

돼지 Cytochrome P450 Aromatase의 새로운 기능

최 인 호, Ph.D.

영남대학교 생물자원학부

여성호르몬으로 잘 알려진 estrogen은 난소의 granulosa 세포와 정소의 Sertoli 세포에서 주로 생성되는 것으로 알려져 있으며 최근엔 사람의 지방, 근육, 뇌, 뼈세포 등에서의 합성 가능성과 각 조직에서 생성되는 estrogen의 생리화학적 기능에 관해 많은 관심이 모여져 왔다. 다른 steroid처럼 지방친화적인 (lipophilic) estrogen은 세포막과 핵막을 쉽게 통과하여 목표세포 (target cell)의 핵에 존재하는 estrogen receptor (ER)에 결합하여 특정 유전자를 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다.

Cytochrome P450 Aromatase (간략히, aromatase)는 steroid hormone을 합성하는 마지막 단계에서 androgens을 estrogens으로 전환시키는데 관여하는 효소이다. Aromatase의 substrate (기질)로 사용되는 androgen에는 androstenedione과 testosterone 등이 있으며, 최종 산물로써 estrone(E1)이나 17 β -estradiol(E2) 등의 estrogen이 생성된다. Aromatase는 steroidogenic tissues의 세포내 골지체에 존재하는 것으로 알려져 있으며, NADPH-cytochrome P450 reductase와 함께 복합체로써 존재한다. NADPH-cytochrome P450 reductase는 다른 steroid hormone에 관여하는 효소들과도 복합체를 형성하여 다른 steroid hormone을 합성할 수 있으므로, 어떤 조직에서 여성호르몬이 만들어질 수 있느냐 하는 것은 그 조직에서 aromatase 단백질이 만들어지느냐에 따라서 결정된다.

Aromatase가 estrogen을 이용하여 androgen을 합성할 때 3번의 연속적인 hydroxylation (수산화 반응) 과정이 관여하며, 3 분자의 산소와 NADPH가 사용되는 것으로 알려져 왔다. 하지만 어떻게 하나의 효소가 여러 개의 steroid substrate를 이용하여 3번의 hydroxylation 과정을 거쳐 다양한 androgen들을 만들 수 있는 지가 이 분야에서 연구하는 학자들 간의 논란의 대상이었다. 그래서 한때는 aromatase가 여러 개 존재하며, 각각의 효소가 다른 estrogen들을 이용하여 다른 형태의 androgen을 합성할 것이라는 추측이 있었다. 그러나 1988년 Corbin 등이 사람의 aromatase 단백질을 만드는 cDNA를 태반조직에서 clone하여, COS-1 세포에서 단백질로 발현시킨 사람의 aromatase가 androstenedione, testosterone, 16 α -hydroxyandrostenedione을 모두 기질로 이용하여 estrogen을 합성할 수 있다는 사실을 증명하였다. 이 결과는 하나의 aromatase 단백질이 화학적으로 다른 구조의 여러 가지 androgen substrate를 이용할 수 있으며, 각각 다른 형태의 estrogen을 생산해 낼 수 있다는 것을 증명하였다. 또한, 사람의 aromatase cDNA를 probe로 이용한 genomic DNA Southern 분석방법에 사람의 염색체에는 단지 1개의 aromatase 유전자만이 존재한다고 결론지어졌다.

돼지의 경우 태반과 난소의 조직으로부터 두 개의 aromatase isoform에 대한 cDNA를 clone이 발견되었고, 두 개의 돼지 aromatase isoform간에 아미노산 서열에 있어서 87%의 유사성을 나타냈으며, 태반에서 clone한 aromatase는 난소에서 clone한 것에 비해 androstenedione을 estrone으로 전환시키는 enzyme activity가 10 배 정도 더 강하다고 보고되었다. 또한, 다른 aromatase isoform들에 대한 cDNA clone들이 12일 된 돼지의 배아와 임신 60일 된 돼지의 태

반조직으로부터 발견되었다. 돼지 배아세포에서 clone된 aromatase의 cDNA 염기 서열은 태반 세포에서 발견한 aromatase와 95%에 가까운 유사도를 보였다. 반면에 배아와 태반들에서 찾은 aromatase clone 들의 cDNA의 open reading frame으로부터 얻은 아미노산 서열은 난소에서 clone한 것과 비교했을 때 90% 이하의 유사도를 보였다. 그래서 몇 년 전 두 연구팀의 합의에 의해 난소에서 clone한 aromatase를 type I, 태반과 배아에서 clone한 aromatase를 각각 type II 와 type III로 각각 명명하기로 결정하였다. 또한, 돼지의 genomic DNA 조각들로 만들어진 EMBL library의 screening을 통해 얻은 aromatase phage clone들을 이용, type III (embryo type) 유전자의 거의 대부분에 대한 restriction enzyme map (제한효소 지도)가 만들어졌으며, 각 exon과 그 주변에 존재하는 intron의 염기 서열이 밝혀졌다. 또한, FISH을 통해 type II와 type III aromatase가 돼지의 1번 염색체에 서로 가까운 곳에 위치한다는 것이 증명되었다. 또한, 종합적인 genomic DNA의 분석결과 돼지에서 발견되는 최소한 3개의 다른 aromatase mRNA들이 각각 다른 유전자로부터 만들어졌다는 것이 증명되었다. 또한, Goldfish와 Zebrafish의 난소와 뇌에서 각각 다른 염기서열을 갖는 mRNA가 발견된다는 사실이 보고되었다. 이것은 돼지의 경우와 함께 인간을 포함한 다른 포유동물에서도 1개 이상의 aromatase 유전자가 존재할 수 있다는 가능성을 다시 한번 시사하고 있다.

최근에 돼지에서 발견되는 각각의 aromatase 유전자의 생화학적 기능을 알아내기 위해 type II (placenta type), type III (embryo type) aromatase에 대한 cDNA를 CHO 세포에 transfection시킨 후 만들어진 aromatase 효소와 같은 방법으로 만들어진 사람의 aromatase 효소, 그리고 돼지의 난소세포에서 분리한 골지체에 있는 aromatase 효소의 activity를 비교 측정하였다. 그 결과 돼지의 type II aromatase는 사람의 태반에서 clone한 aromatase와 유사한 enzyme activity를 보였지만, 돼지 배아에서 clone한 aromatase의 경우 testosterone을 기질로 이용했을 때 최종 산물의 6% 만이 estrogen이고, 나머지 94%가 19-nortestosterone이라는 것이 밝혀졌다. 또한, 돼지의 난소에서 분리한 aromatase도 같은 기질을 이용했을 때 estrogen보다 10배 이상 더 많은 양의 19-nortestosterone이 만들어짐이 증명되었다. 또한, 각각의 aromatase들이 지금까지 알려진 각각의 다른 aromatase inhibitor들에 의해 영향을 받는다는 사실이 입증되었으며, 이는 돼지의 3개 aromatase 단백질의 촉매부위 (catalytic site)가 각각 다른 특이한 단백질의 3차원 구조를 가지고 있다는 사실을 암시하고 있다.

19-nortestosterone은 anabolic steroid의 일종으로서 그 화학적 구조가 testosterone과 유사한 합성호르몬이다. 지방세포의 분화를 억제하는 반면 근육세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 왔으므로, 운동선수들의 경기력 향상, 경마에 이용되는 말의 경기력 향상, 그리고 가축의 성장 촉진을 위해 불법적으로 이용되어져왔다. Anabolic steroid는 인간을 포함한 대부분의 동물에서는 거의 생성되지 않지만, 돼지에서는 대량으로 생합성되는 것으로 알려져 왔다. 하지만 최근 까지 돼지에서 어떤 효소가 어떻게 anabolic steroid를 합성하는 지에 관해서는 밝혀지지 않았었다. 최근의 연구발표에 의하면 19-nortestosterone이 androgen receptor뿐만 아니라 새로 발견된 estrogen receptor β 에 결합할 수 있다는 사실과 착상 전 돼지의 배아에서 많은 양의 androgen receptor와 estrogen receptor β 유전자가 발견된다는 사실은 이 anabolic steroid가 착상직전 돼지의 배아의 급격한 형태학적 변화를 위한 세포증식 및 분화에 관련할 수 있다는 가능성을 시사한다.

Northern blot analysis of P450 aromatase gene expression in porcine embryos, endometrium and placenta during early and midpregnancy

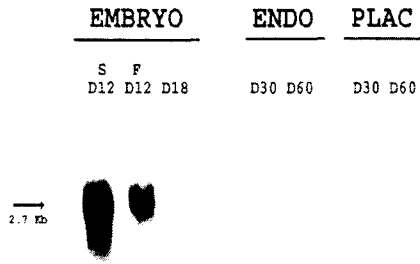


Figure 1.

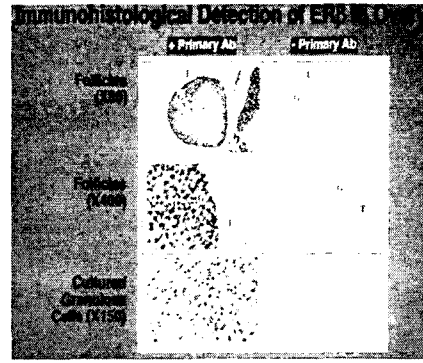


Figure 2.

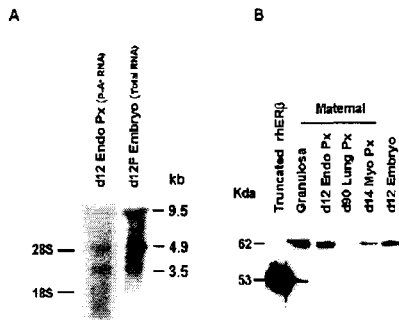


Figure 3.

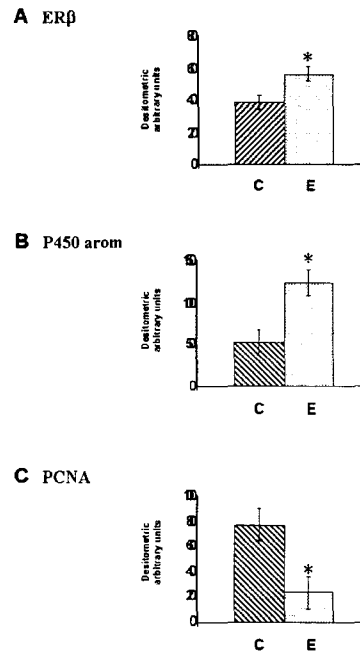


Figure 4.