

쥐의 insulin-like growth factor-I 유전자 발현의 대사조절기전에 관한 연구

†안 미 라

전남대학교 수의과대학 수의학과 및 생물공학연구소
(접수 : 2002. 5. 20., 게재승인 : 2002. 6. 18.)

Metabolic Regulation of Insulin-like Growth Factor-I Expression

Mi Ra An†

College of Veterinary Medicine and Biotechnology Research Institute, Chonnam National University,
Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2002. 5. 20., Accepted : 2002. 6. 18.)

The present study was aimed at investigating the metabolic regulation of insulin-like growth factor-I(IGF-I) expression in fasting animals. The expression of IGF-I gene was determined by a solution hybridization/RNase protection assay using total RNA from control, 4d-fasting, and 2d-fasting-refed rats. The levels of IGF-I transcripts were reduced in 4d-fasting than in control by decreasing its transcriptional rate, which was measured through nuclear run-on assay. DNase I footprinting, which was performed using nuclear extracts from fasting rat, demonstrated protein binding to a sequence that extended from +179 to +210 (termed region B). These data suggest that the expression of IGF-I is transcriptionally regulated through DNA-liver enriched protein binding in a sequence which is located downstream from major transcription initiation site of IGF-I gene.

Key Words : Insulin-like growth factor-I, fasting, DNA-protein binding, C/EBP isoform

서 론

Insulin-like growth factors (IGFs)는 아미노산 서열이나 구조, 그리고 생물학적인 기능이 insulin과 유사한 폴리펩티드이다. 혈액내 순환되는 IGF-I의 양이 대사 상태에 따라서 IGF-II의 양보다 더 민감하게 변화하기 때문에 IGF-I이 생후 삶(postnatal life) 동안 더 중요한 조절 요소인 것으로 알려져 있다. IGF-I은 측분비(paracrine) 조절 뿐만 아니라 국소 성장 요소로서 여러 기관과 조직들에서 발현되고 있으며, 순환되는 IGF-I의 주요 공급처인 간조직에서 50배 내지 100배나 더 많이 발현되므로 성장을 조절하는 내분비(endocrine) 조절자로서의 역할도 한다(1,2).

IGF-I은 국소적으로 작용하는 조직의 성장 및 분화의 촉진제로서 포유동물의 발육과 성장에서 중요한 역할을 하며 성장호르몬(GH)의 여러 가지 성장촉진 작용을 매개한다(3). 또한 창상 치유(wound healing), 적혈구생성 및 연골과 뼈의 개형(remodeling)과 같은 재생과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다(4). 유전자 knockout 연구를 통하여 IGFs가 중요한 태아

의 성장요소들이 밝혀졌고(5) 특히 IGF-I은 중추신경계와 말초신경계의 조직에서도 다양한 기능을 나타내는 다면 발현성의 영양요소(pleiotropic trophic factor)로서 최근에 다시 관심의 대상이 되고 있다(6). 이와 같이 다양한 기능을 가진 IGF-I 유전자의 발현은 사람 및 쥐에서 두 개의 promoters로부터의 전사와 alternative RNA splicing 및 differential RNA polyadenylation과 같은 복잡한 기전들에 의하여 조절된다(1,7). 그러나 GH를 포함한 일부 호르몬들 이외에 위에서 언급한 여러 가지 과정에서 IGF-I 유전자의 발현을 조절하는데 관여하는 요소들에 대하여는 잘 밝혀져 있지 않다. 생체내에서는 영양상태가 IGF-I 유전자의 발현을 조절하는 중요한 요소이며 영양실조 및 당뇨병에 의하여 간을 비롯한 많은 조직에서 IGF-I mRNA양이 감소되었지만 뇌에서는 변화하지 않는 것으로 나타났다(8,9). 그러나 조직 특이하게 그리고 발육에 따라 특이하게 일어나는 IGF-I 유전자의 발현에 대한 정확한 분자적 기전과 호르몬 및 대사가 그것을 어떻게 조절하는지 잘 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 4일 동안 절식시킨 쥐의 간조직에서 IGF-I mRNA의 양이 감소하였으며, 이러한 mRNA양의 감소는 절식에 의하여 IGF-I의 전사율이 감소한 결과인 것을 보여 주었다. 또한 처음으로 절식에 의한 대사 변조 결과 변화된 IGF-I 유전자의 발현 조절에는 IGF-I exon 1의 주요한 전사 개시점으로부터 아래쪽에 존재하는 downstream(+) sequences

† Corresponding Author : College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-2822, Fax : +82-53-814-8790
E-mail : mran@chonnam.ac.kr

가 중요하게 관여한다는 것을 보여 주었으며, 이 sequences에는 간 조직에 풍부하게 존재하는 CAAT/enhancer-binding protein(C/EBP) isoform을 포함한 여러 전사인자(들)이 결합할 것으로 제안하였다.

재료 및 방법

실험동물

다물 사이언스(대전, 한국)에서 구입한 200 g 내외의 수컷 쥐(Sprague Dawley)를 두 군으로 나누어 한 군은 대조군으로 정상사료와 물을 공급하고 다른 한 군은 실험군으로 3일, 또는 4일, 또는 5일간 물만 공급하고 절식시켰다(10). 그 후 4일 실험군의 절반은 정상사료를 다시 2일간 공급하여 회복시켰다. 실험동안 12시간 light/dark cycle이 가동되는 사육실에서 사육하였으며 절식시킨 후 3일, 4일 및 5일과 사료를 2일간 제공받은 실험군들의 체중을 측정하였다.

본 실험에서 사용한 시약들은 ultrapure의 molecular biology 급으로써 Bioneer(대전, 한국)와, Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.), Worthington Biochemical Corp. (Freehold, NJ, U.S.A.), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, U.S.A.), AMRESCO Inc. (Solon, OH, U.S.A.), 그리고 Amersham Biosciences(Uppsala, Sweden)에서 구입하였다.

Nuclear run-on transcription 분석

대조군 및 절식시킨 쥐의 신선한 간 조직으로부터 핵을 분리하기 위하여 4°C에서 sucrose gradient ultracentrifugation을 하였다. 1×10^7 개의 핵과 한 분씩당 200 μ Ci의 32 P-UTP를 사용하여 30°C에서 45분간 *in vitro* transcription을 실행하였다. DNase I과 proteinase K를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 새로이 생성된 1×10^7 cpm의 RNA를 nitrocellulose filter에 고정시킨 변형된 쥐의 IGF-I cDNA와 65°C에서 48시간 동안 hybridization시켰다. 그 후 filter를 세척하고 X-ray film (X-OMAT™ AR-5, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, U.S.A.)에 노출시켜 autoradiograph를 얻었으며, signal이 관측된 spot를 잘라 β -scintillation counter(LS 6500, Beckman Instrument, Inc. Fullerton, CA, U.S.A.)에서 그들의 radioactivity를 측정하여 분석함으로써 상대적인 전사율을 측정하였다(11).

RNA 분리

Chomczynski와 Sacchi(12)의 single-step 방법으로 쥐의 간 및 골격근 조직에서 total RNA를 분리하였다. 즉, 0.1 g의 얼린 조직을 1 mL의 RNAzol 용액(12 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.24% sarcosyl, 1.9 M guanidinium thiocyanate, 50 mM β -mercaptoethanol, 95 mM sodium acetate, pH 5.0, 48% buffer-saturated phenol, pH 4.3)에서 Polytron homogenizer (KINEMATIKA, Switzerland)로 균질화한 후 4°C에 5분간 incubation하여 핵단백질 복합체가 완전히 분해되도록 하였다. 다음에 RNAzol 용액 1 mL당 0.2 mL의 R-chloroform (chloroform : isoamyl alcohol = 49 : 1)을 첨가하고 뚜껑을 꼭 닫은 후 15초 동안 시료들을 격렬하게 섞고 4°C에 5분간 incubation했다. 그 다음 12,000 \times g, 4°C (Eppendorf

Germany)에서 15분 동안 원심 분리한 후 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 시료들을 4°C에서 10분간 incubation한 후 12,000 \times g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 제거하고 RNA pellet을 75% ethanol 1 mL로 두 번 세척하였다. RNA pellet을 진공 속에서 말린 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 물에 용해시키고 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였다. RNA 순도와 동량의 loading 여부는 ethidium bromide로 염색한 gel상에서 28S와 18S rRNAs의 강도를 관찰함으로써 조사하였다(11).

Hybridization probe 제조

Solution hybridization/RNase protection 분석방법으로 절식시킨 동안 변화한 IGF-I의 mRNA를 정량하기 위하여 322 base pair (bp)의 쥐 IGF-I cDNA를 pGEM-2 vector (Promega, Madison, WI, U.S.A.)에 subclone한 plasmid DNA를 EcoRI로 제한하여 linearize시켰다. Linearized DNA와 32 P-UTP (NEN, Boston, MA, U.S.A.), T₃ RNA polymerase (Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하여 radiolabel된 antisense RNA를 얻어 probe로 사용하였다(13).

Solution hybridization/RNase protection 분석

32 P-labeled antisense RNA를 45°C에서 20 μ g의 total RNA와 75% formamide 및 0.4 M NaCl 용액에서 16시간 incubation시킨 후, 시료들을 RNase A와 T₁으로 제한하였다. Protect된 double-stranded hybrids를 ethanol 침전으로 모으고 8% polyacrylamide/ 8 M urea denaturing gel에서 전기영동을 걸었다. Gel을 건조시키고 X-ray film에 노출시킨 후 얻은 autoradiographs를 분석하여 IGF-I에 대한 mRNA의 양을 구하였다(13).

핵 추출물의 준비

대조군을 포함한 절식시킨 쥐의 신선한 간 및 뇌, 그리고 신장 조직으로부터 핵 추출물을 마련하였다(13). 즉 신선한 조직을 A완충액(0.25 M sucrose, 15 mM Tris-HCl, pH 7.9, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM dithiothreitol, 0.4 mM PMSF, 2 mM benzamidine, 1 μ g/mL protease inhibitors)에서 균질화하고 B완충액 (2.3 M sucrose를 함유한 A완충액)을 2배의 부피만큼 첨가하여 혼합한 후 C완충액 (1.8 M sucrose를 함유한 A완충액)의 10 mL cushion위에 올려 넣었다. 그런 다음 SW27 rotor를 이용하여 4°C에서 25,000 rpm으로 초원심분리하였다. 그 결과 생긴 핵 침전물을 D완충액(100 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.4 mM PMSF, 2 mM benzamidine, 1 μ g/mL protease inhibitors)에 resuspend시키고 4°C에서 0.1배의 부피만큼 4 M (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 추출하였다. 이 현탁액을 SW40 rotor를 이용하여 45분 동안 30,000 rpm에서 초원심분리한 후 상층액의 ml당 0.3 g의 (NH₄)₂SO₄ 결정은 상층액에 첨가하여 핵단백질을 침전시키고 E완충액에 resuspend하였다. E완충액(20 mM HEPES, pH 7.8, 10% glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM

Table 1. Effect of Fasting on Body Weight (B.W.) Data are means \pm SEM. Numbers of rats in each group are 4~12

	Control	Fasting (d)			Recovery (2d)
		3	4	5	
B.W. (g)	225 \pm 3	181 \pm 2*	137 \pm 1*	105 \pm 3*	175 \pm 3**

*p<0.000 ; compared with control, **p<0.007 compared with fasting (4d) group

dithiothreitol, 0.5 mM PMSF, 0.2 mM benzamidine, 1 μ g/mL protease inhibitors)에 대하여 4°C에서 투석하고 투석된 물질을 microcentrifuge하여 침전물을 제거한 상층액(핵추출물)을 소량으로 나누어 액체질소에서 급격냉동시킨 후 -70°C에 보관하였다. Bradford 방법(14)을 이용하여 핵추출물의 단백질 농도를 측정하였다.

DNase I protection 분석

DNase I protection 분석은 An 및 Lowe(15)의 방법으로 실행하였다. 이 분석에 이용된 ³²P-label된 probes는 IGF-I의 5'-flanking 지역과 exon 1에 homologous하며 상호보충적인 합성된 oligonucleotide를 가지고 polymerase chain reaction (PCR)을 하여 준비하였다. PCR을 하기 전 5' - 또는 3'-oligonucleotide를 [γ -³²P]ATP와 T₄ polynucleotide kinase를 이용하여 end-label하였다. PCR에서 생성된 증폭된 산물물 gel에서 정제하여 DNase I protection 분석에 사용하였다.

결과 및 고찰

절식에 따른 체중의 변화

실험동물들 3일, 4일, 및 5일 동안 절식시켰을 때 절식시킨 기간에 따라서 대조군의 체중에 비하여 각각 22%, 40%, 및 47%가 통계적으로 유의하게 감소하였으며 (P<0.00), 4일 동안 절식시킨 후 다시 정상사료와 물을 2일간 공급하였을 때 체중이 대조군의 78% (P<0.01)까지 유의하게 회복되었다 (Table 1). 다른 연구자들도 절식시킨 기간에 따라서 체중이 감소하였으며, 체중의 감소와 더불어 혈당과 혈장 insulin의 양, 그리고 혈청내 IGF-I 및 간조직내 GH binding sites의 감소가 동반되는 것으로 보고하였다 (16-18). 이와 같은 결과들은 영양실조뿐만 아니라 신경성 식욕부진 (anorexia nervosa), 만성소화 장애증(celiac disease) 및 인체 면역결핍 바이러스에 감염된 어른 환자와 염증성 bowel disease을 가진 어린이 환자들에게서 보고된 혈청내 IGF-I 농도의 감소(8)와 함께 혈청내 IGF-I의 농도는 섭취한 에너지의 양과 밀접한 관련이 있음을 시사하며, 임상적으로 혈청 IGF-I의 양이 환자의 영양 상태를 알 수 있는 유용한 indicator로서의 역할을 할 수 있게 한다.

절식시킨 간 조직에서 IGF-I mRNA양의 변화

쥐 간조직의 total RNA와 IGF-I antisense Riboprobe를 hybridization하고 RNase protection 분석을 하여 절식시켰을 때의 IGF-I mRNA의 양을 측정하였다. IGF-I mRNA는 exon 1과 2에 의하여 encode되고 서로 다른 promoters에 의하여 발현이 조절되는 두 개의 alternative 5'-untranslated regions 중 하나를 가지고 있다(19). Figure 1에 나타나 있듯이 간 조

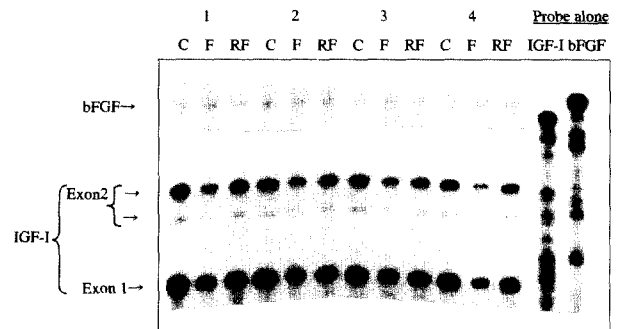


Figure 1. A solution hybridization/RNase protection assay was performed using an IGF-I antisense Riboprobe as described in Materials and Methods. Total RNA(20 μ g) from liver of control (C), 4-d fasting (F) and 2-d refeeding (RF) rats or probe alone was used in the assay. The autoradiogram used in this figure represents 1 day exposure for IGF-I and 1 week for bFGF. Numbers are four different sets of experiments.

직에서 exon 1이나 exon 2를 가지고 있는 IGF-I mRNA이 발현되었다. IGF-I mRNA의 두가지 variants의 양은 절식에 의하여 둘 다 감소하였고, 절식시켰던 쥐를 refeeding시켰을 때 정상으로 다시 회복되는 양상을 보였다. 이것은 절식으로 인한 혈청내 IGF-I의 감소가 혈청 IGF-I의 주요한 공급처인 간 조직내 IGF-I mRNA양의 감소로 기인된 것임을 뒷받침해 주며, northern blot 분석을 한 다른 연구자들의 보고와 일치하는 결과이다(18,20). Angiogenic factor로서 잘 알려져 있는 염기성 섬유모세포 성장요소 (basic fibroblast growth factor; bFGF)는 당뇨병에 걸린 쥐의 눈에서 높게 발현되었지만(21), 절식시킨 간 조직에서는 대조군과 유의 있는 차이를 보이지 않았다(Figure 1).

Figure 2는 골격근 조직에서 분리한 total RNA를 IGF-I 및 bFGF antisense Riboprobe들과 hybridization하고 RNase protection 분석을 한 결과를 보여 주고 있다. 심장근과 뇌 조직에서 관측된 것처럼 exon 1을 가지고 있는 IGF-I mRNA의 variant만이 발현되어 이전의 연구들(13,19)과 일치하였으며, 절식에 의하여 그 양이 대조군보다 감소되었다. 그러나 bFGF의 mRNA 양은 오히려 대조군에 비해 증가된 것으로 나타나 절식에 의한 대사 변조시 bFGF의 발현이 조직에 따라 다르게 조절되고 있음을 암시한다.

절식시킨 간 조직에서 감소된 IGF-I mRNA 발현의 조절 수준

Figure 3A는 IGF-I mRNA의 양에 대한 절식의 효과가 전사수준에서 일어나는지를 조사하기 위하여 가장 직접적인 방법인 nuclear run-on 분석을 하여 얻은 결과이다. IGF-I mRNA의 양이 간에서 가장 많고, 절식시킨 동물의 간에서 가장 급격하게 변화하므로(9) 이 실험을 위하여 간조직을 이

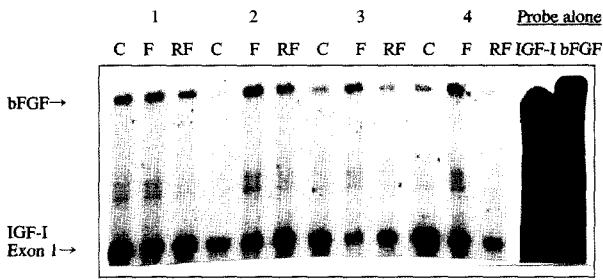


Figure 2. A solution hybridization/RNase protection assay was performed using an IGF-I antisense Riboprobe as described in Materials and Methods. Total RNA(20 µg) from muscle of control (C), 4-d fasting (F) and 2-d refeeding (RF) rats or probe alone was used in the assay. The autoradiogram used in this figure represents 1 week exposure for IGF-I and bFGF. Numbers are four different sets of experiments.

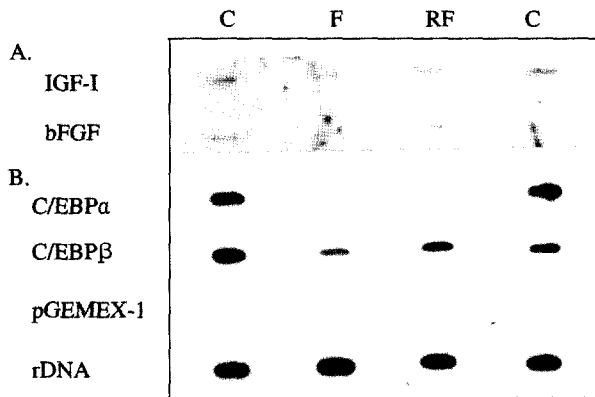


Figure 3. Transcriptional patterns of IGF-I and bFGF genes during the fasting. Nuclear run-off transcriptional analyses from rat liver are shown. The cDNA clones corresponding to the genes indicated on the left were used to hybridized to labeled nascent nuclear RNA. Control animals are denoted as C, 4-d fasting animals as F, and 2-d refeeding animals as RF. Ribosomal RNA genes (rDNA) were included as internal control. The autoradiographs shown in panels A and B were exposed for 2 days and 6 hours, respectively.

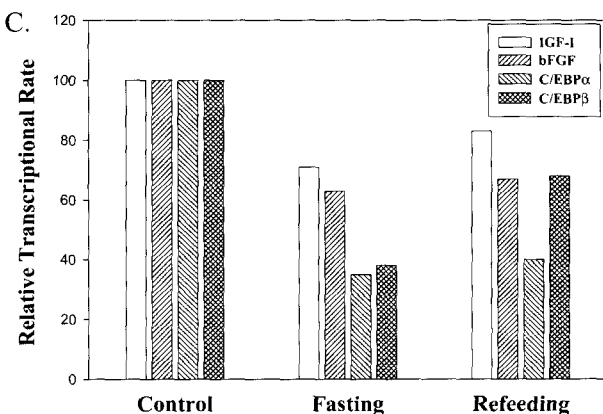


Figure 3C. Bar graphs representing relative transcriptional rates of IGF-I and bFGF genes. Values are the relative levels of each gene compared to the level of rDNA shown in Figure 3B. Relative value of control for each gene was defined as 100.

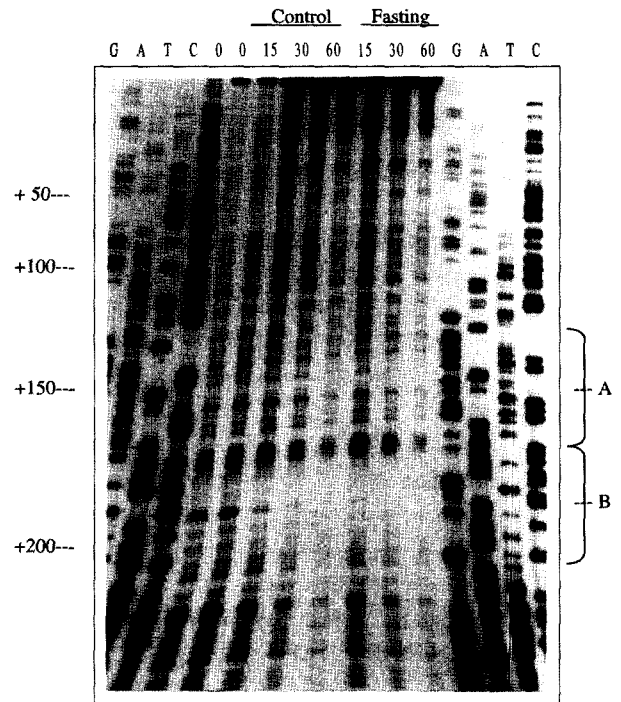


Figure 4. DNase I footprinting of the 5' flanking region and exon 1 of IGF-I was performed using liver nuclear proteins from control or 4-d fasting rats. The DNA fragment used range from -98 to +301. The coding strands are shown. The noncoding strand showed a similar protection pattern. Labeled DNA fragments were incubated with rat liver nuclear protein (µg) in the presence of 4000 ng of nonspecific poly(dI-dC). Lanes G, A, T, and C indicate Dideoxy sequencing reactions of the probe DNA and two O lanes contain no nuclear protein added but only labeled DNA probe. A and B refers to the protected regions. Numbers of the left side indicate nucleotides downstream (+) of the site of transcription initiation.

용하였다. 절식에 의하여 간 조직에서 IGF-I mRNA의 양이 감소되는 것은 전사기전에 의한 것이라는 보고(19)와 일치하게도 전사율이 절식에 의하여 29% 감소하였으며, 감소된 전사율이 refeeding으로 다시 정상으로 회복되는 것으로 나타났다. 염기성 FGF 및 전사인자들인 C/EBP α 및 C/EBP β의 전사율도 절식으로 인하여 감소하였다가 refeeding으로 회복되는 양상을 보여 주었다 (Figure 3B. and 3C.).

IGF-I exon 1의 downstream sequences와 단백질의 binding

IGF-I 유전자의 발현과 대사조절에 관여하는 핵단백질의 결합부위를 찾기 위하여 DNase I footprinting 분석을 시행하였다. 대조군과 절식시킨 실험군의 간조직에서 분리한 핵 추출물을 ³²P로 end-label시킨 -18에서 +301까지의 DNA probe와 incubation시켰다. Figure 4에서 보듯이 +179와 +210 사이의 29-base sequence인 5'-CAGATAGAGCCTGCGCAATCGA AATAAG-3'가 coding strand에서 DNase I에 의한 digestion으로부터 보호되었다(region B). +179와 +210 사이의 뚜렷한 footprint이외에 +143과 +178사이의 두 번째 36-base sequence도 미미하지만 DNase I digestion으로부터 보호되었

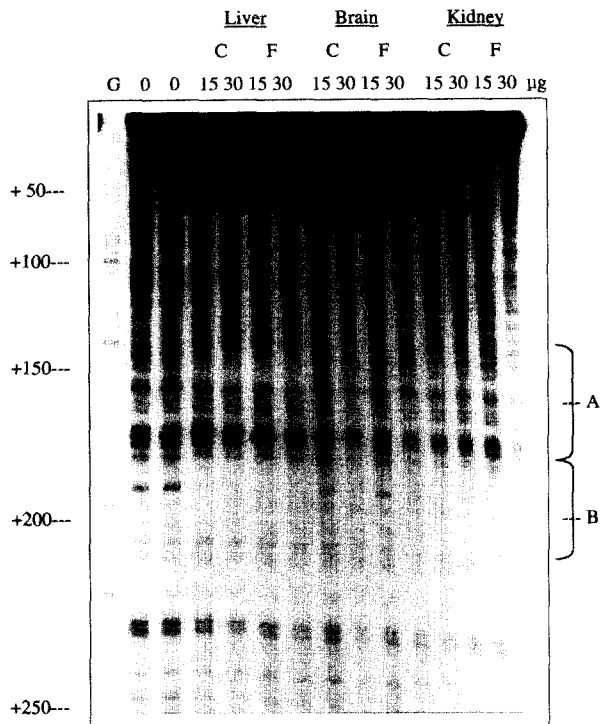


Figure 5. DNase I footprinting of the 5' flanking region and exon 1 of IGF-I was performed using liver, brain, and kidney nuclear proteins from control or 4-d fasting rats. The DNA fragment used range from -98 to +301. The coding strands are shown. The noncoding strand showed a similar protection pattern. Labeled DNA fragments were incubated with rat liver, brain, or kidney nuclear protein in the presence of 4000 ng of nonspecific poly(dI-dC). Lane G indicates Maxam-Gilbert chemical cleavage reactions of the probe DNA. A and B refers to the protected regions. Numbers on the left side indicate nucleotides downstream (+) of the site of transcription initiation. Control animals are denoted as C and 4-d fasting as F.

다(region A). 절식시킨 간에서 얻은 핵 추출물내 전사인자들의 binding을 대조군과 비교했을 때 region A와 B 둘 다에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 이러한 사실은 급성기 반응동안 acute-phase responsive element에 결합하는 multiple C/EBP isoform들, 즉 C/EBP α 와 C/EBP β 의 교환작용에 의하여 AGP-1 유전자의 발현이 조절되는 것(22)과 유사한 기전에 의하여 조절될 가능성이 있음을 시사해 준다. 사실상 29-base sequence를 면밀히 조사해 보니 핵단백질 결합과 전사활성에 필수적인 core octameric sequence인 5'-CGCAATCG-3'가 존재하며(24), C/EBP β 에 대한 consensus binding site인 T(T/G)NNGNAA (G/T)가 포함되어 있다(22). 또한 쥐의 prolactin 유전자에서 확인된 AAATAAA silencer motif도 존재하고 있으므로(25), region B에는 C/EBP family의 전사인자들을 포함한 여러 다른 전사인자들의 binding sites 뿐만 아니라 IGF-I의 전사활성에 영향을 줄 수 있는 silencer가 있어서 IGF-I 유전자의 발현 조절에 region B가 중요한 역할을 할 것으로 제시하고 있다.

IGF-I의 5'-untranslated region이 조직 특이하게 조절되어 RNase protection 분석결과 322, 297 및 241 bp의 크기가 다른 transcripts가 간 조직에서 발현되었고, 뇌와 근육조직에서

는 241 bp의 transcript만이, 그리고 신장과 폐 조직에서는 322와 241 bp의 transcripts가 발현되므로(19 and Figure 1), 간 조직 이외의 뇌 및 신장 조직에서도 핵 추출물을 분리하여 DNase I protection 분석을 하였다(Figure 5). DNase I의 digestion으로부터 보호된 region A와 B가 뇌 및 신장의 핵 추출물내 factors에 의해서도 관측되었으며, 절식에 의하여 IGF-I의 mRNA 양이 대조군에 비하여 감소함에도 불구하고(Figure 1) 대조군과 절식시킨 실험군간의 foot-printing 양상은 크게 변화하지 않았다. Region B는 간조직의 핵추출물 15 μ g에 의하여 보호되었으며 뇌조직의 핵추출물은 훨씬 덜 유효하게 30 μ g을 사용하였을 때 보호되었다. 이러한 사실은 region B에 결합하는 전사인자들이 간 조직에 풍부하게 존재하고 있음을 암시하고 있다.

사람을 포함한 쥐 및 물고기의 IGF-I 유전자의 5'-flanking 지역 및 exon 1내의 sequences에는 주요한 promoter가 있는 것으로 알려져 있지만(7,15), exon 1의 5'-flanking 지역에는 TATAA 및 CAAT box를 포함한 proximal transcriptional control elements가 없다(20). Proximal promoter 지역에 TATAA box가 없는 것과 일치하게도 exon 1을 가지고 있는 IGF-I mRNA에서 다수의 전사 개시 부위가 밝혀졌으나 여러 다른 전사개시 부위의 이용을 조절하는 요인들은 명백하지 않다. 이와 같이 TATAA-less promoters의 전형적인 특성을 가지고 있음에도 불구하고 TATAA-less promoters와는 달리 GC가 풍부한 SP1 결합부위가 없기 때문에 쥐의 IGF-I 유전자의 주요 promoter는 비교적 특이하다(23).

이러한 IGF-I promoter의 활성화는 glucocorticoid를 비롯한 epidermal growth factor나 platelet-derived growth factor, prostaglandin A2, prostaglandin E2와 같은 여러 ligand들에 의해서 조절되며(26-29) IGF-I의 promoter내에 있는 cis-acting element에 C/EBP δ 나 hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF-1 α)가 결합하므로써 IGF-I promoter가 transactivation되는 것으로 보고하였다(24,30). 그러나 IGF-I의 활성화에 exon 1의 downstream sequence들이 미치는 영향을 보고한 연구는 거의 없는 실정이다. 다만 streptozotocin으로 당뇨병을 일으킨 쥐의 경우, IGF-I exon 1의 downstream sequence에 IGF-I 유전자의 발현조절에 관여할 것으로 추정되는 cis-acting element가 있으며(2), 여기에 결합하는 전사인자에 대하여는 아직 characterization이 되지 않았다.

결론적으로 본 실험에서는 절식으로 대사를 변조시켰을 때 조직내 IGF-I mRNA양의 감소가 IGF-I 유전자의 전사를 감소에 의한 것임을 확인하였고, 절식에 의하여 감소된 IGF-I 유전자의 발현을 조절하는 sequences가 IGF-I 유전자의 주요한 전사개시부위로부터 downstream에 존재한다는 것을 보여 주었으며, 이 downstream sequence에는 간 조직에 풍부한 C/EBP family의 전사인자들을 포함한 여러 전사인자(들)이 결합할 것으로 제시하고 있다.

요 약

Insulin-like growth factor-I(IGF-I)은 성장호르몬의 여러 가지 성장촉진 작용을 매개하는 분열 유발성 폴리펩티드이며, 조직의 수선과 재생, 창상치유 및 골대사와 같은 과정들에서

중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 비교적 여러 조직에서 발현되고 있는 IGF-I 유전자의 전사조절에 대한 정확한 분자적 기전과 호르몬 및 대사 상태가 그것을 어떻게 조절하는지 아직 밝혀져 있지 않다.

쥐를 절식시키므로써 대사 상태를 변조시켰을 때, 간 조직 내 IGF-I mRNA의 발현에 미치는 절식의 영향을 살펴보기 위하여 solution hybridization/RNase protection 방법으로 분석하였다. IGF-I의 exon 1 및 exon 2에 의하여 encode된 transcripts 모두가 감소된 결과를 얻었고, 이러한 감소는 전사 수준에서 일어난 것으로 nuclear run-on 분석에 의하여 확인하였다. 또한 절식시킨 쥐에서 IGF-I mRNA의 양을 조절하는 cis-acting elements를 IGF-I 유전자의 5'-flanking 지역과 exon 1과 exon 2에서 밝히고자 절식시킨 쥐의 신선한 간조직에서 핵 추출물을 얻어 IGF-I의 여러 가지 DNA fragments와 반응시켜 DNase I protection 분석을 한 결과, IGF-I 유전자의 주요한 전사 개시점으로부터 downstream에 있는 sequences가 절식으로 변조시킨 대사상태에서 IGF-I의 발현 조절에 중요하며 이곳에는 전사인자인 C/EBP family의 isoform들을 포함한 간조직에 풍부하게 존재하는 여러 전사인자들이 결합할 것으로 제안하였다.

감 사

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되어 이루어졌으므로 이에 감사드립니다. 또한 IGF-I 유전자의 5'-flanking region 및 exon 1과 bFGF DNA를 제공하여 주신 Dr. W. L. Lowe, Jr. (Northwestern University Medical School, Chicago, U.S.A.)에게 감사드립니다.

REFERENCES

- Rotwein, P. (1991), Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II, *Growth Factors*, **5**, 3-18.
- Pao, C. I., J.-I. Zhu, D. G. Robertson, K.-w. M. Lin, P. K. Farmer, S. Begovic, G.-j. Wu, and L. S. Phillips (1995), Transcriptional regulation of the rat insulin-like growth factor-I gene involves metabolism-dependent binding of nuclear proteins to a down stream region, *J. Biol. Chem.* **270**, 24917-24923.
- Lowe, W. L. (1991) In: *Insulin-Like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects* (LeRoith, D., ed.), pp. 49-85, CRC press, Boca Raton.
- Cohick, W. S. and D. R. Clemmons (1993), The insulin-like growth factors, *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 131-153.
- Lamothe, B., A. Baudry, P. Desbois, L. Lamotte, D. Bucchini, P. De Meyts, and R. L. Joshe (1998), Genetic engineering in mice : impact on insulin signalling and action, *Biochem. J.* **335**, 193-204.
- Dor, S., S. Kar, and R. Quirion (1997), Rediscovering an old friend, IGF-I: potential used in the treatment of neurodegenerative diseases, *Trends Neurosci.* **20**, 326-331.
- Mittanck, D. W., S. W. Kim, and P. Rotwein (1997), Essential promoter elements are located within the 5' untranslated region of human insulin-like growth factor-I, *Mol. Cell. Endocrinol.* **126**, 153-163.
- Thissen, J. P., J. M. Ketelslegers, and L. E. Underwood (1994), Nutritional regulation of the insulin-like growth factors, *Endocrine Rev.* **15**, 80-101.
- Lowe, W. L., M. L. Adamo, H. Werner, C. T. Roberts Jr. and D. LeRoith (1989), Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor : effects on gene expression and binding, *J. Clin. Invest.* **84**, 619-626.
- Hayden, J. M., N. W. Marten, E. J. Burke, and D. S. Straus (1994), The effect of fasting on insulin-like growth factor-I nuclear transcript abundance in rat liver, *Endocrinol.* **134**, 760-768.
- An, M. R., C.-C. Hsieh, P. D. Reisner, J. P. Rabek, S. G. Scott, D. T. Kuninger, and J. Papaconstantinou (1996), Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBP α and C/EBP β isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response, *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2295-2306.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* **162**, 456-459.
- Shoba, L., M. R. An, S. J. Frank, and W. L. Lowe (1999), Developmental regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression, *Mol. Cell. Endocrinol.* **152**, 125-136.
- Bradford, M. M. (1976), a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- An, M. R. and W. L. Lowe (1995), The major promoter of the rat insulin-like growth factor-I gene binds a protein complex that is required for basal expression, *Mol. Cell. Endocrinol.* **114**, 77-89.
- Ziegler, T. R., A. Almahfouz, M. T. Pedrini, and R. J. Smith (1995), A comparison of rat small intestinal insulin and insulin-like growth factor I receptors during fasting and refeeding, *Endocrinol.* **136**, 5148-5154.
- Fedele, M. J., T. C. Vary, and P. A. Farrell (2001), Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle selected contribution: IGF-I antibody prevents increases in protein synthesis in epitrochlearis muscles from refeed, diabetic rats, *J. Appl. Physiol.* **90**, 1166-1173.
- Zhang, J., R. E. Whitehead, and L. E. Underwood (1997), Effect of fasting on insulin-like growth factor (IGF)-IA and IGF-IB messenger ribonucleic acids and prehormones in rat liver, *Endocrinol.* **138**, 3112-3118.
- Lowe, W. L., C. T. Roberts, S. R. Lasky, and D. LeRoith (1987), Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8946-8950.
- Straus, D. S., and C. D. Takemoto (1990), Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver, *Mol. Endocrinol.* **4**, 91-100.
- Lowe, W. L., R. Z. Florkiewicz, M. A. Yorci, R. G. Spanheimer, and B. N. Albrecht (1995), Regulation of growth factor mRNA levels in the eyes of diabetic rats, *Metabolism*, **44**, 1038-1045.
- Alam, T., M. R. An, R. C. Mifflin, C.-C. Hsieh, X. Ge, and J. Papaconstantinou (1993), trans-Activation of the α 1-acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid

23. Hall, L. J., Y. Kajimoto, D. Bichell, S.-W. Kim, P. L. James, D. Counts, L.J. Nixon, G. Tobin, and P. Rotwein (1992), Functional analysis of the rat insulin-like growth factor I gene and identification of an IGF-I gene promoter, *DNA Cell Biol.* **11**, 301-313.
24. Umayahara, Y., C. Ji, M. Centrella, P. Rotwein, and T. L. McCarthy (1997), CCAAT/enhancer-binding protein δ activates insulin-like growth factor-I gene transcription in osteoblasts. Identification of a novel cyclic AMP signaling pathway in bone, *J. Biol. Chem.* **272**(50), 31793-31800.
25. Zhang, Z.-H., V. Kumar, R. T. Rivera, J. Chisholm, and D. K. Biswas (1990), Cis-acting negative regulatory element of prolactin gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 4785-4788.
26. Delany, A. M. and E. Canalis (1995), Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells, *Endocrinol.* **136**, 4776-4781.
27. Li, S. and R. Baserga, (1996), Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor regulate the activity of the insulin-like growth factor I gene promoter, *Exp. Gerontol.* **31**, 195-206.
28. Bui, T., C. Kuo, P. Rotwein, D. S. Straus (1997), Prostaglandin A2 specifically represses insulin-like growth factor-I gene expression in C6 rat glioma cells. *Endocrinol.* **138**, 985-993.
29. Thomas, M. J., Y. Umayahara, H. Shu, M. Centrella, P. Rotwein, and T. L. McCarthy (1996), Identification of the cAMP response element that controls transcriptional activation of the insulin-like growth factor-I gene by prostaglandin E2 in osteoblasts, *J. Biol. Chem.* **271**, 21835-21841.
30. Nolten, L. A., P. H. Steenbergh, and J. S. Sussenbach (1995), Hepatocyte nuclear factor 1 α activates promoter I of the human insulin-like growth factor I gene via two distinct binding sites, *Mol. Endocrinol.* **9**, 1488-1499.