

## 인체 소장상피세포주 모델(HT-29)에서 β-알라닌이 타우린수송체 활성에 미치는 영향

윤미영\* · 정한나 · 이해미 · 박태선†

연세대학교 식품영양학과  
\*연세대학교 식품영양과학연구소

### β-Alanine Induced Down-Regulation of the Taurine Transporter Activity in the Human Colon Carcinoma Cell Line (HT-29)

Miyoung Yoon\*, Hanna Jung, Haemee Lee and Taesun Park†

Dept. of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

\*Research Institute of Food and Nutritional Sciences, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

#### Abstract

In the present study, effects of β-alanine, a known taurine antagonist for its structural similarity, on the adaptive regulation and kinetic behavior of the taurine transporter were investigated in the HT-29, human colon carcinoma cell line. Pretreatment of the cell with β-alanine (10 mM) for varying periods from 3 to 30 hrs significantly reduced the taurine uptake compared to the value for control cells. This decrease in the taurine transporter activity was dependent on the incubation time with β-alanine, and the maximal down-regulation of the transporter activity was observed in cells pretreated with β-alanine for 24 hrs (25% of the control value,  $p < 0.01$ ). The taurine transporter appears to bind exclusively with β-alanine in the HT-29 cells since the same concentration of α-alanine added in the culture medium for 24 hrs did not influence the taurine uptake. Kinetic analyses of the taurine transporter activity was performed in the HT-29 cell line with varying taurine concentration (5~60 μM) in the uptake medium. Active taurine uptake was significantly lower in β-alanine pretreated cells compared to the value for control cells in the range of taurine concentration used in the experiment ( $p < 0.001$ ). The cells pretreated with β-alanine showed a 50 % lower maximal velocity ( $V_{max}$ ,  $1.7 \pm 2.0$  nmole · mg protein<sup>-1</sup> · 30 min<sup>-1</sup>), and a 99 % higher Michaelis constant ( $K_m$ ,  $40.3 \pm 7.6$  μM) than the control values ( $3.3 \pm 1.9$  nmole · mg protein<sup>-1</sup> · 30 min<sup>-1</sup>, and  $20.3 \pm 2.1$  μM, respectively). These results on kinetic data suggest that β-alanine induced down-regulation of the taurine transporter activity was associated with decreases in both maximal velocity and affinity of the transporter.

**Key words:** taurine, taurine transporter, human colon carcinoma cell line (HT-29), β-alanine, kinetics

#### 서 론

포유류의 조직에서 고농도로 발견되는 타우린은 구조상 β-아미노산으로 분류되는 동시에, α-탄소에 carboxyl기 대신에 sulfonic acid기가 치환되어 있어서 황황아미노산으로 분류되기도 한다(Fig. 1). 최근 20여년간 타우린의 생물학적 역할에 대한 관심이 높아지면서 타우린이 생체막의 안정화(1), 담즙산 생성(2), 항산화작용(3), 칼슘 항상성의 유지(4), 해당작용 및 글리코겐합성의 촉진(5), 성장조절(6), 삼투압 조절(7), 시력유지(8) 및 면역반응(9) 등의 다양한 생리활성을 나타냄이 보고되었다

한편, 타우린과 유사한 분자구조를 지니는 β-알라닌은 carnosine, antiserme 및 pantothenic acid 등을 구성하는 물

질이며, uracil 또는 cytosine 등과 같은 pyrimidine 염기의 최종 대사산물인 것을 제외하고는 유기체내에서의 생물학적 기능에 관하여 알려진 바가 거의 없다. β-알라닌의 분자구조가 타우린과 유사하다는 사실은 β-알라닌이 타우린에 대하여 길항작용을 나타낼 가능성이 있음을 시사하는 것이다(Fig. 1). 실제로 McBroom과 Davidson(10)에 의하면 타

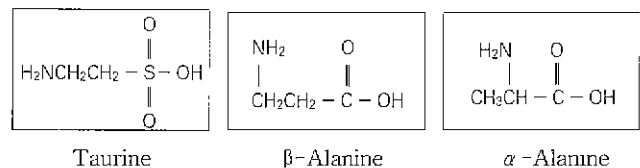


Fig. 1. Chemical structures of taurine, β-alanine and α-alanine.

†Corresponding author. E-mail tspark@yonsei.ac.kr  
Phone: 82-2-2123-3123, Fax: 82-2-312-5229

우린 및 NaCl을 식이로 공급하여 hypernatremia를 유도시킨 흰쥐에게  $\beta$ -알라닌을 함께 공급할 경우 hypernatremia의 유발율이 현저히 저하되었음이 보고되었다. 또한, 고양이에게 식수로  $\beta$ -알라닌을 장기간 공급한 경우 뇌로의 타우린 수송이 저하되어 뇌조직의 타우린농도가 현저히 감소되었고, 그 결과 신경독성이 유발될 수 있음이 제시되었다(11).

장점막에서의 타우린 흡수는 신세뇨관에서의 재흡수, 담즙산을 통한 배설, 그리고 조직에서의 생합성조절과 함께 체내 타우린농도를 적정 수준으로 유지시키는 주요한 기전 중의 하나이다. 장점막세포를 통한 타우린의 흡수는 그동안 주로 소장조직을 perfusion하거나, 동물모델에서 분리된 소장점막으로부터 재조합된 용모막을 이용하여 연구되어져 왔다. 그러나, 이들 모델에서는 세포간의 상호작용 또는 미소혈관계의 영향이 배제되어 있으며, 타우린수송체의 조절 기전을 연구하기 어려운 제한점을 지니고 있다. 최근 소장상피세포를 통한 영양소 및 약물의 흡수 기전을 연구하는데 있어서 인체 대장암세포주인 HT-29 및 Caco-2 세포주의 이용이 급증하고 있다. 이들 소장 상피세포주모델에는 정상 동물의 공장에 존재하는 것과 유사한 특성을 지니는 타우린 수송체가 존재함이 보고되었다. 또한 저자들은 HT-29 세포주를 이용한 선행연구(12)에서 타우린수송체의 활성이 세포의 분화가 진행됨에 따라 차츰 감소하여, *in vivo* system에서 어린 동물에 비해 나이가 증가함에 따라 소장조직의 타우린수송체 발현이 감소되는 현상(13,14)과 유사한 양상이 나타남을 관찰한 바 있다.

타우린수송체의 특성을 연구하는 데 있어서 주요 관심 분야 중의 하나는 타우린의 수송에 관여하는 막단백질이 타우린에 대하여 특이적으로 작용하는가를 밝히는 것이다. 다양한 동물모델에서  $\beta$ -아미노산 수송체의 기질 특이성을 연구한 결과에 의하면 종에 따른 차이를 보이고 있음을 알 수 있다. 토끼를 대상으로 한 실험에서 Munck와 Munck(15)는 타우린에 특이적으로 작용하는 수송체와  $\beta$ -알라닌을 특이적으로 수송하는  $\beta$ -아미노산 수송체가 독립적으로 존재함을 발표하였다. 한편, 흰쥐의 경우 이유기에는 소장조직에서 타우린과  $\beta$ -알라닌이 동일 수송체를 공유하여 흡수되는 반면(13,16), 성장이 완료된 성체의 소장조직에서는 타우린수송체가 타우린에 대하여만 특이적으로 작용하고,  $\beta$ -알라닌과는 결합하지 않음이 제시되었다(17,18). 기니아피그(17,19), 돼지(20) 그리고 해양어류(21)의 소장에 존재하는  $\beta$ -아미노산 수송체는 타우린과  $\beta$ -알라닌을 모두 기질로 받아들이는 것으로 발표되었으며, HT-29 및 Caco-2 세포주에서도 타우린이외의 기타  $\beta$ -아미노산이 타우린수송체를 공유함이 최근 발표되었다(22,23).

본 연구에서는 인체 소장상피세포주 모델인 HT-29 세포주에 존재하는 타우린수송체의 활성이  $\beta$ -알라닌에 의해 경쟁적으로 억제됨을 확인하였고, 소장점막세포의 타우린수송체 활성이 세포내  $\beta$ -알라닌 수준에 따라 적응현상을 나타

냄을 최초로 관찰하였다. 본 연구의 결과는 소장 상피세포막을 통한 능동적 타우린수송에 미치는  $\beta$ -알라닌의 작용기전을 이해하는 데 필요한 기초자료가 될 것이다.

## 재료 및 방법

### 세포배양 및 아미노산 전처리

인체 대장암세포주인 HT-29 세포는 175 cm<sup>2</sup> culture flask에서 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 25  $\mu$ g/mL amphotericin B를 함유한 RPMI 1640을 사용하여 배양시켰다. 개별 실험을 위해 세포주를 분주할 경우 confluent한 상태의 세포를 0.25% trypsin이 함유된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)을 사용하여 분산시키고, 6-well plate의 각 well (35 mm dish)에  $2 \times 10^6$ 개의 세포를 넣고 배양하기 시작하였다. 세포배양은 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C 배양기에서 진행되었다.

$\beta$ -알라닌을 3차 증류수에 녹여 10 mM의 농도로 HT-29 세포에 3~30 시간동안 전처리한 후, 타우린 uptake 활성을 측정하였다. 마찬가지로 L- $\alpha$ -알라닌을 3차 증류수에 녹여 10 mM의 농도로 HT-29 세포에 24시간 동안 전처리한 후, 타우린 uptake 활성을 측정하였다

### 타우린 uptake 활성 측정

HT-29 세포에 의한 타우린 uptake 활성은 Tiruppathi 등(22)의 방법을 일부 변형하여 세포를 6-well plate에 분주한 후 4일째 되는 날, 상온에서 측정하였다. 실험에 이용된 uptake 용액의 구성 성분은 다음과 같았다: 25 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid(HEPES)/hydroxymethyl aminomethane(Tris, pH 7.5), 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 5.5 mM D-mannitol, 그리고 49 nM cold 타우린 및 1 nM <sup>3</sup>H-타우린(NEN Life Science Products, #NET 541). 타우린 uptake 실험을 실시하기 직전, 6-well plate로부터 세포 배양액을 제거한 후 PBS를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 각 well에 1 mL의 uptake 용액을 넣고 상온에서 30분간 배양하여 세포내로 <sup>3</sup>H-타우린이 이동하도록 한 후, 흡입장치를 이용해 재빠르게 용액을 제거하고 PBS로 세번 이상 세포를 세척하였다. 1 mL의 0.1% SDS 용액을 각 well에 넣은 후 실온에서 30분간 방치하여 세포막을 파괴시켰다. 세포 용해액을 scintillation cocktail(Beckman, #S812547)이 담긴 vial에 옮기고, liquid scintillation counter(Beckman, LS6500)를 사용하여 3분간 radioactivity를 측정하였다.

타우린 수송체를 경유하지 않고 단순 확산에 의해 HT-29 세포내로 이동된 타우린 uptake 값은 NaCl 대신 동량의 choline chloride를 uptake 용액에 첨가시킨 상태에서 측정하였다. 능동적 타우린 uptake 값은 NaCl이 존재하는 uptake 용액에서 측정된 총 uptake 값에서 NaCl 대신 choline chloride가

함유된 uptake 용액에서 측정된 uptake 값을 재하여 계산하였다. 타우린 uptake 값은 세번 반복실험의 평균값으로 취하였으며, pmole taurine·mg cell protein<sup>-1</sup>·30 min<sup>-1</sup>으로 나타내었다.

#### 타우린수송체의 kinetics 측정

HT-29 세포에서 타우린수송체의 kinetics를 평가하기 위해 uptake 용액의 타우린농도를 2~60 μM까지 날리하면서 총 uptake 값과 단순 확산에 의한 uptake 값을 측정하였으며, 이때 uptake 용액 중의 <sup>3</sup>H 타우린 농도는 0.1 nM로 유지하였다. 앞에서 설명한 것과 동일한 방법으로 능동적 타우린 uptake 값을 계산하여 Lineweaver-Burk plot으로 변환시키고, 타우린수송체의 최대속력(Vmax) 값과 Michaelis 상수(Km) 값을 각기 산출하였다.

각각의 타우린농도에서 얻어진 HT-29 세포의 타우린 uptake 값은 세번 반복실험의 평균값으로 취하였으며, Vmax 값은 nmole taurine·mg cell protein<sup>-1</sup>·30 min<sup>-1</sup>으로, 그리고 Km 값은 μM로 제시하였다.

#### 통계분석

모든 분석 결과는 mean±SE로 제시하였고, 각 군의 평균값의 차이는 Student's *t*-test를 실시하여 p<0.05, p<0.01 또는 p<0.001 수준에서 유의성을 판정하였다. 타우린수송체의 Vmax 값과 Km 값은 Lineweaver-Burk plot의 Y절편과 X절편 값을 취하여 각기 산출하였다. 모든 통계처리는 Microsoft EXCEL PC 프로그램을 이용하여 실시하였다.

### 결과 및 고찰

β-알라닌 전처리가 타우린 uptake 활성화에 미치는 영향

본 연구팀의 선행 연구결과(12)에 의하면 HT-29 세포주에 β-알라닌을 0.1~10 mM의 농도로 전처리한 후 타우린 uptake 활성을 측정할 결과, 사용된 β-알라닌의 농도에 비례하여 타우린 uptake 수치가 감소하였으며, 10 mM 농도에서 최저치를 나타냈다. 본 연구에서는 타우린 uptake 활성화에 미치는 β-알라닌의 효과에 대한 시간 의존성 여부를 평가하기 위하여 HT-29 세포를 β-알라닌으로 3~30시간의 범위내에서 시간을 달리하여 전처리한 후 타우린 uptake 활성을 측정하였다. 10 mM의 β-알라닌으로 3, 6, 24 및 30시간동안 전처리한 세포에서 측정된 타우린 uptake 수치는 각각 2.56±0.27, 2.42±0.33, 1.47±0.33, 그리고 1.62±0.10 pmole taurine·mg cell protein<sup>-1</sup>·30 min<sup>-1</sup>으로 나타나 대조세포(6.56±0.29 pmole taurine·mg cell protein<sup>-1</sup>·30 min<sup>-1</sup>)에서 측정된 값에 비해 모든 시간대에서 유의적으로 저하되었음이 관찰되었다(Fig. 2). HT-29 세포를 β-알라닌으로 24시간동안 전처리한 경우 타우린 uptake 수치가 최저치(대조세포 수준의 약 25%)를 나타냈으며, 30시간동안 전처리 시에는 더 이상의 감소현상이 나타나지 않았다. 따라서 이후의 실험에서는 24시간 동

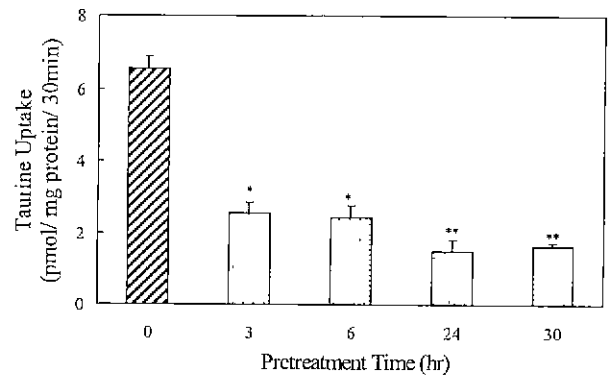


Fig. 2. Pretreatment time dependency of the β-alanine induced inhibition of taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line.

Values are mean±SE from a single experiment done in triplicate. Cells were pretreated with β-alanine (10 mM) for varying periods, and uptake of taurine (50 nM) was measured using a 30 minute incubation. <sup>3</sup>H taurine concentration was maintained at 1 nM in the uptake solution.

\*, \*\*Significantly different from the value for control cells by Student's *t*-test at \*p<0.05, and \*\*p<0.01, respectively

안 β-알라닌으로 전처리된 세포에서 타우린 uptake 활성을 측정하였다.

HT-29 세포주를 사용한 Tiruppathi 등(22)의 연구결과에서도 10 mM의 β-알라닌으로 전처리한 세포의 타우린 uptake 수치가 대조세포에서 관찰된 수치의 약 29% 수준으로 감소한 것으로 나타나 본 실험의 결과를 지지해 주고 있다. 또한 Caco-2 세포주를 사용한 Satsu 등(23)의 연구에서도 10 mM의 β-알라닌으로 24시간동안 전처리한 세포의 타우린 uptake 활성이 대조세포에서 관찰된 수치의 35% 수준으로 나타나 HT-29세포주에서와 유사한 경향을 보였다. HT-29 세포를 대상으로 한 실험(22)에서 uptake 용액에 β-알라닌과 타우린을 동시에 첨가시킨 경우 두가지 물질이 상대 아미노산의 uptake를 서로 감소시킨 결과는 소장상피세포 용모막에서 β-알라닌과 타우린이 단일의 공동 수송체와 결합함을 시사하는 것이며, 이 공동 수송체(타우린수송체)는 β-알라닌보다 타우린에 대하여 더 높은 친화력을 나타내는 것으로 보고되었다.

#### α-알라닌이 타우린수송체 활성화에 미치는 영향

HT-29 세포에서 관찰된 β-알라닌에 의한 타우린 uptake 저해 효과가 β-아미노산에 국한되어 나타나는 효과인지를 규명하기 위하여 동일 세포주모델을 L-α-알라닌으로 전처리한 후 타우린 uptake 활성을 측정하였다. 10 mM의 L-α-알라닌을 세포배양액에 첨가시키고 24시간이 경과한 후 50 nM의 타우린이 함유된 uptake 용액에서 30분간 배양하여 타우린 uptake 활성을 측정하였다. β-알라닌으로 전처리 시 타우린 uptake 활성이 유의하게 감소된 것과는 달리, 같은 농도의 L-α-알라닌으로 24시간동안 전처리한 세포의 타우린 uptake 수치는 6.16±0.29 pmole taurine·mg cell protein<sup>-1</sup>

$\cdot 30 \text{ min}^{-1}$ 로 대조세포의 타우린 uptake 수치( $6.56 \pm 0.29 \text{ pmole taurine} \cdot \text{mg cell protein}^{-1} \cdot 30 \text{ min}^{-1}$ )와 유의적인 차이가 없었다(Fig. 3). 이와같은 결과는 HT-29 세포주에 존재하는 타우린수송체가  $\alpha$ -아미노산에는 비특이적인 수송체제임을 시사하는 것이다.

일반적으로 동물모델에서 공장점막의  $\beta$ -아미노산 수송체는 타우린 등의  $\beta$ -아미노산과 높은 친화력을 나타내며,  $\alpha$ -아미노산과는 거의 상호작용하지 않는 것으로 알려져 있지만(24,25), Andersen과 Munck(26)는 토끼의 회장점막에 존재하는  $\beta$ -아미노산 수송체가  $\beta$ -아미노산뿐 아니라  $\alpha$ -아미노산 및 cationic 아미노산과 상호작용함을 보고한 바 있다. 따라서 기질 특이성 측면에서 HT-29 세포에서 발현되는 타우린수송체는 동물의 공장에서 발현되는 타우린수송체와 유사한 특성을 지님을 알 수 있다.

#### $\beta$ -알라닌에 의한 타우린수송체 kinetics의 변화

다양한 동물모델 및 세포주모델에서 타우린수송체의 활성은 개체 또는 세포의 타우린 영양상태에 따라 적응되는 현상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉, Tirupathi 등(22), Jayanthi 등(27) 그리고 Satsu 등(23)은 소장상피세포주(HT-29, Caco-2) 또는 태반세포주(JAR)를 일정 기간 타우린으로 전처리한 결과 세포의 타우린수송체 활성이 감소하였음을 관찰하였고, 이와같은 타우린수송체 활성의 'down-regulation' 현상은 타우린수송체의  $V_{\max}$ 값과 함께 친화력의 변화를 수반하는 것임을 발표한 바 있다. Chesney 등(28)은 고타우린 식이를 섭취한 흰쥐의 신세뇨관에서 분리된 제조합용모막을 통한 타우린수송이 정상타우린 식이를 섭취한 동물에 비하여 현저히 감소되어 있음을 제시하였다. 이와 유사하게 Park 등(29)도 고양이에게 고타우린 식이를 장기간 섭취시킨

경우 신세뇨관을 통한 타우린 재흡수가 대조군에 비해 현저히 저하되는 반면 무타우린 식이를 섭취시킨 동물에서는 타우린 재흡수가 유의하게 증가되었고, 이는 타우린수송체의  $V_{\max}$  및  $K_m$  값의 변화와 관계가 있음을 제조합용모막을 이용한 실험에서 보고하였다.

본 논문에서는  $\beta$ -알라닌에 의해 HT-29 세포의 타우린수송체가 down-regulation되는 현상에 대한 기전을 규명하기 위하여 타우린수송체의 kinetics 변화 유무를 측정하였다. HT-29 세포에서의 능동적 타우린 uptake 활성은 uptake 용액의 타우린농도가 증가함에 따라 같이 증가하면서 점차로 포화되는 hyperbolic 곡선을 나타내, 타우린 수송과정에 단일 수송체가가 관여함을 제시해 주고 있다(Fig. 4). 10 mM의  $\beta$ -알라닌으로 24시간 전처리한 세포에서의 능동적 타우린 uptake 활성은 측정된 모든 타우린농도에 있어서 대조세포에 비하여 유의적으로 감소하였다( $p < 0.001$ ). 타우린농도의 변화에 따른 타우린 uptake 값의 변화를 Lineweaver-Burk plot으로 변환시켜 타우린수송체의  $V_{\max}$ 와  $K_m$  값을 산출한 결과(Fig. 5, Table 1). 대조세포의 경우  $V_{\max}$  값은  $3.3 \pm 1.9 \text{ nmole} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 30 \text{ min}^{-1}$ , 그리고  $K_m$  값은  $20.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 한편,  $\beta$ -알라닌으로 전처리한 세포에서의  $V_{\max}$  값은  $1.7 \pm 2.0 \text{ nmole} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 30 \text{ min}^{-1}$ 으로 대조세포의 50% 수준으로 유의하게 감소되었으며( $p < 0.001$ ),  $K_m$  값은  $40.3 \pm 7.6 \mu\text{M}$ 로 대조세포의 199% 수준으로 증가되었다( $p < 0.05$ ). 타우린수송체의  $V_{\max}$  값이 감소한 현상은  $\beta$ -알라닌에 의한 수송체 단백질의 양적인 감소를 의미하며,  $K_m$  값의 증가는  $\beta$ -알라닌에 의하여 수송체 단백질의 타우린에 대한 친화도가 감소되었음을 뜻한다. 세포내의  $\beta$ -알라닌농도가 증가하는 경우 타우린수송체의 발현정도와 친화

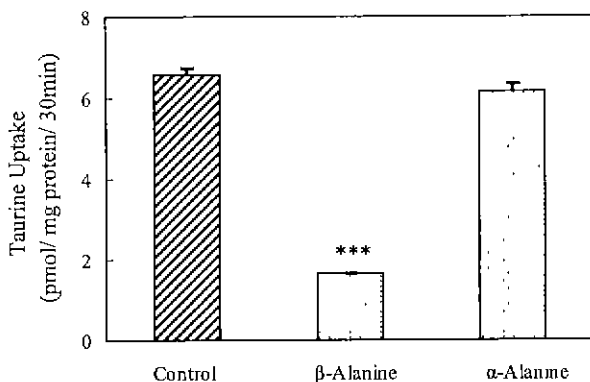


Fig. 3. Effects of  $\beta$ - and  $\alpha$ -alanine on taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line.

Values are mean  $\pm$  SE from a single experiment done in triplicate. Cells were pretreated for 24 hr with  $\beta$ -alanine (10 mM) or  $\alpha$ -alanine (10 mM). Following the pretreatment, uptake of taurine (50 nM) was measured using a 30 minute incubation.  $^3\text{H}$  taurine concentration was maintained at 1 nM in the uptake solution.

\*\*\*Significantly different from the value for control cells by Student's  $t$ -test at  $p < 0.001$ .

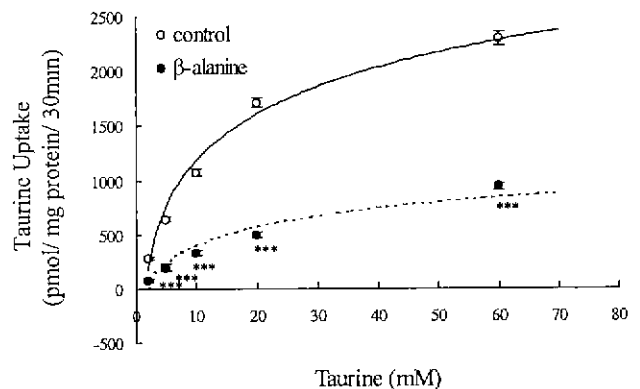
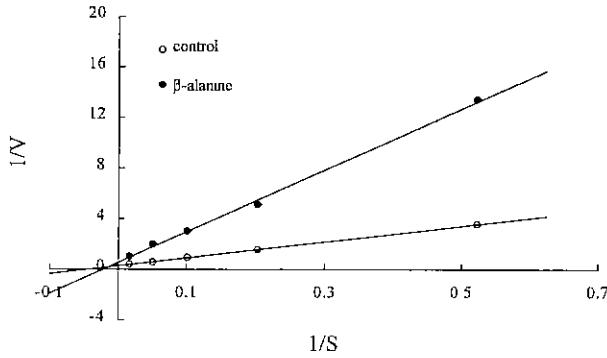


Fig. 4. Influence of  $\beta$ -alanine pretreatment on active taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line.

Values are mean  $\pm$  SE from three separate experiments done in triplicate. Cells were pretreated with  $\beta$ -alanine (10 mM) for 24 hr. Following the pretreatment, active uptake of taurine was measured over a taurine concentration range of 2~60  $\mu\text{M}$  using a 30 minute incubation.  $^3\text{H}$  taurine concentration was maintained at 1 nM in the uptake solution.

\*\*\*Significantly different from the value for control cells by Student's  $t$ -test at  $p < 0.001$ .



**Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of active taurine uptake in the β-alanine pretreated or control HT-29 colon carcinoma cell line 4 days after seeding.**

Values are mean ± SE from three separate experiments done in triplicate. After pretreating the cells with β-alanine (10 mM) for 24 hr, uptake of taurine was measured over a taurine concentration range of 2~60 μM using a 30 minutes incubation <sup>3</sup>H taurine concentration was maintained at 1 nM in the uptake solution. The units for V and S are nmole taurine · mg protein<sup>-1</sup> · 30 min<sup>-1</sup> and μM, respectively.

**Table 1. β-Alanine induced changes in the Vmax and Km of the taurine transporter in the HT-29 colon carcinoma cell line**

	Control	β-Alanine
Vmax (nmole/mg/30 min)	3.3 ± 1.9	1.7 ± 2.0 <sup>***</sup>
Km (μM)	20.3 ± 2.1	40.3 ± 7.6 <sup>*</sup>

Values are mean ± SE from three separate experiments done in triplicate.

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup> Significantly different from the value for control cells by Student's t-test at <sup>\*</sup>p<0.05 and <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, respectively.

력이 감소하는 것은 타우린뿐 아니라 분자구조가 유사한 기타 β-아미노산에 대하여도 타우린수송체가 적응 현상을 나타냈기 때문인 것으로 사료된다. 세포내 β-알라닌 수준이 타우린수송체의 kinetics에 미치는 영향을 측정할 연구는 현재까지 보고된 바가 없으며, 본 논문이 최초의 결과이다.

소장상피세포의 타우린수송체 활성을 변화시키는 작용 기전에 관하여는 그동안 매우 드물게 연구되어져 왔다. Brandsch 등(30)은 HT-29과 Caco-2 세포의 타우린수송체 활성이 protein kinase C에 의해 조절되며, 후자는 타우린수송체의 인산화를 조절하므로써 그 활성을 조절하는 것으로 제시하였다. 같은 연구팀(31)은 2년 뒤 HT-29과 Caco-2 세포주 모델에서 세포내 이차 전령체계인 cyclic AMP 농도가 증가함에 따라 타우린수송체 활성이 감소함을 보고하였다. 타우린수송체 유전자의 발현을 조절하는 기전으로서 Satsu 등(32)은 전사율(transcription rate)의 변화, 그리고 mRNA의 안정성 변화 등의 두가지가 관여할 것으로 제시한 바 있으나, 타우린수송체의 세부적 조절기전을 규명하기 위해서는 유전자 수준에서의 연구가 앞으로 계속되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 인체 소장상피세포주 모델인 HT-29 세포주를 이용하여 β-알라닌 전처리에 의한 타우린수송체 활성 및 수송체의 kinetics 변화 유무를 평가하였다. HT-29 세포를 10 mM의 β-알라닌으로 3~30시간동안 전처리한 결과 대조세포(6.56 ± 0.29 pmole taurine · mg cell protein<sup>-1</sup> 30 min<sup>-1</sup>)에 비해 측정된 모든 시간대에서 타우린 uptake 활성이 유의적으로 저하되었음이 관찰되었으며, 24시간 전처리 후 최저치의 타우린 uptake 값(대조세포 수준의 약 25%)을 나타냈다. 한편 L-α-알라닌은 HT-29 세포의 타우린수송체 활성에 유의적인 영향을 미치지 않음이 관찰되어, 타우린수송체가 β-아미노산에 대하여 특이적으로 작용함을 제시하였다. 10 mM의 β-알라닌으로 24시간 전처리한 세포에서의 능동적 타우린 uptake 활성은 측정된 모든 타우린농도에 있어서 대조세포에 비하여 유의적으로 감소되었다(p<0.001). β-알라닌에 의해 HT-29세포의 타우린수송체가 down-regulation되는 현상에 대한 작용기전을 평가하기 위하여 타우린수송체의 kinetics 변화 유무를 측정할 결과, β-알라닌으로 전처리한 세포에서의 Vmax 값은 1.7 ± 2.0 nmole mg protein<sup>-1</sup> · 30 min<sup>-1</sup>으로 대조세포(3.3 ± 1.9 nmole · mg protein<sup>-1</sup> · 30 min<sup>-1</sup>)의 50% 수준으로 유의하게 감소되었으며(p<0.001), Km 값은 40.3 ± 7.6 μM로 대조세포(20.3 ± 2.1 μM)의 199% 수준으로 증가되었다(p<0.05). 따라서 세포내 β-알라닌의 수준이 변화하는 경우 수송체 단백질의 양적인 감소뿐 아니라 타우린에 대한 친화도가 감소되는 적응 현상이 나타난 것으로 사료된다. 이상에서와 같은 본 연구의 결과는 소장 상피세포내의 β-알라닌 수준이 증가함에 따라 타우린수송체의 kinetics 변화를 수반하는 down-regulation 현상이 나타났음을 밝히는 최초의 보고이다.

감사의 말

이 논문은 1999년 한국학술진흥재단의 '박사후 연수과정 연구지원' 연구비에 의하여 진행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Pasantes-Morales, H., Wright, C.E. and Gaull, G.E. : Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2205-2207 (1985)
2. Hofmann, A.F. and Small, D.M. : Detergent properties of bile salts : correlation with physiological function *Ann. Rev. Med.*, **18**, 333-376 (1967)
3. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M. and Butler, J. : The antioxidant action of taurine, hypotaurine, and their metabolic precursors. *Biochem J.*, **256**, 251-255 (1988)
4. Takahashi, K., Harada, H., Schaffer, S.W. and Azuma, J. : Effect of taurine on intracellular calcium dynamics of cultured myocardial cells during the calcium paradox *Adv Exp Med. Biol.*, **315**, 153-161 (1992)

- 5 Kulakowski, E.C. and Mauro, J. Hypoglycemic properties of taurine not mediated by enhanced insulin release *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2835-2838 (1984)
- 6 Hayes, K.C., Stephan, Z.F. and Sturman, J.A. : Growth depression in taurine-depleted infant monkeys. *J. Nutr.*, **110**, 2058-2064 (1980)
- 7 Thurston, J.H., Hauhart, R.E. and Dirgo, J.A. : Taurine : a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance *Life Sci.*, **26**, 1561-1568 (1980)
- 8 Geggel, H.S., Ament, M.E., Heckenlively, J.R., Martin, D.A. and Kopple, J.D. : Nutritional requirement for taurine in patients on long-term parenteral nutrition. *New Engl. J. Med.*, **312**, 142-146 (1985)
- 9 Redmond, H.P., Stapleton, P.P., Neary, P. and Bouchier-Hayes, D. : Immunonutrition : The role of taurine *Nutrition*, **14**, 599-604 (1998)
- 10 McBroom, M.J. and Davidson, N. :  $\beta$ -Alanine protects against taurine and NaCl-induced hypernatremia in the cat *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **211**, 184-189 (1985)
- 11 Lu, P., Xu, W. and Sturman, J.A. : Dietary  $\beta$ -alanine results in taurine depletion and cerebella damage in adult cats. *J. Neurosci. Res.*, **43**, 112-119 (1978)
- 12 Park, T., Lee, H.M., Kim, J.A., Kim, H.W. and Park, K.K. : Taurine transporter activity in the human colon carcinoma cell line (HT-29) is decreased during cell differentiation. *Korean J. Nutr.*, **33**, 660-667 (2000)
- 13 Moyer, M.S., Goodrich, A.L., Rolfes, M.M. and Suchy, F.J. : Ontogenesis of taurine transport : evidence for a  $\beta$ -carrier in developing rat jejunum *Am. J. Physiol.*, **254**, G870-G877 (1988)
- 14 Sharafuddin, M., Nassar, G.M. and Nassar, C.F. : Taurine transport across the small intestine of adult and suckling rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91A**, 33-36 (1988)
- 15 Munck, L.K. and Munck, B.G. : Variations in amino acid transport along the rabbit small intestine. Mutual jejunal carriers of leucine and lysine *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 83-90 (1992)
- 16 Bernard, J.A., Thaxter, S., Kuchi, K.K. and Ghishan, F.K. : Taurine transport by rat intestine. *Am. J. Physiol.*, **254**, G334-G338 (1988)
- 17 Munck, L.K. and Munck, B.G. : Chloride-dependent intestinal transport of imino and  $\beta$ -amino acids in the guinea pig and rat *Am. J. Physiol.*, **266**, R997-1007 (1994)
- 18 Kim, K.S. : Characterization of the absorption process of taurine across rat small intestine. *Arch. Pharmacol. Res.*, **6**, 109-114 (1983)
- 19 Buffoni, F., Prisisno, P.M., Soldino, G.B. and Ferroni, A.T. : Taurine transfer from the mucosal to the serosal surface in the everted small intestine of guinea pig *Pharmacol. Res. Commun.*, **10**, 911-923 (1978)
- 20 Munck, L.K., Grondah, M.L. and Skadhauge, E. :  $\beta$ -amino acid transport in pig small intestine *in vitro* by a high affinity chloride dependent carrier. *Biochim. Biophys. Acta*, **1238**, 49-56 (1995)
- 21 King, P.A., Goldstein, S.R., Goldstein, J.M. and Goldstein, I. : Taurine transport by the flounder (*Pseudopleuronectes Americanus*) intestine. *J. Exp. Zool.*, **238**, 11-16 (1986)
- 22 Tirupathi, C., Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Liebach, F.H. : Constitutive expression of the taurine transporter in a human carcinoma cell line *Am. J. Physiol.*, **263**, G625-G631 (1992)
- 23 Satsu, H., Watanabe, H., Arai, S. and Shimizu, M. : Characterization and regulation of taurine transport in Caco-2 human intestinal cells. *J. Biochem.*, **121**, 1082-1087 (1997)
- 24 Miyamoto, Y., Tirupathi, C., Ganapathy, V. and Liebach, F.H. : Active transport of taurine in rabbit jejunal brush border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, **257**, G65-G72 (1989)
- 25 Iyamoto, Y., Nakamura, H., Hoshi, T., Ganapathy, V. and Liebach, F.H. : Uphill transport of  $\beta$ -alanine in intestinal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, **259**, G372-G379 (1990)
- 26 Andersen, V. and Munck, B.G. : Transport of the  $\alpha$ -aminonocarboxylic acid, L-alanine by the  $\beta$ -alanine carrier of the rabbit ileum. *Biochim. Biophys. Acta*, **902**, 145-148 (1987)
- 27 Jayanthi, L.D., Ramamoorthy, S., Mahesh, V.B., Liebach, F.H. and Ganapathy, V. : Substrate-specific regulation of the taurine transporter in human placental choriocarcinoma cells (JAR). *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 351-360 (1995)
- 28 Chesney, R.W., Gusowski, N. and Friedman, A.L. : Renal adaptation to altered dietary sulfur amino acid intake occurs at luminal brush border membrane. *Kidney Int.*, **243**, 588-594 (1983)
- 29 Park, T., Rogers, Q.R., Morris, J.G. and Chesney, R.W. : Effect of dietary taurine on renal taurine transport by proximal tubule brush border membrane vesicles in the kitten. *J. Nutr.*, **119**, 1452-1460 (1989)
- 30 Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Liebach, F.H. : Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C *Am. J. Physiol.*, **264**, G939-G946 (1993)
- 31 Brandsch, M., Ramamoorthy, S., Marczin, N., Catravas, J.D., Liebach, J.W., Ganapathy, V. and Liebach, F.H. : Regulation of taurine transport by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines *J. Clin. Invest.*, **96**, 361-369 (1995)
- 32 Satsu, H., Miyamoto, Y. and Shimizu, M. : Hypertonicity stimulates taurine uptake and transporter gene expression in Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1419**, 89-96 (1999)

(2001년 1월 10일 접수)