

배양세포의 Type에 따른 Constitutive Androstane 수용체 (CAR)의 CYP2B PBRU 전사활성 효과: Hep G2와 COS 세포의 비교

민 계 식*

진주산업대학교 미생물공학과

Effects of Constitutive Androstane Receptor (CAR) on PBRU Transactivation of CYP2B Gene in Different Culture Cell Types: Comparison Between Hep G2 and COS-cells

Gyesik Min*

Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

Abstract

The objective of this study was to examine if transient transfection of CAR can transactivate CYP2B1 PBRU reporter gene in COS cells in which the endogenous CYP2B1 gene is not induced by PB. In non-transfected cells of both Hep G2 and COS, the endogeneous expression of CAR was not detected by antibody against CAR. When cultured cells were transfected with CAR expression plasmid, mCAR1-GFP, both cell types expressed high levels of CAR protein and could allow to examine the effect of CAR in PBRU transactivation. Both cell types expressed endogenous RXR and transfection of RXR expression plasmid dramatically increased its protein expression. Whereas CAR transactivated PBRU2C1Luciferase about 12 fold as compared to 2C1Luciferase in Hep G2 cells, it did not stimulate the luciferase activity of the PBRU reporter gene in COS cells. These results indicate that Hep G2 cells can respond to CAR differently from COS cells, and suggest that factors other than CAR and RXR may be required in inducing PBRU activation and the expression of these factors may be different between liver and kidney.

Key words – Constitutive Androstane Receptor, PBRU, Transactivation, Hep G2, COS

서 론

Cytochrome P450는 원핵세포와 진핵세포에 모두 존재하는 Heme을 함유한 mono-oxygenase 단백질군으로서, 외부로부터 들어오는 유해한 화학물질을 대사 분해할 뿐만

아니라 생체화합물의 합성과 분해에도 중요한 역할을 수행한다[1,3,4,7,12,24,30,32,34,38]. 예를 들면 약물, 환경독성물질 혹은 암 유발물질과 같은 외부 화학물질의 대사 및 스테로이드 화합물, 비타민, 지방산 유도체 등과 같은 생체화합물들의 대사는 이러한 산화제에 의해 일어난다[4,12,32,34]. 이들 P450 단백질군의 특징들 중의 하나는 각각의 다른 화학물질에 의해서 특정한 소 군의 유전자의 발현이 촉진되어 다양한 기질들의 대사를 할 수 있기 때문에 특히 동물

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 055-751-3396, Fax: 055-751-3399
E-mail: g-min@jinju.ac.kr

의 간에서 약물들간의 상호작용이 일어나고 다른 약물의 활성과 대사를 변형시키는 데 중요한 역할을 수행한다 [6,7,12,32,34,38].

Phenobarbital (PB)은 간에 다양한 영향을 미치는 화학 물질로서 Cytochrome P450를 포함한 여러 유전자의 mRNA의 발현을 조절한다[6,11,15,22,33,39]. Phenobarbital에 의해서 세포 내 소포체에서 약물대사가 조절된다는 사실은 오랫동안 알려져 왔지만, 이에 관련된 중요한 효소인 Cytochrome P450 유전자의 발현에 관한 활성 조절기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 최근에 이중 Phenobarbital에 의해서 가장 현저하게 발현의 영향을 받는 Cytochrome P450 2B 유전자에 대한 분자적 발현조절 기전을 규명하기 위한 많은 연구와 진전이 있었다[9,10,13,14,16-18,20,25-28,31,35,36]. 먼저, CYP2B2 유전자의 5' upstream에 위치한 -2.3kb 주위의 염기서열에 Phenobarbital에 반응하여 발현을 촉진시키는 Cis-acting enhancer의 기능이 존재하는데, 이는 정상적인 생체의 자연적인 유전자를 사용하거나 외부로부터 상이한 임의의 유전자 (Heterologous)를 접목시켜 일시적인 transfection 혹은 생쥐의 제1차 세포배양을 통하여 유전자의 발현을 촉진함을 밝혀내었다 [10,11,20,26-28,34,36]. 이러한 염기 서열은 DNA를 간세포에 직접 주입하였을 때 상이한 Promoter를 사용하여도 Phenobarbital에 의해서 유전자 발현의 촉진을 유발하는 것으로 알려졌다[27]. 또한 PBRU (Phenobarbital Responsive Unit)의 염기서열에 대한 변이분석을 통하여 이 조절부위에 다양하고 중복적인 조절인자 결합부위가 존재하는데 핵 수용체 결합부위인 NR-1, NR-2, 그리고 NF-1이 이에 해당한다[11-13,15,20].

약물대사의 전형적인 촉진제에 해당하는 Phenobarbital에 의해서 발현되는 CYP2B 유전자의 발현촉진 매개인자로서 Constitutive Androstane Receptor (CAR)가 최근에 규명되었다[8,12,13,16,22,23,25,26,34,37,38,40]. 핵 수용체인 CAR는 PBRU에 위치한 두 군데의 핵 수용체 결합부위 (NR-1, NR-2)에 결합하는데, 외부로부터 자극이 없는 상태에서는 간세포의 세포질에 존재하고, Phenobarbital을 처리한 동물의 세포에서는 핵으로 이동함으로써 Retinoic Acid Receptor (RXR)와 이량체 (Heterodimer)를 형성하여 NR부위에 결합하게 된다[12,13,16,18,26,34]. 사람의 간암세포인 HepG2를 배양했을 때, 동물세포에서 발현할 수 있는 Promoter를 가진 vector에 clone된 CAR유전자를 일시적 또는 안정적으로 세포 내 transfection시켰을 경우 PBRU의 활성

을 촉진시켰을 뿐만 아니라 세포 내 존재하는 CYP2B6 유전자의 발현도 증가되는 현상이 밝혀졌다[13,18,33]. 기능이 상실된 CAR 유전자를 가진 유전자 변이 생쥐에 있어서는 Phenobarbital을 처리하여도 CYP2B 유전자의 발현이 촉진되지 않기 때문에 Phenobarbital에 의한 CYP2B 유전자의 발현 촉진 기전에는 CAR가 중요한 역할을 함을 보여 준다 [39]. CAR는 리간드가 없는 상태에서도 비교적 높은 활성을 갖는 것으로 보아 다른 일반적인 핵 수용체와는 다른 특이적인 성질을 가진다고 할 수 있다[2,8,23,26,33,37,40]. CAR에 대한 리간드로 처음 밝혀진 것이 Androstanes인데 이들은 CAR의 활성을 촉진하기보다는 오히려 억제하기 때문에 항상 활성을 지닌 수용체라는 뜻인 Constitutive Receptor로 CAR가 알려지게 되었다[7,22,23,40]. 이러한 CAR의 활성을 억제하기 위한 Androstanes의 농도는 생리적 농도보다 훨씬 높아야 되기 때문에, Phenobarbital이 처리되지 않은 in vivo 내에서 CAR의 활성억제 조절은 세포 내의 특정 compartment localization과 같은 ligand 이외의 다른 기전이 관여하는 것으로 추정되고 있다[21].

하지만, 지금까지 연구된 CAR의 역할은 모두 간세포 내에서 작용하는 Phenobarbital의 매개체로서 알려져 있다. 다세포 동물에서 각각의 분화된 세포는 독특한 유전자의 발현 Pattern을 갖고 있어서 어느 특정한 세포에서 일어나는 유전자의 발현 특징이나 작용기전 혹은 기능이 다른 종류의 세포에서는 일어나지 않거나 상이한 기전에 의해서 조절된다. 예를 들어, 쥐의 간에서는 Phenobarbital에 의해 cytochrome P450 2B1과 2B2의 발현이 촉진되지만, 콩팥과 같은 간 이외의 조직에서는 CYP2B 유전자의 발현이 현저하게 낮은 뿐만 아니라 Phenobarbital에 의한 유도발현도 일어나지 않는 것으로 알려져 있다[29,31]. 이러한 세포에 따른 반응특이성의 차이를 이용하여 유전자 발현에 관여하는 인자들을 규명하는데 기초적 자료로 이용될 수 있다.

따라서 본 연구의 목적은 CYP2B유전자의 발현이 일어나지 않는 콩팥세포[19]에서 유래한 COS cell line을 이용하여, CAR 단백질을 일시적으로 발현시켰을 때 CYP2B1PBRU의 활성촉진에 영향을 미치는지의 여부를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Plasmid 조합구성

생쥐의 간 cDNA Library로부터 Polymerase 연속반응에

의해서 생쥐 CAR1과 CAR2 cDNA를 분리한 다음 염기서열 분석에 의해 CAR1과 CAR2 단백질의 codon 염기서열을 확인하였다. 포유동물 세포 내에서의 CAR의 발현을 위해서, pGEX2TK-mCAR1으로부터 BamHI과 EcoRI로 분리된 CAR1 cDNA를 동일한 제한 효소들로 자른 pCDNA3 (Invitrogen)에 결합시켜 pCDNA3-CAR1을 합성하였다. CAR-GFP의 발현을 위한 expression vector, pECARC1-GFP는 pCDNA3-CAR로부터 분리된 BamHI/EcoRI 제한 효소 조각을 pEGFP-C1 (BD Biosciences CLONTECH) vector의 BglII/EcoRI site에 융합하여 합성하였다. 포유동물에서 발현할 수 있는 RXR (Retinoic Acid Receptor) plasmid인 pCMX-RXR는 B. Kemper로부터 제공받았고, 보고 유전자 plasmid인 PBRU2C1-Luc와 2C1-Luc는 이전에[18] 보고된 방법을 이용하였다.

박테리아 내에서의 CAR와 RXR의 발현과 정제

박테리아 세포 내에서 N-terminus에 His-tag이 융합된 CAR의 다량의 발현과 분리를 위해서 CAR2 cDNA를 BamHI과 EcoRI로 자른 다음 pET28a+ vector (Novagen Corp)에 주입한 후 pETCAR2를 합성하였다. 박테리아 내에서 FLAG-tagged RXR을 발현하기 위하여 pf:RXR vector를 사용하였다. 박테리아 내 단백질의 발현을 위하여, 1/20 volume의 overnight *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS 배양액을 1 L의 LB broth에 접종시켜 37°C에서 약 1 시간 ($A_{600} = 0.6$) 동안 배양한 후 1 mM isopropyl- β -D-thioglucoopyranoside (IPTG)에 의해 발현을 유도시키고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 증식된 Bacteria를 원심분리에 의해 침전시킨 다음 CAR pellet에 대해서는 20 ml의 Ni-NTA equilibrium buffer (20 mM Tris-HCl, pH. 8.0; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazole; 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 1 mM DTT; 2 ug/ml leupeptin, pepstatin, aprotinin; 10 ug/ml benzamidine)에 다시 부유한 후 French Press에 의한 높은 압력으로 용해하였다. Inclusion body에 함유된 CAR 단백질을 15,000×g에서 15 분 동안 4°C에서 원심분리에 의해 Collection한 다음 생성된 pellet을 8 M Urea에서 2번 wash하고 6 M guanidine-HCl와 1% Nonidet P-40가 함유된 Ni-NTA equilibrium buffer에서 다시 wash하였다. 남은 pellet은 6 M guanidine-HCl와 15 mM beta-mercaptoethanol이 함유된 Ni-NTA equilibrium buffer에서 녹인

(solubilization) 후 Ni-NTA column에서 친화성 크로마토 그래피에 의해 CAR 단백질을 순수 정제분리 하였다. RXR pellet에 대해서는, 20 ml의 20 mM Tris-HCl buffer (pH. 7.9, 500 mM NaCl, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 4 mM DTT, protease inhibitors)에 부유시킨 다음 초음파 법에 의해 세포를 파괴시키고 22,000×g에서 20분 동안 원심분리 하였다. RXR이 함유된 상등액을 M2 agarose (Sigma Chemical Co. U.S.A.) 친화성 resin과 섞은 후 4°C에서 10시간 동안 incubation 하였다. 20 mM Tris-HCl buffer (pH. 7.9, 300 mM NaCl, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA, protease inhibitors)에서 원심분리와 re-suspension으로 5번 wash 한 후 4°C에서 0.3 ml의 20 mM Tris-HCl elution buffer (pH. 7.9, 100 mM NaCl, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 ug/ml FLAG-peptide)로 정제 분리하였다.

항혈청 (Antisera)

CAR에 대한 항혈청 (rabbit anti-mCAR2 immunme serum)은 B. Kemper로부터 제공받았고, RXR에 대한 항혈청 (rabbit anti-human RXR α immune serum)과 GFP에 대한 항혈청 (mouse anti-GFP immune serum)은 Santa Cruz Biotechnology (CA. U.S.A.)에서 구입하였다.

Western Blot에 의한 단백질 발현 조사

배양된 Hep G2 혹은 COS 세포 내에서 transfection을 하지 않은 control 상태와 transfection을 한 후의 CAR와 RXR 단백질의 발현여부를 알아보기 위하여 각각 0.5 ug의 pEmCAR1GFP vector 또는 pCMX-RXR vector를 LipofectAMINE 방법에[21] 의해 95%의 confluency에 도달한 배양세포에 transfection을 하였다. 먼저 transfection하고자 하는 DNA를 OPTI-MEM에 mix한 다음 1 ug의 DNA에 대하여 5 ul의 LipofectAMINE과 혼합한 다음 15 분간 25°C에서 Incubation 하였다. Transfection 하기직전, 배양액을 Serum-free DMEM으로 교체한 다음 DNA/LipofectAMINE/OPTI-MEM 혼합액을 drop-wise로 배양액에 떨어뜨리고 37°C CO₂ (5%) incubator에서 6시간 동안 배양하였다. 그 후 10% Fetal Bovine Serum이 함유된 DMEM에서 다시 36시간동안 배양하였다. 세포 내 발현된 단백질을 추출하기 위하여 배양세포를 PBS로 wash한 다

음 hypotonic buffer에서 vortex하여 원형질막을 파괴하고 추출된 세포전체 단백질 sample을 8.5% SDS-Polyacrylamide에서 전기영동 하였다. 분리된 단백질을 Nitrocellulose membrane에 transfer한 다음 rabbit anti-CAR serum (1:1000), mouse anti-GFP Ab (1:5000), 혹은 rabbit anti-RXR IgG (1:2000)을 30분간 상온에서 incubation하고, horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (CAR와 RXR) 또는 HRP-rabbit anti-mouse IgG (GFP)와 20분간 상온에서 incubation 하여 ECL (Enhanced Chemiluminescence) detection System (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, U.S.A.)에 의해 immunofluorescent 영상을 실시하였다.

세포배양 및 Transfection

Human HepG2 혹은 COS 세포를 10% charcoal-dextran-stripped fetal calf serum, 100 units/ml penicillin과 0.01% streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. Transfection을 위해서, 24-well의 세포배양 plate에 90%의 Confluency로 각각의 세포를 접종한 다음 항생제가 없는 DMEM에서 18 시간동안 배양하였다. LipofectAMINE 방법을[21] 이용하여 1 ug/well의 CYP2B1 PBRU cis-acting element를 minimum promotor인 CYP2C1 Promoter와 firefly luciferase 보고유전자에 융합한 보고 유전자 Plasmid (PBRU2C1Luc), 10 ng/well의 SV40 promoter와 Renilla luciferase 유전자를 함유한 pRL-SV40 plasmid, 그리고 다양한 양의 CAR 발현유전자 pCDNA3CAR1을 각각의 well에 첨가시켰다. PBRU를 제외한 1 ug/well의 2C1Luciferase 보고유전자를 대조 군으로 사용하였다. Transfection 후 각각의 세포를 36시간동안 incubation한 다음 dual luciferase 보고유전자 분석 방법(Promega Biotech)에 의해 luciferase의 활성을 측정하였다. Transfection 효율성의 차이에 의해 발생될 수 있는 변이를 최소화하기 위해 각각의 Sample에 대한 firefly luciferase의 활성을 동등한 Renilla luciferase의 활성과 비교하여 표준화시켰다.

결과 및 고찰

Hep G2와 COS 세포의 CAR 단백질 Western blot Transfection을 하지 않은 Control 상태의 Hep G2와 COS

배양세포에서는 CAR antibody를 사용하여 immunoblot을 시행하였을 때 CAR 단백질의 발현이 거의 나타나지 않았다 (Fig. 1A). 이러한 결과는 콩팥에서는 CAR mRNA의 발현이 일어나지 않는다는 이전의 보고와 일치함을 보여주었다 [5]. Hep G2 세포에서의 CAR 발현이 뚜렷하지 않는 현상은 주어진 조건 하에서 발현 level이 낮거나 antibody의 sensitivity에 기인되는 것으로 추정된다. mCAR1-GFP (0.5ug)를 transfection하였을 때는 Hep G2 세포에서는 발현이 비교적 약하게 나타났지만, COS 세포에서는 강한 mCAR1-GFP 단백질의 발현을 보였다 (Fig. 1A). GFP antibody를 이용하여 immunoblot을 시행하였을 경우에는 transfection된 COS 세포에서 강한 mCAR1-GFP 단백질의 발현을 나타내었을 뿐만 아니라 transfection된 Hep G2 세포에서도 뚜렷한 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 따라서 transfection된 CAR plasmid가 주어진 포유동물 배양세포 조건에서 정상적인 단백질의 발현을 할 수 있음을 확인하였다.

Hep G2와 COS 세포의 RXR 단백질 Western blot

CAR 단백질은 세포 핵 내에서 PBRU의 NR과 결합하여 유전자의 발현을 조절하기 위해서는 RXR과 이량체를 형성해야 하기 때문에 RXR의 발현이 일어나야 한다. 따라서 Hep G2와 COS 세포에서 transfection 전후의 RXR 단백질의 발현을 western immunoblot에 의해 조사하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이 Hep G2 (Fig. 2A)와 COS (Fig. 2B) 세포 모두에서 endogenous RXR의 발현이 일어남을 알 수 있었을 뿐만 아니라 RXR expression plasmid를 transfection 시켰을 때 두 세포 모두에서 단백질의 발현이 현저하게 증가되었다 (Fig. 2A, B).

Dual luciferase Assay - Hep G2와 COS 세포에 대한 CAR의 PBRU Transactivation 비교

Constitutive Androstane Receptor (CAR)에 의한 CYP2B의 PBRU 활성효과를 다르게 분화된 세포에서 차이가 일어나는지를 비교하기 위하여 CAR에 의해 매개되는 PBRU의 transactivation효과를 Hep G2와 COS 세포에서 조사하였다. 각각의 세포를 CAR expression vector와 단일 copy의 CYP2B1PBRU가 minimal CYP2C1 promotor/firefly luciferase 보고유전자와 fusion된 reporter plasmid

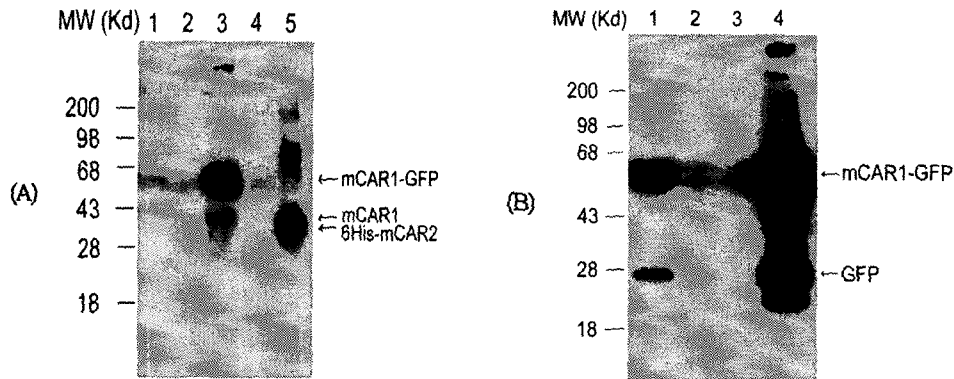


Fig. 1. Expression of CAR protein in Hep G2 and COS cells. Total cell extracts were prepared from either non-transfected control or cells transfected with 0.5 ug of pEmCAR1GFP plasmid. Cellular proteins were separated by 8.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane. (A) The membrane was probed with rabbit anti-mCAR2 antibody (1:1000 dilution) and horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG. Proteins were visualized using ECL detection system. MW; Molecular Weight Marker, lane 1; Hep G2 cells transfected with 0.5 ug of pEmCAR1GFP plasmid, lane 2; Non-transfected Hep G2 cells, lane 3; COS cells transfected with 0.5 ug of pEmCAR1GFP plasmid, lane 4; Non-transfected COS cells, lane 5; Ni-NTA purified 6His-mCAR2 protein from *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS transformed with pET28+6His-mCAR2 plasmid and induced with 1 mM IPTG. The lower band (about 39 Kd) in lane 3 is a cleaved mCAR1 protein from the conjugated GFP protein and the upper band (about 80 Kd) in lane 5 is a doublet of mCAR2 protein. (B) The membrane was probed with mouse anti-GFP Ab (1:5000) and horse radish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. Proteins were visualized using ECL detection system. MW; Molecular Weight Marker, lane 1; Hep G2 cells transfected with 0.5 ug of pEmCAR1GFP plasmid, lane 2; Non-transfected Hep G2 cells, lane 3; Non-transfected COS cells, lane 4; COS cells transfected with 0.5 ug of pEmCAR1GFP plasmid. The lower band (about 26 Kd) in lanes 1 and 4 is the cleaved GFP protein from mCAR1-GFP.

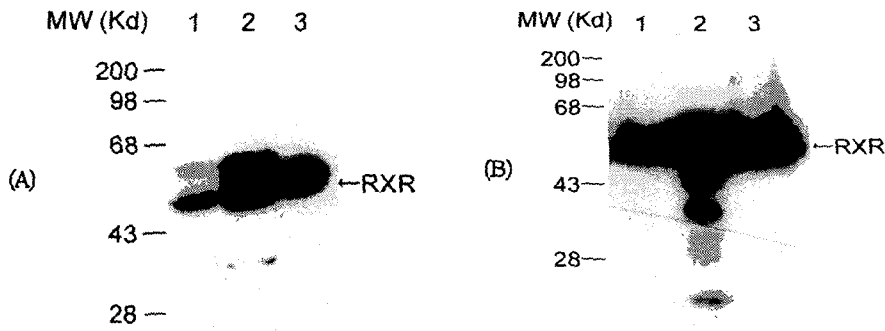


Fig. 2. Expression of RXR protein in Hep G2 and COS cells. Total cell extracts were prepared from either non-transfected control or cells transfected with 0.5 ug of pCMX-RXR plasmid. Cellular proteins were separated by 8.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was probed with rabbit anti-RXR IgG (1:2000 dilution) and horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG. Proteins were visualized using ECL detection system. (A) RXR expression in Hep G2 cells. MW; Molecular Weight Marker, lane 1; Non-transfected Hep G2 cells, lane 2; Hep G2 cells transfected with 0.5 ug of pCMX-RXR plasmid, lane 3; M2 agarose purified FLAG-tagged RXR protein from *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS transformed with pf:RXR plasmid and induced with 1 mM IPTG. (B) RXR expression in COS cells. MW; Molecular Weight Marker, lane 1; Non-transfected COS cells, lane 2; COS cells transfected with 0.5 ug of pCMX-RXR plasmid, lane 3; M2 agarose purified FLAG-tagged RXR protein from *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS transformed with pf:RXR plasmid and induced with 1 mM IPTG.

로 cotransfection을 하였다. 이전에 보고된 결과와 일치하게 Hep G2 세포에서는 transfection된 CAR의 발현에 의해 firefly luciferase 보고단백질의 활성이 약 12배 증가하였다 (Fig. 3). CAR 발현유전자 15 ng을 transfection하였을 때 주어진 보고유전자의 양에 대하여 최대반응을 나타내었고 90 ng의 CAR에 대해서도 더 이상 luciferase의 발현이 증가되지 않았다. CYP2B1PBRU enhancer가 제거된 CYP2C1 promotor/firefly luciferase를 보고유전자로 사용하였을 때는 CAR에 의한 luciferase의 활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 CAR에 의한 transactivation은 PBRU의 염기 sequence에 의존함을 나타낸다고 할 수 있다. RXR expression plasmid를 동시에 transfection시켜도 luciferase 보고유전자의 발현을 더욱 더 증가시키지는 못 하였다 (Data not shown). Hep G2와는 달리, COS 세포에서는 transfection된 CAR의 발현이 firefly luciferase 보고단백질의 활성에 영향을 주지 못하였다 (Fig. 3). CAR expression plasmid를 2.5 ng~90 ng까지 COS 세포에 transfection시

켰을 때 control 보고유전자 CYP2C1promotor/firefly luciferase의 활성과 별다른 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Phenobarbital에 의해 촉진되는 CYP2B 유전자의 발현은 간 조직세포에 대한 특이성을 나타낸다는 이전의 보고와 일치한다. PBRU 염기서열을 포함하는 5'-flanking sequence를 rat CYP2B2에 연결한 다음 transgenic mouse에서 유전자의 발현을 조사한 결과 간세포에서는 Phenobarbital에 의한 발현촉진이 나타났으나 콩팥세포에서는 나타나지 않았다[29]. 또한 콩팥으로부터 추출한 핵단백질이 함유된 *in vitro* transcription system에서도 CYP2B2 Promotor Construct의 전사활성이 Phenobarbital에 의해 유도되지 못했다[31]. 이러한 결과들은 분화된 세포의 종류에 따라서 constitutive androstane receptor (CAR)의 CYP2BPBRU의 활성효과가 다르게 나타날 수 있음을 제시할 뿐만 아니라, 간세포에서는 Phenobarbital에 의한 PBRU의 활성유도를 매개하는 endogenous 인자들 중 CAR와 RXR과는 다른 전사조절 인자들이 필요로 하며 이러한 인자들의 발현이 콩팥 세포에서는 다르게 존재함을 시사한다.

요 약

최근 Phenobarbital에 의해서 발현되는 CYP2B유전자의 발현촉진 매개인자로서 Constitutive Androstane Receptor (CAR)가 최근에 규명되었다. 사람의 간암세포인 HepG2 cell line에 CAR유전자를 transfection시켰을 경우 PBRU의 활성을 촉진시켰다. 지금까지 연구된 CAR의 역할은 주로 간세포 내에서 cytochrome P4502B 유전자의 발현을 촉진하는 Phenobarbital의 매개체로서 알려져 있다. 다세포동물에서 각각의 분화된 세포는 독특한 유전자의 발현 Pattern을 갖고 있어서 어느 특정한 세포에서 일어나는 유전자의 발현특징이나 작용기전 혹은 기능이 다른 종류의 세포에서는 일어나지 않거나 상이한 기전에 의해서 조절된다. 이러한 세포간 특이성을 이용하여 유전자 발현에 관여하는 인자들을 규명하는데 기초적 자료로 이용될 수 있다. 따라서 본 연구의 목적은 CYP2B유전자의 발현이 일어나지 않는 콩팥세포 line (COS)에서 CAR 단백질 수용체가 PBRU의 활성촉진에 영향을 미치는지의 여부를 조사하고자 하였다. Control 상태의 Hep G2와 COS 배양세포에서는 CAR 단

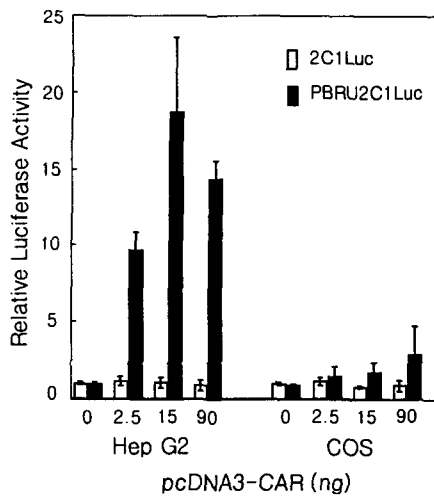


Fig. 3. CAR-dependent transactivation of the CYP2B1 PBRU in Hep G2 cells but not in COS cells. Either Hep G2 cells or COS cells were co-transfected with various amount of pcDNA3-CAR and either 1 ug/well of PBRU2C1Luc or 2C1Luc as indicated and with 10 ng/well of pRL-SV40, which expresses *Renilla* luciferase. The values for firefly luciferase were normalized by dividing the firefly luciferase activity by that of *Renilla* luciferase. The standard errors of the mean were calculated from 9 independent experiments.

백질의 발현이 거의 나타나지 않았다. mCAR1-GFP를 transfection 한 후 CAR antibody를 이용하여 immunoblot을 시행하였을 경우, Hep G2 세포에서는 발현이 비교적 약하게 나타났지만, COS 세포에서는 강한 mCAR1-GFP 단백질의 발현을 보였다. 한편, GFP antibody를 이용하여 immunoblot을 시행하였을 경우에는 COS 세포에서 강한 mCAR1-GFP 단백질의 발현을 나타내었을 뿐만 아니라 Hep G2 세포에서도 명백히 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다. 또한, Hep G2와 COS세포 모두에서 endogenous RXR의 발현이 일어남을 확인하였고 RXR expression plasmid를 transfection시켰을 때 두 세포 모두에서 단백질의 발현이 현저하게 증가되었다. Constitutive Androstane Receptor (CAR)에 의한 CYP2B의 PBRU 활성화효과를 다르게 분화된 세포에서 차이가 일어나는지를 비교하기 위하여 CAR에 의해 매개되는 PBRU의 transactivation효과를 Hep G2와 COS 세포에서 조사하였다. Hep G2 세포에서는 transfection된 CAR의 발현에 의해 firefly luciferase 보고단백질의 활성이 약 12배 증가하였다. CAR 발현유전자를 15 ng transfection하였을 때 주어진 보고유전자의 양에 대하여 최대반응을 나타내었고 CYP2B1PBRU가 제거된 CYP2C1 promotor/firefly luciferase를 보고유전자로 사용하였을 때는 CAR에 의한 luciferase의 활성이 나타나지 않았다. Hep G2와는 달리, COS세포에서는 transfection된 CAR의 발현이 PBRU에 의한 firefly luciferase보고단백질의 발현에 영향을 주지 못하였다. 이러한 결과들은 분화된 세포의 종류에 따라서 constitutive androstane receptor의 CYP2BPBRU 활성화효과가 다르게 나타날 수 있음을 제시할 뿐만 아니라, 간세포에서 Phenobarbital에 의한 PBRU의 활성유도에 영향을 주는 endogenous 매개 인자들 중 CAR와 RXR과는 다른 전사조절인자들이 필요로 하며 이러한 인자들의 발현이 콩팥 세포에서는 다르게 존재함을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2002년 과학기술부 한국과학재단 지정 동물생명산업지역협력연구센터(과제번호:R12-2002-053-01002-0) 연구지원비에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사 드립니다.

참고 문헌

1. Axelrod, J. 1955. The enzymatic deamination of amphetamine (benzedrine). *J. Biol. Chem.* **214**, 753-763.
2. Baes, M., T. Gulick, H. S. Choi, M. G. Martinoli, D. Simha and D. D. Moore. 1994. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1544-1551.
3. Bhagwat, S. V., B. C. Leelavathi, S. K. Shankar, M. R. Boyd and V. Ravindranath. 1995. Cytochrome P450 and associated monooxygenase activities in the rat and human spinal cord-induction, immunological characterization, and immunocytochemical localization. *Neurosci.* **68**, 593-601.
4. Brodie, B. B., J. Axelrod, J. R. Cooper, L. Gaudette, B. N. LaDu, C. Mitoma and S. Udenfriend. 1955. Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* **121**, 603-604.
5. Choi, H-S., M. Chung, I. Tzamelis, D. Simha, Y-K. Lee, W. Seol and D. Moore. 1997. Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR. *J. Biol. Chem.* **272**, 23565-23571.
6. Conney, A. H., C. Davison, R. Gasten and J. J. Burns. 1960. Adaptive increase in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **130**, 1-8.
7. Cooper, D. Y., S. Levine, S. Narasimhulu, O. Rosenthal and R. W. Estabrook. 1965. Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase system. *Science.* **147**, 400-402.
8. Forman, B. M., I. Tzamelis, H. S. Choi, J. Chen, D. Simha, W. Seol, R. M. Evans and D. D. Moore. 1998. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature.* **395**, 612-615.
9. Honkakoski, P., A. Kojo and M. A. Lang. 1992. Regulation of the mouse liver cytochrome P450 2B subfamily by sex hormones and phenobarbital. *Biochemical. J.* **285**, 979-983.
10. Honkakoski, P., R. Moore, K. Washburn and M. Negishi. 1988. Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital-response enhancer module in the CYP2B10 gene. *Mol. Pharmacol.* **53**, 597-601.
11. Honkakoski, P. and M. Negishi. 1997. Characterization of a phenobarbital-responsive enhancer mod-

- ule in mouse P450 Cyp2b10 gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 14943-14949.
12. Honkakoski, P. and M. Negishi. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* **347**, 321-337.
 13. Honkakoski, P., I. Zelko, T. Sueyoshi and M. Negishi. 1998. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol. Cell Biol.* **18**, 5652-5658.
 14. Jean, A., A. Reiss, M. Desrochers, S. Dubois, E. Trottier, Y. Trottier, L. Wirtanen, M. Adesnik, D. J. Waxman and A. Anderson. 1994. Rat liver cytochrome P450 2B3: structure of the CYP2B3 gene and immunological identification of a constitutive P450 2B3-like protein in rat liver. *DNA Cell Biol.* **13**, 781-792.
 15. Johnson, E. F., K. J. Griffin and U. S. Keith. 1999. Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. *Molecular Pharmacology.* **56**, 851-857.
 16. Kawamoto, T., T. Sueyoshi, I. Zelko, R. Moore, K. Washburn and M. Negish. 1999. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell Biol.* **19**, 6318-6322.
 17. Kim, J. and B. Kemper. 1997. Phenobarbital alters protein binding to the CYP2B1/2 phenobarbital-responsive unit in native chromatin. *J. Biol. Chem.* **272**, 29423-29426.
 18. Kim, J., G. Min and B. Kemper. 2001. Chromatin assembly enhances binding to the CYP2B1 phenobarbital-responsive unit (PBRU) of nuclear factor-1, which binds simultaneously with constitutive androstane receptor (CAR)/retinoid x receptor (RXR) and enhances CAR/RXR-mediated activation of the PBRU. *J. Biol. Chem.* **276**, 7559-7567.
 19. Kim, J., I. Rivera-Rivera and B. Kemper. 2000. Tissue-specific chromatin structure of the CYP2B1 phenobarbital-responsive unit and proximal promotor and modulation by phenobarbital. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1126-1132.
 20. Liu, S., Y. Park, I. Rivera-Rivera, H. Li and B. Kemper. 1998. Nuclear factor-1 motif and redundant regulatory elements comprise phenobarbital-responsive enhancer in CYP2B1/2. *DNA Cell Biol.* **17**, 461-470.
 21. Min, G., J. K. Kemper and B. Kemper. 2002. Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **277**, 26356-26363.
 22. Moore, D. and I. Tzamelis. 2001. Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* **12**, 7-10.
 23. Moore, L. B., D. J. Parks, S. A. Jones, R. K. Bledsoe, T. G. Consler, J. B. Stimmel, B. Goodwin, C. Liddle, S. G. Blanchard, T. M. Willson, J. L. Collins and S. A. Kliewer. 2000. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **275**, 15122-15127.
 24. Mueller, G. C. and J. A. Miller. 1949. The reductive cleavage of 4-demethylaminoazobenzene by rat liver: The intracellular distribution of the enzyme system and the requirement for triphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **180**, 1125-1136.
 25. Negishi, M. and P. Honkakoski. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* **347**, 321-337.
 26. Negishi, M. and T. Sueyoshi. 2001. Phenobarbital response elements of Cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 123-143.
 27. Park, Y., H. Li and B. Kemper. 1996. Phenobarbital induction mediated by a distal CYP2B2 sequence in rat liver transiently transfected *in situ*. *J. Biol. Chem.* **271**, 23725-23728.
 28. Ramsden, R., N. B. Beck, K. M. Sommer and C. J. Omiecinski. 1999. Phenobarbital responsiveness conferred by the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice. *Gene.* **228**, 169-179.
 29. Ramsden, R., K. M. Sommer and C. J. Omiecinski. 1993. Phenobarbital induction and tissue-specific expression of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **268**, 21722-21726.
 30. Savas, U., K. J. Griffin and E. F. Johnson. 1999. Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. *Molecular Pharmacology.* **56**, 851-857.
 31. Shervington, A. 1999. CYP2B2 gene expression and phenobarbital induction in kidneys using an *in vitro* transcription system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**, 233-237.

32. Strobel, H. W., A. Y. H. Lu, J. Heidma and M. J. Coon. 1970. Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **245**, 4851-4954.
33. Sueyoshi, T., T. Kawamoto, I. Zelko, P. Honkakoski and M. Negishi. 1999. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J. Biol. Chem.* **274**, 6043-6046.
34. Sueyoshi, T. and M. Negishi. 2001. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 123-143.
35. Suwa, Y., Y. Mizukami, K. Sogawa and Y. Fujii-Kuriyama. 1985. Gene structure of a major form of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 in rat liver. *J. Biol. Chem.* **260**, 7980-7984.
36. Trottier, E., A. Belzil, C. Stoltz and A. Anderson. 1995. Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene* **158**, 263-268.
37. Tzameli, I., P. Pissios, E. G. Schuetz and D. D. Moore. 2000. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2951-2958.
38. Waxman, D. J. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**, 11-23.
39. Waxman, D. J. and L. Azaroff. 1992. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* **281**, 577-592.
40. Wei, P., J. Zhang, M. Egan-Hafley, S. Liang and D. D. Moore. 2000. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature*. **407**, 920-923.

(Received June 2, 2003; Accepted June 17, 2003)