

hCG-induced Endoplasmic Reticulum Stress Leads to Activation of the IRE1/XBP1 Pathway in Mouse Leydig Tumor Cells (mLTC-1)

Sun-Ji Park¹, Tae-Shin Kim² and Dong-Seok Lee^{1*}

¹School of Life Science and Biotechnology (BK 21 plus program), Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Department of Reproductive Medicine, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drives, La Jolla, California 92093, USA

Received July 17, 2014 / Revised August 11, 2014 / Accepted August 11, 2014

This study analyzed whether human chorionic gonadotropin (hCG) induces ER stress via the IRE1/XBP1 pathway in mouse Leydig tumor (mLTC-1) cells. In a previous study, we demonstrated that the unfolding protein response (UPR) plays an important role in the expression of steroidogenic enzymes by modulating the ATF6 pathway, as well as ER stress-mediated apoptosis in hCG-stimulated Leydig cells. Although UPR signaling has been reported to regulate the IRE1/XBP1 pathway, it is not known whether hCG-induced ER stress in Leydig cells can activate the pathway. To investigate the activation of the IRE1/XBP1 pathway in mLTC-1 cells after hCG treatment, we performed a Western blot analysis to detect the phospho-IRE1 protein and an RT-PCR analysis to validate splicing of XBP1 mRNA. We used ER stress-activated indicator (ERAI) constructs for monitoring the activity of IRE1 and then analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry. The expression levels of the phospho-IRE1 protein markedly increased in response to the hCG treatment. In the mLTC-1 cells transfected with an F-XBP1-venus/F-XBP1 Δ DBD-venus construct, the hCG treatment led to the appearance of green fluorescent cells and detectable fluorescence in the nucleus and cytosol, respectively. In addition, splicing of XBP1 mRNA significantly increased after the hCG treatment. Taken together, these results indicate that hCG-induced ER stress leads to activation of the IRE1/XBP1 pathway in Leydig cells.

Key words : ER stress, hCG (human chorionic gonadotropin), IRE1, leydig cells, XBP1

서 론

소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 단백질의 합성과 폴딩(folding), 조립(assembly) 등의 과정이 일어나는 중요한 장소이다. 하지만 소포체내에 과도한 단백질 합성과 미성숙된 단백질의 축적, 칼슘이온의 항상성 이상 등으로 인해 소포체 기능에 장애가 발생하는데 이를 소포체 스트레스(ER stress)라고 한다[3]. 세포는 이 스트레스에 대항하여 생존하기 위한 방어기전으로 UPR (unfolding protein response) 경로를 활성화시킨다.

UPR 경로는 소포체 막에 존재하는 세 가지 신호전달체계인 protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK), inositol-requiring protein 1 (IRE1) 그리고 activating transcription factor 6 (ATF6)에 의해 매개되어 소포체의 항상성을 회복시킨다[6]. PERK, IRE1, ATF6는 스트레스가 없는 상태에

서는 소포체 샤페론인 Grp78/Bip과 결합하여 비활성상태로 존재하지만 소포체 스트레스가 발생하게 되면 Grp78/Bip과의 결합으로부터 분리되어져 활성화된다[14]. 먼저 PERK는 이량체(dimer) 형성 후 자가인산화(autophosphorylation)에 의해 활성화되고, 활성형의 PERK는 eukaryotic translation initiation factor 2a (eIF2a)를 인산화시켜 mRNA에서 단백질로 번역(translation)되는 과정을 감소시킨다[16]. 두 번째로 IRE1은 PERK와 마찬가지로 이량체 형성 후 자가인산화되면 endonuclease로써 작용하여 X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA를 splicing시켜 활성형의 XBP1 단백질로의 발현을 유도하고, 이는 전사인자로 작용하여 소포체 스트레스 관련 유전자의 ER stress response element (ERSE) 부위에 결합하여 전사를 증가시킨다[6, 11]. 마지막으로 glucose-regulated protein (Grp78/ Bip) 에서 분리된 비활성형 ATF6 (p90)는 소포체에서 골지체(Golgi apparatus)로 운반된 후 절단되어 활성형 ATF6 (p50)로 바뀌고 핵 속으로 이동하여 전사인자로 작용하여 샤페론의 발현을 유도한다[11].

이런 UPR signaling에 대한 연구는 인슐린(insulin)을 분비하는 췌장의 베타세포[8], 콜라겐(collagen)을 분비하는 조골세포[4]와 gonadotropin을 분비하는 gonadotrope 세포[2] 등과 같은 특정 단백질을 생산하는 분비 세포에서 많이 이루어졌다. 정소의 레이드히 세포(leydig cell)는 세정관 간극에 위치

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-7366, Fax : +82-53-943-6925

E-mail : lee1@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하며 황체형성호르몬(luteinizing hormone; LH)의 자극을 받아 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone)을 생산하는 또 다른 유형의 분비세포이다. 레이디히 세포는 LH의 자극을 받아 테스토스테론 합성을 위해 성호르몬합성효소들(steroidogenic enzymes)을 지속적으로 발현시켜야 하므로 UPR signaling이 레이디히 세포에서 중요한 조절작용을 할 것으로 생각된다. 이전 연구를 통하여 마우스 레이디히 세포인 mLTC-1 세포와 10주령 수컷 마우스에 LH 유사호르몬인 사람 융모성 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin; hCG)을 처리하였을 때 소포체 스트레스가 야기되어 UPR signaling이 활성화되고 특히 활성형 ATF6 (p50)에 의해 성호르몬합성효소의 발현이 직접적으로 조절되는 것을 처음으로 증명하였다 [9]. 또한 이 hCG를 고농도 혹은 장시간 처리 할 경우 소포체 스트레스 매개의 세포자멸사가 유도되는 것을 *in vivo*와 *in vitro* level의 레이디히 세포에서 모두 확인하였다. 이 연구를 통하여 레이디히 세포 역시 다른 분비세포와 같이 소포체 스트레스가 발생하여 UPR signaling의 조절을 받는다는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 아직 레이디히 세포에서 hCG처리에 의해 증가된 세가지 UPR경로가 각각 어떤 역할을 하는지 다 밝혀지지 않았으며 각 UPR 관련 유전자의 세포 내 역할에 대한 연구가 좀 더 필요한 단계이다.

따라서 본 연구에서는 mLTC-1세포에 hCG를 다양한 농도와 시간으로 처리하여 IRE1 유전자의 활성 여부 및 활성 IRE1의 endonuclease 기능에 의한 XBP1 mRNA의 splicing 유도를 확인하기 위하여 다양한 실험방법을 이용하여 분석하였다. 이 결과를 통하여 향후 정소의 레이디히 세포에서 IRE1/XBP1 유전자의 역할을 연구에 적용 및 응용 가능성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

본 연구에서 사용된 Human chorionic gonadotropin (hCG)는 Intervet 社 (Chorulon, Milton Keynes, Buckinghamshire, UK)으로부터, 8-Bromo-cAMP (8-Br-cAMP)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 그리고 Tunicamycin (Tm)은 Calbiochem (La. Jolla, Cal., USA)에서 각각 구입하였다.

세포배양

실험에 사용한 생쥐 레이디히 세포주인 mLTC-1 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. mLTC-1 세포는 RPMI 1640배지에 10% FBS (fetal bovine serum, Hyclone, Thermo Scientific, Inc.)와 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 그리고 10mM HEPES를 첨가한 배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

Western blot

hCG를 농도별, 시간별로 처리한 후 PRO-PREP buffer (iNtRON Biotechnology Inc.)를 넣어 파쇄한 후 13,000rpm으로 10분간 원심분리 하여 단백질 상층액을 얻어 사용하였다. 단백질을 분리하기 위하여 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 하였다. 그런 다음 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane (Pall Life sciences, NY, USA)으로 이동시키고 5% skim milk에 1시간 동안 blocking 하였다. 이후 membrane을 anti-Grp78/Bip, anti-IRE1 (Cell Signaling, MA, USA), anti-phospho-IRE1 (Abcam, MA, USA), anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 각 1차 antibody로 4°C에서 12시간 배양한다. 1XTBST buffer로 washing 한 후 anti-mouse/ rabbit IgG (Thermo, Scientific, MA, USA)로 각 2차 antibody로 실온에서 1시간 배양한다. 다시 1XTBST buffer로 washing 한 후 ECL 용액(abfrontier, Seoul, Korea)으로 감광시킨 후 암실에서 X-선 필름에 노출시킨 후 인화하였다.

In vitro transient transfection

mLTC-1 세포에 소포체 스트레스-활성 표지자(ER stress-activated indicator, ERAI)인 pCAX-F-XBP1-venus 혹은 pCAX-F-XBP1ΔDBD-venus 플라스미드[10]를 Effectene transfection reagent (Qiagen, Valenica, CA, USA)를 이용하여 세포에 도입하였다. 이후 48시간 뒤에 FBS가 들어있지 않은 RPMI1640 배지에 12시간 배양한다. 그런 다음 5 IU hCG, 500 uM cAMP 그리고 2 μg/ml Tm을 12시간 처리한다.

Flow cytometry 분석

pCAX-F-XBP1-venus 혹은 pCAX-F-XBP1ΔDBD-venus vector를 도입한 mLTC-1세포에 hCG, cAMP를 처리하고 난 후 0.05% trypsin-EDTA (Invitrogen)을 이용하여 세포를 수확한다. 이후 세포를 phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4)로 두 번 washing 하고 DMEM (-Phenol red)에 현탁시켰다. 세포현탁액을 green fluorescence 신호로 FACSCalibur (BD Biosciences, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

형광현미경을 이용한 세포관찰

pCAX-F-XBP1-venus 혹은 pCAX-F-XBP1ΔDBD-venus 플라스미드를 도입한 세포에 소포체 스트레스가 유도되면 녹색 형광이 핵 혹은 세포질에서 발현된다. mLTC-1세포에 이 플라스미드를 각각 도입한 뒤 hCG, cAMP, Tm을 처리하고 형광현미경으로 관찰하였다. 배지를 제거하고 PBS로 두 번 washing 하고 methanol로 고정한 뒤 1 μg/ml Hoechst 33258로 핵을 염색시켰다. 염색 10분 후에 형광현미경(Leica DMIL microscope, DFC420C digital camera)을 이용하여 소포체 스트레스가 핵 혹은 세포질에서의 발현 여부를 관찰하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

5 IU hCG, 500 uM cAMP 그리고 2 µg/ml Tm을 시간 별로 처리한 mLTC-1 cell에 PBS washing 2번 후 1 ml의 Trizol solution(Bio science Technology, Korea)을 넣고 cell scrapper를 이용하여 cell을 수확하였다. 1.5 ml tube에 옮겨서 ice에서 5분간 반응시킨 후 수층과 유기용매층으로 분리시키기 위해 200 µl chloroform을 첨가하여 5분간 반응시킨다. 12,000rpm에 15분간 원심분리 한 뒤, total RNA가 들어있는 상층액을 500 µl의 Isopropanol이 들어있는 새 tube에 옮기고 가볍게 inverting 하였다. 원심분리하여 total RNA pellet을 down 시킨 후, 1 ml의 75% EtOH를 이용하여 2차례 washing 한 다음 상온에서 건조시켰다. 추출된 RNA는 50 µl의 RNase-free water인 DEPC에 희석하였다. 추출한 1 µg의 total RNA와 Oligo-dT 그리고 AccuPower® RT-PCR premix (Bioneer, Korea)을 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 -20°C에 냉동보관 하였다.

RT-PCR 및 XBP1 mRNA의 splicing 분석

합성된 cDNA를 주형으로 특정 primer (Table 1)를 첨가하여 AccuPower® PCR premix (Bioneer)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초, 72°C에서 5분 총 30 cycle 수행하였다. 대조군으로 GAPDH 유전자를 사용하였다. XBP1 mRNA의 splicing 분석하기 위해서 먼저 2X PCR Premix (Enzymomics, Seoul, Korea)와 XBP-1 primer (Table 1)를 이용하여 위의 조건과 동일하게 PCR을 수행하였다. 이 PCR 산물에 Pst1 제한 효소를 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시킨다. 그런 다음 EtBr이 포함된 2% agarose gel에 전기영동하여 UV상에서 band를 확인하였다.

결 과

hCG처리 후 p-IRE1 단백질 발현량 분석

마우스 레이디히 세포에서 hcg처리에 의해 p-IRE1의 발현 패턴을 확인하기 위하여 mLTC-1 세포에 hCG를 농도별, 시간 별로 처리하여 실험을 진행하였다. 먼저 주요한 소포체 스트레스 표지자인 Grp78/Bip의 단백질의 발현 패턴을 확인한 결과 hCG처리에 의해 Grp78/Bip단백질의 발현량이 급격히 증가하는 것을 통하여 이전 연구결과[9]와 같이 mLTC-1 세포에 hCG처리시 소포체 스트레스가 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 1). hCG에 의해 유도된 소포체 스트레스가 IRE1경로를

활성화 시키는지 확인하기 위하여 p-IRE1와 Total IRE1의 단백질 발현량을 western blot을 통하여 확인하였다. Fig. 1A에서 보듯이 hCG의 농도가 증가함에 따라 p-IRE1의 발현이 점점 증가하였다($p < 0.001$). 또한 5IU/ml의 hCG를 시간별시 처리하였을 때, 3시간 후부터 p-IRE1이 급격히 증가하여 24시간 까지 꾸준히 유지되었다(Fig. 1B). 이 결과를 통하여 마우스 레이디히 세포인 mLTC-1세포에 hCG처리에 의해 유도되는 소포체 스트레스는 IRE1을 인산화시키는 것을 단백질 수준에서 확인 할 수 있었다.

hCG와 cAMP 처리에 의한 IRE의 활성 분석

소포체 스트레스에 의해 인산화된 IRE1의 활성화 되어 endonuclease 활성을 가지게 된다. hCG처리에 의해 증가된 p-IRE1이 활성화되어 endonuclease의 기능을 수행하는지 확인하기 위하여 IRE1의 활성을 분석할 수 있는 소포체 스트레스-활성 표지자(ER stress-activated indicator, ERAI)인 pCAX-F-XBP1-venus 혹은 pCAX-F-XBP1 Δ DBD-venus vector를 mLTC-1 세포에 도입하여 실험을 진행하였다[10]. 소포체 스트레스 환경에서 이 vector에 삽입되어 있는 XBP1 유전자가 splicing 되면, splicing된 XBP1 mRNA는 XBP1-venus fusion protein으로 번역되어 녹색 형광이 발현되어 세포 내 활성 IRE1을 표지 할 수 있다. pCAX-F-XBP1-venus는 활성 IRE1에 의해 splicing 되어 만들어진 XBP1-venus fusion protein이 핵에 위치하게 되며, pCAX-F-XBP1 Δ DBD-venus로부터 만들어진 XBP1 Δ DBD-venus fusion protein은 세포질에 위치하게 된다 [5]. Figure 2에서 mLTC-1 세포에 각각 pCAX-F-XBP1-venus, pCAX-F-XBP1 Δ DBD-venus를 transfection 한 뒤 hCG와 hCG 자극에 의한 이차 전달자인 cAMP를 12시간 처리하여 형광현미경으로 관찰하였다. pCAX-F-XBP1-venus vector가 도입된 세포에 hCG와 cAMP 처리 시 녹색 형광을 띄는 세포들이 control에서 보다 많이 증가 되었으며(Fig. 2A), 세포를 확대해서 관찰하니 녹색형광이 핵에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). pCAX-F-XBP1 Δ DBD-venus를 도입한 세포에서도 역시 hCG와 cAMP 처리 시 녹색 형광의 세포들이 많이 발견되며, 녹색 형광 단백질 XBP1 Δ DBD-venus fusion protein이 세포질에서 발현하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2C and 2D). hCG와 cAMP 처리에 의해 증가되는 녹색 형광을 띄는 세포 수는 positive control로써 사용한 소포체 스트레스 유도제인 Tunicamycin (Tm) 처리 한 경우와 비슷한 수준으로 발견되는 것을 확인 하였다.

Table 1. Primer sequence for reverse-transcription PCR

| Gene | Accession number | Forward (5'-3') | Reverse (5'-3') |
|-----------|------------------|--------------------------|--------------------------|
| Grp78/Bip | NM_022310.2 | TGCAGCAGGACATCAAGTTC | CAGCTGCTGAGGCTCATTG |
| XBP1 | NM_013842.2 | AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC | TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG |
| GAPDH | NM_008084.2 | ACCACAGTCCATGCCATCAC | TCCACCACCCTGTTGCTGTA |

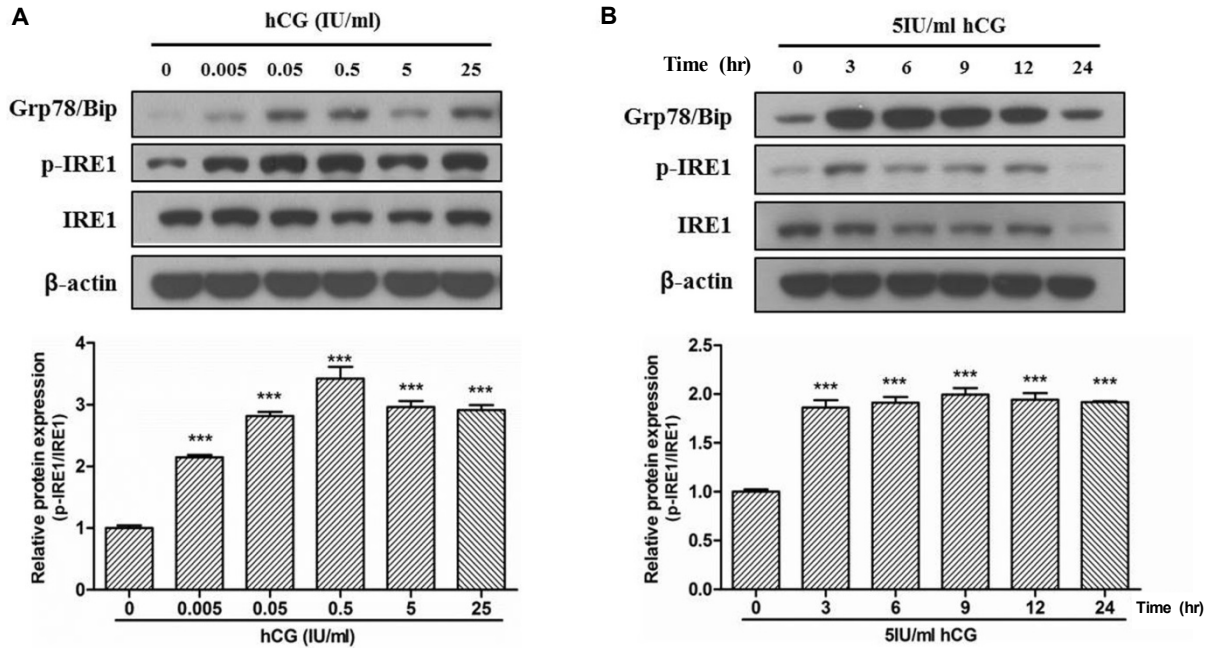


Fig. 1. hCG treatment cause ER stress and leads to IRE1 activation in mLTC-1 cells. Western blot analysis of Grp78/Bip, phospho-IRE1, total IRE1, β -actin protein in treated MLTC-1 cells with variant hCG concentrations. mLTC-1 cells were incubated with dose dependent manner of hCG for 12 hr (A). mLTC-1 cells were incubated with 5 IU/ml hCG for different incubation times (B). phospho-IRE1 protein were quantified and normalized by total IRE1 for Western blot analysis. Data in bar graph are the means \pm SEM of three independent measurements.

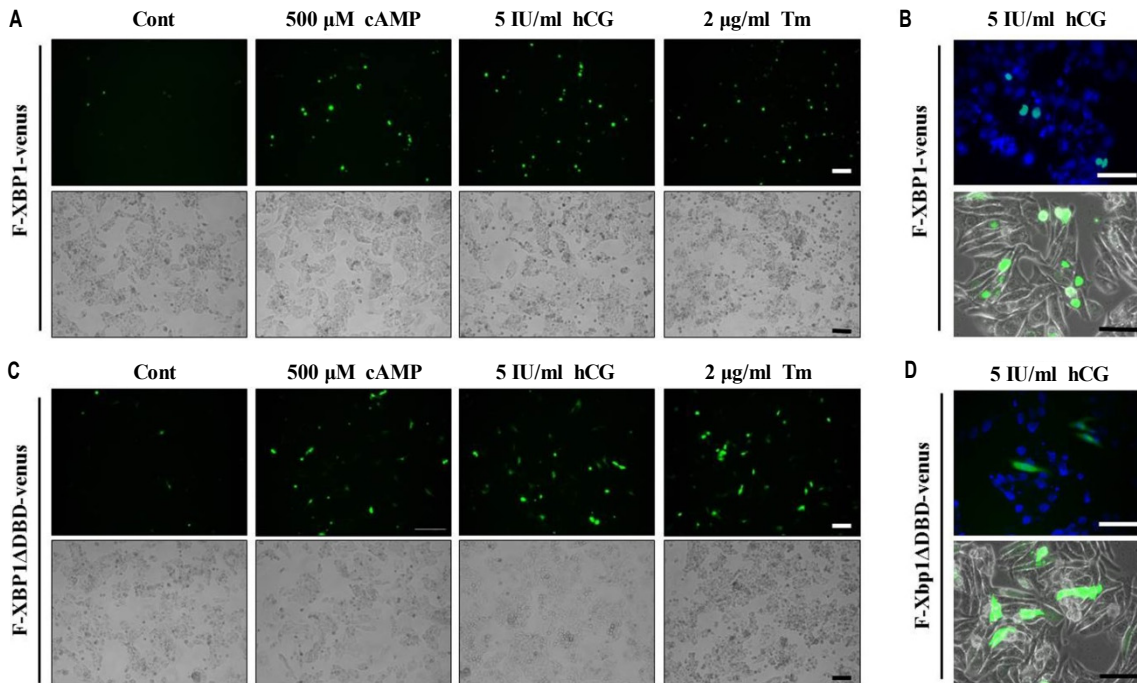


Fig. 2. hCG and cAMP induce the activation of IRE1. Fluorescence (green) image in mLTC-1 cells were transfected with indicator plasmids and treated with cAMP, hCG and Tm. mLTC-1 cells were transfected with pCAX-F-XBP1-venus (A, B) and pCAX-XBP1 Δ DBD-venus (C,D) for 48 hr. After transfection, mLTC-1 cells were pre-incubated with serum free medium for 12 hr, and then cells treated with cAMP (500 μ M), hCG (5 IU/ml), and Tm (2 μ g/ml) as positive control for 12 hr. Cells were fixed with methanol and stained with 1 μ g/ml Hoechst 33258 for 10 min (B,D) And then, cells were visualized and analyzed under a fluorescence microscope. Scale bar, 200 μ m.

또한 pCAX-F-XBP1-venus, pCAX-F-XBP1 Δ DBD-venus 를 각각 도입한 세포에 hCG와 cAMP 처리하여 증가하는 녹색형광의 강도를 조사하고 정량화 하기 위하여 Flow cytometry를 이용하여 분석하였다. Fig. 3에서 확인 할 수 있듯이 control에 비하여 hCG와 cAMP 처리한 세포에서 형광 강도가 많이 증가하였다. 세 번의 반복 실험을 통하여 얻은 평균값을 통계처리하여 그래프화 한 결과 control에 비하여 hCG와 cAMP 처리하였을 때 유의적으로 형광 강도가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다($p < 0.05$). 이 실험들을 통하여 hCG와 2차 전달자인 cAMP 모두 IRE1을 활성화 시키고, 활성화된 IRE1은 endonuclease 기능을 수행하여 도입된 pCAX-F-XBP1-venus 와 pCAX-F-XBP1 Δ DBD-venus의 XBP1 mRNA 영역을 splicing 시키는 것을 확인할 수 있었다.

hCG와 cAMP 처리에 의한 XBP1 mRNA의 splicing 분석

hCG와 cAMP 처리에 의해 활성화된 IRE1이 세포 내에서 발현되는 XBP1 mRNA의 splicing을 유도하는지 확인 하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 분석하였다. XBP1 mRNA는 소포체 스트레스에 의해 활성화된 IRE1에 의해 26개의 nucleotide가 splicing 된다. RT-PCR을 통하여 증폭한 unspliced XBP1 (uXBP1)과 spliced XBP1 (sXBP1)는 26개의 nucleotide 밖에 차이가 나지 않아 바로 전기영동으로 분리하여 확인 하기가 어렵다. 따라서 splicing 되는 26개의 nucleotide 영역 안에 존재하는 Pst1 제한효소 절단 부위를 이용하여 uXBP1와 sXBP1

를 구별하였다[1]. mLTC-1 세포에 cAMP와 hCG를 시간별로 처리한 뒤 sXBP1의 발현 량을 확인 하였다. cAMP 처리 후 4시간부터 sXBP1의 발현이 증가하기 시작하며($p < 0.01$), 처리 시간이 길어 질수록 발현 량이 점점 더 증가하여 8시간에 가장 많이 증가하였다($p < 0.001$). hCG 역시 처리 후 3시간부터 sXBP1 발현이 증가하며($p < 0.01$), 6시간 후부터 급격히 증가하는 것을 확인 할 수 있다($p < 0.001$). cAMP와 hCG 모두 처리 시간의존적으로 sXBP1의 발현이 점점 증가하는 경향을 보이다가 12시간부터는 조금씩 감소하기 시작한다. 하지만 소포체 스트레스 유도물질인 Tm 처리 한 경우, 처리 초반인 4시간 때부터 sXBP1의 발현이 급격히 증가하였다($p < 0.001$). 이 결과들을 통하여 cAMP와 hCG 처리는 mLTC-1 세포에 소포체 스트레스를 유발하며 IRE1/XBP1 경로를 활성화 시키는 것을 확인 할 수 있었다.

고 찰

마우스 정소의 레이디히 세포인 mLTC-1 세포에 hCG와 cAMP를 처리하여 Grp78/Bip의 발현 증가를 통하여 소포체 스트레스가 유도되었음을 확인하였고 이에 대한 방어기작으로 UPR signaling 중 활성 IRE1이 증가하며 XBP1 mRNA의 splicing이 유도되는 것을 통하여 IRE1/XBP1 경로가 활성화됨을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서는 이 IRE1/XBP1 경로를 분석하기 위하여 여러 가지 실험방법을 사용하였다. 먼저 소

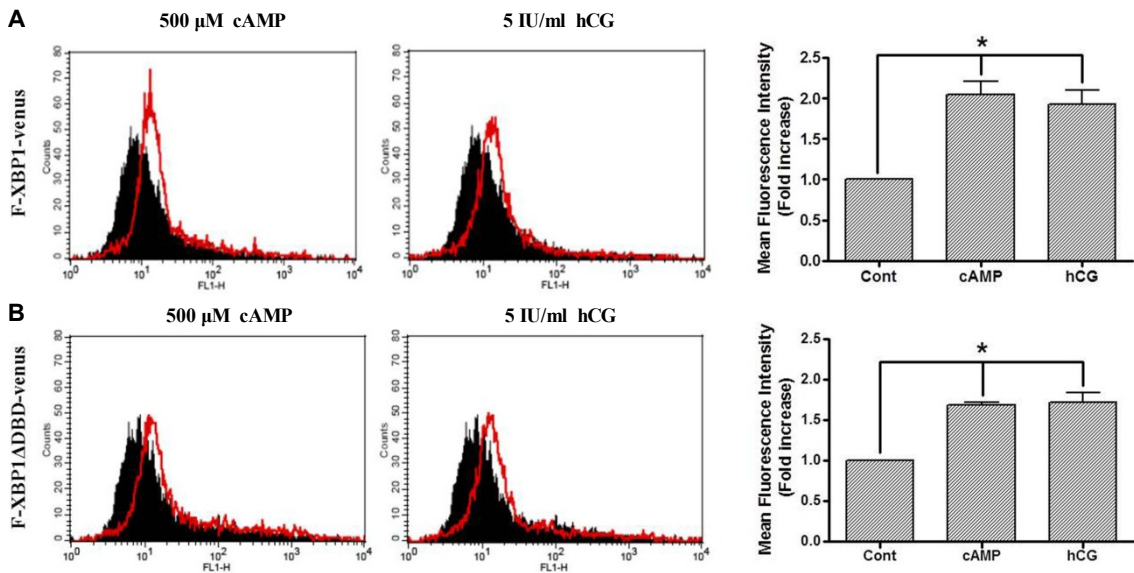


Fig. 3. hCG and cAMP induce the ER stress- dependent splicing of XBP1. Quantification of green fluorescent cells by flow cytometry. After transfected mLTC-1 cells with pCAX-F-XBP1-venus (A) and pCAX-XBP1 Δ DBD-venus (B) were treated with cAMP (500 μ M), hCG (5 IU/ml) for 12 hr, and then cells were analyzed with flow cytometry. The black and red lines indicate non-treated mock transfectants (pCAX, control) and treatments in pCAX-F-XBP1-venus and pCAX-XBP1 Δ DBD-venus, respectively. The mean fluorescence from three experiments is expressed per group of cells; intensities are expressed relative to the level in the each treatment cells. Asterisks indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$) between control (Cont) and treated cells using Student's t-test.

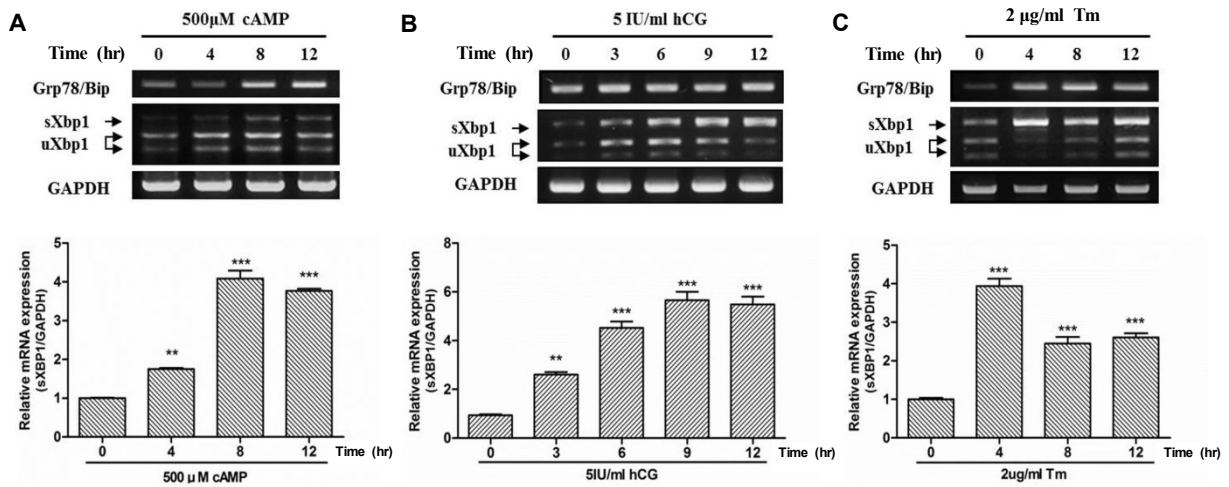


Fig. 4. hCG and its Second messenger cAMP induces ER stress via IRE1/XBP1 pathway in mLTC-1 cells. RT-PCR analysis of spliced XBP1 (sXBP1) and unspliced XBP1 (uXBP1) in 500 μM cAMP (A), 5 IU/ml hCG (B) and 2 μg/ml Tm (C) for indicated times. The sXBP-1 mRNA were quantified and normalized by GAPDH for RT-PCR. Data in the bar graph represent mean ± S.E.M. of three independent measurements. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, compared with control (0 hr).

포체 스트레스에 의해 Grp78/Bip과의 결합에서 해리된 IRE1 단백질이 인산화되는데 이를 분석하기 위하여 Western blot을 수행하여 p-IRE1/ IRE1의 발현을 확인하였다. 다음으로 인산화된 IRE1은 활성화되어 endonuclease 기능을 하므로 이를 확인하기 위하여 ERAI인 pCAX-F-XBP1-venus, pCAX-F-XBP1 ΔDBD-venus vector를 세포에 도입하여 형광현미경과 Flow cytometry를 통하여 분석하였다. 그리고 소포체 스트레스에 의한 세포 내 XBP1 mRNA의 splicing이 유도되는지 확인 하기 위하여 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 뒤 Pst1 제한효소를 처리하여 unspliced XBP1과 spliced XBP1 분리하여 발현 량을 조사하였다. 다음과 같은 실험 방법들을 이용하여 IRE1/XBP1 경로가 활성화 됨을 판단할 수 있었으며, 본 연구를 통하여 정립된 실험방법을 응용하여 mLTC-1 세포 내에서 활성화된 IRE1과 XBP1의 기능을 규명하는데 기여 할 것으로 사료된다. 이전 연구에서 활성화된 ATF6 (p50)를 세포에 과 발현 시켰을 때 테스토스테론 합성에 필수적인 성호르몬합성 효소인 3β- hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD)의 발현을 감소시켰으나, 다른 UPR signaling의 하위 신호전달 유전자인 sXBP1과 ATF4를 과발현 시켰을 경우 3β-HSD의 발현에 영향을 주지 못하였다[9]. 따라서 hCG 처리에 의해 활성화되는 sXBP1은 성호르몬합성 효소의 발현에 직접적으로 관여 하지 않지만 ERSE 부위에 결합하여 소포체 스트레스 관련 유전자의 전사를 증가시키고 단백질의 폴딩을 도와주는 샤페론 기능을 할 것으로 사료되며 추가적인 실험을 통하여 이 가설을 증명할 예정이다[7, 15]. 또한 IRE1이 활성화되면 endonuclease domain과 serine-threonine kinase domain을 가져 2가지 기능을 하게 되는데, 본 연구에서는 활성화된 IRE1의 endonuclease기능에 대하여만 증명하였다. 활성화된 IRE1은 serine-threonine kinase로써 역할을 하여 pro-apoptotic 인자인 Jun N-ter-

минаl kinase (JNK)를 인산화 시켜서 소포체 스트레스 매개의 세포자멸사를 유도한다고 알려져있다[12, 13]. 우리도 이전 연구를 통하여 5IU/ml의 hCG를 처리 뒤 12시간부터 p-JNK의 단백질 발현량이 증가하며 이 것이 소포체 매개의 세포자멸사를 유도할 것이라고 보고하였다. hCG 처리에 의해 증가하는 활성화된 IRE1의 endonuclease domain과 serine-threonine kinase domain이 각각 세포에 작용하는 시기에 대하여 아직 연구가 되지 않았다. 따라서 hCG의 처리 시간 및 농도에 따라 활성화된 IRE1의 어떤 domain이 활성화 되는지 본 연구에서 이용한 실험 방법들을 이용하여 이를 분석할 수 있을 것으로 예상된다. 본 논문을 통하여 향후 정소의 레이디히 세포 내에서 hCG 처리에 의한 IRE와 XBP1 유전자의 역할 연구에 적용 및 응용할 수 있는 가능성을 제시하였으며 이 결과는 기초 연구 자료로써 활용 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 이공분야 기초연구사업(NRF-2012R1A1A2008880) 및 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(112020-03-2-SB020) 그리고 미래창조과학부 한국생명공학연구원 바이오 인프라 위탁과제(KGM4611411)의 지원에 의하여 연구되었음.

References

1. Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. and Ron, D. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96.
2. Do, M. H., Santos, S. J. and Lawson, M. A. 2009. GNRH

- induces the unfolded protein response in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol* **23**, 100-112.
3. Fonseca, S. G., Gromada, J. and Urano, F. 2011. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. *Trends Endocrinol Metab* **22**, 266-274.
 4. Hamamura, K. and Yokota, H. 2007. Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling. *FEBS Lett* **581**, 1769-1774.
 5. Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. and Miura, M. 2004. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med* **10**, 98-102.
 6. Lai, E., Teodoro, T. and Volchuk, A. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* **22**, 193-201.
 7. Lee, A. H., Iwakoshi, N. N. and Glimcher, L. H. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **23**, 7448-7459.
 8. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H. and Hotamisligil, G. S. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461.
 9. Park, S. J., Kim, T. S., Park, C. K., Lee, S. H., Kim, J. M., Lee, K. S., Lee, I. K., Park, J. W., Lawson, M. A. and Lee, D. S. 2013. hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis. *J Mol Endocrinol* **50**, 151-166.
 10. Samali, A., Fitzgerald, U., Deegan, S. and Gupta, S. 2010. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Int J Cell Biol* **2010**, 830307.
 11. Schroder, M. and Kaufman, R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789.
 12. Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M. and Samali, A. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* **7**, 880-885.
 13. Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P. and Ron, D. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**, 664-666.
 14. Wu, J. and Kaufman, R. J. 2006. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* **13**, 374-384.
 15. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891.
 16. Zhao, L. and Ackerman, S. L. 2006. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 444-452.

초록 : mLTC-1 세포에 hCG 처리에 의해 유도된 소포체 스트레스가 IRE1/XBP1 경로의 활성화 유발

박선지¹ · 김태신² · 이동석^{1*}

(¹경북대학교 자연과학대학 생명과학부(BK 21 plus 사업), ²캘리포니아대학교 생식의학부)

본 연구의 목적은 마우스 레이디히 세포인 mLTC-1 세포에 사람 융모성 성선자극호르몬인 hCG를 처리하여 유도되는 소포체 스트레스가 IRE1/XBP1 경로를 통하는지 분석하는 것이다. 이전 연구에서 hCG처리에 의해 레이디히 세포는 소포체 스트레스 매개의 세포자멸사가 유도될 뿐만 아니라 ATF6경로를 조절함으로써 UPR이 성호르몬 합성 효소의 발현에 중요한 역할을 하는 것을 증명하였다. UPR 경로는 또한 IRE1/XBP1 경로를 통하여 조절되는 것이 알려져 있지만 레이디히 세포에서 hCG에 의한 소포체 스트레스에 의해 IRE1/XBP1 경로의 활성화가 유도되는지에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. mLTC-1세포에서 hCG 처리 후 IRE1/XBP1경로의 활성을 조사하기 위하여, 인산화된 IRE1 단백질 확인하기 위한 western blot, XBP1 mRNA splicing 확인하기 위한 RT-PCR을 수행하였다. 또한 우리는 IRE의 활성을 관찰하기 위하여 소포체 스트레스-활성 표지자(ERAI) construct를 이용하고 이를 형광현미경과 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 결과적으로, hCG 처리에 의해 인산화된 IRE1 단백질의 발현 수준이 두드러지게 증가하였다. F-XBP1-venus/ F-XBP1ΔDBD-venus가 도입된 mLTC-1 세포에서, hCG 처리에 의해 녹색 형광을 띄는 세포들이 유도되었고 각각 핵/세포질에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 게다가 hCG 처리 후에 XBP1 mRNA의 splicing 또한 상당히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과들을 통하여 종합해 볼 때 레이디히 세포에서 hCG 처리에 의해 유도되는 소포체 스트레스가 IRE1/XBP1 경로의 활성을 유발하는 것을 확인할 수 있었다.