

난자의 GV 유지 및 감수분열 재개의 분자생물학적 조절기전

차의과학대학교 의생명과학과

이 현 서 · 이 경 아*

Molecular Regulatory Mechanism of GV Arrest and Meiotic Resumption in Oocytes

Hyun-Seo Lee, Kyung-Ah Lee*

CHA University, Department of Biomedical Science

[Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(4): 231-236.]

난자의 감수분열

포유류의 난소에서는 원시생식세포 (primordial germ cells)의 감수분열 (meiosis)이 시작된 후 난자는 원시과립세포 (pre-granulosa cells)에 둘러싸여 원시난포 (primordial follicle)을 형성하고, 그 안에서 감수분열이 prophase I (전기)에 정지된 채로 일정 기간을 존재한다.^{1,2} 이렇게 원시난포 안에 감수분열 전기에 멈춰있는 채로 난자는 난포의 성장과 더불어 크기도 성장함과 동시에 앞으로 일어날 정자와의 수정과 그 이후 배아발달 과정을 관장하기에 필요한 mRNA 및 단백질을 축적하게 된다.

감수분열이 멈춰있는 난자의 핵은 다른 세포에 비하여 매우 커서 특별히 germinal vesicle (GV)라고 부르는데, 그 안에는 2~3개의 인이 뚜렷이 관찰된다. 사춘기가 지나 난포발달을 시작한 후, 배란을 위한 황체화호르몬 (leutinizing hormone, LH)의 surge

가 주어지면 이에 의해 난포 내에 존재하던 난자의 감수분열이 재개되는데, 이 과정을 난자성숙이라고 한다. 즉, 난포 안에서는 난자 주변을 둘러싸고 있는 난구세포 (cumulus cells)의 세포간 연결이 느슨해지면서 그 사이에 존재하는 gap junction의 연결이 끊어지게 되고, 동시에 난자는 핵막이 붕괴되는 현상인 germinal vesicle breakdown (GVBD)가 일어나면서 S phase 없이 metaphase I, II (MI, MII)가 연이어서 일어나게 되고, 난자는 다시 한 번 제1극체가 방출된 MII stage에 정지한 상태로 정자와의 수정을 기다리게 된다.³ 정자에 의해 자극을 받은 난자는 제2극체를 방출하면서 제2감수분열을 완성하게 된다.

난자성숙 조절자, cAMP

난자는 난포 내에 존재하는 동안은 GV를 유지하고 있는데, 이때 난자의 원형질막에 존재하는 G-protein coupled receptor는 충분한 양의 cAMP를 만들어 GV arrest를 유지하게 한다.^{4,5} 크기가 충분히 다 자란 난포에 LH surge가 주어지면 난자성숙을 재개하고 배란하게 된다. 한편, 난포로부터 난자를 꺼내어 체외에서 배양할 경우, 난자는 배양액에 아무런 자극이 없는 상태에서도 난자성숙을 재

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-13, 차의과학대학교 의생명과학과, 차병원 기초의학연구소 4층
Tel: (02) 3468-3440, Fax: (02) 563-2028
e-mail: leeka@cha.ac.kr

*This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korean Government (Ministry of Education, Science and Technology) (2009-0068363).

개하게 되는데, 이를 spontaneous maturation이라고 한다.

생쥐를 포함한 여러 종의 생물을 대상으로, 난자를 체외배양하는 배양액 내 cAMP의 농도가 높게 유지될 경우 난자의 GV-arrest 상태를 유지할 수 있다는 사실이 보고되어 있다.⁶⁻⁹ 그 이후, 세포의 cAMP의 농도를 높게 유지할 수 있는 방법으로는, cAMP의 유도체인 dbcAMP를 직접 배양액에 넣어 줄 수도 있고,⁶ adenylate cyclase를 활성화 시켜서 cAMP를 계속 만들게 하거나,¹⁰ 혹은 cAMP의 분해를 관장하는 phosphodiesterase (PDE)의 activity를 억제하는 IBMX, milrinone 등의 억제제를 처리하는 방법 등을 사용하여 체외에서의 난자성숙을 억제하는 방법이 사용되어 왔다.^{11,12}

난자성숙 조절자, PKA

난자 내 높은 농도의 cAMP는 protein kinase A (PKA)를 active/dissociated 상태로 만들어 주는데 이렇게 activate된 PKA가 난자의 GV-arrest를 유지하며, 반대로 PKA 억제제를 처리했을 때 GV가 그대로 유지되지 못하고 난자성숙이 재개되는 것을 관찰함으로써 PKA가 난자성숙 재개에 관여할 것은 모두가 받아들이는 사실이다.¹³ 그러나, 오래 전부터 cAMP와 PKA의 역할이 알려졌음에도 불구하고, 실제로 난자에서 PKA의 기질이 무엇인지 알려져 있지 않았다가 최근에 M-phase promoting factor (MPF)의 조절인자들인 Wee1, Cdc25 등이 PKA와 G2 cell cycle arrest와 직접적으로 연결되어 있다는 분자생물학적인 기전에 관한 연구가 보고되었다.

Figure 1에서 보는 바와 같이, Wee1이 활성화되어 Cdc2의 14번, 15번 아미노산을 인산화시키면 Cdc2 활성도를 떨어뜨려서 GV arrest를 유지할 수 있고, 반면 Cdc25가 활성화되면 Cdc2의 14, 15번 두 개의 인산을 탈인산화 시켜서 MPF를 활성화시키게 되어 난자성숙이 일어나게 된다. 이렇게 MPF의 활성화에 영향을 미치는 Wee1과 Cdc25 자체가 인산화되는 것이 모두 PKA에 의해서 조절되는 것이 보

고되었다.¹⁴⁻¹⁶ Wee1과 Cdc25는 여러 isoform이 보고되어 있는데, 생쥐에서는 이 중 특별히 Wee1B와 Cdc25B가 관련되어 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁴⁻¹⁶

난자성숙의 또 다른 중요한 조절자로서 Mos/MEK/MAPK pathway가 있는데, cAMP-dependent PKA가 Mos mRNA의 polyadenylation을 억제한다는 것이 흰쥐 난자를 이용하여 연구발표 되어 있다.¹⁷ 따라서, cAMP-PKA 시그널링은 난자의 성숙을 조절하는데 매우 중요한 조절자로 알려져 있는 MPF와 MAPK의 상위에서 작용하며, 이외에도 다른 단백질의 조절자로서 작용할 가능성이 충분히 있기 때문에 난자에서의 cAMP-dependent PKA의 조절을 받는 새로운 기전을 더 연구하는 것이 매우 중요하다고 생각된다. 또한 *Xenopus* 난자에서는 Cdc25C 역시 MAPK에 의해 영향을 받는다는 것이 보고되어 있어,¹⁸ MPF와 MAPK, 그리고 PKA system의 매우 복잡한 상호작용에 의하여 난자의 성숙과 세포주기가 조절되고 있음을 알 수 있다.

난자성숙 조절자, MPF

난자의 감수분열 재개 즉, 난자성숙에 관한 많은 연구가 이루어졌음에도 불구하고, 아직도 어떻게 난자의 감수분열이 정지된 채로 유지되고 재개되는지, LH에 의해 난포 내에서 시작되는 시그널링의 정확한 분자생물학적 기전은 완전히 밝혀져 있지 않다. 그러나, 체세포분열 세포주기의 중요한 조절자인 MPF는 난자의 감수분열도 조절하는 중요한 조절자로서 Cdc2 (또는 CDK1이라 함)과 cyclin B1의 복합체로써 이루어져 있다.¹⁹

원시난포의 성장이 재개되면, 난자는 난포성장과 함께 자라는 동안 충분한 양의 Cdc2와 cyclin B1 단백질이 모두 만들어져야만 난자성숙이 일어날 수 있는 상태의 competency를 갖는다.^{20,21} 성체의 preantral follicle로부터 나온 난자나, 혹은 15일령 이전의 어린 생쥐로부터 나온 난자의 경우, 체외배양을 해도 난자성숙이 일어나지 않는데 그 이

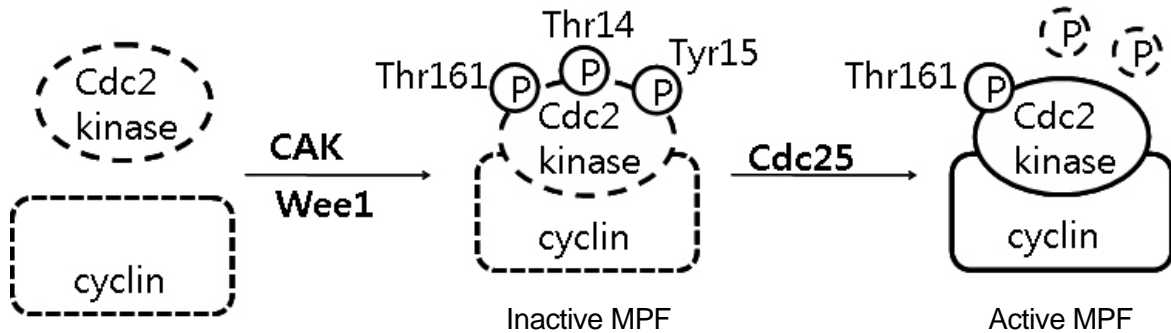


Figure 1. Schematic diagram showing regulatory factors for MPF activity. MPF consists of Cdc2 and cyclin B. Wee1 kinase phosphorylates number 14 and 15 amino acids, while CAK (cyclin-dependent kinase activating kinase) phosphorylates number 161 amino acids. MPF is still inactive when the combined Cdc2 is phosphorylated at 14 and 15 position, and it becomes active when Cdc25 phosphatase dephosphorylates those two phosphates.

Hyun-Seo Lee. Molecular Regulatory Mechanism of GV Arrest and Meiotic Resumption in Oocytes. Korean J Reprod Med 2009.

유는 Cdc2나 cyclin B1 단백질의 양이 충분히 만들어지지 않았거나, 혹은 두 단백질 간의 상호작용이 충분히 이뤄지지 않기 때문인 것으로 생각된다.^{20,22}

GV arrest를 유지하기 위해서는 MPF의 활성을 낮게 유지하는 것, 즉 낮은 Cdc2 활성도를 유지하는 것이 중요하고, 이는 Cdc2의 인산화/탈인산화에 의해 조절되는데, Cdc2의 14번, 15번 아미노산이 Wee1에 의하여 인산화되면 MPF는 비활성화된다 (Figure 1). 이와는 반대로 161번 아미노산을 인산화시키는 cyclin dependent kinase (CDK)-activating kinase (CAK)나, 14번, 15번 아미노산의 탈인산화를 주도하는 Cdc25에 의해 MPF는 활성화된다. 활성화된 MPF는 condensin, nuclear lamin, Golgi matrix 단백질, 그리고 centrosomes, microtubules 등과 관련된 단백질 등의 인산화 및 다른 kinases들을 활성화시켜서 핵막붕괴, chromatin condensation 등 여러 가지 핵과 세포질의 변화를 관장한다.^{23,24}

MPF 활성화 기전에 대한 연구는 아직까지 더 많이 진행되어야 하는 상태로서, 인산화/탈인산화에 의한 활성화 기전 이외에도 cyclinB와 Mos/MEK/MAPK pathway가 중요한 역할을 할 것이라는 연구결과들이 속속 발표되고 있다.^{25,26} Cdc2의 동반자인 cyclin B1의 농도도 Cdc2의 활성도 조절에 매우 중요해서 cyclin B1을 과발현 시킬 경우, 높은 cyclin B1 농도에 의해서 Cdc2가 활성화 되어 난자

내 cAMP가 높음에도 불구하고 GVBD가 일어나는 것이 보고되었다.^{27, 28} 따라서 GV arrest 유지를 위해서는 cyclin B1의 농도조절이 매우 중요하며, 이 과정의 조절을 위해서는 anaphase-promoting complex/cyclosome (APC)가 관여한다. APC는 E3 ubiquitin ligase로써 cyclin B1을 ubiquitination 시켜서 26S proteasome을 통한 proteolysis를 유도한다.^{28,29} GV arrest를 유지하기 위해서는 낮은 농도의 cyclin B1을 유지해야 하고, 이를 위해서 APC가 일해야 하는데, 이때 cdh1이 중요한 co-activator로서 작용한다고 알려져 있다.²⁸ 생쥐난자에서 APC^{cdh1}은 주로 후기 M phase에서 초기 G1 phase에 존재하면서, cyclin B1 분해를 활성화하는데 중요한 역할을 하면서 GV를 arrest하는 것이 보고되었다.²⁸

난자성숙 조절자 Mos/MEK/MAPK

MPF가 난자성숙을 재개하는데 관련되었다는 사실이 관찰 보고된 이후에 얼마 되지 않아서 난자성숙이 일어나는 동안 MAPK 또한 활성화되다가 수정이 일어나면 비활성화 된다는 사실이 보고되었다.^{30,31} MAPK 활성화 기전은 종에 따라 다른데, 설치류의 경우 MAPK 활성화는 GVBD 2시간 이후에 일어나기 때문에, MAPK는 GVBD에는 관련되지 않는 것으로 알려져 있다.³¹ 그러나, Mos로부터

시작하여 여러 단계의 *kinase cascade*를 거쳐서 MAPK로 이어지는 시그널링이 GVBD 이후, 난자의 *meiotic maturation*에서 여러 단계를 조절하는 중요한 인자로 알려져 있다.³² 실제로 *Mos-deficient* 생쥐모형을 이용하여, *Mos/MEK/MAPK* 시그널링은 정상적인 방추사와 염색체를 형성하고, MI stage에 떨어졌던 MPF의 활성을 MI 이후에 다시 활성화시키며, 그 이후의 MII arrest를 유지하는데 매우 중요하다는 사실이 보고되었다.³³

그러나, 인위적으로 MAPK를 활성화시키면 GVBD를 유도하거나 촉진시킨다는 연구가 소의 난자를 이용하여 보고되어 있어서,³⁴ MAPK가 GVBD와 MPF 활성화에 실제로 어떤 역할을 하는지에 대한 연구가 더 필요하다. 현재까지 난자성숙과 그 이후의 세포주기 조절에 관련된 중요한 조절인자로서 가장 많이 알려져 있는 MPF와 MAPK의 상호관계에 대해서는 아직까지 많은 연구가 서로 상반되는 결과를 보이는 경향이 있기도 하고, 종에 따른 차이도 존재하고 있어서 조금 더 깊이 있는 연구가 더 많이 필요한 분야로 생각된다.^{25,35}

난자성숙에 미치는 난포세포의 영향

지금까지는 난자 자체의 MPF와 MAPK에 대하여 정리하였는데, 실제로 난포 내에 존재하는 난자는 난구세포와 과립세포 (*granulosa cells*) 등과 연결된 *cell-to-cell communication*에 의하여 매우 긴밀한 정보를 서로 교환하면서 난자성숙을 억제하거나 조절하는 매우 복잡한 구도 안에서 영향을 받는다. 따라서 주변의 난포세포 없이 체외배양 하는 난자, 혹은 난자-난구세포 복합체의 난자성숙 기전 이외에도 자연상태에서의 난포 내 난자성숙의 기전을 이해하기 위해서는 난구세포와 과립세포와의 관계 및 그 세포들에 의한 기여도를 무시할 수 없을 것이며, 이 난자-난구세포의 복합체와 과립세포 간의 상호조절 관계는 따로 한 축으로 더욱 상세하게 연구되어야 할 것이다. 난포세포의 역할에 대한 정리는 Liang 등에 의한 종설 논문의 한 부분

에 잘 정리되어 있다.³²

맺는 글

1971년 Masui와 Markert에 의해 MPF가 발견된 이후, 지난 30여년 동안 MPF 자체에 대한 생화학적 분석 및 그 기능에 대한 연구결과 이외에도,³⁶ 이를 중심으로 MAPK, cAMP, 그리고 PKA 등 여러 가지 시그널링 네트워크에 의해 난자성숙을 억제하고 재개하는 기전에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나, 아직도 정확한 분자생물학적 기전이 확립되지 않은 채로 더 많은 연구가 필요한 분야이다. 난자성숙에 관한 연구는 난자가 정자와의 정상적인 수정과 그 이후 배아발달을 통해 건강한 아기를 탄생시키기에 반드시 필요한 생식세포로서, 인류의 종족보존 및 행복한 가정을 영위할 수 있기 위해 필수적인 생식의학의 한 축이기도 하지만, 생식세포의 감수분열 기전에 대한 세포생물학적 기초연구에 있어서도 아직도 연구할 과제가 많은 분야이기도 하다.

이제까지 유전자의 작용기전 연구를 위해서 많이 사용되어온 유전자 결핍동물 (*knock out animal*)의 제작을 위해서는 오랜 기간, 많은 비용, 특별한 분자생물학적인 지식과 기술 및 설비를 필요로 하기 때문에 모든 연구자에게 보편화된 접근방법은 되지 못하였다. 그러나, 최근에 시도되고 있는 유전자 간섭 (*RNA interference, RNAi*) 방법은 유전자 결핍동물을 이용한 연구에 비하여 짧은 시간에, 적은 비용으로, 연구실에서 쉽게 접근할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 아직까지 기능이 밝혀져 있지 않은 새로운 유전자나 단백질의 기능을 유전자 간섭방법을 이용하여 연구한다면, 아직까지 많은 부분 밝힐 것이 남아있는 난자성숙의 분자생물학적 조절기전에 관한 연구에 속도를 붙일 수 있을 것으로 기대한다. 난자성숙의 조절기전을 밝히는 연구결과는 궁극적으로 불임환자의 치료 및 성공적인 임신과 출산을 돕는 기초로서 유용하게 사용될 것이다.

참 고 문 헌

1. Eppig JJ. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. The Ovary. New York: Raven press 1993: 185-208.
2. Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 143-58.
3. Schmitt A, Nebreda AR. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J Cell Sci* 2002; 115: 2457-9.
4. Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 2002; 297: 1343-5.
5. Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 2004; 306: 1947-50.
6. Cho WK, Stern S, Biggers JD. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 1974; 187: 383-6.
7. Maller JL, Krebs EG. Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1977; 252: 1712-8.
8. Eppig JJ. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 38: 3-8.
9. Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 153-9.
10. Schorderet-Slatkine S, Baulieu EE. Forskolin increases cAMP and inhibits progesterone induced meiosis reinitiation in *Xenopus laevis* oocytes. *Endocrinology* 1982; 111: 1385-7.
11. Sadler SE, Maller JL. In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 1987; 262: 10644-50.
12. Tsafiriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ, Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 1996; 178: 393-402.
13. Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1986; 114: 453-62.
14. Duckworth BC, Weaver JS, Ruderman JV. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16794-9.
15. Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, De Miguel MP, et al. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* 2002; 30: 446-9.
16. Han SJ, Chen R, Paronetto MP, Conti M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol* 2005; 15: 1670-6.
17. Lazar S, Galiani D, Dekel N. cAMP-Dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. *Mol Endocrinol* 2002; 16(2): 331-41.
18. Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M, Ashorn CL, Gallick GE, Stukenberg PT, et al. Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* 2007; 128: 1119-32.
19. Labbe JC, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, et al. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 1989; 8: 3053-8.
20. Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol Reprod* 2000; 63: 1610-6.
21. Fulka J, Jr., Motlik J, Fulka J, Crozet N. Activity of maturation promoting factor in mammalian oocytes after its dilution by single and multiple fusions. *Dev Biol* 1986; 118: 176-81.
22. Mitra J, Schultz RM. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J Cell Sci* 1996; 109: 2407-15.
23. Doree M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 2002; 115: 2461-4.
24. Jones KT. Turning it on and off: M-phase promoting factor

- during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 1-5.
25. Abrieu A, Doree M, Fisher D. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* 2001; 114: 257-67.
 26. Haccard O, Jessus C. Redundant pathways for Cdc2 activation in *Xenopus* oocyte: either cyclin B or Mos synthesis. *EMBO Rep* 2006; 7: 321-5.
 27. Ledan E, Polanski Z, Terret ME, Maro B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev Biol* 2001; 232: 400-13.
 28. Reis A, Chang HY, Levasseur M, Jones KT. APC^{cdh1} activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 539-40.
 29. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004; 116: 221-34.
 30. Haccard O, Jessus C, Cayla X, Goris J, Merlevede W, Ozon R. In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the *Xenopus* oocyte. *Eur J Biochem* 1990; 192: 633-42.
 31. Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1993; 158: 330-40.
 32. Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2037-55.
 33. Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, et al. Meiotic abnormalities of *c-mos* knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod* 1996; 55: 1315-24.
 34. Fissore RA, He CL, Vande Woude GF. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55: 1261-70.
 35. Frankel SK, Van Linden AA, Riches DW. Heterogeneity in the phosphorylation of human death receptors by p42(mapk/erk2). *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 313-20.
 36. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 177: 129-45.