대한내분비학회지: 제23권 제5 호 2008
10.3803/jkes.2008.23.5.302

□ 원 저 □

성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 성장에 따른 키스펩틴의 효과

전북대학교 치의학전문대학원 구강생리학교실, 예방치의학교실 및 구강생체과학연구소[1], 서울대학교 수의과대학 약리학교실[2]

바타라이저나던 · 박선아 · 윤 화 · 박수정 · 전재규[1] · 장기완[1] · 이소영[2] · 류판동[2] · 한성규

Age-dependent Kisspeptin Effects on the GnRH Neurons in Male and Female Mice

Janardhan P Bhattarai, Seon Ah Park, Hua Yin, Soo Joung Park,
Jae Gyu Jeon[1], Kee Wan Chang[1], So Young Lee[2], Pan Dong Ryu[2], Seong Kyu Han

Department of Oral Physiology, Department of Preventive Dentistry & Institute of Oral Bioscience[1], School of Dentistry, Chonbuk National University; and Laboratory of Veterinary Pharmacology[2], College of Veterinary Medicine, Seoul National University

ABSTRACT

Background: The gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons play a pivotal role in the central regulation of fertility. Kisspeptin binds to the G-protein coupled receptor 54 (GPR54) and GPR54 has been shown to be essential for puberty and subsequent fertility in humans. The recent *in vivo* studies have proved that kisspeptin is an extremely potent activator of GnRH neurons. However, the precise mechanism of action of kisspeptin on the GnRH neurons and the age-dependent kisspeptin effects are not yet fully understood. In this study, we investigated the effects of kisspeptin on the GnRH neurons over the developmental stages in male and female mice.

Methods: Young (< P30) and adult (> P35) GnRH-GFP transgenic mice expressing green fluorescent protein were used in this study. Acute coronal brain slices containing the preoptic area were prepared, and the identified GnRH neurons were recorded using the gramicidin perforated-patch clamp technique.

Results: In young mice, GnRH neurons were excited by bath application of kisspeptin in 36% (13/36) in male, 17% (4/23) in female tested neurons. In adult mice, GnRH neurons were excited in the majority (30/40, 75%) in male, (21/31, 68%) in female neurons tested. However, there was no significant difference between the effects of kisspeptin in male and female mice. In addition, we tested kisspeptin effects in diestrus, proestrus and estrus animals. There were no significant differences of kisspeptin effects over the estrous cycle. Kisspeptin failed to induce excitatory effects on GnRH neurons (6/7, 86%) neurons) by pretreatment of U73122, a protein lipase C (PLC) inhibitor and kisspeptin-induced excitatory effects were decreased by U73122 application (n = 2).

Conclusion: These results demonstrated that kisspeptin-induced membrane excitability was increased after puberty and this supports a previous suggestion that GPR54 is essential for puberty and subsequent fertility. (J Korean Endocr Soc 23:302~309, 2008)

Key Words: GnRH neurons, kisspeptin, perforated patch clamp

접수일자: 2008년 6월 11일
통과일자: 2008년 7월 25일
책임저자: 한성규, 전북대학교치의학전문대학원 구강생리학교실

서 론

성선자극호르몬유리호르몬(gonadotropin releasing hormone, GnRH) 신경세포는 시상하부에 산발적으로 위치하며, 정중융기(median eminence)로 축삭을 내어 성선자극호르몬유리호르몬을 분비한다. 성선자극호르몬유리호르몬은 뇌하수체 전엽에서 gonadotrope를 자극함으로서 황체형성호르몬(luteinizing hormone), 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone)과 같은 성선자극호르몬(gonadotropin) 유리를 조절한다[1].

Metastin으로도 알려진 kisspeptin은 번식기능의 발육 및 조절에 주요한 역할을 담당한다는 여러 가지 증거들이 제시되고 있는데, 그 예로서 ① kisspeptin 신경섬유가 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에 축삭을 뻗어 시냅스를 형성하고[2], ② 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에 G-단백연계수용체 54 (GPR54) mRNA가 발현되어 있으며[3,4], ③ kisspeptin이 GPR54를 매개로 성선자극호르몬유리호르몬 및 성선자극호르몬 분비를 촉진하고[5~8], ④ kisspeptin은 대부분의 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 활성을 강력하게 증가시킨다[9~11]. 최근 Han 등[9]이 형질전환마우스를 이용한 patch clamp 방법에 의해 kisspeptin이 강력하게 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 흥분성을 증가시킨다는 것을 실증하여 kisspeptin이 유력한 사춘기 유발물질일 가능성을 시사하면서 kisspeptin과 GPR54 연구에 많은 연구자들의 관심이 집중되었다. 이후 kisspeptin의 세포 내 작용기전 및 반응양상에 대한 연구가 진행되면서 최근 kisspeptin에 의한 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 활성 증가에 transient receptor potential type C (TRPC) 유사 비선택성 양이온통로, 바륨 감수성 내향편류성 포타슘통로가 관여되어 있고, 세포 내 PLC (protein lipase C)-IP_3 (inositol-(1,4,5)-triphosphate)-Ca^{2+} 경로를 매개한다는 가능성을 제시하였다[10,11]. Han 등[9]에 의해 수컷 마우스에서 kisspeptin의 반응 양상이 연령의존성을 보인다는 것을 증명하였으나 암컷 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서도 같은 양상을 보이는지, 또한 kisspeptin의 반응양상이 암컷과 수컷에서 차이를 보이는지, 암컷의 경우 생리주기별 반응성의 차이가 존재하는지, 그리고 kisspeptin이 세포 내 PLC를 경유로 반응성을 나타내는지에 대한 추가적인 연구가 요구되었다. 따라서 본 연구에서는 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 gramicidin perforated patch clamp 방법을 이용하여 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin의 반응성의 차이를 연령별, 성별, 생리주기별로 조사하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

실험동물로는 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포만 녹색의 형광을 발하도록 형질을 개량한 형질전환 마우스(GnRH-EGFP-Mut5)[9]를 뉴질랜드 오타고대학으로부터 분양받아 실험에 이용하였다. 실험동물 사육실은 12시간 빛-12시간 어둠 상태를 유지하였고, 사료와 물은 무제한 공급하였다. 모든 실험은 전북대학교 실험동물윤리위원회의 승인을 얻어 실시하였으며, 암컷 마우스의 생리주기는 질도말법을 이용하여 결정하였다.

2. 뇌절편 제조

형질전환 마우스를 경추탈골로 희생시키고 절두 후 신속하게 뇌를 적출하여 4℃의 인공뇌척수액에 담가 차가워질 때까지 3~4분간 기다렸다. 인공뇌척수액은 NaCl 118 mM, KCl 3 mM, $CaCl_2$ 0.5 mM, $MgCl_2$ 6 mM, D-glucose 11 mM, HEPES 10 mM, $NaHCO_3$ 25 mM로 조성하였고, 95% O_2, 5% CO_2로 포화 시 pH는 7.4로 유지되도록 하였다. 적출된 뇌는 순간접착제로 차가운 냉장 뇌절편제조기(Microm, Germany)에 고정시키고 medial septum과 preoptic area를 포함하는 150~200 μm 두께의 뇌절편을 만들었다. 제조된 뇌절편은 NaCl 118 mM, KCl 3 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 1.2 mM, D-glucose 11 mM, HEPES 10 mM, $NaHCO_3$ 25 mM의 조성을 가진 32℃의 인공뇌척수액에서 1시간 이상 배양시켜 뇌절편 제조에 의한 손상에서 충분히 회복되도록 기다렸다.

3. 전기생리학적 기록

1시간 이상 배양한 뇌절편을 기록용 챔버에 옮기고 인공뇌척수액을 분당 4~5 mL의 속도로 계속하여 관류시켰으며 뇌절편은 업라이트 형광 현미경(BX50WI, Olympus, 동경, 일본)하에서 관찰하였다. DIC optics로 전환하기 전 고배율에서 GnRH 신경세포의 형광을 확인하였으며 모든 기록은 실온에서 수행되었다.

미세유리전극은 thin-wall borosilicate glass capillary tubing (PG52151-4, 외경 1.5 mm, 내경 1 mm, WPI)을 미세유리전극 제조기(P-97, Sutter Instruments Co. Novato, CA)를 이용하여 만들었다. 유리전극용액은 KCl 130, NaCl 5, $CaCl_2$ 0.4, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, EGTA 1.1 mM로 조성하였고, KOH를 이용하여 pH를 7.3으로 보정한 후 0.22 μm filter를 통해 여과시켰다. Gramicidin (Sigma, St. Louis, MO)은 DMSO에 녹여 2.5 mg/mL 농도로 만들고 5분간 고주파음을 이용해 분쇄하고 유리전극 용액에 1,000배 희석(최종 농도 2.5 μg/mL)한 후 15분간 고주파음을 이용해 다시 분쇄하였다. 유리전극의 끝을 gramicidin이 없는 용액으

로 채우고, 이어서 gramicidin이 첨가된 유리전극 용액을 뒷부분에 채웠다. Gramicidin perforated patch clamp recording은 Axoclamp 2B amplifier (probe gain, x0.01 MU with HS-2 probe, Axon instruments, Foster City, CA)를 이용하여 bridge mode에서 수행하였고, 유리전극 용액을 채운 후 저항은 4~6 MΩ이었다. Gigaseal 형성 후 gramicidin에 의하여 pore가 형성되고 막전압이 -45 mV 이하로 떨어져 안정되었을 때 kisspeptin을 비롯한 약물들을 처치하였다. 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 전기적 활성은 digidata 1322A interface (Axon Instruments)를 이용하여 컴퓨터의 하드디스크에 직접 저장하였고, 신호는 3 kHz로 여과하였으며 후에 pClamp9 software (Axon Instruments)를 이용하여 분석하였다.

4. 통계

연령, 성별 및 생리주기별 kisspeptin에 대한 반응성은 χ^2-test (SPSS version 12.0)로 유의한 차이를 비교하였으며, 막전압의 변화 정도는 one-way ANOVA test (Origin 7.0)를 실시하였으며, $P < 0.05$일 때 유의한 것으로 간주하였다. 실험결과는 % 및 Mean ± SEM으로 표시하였으며, n은 분석된 신경세포의 수를 나타내었다.

결 과

Gramicidin perforated patch clamp recording 방법으로 총 139개의 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 막전압의 변화를 기록하였다. Fig. 1은 어린 동물(생후 30일까지)에서 30 nM kisspeptin 적용에 의해 나타나는 효과의 예를

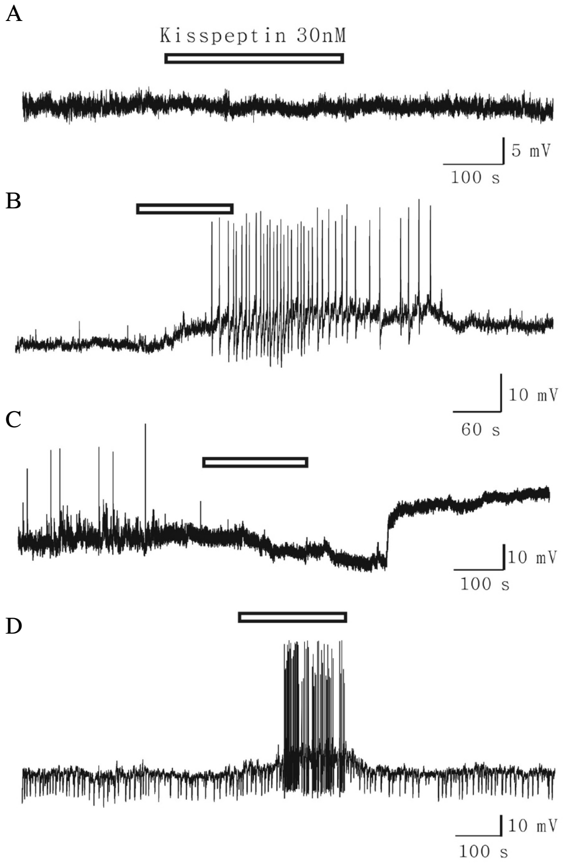

Fig. 1. Minority of young GnRH neurons get affected by kisspeptin. Gramicidin perforated patch recording of a young male GnRH neuron showing no response (A), depolarization with increase of spontaneous firing (B) and hyperpolarization (C) by 30 nM kisspeptin. D, Spontaneously active young female GnRH neuron responding to kisspeptin with transient depolarization accompanied by action potential firing. Bars represent the duration of kisspeptin application.

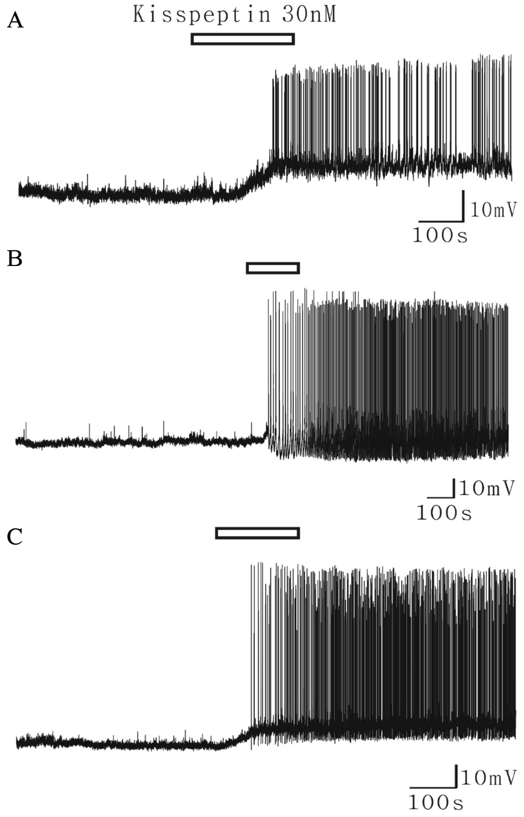

Fig. 2. Majority of adult GnRH neurons are activated by kisspeptin. A, An adult male GnRH neuron depolarized by kisspeptin for > 40 minutes, exhibiting frequent burst of action potential. B, Representative voltage trace of an adult male GnRH neuron showing kisspeptin-induced potent increase in action potential firing. without membrane depolarization. C, A trace from adult female (proestrus) GnRH neuron exhibiting a membrane depolarization accompanied by intense firing of action potential in response to kisspeptin. Bars represent the duration of kisspeptin application.

보여주고 있다. 수컷의 경우 Fig. 1A에 나타난 것처럼 기록된 36개의 세포 중 21개(58%)에서 kisspeptin에 대해 반응성이 나타나지 않았고, 12개의 세포에서 자발적인 firing의 증가와 더불어 탈분극(Fig. 1B, 5.42 ± 0.74 mV, n = 12)이 관찰되었으며, 1개의 세포에서는 탈분극 없이 자발적인 firing 증가만을 보였다(그림 제시하지 않음). 2개의 세포에서는 과분극(Fig. 1C, 6.25 ± 0.15 mV, n = 2)이 관찰되었다. 암컷의 경우 기록된 23개의 세포 중 18개(78%)의 세포에서 kisspeptin 적용에 대하여 반응성이 관찰되지 않았으며 3개(13%)의 세포에서 자발적인 firing을 동반한 탈분극(Fig. 1D, 3.20 ± 0.89 mV, n = 3)이 관찰되었다. 1개의 세포에서는 탈분극 없이 자발적인 firing 증가만이 관찰되었고, 1개의 세포에서는 과분극이 관찰되었다(그림 제시하지 않음).

Fig. 2는 성체(35일령 이상)의 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin의 반응성을 보여주고 있다. Fig. 2A는 수컷 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포가 kisspeptin에 의해 탈분극 및 자발적인 firing의 증가의 예를 보여주고 있다. 기록된 40개의 세포 중 26개(65%)에서 자발적인 firing 증가를 동반한 탈분극 (6.83 ± 0.455 mV, n = 26)이 관찰되었고, 4개의 세포에서는 탈분극 없이 자발적인 firing 증가만이 관찰되었다(Fig. 2B). Fig. 2C는 암컷 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin에 의한 firing 증가를 동반한 탈분극(21/31, 68%)의 예를 보여주고 있다. 3개의 세포에서는 탈분극 없이 자발적인 firing 증가만이 보였고, 8개의 세포에서는 kisspeptin에 대한 반응이 관찰되지 않았으며, 2개의 세포에서는 과분극이 관찰되었다.

Fig. 3은 암컷과 수컷 모든 연령에서 기록된 막전압의 변화를 표시한 그림으로 연령이 증가될수록 탈분극 되는 경우가 증가되는 경향을 보여주고 있다. Fig. 4는 kisspeptin에 의해 탈분극되거나 자발적인 firing이 증가되는 경우를 흥분성으로 간주하여, kisspeptin에 의한 흥분성 효과를 보이는 세포의 비율을 나타낸 그래프로 어린동물에서의 경우 수컷 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 경우 암컷에 비해 kisspeptin에 대한 반응성이 다소 높은 경향을 보이나 통계

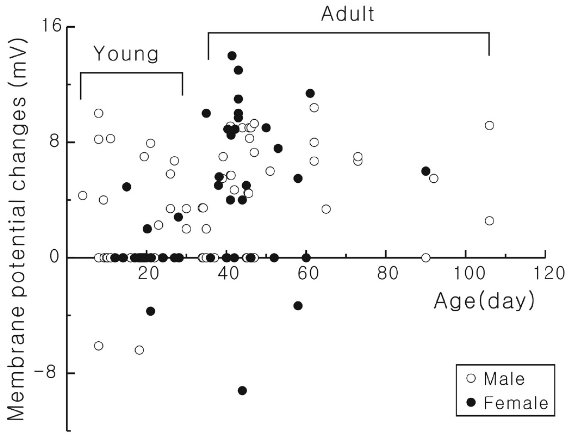

Fig. 3. Effect of kisspeptin over postnatal development. Scattered plots showing the individual membrane potential changes from all GnRH neurons recorded. Male (open circles), female (filled circles).

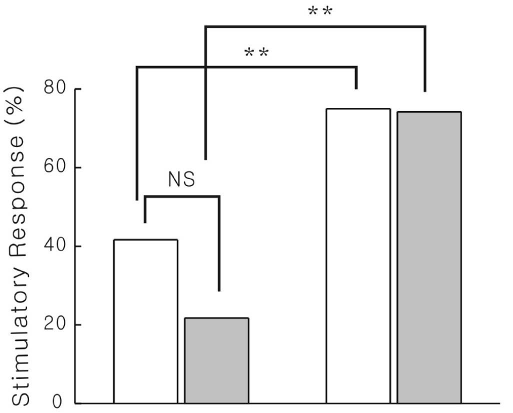

Fig. 4. Bar graph showing developmental differences in the ability of kisspeptin to elicit GnRH neuronal excitability. Comparison of the stimulatory response to kisspeptin between young (< P30) and adult (> P35) male and female mice. NS: not significant, ** represents P < 0.01 (x^2-test).

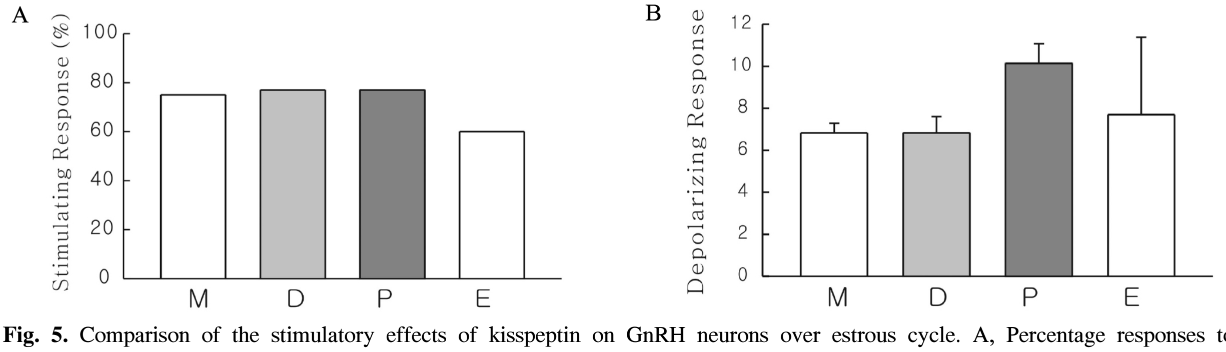

Fig. 5. Comparison of the stimulatory effects of kisspeptin on GnRH neurons over estrous cycle. A, Percentage responses to kisspeptin among adult male (M) and adult female over diestrus (D), proestrus (P) and estrus (E). B, Comparison of kisspeptin-evoked mean membrane potential changes among adult male and female over estrous cyclicity. Error bars represent SEM.

적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(x^2-test, P > 0.05). 그러나 암컷, 수컷 모두에서 성체 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서의 kisspeptin에 의한 흥분성 효과는 어린동물에서와 비교해 보았을 때 현저한 증가가 관찰되었다(x^2-test, P < 0.01). 또한 성체 암컷에서 성호르몬의 변화에 따른

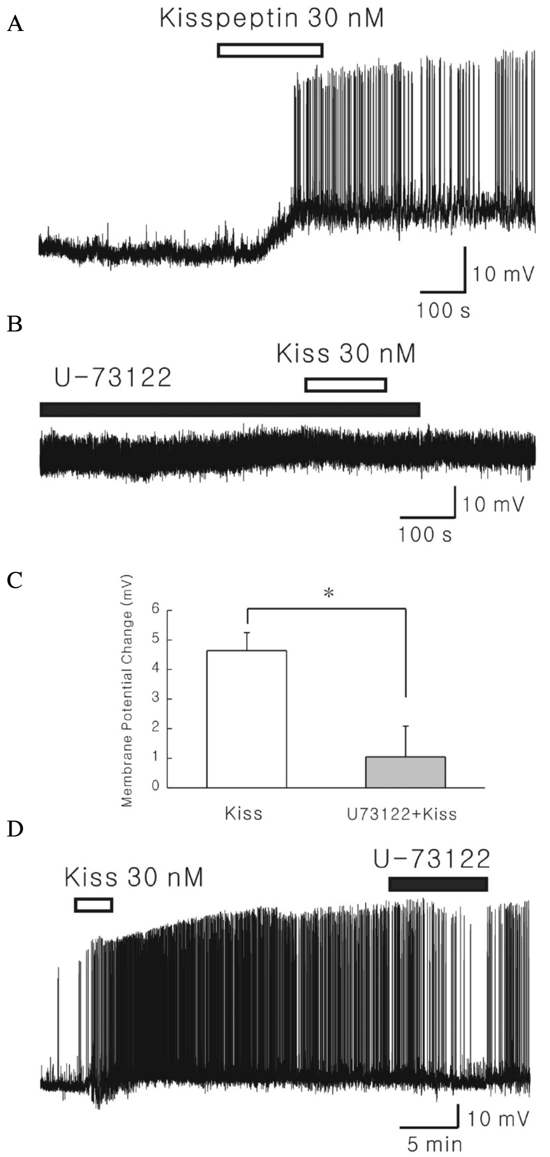

Fig. 6. Intracellular signaling cascade involved in mediating kisspeptin-induced stimulatory effects. A, An adult male GnRH neuron depolarized by kisspeptin for > 40 minutes, exhibiting frequent burst of action potential. B, Representative voltage trace from an adult male GnRH neuron showing no response to 30 nM kisspeptin following pretreatment with 30 μM U73122 (phospholipase C inhibitor). C, A bar graph showing mean (± SEM) response of GnRH neurons to applied kisspeptin versus kisspeptin in the presence of U73122. D, Voltage trace of male representing inhibition of kisspeptin-induced action potential firing with slight hyperpolarization effect by U73122 on prolonged depolarization induced by kisspeptin.

kisspeptin의 반응성을 비교하기 위하여 생리주기에 따른 반응성을 비교하였다. Fig. 5에서 보이는 바와 같이 수컷 및 암컷 diestrus, proestrus, estrus 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin에 의한 반응성을 보이는 정도(Fig 5A, x^2-test, P > 0.05)나 kisspeptin에 의한 막전압의 변화(one-way ANOVA, P > 0.05)에는 차이가 관찰되지 않았다.

GPR54는 Gq 단백과 연계된 수용체이다. 따라서 kisspeptin이 GRP54에 반응하여 나타나는 탈분극이 세포 내 PLC를 경유하는지 알아보기 위하여 PLC 억제제인 U73122을 본 실험에 적용하였다. Fig. 6A는 U73122 (20 μM)를 전처리하지 않은 상태에서 kisspeptin 적용에 의한 탈분극 및 firing 증가의 예를 보여주고 있다. Fig. 6B에서 보이는 바와 같이 20 μM U73122을 전처리 하였을 때 기록된 7개의 세포 중 6개의 세포에서 kisspeptin에 의한 탈분극이 관찰되지 않았다. 1개의 세포에서는 U-73122를 전처리한 상태에서도 현저한 탈분극이 관찰되었다(그림 제시하지 않음). Fig. 6C는 kisspeptin 단독처리 시의 막전압 변화와 PLC 억제제인 U73122를 전처리한 상태에서 보이는 막전압 변화를 비교한 그래프로 U73122 전처리에 의해 kisspeptin의 반응성이 유의성 있게 감소함을 보여주고 있다(n = 7). Kisspeptin에 의해 탈분극 및 자발적인 firing 증가를 유도한 상태에서 U73122를 적용하였을 때 세포막 과분극 및 자발적인 firing의 감소가 관찰되었다(Fig. 6D, n = 2).

고 찰

번식기능의 핵심 중추로 알려진 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포는 olfactory placode에서 생성되어 발생기간 중 시상하부로 이주하여 정착하는데, 특정 신경핵에 밀집되어 있지 않고 시상하부에 산발적으로 분포한다. 따라서 뇌절편에서 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포를 육안적으로 구분한다는 것은 사실상 불가능하여 GT1 (immortalized GnRH) 세포주를 이용한 연구가 주를 이루다가, 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포만이 형광을 발하게 만든 형질전환마우스가 개발되면서 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 전기생리학 연구가 활발히 이루어지기 시작하였다[9,12,13]. 또한 kisspeptin은 G-단백과 연계된 GPR54 수용체에 결합함으로서 세포 내 2차 전달계를 매개로 하여 효과를 내기 때문에 일반적인 whole cell mode보다는 gramicidin 등을 이용한 perforated patch clamp 방법이 아주 유용함을 알 수 있다[14]. Gramicidin은 1가 양이온만을 통과시키는 이온운반체로서, 세포 내 Cl^-, Ca^{2+} 및 2차 전달자 시스템을 그대로 유지한 상태에서 whole cell mode에서 기록하는 방법과 같이 세포막 전체 이온 통로의 활성을 기록할 수 있는 장점이 있다[15].

본 연구에서, 30 nM kisspeptin 적용에 의해 어린동물의 경우 수컷 36%, 암컷 17%의 세포에서만 탈분극 및 자발적

인 firing 증가와 같은 흥분성 효과가 관찰되었고, 사춘기 이후 성체 GnRH 신경세포에서서는 수컷 75%, 암컷 68%에서 세포막 탈분극이나 자발적인 firing 증가가 관찰되었다(Fig. 3, 4). Kisspeptin에 의한 흥분성 효과를 보인 세포의 경우 kisspeptin을 제거한 상태에서도 일부에서는 2시간까지 흥분성 반응이 지속되었기 때문에 일반적으로 40분까지만 기록하였다. 이처럼 nM 농도 수준의 kisspeptin 적용에 의해 강력하고 지속적인 흥분성 효과가 암수 모두에서 사춘기 이후에 현격히 증가되는 양상을 보였다. 일부 세포에서는 과분극을 유발하여 억제성 효과를 보인 경우도 관찰됨으로서 kisspeptin의 또 다른 역할이 예측되지만 kisspeptin에 의한 과분극 유발의 경우가 적어 이에 대한 해석을 위해서는 추가적인 연구가 요구된다(Fig. 3).

일반적으로 사춘기 이전에는 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 활성이 억제 되었다가 사춘기에 접어들면서 성선자극호르몬유리호르몬 분비가 증가되고[16,17], 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 활성을 조절하는 여러 가지 신경세포의 유입이 일어난다[18,19]. 이처럼 사춘기 유발과 동시에 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 활성이 급격히 증가한다는 것을 기초하여, 본 실험에서 얻어진 결과와 같이 사춘기 이후에 kisspeptin에 대한 반응성이 급격히 증가한다는 것은 kisspeptin이 사춘기 유발과 관련성이 있음을 시사하고 있다. Kisspeptin 또는 GPR54가 직접적으로 사춘기 유발에 관여할 수 있다는 증거들은 선행 연구자들에 의해서도 제시되었다. 예를 들어, 중추 내로 kisspeptin을 주입시 GnRH 및 gonadotropin의 분비가 증가되고 [4~7], 영장류 GnRH 신경세포에서 GPR54 mRNA의 발현이 연령에 따라 증가하며[3,6]. 사춘기 전 암컷 랫드에 kisspeptin 투여시 사춘기 유발이 단축되고[6,20], 결정적으로 GPR54 knock out 마우스에서는 사춘기가 유발되지 않는다[21]. 따라서 본 실험에서 얻어진 결과는 선행연구에서 제시된 사춘기유발에 kisspeptin 및 GPR54가 관여한다는 가능성을 보충 설명해 주고 있다. 본 실험을 통해 얻어진 결과로서 암수 모두에서 사춘기를 전후로 kisspeptin의 반응성이 현저히 증가한다는 것은 kisspeptin 및 GPR54가 암수 모두에서 사춘기 유발과 관련성이 있음을 시사하고 있다.

최근 시상하부 kisspeptin 및 KiSS-1 mRNA의 발현정도가 성별에 따른 차이가 있다고 보고되고 있다. 예를 들어, Clarkson 등[2]은 anteroventral periventricular nucleus (AVPV)에 존재하는 kisspeptin 신경세포가 수컷에 비하여 암컷이 10배정도 많고, Kauffman 등[22]도 암컷의 AVPV에서 KiSS-1 mRNA 발현이 수컷에 비하여 높게 발현되어 있음을 보고하였다. 이처럼 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포로 분지하는 kisspeptin 신경세포의 수나 KiSS-1 mRNA의 발현정도에 성별의 차이가 존재하나 본 실험에서 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin에 대한 흥분성 반응의 차이는 관찰되지 않았다. 이는 암수 모두에서 같은 조건으로 실험을 진행하였음에도 불구하고, 뇌절편 제조 시 AVPV로부터 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포로 투사하는 신경섬유가 절단되거나 뇌절편 제조 후 인공뇌척수액에서 장시간 배양되는 과정에서 특정 단백질의 변성에 의한 변화를 배제할 수는 없다.

암컷의 경우 수컷과 달리 생리주기에 따른 성호르몬의 변화가 다양하며 성호르몬 농도에 따라 반응성의 차이가 존재한다. 예를 들어, estradiol은 시상하부 신경세포에서 KiSS-1 mRNA 뿐만 아니라 GPR54의 발현을 조절한다[6,23]. 따라서 kisspeptin이 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 활성을 조절하는데 있어서도 estrogen 농도에 따라서 달라질 가능성이 존재하나 본 실험에서 kisspeptin에 의한 반응 빈도나 막전압 변화 정도에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 5). 이는 위에서도 언급한 바와 같이 GPR54의 발현이나 KiSS-1 mRNA의 발현정도는 성호르몬 농도에 따라 달라질 수 있다. 그러나 본 실험에서 투여된 농도에서는 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 나타나는 반응성의 차이를 보이지 않아 Liu 등[10]에서 보이는 결과와 유사하였다. 그러나 Pieleck-Fortuna와 Moenter[24]은 estradiol에 의해 kisspeptin이 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에 미치는 흥분성에 영향을 미친다고 보고하였다. 그러나 kisspeptin이 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 흥분성을 조절하는데 있어서 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에 존재하는 GPR54에 결합하여 직접적으로 흥분성을 조절하는 기전과 GPR54를 발현하는 다른 신경섬유의 시냅스를 통한 간접적인 흥분성 증가를 유도하는 기전을 설명하면서, kisspeptin에 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에 대한 직접적인 흥분성 증가는 estradiol에 의해 영향을 받지 않고, 시냅스를 통한 간접적인 흥분성 증가에 estradiol이 관여함을 최근에 보고하였다. 본 실험에서도 TTX 존재 하에서 나타나는 흥분성 효과가 관찰되었으므로 (그림 제시하지 않음) kisspeptin의 반응성은 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에 직접 작용하여 나타나는 반응으로 간주할 수 있다.

본 연구를 통해서 kisspeptin이 GPR54와 결합하여 PLC를 경유로 한다는 것을 PLC 억제제를 이용하여 증명하였다. 이와 같은 효과는 최근 Pielecka-Fortuna 등[24] 및 Liu 등[10]에 의해서도 관찰이 되었다. 또 다른 연구자들의 결과를 살펴보면, 어린 암컷 시상하부 explants로 부터 성선자극호르몬유리호르몬 분비를 조사한 연구에서 kisspeptin의 흥분성 효과는 PLC 억제제와 세포 내 칼슘저장고를 고갈시키는 thapsigargin에 의해 억제되었으며 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2와 p39 MAPK (mitogen activated protein kinase) 길항제에 의해 억제되었다고 보고되었다[25]. 이 결과는 GPR54는 세포의 활성을 조절하기 위하여 $G_{q/11}$-PLC-IP_3-Ca^{2+} 경로를 이용한다는 것을 시사하고

있다. 본 실험이 진행된 것과 거의 유사한 시기에 Pielecka-Fortuna 등[24] 및 Liu 등[10]에 의해 kisspeptin에 의한 강력한 탈분극이 PLC를 매개로 한 비선택성 양이온통로의 활성화와 바륨 의존성 포타슘 통로의 억제에 의한다고 보고하였다.

요약하면, gramicidin perforated patch clamp 기법을 이용한 전기생리학적 기록에서 kisspeptin이 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포를 강력하게 활성화시키며, 이러한 반응은 세포 내 PLC를 경유한다. 또한 수컷과 마찬가지로 암컷에서도 연령 의존적으로 kisspeptin에 대한 반응빈도와 반응정도가 증가되었으나 성별에 따른 차이 및 생리주기에 따른 성호르몬 변화에 의한 반응성에는 차이가 관찰되지 않았다. 본 연구결과는 정상적인 G-단백 연계 신호기전이 관여하고, kisspeptin 또는 GPR54가 사춘기유발과 관련이 있음을 암시하고 있다. 또한 본 실험조건에서 kisspeptin에 의한 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 흥분성 작용은 성호르몬 농도에 따라 큰 영향을 받지 않음을 시사한다.

요 약

연구배경: 성선자극호르몬유리호르몬 (GnRH) 신경세포는 시상하부에 산발적으로 위치하며 뇌하수체 전엽에서 성선자극호르몬의 유리를 조절한다. Kisspeptin은 번식기능의 발육 및 조절에 주요한 역할을 담당한다. 최근 형질전환 마우스를 이용한 patch clamp 방법으로 kisspeptin이 강력한 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 흥분성을 증가시킨다는 것이 보고되면서 kisspeptin이 유력한 사춘기 유발물질로의 가능성이 강력하게 시사되었다. 본 연구를 통해 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin의 반응양상이 성별, 암컷의 경우 생리주기별 차이가 존재하는지, 그리고 kisspeptin이 세포 내 PLC를 경유로 반응성을 나타내는지를 확인하고자 하였다.

방법: 사춘기를 기준으로 하여 형질전환 마우스로부터 뇌절편을 얻어 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포를 확인하고 gramicidin perforated-patch clamp 방법을 이용하여 kisspeptin에 대한 반응성을 조사하였다.

결과: 어린 수컷의 경우 33%, 암컷의 경우 17%의 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin에 의해 흥분성 효과가 관찰되었고, 성체 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 수컷의 경우 75%, 암컷의 경우 68%의 신경세포에서 흥분성 효과가 관찰되었다. 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포에서 kisspeptin에 대한 반응성에는 연령에 따른 차이만 보였을 뿐 성별에 따른 차이 및 생리주기에 따른 차이는 관찰되지 않았다. PLC 억제제인 U73122을 전처리한 경우 7개의 세포 중 6개의 세포에서 kisspeptin에 의한 탈분극이 관찰되지 않았다. 1개의 세포에서는 U-73122를 전처리한 상태에서도 현저한 탈분극이 관찰되었다. Kisspeptin에 의해 탈분극 및 자발적인 firing 증가를 유도한 상태에서 U73122를 적용하였을 때 세포막 과분극 및 자발적인 firing의 감소가 관찰되었다.

결론: 이상의 결과는 정상적인 G-단백 연계 신호기전이 관여하고 사춘기유발의 신경조절에 있어서 kisspeptin이 관여되어 있을 가능성을 시사하고, 이러한 kisspeptin에 의한 성선자극호르몬유리호르몬 신경세포의 흥분성 작용은 성호르몬 농도에 의해 크게 영향을 받지 않음을 시사한다.

감사의 글

본 연구 수행이 가능하도록 형질전환 마우스를 제공해 준 뉴질랜드 오타고 의과대학의 Allan E. Herbison 교수에게 감사하며, 본 연구는 한국과학재단 국제협력연구사업(F01-2006-000-10243-0)으로부터 지원받아 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Herbison AE: GnRH neuron. In: Encyclopedia of hormones. Vol 2 (Henry H, Norman A, eds), pp 171-7, San Diego, Academic Press, 2003
2. Clarkson J, Herbison AE: Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin releasing hormone neurons. Endocrinology 147:5817-5825, 2006
3. Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y: Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. Endocrinology 145:3613-3618, 2004
4. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA: Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. Neuroendocrinology 80: 264-272, 2004
5. Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proc Natl Acad Sci USA 102:1761-1766, 2005
6. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E,

Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M: Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. Endocrinology 145:4565-4674, 2004

7. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA: A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology 145:4073-4077, 2004
8. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM: Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. Proc Natl Acad Sci USA 102:2129-2134, 2005
9. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE: Activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J Neurosci 25:11349-11356, 2005
10. Liu X, Lee KH, Herbison AE: Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. Endocrinology, May 15, 2008 [Epub ahead of print]
11. Zhang C, Roepke TA, Kelly MJ, Rønnekleiv OK: Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. J Neurosci 23;28:4423-4434, 2008
12. Suter KJ, Song WJ, Sampson TL, Wuarin JP, Saunders JT, Dudek FE, Moenter SM: Genetic targeting of green fluorescent protein to gonadotropin-releasing hormone neurons: characterization of whole-cell electrophysiological properties and morphology. Endocrinology 141:412-419, 2000
13. Spergel DJ: Calcium and small-conductance calcium-activated potassium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons before, during, and after puberty. Endocrinology 148:2383-2390, 2007
14. Han SK, Todman MG, Herbison AE: Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin releasing hormone neurons. Endocrinology 145:495-499, 2004
15. Rhee JS, Ebihara S, Akaike N: Gramicidin perforated patch-clamp technique reveals glycine-gated outward chloride current in dissociated nucleus solitari neurons of the rat. J Neurophysiol 72:1103-1108, 1994
16. Urbanski HF, Fahy MM, Daschel M, Meshul C: N-methyl-D-aspartate receptor gene expression in the hamster hypothalamus and in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurones. J Reprod Fertil 100:5-9, 1994
17. Plant TM, Barker-Gibb ML: Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. Hum Reprod Update 10:67-67, 2004
18. Terasawa E, Fernandez DL: Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. Endocr Rev 22: 111-115, 2001
19. Grumbach MM: The neuroendocrinology of human puberty revisited. Horm Res 57 Suppl 2:2-1, 2002
20. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T: Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. Biochem Biophys Res Commun 320:383-388, 2004
21. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH: The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 349:1614-1627, 2003
22. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M: Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. Endocrinology 148:1774-1783, 2007
23. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA: Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. Endocrinology 146:2976-2984, 2005
24. Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM: Kisspeptin acts directly and indirectly to increase GnRH neuron activity and its effects are modulated by estradiol. Endocrinology 149:1979-1986, 2008
25. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castano JP, Malagon MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M: Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin- releasing hormone system of the rat. Mol Cell Endocrinol 257-258:75-83, 2006