

## 흰쥐의 난자성숙에 있어서의 칼슘의 대사

충북대학교 자연과학대학 생물학과

홍순갑 · 이준영

### Metabolism of Calcium in the Oocyte Maturation of Rat

Soon Gab Hong and Joon Yeong Lee

*Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea*

#### =Abstract=

The present experiments aimed to investigate the metabolism of calcium during oocyte maturation in rat. The concentration of free calcium and calmodulin in oocytes was measured respectively by using of fluo-3/AM and FITC with microscope fluorescence spectrometer. The ultrastructural localization of calcium precipitates in oocytes was observed with the transmission electron microscope.

Cumulus-free immature oocytes(GV-oocyte) were cultured in vitro through 15 hours. The free calcium concentration in GV oocyte was  $55.9 \pm 3.5 \text{ nM}$ . In calcium-containing medium, the free calcium concentration was increased in germinal vesicle breakdown(GVBD) oocyte( $64.2 \pm 7.3 \text{ nM}$ ). In normal medium after calcium chelator treatment( $10 \mu\text{M}$  BAPTA/AM), the free calcium contents were slightly lower than those in control group. In calcium-free medium, the free calcium content was drastically increased in GVBD( $72.7 \pm 3.4 \text{ nM}$ ) and metaphase I - anaphase I ( $88.0 \pm 3.4 \text{ nM}$ ) oocyte. In maturation rate of oocytes, GVBD rate was high in control group( $82.9 \pm 6.55\%$ ) and calcium chelator treatment group( $91.2 \pm 4.4\%$ ), but in calcium-free medium group, it was low and then the oocyte was degenerated without polar body formation. Relative content of calmodulin in oocyte was significantly( $P < 0.001$ ) increased in metaphase I - anaphase I than in GV and GVBD oocyte. The calcium precipitates were observed in mitochondria and cytoplasm of GV oocyte but that were not observed in mitochondria of GVBD and metaphase I - anaphase I oocyte. And then the calcium precipitates reappeared in mitochondria of metaphase II oocyte.

The above results indicate that changes in free calcium and calmodulin concentration of oocyte occur according to the maturational stages and the extracellular calcium is required during oocyte maturation. Also change of calcium localization in oocyte occurs according to the maturational stages.

**Key Words:** Calcium, Calmodulin, Oocyte Maturation, GVBD, Rat

\* 이 연구는 1996년도 한국과학재단 연구비지원에 의한 결과임(과제번호: 961-0503-026-1).

## 서 론

포유류에서 calcium은 난자의 핵막붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD), 생존력, 극체형성에 필수적임이 돼지와 생쥐에서 보고되었다(Paleos and Powers, 1981; Sato et al., 1980). 포유류 난자의 체외 감수분열적 성숙에는 세포외액의 calcium이 필요함이 쥐(Batta and Knudsen, 1980), 햄스터(Racowsky, 1986), 소(Maruska et al., 1984) 등에서 보고되었다. 이러한 결과들은 생쥐 난자를 calcium이 결핍된 배양액에서 배양했을 때 배양후 1.5시간 안에 퇴화된다는 보고(De Felici and Siracusa, 1982)가 타당성을 뒷받침하고 있다.

생쥐 난자의 자발적 성숙은 calcium 증가를 필요로 하지 않는다는 보고(Carroll and Swann, 1992; Tombes et al., 1992; Mehlmann and Kline, 1994)와 반면에 calcium의 증가는 난자성숙에 필요하다(De Felici et al., 1991)는 상반된 결과가 보고되고 있다. 쥐의 난자내 calcium 농도는 감수분열적 성숙 시작 이전에 증가됨이 관찰되었으며(Batta and Knudsen, 1980), 포유류 미성숙 난자의 배양시 배양액내 calcium chelator인 BAPTA를 처리하면 GVBD가 억제됨이 보고되었다(Homa, 1991; Kaufman and Homa, 1993). 그러나 생쥐 난자의 체외배양 동안에 일어나는 자연발생적인 난자내 calcium oscillation은 inositol 1, 4, 5-triphosphate( $InsP_3$ )에 의해서 파생되고, 세포내에 BAPTA/AM를 처리하면 차단됨이 관찰되었으나 난자의 GVBD에는 영향을 미치지 못함이 보고되었다(Carroll and Swann, 1992). 이러한 결과들은 난구-난자 복합체를 체외 배양시 또는 체내에서  $Ca^{2+}$ 이 난자 외부에서 난자 내로 유입되며, 또한 난자의 성숙시기에 따라  $Ca^{2+}$ 의 요구성이 달라진다는 가정을 추론하게 한다.

포유류 난자의 감수분열 재개는 calmodulin 의존적이라는 것이 보고되었다(Maruska et al., 1984; Sato, 1990). Calcium이 결합된 calmodulin은 세포막, 소포체 및 mitochondria에서 calcium pump를 주관하는 ( $Ca^{2+} - Mg^{2+}$ )ATPase를 활성화시키며(Penniston, 1983), 또한 calmodulin이 calcium channel에 작용함으로써 세포내의 calcium 농도가 조절된다고(Moody, 1985; Nowycky et al., 1985) 알려져 있다. Sato(1990)는 난구세포가 제거된 생

쥐의 미성숙난자 배양시에 calmodulin 저해물질인 W7을 배양 시작 후 15분 안에 처리하면 90% 이상의 난자성숙 억제 효과를 나타냄을 관찰하여, 이를 토대로 calmodulin이 생쥐 난자성숙의 초기단계에 필요하다고 보고하였다.

이상의 보고들로 보아 난자성숙 과정에는 calcium과 calmodulin이 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 그러나 난자성숙에 있어서의 calcium의 대사는 명확하게 밝혀지지 못하고 있다. 이것은 대부분의 실험이 핵막붕괴율과 극체형성률과 같은 난자의 형태적 변화를 토대로 calcium의 역할을 조사하였기 때문이다. 그러므로 본 실험에서는 흰쥐의 난자 성숙에 따른 난자내 free calcium 함량과 calmodulin 함량의 양적·동적 변화를 연관시켜 조사하고자 하였고, 또한 난자내 calcium 분포 양상을 관찰함으로써 난자성숙에 미치는 calcium의 역할과 대사를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 미성숙난자의 획득과 배양

생후 26일된 Sprague-Dawley strain의 흰쥐 암컷을 경추파열로 도살 후 난소를 적출해 내었다. 난소강막을 제거후 난소를 기본배양액(modified Krebs Ringer Bicarbonate Solution, mKRBS)으로 옮겨 넣은 후 해부현미경하에서 예리한 바늘로 난포를 터트려 난자를 채취하였다. 수집된 미성숙난자(germinal vesicle oocyte, GV-oocyte)를 mouth-controlled glass pipette을 사용해 난구세포를 제거하였고, 다시 기본배양액으로 3회 세척한 후 배양에 사용하였다.

난자의 체외배양은 기본배양액을 사용하였다. 배양액 100 $\mu$ l를 배양접시(Falcon)에 넣고 3ml의 paraffin oil(Sigma)을 첨가한 후 배양액에 난자를 넣어 5%의  $CO_2$ 가 혼합된 습기찬 공기를 공급받는 37 $^{\circ}C$  항온기 내에서 15시간 배양하였다. GV-난자의 체외배양은 기본배양액(1.71mM calcium), calcium이 없는 배양액(0mM calcium) 그리고 세포내 calcium chelation 후의 난자를 기본배양액에 옮겨서(BAPTA/AM) 체외배양하였다. Calcium-free 배양액은  $CaCl_2$  대신에 1mM EGTA(sigma)를 첨가하였다. GV-난자의 세포내 calcium-chelation을 위해서는 최종농도 10 $\mu$ M의 1, 2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid(BAPTA/AM, Molecular probes)을 기본배양액

에 첨가하여 37℃ 항온기 내에서 30분간 배양하였다. GV - 난자의 체외배양 중에 배양 0-0.5시간(GV), 2.5-3시간(GVBD), 8-9시간(Metaphase I - Anaphase I), 15시간(Metaphase II)에 해당되는 난자를 채취하여 calcium과 calmodulin 정량 분석에 사용하였다. 모든 배양액은 사용하기 전에 millipore filter(pore size, 0.22µm)로 멸균하였고, 초자기구는 15 lb에서 20분간 고압멸균하거나 180℃에서 20분간 건열멸균하였다.

## 2) Calcium 표준용액에서의 형광량 측정

Calcium 농도 정량은 0~39.8 M의 농도를 갖는 calcium calibration buffer kit(Molecular Probes)를 사용해 측정하였다. Calcium indicator인 fluo-3(Molecular Probes)가 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)에 1mM 농도로 용해된 stock 용액을 최종 농도가 5 µM이 되도록 각각의 calcium 농도(0.000, 0.038, 0.100, 0.225, 0.602, 39.8 M)별 표준 용액 2ml에 희석하여 37℃ 항온기 내에서 30분간 반응시켰다. 표준 용액의 형광량은 microscope fluorescence spectrometer(MPV Compact, Leitz)를 사용하여 450~490 nm의 excitation 파장과 520 nm의 emission 파장을 갖는 filter block I 2/3(Leitz)를 통과해 나온 광량을 측정하였다.

## 3) 난자내 Free Calcium 함량 측정

각 난자의 성숙 단계별(GV, GVBD, Metaphase I - Anaphase I, Metaphase II)로 수집된 난자는 calcium indicator인 fluo-3/AM(Molecular Probes)가 DMSO에 1mM로 용해된 stock 용액을 최종 농도가 5 µM이 되도록 기본배양액으로 희석한 배양액에서 5%의 CO<sub>2</sub>가 혼합된 습기찬 공기를 공급받는 37℃ 항온기 내에서 30분간 배양하였다. 배양후 난자는 기본배양액으로 3회 수세한 후 슬라이드 글라스위에 옮긴 후 mounting medium (Sigma)으로 포매하고, microscope fluorescence spectrometer를 사용하여 측정된 광량으로 calibration curve(Fig. 1)를 이용해 free calcium 함량을 계산하였다.

## 4) 난자의 성숙을 측정

수집된 GV - 난자는 기본배양액(1.71mM calcium), calcium-free 배양액(0mM calcium) 그리고 BAPTA/AM으로 calcium chelation 한후 기본배양액(BAPTA/AM)에서 체외배양하였다. 체외배양

시작 후 핵막붕괴(GVBD)는 3시간 후에, 그리고 제 1극체 형성(polar body formation, PB)은 15시간 후에 도립현미경으로 관찰, 판정하였다.

## 5) 난자내 Calmodulin 함량 측정

각 단계별(GV, GVBD, Metaphase I - Anaphase I, Metaphase II)로 수집된 난자내 calmodulin 함량의 측정방법은 다음과 같이 하였다.

난자는 실온 하에서 30분간 3% paraformaldehyde에 고정하였다. 고정된 난자는 phosphate buffered solution(PBS, pH 7.4)으로 2회 수세한 후 0.1% Triton X-100이 용해된 PBS(PBS-TX)에 5분간 처리한 후 다시 PBS로 수세하였다. 그리고 난자를 BSA가 3mg/ml로 용해된 PBS(PBS-TX-BSA)에 넣어 37℃의 습기찬 항온기에서 30분간 방치하였다. Anti-calmodulin (Sigma)을 BSA가 3mg/ml로 용해된 PBS(PBS-BSA)로 1:100 으로 희석한 용액에 37℃에서 40분간 습기찬 항온기 내에서 반응시켰다. 반응후 실온하에서 PBS-TX-BSA로 10분씩 3회 수세하였다. 수세후 biotin-conjugated anti-goat IgG(Sigma)를 PBS-BSA로 1:200 으로 희석하여 37℃에서 40분간 습기찬 항온기 내에서 반응시켰다. 반응후 실온하에서 PBS-TX-BSA로 10분씩 3회 수세하였다. 그리고 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-biotin (Sigma)을 PBS-BSA로 1:40 으로 희석하여 37℃에서 40분간 습기찬 항온기 내에서 반응시켰다. 반응후 실온하에서 PBS-TX-BSA로 10분씩 3회 수세하였다. 그런후 증류수로 3회 수세하였고, 무형광 슬라이드글라스(Matsunami S-3313, Japan) 위에 옮긴 후 mounting medium (Sigma)으로 포매하여 분석하였다. 난자내 FITC의 형광량은 microscope fluorescence spectrometer를 사용하여 450-490nm의 excitation 파장과 520nm의 emission 파장을 갖는 filter block I 2/3(Leitz)을 통과해 나온 광량을 측정하였다.

## 6) 난자의 세포질내 Calcium 분포의 전자현미경 관찰 준비

체외배양에 있어서의 난자성숙에 따른 세포소기관의 발달 양상과 calcium 분포 양상을 관찰하기 위한 방법은 다음과 같다.

체외배양을 통해 미수정란은 각 단계별(GV, GVBD, Metaphase I - Anaphase I, Metaphase II)

로 수집하였고, 수정란은 체외배양된 성숙 난자를 체외수정 3시간 후에 얻었다. 미수정란과 수정란은 oxalate-pyroantimonate로 염색하여 세포내 calcium 침전물을 관찰한 방법(Ravindranath et al., 1994)에 따라 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate, 1.4% sucrose로 구성된 1차 고정액(pH 7.4)으로 4℃에서 12시간 고정하였다. 일차고정 후 2% potassium pyroantimonate(pH 7.6)을 포함하는 1% osmium tetroxide 용액으로 2시간 동안 후고정하였다. 후고정 후 4℃ 증류수(pH 10)로 15분간 수세한 후 알콜 series로 탈수하였고, propylene oxide로 치환하였고, Epon 812로 포매하여 70℃ 건조기에서 9시간 동안 중합반응시켰다. 경화된 Epon block은 diamond knife를 사용한 초박편절단기(Ultracut S)로 62nm로 절편하여 copper grid(#200)에 올려놓고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(transmission electron microscope, Zeiss EM 109)으로 검경하였다.

#### 7) 통계처리

실험은 3-5회 이상 반복하였으며, 대조군과 실험군의 통계적 유의성은 Microcal Origin(version 3.0)을 이용하여 Student's t-test와 ANOVA-test로 검정하였다.

### 결 과

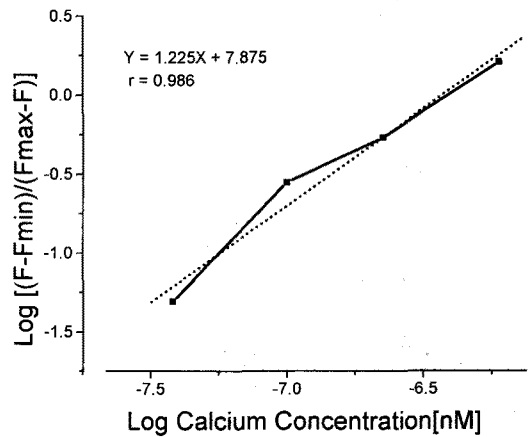
#### 1) 난자성숙에 따른 난자내 Free Calcium 함량 변화

Calcium 농도는 Hong 등(1996)의 calibration curve(Fig. 1)를 이용하여 계산하였다.

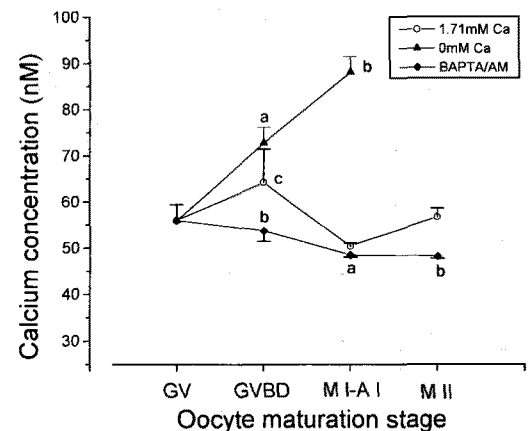
체외배양에서 난자성숙 시기에 따른 난자내 free calcium 함량을 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 1.71mM calcium을 함유하는 기본배양액(1.71mM calcium)에서 미성숙난자(GV)의 free calcium 함량은  $55.95 \pm 3.53$  nM(n=19), 핵막붕괴시기(GVBD)는  $64.16 \pm 7.26$  nM(n=44)로 유의하게( $P < 0.01$ ) 증가하였고, metaphase I - anaphase I의 난자에서는  $50.36 \pm 0.65$  nM(n=17)로 현저히 감소하였다( $P < 0.001$ ) 극체방출 시기(metaphase II)에서는  $56.70 \pm 1.86$  nM(n=16)로 나타났다.

Calcium을 함유하지 않는 배양액(0mM calcium)에서 배양시 핵막붕괴시기 난자의 free calcium 함량은  $72.74 \pm 3.42$  nM(n=15)로, metaphase I -

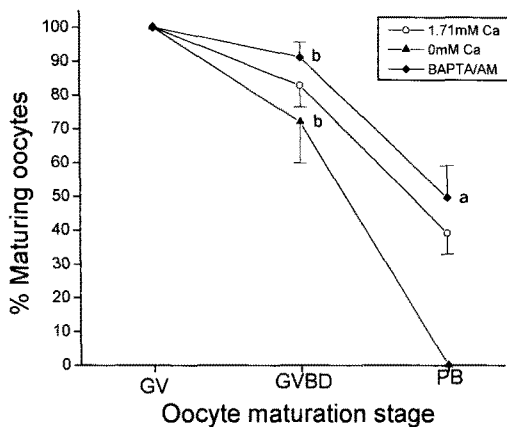
anaphase I의 난자는  $88.03 \pm 3.43$  nM(n=8)로 현저히 증가( $P < 0.001$ )하였으나, metaphase II의 난



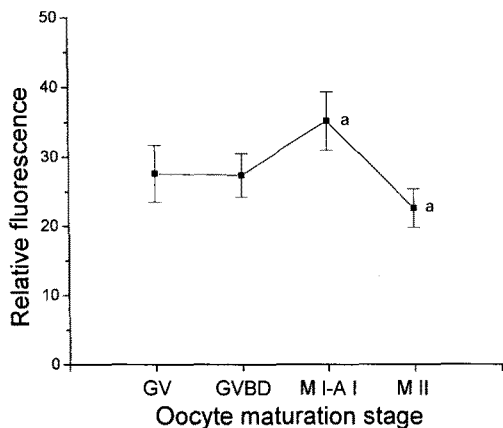
**Figure 1.** Calibration curve of fluo-3 with calcium calibration buffer kit II. The x-intercept equal to the  $\log K_d^{\text{indicator}}$ . F is fluorescence of the fluo-3 in standard solution,  $F_{\text{min}}$  is fluorescence of the fluo-3 in the absence of calcium (0  $\mu\text{M}$  calcium) and  $F_{\text{max}}$  is fluorescence of the fluo-3 in calcium-saturated solution (39.8  $\mu\text{M}$  calcium). Log calcium concentration (nM) represents the free calcium concentration in logarithm.



**Figure 2.** Changes in free calcium concentration on the time course of meiotic maturation of rat cumulus-free oocytes during in vitro culture for 15 hours. Values represent the mean  $\pm$  S.D. Abbreviations: GV=germinal vesicle, GVBD=germinal vesicle breakdown, M I -A I=metaphase I -anaphase I, M II=metaphase II, 1.71mM Ca=calcium-containing medium, 0mM Ca=calcium-free medium, BAPTA/AM=calcium-containing medium, after intracellular calcium chelation with 10  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM (BAPTA/AM). a= $P < 0.05$ , b= $P < 0.01$ , c= $P < 0.001$



**Figure 3.** Effect of calcium in the maturation of rat cumulus-free oocytes during in vitro culture for 15 hours. Abbreviations are same as those in figure 2, and PB=polar body formation. a=P<0.01, b=P<0.001.



**Figure 4.** Changes in relative concentration of calmodulin on the time course of meiotic maturation of rat cumulus-free oocytes during in vitro culture for 15 hours. Values represents the mean  $\pm$  S.D. Relative fluorescence represents the relative concentration of calmodulin. Abbreviations are same as those in figure 2. a=P<0.001.

자로 진행되지 못해 metaphase II 난자의 calcium 함량은 측정이 불가능하였다

Calcium chelator인 BAPTA/AM을 처리한 후 기본배양액으로 옮겨 배양한 난자(BAPTA/AM)에 있어서는 핵막붕괴 난자의 free calcium 함량은  $53.71 \pm 2.31$  nM(n=22)로, metaphase I - anaphase I의 난자는  $48.49 \pm 0.51$  nM(n=24), 그리고 metaphase II 난자는  $48.12 \pm 0.42$  nM(n=14)로 calcium 함량이 통계적으로 유의하게(P<0.01) 감소하였

다.

## 2) 난자성숙률에 미치는 Calcium의 영향

각각의 실험군에 있어서의 난자성숙률을 조사하기 위해 미성숙난자의 체외배양 시작 후 3시간에 핵막붕괴를 그리고 배양 15시간 후에 뚜렷한 제 1 극체를 갖는 극체형성률을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Calcium을 함유하는 배양액군(n=168)과 BAPTA/AM 처리군(n=101)에서의 핵막붕괴율은  $82.9 \pm 6.5\%$  와  $91.2 \pm 4.4\%$  로 높게 나타났으나, calcium을 함유하지 않는 배양액군(n=95)에서는 이보다 낮은  $72.0 \pm 12.1\%$ 의 핵막붕괴율을 나타내었다. 제 1 극체 형성률에 있어서는 calcium을 함유하는 배양액군과 BAPTA /AM 처리군에서  $39.2 \pm 6.2\%$ ,  $49.7 \pm 9.4\%$ 를 나타내었으나, calcium을 함유하지 않는 배양액군에서는 극체형성이 일어나지 않았다.

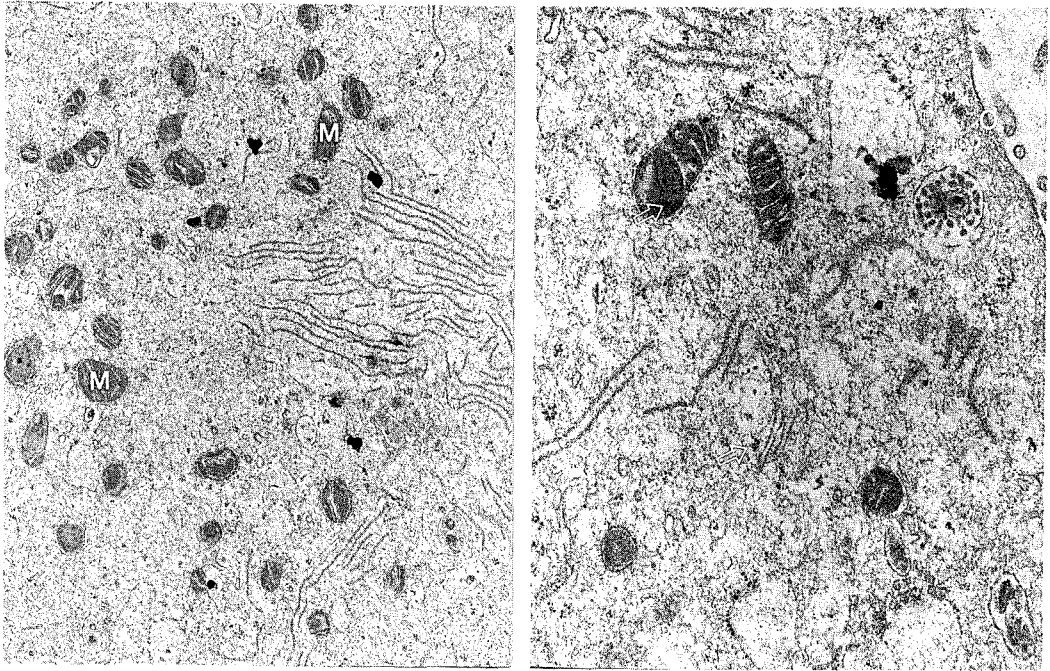
## 3) 난자성숙에 따른 난자내 Calmodulin 함량 변화

난자성숙에 따른 난자내 calcium 함량과 calmodulin 함량의 연관성을 알아보려고 FITC가 표지된 항체를 사용해 측정된 calmodulin의 상대적 함량을 Fig. 4에 나타내었다.

기본배양액에서 체외성숙된 난자의 calmodulin의 형광량은 미성숙난자가  $27.6 \pm 4.1$ (n=45)를 나타내었고, 성숙이 시작된 핵막붕괴 난자는  $27.4 \pm 3.1$ (n=51)로 calmodulin의 형광량은 거의 변화가 없었다. 그러나 metaphase I - anaphase I의 난자는  $35.2 \pm 4.2$ (n=66)으로 유의하게(P<0.01) 증가하였으며, 제 1 극체를 갖는 metaphase II의 난자는  $22.6 \pm 2.8$ (n=72)로 현저하게 감소하였다.

## 4) 전자현미경적 미세구조 및 Calcium 분포 양상

미성숙난자의 세포질에는 많은 수의 mitochondria가 부분적인 군체를 형성하고 있었으며, 크기가 작은 둥근형(round type)과 크기가 조금 큰 막대모양의 타원형(oval type)이었으며, cristae의 발달이 미약하였다(Fig. 5A). Calcium 침전물은 세포질에 부분적으로 산재해 있었고, mitochondria 내부에도 존재하였다(Fig. 5B). 배양 3시간째인 핵막붕괴 시기의 난자는 많은 수의 액포(vacuole)가 나타났고, mitochondria는 둥근형



**A**

**B**

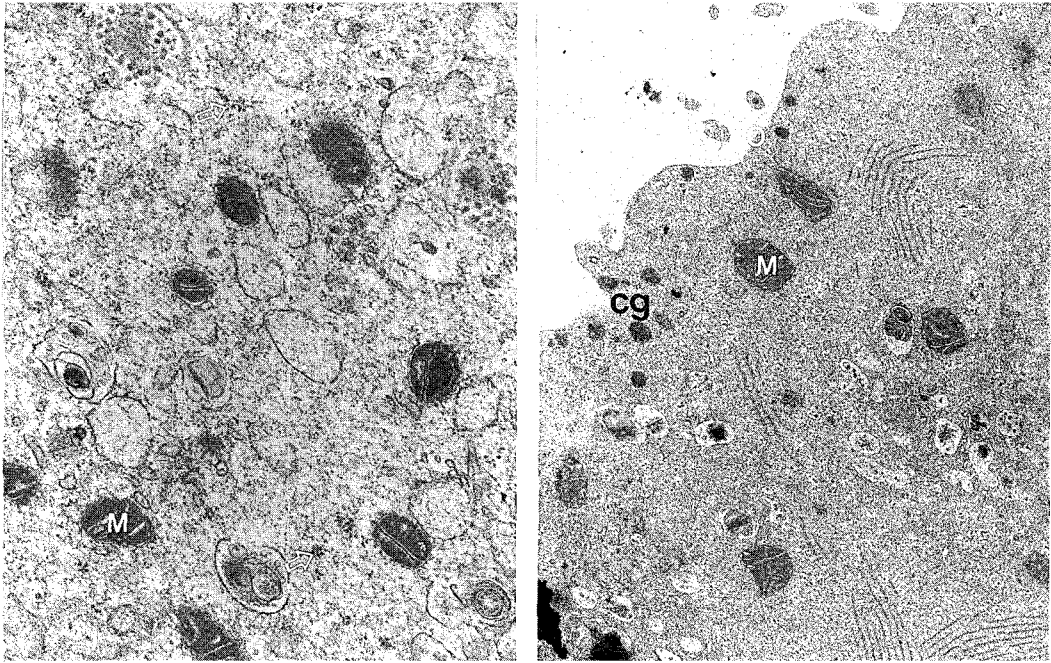
**Figure 5.** Transmission electron micrograph showing calcium localization of rat cumulus-free oocyte in germinal vesicle stage. **A)** Mitochondria in the cytoplasm of oocyte show poor cristae at low magnification ( $\times 12,000$ ). **B)** High magnification micrograph ( $\times 30,000$ ). The arrows shown the calcium-precipitates associated with the mitochondria, in cytoplasm, and some organelles. Abbreviations: O=oolemma, M=mitochondria.

태에서 타원형으로 변화하는 모양을 보였다. Calcium 침전물은 세포질에서는 관찰되나 mitochondria 내에서 발견할 수 없었다(Fig. 6A). Metaphase I - anaphase I의 난자에서는 핵막붕괴시기의 난자와는 별 차이가 없었으나 피질과립이 난막아래에 나타나기 시작했다(Fig. 6B). 성숙한 metaphase II의 난자는 mitochondria 내에 calcium 침전물이 나타났고, 난막근처의 피질과립은 수직으로 증가하였다(Fig. 7A). 수정후 3시간째인 수정란에서는 둥근형의 mitochondria가 나타났고 난막에서 calcium 침전물이 많이 관찰되었다(Fig. 7B).

## 고 찰

본 실험결과에서 calcium을 함유한 기본배양액과 calcium이 없는 배양액(calcium-free medium) 내 핵막붕괴시기의 난자내 calcium 함량은 유의하게 증가하였으나, BAPTA/AM을 처리한 경우 핵막붕괴 시기의 난자내 calcium 함량은 미성숙

난자보다 낮게 나타났다(Fig. 2). 그러나 기본배양액군과 BAPTA/AM 처리군 모두에서 난자는 높은 핵막붕괴율을 나타내었으나, calcium-free 배양액군에서의 핵막붕괴율은 훨씬 낮게 나타났다(Fig. 3). Calcium-free 배양액군에서의 낮은 핵막붕괴율은 미성숙한 생쥐 난자가 calcium-free 배양액에서 배양될 때 1.5시간 안에 퇴화가 일어난다는 보고(De Felici and Siracusa, 1982)와 본 실험의 결과는 일치된다. 또한 calcium-free 배양액군에서 높은 난자내 calcium 함량을 나타내었는데, 이것은 배양액의 영향으로 난자내 저장고로부터의 calcium 방출이 일어난 것으로 생각되며, 이렇게 최적 농도 이상으로 증가된 calcium 함량은 난자의 퇴화를 일으키는 원인이 되는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 생쥐 난자의 핵막붕괴에 calcium 증가가 필요하다는 보고(De Felici et al., 1991; Kaufman and Homa, 1993)와 난자로부터 방출된후 2-4시간 동안 calcium유동이 지속된다는 결과(Carroll et al., 1994)들과 일치하고 있다. 난자의 핵막붕괴에 calcium 증가를 필요로



**A**

**B**

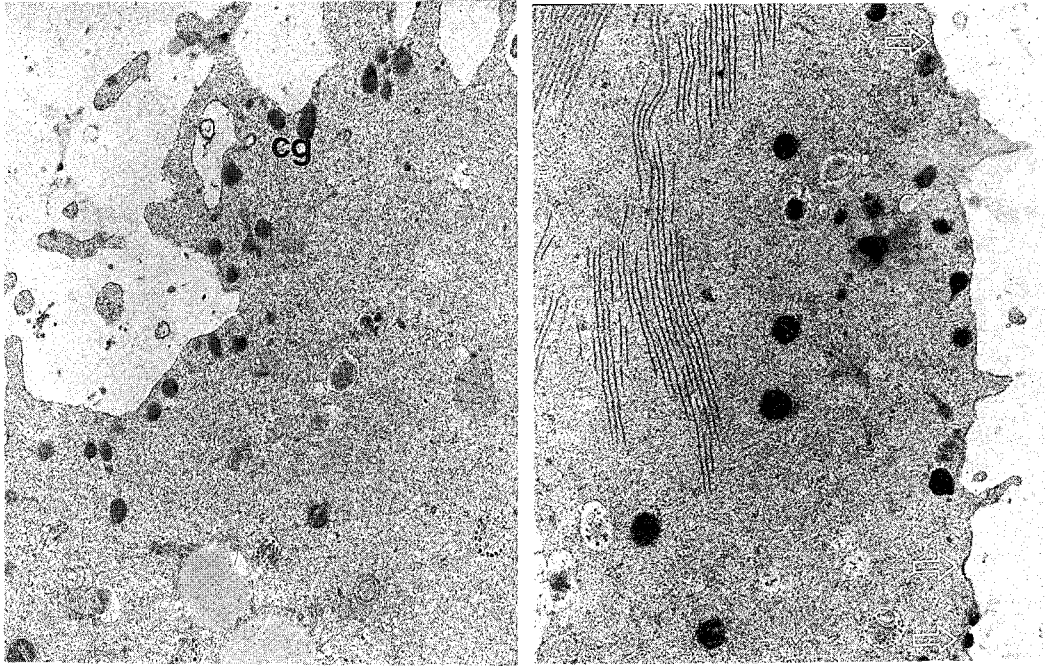
**Figure 6.** Transmission electron micrograph showing calcium localization of rat cumulus-free oocyte at germinal vesicle breakdown stage and at metaphase I -anaphase I stage cultured in vitro. (A) Germinal vesicle breakdown stage. Calcium-precipitates(arrow) disappear within mitochondria. This oocyte was cultured for 3 hours in basic media(mKRBS).  $\times 30,000$ . (B) Metaphase I -anaphase I stage. Some of the cortical granules(cg) located near the plasma membrane. This oocyte was cultured for 8-9 hours in basic media(mKRBS).  $\times 30,000$ .

하지 않는다고 한 Carroll과 Swann(1992), 그리고 Tombes 등(1992)의 실험은 BAPTA/AM을 처리한 난자를 calcium을 포함하는 배양액내에서 관찰하였기 때문에 배양액의 calcium의 영향은 고려되지 않은 결과로 보인다. 그러므로 미성숙한 난자의 핵막붕괴 과정은 세포외액의 calcium이 요구되는 것으로 생각된다.

포유류 난자에 여러 calmodulin 억제물질 처리를 통한 난자성숙 억제 현상은 생쥐(Bornslaeger et al., 1984; Sato et al., 1986), 소(Maruska et al., 1984)에서 보고되었다. 본 실험결과 미성숙난자의 성숙과정 동안에 난자내 calmodulin 함량 변화는 metaphase I - anaphase I 난자에서 통계적으로 유의하게( $P < 0.01$ ) 증가하였다(Fig. 4). 이것은 유사분열의 anaphase 시작과 세포질분열은 calcium 유동과 방추사와 관계되는 calcium - 결합단백질들(calmodulin, calpain 등)에 의존해 일어난다는 보고(Ratan et al., 1988; Hepler, 1989; Kao et al., 1990)와 또한 생쥐 난자에서 형광물질로 표

지된 calmodulin이 염색체가 이동하는 후기의 방추사 부위로 이동되며, 늦은 후기와 말기 사이에 방추사로부터 분리된다는 보고(Hamaguchi et al., 1989)들을 고려할 때 본 실험의 결과에서 흰쥐의 난자성숙시 calmodulin이 anaphase I에서의 염색체 이동을 위한 감수분열 장치에 작용하는 것으로 생각된다.

생쥐의 미성숙난자는 성숙한 난자와는 달리 많은 calcium 저장고를 가지고 있지 않으며, 난자성숙과정 동안에 calcium 저장고의 확충이 일어나는 것으로 보고 있다(Mehlmann et al., 1995). 이것은 미성숙난자가 calcium ionophore인 ionomycin에 반응해 방출하는 calcium량이 성숙난자의 약 1/4 밖에 되지 않는다는 보고에 근거하고 있다(Tombes et al., 1992; Jones et al., 1995). 또한 미성숙난자는 성숙난자에 존재하는 calcium 저장고와 비슷한 크기의 세포내 calcium 저장고를 갖는데, 이 저장고는  $IP_3$ 에 대해 반응성이 약하며, 난자성숙과정 동안에  $IP_3$ 에 대한 반응성 증가가



A

B

**Figure 7.** Transmission electron micrograph showing calcium localization of rat cumulus-free oocyte cultured in vitro at metaphase II and fertilized stage. (A) Metaphase II oocyte. Abundance of cortical granules(cg) were observed near plasma membrane in the oocyte cultured for 15 hours.  $\times 12,000$ . (B) Fertilized oocyte. Calcium-preprecipitates(arrow) appeared on the plasma membrane.  $\times 12,000$

일어난다고 보고하였다(Mehlmann and Kline, 1994). 성계에 있어서 성숙한 난자내 mitochondria는 calcium 저장고로 작용하는데, 수정 과정에서 mitochondria의 역할은 방출되었던 free calcium을 reuptake하는 기관으로 추측되고 있다(Eisen and Reynolds, 1985; Girard et al., 1991). 본 실험에서 난자성숙에 따른 세포소기관의 전자현미경적 관찰 결과 약간의 mitochondria 구조 변화가 관찰되었다(Fig. 5-7). 또한 calcium 침전물은 미성숙난자에서는 mitochondria 내에서 관찰되었다. 이 결과는 mitochondria가 미성숙난자의 calcium 저장고로 이용된다는 주장을 정당화시켜 주고있다. 그리고 핵막붕괴 시기의 난자와 metaphase I - anaphase I 난자에서는 calcium 침전물이 mitochondria 내에서 관찰되지 않았다(Fig. 5B, 6A, B). 이것은 mitochondrial calcium도 핵막붕괴와 세포질 분열에 필요한 free calcium으로 전환된 것으로 생각된다. 그러나 성숙한 metaphase II 난자가 되면 calcium 침전물이 다시 mitochondria 내에서 관찰되었다. 수정란에서는 난자 세포막

에서 관찰되었는데(Fig. 7B), 이는 피질반응과 관련된 것으로 보인다. 이것은 위 보고들과 연관성을 갖는 것으로 생각되며, 난자 성숙 시기에 따라 calcium 저장고가 다르며, 난자성숙과정 동안에 IP3에 대한 calcium 저장고로 존재하는 소포체가 발달되기 이전에는 mitochondria가 calcium 저장고 역할을 부분적으로 담당하는 것으로 사료된다.

본 실험의 여러 결과들을 종합해 볼 때, 난자성숙과정은 세포외액의 calcium에 의존적인 반응인 것으로 사료된다. 난자 성숙시기별로 난자내 free calcium과 calmodulin의 함량이 변화하고, 난자내 calmodulin 함량 변화는 calcium 함량 변화와 일치하지 않게 나타났는데, 이는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 생각된다. 또한 mitochondria가 calcium 저장고 역할을 부분적으로 담당하는 것으로 생각되며, 소포체가 발달되기 이전에 존재하는 calcium 저장고는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.



## 결 론

본 연구는 흰쥐의 난자성숙시기 동안에 calcium 대사를 조사하고자 하였다. 난자내 free calcium과 calmodulin 함량 측정은 fluo-3/AM과 FITC를 사용하여 microscope fluorescence spectrometer로 측정하였다. 난자내 calcium 침전물의 분포양상은 투과전자현미경으로 관찰하였다.

미성숙난자의 체외배양에 있어서, GV-난자내 free calcium 함량은  $55.9 \pm 3.5$  nM를 나타냈다. Calcium 함유 배양액에서 배양된 난자내 free calcium 함량은 핵막붕괴 시기( $64.2 \pm 7.3$  nM)에 증가하였다. Calcium chelator( $10 \mu\text{M}$  BAPTA/AM)를 처리한 후 기본배양액으로 옮겨 배양한 난자에서는 대조군보다 calcium 함량이 약간 낮았다. Calcium을 함유하지 않는 배양액에서 핵막붕괴 시기( $72.7 \pm 3.4$  nM)와 metaphase I - anaphase I ( $88.0 \pm 3.4$  nM)의 난자는 현저히 free calcium 함량이 증가하였다. 난자성숙률에 있어서는 대조군( $82.9 \pm 6.5\%$ )과 calcium chelator 처리군( $91.2 \pm 4.4\%$ )에서는 높은 핵막붕괴율을 나타냈지만, calcium을 함유하지 않는 배양액에서는 대조군보다 낮은 핵막붕괴율( $72.0 \pm 12.1\%$ )을 나타내었고, 극채형성이 이루어지지 않고 퇴화되었다. 난자내 calmodulin 함량은 metaphase I - anaphase I ( $35.2 \pm 4.2$ )에서 미성숙난자( $27.6 \pm 4.1$ )나 핵막붕괴시기 난자( $27.4 \pm 3.1$ )에 비해 유의하게 증가되었다 ( $P < 0.001$ ). 난자내 calcium 분포는 미성숙난자의 경우 mitochondria와 세포질에서 관찰되었고, 핵막붕괴시기와 metaphase I - anaphase I 난자에는 mitochondria 내에서 관찰되지 않았다. 그러나 metaphase II 난자에서는 다시 mitochondria 내에서 관찰되었고, 수정란에서는 세포막에 많이 분포하는 것으로 관찰되었다.

위의 결과들로 보아 난자성숙 시기별로 난자내 free calcium과 calmodulin의 함량 변화가 일어나고, 난자성숙에는 extracellular calcium이 요구됨을 알 수 있다. 또한 난자성숙시기에 따라 난자내 calcium 분포 양상이 변화함을 알 수 있었다.

## 인 용 문 헌

- Batta SK, Knudsen JF: Calcium concentration in cumulus-enclosed oocytes of rats after treatment with pregnant mare's serum. *Biol Reprod* 1980, 22, 243-246.
- Bornslaeger EA, Wilde MA, Schultz RM: Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev Biol* 1984, 105, 488-499.
- Carroll J, Swann K: Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. *J Cell Biol* 1992, 267, 11196-11201.
- Carroll J, Swann K, Whittingham D, Whitaker M: Spatiotemporal dynamics of intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* 1994, 120, 3507-3517.
- De Felici M, Siracusa G: Survival of isolated, fully grown mouse oocytes is strictly dependent on external  $\text{Ca}^{2+}$ . *Dev Biol* 1982, 92, 539-543.
- De Felici M, Dolci S, Siracusa G: An increase of intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  is essential for spontaneous meiotic resumption by mouse oocytes. *J Exp Zool* 1991, 260, 301-405.
- Eisen A, Reynolds GT: Source and sinks for the calcium released during fertilization of single sea urchin eggs. *J Cell Biol* 1985, 100, 1522-1527.
- Girard JP, Gillot I, De Renzis G, Payan P: Calcium pools in sea urchin eggs: Roles of endoplasmic reticulum and mitochondria in relation to fertilization. *Cell Calcium* 1991, 12, 289-299.
- Hamaguchi Y, Iwasa F, Toriyama M, Sakai H: A comparative study of the distribution of fluorescently labeled calmodulin and tubulin in the meiotic apparatus of the mouse oocyte. *Cell structure and function* 1989, 14, 241-248.
- Hepler PK: Calcium transients during mitosis: Observations influx. *J Cell Biol* 1989, 109, 2567-2573.
- Hepler PK, Callaham DA: Free calcium increases during anaphase in stamen hair cells of *Tradescantia*. *J Cell Biol* 1987, 105, 2137-2143.
- Homa ST: Neomycin, an inhibitor of phosphoinositide hydrolysis, inhibits the resumption of bovine oocyte spontaneous meiotic ma-

- turation. *J Exp Zool* 1991, 258, 95-103.
- Hong SG, Choi IY, Lee JY: The change of calcium and calmodulin concentration in preimplantation embryos of rat. *Kor J Fertil Steril* 1996, 23, 223-231.
- Jones KT, Carroll J, Whittingham DG: Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced  $Ca^{2+}$  release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J Biol Chem* 1995, 270, 6671-6677.
- Kao JP, Alderton JM, Tsien RY, Steinhardt RA: Active involvement of  $Ca^{2+}$  in mitotic progression of swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 1990, 111, 183-196.
- Kaufman ML, Homa ST: Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *J Exp Zool* 1993, 256, 69-76.
- Maruska DV, Leibfried ML, First NL: Role of calcium and the calcium-calmodulin complex in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1984, 31, 1-6.
- Mehlmann LM, Kline D: Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Calcium release in response to sperm or inositol triphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol Reprod* 1994, 51, 1088-1098.
- Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA, Kline D: Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 1995, 170, 607-615.
- Moody WJ: The development of calcium and potassium currents during oogenesis in the starfish, *Leptasterias hexactis*. *Dev Biol* 1985, 112, 405-413.
- Nowycky MC, Fos AP, Tsien RW: Three types of neuronal calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985, 316, 440-443.
- Paleos GA, Powers RD: The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. *J Exp Zool* 1981, 217, 409-416.
- Penniston JT: Plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase as active  $Ca^{2+}$  pumps. In: Cheung WY, ed. *Calcium and cell function*, New York: Academic Press, 1983, 4, 99-149.
- Racowsky C: The releasing action of calcium upon cyclic AMP-dependent meiotic arrest in hamster oocytes. *J Exp Zool* 1986, 239, 263-275.
- Ratan RR, Maxfield FR, Shelanski ML: Long lasting and rapid calcium changes during mitosis. *J Cell Biol* 1988, 107, 993-999.
- Ravindranath N, Paradopoulos V, Vornberger W, Zitzmann D, Dym M: Ultrastructural distribution of calcium in the rat testis. *Biol Reprod* 1994, 51, 50-62.
- Sato E: Suppression of spontaneous maturation of isolated cumulus-free mouse oocytes by a calmodulin antagonist. *Endocrinologia Japonica* 1990, 37, 19-25.
- Sato E, Iritani A, Nishidawa Y: Mechanism of inhibition of germinal vesicle breakdown in pig follicular oocytes with special reference to the role of granulosa cell layer. *Jpn J Fertil Steril* 1980, 25, 229-233.
- Sato E, Ueno J, Koide SS: Mouse oocyte maturation modulated by a granulosa cell factor and by heparin and heparan sulfate. *Gamete Res* 1986, 13, 115-124.
- Tombes RM, Simerly C, Borisy GG, Schatten G: Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on  $Ca^{2+}$ , whereas germinal vesicle breakdown is  $Ca^{2+}$ -independent in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 1992, 117, 799-811.