

성균관의대 유전자전사조절 실험실

(경기도 수원시 장안구 천천동 300 성균관대학교 의과대학 5312호)

저희 실험실은 수원에 위치한 성균관대학교 의과대학 분자세포생물학교실 유전자 전사조절 실험실입니다. 구승회 교수님의 지도 아래에 생체 내에서 일어나는 에너지 대사 및 대사 증후군에 관련된 유전자의 발현조절에 대해 연구하고 있습니다. 특히, 간에서 일어나는 당신생성 (gluconeogenesis)와 지질대사에 많은 관심을 가지고 있습니다.



간 당신생성은 공복 시 혈당을 유지하기 위해 젖산, 알라닌 등과 같은 탄수화물이 아닌 대사산물로부터 포도당을 만들어내는 과정으로 특히 중추신경계 등과 같이 포도당과 일부 케톤체만을 에너지원으로 사용하는 생체기관에는 생존을 위한 매우 중요한 현상입니다. 또한 인슐린 저항성을 수반하는 대사 증후군이나 제2형 당뇨병에서는 이 과정이 과도하게 활성화 되어있어, 혈중 포도당 수치를 증가시키는 병리학적 증상 유발에도 기여하는 것으로 알려져 있습니다. 이와 같이 대사증후군의 원인현상이라고 생각되는 인슐린 저항성은 최근에 비만(지질 대사의 이상)과 깊은 상관관계가 있다고 보고되었습니다. 따라서, 저희 실험실에서는 당신생과 인슐린 저항성에 직간접적으로 관여하는 유전자를 연구하여 분자와 세포 수준에서 생리 및 병리학적으로 이해할 수 있는 기초를 제공하며 나아가 이미 밝혀진 분자적 기작을 토대로 대사증후군 및 제2형 당뇨병을 치료하는 신약개발의 표적 인자 또는 유전자의 정보를 제공하는 것을 목표로 삼고 있습니다.

■ 최근 연구내용

올해 3월 대사연구에 최고저널이라고 할 수 있는 "Cell Metabolism" 에 논문을 발표함으로써 그 목표에 한걸음 더 나아갔습니다(Cell Metab. 9(3):240-51). 처음으로 비만과 인슐린저항성이 어떻게 연결될 수 있는지를 밝힌 이 논문은 다음과 같이 크게 3부분으로 나누어 볼 수 있습니다. 첫째, 세포 내 cAMP생성에 반응하는 것으로 알려진 유명한 전사인자 CREB의 핵심 전사보조인자 (coactivator)인 TORC2 (다른 이름은 CRTC2)에 의한 고혈당 현상유도, 둘째, TORC2의 표적유전자인 Lipin1의 동정과 발현조절 연구, 셋째 Lipin1이 어떻게 간에서 인슐린 저항성을 유발하는지 하는 기능을 연구한 부분입니다. 먼저 TORC2에 의한 내당성 장애 (glucose intolerance-혈당이 정상적으로

조절되지 않는 상태) 발생하는 부분입니다. 저희 교수님께서 미국 샌디에고에 위치한 Salk 연구소에서 연구할 당시 TORC2가 CREB의 전사보조인자로 간에서 당신생 조절에 핵심유전자임을 밝혀 Nature에 발표하셨는데, 당시 논문에서는 병리학적 현상보다는 생리학적 현상에 초점을 맞춰 TORC2의 기능을 발표하셨습니다. 발표된 논문을 근거로 실제로 과활성된 TORC2가 hyperglycemia (고혈당)와 내당성 장애를 유발할 수 있다는 가설을 세우고, 과활성 형태의 TORC2 (S171A TORC2)를 발현하는 adenovirus를 제작하여, 정상 생쥐(C57BL6/J)에 투여하였습니다. 실제로, GFP-control 바이러스가 투여된 실험군보다 S171A TORC2를 투여한 실험군에서 고혈당 및 내당성장애가 관찰되었습니다. 그리고 이와 같은 병리학적 현상이 단순하게 당신생 관련유전자 (PEPCK나 G6Pase 등)의 증가로 일어난 것인지, 혹은 아직 밝혀지지 않은 인자에 의해서 일어난 것인지를 확인하기 위하여 microarray를 수행하였고, 그 결과 Lipin1이라는 새로운 TORC2의 표적유전자를 동정하게 되었습니다.

이어서 동정된 Lipin1이 실제로 TORC2에 의해서 발현이 조절되는지를 확인하는 연구를 진행하였습니다. 생쥐와 쥐의 일차간세포주 (primary hepatocyte)를 분리하여, Ad-S171A TORC2 또는 Ad-shLipin1 바이러스를 투여하고, mRNA와 protein level에서 Lipin1의 발현이 증가 또는 감소되는 것을 확인하였고, 마우스에 직접 바이러스를 투여하는 *in vivo* 실험을 통해 TORC2에 의해서 Lipin1의 발현이 조절되는 것을 확인하였습니다. 이 후 실제로 TORC2가 전사수준에서 Lipin1을 조절하는지를 알아보기 위해 Luciferase-reporter gene을 이용하여, 프로모터 부분을 연구하였고, 최종적으로 ChIP assay를 이용하여, 실제로 Lipin1의 프로모터부분에 CREB과 TORC2가 위치하여 Lipin1의 발현을 조절하는 것을 확인하였습니다.

마지막으로 Lipin1의 기능을 밝히기 위한 실험을 진행하였는데, 많은 우여곡절이 있었던 가장 힘든 연구였습니다. Lipin1이 핵에 존재하는 단백질로 알려졌기 때문에, 처음에는 저희 실험실에서도 당뇨병관련 유전자의 발현에 관여할 것이라는 가설을 세우고 실험을 진행하였습니다. 하지만 수많은 반복 실험을 진행했음에도, 이들과 관련 유전자의 발현을 직접적으로 조절한다는 어떠한 증거도 발견할 수 없었습니다. 따라서 새로운 가설을 고민하던 중에 Lipin1이 중성지방의 하나인 diacylglycerol (DAG) 합성할 수 있는 흥미로운 기능을 가지고 있다는 점과, 이미 10여년전부터 세포 내 DAG의 과도한 축적이 인슐린 저항성을 유발할 수 있다는 것이 보고가 있음을 확인하였습니다. 또한 최근에 Yale 대학의 Dr. Shulman에 의해서 간에서 과증가된 DAG가 PKCε 을 활성화할 수 있고, 이것이 인슐린 신호전달체계에 영향을 줌으로 인슐린 저항성을 유발한다는 발표를 토대로 TORC2에 의해서 증가된 Lipin1이 비만상황에 DAG합성을 증가시키고, 이렇게 증가된 DAG가 PKCε 를 활성화시켜 간에서 인슐린 저항성을 유도할 수 있다는 가설을 다시 세우고 기능연구를 시작하였습니다. 놀랍게도 TORC2에 의해 나타난 고혈당 및 내당성 장애와 제2형 당뇨병 모델 (db/db) 생쥐에서 Lipin1을 knockdown시키자, 고혈당 및 내당성 장애가 개선되는 것을 확인할 수 있었습니다.

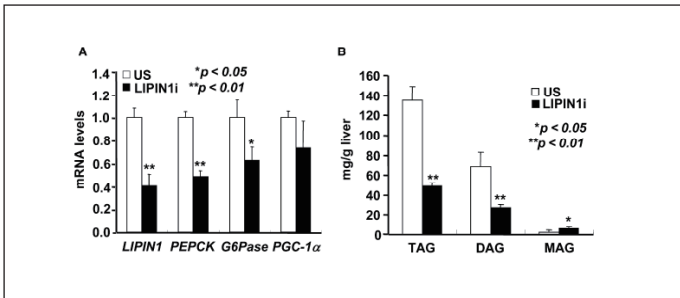


Figure 5. Knockdown of LIPIN1 Improves Hepatic Insulin Sensitivity in db/db Mice (A) Q-PCR analysis showing effect of Ad-US or Ad-LIPIN1 RNAi infection on hepatic expression of gluconeogenic genes in db/db mice fasted for 4 hr. (*p < 0.05; **p < 0.01; n = 3).

또한, 가천의과대학 이길여 암당뇨센터의 최철수 교수님 실험실에서 진행된 Hyperinsulinemic euglycemic clamp 실험에서도 Lipin1 knockdown에 의해 간에서 당신생이 감소되었고, 인슐린 저항성이 개선된 것을 확인할 수 있었습니다. 결론적으로 CREB과 TORC2에 의해 Lipin1이 증가되고, 비만상황에서 축적된 지방을 원료로 DAG의 합성을 비정상적으로 증가시켜, 이로 인해 활성화된 PKCε에 의해 인슐린 저항성이 발생한다는 것입니다.

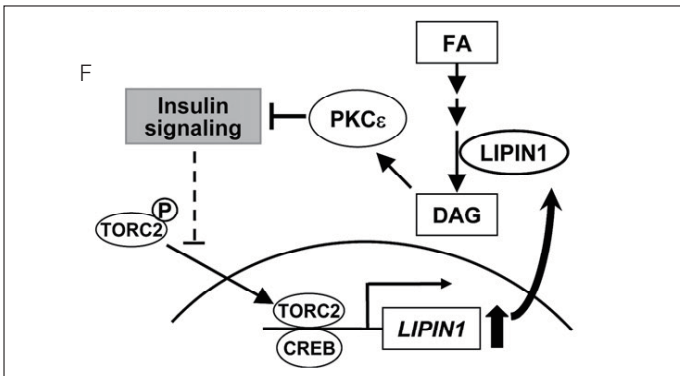


Figure 6. LIPIN1 Knockdown Improves TORC2-Induced Hepatic Glucose Intolerance in Mice. (F) A proposed model of TORC2 and LIPIN1-mediated hepatic insulin resistance. Data in (A)-(C) and (E) represent mean ± SD.

이번 실험에서는 일차간세포주를 사용하였고, *in vivo* 모델로 생쥐를 이용하였습니다. 또한 대부분의 결과는 western blot과 TaKaRa의 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Code TP800)을 이용하여 확인하였고, 생쥐에서 분리한 조직이나 일차간세포주에서 분리한 mRNA에서 모두 깔끔하고 정확한 시그널을 얻을 수가 있었습니다.

(본고의 그림은 논문의 서식과 내용을 그대로 인용하였습니다.)

■ 앞으로 나아갈 방향

최근에는 Lipin1 isoforms의 유전자의 발현과 기능에 관련된 연구를 진행하고 있습니다. 처음 실험실이 시작할 때는 간을 중심으로 연구하였지만, 점차 그 범위를 확대하여 현재는 근육과 지방 세포등과 같은 대사관련 주요 조직에서도 연구를 진행하고 있습니다. 또한 에너지대사와 관련된 또다른 유전자 발현 조절에 관해서도 지속적으로 연구를 진행할 예정입니다.

저희 실험실은 현재 구승희 교수님 이하 박사 후 과정 1명, 박사과정 5명 그리고 석사과정 1명으로 구성되어 있습니다. 저희 실험실에 관심있는 예비 석사 및 박사과정 지원자는 실험실 홈페이지(<http://home.skku.edu/~metabolism>)를 통해 연락주세요.



■ 참고문헌

Ryu D, Oh KJ, Jo HY, Hedrick S, Kim YN, Hwang YJ, Park TS, Han JS, Choi CS, Montminy M, Koo SH. (2009) TORC2 Regulates Hepatic Insulin Signaling via a Mammalian Phosphatidic Acid Phosphatase, LIPIN1. *Cell Metab*, 9(3):240-51.

TaKaRa의 Thermal Cycler Dice Real Time System
사용해보니 이런 점이 좋았어요!



다카라의 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Code TP800)을 이용하면서 가장 좋았던 점은 구동 소프트웨어의 간단한 인터페이스로 셋업이 매우 간편했다는 것입니다. 또한 다양한 형태의 amplification curve, relative value를 자동으로 만들어주는 그래프 차트가 인상적이었고, denaturing 과정에 생성되는 시그널로부터 증폭된 밴드를 전기영동 하지않아도, 하나의 깨끗한 밴드로 증폭이 되었는지를 확인할 수 있어서 편리했습니다. 또한 필요시에는 raw data를 바로 엑셀 등으로 옮겨 저장하고 편집할 수 있어 발표자료, 논문작성시 실험데이터를 편리하게 정리할 수 있었습니다. 이처럼 사용의 편리함과 동시에 데이터에 대한 신뢰도를 한 눈에 확인할 수 있는 것이 다카라 Thermal Cycler Dice Real Time System의 가장 큰 장점이라고 생각합니다.