

The Expression and the Subcellular Localization of Regulatory Subunits of Class IA Phosphoinositide 3-Kinase in L6 Skeletal Muscle Cell

Joo Hong Woo, Jeong Soon Lim and Hye Sun Kim[†]

Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

PI3-kinase activity through p85, the regulatory subunit of class IA PI3-kinase, is indispensable for the growth, differentiation, and survival of skeletal muscle cells, but little is known about the function of other regulatory subunits such as p55 and p50. We examined the subcellular localization and the expression of the regulatory subunits of class IA PI3-kinase in L6 myoblasts. Both p55 and p50 as well as p85 were expressed in L6 myoblasts. Whereas p85 was localized at both cytosolic and nuclear fractions, p55 and p50 were localized at only the nuclear fraction. During the differentiation of L6 myoblasts, the protein concentrations of both p55 and p50 were decreased but that of p85 was not significantly changed. Menadione-induced oxidative stress induced the translocation of p85 from cytosol to nucleus and the increase of p55 expression. These results suggest that the regulatory subunits of class IA PI3-kinase play an important role in L6 myoblasts.

Key Words: PI3-kinase, L6 myoblasts, Skeletal muscle differentiation, Menadione, Oxidative stress

서 론

골격근 세포 (skeletal muscle cells)는 형태적, 생화학적 분화를 하는 세포이다. 형태적 분화는 단세포인 근원 세포 (myoblasts)가 자발적인 세포 융합을 통하여 다핵의 근관을 형성한다. 즉, 분열하던 근원 세포가 세포 주기로부터 빠져 나오면서 길게 신장하고 서로를 인식하여 융합함으로써 다핵의 근관을 형성한다. 생화학적 분화는 myogenin, myosin, α -actin, 및 creatine kinase와 같은 근육이적 단백질을 발현하는 것이다 (Bischoff and Holtzer, 1969; O'Neill and Stockdale, 1972; Endo and Nadal-Ginard, 1978; Nadal-Ginard, 1978). 이처럼 골격근의 분화는 정교하게 체계화된 다단계의 과정을 거쳐야 완성된다. 이러한 근원 세포의 분화 과정을 조절하는 세포 내 신호 전달 과정에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있다. PI3-kinase 신호 전달 과정도 그 중의 하나이다. 즉, LY-294002와 wortmannin과 같은 PI3-kinase 억제제에 노출시키거나 돌연변이 p85를 발현시킨 근원 세포는 분화가 억제된다는 보고는 PI3-kinase 신호 전달 과정이 골격근의 분화와 매우 밀접한 관련이 있음을 시사한다 (Coolican et al., 1997;

Kaliman et al., 1998; Jiang et al., 1999).

PI3-kinase는 근원 세포의 분화뿐만 아니라 세포의 생존, 성장, 증식, 중간 대사 과정 및 세포 골격 단백질의 재배열과 같은 다양한 기능과 관련되어 있다 (Cantley, 2002). 현재까지 알려진 바에 의하면 PI3-kinase는 class I, II, 및 III의 세 개의 그룹으로 나누어진다. 세포막에 위치한 수용체들은 class I PI3-kinase를 활성화시키고 PtdIns(4,5)P₂를 인산화하여 PtdIns(3,4,5)P₃를 만든다. 세포막에서 만들어진 PtdIns(3,4,5)P₃는 pleckstrin homology(PH) 도메인을 갖는 단백질들과 결합한다. Class II PI3-kinase는 아직까지 그 기능이 잘 알려져 있지 않지만, clathrin과 관련이 있는 것으로 추정하고 있다 (Gaidarov et al., 2001). Class III PI3-kinase에는 효모에서 발견된 Vps34p가 있으며 PtdIns만을 기질로 이용하여 PtdIns(3)P로 인산화시킨다. PtdIns(3)P는 FYVE와 PX (phox homology)를 갖는 단백질이 인식하여 결합한다 (DiNitto et al., 2003; Lemmon, 2003).

세 개의 class 중에서 class IA와 IB만 조절 단위체 (regulatory subunit)들과 촉매 단위체 (catalytic subunit)들로 구성된다. 현재까지 발견된 조절 단위체들은 class IA의 p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ 및 p50 α 와 class IB의 p101이 있다. Class IA의 조절 단위체들은 티로신 (tyrosine)이 인산화된 수용체와 결합하여 촉매 단위체인 p110을 활성화 시켜주는 기능을 한다 (Vanhaesebroeck et al., 2005). Class IB의 p101은 G protein 결합 수용체들에 의해서 G α 와 분리된 G $\beta\gamma$ 와 결합하여 촉매 단위체인 p110을 활성화시키는 것으로 보고되었지만 자세한

* 논문 접수: 2006년 5월 17일

수정재접수: 2006년 6월 20일

[†]Corresponding author: Hye Sun Kim, Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Ajou University, Suwon 443-749, Korea.
Tel: +82-31-219-2622, Fax: +82-31-219-1615
e-mail: hsunkim@ajou.ac.kr

작용은 아직까지 더 알려진 것이 없다 (Voigt et al., 2005).

Phosphoinositide들과 관련된 신호 전달 기작에 대한 연구는 대부분 세포 표면이나 세포막에서 일어나는 작용들에 대하여 집중되어 있다. 그러나 핵에서도 phosphoinositide들이 존재하는 것이 발견되고 이들을 합성하는 체계가 있음이 밝혀지고 있다 (D'Santos et al., 1998; Neri et al., 1999a; Martelli et al., 1999; Cocco et al., 2001). PtdIns(4,5)P₂의 합성과 관련된 phospholipase C (PLC), inositol phosphate-related phosphatases, 및 DAG kinase가 핵에 존재하고 있고 (Asano et al., 1994; Previati et al., 1994; York and Majerus 1994; Neri et al., 1999b), PI3-kinase도 면역 세포학적 또는 생화학적인 분석을 통하여 세포의 핵에 존재하는 것이 보고되었다 (Lu et al., 1998; Bacqueville et al., 2001; Neri et al., 2002; Visnjic et al., 2003). 그러나 핵에 존재하는 이들 효소의 구체적인 작용에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

Menadione (Vitamin K₃)은 항암 치료제로 이용되는 물질 중 하나로, H₂O₂ 생성에 의한 산화 스트레스의 유도과 항산화 물질의 arylation을 통해서 세포에 손상을 가하는 것으로 추정되고 있다 (Suzuki and Ono, 1999; Lamson and Plaza, 2003). C2C12 근세포주는 낮은 농도의 menadione에 노출될 때에는 apoptosis가 유발되고, 높은 농도에 노출될 경우 apoptosis와 necrosis가 함께 일어난다는 보고가 있다 (Chiou et al., 2003). Menadione에 의한 산화 스트레스는 PI3-kinase의 활성이 억제된 경우 세포의 손상을 증가시킨다 (Jin et al., 2004). Menadione은 cardiotrophin-1 (CT-1)의 발현을 통해서 cardiomyocyte의 분화를 촉진하는데, PI3-kinase의 활성이 억제된 경우 분화가 되지 않는다 (Sauer et al., 2000; Ateghang et al., 2006). 이 결과들은 menadione의 작용과 PI3-kinase가 밀접한 관련이 있음을 암시하는 것이다. 본 연구에서는 L6 배양 근원 세포에서 menadione에 의한 산화 스트레스와 이와 관련된 PI3-kinase의 작용을 연구하기 위하여 class IA PI3-kinase의 조절 단위체들의 발현 양상의 변화와 함께 세포 내의 분포에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

L6 골격근 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 태아 소의 혈청 (fetal bovine serum; FBS), 말혈청 (horse serum; HS), antibiotic-antimycotic solution 및 trypsin은 WelGENE Inc.에서 구입하였다. Anti-PI3 kinase p85 항체는 Upstate Biotechnology, Inc.에서 구입하였다. Bradford 용액은 Bio-Rad에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 menadione, 그 외의 별도로 명시하지 않은 시약들은 Sigma에서 구매하였다.

2. 세포 배양

L6 근원 세포는 10% FBS를 포함한 DMEM (증식 배양액)에서 37°C, 5% CO₂의 조건 하에 3 일 동안 배양하였다. Menadione을 처리할 때에는 처리 1 시간 전에 세포를 DMEM으로 3 번 씻어 준 다음 혈청을 넣지 않은 DMEM에서 1 시간 동안 배양하였다. Menadione을 표시된 농도로 처리하여 24 시간 동안 동일 조건에서 배양하였다. 분화를 유도하기 위해서는 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 2 번 씻어 준 다음 5% HS이 포함된 DMEM (분화 배양액)으로 교환하여 동일 조건에서 표시된 시간까지 배양하였다. 융합 지수 (fusion index)를 측정하기 위해 표시된 시간까지 배양한 세포를 PBS로 3 회 씻어 준 후, AFA (95% ethanol : 40% formaldehyde : acetic acid = 20 : 2 : 1) 용액으로 5 분간 고정한다. 고정된 세포는 Erlich's hematoxylin 용액으로 30 분 동안 염색을 한 후 위상차 현미경으로 관찰하였다. 200 배의 배율에서 임의로 선택된 시야 안에 존재하는 전체의 핵 수 중에서 3 개 이상의 핵이 포함된 근관 안에 존재하는 핵 수의 비율을 융합 지수로 나타내었다.

3. 세포 추출물 준비 및 세포질과 핵의 분리

세포를 4°C의 PBS로 3 번 씻어준 후 세포를 수확한 다음 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다. 전체 세포 추출물을 얻기 위하여 세포를 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 mM Na₃VO₄, 0.001% protease inhibitor cocktail)에 넣고 초음파 분쇄기로 분쇄한 후 15,000 x g에서 10 초간 원심 분리하여 깨지지 않은 세포를 제거하였다. 반면, 세포질과 핵을 나누기 위해서 lysis buffer에 담긴 세포를 교반기로 30 rpm의 속도로 4°C에서 10 분간 회전시킨 후 23-gauge 주사 바늘을 통해 세포를 여러 번 통과시켰다. 이 용액을 4°C, 800 x g에서 10 분간 원심 분리 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 이 상층액을 세포질 분획이라고 명명하였다. 침전물에는 다시 lysis buffer를 넣고 동일한 조건에서 원심 분리하는 과정을 2 회 더 시행하여 상층액을 제거하였다. 그리고 분리된 침전물을 초음파 분쇄기로 분쇄하여 그 추출물을 핵 분획이라고 명명하였다. 전체 세포 추출물을 비롯한 각 분획의 단백질 농도는 소의 혈청 알부민 (bovine serum albumin; BSA)을 표준 단백질로 하여 Bio-Rad 시약을 이용하는 Bradford법으로 정량하였다.

4. 면역염색반응 (Immunoblot)

동량의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기 영동 (SDS-PAGE)으로 분리한 후, polyvinylidene difluoride (PVDF) 막으로 전기 이동 하였다. 단백질이 전이된

막은 5% 탈지 분유가 포함된 TBST 완충 용액 (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에 넣어 4°C에서 1 시간 동안 천천히 교반시킨 후, 각각의 1차 항체를 이용하여 다시 하룻밤 동안 4°C에서 천천히 교반하였다. TBST 완충 용액으로 막을 5 분씩 3 번 씻어준 후 peroxidase가 결합된 2차 항체와 함께 1 시간 동안 4°C에서 천천히 교반하였다. 이 후 TBST 용액으로 5 분씩 3 번 씻어준 다음 enhanced chemiluminescence (ECL)법으로 항체가 결합한 단백질을 확인하였다.

5. 면역세포염색법 (Immunostaining)

커버 글라스 위에 배양한 L6 근원 세포를 -20°C의 methanol로 10 분간 고정하였다. 3% BSA와 10% 정상 염소 혈청을 섞어 만든 TBST 용액을 고정된 세포와 반응시켜 비 특이적인 항원의 결합을 막았다. Anti-PI3 kinase p85 항체를 3% BSA 용액과 1:100의 비율로 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응하였다. TBST 용액으로 5 분씩 4 번 반복하여 씻어준 후 fluorescent isothiocyanate (FITC)가 결합된 항 토끼 면역 글로불린 항체를 1:100의 비율로 희석하여 40 분 동안 상온에서 반응시켰다. TBST 용액으로 5 분씩 4 번 반복하여 씻어준 후 공초점 현미경 (confocal laser scanning microscope)에서 관찰하였다.

6. 세포독성 측정

Menadione에 의한 세포의 생존율을 측정하기 위해서 MIT assay를 시행하였다. L6 근원 세포를 96-well 배양 용기 (flat bottom)에 한 well당 1,500 개의 세포를 seeding하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 72 시간 동안 배양하였다. 세포를 DMEM으로 2 번 씻어 준 다음 혈청이 포함되지 않은 DMEM으로 갈아주고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 1 시간 동안 배양하였다. 그 다음 menadione의 용해에 사용된 0.05% DMSO와 5, 10, 15, 20, 50 µM menadione을 각각 처리한 후 24 시간 동안 동일한 조건에서 배양한 후 MTT 시약을 각 well에 1 mg/ml의 농도로 처리하고 동일 조건에서 4 시간 더 배양하였다. 형성된 감청색의 formazan crystal은 DMSO로 용해하고 ELISA plate reader (Bio-Rad)를 이용하여 655 nm의 파장에서의 흡광도를 기준으로 하여 570 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. L6 근원 세포에서 PI3-kinase 조절 단위체들의 세포 내 분포

PI3-kinase는 골격근의 성장과 분화에 중요한 역할을 하는 효소이지만 class IA PI3-kinase의 조절 단위체의 기능에 대해

서는 아직 정확하게 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 먼저 이들 조절 단위체의 세포 내 존재 위치를 조사하기 위하여 핵을 따로 분리하였다. 세포에서 핵을 분리하기 위하여 23-gauge 주사 바늘로 여러 번 세포를 이동시켜 세포막을 파괴하였다. 이 때 세포질이 깨끗하게 제거된 핵이 90% 이상 포함될 때까지 위상차 현미경으로 확인을 하면서 반복하였다. Fig. 1A의 좌측 사진은 위상차 현미경으로 세포막과 세포질 부분이 거의 제거된 핵을 관찰한 모습이다. 현미경으로 관찰된 것이 핵이 맞는지 확인하기 위하여 DNA와 결합하는 propidium iodide로 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하였다 (Fig. 1A, 우측 사진). 그 결과 수확된 핵이 propidium iodide로 염색된 것과 일치함으로써 핵이 순수하게 분리되었음을 확인하였다.

근원 세포에 존재하는 class IA PI3-kinase의 조절 단위체의 종류를 확인하기 위하여 분리된 핵 분획 (lane N)과 나머지 부분 (lane C; 편의상 이후에는 세포질 분획으로 명명함)을 따로 수확하여 단백질을 용해한 다음 전기 영동으로 전개하고 anti-PI3 kinase p85 항체를 이용하여 염색하였다. 핵 분획의 분리가 성공적인지의 여부는 핵의 표지 단백질인 histone H4의 존재로 확인하였다. 또한 핵 분획에 세포막 단백질이 오염되었는지의 여부는 세포막 단백질인 Na⁺/K⁺ ATPase의 존재로 확인하였다. 핵 분획에서 histone H4의 존재는 확인되었으나 Na⁺/K⁺ ATPase는 확인되지 않는 것으로 보아 핵 분획의 분리가 성공적인 것을 알 수 있다 (Fig. 1B). 또한 세포질에 존재한다고 알려져 있는 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)도 핵 분획에서 전혀 검출되지 않아 본 연구에서 분리한 핵 분획에는 세포질 분획도 오염되어 있지 않음을 확인하였다 (data not shown).

본 연구에서 사용한 anti-PI3 kinase p85 항체는 class IA의 PI3-kinase 조절 단위체들을 모두 인식하는 항체이다 (Inukai et al., 1996). 면역염색 결과, p85는 핵 분획 (lane N)과 세포질 분획 (lane C) 모두 검출되었으나 p55와 p50은 핵 분획에서만 확인되었다 (Fig. 1B). 이 결과는 L6 근원 세포의 핵 분획에 PI3-kinase 조절 단위체가 존재함을 분명히 보여주는 결과이며, 또한 핵 분획에는 세포질 분획과는 달리 p85 외에 p55와 p50의 조절 단위체가 존재함을 보여주는 것이다. 이번에는 anti-PI3 kinase p85 항체로 세포를 염색하고 공초점 현미경으로 관찰함으로써 PI3-kinase 조절 단위체의 세포 내 분포를 알아보았다 (Fig. 1C). 그 결과, PI3-kinase 조절 단위체들은 근원 세포의 세포질 전체에 흩어져 있고 일부는 세포막 부분에 위치하고 있으며, 일부는 핵 주변에 분포되어 있음을 보여주었다. 또한 핵 안에도 부분적으로 모여 있는 것을 볼 수 있다 (Fig. 1C의 사진 a와 c). 염색된 세포 하나를 확대하여 보면 특히 핵 주변으로 이들 조절 단위체들이 많이 분포되어 있는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 1C의 사진 c)

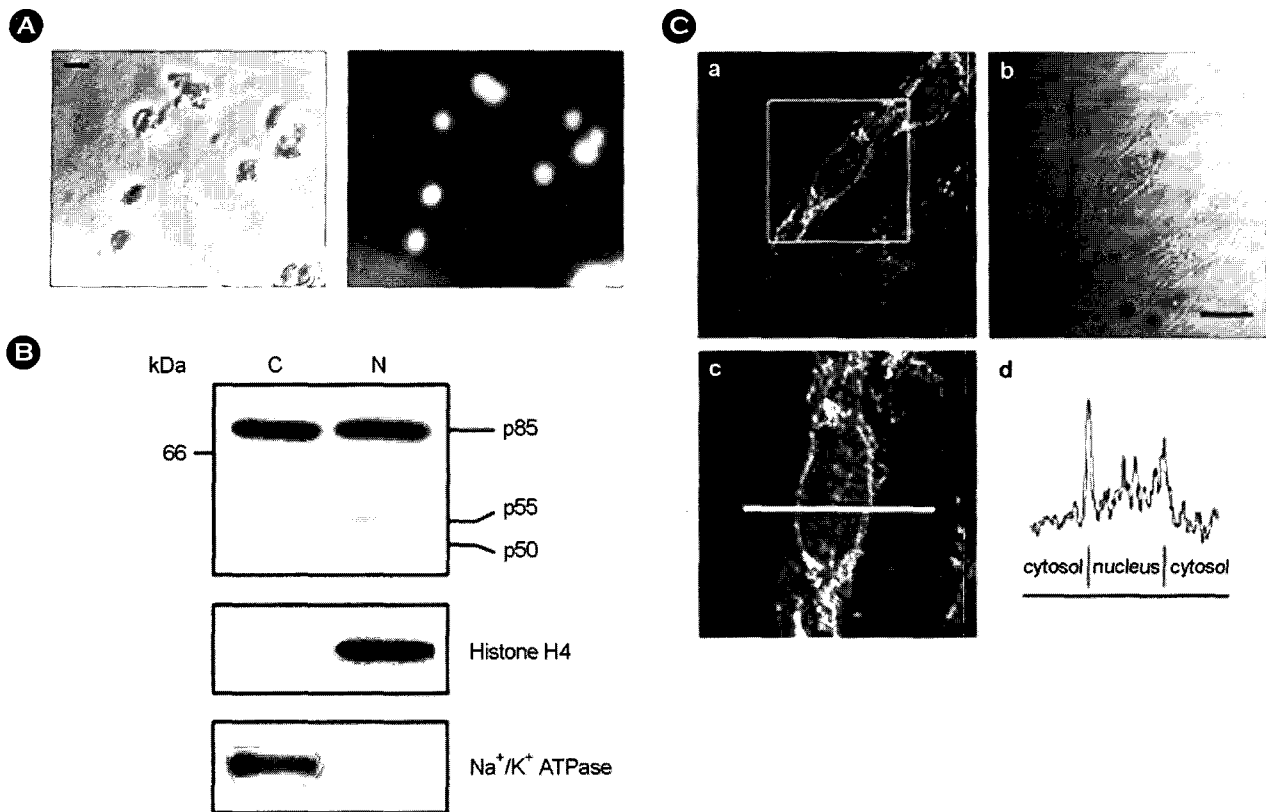


Fig. 1. Analysis of subcellular localization of regulatory subunits of class IA PI3-kinase. **A.** Nuclei of L6 myoblasts were prepared as indicated in Materials and Methods. Isolated nuclei were subjected to examination with a phase-contrast microscopy (left) and nuclei stained with propidium iodide (50 $\mu\text{g/ml}$) were examined under a fluorescent microscope (right). Bar indicates 10 μm . **B.** Equal amounts (20 μg) of cytosolic (lane C) or nuclear (lane N) fraction were separated on a SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane. The regulatory subunits of PI3-kinase were identified by using an anti-PI3 kinase p85 antibody. Histone H4 or Na^+/K^+ ATPase was identified with the anti-histone H4 or anti- Na^+/K^+ ATPase antibodies which were used as a fraction marker for the nuclear and cytosolic fractions, respectively. **C.** L6 myoblasts fixed with methanol and immunostained with the anti-PI3 kinase p85 antibody. The regulatory subunits of PI3-kinase were observed under a fluorescent microscope (a) and the same cells were observed under a phase-contrast microscope (b). The area selected by the box in the photo "a" is enlarged (c). The intensity of the regulatory subunits of PI3-kinase localized on the line in the photo "c" is represented in the plot profile (d). Bar indicates 10 μm .

이 결과는 PI3-kinase 조절 단위체들이 알려진 바와 같이 L6 근원 세포의 세포막과 세포질에 존재하지만, 핵의 막 주변과 핵 안에도 존재한다는 것을 분명히 보여주는 것이다. L6 근원 세포의 핵에서도 p85, p55, 및 p50와 같은 PI3-kinase의 조절 단위체들이 발견된다는 것은 이들 조절 단위체가 핵에서 독자적으로 혹은 PI3-kinase의 작용을 통하여 어떤 기능을 하고 있음을 시사하는 것이다.

2. L6 근원 세포의 분화 과정에 따른 PI3-kinase 조절 단위체들의 분포

골격근 세포는 분화 과정을 통하여 단핵의 근원 세포가 서로 융합하여 다핵의 근관을 만드는 형태적 분화가 특징적이며 이와 함께 세포 내의 많은 단백질들의 발현 변화가 동반된다. 성장 인자가 풍부하게 존재하는 증식 배양액에서 배양 중인 L6 근원 세포를 분화 배양액으로 바꾸어 주면 증식을

멈추고 서로 일렬로 배열하면서 길게 신장된다. 본 실험의 조건에서는 분화 유도 후 24~30 시간째부터 융합을 시작하여 96 시간에 이르면 약 80%의 세포가 융합하는 것으로 나타난다 (Fig. 2A). 한편 PI3-kinase의 활성화는 골격근 세포의 분화에 반드시 필요하며, PI3-kinase의 활성을 억제하면 특히 단백질인 myogenin의 발현이 저해될 뿐만 아니라 근원 세포의 융합도 억제되는 것으로 알려져 있다 (Coolican et al. 1997; Jiang et al., 1999; Kaliman et al. 1998; Woo et al., 2006). 쥐에서는 뇌, 간, 신장뿐만 아니라 골격근 조직에서도 class IA PI3-kinase 조절 단위체가 존재한다 (Inukai et al., 1997). 그러나 아직 근원 세포의 분화 과정에서 각 단위체들의 기능이나 작용 과정은 잘 알려져 있지 않다.

앞서의 결과를 통하여 배양 근원 세포에서 PI3-kinase의 존재를 확인하였으므로 이번에는 L6 근원 세포의 분화 과정에서 이들 조절 단위체의 발현 및 세포 내 분포가 변화하는

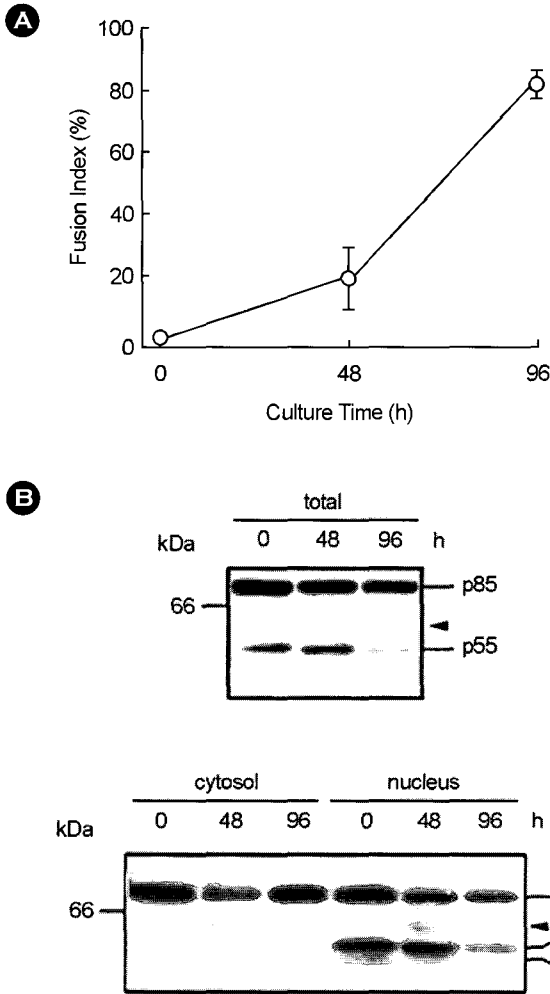


Fig. 2. The expression and the subcellular localization of the regulatory subunits of class IA PI3-kinase in the differentiation of L6 myoblasts. **A.** At the indicated culture times, cells cultured in a differentiation medium were stained with a hematoxylin solution and the fusion of myoblasts was determined as described under Materials and Methods. **B.** Under the same culture conditions, total cell lysate, cytosolic, and nuclear fractions were prepared as previously described. The expression of the regulatory subunits of class IA PI3-kinase was assayed by an immunoblot analysis with the anti-PI3 kinase p85 antibody. Arrow head indicates an unidentified 60 kDa protein which interacted with anti-PI3 kinase p85 antibody.

지를 조사하였다. 증식 배양액에서 3일간 배양하여 분화 유도 직전의 근원 세포 (0 시간)와 분화 유도 후 48시간, 96시간 후의 세포를 각각 수확하여, 재료 및 방법에 기술한 대로 전체 세포 추출물 (total)을 얻었다. 또한 앞서의 방법과 마찬가지로 핵 분획 (nucleus)을 따로 얻고 세포질 분획 (cytosol)과 분리하였다. 동량의 단백질을 전기 영동으로 전개하고 각 추출물에 존재하는 PI3-kinase의 조절 단위체를 면역염색을 통하여 알아보았다 (Fig. 2B). 먼저 p85의 발현은 분화 초기부터 시작되었음을 보여주고 있으며, 전체 세포 추

출물에 존재하는 p85의 양은 분화가 진행됨에 따라 약간 감소하였다. 그리고 p55의 발현양은 분화 과정에 따라 크게 감소하는 것으로 나타났으며, p50의 발현양은 극히 적어서 본 그림에서는 뚜렷이 확인하기 어렵다. Fig. 1과는 달리 전체 세포 추출물에서 p50이 발견되지 않는 것은 이 단백질의 양이 상대적으로 소량 존재하기 때문인 것으로 생각된다. 한편 핵 분획과 세포질 분획을 따로 분리하여 이들 조절 단위체들의 발현을 조사해 보면 흥미롭게도 이들의 증감이 서로 다르다는 사실을 보여주었다. 먼저 p85의 발현은 세포질 분획에서는 융합 초기 상태인 48시간에 약간 감소하기는 하였지만 분화가 진행되면서 다시 분화 초기 상태 (0 시간)의 양으로 회복되었다. 그러나 핵 분획에 존재하는 p85의 양은 분화와 더불어 감소하였다. Fig. 1에서와 같이 p55는 핵 분획에서만 발견되었는데 분화가 진행됨에 따라 그 양은 다소 감소하였다. 그리고 전체 세포 추출물에서는 검출되지 않았던 p50 역시 핵 분획만을 따로 전기 영동 하였을 때 검출되었으며, 그 양은 분화가 진행됨에 따라 감소하였고 세포 융합이 거의 다 이루어진 96시간에는 거의 검출되지 않았다. 특이할 만한 점은 48시간의 핵에서만 약 60 kDa에 해당하는 단백질이 anti-PI3 kinase p85 항체에 의해서 검출되는데 이것이 근원 세포의 융합이 활발한 이 시기에만 발현하는 또 다른 PI3-kinase 조절 단위체인지 아니면 비 특이적 반응인지에 대해서는 더 확인이 필요하다.

PI3-kinase는 세포의 성장, 분화, 생존 등에서 중요한 작용을 할 뿐만 아니라 분화한 골격근 조직에서는 포도당의 세포 내 이동에도 관여한다 (Berger et al., 1994). 세포막을 포함한 세포질 분획에서의 p85의 양이 분화 과정에 따라 큰 변화를 보이지 않는 것은 이와 같이 근육 조직의 기능에 필요한 작용을 지속적으로 수행하기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 반면 핵에는 p85와 함께 다른 조절 단위체인 p55와 p50이 존재하며 이들의 양은 분화 초기에 많고 분화가 진행되면서는 감소하는 것으로 보아 이들의 작용은 본격적인 분화가 진행되기 전에 필요한 것으로 생각된다. 이상의 결과는 근원 세포의 분화 과정에서 class IA PI3-kinase의 조절 단위체의 종류와 발현양이 핵과 세포질 분획에서 다르게 나타나고 그것은 이 단백질의 기능이 분화 단계에 따라 다를 수 있음을 시사하는 것이다.

3. Menadione에 의한 p85의 핵으로의 이동과 p55의 발현 변화

인간의 신장에서 유래한 상피 세포 계열인 293T 세포에 산화 스트레스를 가하면 p85가 핵으로 옮겨 간다는 보고가 있다 (Tanaka et al., 1999). 그러나 이렇게 이동한 p85가 핵에서 어떤 작용을 하는지는 아직 분명하게 밝혀지지 않고 있다. 이번에는 위 결과에서 밝힌 핵에 존재하는 PI3-kinase의 조

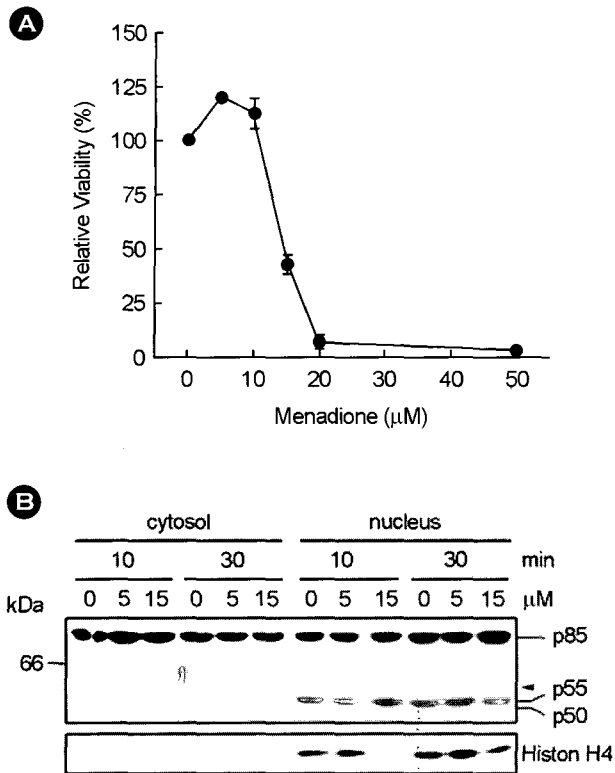


Fig. 3. The effect of menadione on the expression and the subcellular localization of the regulatory subunits of class IA PI3-kinase. **A.** Cell survival under the menadione-induced oxidative stress was determined by MTT assay. L6 myoblasts were exposed to menadione for 24 h with increasing doses. The relative viability is expressed as a ratio of each treatment to that of the DMSO-treated cells. **B.** Cytosolic or nuclear fractions were separated on a SDS-PAGE. The expression of the regulatory subunits of class IA PI3-kinase or histone H4 was assayed by western blot analysis with the anti-p85 or the anti-histone H4 antibodies, respectively. Arrow head represents the unidentified 60 kDa protein which interacted with anti-PI3 kinase p85 antibody.

질 단위체들의 기능이 위의 보고와 관련성이 있는지를 조사하였다. 즉, L6 근원 세포에서도 산화 스트레스에 의해 이들 조절 단위체의 세포 내 분포에 영향을 주는지를 알아보았다. 본 연구에서는 menadione을 선택하였는데, 이미 menadione은 여러 종류의 세포들에서 산화 스트레스를 유발하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려진 물질이다 (Lamson and Plaza, 2003). 먼저 L6 근원 세포가 menadione에 의해 유발되는 산화 스트레스에 영향을 받는지 확인해 보기 위하여 세포의 생존율을 MTT assay를 통하여 조사해 보았다 (Fig. 3A). 그림에서 보는 바와 같이 저농도 (5~10 μM)의 menadione에서는 세포의 생존율이 오히려 10~20% 정도 증가하였다. 그러나 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율은 급격히 감소하였고 20 μM 이상의 농도에서는 대부분의 세포들이 사멸하였다. 이 결과는 menadione이 일정 농도 이상에서는 근원 세포에 산화 스트레스를 유발하여 세포를 사멸시키는 작용을 하는

것임을 보여주는 것이다. 한편 MTT assay를 위해 사용한 혈청을 제거한 배양액에서 L6 근원 세포를 배양하면 배양액에 성장 인자가 없기 때문에 세포의 증식이 진행되지 못해 세포 수가 크게 늘지 않는다. HeLa cells에 H₂O₂가 낮은 농도로 가해지는 경우 처리 농도에 따라 증식이 증가하는 등 (Liu et al., 2003) 저농도의 산화 스트레스는 여러 가지 신호 전달을 일으키는 물질로 작용한다는 보고가 있다. 그러므로 저농도의 menadione에 의해 유발되는 산화 스트레스가 오히려 L6 근원 세포의 증식을 촉진하는 신호 전달 물질로도 작용할 가능성도 배제할 수는 없다.

이번에는 menadione의 작용에 의해서 PI3-kinase 조절 단위체들의 발현과 세포 내에서의 분포가 변화하는지를 조사하였다. 앞서 기술한 방법에 따라 핵 분획을 세포질 분획과 따로 분리하여 얻고 PI3-kinase 조절 단위체들의 양을 anti-PI3 kinase p85 항체를 이용하여 확인하였다 (Fig. 3B). 그림에서 보는 바와 같이 menadione의 처리 농도와 처리 시간이 증가할수록 세포질 분획에 존재하는 p85의 양은 다소 감소하였다. 반면 핵 분획에서는 menadione의 농도가 증가할수록 p85의 양이 점점 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과는 앞서 언급한 293T 세포에서와 마찬가지로 L6 근원 세포에서도 menadione에 의해 유발되는 산화 스트레스가 p85를 세포질에서 핵으로의 이동을 유도할 수 있음을 보여주는 것이다. 한편 p55는 핵에서만 검출되었고, 15 μM menadione은 10 분에, 5 μM menadione은 30 분 처리 시간에 p55의 양이 다소 증가하였음을 보여주고 있다. 역시 세포질과 핵의 분리를 확인하기 위하여 histone H4의 분포를 확인하였다. 특이한 점은 15 μM menadione이 10 분 동안 처리된 경우 세포질과 핵 어디에서도 histone H4가 검출되지 않았고, 30 분 처리에서는 핵에서 약간 회복되었다. 인간 표피 세포 (human keratinocytes)의 연구에서 단백질의 손상을 유발하는 glyoxal은 핵안의 DNA를 손상시킬 뿐만 아니라 핵의 proteasome을 활성화시켜 carboxymethylated histone들의 분해를 촉진하는 것이 최근에 보고되었다 (Cervantes-Laurean et al., 2005). 이 결과는 histone H4가 menadione에 의한 산화 스트레스에 의해 단백질 수준에서 영향을 받는 것으로 보이며, 빠르게 분해된 후 다시 합성되는 것으로 생각된다.

현재까지의 PI3-kinase에 대한 연구는 세포질과 세포막에 존재하는 이 효소의 작용에 대한 것이 주를 이루었다. 그러나 최근에는 이 효소가 핵에도 존재한다는 보고가 있어 핵에서의 이 단백질의 기능에 대한 관심이 집중되고 있다. 본 연구에서 PI3-kinase의 조절 단위체가 세포질뿐만 아니라 핵에도 존재하고, 핵과 세포질에 존재하는 조절 단위체가 다르며, 그것은 분화 과정과 menadione에 의한 산화 스트레스에 의해서 조절될 수 있음을 밝혔다. 그러므로 핵에 존재하는 PI3-kinase의 작용을 밝히는 연구가 계속 되어야 한다.

감사의 글

이 논문은 the Regional Technology Innovation Program of MOCIE (RTI04-03-05)의 연구비 지원에 의해서 이루어졌으며, 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Asano M, Tamiya-Koizumi K, Homma Y, Takenawa T, Nimura Y, Kojima K, Yoshida S. Purification and characterization of nuclear phospholipase C specific for phosphoinositides. *J Biol Chem.* 1994. 269: 12360-12366.
- Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, Sauer H. Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 α and intracellular reactive oxygen species. *J Cell Sci.* 2006. 119: 1043-1052.
- Bacqueville D, Deleris P, Mendre C, Pieraggi MT, Chap H, Guillon G, Perret B, Breton-Douillon M. Characterization of a G protein-activated phosphoinositide 3-kinase in vascular smooth muscle cell nuclei. *J Biol Chem.* 2001. 276: 22170-22176.
- Berger J, Hayes N, Szalkowski DM, Zhang B. PI 3-kinase activation is required for insulin stimulation of glucose transport into L6 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994. 205: 570-576.
- Bischoff R, Holtzer H. Mitosis and the process of differentiation of myogenic cells in vitro. *J Cell Biol.* 1969. 41: 188-200.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002. 296: 1655-1657.
- Cervantes-Laurean D, Roberts MJ, Jacobson EL, Jacobson MK. Nuclear proteasome activation and degradation of carboxymethylated histones in human keratinocytes following glyoxal treatment. *Free Radic Biol Med.* 2005. 38: 786-795.
- Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF. Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation. *Toxicology* 2003. 191: 77-88.
- Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Rhee SG, Manzoli FA. Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2001. 1530: 1-14.
- Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 1997. 272: 6653-6662.
- D'Santos CS, Clarke JH, Divecha N. Phospholipid signalling in the nucleus. Een DAG uit het leven van de inositide signaling in de nucleus. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1436: 201-232.
- DiNitto JP, Cronin TC, Lambright DG. Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE.* 2003. 2003: re16.
- Endo T, Nadal-Ginard B. Three types of muscle-specific gene expression in fusion-blocked rat skeletal muscle cells: translational control in EGTA-treated cells. *Cell* 1987. 49: 515-526.
- Gaidarov I, Smith ME, Domin J, Keen JH. The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol Cell* 2001. 7: 443-449.
- Inukai K, Anai M, Van Breda E, Hosaka T, Katagiri H, Funaki M, Fukushima Y, Ogihara T, Yazaki Y, Kikuchi, Oka Y, Asano T. A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85alpha gene. *J Biol Chem.* 1996. 271: 5317-5320.
- Jiang BH, Aoki M, Zheng JZ, Li J, Vogt PK. Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. 96: 2077-2081.
- Jin Q, Jhun BS, Lee SH, Lee J, Pi Y, Cho YH, Baik HH, Kang I. Differential regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, mitogen-activated protein kinase, and AMP-activated protein kinase pathways during menadione-induced oxidative stress in the kidney of young and old rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. 315: 555-561.
- Kaliman P, Canicio J, Shepherd PR, Beeton CA, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Insulin-like growth factors require phosphatidylinositol 3-kinase to signal myogenesis: dominant negative p85 expression blocks differentiation of L6E9 muscle cells. *Mol Endocrinol.* 1998. 12: 66-77.
- Lamson DW, Plaza SM. The anticancer effects of vitamin K. *Altern Med Rev.* 2003. 8: 303-318.
- Lemmon MA. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 2003. 4: 201-213.
- Liu YW, Sakaeda T, Takara K, Nakamura T, Ohmoto N, Komoto C, Kobayashi H, Yagami T, Okamura N, Okumura K. Effects of reactive oxygen species on cell proliferation and death in HeLa cells and its MDR1-overexpressing derivative cell line. *Biol Pharm Bull.* 2003. 26: 278-281.
- Lu PJ, Hsu AL, Wang DS, Yan HY, Yin HL, Chen CS. Phosphoinositide 3-kinase in rat liver nuclei. *Biochemistry* 1998. 37: 5738-5745.
- Martelli AM, Capitani S, Neri LM. The generation of lipid signaling molecules in the nucleus. *Prog Lipid Res.* 1999. 38: 273

- Nadal-Ginard B. Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* 1978. 15: 855-864.
- Neri LM, Capitani S, Borgatti P, Martelli AM. Lipid signaling and cell responses at the nuclear level. *Histol Histopathol.* 1999a. 14: 321-335.
- Neri LM, Marchisio M, Colamussi ML, Bertagnolo V. Monocytic differentiation of HL-60 cells is characterized by the nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase and of definite phosphatidylinositol-specific phospholipase C isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999b. 259: 314-320.
- Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta.* 2002. 1584: 73-80.
- O'Neill MC, Stockdale FE. A kinetic analysis of myogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 1972. 52: 52-65.
- Previati M, Bertagnolo V, Mazzoni M, Osti F, Borgatti P, Capitani S. Diacylglycerol kinase activity in rat liver nuclei. *Cell Signal.* 1994. 6: 393-403.
- Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 2000. 476: 218-223.
- Suzuki Y, Ono Y. Involvement of reactive oxygen species produced via NADPH oxidase in tyrosine phosphorylation in human B- and T-lineage lymphoid cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. 225: 262-267.
- Tanaka K, Horiguchi K, Yoshida T, Takeda M, Fujisawa H, Takeuchi K, Umeda M, Kato S, Ihara S, Nagata S, Fukui Y. Evidence that a phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein can function in nucleus. *J Biol Chem.* 274: 3919-3922.
- Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC. Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci.* 2005. 30: 194-204.
- Visnjic D, Curic J, Crljen V, Batinic D, Volinia S, Banfic H. Nuclear phosphoinositide 3-kinase C2beta activation during G2/M phase of the cell cycle in HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003. 1631: 61-71.
- Voigt P, Brock C, Nurnberg B, Schaefer M. Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Biol Chem.* 2005. 280: 5121-5127.
- Woo JH, Kim JH, Inhee MJ, Kim HS. Lipid products of phosphoinositide 3-kinase abrogate genistein-induced fusion inhibition in myoblasts. *Eur J Pharmacol.* 2006. 529: 84-94.
- York JD, Majerus PW. Nuclear phosphatidylinositols decrease during S-phase of the cell cycle in HeLa cells. *J Biol Chem.* 1994. 269: 7047-7050.