

우 (牛)심근조직의 mitochondria에서 cytochrome-c-oxidase의 형성과 변화

김 수 진*

한림대학교 자연과학대학 생명과학과

The Formation and Change of Cytochrome-c-oxidase in the Mitochondria of the Bovine Cardiac Muscle

Soo Jin Kim*

Department of Life Science, College of Natural Science, Hallym University,
Gangwon-Do 200-702, Korea

(Received May 15, 2008; Accepted June 19, 2008)

ABSTRACT

Cytochrome-c-oxidase in mitochondria membrane is one of the most important factors for energy generation in the cell. As well as it is electron transfer enzyme, it is also heavily related to the apoptosis and other pathologic conditions. Meanwhile, porin is a protein located in inner and outer membranes of mitochondria, which is assumed to be functionally correlated with cytochrome-c-oxidase. It functions as forming electron transfer chain and conveying ATP. Therefore, using the immune-microscopy, It compared the distribution of cytochrome-c-oxidase and porin to figure out the formation and changes on cytochrome-c-oxidase in mitochondrial cristae.

The sarcoplasm of cardiac muscle tissue has many mitochondria. They are classified into two groups: the mitochondria with many cytochrome-c-oxidase and the mitochondria with only porins. The mitochondria with porins had few cytochrome-c-oxidases in their membrane; in contrast, the other mitochondria with rich cytochrome-c-oxidase had few porins in their walls. In addition, according to the location of the tissue in bovine heart, distribution of those kind of mitochondria had been clearly separated. As a result, it could be assumed that immature mitochondria has many porins to transfer the protein materials from sarcoplasm through the porins, and they made cytochrome-c-oxidase until it is enough, and then they decreased the porin and maintained minimum number of the porin.

Keywords : Cytochrom-c-oxidase, Porin protein, Bovine cardiac muscle tissue Immunogold labeling, Immuno-fluorescence labeling

서 론

Mitochondria는 생체세포 내에서 에너지(ATP)를 합성하는 세포소기관으로 외막과 내막으로 구성되고 내막에는 에

너지 합성에 관여하는 전자전달계효소들이 분포하고 있다. 내막에 분포하는 전자전달계효소들에는 Cytochrome complex I인 NADH-ubiquinone reductase와 Cytochrome complex II인 Succinate-ubiquinone reductase, Cytochrome complex III인 Ubiquinone-Cytochrome-c-reductase, Cytochrome com-

*이 논문은 2007년도 한림대학교 학술연구비지원사업에 의하여 이루어졌음.

* Correspondence should be addressed to Prof. Soo Jin Kim, Department of Life Science, College of Natural Science, Hallym University, Chuncheon-Si, Gangwon-Do 200-702, Korea. Ph.: (033) 248-2091, Fax: (033) 256-3420, E-mail: sjkim@hallym.ac.kr

plex IV인 Cytochrome-c-oxidase 그리고 Cytochrome complex V인 ATPase들이 있다. 그들 중에 COX (cytochrome aa₃, cytochrome IV, cytochrome-c-oxidase)는 mitochondria가 인산화 반응에 의한 에너지를 형성시킬 때 산소와 수소 분자를 결합시켜 물을 형성시키는 반응에 관여하는 효소로 알려져 있다.

COX (cytochrome complex IV, cytochrome-c-oxidase)는 mitochondria의 발생과 동시에 형성된 3종류의 단백질 소단위와 mitochondria가 포함된 모세포 유전자에 의해서 형성된 10종류의 단백질 소단위가 mitochondria 외막의 porin 단백질 통로를 통하여 mitochondria내로 운반되어 내막의 단백질 복합체를 이루어 전자전달계효소를 구성하는 것으로 알려졌다(Jamal, 2005). Porin 단백질은 세포질에서 합성된 mitochondria 효소단백의 소단위들을 mitochondria 내로 전달시키는 역할을 하므로 COX 등의 효소단백의 형성을 조절하고 ATP를 mitochondria로부터 세포질로 이동시키는 기능이 있는 것으로 알려져 있다 (Konstantinova et al., 1995; Jamal, 2005).

동물의 심근조직은 근섬유다발을 둘러싸고 있는 근형질에 많은 mitochondria가 분포하고 mitochondria 내막에는 COX 효소가 항상 다량 존재하는 것으로 알려져 있고 심근 조직의 ATP 요구량에 따라 mitochondria 내막의 COX 양도 증가하는 것으로 알려져 있다 (Kim & Jung, 1990). 근조직의 근형질에 mitochondria에는 COX가 결손되면 근 무력증 등 질병이 유발되는 것으로 보고된 바 있다 (Kim et al., 1987). 최근에는 mitochondria 내막의 COX의 결손과 연관된 세포 자연사, 당뇨병, 암, 치매, 파킨슨씨병 등 질병에 관한 많은 보고가 있었다 (Hanson et al., 2002). 이는 세포이상과 연관된 COX가 세포내 생리현상에 긴밀하게 관여하고 있으므로 COX의 형성과 분포 및 결손을 조절하는 경로의 규명은 매우 중요하다. 특히 COX의 관한 분자구조를 바탕으로 한 이론적 근거가 밝혀지는 것은 중요함에도 불구하고 이에 관한 연구보고는 미비하였다.

따라서 이 연구에서 면역항체를 이용한 광학, 형광 및 전자현미경을 사용하여 우심근 조직의 mitochondria에서 COX subunit II와 porin 단백질의 분포를 확인하여 상호연관성을 알아보려고 하였으며, mitochondria 내막의 전자전달계 효소인 COX subunit II의 형성과 형성경로 및 분포와 변화 양상을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물인 소(牛)는 도축장에서 도살되는 한우(*Bos tau-*

rus coreanae) 3년생 수소 5마리와 5년생 암소 5마리로부터 심근을 채취하였다. 심근 부위는 심근이 잘 발달된 우심실 중부 1 cm 깊이의 심근을 2 cm × 2 cm × 2 cm로 절단하여 실험에 사용하였다.

면역반응에 사용된 항체는 단클론 항체로 mouse anti-Porin 31HL (Ab2) mAb (Clabiochem 529534)와 mouse anti-Complex IV subunit II mAb (Mitosciences MS)를 사용하였다.

형광항체는 FITC (alexa488 invitrogen A21131) goat anti-mouse IgG_{2a}와 Texas Red (alexa594 invitrogen A21145) goat anti-mouse IgG_{2b}를 이차 형광표지 항체로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 조직항원제작

광학 및 형광현미경 관찰을 위한 조직항원은 0.5 cm × 1 cm × 1 cm의 심근 조직을 1% paraformaldehyde 용액에 24 시간 고정, ethanol로 탈수하고 paraffin으로 포매하여 2.0 μm 조직절편을 제작하였다. 전자현미경 관찰을 위한 조직항원은 심근조직을 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde 고정액에 2시간 전고정하고 2% osmium tetroxide 고정액으로 2시간 후 고정 하였고, ethanol로 탈수하여 Lowicryl HM 20 혼합액에 포매한 다음 Reichert-Jung ultramicrotome 으로 60 nm 초박절편을 제작하여 조직항원으로 사용하였다.

2) 광학현미경 관찰 면역항체 반응

제작한 조직항원슬라이드를 xylene으로 paraffin을 제거하고 함유과정을 거쳐, 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0)에 0.1% triton100, 0.05% tween20를 첨가한 용액과 peroxidase block 용액 및 0.02 M tris buffer (pH 8.2)에 처리하였다. 완충용액에 처리된 조직항원에 mouse anti-Porin 31HL (Ab2) mAb과 mouse anti-Complex IV subunit II mAb를 1 : 1000로 희석된 희석용액에 반응시켰다. 일차항체에 반응시킨 조직항원은 DAKO Envision⁺의 polymer-HRP anti-mouse (K4006)에 반응시키고 DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)에 처리하고 hematoxylin에 염색하여 Leica DM2000 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 형광현미경관찰 면역항체 반응

제작한 조직항원슬라이드를 xylene으로 paraffin을 제거하고 함유과정을 거쳐, 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0)에 0.1% triton100, 0.05% tween20를 첨가한 용액과 peroxidase block 용액 및 0.02 M tris buffer (pH 8.2)에 처리하였다. 완충용액에 처리된 조직항원에 mouse anti-Porin 31HL (Ab2) mAb와 mouse anti-Complex IV subunit II mAb를 phosphate buffer와 1 : 1,000으로 희석하여 반응시켰다. 일차항체에 반응시킨 조직항원은 FITC goat anti-mouse IgG_{2a}와 Texas Red goat anti-mouse IgG_{2b}를 phosphate buffer와 1 : 1,000으로

로 희석한 용액에 면역반응 시키고 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, invitrogen, D21490)에 염색하여 Leica DM2000형광현미경으로 관찰하였다.

4) 전자현미경관찰 면역항체 반응

Nickel grid에 부착된 초박절편은 1% periodic acid에 처리하고, phosphate buffer로 세척하였다. 5% normal goat serum과 5% Bovine Serum Albumin, 0.1% Cold Water Fish Skin이 첨가된 phosphate buffer를 사용하여 비특이성 반응을 억제하였다. mouse anti-Porin 31HL (Ab2) mAb와 mouse anti-Complex IV subunit II mAb를 phosphate buffer와 1 : 100으로 희석하여 일차 항체로 각각 면역반응 시키고, 표지항체로 Goat anti-mouse IgG+IgM gold particle (10 nm)를 phosphate buffer에 1 : 20으로 희석하여 반응시킨 후 phosphate buffer와 증류수로 세척하였다. 처리된 재료는 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색 하여 Zeiss EM109 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

심근조직은 심근섬유들이 다발을 형성하고 섬유다발들 사이로 근형질이 채워져 있으며, 근형질에는 불규칙하게 분포하는 핵과 mitochondria 및 근세포소기관들이 포함되어 있었다 (Fig. 1). 근조직의 횡단면에 COX subunit II (cytochrome-c-oxidase, complex IV) 효소단백에 대한 단클론 항체를 반응시키고 peroxidase 표지항체로 처리한 다음 DAB를 이용한 발색반응으로 관찰한 결과 근원섬유 사이의 근형질에 분포하는 mitochondria에서 COX subunit II를 다량 함유하고 있음이 확인되었다. 심근 조직의 모든 근형질 mitochondria에서 COX subunit II를 함유하고 있는 것은 아니며, 근조직 부위에 따라 mitochondria들이 각각 상이하게 COX subunit II를 함유하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1).

심근의 근 다발 (muscle fascicles)은 다수의 근원섬유 다발들로 구성된 근세포 (muscle fiber, muscle cell)는 근형질에 COX subunit II 항체에 반응이 나타나는 COX subunit II를 다량 포함하는 mitochondria가 분포하는 근세포와 COX subunit II 항체에 대하여 반응이 없거나 COX 효소를 포함하지 않는 mitochondria가 분포하는 근세포로 구별되었다 (Fig. 2). 근원섬유 다발들로 구성된 근섬유 즉 근세포들은 횡단면 표면에서 mitochondria가 근원섬유사이로 구형으로 나타나 일부의 근세포들은 mitochondria가 섬유형태로 관찰되었다 (Fig. 2).

심근조직의 종단면 조직항원에 COX subunit II 항체를 반응시킨 결과 근원섬유들이 배열된 사이 근형질에 분포하는 mitochondria는 근원섬유의 배열과 나란히 분포하며, 부분적으로 mitochondria 분포 밀도가 높은 부위는 mitochondria

가 근원섬유와 나란히 배열된 형태로 관찰되었다. 근세포에 분포하는 핵은 다수가 불규칙하게 분포하는 것으로 관찰되었으며, COX subunit II 항체 반응이 미약한 근세포들은 COX subunit II 효소단백질이 포함되지 않은 mitochondria가 존재하는 것으로 확인되었다 (Fig. 3).

심근조직의 횡단면 조직항원에 porin 단백에 대한 항체를 반응시키고 형광표지항체를 이차반응 시킨 다음 DAPI에 처리하여 형광현미경으로 관찰한 결과 porin 단백질이 포함된 mitochondria가 존재하는 근세포들은 Texas red 형광으로 인하여 적색을 나타내었다 (Fig. 4). 근세포가장자리에 DAPI에 반응한 핵이 청색으로 불규칙하게 존재하는 것이 관찰되었다. 근원섬유사이에 분포하는 많은 porin 단백질이 포함된 mitochondria는 밝은 주황색을 나타내고 있으나 porin 단백질이 적은 양으로 분포하는 근세포는 흐린 주황색을 나타내어 porin 단백질의 양적 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 형광현미경 관찰에서 porin 단백질이 존재하는 주황색 근세포의 경계가 분명하게 관찰 되었다 (Fig. 4).

Fig. 4와 동일한 항원조직에 COX subunit II 단백질에 대한 항체를 반응시키고 FITC 형광표지항체를 이차반응 시킨 다음 DAPI에 처리하여 형광현미경으로 관찰한 결과 COX subunit II 단백질이 포함된 mitochondria가 존재하는 근세포들은 FITC 형광반응으로 밝은 녹색으로 나타나며, 녹색으로 나타나는 근세포 가장자리에는 DAPI에 반응된 핵이 청색으로 관찰되었다 (Fig. 5). COX subunit II 단백질이 적은 양으로 분포하는 mitochondria를 포함하는 근세포들은 녹색의 반응이 관찰되지 않는다. COX subunit II 단백을 포함하는 mitochondria가 분포하고 있지 않는 근세포들에도 다수의 핵이 청색으로 관찰되어 근세포의 존재를 확인할 수 있었다. Fig. 4에서 밝은 주황색으로 Texas red에 반응된 부위에는 COX subunit II 단백질에 표지된 FITC 형광반응이 나타나지 않는 것으로 관찰되었다. 반면에 Fig. 4에서 porin 단백질이 관찰되지 않는 근세포에는 COX subunit II 단백을 다량 포함하는 mitochondria가 분포하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5).

동일한 조직항원에 porin 단백질 단클론 항체와 COX subunit II 단백질 단클론 항체를 혼합하여 동시에 반응시킨 다음 각각의 단클론 이형항체에 표지된 FITC와 Texas red를 중복 반응시켰을 때 porin 단백질이 풍부한 주황색 형광을 나타내는 근세포에는 COX subunit II 단백질의 녹색 형광이 관찰되었으며, porin 단백질의 주황색 이 나타나는 근세포에는 COX subunit II 단백질의 녹색형광이 나타나는 것으로 관찰되어 porin 단백을 포함하는 근세포와 COX subunit II 단백을 포함하는 근세포가 각각 상이하게 구성되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 일부 근세포에는 녹색 형광과 주황색 형광이 중복되어 노란색 형광으로 나타나는 porin 단백질과 COX subunit II 단백을 동시에 포함하고 있는 mitochondria

가 분포하는 근세포가 존재하는 것으로 확인되었다. 그러나 대부분의 근세포들은 porin 단백질이 풍부하면, COX subunit II 단백질이 부족하고 COX subunit II 단백질이 풍부하면 porin 단백질이 빈약한 것으로 확인되었다(Fig. 6).

심근조직의 종단면 조직항원에 porin 단백질 항체를 반응시키고 peroxidase 표지항체가 반응된 부위에 DAB를 발색처리했을 때 근원섬유들이 배열된 사이 근형질에 porin을 포함하는 mitochondria가 근원섬유의 배열과 나란히 분포하며, 부분적으로 mitochondria 분포 밀도가 높은 부위는 mitochondria가 근원섬유와 나란히 배열된 형태로 관찰되었다. Porin 단백질을 포함하지 않은 근세포에도 다수의 핵이 분포하여 근세포의 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 porin을 풍부하게 함유한 mitochondria가 분포하는 근세포와 porin을 미약하게 함유한 mitochondria가 분포하는 근세포들이 공존함을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

심근조직의 종단면 조직항원에 COX subunit II 단백질 항체를 반응시키고 peroxidase 표지항체가 반응된 부위에 DAB를 발색처리했을 때 근원섬유들이 배열된 사이 근형질에 COX subunit II 단백질을 포함하는 mitochondria가 근원섬유의 배열과 나란히 분포하며, 부분적으로 mitochondria 분포 밀도가 높은 부위는 mitochondria가 근원섬유와 나란히 배열된 형태로 관찰되었다. COX subunit II 단백질 포함하지 않은 근세포에도 다수의 핵이 분포하여 근세포의 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 COX subunit II 단백질을 풍부하게 함유한 mitochondria가 분포하는 근세포와 COX subunit II 단백질을 미약하게 함유한 mitochondria가 분포하는 근세포들이 공존함을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

심근조직의 종단면 조직항원에 porin 단백질 항체를 반응시키고 황금표지항체를 반응하여 전자현미경으로 관찰했을 때 근원섬유 주위에 cristae가 발달하지 않은 mitochondria에 황금입자가 표지되어 porin을 포함하는 mitochondria가 근원섬유 사이에 분포하는 것으로 관찰되었다. 그러나 cristae가 발달한 mitochondria에는 황금입자의 표지가 다소 미약하게 표지된 것으로 관찰되었다(Fig. 9) 반면에 심근조직의 종단면 조직항원에 COX subunit II 단백질 항체를 반응시키고 황금표지항체를 반응하여 전자현미경으로 관찰했을 때 근원섬유 주위에 cristae가 발달한 mitochondria에 황금입자가 표지되어 COX subunit II 단백질을 포함하는 mitochondria가 근원섬유 사이에 분포하는 것으로 관찰되었다. 그러나 cristae가 발달하지 않은 mitochondria에는 황금입자의 표지가 다소 미약하게 표지된 것으로 관찰되었다(Fig. 10).

고 찰

Mitochondria는 세포내 ATP에너지를 합성하는 세포소기

관으로 내막인 cristae의 전자전달계효소들에 의하여 ATP가 합성되며, 합성된 ATP는 외막에 분포하는 porin 단백질에 의하여 mitochondria의 기질에서 세포질로 이동되는 것으로 알려져 있다(Konstantinova et al., 1995). ATP 합성에 관여하는 전자전달계효소들 중에 COX (cytochrome-c-oxidase)는 ATP 합성에 사용되는 수소와 기질속의 산소를 결합하여 물을 형성시키는 효소로 알려져 있다. 따라서 mitochondria가 형성되어 기능을 수행하면 cristae에는 COX (cytochrome-c-oxidase) 효소가 항상 존재하며, cristae에서 COX가 결손이 생기면 mitochondria 이상으로 인하여 근육질환이 유발되는 것으로 알려져 왔다(Kim et al., 1987; Jung & Kim, 1990). (Vik et al., 1981)에 의하면 COX의 분자적 구성 13종류의 소단위로 구성되어 있다. 이들 단백질 소단위들의 유전적 근원은 3종류의 소단위 유전자는 mitochondria 기질에 유전적 근원을 갖고 있으며, 나머지 10종류의 소단위 유전자는 모세포의 핵에 유전적 근원을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Huttemann et al., 2003). 또한 이들 소단위들은 그 기능이 재각각 상이하며 일부 소단위에는 cardiolipin의 광 결합으로 전자전달과정에서 극대화 효과를 나타내기도 한다(Sedlak et al., 2006).

이 실험에서 심근 조직의 mitochondria에 COX 단백질이 항상 균일하게 분포하는 것이 아니며, 근세포에 따라 COX 단백질을 포함 하는 세포와 포함하지 않는 세포로 구별되었다. COX 단백질을 다량 포함하는 근세포는 근원섬유를 따라 mitochondria들이 나란히 그리고 규칙적으로 분포하고, COX 단백질을 다량 포함하는 근세포와 COX 단백질이 소량으로 포함된 근세포들이 번갈아가며 분포하고 있음이 관찰되어 심근조직의 근세포의 근형질에는 COX 효소가 형성된 mitochondria를 함유한 근세포와 COX 효소가 형성되지 않은 mitochondria를 함유한 근세포가 공존하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 심근조직은 ATP를 다량 요구하는 즉 활성근과 ATP를 요구하지 않는 비활성 근세포가 공존하는 것으로 생각되었다.

Mitochondria의 COX 단백질에 여러 원인으로 이상이 나타나면 세포내 에너지 생성이 불가능하므로 조직세포의 기능이 기능 저하로 질병으로 이어진다(Hanson et al., 2002; Persichini et al., 2005; Shivaa et al., 2005). 이들 질병 중에는 인슐린을 생성하는 세포에 COX 단백질이 결손된 당뇨병, 뇌신경세포에 COX 단백질이 결손된 파킨슨씨병 등이 대표적으로 알려진 질병이다. COX 단백질은 mitochondria에서 구성과 기능이 다양한 것으로 알려져 있다. Persichini et al. (2005)에 의하면 세포내 물질대사로 형성되는 산화질소(nitric oxide NO)와 COX가 기능적으로 연관성이 있는 것을 쥐의 소뇌 피질에서 NO synthases (NOS) 단백질이 존재하여 COX 연관되어 질산대사에 관여함을 증명한 바 있다. Prabu et al. (2006)은 토끼의 심장에서 산소부족으로 인한

근세포가 손상을 받았을 때 COX 단백질이 근세포의 회복을 조절할 수 있는 능력이 있으며, Lee et al. (2005)은 소의 간 조직에서 glycogen 대사는 COX subunit I의 활성화와 연관이 있는 것으로 보고한 바 있다. 이러한 다양한 기능이 있는 COX 단백질은 근세포에서도 다양한 형태로 나타나 역동적이라는 사실이 알려지면서 mitochondria의 COX 단백질의 형성과 분포에 관한 가설이 일부 제시 되어 형성과 분포에 관한 연구가 이루어지고 있다.

이 실험에서 COX subunit II 단백을 풍부하게 함유한 mitochondria가 분포하는 근세포와 COX subunit II 단백을 미약하게 함유한 mitochondria가 분포하는 근세포들이 공존함을 확인할 수 있었다. COX subunit II 단백 포함하지 않은 근세포에도 다수의 핵이 분포하여 근세포의 존재를 확인할 수 있었으며, 근원섬유 주위에 cristae가 발달한 mitochondria에 황금입자가 표지되어 COX subunit II 단백을 포함하는 mitochondria가 근원섬유 사이에 분포하는 것으로 관찰되었다. 그러나 cristae가 발달하지 않은 mitochondria에도 미약하지만 황금입자 표지가 관찰되어 COX subunit II 단백질이 mitochondria의 cristae에 주로 분포하고 기질에도 소량 분포하는 것으로 생각되었다. 근원섬유 주위에 cristae가 발달하지 않은 mitochondria에 황금입자가 표지되어 porin을 포함하는 mitochondria가 근원섬유 사이에 분포하는 것으로 관찰되었다. 그러나 cristae가 발달한 mitochondria에는 황금입자의 표지가 다소 미약하게 표지된 것으로 관찰되어 porin 단백질은 cristae가 형성되지 않은 mitochondria에서 기질에도 분포하지만 cristae가 발달하면 mitochondria 외막에 주로 분포하는 것으로 생각되었다. 따라서 porin 단백질은 mitochondria가 형성될 때는 세포질에서 mitochondria 기질에 이르기까지 다양하게 분포하지만 mitochondria가 성숙하면 많은 단백질이 소멸되고 일부 porin 단백질이 mitochondria 외막에 한정되어 분포하는 것으로 사료된다. 이는 porin 단백질이 COX 효소의 소단위 단백질을 운반하여 cristae에 COX 효소를 형성시킨 다음 대부분 소멸되고 일부가 mitochondria 외막에 존재하여 ATP 운반 통로로 작용하는 것으로 생각된다.

Piana et al. (2005)에 의하면 COX 단백질은 13종류의 소단위 중에 모세포의 DNA에 의하여 유도되어 합성된 10종류의 소단위는 mitochondria 외막의 porin 단백질에 의하여 mitochondria 기질로 운반되면서 내막의 형성과 동시에 COX 복합단백체를 형성하는 것으로 보고한 바 있다. 또한 porin은 외막에 ion 통로를 형성하여 COX 단백질들의 소단위들의 뿐만 아니라 mitochondria 내로 유입되는 물질의 통로로 역할을 수행할 수 있는 단백질로 보고된 바 있다 (Piana et al., 2005). 또한 mitochondria 외막에 porin 또는 VDAC (voltage-dependent anion-selective channel)이라고 알려진 단백질 세포질에 존재하는 음이온을 선택적으로 통과시키는 역

할을 수행하며, porin 채널에 의해 통과된 음이온 및 전자들이 전자전달계 효소로 전달되는 것으로 알려져 있다 (Colombini, 1979). Porin 단백질은 효모, 동물 식물에 이르는 대부분의 진핵생물에서 발견되는 것으로 보고된 바 있다 (Linden et al., 1982; De Pinto et al., 1989; Heins et al., 1994; Abrecht et al., 2000). Porin 단백질은 미토콘드리아의 외막에 작은 세공(細孔)형태로 형성되어 있는 단백질로 알려져 있으며 전압에 의존하는 단백질로 알려져 있다 (Schein et al., 1976). Porin 단백질의 전압의존은 전위가 0mV에 가까워지면 porin의 채널이 열린 상태에서의 succinate, malate, ATP와 같은 음전하용질의 확산이 가능해지지만 양이온이 선택적인 전도 상태로 전환되지 않는 경우도 있는 것으로 알려져 있다 (Rostovtseva & Colombini, 1997).

이 실험에서는 porin 단백질과 COX 단백질의 관계와 COX 단백질의 형성과 변화에 porin 단백질의 역할을 알아보기 위하여 근조직의 횡단면 조직항원에 porin 단백질에 대한 항체를 반응시키고 형광표지항체를 이차반응 시킨 다음 DAPI에 처리하여 형광현미경으로 관찰한 결과 porin 단백질이 포함된 mitochondria가 존재하는 근세포들은 Texas red 형광으로 인하여 적색을 나타내었다. 근세포가 가장자리에 ADPI에 반응한 핵이 청색으로 불규칙하게 존재하는 것이 관찰되었으며 근원섬유사이에 분포하는 많은 porin 단백질이 포함된 mitochondria는 밝은 주황색을 나타내고 있으나 porin 단백질이 적은 양으로 분포하는 근세포는 흐린 주황색을 나타내어 porin 단백질의 양적 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 형광현미경 관찰에서 porin 단백질이 존재하는 주황색 근세포들의 경계가 분명하게 관찰 되었다. 동일한 항원조직에 COX subunit II 단백질에 대한 항체를 반응시키고 FITC 형광표지항체를 이차반응 시킨 다음 DAPI에 처리하여 형광현미경으로 관찰한 결과 COX subunit II 단백질이 포함된 mitochondria가 존재하는 근세포들은 FITC 형광반응으로 밝은 녹색으로 나타나며, 녹색으로 나타나는 근세포 가장자리에는 DAPI에 반응된 핵이 청색으로 관찰되었다. COX subunit II 단백질이 적은 양으로 분포하는 mitochondria를 포함하는 근세포들은 녹색의 반응이 관찰되지 않았으나 다수의 핵이 청색으로 관찰되어 근세포의 존재를 확인할 수 있었다. 밝은 주황색으로 Texas red에 반응된 부위에는 COX subunit II 단백질에 표지된 FITC 형광반응이 나타나지 않는 것으로 관찰되는 반면에 porin 단백질이 관찰되지 않는 근세포에는 COX subunit II 단백을 다량 포함하는 mitochondria가 분포하는 것으로 관찰되었다. 동일한 조직항원에 porin 단백질 단클론 항체와 COX subunit II 단백 단클론 항체를 혼합하여 동시에 반응시킨 다음 각각의 단클론 이형항체에 표지된 FITC와 Texas red를 중복 반응시켰을 때 porin 단백질이 풍부한 주황색 형광을 나타내는 근세포에는 COX subunit II 단백질의 녹색 형광이 관찰되었다. Porin 단백질로 주황색이 나

타나는 근세포에는 COX subunit II 단백질의 녹색형광이 나타나는 것으로 관찰되어 porin 단백을 포함하는 근세포와 COX subunit II 단백을 포함하는 근세포가 각각 상이하게 구성되어 있음을 알 수 있었다. 일부 근세포에는 녹색 형광과 주황색 형광이 중복되어 노란색 형광으로 나타나는 porin 단백질과 COX subunit II 단백을 동시에 포함하고 있는 mitochondria가 분포하는 근세포가 존재하는 것으로 확인되었다. 그러나 대부분의 근세포들은 porin 단백질이 풍부하면, COX subunit II 단백질이 부족하고 COX subunit II 단백질이 풍부하면 porin 단백질이 빈약한 것으로 확인되었다. 이는 porin 단백질이 COX 단백을 형성시킨 다음 대부분은 소실되고 일부만이 mitochondria 외막의 통로를 형성하는 것으로 생각된다. 또한 COX 단백질은 mitochondria가 형성되면서 동시에 합성된다고 하기보다는 mitochondria가 형성된 다음에도 합성과 분해가 기능에 따라 불규칙적으로 이루어지는 것으로 생각되었다.

이상의 결과로 근세포의 COX 단백질은 고정된 분포와 일정한 형성 주기가 아니며, 유동적으로 형성되고 근세포의 활성에 따라 다양하게 분포하는 특성이 있는 것으로 생각되었다. 따라서 근세포의 조직은 부분적으로 주기적으로 활성화가 이루어짐으로써 지속적인 근세포의 수명을 유지하는 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- Abrecht H, Wattiez R, Ruyschaert JM, Homble F: Purification and characterization of two voltage-dependent anion channel isoforms from plant seeds. *Plant Physiol* 124 : 1181-1190, 2000.
- Colombini M: A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* 279(5714) : 643-645, 1979.
- De Pinto V, Benz R, Caggese C, Palmieri F: Characterization of the mitochondrial porin from *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* 987(1) : 1-7, 1989.
- Hanson BJ, Capaldi RA, Marusich MF, Sherwood SW: An immunocytochemical approach to detection of mitochondrial disorders. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(10) : 1281-1288, 2002.
- Heins L, Mentzel H, Schmid A, Benz R, Schmitz UK: Biochemical, molecular, and functional characterization of porin isoforms from potato mitochondria. *J Biol Chem* 269(42) : 26402-26410, 1994.
- Huttemann M, Schmidt TR, Grossman LI: A third isoform of cytochrome c oxidase subunit VIII is present in mammals. *Gene* 312 : 95-102, 2003.
- Jamal JA: Involvement of porin N,N-dicyclohexylcarbodiimide-reactive domain in hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane. *Protein J* 24(1) : 1-8, 2005.
- Kim SJ, Jung HS: Immunogold labeling of the enzyme in mitochondria inner membrane of beef and rat heart. *Hallym Univ J* 8 : 45-62, 1990.
- Kim SJ, Lee KO, Takamiya S, Capaldi RA: Mitochondrial myopathy involving ubiquinol-cytochrome-c-oxidoreductase (complex III) identified by immunoelectron microscopy. *Biochem Biophys Acta* 894 : 270-279, 1987.
- Konstantinova SA, Manneila CA, Skulachev VP, Zorov DB: Immunoelectron microscopic study of the distribution of porin on outer membranes of rat heart mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27(1) : 93-99, 1995.
- Linden M, Gellerfors P, Nelson BD: Purification of a protein having pore forming activity from the rat liver mitochondrial outer membrane. *Biochem J* 208 : 77-82, 1982.
- Persichini T, Mazzone V, Politicelli F, Morena S, Venturini G, Clementi E, Colasanti M: Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase. *Neuroscience Letters* 384 : 254-259, 2005.
- Piana GL, Marzullib M, Gorgoglione V, Lofrumento NE: Porin and cytochrome oxidase containing contact sites involved in the oxidation of cytosolic NADH. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 436 : 91-100, 2005.
- Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, Avadhani NG : Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *The Journal of Biological Chemistry* 281(4) : 2061-2070, 2006.
- Rostovtseva T, Colombini M: VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J* 72(5) : 1954-1962, 1997.
- Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A: Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* 30(2) : 99-120, 1976.
- Sedlak E, Panda M, Dale MP, Weintraub ST, Robinson NC: Photolabeling of cardiolipin binding subunits within bovine Heart cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 45 : 746-754, 2006.
- Shiva S, Oh JY, Landar AL, Ulasova E, Venkatraman A, Bailey SM, Darley-Usmar VM: Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 38(3) : 297-306, 2005.
- Vik SB, Georgevich G, Capaldi RA: Diphosphatidylglycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 78(3) : 1456-1460, 1981.

< 국문초록 >

Mitochondria 내막의 cytochrome-c-oxidase는 세포의 에너지 생합성에 중요한 요소이며, 세포자멸사와 각종세포의 병리학적인 현상과 밀접한 연관성이 있는 전자전달계효소로 알려져 있다. Porin 단백질은 mitochondria 내막과 외막에 분포하는 효소단백은

로 전자전달계효소 형성과 ATP 운반에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 면역현미경법을 사용하여 cytochrome-c-oxidase의 분포와 porin 단백질과의 연관성을 확인하여 mitochondria의 cristae에 분포하는 cytochrome-c-oxidase의 형성과 변화를 알아보고자 하였다.

Cardiac muscle tissue의 sarcoplasm에는 많은 수의 mitochondria가 분포하며, cytochrome-c-oxidase가 풍부한 mitochondria와 porin 단백질이 풍부한 mitochondria로 구별되었다. Cytochrome-c-oxidase가 풍부한 mitochondria는 porin 단백질이 빈약하

고 porin 단백질이 풍부한 mitochondria는 cytochrome-c-oxidase가 소량 포함되어 있는 것으로 관찰되었다. 심근조직의 부위에 따라 근형질에 분포하는 mitochondria에 cytochrome-c-oxidase가 풍부한 mitochondria와 porin 단백질이 풍부한 mitochondria가 각각 상이하게 분포하였다. 이상의 결과로 미성숙 mitochondria는 많은 양의 porin 단백질을 함유하여 근형질로부터 단백질 소단위를 mitochondria 막내로 운반하여 cytochrome-c-oxidase를 형성시키고 mitochondria가 성숙하면서 ATP를 운반할 최소한 양의 porin 단백질을 남기고 소멸되는 것으로 추측된다.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Light microscopical observation of the bovine cardiac muscle cross section region colorized with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction ($\times 200$). It observed muscular fiber subunit which was composed of several myofibril, sarcoplasm and nucleus. Some mitochondria of myofibril space observed that distribution of cytochrome-c-oxidase (arrow). Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 2. Light microscopical observation of the bovine cardiac muscle cross section region colorized with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction ($\times 1,000$). It observed mitochondria of sarcoplasm which was composed of myofibril, sarcoplasm and nucleus colorized with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction and it was not colorized. Colorization at mitochondria of sarcoplasm with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction form mitochondria and muscular fiber (COXM). On the other hand not colorization at muscular tissue observed that muscular cell made up only myofibril (none COXM). Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 3. Light microscopical observation of the bovine cardiac muscle longitudinal section region colorized with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction ($\times 1,000$). It observed muscular tissue which was composed of several myofibril, sarcoplasm and nucleus with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction on longitudinal section region abundance of mitochondria. Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 4. Fluorescence microscopical observation of the bovine cardiac muscle cross section region labeled with porin monoclonal antibody reaction ($\times 400$, Texas red). It observed that longitudinal section region of myofibril react abundance of mitochondria with porin monoclonal antibody (porinM). Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 5. Fluorescence microscopical observation of the bovine cardiac muscle cross section region labeled with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction ($\times 400$, FITC). It observed that between myofibril react mitochondria of sarcoplasm with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody (COXM). Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 6. Fluorescence microscopical observation of the bovine cardiac muscle cross section region labeled with cytochrome-c-oxidase and porin monoclonal antibody reaction at the fluorescence merged images ($\times 400$, FITC and Texas red). It observed that between myofibril react mitochondria of sarcoplasm with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody (green color, COXM) and abundance of mitochondria with porin monoclonal antibody (red color, Porin M). Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 7. Light microscopical observation of the bovine cardiac muscle longitudinal section region colorized with porin monoclonal antibody reaction ($\times 400$). It observed muscular fiber subunit which was composed of several myofibril, sarcoplasm and nucleus. Some mitochondria of myofibril space observed that distribution of porin. Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 8. Light microscopical observation of the bovine cardiac muscle longitudinal section region colorized with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction ($\times 400$). It observed muscular fiber subunit which was composed of several myofibril, sarcoplasm and nucleus. Mitochondria of muscular tissue distinguish including of cytochrome-c-oxidase and not including of that. Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 9. Transmission Electron Microscopical observation of the bovine cardiac muscle longitudinal section region labeled gold particle with porin monoclonal antibody reaction ($\times 20,000$). It observed that a numbers mitochondria of between myofibril include porin. Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.

Fig. 10. Transmission Electron Microscopical observation of the bovine cardiac muscle longitudinal section region labeled gold particle with cytochrome-c-oxidase monoclonal antibody reaction ($\times 20,000$). It observed that mitochondrial cristae of between myofibril include a numbers cytochrome-c-oxidase. Scale Bar= $1 \mu\text{m}$.



