

생쥐의 생식기관내 Glucosamine-6-Phosphate Deaminase (GNPDA) 발현

경기대학교 자연과학부 생물학과, 아주대학교 의과대학 비뇨기과학교실¹

계명찬 · 김창겸 · 안현수¹ · 김영수^{1*}

=Abstract=

Expression of Mouse Homolog of Glucosamine-6-Phosphate Deaminase in Reproductive Organs

Myung Chan Gye, Chang Gyum Kim, Hyun Soo Ahn¹ and Young Soo Kim^{1*}

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon, Korea; ¹Department of Urology, College of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea

Purpose: To verify the expression of the mouse homolog of glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA) in the testis and reproductive organs.

Materials and Methods: Expression of GNPDA was examined using a polyclonal antibody raised against a synthetic oligopeptide of the N-terminus of the protein.

Results: In Western blots, an immunoreactive band of Mr 35 kDa was detected in the testis, ovary, and uterus extracts. Expression of GNPDA was greater in the adult than in the immature testis. With immunostaining, a positive signal was found in the cytoplasm of interstitial, Sertoli, and germ cells of adult testis. In the ovary, positive staining was found in the interstitial and luteal cells.

Conclusion: The expression of GNPDA in many reproductive tissues suggests that the enzyme plays a housekeeping role in cell physiology and in the differentiation of the seminiferous tubules.

Key Words: Deaminases, Mouse, Testis

서 론

Glucosamine-6-phosphate deaminase (isomerase) (GNPDA) (EC 5.3.1.40)는 hexosamine과 해당 과정을 연결하는 유일한 효소로 D-glucosamine 6-phosphate의 D-fructose 6-phosphate와 ammonium ion으로 가역적 변환을 촉매한다. GNPDA는 N-acetyl-D-glucosamine 6-phosphate에 의해 활성화되며 일단의 aldoseketose isomerases에 속하며 amination과 deamination을 수행한다 (1). 최근 헵스터의 정자로부터 subunit Mr. 33 kDa의 수용성 단백질로 정자 두부의 적도면 (equatorial segment)에 위치하며, 난자내에 주입되었을 때 Ca²⁺ oscillations을 유발하는 Oscillin이 발견되었다 (2). 이 단백질은 대장균의 GNPDA와 유사한 구조를 가지며 (2), 체외

에서 발현시킨 단백질이 난자활성화 능력이 없는 것으로 알려져 난자활성화 단백질의 여부가 논란이 되었다 (3). GNPDA 유전자는 사람 (4, 5), 소의 신장 (6)에서 분리되었다. GNPDA는 신장과 소장의 흡수상피의 상부, 뇌의 신경종단부위와 정자 등 많은 에너지를 소비하는 조직 또는 세포에서 발현이 확인된다 (3). 본 연구에서는 생쥐의 정소와 정자 그리고 성체의 기타 조직을 대상으로 GNPDA의 단백질 항원 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

1. GNPDA 항체생산

항체생산을 위한 항원은 생쥐 GNPDA cDNA 염기서열 (W59746 clone, Gene Bank)에 기초한 아미노산서열에 근거하여 GNPDA의 N-말단에 대한 합성펩타이드 (COFNP-GPEKYFT)를 Takara (Japan)사에 의뢰하여 제조하였다. 합성펩타이드는 keyhole limpet hemocyanine과 결합시켜 토끼

교신저자: 김영수, 아주대학교 의과대학 비뇨기과학교실
수원시 팔달구 원천동 ☎ 442-721
전화 : 0331) 219-5585, Fax : 0331) 219-5276

본 연구는 보건복지부 (HMP-98-M-1-0017) 지원으로 수행되었음.

에 피하주사 하였다. 4주 후 1회의 항원을 주사하고 1주일 후 심장으로부터 채혈하여 혈청을 제조하였다. Protein A-Sepharose 4BL컬럼 (Pharmacia LKB)을 이용하여 혈청으로부터 IgG를 분획하고 PBS로 투석하여 염을 제거하였다. ELISA법으로 조사한 합성펩타이드 항원에 대한 항혈청 내 항체의 titer는 1:1,000,000으로 항혈청 또는 정제된 IgG를 western blot과 면역조직화학염색에 이용하였다.

2. 단백질 추출

ICR계의 생후 1 및 8주된 수컷 생쥐로부터 정소를 적출하였다. 수획한 조직은 homogenizer로 옮겨 조직 100 mg 당 1 ml의 extraction buffer (PBS containing 1% SDS, 1% Triton X-100)에 protease inhibitor cocktail (Complete™, Boehringer Mannheim, Germany)를 첨가한 용액으로 마쇄하였다. 마쇄액을 microcentrifuge에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 획득한 후 Bradford (7)에 따라 단백질을 정량하였다. 암컷 생쥐로부터 난소와 자궁을 적출하여 같은 방법으로 단백질을 추출하였다. 생쥐 정자 채취를 위해 성체로부터 부정소 미부를 적출하여 modified Tyrode (8) 용액내에 정치한 후 적당한 압력을 가하여 부정소 관강의 정자를 방출시켰다. 상온에서 15분간 정치하여 배양액 상층부의 정자를 수획하여 1000 g에서 10분간 원심분리하여 정자를 수획하였다. 사람 정자는 자원자로부터 수음을 통해 채취한 정액을 Percol 세척하여 정자만을 획득하였다.

3. 단백질 전기영동 Western Blotting

단백질 시료에 2X sample buffer (9)를 첨가하여 100℃에서 10분간 가열한 10% acrylamide gel에서 전기영동하였다.

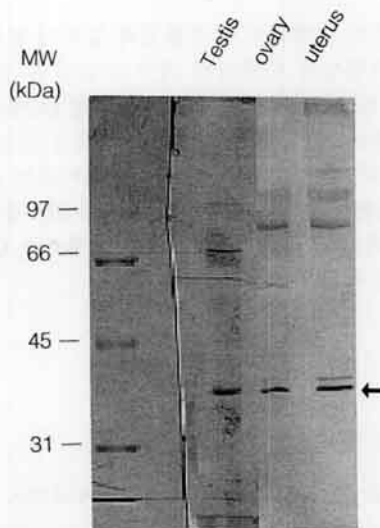


Figure 1. Western blot of GNPDA in mouse reproductive organs. Protein extracts of adult testis, ovary, uterus were resolved in SDS-PAGE (10% acrylamide gel) and subjected to immuno blotting using GNPDA antibody.

전기영동 후 Towbin 등 (10)의 방법으로 PVDF membrane으로 단백질을 전이하였다. 단백질이 전이된 blot은 5% bovine serum albumin (BSA)를 첨가한 TBS (Tris buffered saline)에서 1시간 정치한 후 TBS로 2회 세척하였다. Rabbit anti-GNPDA 혈청을 1:2,000으로 희석하여 (0.5 µg/ml in 1% BSA in TBS) 막에 도포한 후 상온에서 1시간 동안 배양하였다. TBS로 3회 세척 후, goat anti-rabbit IgG antibody (alkaline phosphatase conjugate, Promega)를 도포하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. TBS로 3회 세척 후 alkaline phosphatase buffer (0.1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂)에서 10분간 정치한 후 coloring reagent (Western stabilize, Promega)를 도포하여 발색하였다.

4. 면역조직화학적 검출

생쥐 정소 및 사람의 정소 생검조직을 5% formaldehyde 용액 (in PBS)로 고정한 후 graded alcohol series를 거쳐 탈수한 후 paraffin에 포매하였다. 5 µm 두께로 박절한 절편을 polylysine이 도포된 슬라이드에 붙인 후 탈파라핀 과정을 거쳐 면역염색을 수행하였다. PBS에서 1시간 동안 정치한 후 5% BSA를 첨가한 PBS로 1시간 동안 배양하였다. GNPDA 항체를 1% BSA를 첨가한 PBS로 1:50 희석하여 조직절편 위에 도포하고 상온의 습윤조건에서 1시간 정치하였다. 대조군으로는 항체 대신 rabbit non-immune IgG를 사용하였다. PBT (0.1% Triton X-100 in PBS)로 3회 세척한 후, goat anti-rabbit IgG antibody (peroxidase conjugate, Promega)를 도포하고 30분간 정치하였다. PBT로 3회 세척한 후 diaminobezidine solution (DAKO)으로 발색하였다. 발색 후 증류수로 세척한 후 hematoxylin으로 counterstaining 한 후 영구표본으로 제작하였다. 400배 시야의 현미경 시야에서

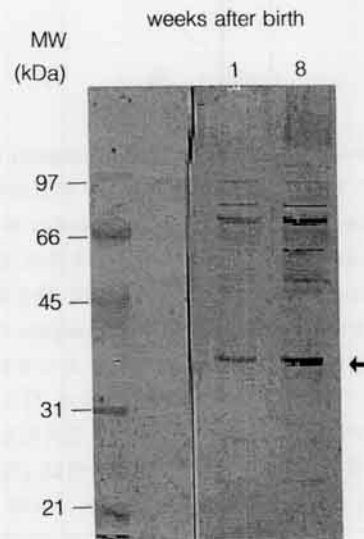


Figure 2. Western blot of GNPDA in mouse testis. Protein extracts from 1 and 8 weeks old testis were resolved in SDS-PAGE (10% acrylamide gel) and subjected to immuno blotting using GNPDA antibody. Arrow indicates GNPDA (35 kDa).

관찰하여 조직내 GNPDA 발현부위를 color negative film (iso 100, Kodak)에 사진 촬영 기록하였다.

결 과

Western blot 결과 생쥐 정소 단백질 추출물로부터 생쥐의 GNPDA로 추정되는 Mr. 35 kDa (reduced condition)의 항원을 검출하였다. 성체의 난소 및 자궁조직 추출물에서도 같은 크기의 항원이 검출되었다 (Figure 1). 출생 후 생쥐 정소내 발현양은 성체에서 크게 증가하였다 (Figure 2). 생쥐의 정자내에 존재하는 Mr. 35 kDa 크기의 항원의 양은 매우 희소한 반면, 사람의 정자에서는 Mr. 33 kDa의 항원이 다량 검출되었다 (Figure 3).

면역조직염색 결과 생후 8주된 생쥐 정소에서 세정관내 Sertoli 세포와 생식세포, 그리고 간충조직 세포의 세포질이 강하게 염색되었고 Sertoli cells의 염색 정도는 세정관 단면마다 약간의 차이를 보였다 (Figure 2A). 사람 정소의 생검조직의 염색 결과 생쥐와 유사한 양상으로 염색되었다 (Figure 2B). Rabbit non-immune IgG를 사용한 대조군에서는 특이적인 염색이 관찰되지 않았다 (Figure 2C and D). 성체의 다른 조직으로 생쥐 난소내 발현은 협막과 황체화 세포에서 확인되었다 (Figure 4E).

고 찰

정소 이외에도 난소 및 자궁조직에서 GNPDA의 발현을

확인할 수 있었으며 정소가 가장 높은 수준의 발현을 보였다 (Figure 1). 이 결과는 Lee 등 (11)에서 정소 이외의 다른 조직에서 나타난 GNPDA mRNA의 RT-PCR 결과와 일치한다. 면역조직화학염색의 결과 세정관내 생식세포는 물론 Sertoli cell 그리고 간충조직내의 Leydig cell의 세포질에서 신호가 검출되어 in situ hybridization 결과와도 일치하였다. 정소 이외의 조직으로 난소내의 발현을 확인한 결과 난포의 협막과 황체화세포에서 확인되었다 (Figure 4E). Oscillin의 아미노산서열이 *E. coli*의 hexose phosphate isomerase와 유사하며 (2) 최근 클로닝된 oscillin 유전자에 의해 암호화된 단백질이 포유동물의 glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA) 활성을 갖는 단백질을 만든다는 사실 (3) 등에 미루어 oscillin이 남성 생식세포 특이적 발현 유전자는 아닌 것으로 추측된다.

선행연구에서 생쥐의 정소를 재료로 RT-PCR을 통해 성숙한 정소에서는 다량의 oscillin (GNPDA)이 발현되지만 출생 전 생쥐 태아 및 생후 1주의 정소에서는 발현이 매우 적었고 생후 2주의 미성숙한 생쥐의 정소에서 적은 양이 검출되었고 이후부터 증가함을 보고한 바 있다 (10). 본 실험에서 western blot상에서 생쥐의 GNPDA로 추정되는 Mr. 35 kDa의 항원이 검출되었으며 정소내 발현량이 성체에서 크게 증가하였다 (Figure 1). 따라서 정소내 GNPDA의 발현이 세정관의 분화 및 정자형성의 진행에 따라 양적으로 증가하는 것으로 추측된다.

정자내에 존재하는 GNPDA 발현을 조사한 결과 생쥐 정자에서 Mr. 35 kDa 항원과 사람의 정자에서 Mr. 33 kDa의 항원이 검출되었다. 같은 분자량의 차이는 단백질 수준에서의 생화학적 변화를 생각할 수 있다. 생쥐 정자에서의

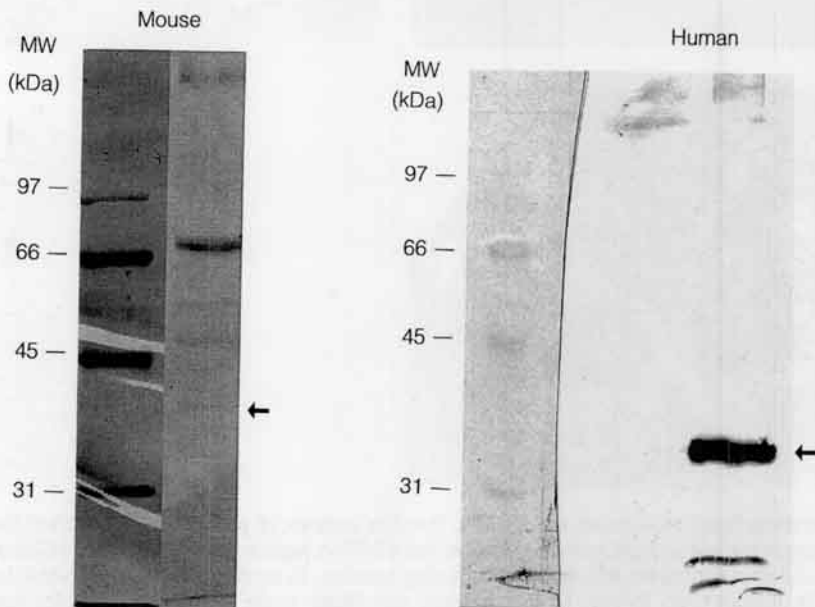


Figure 3. Western blot of GNPDA in mouse and human spermatozoa. A, mouse sperm. Arrow indicates GNPDA (35 kDa). B, human sperm. Arrow indicates GNPDA (33 kDa).

발현이 극히 적은 반면 사람 정자에서는 다량으로 검출되었다. 이와 같은 양적인 차이는 생쥐의 경우 부정소 정자를 사용하고 사람은 사정된 정자를 사용하였으므로 정장내에 존재하는 GNPDA의 오염에 따른 차이로 추측된다.

생쥐의 정소내 세정관에서 Sertoli cells의 증식은 출생 후

2주 사이에 일어나지만 기능적인 세정관 상피의 출현은 주로 사춘기 이후로 알려져 있다 (12). 이 과정에서 세정관 조직의 재배치가 수반되며 생식세포들에서는 apoptosis를 통한 세포사멸이 일어난다 (13, 14). 성체의 Sertoli cell을 포함한 정소내 체세포들은 잘 발달된 세포질내 막성구조물

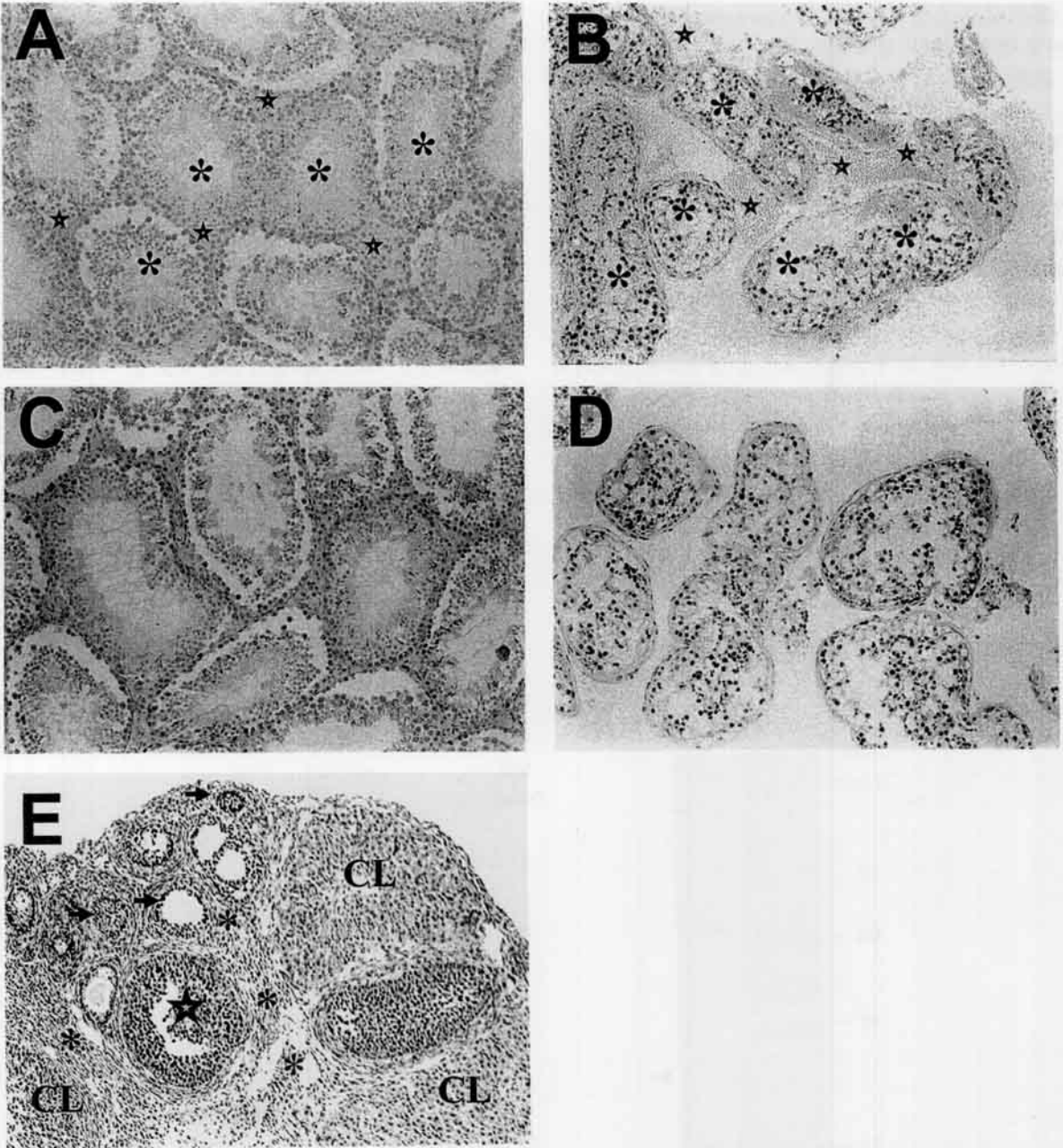


Figure 4. Immunohistochemical localization of GNPDA. Paraffin sections of paraformaldehyde-fixed mouse testis, ovary, and human testis biopsy were subjected to immunostaining. Rabbit anti GNPDA peptide polyclonal serum (diluted to 1/50) was followed by peroxidase conjugated goat anti rabbit IgG and DAB coloring reaction. In control, non-immune rabbit IgG was used. **A** and **C**, mouse testis. **B** and **D**, human testis biopsy. Intense labeling was found in the seminiferous tubules (asterisks) and interstitial cells (stars). **E**, mouse ovary. Interstitial cells (asterisks) were stained but granulosa cells in the growing (arrows) and Graaffian follicles (star) were not. Differential labeling on the luteal cells of corpus luteum (CL) are seen. **A**, **B**, and **E**, GNPDA antibody staining. **C** and **D**, control IgG staining.

을 가지며, 세정관내에서 증식, 감수분열 및 정자의 형태 형성 단계에 있는 생식세포들 역시 막성구조를 발달시키며 특히 round spermatid에서 일어나는 침체의 발생 과정 동안에 확연하다. 따라서 성체에서 관찰되는 정소조직내 GNPDA 발현의 증가는 세정관 상피 및 생식세포 분화에 GNPDA가 관여하고 있음을 의미한다. 정소절편의 면역조직염색 결과 Sertoli cells 및 생식세포의 세포질에서 강한 신호를 검출하였다. 따라서 GNPDA가 조직분화 과정 동안 세포잔해를 분해에 관여하는 것으로 사료된다. 정자에서 oscillin은 두부의 적도면의 세포질 (2) 및 침체내에 존재하는 것으로 보고되었다 (15). 따라서 정소내 생식세포에서 GNPDA의 발현은 정자형성의 초기단계에 있는 생식세포에서 발현되기 시작하여 정자형성의 진행에 따라 증가하고, 정자 두부에 축적되는 것으로 추측할 수 있다.

생쥐 성체의 세정관내 Sertoli cells의 염색 정도는 세정관 단면마다 약간의 차이를 보였으며 이는 정자형성에 따른 세정관 상피의 주기에 따라 Sertoli cells내 GNPDA의 발현이 다른 것으로 추측된다. Sertoli cell은 세정관 상피의 주기에 따라 구조적 변화를 거치며 정자형성 후기에는 발생중인 정자의 세포질잔해를 흡수하여 분해한다 (12). 세정관의 분화는 조직재배치의 좋은 모델로 이 과정에서 Sertoli cell는 세정관 조직재배치의 중심적인 역할을 수행한다. 따라서 GNPDA가 세정관 조직재구성 과정에서 물질의 흡수와 분비 및 steroidogenesis 등에 요구되는 에너지 요구성을 반영하는 것으로 사료된다. 많은 수의 용해소체 항원들이 분비와 재흡수를 통해 성숙되는데 당단백질과 glycosaminoglycans (GAGs)가 용해소체에서 분해 과정을 통해 N-acetylhexosamines 잔기가 재순환된다 (16). GNPDA는 정소의 간층조직에서도 발현되었다 (Figure 4 A and C). 쥐에서 proteoglycans의 합성은 Leydig 세포의 testosterone 합성에 필수적이다 (17). 따라서 GNPDA의 발현이 steroid의 합성에 따른 에너지 요구를 반영하는 것으로 추측할 수 있다. 한편 운동성이 있는 정자의 sialic acid 함량이 감소되어 있음이 보고되었다 (18). 따라서 GNPDA의 발현이 정자의 형태형성 과정에서 hexosamine을 포함한 당잔기의 조작에 관여할 가능성이 있다.

결 론

ICR계 생쥐의 미성숙 정소, 성숙 정소, 그리고 성체의 다른 기관들로부터 단백질을 추출하고 western blot 및 면역조직화학적 염색으로 GNPDA의 발현을 조사하였다. 성체의 정소에서 다량의 GNPDA를 확인하였고 성체의 다른 기관에서도 GNPDA 발현을 확인하였다. 면역조직화학적 염색을 통해 세정관내 생식세포와 Sertoli cell 그리고 간층조직의 Leydig cell에서 GNPDA의 발현을 확인하였다. 이러한 GNPDA의 발현양상으로 볼 때 GNPDA는 다양한 조직에서 발현되는 공통적인 항원으로 특히 정소내 steroid 합

성과 세정관 조직분화에 작용하는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Oliva G, Fontes MR, Garratt RC, Altamirano MM, Calcagno ML, Horjales E. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* 1995; 3: 1323-32.
- 2) Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 379: 364-8.
- 3) Wolosker H, Kline D, Bian Y, Blackshaw S, Cameron AM, Fralich TJ, Schnaar RL, Snyder SH. Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB J* 1998; 12: 91-9.
- 4) Weidanz JA, Campbell P, DeLucas LJ, Jin J, Moore D, Roden L, Yu H, Heilmann E, Vezza AC. Glucosamine 6-phosphate deaminase in normal human erythrocytes. *Br J Haematol* 1995; 91: 72-9.
- 5) Shevchenko V, Hogben M, Ekong R, Parrington J, Lai FA. The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* 1998; 216: 31-8.
- 6) Lara-Lemus R, Calcagno ML. Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1388: 1-9.
- 7) Bradford MM. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochem* 1976; 72: 248-54.
- 8) Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winter MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-80.
- 9) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly on the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 10) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Sci Acad USA* 1979; 76: 4350-4.
- 11) Lee YH, Choi KW, Kim JW, Kim MK, Nah H, Gye MC. Expression of Oscillin in Mouse Testis. *Kor J Anrol* 1998; 16: 129-34.
- 12) Gondos B, Berndston WE. Postnatal and pubertal development. In: Russell LD, Griswold MD, editors. *The Sertoli Cell*. Clearwater FL: Cache River Press, 1993; 11554.
- 13) Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An

- early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997; 16: 2262-70.
- 14) Wang RA, Nakane PK, Koji T. Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* 1998; 58: 1250-6.
- 15) Montag M, van der Ven K, Dorbecker C, van der Ven H. Characterization of testicular mouse glucosamine 6-phosphate deaminase (GNPDA). *FEBS Lett* 1999; 458: 141-4.
- 16) Rome LH, Hill DF. Lysosomal degradation of glycoproteins and glycosaminoglycans. Efflux and recycling of sulphate and N-acetylhexosamines. *Biochem J* 1986; 235: 707-13.
- 17) Grudet N, Bonnamy PJ, Le Goff D, Carreau S. Role of proteoglycans on testosterone synthesis by purified Leydig cells from immature and mature rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 68:153-62.
- 18) Oshio S, Kaneko S, Iizuka R, Mohri H. Sialic acid in purified human sperm. *Arch Androl* 1987; 18: 225-30.
-