

tion systems in cellular metabolism and homeostasis. Recently, several deubiquitinating enzymes are known to function as important regulators in signal transduction. In this way, we found a deubiquitinating enzyme, HIDE (Hsp90 interacting deubiquitinating enzyme), which interacts with heat shock protein 90 (Hsp90). We characterized the catalytic activity, the interaction with Hsp90, the tissue distribution, and the localization of HIDE. Interestingly, HIDE proteins were detected only in the testis, and the expression is limited in the Sertoli cells and meiotic germ cells.

Method: To search for the conserved domains of HIDE, we scanned program using several databases. Transcript distribution was studied by Northern blot analysis, and protein distribution was studied by western blotting. Deubiquitinating activity was confirmed by the Ub- β -galactosidase assay. Interaction between HIDE and Hsp90 was confirmed by co-immunoprecipitation. Localization of HIDE and Hsp90 within cell lines was studied by immunofluorescence microscopy, and distribution of HIDE within the testis was studied by immunohistochemistry.

Results: HIDE has two CS (a domain conserved in CHORD-containing protein and SGT1) domains, which were previously known as a putative Hsp90 binding domain, and the cellular localization of HIDE was merged with that of Hsp90 in the cytoplasm. The catalytic domain of HIDE contains a zinc finger domain, and deubiquitinates the monoubiquitin moiety of ubiquitin- β -galactosidase, but does not reduce the global pool of polyubiquitin chains. HIDE transcripts were highly expressed in the testis, muscle and heart. However, HIDE proteins were detected only in the testis. The immunostaining analysis revealed that HIDE is highly expressed in meiotic spermatocytes and Sertoli cells, but absent in Leydig cells, spermatogonia and sperms. We suggest that HIDE is highly expressed in meiotic germ cells but not in pre-meiotic germ cells and differentiated sperms, and may function during spermatogenesis.

Conclusions: HIDE transcript was highly expressed in the testis, heart, and muscle, but HIDE proteins were detected only in the testis. HIDE interacted with Hsp90, and HIDE was co-localized with Hsp90 within the cytoplasm. HIDE is highly expressed in the meiotic germ cells in the testis.

P-23 생식주기와 착상기를 전후의 생쥐 자궁에서 Junctional Adhesion Molecule-1 (JAM-1)의 발현 및 Steroid에 의한 발현의 조절

김 다 혜 · 계 명 찬

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Background & Objectives: 상피조직의 apical side에 형성되는 밀착결합 (Tight Junction, TJ)은 혈액-조직 사이의 확산장벽을 형성하여 조직 특이적 특수 환경 조성에 중요한 역할을 한다. 밀착결합은 occludin, claudins 등 integral membrane protein과 ZO-1, JAM 등의 plaque protein으로 구성되며 세포질 골격 및 다양한 신호전달 분자와 복합체를 형성한다. 따라서 다양한 조직에서 세포 내외부의 신호에 반응하여 그 구조와 기능이 역동적으로 조절된다. 자궁내막은 생식주기와 착상을 위한 준비과정 동안 주로 난소 스테로이드의 영향 하에 구조 및 기능적 분화를 진행한다. 자궁내막에 존재하는 상피와 혈

관내피세포에서 발현되는 밀착유전자들은 특히 착상의 준비와 진행에 필요한 환경 조성에 중요한 역할이 있을 것으로 추측되고 있으나 현재까지 이 시기 동안 자궁내막의 밀착결합의 분자적 구조 및 난소스테로이드에 의한 밀착결합 발현의 조절기작은 규명되지 않고 있다. 특히 여러 밀착결합 유전자들 가운데 JAM-1은 혈관 내피세포를 통한 neutrophil의 이동에 관여하므로 세포 간 확산장벽 뿐 아니라 세포 이동의 중요한 조절요인으로 알려져 있다. 본 연구에서는 생쥐 자궁에서 생식주기, 착상 전 후 기간 동안의 밀착결합 유전자인 JAM-1 유전자의 발현양상을 조사하였고 난소절제 생쥐모델을 이용하여 난소 스테로이드에 의한 JAM-1 유전자의 발현조절을 연구하였다.

Method: 생후 8주령의 성숙한 암컷 생쥐의 발정 주기를 질상피도말법으로 검색하여 주기별로 자궁 조직을 획득하였다. 또한 수컷과 교미 후 질전 형성일을 기준으로 임신 (GD) 6일의 자궁을 획득하였다. 특히 임신 6일에 Chicago Blue를 정맥주사 후 자궁을 착상부위와 비착상부위로 구분하여 절취하였다. 한편 암컷 생쥐에서 난소를 절제한 후 estrogen (E2) 또는 progesterone (P4)을 투여한 후 6, 12, 24시간 및 E2 주사 24시간에 P4를 주사하고 12시간 후에 자궁조직을 획득하였다 (E2 + P4). 조사대상 밀착결합 유전자로는 상피에서 주로 발현되는 JAM-1을 확인하였다. 자궁조직에서 에스트로겐의 영향을 확인하기 위해 lactoferrin의 발현을 확인하였다. 자궁조직 전체에서 JAM-1 mRNA의 발현정도는 최적화된 semiquantitative RT-PCR, Western blot으로 분석하였고, 부위특이적 발현은 laser captured microdissection (LCM) 및 면역조직화학법으로 분석하였다.

Results: JAM-1 mRNA 발현은 proestrous stage에 가장 높았으며 estrous stage까지 높게 유지되었고, metestrous 시기에 급격히 감소하였다가 diestrous 시기에 다시 증가하였다. LCM으로 획득한 내막 관상상피에서 다량의 JAM-1 mRNA가 확인되었다. 자궁에서 JAM-1 단백질 발현 부위는 내막 관상상피 및 분비선상피에서 확인되었다. Western blot 상에서 Mr. 36~40 kDa의 항원의 발현이 확인되었다. E2 또는 P4를 투여한 난소절제 생쥐의 자궁 (OVX)에서는 소량의 JAM-1이 발현되었으며, E2 투여 후 12시간에 높은 발현이 유도되었다가 이후 감소하였다. P4 단독 처리 후 6시간에 JAM-1의 발현은 대조군 보다 감소하였고 12시간 후에는 다시 증가하여 대조군 수준으로 회복되었다. E2 + P4 처리군에서는 P4 처리 후 시간에 따라 JAM-1의 발현이 감소되어 대조군 이하로 감소하였다. 착상 전후 임신 일자별로는 임신 3일에 가장 높은 발현을 보였으며 착상기인 임신 4.5일 이후에는 낮은 발현을 보였다. JAM-1은 특히 GD6의 비착상부위에서 착상부위보다 많이 발현되었다.

Conclusions: JAM-1은 자궁내막 상피세포 사이의 밀착결합에 의한 세포 간 확산장벽 형성과 기능에 중요한 요인으로 사료된다. 난포기 (증식기) 및 난소절제 E2 처리군에서 JAM-1 발현이 높으며 황체기 (분비기) 및 난소절제 E2 + P4 처리군에서 JAM-1 발현이 감소하므로 착상기 자궁내막 조직의 확산장벽이 감소에 관여할 것으로 사료된다.