

Insulin-like growth factor-I 유전자의 조직 특이적 발현에 대한 조절기전

† 안 미 라

전남대학교 수의과대학 수의학과 및 생물공학연구소
(접수 : 2003. 7. 26. 게재승인 : 2003. 8. 27.)

Regulatory Mechanism in Tissue-specific Expression of Insulin-like Growth Factor-I Gene

Mi-Ra An†

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

(Received : 2003. 7. 26. Accepted : 2003. 8. 27.)

The present study was aimed at investigating the regulatory mechanism in tissue-specific expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene. The expression of IGF-I gene was determined by a solution hybridization/RNase protection assay using total RNA prepared from rat liver or brain of various ages. The levels of IGF-I transcripts were increased in liver gradually after birth, but decreased in brain. By using an oligonucleotide (FRE) corresponding to the C/EBP binding site of the rat IGF-I exon 1, multiple forms of C/EBP α and C/EBP β proteins, which have DNA-binding activity, were detected in the rat liver or brain. Western immunoblot and southwestern analyses show that p42^{C/EBP α} , p38^{C/EBP α} , p35^{C/EBP α} , p38^{C/EBP β} , and p35^{C/EBP β} form specific complexes with the IGF-I exon 1 oligonucleotide in liver nuclear extract and that p42^{C/EBP α} and p38^{C/EBP β} form complexes in brain. These data suggest that the formation of FRE-C/EBP isoform complexes may play important roles in the tissue-specific regulation of IGF-I gene expression.

Key Words : Insulin-like growth factor-I, tissue-specific expression, C/EBP α , C/EBP β

서 론

Insulin-like growth factor-I (IGF-I)은 성장호르몬의 여러 가지 작용들을 매개할 뿐만 아니라 국소적으로도 작용하여 조직의 성장과 분화를 촉진시킴으로써 성장과 발달에 있어서 중요한 역할을 하는 폴리펩티드이다. IGF-I은 간에서 가장 높게 발현되며 매우 다양한 조직에서 발현된다(1-3).

IGF-I 유전자의 발현은 사람 및 쥐에서 두 개의 promoters (P1과 P2)로부터의 전사와 alternative RNA splicing 및 differential RNA polyadenylation과 같은 복잡한 기전들에 의하여 조절된다(4-6). 이러한 과정에는 조직에 따라 성장호르몬을 포함한 glucocorticoid, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, prostaglandin (PG) A₂, PG E₂ 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(7-10). 생체 내에서는 영양상태가 IGF-I 유전자의 발현을 조절하는 중요한 요소이며

영양실조 및 당뇨병에 의하여 간을 비롯한 많은 조직에서 IGF-I mRNA 양이 감소되었지만 뇌에서는 변화하지 않는 것으로 나타났다(11). 또한 발달에 따른 IGF-I 유전자의 발현변화는 GH 수용체의 발현변화에 의존하는 것으로 보고되었고(12), 사람의 IGF-I 유전자 exon 1의 upstream에 존재하는 P1에 hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF-1 α)와 C/EBP α , C/EBP β , 그리고 C/EBP δ 등이 결합하여 조직 및 발달 단계 특이한 발현에 중요한 역할을 할 것으로 제안되었지만(13-15), exon 1의 downstream sequence가 IGF-I 유전자의 조직 특이적 발현 조절에 영향을 주는 지에 대하여는 잘 밝혀져 있지 않다.

CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)는 leucine repeats에 연결된 염기성 영역을 가지고 있는 bZIP 단백질로 불리우는 전사인자들에 속한다. Leucine zipper 영역은 C/EBP의 dimerization에 관여한다. C/EBP는 간, 폐, 및 지방과 같이 완전히 분화된 조직에서 주로 발현된다(16-18). 또한 C/EBP는 혈청 알부민, stearoyl acyl-CoA desaturase-1, 422/aP2 protein, insulin responsive glucose transporter들에 대한 유전자들을 transactivation시키며 세포의 성장, 분화, 그리고 간과 지방 조직내 에너지 대사에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(17, 18).

† 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

본 연구에서는 연령이 다른 쥐의 간 및 뇌 조직을 이용하여 IGF-I 유전자가 조직에 따라 다르게 발현되는 것을 보여 주었으며, 이러한 조직 특이한 IGF-I 발현은 IGF-I exon 1의 주요한 전사 개시점으로부터 아래쪽에 존재하는 FRE에 서로 다른 분자량의 C/EBP α 나 C/EBP β isoform들이 결합함으로써 조절될 것으로 제안하였다.

재료 및 방법

실험동물

여러 연령의 쥐 (Sprague-Dawley) 들을 정상사료와 물을 공급하여 사육하였다. 본 실험에서 사용한 시약들은 ultrapure의 molecular biology 급으로써 Sigma Chemical Company (St. Louis, MD, USA)와, Worthington Biochemical Corp. (Freehold, NJ, USA), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), AMRESCO Inc. (Solon, OH, USA), 그리고 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)에서 구입하였다. 일차항체인 다클론 anti-goat C/EBP 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, 이차항체인 단클론 anti-rabbit IgG 항체는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MD, USA)에서 구입하였다.

RNA 분리와 hybridization probe 제조

Chomczynski와 Sacchi(19)의 single-step 방법으로 쥐의 간 및 뇌 조직에서 total RNA를 분리하였으며 solution hybridization/RNase protection 분석방법으로 IGF-I의 mRNA를 정량하기 위하여 322 base pair (bp)의 쥐 IGF-I cDNA를 pGEM-2 vector (Promega, Madison, WI, USA)에 subclone한 plasmid DNA를 EcoRI로 제한하여 linearize시켰다. Linearized DNA와 ³²P-UTP (NEN, Boston, MA, USA), T₃ RNA polymerase (Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하여 radiolabel된 antisense RNA를 얻어 probe로 사용하였다(12).

Solution hybridization/RNase protection 분석

³²P-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. 특정한 mRNA의 양은 Fuji BAS 1000 Phosphorimager (Fuji Medical Systems, Stamford, CT, USA)를 이용하여 gels에서 측정하였다(12).

핵 추출물의 준비

쥐의 신선한 간 및 뇌 조직으로부터의 핵 추출물은 전에 언급한 대로 준비하였다(20). Bradford 방법(21)을 이용하여 단백질 농도를 측정하고 핵 추출물을 소량으로 나누어 액체 질소에서 급격히 냉동시킨 후 -75°C에 보관하였다.

Western blot과 southwestern 분석

핵 추출물을 12% polyacrylamide-SDS gel을 이용하여 전기영동하여 분리하였다(17). 전기영동한 후 단백질들을 PVDF-plus

(MSI, Westborough, MA, USA) membrane에 옮긴 후 면역분석(western)이나 oligonucleotide 결합분석(southwestern)을 하였다. Western 분석은 C/EBP α , C/EBP β , 또는 C/EBP δ 에 특수한 다클론 항체를 사용하여 ECL Plus kit의 공급처 (Amersham Biosciences, UK)가 제안한 방법대로 시행하였다. Southwestern 분석은 다음의 oligonucleotide FRE (wt)를 이용하여 시행하였다.

Electrophoretic mobility shift 분석

Electrophoretic mobility shift 분석은 [γ -³²P]ATP와 T₄ polynucleotide kinase로 두가닥의 oligonucleotide를 radioactive하게 labeling하여 실시하였다(18). 이 label된 DNA를 약 1 ng되게 취하여 여러 가지 양의 핵 추출물과 20 μ l의 반응액(4000 ng poly (dI · dC), 25 mM HEPES, pH 7.9, 60 mM KCl, 12% glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.75 mM dithiothreitol, 0.2 mM PMSF)에서 실온에서 20분간 incubation 하였다. DNA-단백질 혼합체를 5% nondenaturing polyacrylamide gels에서 분리하였다. 특수한 supershift 분석은 핵 추출물을 C/EBP α , C/EBP β , 또는 C/EBP δ 에 특수한 다클론 항체(Santa Cruz, USA)으로 전처치한 후 위와 같이 실시하였다.

Oligonucleotides

다음과 같은 oligonucleotide들과 그들의 complementary strands를 electrophoretic mobility shift 분석이나 southwestern 분석에서 probe나 또는 competitor로 사용하였다.

5' - CAGATAGAGCCTGCGCAATCGAAATAAAG - 3'

Oligonucleotide FRE (wt)

5' - CAGGAACATTTTTCGCGCAATCGAAATAAAG - 3'

Oligonucleotide FRE (m1)

5' - CAGATAGAGCCCTGCAGGTCGAAATAAAG - 3'

Oligonucleotide FRE (m2)

5' - CAGATAGAGCCTGCGCAATCGGGGCGGGG - 3'

Oligonucleotide FRE (m3)

Oligonucleotide의 complementary strand들을 STE 완충용액(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 동량 섞어서 95°C에서 10분간 가열한 후 실온으로 서서히 식혀서 anneal시켰다(18).

결과 및 고찰

쥐의 간 및 뇌 조직에서 IGF-I mRNA의 발현

쥐의 간 및 뇌 조직의 total RNA와 IGF-I antisense riboprobe를 hybridization하고 RNase protection 분석을 하여 조직간 IGF-I mRNA의 생성을 측정, 비교하였다. Fig. 1A와 2A에 나타나 있듯이 간 조직에서 exon 1이나 exon 2를 가지고 있는 IGF-I mRNA이 다 발현되었으며, 생후 4-5개월에 IGF-I mRNA의 두 가지 variants의 양이 현저히 증가하였다. 반면에 뇌조직에서 IGF-I mRNA는 exon 1만을 가지고 있고, 4-5개월부터는 오히려 그 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 1B와 2B). 대조유전자로서 이용한 산성 섬유모세포 성

장요소 (acidic fibroblast growth factor; aFGF)의 발현은 간 및 뇌 조직 모두에서 연령이 증가함에 따라 증가하여, IGF-I의 조직간 발현 차이가 특이함을 나타낸다(Fig. 2). 이와 같이 조직간 IGF-I의 차별적인 발현은 발달단계에 의해서서 뿐만 아니라 칼로리 제한과 같은 대사 변조에 의해서서도 나타남이 보고되었다(12, 20).

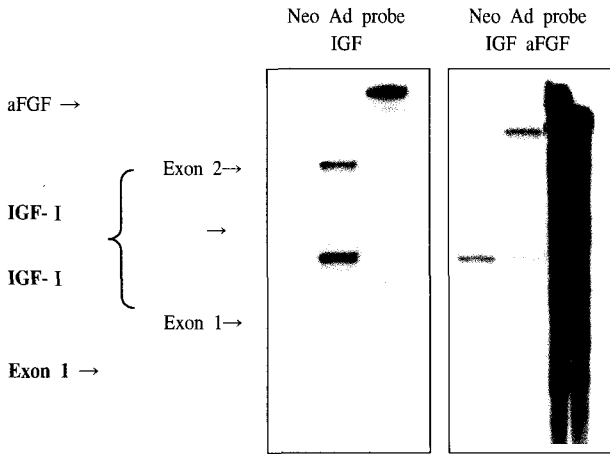


Figure 1. Tissue-specific expression of IGF-I gene in rat liver (A) and brain (B). RNA prepared from rats of 4-5 day old neonates (Neo) and 4-5 months old adult (Ad) was used in an RNase protection assay. The 32P-labeled IGF-I antisense RNA that was used as a probe differentiated between IGF-I mRNAs that contained exon 1 or exon 2. As a control, rat acidic fibroblast growth factor (aFGF) antisense RNAs were transcribed. Autoradiograms used in panels A and B represent 3 hr and 3 days exposures, respectively. The arrows indicate IGF-I mRNAs that contain either exon 1 or exon 2 in panel A and aFGF and IGF-I mRNAs that contain exon 1 in panel B.

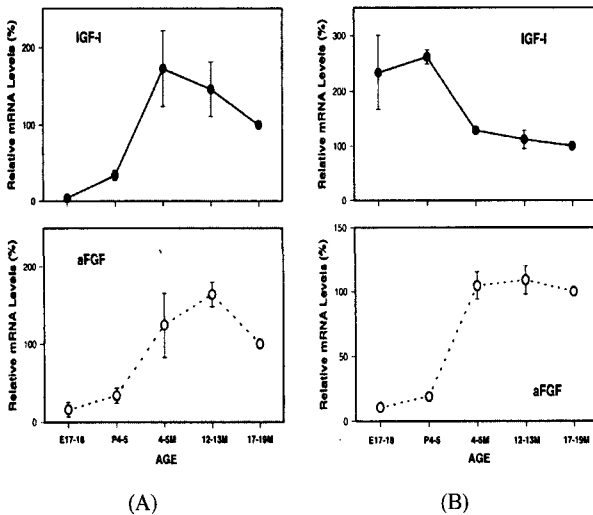


Figure 2. Differential expression of IGF-I gene in rat liver (A) and brain (B). Values are the relative levels of IGF-I (indicated by the solid lines) or aFGF (indicated by the dotted lines) mRNA at fetal (E17-18), neonatal (P4-5), young (4-5M), mature (12-13M), and old (17-18M) stages compared to the level in old rats, which was defined as 100 for each tissue. Each value is the mean \pm SEM of duplicate determinations of the level in three different preparations of RNA, each prepared from either a different rat (4M-18M) or pooled neonates or fetuses from different litters.

간 또는 뇌 조직의 핵 추출물과 FRE의 결합

DNase I footprint 분석을 이용하여 IGF-I 유전자의 발현에 관여하는 핵단백질이 결합하는 부위를 찾는 이전 연구에서 IGF-I exon 1의 downstream에 다수의 단백질 결합 영역이 있음을 보여 주었다(20). 절식시킨 쥐의 간이나 뇌조직에서 분리한 핵단백질로 실시한 footprint를 분석한 결과, C/EBP 결합부위를 포함하고 있는 +179와 +210 nucleotide residue들 사이의 29-base sequence가 매우 강하게 보호되므로 그곳을 fasting responsive element (FRE)로 명명하였다. 또한 IGF-I의 5'-flanking 지역과 exon 1에서 IGF-I 유전자의 발현에 필요한 minimal region을 찾는 이전 연구에서도 IGF-I exon 1의 +183과 +302 nucleotide residue들 사이에 IGF-I의 발현을 증가시키는 sequence가 있음을 보여주었다(5).

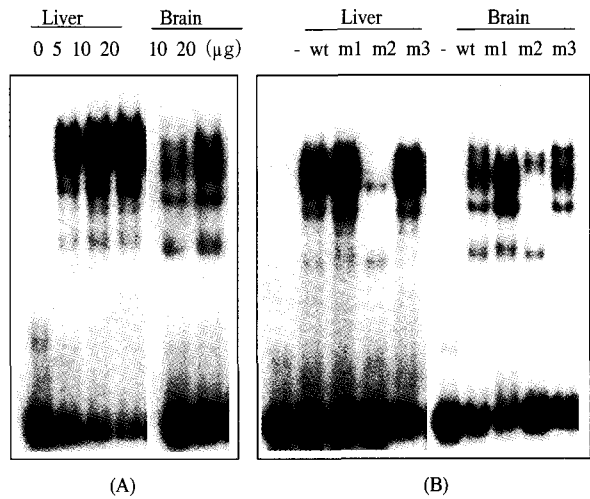


Figure 3. Binding of hepatic and brain nuclear proteins to the IGF-I FRE. Panel A, autoradiographs of EMSA performed on native gels were shown using different concentrations of nuclear extracts. Each reaction contained 4000ng of nonspecific poly(dI-dC). The five DNA-protein complexes are indicated as C1, C2, C3, and C4. FD stands for unbound or free DNA. Panel B, The wild-type FRE is indicated as wt. The FRE templates containing site-specific mutations in only the C/EBP β binding site overlapped with half of octameric core or the silencer motif are indicated as m2 or m3, respectively, and one containing nonspecific mutation as m1, and sequences are described under "Materials and Methods".

FRE를 인지하는 *trans-acting* factor들을 분석하기 위하여 FRE에 해당하는 oligonucleotide들을 이용하여 electrophoretic mobility shift 분석 (EMSA)을 실시하였다. 2개월 된 흰쥐의 간 또는 뇌조직에서 준비한 핵 추출물은 FRE에 결합하여 두 조직간에 유사한 pattern의 복합체 (complex) 4개 (C1과 C2, C3, 그리고 C4)를 형성하였다(Fig. 3A). 간 또는 뇌조직에서 추출한 핵단백질을 같은 농도로 사용하였을 때 형성된 DNA-단백질 복합체의 강도는 간 조직의 경우가 더 컸다. 이것은 FRE와의 복합체 형성에 관여하는 단백질들이 간조직에 더 풍부하게 존재함을 암시하고 있다.

네 가지 복합체의 결합부위의 정확한 위치를 확인하기 위하여 site-specific mutation을 가진 mutant oligonucleotide들 (m1, m2, 또는 m3)을 사용하였다(Fig. 3B). 잠재적인 C/EBP 결합부위인 TGCGAA T(18)를 CTGCAGG T로 변형시켰을

때(m2), 간 조직의 경우 C1과 C2, 및 C4 복합체가 완전히 사라지고 C3 복합체는 약하게 남아 있는 반면에, 뇌 조직의 경우는 네 개의 복합체가 완전히 사라지고 C1과 C2 복합체의 중간 위치에 새로운 복합체가 형성되어 있다. Silencer motif인 AAATAAA(22)를 GGGCGGG로 변형시켰을 때는 (m3) 간이나 뇌 조직 모두에서 네 개의 복합체들의 강도가 더 강하게 나타났다. C/EBP 결합부위 앞쪽에 비특이적인 변이를 가지고 있는 m1의 경우, 간 조직에서는 네 개의 복합체들이 더 강하게 나타났으나 뇌 조직에서는 C1이 사라졌고 C2-C4의 세 복합체의 형성이 더 강하게 나타났다. 이상의 결과들은 FRE와 간 또는 뇌 조직의 핵 추출물들이 결합하여 조직간 유사한 pattern의 DNA-단백질 복합체를 형성하지만 각 복합체의 형성에는 서로 다른 즉, 조직 특이한 단백질들이 관여할 것으로 추정된다.

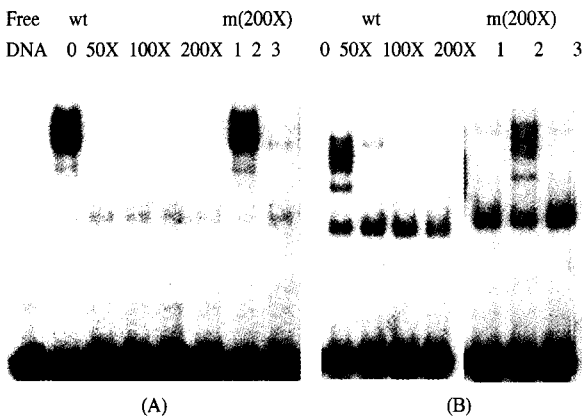


Figure 4. Competition EMSA was performed in the presence of 0, 50X, 100X, or 200X molar excess of unlabeled oligonucleotide FRE wild-type (wt) or mutants (m 1, 2, or 3). All lanes contained 5 or 10 µg of hepatic(A) or brain(B) nuclear protein, respectively.

야생형 FRE (wt)를 labeling하지 않고 50배, 100배, 그리고 200배의 몰 과량으로 첨가하여 EMSA를 하였을 때 생성된 간 조직의 핵 추출물과의 네 가지 복합체는 완전히 사라졌으므로 C1-C4의 형성은 sequence-specific하다는 것을 알 수 있다(Fig. 4A). 뇌 조직의 경우에 C1-C4 들은 사라졌지만 C1과 C2 사이에 생성된 새로운 복합체는 200배의 야생형 FRE (wt)로 경쟁시키더라도 남아 있는 것으로 보아 비특이적이거나 또는 뇌 조직 특이한 단백질에 의하여 생성된 것일 가능성을 배제하지 못한다(Fig. 4B). 비특이적인 변이나 silencer motif의 변이가 있는 mutant oligonucleotide들 (m1 또는 m3)을 200배 몰 과량 첨가하였을 때 C1-C4가 모두 사라졌으나 C/EBP 결합부위를 변형시킨 m2 oligonucleotide를 200배 몰 과량 첨가하더라도 네가지 복합체가 그대로 있는 것으로 보아 C1-C4복합체의 형성에는 다양한 C/EBP-like 단백질들이 동일한 DNA 결합 영역과 상호작용할 수 있음을 강하게 암시한다(Fig. 4).

FRE와 세가지 C/EBP isoform들과의 상호작용

DNA-단백질 복합체들 (C1-C4)이 전사인자인 C/EBP family member들에 의하여 형성되었는지를 알아보기 위하여 C/EBP 개개의 isoform에 특이한 합성 펩티드에 대하여 만들

어진 특수한 항체를 이용하여 EMSA를 시행하였다(Fig. 5). C/EBPa에 대한 항체와 간 조직의 핵 추출물은 C1과 C2 복합체들을 더 느리게 움직이는 형태로 전환하였으며 (supershift), C/EBPβ에 대한 항체는 C3와 C4를 인지하였다 (Fig. 5A). 뇌 조직의 경우, C/EBPa에 대한 항체가 C2만을, 그리고 C/EBPβ에 대한 항체는 C3와 C4의 일부를 인지하는 것으로 나타났는데(Fig. 5B), 이것이 뇌 조직의 특이한 결과 인지는 미래에 더 자세히 연구해야 한다.

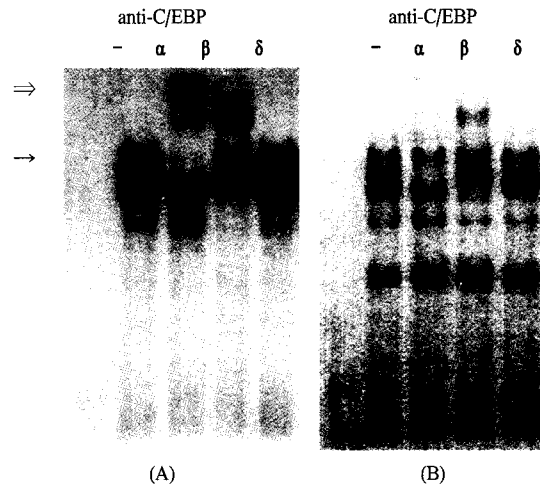


Figure 5. Immunological identification of protein complexes formed with the IGF-I FRE. EMSA was performed with hepatic(A) or brain(B) nuclearproteins from 2 month old rats and antibodies specific for the three isoforms of C/EBP. The thick and thin arrows denote the positions of DNA-protein complexes shifted by the specific antibodies.

이상의 결과들은 FRE에 결합하여 생성된 DNA-단백질 복합체들 (C1-C4)은 C/EBPa 및 C/EBPβ isoform들을 포함하고 있음을 보여 주었고 C/EBPδ에 대한 항체로는 supershift가 관측되지 않았으므로(Fig. 5) *in vivo* 간이나 뇌 조직에서는 C/EBPδ가 IGF-I의 발현에 중요한 요소가 아님을 암시하고 있다. IGF-I이 발현되는 신장조직에서 추출한 핵 단백질과 FRE를 반응시켰을 때 형성된 복합체에서는 C/EBPδ에 대한 항체에 의하여 supershift 현상이 관측되었으며 (data not shown), C/EBPδ가 급성기 반응동안에 α₁-acid glycoprotein 유전자의 발현을 유도하는데 간 조직이 아닌 신장 조직에서 중요한 역할을 하고, 조골세포에서 IGF-I 전사를 C/EBPδ가 활성화시킨다는 보고(18, 23)들에 의하면 조직에 따라 서로 다른 C/EBP isoform들이 동일한 C/EBP 결합 영역에 결합하여 유전자의 발현을 조절하는 것으로 사료된다.

FRE에 결합하는 C/EBP 단백질의 확인

이전 연구들은 여러 가지 크기의 C/EBPa (42-와 30-kD) 및 C/EBPβ (35-와 20-kD) isoform들이 지방 및 간 조직에서 발현됨을 보고하였다(17, 24, 25). 본 연구에서는 간이나 뇌 조직의 핵단백질에서 FRE에 결합하는 단백질의 분자량과 결합 활성을 알아보기 위하여 southwestern blotting 분석을 하는데 FRE oligonucleotide를 이용하였다(Fig. 6). 간 조직의 핵 추출물에서 42-, 38-, 및 35-kD의 띠가 나타났고 38-kD 띠의 강도가 다른 띠의 강도에 비하여 약하였다. 뇌 조직의 핵단

백질에서는 50-, 42-, 및 38-kD의 띠가 측정되었으며 42-kD 띠의 강도가 약하게 나타났다.

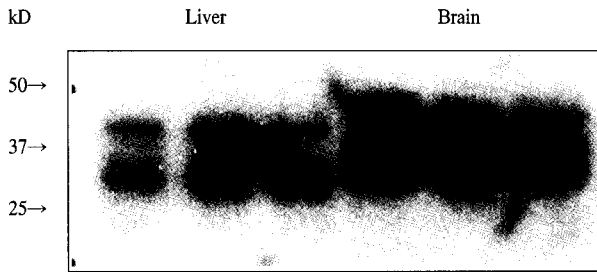


Figure 6. Southwestern analysis of liver or brain nuclear proteins that bind to the FRE of the IGF-I gene. Nuclear proteins (10 or 20µg) prepared from fresh livers or brains were subjected to SDS-PAGE, blotted onto PVDF membranes, and probed with 106 cpm of 32P-FRE oligonucleotide per ml as described in Materials and Methods. The locations of the molecular size standards are shown on the left.

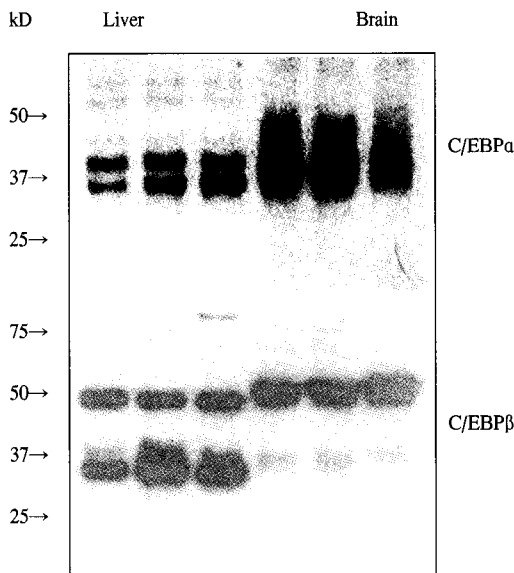


Figure 7. Western analysis of the levels of C/EBPα and C/EBPβ isoforms in liver and brain nuclei. Nuclear extracts (10 or 20µg, respectively) from liver or brain of 2 month old rats were loaded in individual lanes and subjected to SDS-PAGE. Immunoblots were incubated with monospecific polyclonal antibodies against either C/EBPα or C/EBPβ. Monoclonal anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase was used to detect antigen-antibody complexes in each immunoblot as described in Materials and Methods. The locations of the molecular size standards are indicated on the left of each panel.

C/EBP 단백질의 전체 양과 FRE에 결합하는 C/EBP 단백질의 종류를 확인하기 위하여 특이한 anti-C/EBP 항체들을 이용하여 western immunoblotting을 하여 C/EBPα와 C/EBPβ 단백질 양을 분석하였다(Fig. 7). Anti-C/EBPα 항체로 western immunoblotting한 결과, 42- 및 35-kD의 띠가 간 및 뇌 조직 모두에서 측정되었으며 두 가지 띠의 양은 비슷한 양으로 존재하였다. Anti-C/EBPβ 항체는 간 조직에서 48-, 38-, 및 35-kD의 세 개의 띠를, 뇌 조직에서는 50-과 38-kD의 두 개의 띠를 측정하였으며, p38^{C/EBPα}와 p38^{C/EBPβ}는 다른 크기의

C/EBP isoform보다 단백질 양이 적었다.

DNA-결합 활성 분석과 특이한 항체와의 상호작용에 의하여 측정된 p35^{C/EBPα}와 p48^{C/EBPβ}는 FRE에 결합하지 않는 것으로 나타났는데 이것들은 DNA-결합 활성이 없으므로 GADD153이나 CHOP 그리고 Id와 같이 negative regulator들로 작용할 가능성이 있다(26-28).

이상의 결과들을 종합해 볼 때 FRE에 간 조직의 핵 단백질이 결합하여 형성된 복합체 C1은 p42^{C/EBPα}가, C2는 p38^{C/EBPα}가, C3는 p35^{C/EBPα}와 p38^{C/EBPβ}, 그리고 C4는 p35^{C/EBPβ}로 이루어져 있고 뇌 조직에서 C2는 p42^{C/EBPα}가, C3와 C4는 일부가 p38^{C/EBPβ}로 이루어져 있음을 암시한다. 미래에는 각 복합체를 따로 분리하여 FRE에 결합해 있는 단백질을 추출한 후 그 단백질을 확인하는 실험이 시행되어야 한다.

결론적으로 본 실험에서는 IGF-I 유전자의 발현이 간 조직에서는 생후 증가한 반면에 뇌 조직에서는 생후 감소하는 것으로 나타나 조직에 따라 그리고 발달에 따라 다르게 조절됨을 확인하였고, 이러한 유전자의 발현을 조절하는데는 IGF-I exon 1에 존재하는 FRE와 C/EBP family member 중 여러 가지 크기의 C/EBPα 및 C/EBPβ isoform들의 상호작용이 중요한 역할을 하는 것으로 보여 주었다.

요 약

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) 유전자의 발현은 사람 및 쥐에서 두 개의 promoters (P1과 P2)로부터의 전사와 alternative RNA splicing 및 differential RNA polyadenylation 과 같은 복잡한 기전들에 의하여 조절되는데 조직에 따라 성장호르몬을 포함한 여러 요소들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 사람의 IGF-I 유전자 exon 1의 upstream에 존재하는 P1에 hepatocyte nuclear factor 1α와 CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) isoform 들이 결합하여 조직 및 발달 단계 특이한 발현에 중요한 역할을 할 것으로 제안되었지만, exon 1의 downstream sequence가 IGF-I 유전자의 조직 특이적 발현을 조절하는 지에 대하여는 연구되어 있지 않다.

연령이 다른 쥐의 간 및 뇌 조직에서 total RNA를 분리하고 solution hybridization/RNase protection 방법으로 분석하여 IGF-I 유전자의 발현이 태어난 후 간 조직에서는 점차적으로 증가하였지만 뇌조직에서는 감소하여 발달단계에 따라 조직 특이하게 발현되는 것을 확인하였다. IGF-I exon 1의 주요한 전사 개시점으로부터 아래쪽에 존재하는 C/EBP 결합부위를 포함하고 있는 cis-acting element에 해당하는 oligonucleotide 들과 간 및 뇌조직에서 분리한 핵단백질들을 이용하여 DNA-결합 활성을 가진 분자량이 다른 C/EBPα나 C/EBPβ 단백질들을 확인하였으며 southwestern 및 western immunoblotting 분석을 하여 간 조직의 핵 추출물에서는 42^{C/EBPα}, 와 p38^{C/EBPα}, p35^{C/EBPα}, p38^{C/EBPβ}, 그리고 p35^{C/EBPβ}가 IGF-I exon 1 oligonucleotide와 복합체를 형성하고 뇌 조직에서는 p42^{C/EBPα}과 p38^{C/EBPβ}가 복합체 형성에 관여하는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 FRE-C/EBP isoform 복합체 형성이 IGF-I 유전자 발현의 조직 특이적 조절에 중요한 역할을 할 것으로 제안한다.

감 사

이 논문은 1998년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Jones, J. I. and D. R. Clemmons (1995), Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions, *Endocr. Rev.* **16**, 3-34.
- Stewart, C. E. and P. Rotwein (1996), Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors, *Physiol. Rev.* **76**, 1005-1026.
- Froesch, E. R., M. A. Hussain, C. Schmid, and J. Zapf (1996), Insulin-like growth factor I: physiology, metabolic effects and clinical uses, *Diabetes Metab. Rev.* **12**, 195-215.
- 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 exon I, *Mol. Cell. Endocrinol.* **126**, 153-163.
- 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.
- 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.
- Delany, A. M. and E. Canalis (1995), Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells, *Endocrinology* **136**, 4776-4781.
- 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.
- Bui, T., C. Kuo, P. Rotwein, and D. S. Straus (1997), Prostaglandin A2 specifically represses insulin-like growth factor-I gene expression in C6 rat glioma cells, *Endocrinology* **138**, 985-993.
- 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.
- Thissen, J. P., J. M. Ketelslegers, and L. E. Underwood (1994), Nutritional regulation of the insulin-like growth factors, *Endocrine Rev.* **15**, 80-101.
- 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.
- Nolten, L. A., F. M. A. van Schaik, P. H. Steenbergh, and J. S. Sussenbach (1994), Expression of the insulin-like growth factor I gene is stimulated by the liver-enriched transcription factors C/EBP α and LAP, *Mol. Endocrinol.* **8**, 1636-1645.
- Nolten, L. A., P. H. Steenbergh, and J. S. Sussenbach (1995), Hepatocyte nuclear factor 1 α activates promoter 1 of the human insulin-like growth factor I gene via two distinct binding sites, *Mol. Endocrinol.* **9**, 1488-1499.
- Umayahara, Y., Y. Kajimoto, Y. Fujitani, S. Gorogawa, T. Yasuda, A. Kuroda, K. Ohtoshi, S. Yoshida, D. Kawamori, Y. Yamasaki, and M. Hori (2002), Protein kinase C-dependent, CCAAT/enhancer-binding protein β -mediated expression of insulin-like growth factor I gene, *J. Biol. Chem.* **277**, 15261-15270.
- Yiangou, M., S. G. Scott, J. P. Rabek, M. R. An, W. Xiong, and J. Papaconstantinou (2001), Effects of mercuric chloride on the regulation of expression of the acute phase response components α_1 -acid glycoprotein and C/EBP transcription factors, *Biochim. Biophys. Acta* **1518**, 47-56.
- 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.
- 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 receptor, *J. Biol. Chem.* **268**, 15681-15688.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* **162**, 456-459.
- An, M. R. (2002), Metabolic regulation of insulin-like growth factor-I expression, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 283-289.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cao, Z., R. M. Umek, and S. L. McKnight (1991), Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells, *Genes Dev.* **5**, 1538-1552.
- Ossipow, V. P., P. Descombes, and U. Schibler (1993), CCAAT/enhancer binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8219-8223.
- Benezra, R., R. L. Davis, D. Lockshon, D. L. Turner, and H. Weintraub (1990), The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA-binding proteins, *Cell* **61**, 49-59.
- Ron, D. and J. F. Habener (1992), CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant negative inhibitor of gene transcription, *Genes Dev.* **6**, 439-453.
- Carlson, S. G., T. W. Fawcett, J. D. Bartlett, M. Bernier, and N. J. Holbrook (1993), Regulation of the C/EBP-related gene *gadd153* by glucose deprivation, *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4736-4744.