

생쥐 초기배아의 유전자 활성화에 미치는 Protein Kinase Inhibitors의 영향

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 이과대학 생화학과¹
성신여자대학교 자연과학대학 생물학과²

이정은 · 채영규¹ · 배인하² · 윤용달 · 김문규

Effects of Protein Kinase Inhibitors on Gene Activation of Early Embryos in Mouse

Jeong Eun Lee, Young Gyu Chai¹, In-Ha Bae², Young-Dal Yoon and Moon Kyo Kim

Department of Biology, Department of Biochemistry¹, Hanyang University,
Department of Biology², Sungshin Women's University, Seoul, Korea

= Abstract =

Transcriptional activation of the embryonic genome initiates at 2-cell stage in mouse embryo and is characterized by the synthesis of TRC which is restricted to 2-cell stage. To investigate the roles of various protein kinases on the embryonic gene activation, the effects of protein kinase inhibitors on *in vitro* development and protein synthetic profiles of the early mouse embryos were examined.

None of α -amanitin which is a mRNA synthetic inhibitor, H8 which is a PKA inhibitor, and H7 which is a PKC inhibitor, affected on first cleavage of mouse 1-cell embryos *in vitro*. However, all of these drugs inhibited the second cleavage. When the drugs were removed following treatment for 6 hours, H8 or H7 treatment showed little inhibition on subsequent development of 1-cell embryos to 2-cell stage or further. In contrast, α -amanitin irreversibly inhibited the development of 1-cell embryos to 2-cell stage following removal of the drug. Genistein, a TPK inhibitor, inhibited both the first cleavage of 1-cell embryos and the second cleavage of 2-cell embryos, suggesting that TPK activity may be important during the early cleavages.

All of the above four drugs inhibited TRC synthesis as shown by the fluorographic analysis of [³⁵S]-Met labeled protein profiles. When late 1-cell embryos were treated with H7 and analyzed synthetic patterns of [³⁵S]-Met labeled protein, the quantitative differences of protein synthesis on SDS-PAGE appeared on 77 kD and 33 kD region at 32~38 hours post hCG.

From these studies, transcriptional activation of embryonic genome is not essential to the mouse 1-cell embryos to develop to 2-cell stage. However, TPK activity is requisite for both the first cleavage and second cleavage. Similarly, both PKC and PKA activities are required for the second cleavage of mouse embryos, but not for the first cleavage.

* 본 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성 연구비(BSRI-94-4437) 지원에 의한 것임.

서 론

포유류의 배발생 과정에서 초기에는 모계에서 유래된 유전물질에 의해 발생이 조절되고, 발생이 진행됨에 따라 배아의 유전자에 의해 발생이 조절된다. 모계조절(maternal control)에서 배아조절(embryonic control)로의 전환은 모계에서 유래된 mRNA의 손실, 배아 유전자(embryonic gene)의 활성화, 전사 억제제의 존재하에서 나타나는 발생증지현상, 전환의 전후 시기에 나타나는 단백질 합성 양상의 질적인 변화 등을 수반하며, 체외배양시 나타나는 '난할증지현상'과도 깊은 관련이 있는 것으로 여겨진다(Telford *et al.*, 1990). 이러한 발생조절의 전환시기는 햄스터의 경우에는 2-세포기(Seshagiri *et al.*, 1992), 사람은 4~8-세포기(Braude *et al.*, 1988), 양과 토끼는 8~16-세포기에 일어나는 것으로 알려져, 그 시기는 각 동물에 따라 다르게 나타난다(review, Telford *et al.*, 1990).

생쥐에서는 배아 유전자의 전사 활성화가 2-세포기에 일어난다고 보고되고 있다(Schultz, 1986; Taylor and Piko, 1987; Poueymirou and Schultz, 1989; Manejwala *et al.*, 1991). 모계에서 유래된 mRNA의 전사 후 변화는 이미 난자 성숙 과정 중에 시작되어 완전히 성장된 난자와 배란된 난자를 비교해 보면 약 30%의 polyadenylated mRNA의 손실이 나타나고(Bachvarova *et al.*, 1985), 이러한 변화들은 수정 후에도 계속되어(Clegg and Piko, 1983a; 1983b) 중기 2-세포기에는 모계의 polyadenylated mRNA 대부분이 붕괴된다(Piko and Clegg, 1982). 한편 후기 2-세포기에는 배아의 유전자로부터 많은 종류의 RNA가 합성되기 시작한다(Clegg and Piko, 1983a; 1983b). 생쥐 1-세포기 배아와 2-세포기 배아 사이에 나타나는 이러한 mRNA의 질적 및 양적인 변화는 단백질 합성 양상의 변화를 가져오며, 이 변화의 일부는 선제하던 mRNA의 번역 활성화와(Braude *et al.*, 1979; Cascio and Wassarman, 1982; Bolton *et al.*, 1984), 일부는 번역 후 변형(post-translational modification)과 polypeptide turnover에 기인한다(Howlet and Bolton, 1985; Howlet, 1986).

수정 후 생쥐 배아의 첫번째 세포주기는 RNA polymerase II 억제제인 α -amanitin에 영향을 받지 않지만(Golbus *et al.*, 1973) 2-세포기 배아에서는

α -amanitin에 의해서 일부 단백질 합성이 억제된다고 보고되고 있다(Bolton *et al.*, 1984; Poueymirou and Schultz, 1987, 1989). 이러한 α -amanitin-sensitive protein들은 전사 활성을 판단하는 중요한 표지물질이 된다. 이들 중 분자량이 73kD, 70kD, 68kD인 단백질들을 TRC(Transcription Requiring Complex)라 하며 이들의 합성은 2-세포기에 제한되고 핵에 존재한다. 이들은 전사 활성화의 주요 산물로 알려진 hsp70(heats shock protein 70, Bensaude *et al.*, 1983; Bolton *et al.*, 1984)과는 electrophoretic mobility와 soluble property에 의해서 구별되어 진다(Conover *et al.*, 1991).

배아 유전자의 전사 활성화는 수정 이후 경과되는 시간의 길이에 따라 영향을 받으나(Latham *et al.*, 1992), DNA합성(Howlett, 1986; Poueymirou and Schultz, 1987), 세포분열(Petzoldt, 1984; Poueymirou and Schultz, 1987, 1989), 핵과 세포질의 비율(Petzoldt and Muggleton-Harris, 1987)등과는 관계가 없다고 보고되고 있다. 한편 Williams 등(1992)은 정자가 ligand로서 난자 원형질막의 G protein-coupled receptor와 상호작용을 통해 난자의 활성을 일으키는 것으로 보고하고 있다. 따라서 수정 후 난자와 정자의 융합이 신호가 되어 첫번째 난할과정을 거치는 동안 난자내에 축적되어 있던 mRNA가 번역되거나 이미 합성되어 있던 단백질이 번역 후 변형을 통하여 활성화되고 이 인자(들)가 배아 유전자의 활성화를 조절할 것이라고 생각된다.

세포의 신호전달(signal transduction)은 이차전령(second messenger)을 통해 세포내에서 다양한 생물학적 반응들을 불러 일으킨다. 신호 의존적인 전사 활성화(signal-dependent transcriptional induction)의 경우 외부자극은 수용체를 매개로 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)와 Ca^{++} 등과 같은 이차전령을 생성시키고, 이는 순차적으로 각종 protein kinases와 protein phosphatases를 활성화시켜 유전자 발현을 조절하게 된다. 또한 세포의 대사 및 증식, 분화등을 조절하는 것으로 알려진 EGF(epidermal growth factor)를 비롯한 여러 성장요인들의 수용체에서 tyrosine protein kinase(TPK)의 활성이 나타나는 것으로 알려져 있다(Nilsen-Hamilton, 1989).

생쥐 1-세포기 배아에서는 PKA의 활성(Poueymirou and Schultz, 1989)과 TPK의 활성

Table 1. Dosage effects of α -amanitin(α -AM), H8, H7, or genistein(Gen) on development of the late 1-cell mouse embryos during *in vitro* culture

Treatment (Conc.)#	No. of 1-cell embryos cultured	No. of embryos developed						
		48 hours post hCG			72 hours post hCG			
		1-cell	≥ 2 -cell	CR1 ^a	1-cell	2-cell	≥ 4 -cell	CR2 ^b
Control	106	0	106	100.0	0	10	96	90.6
α -AM (10)	46	1	45	97.8	1	45	0	0.0*
α -AM (25)	43	0	43	100.0	0	43	0	0.0*
H8 (50)	42	0	42	100.0	0	9	33	78.6
H8 (100)	62	2	60	96.8	1	59	1	1.7*
H8 (200)	37	2	37	94.9	2	37	0	0.0*
H7 (25)	64	0	64	100.0	0	40	24	37.5*
H7 (50)	82	0	82	100.0	0	80	0	0.0*
H7 (100)	56	2	56	96.6	1	51	0	0.0*
Gen (50)	81	37	39	48.1	30	32	0	0.0*
Gen (75)	79	57	22	27.9*	36	16	0	0.0*

The late 1-cell mouse embryos were collected at 26 hours post hCG.

#; The unit of concentration of α -AM was $\mu\text{g/ml}$ and those of H8, H7, and genistein were μM .

Degenerated embryos are not shown in this table.

a; First cleavage rate(%)=No. of 2-cell embryos/No. of the examined embryos \times 100.

b; Second cleavage rate(%)=No. of 4-cell embryos/No. of 2-cell embryos \times 100.

Significance: * $p < 0.001$

(Besterman and Schultz, 1990)이 있으며, 전사 인자 AP-1의 활성(Schwartz and Schultz, 1992)도 나타나는 것으로 보고되고 있다. 따라서 발생과정 중 배아 유전자의 전사 활성화도 세포에 존재하는 신호전달에 의한 조절기작들이 관여할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 PKA 억제제인 N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquin-olinesulfonamide(H8)(Hidaka *et al.*, 1984)와 PKC 억제제인 1-(5-isoquinoliny)sulfonyl)-2-methylpiperazine(H7)(Hidaka *et al.*, 1984), 그리고 TPK 억제제인 genistein(Akiyama *et al.*, 1987)을 생쥐 1-세포기와 2-세포기 배아에 처리하여 이들이 배아의 유전자 활성화에 미치는 영향을 알아보고, 이들이 조절하는 단백질 합성 양상을 비교하여 배아의 유전자 활성화에 관여하는 인자(들)를 알아봄으로써 포유류 배발생 초기에 일어나는 유전자 활성화의 조절기작을 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 배아의 획득

본 실험에서 사용한 실험동물은 광주기를 명

14시간, 암 10시간으로 조절되는 사육실에서 사육된 Swiss albino인 ICR계통의 생쥐로 암컷은 생후 7-8주 된 것을, 수컷은 생후 12주 이상 된 것을 사용하였다.

배아를 획득하기 위하여 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma)과 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma)를 46~48시간 간격으로 암컷생쥐의 복강내에 주사하여 파배란을 유도한 뒤, 수컷 생쥐와 교미시켰다. 이때 배아시기의 동기화(synchronization)를 위해 교미시간을 hCG주사 후 12~14시간으로 제한하였다(Latham *et al.*, 1991).

초기 1-세포기 배아는 hCG주사 후 20시간에 질진(vaginal plug)이 확인된 암컷으로부터 수란관을 적출해 해부현미경(Wild M3Z)하에서 팽대부를 핀셋으로 찢어서 획득한 뒤, 난구세포피를 제거하기 위해 0.1% hyaluronidase(Sigma)를 처리하였다. 후기 1-세포기 배아는 hCG주사 후 26시간에, 그리고 초기 2-세포기 배아는 hCG주사 후 32시간에 수란관을 적출하여 기본배양액을 관류(flushing)하는 방법으로 획득하였으며, 필요에 따라 0.1% hyaluronidase를 처리하였다(Bolton *et al.*, 1984).

2. 배아의 배양

배아는 microdroplet 방법으로 37℃, 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기(Cellstar QWJ100)내에서 배양하였다(Brinster, 1963).

기본배양액으로는 0.1% BSA(bovine serum albumin, Sigma)가 첨가된 simplex optimized medium(SOM, Lawitts and Biggers, 1992)을 사용하였다.

각각의 실험군은 예비실험 결과(표 1)를 바탕으로 25 µg/ml *α*-amanitin(Sigma), 100 µM H8(Sigma), 50 µM H7(Sigma), 75 µM genistein(Sigma)을 처리한 배양액에서 배양하였다. 대조군은 실험군과 같이 수확하여 억제제를 처리하지 않고 배양한 배아로 하였다.

배아의 초기 발생 양상은 hCG주사 후 48, 72시간에 해부현미경 하에서 첫번째와 두번째 난할의 유무로 판정하였다.

3. 배아의 [³⁵S]methionine 방사능 표지

각각의 protein kinase inhibitor가 TRC 합성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 hCG주사 후 39시간부터, H7의 영향하에서 합성되는 단백질 양상을 비교하기 위해서는 hCG주사 후 26시간부터 3시간 간격으로 배아를 1 mCi/ml L-[³⁵S]methionine(sp. act. approx. >1000 Ci/mmol, Amersham, UK)이 포함된 배양액에서 3시간 동안 방사능으로 표지시켰다.

방사능으로 표지된 배아는 0.1% PVP(polyvinylpyrrolidone, Sigma)가 포함된 배양액으로 여러번 세척한 후, SDS-PAGE 분석을 위해서 20 µl SDS-sample buffer(Laemmli, 1970)에 넣어 -20℃에서 냉동보관 하였다.

TRC 합성 여부를 알아보기 위해서 방사능으로 표지된 배아의 일부를 Conover 등(1991)의 방법에 따라 2% Triton X-100(TX-100, Sigma)과 0.3 M KCl을 포함하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)로 상온에서 10~15분간 처리하고 0.25 M MgCl₂가 포함된 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)에 세척한 후 전기영동 분석을 위해 SDS-sample buffer(Laemmli, 1970)에 넣어 -20℃에서 보관하였다.

4. 일차원 전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli(1970)의 방법을 변용하여 0.75 mm 두께의 4% stacking gel과 7.5% separating gel을 사용하였다. 준비된 시료를 10~12 embryos/lane이 되도록 loading 한 뒤, gel은 9 mA로 stacking, 18 mA로 separating 시켰다.

전기영동이 끝난 후 gel은 Merrill 등(1981)의 방법에 따라 silver staining을 하였다. ³⁵S로 표지된 단백질을 검출하기 위해 intensifying screen하에서 Kodak X-Omat AR5 X-ray film을 가지고 fluorography를 수행하였다(Bonner and Laskey, 1974). 이 때 gel은 -70℃에서 4~5일간 노출시켰다.

5. 통계 처리

첫번째 난할률은 실험한 총 배아의 수와 2-세포기로 발생한 배아수로, 두번째 난할률은 hCG주사 후 48시간에서 2-세포기로 발생한 배아수와 hCG주사 후 72시간에서 4-세포기로 발생한 배아의 수로 통계 처리를 하였다. 관찰 결과의 통계 처리는 χ^2 -test로 하였으며, 이때 p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였다.

Table 2. Effects of *α*-amanitin(*α*-AM), H8, H7, or genistein(Gen) on development of the early 1-cell mouse embryos during *in vitro* culture

Treatment	No. of 1-cell embryos cultured	No. of embryos developed						
		48 hours post hCG			72 hours post hCG			
		1-cell	≥2-cell	CR1 ^a	1-cell	2-cell	≥4-cell	CR2 ^b
Control	99	0	99	100.0	0	4	95	96.0
<i>α</i> -AM (25)	10	0	10	100.0	0	9	0	0.0*
H8 (100)	37	0	37	100.0	0	35	2	5.4*
H7 (50)	21	0	21	100.0	0	21	0	0.0*
Gen (75)	39	37	0	0.0*	18	0	0	0.0*

The early 1-cell mouse embryos were collected at 20 hours post hCG. Degenerated embryos are not shown in the data. All abbreviations are the same as in Table 1. Significance: *p<0.001

Table 3. Effects of α -amanitin(α -AM), H8, H7, or genistein(Gen) on development of the late 1-cell mouse embryos during *in vitro* culture

Treatment	No. of 1-cell embryos cultured	No. of embryos developed						
		48 hours post hCG			72 hours post hCG			
		1-cell	≥ 2 -cell	CR1 ^a	1-cell	2-cell	≥ 4 -cell	CR2 ^b
Control	100	0	180	100.0	0	19	161	89.4
α -AM (25)	83	1	82	98.8	0	82	0	0.0*
H8 (100)	109	3	106	97.2	2	105	1	0.9*
H7 (50)	82	0	82	100.0	0	80	0	0.0*
Gen (75)	120	86	23	20.9*	51	16	0	0.0*

The early 1-cell mouse embryos were collected at 20 hours post hCG. Degenerated embryos are not shown in the data. All abbreviations are the same as in Table 1. Significance: * $p < 0.001$

Table 4. Effects of α -amanitin(α -AM), H8, H7, or genistein(Gen) on development of the late 2-cell mouse embryos during *in vitro* culture

Treatment	No. of 2-cell embryos cultured	No. of embryos developed		
		72 hours post hCG		
		2-cell	≥ 4 -cell	CR2 ^b
Control	77	8	69	89.6
α -AM (25)	73	73	0	0.0*
H8 (100)	83	81	1	1.2*
H7 (50)	84	81	3	3.6*
Gen (75)	64	33	0	0.0*

The early 2-cell mouse embryos were collected at 32 hours post hCG. Degenerated embryos are not shown in the data. All abbreviations are the same as in Table 1. Significance: * $p < 0.001$

결 과

1. 난할에 미치는 Protein Kinase Inhibitors의 영향

생쥐 배아의 유전자 발현에 작용하는 각종 protein kinase의 역할을 규명하기 위해 먼저 각각의 protein kinase 억제제를 사용하여 이들이 배아의 첫번째 및 두번째 난할에 미치는 영향을 알아보았다.

초기 1-세포기 배아에 α -amanitin, H8, H7의 처리는 첫번째 난할에는 영향을 주지 않았으나 대부분이 4-세포기로의 발생에는 실패하였다. 한편 genistein 처리군의 경우, 1-세포기 배아들 모두가 난할을 하지 못하고 1-세포기에 머물러 있었다(표 2).

표 3에서 보는바와 같이 후기 1-세포기 배아에 각각의 억제제를 처리하였을 때, α -amanitin 처리군, H8 처리군, H7 처리군 대부분이 2-세포기 배아로 발생하였으나 2-세포기에서 발생이 중지되었다. Genistein 처리군에서는 20.9%의 낮은 첫번

째 난할률을 보여 표 1과 비교 시 생쥐 배아의 초기 1-세포기에 처리된 genistein이 첫번째 난할을 억제하는 효과가 강한 것으로 나타났다.

초기 2-세포기에 처리된 각각의 억제제들은 모두 4-세포기 배아로의 발생을 저해하는 것으로 나타났다(표 4).

위의 결과들로 볼 때, α -amanitin, H8, H7의 처리는 배아를 획득한 시간에 관계없이 첫번째 난할에 영향을 주지 않았지만 두번째 난할에서는 난할 억제 효과를 나타내었다. 그러나 수정란에 처리된 genistein은 첫번째 난할을 억제하였으며, 2-세포기에 처리하였을 때 두번째 난할도 억제하였다.

각각의 protein kinase 억제제가 작용하는 시기를 보다 명확히 알기 위하여 배아에 일정시간만 각각의 억제제를 처리한 후 기본 배양액으로 옮겨 배양한 실험에서, 초기 1-세포기 배아에 처음 6시간만 억제제를 처리하였을 때, α -amanitin 처리군은 4-세포기로 발생하지 못하였으나 H8 처리군, H7 처리군은 각각 89.6%, 88.7%의 난할률을 나타내어, 표 1과 비교시 배아의 첫번째 세포

Table 5. Effects of *α*-amanitin(*α*-AM), H8, H7, or genistein(Gen) on development of the early 1-cell mouse embryos during *in vitro* culture

Treatment	No. of 1-cell embryos cultured	No. of embryos developed						
		48 hours post hCG			72 hours post hCG			
		1-cell	≥2-cell	CR1 ^a	1-cell	2-cell	≥4-cell	CR2 ^b
Control	89	1	88	98.9	0	4	85	95.5
<i>α</i> -AM (25)	41	0	40	97.6	0	37	0	0.0*
H8 (100)	67	0	67	100.0	0	7	60	89.6
H7 (50)	54	1	53	98.1	1	6	47	88.7
Gen (75)	64	25	39	60.9	9	23	32	82.1

The early 1-cell mouse embryos collected at 20 hours post hCG were treated with or without the above drugs for 6 hours. After treatment, embryos were transferred to SOM and cultured further in the absence of drugs. Degenerated embryos are not shown in the data. All abbreviations are the same as in Table 1. Significance: *p < 0.001

Table 6. Effects of the initial 6 hours treatment of *α*-amanitin(*α*-AM), H8, H7, or genistein(Gen) on development of the late 1-cell mouse embryos during *in vitro* culture

Treatment	No. of 1-cell embryos cultured	No. of embryos developed						
		48 hours post hCG			72 hours post hCG			
		1-cell	≥2-cell	CR1 ^a	1-cell	2-cell	4-cell	CR2 ^b
Control	84	0	84	100.0	0	4	80	95.2
<i>α</i> -AM 925)	82	0	82	100.0	0	82	0	0.0*
H8 (100)	100	1	99	99.0	0	37	63	63.6
H7 (50)	98	0	98	100.0	0	36	60	61.2
Gen (75)	111	18	93	83.8	8	44	59	63.4

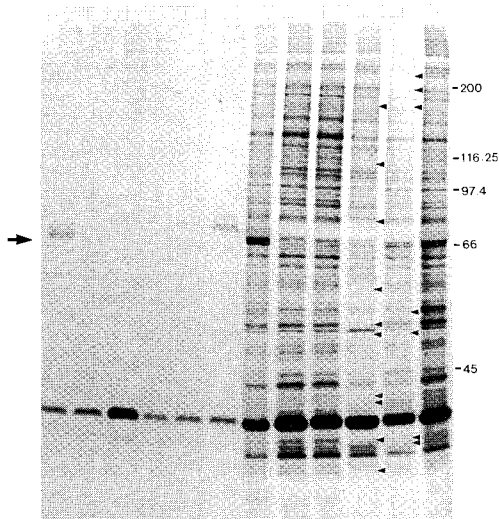
The early 1-cell mouse embryos collected at 26 hours post hCG were treated with or without the above drugs for 6 hours. After treatment, embryos were transferred to SOM and cultured further in the absence of drugs. Degenerated embryos are not shown in the data. All abbreviations are the same as in Table 1. Significance: *p < 0.001

주기에서 초반 6시간에만 처리된 H8과 H7은 두 번째 난할에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 genistein 처리군의 경우에는 첫 번째 난할률이 60.9%로 나타나 표 1과 비교하여 유의한 차이 (p < 0.001)를 나타냈다(표 5).

표 6에서 보는 바와 같이 후기 1-세포기 배아에 처음 6시간만 억제제가 처리되었을 때, *α*-amanitin 처리군은 두 번째 난할이 억제되었다. 반면에 H8 처리군, H7 처리군, genistein 처리군에서는 각각 63.6%, 61.2%, 63.4%의 두 번째 난할률을 보여 대조군(95.2%)과 유의한 차이를 보이지는 않았으나 표 3, 4와 비교시 생쥐 배아의 첫 번째 세포주기에서 후반 6시간에 처리된 각각의 protein kinase 억제제는 두 번째 난할에 영향을 주는 경향성을 보였다.

2. TRC 합성에 미치는 Protein Kinase Inhibitors의 영향

초기 2-세포기 배아에 각각의 protein kinase 억제제를 처리한 후 [³⁵S]methionine으로 방사능 표지시켜 배아 유전자 발현의 특징이 되는 TRC를 중심으로 배아 내에서 합성되는 단백질의 양상을 조사해 보았다. 그림 I에서 보는 바와 같이 모든 처리군에서 TRC의 합성이 억제되었으며 *α*-amanitin 처리군과 H7 처리군에서 억제정도가 더 강하게 나타났다. 또한 대조군이나 다른 처리군에 비해 H7 처리군과 genistein 처리군에서는 TRC 이외에 전반적으로 단백질 합성이 억제되는 경향을 보였다. H7 처리군에서는 분자량이 153 kD, 110 kD, 83 kD, 58 kD, 47 kD, 30 kD, 28.5 kD, 20 kD, 15.5 kD인 단백질들의 합성이 억제되었으며 분자량이 49 kD인 단백질 합성이 감소되었다. genistein 처리군에서는 분자량이 197 kD, 180 kD, 176 kD, 153 kD, 50 kD, 47 kD, 21 kD, 19.5 kD인 단백질의 합성이 억제되었다.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Plate I. Fluorogram of TRC synthesis in early 2-cell embryos treated with α -amanitin, H8, H7, genistein or not. The embryos of control group I were cultured in SOM at 32 hours post hCG and then radiolabeled for 3 hours starting at 39 hours post hCG. The embryos of group II were cultured and radiolabeled for 3 hours at 39 hours post hCG. In the experimental groups, early 2-cell embryos were cultured in SOM containing α -amanitin (25 μ g/ml), 100 μ M H8, 50 μ M H7 or 75 μ M genistein at 32 hours post hCG and then radiolabeled in SOM containing α -amanitin, H8, H7 or genistein for 3 hours starting at 39 hours post hCG. Lane 1~6, proteins remained after solubilization with TX-100. Lane 7~12, whole embryonic proteins. Lane 1 and 7, control I; lane 2 and 8, α -amanitin; lane 3 and 9, H8; lane 4 and 10, H7; lane 5 and 11, genistein; lane 6 and 12, control II. Arrow indicates the location of TRC proteins. Arrowheads indicate proteins whose synthesis were preferentially inhibited by H7 or gen-

3. 단백질 합성에 미치는 Protein Kinase Inhibitors의 영향.

위의 결과들로 보아 PKC의 억제제인 H7이 난할 억제 효과와 전사 억제 효과가 가장 컸으며 후기 1-세포기에서 영향을 주기 시작하여 초기 2-세포기에 작용하는 것으로 나타났다. 따라서 hCG주사 후 26시간부터 3시간 간격으로 [35 S] methionine으로 방사능 표지시켜 대조군과 H7 처리군의 단백질 합성 양상의 차이를 비교해 보았다. 그림 II에서 나타나는 것과 같이 hCG주사 후 26-32시간 사이에서는 대조군과 H7 처리군간의 단백질 합성 양상의 차이가 나타나지 않았으나,

hCG주사 후 32~35, 35~38시간 사이의 대조군과 H7 처리군에서는 분자량이 77 kD와 33 kD인 부위에서 단백질 합성이 감소하는 것으로 나타났다.

고 찰

포유류의 배발생 과정에서 초기에는 난자내에 축적된 물질에 의해 발생이 조절되고 발생이 진행됨에 따라 배아 스스로 조절하는 배아조절로 전환된다(Telford *et al.*, 1990). 생쥐의 경우 배아 유전자의 전사는 2-세포기에 처음으로 일어나는데(Schultz, 1986; Taylor and Piko, 1987; Poueymirou and Schultz, 1989; Manejwala *et al.*, 1991), 수정 후 2-세포기까지 RNA의 합성은 미약하고 RNA polymerase II의 활성도 없으며(Moore, 1975) 단백질 합성 능력도 낮게 유지된다. 그러나 배아내 단백질의 질적인 변화는 첫번째 난할과정에서 일어나며(Howlett and Bolton, 1985), 이 변화의 대부분은 특정 단백질의 인산화, glycosylation과 같은 번역후 변형(post-translational modification)에 의한 것으로 알려져 있다(Van Blerkom, 1981; Howlett and Bolton, 1985; Howlett, 1986).

생쥐 2-세포기 배아에서 일어나는 배아의 전사 활성화에 미치는 PKA, PKC, TPK의 영향을 알아보기 위하여 수행한 본 실험에서, α -amanitin의 처리는 수정란의 첫번째 난할에는 영향을 주지 않았으나 두번째 난할은 비가역적으로 억제하는 것으로 나타났다(표 2~6). 또한 TRC의 합성을 억제하여(그림 I) 생쥐에서 배아의 전사 활성화가 후기 2-세포기에 시작됨을 알 수 있었다.

PKA 억제제인 H8의 처리는 두번째 난할과 TRC 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 표 2~4에서처럼 PKC의 억제제인 H7의 처리는 낮은 농도(50 μ M)에서도 H8과 유사한 효과를 보였고 TRC 합성도 H8보다 더 강하게 억제하여(그림 I), 생쥐에서 H8은 농도 의존적으로 생쥐 2-세포기 배아의 난할과 TRC의 합성, 단백질의 인산화를 억제하는 반면 유사 농도의 H7은 억제 효과가 미약하다고 보고한 Poueymirou와 Schultz (1989)의 결과와는 다르게 나타났다. 이것은 사용한 생쥐의 strain들간(CF-1 : ICR)의 차이 혹은 여러 배양조건의 차이에 기인하는 것으로 여겨진다. 본 실험의 결과 PKC에 의해 촉매된 단백

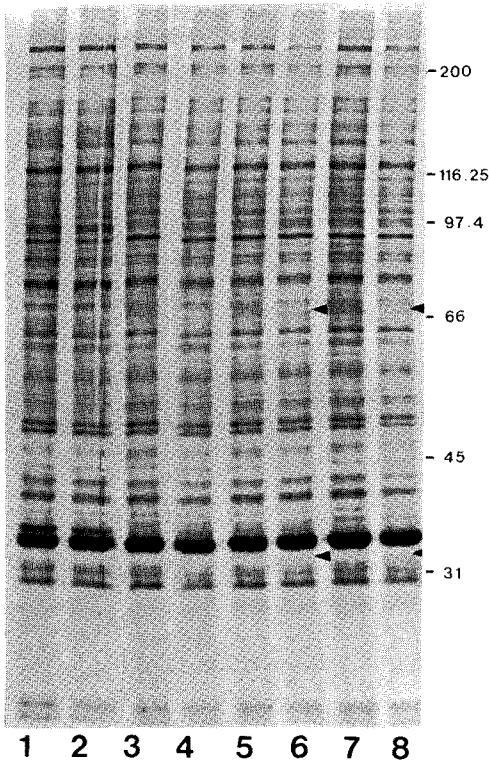


Plate II. Fluorogram of [^{35}S]methionine labeled protein profiles of mouse embryos from late 1-cell stage to early 2-cell stage in the presence or absence of H7. The embryos were cultured at 26 hours post hCG and radiolabeled for every 3 hrs between 26 hours and 38 hours post hCG. the concentration of H7 was 50 μM . Lane 1, control; lane 2, H7(26-29 hours post hCG). Lane 3, control; lane 4(29~32 hours post hCG). Lane 5, control; lane 6, H7(32~35 hours post hCG). Lane 7, control; lane 8, H7(35~38) hours post hCG). Arrowheads indicate proteins whose synthesis are preferentially inhibited by H7.

질 인산화가 ICR 계통의 생쥐 초기배아의 전사 조절기작에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. hCG주사후 39~42시간에 일어나는 단백질 합성은 H7의 처리에 의해 전반적으로 억제되는 양상을 보였다(그림 I).

TPK가 생쥐 수정란의 DNA합성과 meiotic cell cycle에서 mitotic cell cycle로의 전환에 관여할 것이라고 Besterman과 Schultz(1990)는 보고하고 있다. 이들의 실험 결과와 유사하게 genistein의 처리는 1-세포기 배아의 첫번째 난할을 가역적으로 억제하였고(표 2~6), TRC의 합성은 다른 처리군에 비해 그 정도가 낮지만 억제되었으며 전

반적인 단백질 합성이 감소되었다(그림 I). 그러므로 genistein은 가역적인 TPK의 억제제로 그 전환이 신속하게 일어나는 것으로 보여지며 생쥐 배아의 첫번째 난할과 유전자 활성화에 모두 영향을 주는 것으로 여겨진다.

배아의 전사 활성화에 앞서 첫번째 세포주기를 거치는 동안 세포질 자체가 전사를 수용할 수 없는 상태에서 수용 가능한 상태로 전환이 일어난다고 Latham 등(1992)은 보고하고 있다. 이와 유사하게 생쥐 배아에서 각각의 protein kinase 억제제가 전사 활성화에 관여하는 시기를 결정하기 위해 각각의 억제제를 1-세포기 배아에 일정 시기만을 처리한 결과, 초기 1-세포기에는 영향을 주지 않고 후기 1-세포기에서 영향을 미치는 경향을 보였다. 따라서 발생과정 중 수정 이후 일정 시간이 지나야 배아의 전사 활성화가 일어날 수 있는 여건이 성숙되며 생쥐에서는 그 시기가 후기 1-세포기 이후라고 여겨된다.

위의 결과로 보아 생쥐 배아의 전사 활성화에 PKC와 PKA, TPK가 모두 관여할 것으로 나타났다. 그 중 가장 억제효과가 강하게 나타난 PKC의 작용을 분석해 보고자 H7을 처리하여 후기 1-세포기에서 초기 2-세포기까지 3시간 별로 단백질 합성 양상을 비교하였다. 일차원 전기영동상에서는 큰 차이를 보이지는 않았으나, hCG주사 후 32시간에 38시간 사이에 H7 처리군에서 분자량이 77 kD와 33 kD 부분에서 단백질이 감소하는 양상을 보였다.

포유류에 있어서 mRNA의 합성은 인산화된 RNA polymerase II에 의해서 촉매되는 것으로 알려져 있다(Cadena and Dahmus, 1987). 즉 인산화 정도에 따라 RNA polymerase는 IIa와 IIo의 2가지 형태로 나뉜다. RNA polymerase IIa는 preinitiation complex의 구성 성분으로 이 복합체는 protein kinase(s)를 포함하고 있어, 전사의 개시에 앞서 RNA polymerase II는 인산화된 형태인 IIo로 전환된다(Laybourn and Dahmus, 1990). 또한 대부분의 전사인자는 인산단백질(phosphoprotein)이며 이들의 기능은 인산화와 탈인산화에 의해 조절된다(Mitchell and Tjian, 1989). 한편, cAMP는 PKA를 통해 핵단백질인 CREB를 가역적으로 인산화 시킴으로써 전핵생물의 유전자 발현을 조절하고(Montminy *et al.*, 1990; Lamph *et al.*, 1990) 전사인자 AP-1은 TRE를 인식하며 TPA나 여러 성장인자들의 처리는

PKC를 활성화시켜 결국 AP-1-response gene을 발현시킨다고(Bolye *et al.*, 1991) 알려져 있다. Schwartz와 Schultz(1992)에 의하면 hsp70-driven galactosidase report gene을 GV 난자와 aphidicolin-arrested 1-세포기 배아에 주입하여 그 발현 조절에 관해 연구한 결과, PKA가 배아의 유전자 발현에 관련되며 AP-1 활성이 생쥐 배아에서 나타난다고 보고하고 있다.

위의 결과들을 종합해 보면 생쥐에서 PKC와 PKA, TPK는 모두 배아의 유전자 활성화에 관련되며, ICR 생쥐에서는 이들 중 PKC가 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. TPK는 세포분열에 관련되며 TPK의 활성이 생쥐 배아의 초기 난할에 필요하다고 여겨진다. 이들 protein kinase들이 어떠한 기작을 통해 전사를 활성화 시키는지에 관해서는 확실히 말할 수는 없으나, 아마도 수정시 정자와의 융합을 신호로 일정한 시간이 경과한 후기 1-세포기 이후에 protein kinase들이 각기 다른 경로를 통해 억제된 상태의 RNA polymerase II를 활성화시키거나 CREB, TRE와 같은 전사 인자들을 활성화시켜 2-세포기에서 배아 계놈의 전사를 활성화 시킬 것으로 사료된다.

따라서 앞으로 이에 관련된 인자(단백질)들의 생화학적 분석이 필요하며 이를 바탕으로 특정한 시기에 배아 유전자의 전사가 활성화되는 기작을 밝히는 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 이를 기반으로 배아에 이식된 핵의 reprogramming기작, 난자의 parthenogenic activation기작 등과의 관련성을 비교하는 연구를 통해 포유류에 있어서 발생 조절기작을 밝히는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

결 론

본 실험은 생쥐 초기배아에서 배아의 genome 활성화에 미치는 protein kinase들의 영향을 알아보기 위하여, PKA, PKC, TPK의 억제제인 H8, H7, genistein을 초기, 후기 1-세포기 배아 및 초기 2-세포기 배아에 처리하여 난할에 미치는 영향 및 genome 활성화의 증거로 알려져 있는 TRC의 합성 여부를 관찰하여 보았다.

H8, H7은 모두 생쥐 배아의 첫번째 난할에는 영향을 주지 않았으나 가역적으로 두번째 난할을 억제하였으며, TRC의 합성을 억제하였다.

Genistein은 가역적으로 첫번째 난할을 억제하였고, 두번째 난할과 TRC의 합성도 억제하였다.

TRC의 합성을 가장 강하게 억제하는 것으로 나타난 H7을 후기 1-세포기 배아에 처리하여 배아의 단백질 합성 양상을 비교해 보았을 때, hCG주사 후 32~35시간과 35~38시간에 각각 분자량이 33 kD, 47 kD와 47 kD, 74 kD인 단백질의 합성이 억제되었다.

이상의 결과로 보아 생쥐 2-세포기 배아의 genome 활성화에 PKA, PKC, TPK가 작용을 하며, 이들이 서로 다른 경로를 통해 유전자의 활성화를 조절할 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y : Genistein, specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987, 262(12), 5592-5595.
- Bachvarova R, Deleon V, Johnson A, Kaplan G, Payton BV : Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1985, 108, 325-331.
- Bensaude O, Babinet C, Morange M, Jacob F : Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature* 1983, 305, 331-333.
- Besterman B, Schultz RM : Regulation of mouse preimplantation development: inhibitory effect of genistein, an inhibitor of tyrosine protein phosphorylation, on cleavage of one-cell embryos. *J Exp Zool* 1990, 256, 44-53.
- Bolton VN, Oades PJ, Johnson MH : The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Exp Zool* 1984, 79, 139-163.
- Bonner WM, Laskey RA : A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 1974, 46, 83-88.
- Boyle WJ, Smeal T, Defize LHK, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T: Activation of protein kinase C decreases phosphorylation

- of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 1991, 64, 573-584.
- Braude P, Bolton V, Moore S : Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988, 332, 459-461.
- Braude P, Pelham H, Flach G, Lobatto R : Post-transcriptional control in the early mouse embryo. *Nature* 1979, 282, 102-105.
- Brinster RL : A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two cell embryo to blastocyst. *Exp Cell Res* 1963, 32, 305-308.
- Cadena DL, Dahmus ME : Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of polymerase II. *J Biol Chem* 1987, 262(26), 12468-12474.
- Cascio SM, Wassarman PM : Program of early development in the mammal: Post-transcriptional control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes and early embryos. *Dev Biol* 1982, 89, 397-408.
- Clegg KB, Piko L : Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 1983a, 74, 169-182.
- Clegg KB, Piko L : Poly (A) length, cytoplasmic polyadenylation and synthesis of poly(A)+ RNA in early mouse embryos. *Dev Biol* 1983b, 95, 331-341.
- Conover JC, Temeles GL, Zimmermann JW, Burke B, Schultz RM : Stage-specific expression of proteins that are major products of zygotic gene activation in the mouse embryo. *Dev Biol* 1991, 144, 392-404.
- Golbus MS, Calarco PG, Epstein CJ : The effects of inhibitors of RNA synthesis (*a*-amanitin and actinomycin D) on preimplantation mouse embryogenesis. *J Exp Zool* 1973, 186, 207-216.
- Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y : Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 1984, 23(21), 5036-5041.
- Howlett SK, Bolton VN : Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morph* 1985, 87, 175-206.
- Howlett SK: A set of proteins showing cell cycle dependent modification in the early mouse embryo. *Cell* 1986, 45, 387-396.
- Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy M, Verma IM : Negative and positive regulation by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 4320-4324.
- Latham KE, Solter D, Schultz RM : Acquisition of a transcriptionally permissive state during the 1-cell stage of mouse embryogenesis. *Dev Biol* 1992, 149, 457-462.
- Lawitts JA, Biggers JD : Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Mol Reprod Dev* 1992, 31, 189-194.
- Laybourn PJ, Dahmus ME : Phosphorylation of RNA polymerase IIA occurs subsequent to interaction with the promoter and before the initiation of transcription. *J Biol Chem* 1990, 265(22), 13165-13173.
- Manejwala FM, Logan CY, Schultz RM : Regulation of hsp70 mRNA levels during oocyte maturation and zygotic gene activation in the mouse. *Dev Biol* 1991, 144, 301-308.
- Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH : Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 1981, 211, 1437-1438.
- Mitchell PJ, Tjian R : Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 1989, 245, 371-378.
- Montminy MR, Gonzales GA, Yamamoto KK : Characteristics of the cAMP response unit. *Metabolism* 1990, 39, 6-12.
- Moore GPM: The RNA polymerase activity of the preimplantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morph* 1975, 34, 291-298.

- Nilsen-Hamilton M. : Growth Factor Signaling in early Mammalian Development. In: Roseblum, I.Y. S. Heyner eds *Growth Factors in Mammalian Development*. New York, CRC Press, 1989, pp. 135-166.
- Petzoldt U: Regulation of stage-specific gene expression during early mouse development: effect of cytochalasin B and aphidicolin on stage-specific protein synthesis in mouse eggs. *Cell Differ* 1984, 15, 163-167.
- Petzoldt U, Muggleton-Harris A : The effect of the nucleocytoplasmic ratio on protein synthesis and expression of stage specific antigen in early cleaving mouse embryos. *Development* 1987, 99, 481-491.
- Piko L, Clegg KB : Quantitative changes in total RNA, total poly(A) and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol* 1982, 89, 362-378.
- Poueymirou WT, Schultz RM : Differential effects of activators of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C on cleavage of one-cell mouse embryos and protein synthesis and phosphorylation in one- and two-cell embryos. *Dev Biol* 1987, 121, 489-498.
- Poueymirou WT, Schultz RM : Regulation of mouse preimplantation development: Inhibition of synthesis of proteins in the two-cell embryo that require transcription by inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Dev Biol* 1989, 133, 588-599.
- Schwartz DA, Schultz RM : Zygotic gene activation in the mouse embryo: Involvement of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase and appearance of an AP-1-like activity. *Mol Reprod Dev* 1992, 32, 209-216.
- Seshagiri PB, McKenzie DI, Bavister BD, Williamson JL, Aiken JM : Golden hamster embryonic genome activation occurs at the two-cell stage: Correlation with major developmental changes. *Mol Reprod Dev* 1992, 32, 229-235.
- Schultz GA: Utilization of Genetic Information in the Preimplantation Mouse Embryo. In: Rossant, J. R.A. Pederson. eds *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. Cambridge Univ Press, 1986, pp. 239-265.
- Taylor SS, Piko L : Patterns of mRNA prevalence and expression of B1 and B2 transcripts in early mouse embryos. *Development* 1987, 101, 877-892.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA : Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990, 26, 90-100.
- Van Blerkom J : Structural relationship and posttranslational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78(12), 7629-7633.
- Williams CJ, Schultz RM, Kopf GS : Role of G proteins in mouse egg activation: Stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP2f conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. *Dev Biol* 1992, 151, 288-296.