

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0055651 (43) 공개일자 2014년05월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/075 (2010.01)	(71) 출원인 충남대학교산학협력단	
(21) 출원번호 10-2012-0122801	대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)	
(22) 출원일자 2012년11월01일	(72) 발명자	
심사청구일자 없음	진동일	
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도	대전광역시 유성구 왕가봉로 23, 1102동 1103호(노은동, 열매마을11단지)	
	장진옥	
	마이크로바이올로지 앤드 이뮤놀로지, 홀잉스 캔서 센터, 86 조나탄 루카스 스트리트, HCC H0609, 차를레스톤, SC 29425, USA	
	(74) 대리인	
	위병갑	

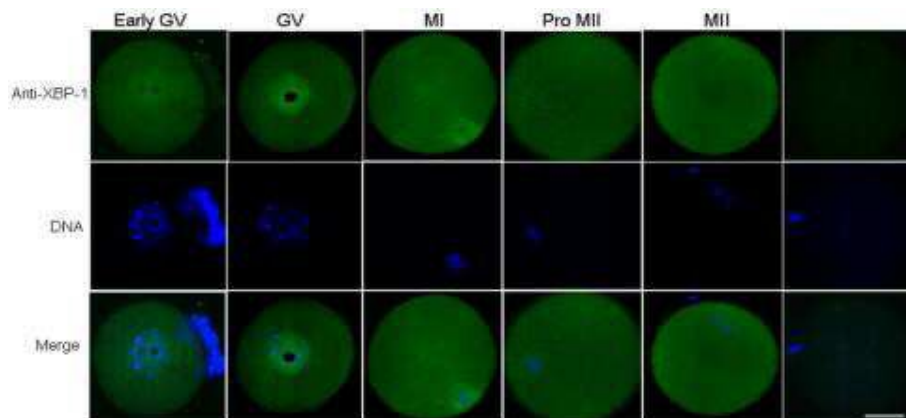
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지 조성물 및 이를 이용한 포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법**

(57) 요약

본 발명은 포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지 조성물 및 이를 이용한 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate)를 포함하는 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지와 이를 이용한 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법에 관한 것이다. 본 발명의 배지 조성물 및 이를 이용한 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법에 의하면, 포유동물의 난모세포를 대상으로 효율적인 난모세포의 성숙화 및 배아 발달을 촉진시킬 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009060

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21 동물신약장기개발사업

연구과제명 바이오장기용 다중 형질전환 세포주 구축 및 새로운 형질전환폐지의 생산과 분석

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2014.12.14

특허청구의 범위

청구항 1

ER 스트레스(ER stress)에 의한 아폽토시스(apoptosis) 저해제를 유효성분으로 함유하는 포유동물의 난모세포(Oocytes) 성숙화 및 배아(embryos) 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 ER 스트레스에 의한 아폽토시스 저해제는 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate)인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 3

ER 스트레스(ER stress)에 의한 아폽토시스(apoptosis)를 저해하는 것을 특징으로 하는 포유동물의 난모세포(Oocytes) 성숙화 및 배아(embryos) 발달 촉진 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

포유동물 난모세포를 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate)가 포함된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 타우로우르소데옥시콜레이트는 배지 중 10~100 μ M의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지 조성물 및 이를 이용한 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate)를 포함하는 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지와 이를 이용한 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 폴딩(folding)되지 않거나, 잘못 폴딩된 단백질들은 소포체(Endoplasmic Reticulum, ER)에 축적되고, Unfolded Protein Response(UPR)를 활성화시켜 세포들을 스트레스에 반응하도록 한다. ER은 세포막 단백질들과 지질 합성의 주요 세포기관이고, 세포 내 칼슘 항상성의 유지에 관여한다. ER 항상성이 동요되거나, 조절 메커니즘에 걸리는 과부하는 지속된 스트레스로 인한 세포의 아폽토시스(apoptosis)를 유도한다. 포유동물에서 이러한 ER 스트레스에 의한 아폽토시스 메커니즘은 잘 알려져 있지는 않지만, EIF2AK3(PERK), ERN1(IRE1 α) 및 ATF6가 ER 스트레스 과정에서 UPR을 활성화시키는 것으로 이해되고 있다.

[0003] 마우스와 인간 체세포에서, X-box-binding protein 1(XBP1)이 UPR 유전자의 발현을 조절하는 주된 activator로서 알려져 있다. 스트레스 상태에서, XBP1 유전자의 전사가 유도되고, 전사체는 endoribonuclease에 의하여 26 리보뉴클레오타드가 제거되는 통상적이지 않은 스플라이싱의 결과로 스플라이싱된 XBP-1(XBP1-s)을 생성한다. 스플라이싱된 XBP-1만이 세포의 핵으로 이동하여 UPR 유전자를 활성화하게 된다. 그러므로, XBP1-s은 *in vivo*와 *in vitro*에서 ER 스트레스를 모니터링하는데 널리 사용되고 있다.

[0004] 한편, 포유동물의 수정란을 성숙화시키는 다양한 시도들이 존재하는데, 이는 보다 효과적인 체외 수정란 이식 방법을 제공하기 위함이다. 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 10-1107329의 "타우로우르소데옥시콜산을 포함하

는 배지 조성물 및 이를 이용한 포유동물 수정란 대량 생산 방법"에서는 체외 수정란 또는 복제 수정란을 타우로우르소데옥시콜산이 첨가된 배지에서 배양하여 수정란의 대량 생산을 가능하게 하는 방법이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1107329

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지 조성물을 제공하고, 상기 배지 조성물을 이용하여 포유동물의 난모세포를 성숙화시키고 배아 발달을 촉진시킬 수 있는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 ER 스트레스(ER stress)에 의한 아포토시스(apoptosis) 저해제를 유효성분으로 함유하는 포유동물의 난모세포(Oocytes) 성숙화 및 배아(embryos) 발달 촉진용 배지 조성물을 제공한다.

[0008] 상기 ER 스트레스에 의한 아포토시스 저해제는 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate)인 것이 바람직하다.

[0009] 또한, 본 발명은 ER 스트레스(ER stress)에 의한 아포토시스(apoptosis)를 저해하는 것을 특징으로 하는 포유동물의 난모세포(Oocytes) 성숙화 및 배아(embryos) 발달 촉진 방법을 제공한다.

[0010] 상기 방법은 포유동물 난모세포를 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate)가 포함된 배지에서 배양하는 것이 바람직하다.

[0011] 상기 타우로우르소데옥시콜레이트는 배지 중 10~100 μ M의 농도로 첨가되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 배지 조성물 및 이를 이용한 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법에 의하면, 포유동물의 난모세포를 대상으로 효율적인 난모세포의 성숙화 및 배아 발달을 촉진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a 및 도 1b는 마우스 난모세포 및 preimplantation embryos에서 내성 XBP-1을 검출한 결과이고,
 도 2a 내지 도 2c는 마우스 preimplantation embryos에서 *XBP-1* 스플라이싱을 검출한 결과이고,
 도 3a 및 도 3b는 마우스 배아 발달에서 스트레스 유도제의 효과를 측정된 결과이고,
 도 4a 내지 도 4d는 1-cell 단계 배아에서 활성 XBP-1의 발현을 측정된 결과이고,
 도 5a 및 도 5b는 스트레스 유도제의 XBP-1의 분포의 농도 의존성을 확인한 결과이고,
 도 6a 및 도 6b는 마우스 blastocyst에서 아포토시스에 대한 TUDCA의 효과를 확인한 결과이고,
 도 7a 내지 도 7d는 돼지 시스템에서 ER 스트레스 신호를 검출한 결과를 나타낸 것이고,
 도 8은 돼지 난모세포 및 preimplantation embryos에서 *XBP-1* mRNA의 발현 양상을 나타낸 사진이고,
 도 9a 내지 도 9c는 돼지 난모세포의 성숙화에 TUDCA가 미치는 영향을 보여주는 결과이고,
 도 10a 내지 도 10d는 돼지 blastocyst의 quality에 대한 TUDCA의 효과를 나타내는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0015] 본 발명의 발명자들은 포유동물의 난모세포를 이용하여 체외에서 대량으로 난모세포를 성숙화시키고, 배아 발달을 촉진시킬 수 있는 방법을 개발하고자 연구를 거듭한 결과, 세포의 ER 스트레스에 의한 아폽토시스 저해제를 배지에 첨가함으로써 세포의 ER 스트레스에 의한 아폽토시스를 저해하여 난모세포의 성숙화 및 배아 발달 촉진을 유도할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 따라서, 본 발명은 ER 스트레스(ER stress)에 의한 아폽토시스(apoptosis) 저해제를 유효성분으로 함유하는 포유동물의 난모세포(Oocytes) 성숙화 및 배아(embryos) 발달 촉진용 배지 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 ER 스트레스는 세포 내 UPR에 의하여 야기되는 것으로서 아폽토시스로 이어지는 일련의 과정에서 중요한 역할을 담당한다.
- [0018] 상기 ER 스트레스에 의한 아폽토시스 저해제는 다음의 화학식 1로 표시되는 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate, TUDCA)이다.
- [0019] <화학식 1>
- CC(C)CC(=O)NCCS(=O)(=O)O.C1[C@H](O)[C@H](C)[C@@H](O)[C@H]2[C@@H]1CC[C@@H](C2)C · 2H₂O
- [0020]
- [0021] 타우로우르소데옥시콜레이트는 담즙산의 일종으로 우루소데옥시콜린산의 유사체로서 간경변의 치료에 주로 이용되고 있다. 본 발명의 포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달을 촉진시키기 위한 배지 성분에는 포함되는 타우로우르소데옥시콜레이트는 포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진에 동등한 효과를 나타내는 한 상기 화학식 1로 표시되는 타우로우르소데옥시콜레이트뿐만 아니라 이의 유도체들도 포함될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진을 위한 배지 조성물에 포함되는 타우로우르소데옥시콜레이트는 10~100 μM의 농도로 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0023] 상기 포유동물 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지는 통상적인 포유동물의 생식세포의 배양에 이용되는 기본 배지에 본 발명의 타우로우르소데옥시콜레이트를 첨가하여 사용할 수 있으며, 상기 기본 배지는 무기염류, 탄소원, 아미노산, 우 혈청 알부민, 기타 보조인자 등을 기본적으로 함유하는 배지로서 당업자에게 알려진 일반적인 배지들을 사용하는 것이 가능하다. 상업적으로 구입할 수 있는 배지로서는 예를 들어 NCSU-23 또는 PZM-3이다.
- [0024] 본 발명에서 "포유동물"이라 함은 인간을 제외한 돼지, 소, 염소, 양, 마우스를 포함할 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 "난모세포(Oocytes)"는 포유동물의 난자 형성 과정 중 난소 내에서 분열 증식을 정지하고 성장기에 들어간 세포를 의미한다.
- [0026] 본 발명의 "성숙(maturation)"이라 함은 난모세포가 정자와 수정이 가능할 정도로 자란 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 "배아(embryos)"라 함은 성숙한 난모세포와 정자가 수정하여 발달된 수정란을 말한다.
- [0028] 본 발명의 "발달(development)"이라 함은 수정란이 개체로서 성숙되어 가는 과정을 말한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 ER 스트레스(ER stress)에 의한 아폽토시스(apoptosis)를 저해하는 것을 특징으로 하는 포유동물의 난모세포(Oocytes) 성숙화 및 배아(embryos) 발달 촉진 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 방법은 포유동물 난모세포를 타우로우르소데옥시콜레이트(tauroursodeoxycholate)가 포함된 배지에서 배양

하는 것이 바람직하다.

[0031] 상기 타우로우르소테옥시콜레이트는 배지 중 10~100 μ M의 농도로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0032] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0033] [실시예]

[0034] 본 실시예에서 사용된 모든 chemicals은 다른 기재가 없는 한 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 또한, 본 실시예에서 사용된 모든 동물 실험은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 시행되었다. 또한, 본 실시예에 사용된 모든 데이터는 one-way ANOVA 및 Statistical Analysis System(SAS, Cary, NC)의 general linear models을 포함하는 Fisher's protected least significant difference(LSD)를 사용하여 분석하였다. 편차는 <0.05이다.

[0035] 실시예 1

[0036] 1. 재료 및 방법

[0037] 마우스 난모세포 및 배아의 준비

[0038] vesicle stage의 난모세포를 ICR 암컷 마우스(Charles River)로부터 cumulus-oocyte complexes(COCs)로서 분리하였다. 5~7주령 암컷 마우스에 5IU PMSG를 주사하여 과배란을 유도하고, 48시간 후 희생시켰다. 난소를 FHM 배지(Millipore)로 수거하였다. COCs를 기계적으로 제거시키고, 난모세포를 0.1%(w/v) hyaluronidase를 함유하는 FHM 배지에서 피펫팅하여 세척하였다. germinal vesicle을 포함하는 난모세포를 수거하였다. 성숙한 MII 난모세포는 PMSG 주사하고, 44시간 후 5IU hCG COCs를 주사한 후 COCs로 수거하였다. hCG 주사 18시간 후 마우스를 희생시켰다. COCs를 FHM에서 나팔관으로부터 제거하고 hyaluronidase를 사용하여 난모세포를 수거하였다. zygotes와 embryos를 얻기 위하여, 암컷 쥐에 hCG를 주사하고, 수컷과 교배시킨 후, one-cell, two-cell, four-cell, eight-cell embryos, morulae, blastocysts를 각각 얻기 위하여 18, 44, 64, 72 88 및 96h phCG에 희생시켰다.

[0039] 배아의 in vitro culture와 TUDCA treatment

[0040] 배아 발달에 대한 TM(tunicamycin), sorbitol 및 TUDCA의 효과를 확인하기 위하여, two-cell stage 배아를 44h phCG에서 수거하고, TM, sorbitol 또는 TUDCA의 존재 또는 부재하에서 배양하였다. 요구되는 drug 농도는 M16에 stock solution으로 희석하여 사용하였다. 25~30개의 배아들을 40 μ L droplets의 culture medium에 두고, 미네랄 오일을 덮고, 37°C, 5%(v/v) CO₂ 하에서 배양하였다.

[0041] RT-PCR

[0042] 유전자 발현을 분석하기 위하여, 다양한 단계의 성숙 난모세포 및 초기 배아 단계를 수거하였다. total RNA를 RNeasy Mini Kits(Qiagen, Valencia, CA, USA)로 제조사의 지시에 따라 추출하였다. 역전사 반응을 위하여, 최종 20 μ L 부피의 total RNA(0.5mg oligo-dT, 1 $\times$ RT buffer, 10mM dithiothreitol, 10mM dNTPs)를 37°C에서 50분, 70°C에서 15분 동안 역전사 반응시키고, 결과물을 4°C에 보관하였다. 각 RT-PCT 반응물은 4 μ L cDNA, 10pm/ μ L의 forward primer 및 reverse primer이었다(표 1). 3회 반복적으로 수행하였으며, 각 샘플의 mRNA 농도를 β -actin mRNA로 측정하였다.

표 1

[0043]

gene	primer	sequence	Accession No.	Annealing (°C)	Product size (bp)
XBP-1	Foward	actcggctctggaaatctg	AF027963	60	279
	Reverse	tagccaggaacgtctac			
beta-actin	Foward	atatcgctgcgctggtcgtc	NM007393	60	517
	Reverse	aggatggcgtgagggagagc			

[0044] **Immunofluorescence Analysis**

[0045] 여러 단계의 마우스 배아를 실온에서 30분 동안 4%(v/v) paraformaldehyde에서 고정시키고, 0.1%(v/v) Triton-100을 30분 동안 침투시켰다. 난모세포와 배아를 4℃에서 3%(w/v) BSA를 포함하는 PBS에 오버나이트로 블로킹시키고, blocking solution으로 희석된 rabbit polyclonal anti-XBP-1 antibody(Santa Cruz Biochemicals, Santa Cruz, CA, USA)로 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 0.5%(v/v) Tween-20을 포함하는 PBS로 세척한 후, 샘플을 blocking solution에 용해된 anti-rabbit FITC-conjugated secondary antibody로 37℃에서 60분 동안 반응시켰다. 다음으로, 다양한 발달 단계의 샘플들을 DAPI를 포함하는 VECTASHIELD Mounting Medium을 사용하여 마운팅시켰다. 영상은 Zeiss scanning laser confocal microscope를 사용하여 얻었으며, LSM Image Browser를 사용하여 분석하였다. 최소 20 난모세포 또는 배아를 매 단계마다 측정하였다.

[0046] **Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling(TUNEL) Assay**

[0047] Blastocyst를 폴리비닐피롤리돈(PVP; 1mg/mL)를 포함하는 PBS(pH 7.4)에 세번 세척하고, 4%(v/v) paraformaldehyde를 함유하는 PBS로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정 후, parthenotes를 PVA-PBS로 세척하고, 0.3%(v/v) Triton-X100으로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하여 침투시켰다. 배아를 PVA-PBS로 두 번 세척하고, fluorescein-conjugated dUTP 및 terminal deoxynucleotidyl transferase(*in situ* Cell Death Detection Kit; Roche, Mannheim, Germany)로 암실 조건에서 실온으로 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 전체 핵을 표지하기 위하여 40 µg/mL propidium iodide(PI) 및 50 µg/mL RNaseA를 37℃에서 1시간 동안 countstaining 한 후, 배아를 얇은 커버슬립에 마운팅시키고, confocal microscope로 관찰하였다.

[0048] **Western Blotting**

[0049] 다양한 단계의 마우스 배아(샘플당 n=100)을 PVA-PBS로 3회 세척하고, extraction buffer(PRO-PREP; Intron Biotechnology, Seong, Korea)로 재현탁시켰다. 추출된 단백질을 10%(w/v) SDS-PAGE에서 Bio-Rad apparatus(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 분리하고, Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell을 사용하여 membrane으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 5%(w/v) skimmed milk와 0.5%(v/v) Tween-20을 포함하는 Tris-buffer saline으로 블로킹시키고, 5%(w/v) non-fat dry milk powder와 0.1%(v/v) Tween-20를 포함하는 Tris buffered saline에 용해된 XBP-1와 β-actin(Santa Cruz Biochemicals)에 대한 primary antibody에 15분 동안 노출시키고, 항원-항체 복합체를 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG peroxidase conjugates로 ECL detection kit(AmershamBioscience, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 검출하였다. 모든 실험은 3번 반복되었다.

[0050] **2. 결 과**

[0051] **마우스 난모세포 및 preimplantation embryos에서의 XBP-1의 발현 위치**

[0052] GV, two-cell, four-cell, eight-cell, morula 및 blastocyst 단계에서의 마우스 XBP-1은 대부분이 핵에 존재하며, 일부가 세포질에 존재함을 확인하였다(도 1b). 반대로, one-cell 단계에서의 마우스 XBP-1은 주로 세포질에 존재함을 확인하였다(도 1a). 감수분열 단계에서, XBP-1은 metaphase I에서 spindle microtubules에 위치하나, pro-metaphase II와 metaphase II로 진행할수록 spindle microtubules에서의 신호 강도는 약화되었다(도 1a).

[0053] **초기 단계 배아에서 마우스 XBP-1 mRNA 스플라이싱의 특징**

[0054] RT-PCR 분석에서는 two-cell, four-cell, morula 및 blastocyst 단계에서 스스플라이싱된 *XBP-1s* 및 스플라이싱되지 않은 *XBP-1u* mRNA가 모두 검출되었으나, one-cell 단계에서는 *XBP-1u* mRNA만이 검출되었다.(도 2a). Western Bolt 분석에서도 위와 일치되는 결과를 얻을 수 있었다(도 2 b). 이러한 결과는 마우스 preimplantion embryos의 발달에 XBP-1이 중요한 역할을 담당하는 것으로 예측할 수 있다.

[0055] 마우스 배아 발달에서 배양 스트레스의 효과

[0056] one-cell 배아를 2 μ g/mL TM 또는 25mM sorbitol로 처리한 결과, blastocyst 발달 속도가 현저히 감소함을 확인하였다(도 3). 그러나, TM 또는 sorbitol의 부재하에서 two-cell 단계 배아의 약 80%가 60시간 후 blastocyst로 발달함을 확인하였다. 그러나, 5 μ g/mL TM 또는 50mM sorbitol 이상을 처리한 배아의 경우 two-cell 단계에서 발달을 멈추었으며, blastocyst로 진행하지 않았다. 이러한 결과는 지속된 배양 스트레스는 배아를 Two-cell 단계에서 정지시킬 수 있음을 암시한다.

[0057] 스트레스 유도제에 의한 one-cell 단계 배아에서의 active XBP-1의 유도

[0058] 배양 스트레스와 ER 스트레스의 관계를 확인하기 위하여, one-cell 단계 마우스 배아를 TM 또는 sorbitol의 존재 또는 부재하에 배양하였다. RT-PCR 결과 정상적인 one-cell 배아에서는 스플라이싱된 *XBP-1*이 확인되지 않았지만, 1 μ g/mL TM 또는 25mM sorbitol로 처리한 one-cell 배아의 경우 스플라이싱된 *XBP-1*이 확인되었다(도 4a). 이러한 결과는 western blot 분석에서도 동일하였다(도 4c). 추가적으로, immunostaining 분석 결과, TM 또는 sorbitol 처리되지 않은 정상 one-cell 배아의 경우 세포질에서만 XBP-1 단백질이 확인되었으나, 1 μ g/mL TM 또는 25mM sorbitol이 처리된 one-cell 배아의 경우 세포질과 핵 양쪽에서 XBP-1 단백질이 확인되었다(도 4b). 이러한 결과로부터, 초기 단계 배아에서 ER 스트레스 유도는 1 μ g/mL TM 또는 25mM sorbitol 농도인 것이 최적임을 알 수 있다.

[0059] 스트레스 유도된 Two-cell 단계 배아에서 XBP-1 단백질의 영향

[0060] TM 및 sorbitol과 같은 스트레스 유도제의 부재 하에서, two-cell 단계 배아는 세포질에 약간의 신호가 감지된 것을 제외하고는 핵에서는 XBP-1이 확인되지 않았다(도 5a). 또한, 고농도의 스트레스 유도제와 TUDCA를 함께 처리하였을 경우, two-cell 단계 배아의 XBP-1은 핵으로 재배치되었다. 이러한 결과는 western blot 분석에서도 동일하였다(도 5b). 이러한 결과를 종합할 때, 핵에 존재하는 XBP-1만이 기능성임을 예측할 수 있다.

[0061] 마우스 배아 발달에서 TUDCA의 효과

[0062] TUDCA가 ER 스트레스로 유도되는 아폽토시스를 저해할 수 있는지를 확인하기 위하여, one-cell 배아를 스트레스 유도제로 처리한 대조군과 스트레스 유도제와 TUDCA를 함께 처리한 실험군으로 나누어 blastocyst로의 발달을 관찰하고 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 표 2에 나타난 바와 같이, TUDCA는 blastocyst로의 발달 속도뿐만 아니라 발달되는 개체 수에 있어서도 현저한 증가가 있음을 확인할 수 있었다.

표 2

[0063]

군	oocyte의 수	cleavage(%)	Blastocyst(%)	total nuclei의 수
control	201	87.1 $\pm$ 2.4	81.1 $\pm$ 0.7	104.3 $\pm$ 2.1
TM	197	88.4 $\pm$ 1.4	43.7 $\pm$ 3.2	95.7 $\pm$ 1.5
Sorbitol	197	86.3 $\pm$ 1.3	20.0 $\pm$ 1.4	91.3 $\pm$ 1.2
TUDCA	198	94.9 $\pm$ 1.8	95.8 $\pm$ 0.8	119.3 $\pm$ 1.2
TM+TUDCA	192	87.0 $\pm$ 0.6	80.3 $\pm$ 1.5	101.3 $\pm$ 0.6
sorbitol+TUDCA	195	88.7 $\pm$ 0.8	79.8 $\pm$ 2.6	103.0 $\pm$ 1.0

[0064] blastocyst에서 스트레스 유도제에 의한 아폽토시스 유도 효과

[0065] 1 μ g/mL TM 또는 25mM sorbitol이 처리된 blastocyst의 경우 apoptosis가 현저히 확인되지는 않았다. 그러나, 5 μ g/mL TM 또는 50mM sorbitol이 처리된 blastocyst의 경우 DNA fragmentation이 현저히 증가함으로 확인하였고, TUDCA를 함께 처리한 경우에는 blastocyst의 apoptosis가 현저히 감소함을 확인하였다(도 6). 이러한 결과로부터 TUDCA는 마우스 배아 발달에서 ER 스트레스로 유도되는 아폽토시스를 약화시킴을 예측할 수 있다.

[0066] 실시예 2

[0067] 1. 재료 및 방법

[0068] 세포 배양 및 ER 스트레스 조건

[0069] 돼지 태아(임신 25~26일)로부터 유래된 Porcine embryo fibroblast(PEF) cells을 10%(v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 1%(w/v) nonessential amino acids(NEAA), 및 0.1%(w/v) gentamicin을 함유하는 Dulbecco modified Eagle medium에서 배양하였다. PFE cell을 5%(v/v) CO₂ 및 37℃의 습윤한 조건에 두었다. ER 스트레스를 유도하기 위하여, six well dish에 시딩된 PEF cell을 TM(dimethyl sulfoxide 내에 2 µg/mL)으로 처리하고, 6시간 후에 수거하였다.

[0070] 돼지 난모세포의 in vitro maturation

[0071] 도축장에서 도축된 100~130kg의 암돼지의 난소를 수거하고, 75 µg/ml potassium penicillin G 및 50mg/ml streptomycin sulfate를 포함하는 0.9% (w/v) saline에 담근 후 37℃로 유지한 채 3시간 이내에 실험실로 옮겼다. follicle로부터 18-게이지 바늘을 통하여 aspiration시켜 cumulus-oocyte 복합체를 수거하고, 10ml syringe에 두었다. TL-HEPES medium (HEPES-buffered Tyrode lactate; Sigma)으로 3회 세척하고, 4웰 멀티디쉬를 이용하여 5%(v/v) CO₂ 및 38.5℃의 조건으로 IVM 배지에서 난모세포를 성숙화시켰다. 난모세포 성숙화에 사용된 배지는 10%(v/v) follicular fluid, 0.57mM cysteine, 10ng/ml β-mercaptoethanol, 10ng/ml epidermal growth factor, 10IU/ml equine chorionic gonadotropin(eCG), 및 10IU/ml human chorionic gonadotropin(hCG)을 포함하는 NCSU-23이었다. 22시간 배양한 후, 난모세포를 상기 배지로 즉시 3회 세척하고, 상기 호르몬의 부재하에 상기 배지로 22시간 동안 추가 배양하였다.

[0072] Parthenogenic activation

[0073] in vitro maturation 후, 0.1%(w/v) polyvinyl alcohol(PVA) 및 0.3%(w/v) hyaluronidase를 포함하는 TL-HEPES에서 반복적인 피켓팅으로 cumulus cells을 제거하였다. 난모세포를 0.3M D-mannitol, 0.1mM MgSO₄, 0.05mM CaCl₂, 및 0.01%(w/v) PVA을 포함하는 활성화 용액에 적용시켰다. 상기 난모세포를 ECM 2001 Electro Cell Manipulator(BTX)를 사용하여 30 µs 동안 15kV/cm의 직류펄스로 자극하였다. 활성화 후, 난모세포를 배양 배지로 즉시 3회 세척하고, 50 µL의 배양 배지로 옮긴 후, 60cm 직경 디쉬에서 미네랄 오일로 덮었다. 배양은 38.5℃, 5%(v/v) CO₂의 조건에서 7일 동안 진행되었다. in vitro culture(IVC) 배지는 Porcine Zygote Medium-3(PZM-3)를 사용하였다.

[0074] RT-PCR

[0075] 아폭토시스와 관련된 유전자들을 분석하기 위하여, 다양한 단계의 성숙 난모세포 및 초기 단계의 배아를 선별하였다. 이후 과정은 다음의 표 3의 프라이머 세트를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다.

표 3

[0076]

gene	primer	seq.	Accession No.	Annealing Tm (°C)	product size (bp)
XBP1	Foward	aacgatcaagcagtgactattcg	AF07449	60	263
	Reverse	gagtacagggtggtgaagtgagg			
BAX	Foward	acacctcatagccatgaaac	YA55048	56	232
	Reverse	atggctgacatcaagatacc			
BCL2	Foward	agagctttgagcaggtattg	NM214285	56	253
	Reverse	gcattgtttccgtagagttc			
TP53	Foward	cctcacatcatcacactgg	AF098067	60	279

ACTB	Reverse	agctctcgggaacatctcgaa	U07786	55	326
	Foward	ggtaaggctgggaaggactc			
	Reverse	cggtaggtactccaggatg			

[0077] **Immunofluorescence**

[0078] Germinal Vesicle(GV), GV breakdown(GVBD), metaphase I(MI), metaphase II(MII) 난모세포를 각각 0, 6, 22 및 44시간에 수거하고 성숙화 배지로 옮겼다. 추가적으로, 1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula 및 blastocyst 배아를 성숙된 난모세포의 활성화 후 10, 36, 72, 96 및 144시간 후 각각 얻었다. 이후의 단계들은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0079] **Dual Differential staining**

[0080] blastocyst(6일차)의 ICM과 trophectoderm의 differential staining은 Machaty Z. et. al., Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. Biol Reprod 1998; 59; 451-455의 방법에 따라 진행하였다.

[0081] **TUNEL Assay**

[0082] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 진행하였다.

[0083] **활성 산소종의 측정**

[0084] 성숙한 난모세포를 10mM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCHFDA)의 존재하에 39℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, TCM-199 배지로 즉시 3회 세척한 후, 450~490nm의 파장을 이용하여 epifluorescence microscopy(Olympus)로 DCHFDA로부터의 세포내 형광을 검출하고, 515~565nm에서 발광을 모니터링하였다. 현미경에 부착된 디지털카메라(Nikon)로 영상을 얻고, 형광 난모세포의 mean gray value를 ImageJ software(National Institutes of Health)로 측정하였다. 실험은 20~25 난모세포를 사용하여 3회 반복하였다.

[0085] **Western blot 분석**

[0086] metaphase I(MI), metaphase II(MII) 난모세포 및 blastocyst(샘플당 n=50)을 PVA-PBS로 3회 세척하고, extraction buffer(PRO-PREP; Intron Biotechnology, Seong, Korea)로 재현탁시켰다. 추출된 단백질을 10%(w/v) SDS-PAGE에서 Bio-Rad apparatus(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 분리하고, Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell을 사용하여 membrane으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 5%(w/v) skimmed milk와 0.5%(v/v) Tween-20을 포함하는 Tris-buffer saline으로 블로킹시키고, 5%(w/v) non-fat dry milk powder와 0.1%(v/v) Tween-20을 포함하는 Tris buffered saline에 용해된 rabbit polyclonal anti-MAPK3/1(ERK1/2), mouse monoclonal anti-phospho MAPK3/1(ERK1/2), 또는 mouse monoclonal anti-caspase-3(Santa Cruz Biochemicals) primary antibody에 노출시키고, 0.5%(v/v) Tween-20을 함유하는 Tris-buffered saline으로 15분 동안 세척한 후, 항원-항체 복합체를 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG peroxidase conjugates로 ECL detection kit(AmershamBioscience, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 검출하였다. 모든 실험은 3번 반복되었다. 대조군으로서 β -actin을 사용하였다.

[0087] **2. 결 과**

[0088] **돼지 난모세포 및 preimplantation embryos에서 XBP-1의 분포**

[0089] PEF 세포를 TM으로 6시간 동안 처리한 결과, XBP-1은 핵과 세포질에 모두 분포하였다(도 7a). western blot 분석에 따르면, PEF 세포를 TM으로 6시간 동안 처리한 결과 XBP-1s은 크게 증가하였으며, XBP-1u은 변화가 없었으며, 이러한 결과는 immunostaining 분석 결과와 일치한다(도 7b). PEF 세포를 TM과 TUDCA로 동시에 처리하였을 경우, TM에 의하여 증가된 XBP-1 단백질의 발현 정도가 감소하였다.

[0090] XBP-1 특이적 항체를 사용하여 성숙한 난모세포와 초기 단계 배아의 XBP-1의 세포내 분포를 확인한 결과, GV, 4-cell, morula, blastocyst에서는 주로 핵에 존재함을 확인하였고, metaphase I(MI), metaphase II(MII), 1-cell, 2-cell, 8-cell 단계에서는 세포질에 주로 존재함을 확인하였다(도 7c). 추가적으로, 4-cell에서는 TM에 의하여 XBP-1의 핵에서의 발현이 현저하였다(도 7D).

[0091] 난모세포와 초기 단계 배아에서 돼지 XBP-1 mRNA 스플라이싱의 특징

[0092] PEF 세포를 TM으로 6시간 처리한 후, XBP-1s와 XBP-1u의 발현 수준을 RT-PCR로 확인하였다(도 8의 A). 그 결과, GV, 4-cell, morula, blastocyst 단계에서는 XBP-1s와 XBP-1u가 모두 확인되었으나, MI, MII, 1-cell, 2-cell 단계에서는 XBP-1u만이 확인되었다(도 8의 B).

[0093] in vitro 돼지 배아 발달에서 TUDCA의 효과

[0094] 난모세포의 발달을 촉진시키기 위한 PZM-3 배지에서의 TUDCA의 농도를 확인하였다. 표 4에 나타난 바와 같이, TUDCA를 첨가한 경우 난모세포의 분열이 증가함을 확인하였다. 추가적으로, TUDCA의 존재하에서 배아의 blastocyst 단계로의 발달은 대조군에 비하여 현저히 증가됨을 확인할 수 있다.

표 4

군	oocytes(n)	cleavage rate(%)	Blastocyst rate(%)	nuclei(n)		
				ICM	Troph-ectoderm	total
control	96	81.2±0.4	25.1±1.5	5.3±0.6	26.7±0.6	32.0±1.0
10uM	101	82.2±0.3	26.7±4.2	6.0±0.0	26.3±0.6	32.3±0.6
50uM	95	90.5±1.3	32.6±1.0	10.7±0.6	31.0±0.0	41.7±0.6
100uM	92	77.2±0.8	22.8±0.8	5.0±1.0	25.7±0.6	30.7±1.5

[0096] MAPK pathway를 통한 난모세포의 성숙화에 TUDCA의 효과

[0097] 50 μM TUDCA가 첨가된 TCM-199 배지에서 배양된 난모세포의 GVBD, MI, MII 단계로의 성숙화는 대조군에 비하여 현저히 증가되었다(표 5).

표 5

시간	군	oocytes(n)	oocyte maturation rate(%)			
			GV	GVBD	M I	M II
22hr	control	205	17.6±1.5	27.3±1.4	37.6±0.8	17.5±1.3
	TUDCA	196	5.6±1.9	28.1±1.1	48.5±1.3	17.8±2.0
44hr	control	210	6.2±1.0	14.3±1.1	15.2±0.2	64.3±2.0
	TUDCA	203	2.9±1.0	5.9±1.5	14.8±0.9	76.4±3.2

[0099] 활성산소종(ROS)의 농도와 MAPK pathway 활성화는 난모세포의 성숙화에 영향을 주었다. 50 μM TUDCA의 존재하에 배양된 난모세포에서의 ROS 농도는 대조군에 비하여 현저히 감소되었다(도 9a). western blot 분석의 결과, TUDCA의 존재하에 배양된 MI 난모세포에서의 pMAPK3/1(ERK1/2) 단백질의 발현은 대조군에 비하여 현저히 증가하였다. 그러나, TUDCA의 존재하에 배양된 MII 난모세포에서의 pMAPK3/1(ERK1/2) 단백질의 발현에는 큰 변화가 없었다(도 9b 및 도 9c).

[0100] in vitro에서 TUDCA에 의한 돼지 blastocyst의 quality 평가

[0101] TUDCA의 존재하에 배양된 돼지 blastocyst의 quality를 TM을 첨가하여 배양한 대조군과 비교하였다(표 6).

표 6

군	oocytes(n)	cleavage rate(%)	Blastocyst rate(%)	nuclei(n)		
				ICM	Troph-ectoderm	total
control	201	79.6±1.2	24.9±0.7	5.5±0.6	27.5±1.3	33.0±0.8
TM	215	47.4±0.9	13.0±1.5	2.3±1.0	21.0±0.8	23.3±1.3
TM+TUDCA	211	78.7±1.2	24.2±1.9	5.3±1.0	26.8±1.0	32.1±1.8
TUDCA	204	87.3±2.2	32.9±2.8	10.8±1.0	32.5±1.9	43.3±1.3

표 6에 나타난 바와 같이, TUDCA를 처리한 경우, 난모세포의 분열 속도, blastocyst로의 발달율, 총 핵의 숫자 등에서 TM 처리 군에 비하여 현저히 증가됨을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 아포토시스의 수준은 blastocyst의 quality를 반영한다고 예측할 수 있다. TUNEL assay는 TUDCA 처리 군이 대조군에 비하여 DNA fragmentation이 현저히 감소됨을 보여준다(도 10a 및 도 10b).

TUDCA의 돼지 blastocyst의 아포토시스 효과

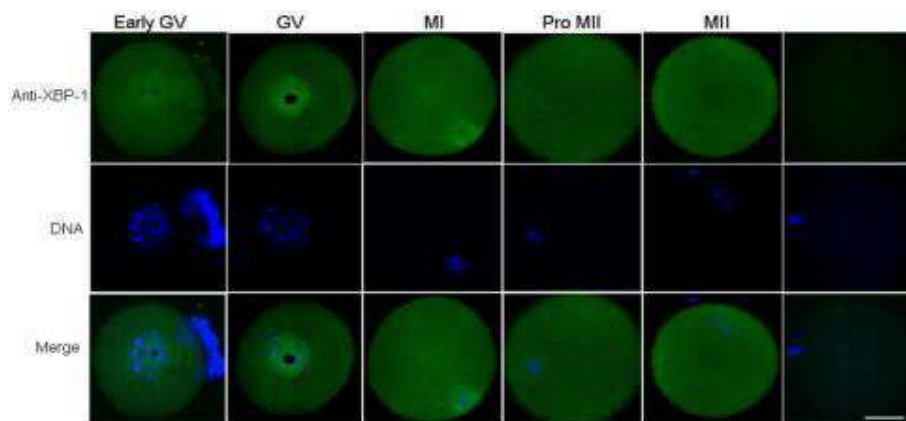
TUDCA의 존재 또는 부재 하에서 배양된 blastocyst의 proapoptotic gene의 발현량을 wuantitative PCR로 확인하였다. BCL2L1 mRNA의 발현은 대조군에 비하여 증가하였으나, BAX 및 TP53은 감소하였다(도 10c).

western blot 분석의 결과는 TUDCA로 처리된 blastocyst에서 caspasse-3의 발현이 대조군에 비하여 현저히 낮음을 확인할 수 있다(도 10d).

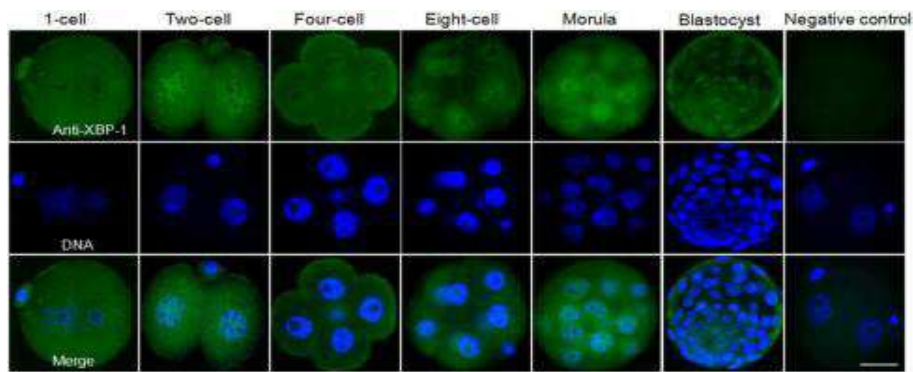
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

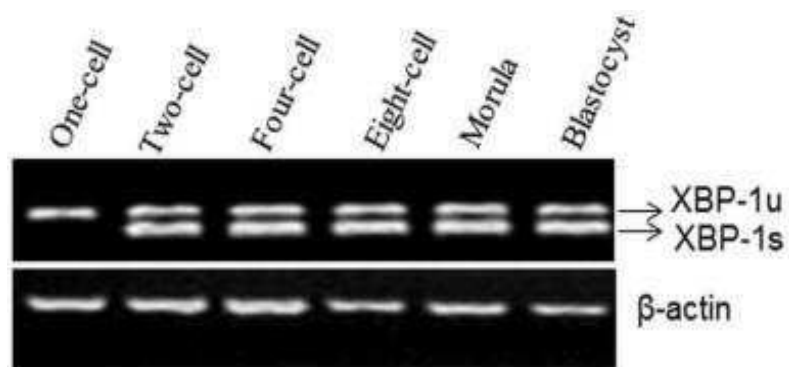
도면1a



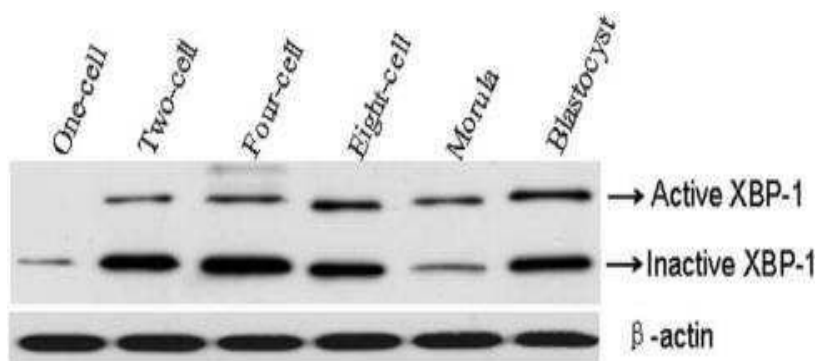
도면1b



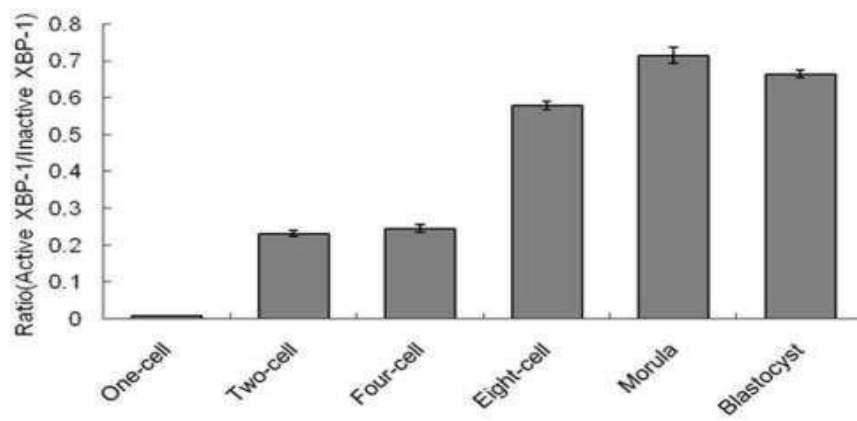
도면2a



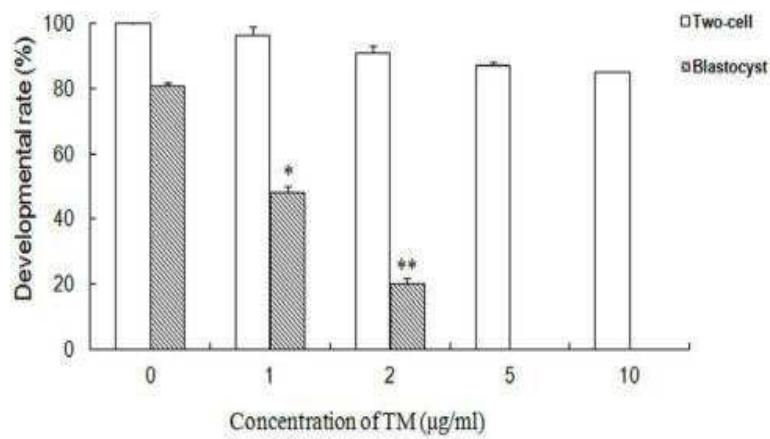
도면2b



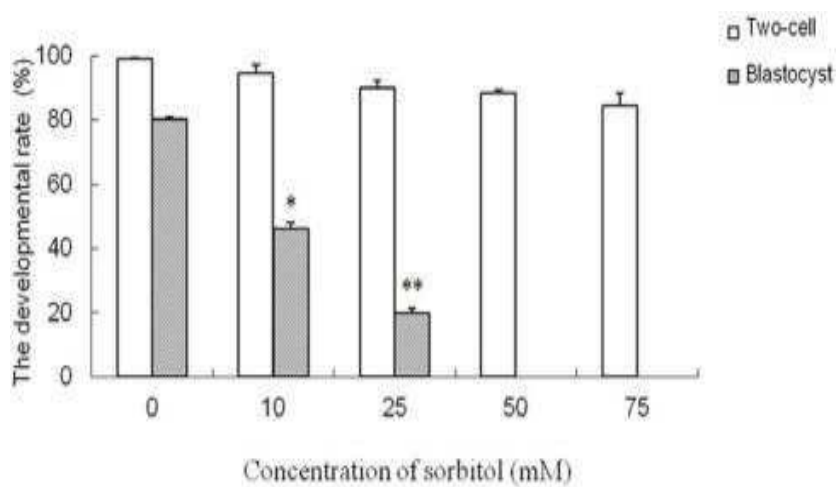
도면2c



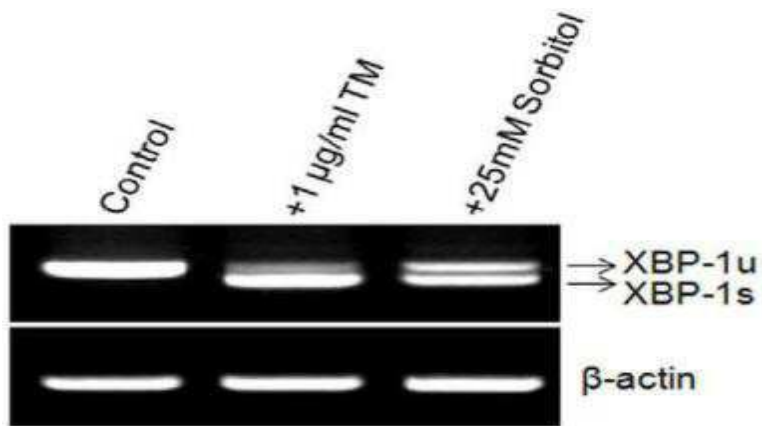
도면3a



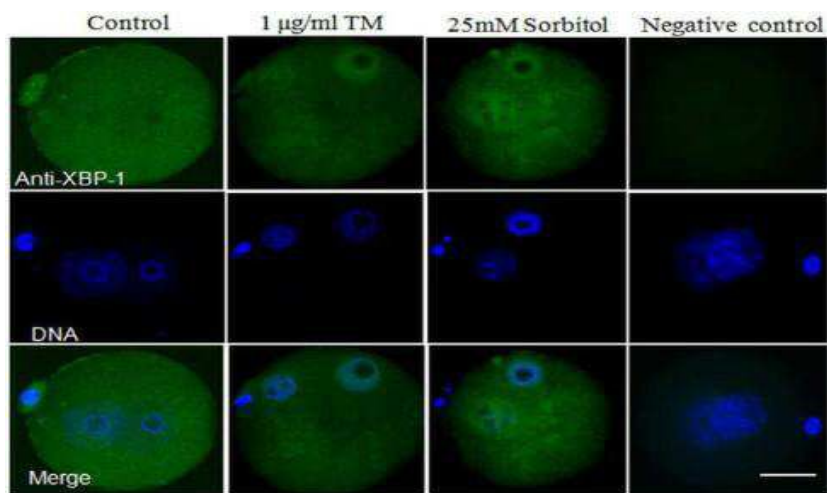
도면3b



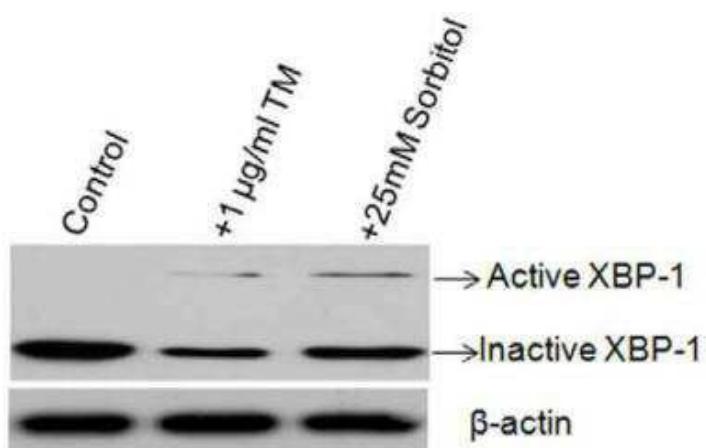
도면4a



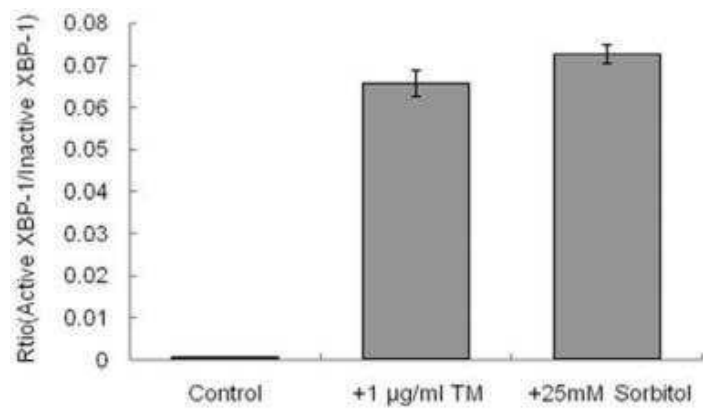
도면4b



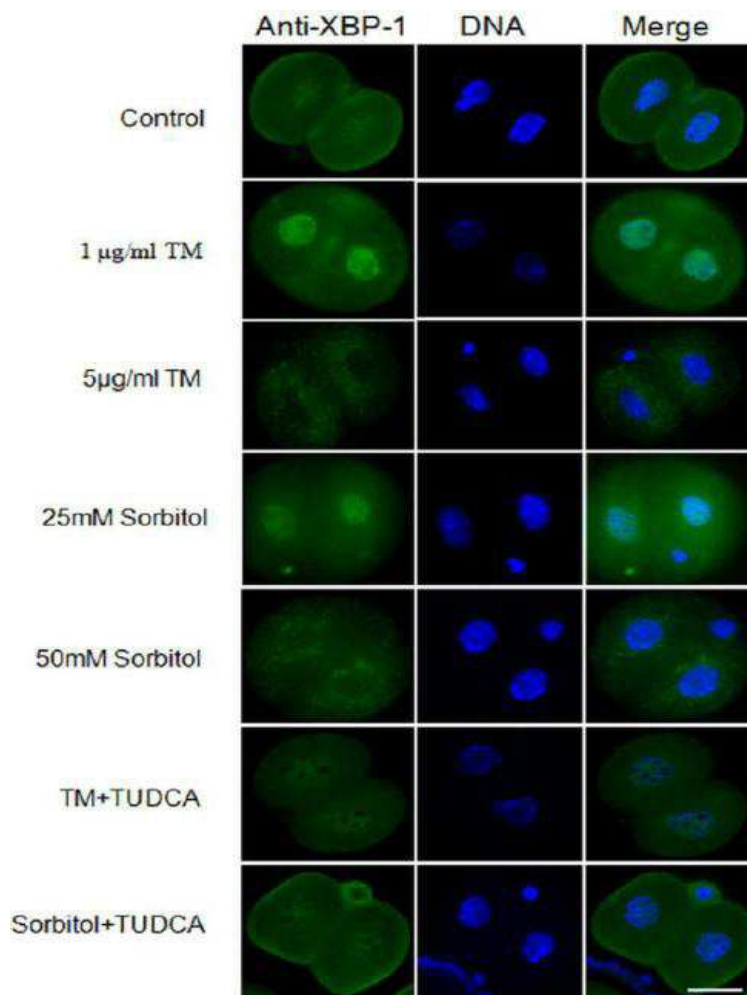
도면4c



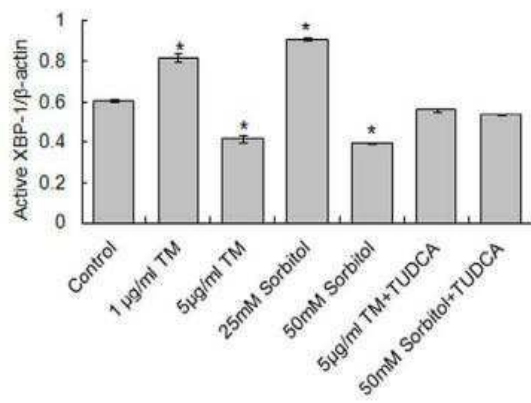
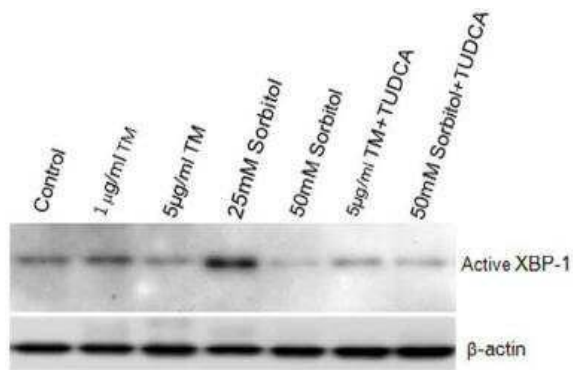
도면4d



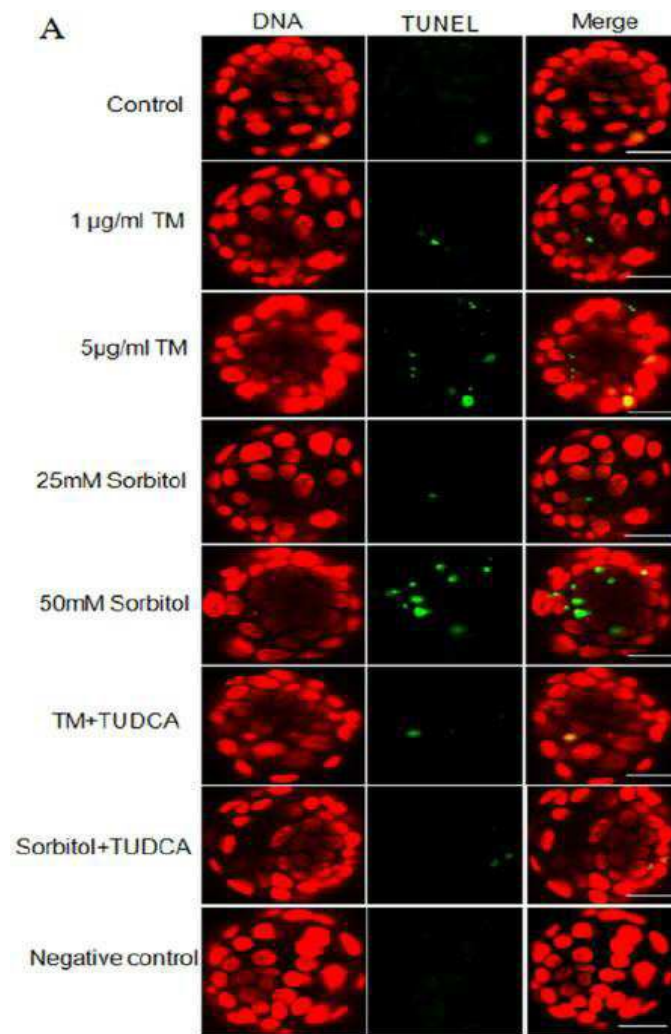
도면5a



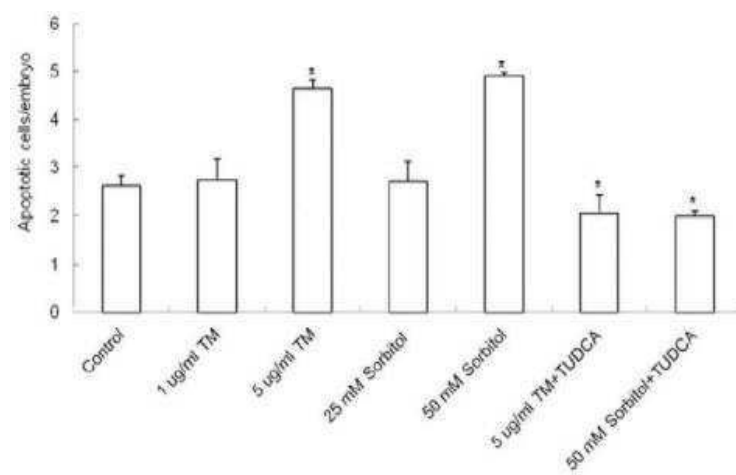
도면5b



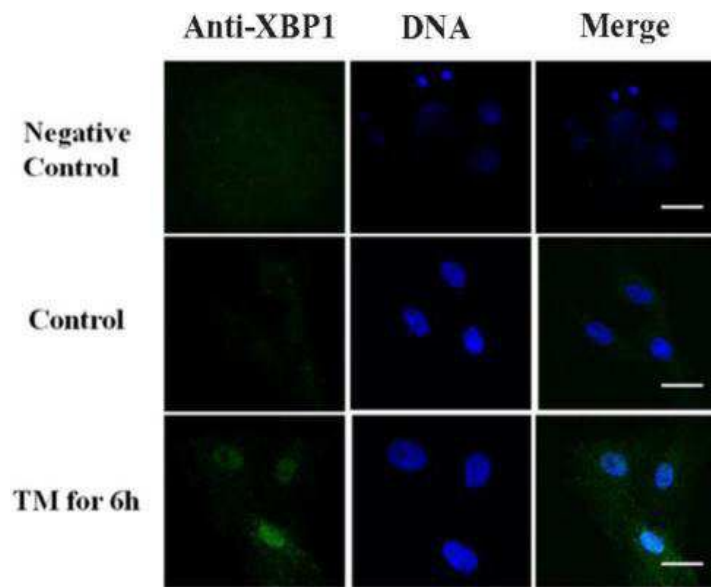
도면6a



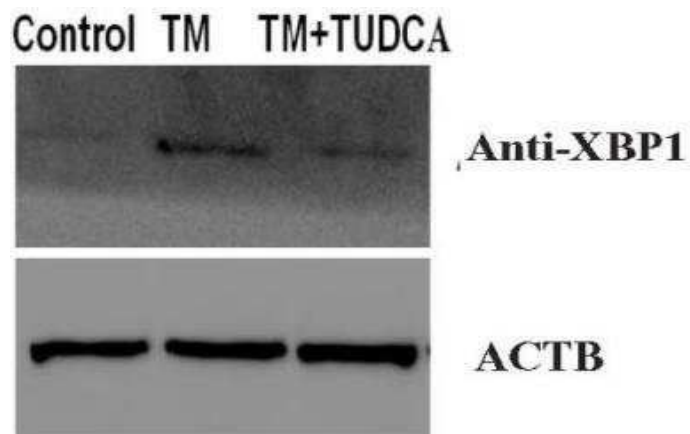
도면6b



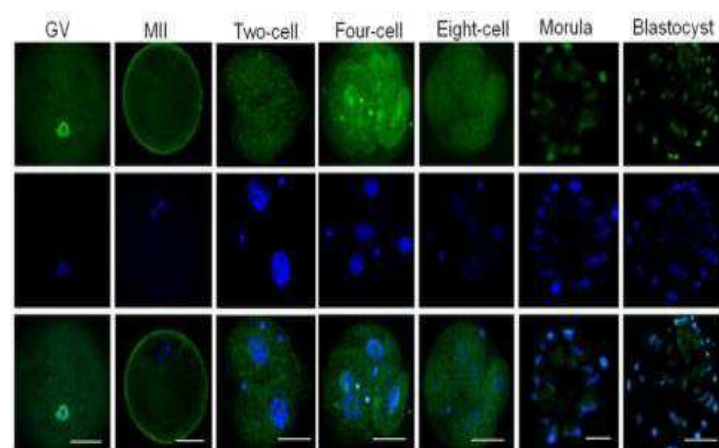
도면7a



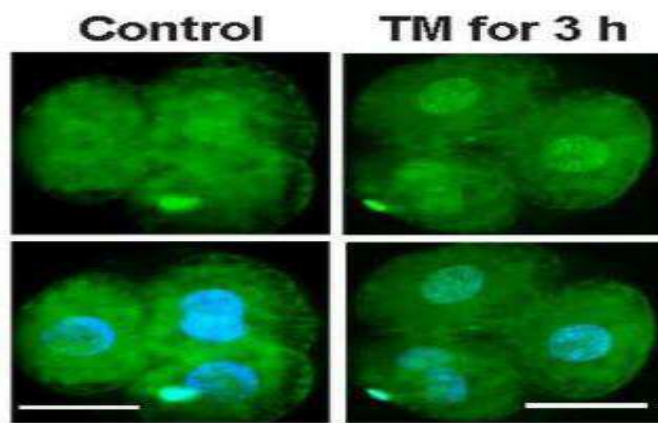
도면7b



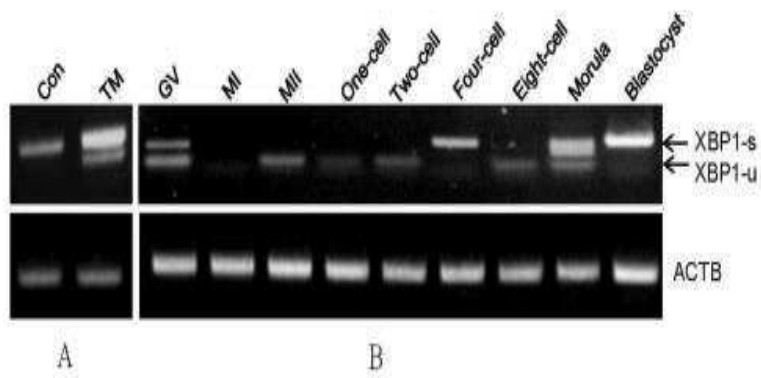
도면7c



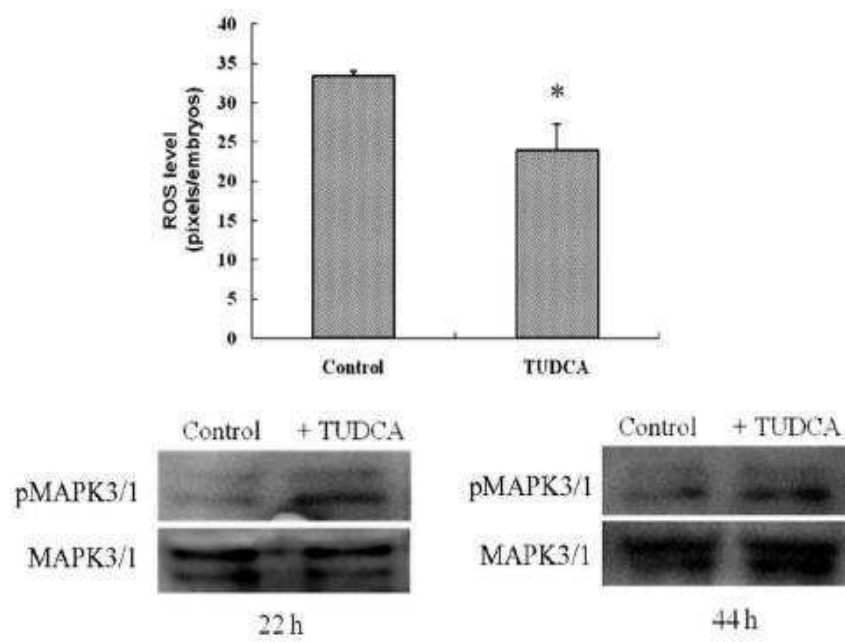
도면7d



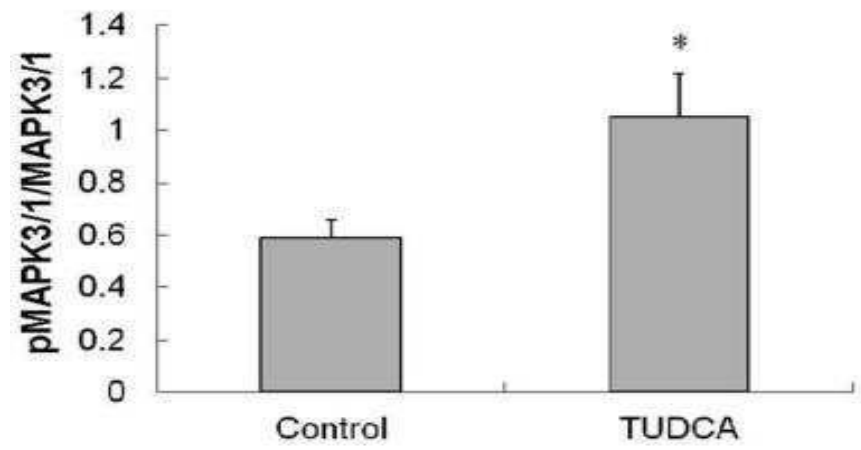
도면8



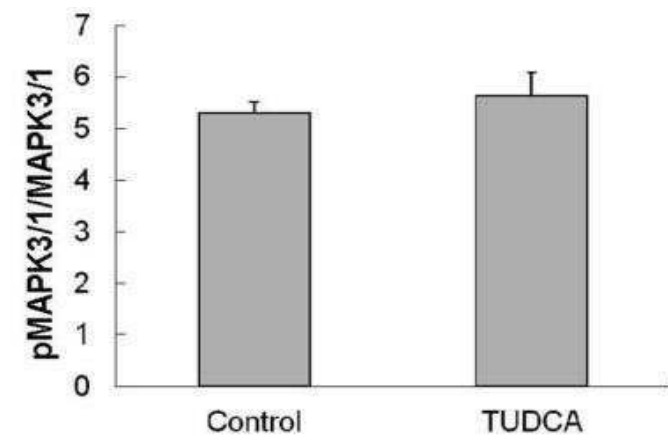
도면9a



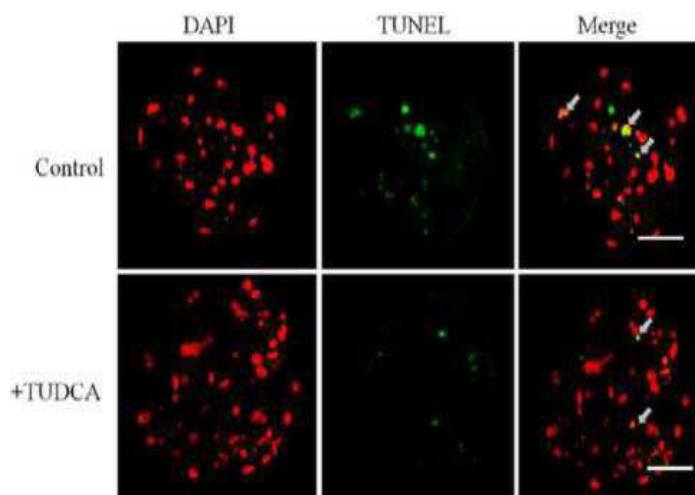
도면9b



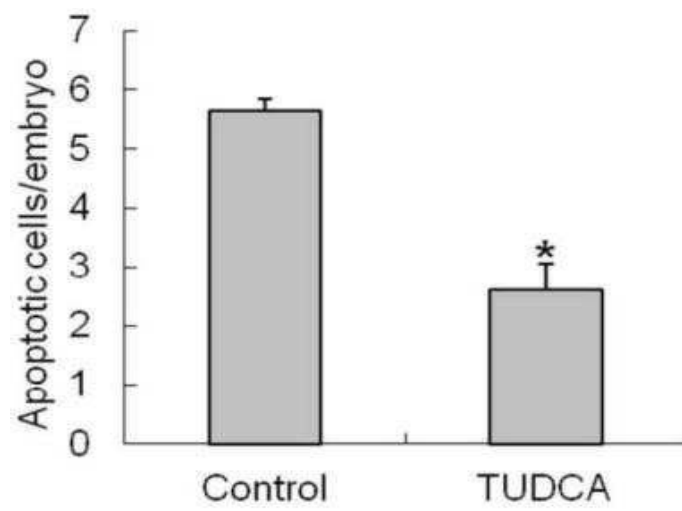
도면9c



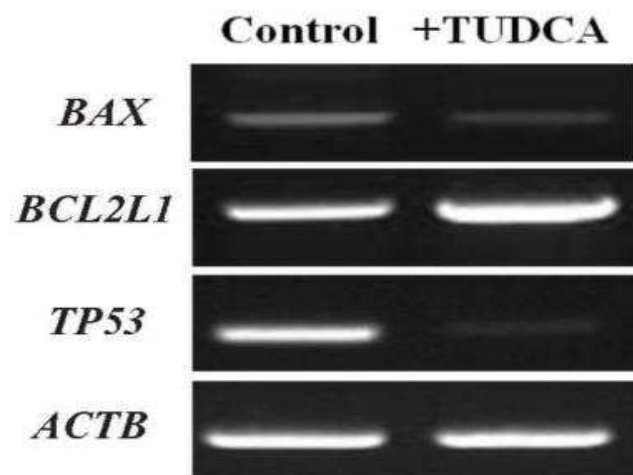
도면10a



도면10b



도면10c



도면10d

