

인간 조직에서 Heat Shock Protein A2 (*HspA2*) 단백질의 발현

대진의료재단 분당 제생병원 불임 및 생식의학연구소¹, 진단병리과², 산부인과³, 비뇨기과⁴,
서강대학교 이과대학 생명과학과⁵

손원영^{1,5} · 황서하⁵ · 한징택⁵ · 이재호¹ · 최윤정² · 김석중^{1,3} · 김영찬^{1,4}

Expression of Heat Shock Protein *HspA2* in Human Tissues

W.Y. Son^{1,5}, S.H. Hwang⁵, C.T. Han⁵, J.H. Lee¹, Y.J. Choi², S. Kim^{1,3} and Y.C. Kim^{1,4}

¹Center for Reproduction and Genetics, ²Department of Pathology, ³Department of OB/GY,

⁴Department of Urology, Pundang Jesaeng General Hospital, Daejin Medical Center, Kyungki-Do, 463-050, Korea, ⁵Department of Life Science, Sogang University, Seoul, Korea

= Abstract =

In mouse, the heat shock protein 70-2 (*hsp70-2*) is found to have special function in spermatogenesis. Based on the observation, the hypothesis that human *hspA2* (human gene; 98.2% amino acid homology with *hsp70-2*) might have important function in spermatogenesis in human testes was proposed. To test the hypothesis, we examined the expression of *hspA2* in human tissues.

Expression vector pDMC4 for expression of the human *hspA2* protein using pTricHisB (invitrogen, USA) was constructed and the expressed *hspA2* protein was cross-reacted with antiserum 2A raised against mouse *hsp70-2* protein. Based on the cross-reactivity, we determined the expression level of *hspA2* protein in human tissues by western blot analysis using the antiserum 2A.

We demonstrated that antiserum 2A antibodies detected human *hspA2* protein with specificity which was produced in the *E.coli* expression system. On Western blot analyses, significant *hspA2* expression was observed in testes with normal spermatogenesis, whereas a low level of *hspA2* was expressed in testis with Sertoli-cell only syndrome. Also, a small amount of *hspA2* was detected in breast, stomach, prostate, colon, liver, ovary, and epididymis. These results demonstrate that the *hspA2* protein is highly expressed in male specific germ cells, which in turn suggests that *hspA2* protein might play a specific role during meiosis in human testes as suggested in the murine model. However, further studies should be attempted to determine the function of *hspA2* protein in human spermatogenesis.

Key Words: Spermatogenesis, *hspA2* protein, Sertoli-cell only syndrome, and western blot analysis

서 론

정자형성은 미성숙 남성 생식세포로부터 체세

포 분열과 감수분열, 그리고 세포 분화의 복잡한 과정을 통하여 이루어진다. 이들 과정 중에 특정 단백질 발현과 그 발현 양의 변화에 의해 세포의 형태 그리고 기능의 변화가 이루어진다.

Heat shock protein (*hsp*)들은 세포들이 여러가지 스트레스를 받을 때 그것에 대한 방어 작용으로서 세포 내에서 빠르게 합성되는 단백질이다 (Miller 등, 1991). 방어 작용으로 뿐만 아니라 어떤 *hsp*들은 스트레스에 의하지 않고도 일정하게 발현이 되어 이들이 세포 내에서 다양한 기능에 관여하고 있다고 보고되고 있다. *Hsp*들은 주로 단백질의 degradation, 단백질의 folding, assembly, 그리고 transport의 기능과 관련이 있다고 알려져 있다 (Georgopoulos 등, 1993). *Hsp*들은 또한 germ cell 분화 등과 같은 발생과정에서 중요한 역할을 한다고도 알려져 있다. 이들 *hsp*들 중에 가장 풍부하고 일반적인 단백질은 70 kDa 범위의 단백질들 (*hsp70*)이다.

생쥐에서 정자형성 과정 동안에 발현이 되는 *hsp70*으로 태사기 정모세포 단계에서 높은 수준으로 발현하는 *hsp70-2* 단백질 (Allen 등, 1988)에 대한 연구가 최근까지 이루어져, 생쥐 생식세포에서 *hsp70-2* 단백질은 *hsp70-2* 유전자의 산물이라는 것이 밝혀졌다 (Rosario 등, 1992), 이 유전자는 인간의 *hspA2* 유전자와 아미노산 서열이 98.2%로 동일하여 아마 인간에서는 *hspA2* 단백질이 생쥐의 *hsp70-2* 단백질과 같은 기능을 할 것이라고 생각 (Bonnycastle 등, 1994)은 되나 아직 규명은 되지 않은 상태이다.

본 실험은 인간의 *hspA2* 유전자의 산물을 대장균을 통하여 발현시킨 후 생쥐의 *hsp70-2* 단백질의 발현을 연구하는데 사용했던 antiserum 2A를 적용하여, 그 항체가 인간의 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있는지를 증명하고자 하였고, 이를 토대로 인간의 여러 조직에서 *hspA2* 단백질 발현을 연구하여 *hspA2* 단백질이 남성 생식세포의 발달과 관련이 있는지를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *HspA2* 단백질을 얻기 위한 expression vector의 제조

HspA2 gene의 open reading frame (ORF)을 증폭시키기 위한 primers를 제작하였으며, plasmid에 cloning을 용이하게 하기 위하여 한쪽 primer는 *EcoRI* 제한효소 site를 넣어서 제조하였고 다른 한쪽은 *HindIII* 제한효소 site를 넣어 제조하였다. sense primer의 sequence는 5'-gctcggattcagtcaggatgctg-3'이었고 antisense primer는 5'-agtccaagcttagtccacttc-

ttcgat-3'이었다. Genomic DNA는 다음과 같이 준비하였다. 정상적으로 정자 생성이 일어나는 정소 조직을 1.5 ml microcentrifuge tube에 담고, 미리 60~65°C로 예열시킨 proteinase K 용해 용액 (0.5% SDS, 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris [pH8.0], 2 mM EDTA)에 신선한 proteinase K를 최종 농도가 100 µg/ml가 되도록 만든 다음 이 용액 200 µl를 조직에 가하고 6시간 동안 60~65°C로 유지하며 세포를 용해시켰다. 여기에 8 M potassium acetate 37.5 µl를 넣고 잘 섞은 후 chloroform 250 µl를 첨가하여 얼음에 30분 정도 방치하고, 이어 10,000 rpm으로 8분간 원심 분리하여 상층 액을 얻었다. 이 상층 액을 에탄올로 침전시킨 후 RNase처리로 RNA를 제거하여 DNA를 얻었다. *HspA2* 단백질의 open reading frame (ORF)은 중합효소 반응으로 증폭하였다. 중합효소 반응은 94°C에서 1분, 62°C에서 30초, 그리고 72°C에서 2분 동안 진행시키는 cycle로 35 cycle 실행하였고 마지막에 72°C에서 10분 동안 반응시켰다. 중합효소 반응에 의해서 합성된 ORF의 크기는 1.93 kbp로서 *EcoRI/HindIII* 제한효소로 처리한 후 agarose gel에서 electroelution하여 pBS plasmid에 cloning, *E.coli* strain Top10+에 transformation 시킨 후 증폭된 산물이 맞는지 sequencing하여 확인하였다 (Fig. 1. Schematic diagram). Plasmid pDMC3를 *E.coli*에서 증폭시켜 회수한 후 *EcoRI/HindIII* 제한효소로 잘라서 electroelution하여 ORF를 회수하였다. 회수된 ORF는 expression vector인 pTrcHisB (Invitrogen, USA)에 cloning하여 *hspA2* expression vector pDMC4를 준비하였다. *HspA2* 단백질의 발현은 IPTG 1 mM을 사용하여 시간 별로 2, 4시간 동안 유도하였으며 생쥐의 *hsp70-2* 단백질의 항체 antiserum 2A를 사용하여 발현시킨 인간의 *hspA2* 단백질과의 cross-reactivity를 시험하였다.

2. 조직의 준비

불임을 주소로 내원한 무정자증 환자들 중 고환 조직 검사를 시행하여, 폐쇄성 무정자증을 가진 정상적인 정자형성이 일어나는 환자와 썬토리 세포 증후군 환자의 고환 조직, 그리고 조직 검사 후 정상으로 나타난 인간 조직들을 회수 후, 즉시 액체 질소에 담가 실험 때까지 냉동 보관하였다.

3. 단백질 용액의 준비

액체 질소에 보관한 조직들을 신선하게 준비된

단백질 lysis buffer (50 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinin)에서 균질화시켜 단백질 균질액을 준비하였다. 그 균질액을 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 윗 용액을 취한 후 SDS-PAGE와 western blot 분석에 사용하였다. 조직들의 추출물의 단백질 농도는 micro BCA assay 방법을 사용하였다.

4. Western blot 분석

조직들로부터 전체 단백질 20 µg을 SDS 단백질 sample buffer (62.5 mM Tris pH6.8, 40 mM DTT, 2% SDS, 0.025% bromophenol blue, 10% glycerol) 10 µl에 resuspension시킨 후 5분 동안 boiling하고 12% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 electrotransfer하였다. 그 blots을 5% non-

fat dried milk가 첨가되어 있는 TBS-T (TBS buffer + 0.1% Tween 20)로 1시간 동안 상온에서 blocking을 시키고 TBS-T로 3회 세척 후 antiserum 2A (1:2,000 희석)를 첨가하여 1차 반응을 시켰다. TBS-T로 3회 세척 후 anti-rabbit 항체를 사용하여 2차 반응을 시킨 후, 그 단백질은 기질인 4-chloro-1-naphtol을 사용하여 detection 하였다.

결 과

1. *HspA2* expression in *E. coli* with expression vector

생쥐의 *hsp70-2* 단백질만을 특이하게 인지하는 antiserum 2A가 인간에서 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있는지를 증명하기 위하여 대장균 발현 시스템을 이용하였다. Fig. 2A는 expression vector가 있는 *E. coli*를 IPTG 1 mM로 induction한 후

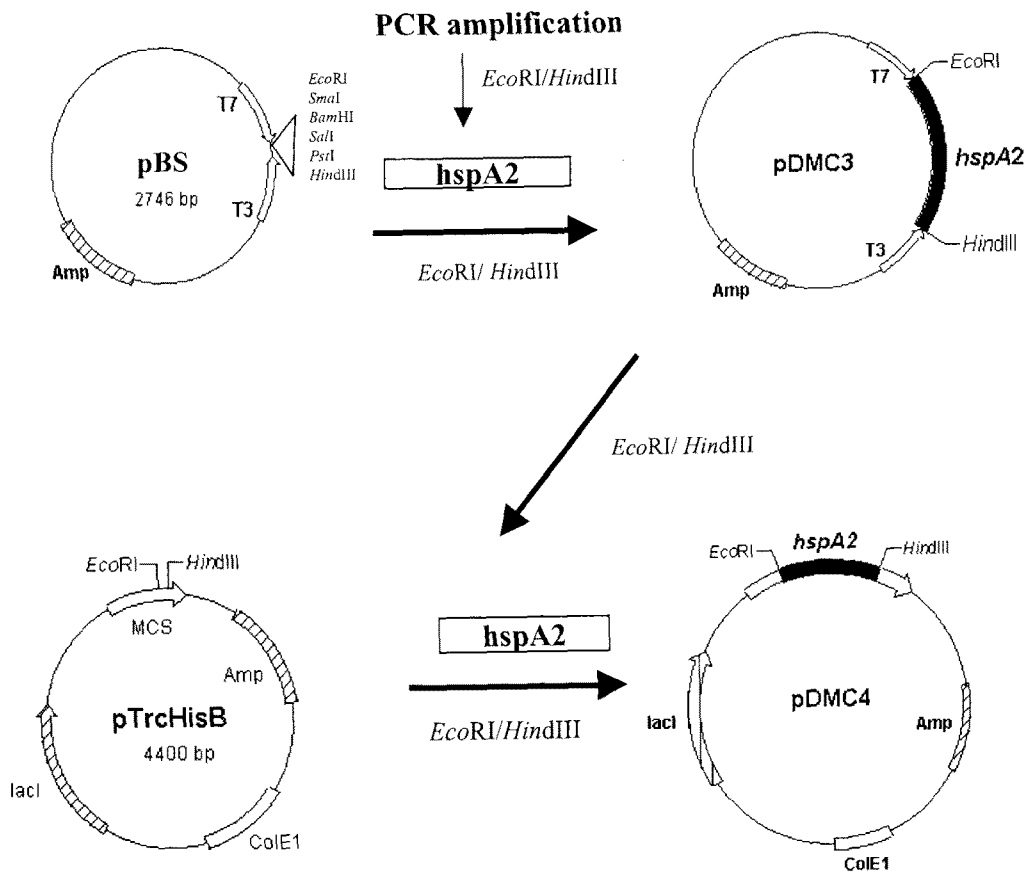


Fig. 1. Schematic diagram for construction of expression vector, pDMC4.

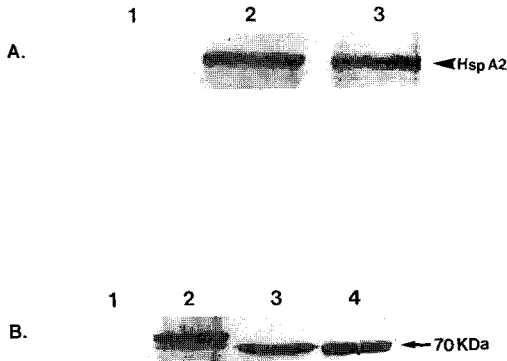


Fig. 2. Expression of *hspA2* protein in *E. coli*; (A) induction of *hspA2* protein by IPTG 1 mM following 0, 2, and 4 hours; (B) For western blot; Lanes; 1, IPTG non-induced control; 2, *hspA2* induced by 1 mM IPTG for 2 hours; 3, *hspA2* in human testis extract; 4, *hsp70-2* in mouse testis extract.

antiserum 2A로 western blot한 결과이다. 1번 줄은 IPTG로 induction하지 않은 control군, 2번 줄은 2시간 induction한 군, 3번 줄은 4시간 동안 *hspA2* 단백질을 유도한 군이다. Western blot 결과에서 볼 수 있듯이 2시간과 4시간 동안 1 mM IPTG induction 후에 발현 양의 차이는 없었으며 따라서 2시간을 조건으로 *hspA2* fusion 단백질을 발현시켜 인간과 생쥐의 정소 조직의 균질액과 같이 western blot하여 보았다 (Fig. 2B). Antiserum 2A에 의해 인간과 쥐의 정소 조직에서 같은 크기의 단백질이 western blot으로 나타났고 (lanes 3, 4) 대장균에서 발현시킨 *hspA2* fusion 단백질도 같이 관찰되어 (lane 2)이 항체가 생쥐에서 *hsp70-2* 단백질을 인지하는 것과 같이 인간의 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있다는 것을 확인하였다.

2. Expression of Heat Shock Protein A2 in Human Tissue

Antiserum 2A가 인간의 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있다는 것을 확인한 후 인간의 여러 조직에서 이 단백질의 발현 정도를 비교해 보고자 하였다. Fig. 3은 인간의 여러 조직의 단백질 균질액을 SDS-PAGE한 후 antiserum 2A로 western blot한 결과를 나타낸 그림이다. 정상적으로 정자형성이 되는 폐쇄성 무정자증 환자의 고환 조직에서 *hspA2* 단백질의 발현이 남성의 생식세포가 없는 비 폐쇄성 씨토리 증후군을 가진 고환 조직에 비해 아주 높게 증가되는 것을 볼 수 있으며

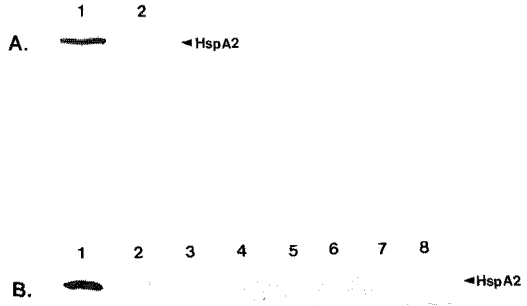


Fig. 3. Expression of the *HspA2* protein in human tissues. (A) Lanes; 1, testis with normal spermatogenesis; 2, testis with Sertoli-cell only syndrome; (B) Lanes; 1, testis with normal spermatogenesis; 2, breast; 3, stomach; 4, prostate; 5, colon; 6, liver; 7, ovary; 8, epididymis.

(Fig. 3A, lanes 1, 2), 여성 생식세포가 있는 ovary에서는 낮은 정도로 발현이 일어났다 (Fig. 3B, lane 7). 또한 breast, stomach, prostate, colon, liver, 그리고 epididymis 등의 조직에서도 아주 낮게 단백질의 발현이 관찰되었다 (Fig. 3B, lanes 2, 3, 4, 5, 6, 8). 따라서 인간의 *hspA2* 단백질이 주로 남성 생식세포에서 발현되는 것을 알 수 있다.

고 찰

우리는 본 실험을 통하여 다른 인간의 조직과 달리 정상적으로 정자형성이 이루어지고 있는 고환 조직의 생식세포에서 인간의 *hspA2* 단백질이 유의성 있게 높이 발현됨을 볼 수 있어, 이를 통하여 *hspA2* 단백질이 인간의 정자형성 과정에서 중요한 역할을 할 것이라는 것을 알 수 있었다.

Allen 등 (1988)은 생쥐의 정자형성 과정에서 heat shock에 의한 stress에 의하지 않고도 계속적으로 발현이 되는 단백질을 동정하였으며 그 단백질을 P70으로 명명하였다. 또한 생식세포들을 각 단계별로 분리하여 P70 단백질이 세포의 분화과정 중 태사기 정자형성 단계에서 특히하게 가장 많이 발현된다는 것을 보고하였다 (Allen 등, 1988). 같은 연구팀의 Rosario 등 (1992)은 P70 단백질이 *hsp70-2* gene의 산물임을 확인하여 P70 단백질을 *hsp70-2* 단백질이라고 하였으며 생식세포와 체세포의 다른 heat shock 단백질과 결합하지 않는 *hsp70-2* 단백질에 대한 antiserum 2A를 얻어 western blot 방법으로 이를 증명하였다. *Hsp70-2* 단백

질이 음성 생쥐의 정자형성에 중요하게 작용할 것이라는 직접적인 증거는 같은 연구팀의 Dix 등 (1996)의 연구에 의해 밝혀졌는데 그들은 *gene targeting* 방법으로 *hsp70-2* 유전자의 발현을 제거했을 때 자성 생쥐는 이상이 없었으나 음성 생쥐는 정자형성이 1차 정모세포 단계에서 정지되고 불임을 유발함을 보고하였다.

위의 설치류를 통한 연구들을 우리는 인간의 정자형성을 연구하는데 적용하여 보았다. 생쥐의 *hsp70-2* 단백질과 가장 유사성이 높은 인간의 단백질은 *hspA2*이다 (Bonnycastle 등, 1994). 이 단백질은 설치류의 *hsp70-2* 단백질과 98.2%의 아미노산 배열의 동일성을 가지고 있다 (Bonnycastle 등, 1994). 따라서 *hsp70-2* 단백질을 인지하는 antiserum 2A가 인간에서는 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있을 것이라고 생각되나 우리는 antiserum 2A를 만드는데 사용했던 peptide sequence 부분이 인간의 *hspA2* 단백질과 아미노산 서열이 가장 많이 틀리는 부분이라는 것을 확인하게 되었다. *Hsp70-2* 단백질의 611번부터 628번까지를 antiserum 2A를 만드는데 사용했는데 서열은 NH₂-SKLYQ-GGPGGGGSSGGPT-COOH이고 그 부분의 *hspA2* 아미노산 서열은 *hspA2* 단백질의 611번부터 634번으로 NH₂-SKLYQGGPGGGSGGGSGGASGGPT-COOH 부분이다. 따라서 생쥐의 *hsp70-2* 단백질의 경우 인간의 *hspA2* 단백질의 622번부터 627번까지 deletion되어있고 *hsp70-2* 단백질의 623번 serine아미노산이 인간의 *hspA2*는 adenine아미노산으로 차이가 난다. 따라서 우리는 이 antiserum 2A가 인간의 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있는지를 일차적으로 연구하여 보았다. 인간의 *hspA2* 유전자를 Fig. 1과 같이 cloning하여 대장균에서 발현시켜 antiserum 2A를 사용, western blot으로 확인한 결과 히스티딘과 다른 아미노산들이 같이 결합되어 발현된 약 73 kDa의 fusion 단백질이 detect되어 antiserum 2A가 인간의 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있다는 것을 확인하였고 따라서 인간의 *hspA2* 단백질이 생쥐의 *hsp70-2* 단백질과 유사한 기능을 할 것이라고 생각되었다.

Bonnycastle 등 (1994)은 *hspA2* mRNA의 발현이 거의 모든 인간의 조직에서 constitutive하게 발현이 되는데 정소에서는 유의차 있게 많이 발현됨을 관찰하였다. 생식세포에서 대부분의 mRNA는 단백질과 결합되어 있는 mRNP의 형태로 존재하여 mRNA와 단백질의 발현에서 차이가 보일 수

있다. 따라서 우리는 *hspA2* 단백질의 발현을 인간의 조직에서 연구하여 보았다. 그 결과 mRNA 발현과 유사하게 정상적으로 정자형성이 일어나고 있는 인간의 고환 조직에서 대부분의 다른 인간 조직들에 비해 유의성 있게 높은 *hspA2* 단백질의 발현을 보여 주었다 (Fig. 3). 이 결과는 *hspA2*의 발현이 유전자의 전사 단계에서 주요하게 조절됨을 나타내어 준다. 또한 남성의 생식세포가 전혀 없는 씨토리 증후군 환자의 고환 조직에서도 다른 조직들과 비슷하게 낮은 수준으로 단백질이 발현되고, 여성의 생식세포가 있는 난소에서도 낮게 발현이 되어 *hspA2* 단백질이 남성의 생식세포에서만 특이하게 많이 발현되는 것을 알 수 있었다.

이들 결과들은 인간의 *hspA2* 단백질이 생쥐의 *hsp70-2* 단백질과 같이 남성의 생식세포 발달과정에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사해 주며 대장균을 통하여 발현시킨 *hspA2* 단백질을 통하여 인간의 생식세포에서 이 단백질의 어떠한 기능을 하는가에 대한 연구가 진행 중이다.

결 론

결론적으로, 생쥐의 *hsp70-2* 단백질을 인지하는 antiserum 2A가 인간의 *hspA2* 단백질과 cross-reactivity가 있으며, *hspA2* 단백질의 발현이 남성의 생식세포에서 특이하게 많이 발현이 이루어지고 있어, 인간의 정자형성에서 생식세포가 발달하는데 어떤 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 인간의 정자형성 과정에서 *hspA2* 단백질의 기능을 밝히기 위해서는 그 단백질이 생식세포 내에서 어떻게 작용을 하는지에 대한 세포 생화학적인 연구가 필요할 것이라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM: A novel *hsp70*-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Mol Cell Biol* 1988, 8, 828-832.
- Bonnycastle LLC, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, et al.: Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (*HSP A2*). *Genomics* 1994, 23, 85-93.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura

- N, Poorman-Allen P, et al.: Targeted gene disruption of *HSP70-2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *PNAS* 1996, 93, 3264-3268.
- Georgopoulos C, Welch WJ: Role of the major heat shock protein as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 1993, 9, 601-634.
- Giraldo A, Silva E, Martinez I, Campos C, Guzman J: Pericentric inversion of chromosome 1 in three sterile brothers. *Hum Genet* 1981, 58, 226-227.
- Johnson SG: Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970, 1, 2-15.
- Kretser DM de, Burger HG, Hudson B: The relationship between germinal cells and serum FSH levels in males with infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1974, 38, 787-793.
- Leonard C, Bisson JP, David G: Male sterility associated with familial translocation heterozygosity: t (8; 15) (q22; p11). *Arch Androl* 1979, 2, 269-275.
- Matsumoto M, Fujimoto H: Cloning of a *hsp70*-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 166, 43-49.
- Meyer JM, Roos M, Rumpfer Y: Statistical study of a semiquantitative evaluation of testicular biopsies. *Arch Androl* 1988, 10, 71-79.
- Miller EK, Raese JD, Morrison-Bogorad M: Expression of heat shock protein 70 and heat shock cognate 70 messenger RNAs in rat cortex and cerebellum after heat shock or amphetamine treatment. *J Neurochem* 1991, 56, 2060-2071.
- Rosario MO, Perkins SL, O'Brien DA, Allen RL, Eddy EM: Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (P70) of mouse spermatogenic cells. *Devel Biol* 1992, 150, 1-11.
-