미뢰함유설상피와 비함유설상피 단백질에 관한 SDS-PAGE적 비교 연구

서울대학교 치과대학 및 치학연구소
구강해부학교실 및 구강생화학교실*

김현만 · 황성명 · 고재승 · 김정근*

Ⅰ. 서 론

맛을 느끼는데 중요하며 상피세포들과 구조적으로 다른 미뢰(Murray 1971 : Miller 및 Chaudry 1976 : 김 1983)[15, 14, 24]에 관한 생화학적 연구는 조직화학적인 방법으로 미뢰에서 Alkaline phosphatase, Adenosine triphosphatase등과 같은 효소들을 관찰한 것(Bourne 1948 : Iwayama 및 Nada 1966 : Akisaka 및 Oda 1977 : Zalewski 1979 : 김등1982)[4, 11, 1, 23, 25] 이외에는 희소하다. 이는 미뢰를 상피내에서 순수하게 분리해내는 것이 어렵기 때문인데, 지금까지 이에 관한 연구는 전기영동 방법으로 미뢰에서 특수단백질을 발견하고자 한 연구와 (Koyama 및 Kurihira 1971 : Uehara 1973)[12, 19], 미뢰의 여러 성분을 원심분리방법으로 분리한 후 그것들의 성분을 연구한 것(Lum 및 Henkin 1976)[13] 이외에는 보고된 바가 별로없다. 그러나 그러한 보고들마저 상충된 점이 많아 미뢰의 생화학적 성질에 관해 확실히 알려져 있지 못하다.

이에 저자들은 미뢰에 전기영동방법으로 분리되는 미뢰내고유단백질이 존재한다는 보고(Uehara 1973)[19]와 존재하지 않는다는(Koyama 및 Kurihira 1971)[12]서로 상충되는 보고가 있어, 분자량에따라 단백질을 분리할 수 있는 SDS-PAGE로 미뢰를 함유하는 설상피와 함유하지않는 설상피간의 단백질조성을 비교연구하여 미뢰의 단백질조성과 미뢰함유상피의 단백질조성에 대해 고찰하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

●실험동물 및 실험부위

백서의 설배점막은 심상유두가 존재하며 적은 수의 미뢰가 위치해 있는 전방부(부위Ⅰ)와 많은 수의 미뢰를 함유하고 있는 후방부의 유곽유두 (부위Ⅱ), 그리고 대사상유두와 유곽유두 사이의 미뢰가 존재하지 않는 부위(부위Ⅲ)로 크게 나눌 수 있어 (Fig. 1) (Uehara 1973), 이들 세부위를 실험부위로 하였다. 백서는 미뢰의 발생이 끝난 시기인 (Miller 및 Chaudry 1976)[14] 생후 4주경의 건강하게 사육된 Sprague-Dawley계 웅성백서 20마리를 사용하였다.

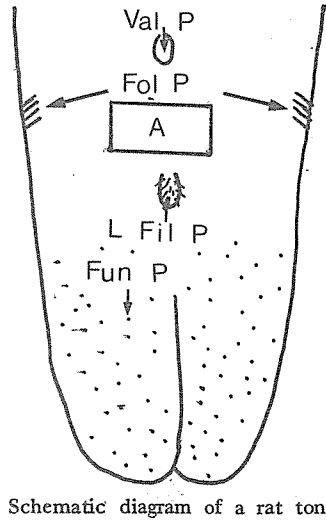

Fig. 1. Schematic diagram of a rat tongue. Val P, Vallate papilla; Fol P, Foliate papilla; L Fil P, large filiform papilla; Fun P, fungiform papilla. Taste buds are contained in Fol P and Fun P and most plentifully in Val P. Region A is the dorsal mucosa without any taste bud. (modified from Uehara (1973)[19])

●실험재료

Sodium Dodecyl Sulfate(SDS), Acrylamide,Me-

thylene, Bisacrylamide(MBA), TEMED, Bromophenol, Trypsin Inhibitor, Bovine Serum Albumin (BSA), Coomassie Brillant Blue(CBB)들은 Sigma Co.(St. Louis)로 부터 구입하였다. Tris(Hydroxy methyl) Aminomethane, β-Mercaptoethanol (BME)는 E. Merk(Darmstadt)에서, Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)은 Flow. Lab. (North Ryde)에서, Ca^{++}, Mg^{++} Free-Hank's Balanced Salt Solution(CMF HBSS)은 Common Wealth Lab. (Melbourne)에서, EDTA는 Shinyo Pure Chemical Co.(Osaka), Ammonium Persulfate는 Showa Chemical Co.(Tokyo)로 부터 각각 구입하였다. 이외에 사용한 모든 시약들은 reagent grade를 사용하였다.

● 상피분리

상피분리 방법으로는 Baratz등(1977)[2]의 방법을 일부 변경하여 이용하였다. 백서를 척수 절단술에 의해 희생시킨 후 즉시 설체를 제거해내어 실온(20°~25℃)에서 HBSS가 들어있는 시계접시에 넣었다. 제거된 설체는 HBSS로 3번 세척한후 부위 Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ의 실험부위마다 가능한한 상피하 조직이 적게 포함되도록 노력하면서 설배점막을 사각형으로 절제해 내었는데 유곽유두만은 유두부위의 상피만 포함되도록 유두의 모양에 따라 유곽유두의 외곽상피부위를 제거해 내었다. 각 부위의 조직은 실온에서 CMFHBSS에 15분간 처리한 후 37℃의 0.7% EDTA가 함유되어 있는 CMFHBSS에 약 2시간여동안 처리하였다(Scaletta 및 MacLallum 1972)[16]; 이후 핀셋을 사용하여 상피를 결합조직으로 부터 벗겨내고 상피와 결합조직간의 분리를 조사하기 위해서 냉동절편기를 사용하여 절편을 만든 후 Toluidine blue O로 염색하여 광학현미경으로 경검하였다.

● 단백질 추출

단백질추출을 위해서는 박리된 상피를 면도칼로 잘게 저민 후, 각각의 부위마다 습중량으로 10mg의 조직당 1% W/V SDS와 1% V/V BME가함유된 0.01M Sodium phosphate Buffer(pH 7.2) 환원용액이 0.5ml가 되게하여 밀폐된 시험관에서 12시간 동안 37℃로 유지하고 이후 시료를 20~30분간 100℃까지 가열하였다(Baratz등 1977)[2]. 가열된 시료들은 실온이 되게한 후 30분간 15000g로 원심분리하여 맑은 상청액만을 −60℃에 보관하였다. 용해되지 않은 시료들은 위와같은 방법을 반복하여 총 3번까지 추출하였다. 각각의 부위마다 상청액을 모은 후 각각의 단백질양을 Gornall등 (1949)[10]의 방법으로 측정하였다.

● SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

용해된 단백질 시료들은 Weber 및 Osborn(1975)[21]의 방법에 따라 SDS-Tris tube gel 방법을 이용하여 disc-electrophoresis하였다. 겔은 분리겔(Running gel)을 0.99% SDS를 함유한 10% Acrylamide겔이 되게하였고(1.5M Tris-HCl buffer, pH 8.8), Staking gel을 0.1% SDS가 함유된 겔(0.5M Tris-Hcl buffer, pH6.8)로 만들었다. 각각의 gel의 길이는 Staking gel이 5㎜, Running gel이 70㎜이었으며 gel의 직경은 6㎜이었다. Reservoir buffer는 0.1% SDS가 함유된 Tris-glycine buffer(pH 8.3)를 사용하였다. 각부위마다 80μg과 130μg의 단백질을 전기영동하였다. 전기영동은 4℃에서 Stalking gel시에는 1mA/gel, Running gel시에는 3mA/gel의 전류를 걸었는데, Bromophenol의 띠가 양극쪽 gel끝으로 부터 약 4~10㎜에 도달할 때까지 전류를 흘렸다. 전기영동후 각 gel들은 0.25% CBB, 45% Methanol, 0.92% Acetic acid가 함유된 염색용액으로 12시간 동안 고정 염색하였다. 염색된 gel의 탈염은 단순확산방법으로 5% Methanol, 7.5% glacial acetic acid가 함유된 수용액을 사용하였다.

● Gel Scanning 및 분자량 측정

탈염이 끝난 각 gel들은 densitometer (Cosmo Co.)로 scanning하였다. 분자량 측정을 위해서는 표준단백질로서 Trypsin cnhibitor(M. W. 20100) 와 BSA(M. W. 68000)를 사용하였는데 시료의 전기영동시 같은 방법으로 전기영동 하였다. 각각의 띠들의 분자량측정은 Weber등(1972)[20]의 방법에 따라 표준단백질에 대한 각각의 단백질의 상대적인 이동거리를 계산하여 측정하였다.

Ⅲ. 결 과

0.7% EDTA용액은 상피를 상피하결합 조직으로부터 기저막부위에서 분리시켰다. 부위Ⅰ의 박리된 상피에는 육안적으로도 확인할 수 있는 심상유두가 위치하였는데, 심상유두에는 미뢰가 함유되어있었으며 심상유두 이외에 각화가 잘 된 사상 유두들이 발달되어 있었다. 부위Ⅱ의 유곽유두는 유곽유두외 부상피가 미량으로 함께 절제되어 있었으며 많은

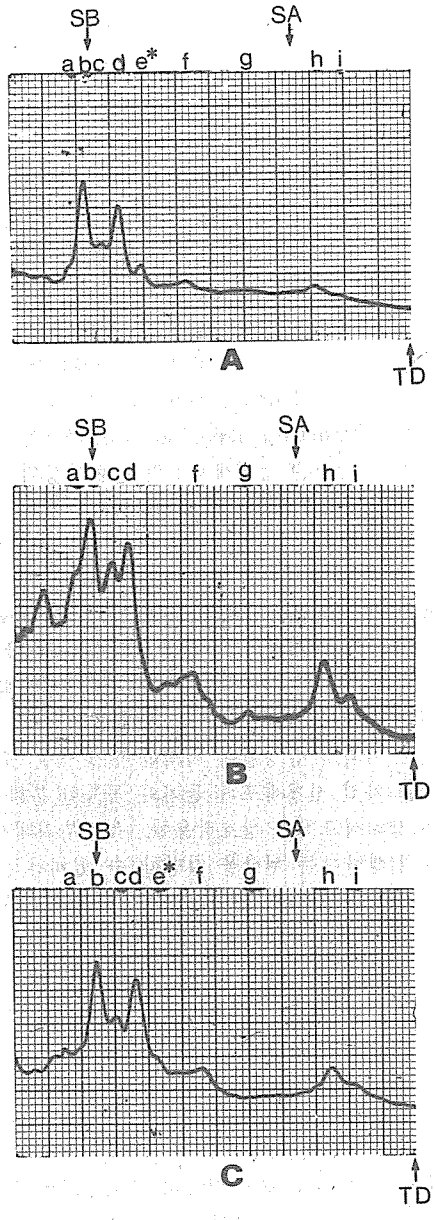

Fig. 2. Densitometric scans of SDS-polyacrylamide gels of dorsal lingual epithelial extracts.
A, the area with fungiform papilla (Area I)
B, the area between large filiform papilla and vallate papilla (Area III)
C, vallate papilla (Area II)
TD, tracking dye.
Standard molecules were BSA (M.W. 68000) (SB) and trypsin inhibitor (M.W. 20100) (SA). Each alphabets above the graphs denote the major peak of protein scan. e* peak was found in A and C which contain taste buds.

수의 미뢰를 상피내에 함유하고 있었다.

SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질의 띠는(그림 2) 각각의 gel에서 20개이상을 인정할 수 있었는데 80μg의 시료를 분석한 경우 약간의 minor band 들이 미약하게 염색되어 분별이 힘든것 이외에는 80 μg과 130μg의 분석결과들이 동일하였다. major band들은 M. W. 49000~70000, M. W. 30000~45000사이, 그리고 M. W. 14000~18000사이에서 관찰되었다. 가장 많은 양을 점유한 단백질은 M. W.70000의 것이었고, M. W. 60000, M. W. 65000의 것 순서로 많은 양을 점유하였다.

대체로 3부위의 단백질분리양상은 유사하였는데, 특히 부위Ⅰ과 부위Ⅱ의 미뢰를 함유하고있는 부위의 것이 서로 좀더 유사하며 부위Ⅲ에서 발견되지 않는 M. W. 49000의 단백질이 부위Ⅰ과 부위Ⅱ에서 다량 발견되었다. 그러나 부위Ⅱ에서 발견될 수 있는 미뢰고유단백질은 발견되지 않았다.

Ⅳ. 고 안

SDS-PAGE는 조직을 SDS와 BME의 존재하에 100℃에 끓여 단백질을 추출하고 dissociation 시킬 수 있는 방법이외로는 연구하기 힘든 다조성계(Multicomponent system)물을 분석하는데 널리 응용되는 방법으로 분자량에 따라 polypeptide chain을 분석할 수 있다(Weber 및 Osborn 1975)[21]. 따라서 SDS-PAGE는 여러종류의 단백질이 복합되어있는 상피세포와 미뢰세포의 단백질조성을 연구하는 방법으로 적절하다고 여겨진다.

상피를 연구하기 위해서는 순수하게 상피만을 분리해내야 하는데, EDTA는 상피를 기저판수준에서 결합조직으로부터 분리해낼 수 있어, EDTA에 의한 상피분리방법은 단백질활성이 문제되지 않는 경우의 상피단백질연구에 널리 이용되고 있다 (Scalette 및 MacCallum 1972)[16]. 본 연구에서도 이와같은 분리양상을 광학현미경 상으로 확인할 수 있어, EDTA에 의해 분리해낸 상피들은 결합조직성분에 의해 오염되지 않은것으로 여겼다. 그러나 상피분리과정에서 EDTA를 조직에 1시간여 동안 처리하였기 때문에 이러한 과정이 연구결과에 어떠한 영향을 주었을 가능성을 고려할 수 있었으나, Baratz등(1977)[2]의 연구결과에 의하면 EDTA는 SDS-PAGE에 의한 단백질분석에 영향을 미치지 않았다고 하였다. 한편 BME가 충분히 Sulfhydryl redu-

ction을 시킬수 있는 농도는 상피단백질추출시 1% 정도로 충분하다고 알려져 있어(Baratz등 1977)[2], 본 연구에서도 BMF농도로 1%를 이용하였다.

상피에 가장많이 함유되어 있는 단백질은 keratin으로 알려져 있고, keratin은 몇가지종류의 복합체로 분자량은 약 43000~70000정도이며 서로 다른 부위의 상피는 약간씩 다른 조성의 keratin을 함유하고 있다(Dale등 1977 ; Sun 및 Green 1978 ; Steinert등 1981 ; Dale등 1982)[5, 18, 17, 6] 따라서, 본 연구에서 3부위 모두 M.W.40000~70000사이에서 발견된 Major band들은 상피세포들의 keratin 으로 사료할 수 있었다. 즉 M.W.49000인 단백질이 미뢰를 함유하고 있는 부위인 부위Ⅰ과 Ⅱ에서만 발견되며 부위Ⅲ인 미뢰를 함유하지 않는 설상피의 것보다 부위Ⅰ과 Ⅱ의 분리양상이 좀더 유사한것은 미뢰를 함유하고 있는 설상피와 그렇지 않은 부위의 설상피간에 각화양상내지는 세포분화양상이 다른점이 있다는 것을 시사한다 하겠다. 그러나, 미뢰함유부위가 각화양상이 다른 독특한 것이 미뢰세포만의 독특한 것으로는 여길수 없었는데, 이는 미뢰의 수가 적은 부위Ⅰ과 미뢰의 수가 많은 부위Ⅱ의 양상이 동일한 것은 단백질분리양상의 독특한 점이 미뢰자체만의 성질에 기인하는 것은 아니고, 상피세포의 성질에 기인할 가능성이 큰 것을 암시한다 사료되었다.

아직까지 미뢰의 keratin에 대해서는 보고된 바가 가 없어 본 연구의 결과만으로 미뢰의 keratin성질을 사료할 수 없어 저자들은 면역조직화학방법으로 미뢰의 keratin연구를 수행중에 있기 때문에, 장차 본 연구의 결과를 해석하는데 도움이 될 것으로 여겨진다.

Koyama 및 Kurihara(1971)[12]는 semimicrodisc electrophoresis방법으로 소의 유곽유두와 심상유두부위의 미뢰를 연구하여 미뢰내의 고유단백질을 발견하고자 하였으나, 발견해내지 못한 바가 있는데, 그들의 연구는 상피를 상피하조직에서 분리해내지않고 근육, 선조직, 혈액등이 포함된 채로 연구하였기 때문에 적절하지 못했던 것으로 여겨지고 있다. Uehara(1973)[19]는 백서의 유곽유두에서 trypsin과 elastase를 사용하여 기술적으로 미뢰만을 분리해내는데 성공하여 microelectrophoresis 방법으로 미뢰내에 고유단백질이 존재할 가능성을 보인바있다. 그러나 Uehara(1973)[19]의 연구는 미뢰의 성질을 알기위해 미뢰와 유곽유두주위의 상피를 비교한 것이기 때문에 분리된 고유단백질이 미뢰 와 미뢰주위상피에 공존할 가능성과 미뢰를 분리하기 위해 사용한 효소들의 영향을 배제할 수 없었던 것으로 여겨진다.

본 연구의 결과는 미뢰를 함유하고있는 부위가 그렇지 않은 부위와 keratin조성이 다른것을 보여주었는데, 이는 각화현상이 상피세포분화의 가장 독특하고 주된 것이므로(Steinert등 1981)[17]미뢰를 함유하는 부위와 그렇지않은 부위의 상피간에는 분화양상이 다르다는 것을 암시한다 사료되었다. 나아가 미뢰세포는 설상피에서 분화되는 것으로 알려져 있기 때문에(Forbman 1965, 1969, 1971)[7, 8, 9], 미뢰의 발생이 이와같은 상피세포간의 분화양상의 차이와 관련이 있을 가능성도 여길 수 있었는데, 미뢰가 분화되기 위해서는 신경에서 유래되는 것으로 믿어지는 모종의 물질이 필요하다는(Beidler 및 Smallman 1965 ; Farbman 1965, 1969, 1971 ; Zalewski 1969 ; Murray 1971)[3, 7, 8, 9, 22, 15] 흥미로운 발생학적 보고들이 있으나, 아직까지 이에관한 생화학적 근거는 제시되지 못하고 있다. 이에관해 본 연구의 결과는 미뢰가 발생할때 미뢰를 발생시킬 수 있는 능력을 가진 신경세포의 돌기와 독특한 분화능력을 갖는 상피세포간의 상호작용이, 특정부위에서만 미뢰가 발생한다는 현상을 설명할 수 있게하는 초보적인 연구가 될 가능성이 있다고 사료되었다.

한편 미뢰에는 Alkaline phosphatase, Adenosine Triphosphatase등이 존재하며(Bourne 1948 ; Iwayama 및 Nada 1966 ; Akisaka 및 Oda 1977 ; Zalewski 1979 ; 김등 1982)[4, 11, 1, 23, 25], 이들의 활성이 상피세포보다 미뢰세포들이 높다는 것은(Lum 및 Henkin 1976)[13] 잘 알려져있는데, 본 연구결과에서 이와같은 성질을 확인케하는 결과는 얻을 수 없었는데 이는 본 연구에서 사용한 단백질양이 SDS-PAGE의 sensitivity 범위안에 들어가지 않았을 가능성이 있기때문인 것으로 사료되었는데, 장차 본 연구의 결과는 상피의 총단백질을 수용성 단백질과 불수용성단백질을 분리하여 연구함으로서 좀더 많은 결과를 얻을 수 있을 것이다.

V. 결 론

미뢰에 미뢰고유의 단백질이 존재하는가를 알기 위해 미뢰를 다량함유하는 설상피(유곽유두)와 소량함유하는 설상피(심상유두부위) 그리고 미뢰를

함유하지 않는 설상피(유곽유두와 대사상유두사이)를 상피하결합조직으로 부터 분리해낸후 총단백질을 추출하여 disc SDS-PAGE로 조사하였다. 3부위의 시료들은 gel상에서 유사하게 분리되어 미뢰의 고유단백질은 발견되지 않았으나 각질단백질으로 여겨지는 M.W.49000의 단백질이 미뢰를 함유하는 상피의 추출물에서만 발견되어 미뢰를 함유하는 설배상피와 함유하지 않는 설배상피간의 세포분화가 다를 가능성이 있음을 암시하였다.

참 고 문 헌

1. Akisaka, T. and Oda, M.: The fine structural localization of adenosine triphosphatase activity on the taste buds in the fungiform papillae of the rat. Arch. Histol. Jap. 40:63-72, 1977.
2. Baratz, R.S., Farbman, A.I., and Telser, A.: Developmental Changes in the protein profile of cornifying lingual epithelium: J. Invest. Dermatol. 68:277-284, 1977.
3. Beidler, L.M. and Smallman, R.L.: Renewal of cells within taste buds. J. Cell. Biol. 27:263-272, 1965.
4. Bourne, G.H.: Alkaline phosphatase in taste buds and nasal mucosa. Nature 161: 335, 1948.
5. Dale, B.A., Stern, I.B., and Clagett, J.A.: Initial characterization of the proteins of keratinized epithelium of rat oral mucosa. Arch. Oral Biol. 22:75-82, 1977.
6. Dale, B.A., Thompson, W.B., Stern, I.B.: Distribution of histidine-rich basic protein, a possible keratin matrix protein, in rat oral epithelium. Arch. Oral Biol. 27:535-545, 1982.
7. Farbman, A.I.: Electron microscope study of developing taste bud in rat fungiform papilla. Devel. Biol. 11:110-135, 1965.
8. Farbman, A.I.: Fine structure of degenerating taste buds after dennervation. J. Embry. Exp. Morph. 22:55-68, 1969.
9. Farbman, A.I.: Development of the taste bud. Handbook of sensory physiology Vol. IV; Taste pp 51-62. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, N.Y. 1971.
10. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177:751-766, 1949.
11. Iwayama, T. and Nada, O.: Histochemically demonstrable ATPase activity in the taste buds of the rat. Exp. Cell. Res. 46:607-608, 1966.
12. Koyama, N. and Kurihara, K.: Do unique proteins exist in taste buds? J. Gen. Physiol. 57:297-302, 1971.
13. Lum, C.K.L. and Henkin R.I.: Characterization of fractions from taste bud and non-taste bud-enriched filtrates from and around bovine circumvallate papillae. Biochim. Biophys. Acta 421:362-379, 1976.
14. Miller, R.L. and Chaudry, A.P.: An ultrastructural study on the development of vallate taste buds of the golden syrian hamster. Acta Anat. 94:190-206, 1976.
15. Murray, R.G.: Ultrastructure of taste receptors. Handbook of sensory physiology Vol. IV Chemical Senses Part 2 pp 31-50. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y. 1971.
16. Scaletta, L.J. and MacCallum, D.K.: A fine structural study of divalent cation-mediated epithelial union with connective tissue in human oral mucosa. Am. J. Anat. 133:431-453, 1972.
17. Steinert, P.M., Cantieri, J.S., Teller, D.C., Lonsdale-Eccles, J.D., and Dale, B.A.: Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:4097-4101, 1981.

18. Sun, T.T. and Green, H.: Keratin filaments of cultured human epidermal cells. Formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation. J. Biol. Chem. 253:2053-2060, 1978.
19. Uehara, S.: Disc electrophoresis of extracts from the taste buds located in circumvallate papillae of rat tongue. J. Gen. Physiol. 61:290-304, 1973.
20. Weber, K., Pringle, J.R., Osborn, M.: In "Methods in Enzymology" (C.H.W. Hirs and S.N-Timasheff, eds.), Vol. 26, pp3 Academic Press, New York, 1972.
21. Weber, K. and Osborn, M.: "Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures." in The Proteins 3rd ed. Neurath, H. and Hill, R.L. eds.pp 180-225, Academic Press N.Y. San Francisco, London, 1975.
22. Zalewski, A.A.: Regeneration of taste buds after reinnervation by peripheral or central sensory fibers of vagal ganglia. Exp. Neurol. 25:429-437, 1969.
23. Zalewski, A.A.: The distribution of alkaline phosphatare activity in normal and cross-species regenerated rat and mouse taste buds. Anat. Rec. 194:238-292, 1979.
24. 김현만 : 백서연구개 미뢰의 미세구조에 관한 연구. 치대논문집, 7 : 53-72, 1983.
25. 김현만, 황성명, 고재승 : 흰쥐 엽상유두미뢰의 조직화학적 연구, 대한구강해부학회지, 6 : 31-40, 1982.

SDS-PAGE OF THE LINGUAL EPITHELIUM WITH SPECIAL REFERENCE TO TASTE BUDS.

*Department of Oral Anatomy and Department of Oral Biochemistry**

College of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University

Kim, Hyun-Man; Hwang, Sung-Myung; Ko, Jae-Seung; Kim, Jung-Keun*

≫ Abstract ≪

As a study to elucidate whether taste buds contain specific proteins, rat dorsal lingual epithelium was analysed by electrophoresis. The epithelium of the vallate papilla (with numerous taste buds), the area of the fungiform papilla (with a few taste buds), and the area between vallate papilla and large filiform papilla (not containing taste buds) were strippled off by treatment with 0.7% EDTA. The epithelial protein was extracted by 1% SDS and 1% Mercaptoethanol in 0.01M phosphate buffer (pH7.2). Extracts were analysed by disc SDS-PAGE. Because the patterns of protein composition from each site were similar with each other as a whole, it is concluded that taste buds do not contain specific protein detected by SDS-PAGE in adult rat. But a protein on M.W. 49000 which lies in the area of molecular weight of keratin molecules was found only in the epithelium containing taste buds.

This results suggested that the epithelium containing taste buds differentiate dissimilarly to the epithelium not containing taste buds.