

말 정소내 protein kinase C의 발현

진 재 광 · 신 태 균

제주대학교 농과대학 수의학과
(1998년 1월 5일 접수)

Expression of protein kinase C in the testes of horse

Jae-kwang Jin, Tae-kyun Shin

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Cheju National University,
Cheju 690-756, Korea*

(Received Jan 5, 1998)

Abstract : To investigate the involvement of protein kinase C(PKC) isoenzyme in the testes which control spermatogenesis and hormone secretion, we examined cellular distribution of four types of PKC α , β I, δ and θ in the horse testes using PKC antisera by western blot analysis and immunohistochemistry.

By the western blot analysis, PKC α and β I were detected at 82KD, while PKC δ and θ were detected at 80KD in the testes of both juvenile and adult horses. In juvenile horse, PKC α , δ and θ except β I were not detected in the cells of the testes, whereas PKC β I was immunoreacted with only in spermatocytes. In adult, PKC α , β I, δ and θ isoenzymes were localized in interstitial cells of the testes. In the seminiferous tubules, PKC β I is localized in spermatocyte, spermatid and spermatozoa, while PKC δ is localized only in spermatids.

We suggest that this is a first report to localize PKC in the testes of horse and PKC isoenzymes are upregulated in the cells of horse testes depending on ages. These findings also suggest that certain PKC isoenzyme plays an important role in the signal transduction of spermatogenic cells and interstitial cells in horse testes.

Key words : protein kinase C, horse, testes, western blot, immunohistochemistry.

서 론

Protein kinase C(PKC)는 transmembrane signal transduction에 중요한 역할을 담당하는 효소^{1,2}로써 뇌, 신장, 폐, 심장, 비장, 난소 및 정소 등 거의 모든 조직에 분포하며 세포의 분화와 증식에 관여하고 있다³. PKC는 domain 구성에 따라 conventional PKC(cPKC) α , β I, β II, γ 와 novel PKC(nPKC) δ , ϵ , ζ , η , θ 의 2가지 그룹으로 나누어 진다⁴. cPKC(α , β I, β II, γ)는 3개의 domain 즉, 인지질, DAG/phorbol ester 결합 C1 domain, 칼슘결합 C2 domain 그리고 촉매성 C3 domain을 함유하여 칼슘, 인지질, DAG에 의해 활성화 된다^{5,6}. 반면 nPKC(δ , ϵ , ζ , η)는 칼슘결합 C2 domain이 없으므로, Ca^{2+} 에 관계없이 활성화 될 수 있다^{6,7}. 이상과 같이 PKC 아형에 따라 서로 다른 경로를 통해 활성화 된 PKC는 세포 고유의 기능을 담당할 수 있게 된다⁶. 비록 PKC는 활성화 시킬 수 있는 인자에 의해 2군으로 구분되나 PKC는 아형에 따라 장기 및 조직 내에서 발현은 상당한 차이를 나타낼 뿐만아니라^{8,9} 비록 유전자수준에서 구조적으로 유사한 PKC 아형도 세포내 분포는 다른 것으로 알려지고 있다¹⁰.

정소는 생식세포 분화 및 음성 호르몬의 분비가 일어나는 장기로서 성장함에 따라 뇌하수체로부터 전달되는 FSH 등의 호르몬 뿐만아니라 간질세포에서 방출되는 음성 호르몬 등에 의해 끝은 정세관내 정자발생세포는 분화하여 정자를 생산하게 된다. 이와같은 세포분화 과정에는 PKC와 같은 신호전달효소가 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며^{10,11}, nPKC δ 와 같은 일부 PKC 아형이 결손될 경우 음성 불임을 초래하기도 한다¹¹. 지금까지 일부 PKC 아형이 수컷 생식기 계통에서 확인되었으나¹²⁻¹⁴, 정소내에서 PKC 아형에 따른 세포내 발현에 대해서는 알려진 바 많지 않으며 더구나 가축의 정소에서는 보고된 바 거의 없다.

본 연구에서는 성장함에 따른 정소내 PKC의 역할을 확인하기 위하여 말의 정소조직에서 PKC 아형의 발현 양상을 면역조직화학적으로 비교 검사하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 실험에 이용된 말의 정소는 더러브렛종 7두(1년생 미만 1두, 3년생 이상 6두)로부터 거세를 통해

얻었다.

항체 및 시약 : 사용한 1차 항체는 rabbit anti-PKC α , rabbit anti-PKC β I, rabbit anti-PKC δ , rabbit anti-PKC θ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)를 사용하였으며, 면역조직화학은 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하였다. 그리고 western blotting을 위한 시약은 Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA)에서 구입하여 사용하였고, horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG와 3,3-diaminobenzidine DAB)는 Sigma로부터 구입하였다.

Western blotting : 냉동보관(-70℃)된 조직을 10% phosphate buffered saline(PBS) 용액에 균질화 하고, 12,000g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 취하여 Lowry(1951)법으로 정량한 다음, 30µg/ml 되게 2x SDS sample buffer [10% SDS, 1% bromophenyl blue, glycerol, 0.5M tris-HCl, pH 8.0]를 첨가한 후 5분동안 boiling 한 다음, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다(Laemmli, 1970). Separating gel로는 7.5% linear gradient gel을 사용하였으며, stacking gel의 acrylamide 농도는 4.5% 였다. 전기영동이 끝난 겔은 coomassie blue R-250으로 염색한 후 단백질의 분리양상을 조사하였다.

전기영동이 끝난 후 전이완충용액(25mM Tris, 14.4g glycine, 20%v/v methanol, pH 8.3)을 이용하여 100mA에서 4시간동안 니트로셀룰로오스 막(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)에 전이하였다. 전이가 끝나면 니트로셀룰로오스를 blocking solution [5% BSA ; bovine serum albumin/TBS ; tris-buffered saline(50mM Tris, 20mM NaCl, pH 7.4)]에서 1시간동안 반응시켰다. 그후 TBS-5% BSA 용액에 희석한 rabbit anti-PKC α (1:1,000), PKC β I (1:1,000), PKC θ (1:1,000), PKC δ (1:1,000)를 넣고 4℃에서 overnight 시킨 후 horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG(1:1,000, TBS)를 1시간 반응시켜 TBS 용액으로 5분간 두번, TNT(0.1% Triton X-100/TBS) 용액으로 한번 수세후 diaminobenzidine(DAB)를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 수세하여 발색을 정지시켰다.

면역조직화학 염색 : 조직을 10% buffered formalin 용액에서 고정시킨 후 ethanol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 paraffin에 포매한 후 5µm 두께로 절편을 만들었다. 파라핀을 제거한 후 조직절편을 항체에 반응시키기 전에 내재성 peroxidase를 제거하기 위하여 3% H₂O

를 첨가한 methanol 용액에 20분간 반응시켰으며, 비특이적 면역반응을 방지하기 위하여 10% normal goat serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체 rabbit anti-PKC α (1:100), PKC β I (1:100), PKC δ (1:100), PKC θ (1:100)를 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 biotinylated anti-rabbit IgG(1:200)를 실온에서 45분간 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase complex(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 실온에서 45분간 반응시켰으며, 각 단계 별 반응후에는 PBS로 5분간 3회 충분히 세척하였다. 면역반응이 끝난 조직은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.5mg/ml) 용액에 H₂O₂가 0.009% 되게 희석된 용액에서 발색반응을 나타내었다. 양성반응이 나타난 조직을 hematoxylin 용액으로 대조염색을 하고, ethanol, xylenes의 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

Western blotting analysis : 말의 정소에서 PKC α , PKC β I, PKC δ 그리고 PKC θ isoenzyme의 발현을 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다. cPKC인 PKC α , PKC β I는 대략 82KD에서 면역반응을 보였으며(Fig 1), nPKC인 PKC δ 와 PKC θ 는 약 80KD에서 면역반응을 보였었다(Fig 1).

Table 1. Cellular distribution of PKC α , PKC β I, PKC δ and θ in juvenile(below 1 year) and adult(over 3 years) horse testes

Age	PKC α	PKC β I	PKC δ	PKC θ	cell/tissue
Juvenile	-	-	-	-	Leydig cell
	-	-	-	-	Sertoli cell
	-	-	-	-	spermatogonium
	-	+	-	-	spermatocyte
	-	-	-	-	spermatid
	-	-	-	-	spermatozoa
Adult	++	+	++	++	Leydig cell
	-	-	-	-	Sertoli cell
	-	-	-	-	spermatogonium
	-	+	-	-	spermatocyte
	-	+	-	++	spermatid
	-	++	-	-	spermatozoa

Abbreviations : -, negative ; +, weak ; ++, intense.

면역조직화학 염색 : 미성숙한 말의 정소내 간질세포, Sertoli cell 그리고 정세관내 어느 세포에서도 cPKC인 PKC α (Fig 2A) 그리고 nPKC인 PKC δ (Fig 2E), PKC θ (Fig 2G)는 양성반응이 관찰되지 않았으나 PKC β I (Fig 2C)은 정소의 정세관내 정모세포에서 약한 양성반응이 관찰되었다.

성숙한 말 정소에서는 간질세포에서 정도의 차이는 있으나 PKC α (Fig 2B), PKC β I (Fig 2D), PKC δ (Fig 2F) 그리고 PKC θ (Fig 2H) 모두 발현되었다. 정세관내에서는 정자 및 정모세포, 정자세포에서 PKC β I (Fig 2D), 정자세포에서 PKC δ (Fig 2F)가 각각 면역반응을 보인 반면 다른 PKC 아형은 양성세포가 확인되지 않았다(Table 1).

고 찰

본 실험에서 말의 정소내 PKC의 발현여부를 조사한 바 cPKC인 PKC α , PKC β I 그리고 nPKC인 PKC δ , PKC θ 등 조사한 4종의 PKC가 말의 정소내에 발현함을 처음으로 확인하였으며, 이 결과는 mouse의 정소에서 PKC mRNA의 발현을 조사한 Mischak *et al*¹⁴의 northern blot 결과와 일치하는 경향이였다. 그러나 mouse의 정소 내에서는 PKC의 발현이 다른 PKC 아형에 비해 많이 발현된다고 한 northern blot 결과¹⁴와 차이는 있으나 PKC는 뇌조직¹⁵에서 뿐만 아니라 정소내 신호전달체계에서도 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다.

성숙함에 따른 말의 정소내 PKC의 발현을 western blotting한 결과로 비교한 결과 정자세포가 발생되지 않은 1년생 이하 말과 정자가 꼭정세관내에서 확인되는 성숙한 말의 경우 조사한 4종의 PKC(α , β I, δ , θ) 아형은 두 연령군 모두에서 발현됨을 확인하였다. 비록 본 실험에서는 정량적 분석이 이루어지지 않아 발현정도를 연령에 따라 비교하기는 곤란하였으나 PKC와 같이 mouse 정자세포의 발육¹¹과 관련성이 큰 PKC 아형은 말의 경우에서도 성숙함에 따라 발현도 증가할 것으로 생각된다. 이와같이 발육단계에 따른 PKC의 발현차이는 뇌조직에서도 분명하게 나타난다고 한다¹⁶.

본 실험에서 4종의 PKC 아형이 모두 확인된 western blot 결과와 달리 면역조직화학적 소견상 미성숙한 말의 정소에서는 정모세포에서 PKC β I만이 양성인 반면 PKC α , δ , θ 는 정소내 어느 세포에서도 확인되지 않았다. 이와같이 PKC는 아형에 따라 미숙한 말의 정소내에

서 면역양성세포를 동정하기 어려운 점은 정소내 세포에서 극히 적은 PKC를 발현함으로써 면역조직화학적 소견에서는 확인되지 않았을 것으로 생각된다.

정소내 세포형에 따라 PKC 아형의 발현을 비교해보면 mouse 정소 간질세포에서 PKC α ¹⁷ 및 PKC θ ¹⁰ 등이 단편적으로 확인된 바 있으나 본 실험에서 말의 경우 조사한 4종의 PKC(α , β I, δ , θ)가 모두 확인되어 이들은 말의 정소 간질세포에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 이와같은 소견은 PKC δ 가 정자세포 특이성을 갖는다¹¹는 기존의 결과와 다소 다른점으로써 동물간의 차이로 생각된다. 이와같은 PKC 발현에 관한 종간의 차이는 안구에서도 확인되어 포유류에서는 안구 망막내 muller cell에서 그리고 금붕어에서는 망막내 일부 신경절세포에서 면역양성반응을 보인다고 한다⁸.

Sertoli cell에서 PKC의 발현을 비교해 보면 PKC α 가 Sertoli cell line에서 발현된다¹⁷고 보고하였고, Wetsel et al³은 랫드의 정소를 면역조직화학 염색결과 Sertoli cell에 PKC β I이 분포한다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 말의 정소조직을 면역조직화학 염색한 결과 조사한 PKC α , PKC β I, PKC δ 그리고 PKC θ 모두 양성반응을 나타내지 않아 큰 차이를 보였으며 이와같은 결과는 염색방법에 따른 차이거나 또한 동물에 따른 차이라고 생각된다.

정모세포에서 PKC isoenzyme의 정소내 세포형태별 분포여부에 대한 연구결과 본 실험에서 처음으로 PKC β I이 미성숙한 말의 정소 정모세포에서 분포하고 있음을 확인하였다. 이는 이 isoenzyme이 정자를 형성하기 위해 진행중인 정모세포의 분화과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 특히 성성숙한 말의 정소 곡정세관내 정자세포와 정자도 PKC β I을 발현하고 있는 점으로 보아 정모세포로부터 정자에 이르기까지 전과정에 걸쳐 avidin-biotin complex 법에 의해 확인될 수 있는 유일한 PKC 아형으로 생각된다.

정자세포에서 PKC δ 는 정자세포의 분화에 중요한 인자로 알려져 있으며¹¹, 그의 PKC isoenzyme인 PKC α , PKC β I 그리고 PKC θ 의 분포여부에 대한 연구는 보고된 바는 없다. 본 실험에서도 PKC δ 만이 정자세포에서 양성반응을 보인점으로 보아 말에서도 정자형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

정자에서 PKC의 발현은 정자의 선체반응⁹ 및 편모운

동¹⁸에 관여하며, 소의 정자를 분리하여 PKC를 검사한 결과 PKC α , PKC β I이 발현된다¹³고 보고하였으나 말의 정소내 정자에서는 PKC α 의 양성반응은 관찰되지 않았고, PKC β I은 소¹³에서와 같이 양성반응을 보였다. 이와같은 소견은 PKC β I의 경우 미성숙 단계의 정모세포에서부터 정자에 이를 때까지 이들 세포계에서 중요한 역할을 담당하며, 그 외 PKC 아형은 정자형성세포 자체가 유전자를 가지고 있으면서 발달단계에 따라 mRNA를 형성함과 동시에 막투과 신호전달에 활용될 수 있는 protein을 생산하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 말의 정소에서는 cPKC인 PKC α , β I 그리고 nPKC인 PKC δ 와 θ 가 발현되고 있으며, PKC 아형에 따라 정자발생 및 음성 호르몬 분비에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 정소내 각 PKC의 특성규명은 번식과 관련된 세포의 신호전달체계의 이해에 도움을 줄 것으로 생각된다.

결론

정자발생 및 음성호르몬을 분비하는 정소내 PKC의 역할을 유추하기 위하여 말의 정소를 대상으로 PKC의 발현양상을 western blotting과 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다. Western blot 결과 미성숙 및 성성숙한 말의 정소에서 조사한 4종의 PKC α , PKC β I, PKC δ 그리고 PKC θ 의 발현이 확인되었다. 면역염색 결과 미성숙한 말(1년생 이하)의 정소에서는 정모세포에서 PKC β I만이 양성반응을 보인 반면 PKC α , PKC δ 및 PKC θ 는 어느 세포에서도 양성반응을 나타내지 않았다. 성성숙한 말(3년생 이상)의 정소에서 PKC β I은 정모세포 및 정자에 이르기까지 양성반응을 보인 반면 PKC δ 는 정자세포 특이성을 나타내었으며, 간질세포에서는 조사한 4종의 PKC α , β I, δ 및 θ 모두 인정되었다. 이상의 결과는 말의 정소내 신호전달효소 PKC α , β I, δ , θ 의 발현을 조사한 첫 보고이며 특히 PKC β I은 정자형성세포계에서, PKC δ 는 정자세포 특이성을 가진 신호전달효소로 생각되며, 정소내에서 발현되는 PKC 아형의 특성규명은 번식과 관련된 연구에 도움을 줄 것으로 생각된다.

감사의 글 : 말의 고환조직을 제공해주신 김희석 교수님과 한국마사회 최종복님께 깊이 감사드립니다.

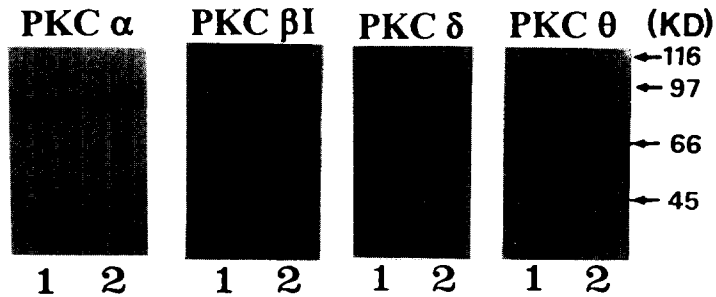


Fig 1. Western blot analysis of PKC α , PKC β I, PKC δ and PKC θ in the testes of adult(lane 1) and juvenile(lane 2) horses.

참 고 문 헌

- Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*, 225:1365-1370, 1984.
- Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233:305-312, 1986.
- Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, *et al.* Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol*, 117:121-133, 1992.
- Nishizuka Y. Studies and perspectives of the protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer*, 63: 1892-1903, 1989.
- Burns DJ, Bloomenthal J, Lee MH, *et al.* Expression of the α , β II, and γ protein kinase C isozymes in the baculovirus-insect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms. *J Biol Chem*, 265:12044-12051, 1990.
- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334:661-665, 1988.
- Osada S, Mizuno K, Saido TC, *et al.* A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J Biol Chem*, 265:22434-22440, 1990.
- Osborne NN, Wood J, Groome N. The occurrence of three calcium-independent protein kinase C subspecies (δ , ϵ and ζ) in retina of different species. *Brain Res*, 637:156-162, 1994.
- Brandt SJ, Nield JE, Bell RM. Distinct pattern of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues. *Cell*, 49:57-63, 1987.
- Shin T, Jin JK, Kim SJ, *et al.* Immunohistochemical localization of protein kinase C in mouse tissues. *Korean J of Lab Anim Sci*, 12:189-191, 1996.
- Um JY, Choi BM, Kim JS, *et al.* Expression of protein kinase C gene in germ cells. *J Urol*, 154:1237-1240, 1995.
- Breitbart H, Lax J, Rotem R, *et al.* Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J*, 281:473-476, 1992.
- Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H. Subcellular distribution of protein kinase C and I in bovine spermatozoa and their regulation by calcium and phorbol ester. *Biol Reprod*, 56:454-459, 1997.
- Mischak H, Goodnight J, Henderson DW, *et al.* Unique expression pattern of protein kinase C- δ : high mRNA levels in normal mouse testes and in T-lymphocyte cells and neoplasms. *FEBS Lett*, 326:51-55, 1993.
- Mochly-Rosen D, Basbaum AI, and Koshland DE. Dis

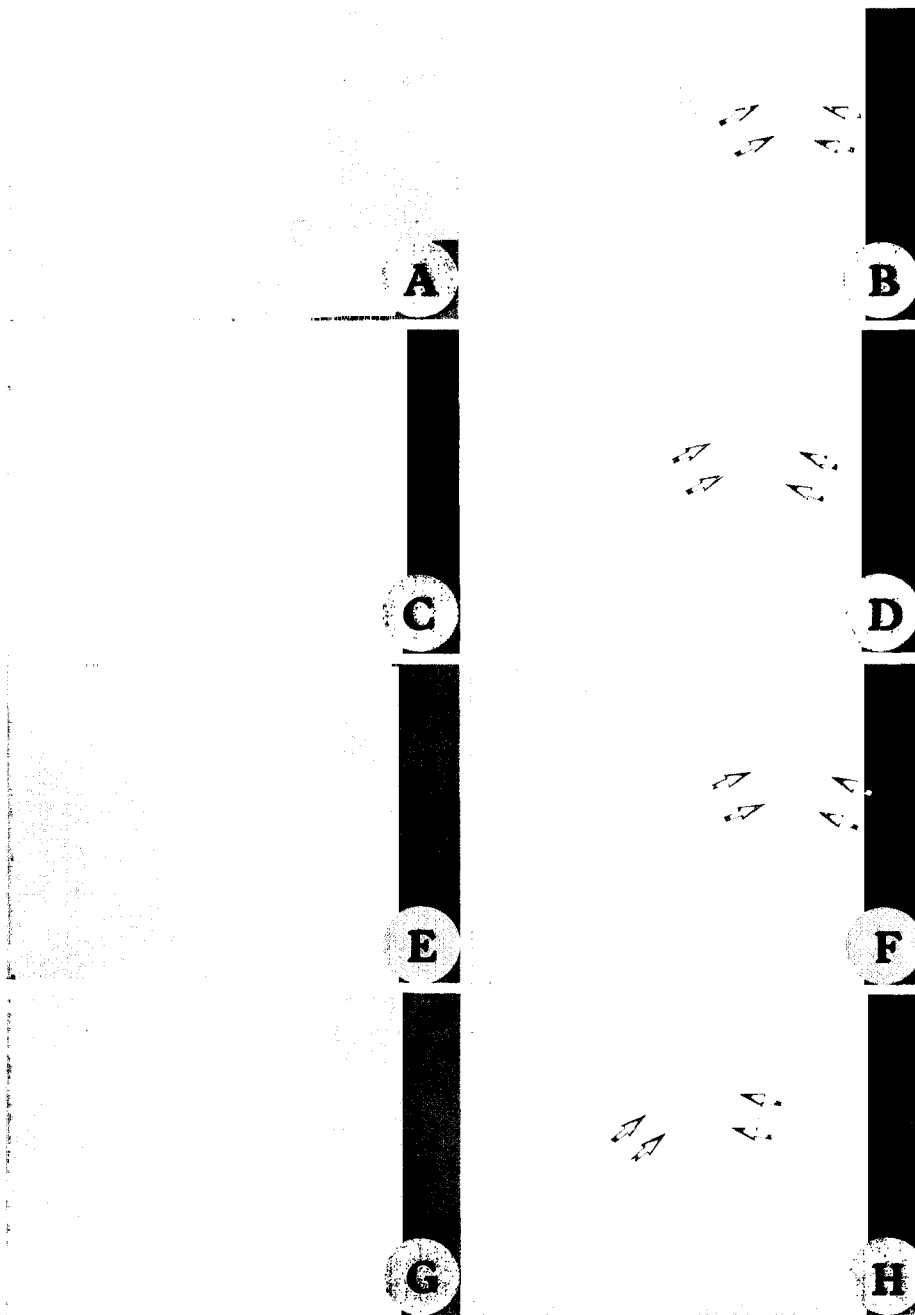


Fig 2. Immunostaining of PKC α , PKC β 1, PKC β 1, PKC δ and PKC θ in juvenile and adult horse testes by avidin-biotin complex method. In juvenile testes, immunoreactivity of PKC α (A), PKC δ (E) and PKC θ (G) is not detected in any cells, and PKC β 1 (B) is seen in the spermatocyte (arrow head). In adult testes, immunoreactivity of PKC α (B), PKC β 1 (D), PKC δ (F) and PKC θ (H) is localized in interstitial cells (arrow). In the seminiferous tubules, PKC β 1 (D) is localized in spermatocytes, spermatids and spermatozoa (star), while PKC δ (F) is localized only in spermatids (star).

- tinct cellular and regional localization of immunoreactive protein kinase C in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:4660-4664, 1987.
16. Yoshida Y, Huang FL, Nakabayashi H, *et al.* Tissue distribution and developmental expression of protein kinase C isoenzymes. *J Biol Chem*, 263:9868-9873, 1988.
 17. Pelosin JM, Ricouart A, Sergheraert C. Expression of protein kinase C isoforms in various steroidogenic cell types. *Mol Cell Endocrinol*, 75:149-155, 1991.
 18. Rotem R, Paz GF, Hominnai ZT, *et al.* Ca²⁺-independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm. *Endocrinology*, 131:2235-2243, 1992.