

P-9

생쥐 자궁의  $\beta$ -galactosidase의 발현

안정원<sup>1,2</sup>, 김해권<sup>1</sup>, 윤현수<sup>2</sup>, 노성일<sup>2</sup>, 조동재<sup>3</sup>  
서울여자대학교 생물학과<sup>1</sup>, 영동제일병원<sup>2</sup>, 연세대학교 산부인과<sup>3</sup>

서론

포유류의 생식기관 중 자궁은 초기배아가 계속적인 발생을 유지하기 위하여 착상하는 부위로서 매우 중요한 역할을 담당한다. 자궁은 내막층, 결합조직층 근육층 그리고 외막층으로 이루어져 있다. 내막층은 한 층의 상피세포(luminal epithelium)와 선상피세포(glandular epithelium)로 구성되며, basal lamina를 경계로 하여 내막층과 구분이 되는 결합조직층은 extracellular matrix (ECM), 혈관과 림프관, 섬유세포 등의 성분들로 구성된다. 이중 ECM과 basal lamina는 collagen, elastin등의 구조단단백질과 polysaccharide chain으로 구성된 proteoglycan과 glycosaminoglycan (GAG) 등으로 구성되어 있다. GAG와 proteoglycan molecule들은 결합조직 내에서 gel과 같은 형태의 기본구성물질을 이루고 있다(Adams and Watt, 1993).

다양한 결합조직 성분들로 구성된 자궁조직들을 remodeling하는 데는 여러 가지 protease, glycosidase 등의 효소가 관여하게 된다. glycosidase는 보통 intracellular lysosome에 존재하나 세포외에 존재할 경우에는 exoglycosidase로써 여러 가지 당단백질이나 그 밖의 sugar residue를 포함하는 물질들의 oligosaccharide를 제거함으로써 당성분을 용해하는 역할을 한다(Glasser and Conrad, 1979). 잘 알려진 glycosidase로는  $\alpha$ - 및  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -hexosaminidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -fucosidase 등이 있다.

Glycosidase들 중 특히  $\beta$ -galactosidase는 lysosomal hydrolase로서 gangliosides, glycoproteins, glycosaminoglycans 등의  $\beta$ -linked terminal galactosyl residue를 끊는 역할을 한다(Conzelmann, 1987; Morreau, 1989). 포유동물의 간조직과 백혈구에도  $\beta$ -galactosidase가 존재하며 GM1-gangliosides를 분해하는 기능이 있다(Suzuki, 1980). 또한  $\beta$ -galactosidase는 insulin-like-growth factor-II(IGF-II)의 binding affinity를 감소시키는 것으로 보고되었다(Kiess W, 1990). 특히 흰쥐의 epididymal cell에서는  $\beta$ -galactosidase가 발견되는데, epididymal luminal fluid에 존재하는  $\beta$ -galactosidase는 sperm surface의 high-affinity binding site에 결합하여 sperm surface를 변화시킴으로써 이 효소가 난자와의 수

정에 필요한 기능적인 활성을 갖도록 한다고 제안된 바 있다(Skudlarek *et al.*, 1993).

본 연구에서는 포유동물의 생식에 필요한 자궁조직의 분화과정에서  $\beta$ -galactosidase가 수행하는 역할을 규명하기 위하여 생쥐의 자궁조직을 재료로 하여 생식주기와 임신에 따른 자궁조직의  $\beta$ -galactosidase의 mRNA와 단백질의 발현양상과 동 효소의 활성도를 조사하였다.

재료 및 방법

생쥐의 생식주기를 diestrus, proestrus, estrus, metestrus로 나누고 각각의 주기의 자궁으로부터 자궁내액과 조직추출액을 얻어 각각 조사하였다. 또한 임신이 확인된 생쥐의 자궁으로부터 임신 1일, 2일, 3일, 4일째에 같은 방법으로 시료를 얻어 조사하였다.

$\beta$ -galactosidase mRNA의 발현은  $\beta$ -galactosidase cDNA의 primer를 이용하여 역전사-중합효소연쇄 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 방법으로 분석하였고 단백질의 발현은  $\beta$ -galactosidase에 대한 항체를 사용하여 전기영동과 western blotting을 이용한 방법 그리고 p-nitrophenyl- $\beta$ -galactosidase를 기질로 하는 효소활성측정 방법으로 분석하였다

결과 및 논의

생쥐의 자궁조직에서는  $\beta$ -galactosidase mRNA가 관찰되었으며 이 mRNA는 생식주기에 상관없이 항상 나타났다. 또한 임신 1일에서 4일째까지의 자궁조직에서도 발현되는 것이 관찰되었다. 한편 항체를 이용하여 자궁의 조직추출액의  $\beta$ -galactosidase 단백질의 발현 양상을 조사한 결과 모든 생식주기에서 각각 73kDa, 68kDa, 63kDa, 59kDa의 분자량을 갖는 4가지 isozyme이 존재하는 것이 관찰되었고 이중 63kDa 단백질의 양이 가장 많았다. 자궁내액에서는 자궁 조직추출액에서 나타난 4가지 isozyme 외에도 54kDa isozyme과 50kDa이 추가로 발견되었다. 이 중 54kDa 단백질의 양은 상대적으로 많지 않았으나 50kDa 단백질은 매우 많은 양이 나타났다. 이 결과로 미루어 54kDa 및 50kDa isozyme은 자궁의 조직세포에서 합성되거나 자궁강으로 분비된 후에 활성화되

는 효소인 것으로 여겨진다. 한편 임신 1일째에서 4일째의 자궁 조직추출액의  $\beta$ -galactosidase 단백질의 발현 양상을 같은 방법으로 분석한 결과 모든 시기의 시료가 68kD, 63kDa 등 두 개의 isozyme의 존재를 나타내었고 1일째에서 4일째로 갈수록 점점 더 합성량이 증가하는 것이 관찰되었다.

생식주기에 따른 자궁 조직추출액의  $\beta$ -galactosidase의 활성은 proestrus 시기에 가장 높았으며(0.35  $\mu$ mol/mg protein/hr) estrus와 metestrus로 갈수록 점차 그 활성이 감소(0.30  $\mu$ mol/mg protein/hr 및 0.20  $\mu$ mol/mg protein/hr)하였다(Fig. 1). 이에 대해 자궁내액의 동 효소의 활성은 diestrus 시기에 가장 높은 활성(0.087  $\mu$ mol/mg protein/hr)을 보였고 proestrus, estrus 및 metestrus로 진행함에 따라 감소하였다(Fig. 2). 한편 임신 1일째의 자궁조직추출액의  $\beta$ -galactosidase의 활성은 0.32  $\mu$ mol/mg protein/hr로서 생식주기 중의 proestrus 시기의 값과 비슷하였으나 임신기간이 경과할수록 점점 더 높은 활성(D2, 0.42  $\mu$ mol; D3, 0.47  $\mu$ mol; D4, 0.57  $\mu$ mol/mg protein/hr)을 나타내었다(Fig. 3).

본 연구의 결과로 미루어 생쥐 자궁의 조직추출액의  $\beta$ -galactosidase의 발현이 생식 주기 동안 proestrus 시기에 가장 높은 활성을 나타낸 것은 자궁 조직의 remodeling에 필요한 동 효소의 합성이 이 시기에 가장 활발하기 때문으로 여겨진다. 그러나 자궁내액의 경우 diestrus 시기에 가장 높은 활성을 나타내었는데 이는 diestrus 시기에 자궁 내막세포가 탈락막으로 전환되면서 세포내의 효소가 분비되기 때문으로 여겨진다. 이때 분비된 효소들은 자궁의 내막세포들을 지지해 주고 있던 mucopolysaccharide를 용해시켜 내막층을 떨어져 나가게 함으로써 결국은 새로운 생식주기에 따른 조직의 세포분화를 가능하게 하는 것으로 사료된다.

흰쥐의 경우, 자궁조직에서는  $\beta$ -galactosidase를 포함한 다른 여러 가지 glycosidase가 발현되며,  $\beta$ -glucosidase를 제외한 다른 glycosidase들은 progesterone을 주입하였을 때 보다 더 높은 활성을 나타내므로 자궁조직 내의 대부분의 glycosidase들은 호르몬에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Munakat, 1986).

한편 임신 1일째에서 4일째까지의 경우, 임신이 진행될수록  $\beta$ -galactosidase 단백질의 양이 증가하고 더 높은 활성이 나타난 것은 임신 유지를 위한 생식 호르몬의 분비로 인해 결국 많은 양의 단백질이 발현되어 이로 인해 활성이 증가하는 것으로 여겨진다. 이러한 연구 결과들로 미루어 볼 때,  $\beta$ -galactosidase는 생쥐 자궁의 생식주기에 따른 remodeling뿐만 아니라 임신 초기의 배아의 착상과정에도 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

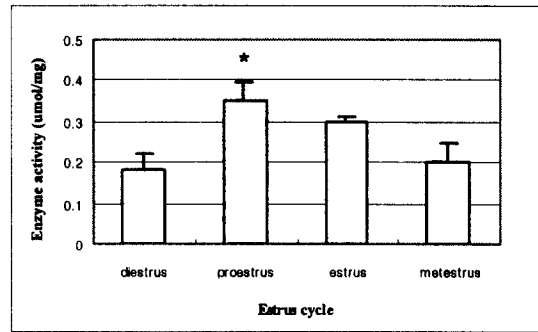


Figure 1. Activity of  $\beta$ -galactosidase in mouse uterine tissue(UT) during estrus cycles. The data are expressed as the mean SEM from 4 independent experiments. The asterisk indicates that the difference is significant (P0.05, t-test) compared to metestrus.

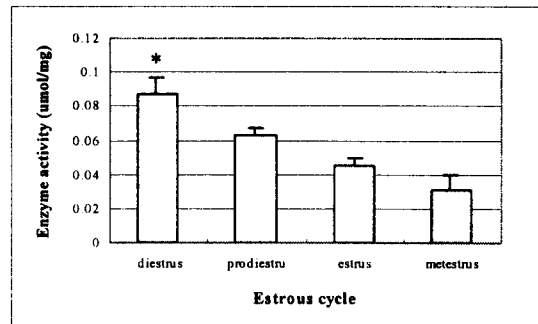


Figure 2. Activity of  $\beta$ -galactosidase in mouse uterine fluid (UF) during estrus cycles. The data are expressed as the mean SEM from 4 independent experiments. The asterisk indicates that the difference is significant (P0.01, t-test) compared to estrus.

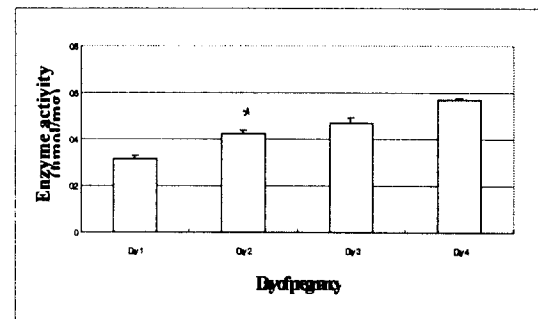


Figure 3. Activity of  $\beta$ -galactosidase in mouse uterine tissue (UT) during early pregnancy. The data are expressed as the mean SEM from 3 independent experiments. The asterisk indicates that the difference is significant (P0.01, t-test) compared to Day 1.

## 요 약

생쥐 자궁의 조직세포는 생식주기와 초기 임신 시기동안  $\beta$ -galactosidase mRNA를 지속적으로 발현하며, 이로부터 합성 및 분비되는  $\beta$ -galactosidase 단백질의 발현과 활성은 자궁의 조직추출액에서는 생식주기 중 proestrus시기에, 자궁내액에서는 diestrus시기에 가장 높게 나타났고 임신 1일째부터 4일째의 기간동안에는 임신이 진행될수록 점점 더 높게 나타났다. 이러한 결과로 미루어  $\beta$ -galactosidase는 생쥐의 생식 활동 즉, 생식 주기동안의 자궁 조직세포의 분화와 임신 초기 배아의 자궁 내막에의 착상에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Adams JC and Watt FM (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183-1198.
- Skudlarek MD (1993)  $\beta$ -D-Galactosidase of rat spermatozoa: Subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. *Biol Reprod* 49: 204-213.