

생쥐의 부정소에서 Glucosamine-6-Phosphate Deaminase (GNPDA)의 발현

경기대학교 자연과학부 생물학과, 아주대학교 의과대학 비뇨기과

계명찬 · 안현수¹ · 김영수¹

= Abstract =

Expression of Glucosamine-6-Phosphate Deaminase (GNPDA) in Mouse Epididymis

Myung Chan Gye, Hyun Soo Ahn¹, Young Soo Kim¹

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

Purpose: To verify the expression of mouse homologue of glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA) in mouse epididymis.

Materials and Methods: GNPDA expression was examined in mouse epididymis using the polyclonal antibody raised against a synthetic oligopeptide of N-terminus of mouse homologue of GNPDA.

Results: In Western blot, immunoreactive band of Mr. 33 kDa was detected in the cauda epididymal extracts. In immunostaining, positive signal was found in the cytoplasm and stereocillia of epithelial cells of cauda epididymal tubule, and interstitial cells of adult epididymis.

Conclusion: Expression of GNPDA in epididymis suggests that it is possibly involved in absorption and intracellular digestion of luminal contents, and the remodeling of epithelia in mouse epididymis.

Key Words: GNPDA, Epididymis, Mouse

서 론

Glucosamine-6-phosphate deaminase (isomerase) (GNPDA) (EC 5.3.1.40)는 hexosamine과 해당과정을 연결하는 유일한 효소로 D-glucosamine 6-phosphate의 D-fructose 6-phosphate와 ammonium ion으로 가역적 변환을 촉매한다 (1). 최근 햄스터의 정자로부터 분자량 33 kDa의 수용성 단백질로 난자내에 주입되었을 때 Ca²⁺ oscillations을 유발하는 Oscillin이 발견되었다 (2). 이 단백질은 대장균의 GNPDA와 유사한 구조를 가지며 (2), 체외에서 발견시킨 항원이 난자활성화 능력이 없는 것으로 알려져 난자활성화 단백질의 여부가 논란이 되었다 (3).

GNPDA 유전자는 사람 (4,5), 소의 신장 (6)에서 분리되었으며 신장과 소장, 흡수상피의 상부, 뇌의 신경중단부위와 정자 등에서 발현이 확인되었다 (3). 생쥐의 정소에서 GNPDA의 발현은 출생 후 성적 성숙에 따라 증가하며 정소내 간충조직 및 세정관내 Sertoli cell 및 germ cell에서 발현된다 (7,8). 이러한 증거로 미루어 볼 때, GNPDA가 최초로 제시되었던 정자내에 존재하는 난자활성화물질의 가능성은 희박하며 성체에서 많은 에너지를 소비하는 조직 또는 세포에서 발현이 확인되는 것에 미루어 물질의 흡수와 에너지대사 및 조직재배치에 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있다. 현재까지 생쥐 및 사람의 정소와 생쥐의 난소와 자궁 등의 생식기관에서 GNPDA의 발현이 보고되었으며 (7), 난소에서의 발현은 조직재배치가 활발히 진행되는 부위에서 활발한 것으로 확인되었다.

사람을 포함한 다양한 척추동물의 부정소는 부위별로 조직학적, 생화학적으로 특징적인 모습을 나타내며 각 부위별로 정자의 성숙과 저장과 관련된 물질의 분비 및 흡수 기능

교신저자: 김영수, 아주대학교 의과대학 비뇨기과
경기도 수원시 팔달구 원천동 ☎ 442-721
전화: 031) 219-5585, Fax: 031) 219-5276
본 연구는 보건복지부 (HMP-98-M-1-0017) 지원으로 수행되었음.

에도 차이를 보인다 (9). 선행연구자들에 의해 GNPDA가 상피조직의 물질의 분비 및 흡수, 조직재구성에 기능이 있을 것으로 제시되었으나 (3,7) 부정소에서 GNPDA의 발현의 부위별 양상은 알려지지 않았다. 본 연구에서는 생쥐의 부정소를 대상으로 부정소두부, 체부, 미부에서 GNPDA의 단백질항원의 발현의 차이를 조사하였다.

재료 및 방법

단백질 전기영동 및 Western Blotting

ICR계의 생후 8주된 수컷 생쥐로부터 부정소를 적출하였다. 두부 (caput), 체부 (corpus), 미부 (cauda)로 분리한 조직은 homogenizer로 옮겨 조직 100 mg 당 1 ml의 extraction buffer (PBS containing 1% SDS, 1% Triton X-100)에 protease inhibitor cocktail (Complete TM, Boehringer Mannheim, Germany)를 첨가한 용액으로 마쇄하였다. 마쇄액을 microcentrifuge에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 획득하였다. Bradford 방법에 따라 상층액내의 단백질 정량 후 (10) 단백질 시료에 2X sample buffer (11)를 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 10% acrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기영동 후 Towbin등 (12)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. 생쥐 GNPDA의 N-말단에 대한 합성 펩타이드 (CQFNPGPEKYFT)에 대한 항체로부터 정제한 IgG를 1:1,000으로 희석하여 (0.5 ug/ml in 1% BSA in TBS) 막에 도포한 후 상온에서 1시간 동안 배양하였다 (7). TBS로 3회 세척 후, goat anti-rabbit IgG antibody (alkaline phosphatase conjugate, Promega)를 도포하여 상온에서 1시간동안 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.

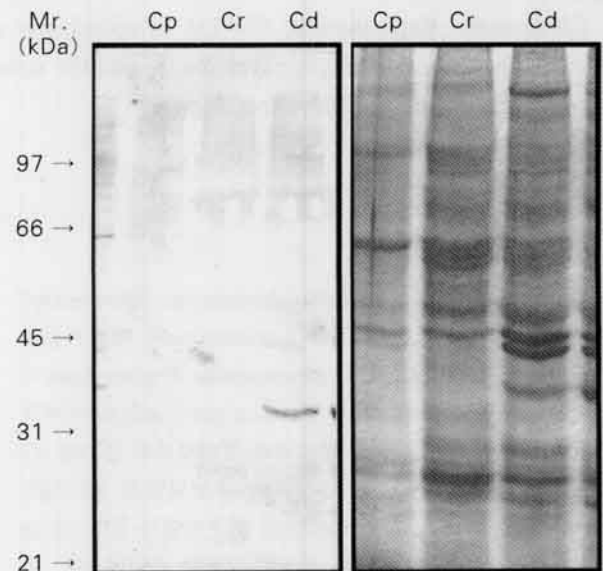
면역조직화학적 검출

ICR계의 생후 8주된 수컷 생쥐로부터 부정소를 적출하여 두부 (caput), 체부 (corpus), 미부 (cauda)로 분리하여 phosphate buffered saline (PBS)에 희석한 5% formaldehyde 용액으로 고정하였다. 알코올시리즈를 거쳐 탈수시킨 후 paraffin에 포매하여 5 um 두께로 박절하였다. Polylysine이 도포된 슬라이드에 절편을 붙인 후 탈파라핀

과정을 거쳐 PBS에서 1시간 동안 정치한 후 면역염색을 수행하였다. 비특이적 항원-항체반응을 억제하기 위해 5% BSA를 첨가한 PBS로 1시간 동안 상온에서 배양한 후 3% H₂O₂ 용액을 도포하여 내재하는 peroxidase를 불활성화하였다. GNPDA항체를 1% BSA를 첨가한 PBS로 1:50 희석하여 조직절편 위에 도포하고 상온의 습윤조건에서 1시간 정치하였다. 대조군으로는 항체 대신 rabbit nonimmune 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. 200배 시야의 현미경 시야에서 관찰하여 조직내 GNPDA 발현부위를 color negative film (iso 100, Kodak)에 사진촬영 기록하였다.

결 과

Western blot 결과 생쥐 부정소 단백질 추출물로부터 Mr. 33 kDa (reduced condition)의 항원이 검출되었으며 부정



Western Blot SDS-PAGE

Figure 1. Western blot of GNPDA in epididymis of the adult mice. Protein extracts of the caput, corpus, and cauda epididymis from adult mice were resolved in SDS-PAGE (10% acrylamide gel) and subjected to immunoblotting using antibody raised against synthetic peptides corresponding to N-terminal peptide of mouse GNPDA.

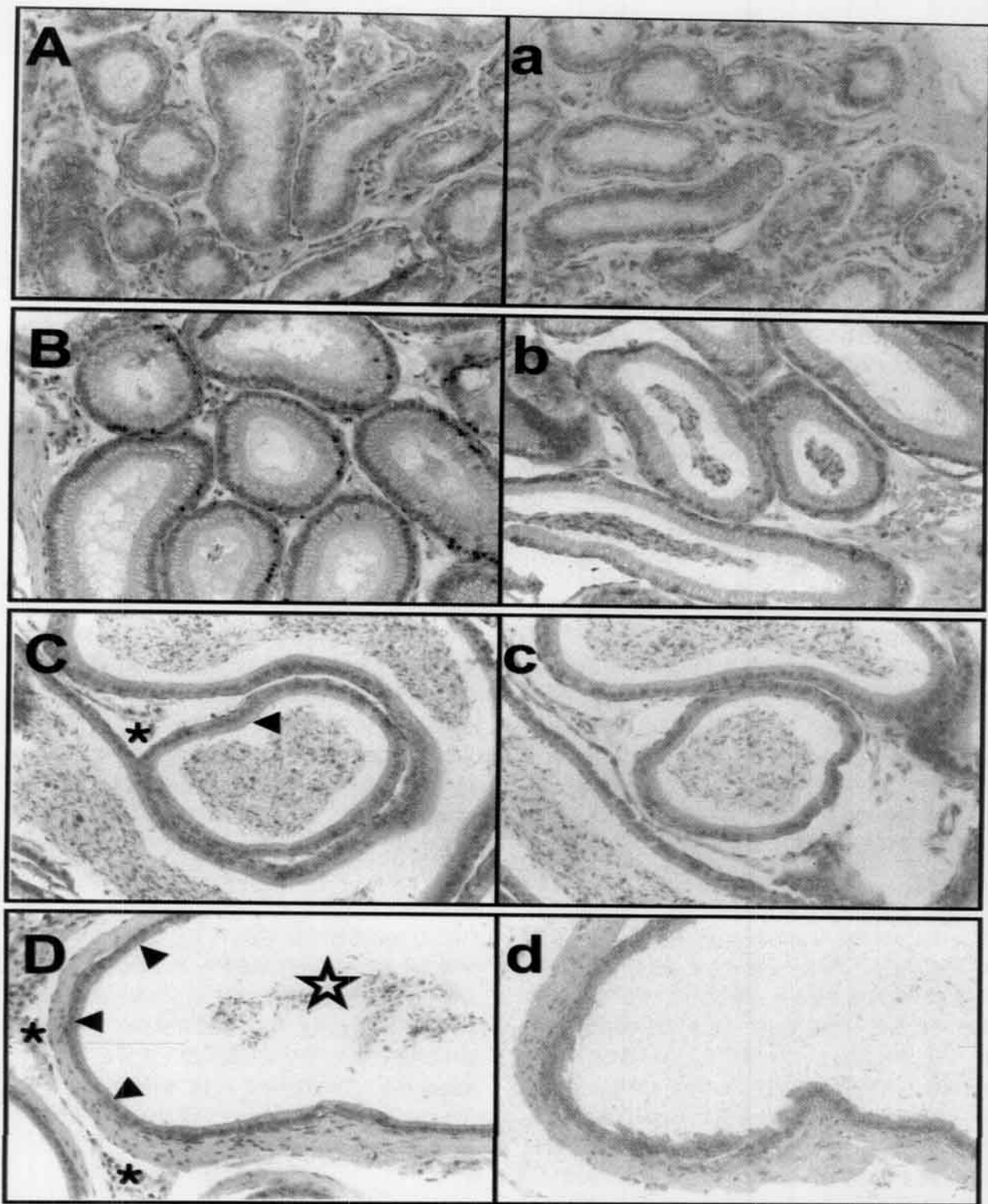


Figure 2. Immunohistochemical localization of GNPDA in epididymis of the adult mouse. Paraffin sections of paraformaldehyde-fixed mouse epididymis were subjected to immunostaining. Labeling with rabbit anti GNPDA peptide polyclonal serum (diluted to 1/50) was followed by peroxidase-conjugated goat anti rabbit IgG and DAB coloring reaction. A and a, proximal caput epididymis; B and b, distal caput epididymis; C and c, corpus epididymis; D and d, cauda epididymis. A - D, GNPDA antiserum; a - d, normal IgG. Intense labeling was found in the epithelium of the epididymal tubules (arrowheads), interstitial cells (asterisks), and lumen (stars) in cauda epididymis.

소 부위별로 미부 부정소의 발현이 가장 많았다 (Figure 1). 면역조직염색 결과 생 후 8주된 생쥐 부정소에서 세정관내 상피세포와 관강, 그리고 간질조직 세포의 세포질이 염색되었다. 두부 부정소 선단 및 후위부에서는 GNPDA 항체 처리군과 (Figure 2A and B) non-immune IgG를 사용한 대조군 (Figure 2a and b) 사이에 차이가 없었다. 체부 부정소 상피에서는 미약한 신호가 검출되었으나 (arrowhead in Figure 2C) non-immune IgG를 사용한 대조군에서는 특이적인 염색이 관찰되지 않았다 (Figure 2c). 미부 부정소의 경우관강의 상피에서는 apical region 및 세포질부위에서 신호가 검출되었으며 (arrowheads in Figure 2D) 관강내에도 신호가 검출되었다 (star in Figure 2D). 간질조직의 세포질이 강하게 염색되었다 (asterisks in Figure 2D). 반면 rabbit non-immune IgG를 사용한 대조군에서는 특이적인 염색이 관찰되지 않았다 (Figure 2d).

고 찰

본 연구 결과 생쥐 부정소 마쇄액의 Western blot상에서 생쥐의 GNPDA로 추정되는 Mr. 33 kDa의 항원이 검출되었으며 미부 부정소가 가장 높은 발현을 보였다 (Figure 1). 면역조직화학 염색을 통해 부정소에서 GNPDA의 발현은 부위별로 차이가 있음을 확인하였다. 부정소 두부 및 체부의 발현은 없거나 미약한 반면 미부부정소에서는 관강내외 상피 및 관강내에서 발현이 관찰되었고 간질조직에서도 발현이 확인되었다 (Figure 2D). 이는 부정소 부위별로 정자의 성숙에 관여하는 상피의 기능적 차이와 관련된 것으로 추측된다.

성체의 부정소 상피는 분비 및 흡수기능이 매우 왕성하며 잘 발달된 세포질내 막성구조물을 갖는다 (9). 정자가 두부와 체부 부정소를 거치는 동안 성숙에 관련된 주요한 변화가 일어나며 미부 부정소는 주로 정자를 저장하는 기능과 함께 노화 또는 사멸된 정자의 세포내 소화 기능을 수행한다 (13). 최근 정소 및 정자 신장과 소장의 흡수상피의 상부, 뇌의 신경종단부위 등 많은 에너지를 소비하는 조직 또는 세포에서 GNPDA의 발현이 보고되었다 (3,7,8). 특히 미부 부정소 상피의 관강쪽을 향한 미용모부위에서 GNPDA의 발현이 강하게 관찰되었다. 따라서 미부 부정소 상피에서 관찰되는 GNPDA의 발현은 부정소 상피에서 물질의 흡수와 분비등에 요구되는 에너지 요구성을 반영하는 것으로 사료된다. 많은 수의 용해소체 항원들이 분비와 재흡수를 통해 성숙되는데 당단백질과 glycosaminoglycans (GAGs)가 용해소체에서 분해과정을 통해 N-acetylhexosa-

mines 잔기가 재순환되며 GNPDA는 deamination 을 통해 hexosamine을 에너지 대사로 전환한다 (14). 다양한 용해소체 효소가 부정소 전체 부위에서 발현되며 이들은 상피세포에 존재하거나 분비되어 관강내에 존재한다 (15). 부정소에서 발현되는 단백질분해효소 및 당쇄의 가공에 관여하는 항원의 변화에 관여하며 정자표면 항원의 hexosamine 잔기등의 변화에 직접적인 영향을 미친다 (16). 그러나 이러한 변화는 주로 정자가 두부 부정소를 거치는 동안 확인한 반면 미부 부정소를 거치는 동안 정자의 성숙과 관련된 항원의 변화는 미미하다 (13). 따라서 미부 부정소 상피세포의 세포질에서 GNPDA가 다량으로 발현되는 원인으로 분비항원으로 작용하여 정자의 성숙에 관여하기 보다는 미부 부정소 상피에서는 흡수된 정자 또는 관강내액 기원의 hexosamine 잔기를 대사에 전환하기 위한 장치로 추측할 수 있다. 한편 미부 부정소 상피는 endocytosis가 왕성하며 잘 발달된 lysosome과 함께 분비 구조를 갖는데 부정소 상피세포의 lysosomal enzymes은 세포의 종류 뿐 아니라 동일한 세포라 하여도 부정소 부위별로 차이가 있으며 이는 세포내로 흡수되는 물질의 종류가 다르기 때문이다 (17). 항 후 부정소 상피의 체외배양 시스템에서 GNPDA를 선택적으로 억제하는 약물을 이용한 hexosamine 잔기의 대사 전환 기능과 관련된 확인이 요망된다.

한편 사춘기 이후 정소로부터 정자가 부정소로 진입하는 시기에 이미 부정소에는 관강이 출현하고 기능적인 부정소 관 상피의 분화가 확인하다. 이 후 부정소에서는 조직재배치의 일환으로 정소에 의존적인 상피의 증식 및 apoptosis를 통한 사멸이 일어난다 (18). 성체의 부정소 상피세포들 가운데 주세포 (principal cell)는 기저세포 (basal cell) 보다 증식활동이 활발한 반면 apoptosis의 빈도 또한 높다 (18,19). 주세포는 미부 부정소내 상피의 대부분을 차지하며 물질의 분비 및 흡수가 왕성하다. 본 실험결과 미부 부정소내 GNPDA 발현이 두부, 체부 부정소에 비해 상대적으로 많은 것으로 미루어 GNPDA는 주세포의 사멸을 통한 상피조직의 재배치, 관강 내용물의 분비 및 흡수 및 흡수된 hexosamine 잔기의 대사등에 관여할 것으로 추측된다.

결 론

ICR계 생쥐의 성숙 개체의 부정소로부터 Western blot 및 면역조직화학적 염색으로 glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA)의 발현을 조사하였다. 성체의 부정소 미부에서 생쥐의 GNPDA로 추정되는 Mr. 33 kDa의

항원이 다량 발현되었다. 면역조직화학 염색을 통해 미부 부정소 상피세포의 미세음모 및 세포질, 간층조직 세포의 세포질, 그리고 관강내에서 GNPDA의 발현을 확인하였다. 미부 부정소에서 발현되는 GNPDA는 상피세포의 물질흡수 및 정자의 저장과 흡수에 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) Gye MC, Kim CG, Ahn HS, Kim YS. Expression of mouse homologue of glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA) in reproductive organs. *Kor J Androl* 2000; 18: 41-46.
- 8) 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.
- 9) Zunke U, Gossrau R. Morphology and zonal division of the ductus epididymidis of rats. II. Electron microscopic investigations. *Anat Anz* 1981; 150: 298-326.
- 10) 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.
- 11) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly on the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 12) 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.
- 13) Waites GM. Functional relationships of the mammalian testis and epididymis. *Aust J Biol Sci* 1980; 33: 355-70.
- 14) Rome LH, Hill DF. Lysosomal degradation of glycoproteins and glycosaminoglycans. Efflux and recycling of sulphate and N-acetylhexosamines. *Biochem J* 1986; 235: 707-13.
- 15) Raczek S, Yeung CH, Hasilik A, Robenek H, Hertle L, Schulze H, Cooper TG. Immunocytochemical localisation of some lysosomal hydrolases, their presence in luminal fluid and their directional secretion by human epididymal cells in culture. *Cell Tissue Res* 1995; 280: 415-25.
- 16) Tulsiani DR, Orgebin-Crist MC, Skudlarek MD. Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 85-97.
- 17) Andonian S, Hermo L. Cell- and region-specific localization of lysosomal and secretory proteins and endocytic receptors in epithelial cells of the cauda epididymidis and vas deferens of the adult rat. *J Androl* 1999; 20: 415-29.
- 18) Fan X, Robaire B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* 1998; 139: 2128-36.
- 19) Ramirez R, Martin R, Martin JJ, Ramirez JR, Paniagua R, Santamaria L. Changes in the

number, proliferation rates, and bcl-2 protein
immunoexpression of epithelial and periductal

cells from rat epididymis during postnatal deve-
lopment. *J Androl* 1999; 20: 702-12.
