예상하는 것과 생쥐, 사람, 돼지 단백질 서열의 상동성을 정렬하는 일은 BioEdit Sequence Alignment Editor program V7.0.0 (Tom Hall Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA)을 사용하여 수행하였다.

결 과

1. GV 난자와 난구세포 사이에서 차이 나게 발현하는 유전자 발현양상

생쥐의 미성숙 난자와 성숙 난자 사이에 차이 나게 발현하는 유전자들을 ACP-PCR을 이용하여 발굴한 유전자 목록 중 성숙 난자에서 많이 발현하

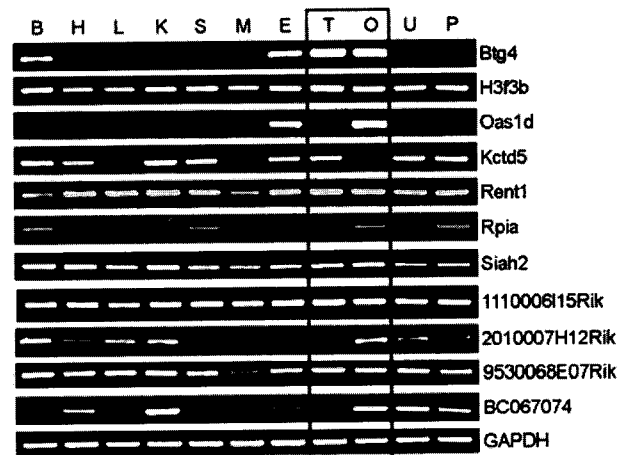


Figure 2. RT-PCR analysis of various MII-selective genes in various mouse tissues identified by ACP-PCR method. GAPDH was used as an internal control. Genes that highly expressed in gonads, especially in ovary were selected (Red box). B, Brain; H, Heart; L, Liver; K, Kidney; S, Stomach; M, Muscle; E, Epididymis; T, Testis; O, Ovary; U, Un-pregnant Uterus; P, Placenta.

는 11개의 유전자 (Btg4, H3f3b, Oas1d, Kctd5, Rent1, Rpia, Siah2, 1110006115Rik, 2010007H12Rik, 9530068E07Rik, BC067074)를 선택하여, 생쥐의 다양한 조직에서 이 유전자들의 발현양상을 RT-PCR을 통해 알아보았다. 흥미롭게도 4개의 유전자 (Oas1d, Rpia, 2010007H12Rik, BC067074)는 다른 조직과 비교해 생식소에서, 그 중에서도 정소보다는 난소에서 특히 많이 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2).

이처럼 난소에서 특히 많이 발현하는 4개의 유전자의 발현을 다시 난소 내 세포, 즉 난자와 난

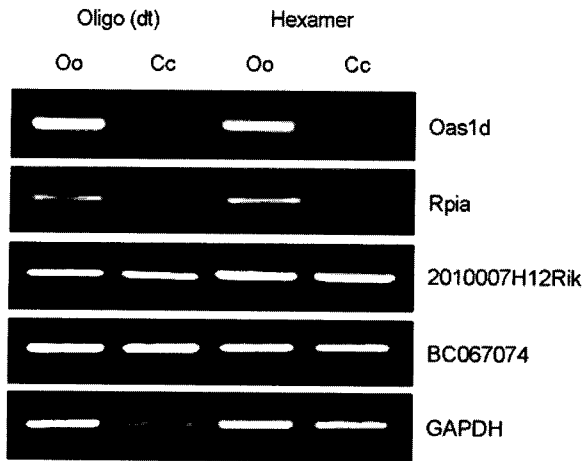


Figure 3. RT-PCR analysis of four ovary-selective genes. cDNAs were prepared by using two different methods, oligo(dT) and hexamer. For PCR reaction, cDNA equivalent to that of single oocyte was used as template for amplification. GAPDH was used as an internal control. Oo; GV oocytes, Cc; Cumulus cells.

구세포에서 각 유전자의 발현하고 있는 mRNA polyadenylation 상태를 알아보기 위하여 oligo(dT)와 hexamer를 이용하여 reverse transcription한 후, PCR 하여 비교해 보았다 (Figure 3). Oas1d는 oligo(dT)와 hexamer를 이용한 두 경우 모두에서 모두 난자 특이적으로 발현함을 확인할 수 있었으나, 반면 Rpia는 oligo(dT)를 이용할 경우에는 난자 특이적으로 발현하였지만, hexamer를 이용할 경우에는 난구세포에서 적은 양 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 2010007H12Rik, BC067074는 oligo(dT)와 hexamer에서 모두 난자와 난구세포에서 높게 발현하는 것을 관찰하였다.

2. EST clustering 기법을 이용한 돼지의 Rpia 유전자 동정

생쥐의 난소에서 많이 발현하고, 특히 난자에서 높게 발현하는 Oas1d와 Rpia 유전자중 Oas1d는 수정 이후 배 발생 단계까지 중요한 역할을 하는 유전자임이 이미 밝혀져 보고되어 있었다.¹⁰ 따라서, 본 연구에서는 Rpia를 연구대상으로 선택하였는데, 생쥐의 염기서열은 알려져 있음에도 불구하고, 돼지의 염기서열이 아직 밝혀져 있지 않으므로 먼

저 EST clustering 기법을 이용하여 돼지의 Rpia를 동정하였다. 1,834 bp의 사람 Rpia (NM_144563)를 기준으로 돼지의 EST BLAST 프로그램에 검색하여 돼지의 48개의 EST 조각이 존재하는 것을 확인하였고 (data not shown), 이중 412 bp의 AJ662969, 724 bp의 CK454038, 610 bp의 DY416706을 선택하여 돼지 Rpia를 연결하였다 (Figure 4A). 동정한 돼지 Rpia는 총 1,211 bp의 길이를 가지며 시작 코돈과 정지 코돈을 확인함으로써 10 bp의 5'-UTR, 281 bp의 3'-UTR, 920 bp의 ORF로 구성된다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4B). 이렇게 동정한 돼지의 Rpia와 각 종간의 아미노산 서열의 상동성을 정렬해 보면, 생쥐와는 87.5%, 사람과는 92.8% 높은 상동성을 가진 것을 확인하였다 (Figure 4C). 동정한 돼지 Rpia의 서열을 GenBank에 등록하였다 (Accession Number EF 213106).

3. 생쥐와 돼지의 종 특이적 Rpia 발현양상

돼지에서 동정한 Rpia의 발현양상을 난포 내 세포에서 확인하기 위해 총 1,211 bp 길이의 유전자 중 445~758 bp 부위에 PCR 생산물이 313 bp 길이가 되게 primer를 만들어서, 배란 전 난포로부터 난자, 난구세포, 과립세포를 분리하여 RT-PCR로 확인하였다. 각각의 세포들이 잘 분리되었는지 확인하기 위해 난자 특이적으로 발현하는 유전자와 난구세포, 과립세포에서 발현하는 유전자를 생쥐에서는 GDF-9와 FSHR를, 돼지에서는 Has2와 Has3 유전자를 각각 비교 유전자로 확인해 보았다. GDF-9과 Has3는 난자 특이적으로 발현하였고, FSHR과 Has2는 난구세포와 과립세포에서 발현하는 것으로 보아 각각 세포들 분리가 잘 된 것을 확인하였다. 또한 모든 세포에서 GAPDH와 β -actin 유전자가 발현하는 반면 생쥐의 Rpia는 난포세포와 과립세포에서 발현하지 않고 난자 특이적으로 발현하는 것을 확인하였는데, 이는 난자 특이적으로 발현하고 있는 유전자로 알려진 GDF-9의 발현양상과 동일하였다. 그러나 돼지에서 Rpia 발현은 생쥐와 차이를 보였는데, 난자는 물론 난구세포 및 과립세포 모두에서

발현하는 것을 확인하였다. 이를 통해 Rpia의 발현은 두 종간에서, 특히 난포 내 중요 세포에서 Rpia의 발현이 차이 나는 것을 확인하였다 (Figure 5).

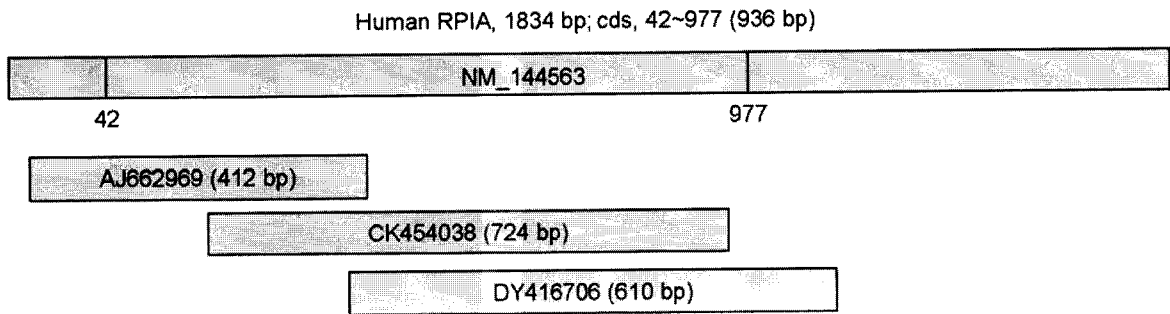
고 찰

포유류에서 여성의 생식세포인 난자는 매우 큰 핵을 (germinal vesicle; GV) 가지고 있으며 오랜 기간 동안 제1 감수분열에 정지되어 있다. 미성숙한

GV 난자에서 성숙한 MII까지 성숙하는 동안 난자는 수정 이후 배 발생 단계까지 정상적으로 발달할 수 있는 충분한 능력을 갖추기 위해 핵 성숙과 세포질 성숙 과정을 거치게 된다.^{2,3}

본 연구진은 난자의 핵 성숙 및 세포질 성숙을 조절하는 분자 생물학적 기전연구를 집중하여 수행하고 있다. 본 연구에서는 ACP-PCR로 얻은 DEGs 목록 중에서 Rpia라는 포도당 대사에 주요한 역할을 하는 유전자를 선택하게 된 과정을 설명하였다.

A



B

```

1  GCGCGCGGGATGCAGCGCCTTGGGCCCTTCAGCACCTCTACGGGCGGGTCTGGCCCGCTGCCGGGCGGGCTGGGGCGCGGCCTCTGCGCGAGGCG 100
    M Q R L G P F S T L Y G R V L A P L P G R A G G A A S G G G
101 GGAACAGCTGGGGCGTCTGGGTTTCGCACGTGCAGCTCCGGGACGCGCGCAGTTCCGGCGTTGGCAGCACTAGTACCAGCAGTGGGGACGCTAACACGCT 200
    G N S W G V L G S H V Q P P G R A Q F G V G S T S T S S G D A N S V
201 CTGCCCGGCCCTCCACGATGTCCAAGGCCGAGGAGGCAAGAAGCTGGCGGGCGCGCGCGCTGGAGAACCACGTGAGGAATAACCAAGTGTCTGGGA 300
    C P A P S T M S K A E E A K K L A G R A A V E N H V R N N Q V L G
301 ATTGGAAGTGGTTCTACAATGTGTCAGCAATAGCTGAAAGAGTGAACAGGAGAATCTGAACCTCATCTGTATCCCCACTTCCCTCCAGG 400
    I G S G S T I V H A V Q R I A E R V K Q E N L N L I C I P T S F Q
401 CCCGTCAGCTCATCTGCAGCATGGCTTAACTCTCAGTGACCTGGACCGACACCCAGAGATTGACCTCGCCATCGATGGTGTGATGAAGTAGATGCTGA 500
    A R Q L I L Q H G L T L S D L D R H P E I D L A I D G A D E V D A D
501 TCTCAATCTCATCAAGGGCGGTGGAGGCTGCCTGACCCAGGAGAAAATGTAGCTGGCAACGCCAGTCCGCTTCATCGTGTATCGCCGATTTCAGGAAGGAT 600
    L N L I K G G G G C L T Q E K I V A G N A S R F I V I A D F R K D
601 TCAAAGAACCTTGGGGACAGTGGCACAAGGGAATCCCCATCGAGGTATCCCCATGGCCTACGTCCAGTGAGCCGACCCGTGACCCAGAAGTTTGGGG 700
    S K N L G D Q W H K G I P I E V I P M A Y V P V S R T V T Q K F G
701 GCGTAATGAACTTCGAATGGCCGTCACAAGGCAGGACCTGTGGTGACAGATAATGGAAATTTTATCCTGGACTGGAAGTTCGACCCGGTCCACAAATG 800
    G V I E L R M A V N K A G P V V T D N G N F I L D W K F D R V H K W
801 GAGTCAAGTGAACACAGCTATCACCATGATCCCAGGCGTGGTGACACGGGCTGTTCATCAACATGGCTGAGAGAGTCTACTTCGGGATGCGAGGATGGC 900
    S E V N T A I T M I P G V V D T G L F I N M A E R V Y F G M Q D G
901 TCAGTGAACATGAGGGAGAAGCCTTTCTAAACCGAAGCTGCAGGAGCAGGGTGTGTCCACCCACGTCGCCGCCACCCCGGAGGCACACCTGCCTCCC 1000
    S V N M R E K P F
1001 CAGGAGCCTTGCCTTAACGCTCTGTGCCAGGTGGACAGCTTGGCAGGGTGGGGGTTGAGGTTAAATCTGGTCTTCTGAAGTATTATTATTAATTAT 1100
1101 CTTTTTAAAGAGAGAAATATAAACATATATATTTTTACTATTAAAAATACTCAGTTTTTTTTTATAAAGTAGAACTTGATTTTCATGTTTTATATGAGACA 1200
1201 TTTACCAAAAA 1211
    
```

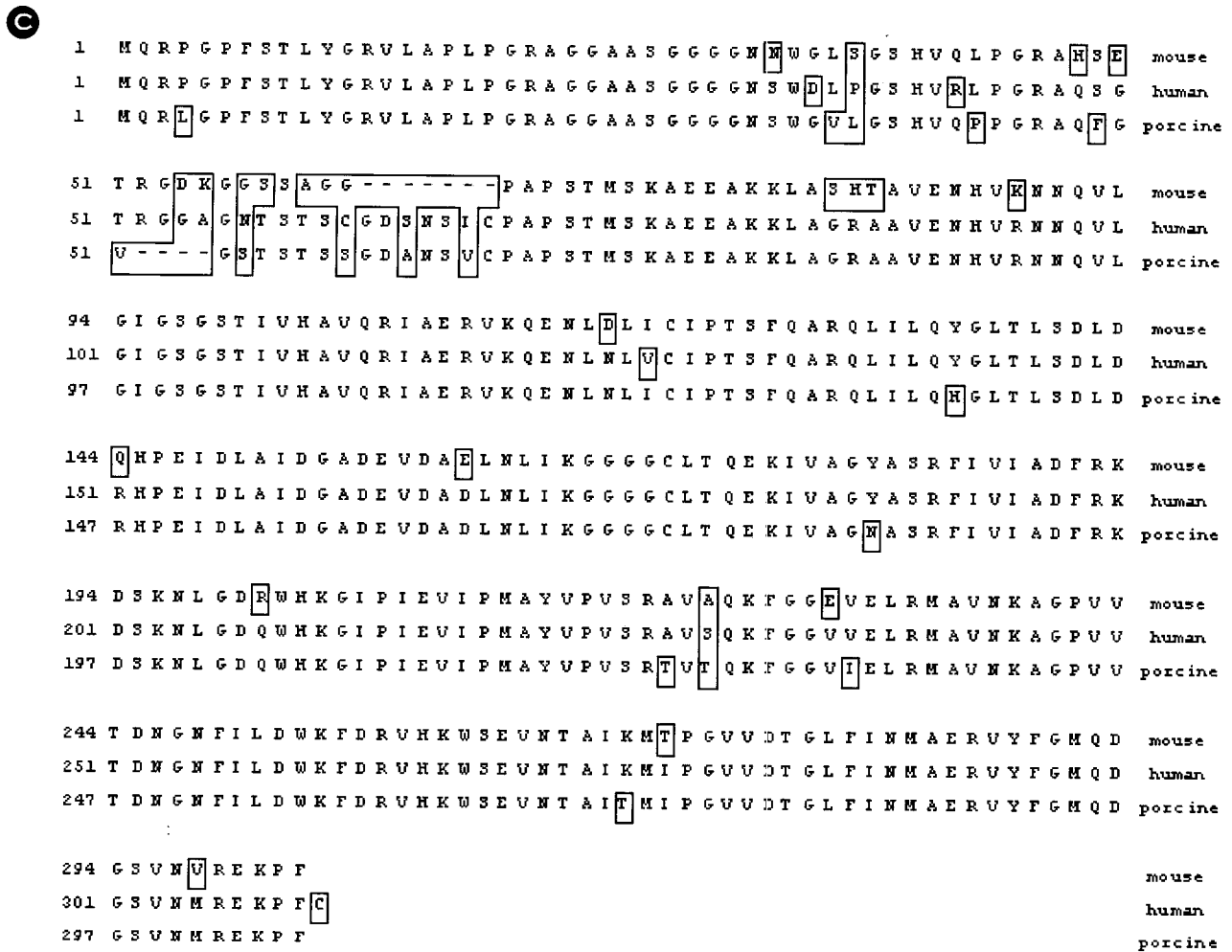


Figure 4. EST Clustering for porcine Rpia sequences. (A). Schematic diagram of EST clustering of porcine Rpia sequences starting from human Rpia (NM-144563). The complete coding sequence of the porcine Rpia was determined by assembling AJ662969, CK454038 and DY416706. Nucleotides 37-957 constitute the coding region of porcine Rpia. (B). The complete coding sequence of the porcine Rpia cDNA and its amino-acid sequence. The porcine Rpia gene encodes the 306 amino acids for Rpia protein. (C). Alignment of amino acid sequences of Ribose 5-phosphate isomerase A in three different species, mouse, human, and porcine. Different residues are boxed, and the numbers left indicate the amino acid position in each sequence. The GenBank accession numbers for mouse, human, and porcine are NM_008618, NM_005917, and EF213106.

또한 생쥐에서 Rpia를 목표유전자로 정함으로 인해 돼지의 Rpia 유전자 염기서열이 아직 밝혀져 있지 않은 것을 발견하였고, 이에 돼지의 Rpia 유전자 염기서열을 동정하였다. 이후, 난소에서의 이 유전자의 발현양상을 분석한 결과, 생쥐의 경우에는 난자 특이적으로 발현하는데 반하여, 돼지의 경우에는 난자, 난구세포, 과립세포 모두에서 Rpia가 발현함으로 생쥐와 돼지의 두 종간에 Rpia 유전자의 발현양상이 차이가 있음을 확인하였다.

난자 성숙은 난자와 난자 주위를 둘러싸고 있는 난구세포와 과립세포, 각 세포간 결합을 통해서 여러 가지 물질의 상호 교환에 의해 조절될 뿐 아니라, 각 세포들의 역할에 의해서 조절되는데, 그 중 난자가 이 모든 것을 지휘하는 중요한 역할을 한다고 생각되어지고 있기 때문에,¹¹ 난소 및 난자 특이적으로 발현하는 유전자를 선택하여 그 기능을 연구하는 것은 매우 유용한 방법이라고 생각된다. 성숙 난자에서 높게 발현하는 유전자 중에서도 난소

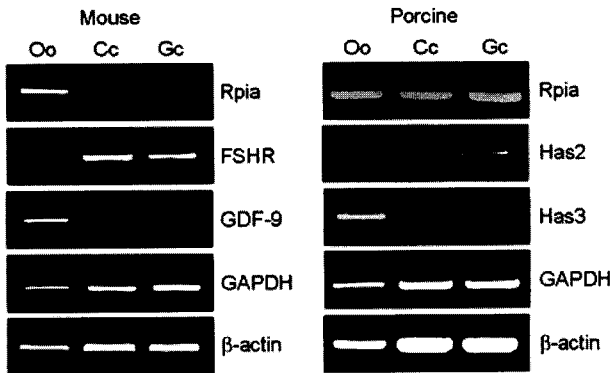


Figure 5. Confirmation of *Rpia* mRNA expression in mouse and porcine follicular cells using RT-PCR. For the PCR reaction, cDNA equivalent to that of single oocyte was used as templates for amplification. GAPDH and β -actin were used as an internal control. Oo; GV oocytes, Cc; Cumulus cells, Gc; Granulosa cells.

에서 높게 발현하는 4개의 유전자의 발현을 oligo (dT)와 hexamer를 이용하여 비교하였는데, 그 이유는 oligo(dT)를 이용하여 reverse transcription할 경우에는 polyadenylation되어 poly(A) tail을 가진 전사체만을 확인할 수 있지만, hexamer를 이용할 경우는 mRNA 서열의 아무 곳에서도 무작위로 합성되기 때문에 deadenylation 되어 poly(A) tail를 갖지 않은 형성하지 못한 전사체의 존재까지 확인해 볼 수 있다.¹² 4개의 유전자중 2개, *Oas1d*와 *Rpia*의 유전자의 발현양상이 난자에서 높게 발현하는 결과를 관찰할 수 있었다. 그런데, *Oas1d*는 oligo(dT)와 hexamer 모두 난자 특이적으로 발현하였으나, 이미 다른 연구진에 의하여 난자 특이적으로 발현함이 보고되어 있었고, 유전자결핍 동물 모델을 만들어서 이 유전자가 결핍되면 난포 내 세포들의 발달이 감소하며 배란이 수정 이후 배 발생 단계까지 중요한 역할을 하는 유전자임이 이미 보고되어 있었다.¹⁰ 따라서 아직까지 기능 연구가 많이 되지 않은 *Rpia*를 연구대상으로 삼았는데, *Rpia*는 oligo(dT)에서는 난자 특이적으로 발현하였지만, hexamer에서는 난포세포에서도 적은 양 발현하는 것을 관찰할 수 있었다. 특정유전자의 polyadenylation된 전사체들은 곧 translation되어 단백질을 만들 수 있는 것을 의미하며, oligo(dT)를 이용하여 측정 가능하다. 반면

hexamer를 이용하여 전사체의 양을 측정할 경우, polyadenylation된 전사체 이외에도 deadenylation된 채로 존재하는 양까지도 측정할 수 있다.^{13~16} 이렇게 deadenylation되어 존재하고 있던 전사체로는 특히 배아 발달 과정에 필요한 몇 가지의 maternal mRNA가 대표적인 예인데, 이와 같이 난자 내에 불활성한 형태로 존재하다가 특정한 시기에 특정한 세포에서 짧은 시간 안에 단백질을 만드는 일에 사용되는 것으로 생각된다.¹⁶ 이번 연구에서 생쥐의 결과를 위의 기전을 토대로 생각해 볼 때 난구세포에 적은 양 존재하는 *Rpia* mRNA는 단백질을 합성하지는 않는 형태로 존재하고 있으나, 필요한 순간에 언제든지 polyadenylation될 수 있는 pool로 존재하고 있는 것으로 추측된다.

본 연구진은 그 동안 생쥐의 난자 성숙 과정에서 차이 나게 발현하는 유전자를 발굴하고 그 중에서 기능이 알려지지 않은 유전자의 기능 연구를 수행해 오고 있다. 이와 같은 기술력과 정보를 바탕으로 생쥐의 결과를 돼지의 난자 성숙 과정에 접목하여, 해당 유전자의 기능을 비교분석하는 연구를 수행하고 있는데, 돼지의 유전자 중에는 아직까지 그 염기서열이 보고되어 있지 않은 유전자가 많이 있다. 돼지의 *Rpia* 유전자도 아직까지 그 염기서열이 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서 EST clustering 기법을 통해 돼지의 *Rpia*를 동정하여 GenBank에 등록하였다 (Accession Number EF213106). EST clustering 기법은 database에 등록되어 있는 유전자의 조각 즉, EST 서열들을 computer상에서 생명 정보학적 방법을 이용하여 overlap되는 부분을 중심으로 서로 연결하고 NCBI에서 UniGene과 같은 서열을 예측함으로써 유전자의 염기서열을 동정할 수 있는 방법이다.¹⁷ 실제로 돼지에서 많은 유전자들이 EST 서열로만 존재하고 전체 염기서열이 밝혀져 있지 않은데, 생쥐에서 밝혀진 유전자들의 정보를 바탕으로 돼지에서 동정하는 일은 돼지에서 유전자 서열을 새로 밝히는 일 뿐만 아니라 돼지의 난자 성숙 과정의 분자생물학적 기전을 연구하는데 중요한 자료가 될 것이다.

Rpia는 포도당 대사 과정 중 PPP에 필수적인 효소이며, 더욱이 돼지에서 동정한 것이 흥미롭고 중요한 것은 돼지 난자의 PPP는 다른 종과 매우 다른 독특한 특징을 보이는데, 그 활성이 체외 배양과 체내 배양할 때 큰 차이를 보이는 것이다. 생쥐 난자의 경우 체외, 체내 배양할 때 비슷하게 PPP가 활성화되지만 돼지 난자의 경우 체외 배양할 때 PPP의 활성이 8배 이상 떨어지며 PPP 활성을 억제하는 물질을 첨가했을 때 Glutathione (GSH) 양이 함께 떨어졌다고 보고되어 있다.¹⁸ GSH는 항산화 물질로써 활성 산소로부터 난자를 보호해 주는 역할을 하고, 정자의 decondensation에 참여하며 전핵을 형성하는데 중요한 역할을 하여 수정 이후 정상적인 배 발생 단계에도 중요한 역할을 한다.¹⁹ 이를 통해 돼지 난자의 PPP의 활성화는 핵 성숙 뿐만 아니라 세포질 성숙에도 많은 영향을 끼친다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서 생쥐와 돼지에서 Rpia가 난자 및 난구세포, 과립세포에서의 발현이 매우 다른 것을 확인하였는데, 생쥐에서 난자 특이적으로 발현하는 반면에 돼지에서는 난자, 난구세포, 과립세포에서 모두 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, hexamer를 이용한 RT-PCR 결과로부터 생쥐의 경우에도 난구세포에서 deadenylation된 형태의 Rpia 전사체는 적은 양 존재하고 있다는 것을 알 수 있었는데, 이 사실은 세포의 에너지 대사의 변화가 필요한 순간 즉각적인 변화를 갖기 위한 전략으로 보이며, 이것이 난자 성숙을 세밀하게 조절하기 위한 기전의 하나인 것으로 생각된다. 본 연구결과, 대사에 연관되어 있는 효소들의 발현이 특히 난자와 난구세포에서 발현하고 있는 양상이 생쥐와 돼지, 두 종간에 차이 나는 것은 또한 각 세포의 PPP 활성화의 차이와 깊은 연관이 있을 것이라 생각할 수 있다. 이와 같은 차이가 난자의 체외 성숙 시 생쥐와 돼지의 성숙율 및 성숙난의 품질의 차이와 깊은 관련이 있을 것으로 추측된다. 돼지 난자는 보통 70% 이상 핵 성숙이 진행되어도 세포질 성숙까지 잘 진행되지 않아 polyspermy 등 다른 종에 비해

배아생성 성공률이 매우 낮는데 이와 같은 문제점의 해결을 각 세포의 에너지 대사 경로의 차이와 연관하여 풀어갈 수 있을 것으로 사료된다.²⁰

최근 종간 PPP 활성화의 차이를 통해 돼지 난자의 체외 배양 시 배양액에 PPP를 활성화 시킬 수 있는 NADP, PRPP, R-5-P 등을 넣어 난자 성숙율을 높인 실험들이 진행되고 있다.^{21,22} 이처럼 서로 다른 종간 대사 관련 유전자의 발현 차이에 관한 연구는 보다 나은 난자의 체외 성숙, 체외 수정, 체외 배양 시스템을 구축하는데 중요한 자료가 될 것이다. 체외 배양 시 난자 성숙율과 배 발생율의 종간의 차이는 PPP 활성화 차이 뿐만 아니라 아직까지 많이 알려져 있지 않은 여러 가지 분자생물학적 기전의 차이 때문 일 것이라 생각할 수 있는데 이 부분에 대한 후속연구가 활발히 진행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구를 기반으로 생쥐에서 미성숙 난자와 성숙한 난자에서 차이 나게 발현하는 유전자 목록을 중심으로 여러 유전자의 기능을 연구하는 가운데 중요한 분자생물학적 기전에 관련된 유전자를 발굴하고, 이에 따른 돼지의 유전자 염기서열을 발굴하여, 종간 난자 성숙의 기전의 차이를 이해한다면 다른 종보다 현저히 낮은 배 발생율을 가지고 있는 돼지, 나아가서는 사람에서의 체외 성숙 및 배아 발달의 성적을 높일 수 있는 새로운 체외 배양 시스템 구축할 수 있을 것이라 기대한다.

참 고 문 헌

1. Yoon SJ, Chung HM, Cha KY, Kim NH, Lee KA. Differentially expressed mRNA profiles between immature germinal vesicle (GV) and mature metaphase II (MII) mouse oocytes. *Dev. Reprod* 2004; 8: 35-42.
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. *Theriogenol* 2001; 55: 1241-54.
4. Yoon SJ, Koo DB, Park JS, Choi KH, Han YM, Lee KA. Role

- of cytosolic malate dehydrogenase in oocyte maturation and embryo development. *Fertil. Steril* 2006; 86(S3): 1129-36.
5. Colton SA, Humpherson PG, Leese HJ, Downs SM. Physiological changes in oocyte-cumulus cell complexes from diabetic mice that potentially influence meiotic regulation. *Biol Reprod* 2003; 69: 761-70.
 6. Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol Reprod* 1998; 58: 1084-94.
 7. Sato H, Iwata T, Hayashi K, Kimura T, Kuwayama Y, Monji Y. The effect of glucose on the progression of the nuclear maturation of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 2007; 99: 299-305.
 8. McGrath SA, Esqueda AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 131-6.
 9. Kimura NK, Konno Y, Miyoshi K, Matsumoto H, Sato E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocytes complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2002; 66: 707-17.
 10. Yan W, Ma L, Stein P, Pangas SA, Burns KH, Bai Y, et al. Mice deficient in oocyte-specific oligoadenylate synthetase-like protein OAS1D display reduced fertility. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4615-24.
 11. Eppig J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reprod* 2001; 122: 829-38.
 12. Lequarre A, Traverso J, Marchandise J, Donnay I. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. *Biol Reprod* 2004; 71: 425-31.
 13. Bettgowda A, Patel OV, Ireland JJ, Smith GW. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, β -glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase, β -actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 267-78.
 14. Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J, Donnay I. An embryonic poly(A)-binding protein (ePAB) is expressed in mouse oocytes and early preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 367-72.
 15. Piccioni F, Zappavigna V, Verrotti AC. Translational regulation during oogenesis and early development: The cap-poly(A) tail relationship. *C R Biol* 2005; 328: 863-81.
 16. Oh B, Hwang S, McLaughlin J, Solter D, Knowles BB. Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition. *Development* 2000; 127: 3795-803.
 17. Hwang SJ, Park CE, Hwang KC, Lee KA. Identification of a novel gene by EST clustering and its expression in mouse ovary and testis. *Korean J Fertil Steril* 2006; 33: 253-63.
 18. Herrick JR, Brad AM, Krisher RL. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. *Reprod* 2006; 131: 289-98.
 19. Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T, Nagai T. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenol* 1993; 39: 1303-11.
 20. Krisher RL, Brad JR, Herrick ML, Sparman JE, Swain A. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Anim Reprod Sci* 2007; 98: 72-96.
 21. Singh B, Meng L, Rutledge JM, Armstrong DT. Effects of epidermal growth factor and follicle stimulating hormone during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 401-7.
 22. Tubman L, Peter A, Krisher R. Pentose phosphate pathway activity controls nuclear maturation of porcine oocytes. *Reprod Fertil* 2006; 18: 279-80.

= 국문초록 =

목적: 본 연구진은 선행연구를 통하여 생쥐의 미성숙 난자와 성숙 난자 사이에 차이 나게 발현하는 유전자 (DEGs)의 목록을 보유하고 있는데,¹ 그 중에서 pentose phosphate pathway (PPP)에 필수적 효소인 Ribose 5-phosphate isomerase A (Rpia)를 선택하여 본 연구를 수행하였다. 난자 성숙 과정에 관련된 Rpia의 기능을 알아보기 위한 기초연구로서 생쥐와 돼지의 난소에서 Rpia의 발현을 비교분석 하였다.

연구방법: 생쥐의 각 조직에서 11개의 MII-selective DEGs의 발현을 RT-PCR 방법으로 확인하여 난소에서 강하게 발현하는 4개의 유전자를 선택하였고, 다시 이들 4개 유전자 중 난자에서 높게 발현하는 Rpia를 선택하여 생쥐 및 돼지의 난자, 난구세포, 과립세포에서의 발현을 비교분석 하였다. 돼지 Rpia 염기서열은 밝혀져 있지 않아 EST clustering 기법을 통해 동정하였다.

결과: EST clustering 기법으로 찾아낸 돼지 Rpia 염기서열은 GenBank에 등록하였고 (Accession Number: EF213106), 이를 근거로 primer를 작성하여 RT-PCR을 수행하였다. Rpia 유전자는 생쥐에서는 난자 특이적으로 발현하는 반면 돼지에서는 난자, 난구세포, 과립세포에서 모두 발현하는 차이점을 발견하였다.

결론: 본 연구는 생쥐와 돼지의 난소에서 Rpia 유전자 동정에 대한 첫 보고로서, 본 연구결과로부터 생쥐와 돼지의 COCs는 서로 다른 경로로 포도당의 대사가 일어나는 것을 알 수 있었다. 따라서 이와 같은 차이점이 두 종의 난자를 체외 배양할 때 나타나는 난자 성숙률의 차이를 가져 오는 기전 중의 하나가 아닐까 추측된다. 난자 성숙을 조절하는 기전을 연구함과 동시에 체외에서 난자 성숙이 어려운 종의 최적의 IVM (in vitro maturation) 조건을 찾기 위해서는 앞으로 난자와 주변세포의 포도당 대사과정에 미치는 Rpia의 기능에 대한 후속연구가 필요할 것으로 사료된다.

중심단어: EST clustering, 체외 성숙, 펜토오스 인산 경로, Ribose 5-phosphate isomerase A (Rpia)