

생쥐 난자 배양시 외분비 관련 요소들이 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과, 서울여자대학교 자연과학대학 생물학과*

강혜나 · 배인하 · 김해권*

Effect of Exocytosis Factor on Spontaneous Zona Pellucida Hardening during in Vitro Culture of the Mouse Oocytes

Hye Na Kang, In-Ha Bae and Haekwon Kim*

*Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University
Department of Biology, College of Natural Sciences, Seoul Woman's University**

= Abstract =

"Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture is most likely due to cortical granules exocytosis.

Thus the purpose of the present study was to determine whether the exocytosis factor is involved in spontaneous zona pellucida hardening during in vitro culture of the mouse.

The results obtained from these experiments were summarized as follows;

1. When a protein synthesis inhibitor(100 μ g/ml puromycin) was added to the culture medium, it did not prevent spontaneous ZPH of mouse oocyte during in vitro culture.
2. Calmodulin antagonists(trifluoperazine and chlorpromazine) and calcium channel blocker (verapamil) had no inhibitory effect in spontaneous ZPH.
3. A microtubule assembly inhibitor, colcemid had some inhibitory effect on spontaneous ZPH.
4. Treatment with a microfilament formation blocker(cytochalasin-B) at 1 μ g/ml concentration, resulted in the excellent inhibitory effect on spontaneous ZPH. However cytochalasin-B did not inhibit ethanol-induced ZPH.

서 론

생쥐 난자의 체외 배양시 일어나는 투명대의 경화 현상(zona pellucida hardening; ZPH)은 난자내 피질 과립 외분비(cortical granule exocytosis)에 그 원인을 두고 있으며, 이에 대한 유도나 억제 방법에 대한 연구가 진행되어왔을 뿐 그 기작은 아직까지 알려진바가 없다. 성숙(maturation)시 제1감수분열 중기와 제2감수분열 중기 사이에 일어나는 피질 과립의 외분비와 재분포로 난자 성숙과 관련된 피

질 과립의 부재지역(cortical granule-free domain)형성으로인한 세포질에서 피질 과립 분포의 극성이 나타나게 된다(Schuel, 1978; Gulyas, 1980; Guraya, 1982; Ducibella et al., 1990). 이때 피질 과립을 포함하고, 짧은 미세융모(microvilli)가 있는 원형질막에 의해 덮여져 나타나는 난 피질의 대부분에서 정자의 침투(sperm penetration)가 가능하다. 반면 미세융모가 없는 원형질막에 의해 둘러싸여져 있는 전 피질의 20-40% 정도의 피질 과립 부재지역에서는 수정가능한 부정소 정자의 결합이 불가능하며, 세포 분열 기관들과 관련되어 극체(polar body)출현동안의 세포질 분열등이 일어날 수 있다(Nicosia et al., 1977; Cherr et al., 1988; Ducibella et al., 1988).

*본 연구는 문교부 기초과학육성 연구비(BSRI-90-426)의 일부 보조 및 한국 과학재단지원 목적 기초 연구비로 수행되었음.

이러한 피질 과립 외분비에 의한 막구조 변화는 다정자 수정 방지를 일으키는데 가장 연구가 활발한 성게(sea urchin)의 경우 3가지 다른 방법으로 일어남이 알려져있다. 첫째, 수정막(fertilization envelope)의 상승으로 난황막에 부착되어있는 여러 정자들과 난자의 원형질막사이 거리를 증가시킨다. 둘째, 피질 과립은 hydrogen peroxide와 peroxidase를 분비하여 수정막의 당단백질(glycoprotein)을 crosslink시킨다(Foerder and Shapiro, 1977). 이에 의해 수정막은 경화(hardening)되어 정자의 단백질 분해 효소(protease)에 의한 분해에 저항성을 지니게된다. 셋째, 피질 과립은 단백질 분해 효소를 분비하여 난황막의 당단백질성의 정자 수용체(sperm receptor)를 제거한다(Carroll and Epel, 1975). 또 이러한 피질 과립 외분비시 피질 과립막과 난자의 원형질막과의 융합에 따른 난자의 표면 지역 증가는 미세용모(microvilli)로 나타났다가 후에 endocytosis를 통해 난자의 원형질막 표면으로 부터 사라지는 것도 알려져 있다(Fisher and Rebhun, 1983).

포유류에서의 다정자 수정 방지 역시 성게와 매우 흡사하여 생쥐란의 경우, 피질반응 동안 위황강으로 피질 과립내 가수분해효소를 분비하여 투명대(zona pellucida)라는 난자 최외막의 변화를 일으킨다(Wassarman, 1987).

본 실험은 피질 과립 외분비시 그 재분포와 이동에 관계될 microfilament와 microtubule형성과 그에 관여하는 calcium의 작용 여부를 통해 체외 난자 성숙시의 '자발적 투명대 경화 현상'의 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 난자의 준비

본 실험에는 성신여자대학교 생물학과에서 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 Swiss albino인 ICR계통의 3-4주된 암컷을 사용하였다.

1) 미성숙 난자(Oocyte with germinal vesicle;GV oocyte)

경추골 파열로 도살한 생쥐로부터 난소를 적출하여 성장한 여포를 예리한 바늘로 터뜨려 여포로부터 난자를 분리하여 실험에 사용하였다. 분리된 난자의 난구세포는 mouth con-

trolled micropipette을 이용하여 제거하였으며 해부현미경(stereozoom 7, Bausch & Lomb, zoomrange 1.0×-7.0×, U.S.A.)하에서 난구세포가 제거된 정상 미성숙 난자(nude & denuded GV oocyte)만을 수집하여 사용하였다.

2) 극체 형성 난자(Oocyte with a polar body)

5 I.U. PMSG와 hCG를 46시간 간격으로 주사하고 hCG주사 후 13-14시간이 경과하면 생쥐를 도살하여 수란관(oviduct)을 적출한 뒤 해부현미경하에서 핀셋으로 수란관 팽대부위(infundibulum)부근을 찢어 성숙하여 배란된 난자를 얻었다. 난자주위의 mucin성분과 난구세포 제거를 위해 hyaluronidase(Sigma)를 3분간 처리하였다.

이 때 hyaluronidase는 polyvinyl-pyrrolidone (PVP; Sigma) 200mg과 함께 20ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS)에 녹여 300 U.S.P./ml이 되게하여 사용하였다.

3) Ethanol에 의해 활성화된 난자

난구세포가 제거된 성숙 배란된 난자를 기본배양액내 포함되어 있는 7% ethanol에 3-5분간 처리하여 활성화시키고(Gulyas and Yuan, 1985), 3-4회 기본배양액으로 세척 후 실험 재료로 사용하였다.

위의 모든 난소와 난관은 채취 후 기본배양액으로 3번 세척 후 2ml의 기본 배양액이 들어있는 시계접시로 옮겨 해부현미경하에서 난자 분리를 하였으며, 완전 분리된 난자도 또한 각 배양액으로 3번 세척하여 배양접시로 옮겼다.

2. 난자의 배양

난자의 배양은 실험군에 처리한 물질에 따라 다음 2가지 방법을 이용하였다.

1) 친수성 화학물질일 경우

증류수 혹은 PBS에 녹여서 사용하였으며 이때의 난자 배양은, 배양접시(plastic dishes, Falcon; 60mm×15mm)위에 배양액을 20μl씩 놓고 그 위에 파라핀유(paraffin oil light; Sigma)를 덮어서 37°C, 5% CO₂가 포함된 공기를 공급하고, 100% 습도가 유지되는 배양기내에서 배양하는 microdroplet 방법을 이용하였다(Biggers, 1971).

2) 소수성 화학물질일 경우

Ethanol에 녹여서 사용하였으며 이때의 난자 배양은, 4개의 well을 가진 배양접시(4well

multidish, Nunclon, Denmark; 16mm×11mm)에 배양액 1ml을 채우고 가운데 증류수 4ml을 채워 배양액의 증발을 방지한 상태에서 역시 37°C, 5% CO₂, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하는 방법을 이용하였다.

3. 배양액과 처리물질

모든 실험에 사용된 기본배양액은 M16배양액(Hogan et al., 1986)으로 하였으며 성분중에서 NaHCO₃와 bovine serum albumin(BSA; Sigma)을 제외한 나머지는 3차 증류수에 녹여 10배로 농축된 stock solution으로 만들었고, Na-lactate, Na-pyruvate와 CaCl₂는 100배로 농축된 stock solution을 만들어 냉장 보관하여 매 실험마다 필요량을 희석하여 사용하였다. 또 NaHCO₃와 BSA는 사용직전 녹여 사용하였으며 모든 stock solution은 활성감소를 방지하기 위해 1주일마다 새로 만들어 사용하였다. BSA가 들어있는 기본배양액에서 배양되어 투명대 경화가 일어난 대조군외, 투명대 경화가 억제된 다른 대조군 설정을 위한 변형된 기본배양액으로 M16배양액에 BSA 대신 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Grand Island, NY)을 녹인 것을 사용하였다. 단, 실험군의 처리물질을 유기용매 즉, DMSO나 ethanol에 녹인 경우 그 용매의 처리 최고 농도를 대조군 배양액에 첨가하여 배양에 사용하였다.

실험군 설정을 위한 각 처리용 물질의 stock solution은 다음과 같이 만들었다.

1) Puromycin(Sigma)은 증류수에 녹여 10mg/ml의 stock solution을 만든 후 100 μ g/ml로 희석하여 사용하였다(Clarke and Masui, 1983).

2) Colcemid(Col; Sigma)은 PBS에 녹여 5mg/ml의 stock solution을 만든 후 0.1, 0.5, 1.5 μ g/ml로 희석하여 사용하였다.

3) Cytochasin B(Cyto-B; Sigma)는 ethanol에 녹여 5mg/ml의 stock solution을 만든 후 각각 0.1, 1, 10 μ g/ml로 희석하여 사용하였다(Longo and Chen, 1985).

4) Trifluoperazine(TFP; Sigma)과 Verapamil(Sigma)은 증류수에 녹여 10⁻¹M의 stock solution을 만든 후 각각 10, 100, 1000 μ M과 100 μ M로 희석하여 사용하였다(Jagiello et al., 1982).

5) Chlorpromazine(CPZ; Sigma)은 ethanol

에 녹여 10⁻³M의 stock solution을 만든 후 0.1, 1, 10, 50 μ M로 희석하여 사용하였다.

배양액은 사용전 0.22 μ m millipore membrane으로 여과멸균하여 2시간 이상 배양기에서 평형시킨 후, 암처에서 냉동 보관된 처리용 물질의 stock solution의 희석과 배양에 사용하였다. 희석은 기본배양액과 변형된 기본배양액을 모두 사용한 puromycin, cytochasin-B 경우를 제외하고는 모두 기본배양액으로 하였으며, 실험에 사용될 모든 초자기구는 건열멸균(160°C, 90분) 또는 고압멸균(121°C, 15Lb/inch², 15분)하였다.

4. 배양 후 난자의 검경

배양 시작 시간을 0으로 하여 정상적 난자의 제 2 감수분열 중기 도달 시기인 17-18시간을 기준으로 배양 시간을 정하였다. 체내에서의 성숙 재개 경우의 비교를 위해서는 hCG 주사 후 3시간에 성숙을 재개하여 핵막이 붕괴된 난자를 난소로부터 적출하여 체외에서 14시간 더 배양하여 사용하였다. Ethanol로 활성화시키기 위한 극체 형성 난자는 hCG 주사 후 13-14시간에 수란관으로부터 적출하여 체외에서 1시간 더 배양하여 사용하였다.

핵상은 핵막과 인이 뚜렷한 미성숙 난자(GV), 핵막과 인이 소실되어 성숙을 재개한 난자(GVBD, 제 1 감수분열 중기-말기), 그리고 제 1감수분열 후 일차 극체를 형성한 난자(PB, 제 2 감수분열중기)로 분류하였다.

5. Zona hardening assay를 위한 난자의 선택

두 대조군에서 투명대 경화 현상이 억제된 경우의 기준인 FBS가 들어있는 배양액에서의 배양이나, 투명대 경화 현상이 억제되지 못한 경우의 기준인 BSA가 들어있는 배양액에서의 배양은 제 1 극체형성 난자를 선택 사용하였고 실험군에서는 각 처리 경우의 최종 성숙 상태 난자만을 정상적 발달로 고려하여 선택 사용하였다.

6. Zona hardening assay

각 배양시간 후 성숙 정도에 따라 난자를 분류하여 각각 4mg/ml 농도의 PVP(Sigma)가 들어있는 M16배양액(M16+4mg/ml PVP)에서 3회 세척한 후 pH 7.2인 1mg/ml 농도의 α -chymotrypsin(Sigma) 50 μ l drops에서 1회

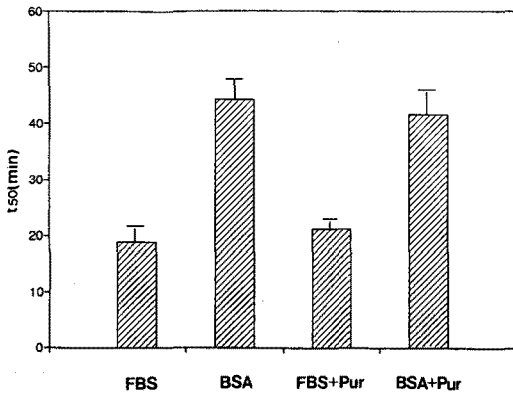


Fig. 1. Effects of puromycin on spontaneous zona pellucida hardening during in vitro culture of the mouse oocytes. Data are expressed as mean \pm SEM from 9 replicates, each using oocytes from 18 different mouse. The differences of the value between the experimental groups are of no significant when compared to each control group by t-test.

세척한 다음 enzyme drop에 파라핀유(Sigma)를 덮어 배양기에 넣어 37°C를 유지시키며 assay하였다. Assay처음 시작 시간부터 1시간 30분까지는 5분 간격으로, 그 후부터 assay종료시까지는 15분 간격으로 위상차도립현미경(Phase contrast microscopes, Leitz, Germany)을 이용하여 투명대가 완전히 분해된 난자수를 세었다(Schmell and Gulyas, 1980; De Felici and Siracusa, 1982; Gulyas and Yuan, 1985).

7. 통계처리

대조군과 실험군 사이의 분해 시간 차이를 비교하기 위한 실험 자료의 통계처리는 student t-test를 이용하였으며, 이 계산의 값은 각 실험에서의 t₅₀, 즉 전체 난자 수의 50%에 해당하는 난자의 투명대가 분해되어 사라지는데 요구되는 시간의 평균값을 직선회귀(linear-regression)으로 구한 후 그것의 \pm SEM(standard error means)로 정하였다.

결 과

1. 단백질 합성 억제제 처리가 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

체외 난자 성숙시 피질 과립 외분비에 의한 투명대의 경화 유도에 새로운 단백질의 합성이 요구되는가를 알아보기위해 이 실험을 하

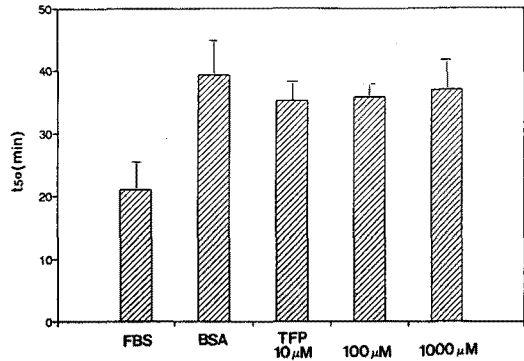


Fig. 2. Effects of trifluoperazine(TFP) on spontaneous ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 replicates, each using oocytes from 8 different mouse. The differences of the value between the experimental groups are of no significant when compared to control group containing BSA by t-test.

였다. 생쥐 미성숙 난자를 극체 형성과 단백질 합성 억제제인 puromycin이 100 μ g/ml 농도로 녹아있는, 10%의 FBS가 첨가된 M16 배양액(M16+10%FBS)과 0.4%의 BSA가 첨가된 M16배양액(M16+4mg/mlBSA)에서 17시간 배양한 후 투명대의 solubility를 조사하여 대조군인 M16+FBS, M16+BSA와 비교하였다(그림 1).

2. Calcium 관련 요소들이 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

투명대 경화의 원인인 피질 과립 외분비에 관여하는 calcium의 작용을 알아보기 위해 calcium 수용체인 calmodulin의 antagonist(trifluoperazine, TFP; chlorpromazine, CPZ)와 calcium channel block(verapamil; Ver)를 사용하였다.

생쥐 미성숙 난자를 두 대조군에서 각각 배양한 후 얻은 극체 형성 난자와, BSA첨가 기본배양액에 TFP는 각각 10, 100, 1000 μ M 농도로(그림 2), CPZ는 0.1, 1 μ g/ml(그림 3)농도로 희석 처리하여 배양 후 얻은 극체 형성 난자와 t₅₀을 비교하였다. 그림 2에서 TFP 10, 100, 1000 μ M의 경우 t₅₀(35.09 \pm 2.75; 35.63 \pm 1.97; 36.83 \pm 4.46), 그리고 그림 3에서 CPZ 0.1, 1 μ g/ml의 경우 t₅₀(35.04 \pm 3.30; 35.59 \pm 2.05)은 각각의 대조군중 M16+BSA의 t₅₀(=39.19 \pm 5.22; 40.85 \pm 2.48)과 유사하게 나타나 투명대 경화를 억제하지 못함을 보였다.

한편 verapamil이 녹아있는 BSA첨가 기본

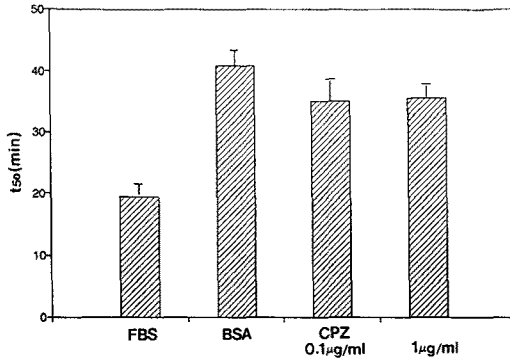


Fig. 3. Effects of chlorpromazine(CPZ) on spontaneous ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 replicates, each using oocytes from 8 different mouse. The differences of the value between the experimental groups are of no significant when compared to control group containing BSA by t-test.

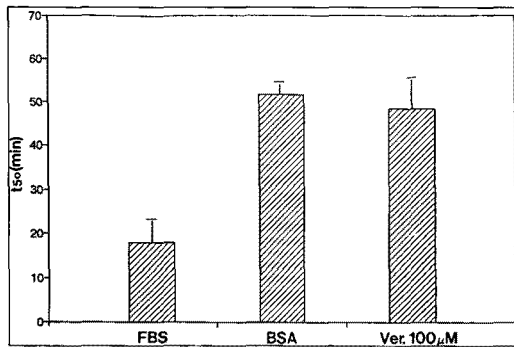


Fig. 4. Effects of verapamil(Ver) on spontaneous ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 replicates, each using oocytes from 4 different mouse. The difference of the value between the experimental group and the control group containing BSA is of no significant by t-test.

배양액에서 배양한 경우의 극체형성 난자도 100µM 농도에서의 t₅₀(=48.38 \pm 6.67)이 대조군 M16+BSA의 t₅₀(=51.77 \pm 2.48)과 유사하게 나타나 역시 투명대 경화를 억제하지 못함을 보였다(그림 4).

3. Colcemid 처리가 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

투명대 경화의 원인이 되는 피질 과립 외분비와 microtubule(MT)사이의 관련 여부를 조사하기 위해 일반적 MT 형성 억제제로 알려진 colcemid(Col)의 처리 결과를 그림 5에

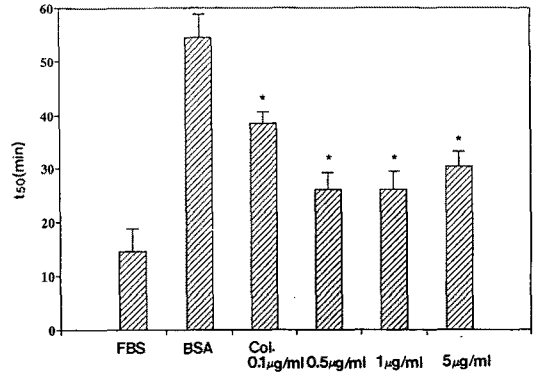


Fig. 5. Effects of colcemid(Col) on spontaneous ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 replicates, each using oocytes from 8 different mouse. The asterisk denotes a significant difference(*, $p < 0.01$) from control group containing BSA by t-test.

약하였다. 생쥐 미성숙 난자를 두 대조군에서 각기 배양한 후 얻은 극체 형성 난자와, Col을 각각 0.1, 0.5, 1, 5µg/ml로 녹인 BSA첨가 기본배양액에서 배양한 후 얻은 성숙 재개 난자의 t₅₀을 비교하였다. Col처리 실험군의 t₅₀(0.1µg/ml=38.49 \pm 1.98; 0.5µg/ml=25.98 \pm 2.96; 1µg/ml=25.98 \pm 2.91; 5µg/ml=30.33 \pm 2.33)은 대조군인 M16+FBS의 t₅₀(=14.50 \pm 4.12)보다는 그 시간이 기나 M16+BSA의 t₅₀(=54.40 \pm 4.27)보다는 짧게 나타나 MT 형성을 억제하여 극체 형성을 억제하는 Col가 투명대의 경화를 유의하게 억제할 수 있음을 보였다($p < 0.01$).

4. Cytochalasin-B 처리가 자발적 투명대 경화 현상에 미치는 영향

투명대 경화의 원인이 되는 피질 과립 외분비와 microfilament(MF)의 관련성 조사를 위해 MF 형성 억제제인 cytochalasin-B(Cyto-B)를 사용하였다. 생쥐 미성숙 난자를 BSA첨가 기본배양액에 0.1, 1, 10µg/ml로 녹아있는 Cyto-B 처리군에서 배양한 경우의 최종 성숙 상태 난자와, 두 대조군에서 성숙된 극체 형성 난자의 t₅₀을 비교하였다(그림 6).

대조군 M16+FBS(t₅₀=17.52 \pm 2.87)보다는 t₅₀이 길게 나타났으나 M16+BSA(t₅₀=48.71 \pm 4.75)보다는 짧게 나타난 Cyto-B 0.1µg/ml 경우의 t₅₀(=33.13 \pm 6.37)은 BSA첨가 대조군과 비교시 유의한 투명대 경화 억제능을 보였으며($p < 0.01$), 극체 형성을 억제하는 가

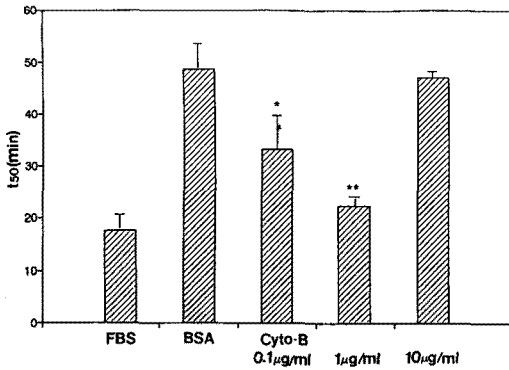


Fig. 6. Effects of cytochalasin B on spontaneous ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 6 replicates, each using oocytes from 12 different mouse. Asterisks denote a significant difference(*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$) from control group containing BSA, by the pooled t-test.

최소 농도(optimal concentration)인 $1 \mu\text{g/ml}$ ($t_{50} = 22.34 \pm 1.56$)에서 투명대 경화를 현저히 억제함을 보였다($p < 0.01$). 그리고 고농도 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서는 효과를 나타내지 못해 Cyto-B는 저농도에서 더욱 투명대 경화에 억제 효과를 나타냄을 또한 보여주었다.

5. Cytochalasin-B처리가 ethanol에 의한 투명대 경화 현상에 미치는 영향

$1 \mu\text{g/ml}$ 농도의 Cyto-B는 난자 성숙 동안의 자발적 투명대 경화를 억제하였다. 이 농도의 Cyto-B가 체내에서 성숙된 극체 형성 난자의 ethanol에 의한 활성화시 일어나는 투명대 경화 또한 억제할 수 있나를 알아보려고 이 실험을 하였다.

PMSG와 hCG를 46시간 간격을 두고 주사한 뒤 13-14시간째에 얻은 체내에서 완전 성숙된 극체 형성 난자를 BSA첨가 기본배양액에서 1시간 배양 후, 바로 assay한 경우와 $1 \mu\text{g/ml}$ Cyto-B를 녹인 BSA첨가 기본배양액에서 1시간 배양 후, 바로 assay한 경우와 위와 동일하게 ethanol로 활성화시킨 다음 assay한 경우를 실험군으로 설정하여 t_{50} 을 비교하였다(그림 7). 비활성화 대조군 $t_{50} (= 17.65 \pm 5.26)$ 과 실험군의 $t_{50} (= 20.91 \pm 2.17)$ 이, 활성화되어진 대조군 $t_{50} (= 128.61 \pm 2.18)$ 과 실험군 $t_{50} (= 113.02 \pm 5.45)$ 이 차이없게 나타나 ethanol에 의한 투명대 경화에는 Cyto-B의 효과가 없음을 보였다.

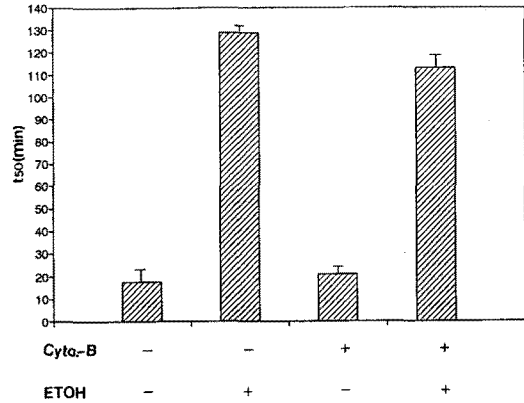


Fig. 7. Effects of cytochalasin-B(Cyto-B) on ethanol-induced ZPH. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 replicates, each using oocytes from 8 different mouse. The differences of the value between the experimental groups are of no significant when compared to the each control group.

고 찰

난자가 수정가능한 정자에 의해 자극될 때 signal transduction에 의한 피질 과립 내용물의 외분비(exocytosis)기작은 다음과 같다. 정자가 난막과 결합하게되면 막상의 G-protein이 활성화되어 phospholipase C로 하여금 phosphatidy1 inositol 4, 5-bisphosphate(PIP_2)에서 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP_3)와 diacylglycerol(DG)을 만들게 하여, IP_3 는 세포내 calcium저장체로부터 calcium의 분비를 일으키고 DG는 PKC활성을 야기하게 된다. 그리고 이때 분비된 calcium에 의해 피질 과립과 난자 원형질막의 여러 위치에서 융합이 유도되어, 난막과 난황막사이 지역 즉 위황강(perivitelline space)으로 피질 과립의 내용물이 분비되어 진다(Berridge, 1984; Berridge and Irvine, 1989; Whitaker and Patel, 1990).

피질 과립 외분비에 의해 투명대 경화 현상이 일어날 때 새로운 단백질의 합성이 필요한가를 알아보기위해 단백질 합성 억제제인 puromycin을 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리해 보았다. 그 결과 자발적 투명대의 경화는 puromycin에 의한 영향은 받지않는 것으로 나타났고 이는 결국 피질 과립 외분비와 자발적 투명대 경화에는 새로운 단백질의 합성이 필요하지 않다는 것을 의미한다(그림 1).

피질 과립 외분비시 요구되는 calcium에 그

수용체인 calmodulin이 관여하는가를 알아보기 위한 calmodulin antagonists의 처리와 calcium channel blocker의 처리 결과 자발적 투명대 경화가 일어났다(그림 2, 3, 4). 이는 chromaffin cell에서 catecholamine등이 분비될 때 calmodulin이 관여하는 것과는(Kenigsberg and Trifaro, 1985) 상반되게 피질 과립 외분비에 관여되는 calcium은 calmodulin과는 무관하게 작용할 수 있음을 보여준다. 또 Calcium channel blocker인 verapamil의 처리 경우에도 verapamil이 작용 못하는 다른 channel로 배양액의 calcium이 들어가 작용하는 것인지 세포내 calcium 저장체에서 calcium이 분비되어 작용하는 것인지는 분명치않아도 투명대 경화를 보였다. 그러나 실제로 피질 과립 외분비 정도와 투명대 경화 정도와는 서로 비례하지 않으므로 여기서 calcium과 관계되는 여러 요소의 처리로 피질 과립 외분비 정도를 절대적으로 평가하기는 어렵다. 왜냐하면 미성숙 난자의 경우 위황강이 성숙된 난자의 경우보다 훨씬 적어 투명대외도 더욱 근접해 있고 분비된 피질 과립 내용물이 위황강내 액체로 희석될 가능성 또한 감소해 적은 내용물이 많은 투명대 경화를 야기할 수 있기 때문이다. 그러므로 이 실험에서도 투명대 경화는 일어났으나 피질 과립 외분비는 거의 안일어났을 수도 있다. 피질 과립 외분비와 관련있는 Ca^{+2} -dependent pathway가 미성숙 난자의 경우 아직 불완전하다는 최근의 Ducibella (1993)연구와 비교해 볼 때 본 실험에서의 투명대 경화는 calcium관련 요소 처리와는 무관한 별개 현상일 수 있다.

생쥐 난자에 colcemid를 처리하여 microtubule(MT) 형성을 억제한 경우의 투명대 경화감소는 피질 과립 외분비 기작의 불완전한 야기와 관련된 것으로 사료된다. 이것은 결과 4에서의 microfilament(MF) 형성 억제 경우와 비교할 때 colcemid가 피질 과립 외분비를 완전히는 억제하지 못함을 보이는데(그림 5), 이는 피질 과립 외분비에 중요한 작용을 하는 피질 과립의 분포 변화로 인한 극성 야기의 부분적 실패에 기인하는 것으로 보인다(Ducibella et al., 1990). Longo와 Chen(1985)의 보고에 근거할 때 colcemid의 처리는 약간의 미세음모 감소만을 야기할 뿐 여전히 많은 분포를 나타내는 미세음모 지역을 통해 피질 과립의 외분비가 가능할 것으로 추정된다.

MT 형성 억제제와는 다르게 MF 형성 억제제인 cytochalasin-B의 처리는 저농도에서 뚜렷한 투명대 경화 억제 효과를 보였다. 특히 Cyto-B는 극체 형성을 억제하는 최소의 농도에서 고도의 유의차를 지닌 투명대 경화 억제 효과(그림 6)를 나타냈는데 이미 미세음모의 현저한 감소(Longo and Chen, 1985)로 미세음모 분포 지역에서 일어나는 피질 과립 외분비가 억제되어지고, Cyto-B가 MF의 외분비 관여를 막아(Bretscher, 1991) 피질 과립의 subcortical region으로의 이동을 방해하기 때문인 것으로 사료된다.

반면 극체 형성 난자의 ethanol에 의한 투명대 경화는 Cyto-B가 억제할 수 없음을 나타내, 결과 4의 자발적 투명대 경화와는 상이하게 Cyto-B는 수정에 의한 투명대 경화와 동일시되고 있는 ethanol에 의한 투명대 경화는 억제할 수 없음을 보였다(그림 7). 이것은 ethanol에 의한 투명대 경화는 ethanol처리로 calcium의 농도 증가를 가져와 이것이 세포질내의 피질 과립 외분비 현상을 유도하며 마치 polyspermy방지를 야기하는 수정난과 같은 기작이 일어났기 때문으로 사료된다.

실험 결과 체외에서 난자 성숙시 일어나는 자발적 투명대 경화 현상은 세포막 channel을 통해 유입되어 작용하는 외부 calcium이 아닌, calmodulin과 무관하게 작용하는 세포 내부 calcium에 의한 피질 과립 외분비에 그 원인이 있으며, 이 외분비시 부분적 억제를 나타내는 colcemid와는 상이하게 cytochalasin-B는 완전 억제 가능했다. 그리고 이러한 자발적 투명대 경화의 cytochalasin-B에 의한 완전한 억제는 ethanol에 의한 투명대 경화나 그와 동일시되고 있는 수정에 의한 투명대 경화와는 차이를 나타냈다.

인 용 문 헌

- Berridge MJ: Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 1984, 220, 345-360.
- Berridge MJ, Irvine RF: Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989, 341, 197-205.
- Biggers JD: New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. In; *Biology of the*

- Blastocyst(Blandau, R.J. ed). Univ. Chicago Press, Chicago, 1971, pp. 319-327.
- Bretscher A:Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Ann Rev Cell Biol* 1991, 7, 337-374.
- Carroll EJ, Epel D:Isolation and biological activity of proteases released by sea urchin eggs following fertilization, *Dev Biol* 1979, 44, 22-32.
- Cherr GN, Drobnis EA, Katz DF:Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J Exp Zool* 1988, 246, 81-93.
- Clarke HJ, Masui Y:The induction of reversible and irreversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibition during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1983, 97, 291-301.
- De Felici M, Siracusa G:"Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Res* 1982, 6, 107-113.
- Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Aalberg J, Rangarajan S:Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol* 1988, 130, 184-197.
- Ducibella T, Rangarajan S, Anderson E:The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. *Dev Biol* 1988, 130, 789-792.
- Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B:Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biol Reprod* 1990, 43, 870-876.
- Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, Kopf GS, Schultz RM:Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 1990, 137, 46-55.
- Ducibella T, Kurasawa S, Duffy P, Kopf GS, Schultz RM:Regulation of the polyspermy block in the mouse egg:Maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1, 4, 5-triphosphate and an activator of protein kinase C. *Biol Reprod* 1993, 48, 1251-1257.
- Fisher GW, Rebhun LI:Sea urchin egg cortical granule exocytosis is followed by a burst of membrane retrieval via uptake into coated vesicles. *Dev Biol* 1983, 99, 456-472.
- Foerder CA, Shapiro BM:Release of ovoperoxidase from sea urchin egg hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74, 4214-4218.
- Gulyas BJ:Cortical granules of mammalian eggs. *Int Rev Cyto* 1980, 63, 357-392.
- Gulyas BJ, Yuan LC:Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *J Exp Zool* 1985, 233, 269-276.
- Guraya SS:Recent progress in the structure, origin, composition, and function of cortical granules in animal egg. *Int Rev Cyto* 1982, 78, 257-360.
- Hogan B, Costantini F, Lacy E:Manipulating of Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1986, pp. 250.
- Jagiello G, Ducayen MB, Downey R, Jonassen A:Alterations of mammalian oocyte meiosis I with divalent cations and calmodulin. *Cell Calcium* 1982, 3, 153-162.
- Kenigsberg RL, Trifaro JM:Microinjection of calmodulin antibodies into cultured chromaffin cells blocks catecholamine release in response to stimulation. *Neuroscience* 1985, 14, 335-347.
- Longo FJ, Chen D-Y:Development of cortical polarity in mouse eggs:Involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol* 1985, 107, 382-394.
- Nicosia SV, Wolp DP, Inoue M:Cortical gran-

- ule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Dev Biol* 1977, 57, 56-74.
- Pierce KE, Siebert MC, Kopf GS, Schultz RM, Calarco PG: Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. *Dev Biol* 1990, 141, 381-392.
- Schmell ED, Gulyas BJ: Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence for the enzyme's role in hardening the zona pellucida. *Gamete Res* 1980, 3, 279-290.
- Schuel H: Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development: A critical review. *Gamete Res* 1978, 1, 299-382.
- Schuel H: Function of egg cortical granules. In "Biology of fertilization" (C.B. Metz and Monroy, Eds), Academic Press, New York. 1985, Vol. 3, pp. 1-44.
- Wassarman PM: Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem* 1988, 57, 415-442.
- Whitaker M, Patel R: Calcium and cycle control. *Development* 1990, 108, 525-542.
-