

GOVP 12016399

생쥐난자 및 수정란 이후 배에서의  $\text{Ca}^{2+}$ -channel  
동정에 관한 연구

Identification of  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(s) in the mouse follicular  
oocyte and preimplantational embryos

성신여자대학교

과학기술부

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 여자대학연구기반 확충사업 (세부과제 “생쥐난자 및 수정난 이후 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2000. 9. 17

주관연구기관명 : 성신여자대학교

주관연구책임자 : 배 인 하

## 요 약 문

### I. 제목 : 생쥐 난자 및 수정란 이후 배에서의 $Ca^{2+}$ -channel의 동정에 관한 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

세포대사과정에서  $Ca^{2+}$ 는 아주 중요한 요소로 인정되어 왔다.  $Ca^{2+}$ 은 세포내의 생존과 대사과정에서 효소의 촉매제로써, 신경세포에서의 신경전달물질분비, 근육세포의 수축과정, memory 저장, 각 기관의 홀몬 분비와 소화 효소분비 및 세포분열, 조직의 발생과 분화과정을 조절하고 있어 세포 내 여러 가지 이온 중에서도 가장 중요하고 필수적인 이온이다(Marlene et al., 1989, Berridge et al., 1998).

포유동물의 난자성숙과정이 일어날 때 난자막의 탈분극(depolarization) 또 수정이나 세포의 활성화(activation) 및 세포의 분열과정에서 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 증가가 절대적으로 필수적인 요소로 작용하고 있으나 이들의  $Ca^{2+}$ 이 세포 내로 들어오는  $Ca^{2+}$ -channel의 존재에 관한 연구는 거의 없었다. 근육 세포와 신경세포 등에서는  $Ca^{2+}$ -channel에 관한 연구가 어느 동물 종류 여하를 막론하고 많이 연구되어 왔던 것은 사실이다. 이것은 전혀 재료상의 이점 때문이라고 사료된다.

그러나 포유류의 난자나 수정란은 재료 수집에 있어 다른 조직의 경우와는 달리 극히 제한된 숫자의 난자나 수정란으로  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 인정할 연구가 어려웠으며 몇몇의 연구에서는 어떤 type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재한다고 channel type을 밝힌 연구는 거의 없었으나 막연히  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 인정할 연구가 더러 있었다(Yoshida 1982, 1983, 1985, 1986; Powers, 1982; Lefevre et al., 1995; Bae & Channing, 1985; Blancato & Seyler, 1990). Mattioli et al.(1998)이 돼지난자에서 P/Q type  $Ca^{2+}$ -channel inhibitor와 고농도의  $K^+$  처리에 의한 세포막의 탈분극화 유도방법 및 confocal laser scanning microscope(공초점 현미경)를 이용하여 P/Q type의  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 영국 생식생리학회에서의 연례대회에서 abstract from으로 보고한 것이 처음이었다. 세포의 조직에 따라 세포막에 존재하는  $Ca^{2+}$ -channel로는 voltage dependent  $Ca^{2+}$ -channel로는 L-type, T-type, P/Q-type, N-type 및 R-type등이 있으며 ligand-gated  $Ca^{2+}$ -channel로는 ryanodine receptor-channel,  $IP_3$  receptor channel, NMDA receptor channel 등이 있으며 이외에  $Ca^{2+}$ -leak channel도 있다(Clague et al., 1993; Durroux et al., 1992; Lotshaw & Li, 1996).

이와같이 여러 가지 종류의  $Ca^{2+}$ -channel이 알려져 있지만 각 type의 channel이 한 개체내의 세포라 하더라도 조직에 따라 각기 다른 type의 channel이 존재하며 또 한 종류의 세포에도 한 종류의 channel만이 존재하는 것이 아니고 두 가지 이상의 channel이 공존하고 있는 것으로 밝혀져 있다(Parys et al., 1992; Kume et al., 1993; Bae et al., 1999). 또한 channel이 고정된 것이 아니라 분화정도에 channel이

따라 변화하고 있다고 알려져 있기 때문이다(Barahanin et al., 1989; Bae et al., 1999).

세포내에서의  $Ca^{2+}$ 은 대체로  $\sim 100nM$   $Ca^{2+}$  유지되고 있는 것은 그 만큼 intracellular  $Ca^{2+}$ 의 조절과정이 정확하게 이루어지고 있다는 증거이다. 세포막에는 외부에서 세포안으로 투과시키는  $Ca^{2+}$ -channel이 여러 가지 종류가 있으며, 세포내에서  $Ca^{2+}$ 을 세포밖으로 퍼내는 Ca-ATPase, Na-Ca exchange pump 등이 있으며 또 어느 일정 수준의 intracellular store 역할을 하고 있는 ER(endoplasmic reticulum), mitochondria 및 nuclear membrane 등이 있어 calcium의 저장 역할을 하고 있다. 이외에도 세포질에는 많은 종류의 calcium-binding protein등이 있어 역시 intracellular calcium을 어느 일정 수준으로 유지하는 기작이 되고 있다. 이와 같이 여러 가지 종류의 calcium control system이 복합적으로 작용하여 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 항상 일정 수준으로 유지하고 있다.

포유동물의 난자에서 착상전 배로 분화하는 과정에서  $Ca^{2+}$ 이 필수적으로 요구되고 있는 단계들이 있음이 밝혀져 있으나 어떤 type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는지는 거의 미개척 상태이며 Mattioli et al.(1998)이 초록 형태로 돼지 난자에서 P-type  $Ca^{2+}$ -channel이 존재한다는 연구를 제외하고는 Bae et al.(1999)이 생쥐난자에서 3가지 type의 voltage dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 증명한 것이 정식 논문 형태로는 처음이다. 난자에서 착상전 배로의 분화과정에서  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 예상되고 있으나 이에 대한 연구가 전무한 상태라  $Ca^{2+}$ -channel 등이 밝혀지고 또  $Ca^{2+}$  대사과정이 밝혀짐으로서 난자에서 착상전 배로의 분화과정에 얽힌 많은 대사과정을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.  $Ca^{2+}$ -channel 연구가 필요한 또 하나의 중요한 이유는 아래와 같은 사실 때문이다. 모든 동물의 세포에는 세포분열이 일어나기 직전 반드시 세포질 내  $Ca^{2+}$  농도 증가 현상이 있는 후에 세포분열과정이 일어나고 있으며 이와 같은  $Ca^{2+}$  농도 증가 현상을 방해하면 세포분열이 전혀 일어나지 않으나  $Ca^{2+}$ -ionophore 및  $IP_3$  등의 처리 및 주입으로 세포질 내  $Ca^{2+}$  농도를 높여주면 다시 분열이 재개되고 있다 (Steinhardt & Alderton, 1988; Kao et al., 1990; Kline & Kline, 1992; Hepler, 1994).

2-cell block에 걸려 있는 생쥐배의 배양액에  $Ca^{2+}$ 을 넣어주지 않으면 바로 퇴화되지만 후기 2-cell 배의 배양액에는  $Ca^{2+}$ 을 전혀 넣어주지 않아도 8-cell stage나 16-cell stage까지 발생이 진전되지만(Bae & Park, 1987) 궁극적으로는 포배기 (blastocyst)로 발생은 하지 못하고 중도에서 퇴화된다(Bae & Yoon, 1995). 8-cell 시기에  $Ca^{2+}$ 을 넣어주면 compaction(치밀화 현상)이 일어난 후 포배기로의 발생이 가능하다(Kim & Bae, 1994). 이런 점에서도  $Ca^{2+}$ -channel을 통한  $Ca^{2+}$ -influx가 일어나고 또 요구되고 있지만 어떤 type의  $Ca^{2+}$ -channel이 작동되고 있는지 전혀 알려져 있지 않은 상태이다.

따라서 최근에 confocal laser scanning microscope가 발달되고 있어 적당한  $Ca^{2+}$ -channel antibody와 fluorescent dye와 또  $^{45}Ca^{2+}$ 를 이용한  $\beta$ -counter 등을 복

합적으로 이용하면 난자에서 착상 전 배에 이르기까지의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정을 할 수 있을 것으로 예상된다. 또 이 외에도 전기 생리학적 방법이나 분자 생물학적 방법으로는 접근 할 수 있을 것으로 사료된다.

### Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. 1차년도 연구개발의 내용 및 범위 :

가. 생쥐의 여포난자, 배란된 난자 및 수정란(fertilized ovum)에서의 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel(① P/Q-type ② N-type ③ L-type( $\alpha 1C$  및  $\alpha 1D$  type)의 존재를 immunocytochemistry 방법을 사용하여 증명한다(Bae et al., 1999).

나. 공초점 현미경을 이용하여 2-cell embryo에서  $Ca^{2+}$ -leak channel을 동정하는 방법 :

2-cell embryo는 본 교실에서 시행하고 있는 생후 5주 된 암컷생쥐에 PMSG 및 hCG를 주사하고 바로 수정 가능한 수컷과 합사시켜 난자를 수정시키고 hCG 주사 후 33hr에서 난관을 세척하여 2-cell embryo를 수집한다. 2-cell embryo를 기본 배양액으로 3회 세척한 후 25mm cover glass의 중심부위에 cell tak을 도말시켜 말린 cover glass 위에다  $15\mu l$ 의 배양액에 들어있는 2-cell embryo를 cover glass 중심부위에다 부착시킨다. 이후  $5\mu l$  EGTA( $Ca^{2+}$ -chelator) 5.13mM을 1ml 주사기와 30G 주사바늘을 이용하여  $15\mu l$  배양액 속에다 넣어 배양액 속의  $Ca^{2+}$ 을 전부 EGTA로 7분 정도 chelation 시킨다.

이렇게 EGTA를 처리한 group과 EGTA를 처리하지 않은 group에다 역시 1ml 주사기와 30G 바늘을 이용하여  $Ni^{2+}$  1mM,  $5\mu l$ 을 처리한 후 바로 공초점 현미경으로 2-cell embryo내 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 scanning한다 ( $Ni^{2+}$  처리시 세포내  $Ca^{2+}$  store로부터  $Ca^{2+}$  release가 일어남을 발견한 방법을 사용; 본교실의 방법).

#### 2. 2차년도의 연구개발의 내용 및 범위 : early 2-cell embryo에서의 $Ca^{2+}$ -channel의 동정

2-cell embryo에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정이 2차년도의 연구내용이다. 즉 zygote에서 2-cell embryo로 발생하는 동안에 어떤 type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하며 또 이들  $Ca^{2+}$ -channel이 2-cell embryo로 발생과정 중에  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 있었는지를 검정한다.

#### 가. 2-cell embryo에서의 $Ca^{2+}$ -channel의 동정

##### (1) 살아있는 세포내 $Ca^{2+}$ 의 측정 :

dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시킨 Fluo-3AM  $5\mu M$ 을 perfusion 용액에 넣어 45분-1시간 동안 incubation시킨다. Perfusion 후 세포내로 유입하지 않은 Fluo-3AM을 제거시키기 위해 기본 배양액으로 3회 세척한다. 배의 고정을 위한

25mm cover glass 중앙부위에 cell tak을 도말한 부위 위에다 기본 배양액 (BSA-free) 50 $\mu$ l 배양액 drop을 만들고 10-20개의 배를 넣어 cover glass의 중앙부위에 단단히 부착되도록 흔들리지 않도록 하고 잠시 방치해둔다. 형광발광도는 Fluo-3AM의 excitation인 450-490nm에 의해 측정하고 모든 측정은 Olympus laser scanning microscope(1 $\times$ 70 형광현미경, Olympus, Japan)으로 5초 간격으로 20-100장을 scanning한 후 fluorescence intensity의 변화를 micro-soft사의 excel(Excel 97)로 전환한 후 fluorescence intensity의 평균(average), 편차(SD), 최고값, 최소값을 구했다. Ca<sup>2+</sup> 농도의 상대치는

$$[Ca^{2+}] = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

dissociation constant(Kd)=316nM

Stachecki et al.(1994)가 사용한 상대적 비교 방법을 사용한다.

(2) Immunocytochemical method를 이용한 Ca<sup>2+</sup>-channel의 동정 및 Ca<sup>2+</sup>-channel의 변화유무에 관한 검정

2-cell embryo는 본 교실에서 항상하고 있는 방법을 이용하여 early 2-cell embryo를 수집한다. 회수된 2-cell embryo를 1차년도의 immunocytochemical method를 이용한 whole cell mounting staining 방법을 사용하였다(Bae et al.,1999).

hCG 주사 후 30-33시간에 회수한 배로 zygote와 early 2-cell embryo가 섞여있어 early 2-cell과 zygote을 hyaluronidase로 처리한 후 각각 따로 group을 만들었다.

후기 2세포기 배는 hCG 주사 후 48-50시간에 회수된 배를 말한다.

체내 배양과 체외 배양에서 오는 차이를 비교하고자 체외 배양의 경우 Ni<sup>2+</sup> 50 $\mu$ M을 처리하여 20시간 배양함으로써 2-cell block이 극복된 후기 2-cell 배를 사용하였다.

Immunocytochemical method를 사용하여 Ca<sup>2+</sup>-channel을 동정한 group은 ① 수정난 ② 초기 2-세포배 ③ 20시간 체외 배양된 2-세포배 ④ 20 시간동안 Ni<sup>2+</sup>처리된 2-세포배 ⑤ 후기 2-세포배 등의 5가지 group으로 나누어 Ca<sup>2+</sup>-channel을 동정하였다.

(3) 공초점 현미경을 이용한 Ca<sup>2+</sup>-leak channel의 동정

초기 2-세포배를 hCG 주사 후 33시간에서 회수하여 기본배양액으로 3회 세척한 후 Fluo-3AM 5 $\mu$ l/ml이 들어있는 perfusion 용액에서 37 $^{\circ}$ C에서 45분-1시간 배양해서 세포 내로 Fluo-3AM를 침투시킨다. 침투되지 않는 Fluo-3AM을 제거하기 위해 다시 기본 배양액으로 3회 세척한다.

25mm cover glass의 중심부에 cell tak을 도말하여 cover glass의 중심부위에 세포가 단단히 부착되도록 7분 정도 기다린다. EGTA 5.13mM을 처리한 group과 EGTA를 처리하지 않은 group의 두 가지로 만든 후 공초점 현미경 하에서 초점을

맞춘다. 초점을 맞춘 후 image scanning을 시작한 후 바로  $Ni^{2+}$  1mM,  $5\mu l$ 을 처리한 후 계속 imaging을 scanning을 한다.

image scanning을 끝낸 후 imaging을 intracellular  $Ca^{2+}$  curve로 전환시킨다.

3. 3차년도의 연구개발의 내용 및 범위 : 생쥐 2-세포 → 8-세포배로 될 때  $Ca^{2+}$ -channel의 동정 및 분포조사

$Ca^{2+}$ -channel이 배의 발생과정 중  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 있는지 여부와 또 이런 channel이 배의 발생과정 중에 분포도에도 변화가 일어나는지 여부를 밝히고자 한다. 앞서 언급한바와 같이  $Ca^{2+}$  대사가 초기 2-세포배와 후기 2-세포배에서 서로 완전히 반대되는 양상을 보여주고 있어  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 예견되고 있으며 또 초기 8-세포배에서는 치밀화현상(compaction)이 일어난 후 포배기(blastocyst)로 발생된다. 그러나 초기 8-세포배에서 일어나는 치밀화 현상은 반드시 배양액 내  $Ca^{2+}$ 의 존재를 필수적으로 요구하고 있어 역시  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 예상되고 있기 때문에 2-세포배 → 8-세포배로 변할 때 분명히  $Ca^{2+}$ -channel의 변화에 대한 연구가 있어야한다고 생각한다.

가. Immunocytochemical method를 이용한  $Ca^{2+}$ -channel의 동정

4-세포배 → 8-세포배의 수집은 5주 된 ICR 암컷 생쥐의 복강에 PMSG 5IU, HCG 5IU를 48시간 간격으로 주사한다. HCG 주사 후 바로 생식력이 강한 수컷과 합사시켜 수정을 유도한다. 다음 날 아침 vaginal plug로 check하여 positive로 나온 암컷만을 골라 실험에 사용한다. HCG 주사 후 56시간에 도살 후 양쪽 난관을 세척하여 4-세포배를 얻는다. 초기 8-세포배는 hCG 주사후 72시간에서 난관을 세척하여 얻는다. Immunocytochemical method는 앞서 행했던 whole cell mounting 방법으로 한다.

나.  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화

Immunocytochemistry 방법의 결과 slide 상의 embryo에서  $Ca^{2+}$ -channel staining이 된 할구와 되지 않은 할구의 수를 counting 비례를 구하고 이를 3가지  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 것을 pooling하여 확률 분포도를 작성한다. 이런 확률 분포도를 작성해보면 다음 단계의 발생과정에서 분화(differentiation)의 방향을 예측할 수 있을 것으로 생각한다.



## IV. 연구개발결과

### 1. 1차년도 연구결과

#### 가. 난자에서의 $Ca^{2+}$ 의 정량

유도결합플라즈마 / 질량광도계(ICP/MA, PQ3STE medel, 대전기초과학기원연구소)로 여포난자 배란 난자 및 수정난자에서의 intracellular  $Ca^{2+}$  정량 결과는 다음 표1과 같다.

Table 1. Calcium concentration in oocyte and embryo.

oocyte	calcium concentration (mean + SE)
2PN	1.78ng ± 0.08
MII	4.78ng ± 0.21
GV	1.50ng ± 0.06
seum	1.9375mM ± 0.07

3 replication

PN : Pronucleus, MII : metaphase of 2nd meiosis, GV : germinal vesicle

발생 상태의 진전에 따라 GV → MII → 2PN 순서가 된다.

germinal vesicle(GV) 상태의 intracellular  $Ca^{2+}$  농도를 비교적 농도치로 가정하면 즉, 1.50ng=100nM로 가정할 때

$$1.50ng : 100nM = 1.78 : x$$

$$x = 1.50 \times 100 / 1.78 = 118.6nM \text{이며 MII 상태일 때는}$$

$$1.50 : 100 = 4.78 : x, x = 4.78 \times 100 / 1.50 = 318.66nM$$

즉, GV → MII → PN

100nM    318.6nM    118.6nM

난자세포가 성숙할 때 intracellular  $Ca^{2+}$  농도는 급격히 증가하는 양상을 보이지만 일단 정자와 수정 직후 oscillation이 끝난세포는 basal level로 돌아감을 알 수 있다. 즉, 난자 성숙 시 분명히  $Ca^{2+}$  증가현상이 필연적으로 일어나고 있음을 말해준다. 혈청은 기본 배양액의 수준보다 높은 것으로 나타나고 있다. 1.937mM±0.07

#### 나. Immunocytochemical method를 이용한 $Ca^{2+}$ -channel의 동정

① 생쥐 여포난자에서 3가지 type의 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 immunocytochemical method로 확인하였으며 P/Q-type은 localized staining을 많이 보여주며 N-type은 세포막 전체에 균일하게 염색되지만 P/Q-type의 staining에 비해 아주 약하다.

L-type의 경우 아주 선명한 localized staining pattern을 보여주고 있다( $\alpha 1C$  및  $\alpha 1D$  type 다 같이 존재하고 있음).

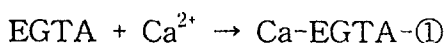
② 배란된 난자 : 여포난자에서처럼 3가지 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 존재가 확인되었으나 ㉞ P/Q-type의 경우 여포난자에서 보다도 훨씬 많은 수의 localized staining을 볼 수 있었던 것이 특징이다. ㉟ N-type의 경우 여포난자에서처럼 모두 homogeneous staining pattern을 보여주고 있다. ㊱ L-type의  $\alpha 1C$ 의 경우 localized staining이 뚜렷하며 주로 여포난자에서 보다도 localized staining의 수가 많다.

③ 수정란 : ㉞ P/Q-type의 경우 앞서의 배란 난자에서와는 달리 localized staining의 수가 훨씬 줄어들었고 대체로 1-2개 정도가 대부분이었다. ㉟ N-type의 경우 여포난자 배란된 난자에서처럼 homogeneous staining의 pattern이 대부분이다. ㊱ L-type의 경우  $\alpha 1C$ 의 경우는 localized staining의 수가 배란난자에서 보다도 줄어들어 1-2개정도,  $\alpha 1D$ 의 경우도 비슷한 양상이다.

결론: 상기의 결과로 종합해 볼 때 여포난자, 배란난자 및 수정란에서 모두 3가지 종류의 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 존재가 확인되었으나 발생의 진전에 따라  $Ca^{2+}$ -channel의 분포상태가 많이 변화하고 있음을 보였다.

#### 다. 공초점 현미경을 이용한 $Ca^{2+}$ -leak channel의 동정

① 초기 2-세포배(hCG 주사 후 33시간에서 난관을 세척하여 얻는다)에서 EGTA를 처리하고 처리하지 않은 두 group에서  $Ni^{2+}$ 를 처리할 때 intracellular  $Ca^{2+}$  농도 증가 pattern이 아주 달랐다. 즉 Fig. 6, Fig. 7에서처럼  $Ni^{2+}$  처리 후 EGTA처리 group과 EGTA를 처리하지 않은 group에서 curve의 peak가 잘라진 형태를 하고 있는 것은



$Ca-EGTA + Ni^{2+} \rightarrow Ni-EGTA + Ca^{2+}$ -② 에서 formation constant의 차이로 EGTA와 chelation되어있을 Ca이  $Ni^{2+}$  처리로 치환되어 ion 상태의  $Ca^{2+}$ 으로 돌아와 이것이  $Ca^{2+}$ -leak channel을 통해 influx됨으로써 나타나는 현상이다.

EGTA와의 formation constant :  $\text{Ca}^{2+}=10.61=\log kf$

$\text{Ni}^{2+}=18.52=\log kf$

$18.52 - 10.61 = 7.93 \approx 8 = \log kf = \log 10^8$

즉,  $\log kf=8=\log 10^8$  이다. 이것은  $\text{Ni}^{2+}$ 이 Ca-EGTA chelation에서  $\text{Ca}^{2+}$ 보다 치환력이 약  $10^8$ 배나 높기 때문에 Ca와 Ni이 쉽게 치환되는 반응이 일어난다.

② 또 한가지 추가해서 언급하면 Fig. 6에서의 6A-1U, 6A-2U의 leak channel과 Fig. 7의 EDTA를 처리하지 않은 그룹에서  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel 은 서로 같은 type이 아니라 서로 다른 type 이라고 생각된다. Fig. 7의  $\text{Ca}^{2+}$  peak을 이루는  $\text{Ca}^{2+}$  influx 현상과 Fig. 6의 plat 상태의  $\text{Ca}^{2+}$  influx는 분명히 첫째, 시간적으로 보아 다르다. 즉, Fig. 6에서는 plat 유지상태가 3분 이상이나 지속하고 있다.

둘째, Fig. 7의  $\text{Ca}^{2+}$ -peak는 단 시간에만 opening되는  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel이라고 보아진다. 이점은 Clague et al.(1993)이 주장한 것처럼 3가지 type의  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel이 존재한다는 주장과도 합치된다.

③ 또 한가지 다른 해석은 Fig. 6 과 Fig. 7에서 EGTA 처리량이 5.13nM, 5 $\mu$ l와 2.56mM, 5 $\mu$ l로 EGTA의 농도는 달랐지만 배양액 내 존재하는  $\text{Ca}^{2+}$  1.71mM와  $\text{Mg}^{2+}$  0.85mM을 모두 chelation 시키는 농도이기 때문에  $\text{Ca}^{2+}$ -peak에는 차이가 없다. 즉 300nM 정도로 양쪽 다 같은 높이의 peak(Fig. 7의 EGTA처리 group의 peak)로  $\text{Ca}^{2+}$ 양이 거의 같다는 증거이다.

( $\because 40 : 100\text{nM} = 120 : X$ )

$$X = 120 \times 100\text{nM} / 40 = 300\text{nM}$$

## 2. 2차년도 연구결과

### 가. 2-세포배에서의 $\text{Ca}^{2+}$ 의 측정

공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 fluorescence intensity를 측정하여 구한 2-세포배의 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 의 측정결과는 다음과 같다.

Table 2. 2-cell에서의 calcium 정량

	Average	SD	Max	Min
1) GV oocyte(10)	1247.5	233.4	1686.1	579.8
2) Zygote (32)	648.9	145.3	1179.9	398.8
3) Early 2-cell(52)	1131.1	238.6	1761.8	532.3
4) Late 2-cell(51)	1747.5	595.5	3351.6	719.6
5) Zygote oscillation(13)	1693.6	909.4	3969.7	568.9

2)의 zygote는 이미 oscillation이 완전히 끝난 상태의 zygote들임.

1차 연도의 난자 내에서의 calcium 정량(ICP/MS를 이용해 측정된 것)과 비교하기 위해 germinal vesicle 상태의 미성숙 난자와 수정란을 함께 측정하였다.

수정란에서는 공초점현미경으로 scanning을 하는 동안 수정 반응과 관련된 세포내  $Ca^{2+}$ 의 진동현상이 관찰되는 수정란은 따로 계산하였다(13/45개). 이 때 사용된 GV oocyte는 GVBD(germinal vesicle breakdown)이 일어나기 시작하는 단계로 보아진다. 즉 dbcAMP  $100 \mu\text{g/ml}$ 이 들어있는 배양액 내에서 Fluo-3AM으로 45분-1시간 perfusion 한 후 침투되지 않은 Fluo-3AM을 제거하기 위해서 3회 기본배양액으로 세척하였으나 이미 1시간 가량 지난 후이기 때문에 난자의 GV는 GVBD가 일어나기 위한 준비과정이 진행되고 있는 시점이라 할 수 있다.

이런 상태에 있다보니 GV oocyte가 수정 후 oscillation이 끝난 zygote에서의 intracellular  $Ca^{2+}$ 보다 훨씬 높은 상태에 있다.

zygote oscillation은 보다 높은 상태의 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 유지하고 있으며 이런 oscillation이 일어날 때는  $Ca^{2+}$  store에서의  $Ca^{2+}$  release가 주류를 이루고 있다고 하지만  $Ca^{2+}$ -leak channel를 통한  $Ca^{2+}$  influx가 분명히 있는 것으로 추정되며 이 때문에 zygote oscillation에서의 intracellular  $Ca^{2+}$  농도가 높은 것으로 판명된다. 이것은 초기 2-세포배가 후기 2-세포배로 발생 중 많은 량의 calcium 축적현상이 뒤따르고 있음을 보여주고 있다.

즉, 초기 2-세포배는 intracellular  $Ca^{2+}$  level이 상당히 낮으나 후기 2-세포배는 아주 높은 상태의 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 유지하고 있는 것으로 판명되었다. 이런 관계로 초기 2-세포배는  $Ca^{2+}$ -free 배양액에서는 쉽게 퇴화되지만 후기 2-세포배는  $Ca^{2+}$ -free 배양액에는 4-cell, 8-cell, 16-cell 등으로 분열하고 있음이 증명되었고 (Bae & Park, 1987), 후기 2-세포배가  $Ca^{2+}$  없이 세포분열을 계속할 수 있는 현상은 본 교실에서 처음 발견하였다. 어떤 동물세포도 심지어 암세포도  $Ca^{2+}$  없이는 분열이 일어나지 않지만 후기 2-세포배는  $Ca^{2+}$  없이도 분열이 일어나고 있는 동물세포중 유일한 예외에 속하고 있다.

나. Immunocytochemical method를 이용한  $Ca^{2+}$ -channel의 동정

① 수정란 : 1차 연도의  $Ca^{2+}$ -channel을 참조

② 초기 2-세포배

㉞ P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel : localized staining이 강하게 나타나며 대개 2개 이상을 보여주고 있다.

㉟ N-type  $Ca^{2+}$ -channel : 수정란과 같이 localized staining이 조금 나타나기 시작하며 polar body에는 강한 staining을 보여주고 있다.

㊱ L-type  $Ca^{2+}$ -channel : P/Q-type 다음으로 localized staining의 수가 많다.

상기 각 처리군이 수정란과 비교했을 때 localized staining의 수가 증가하고 있다.

③ 20시간 체외 배양된 2-세포배

㉞ P/Q type  $Ca^{2+}$ -channel : 초기 2-세포배와 비교해서 별 차이가 없다.

㉟ N type  $Ca^{2+}$ -channel : 초기 2-세포배와 비교해서 별 차이가 없다.

㊱ L type  $Ca^{2+}$ -channel( $\alpha 1C$ ) : 초기 2-세포배보다 localized staining의 수가 증가하였다.

④ 20 시간  $Ni^{2+}$  처리된 2-세포배

$Ni^{2+}$  처리가 이미 2-cell block의 극복효과가 있음이 보고된 바 있다(Bae & Yoon, 1995). 각 항체 처리군 사이에 큰 차이를 보이지는 않았으나 N-type  $Ca^{2+}$ -channel의 경우 localized staining의 수가 초기 2-세포배 보다 높게 나타나고 있다.

또한 L-type의 경우도 초기 2-세포배 보다 localized staining의 수가 높게 나타나고 있다.

⑤ 후기 2-세포배

㉞ P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel : 초기 2-세포배와 비슷한 양상을 보인다.

㉟ N-type  $Ca^{2+}$ -channel : 다른 시기의 2-세포배 보다 극체만이 염색되는 경향이 뚜렷하다.

㊱ L-type  $Ca^{2+}$ -channel : localized staining이 다른 시기의 2-세포배 보다 적게 나타나고 있다.

결론: 상기의 2-세포배에서도 1차년도 처럼 3가지 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 존재가 확인되었다. 그러나 ① 초기 2-세포배 ② 20시간 체외배양 된 2-세포배 ③ 20시간  $Ni^{2+}$  처리 된 2-세포배 ④ 후기 2-세포배 등에서  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화가 아주 많이 관찰되었다.

## 다. 공초점 현미경로 확인한 $Ca^{2+}$ -leak channel의 동정

1차년도에  $Ca^{2+}$ -leak channel의 동정과 내용이 같지만 한 가지 더 추가하고 싶은 내용은 Fig. 6의 6A-1U와 6A-2U 및 6A-3R 등에서 볼 수 있는 sustained level의  $Ca^{2+}$  농도는 적어도 3분 이상이나 유지되고 있어 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel이 open되어 일어나는  $Ca^{2+}$  influx로 보기는 어렵다. 즉, 앞서의 설명에서처럼 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 influx의 경우(Fig. 2) 100mS와 3분(180S)는 엄청난 차이가 난다. 그러므로 6A-1U, 6A-2U, 6A-3R 등에서 보이는 sustained flat  $Ca^{2+}$  level은  $Ca^{2+}$ -leak channel을 통해 들어 온 Ca-influx 때문이 분명하다. 이 type은 Fig. 7의  $Ca^{2+}$ -leak channel과는 다른 type으로 해석한다.

## 3. 3차년도의 연구결과

4-세포기 → 8-세포기 간의  $Ca^{2+}$ -channel의 변화상

### 가. P/Q-type channel

① P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel : 2-세포배까지는 localized distribution pattern을 보였으나 4-세포기 → 8-세포기로 발생동안에는 전부가 homogeneous staining pattern을 보였음. 아주 특이한  $Ca^{2+}$ -channel 상의 변화이다.

② 4-세포배 시기부터는 P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel이 전혀 없는 할구(blastomere)가 나타나기 시작하였다. P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel이 있는 할구와 없는 할구의 비율이 31 : 22로 나타나 전체 2/5정도의 할구는 P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel이 전혀 존재하지 않는 할구들이다.

③ 이런 현상은 4-세포기배에서 부터 선택적 유전자 활성이 나타나 궁극적으로는 분화단계의 가장 시초적인 현상으로 추정된다. 이와 같은 현상은 2-세포배에서는 전혀 찾아 볼 수 없었던 현상들이다.

### 나. N-type $Ca^{2+}$ -channel

① N-type  $Ca^{2+}$ -channel은 여포난자에서부터 정자와의 수정을 거친 zygote에 이르기까지는 난자 막상에 N-type  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 지가 의심스러운 정도로 staining이 약했으나, polar body는 강하게 염색되어 N-type의 존재가 확인되었지만 2-cell 때에는 localized staining이 아주 증가하였다. 이 변화 역시 아주 특이한 변화 중의 하나이다.

② P/Q-type channel처럼 4-세포배로 발생이 진전되면 N-type  $Ca^{2+}$ -channel의 존재가 전혀 확인되지 않은 비율이 점점 늘어나 N-type channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구의 비율이 24 : 43으로 약 2/3의 할구가 N-type channel이 전혀 존재하지 않는 할구이다.

이것은 배 발생이 진전됨에 따라 N-type  $Ca^{2+}$ -channel의 유전자가 비활성화 된다

는 증거이며 또한 난자 시기와는 달리  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 현저히 나타나는 시기라고 보여진다. 물론 발생 분야에서는 초기 8-세포배에서 일어나는 밀집화 현상이 배의 분화의 최초의 시점이라고 보고 있으나 이것은 어디까지나 외형적 형태적으로 보여지는 첫 징조이지만 내부적으로는 이와 같은  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화가 먼저 일어난 후에야 외형적인 분화형태로 볼 수 있다는 점에서 추정할 수 있는 현상이라 하겠다.

다. L-type  $Ca^{2+}$ -channel( $\alpha 1C$ )

① 4-세포배로 발전하면 앞서의 가. P/Q- 나. N-type  $Ca^{2+}$ -channel의 경우처럼  $\alpha 1C$  type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구의 비율이 36 : 27로 나타나 L-type( $\alpha 1C$ ) channel이 없는 할구가 역시 나타난다.

(L-type 중  $\alpha 1D$  antibody는 연구비 관계로 더 이상 계속하지 않고 있음)

결론: 상기의 3가지 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구를 4-세포배에서 분포도를 보면 다음과 같은 확률로 그 분포가 달라지고 있다.

Table 3. 4-세포배에서 3가지  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구의 분포도 확률

Channel type	Channel의 존재가 확인된 할구 : 비존재 할구	존재할 확률	존재하지 않을 확률
P/Q-type	31 : 22	31/53	22/53
N-type	24 : 43	24/67	43/67
L-type	36 : 27	4/7	3/9

Table 4. 확률 계산표

P/Q-type channel만 표현될 확률  $31/53 \times 43/67 \times 3/7 = 3999/24857$

N-type channel만 표현될 확률  $22/53 \times 24/67 \times 3/7 = 1584/24857$

L-type channel만 표현될 확률  $22/53 \times 43/67 \times 4/7 = 3784/24857$

P/Q-와 N-type channel만 표현될 확률  $31/53 \times 24/67 \times 3/7 = 2232/24857$

P/Q-와 L-type channel만 표현될 확률  $31/53 \times 43/67 \times 4/7 = 5332/24857$

N-와 L-type channel만 표현될 확률  $22/53 \times 24/67 \times 4/7 = 2112/24857$

3가지 type의 channel이 모두 표현될 확률  $31/53 \times 24/24/67 \times 4/7 = 2996/24857$

3가지 type의 channel이 모두 표현되지 않는 확률  $22/53 \times 43/67 \times 3/7 = 2838/24857$

이것을 histogram으로 표시하면 다음과 같다.

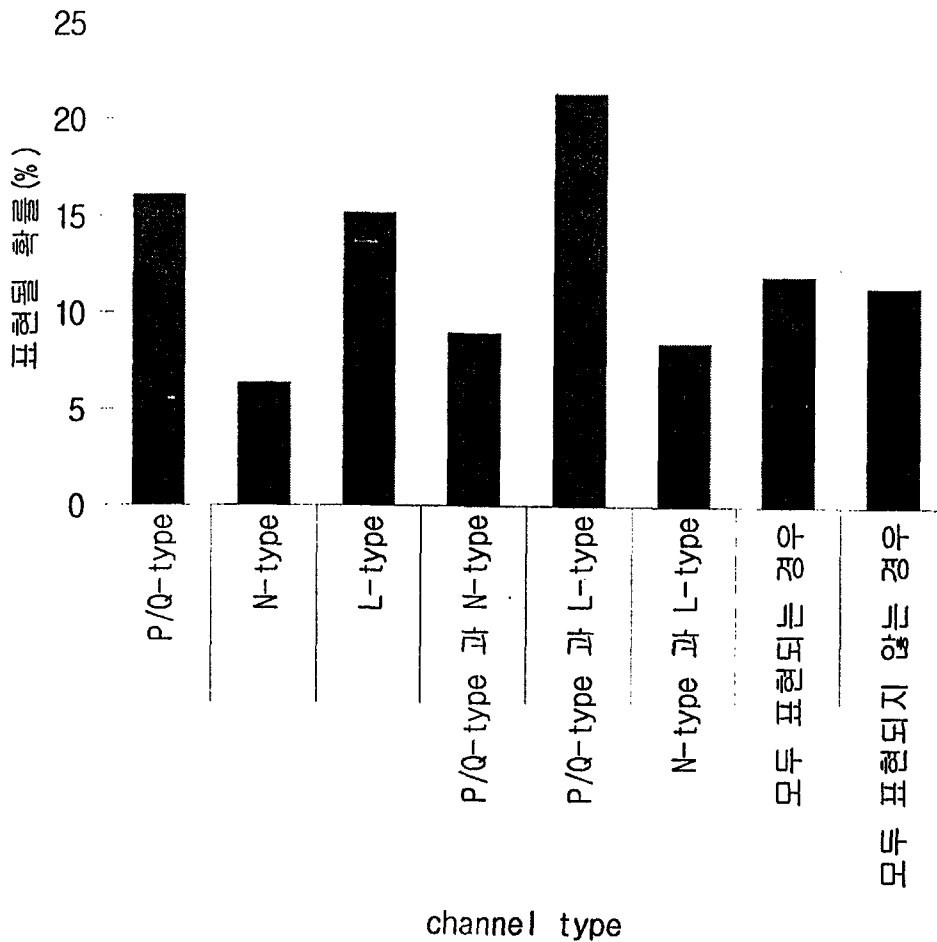


Fig. 1 4-세포배 → 8-세포배로 발생할 때  $Ca^{2+}$ -channel이 표현되는 확률



결론: 3차년도 연구 결과, 3가지 type의 voltage dependent  $Ca^{2+}$ -channel(① P/Q-type ② N-type ③ L-type( $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1D$ ))이 있는 할구와 없는 할구 그리고 전혀  $Ca^{2+}$ -channel이 없는 할구 및 3개의  $Ca^{2+}$ -channel이 다 존재하는 할구들이 나타남으로써 초기 8-세포배에서 일어나는 치밀화 현상이 수정 후 처음 일어나는 분화 과정이란 점에서 본다면 이 치밀화 현상은  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화에 기인한 현상이 아닌가 하는 추정이 가능하며 포배기에서 inner cell mass와 trophoblast 등의 세포군으로 나누어지는 분화과정 자체로 4-세포배에서 시작하는  $Ca^{2+}$ -channel 유무 및 분포변화 중에서 유추될 수 있는 것으로 추정된다. 이런 발전으로 생물학계의 mystery 중의 하나인 분화과정을 해석 할 수 있는 뒷받침이 되는 것이 아닌가 하는 생각이 든다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서는 포유동물의 여포난자에서부터 8-세포배로 발생하기까지의 발생과정에서 처음으로  $Ca^{2+}$ -channel을 동정하였고 또  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화를 체계적으로 연구하였다. 포유동물의 난자와 배의 수를 조직 세포에서처럼 많이 얻을 수 없는 실험상의 애로점 때문에 이 분야에서의 연구가 많이 지연되어 왔던 것은 사실이다. 이런 관점은 성계와 양서류의 난자와 배에서  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 연구가 포유동물의 난자나 배에서의 연구보다도 훨씬 빨랐던 점(Steinhardt & Alderton, 1988 : Parys et al., 1992 : Kume et al., 1993)에서도 볼 수 있다. 이것은 전혀 재료상의 이점 때문이었다. 그러나 최근에 와서 공초점 현미경의 등장과 활발한 fluorescent dye의 개발결과 재료상 양적인 handicap을 극복할 수 있었던 관계로 이 분야의 연구개척이 시작되었다고 생각된다. 포유동물의 난자와 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 규명과 더불어  $Ca^{2+}$  대사에 대한 연구는 기초과학분야에서 꼭 밝혀져야 할 분야이다. 더구나 난자나 배는 발생 분화하여 하나의 개체를 이루는 조직과 기관으로 분화한다. 이런 점에서 배의 발생 시에 나타나는  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 모든 조직분화의 최초의 시발점이 되므로 난자에서 착상 전 배의 발생에 이르기까지의  $Ca^{2+}$ -channel과 세포내 calcium 대사에 대한 연구가 철저히 이루어져야 기초과학의 터전이 다져진다고 생각한다. 이런 점에서  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 연구는 꼭 있어야 하고 또 반드시 거쳐야 하는 단계라고 생각한다. 현재까지 근육세포만이 수축하고 그 외의 세포들이 수축을 하지 않는 것으로 일반적으로 알려져 있으나 난자는 발생과정 중 특히 난자가 성숙할 때 또 정자와 수정이 일어난 후 등에서도 난자의 수축과정이 아주 활발하게 일어나고 있었으나 이에 대한 설명이 부족했던 것은 이와 같은  $Ca^{2+}$  대사 및  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 연구가 부족했던 탓이라고 본다.

응용면에서는 동물 세포에서는  $Ca^{2+}$  없이는 세포분열 자체가 일어나지 않는다 심지어 암세포의 분열도  $Ca^{2+}$ 가 존재하지 않는 배양액에서는 분열이 일어나지 않는다.

또 최근에 동물세포의 cloning에 많은 관심이 쏟아지고 있다. 즉, 장기 이식 및 장기 대체과정이 cloning을 통해 이루어 질 수 있으나 이 cloning의 핵치환(nucleus transplantation)이 cloning과정의 가장 중요한 과정인데 치환될 핵을 세포분열 후 바로  $Ca^{2+}$ -free 배양액에서 처리해야 핵을  $G_0$  상태로 유지 할 수 가 있어 이  $G_0$  상태의 핵을 치환 및 이식해야 cloning이 이루어 질 수 있다. 이런  $Ca^{2+}$  대사과정의 정보가 cloning에 이용되고 있다. 또 다른 한가지 응용면은 암세포 조직을  $Ca^{2+}$ -free 상태로 만들어 줄 때 더 이상의 암의 진전을 막을 수 있고 암 부위의 수술보다 혈관형성과정과 암 부위를  $Ca^{2+}$ -free 상태로 만들어 주는 연구를 한다면 암의 진전을 차단하고 암을 극복 할 수 있는 또 하나의 지름길로 이어질 수 있다는 점도 응용면에 이용될 수 가 있다고 사료된다.

## Summary

In the present studies, it was aimed to find out that what type of  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(s) is present in the oocyte and preimplantational embryos of the mouse, and how  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(s) changes depending on the developmental progresses.

Three types of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channels (① P/Q-type ② N-type ③ L-type) were identified in the follicular oocytes of the mouse, and the 3 types  $\text{Ca}^{2+}$ -channels were also present in all type of oocyte, zygote, 2-cell embryo, 4-cell embryo and 8-cell embryos but it was found that depending on the developmental progresses, the distributional changes of three type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels were found to be very variable.

In 4-cell and early 8-cell embryos some of blastomeres have no specific  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(s) and some of the embryo even have no  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(s) at all.

Assuming 8-cell embryo <sup>as</sup> the first step of differentiation, distributional change pattern of  $\text{Ca}^{2+}$ -channels <sup>must be prepared</sup> ~~was found~~ already in 4-cell embryos in advance. It is assumed that this early distributional changes of  $\text{Ca}^{2+}$ -channel be the basis of differentiation. In addition, two types of  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channels were also identified in the present studies, in which two of the leak channel showed quite different  $\text{Ca}^{2+}$ -influx.

Further studies are needed for the investigation of other types  $\text{Ca}^{2+}$ -channel. and  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel

~~Present~~ Present studies were supported by — — —

## Concise descriptions of research

1. Introduction	.....	21
2. Current aspects of research over the world	.....	23
3. Contents and results of research	.....	25
4. Accomplishments and contributinal aspects of research	.....	68
5. Applied aspects of research	.....	70
6. References	.....	72

## 목 차

제 1장 서론	.....	21
제 2장 국내외 기술개발 현황	.....	23
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	.....	25
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	.....	68
제 5장 연구개발결과의 활용계획	.....	70
제 6장 참고문헌	.....	72

## 제 1장 서론

세포대사과정에서  $Ca^{2+}$ 는 아주 중요한 요소로 인정되어 왔다.  $Ca^{2+}$ 은 세포내 대사과정에서 효소의 촉매제로써, 신경세포에서의 신경전달물질분비, 근육세포의 수축과정, memory 저장, 각 기관의 홀몬 분비와 소화 효소분비 및 세포분열, 조직의 발생과 분화과정을 조절하고 있어 세포 내 여러 가지 이온 중에서도 가장 중요하고 필수적인 이온이다(Marlene et al., 1989; Berridge et al., 1998).

포유동물의 난자성숙과정이 일어날 때 난자막의 탈분극(depolarization) 또 수정이나 수정란 활성화(activation) 및 세포의 분열과정에서 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 증가가 절대적으로 필수적인 요소로 작용하고 있으나  $Ca^{2+}$ 이 세포 내로 들어오는  $Ca^{2+}$ -channel의 존재에 관한 연구는 거의 없었다. 근육 세포와 신경세포 등에서는  $Ca^{2+}$ -channel에 관한 연구가 어느 동물 종류 여하를 막론하고 많이 연구되어 왔던 것은 사실이다. 이것은 전혀 재료상의 이점 때문이라고 사료된다.

그러나 포유류의 난자나 수정란은 재료 수집에 있어 다른 조직의 경우와는 달리 극히 제한된 숫자의 난자나 수정란으로  $Ca^{2+}$ -channel의 존재에 대한 연구가 어려웠으며 몇몇의 연구에서는  $Ca^{2+}$ -channel type을 밝힌 연구는 거의 없었으나 막연히  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 인정한 연구가 더러 있었다(Yoshida 1982, 1983, 1985, 1986; Powers, 1982; Lefevre et al., 1995; Bae & Channing, 1985; Blancato & Seyler, 1990).

그러나, Mattioli et al.(1998)이 돼지난자에서 P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel inhibitor와 고농도의  $K^+$  처리에 의한 세포막의 탈분극화 유도방법 및 공초점 현미경을 이용하여 P-type  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 영국 생식생리학회회의 연례대회에서 abstract form으로 보고한 것이 처음이었다. 세포의 조직에 따라 세포막에 존재하는 voltage dependent  $Ca^{2+}$ -channel로는 L-type, T-type, P/Q-type, N-type 및 R-type등이 있으며 ligand-gated  $Ca^{2+}$ -channel로는 ryanodine receptor-channel,  $IP_3$  receptor channel, NMDA receptor channel 등이 있으며 이외에  $Ca^{2+}$ -leak channel도 3가지 type이 있다(Clague et al., 1993; Durroux et al., 1992; Lotshaw & Li, 1996).

이와같이 여러 가지 종류의  $Ca^{2+}$ -channel이 알려져 있지만 각 type의 channel이 한 개체내의 세포라 하더라도 조직에 따라 각기 다른 type의 channel이 존재하며 또 한 종류의 세포에도 한 종류의 channel만이 존재하는 것이 아니고 두 가지 이상의 channel이 공존하고 있는 것으로 밝혀져 있다.(Parys et al., 1992; Kume et al., 1993; Bae et al., 1999) 또한 channel이 고정된 것이 아니라 분화정도에 따라 channel이 따라 변화하고 있다고 알려져 있기 때문이다(Barahanin et al., 1989; Bae et al., 1999).

세포내에서의  $Ca^{2+}$ 은 대체로  $\sim 100nM$   $Ca^{2+}$  유지되고 있는 것은 그 만큼 intracellular  $Ca^{2+}$ 의 조절과정이 정확하게 이루어지고 있다는 증거이다. 세포막에는

밖에서 세포안으로  $Ca^{2+}$ 이 이동하는  $Ca^{2+}$ -channel이 여러 가지 종류가 있으며 세포 내에서  $Ca^{2+}$ 을 세포밖으로 퍼내는 Ca-ATPase, Na-Ca exchange pump system 또는 일정 수준의 intracellular store 역할을 하고 있는 ER(endoplasmic reticulum), mitochondria 및 nuclear membrane 등이 있어 calcium의 저장 역할을 하고 있다. 이외에도 세포질에는 많은 종류의 calcium-binding protein등이 있어 역시 intracellular calcium을 어느 일정 수준으로 유지하는 기작이 되고 있다. 이와 같이 여러 가지 종류의 calcium control system이 복합적으로 작용하여 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 항상 일정 수준으로 유지하고 있다.

포유동물의 난자에서 착상전 배로 분화하는 과정에서  $Ca^{2+}$ 이 필수적으로 요구되고 있는 단계들이 있음이 밝혀져 있으나(Bae & Yoon, 1995) 어떤 type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는지는 거의 미 개척 상태이며 Mattioli et al.(1998)이 초록 형태로 돼지 난자에서 P-type  $Ca^{2+}$ -channel이 존재한다는 연구를 제회하고는 Bae et al.(1999)이 생쥐난자에서 3가지 type의 voltage dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 증명한 것이 정식 논문 형태로는 처음이다. 난자에서 착상전 배로의 분화과정에서  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 예상되고 있으나 이에 대한 연구가 전무한 상태라  $Ca^{2+}$ -channel 등이 밝혀지고 또  $Ca^{2+}$  대사과정이 밝혀짐으로서 난자에서 착상전 배로의 분화과정에 얽힌 많은 대사과정을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.  $Ca^{2+}$ -channel 연구가 필요한 또 하나의 중요한 이유는 아래와 같은 사실 때문이다. 모든 동물의 세포에는 세포분열이 일어나기 직전 반드시 세포질 내  $Ca^{2+}$  농도 증가 현상이 있는 후에 세포분열과정이 일어나고 있으며 이와 같은  $Ca^{2+}$  농도 증가 현상을 방해하면 세포분열이 전혀 일어나지 않으나  $Ca^{2+}$ -ionophore 및  $IP_3$  등의 처리 및 주입으로 세포질 내  $Ca^{2+}$  농도를 높여주면 다시 분열이 재개되고 있다(Steinhardt & Alderton, 1988; Kao et al., 1990; Kline & Kline, 1992; Hepler, 1994).

2-cell block에 걸려 있는 생쥐배의 배양액에  $Ca^{2+}$ 을 넣어주지 않으면 바로 퇴화되지만 후기 2-cell 배의 배양액에는  $Ca^{2+}$ 을 전혀 넣어주지 않아도 8-cell stage나 16-cell stage까지 발생이 진전되지만(Bae & Park, 1987) 궁극적으로는 포배기(blastocyst)로 발생은 하지 못하고 중도에서 퇴화된다(Bae & Yoon, 1995). 8-cell 시기에  $Ca^{2+}$ 을 넣어주면 compaction(치밀화 현상)이 일어난 후 포배기로의 발생이 가능하다(Kim & Bae, 1994). 이런 점에서도  $Ca^{2+}$ -channel을 통한  $Ca^{2+}$ -influx가 일어나고 또 요구되고 있지만 어떤 type의  $Ca^{2+}$ -channel이 작동되고 있는지 전혀 알려져 있지 않은 상태이다.

따라서 최근에 공초점 현미경이 발달되어있고 적당한  $Ca^{2+}$ -channel antibody와 fluorescent dye 등을 사용하고 또  $^{45}Ca^{2+}$ 를 이용한  $\beta$ -counter 등을 복합적으로 이용하면 난자에서 착상 전 배에 이르기까지의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정을 할 수 있을 것으로 예상된다. 또 이 외에도 전기 생리학적 방법이나 분자 생물학적 방법으로는 접근 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

세포에서  $Ca^{2+}$ 은 가장 중요한 ion으로 작용하고 이제는  $Ca^{2+}$ 을 2nd messenger 중의 하나라고까지 해석하고 있다(Berridge et al., 1998). 이와 같은  $Ca^{2+}$ 은 즉, ion 상태의  $Ca^{2+}$ 은 어느 동물세포이고 간에 대개 어느 일정 수준의 농도를 항상 유지하고 있다( $\sim 100nM$ ). 세포내에서  $Ca^{2+}$ 을 일정 수준으로 유지하는 조절과정으로는

- ①  $Ca^{2+}$ -channel을 통한 세포내로의  $Ca^{2+}$ -influx
- ② 세포내 많이 들어 있는  $Ca^{2+}$ 을 세포 밖으로 퍼내는 세포막상의 pump 작용을 하는  $Ca^{2+}$ -ATPase 및  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchange system의 작동
- ③ 세포내  $Ca^{2+}$  store 역할을 하고 있는 ER(endoplasmic reticulum), mitochondria 및 핵막(nucleus membrane, 이중막 구조를 하고 있음)내에  $Ca^{2+}$ 이 들어있어 저장과 release가 일어나고 있음
- ④ 세포질 내  $Ca^{2+}$ 을 binding시키는  $Ca^{2+}$ -binding protein이 아주 여러 가지 종류가 있음

이와 같은 4가지 system의 조절작용으로 항상 세포내에서는 일정상태의  $Ca^{2+}$  이온이 유지되고 있으나 세포내 대사과정이 크게 달라지기 전에 반드시  $Ca^{2+}$  농도 증가 현상이 있고 난 다음 세포분열과 같은 현상이 뒤따르고 있다. 또 이와 반대로 세포내  $Ca^{2+}$ 이 너무 많아 mitochondria내로 포화상태의 calcium 저장이 일어날 때 세포의 죽음(apoptosis) 현상이 유발된다.

서론에서 밝혔듯이 포유류의 난자나 수정란에서  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 연구가 거의 없었다. 이것은 난자나 수정란을 다량 수집해야 하는데 이것이 다른 조직세포처럼 쉽지가 않아 거의 불가능하였던 관계로 즉, 재료상의 난점 때문에 포유류 난자나 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel에 관한 연구가 활발하지 못했다. 그러나 이런 재료를 다량 많이 구할 수 있었던 동물, 성계나 양서류에서는  $Ca^{2+}$ -channel 동정에 관한 연구가 1980년 이전부터 있었다(Moody & Lansman, 1983; Lotan et al., 1989; Umbach and Gunderson, 1987).

그러나 포유동물에서도 난자나 착상전의 배에서 막연히  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 입증한 연구는 더러 있었지만(Yoshida, 1982, 1983, 1985, 1986; Powers, 1982; Leferve et al., 1995; Bae and Channing, 1985; Blancato and Seyler, 1990)  $Ca^{2+}$ -channel type을 밝힌 연구는 Mattioli et al.(1998)이 돼지 난자에서 P-type  $Ca^{2+}$ -channel inhibitor와 공초점 현미경을 이용하여 발표한 것이 처음이었으나 이것은 어디까지나 학회발표 때 낸 abstract form이었고 Bae et al.(1999)이 Identification of three type of voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channels in mouse follicular oocytes로 발표한 것이 정식 논문 형태로는 제일 처음의 연구이다.

이런 점에서 본 교실이 포유동물의 난자나 착상 전 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 연구로는 세계 어느 누구보다도 앞서가고 있다고 감히 자부하고 있다. 포유동물의 난자나 배는 모든 개체조직의 기원을 이루고 있는 상태에 있는 세포이므로 이에 대



한 연구가 철저히 있어야만 배가 조직으로 분화하고 조직에서 기관으로 그리고 여러 기관이 모여 하나의 개체를 형성해 가는 과정으로 발생하고 있다. 이런 점에서 난자는 그 시발점이 되고 있는 지점이며 배는 조직 분화로 이어지는 과정에 있는 세포들이다. 조직분화가 이루어짐에 따라  $Ca^{2+}$ -channel도 한 가지 종류만 있는 것이 아니라 두 가지 이상의 channel이 공존하고 있는 것으로 밝혀져 있다(Parys et al., 1992; Kume et al., 1993; Bae et al., 1999).

또 이들 channel이 고정된 것이 아니라 분화정도에 따라 channel이 따라 변화하고 있다고 알려져 있기 때문이다(Barahanin et al., 1989, Bae et al., 1999 보고서).

그러나 현재까지 포유동물의 난자와 착상 전 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정에 관한 연구는 Mattioli et al. (1998)과 Bae et al. (1999)의 연구 외 달리 발표된 논문이 없다(2000년 9월 15일 Medline check 결과).

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### I. 연구개발의 내용 및 범위

#### 가. 1차년도 연구개발의 내용 및 범위

(1) 생쥐의 여포난자, 배란된 난자 및 수정란(fertilized ovum)에서의 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel(① P/Q-type ② N-type ③ L-type( $\alpha 1C$  및  $\alpha 1D$  type)의 존재를 immunocytochemistry 방법을 사용하여 증명한다.

(2) 공초점 현미경을 이용하여 2-cell embryo에서  $Ca^{2+}$ -leak channel을 동정하는 방법 :

2-cell embryo는 본 교실에서 시행하고 있는 생후 5주 된 암컷생쥐에 PMSG 및 hCG를 주사하고 바로 수정 가능한 수컷과 합사시켜 난자를 수정시키고 hCG 주사 후 33hr에서 난관을 세척하여 2-cell embryo를 수집하여 Fluo-3 AM  $5\mu\text{l/ml}$ 을 45분-1시간동안 배양액에 섞어 perfusion(embryo내로 Fluo-3 AM을 침투시킨다)시킨 후 2-embryo를 꺼내어 배양액으로 3회 세척한 후 25mm cover glass의 중심부위에 cell tak을 도말시켜 말린다. cover glass 위에는  $15\mu\text{l}$ 의 배양액에 들어있는 2-cell embryo를 cover glass 중심부위에 부착시킨다. 이후  $5\mu\text{l}$  EGTA( $Ca^{2+}$ -chelator)  $5.13\text{mM}$ 을 1ml 주사기와 30G 주사바늘을 이용하여  $15\mu\text{l}$  배양액 속에다 넣어 배양액 속의  $Ca^{2+}$ 을 전부 EGTA로 7분간 chelation 시킨다.

이렇게 EGTA를 처리한 group과 EGTA를 처리하지 않은 group에다 역시 1ml 주사기와 30G 바늘을 이용하여  $Ni^{2+}$   $1\text{mM}$ ,  $5\mu\text{l}$ 을 처리한 후 바로 공초점 현미경으로 2-cell embryo내 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 check한다.

나. 2차년도 연구개발의 내용 및 범위 : early 2-cell embryo에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정

2-cell embryo에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정이 2차년도의 연구내용이다. 즉 zygote에서 2-cell embryo로 발생하는 동안에 어떤 type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하며 또 이들  $Ca^{2+}$ -channel이 2-cell embryo로 발생과정 중에  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 있었는지를 검정한다.

(1) 2-cell embryo에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정

가) 살아있는 세포내  $Ca^{2+}$ 의 측정 :

dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시킨 Fluo-3AM  $5\mu\text{M}$ 을 perfusion 용액에 넣어 45분-1시간 동안 incubation시킨다. Perfusion 후 세포내로 유입하지 않은 Fluo-3AM

을 제거시키기 위해 기본 배양액으로 3회 세척한다. 배의 고정을 위한 25mm cover glass 중앙부위에 cell tak을 도말한 부위 위에다 기본 배양액(BSA-free) 50 $\mu$ l 배양액 drop을 만들고 10-20개의 배를 넣어 cover glass의 중앙부위에 단단히 부착되도록 흔들리지 않도록 하고 잠시 방치해둔다. 형광발광도는 Fluo-3AM의 excitation인 450-490nm에 의해 측정하고 모든 측정은 Olympus laser scanning microscope(70 $\times$ 형광현미경, Olympus, Japan)으로 5초 간격으로 20-100장을 scanning한 후 fluorescence intensity의 변화를 micro-soft사의 excel(Excel 97)로 전환한 후 fluorescence intensity의 평균(average), 편차(SD), 최고값, 최소값을 구했다. Ca<sup>2+</sup> 농도의 상대치는

$$[Ca^{2+}] = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

dissociation constant(Kd)=316nM

Stachecki et al (1994)가 사용한 상대적 비교 방법을 사용한다.

나) Immunocytochemical method를 이용한 Ca<sup>2+</sup>-channel의 동정 및 Ca<sup>2+</sup>-channel의 변화유무에 관한 검정

2-cell embryo는 본 교실에서 항상하고 있는 방법을 이용하여 early 2-cell embryo를 수집한다. 회수된 2-cell embryo를 1차년도 immunocytochemical method를 이용한 whole cell mounting staining 방법을 사용하였다.

hCG 주사 후 30-33시간에 회수한 배로 zygote와 early 2-cell embryo가 섞여있어 early 2-cell과 zygote을 hyaluronidase로 처리한 후 각각 따로 group을 만들었다.

후기 2세포기 배는 hCG 주사 후 48-50시간에 회수된 배를 말한다.

체내 배양과 체외 배양에서 오는 차이를 비교하고자 체외 배양의 경우 Ni<sup>2+</sup> 50 $\mu$ M을 처리하여 20시간 배양함으로써 2-cell block이 극복된 후기 2-cell 배를 사용하였다.

Immunocytochemical method를 사용하여 Ca<sup>2+</sup>-channel을 동정한 group은 ① 수정난 ② 초기 2-세포배 ③ 20시간 체외 배양된 2-세포배 ④ 20 시간동안 Ni<sup>2+</sup>처리된 2-세포배 ⑤ 후기 2-세포배 등의 5가지 group으로 나누어 Ca<sup>2+</sup>-channel을 동정하였다.

다) 공초점 현미경을 이용한 Ca<sup>2+</sup>-leak channel의 동정

초기 2-세포배를 hCG 주사 후 33시간에서 회수하여 기본배양액으로 3회 세척한 후 Fluo-3AM 5 $\mu$ l/ml이 들어있는 perfusion 용액에서 37 $^{\circ}$ C에서 45분-1시간 배양해서 세포 내로 Fluo-3AM를 침투시킨다. 침투되지 않는 Fluo-3AM을 제거하기 위해 다시 기본 배양액으로 3회 세척한다.

25mm cover glass의 중심부에 cell tak을 도말하여 cover glass의 중심부위에 세포가 단단히 부착되도록 7분 정도 기다린다. EGTA 5.13mM을 처리한 group과

EGTA를 처리하지 않은 group의 두 가지로 만든 후 공초점 현미경 하에서 초점을 맞춘다. 초점을 맞춘 후 image scanning을 시작한 후 바로  $Ni^{2+}$  1mM,  $5\mu l$ 을 처리한 후 계속 imaging을 scanning을 한다.

image scanning을 끝낸 후 imaging을 intracellular  $Ca^{2+}$  curve로 전환시킨다.

다. 3차년도의 연구개발의 내용 및 범위 : 생쥐 2-세포 → 8-세포배로 될 때  $Ca^{2+}$ -channel의 동정 및 분포조사

$Ca^{2+}$ -channel이 배의 발생과정 중  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 있는지 여부와 또 이런 channel이 배의 발생과정 중에 분포에도 변화가 일어나는지 여부를 밝히고자 한다. 앞서 언급한바와 같이  $Ca^{2+}$  대사가 초기 2-세포배와 후기 2-세포배에서 서로 완전히 반대되는 양상을 보여주고 있어  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 예견되고 있으며 또 초기 8-세포배에서는 치밀화현상(compaction)과정이 일어난 후 포배기(blastocyst)로 발생된다. 그러나 초기 8-세포배에서 일어나는 치밀화 현상은 반드시 배양액 내  $Ca^{2+}$ 의 존재를 필수적으로 요구하고 있어 역시  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 예상되고 있기 때문에 2-세포배 → 8-세포배로 변할 때 분명히  $Ca^{2+}$ -channel의 변화에 대한 연구가 있어야한다고 생각한다.

(1) Immunocytochemical method를 이용한  $Ca^{2+}$ -channel의 동정

4-세포배 → 8-세포배의 수집은 5주 된 ICR 암컷 생쥐의 복강에 PMSG 5IU, HCG 5IU를 48시간 간격으로 주사한다. HCG 주사 후 바로 생식력이 강한 수컷과 합사시켜 수정을 유도한다. 다음 날 아침 vaginal plug로 check하여 positive 나온 암컷만을 골라 실험에 사용한다. HCG 주사 후 56시간에 도살 후 양쪽 난관을 세척하여 4-세포배를 얻는다. Immunocytochemical method는 앞서 행했던 whole cell mounting 방법으로 한다. 8-세포배는 hCG 처리후 72시간에서 난관을 세척하여 얻는다.

(2)  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화

Immunocytochemistry 방법의 결과 slide 상의 embryo에서  $Ca^{2+}$ -channel staining이 된 할구와 되지 않은 할구의 수를 counting 비례를 구하고 이를 3가지  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 것을 pooling하여 확률 분포도를 작성한다. 이런 확률 분포도를 작성해보면 다음 단계의 발생과정에서 분화의 방향을 예측할 수 있을 것으로 생각한다.

## II. 연구 결과

### 가. 1차년도 연구결과

#### (1) 난자에서의 $Ca^{2+}$ 의 정량

유도결합플라즈마 / 질량광도계(1CP/MA, PQ3STE medel, 대전기초과학기원연구소)로 여포난자 배란 난자 및 수정난자에서의 intracellular  $Ca^{2+}$  정량 결과는 다음 표1과 같다.

Table 1. Calcium concentrations in oocyte and embryo

oocyte	calcium concentration (mean + SE)
2PN	1.78ng ± 0.08
MII	4.78ng ± 0.21
GV	1.50ng ± 0.06
seum	1.9375mM ± 0.07

3 replication

PN : Pronucleus, MII : metaphase of 2nd meiosis, GV : germinal vesicle

발생 상태의 진전에 따라 GV → MII → 2PN 순서가 된다.

germinal vesicle(GV) 상태의 intracellular  $Ca^{2+}$  농도를 비교적 농도치로 가정하면 즉, 1.50ng=100nM로 가정할 때

$$1.50ng : 100nM = 1.78 : x$$

$$x = 1.50 \times 100 / 1.78 = 118.6nM \text{이며 MII 상태일 때는}$$

$$1.50 : 100 = 4.78 : x, x = 4.78 \times 100 / 1.50 = 318.66nM$$

즉, GV → MII → PN

100nM    318.6nM    118.6nM

난자세포가 성숙할 때 intracellular  $Ca^{2+}$  농도는 급격히 증가하는 양상을 보이지만 일단 정자와 수정 후는 basal level로 돌아감을 알 수 있다. 즉, 난자 성숙 시 분명히  $Ca^{2+}$  증가현상이 필연적으로 일어나고 있음을 말해준다. 혈청은 기본 배양액의 수준보다 높은 것으로 나타나고 있다. 1.937mM ± 0.07

## (2) $\text{Ca}^{2+}$ -channel antibodies를 이용한 $\text{Ca}^{2+}$ -channel의 동정

(가) 여포난자에서 3가지 type의 voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel의 존재를 immunocytochemical method로 확인하였으며 P/Q-type은 localized staining을 많이 보여주며 N-type은 세포막 전체에 균일하게 염색되지만 P/Q-type의 staining에 비해 아주 약하다.

L-type의 경우 아주 선명한 localized staining pattern을 보여주고 있다( $\alpha 1C$  및  $\alpha 1D$  type 다 같이 존재하고 있음).

(나) 배란된 난자 : 여포난자에서처럼 3가지 voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel의 존재가 확인되었으나 ① P/Q-type의 경우 여포난자에서 보다는 훨씬 많은 수의 localized staining을 볼 수 있었던 것이 특징이다. ② N-type의 경우 여포난자에서처럼 모두 homogeneous staining pattern을 보여주고 있다. ③ L-type의  $\alpha 1C$ 의 경우 localized staining이 뚜렷하며 주로 여포난자에서 보다는 localized staining의 수가 많다.

(다) 수정란 : ① P/Q-type의 경우 앞서의 배란 난자에서와는 달리 localized staining의 수가 훨씬 줄어들었고 대체로 1-2개 정도가 대부분이었다. ② N-type의 경우 여포난자 배란된 난자에서처럼 homogeneous staining의 pattern이 대부분이다. ③ L-type의 경우  $\alpha 1C$ 의 경우는 localized staining의 수가 배란난자에서 보다는 줄어들어 1-2개정도,  $\alpha 1D$ 의 경우도 비슷한 양상이다.

상기의 결과로 종합해 볼 때 여포난자, 배란난자 및 수정란에서 모두 3가지 종류의 voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel의 존재가 확인되었으나 발생의 진전에 따라  $\text{Ca}^{2+}$ -channel의 분포상태가 많이 변화하고 있음을 보였다.

## (3) 공초점 현미경을 이용한 $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel의 동정

(가) 초기 2-세포배(hCG 주사 후 33시간에서 난관을 세척하여 얻는다)에서 EGTA를 처리하고 처리하지 않은 두 group에서  $\text{Ni}^{2+}$ 을 처리할 때 intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  농도 증가 pattern이 아주 달랐다. 즉 Fig. 6, Fig. 7에서처럼  $\text{Ni}^{2+}$  처리 후 EGTA처리 group과 EGTA를 처리하지 않은 group에서 curve의 peak가 잘라진 형태를 하고 있는 것은



$\text{Ca-EGTA} + \text{Ni}^{2+} \rightarrow \text{Ni-EGTA} + \text{Ca}^{2+}$ ---② 에서 formation constant의 차이로 EGTA와 chelation되어있을 Ca이  $\text{Ni}^{2+}$  처리로 치환되어 ion 상태의  $\text{Ca}^{2+}$ 으로 돌아와 이것이  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel을 통해 influx됨으로써 나타나는 현상이다.

EGTA와의 formation constant :  $\text{Ca}^{2+}=10.61=\log kf$

$$Ni^{2+}=18.52=\log kf$$

$$18.52 - 10.61 = 7.93 \approx 8 = \log kf = \log 10^8$$

즉,  $\log kf=8=\log 10^8$  이다. 이것은  $Ni^{2+}$ 이 Ca-EGTA chelation에서  $Ca^{2+}$ 보다 치환력이 약  $10^8$ 배나 높기 때문에 Ca와 Ni이 쉽게 치환되는 반응이 일어난다.

(나) 또 Fig. 6에서의 6A-1U나 6A-2U처럼 plat 상태의 intracellular  $Ca^{2+}$ 이 오랫동안 고농도를 유지하는 것 역시  $Ca^{2+}$ -leak channel을 통해  $Ca^{2+}$  influx가 계속되고 있기 때문이라고 해석된다. 다시 말하면 membrane depolarization으로  $Ca^{2+}$  influx가 일어날 수 있으나 membrane depolarization 자체가 오래 지속되지 않기 때문에 바로 6A-1D에서처럼 basal level로 돌아가지만 6A-1U나 6A-2U의 경우 이런 고농도의  $Ca^{2+}$  상태가 3분이상으로 오랫동안 지속되는 것은 membrane depolarization에 의한 voltage dependent  $Ca^{2+}$ -channel이 open 되어 일어나는 것으로는 해석될 수가 없다. 즉, Fig.7의 EGTA를 처리하지 않은 group의 그림을 거꾸로 뒤집어 놓은 것과 우측의 그림을 비교하면 같은 모양이다. 우측의 그림은 100mS로 plot 할 때의 그림이다. 이것은 1초를 1000mS로 나눌 때의 100mS 단위이기 때문에 1/10초에 해당하지만 Fig.7과는 천양지 차이이다. 또한 6A-1U와 6A-2D의 peak 높이는 Fig. 7에서의 EGTA를 처리하지 않았을 때  $Ca^{2+}$ -peak와 같은 높이들이다. 즉,  $Ca^{2+}$ -leak channel에 의한  $Ca^{2+}$  influx가 있었음을 말한다

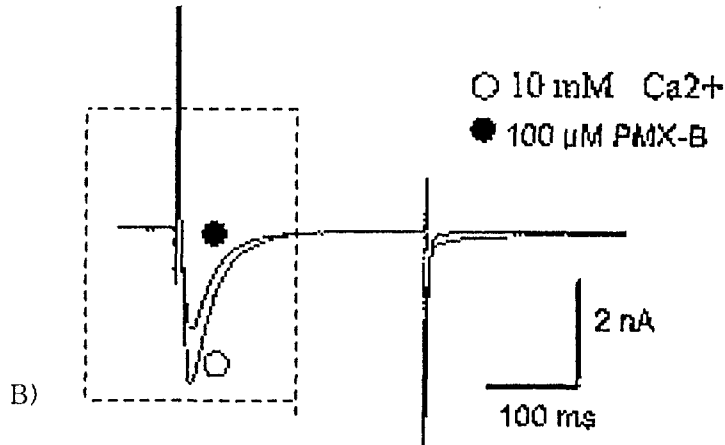
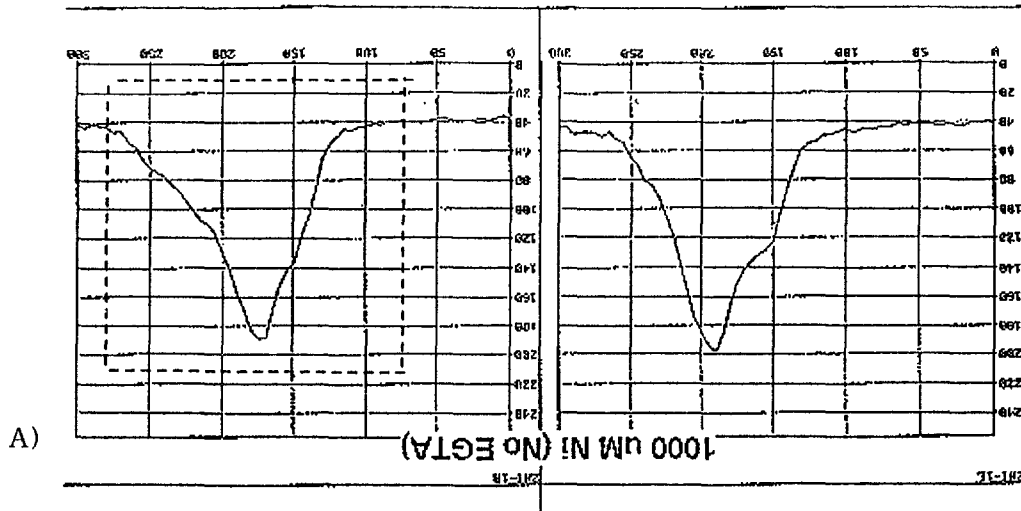


Fig. 2 Depolarization으로 인한 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel을 통한  $Ca^{2+}$  influx와 공초점 현미경하에서 check된  $Ca^{2+}$ -leak channel에 의한  $Ca^{2+}$  influx 비교

Fig. 2A 와 2B의 전체적인 모양은 비슷하다(점선으로 싸 놓은 부위).

Fig. 2A의 하단의 숫자는 1~300초까지를 표시하였고 Fig. 2B의 100mS가 단위로 되어있다.

1 second = 1000mS 이기 때문에 Fig. B의  $Ca^{2+}$  influx(curve가 X축 이하로 내려오는 peak부분)은 100mS내에 다시 basal level로 돌아가지만 Fig. 2A의 intracellular  $Ca^{2+}$ (내부 ER에서 release된  $Ca^{2+}$ 과  $Ca^{2+}$ -leak channel을 통해 들어간  $Ca^{2+}$ -influx를 합친 것)은 약 300초 사이에 일어나므로 Fig. 2A의 calcium influx는 membrane depolarization에 의한 것이라고는 할 수 없다.

Fig. 2B가 전형적인 membrane depolarization 즉, voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 opening으로 들어온  $Ca^{2+}$  influx를 나타내고 있다.

따라서 Fig. 2A의  $Ca^{2+}$ -influx는 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel의 opening으로 들



어간  $\text{Ca}^{2+}$  ion influx가 아니다.

(다) 또 한가지 추가해서 언급하면 Fig. 6에서의 6A-1U, 6A-2U의 leak channel과 Fig. 7의 EDTA를 처리하지 않은 그룹에서  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel 은 서로 같은 type이 아니라 서로 다른 type 이라고 생각된다. Fig. 7의  $\text{Ca}^{2+}$  peak을 이루는  $\text{Ca}^{2+}$  influx 현상과 Fig. 6의 plat 상태의  $\text{Ca}^{2+}$  influx는 분명히 첫째, 시간적으로 보아 다르다. 즉, Fig. 6에서는 plat 유지상태가 3분 이상이나 지속하고 있다.

둘째, Fig. 7의  $\text{Ca}^{2+}$ -peak는 단 시간에만 opening되는  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel이라고 보아진다. 이점은 Clague et al.(1993)이 주장한 것처럼 3가지 type의  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel이 존재한다는 주장과도 합치된다.

(라) 또 한가지 다른 해석은 Fig. 6 과 Fig. 7에서 EGTA 처리량이 5.13nM, 5 $\mu\text{l}$ 와 2.56mM, 5 $\mu\text{l}$ 로 EGTA의 농도는 달랐지만 배양액 내 존재하는  $\text{Ca}^{2+}$  1.71mM와  $\text{Mg}^{2+}$  0.85mM을 모두 chelation 시키는 농도이기 때문에  $\text{Ca}^{2+}$ -peak에는 차이가 없다. 즉 300nM 정도로 양쪽 다 같은 높이의 peak(Fig. 7의 EGTA처리 group의 peak)로  $\text{Ca}^{2+}$ 양이 거의 같다는 증거이다.

( $\because 40 : 100\text{nM} = 120 : X$ )

$$X = 120 \times 100\text{nM} / 40 = 300\text{nM}$$

Ca<sup>2+</sup>-channel antibody를 이용한 Ca<sup>2+</sup>-channel의 동정

Fig. 3 Follicular oocyte(여포난자)

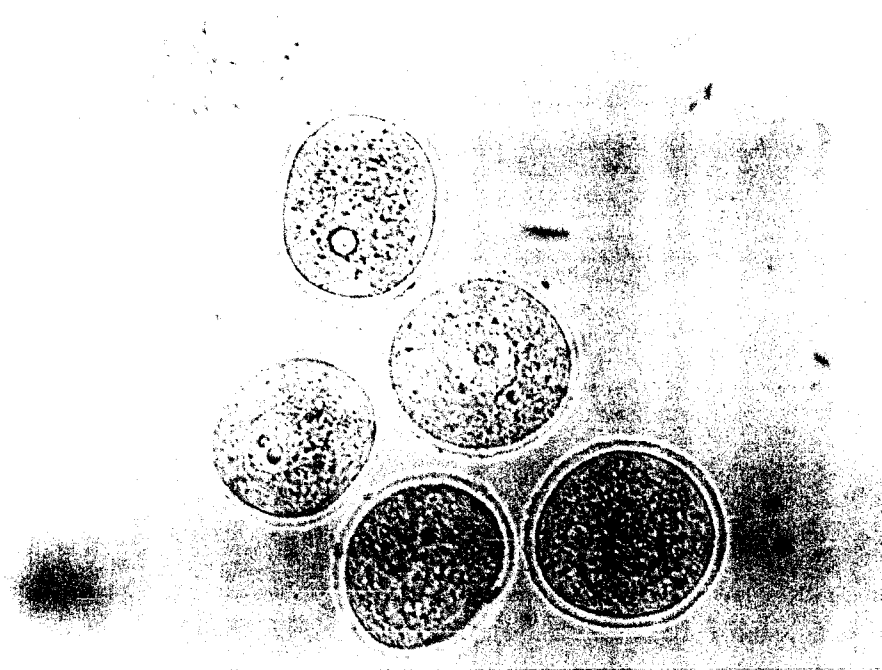


Fig. 3A Control

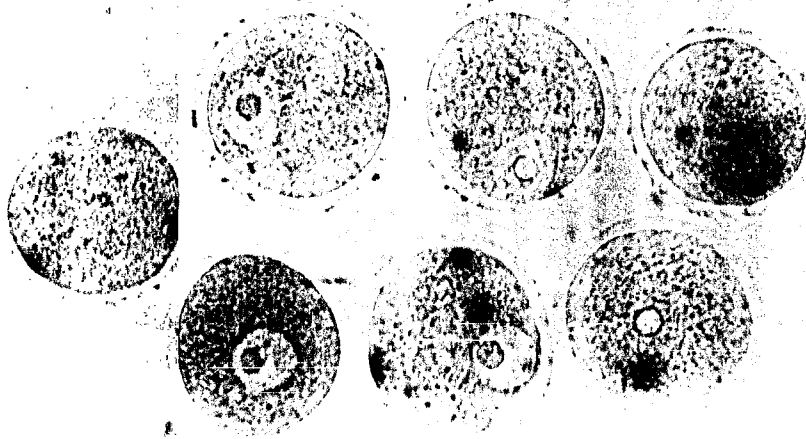


Fig. 3B P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti-  $\alpha_{1A}$ )

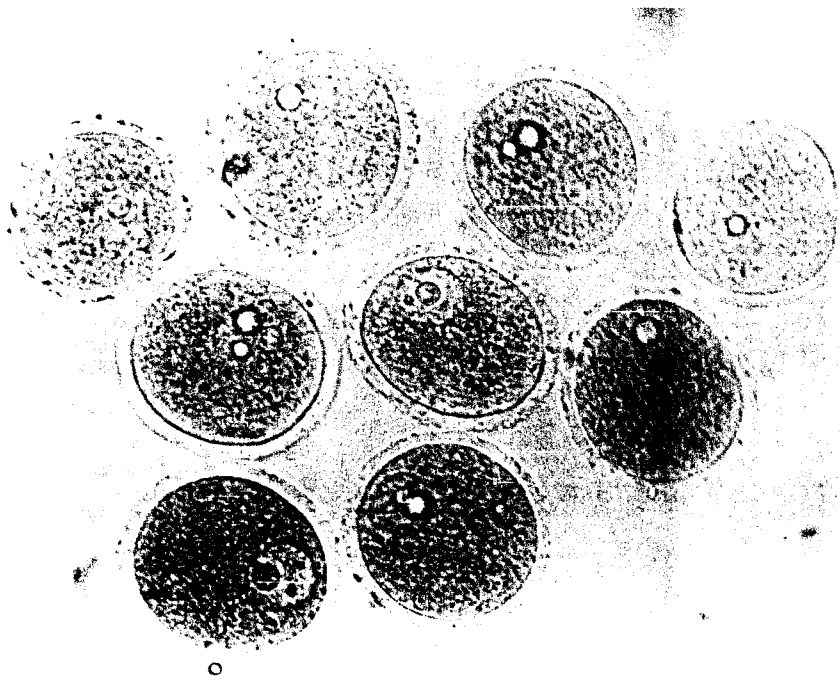


Fig. 3C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

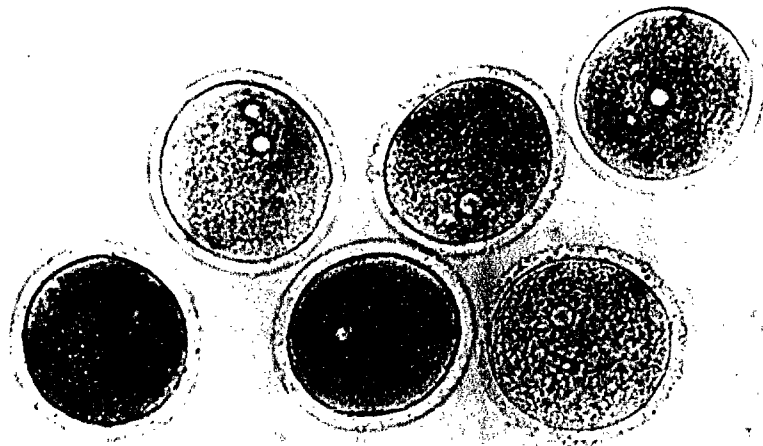


Fig. 3D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

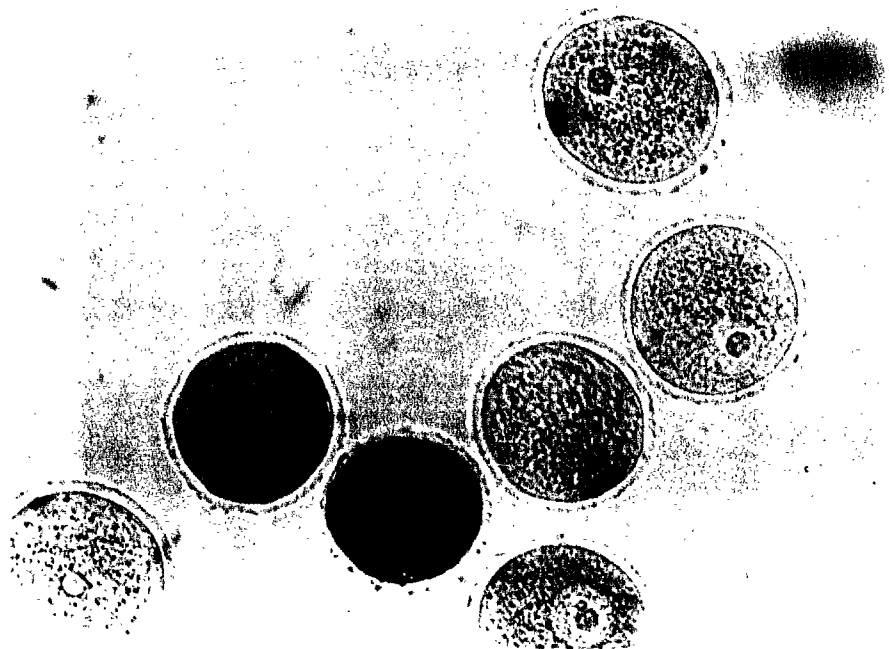


Fig. 3E L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1D}$ )

Fig. 4 Ovulated oocyte(배란된 난자)

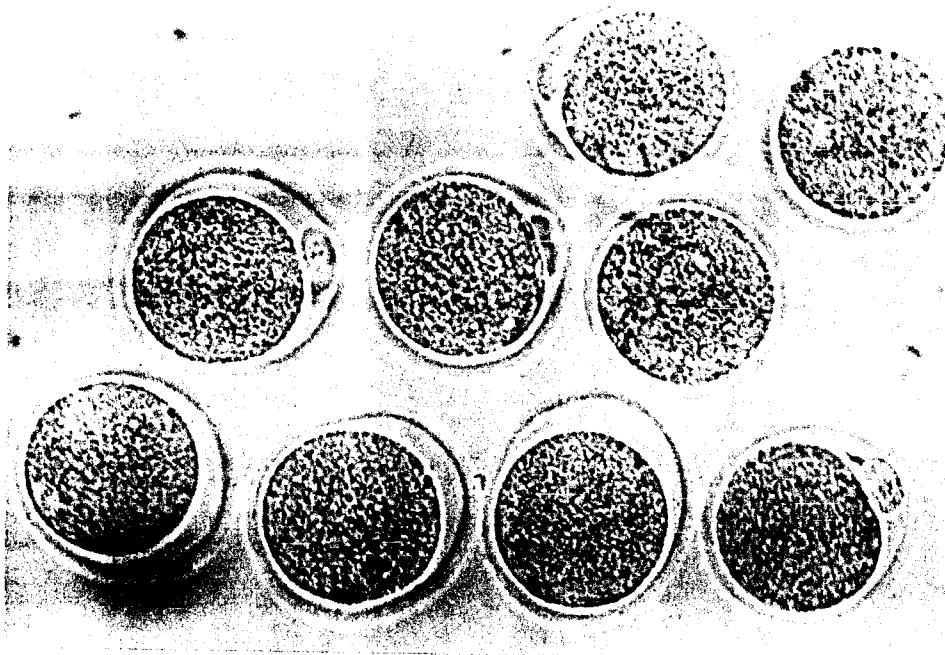


Fig. 4A Control

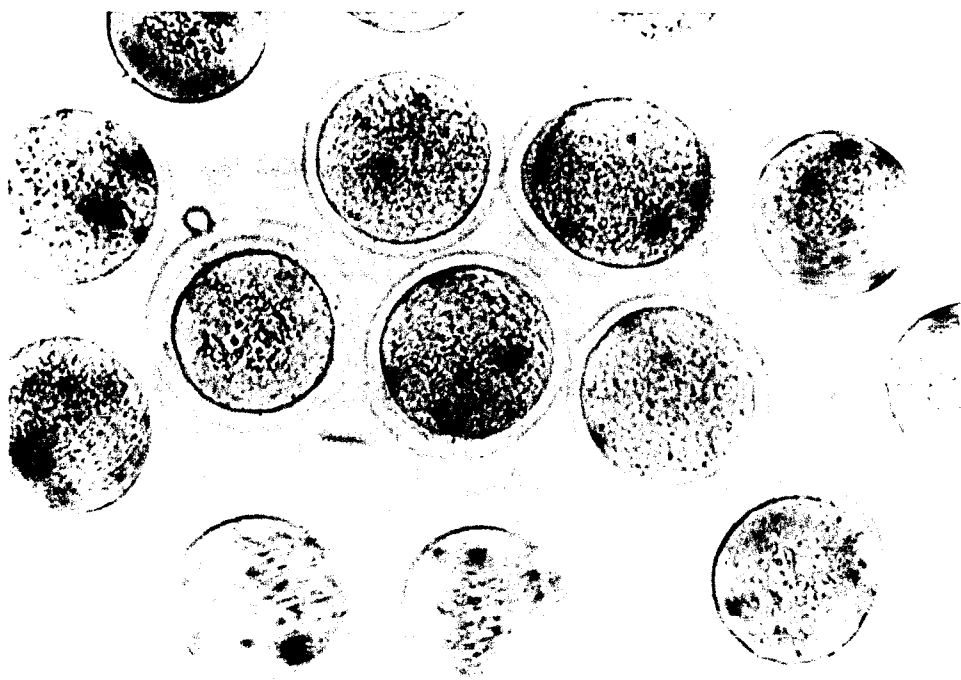


Fig. 4B P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

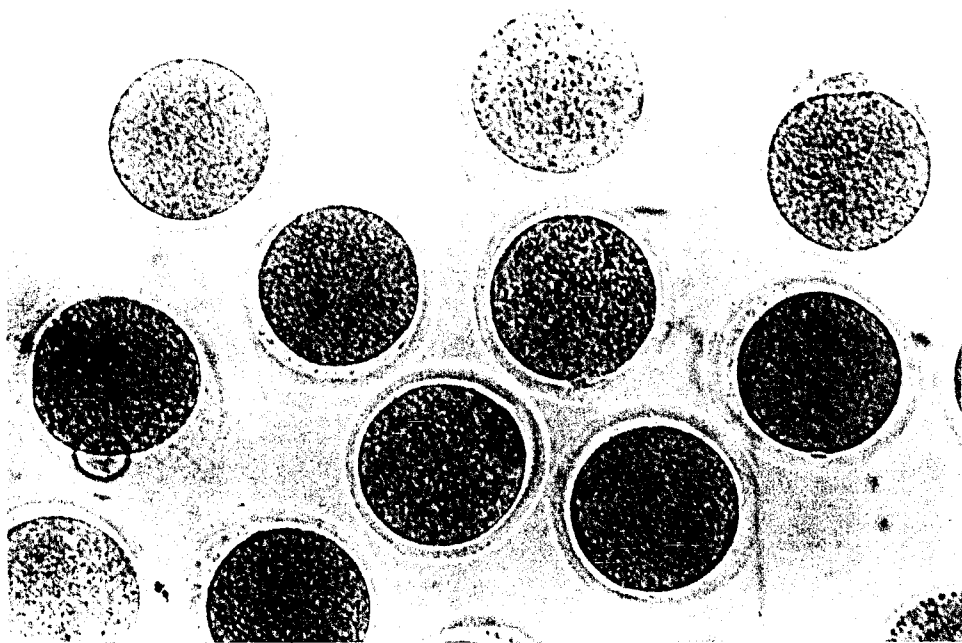


Fig. 4C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

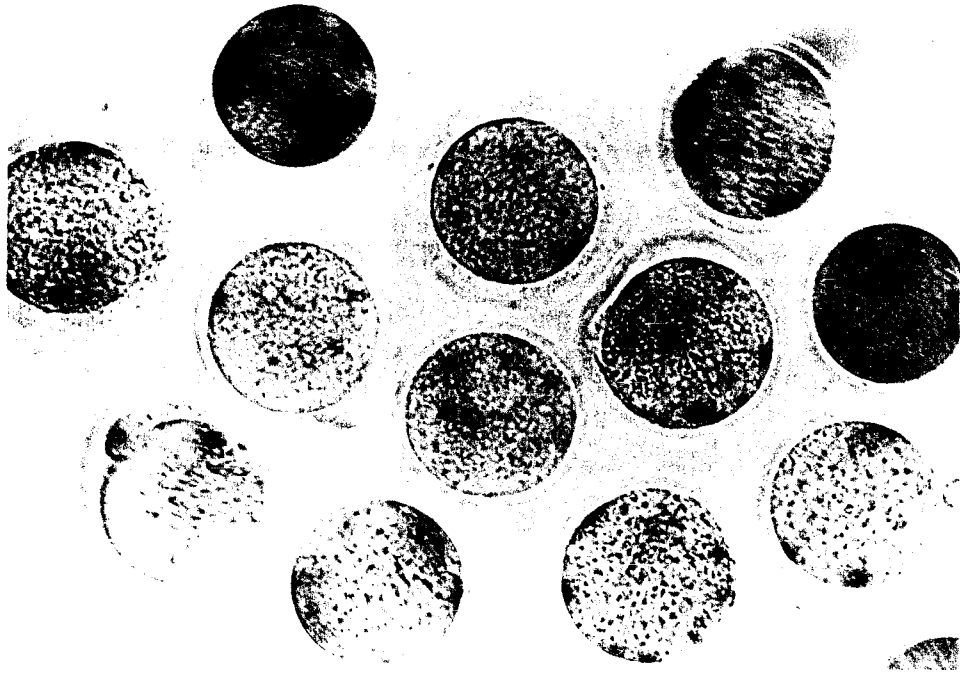


Fig. 4D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

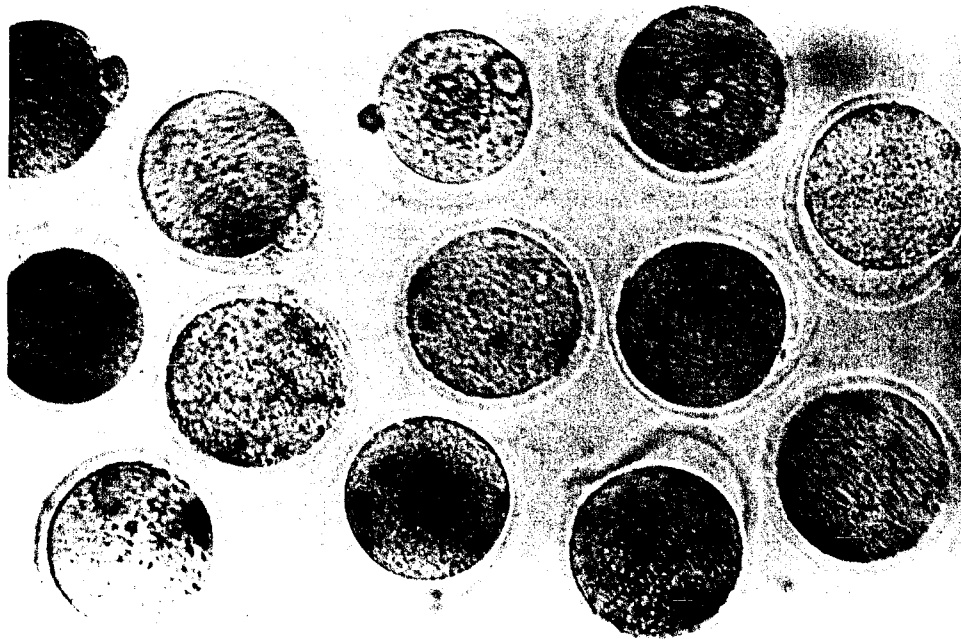


Fig. 4E L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1D}$ )

Fig. 5 Fertilized eggs(수정란)

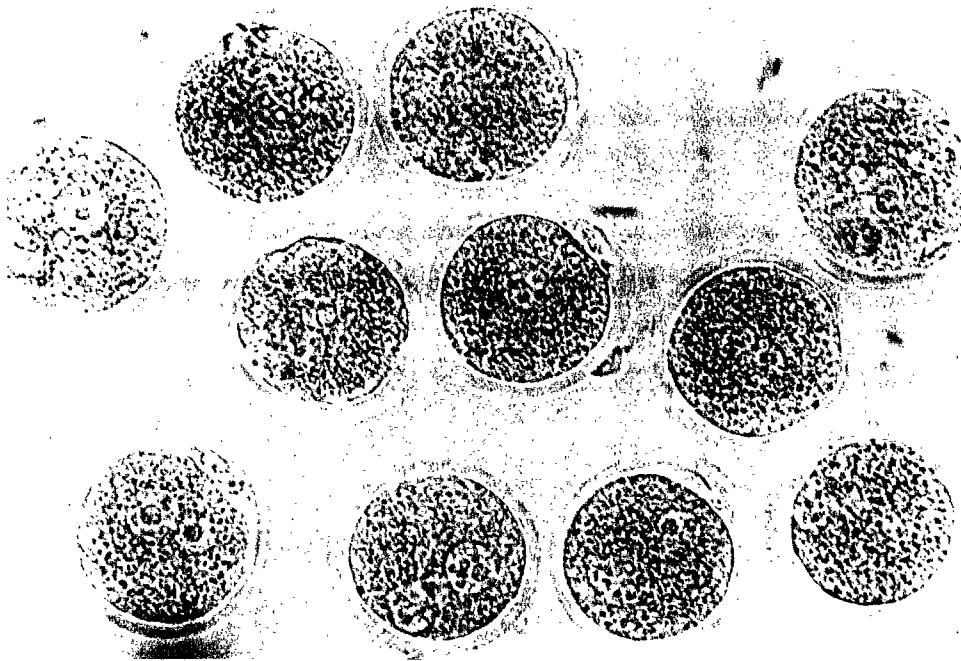


Fig. 5A Control



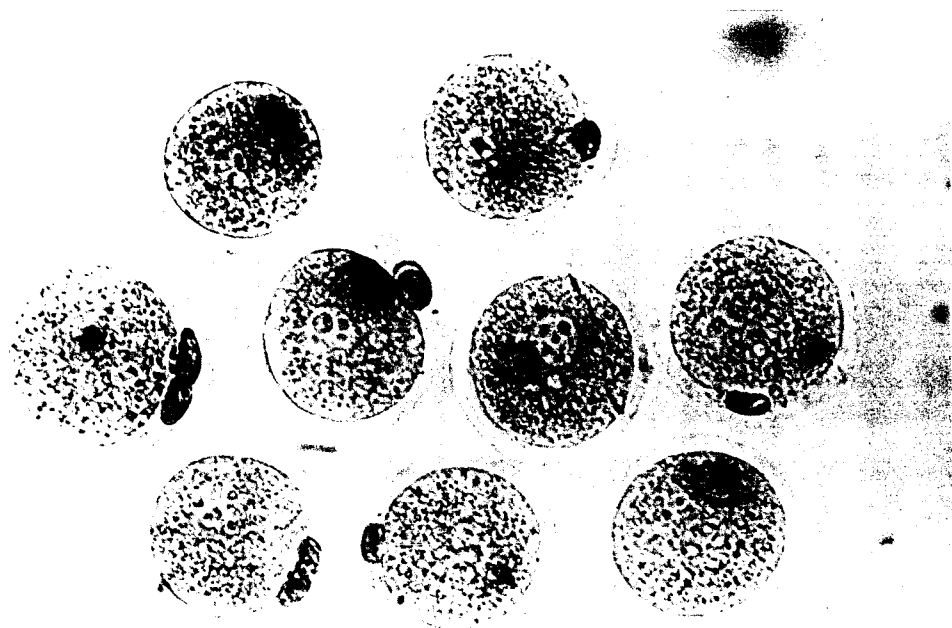


Fig. 5B P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

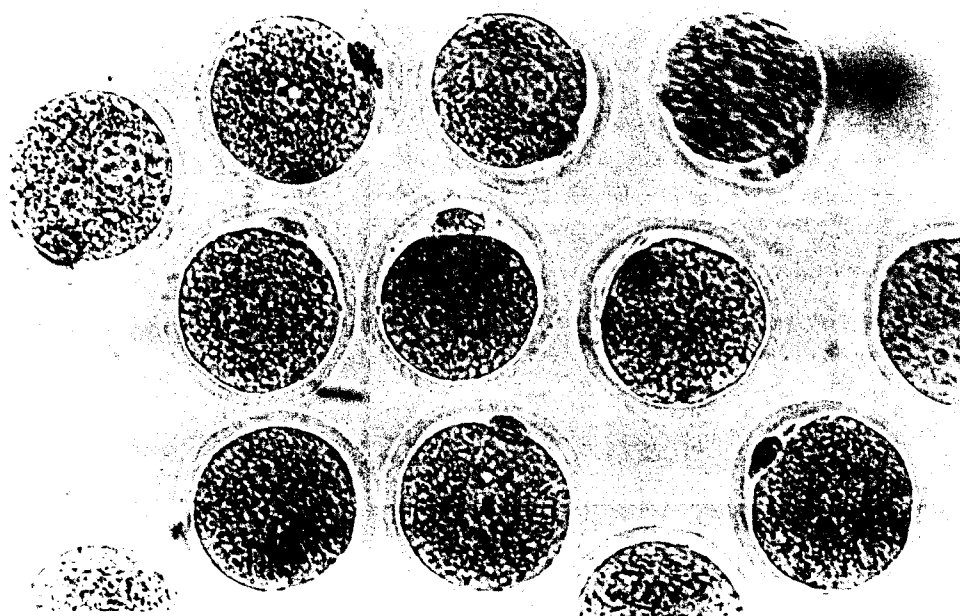


Fig. 5C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

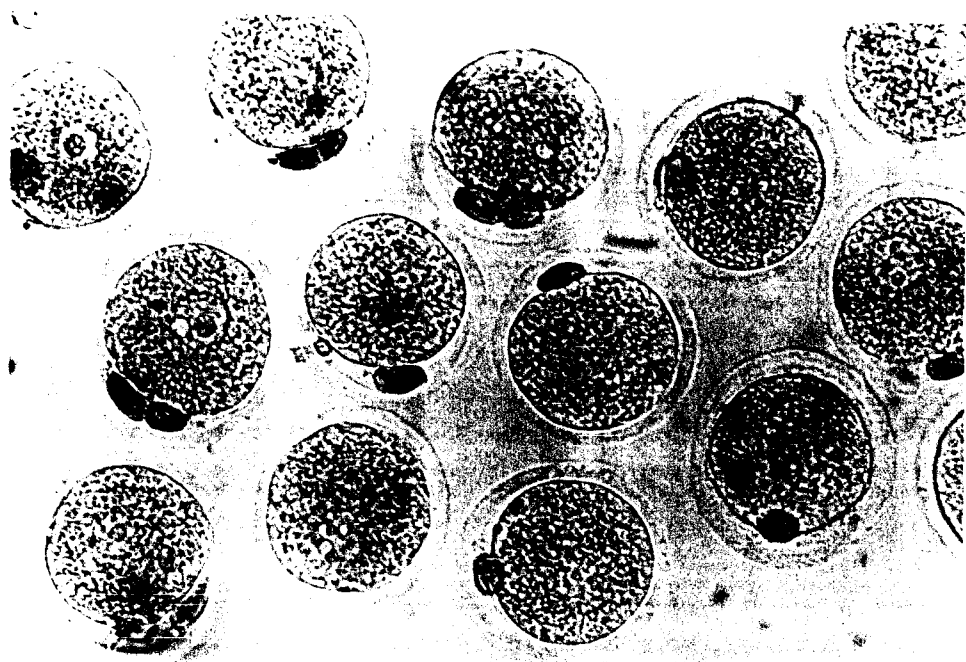


Fig. 5D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

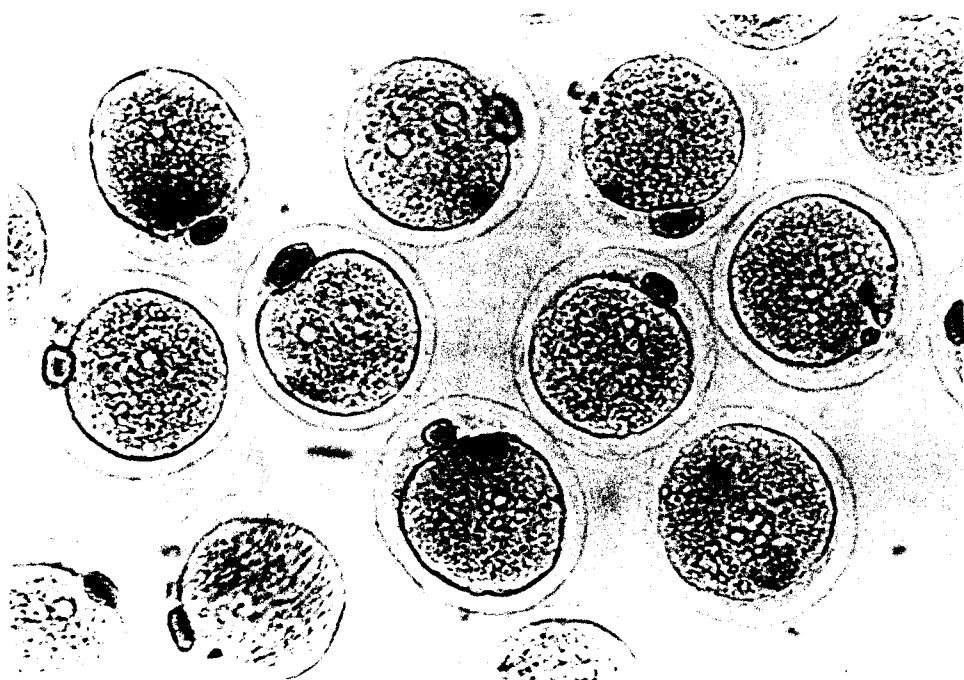


Fig. 5E L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1D}$ )

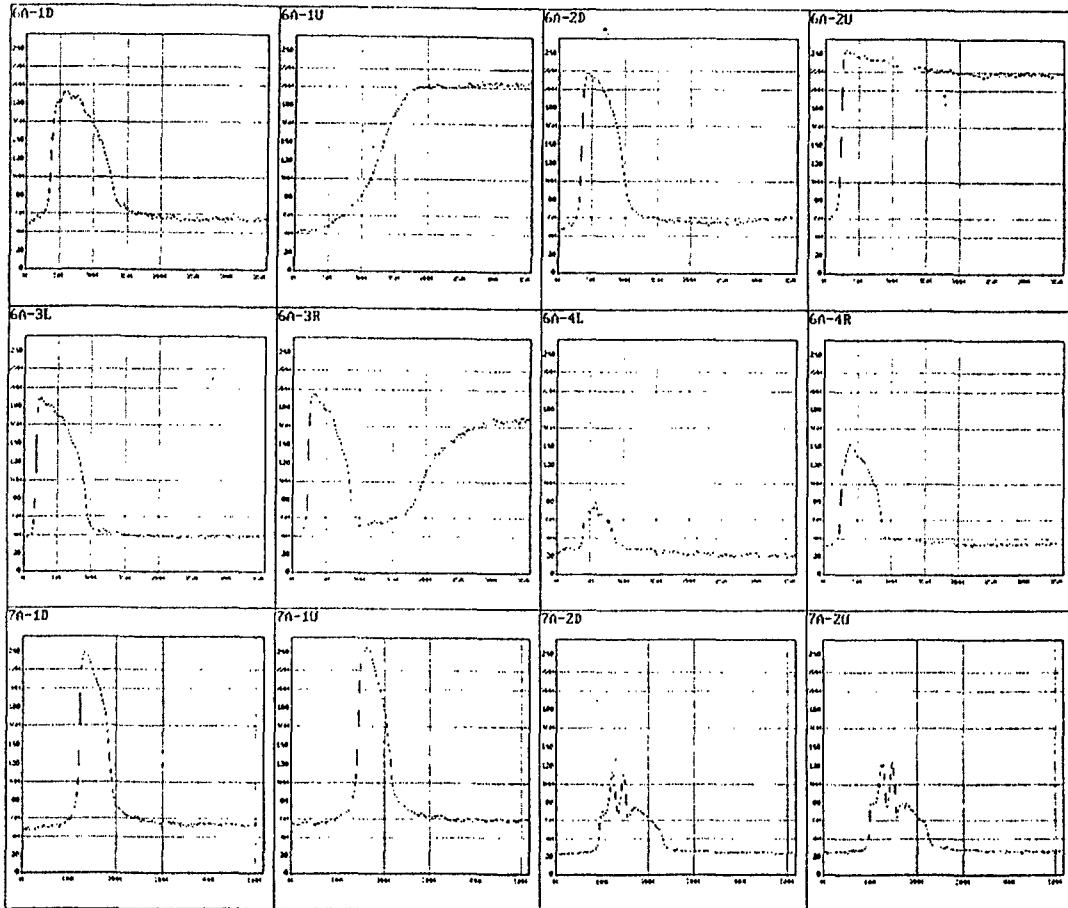


Fig. 6 제 1 type의 Ca<sup>2+</sup>-channel의 존재를 나타내는 confocal laser scanning microscope의 image curve

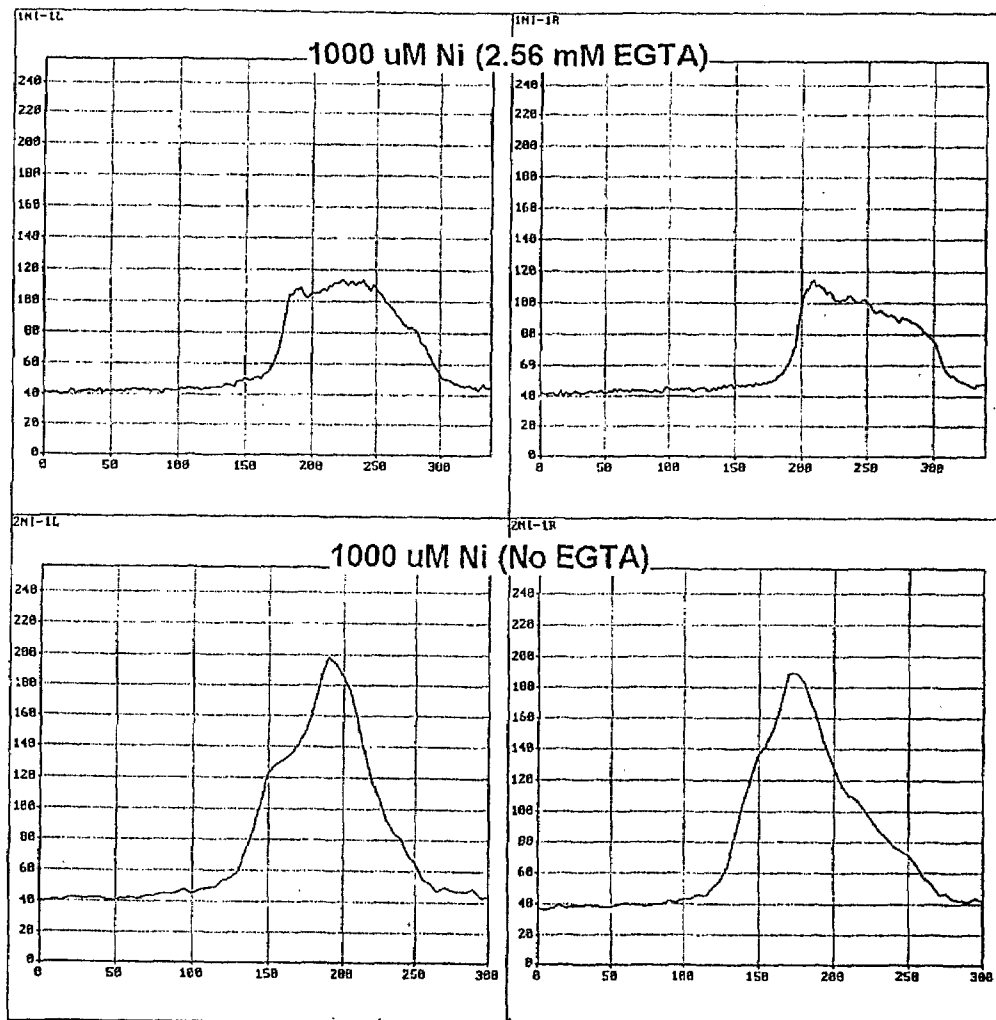


Fig. 7 제 2 type의 Ca<sup>2+</sup>-leak channel의 존재를 나타내는 confocal laser scanning microscope의 image curve (EGTA 처리군과 처리되지 않은군)

나. 2차년도 연구결과

(1) 2-세포배에서의  $Ca^{2+}$ 의 측정

공초점 현미경을 이용하여 fluorescence intensity를 측정하여 구한 2-세포배의 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 측정결과는 다음과 같다.

Table 2. 2-cell 배에서의  $Ca^{2+}$ 정량

	Average	SD	Max	Min
1) GV oocyte(10)	1247.5	233.4	1686.1	579.8
2) Zygote (32)	648.9	145.3	1179.9	398.8
3) Early 2-cell(52)	1131.1	238.6	1761.8	532.3
4) Late 2-cell(51)	1747.5	595.5	3351.6	719.6
5) Zygote oscillation(13)	1693.6	909.4	3969.7	568.9

2)의 zygote는 이미 oscillation이 완전히 끝난 상태의 zygote들임.

1차 연도의 난자 내에서의 calcium 정량(ICP/MS를 이용해 측정한 것)과 비교하기 위해 germinal vesicle 상태의 미성숙 난자와 수정란을 함께 측정하였다.

수정란에서는 공초점현미경으로 scanning을 하는 동안 수정 반응과 관련된 세포내  $Ca^{2+}$ 의 진동현상이 관찰되는 수정란은 따로 계산하였다(13/45개). 이 때 사용된 GV oocyte는 GVBD(germinal vesicle breakdown)이 일어나기 시작하는 단계로 보아진다. 즉 dbcAMP 100  $\mu$ g/ml이 들어있는 배양액 내에서 Fluo-3AM으로 45분-1시간 perfusion 한 후 침투되지 않은 Fluo-3AM을 제거하기 위해서 3회 기본배양액으로 세척하였으나 이미 1시간 가량 지난 후이기 때문에 난자의 GV는 GVBD가 일어나기 위한 준비과정이 진행되고 있는 시점이라 할 수 있다.

이런 상태에 있다보니 GV oocyte가 수정 후 oscillation이 끝난 zygote에서의 intracellular  $Ca^{2+}$ 보다 훨씬 높은 상태에 있다. 그러나 정확한 원인은 아직 밝혀지지 않고 있다.

Zygote oscillation은 보다 높은 상태의 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 유지하고 있으며 이런 oscillation이 일어날 때는  $Ca^{2+}$ store에서의  $Ca^{2+}$ release가 주류를 이루고 있다고 하지만  $Ca^{2+}$ -leak channel를 통한  $Ca^{2+}$ influx가 분명히 있는 것으로 추정되며 이 때문에 zygote oscillation에서의 intracellular  $Ca^{2+}$  농도가 높은 것으로 판명된다. 이것은 초기 2-세포배가 후기 2-세포배로 발생 중 많은 량의 calcium 축적현상이 뒤따르고 있음을 보여주고 있다.

즉, 초기 2-세포배는 intracellular  $Ca^{2+}$  level이 상당히 낮으나 후기 2-세포배는 아주 높은 상태의 intracellular  $Ca^{2+}$ 을 유지하고 있는 것으로 판명되었다. 이런 관계로 초기 2-세포배는  $Ca^{2+}$ -free 배양액에서는 쉽게 퇴화되지만 후기 2-세포배는

Ca<sup>2+</sup>-free 배양액에는 4-cell, 8-cell, 16-cell 등으로 분열하고 있음이 증명되었고 (Bae & Park, 1987), (후기 2-세포배가 Ca<sup>2+</sup> 없이 세포분열을 계속할 수 있는 현상은 본 교실에서 처음 발견하였다). 어떤 동물세포도 심지어 암세포도 Ca<sup>2+</sup> 없이는 분열이 일어나지 않지만 후기 2-세포배는 Ca<sup>2+</sup> 없이도 분열이 일어나고 있는 동물세포중 유일한 예외에 속하고 있다.

## (2) Immunocytochemical method를 이용한 Ca<sup>2+</sup>-channel의 동정

(가) 수정란 : 1차 연도의 Ca<sup>2+</sup>-channel을 참조

(나) 초기 2-세포배

① P/Q-type Ca<sup>2+</sup>-channel : localized staining이 강하게 나타나며 대개 2개 이상을 보여주고 있다.

② N-type Ca<sup>2+</sup>-channel : 수정란과 같이 localized staining이 조금 나타나기 시작하며 polar body에는 강한 staining을 보여주고 있다.

③ L-type Ca<sup>2+</sup>-channel : P/Q-type 다음으로 localized staining의 수가 많다.

상기 각 처리군이 수정란과 비교했을 때 localized staining의 수가 증가하고 있다.

(다) 20시간 체외 배양된 2-세포배

① P/Q type Ca<sup>2+</sup>-channel : 초기 2-세포배와 비교해서 별 차이가 없다.

② N type Ca<sup>2+</sup>-channel : 초기 2-세포배와 비교해서 별 차이가 없다.

③ L type Ca<sup>2+</sup>-channel ( $\alpha 1C$ ) : 초기 2-세포배보다 localized staining의 수가 증가하였다.

(라) 20 시간 Ni<sup>2+</sup> 처리된 2-세포배

Ni<sup>2+</sup> 처리가 이미 2-cell block의 극복효과가 있음이 보고된 바 있다(Bae & Yoon, 1995). 각 항체 처리군 사이에 큰 차이를 보이지는 않았으나 N-type Ca<sup>2+</sup>-channel의 경우 localized staining의 수가 초기 2-세포배 보다 높게 나타나고 있다.

또한 L-type의 경우도 초기 2-세포배 보다 localized staining의 수가 높게 나타나고 있다.

(마) 후기 2-세포배

① P/Q-type Ca<sup>2+</sup>-channel : 초기 2-세포배와 비슷한 양상을 보인다.

② N-type Ca<sup>2+</sup>-channel : 다른 시기의 2-세포배 보다 극체만이 염색되는 경향이 뚜렷하다.

③ L-type Ca<sup>2+</sup>-channel : localized staining이 다른 시기의 2-세포배 보다 적게 나타나고 있다.

결론: 상기의 2-세포배에서도 1차년도 처럼 3가지 voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channel

의 존재가 확인되었다. 그러나 ① 초기 2-세포배 ② 20시간 체외배양 된 2-세포배 ③ 20시간  $\text{Ni}^{2+}$  처리 된 2-세포배 ④ 후기 2-세포배 등에서  $\text{Ca}^{2+}$ -channel의 분포변화가 아주 많이 관찰되었다.

### (3) 공초점 현미경로 확인한 $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel의 동정

1차년도에  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel의 동정과 내용이 같지만 한 가지 더 추가하고 싶은 내용은 Fig. 6의 6A-1U와 6A-2U 및 6A-3R 등에서 볼 수 있는 sustained level의  $\text{Ca}^{2+}$  농도는 적어도 3분 이상이나 유지되고 있어 voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel이 open되어 일어나는  $\text{Ca}^{2+}$  influx로 보기는 어렵다. 즉, 앞서의 설명에서처럼 voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel의 influx의 경우 100mS와 3분(180S)는 엄청난 차이가 난다. 그러므로 6A-1U, 6A-2U, 6A-3R 등에서 보이는 sustained flat  $\text{Ca}^{2+}$  level은  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel을 통해 들어 온 Ca-influx 때문이 분명하다. 이 type은 Fig. 7의  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channel과는 다른 type으로 해석한다.

Table 5. Number of localized staining and staining intensity of immunostained Early 2-cell (post hCG 30-33hr)

Antibody/ Total No. of oocytes	No. of staining.	Number of localized staining						Homogeneous staining
		1		2	3	4	5	weak
		PB	Blastomere					
Control ( 32 )	32(100)							
Anti $\alpha_{1A}$ (1:120) ( 67 )	2(3.0)	1 (1.5)	15 (22.4)	40(59.6)	4(6.0)	1(1.5)		4(6.0) (2C-2, 1/2C-2)
Anti $\alpha_{1B}$ (1:400) ( 66 )	6(9.0)	5 (7.6)	24 (36.4)	27(40.9)				4(6.1) (2C 1, 1/2C-3)
Anti $\alpha_{1C}$ (1:400) ( 69 )	2(2.9)	7 (10.1)	20 (29.0)	38(55.1)				2(2.9) (2C-1, 1/2C-1)

※ Parenthesis indicate percentage of staining.

PB: polar body

Five replicates were done



Table 6. Number of localized staining and staining intensity of immunostained in vitro cultured 2-cell

Antibody/ Total No. of oocytes	No/ staining	Number of localized staining					Homogeneous staining	
		1		2	3	4	5	weak
		PB	Blastomere					
Control ( 28 )	28(100)							
Anti $\alpha_{1A}$ (1:120) ( 76 )	2(2.7)	1 (1.3)	22 (28.9)	39(51.3)	7(9.3)	3(3.9)		2(2.6) (1/2C, 2C)
Anti $\alpha_{1B}$ (1:400) ( 75 )	5(6.7)	12 (16.0)	30 (40.0)	23(30.6)	1(1.3)	2(2.7)		2(2.7) (1/2C)
Anti $\alpha_{1C}$ (1:400) ( 71 )	4(5.6)	15 (21.1)	28 (39.5)	16(22.6)	5(7.0)	2(2.8)		1(1.4) (1/2C)

\* Parenthesis indicate percentage of staining.

PB: polar body

Three replicates were done

Table 7. Number of localized staining and staining intensity of immunostained Ni 50uM treated 2-cell

Antibody/ Total No. of oocytes	No of staining	Number of localized staining					Homogeneous staining	
		1		2	3	4	5	weak
		PB	Blastomere					
Control ( 28 )	28(100)							
Anti $\alpha_{1A}$ (1:120) ( 76 )	2(2.6)	3 (3.9)	26 (34.3)	37(48.7)	6(7.9)			2(2.6) (2C-1, 1/2C-1)
Anti $\alpha_{1B}$ (1:400) ( 79 )	7(8.9)	17 (21.5)	27 (34.2)	17(21.5)	2(2.5)			9(11.4) (2C-4, 1/2C-5)
Anti $\alpha_{1C}$ (1:400) ( 90 )	7(7.8)	16 (17.8)	34 (37.8)	20(22.2)	3(3.3)			10(11.1) (2C-5, 1/2C-5)

※ Parenthesis indicate percentage of staining.

PB: polar body

Three replicates were done

Table 8. Number of localized staining and staining intensity of immunostained late 2-cell

Antibody/ Total No. of oocytes	Non- staining	Number of localized staining					Homogeneous staining	
		1		2	3	4	5	weak
		PB	Blastomere					
Control ( 32 )	32(100)							
Anti $\alpha_{1A}$ (1:120) ( 89 )	1(1.1)	2 (2.3)	21 (23.6)	51(57.3)	6(6.7)	6(6.7)		2(2.3) (2C-2)
Anti $\alpha_{1B}$ (1:400) ( 78 )	3(3.8)	25 (32.1)	34 (43.6)	9(11.5)	2 (2.6)			5(6.4) (2C-4, 1/2C-1)
Anti $\alpha_{1C}$ (1:400) ( 86 )	20(23.3)	6 (6.9)	44 (51.1)	14(16.3)	1(1.2)			1(1.2) (2C-1)

\* Parenthesis indicate percentage of staining.

PB: polar body

Three replicates were done

Ca<sup>2+</sup>-channel antibody를 이용한 Ca<sup>2+</sup>-channel의 동정

Fig. 8 Early 2-cell (Post hCG 30-33hr)

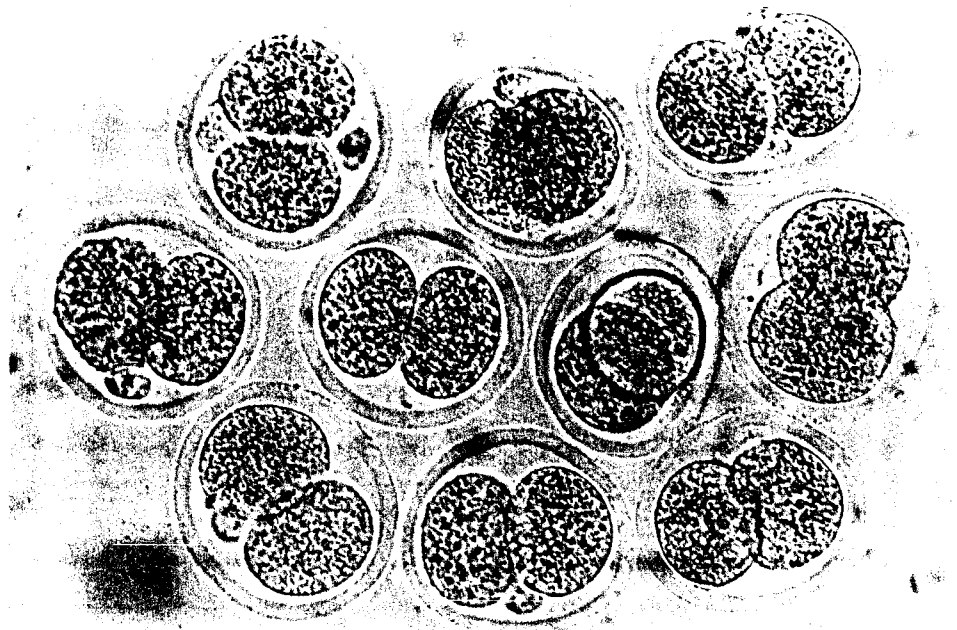


Fig. 8A Control

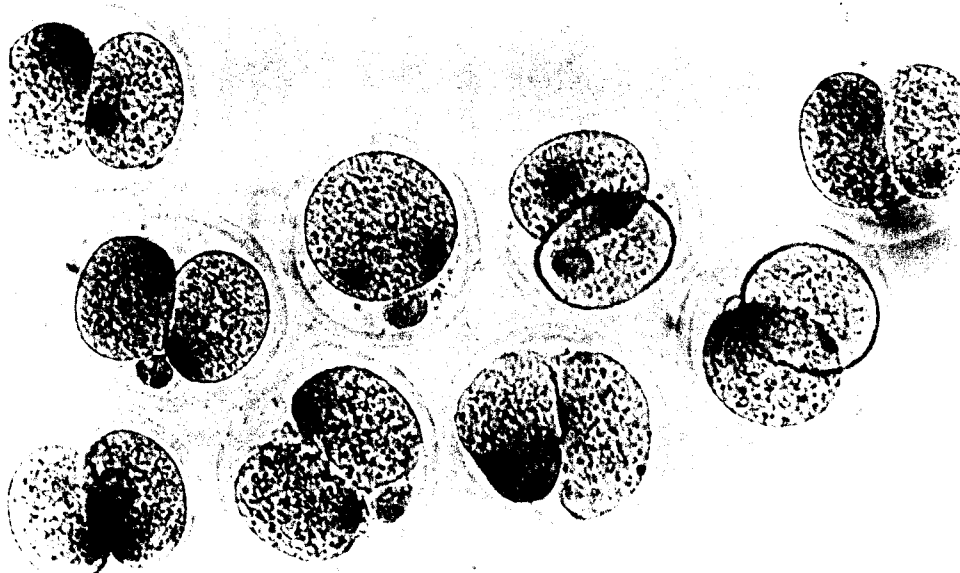


Fig. 8B P/Q-type Ca<sup>2+</sup>-channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

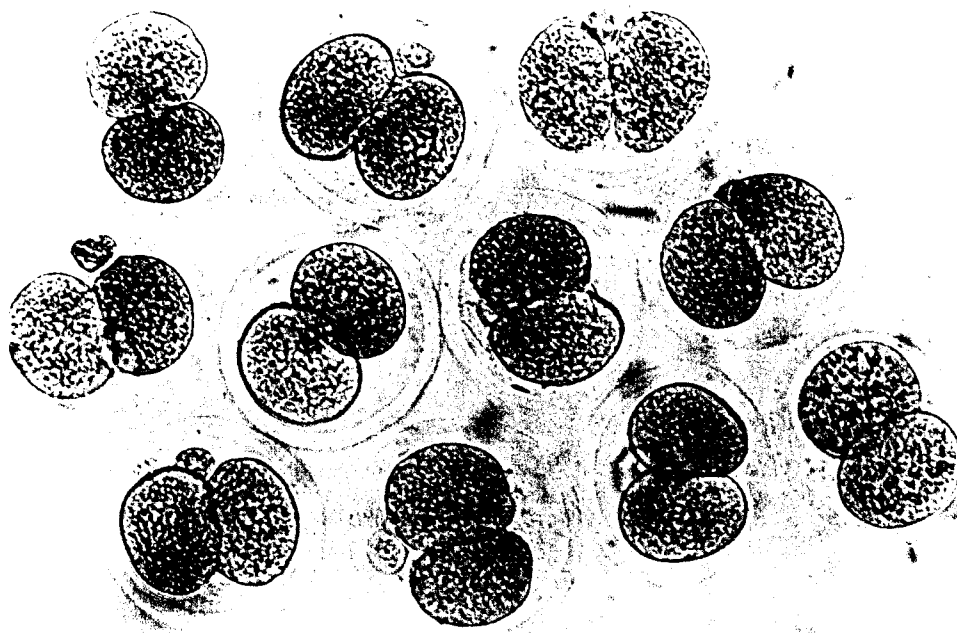


Fig. 8C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

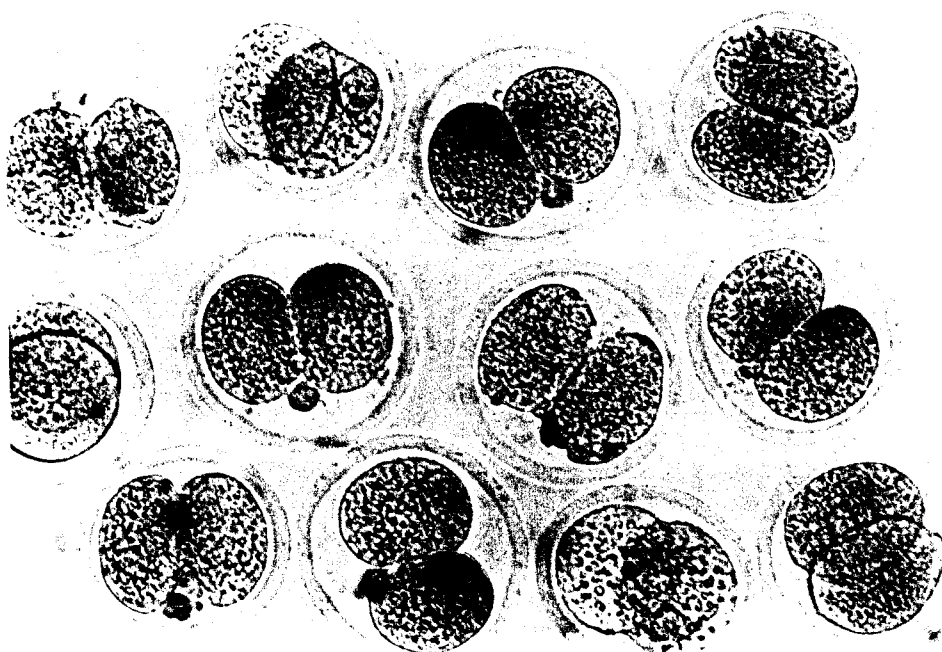


Fig. 8D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

Fig. 9 In Vitro Cultured 2-cell

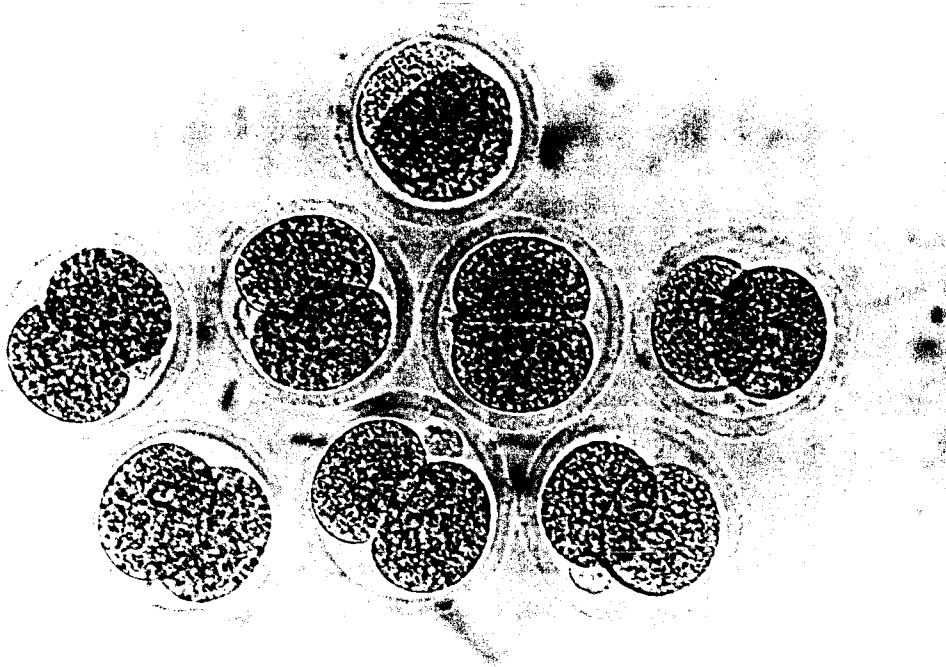


Fig. 9A Control

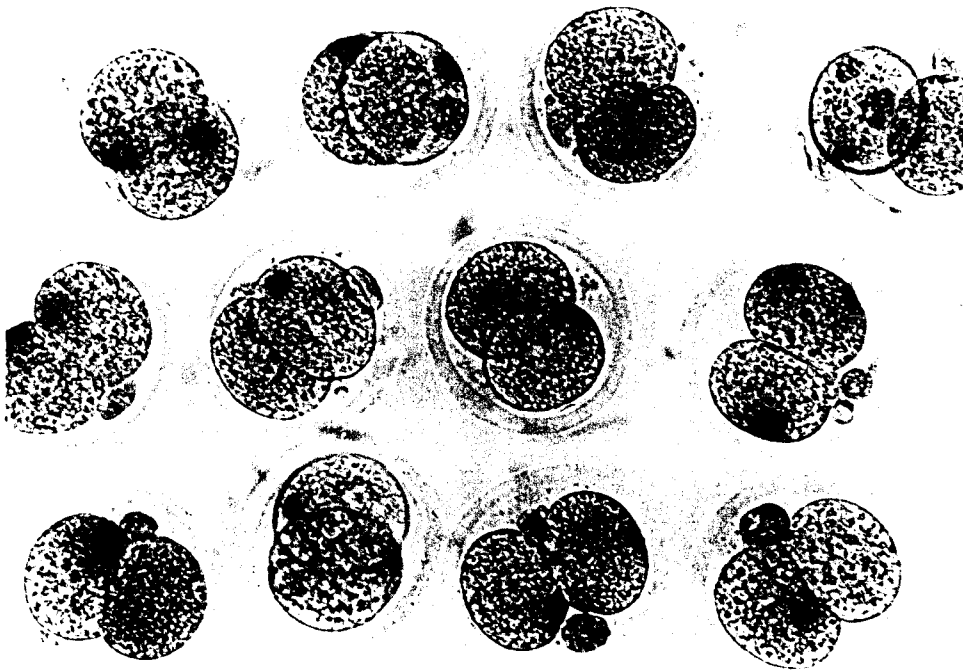


Fig. 9B P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

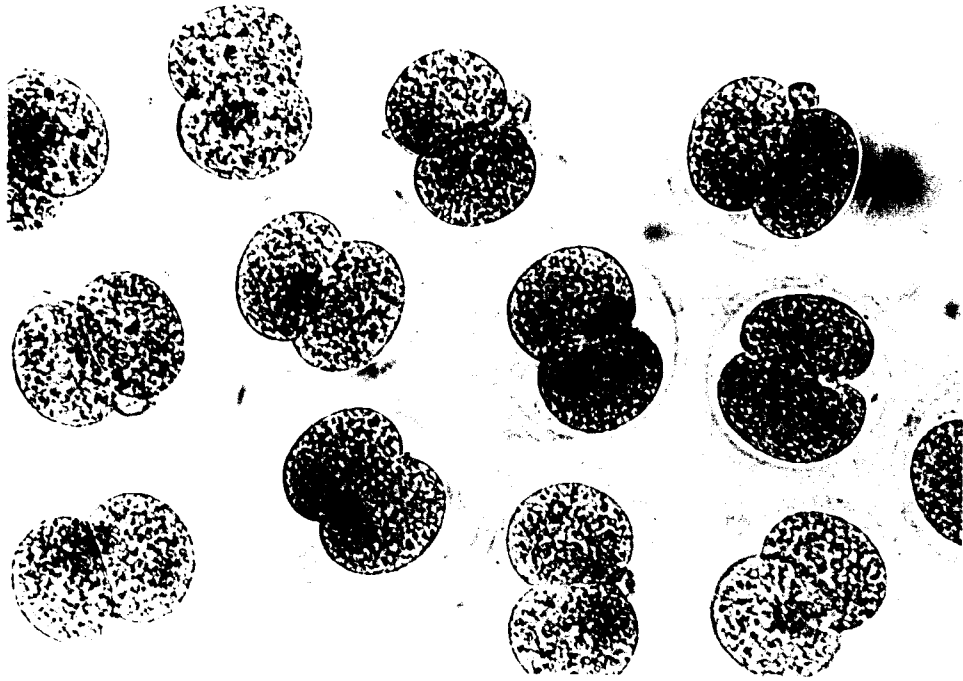


Fig. 9C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

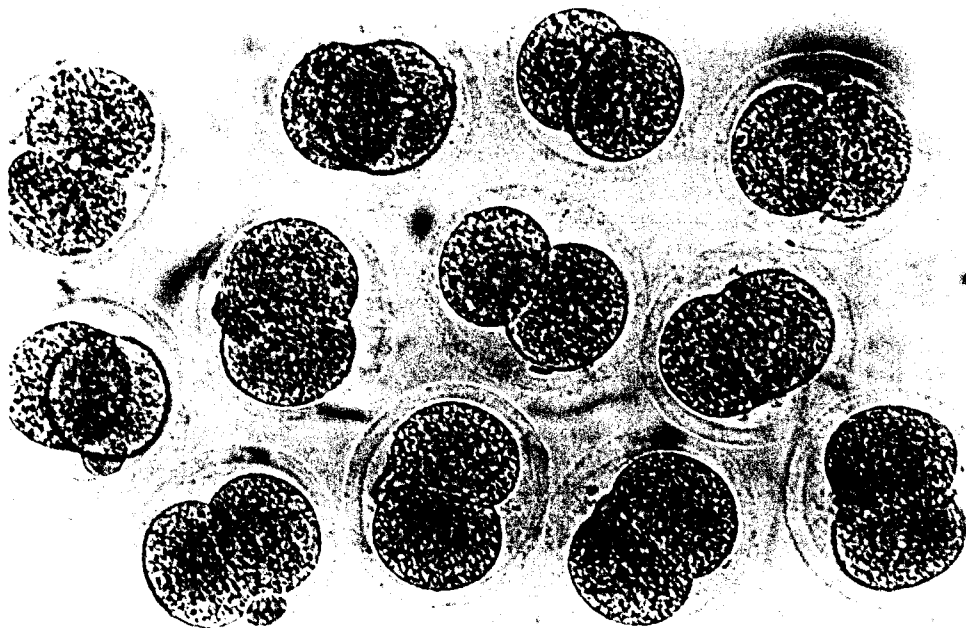


Fig. 9D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

Fig. 10 In Vitro Culture 2-cell in  $50 \mu\text{M Ni}^{2+}$

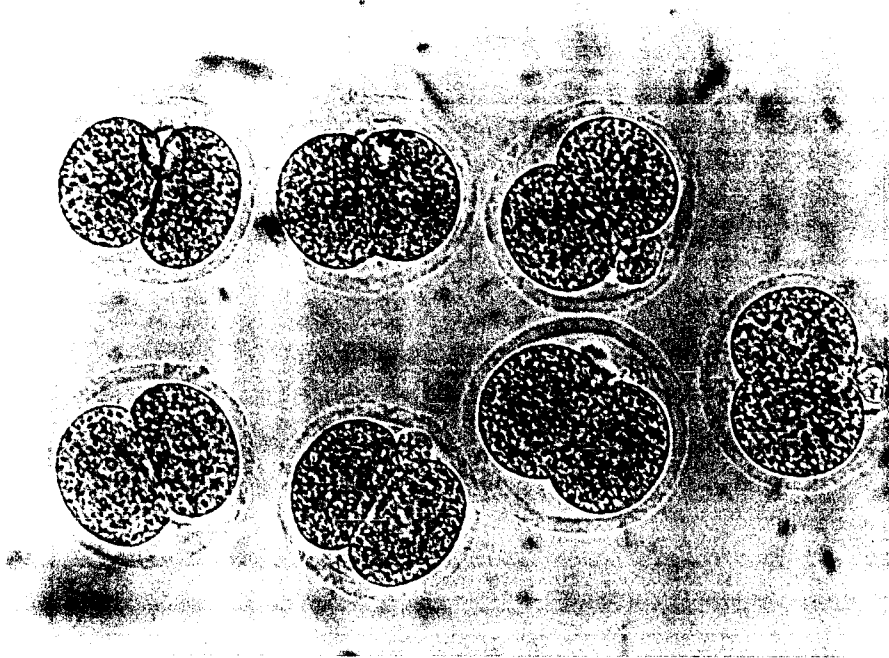


Fig. 10A Control

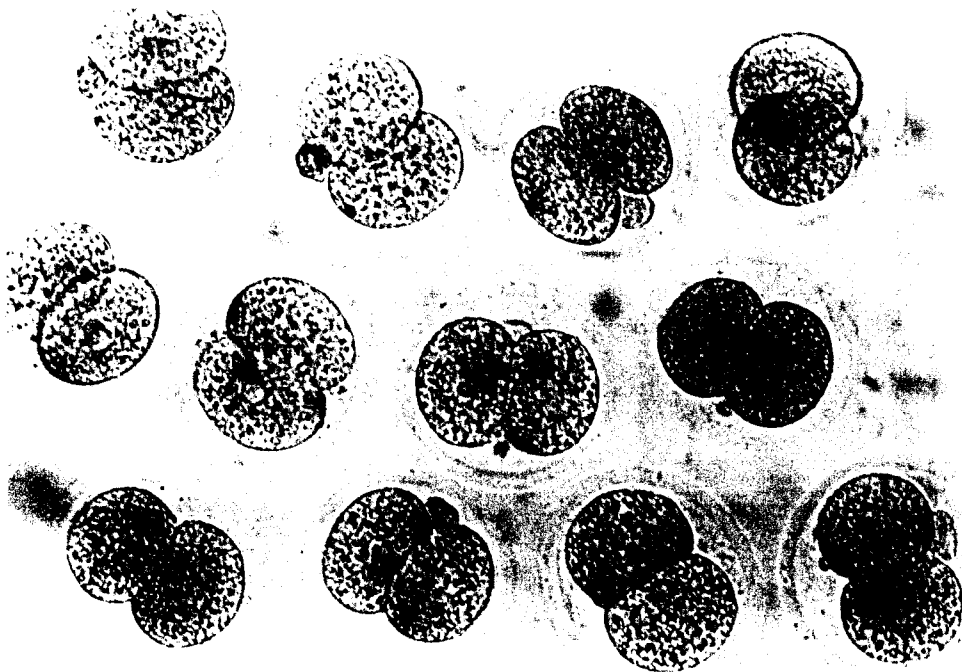


Fig. 10B P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti- $\alpha_{1A}$ )



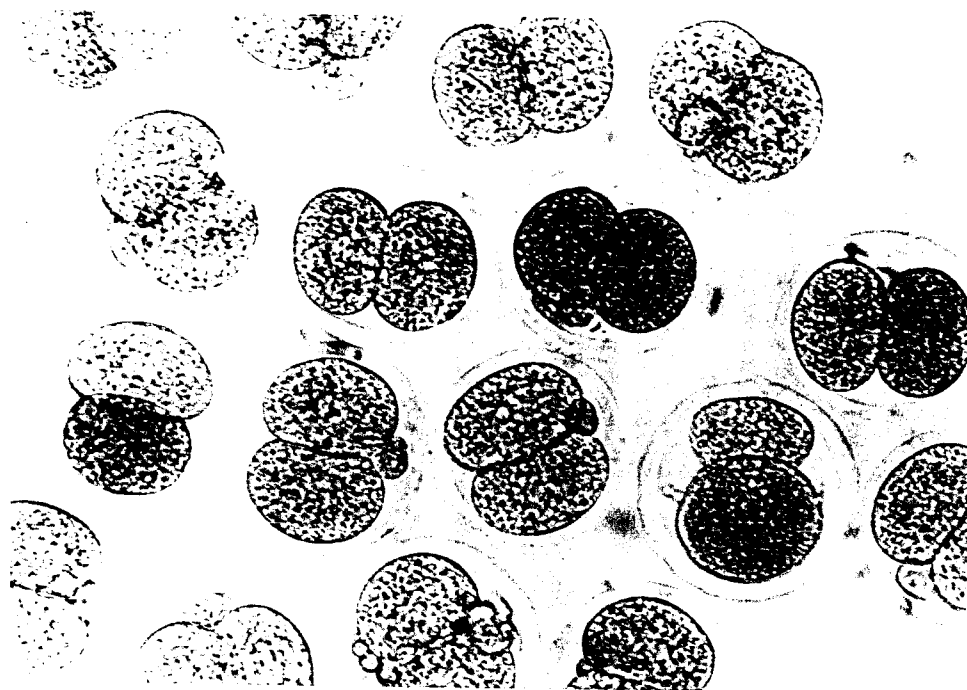


Fig. 10C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

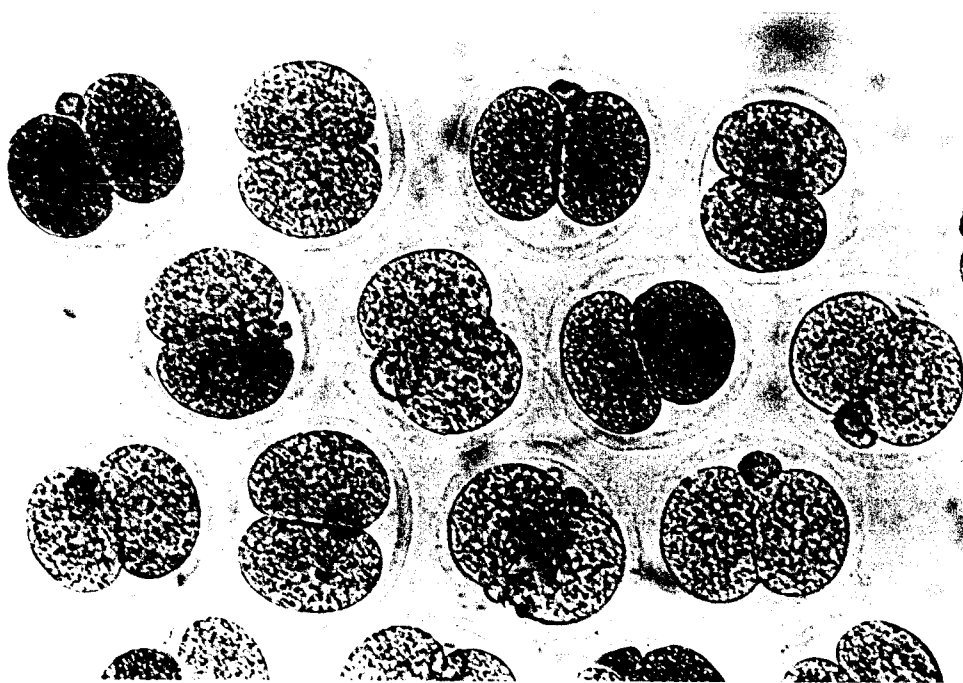


Fig. 10D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

Fig. 11 Late 2-cell (Post hCG 48-50hr)

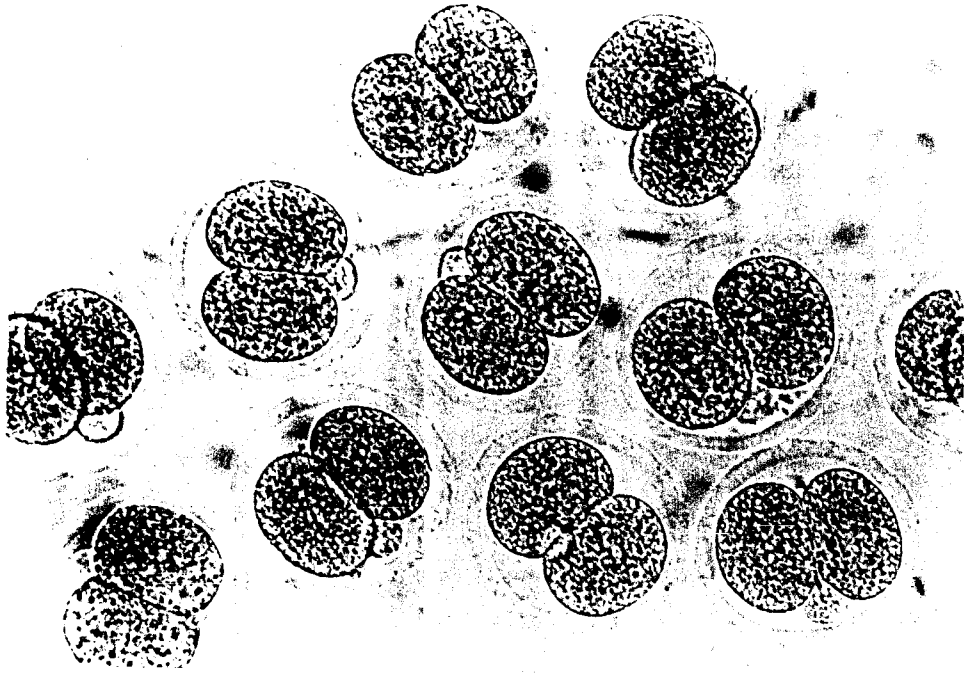


Fig. 11A Control

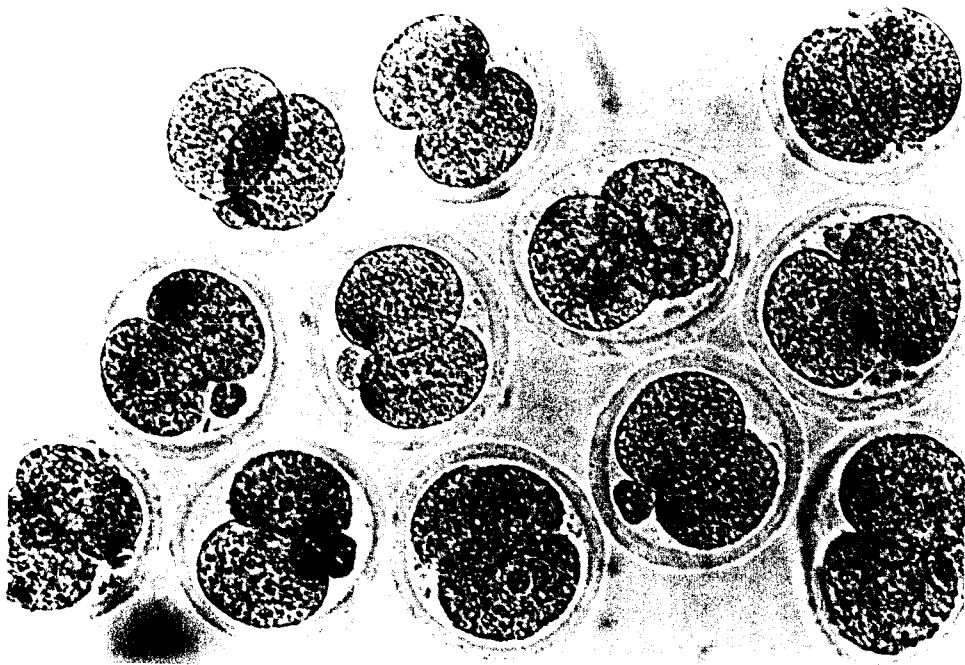


Fig. 11B P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

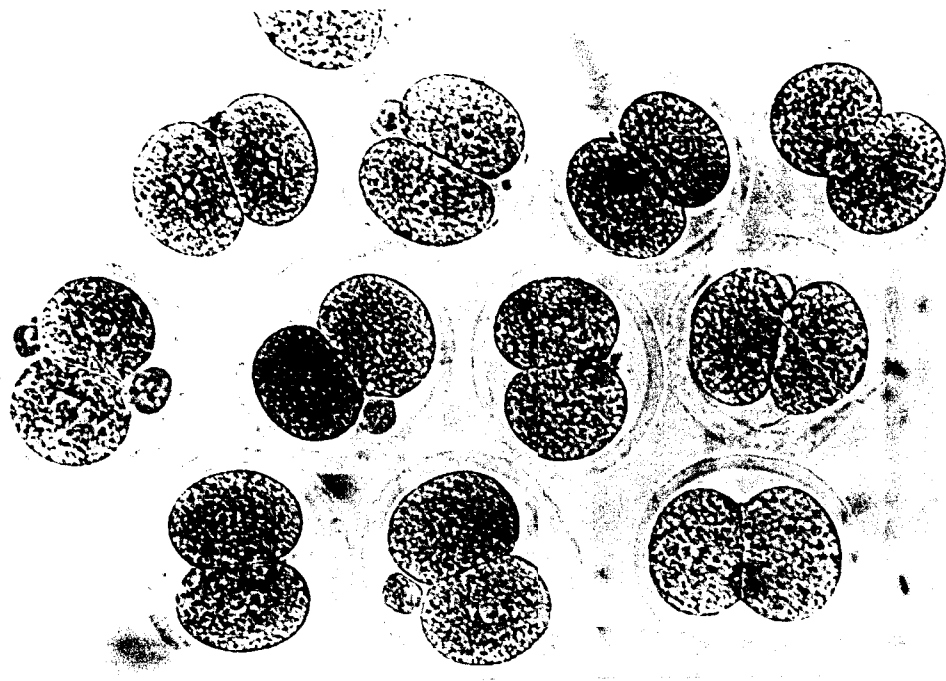


Fig. 11C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

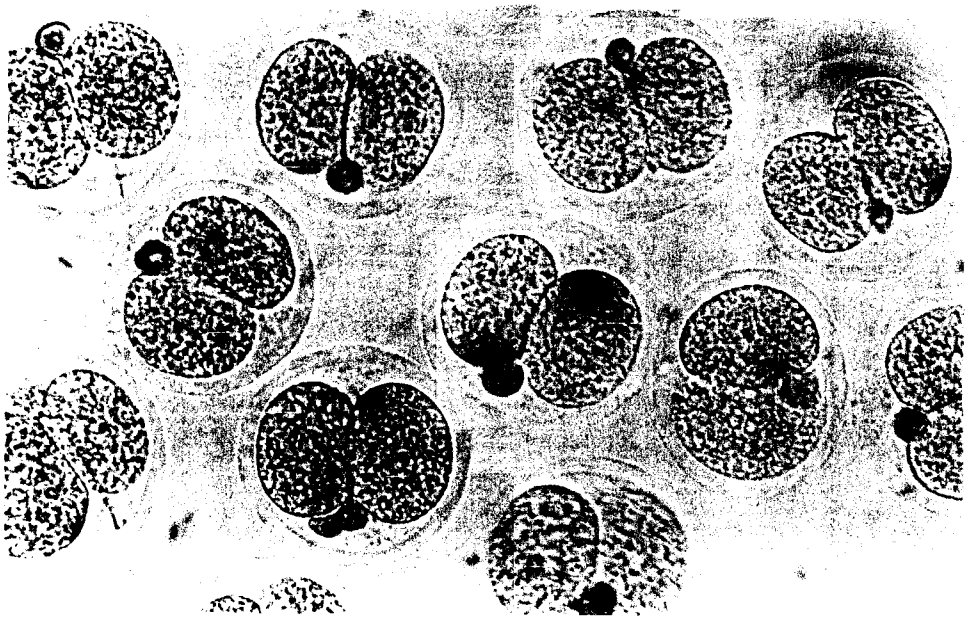


Fig. 11D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

다. 3차년도의 연구결과

4-세포기 → 8-세포기 간의  $Ca^{2+}$ -channel의 변화상

(1) P/Q-type channel

(가) P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel : 2-세포배까지는 localized distribution pattern을 보였으나 4-세포기 → 8-세포기로 발생동안에는 전부가 homogeneous staining pattern을 보였음. 아주 특이한  $Ca^{2+}$ -channel 상의 변화이다.

(나) 4-세포배 시기부터는 P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel이 전혀 없는 할구(blastomere)가 나타나기 시작하였다. P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel이 있는 할구와 없는 할구의 비율이 31 : 22로 나타나 전체 2/5정도의 할구는 P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel이 전혀 존재하지 않는 할구들이다.

(다) 이런 현상은 4-세포기배에서 부터 선택적 유전자 활성이 나타나 궁극적으로는 분화단계의 가장 시초적인 현상으로 추정된다. 이와 같은 현상은 2-세포배에서는 전혀 찾아 볼 수 없었던 현상들이다.

(2) N-type  $Ca^{2+}$ -channel

(가) N-type  $Ca^{2+}$ -channel은 여포난자에서부터 정자와의 수정을 거친 zygote에 이르기까지는 난자 막상에 N-type  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 지가 의심스러울 정도로 staining이 약했으나 polar body는 강하게 염색되어 N-type의 존재가 확인되었지만 2-cell 때에는 localized staining이 아주 증가하였다. 이 변화 역시 아주 특이한 변화 중의 하나이다.

(나) P/Q-type channel처럼 4-세포배로 발생이 진전되면 N-type  $Ca^{2+}$ -channel의 존재가 전혀 확인되지 않은 비율이 점점 늘어나 N-type channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구의 비율이 24 : 43으로 약 2/3의 할구가 N-type channel이 전혀 존재하지 않는 할구이다.

이것은 배 발생이 진전됨에 따라 N-type  $Ca^{2+}$ -channel의 유전자가 비활성화 된다는 증거이며 또한 난자 시기와는 달리  $Ca^{2+}$ -channel의 변화가 현저히 나타나는 시기라고 보여진다. 물론 발생 분야에서는 초기 8-세포배에서 일어나는 밀집화 현상이 배의 분화의 최초의 시점이라고 보고 있으나 이것은 어디까지나 외형적 형태적으로 보여지는 첫 징조이지만 내부적으로는 이와 같은  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화가 먼저 일어난 후에야 외형적인 분화형태로 볼 수 있다는 점에서 추정할 수 있는 현상이라 하겠다.

(3) L-type  $Ca^{2+}$ -channel( $\alpha 1C$ )

(가) 4-세포배로 발전하면 앞서의 ① P/Q- ② N-type  $Ca^{2+}$ -channel의 경우처럼  $\alpha 1C$  type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구의 비율이 36 : 27로 나타나 L-type( $\alpha 1C$ ) channel이 없는 할구가 역시 나타난다.

(L-type 중  $\alpha 1D$  antibody는 연구비 관계로 더 이상 계속하지 않고 있음)

결론: 상기의 3가지 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구를 4-세포배에서 분포도를 보면 다음과 같은 확률로 그 분포가 달라지고 있다.

Table 3. 4-세포배에서 3가지  $Ca^{2+}$ -channel이 존재하는 할구와 존재하지 않는 할구의 분포도 확률

Channel type	Channel의 존재가 확인된 할구 : 비존재 할구	존재할 확률	존재하지 않을 확률
P/Q-type	31 : 22	31/53	22/53
N-type	24 : 43	24/67	43/67
L-type	36 : 27	4/7	3/9

Table 4. 확률 계산표

P/Q-type channel만 표현될 확률  $31/53 \times 43/67 \times 3/7 = 3999/24857$

N-type channel만 표현될 확률  $22/53 \times 24/67 \times 3/7 = 1584/24857$

L-type channel만 표현될 확률  $22/53 \times 43/67 \times 4/7 = 3784/24857$

P/Q-와 N-type channel만 표현될 확률  $31/53 \times 24/67 \times 3/7 = 2232/24857$

P/Q-와 L-type channel만 표현될 확률  $31/53 \times 43/67 \times 4/7 = 5332/24857$

N-와 L-type channel만 표현될 확률  $22/53 \times 24/67 \times 4/7 = 2112/24857$

3가지 type의 channel이 모두 표현될 확률  $31/53 \times 24/24/67 \times 4/7 = 2996/24857$

3가지 type의 channel이 모두 표현되지 않는 확률  $22/53 \times 43/67 \times 3/7 = 2838/24857$

이것을 histogram으로 표시하면 다음과 같다.

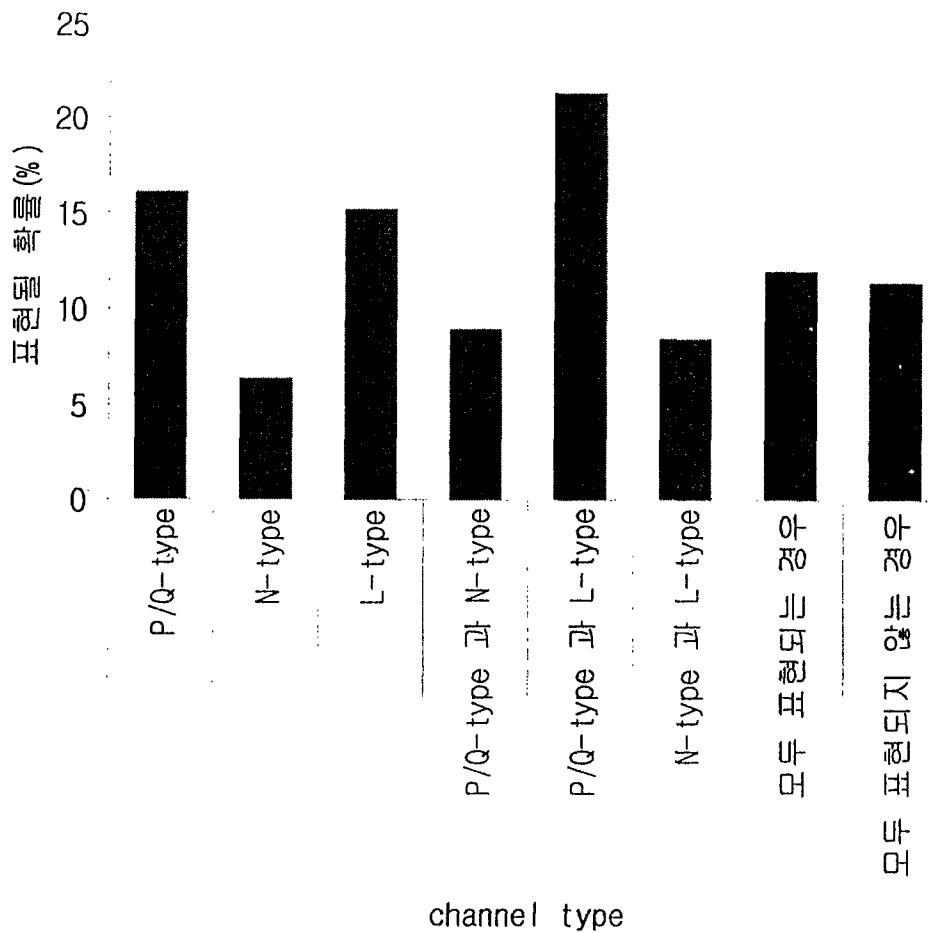


Fig. 1 4-세포배 → 8-세포배로 발생할 때  $Ca^{2+}$ -channel이 표현되는 확률을 나타낸 그림

결론: 3차년도의 연구 결과, 3가지 type의 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel(① P/Q-type ② N-type ③ L-type( $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1D$ ))이 있는 할구와 없는 할구 그리고 전혀  $Ca^{2+}$ -channel이 없는 할구 및 3개의  $Ca^{2+}$ -channel이 다 존재하는 할구들이 나타남으로써 초기 8-세포배에서 일어나는 치밀화 현상이 수정 후 처음 일어나는 분화과정이란 점에서 본다면 이 치밀화 현상은  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화에 기인한 현상이 아닌가 하는 추정이 가능하며 포배기에서 inner cell mass와 trophoblast 등의 세포군으로 나누어지는 분화과정 자체로 4-세포배에서 시작하는  $Ca^{2+}$ -channel 유무 및 분포변화 중에서 유추될 수 있는 것으로 추정된다. 이런 발전으로 생물학계의 mystery 중의 하나인 분화과정을 해석 할 수 있는 뒷받침이 되는 것이 아닌가 하는 생각이 든다.

Ca<sup>2+</sup>-channel antibody를 이용한 Ca<sup>2+</sup>-channel의 동정

Fig. 12 Post hCG 58hr(In Vivo)

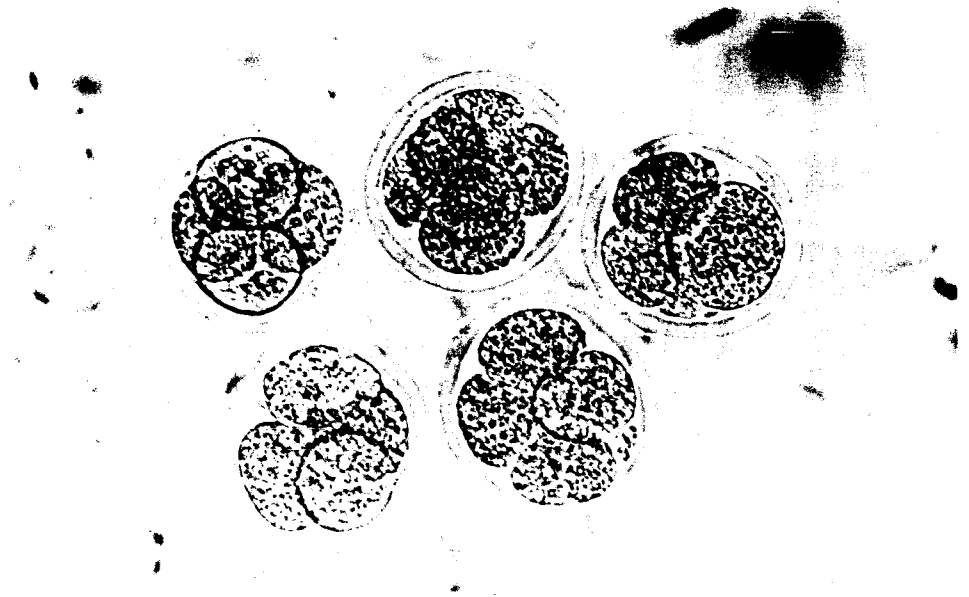


Fig. 12A Control

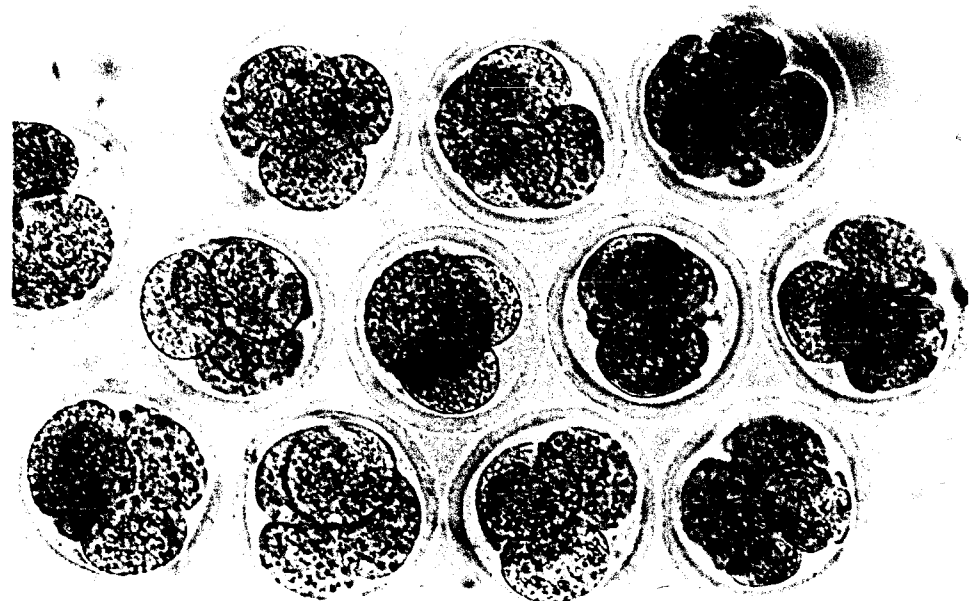


Fig. 12B P/Q-type Ca<sup>2+</sup>-channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

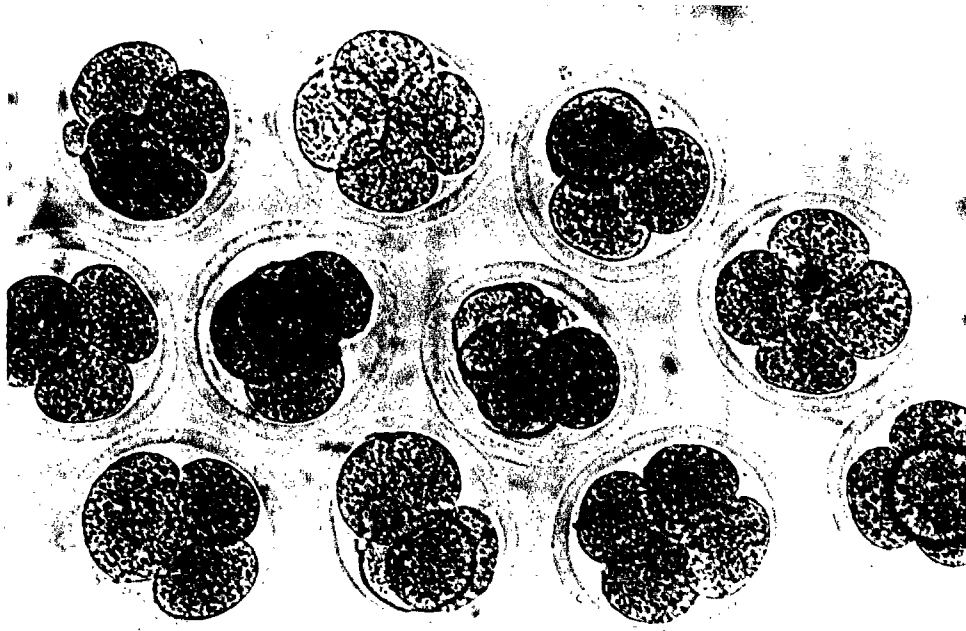


Fig. 12C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

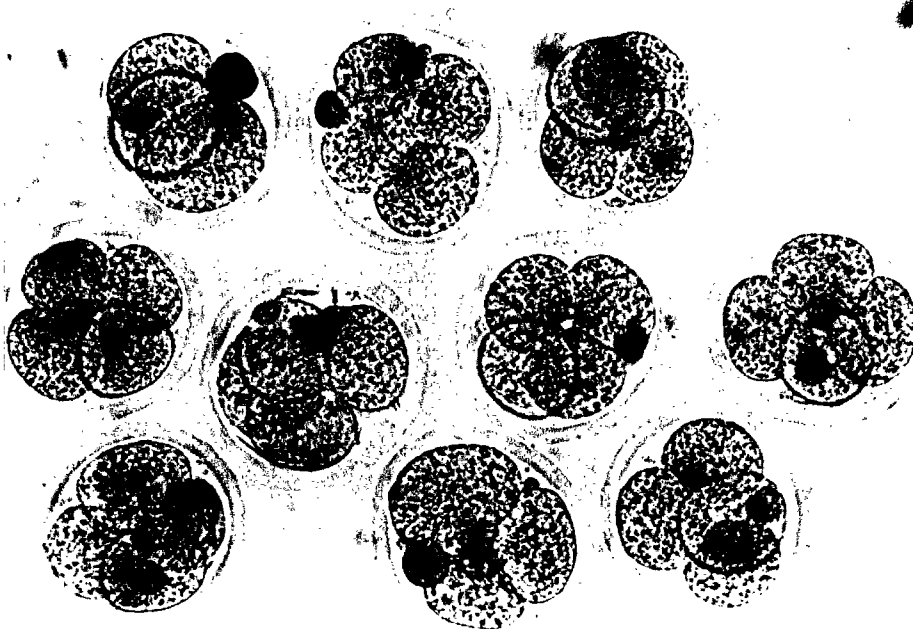


Fig. 12D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )



Fig. 13 Post hCG 64hr(In Vivo)

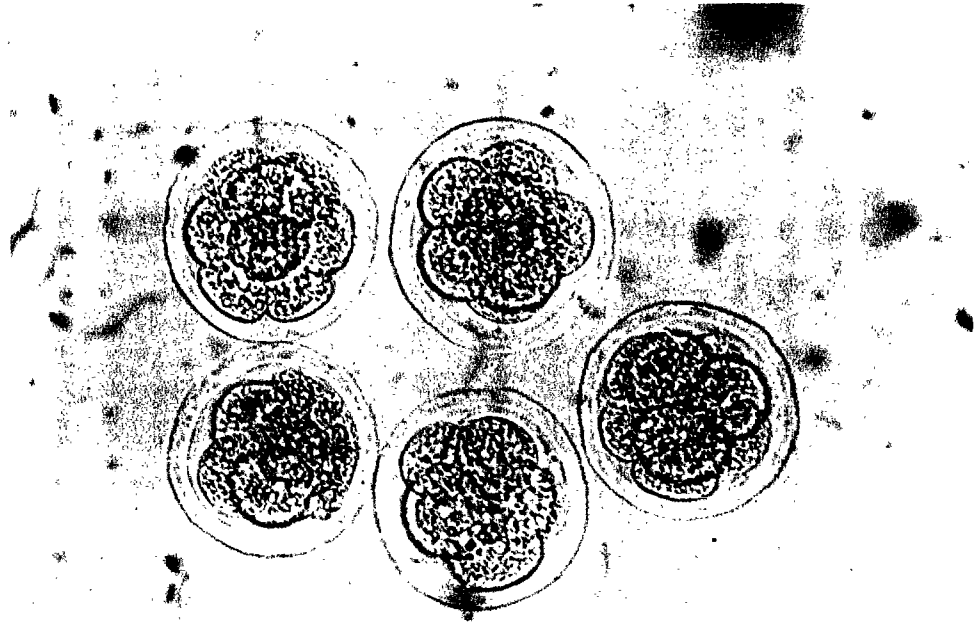


Fig. 13A Control

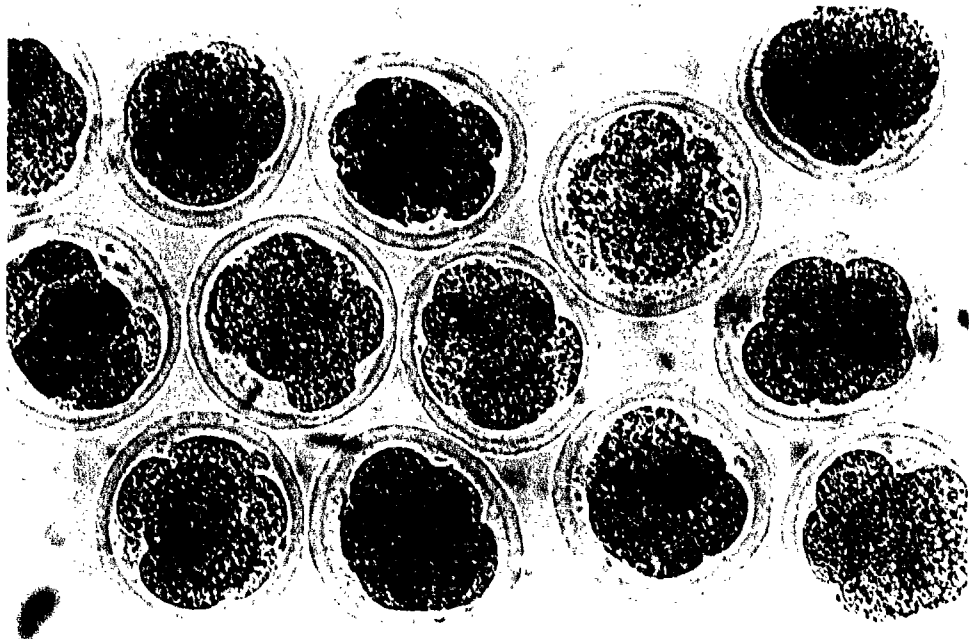


Fig. 13B P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

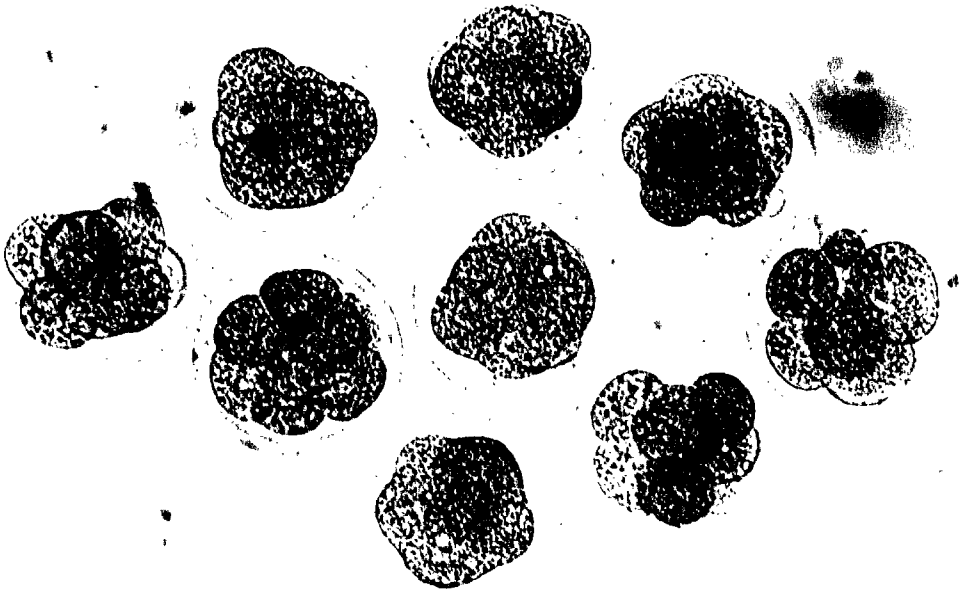


Fig. 13C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

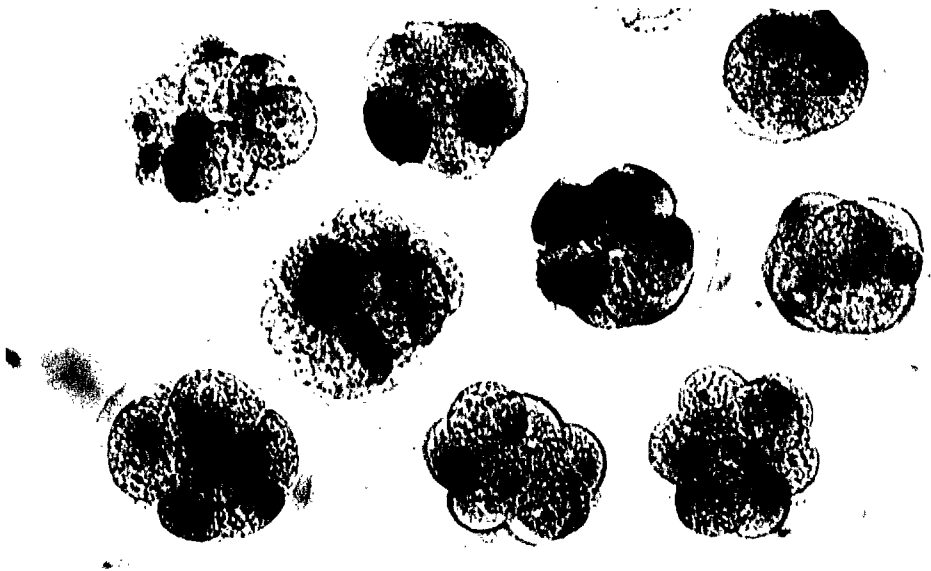


Fig. 13D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

Fig. 14 Post hCG 72hr(In Vivo)

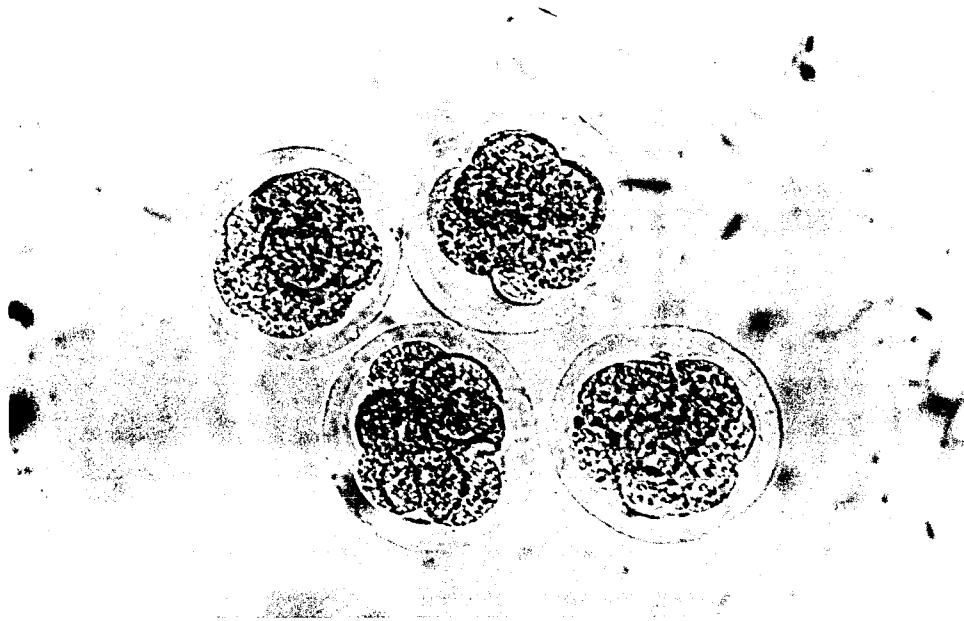


Fig. 14A Control

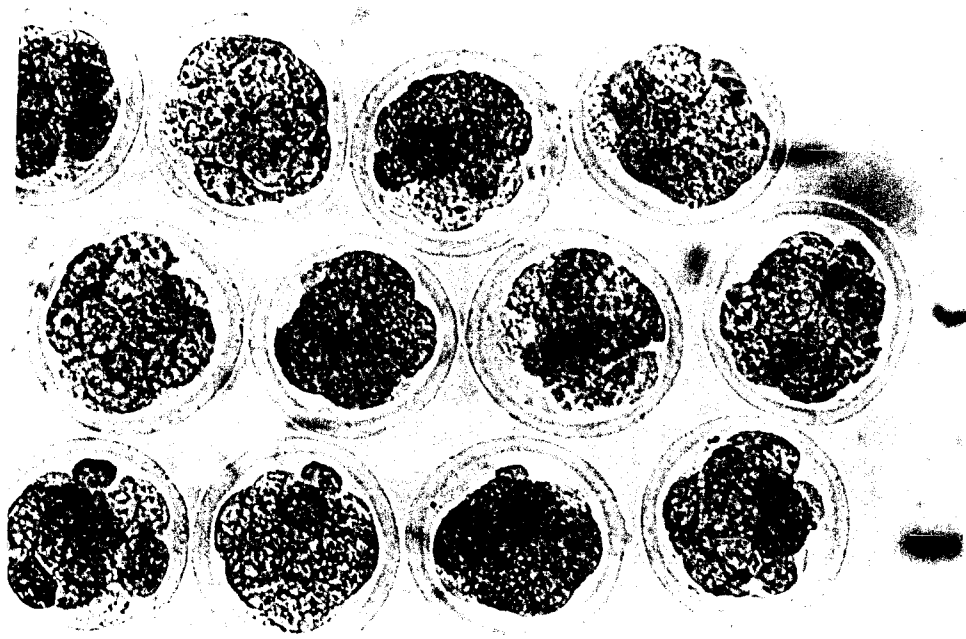


Fig. 14B P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel(anti- $\alpha_{1A}$ )

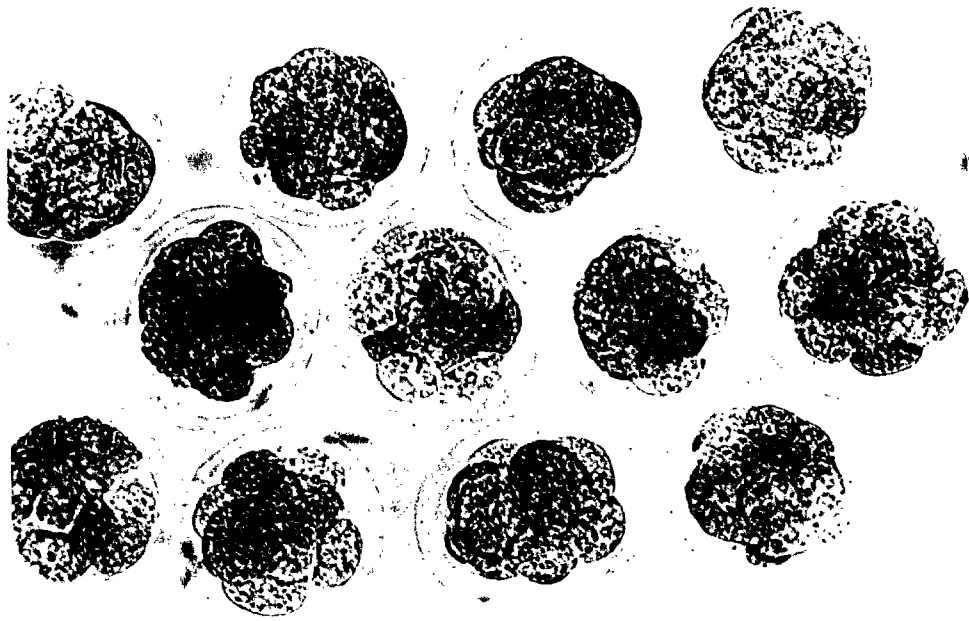


Fig. 14C N-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1B}$ )

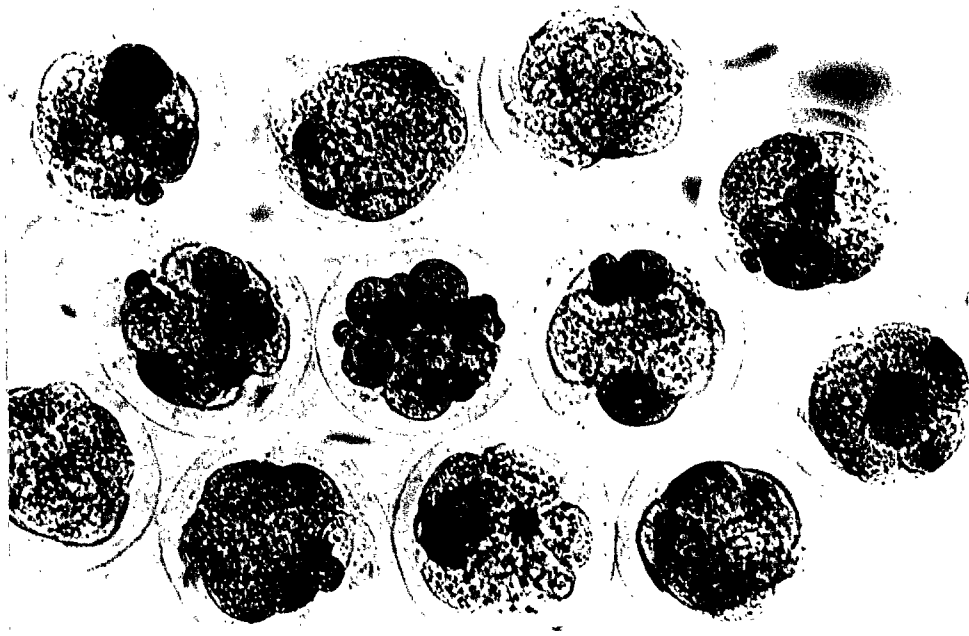


Fig. 14D L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel(anti  $\alpha_{1C}$ )

## 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

본 연구에서 3차년도까지의 연구는 포유동물(생쥐)의 여포난자에서부터 초기 8-세포배에 이르기까지의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정과 이들  $Ca^{2+}$ -channel의 분포변화에 대한 경향을 조사한 연구이다.

포유동물의 난자나 수정 후 착상 전까지의 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel에 관한 연구는 거의 없었다. 즉, 실험재료를 많이 얻지 못하는 상황 때문에 이에 대한 연구수행이 어려웠던 관계 때문이라고 판단된다. 이와는 달리 양서류나 무척추동물의 성체 등에서의  $Ca^{2+}$ -channel에 관한 연구는 오히려 포유류의 난자 및 배에서의 연구보다도 훨씬 이전부터 행해져 많은 종류의  $Ca^{2+}$ -channel이 동정되었다(Moody and Lausman, 1983 ; Lotan et al, 1989 ; Umbach & Gundersen, 1987).

그러나 포유류에서도  $Ca^{2+}$ -channel type을 밝히지는 못했으나  $Ca^{2+}$ -channel이 존재한다는 연구는 1980년대에서부터 연구되기 시작하였다(Yoshida, 1982, 1983, 1985, 1985 ; Powers, 1982 ; Leferve et al., 1995 ; Bae and Channing, 1985; Blancato and Seyler, 1990).

최근에 Mattioli et al. (1998)가 P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel inhibitor와 공초점 현미경을 이용하여 돼지난자에서 P/Q-type  $Ca^{2+}$ -channel이 존재한다는 것을 처음으로 발표하였으나 이 논문은 영국생식생리학회의 연례학회 때 abstract form 으로 발표된 것이다. 이 다음 본 교실에서 생쥐여포난자에서 3가지 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel, ① P/Q-type, ② N-type, ③ L-type의  $Ca^{2+}$ -channel이 존재한다고 증명한 논문이 정규논문형태로는 처음의 연구였다.

본 연구는 이제 3차년도까지 여포난자, 배란난자, 체외성숙난자, 수정난자, 초기 2-세포배, 후기 2-세포배, 체외 배양 2-세포배,  $Ni^{2+}$  처리 2-세포배, 4-세포배, 체외배양된 4-세포배,  $Ni^{2+}$  처리 4-세포배 및 초기 8-세포배 중에서 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel중의 ① P/Q-type, ② N-type 및 ③ L-type의  $Ca^{2+}$ -channel의 존재를 증명하였다.(원고준비중)

그리고 이외 두 가지 type의  $Ca^{2+}$ -leak channel의 존재를 본 연구에서 확인하였다(원고 준비중).

난자나 수정란은 개체발생에 있어 가장 시초점에 해당되는 세포이다. 수정란이 분열과 분화과정을 거쳐 조직으로 변하고 또 조직들이 모여 기관을 형성하고 기관들이 완성됨으로써 하나의 개체 발생이 이루어진다는 점에서 보면 난자 수정란 및 초기 착상 전 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel은 나중에 근육세포, 신경세포 등의  $Ca^{2+}$ -channel로 발전되어간다.

이런 점에서 보면 본 교실에서의  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 연구는 포유동물의 하나의 개체 발생에 앞서 그 시발점에서부터 시작되어 착상 전 배에 이르기까지 각종  $Ca^{2+}$ -channel에 대한 연구가 체계적으로 수행되었고 증명되었다는 점에서 세계의 어느 연구 그룹보다도 앞서가고 있으며 이를 체계화시켜가고자 하는 뚜렷한 목표를

갖고 연구 수행을 하고있다는 점에서 자부심을 갖고 있다.

이와 같은 기초연구가 토대가 되어 응용연구로 발전할 수가 있다. 본 교실에서는  $Ca^{2+}$ -channel 외에 세포에서  $Ca^{2+}$  대사에 관한 연구를 오래 전부터 하고 있다. 이런 점에서 본 연구는  $Ca^{2+}$  대사 연구와 함께 기초과학의 토대를 닦는데 일익을 분명히 하고 있으며 앞으로 관련분야에서도 많은 정보 제공이 될 것으로 확신한다.

그러나, 3차년도까지의 결과에서 3가지 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel과  $Ca^{2+}$ -leak channel에 관한 동정이 이루어졌다. 그러나 이들  $Ca^{2+}$ -channel 외에도 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channel도 T-type, R-type 등이 있으며 또 ligand receptor channel과  $Ca^{2+}$ -leak channel 등도 3가지 type이 있다고 알려져 있으나 이들 channel이 포유동물의 난자에서는 아직 연구하지 않고 있어 이들에 대한 연구도 분명히 밝혀져야 한다.

이런 점에서 아직도 밝혀야 할  $Ca^{2+}$ -channel 연구가 많다.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구는 포유동물의 난자 및 수정란에서부터 착상 전 배에 이르기까지의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정에 관한 연구이다. 앞서에서 밝힌 것처럼 본 연구는 처음으로 포유동물의 난자 및 배에서의  $Ca^{2+}$ -channel의 동정과 분포변화에 대한 연구이므로 우선 기초과학의 토대가 된다. 즉, 모든 교과서에서도 인용되어야하고 또 타 분야의 각종 동물에 대한 연구에서도 많은 인용이 되리라고 예상된다.

난자나 수정란은 개체 발생과정에서 시초의 세포이므로 모든 조직과 기관을 이루는 세포들이 여기서부터 출발하는 관계로 난자와 수정란에서의  $Ca^{2+}$ -channel 연구는 시초점의 세포에서의 연구이기 때문에 세포분화에서 조직분화로 이어질 때 각종 세포의  $Ca^{2+}$ -channel의 추적의 근본이 된다는 점에서 아주 꼭 이루어져야하는 연구 중의 하나이다.

① 세포에서의  $Ca^{2+}$  대사와 연관되어서는 최근 animal cloning에서 발전하여 나아가 human cloning에 대한 여론이 높다. human cloning을 해서는 안 된다는 그런 여론-이것은 어디까지나 종교적 측면과 윤리적 측면에서의 반대이지만 human cloning을 과학적 측면에서는 오히려 조장하는 여론이 높다. 아무튼, cloning 과정에서 가장 중요한 부분은 이식해야 할 핵의 상태가  $G_0$  상태에 있는 핵을 이식해야 하는데 세포 분열 후 바로 분열된 세포를  $Ca^{2+}$ 이 전혀 없는  $Ca^{2+}$ -free 배양액에다 incubation시킨 상태로 유지되어야 하거나 모든  $Ca^{2+}$ -channel inhibitor를 처리하여  $Ca^{2+}$  influx가 전혀 일어나지 않는 상태에서 유지되어야 한다. 만약  $G_1$  상태로 발전한 세포의 핵은 S 시기에 DNA 복제가 일어나기 때문에  $G_1$  상태로 들어간 핵을 사용해서는 안 된다. 이와 같이 동물의 cloning이나 human cloning시에 반드시 이식될 핵을  $G_0$  상태로 유지케 하는 데는  $Ca^{2+}$ -free 용액에서 유지된 세포를 사용한다. 즉, cloning 과정에 이용되고 있다.

② 두 번째는 암세포의 분열은 한 마디로 무한정으로 분열하고 있다. 암세포 분열도  $Ca^{2+}$ -free 배양액에서는 절대로 세포분열이 일어나지 않는다. 그러나 암세포의  $Ca^{2+}$  요구는 보통 정상 세포의 1/10 정도이다. 정상적인 세포의 배양액  $Ca^{2+}$  농도는 대체로 1.71mM 상태이면 되지만 암세포 종류에 따른 특성도 있어  $Ca^{2+}$ -free 상태로 만들어 주는 것이 가장 안전하다. 암세포의 번식을 방지하기 위해서는 암세포 자체에 혈액을 통한 영양공급통로를 막으면서  $Ca^{2+}$ 이 암세포에 들어가지 못하도록 하는 device만 고안한다면 얼마든지 암세포의 번식을 막을 수 있고 또  $Ca^{2+}$ -free 상태에서는 어떤 동물세포이건 간에 이들 세포는 반드시 퇴화(degeneration)되므로 암의 퇴치현상이 일어나 암을 치료 할 수 있게 된다.

이와 같은  $Ca^{2+}$  ion의 세포분열에서의 역할은  $Ca^{2+}$  자체가 세포내 대사에 관련하고 있는 거의 모든 효소의 activator 역할을 하고 있는데서 기인한다. 간단히 말하면 세포에서  $Ca^{2+}$ 을 전부 없애버리면 세포는 1-2시간 안에 퇴화하기 시작하고 결국 한 개체의 생명도 끊어지게 된다. 왜냐하면  $Ca^{2+}$ 이 없으면 거의 모든 효소가 활성화되

지 않아 거의 모든 대사과정이 정지되기 때문이다. 이런 점에서 앞서 지적했듯이  $\text{Ca}^{2+}$  ion이 세포에 얼마나 중요한 요소인지를 쉽게 알 수가 있다.

③ 또한 남녀가 노년기에 들면 골다공증이란 현상 때문에 많은 사람들이 고통을 당하고 있지만 이것 역시 골조직에서  $\text{Ca}^{2+}$ 이 모자라는데서 오는 현상이다. 이것 역시  $\text{Ca}^{2+}$  대사와 밀접한 관계를 갖고 있는 현상 중의 하나이다. 노년기에 소장 상피세포에서의  $\text{Ca}^{2+}$  흡수가 잘 되도록 하는 고안이나 그런 drug을 개발한다면 골다공증 같은 현상은 쉽게 치유할 수가 있다.



## 제 6장 참고문헌

- Bae I-H & Channing CP(1985) Effect of  $Ca^{2+}$  on pig follicular oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.* 33:79-87
- Bae I-H & Park J-H(1987) Studies on the requirements of  $Ca^{2+}$  for cell division and  $Ca^{2+}$  permeability of plasma membrane of fast dividing mouse embryo cells. *Kor. J. Fert. Steril.* 14:93-100
- Bae I-H & Yoon S-Y(1995) The effect of  $Ca^{2+}$  inhibitor on the in vitro 2-cell block of the mouse. *Kor. J. Fert. Steril.* 22:1-10
- Bae I-H, Yoon S-Y, Kim H-K, Y-D Yoon & M-K Kim(1997) Effect of  $Ca^{2+}$  on the blastocoel formation and hatching in the preimplantational mouse embryos. *Suppl. Mol. Biol. Cell.* 8:221a
- Bae I-H, SY Yoon, YD Yoon, MK Kim, and HK Kim(1999) Identification of three types of voltage dependent  $Ca^{2+}$ -channels in mouse follicular oocytes. *Korean J Biol Sci.* 3:53-58
- Barahanin JM, T Barsotto, M Coppola, MM Fosset, C Hosey, D Mourre, J Pauron, G Qua, A Romey, S Schmid, C Vandaele, Van Renterghem & M Lazdunski(1998) Biochemistry, molecular pharmacology and functional control of  $Ca^{2+}$  channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 560:15-26
- Berridge MJ, MD Bootman, P Lipp(1998) Calcium- a life and death signal. *Nature.* 395:645-648
- Blancato JK, Seyler DE (1990) Effect of calcium-modifying drugs on mouse In vitro fertilization and preimplantation Development. *Int J Fert* 35: 171-176
- Clague JR & GA Langer(1994) The pathogenesis of free radical-induced calcium leak in cultured rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 26:11-21
- Clague JR, JA Post & GA Langer(1993) Cationic amphiphiles prevent Calcium leak induced by ATP depletion in myocardial cells. *Cir. Res.* 72:214-218
- Durroux T, N Gallo-Payer, L Bilodeau & MD Poyet(1992) Background

calcium permeable channels in glomerulosa cells from adrenal gland. *J. Membrane Biol.* 129:145-153

Hepler PK (1994) The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 16:322-30.

Kao JP, Alderton JM, Tsien RY, and Steinhardt JRA(1990) Active involvement of  $Ca^{2+}$  in mitotic progression of Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 111:183-196.

Kim HS, and I-H Bae(1994) Effects of  $Ca^{2+}$  inhibitors on compaction of mouse 8-cell embryos. *Kor J Fertil Steril.* 21(1):49-62

Kline D and JT Kline(1992) Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol.* 149:80-89

Kume S, A Muto, J Aruga et al.(1993) The Xenopus  $IP_3$  receptor ; Structure, function and localization in oocytes eggs. *Cell.* 73:555-570

Lefevre B, Pesty A, Testart J(1995) Cytoplasmic and nucleic calcium oscillations in immature mouse oocytes: evidence of wave polarization by confocal imaging. *Exp Cell Res.* 218(1):166-73.

Lotan I, Gigi A, Dascal N(1989) Expression of voltage-dependent Ca channels from skeletal muscle in Xenopus oocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 560:183-4

Lotshaw DP and F Li(1996) Angiotensin II activation of  $Ca^{2+}$ -permeant nonselective calcium channels in rat adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol.* 271(5pt) :C1705-C1715

Marlene HM, FC Channing, CM O'Callahan and J Ptasienski(1989) L-type calcium channels in cardiac and skeletal muscle. *New York Academy Science.* 560:27-38

Mattioli M, Barboni B, Gioia L (1998) Membrane depolarization triggers maturation in meiotically arrested pig oocytes by activating P-type  $Ca^{2+}$ -channels on the oolemma. *J Reprod Fert. abstract series* 21, 27

Moody WJ & JB Lansman(1983) Developmental regulation of  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  currents during hormone-induced maturation of starfish oocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3096-3100

Parys JB, SW Sernett, S Delisle, PM Snyder, MJ Welsh & KP Campbell(1992) Isolation, characterization of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor protein in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267:18776-18782

Powers RD(1982) Changes in mouse oocyte membrane potential and permeability during meiotic maturation. *J. Exp. Zool.* 221:365-371

Stachecki JJ, Yelian FD, Schultz JF, Leach RE, Armant DR. (1994) Blastocyst cavitation is accelerated by ethanol- or ionophore-induced elevation of intracellular calcium. *Biol Reprod.* 50(1):1-9.

Steinhardt RA and Alderton J(1988) Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryos. *Nature* 332:364-366.

Umbach JA and Gundersen CB(1987) Expression of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from *Torpedo* electric lobe. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(15):5464-8.

Yoshida S(1982)  $\text{Na}^+$  &  $\text{Ca}^{2+}$  spike produced by ions passing through calcium channels in mouse ovarian oocytes. *Pflugers Arch* 395: 84-86

Yoshida S(1983) Permeation of divalent and monovalent cations through the ovarian oocyte membrane of the mouse. *J Physiol.* 339:631-42.

Yoshida S(1985) Action potentials dependent on monovalent cations in developing mouse embryos. *Dev Biol* 110: 200-206

Yoshida S(1986) Effects of the calcium channel blocker diltiazem on the excitability of mouse oocytes. *Gamete Reserch* 13: 309-316