

흰쥐 간장에 있어서 아실-CoA 합성효소4의 기능연구*

정영희 · 문승주 · 강만종[§]

전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부, 생물공학연구소, 농업과학기술연구소

Functional Studies of Acyl-CoA Synthetase 4 in the Rat Liver*

Jeong, Young Hee · Moon, Seung Ju · Kang, Man Jong[§]

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science,
Biotechnology Research Institute, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

Acyl-CoA synthetase 4 (ACS4) is an arachidonate-preferring enzyme abundant in steroidogenic tissues. We examined ACS4 in rat liver, which contains a variety of pathways that use acyl-CoAs, in order to determine subcellular locations. We demonstrate that ACS4 protein was present most abundantly in the mitochondria and to a much lesser extent in the peroxisomes and microsomes. To determine the dietary effects on the level of ACS4 mRNA, northern blotting was carried out using total RNA from the livers of adult male rats fed various diets. Fasting, high fat diet, and fat-free high sucrose diet increased the hepatic level of ACS4 mRNA approximately 2-fold. Furthermore, the levels of ACS4 mRNA were induced by DEHP[Di-(2-ethylhexyl) phthalate]. These data suggest that ACS4 expression in the liver is regulated with a variety of pathways, including β -oxidation, hormone, and insulin. (*Korean J Nutrition* 36(4) : 376~381, 2003)

KEY WORDS: acyl-CoA synthetase, arachidonic acid, subcellular fractionation, northern blotting, western blotting, fasting, high fat diet, fat-free high sucrose diet, DEHP[Di-(2-ethylhexyl) phthalate].

서 론

지방산은 동물에 있어서 에너지의 저장 및 호르몬 합성, 세포내 신호전달, 세포막의 주요 구성성분 등 매우 다양한 생체 기능에 이용된다. 포유동물에서 지방산 생합성의 최종 생산물은 유리 지방산이므로 지방산은 아실-CoA 합성효소 (acyl-CoA synthetase, ACS) [EC 6.2.1.3]의 작용 없이는 대사 이용되지 못한다.^{1,2)}

아실-CoA 합성효소은 ATP존재 하에 지방산과 코엔자임 A (CoA)를 결합시켜 아실-CoA를 합성하는 효소이다. 본 효소에 의하여 생산된 아실-CoA는 미토콘드리아와 페옥시솜에서는 β -산화에 의하여 분해되어 에너지를 생산하고, 소포체에서는 트리글리세롤, 인지질과 콜레스테롤 에스터 등의 지질합성, 지방산 생합성의 피드백저해 등의 정보전달 등 광범위하게 이용되는 중요한 대사 중간체이다.

접수일 : 2003년 3월 3일

채택일 : 2003년 5월 6일

*This study was financially supported by Chonnam National University in the program, 2000.

[§]To whom correspondence should be addressed.

1990년 본 효소의 유전자가 처음으로 동정된 후 현재 까지 조직특이성과 기질 특이성이 다른 5종류의 유전자 (ACS1~5)가 보고되고 있다.^{3~7)} 이 유전자들은 구조와 기질특이성에 의하여 2가지 유형으로 분류된다. ACS1,³⁾ ACS2,⁴⁾ ACS5⁷⁾는 팔미트산 등 광범위한 포화, 불포화지방산을 기질로 이용하고 아미노산 서열은 서로간에 약 65%의 상동성을 나타내고 있다. ACS1은 주로 간장, 심장, 지방조직에서, ACS2는 뇌에서, ACS5는 소장에서 높게 발현한다. ACS3⁵⁾와 ACS4⁶⁾는 생리활성물질의 전구체인 아라키돈산과 아이코사펜타에노산을 기질로 이용하고, ACS3는 주로 뇌에, ACS4는 부신, 뇌, 간장, 정소 등 광범위한 조직에서 발현하고 있으며, 특히 스테로이드 생산조직에서 높게 발현하고 있다. ACS3와 ACS4의 아미노산 서열은 약 68%의 상동성이 있고 ACS1, ACS2, ACS5와는 약 30%의 상동성을 나타내고 있다.

또한, 아실-CoA 합성효소는 아라키돈산 대사에 있어서 중요한 역할을 수행하고 있다. 아라키돈산과 아이코사펜타에노산은 프로스타글란дин과 루코트리엔 등의 생리활성을 가진 아이코사노이드의 전구체이며, 세포막의 인지질로부터 phospholipases A2에 의하여 유리된다. 유리된 아라

기돈산의 일부분은 생리활성이 높은 프로스타글란딘과 루코트리엔으로 변환되어 염증반응, 혈소판응집, 혈관신생, 분만, 세포사 등 다양한 반응에 이용된다. 그러나 유리된 대부분의 아라기돈산은 아실-CoA 합성에 의하여 아라기도닐-CoA로 변환되고 다시 인지질로 재에스터화된다. 이러한 기능에 의하여 세포내의 아이코사노이드의 농도는 조절되는 것으로 보고되고 있다.^{8~10)} 이와 같이 아라기돈산은 생체에 있어서 중요한 지방산이며 아실-CoA 합성효소 4 (ACS4)는 아라기돈산에 대하여 매우 특이적인 친화성을 나타내는 것으로 보고되어 있다.⁶⁾ ACS4는 여러 조직에서 발현하지만 특히 부신, 난소, 고환의 steroidogenic cell에 존재하면서 HDL-콜레스테롤 에스테르를 CoA thioester로 재에스터화하는 것으로 보고하고 있다. 또한 ACS4 유전자 적중 생쥐에서는 자궁에 있어서 프로스타글란딘 생산에 관여하고, 임신 유지에 관여하는 것으로 보고하고 있다.¹¹⁾

간에서의 아실-CoA 합성효소는 기본적인 지방산 대사에 관여하는 것으로 추정되고 있으며 주로 발현되는 것이 ACS1과 ACS4로 보고되어 있다. 특히, ACS1는 미토콘드리아, 페옥시솜, 마이크로솜에 존재하고 있으며 지방산화와 합성에 관여하는 것으로 추정되고 있으나¹²⁾ 간장에 있어서 ACS4의 기능은 불분명하다. 그러므로 본 연구에서는 간장에 있어서 ACS4의 기능을 확인하기 위한 기초 실험으로써 세포내 소기관에 있어서 발현 여부와 고지방식과 저지방식, 절식한 흰쥐에서 이들 유전자의 발현 정도를 확인함으로써 음식물로부터 섭취한 지방의 이용에 관여하는지를 확인함과 동시에 페옥시솜 증식인자인 DEHP[Di-(2-ethylhexyl)phthalate]를 급여한 처리군에 있어서 ACS4가 페옥시솜 β -산화에 관여하는지 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험에 사용한 동물은 200~300 g의 수컷 Wistar 흰쥐로서 각 실험군당 6마리씩 일반적인 사양조건 12시간 점등과 12시간 소동의 조건 하에서 사육하였으며 실험 전까지 물과 일반사료 (삼양사, 쥐사료)를 무제한 급식하였다. high fat 및 fat-free 사료 급여시에는 급여전 48시간 절식시킨 후 다시 사료를 72시간 동안 급여하였고, 고지방식으로는 일반사료에 10% soybean oil을 혼합하여 급여하였으며, fat-free 사료는 69% sucrose, 20% casein, 4% mineral mixture, 2% vitamin mixture, 5% cellulose

powder를 급여하였다. 그리고 절식 처리군은 일반 사료를 급여하였으며 도살 48시간 전부터 절식을 실시하였다. 그리고 DEHP[Di-(2-ethylhexyl)phthalate] 처리군은 2%의 DEHP를 일반사료에 첨가하여 72시간 동안 급여하였다.

2. 흰쥐 간장에 있어서 Subcellular fractionation

Subcellular fractionation은 일반 사료를 급여한 흰쥐의 간장을 이용하여 Osumi와 Hashimoto의 방법에 따라 아래와 같이 실시하였다.¹³⁾

흰쥐를 도살 전 12시간 절식하였으며, 단두로 도살하여 간장을 적출하였다. 적출한 간장 10 g은 차가운 3배용량의 glycylglycine buffer [0.25M sucrose, 10 mM glycylglycine-KOH (pH7.4)]에 넣고 해부용 가위로 가늘게 절단하였다. 절단된 조직은 Potter-Elvehjem형 Teflon homogenizer로 1,300 rpm/min. 속도로 1왕복하여 균질화하였다. 이것을 1,000 \times g에서 10분 원심하고 상층 30 ml를 회수하였다. 침전은 30ml의 glycylglycine buffer를 넣고 혼탁한 후 위와 동일한 조건에서 균질화한 다음 1,000 \times g에서 6분 원심하고 상층 30 ml를 회수하였으며 앞에서 회수한 상층과 혼합하였다. 이 상층을 간장 중량의 10배 용량이 되도록 glycylglycine buffer를 첨가하였다 (전체 100 ml). 이렇게 준비된 세포 균질액을 이용하여 subcellular fractionation을 실시하였다. 먼저, 세포 균질액을 3,300 \times g에서 10분 원심한 다음 상층 A를 회수하였다. 침전은 1/10 배 용량의 glycylglycine buffer에 혼탁한 다음 3,300 \times g에서 10분 원심 후 회수된 상층은 상층 A와 혼합하였으며 침전은 20 ml의 glycylglycine buffer에 혼탁하여 무거운 미토콘드리아 분획으로 하였다. 회수된 상층 A는 25,000 \times g, 4°C에서 10분 원심 후 상층 B를 회수하였다. 침전은 5 ml의 glycylglycine buffer에 혼탁하여 위와 동일하게 원심한 후 상층을 회수하였으며 상층 B와 혼합하였다. 침전은 20 ml의 glycylglycine buffer에 혼탁하여 가벼운 미토콘드리아 분획으로 하였다. 상층 B는 70 ml Polycarbonate tube (Beckman)에 넣고 Beckman 45Ti rotor에서 105,000 \times g, 1시간 원심 후 상층을 가용성 분획으로 하고 침전은 40 ml의 glycylglycine buffer에 혼탁하여 마이크로솜 분획으로 하였다.

미토콘드리아와 페옥시솜 분획은 가벼운 미토콘드리아 분획으로부터 자당밀도구배원심분리에 의하여 아래와 같은 방법에 의하여 분획하였다.

먼저, 10 mM glycylglycine-KOH (pH7.4)을 이용하여 53.9% (W/W, 비중 1.26), 45.8% (비중 1.215), 37.4% (비중 1.17)와 23.2% (비중 1.10)의 자당용액을 제조하

였다. 이 자당용액을 backman 초원심기 tube ($1 \times 31/2$ tube)에 53.9% (7.5 ml), 45.8% (11.2 ml), 37.4% (11.2 ml)와 23.2% (7.5 ml) 순으로 중충하고 최상부에 가벼운 미토콘드리아 2 ml을 중충하였다. 이것을 SW28 rotar (Backman)에서 27,600 rpm, 4°C, 2시간 원심하였다. 원심 후 perlstatic pump를 이용하여 튜브의 밑에서부터 3 ml 씩 시료를 회수하였다. 45.8%와 53.9% 자당용액 사이에서는 페옥시솜 분획, 37.4%와 45.8% 당용액 사이에서는 미토콘드리아 분획을 분리하였다.

분리된 마이크로솜, 미토콘드리아와 페옥시솜 분획은 5 배 용량의 50 mM potassium phosphate (pH7.5)을 넣고 10,000×, 4°C에서 1시간 원심하여 침전을 회수하였다. 침전은 50 mM potassium phosphate (pH7.5), 0.5% Triton X-100 (v/v), 1 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, 20% glycerol에 혼탁하여 실험 전까지 -80°C에 보존하였다. 그리고 단백질의 농도는 Lowry 법에 따라 측정하였고 표준액으로는 bovine serum albumin을 사용하였다.¹⁴⁾

각 분획이 순수하게 분리되었는지 확인하기 위하여 마이크로솜 분획은 glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9),¹⁵⁾ 미토콘드리아 분획은 glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2),¹⁶⁾ 페옥시솜 분획은 catalase (EC 1.11.1.6)¹⁷⁾ 활성을 측정하였다.

3. Western blotting

Western blotting은 각 분획의 단백질 150 μ g을 이용하여 아래와 같이 실시하였다. 각 분획의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 PVDF membrane (Bio-Rad사)에 전이한 다음 5% 탈지유를 포함하는 PBS buffer에서 2시간 처리를 하였다. 일차 항체는 재조합 단백질을 이용하여 토끼에서 제조한 항-ACS4 폴리클로널 항체⁶⁾를 2000배 (6 μ g/ml) 회석하여 사용하였으며 실온에서 PVDF membrane에 1시간 반응을 유도하였다. 반응 후 0.1% Tween 20 (w/v)를 포함하는 PBS buffer로 15분 3회 세척한 다음 1% BSA를 포함하는 PBS에 1000배

회석된 peroxidase labelled anti-rabbit IgG (Vector 사) 2차 항체로 1시간 반응을 유도한 다음 0.1% Tween 20 (w/v)를 포함하는 PBS buffer로 15분 3회 세척하고 ECL kit (Amercham Pharmacia Biotech. Inc.)을 이용하여 단백질을 검출하였다.

4. Northern blotting

Total RNA는 흰쥐의 간장으로부터 guanidinium isothiocyanate-CsCl 법¹⁸⁾에 따라 제조하였다. Northern blotting을 위하여 15 μ g의 Total RNA를 glyoxal에 의하여 변성시키고 1.5% 아가로즈 젤에서 전기영동한 다음 zeta-probe membrane (Bio-Rad 사)에 전이시켰다. Membrane은 5×SPE, 5×enhardt's, 1% SDS (w/v), 50% formamide (w/v)을 포함하는 용액에서 42°C, 15시간 hybridization을 실시하였다. Probe는 rat ACS4/SmaI-XbaI, 1897 bp의 DNA 단편을 BcaBEST labelling kit (Takara 사)와 [α -32P]dCTP (110TBq/mmol, Amer-sham 사)를 이용하여 제조하였다. membrane은 hybridization 후 0.2%SSC, 0.1%SDS (w/v)에서 68°C, 30분, 3회 세척한 다음 autoradiography를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 흰쥐 간장에 있어서 Subcellular fractionation

흰쥐 간장에서 subcellular fractionation을 실시한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 marker enzyme의 활성을 각 세포내 소기관에 따라 특이적으로 나타났다. 미토콘드리아의 marker enzyme인 glutamate dehydrogenase은 미토콘드리아에서 $1.37 \pm 0.08 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 이었고 페옥시솜과 마이크로솜에서는 각각 $0.33 \pm 0.02 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 와 $0.07 \pm 0.01 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 로 미토콘드리아에서가 페옥시솜과 마이크로솜보다 약 4.1배 및 약 19.5배 높은 활성을 나타내었다. 페옥시솜 marker enzyme인 catalase의 활성은 미토콘드리아, 페옥시솜, 마이크로솜에서 각각

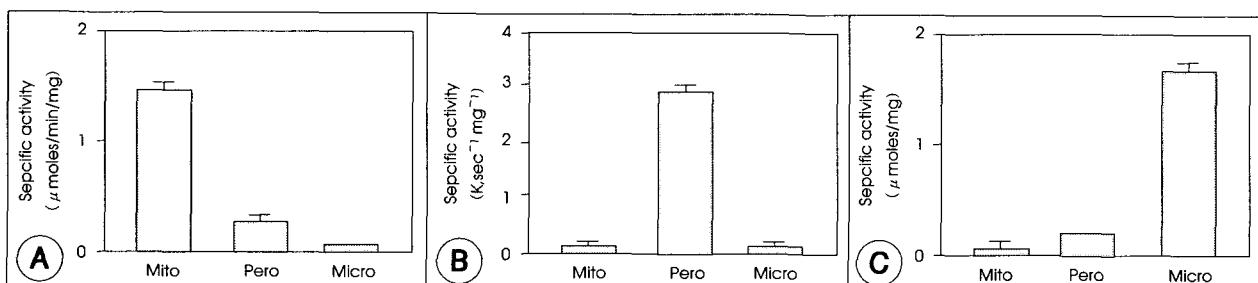


Fig. 1. Subcellular distribution of marker enzyme activities. Liver homogenates were fractionated with mitochondria (Mito), peroxisomes (Pero) and microsomes (Micro) as described by Osumi and Hashimoto¹³⁾. Glutamate dehydrogenase (A), catalase (B), and glucose-6-phosphate (C) activities were detected with marker enzymes.

$0.09 \pm 0.03 \text{ k.sec}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $3.02 \pm 0.04 \text{ k.sec}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $0.08 \pm 0.01 \text{ k.sec}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 으로 페옥시솜에서 가장 높은 활성을 나타내어 미토콘드리아보다 약 33.5배, 마이크로솜보다 약 37.7배 높았다. 그리고 마이크로솜의 marker enzyme인 glucose-6-phosphatase의 활성은 마이크로솜에서가 $1.47 \pm 0.09 \mu\text{mole}/\text{mg}$ 으로 가장 높았으며, 미토콘드리아와 페옥시솜에서는 각각 $0.10 \pm 0.04 \mu\text{mole}/\text{mg}$ 와 $0.25 \pm 0.01 \mu\text{mole}/\text{mg}$ 로서 마이크로솜보다 현저하게 낮았다.

이러한 결과를 보면 미토콘드리아에서 사용한 marker enzyme의 활성은 Lai 등¹⁹⁾과 Miyazawa 등²⁰⁾의 결과와 유사한 결과로서 미토콘드리아가 정상적으로 분리되었음을 나타내고 있다. 그리고 페옥시솜 marker enzyme의 결과는 Stefan 등²¹⁾과 Miyazawa 등²⁰⁾의 결과와 같이 페옥시솜에서 특이적으로 활성을 나타내었다. 또한 마이크로솜에서는 glucose-6-phosphatase의 활성이 가장 높았는데 이와 같은 결과는 Duve 등²²⁾의 결과와 동일한 것으로 본 연구방법에 의하여 세포내 소기관의 분리는 매우 정상적으로 되었음을 나타내고 있다.

2. 미토콘드리아, 페옥시솜, 마이크로솜에 있어서 아실-CoA 합성효소4의 발현

ACS1은 팔미트산을 기본으로 광범위한 포화·불포화지방산을 기질로 이용하고 흰쥐 간장의 마이크로솜, 미토콘드리아와 페옥시솜에 존재하는 것으로 보고하고 있으며¹²⁾ Lewin 등²³⁾은 ACS1이 소포체와 미토콘드리아 결합막 (mitochondria-associated membrane)에 존재하고 ACS4는 미토콘드리아 결합막과 페옥시솜에 존재하는 것으로 보고하고 있다. 그러나 본 연구에서 흰쥐 간장으로부터 미토콘드리아, 페옥시솜, 마이크로솜을 subcellular fractionation하고 ACS4 항체를 이용하여 western blotting을 실시한 결과 ACS4 단백질은 흰쥐 간장의 미토콘드리아, 페옥시솜, 마이크로솜에서 모두 존재함이 확인되었으며 그 발현양은 미토콘드리아에서 가장 높았으며 그 다음은 마이크로솜, 페옥시솜의 순이었다 (Fig. 2).

일반적으로 아실-CoA 합성효소에 의하여 생산된 아실-CoA는 미토콘드리아와 페옥시솜에서는 β -산화에 의하여 분해되어 에너지를 생산하고, 소포체에서는 트리글리세롤, 인지질과 콜레스테롤 에스터 등의 지질합성 등에 이용된다.²⁴⁾ 아라키돈산은 성장인자나 인슐린과 같은 호르몬이 수용체에 결합하면 phospholipase A2의 작용에 의하여 세포막의 인지질로부터 분리되고 유리된 아라키돈산의 일부는 생체에 있어서 다양한 기능을 수행하는 아이코사노이

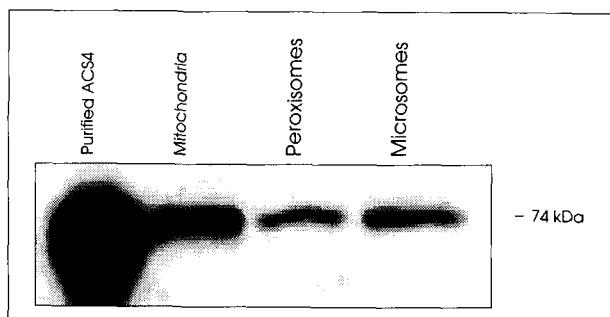


Fig. 2. Location of ACS4 protein in rat liver subcellular fractions. $150 \mu\text{g}$ of the mitochondria, peroxisomes, and microsomes protein were subjected to electrophoresis on an 8% SDS-polyacrylamid gel and transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad). For chemiluminescent detection, the immunoreactive bands were visualized by incubating the membrane with anti-rat ACS4 antibody and a chemiluminescence detection system as described in the materials and methods.

드를 합성한다. 그러나 아이코사노이드로 변환되는 아라키돈산은 5%이하로 대부분은 아실-CoA 합성효소에 의하여 인지질로 재에스테르화된다.²⁵⁾ 그리고 ACS4는 여러 포화불포화지방산 중에 아라키돈산에 대하여 매우 높은 기질 특이성을 나타내는 것으로 Kang 등⁶⁾은 보고하였다. 또한 Waku²⁴⁾의 보고에 의하면 흰쥐 간장에 있어서 페옥시솜과 미토콘드리아에 있어 아라키돈산에 대한 아실-CoA 합성효소의 활성은 팔미트산에 대한 활성보다 약간 적으로 것으로 보고하고 있지만 이 것은 페옥시솜과 미토콘드리아에 아라키돈산 특이적인 아실-CoA 합성효소가 존재할 가능성을 나타내고 있다. 또한 흰쥐 간장의 마이크로솜에는 아라키돈산과 같은 불포화지방산에 특이적인 아실-CoA 합성효소가 존재할 가능성이 보고되고 있다.^{26,27)} 이러한 결과를 종합적으로 고찰해보면 각 세포내 소기관에 있어서 ACS4의 자세한 기능연구가 수행되어야 하지만 ACS4는 ACS1과 마찬가지로 흰쥐 간장의 마이크로솜, 미토콘드리아와 페옥시솜에 존재하는 것으로 추측된다.

3. 음식물이 아실-CoA 합성효소 4 mRNA의 발현에 미치는 영향

High fat diet와 fat-free high sucrose diet를 급여한 흰쥐 간장에 있어서 ACS1과 ACS5는 mRNA의 발현이 조절되는 것으로 보고되었다. Suzuki 등³⁾의 보고에 의하면 ACS1은 48시간 절식한 후 high fat diet와 fat-free high sucrose diet을 다시 급여하면 간장에 있어서 mRNA의 발현이 증가하며, ACS5의 mRNA 발현은 절식하였을 때 약 50%, high cholesterol을 급여하였을 때는 약 60%의 발현이 감소하였고 fat-free high sucrose diet을 급여하였을 때는 ACS1과 마찬가지로 증가하였다고 Oikawa 등⁷⁾은 보고하고 있다. 본 연구에서 ACS4는 절식하였을 때와

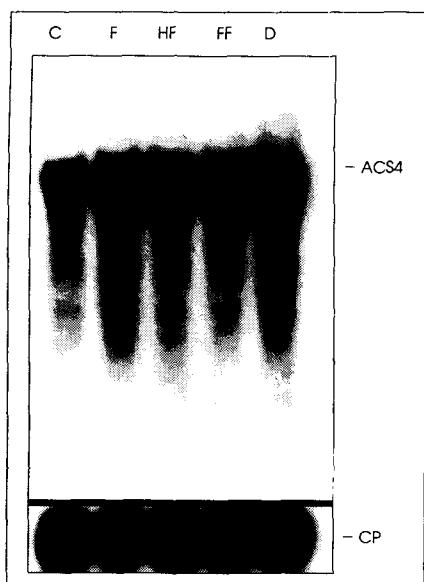


Fig. 3. Dietary effects on the hepatic ACS4 mRNA levels. Total hepatic RNA from rats ($n = 6$) fed the control diet (C), fasted (F), high fat (HF), fat-free high sucrose (FF), and DEHP diets were subjected to Northern blot analysis with rat ACS4 cDNA (upper panel) as described in the materials and methods. The same samples were subsequently hybridized with a control probe for rat cyclophilin (CP) cDNA probe (lower panel).

high fat diet, fat-free high sucrose diet을 급여하였을 때는 대조군에 비하여 2.3배 mRNA의 발현이 증가하였으며 DEHP를 급여하였을 때는 3.9배 mRNA의 증가를 나타내었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 ACS1과 ACS5와 다른 현상으로 ACS4는 간장에 있어서 다양한 기능을 수행하는 것으로 생각된다. fat-free high sucrose diet을 급여하였을 때 mRNA의 증가는 ACS5와 같이 혈액내 인슐린의 양이 간장에 있어서 ACS4의 mRNA의 발현양을 조절하는 것으로 추측되며 acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase gene과 같은 여러 lipogenic gene들도 인슐린에 의하여 조절되고 있음을 보고하고 있다.^{28,29)} 또한 아라키돈산은 세포막을 구성하는 지방산의 약 40%를 차지하고³⁰⁾ adrenocorticotrophic hormone에 의하여 아라키돈산에 의한 세포내 신호전달이 시작되는 것으로 알려지고 있다.³¹⁾ 절식은 ACTH, forskolin, forskolin-stimulated cAMP 양을 증가시키며, P450 scc, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 21-hydroxylase, 11beta-hydroxylase와 같은 steroidogenic enzyme의 활성을 높인다고 Chang³²⁾은 보고하고 있다. ACS4는 Cho 등³³⁾의 보고에 의하면 ACTH, forskolin과 bd-cAMP에 의하여 그 mRNA의 발현은 증가된다고 보고하였다. 그러므로 본 실험의 절식 처리군에서는 이와 같은 영향에 의하여 ACS4의 mRNA 발현은 증가한 것으로 생각된다. 그리고 PPAR α activator인 gemfibrozol을 처리

한 흰쥐의 페옥시솜에서는 ACS1과 같이 ACS4의 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있으며 이러한 현상은 페옥시솜에 있어서 β -산화의 증가에 의한 것이라고 보고하고 있다.^{34,35)} 본 연구에서도 페옥시솜 증식인자인 DEHP [Di-(2-ethylhexyl)phthalate]을 처리한 간장에서 ACS4의 mRNA의 발현은 4배 증가하였으며 페옥시솜에서의 β -산화도 증가한 것으로 생각된다.

요약

본 연구에서는 흰쥐 간장에 있어서 아실-CoA 합성효소 4의 세포내 소기관의 존재 여부를 확인함과 동시에 fasting, high fat diet, fat-free high sucrose diet, 페옥시솜 증식 인자인 DEHP [Di-(2-ethylhexyl)phthalate]를 급여한 흰쥐 간장에 있어서 ACS4의 발현에 대하여 조사하였다. ACS4는 ACS1과 마찬가지로 흰쥐 간장의 마이크로솜, 미토콘드리아와 페옥시솜에 존재하는 것으로 생각되며 미토콘드리아에서 가장 많은 단백질이 검출되었다. ACS4 mRNA는 절식하였을 때와 high fat diet, fat-free high sucrose diet을 급여하였을 때는 대조군에 비하여 2.3배 발현이 증가하였으며 DEHP를 급여하였을 때는 3.9배 mRNA의 증가를 나타내었다. 이러한 결과를 종합하여 보면 간장에 있어서 ACS4는 기본적인 β -산화뿐만 아니라 호르몬에 의한 조절과 간접적으로는 인슐린에 의한 조절도 받는 것으로 생각되며 다양한 기능을 수행하고 있음을 추측할 수 있다.

Literature cited

- Burton DN, Haavik AG, Porter JW. Comparative studies of the rat and pigeon fatty acid synthetase. *Arch Biochem Biophys* 126: 141-145, 1968
- Kumar S. Functional deacylases of pigeon liver fatty acid synthetase complex. *J Biol Chem* 250: 5150-5185, 1975
- Suzuki H, Kawarabayasi Y, Kondo J, Abe T, NishiKawa K, Kimura S, Hashimoto T, Yamamoto T. Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 265: 8681-8685, 1990
- Fujino T, Yamamoto T. Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. *J Biochem* 111: 197-203, 1992
- Fujino T, Kang M, Suzuki H, Iijima H, Yamamoto T. Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3. *J Biol Chem* 271: 16748-16752, 1996
- Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H, Yamamoto T. A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal,

- ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2880-2884, 1997
- 7) Oikawa E, Iijima H, Suzuki T, Sasano H, Sato H, Kamataki A, Nagura H, Kang MJ, Fujino T, Suzuki H, Yamamoto TT. A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J Biochem* 124(3): 679-685, 1998
- 8) Lin L-L, Lin AY, Knopf JL. Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6147-6151, 1992
- 9) Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72(2): 269-278, 1993
- 10) Majerus PW, Prescott SM, Hofmann SL, Neufeld EJ, Wilson DB. Uptake and release of arachidonate by platelets. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 11: 45-52, 1983
- 11) Cho YY, Kang MJ, Sone H, Suzuki T, Abe M, Igarashi M, Tokunaga T, Ogawa S, Takei YA, Miyazawa T, Sasano H, Fujino T, Yamamoto TT. Abnormal uterus with polycysts, accumulation of uterine prostaglandins, and reduced fertility in mice heterozygous for acyl-CoA synthetase 4 deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 284(4): 993-997, 2001
- 12) Miyazawa S, Hashimoto T, Yokota S. Identity of long-chain acyl-coenzyme A synthetase of microsomes, mitochondria, and peroxisomes in rat liver. *J Biochem* 98: 723-733, 1985
- 13) Osumi T, Hashimoto T. Enhancement of fatty acyl-CoA oxidizing activity in rat liver peroxisomes by di-(*i*-ethylhexyl) phthalate. *J Biochem* 83(5): 1361-1365, 1978
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 16) Baginski ES, Foa PP, Zak B. Glucose-6-phosphate. In: Methods of enzymatic analysis 2nd English Ed Vol. 2, pp.876-880, Academic press, New York, 1974
- 17) Schmidt E. Glutamate dehydrogenase. In: Methods of enzymatic analysis 2nd English Ed Vol. 2, pp.650-656, Academic press, New York, 1974
- 18) Abei H. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis 2nd English Ed Vol. 2, pp.673-684, Academic press, New York, 1974
- 19) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 2nd Ed. 1989
- 20) Lai JC, Sheu KF, Kim YT, Clarke DD, Blass JP. The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): is GDH a marker for mitochondria in brain? *Neurochem Res* 11: 733-744, 1986
- 21) Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T. The presence of a new 3-oxoacyl-CoA thiolase in rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem* 103: 589-596, 1980
- 22) Stefan EHA, Fujiki Y, Shio H, Lazarow PB. Partial disassembly of peroxisomes. *J Cell Biol* 101: 294-305, 1985
- 23) de Duve C, Pressman BC, Ghanett R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* 60: 604-617, 1955
- 24) Lewin TM, Kim JH, Granger DA, Vance JE, Coleman RA. Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem* 276(27): 24674-24679, 2001
- 25) Waku K. Origins and fates of fatty acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta* 1124(2): 101-111, 1992
- 26) Shimizu T and Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 55: 1-14, 1990
- 27) Lippel K. Activation of branched and other long-chain fatty acids by rat liver microsomes. *J Lipid Res* 14(1): 102-109, 1973
- 28) Pande SV, Mead JF. Long chain fatty acid activation in subcellular preparations from rat liver. *J Biol Chem* 243(2): 352-61, 1968
- 29) Iritani N. Nutrition and hormonal regulation of lipogenic-enzyme gene expression in rat liver. *Eur J Biochem* 205: 433-442, 1992
- 30) Girard J, Perdereau D, Foufelle F, Prip-Buus C, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 8: 36-42, 1994
- 31) Wang H, Walker SW, Mason JI, Morley SD, Williams BC. Role of arachidonic acid metabolism in ACTH-stimulated cortisol secretion by bovine adrenocortical cells. *Endocr Res* 26: 705-709, 2000
- 32) Wang X and Stocco DM. Cyclic AMP and arachidonic acid: a tale of two pathways. *Mol Cell Endocrinol* 158: 7-12, 1999
- 33) Chang LL, Kau MM, Wun WS, Ho LT, Wang PS. Effects of fasting on corticosterone production by zona fasciculata-reticularis cells in ovariectomized rats. *J Investig Med* 50(2): 86-94, 2002
- 34) Cho YY, Kang MJ, Ogawa S, Yamashita Y, Fujino T, Yamamoto TT. Regulation by adrenocorticotropic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-prefering enzyme expressed in steroidogenic tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 274(3): 741-5, 2000
- 35) Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerz J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270: 19269-19276, 1995
- 36) Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK, Coleman RA. Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Arch Biochem Biophys* 404(2): 263-270, 2002