

Molecular Characterization of Ischemia-Responsive Protein 94 (irp94) Response to Unfolded Protein Responses in the Neuron

Seung-Whan Kim¹, Kisang Kwon³, Kee-Sun Shin⁴, Seung-Ho Kim² and O-Yu Kwon^{3†}

¹Department of Emergency Medicine Chungnam National University Hospital, Taejeon 301-721, Korea.

²Department of Emergency Medicine, Yonsei University of Medicine, Seoul 120-752, Korea.

³Department of Anatomy College of Medicine Chungnam National University, Taejeon 301-747, Korea.

⁴Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea

The ischemia-responsive 94 gene (*irp94*) encoding a 94 kDa endoplasmic reticulum resident protein was investigated its molecular properties associated with unfolded protein responses. First, the expression of *irp94* mRNA was tested after the reperfusion of the transient forebrain ischemia induction at the central nervous system in three Mongolian gerbils. Second, *irp94* expression in PC12 cells, which are derived from transplantable rat pheochromocytoma cultured in the DMEM media, was tested at transcriptional and translational levels. The half life of *irp94* mRNA was also determined in PC12 cells. Last, the changes of *irp94* mRNA expression were investigated by the addition of various ER stress inducible chemicals (A23187, BFA, tunicamycin, DTT and H₂O₂) and proteasome inhibitors, and heat shock. High level expression of *irp94* mRNA was detected after 3 hours reperfusion in the both sites of the cerebral cortex and hippocampus of the gerbil brain. The main regulation of *irp94* mRNA expression in PC12 cells was determined at the transcriptional level. The half life of *irp94* mRNA in PC12 cells was approximately 5 hours after the initial translation. The remarkable expression of *irp94* mRNA was detected by the treatment of tunicamycin, which blocks glycosylation of newly synthesized polypeptides, and H₂O₂, which induces apoptosis. When PC12 cells were treated with the cytosol proteasome inhibitors such as ALLN (N-acetyl-leucyl-norleucinal) and MG 132 (methylguanidine), *irp94* mRNA expression was increased. These results indicate that expression of *irp94* was induced by ER stress including oxidation condition and glycosylation blocking in proteins. Expression of *irp94* was increased when the cells were chased after heat shock, suggesting that *irp94* may be involved in recovery rather than protection against ER stresses. In addition, *irp94* expression was remarkably increased when cytosol proteasomes were inhibited by ALLN and MG 132, suggesting that *irp94* plays an important role for maintaining the ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation) function.

Key Words: irp94, Chaperone, Endoplasmic reticulum, Ischemia, Neuron

서 론

허혈 (ischemia)이란 조직에 혈류공급이 중단되어서 세포 손상이 일어나는 것을 말하며 뇌허혈 (cerebral ischemia)은 뇌졸중 또는 중풍으로 잘 알려져 있다. 그리고 일단 허혈이 한번 일어난 후에 혈액이 재관류 (reperfusion)하여도 신경세포의 손상은 치명적이다. 뇌허혈은 혈류 결핍의 양상 및 부위에 따라 전뇌 허혈증 (global cerebral ischemia), 전뇌 허혈

증 (forebrain ischemia), 국소성 뇌허혈증 (focal cerebral ischemia) 등으로 나눌 수 있다. 실험동물 모델에서 일과성 전뇌 허혈 (transient forebrain ischemia)은 허혈에 특히 취약한 부위로 알려진 해마 (hippocampus)의 CA1 부위에 선택적 신경세포사 (selective neuronal death)를 유도하는 것으로 보고되고 있다 (Pulsinelli et al., 1982; Wolf et al., 1992). 이와 같은 신경세포사는 일과성 전뇌 허혈 후에 수 일간 전개되기 때문에, 급성 에너지 소실에 의한 단순 신경세포 괴사 (simple neuronal necrosis)와는 달리, 성숙 현상 (maturation phenomenon) 혹은 지연성 신경세포사 (delayed neuronal death)라고 부른다. 최근 분자생물학이 발달하면서 실험적 전뇌 허혈 유도 후의 유전자나 단백질 발현과 같은 신경세포의 스트레스 반응이 많이 연구, 보고되고 있다 (Morimoto et al., 1994). 즉, 일과성 전뇌 허혈 유도 후 immediate early genes,

*논문 접수: 2006년 5월 1일

수정재접수: 2006년 5월 17일

†교신저자: 권오유, (우) 301-747 대전광역시 중구 문화동 6, 충남대학교 의과대학 해부학교실

Tel: 042-580-8206, Fax: 042-586-4800

e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

apoptosis-related gene, epidermal growth factor (EGF), facio-genital dysplasia gene product (FGD), apoptosis promoter gene (APG), sulfated glycoprotein-2, interleukin-1 beta, heat shock protein 70 (hsp70), hsp72, fibroblast growth factor-receptor, endoplasmic reticulum protein 72 (Erp72), brain-derived neurotrophic factor, cyclooxygenase-2 등 많은 유전자들의 활성화 및 단백질 유도가 보고되었다 (Nowak, 1991; Blumenfeld et al., 1992; Takami et al., 1992; Takami et al., 1993; Wiessner et al., 1993; Yabuuchi et al., 1994; Higashi et al., 1995; Sommer et al., 1995; Chen et al., 1996; Ohtsuki et al., 1996; Mochizuki et al., 1998; Tsukahara et al., 1998; Xue et al., 1998; Kawahara et al., 1999). 그러나 이 같은 각종 인자들이 허혈 유도과정에서 어떤 역할을 하는지, 신경세포의 방어수단으로서 어떻게 작용하는지, 허혈의 진행과정에서 단백질 분해에 어떻게 작용하는지, 이웃한 신경세포에게 어떤 종류의 신호를 어떻게 전달하는지 등과 같은 문제는 아직까지 분명하게 밝혀져 있지 않고 있다 (Higashi et al., 1995). 이들 중 일부 유전자는 신경세포의 괴사를 촉진시키지만, 반면에 어떤 유전자들은 일과성 전뇌 허혈에서 신경세포의 생존을 돕기도 한다 (Mochizuki et al., 1998). 예를 들어 일과성 허혈 후에는 apoptosis-effector gene 인 *bax*의 발현이 증가하여 신경세포의 괴사를 유도하는 반면, *c-jun* 같은 암 유전자나 retinoic acid-responsive gene 등의 유전자는 허혈에 대한 내성에 관여한다는 사실이 보고되었다 (Sommer et al., 1995; Chen et al., 1996). 그러나 많은 연구 보고에도 불구하고 허혈로 유도되는 신경세포의 변성과 방어에 대해서는 아직도 분자생물학적인 기전이 명확히 밝혀지지 않고 있다.

1999년 Yagita에 의해 처음 보고된 ischemia-responsive protein 94 kDa (irp94)는 일과성 전뇌 허혈에 빠진 백서의 뇌에서 differential display-polymerase chain reaction (DD-PCR) 방법으로 분리된 유전자로서, hsp110 family에 속하지만 지금까지 보고된 것과는 전혀 다른 분자특성을 보인다 (Yagita et al., 1999, 2001). 백서의 정상조직 중 irp94의 발현이 확인되는 곳은 폐, 위, 간, 비장, 신장, 고환, 뇌로 알려져 있다. irp94는 백서의 총경동맥을 임시로 결찰하여 허혈을 유도했을 경우 15분째에 가장 강하게 발현하며, 10분 허혈 후 재관류를 시켰을 때에는 12시간째까지 발현이 증가한다 (Koh et al., 2000). 배양세포를 대상으로 irp94의 샤페론 (chaperone) 성질을 알아 본 ATP-depletion 실험에서는, ATP 결핍 2시간째부터 강한 발현을 보였으며, 소포체 (endoplasmic reticulum; ER) 샤페론으로 잘 알려진 Erp72보다 민감한 반응을 보여 허혈 상태가 또 하나의 소포체 스트레스로 작용함을 알 수 있었다. 최근의 Fischer rat thyroid epithelial cell line (FRTL-5 cells) 갑상선 배양세포를 사용한 연구에서는 irp94 발현이 소포체 스트레스에 의해서 유도되며 갑상샘 자극호르몬 (thyroid sti-

mulating hormone; TSH)에 의해 더욱 강하게 유도되는 것으로 밝혀졌다 (Kim et al., 2001). 지금까지의 irp94에 관해서는 유전자의 발현위치, 호르몬 및 소포체 스트레스에 의한 발현 등이 연구되었지만, 실제로 irp94가 허혈성 손상으로 유도된 세포성 외부환경의 변화에 반응하여 어떤 시기와 위치에 발현하는지는 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

뇌허혈에 대한 가장 대표적인 분자생물학적 연구는 세포 내 칼슘의 변화에 관한 것이다. 칼슘대사 항상성의 장애는 소포체 내의 스트레스 대항반응과 신호전달기능 이상에 관련된 일련의 반응으로 나타나, 정상적이지 못한 단백질 접힘 (folding)과 당쇄부가 (glycosylation)의 결합이 동시에 발생하여 이들이 스트레스 유발인자 (stress-inducible factor)가 되어 unfolded protein response (UPR)가 유도되어 각각의 스트레스 단백질 유전자가 작동하게 된다. 최근의 분자생물학적 기법에 기반을 둔 신경조직의 허혈성 손상연구들에서는 허혈로 인해 소포체 내의 환경변화가 일어나 소포체 내에서 합성되는 분비단백질의 접힘 및 조립 (assembly)이 비정상적으로 되는 것이 중요한 원인으로 밝혀지기 시작하였다. 이러한 관점에서 신경세포 내의 UPR에 의한 irp94 유전자의 발현변화가 허혈 유도와 진행과정에 어떤 영향을 미치는지를 분명하게 하는 것이 뇌허혈 손상의 기전을 이해하는데 큰 도움을 줄 것이다.

본 연구에서는 백서의 irp94 cDNA의 501 bp DNA 단편을 분자탐색자 (molecular probe)로 사용하여 Northern blotting 방법을 통해 irp94 mRNA의 열 충격 및 각종 소포체 스트레스 유발 약물들에 대한 발현 정도, mRNA의 세포 내 반감기 발현조절 특이성, 허혈 후 재관류 때의 뇌조직에서의 발현 변화, 프로테오좀 억제제에 대한 반응 등을 관찰하여 irp94 유전자가 신경세포의 소포체 스트레스에서의 역할을 규명하고자 하였다. 실험의 결과는 허혈손상과 관련된 irp94의 역할에 대한 정보제공과 함께 허혈손상의 진단과 치료에서 새로운 가능성을 여는데 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

1. Gerbil의 뇌허혈 유도

대동맥에서 분지되는 척추동맥이 없어서 뇌허혈 실험에 많이 사용되는 수컷 Mongolian gerbil을 1.5% 할로탄과 N₂O/O₂ (7:3)의 혼합 가스로 흡인 마취시킨 후 전경부를 정중 절개하여 수술 현미경하에서 양측 총경동맥을 노출하였다. 총경동맥을 협자 (clip)를 사용하여 30분 동안 결찰하여 일과성 전뇌 허혈을 유도하였다. 협자로는 약 60 g의 압력을 가진 신경외과에서 혈관수술에 사용하는 Sugita mini-temporary clip을 사용하였다. 마취상태에서 30분 간의 허혈과 3시간 동안의 재관류 과정을 거친 gerbil의 뇌를 신속하게 적출하여 대

뇌피질, 소뇌, 해마, 척수 부위에서 total RNA를 추출하였다. 대조군과 실험군으로는 각각 세 마리씩의 gerbil을 사용하였고 대조군은 허혈 및 재관류 과정을 제외한 모든 마취, 실험 조작을 실험군과 동일하게 시행하였다.

2. PC12 세포 배양 및 시약류

백서의 갈색세포종에서 유래한 PC12 세포를 37°C의 온도와 90% 이상의 습도가 유지되는 환경에서 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 50 units penicillin을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)에서 1주일에 3회 배지를 교환하면서 배양하였다. 실험에 사용하는 세포는 약 70%의 세포충실도 (confluence)를 유지하도록 0.5% horse serum과 0.25% fetal bovine serum이 포함된 DMEM에서 하루 동안 배양시켜 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약 중에서 특별하게 언급하지 않은 시약류는 모두 Sigma Chemical Co. (MO, USA)의 것을 사용하였다.

3. RT-PCR 및 Northern blotting

Gerbil의 뇌조직과 PC12 세포로부터의 total RNA 분리에는 RNazol™ B Kit (Tel-Test, Inc. TX, USA)를 사용하였다. 뇌조직은 약 5~10 mg의 조직을 RNazol™ B 800 µl와 함께 1.5 ml tube에 넣고 얼음 위에서 덩어리가 없어질 때까지 homogenization 시킨 다음 RNA 추출 용액 200 µl를 첨가하여 약 30초간 교반 후 상온에서 5분간 방치하였다. PC12 세포는 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 3회 세척 후 PBS 800 µl와 함께 상온에서 5분간 방치하여 용해시켰다. 이후 12,000 x g (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 얻은 500 µl의 상층액에 500 µl의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 15분간 방치 후 다시 12,000 x g (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 튜브의 바닥에서 백황색의 침전물을 얻었다. 이 침전물에 75% ethanol 500 µl를 첨가하고 잘 교반하여 7,500 x g (4°C)에서 8분간 원심 분리하여 RNA를 얻었으며 total RNA의 질량은 spectrophotometer로 측정하였다. RNA를 다룰 때는 항상 장갑을 착용하였고 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 물을 사용하였으며, -20°C에서 1 mM의 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (pH 7)를 함유한 멸균 증류수에 보관하였다.

Northern blotting을 위해 irp94 유전자 (GenBank accession No. AF077354)의 단편을 RT-PCR 방법으로 얻은 501 bp를 random primer kit로 사용하여 ³²P를 표식하여 molecular probe로 사용하였다. PCR primer로는 irp94 유전자의 coding region 중 PCR 산물이 501 bp가 만들어지도록 forward primer (20-mer); 5'-CAGGATTTGCCCTATCCAGA-3', reverse primer (20-mer); 5'-GTCATTCGGTTCCTTCTCCA-3'를 제작하였다. Gerbil 뇌조직의 total RNA를 주형으로 사용하여 전술한 두 길잡이를 이용하여 31회의 중합효소연쇄반응을 시행하여 501

bp DNA 단편을 얻었다. 이것을 TA 플라스미드 (Promega, WI, USA)에 ligation하여 JM109 competent bacteria 100 µl와 10 ng의 재조합 플라스미드를 섞은 후 얼음 위에 10분 방치하고, 42°C에서 50초 동안 열 충격을 준 다음 다시 2분 동안 얼음에 방치하였다. 이후 상온의 SOC 배지 900 µl를 첨가하여 60분간 37°C에서 225 rpm으로 원심 분리하여 JM109를 X-gal과 IPTG가 포함된 ampicillin agar plate에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양균주에서 white colony를 분리 배양하여 플라스미드의 유무를 확인하고, 제한효소로 소화시켜 우무 겔 (agarose gel)에 전기영동하여 501 bp의 irp94 DNA 단편을 가진 플라스미드임을 확인하고, 탐색자로 사용하기 위하여 플라스미드를 Wizard Miniprep Kit (Promega, WI, USA)로 대량 분리하였다. 삽입된 irp94 DNA의 재확인을 위해서는 DNA 염기순서분석을 시행하여 irp94임을 재확인하였다.

Total RNA를 변성시켜 formaldehyde gel에서 분획하였다. 즉, 50% formamide/2.2 M formaldehyde가 포함된 1×MOPS buffer (20 mM MOPS, 5 mM Sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0)에 RNA 20 µg을 용해시킨 다음 65°C에서 5분간 가열하여 상온에서 방치한 후 1% formaldehyde gel에서 분석하였다. 전기영동은 gel을 물로 여러 번 닦아서 formaldehyde를 제거하고 PVDF Western Blotting Membrane (Schleicher & Schuell BioScience, NH, USA)에 모세관 현상을 이용하여 하룻밤 동안 시행하였다. PVDF membrane은 5×SSC로 희석시킨 20×SSC [174 g NaCl (3 M), 88.2 g sodium citrate (0.3 M), pH 7]로 가볍게 세척하고, 68°C에서 2시간 동안 열을 가하여 RNA를 고정시켰다. 이후 Quick hybridization solution (Stratagen, WA, USA)으로 62°C에서 30분간 prehybridization 시키고, ³²P로 표식한 변성탐색자를 사용하여 62°C에서 12시간 동안 중합반응을 마친 다음 20×SSPE (1L) [175.3 g NaCl (3 M), 27.6 g NaH₂PO₄ (0.2 M), 40 ml 0.5 M EDTA]를 6×SSPE로 희석하여 0.5% SDS를 섞어 15분 동안 2회, 1×SSPE/0.5% SDS (37°C)로 2회 세척하고 0.1×SSPE/0.1% SDS로 60분간 60°C에서 세척하였다. 필름 감광은 Kodak-OMAT AR을 사용하여 -80°C에서 하룻밤 동안 실시하였다.

4. irp94 mRNA의 발현 특이성 및 세포 내 반감기

배양한 PC12 세포에 전사의 특이적 억제제인 actinomycin D (AD) 0.2 µg/ml, 유전암호해석의 특이적 억제제인 cycloheximide (CH) 2 µg/ml을 각각 2시간, 10시간 씩 처리한 후 total RNA를 얻어 Northern blotting을 시행하였다. 배양한 PC12 세포에 전사효소인 RNA polymerase II의 특이적 억제제인 5,6-dichlo-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) 25 µg/ml을 처리하여 mRNA의 합성을 저지시킨 후 8시간까지 2시간 간격으로 세포 내에 남아 있는 total RNA의 양을 Northern blotting으로 측정하여 시간에 따른 감소 정도를 통해 반감기

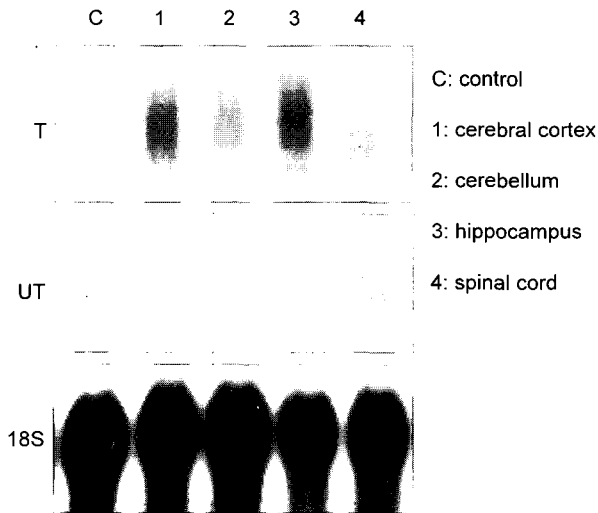


Fig. 1. Northern blot analysis of *irp94* mRNA in Mongolian gerbil brain. The upper panel in each Northern blotting shows *irp94* mRNA resulting ischemia induction, middle panel is without ischemia induction. The lower panel shows rat 18S rRNA as a loading control. C, control; line 1~4 ordinary, 1, cerebral cortex; cerebellum, hippocampus, spinal cord.

를 산출하였다.

5. *irp94* mRNA의 소포체 스트레스 유도 약물 및 열 충격에 의한 발현

PC12 세포에 소포체 내의 칼슘을 교란시켜서 단백질의 정상적인 접힘을 방해하는 Ca^{++} 이온운반체 (ionophor)인 A23187 10 μ M, 소포체에서 Golgi complex로 신생분비단백질의 이동을 차단하는 brefeldin A (BFA) 10 μ g/ml, 신생분비단백질의 당쇄부가 (N-glycosylation)를 방해하여 단백질 접힘을 방해하는 tunicamycin 2 μ g/ml, 강력한 환원제로서 신생단백질의 각 thiol기 (-SH)가 이황화결합 (-S-S-)으로 형성되는 것을 방해하는 dithiothreitol (DTT) 3 mM, 소포체 내의 산화 스트레스를 유도하여 정상적인 단백질의 접힘 및 조립을 방해하는 H_2O_2 23 μ g/ml의 5가지 소포체 스트레스 유도 약물을 처리하여 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 이후 차가운 PBS로 3회 세척한 후 RNAzol™ B Kit을 사용하여 total RNA를 얻어 Northern blotting을 시행하였다. 그리고 발현이 증가하는 약물에 대해서는 다양한 약물처리 시간에 따른 발현 양상을 알아보는 추가 실험을 하였다. PC12 세포에 45°C/15분의 열 충격을 가한 뒤에 37°C에서 0시간, 1시간, 5시간 경과 후 각각의 total RNA를 얻어 Northern blotting을 시행하였다.

6. 소포체와 세포질 간의 의사소통에서 *irp94* mRNA의 역할

PC12 세포의 세포질 프로테오솜 (proteasome) 억제제인

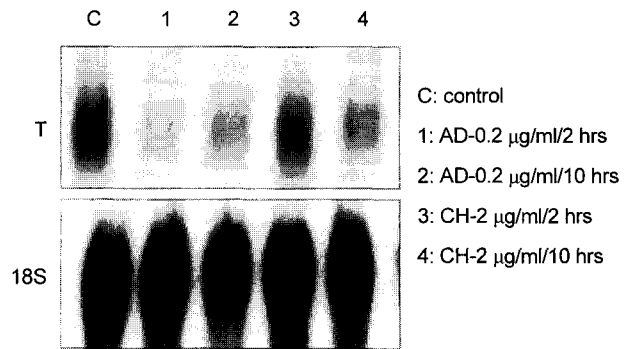


Fig. 2. Northern blot analysis showing the effects of actinomycin D and cycloheximide on *irp94* mRNA. Confluent PC12 cells were treated with actinomycin D or cycloheximide for indicated time, respectively. The lower panel shows rat 18S rRNA as a loading control. C, control; line 1-4 ordinary, AD-0.2 μ g/ml/2 h; AD-0.2 μ g/ml/10 h; CH-2 μ g/ml/2 h; CH-2 μ g/ml/10 h.

N-acetyl-leucyl-norleucinal (ALLN) 25 μ M과 methylguanidine (MG 132) 25 μ M를 각각 37°C에서 30분씩 처리하여 total RNA를 얻어 Northern blotting을 시행하였다.

결 과

일과성 전뇌 허혈/재관류 후 gerbil 뇌조직에서의 *irp94* mRNA 발현 부위를 조사하였다. 총경동맥의 일시 결찰에 의한 30분 간의 일과성 전뇌 허혈 및 3시간 재관류의 결과, 대조군에서는 특이적인 발현 양상을 관찰할 수 없었으나 실험군에서는 대뇌피질과 해마 부위에서 *irp94* mRNA의 강한 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). *irp94* mRNA의 발현 특이성을 알아보았다. 전사 억제제인 AD, 유전암호해독 억제제인 CH 처리 모두가 PC12 세포의 *irp94* mRNA 발현을 약화시켰다. 또한 이러한 발현 약화는 AD 처리군에서 더욱 현저하여 *irp94* mRNA의 발현은 유전암호해독 수준보다는 전사 수준에서 조절됨을 알 수 있었다. CH 처리군에서 보인 대조군보다 약한 *irp94* mRNA의 발현은 PC12 세포의 전체적인 유전암호해독 저하로 인한 부작용으로 사료된다 (Fig. 2). *irp94* mRNA의 세포 내 반감기를 측정하였다. *irp94* mRNA는 시간이 경과하면서 점점 약한 발현을 보였다. DRB 처리 전의 발현 정도를 100%로 하여 시간에 따른 발현 정도를 도표로 표시할 때, 세포 내 반감기는 약 5시간임을 알 수 있었다 (Fig. 3). 각종 소포체 스트레스 유도 약물에 대한 *irp94* mRNA의 발현을 조사하였다. PC12 세포는 5가지 약물 중 tunicamycin 처리에 가장 강한 *irp94* mRNA의 발현을 보였다. H_2O_2 에도 발현이 증가하였으나 나머지 약물에서는 대조군에 비해 괄목할 만한 발현을 보이지 않았다 (Fig. 4). 신생분비단백질의 당쇄부가 방해에 의한 *irp94* mRNA의 발현을 조사하였다. 신생단백질의 당쇄부가 (N-glycosylation)를 특이적으로 방해

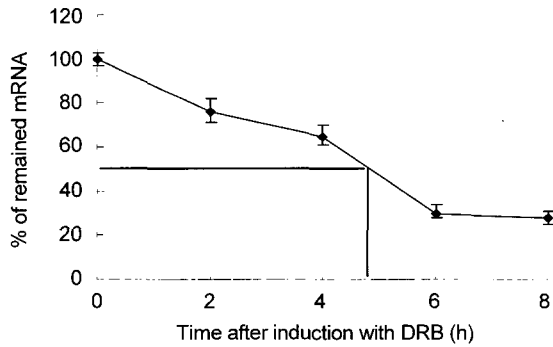
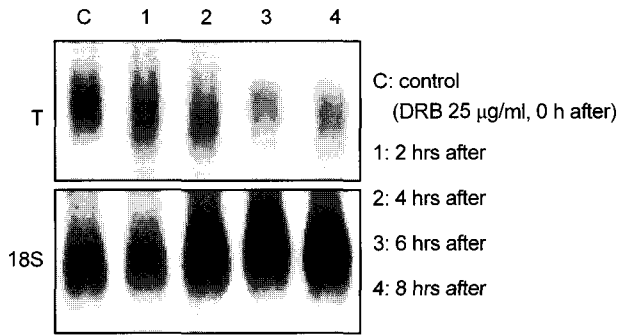


Fig. 3. Estimation of irp94 mRNA half life in a cell. Confluent PC12 cells were treated with DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole), which is a specific inhibitor of RNA polymerase II. Total RNA was purified after indicated times. The DRB treatment prevents new mRNA synthesis and permits the monitoring of intracellular residue mRNAs.

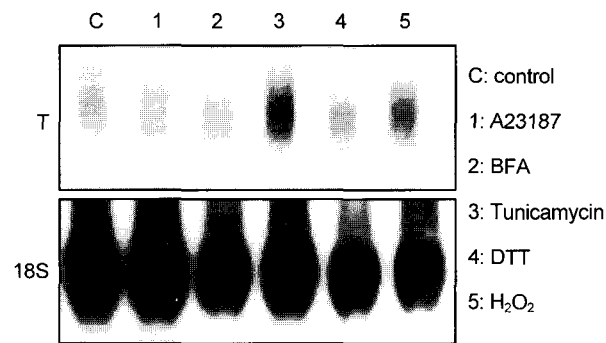


Fig. 4. The expression of irp94 against ER stress inducible drugs in PC12 cells. Confluent PC12 cells were treated with each ER stress inducible drug, and the purified total RNA was used in Northern blotting. T: Treatment of each ER stress inducible drug, 18S: 18S rRNA (control; lower panel).

하는 tunicamycin 4 μ l/ml를 1시간, 3시간, 5시간, 12시간 동안 처리하였을 때에 irp94 mRNA는 점점 강하게 발현되었다 (Fig. 5). 산화 스트레스에 대한 irp94 mRNA의 발현을 조사하였다. 대조군에 비해 H₂O₂ 처리 3시간 경과시 irp94 mRNA가 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 열 충격

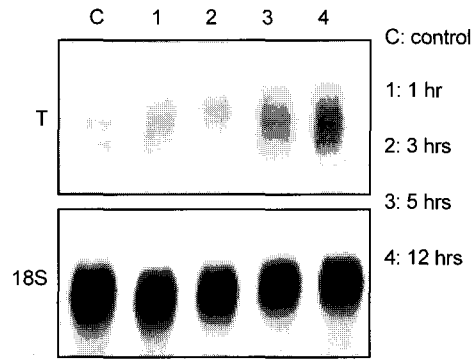


Fig. 5. The expression of irp94 against glycosylation inhibition in PC12 cells. Confluent PC12 cells were treated with N-glycosylation inhibitor of tunicamycin during indicated times, and purified each total RNA was used in Northern blotting. T: tunicamycin 4 μ l/ml treatment, 18S: 18S rRNA (control).

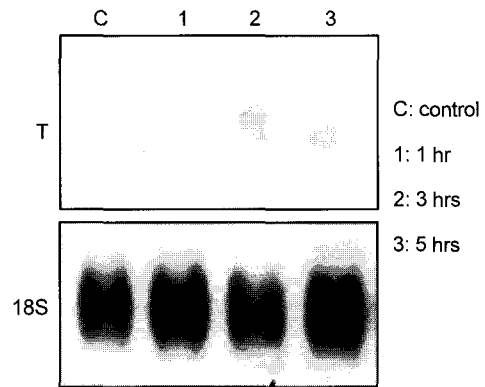


Fig. 6. The expression of irp94 against oxidative stress in PC12 cells. Confluent PC12 cells were treated with oxidative stress inducible H₂O₂ during indicated times, and purified each total RNA was used in Northern blotting. T: H₂O₂ 23 μ l/ml treatment, 18S: 18S rRNA (control).

에 대한 irp94 mRNA의 발현을 조사하였다. 열 충격 (45 $^{\circ}$ C에서 15분) 처리 직후에 비하여 일정한 시간 (1시간, 5시간)이 경과할수록 irp94의 발현은 더욱 강해졌다 (Fig. 7). 세포질 프로테오좀 억제제에 대한 irp94 mRNA의 발현을 조사하였다. 대조군에 비하여 ALLN, MG 132 투여군 각각에서 강한 발현이 관찰되었다 (Fig. 8).

고 찰

최근까지 허혈에 따르는 장기상해는, 에너지대사의 붕괴에 의한 일련의 세포죽음으로 생각되었다. 허혈에서 뇌조직뿐만 아니라 심장과 신장에서 열 충격 단백질 (heat shock protein; hsp)의 발현이 보고된 이래, 허혈에 의한 세포죽음을 허혈 스트레스에 대한 세포의 응답 현상으로 이해할 필요성이 제기되었다. 허혈은 여러 종류의 화학 스트레스로 구성된 복합

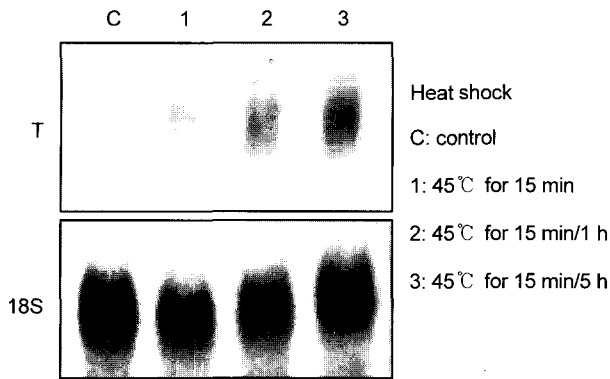


Fig. 7. The expression of irp94 against heat shock in PC12 cells. Confluent PC12 cells were treated with heat shock during indicated times, and chase 0 h, 1 h and 5 h at the control conditions. The purified each total RNA was used in Northern blotting. T: Heat shock treatment, 18S: 18S rRNA (control).

스트레스로서 각각 다른 세포 내 소기관들을 표적으로 하고 있다. 예를 들어, 생체반응으로 발생하는 활성산소와 자유기체 (free radical compound)는 DNA 장애를 유발하며 세포 내의 ATP 감소는 세포질의 단백질 변성을 유발하여 세포질의 기능을 상실하게 만든다. 이러한 허혈 스트레스에 대응하기 위하여 세포는 각각의 세포 내 소기관에서 다양한 스트레스 단백질의 발현을 유도한다.

신경세포의 허혈손상에 대한 방어 메커니즘은 아직 명확하게 밝혀지지 못했다. 지금까지의 연구를 살펴보면 세포 내 칼슘의 항상성 (homeostasis) 유지가 중요하여 세포 내 칼슘의 교란은 허혈손상과 깊은 관계를 가진다는 것을 알 수 있었다. 신경세포의 허혈손상시 항상성의 장애가 발생하는 곳은 세포질과 mitochondria의 칼슘이온의 농도변화에 기인한 세포의 항상성의 장애가 중요한 시발점으로 여겨졌지만, 최근의 연구에 의하면 정상적인 기능을 위하여 세포질보다 몇 배의 활동도 (activity)가 필요한 소포체 내의 칼슘농도의 저하로 인한 소포체단백질의 정상적인 접힘과 공정화 (processing)의 장애로 신경세포의 사멸이 유도된다는 것이 대체적인 통설이다 (Paschen and Doutheil, 1999; Paschen, 2000; Paschen, 2001; Paschen and Frandsen, 2001). 또한 현재까지의 분자세포생물학적 연구 결과에 따르면 허혈손상시 소포체 내의 환경변화 (단백질의 당쇄합성 저해, 단백질의 이황화결합 형성 저해, 칼슘고갈, 분비단백질의 소포체에서 Golgi 복합체로의 이동 저해, ATP 고갈유도)에 의한 소포체 내 분비단백질의 접힘 및 조합 과정의 불량이 결정적인 원인으로 밝혀지기 시작하였다. 이상의 과정에서 허혈 자극이 소포체의 기능 이상을 초래하게 되는 기전을 종합적으로 살펴보면 정상시에는 에너지가 소모되는 과정으로 세포질에서 소포체내강 (ER lumen)으로 칼슘이온을 역으로 이동시키는 능동적인 ER Ca²⁺-ATPase (SERCA)에 의해서 소포체와 세포질 사이에

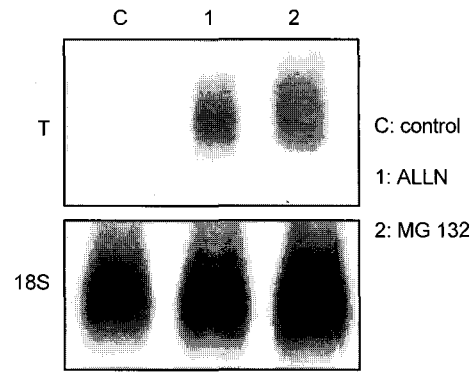


Fig. 8. The expression of irp94 against proteasome inhibitors in PC12 cells. Confluent PC12 cells were treated with proteasome inhibitors (Alln or MG 132) during indicated times, and purified each total RNA was used in Northern blotting. T: ALLN or MG 132 treatment, 18S: 18S rRNA (control).

급격한 칼슘이온농도의 차이가 존재하게 되는데 허혈손상이 발생하면 소포체 내의 칼슘항상성의 이상에 직접적인 영향을 끼치게 되고 소포체 내에 저장되어 있던 칼슘이 유리되면서 oxygen/glucose-deprivation (OGD) 작용에 의해서 세포질 내에 존재하는 칼슘이온의 활성도의 증가를 유발하여 허혈손상에 대한 일련의 다양한 유전자의 발현 및 억제작용을 촉발한다는 것이다 (Paschen, 2000).

일반적으로 세포 속에는 복잡한 구조를 가진 수 많은 단백질이 존재하며, 이들 중 대부분은 세포골격 단백질과 같이 ATP 분자가 있어야만 정상적인 구조를 가질 수 있다. 허혈이라는 복합 스트레스는 세포 내 에너지대사를 저해하여 ATP의 고갈, 혐기성 해당작용에 의한 산성도 (pH) 저하, 활성산소의 발생을 유도하고 이러한 자극이 더욱 세포 내 단백질 변성을 촉진시키게 된다. 이러한 환경변화에 대한 방어 인자로서 소포체 샤페론이 유도되어 세포 내 분비단백질과 막단백질의 비가역적인 변성을 억제하게 된다. 신경세포에 일과성 뇌허혈 손상이 가해진 상황에서, 허혈로 인한 유전암호해독과정의 억제 (shut-down)가 초기 재판류시에는 unfolded protein의 합성을 봉쇄하고 aggregation을 억제하여 신경세포를 보호하는 방향으로 나타나고, 재판류의 기간이 길어질수록 신경세포보호 단백질 (neuroprotective protein)인 XBP1^{proc}과 GRP78과 같은 유전자의 새로운 합성을 방해하여 신경세포에 해로운 작용을 보이는데 이와 같은 점에서 유전암호해독을 억제하는 작용은 궁극적으로 신경세포의 괴사를 유발하는 과정에서 신경세포의 보호작용과 독성작용을 다 함께 나타내는 양면적인 역할을 담당하게 된다 (Paschen 2003). 또한 최근의 연구에 의하면 소포체 스트레스가 유도되면 소포체 내에 축적되는 비정상적인 단백질들이 일정 비율로 분해된다는 개념인 endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD)이 확립되었다. 소포체 내에서 유전암호 해

독되는 단백질의 약 30%가 비정상적으로 접힌 (unfolded, misfolded 혹은 malfolded) 단백질이지만 내, 외부의 자극에 의해서 과도하게 축적되지 않으면 질병으로 이어지는 않는다. 그 이유는 소포체 내에서 정상적인 단백질로 접혀지지 못한 것들은 세포질의 프로테오솜과 긴밀한 관계를 유지하여 분해되어 버림으로써 일정 수준 이하로 유지된다. 이러한 ERAD 메커니즘이 정상적으로 작동되지 못하면 과도한 비정상적인 단백질이 소포체 내에 축적됨으로써 유발되는 endoplasmic reticulum storage disease (ERSD)가 된다. 본 연구의 대상인 irp94가 허혈 스트레스의 방어인자로서의 가능성을 보여준다 할 수 있다. 즉 irp94는 허혈이라는 세포의 손상 원인에 대해 신생단백질의 생산을 동반하는 역동적인 항스트레스 반응의 일부를 담당하고 있다.

본 연구 결과에서 얻은 irp94의 허혈손상에서의 역할은 다음과 같이 정리할 수 있다. irp94가 허혈 및 재관류 손상에 가장 취약한 부위인 대뇌피질과 해마 부위에서 강한 발현을 보인 점은 허혈 스트레스의 방어인자로서의 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있다. 그리고 irp94 유전자의 발현조절은 전사 단계에서 이루어지며 세포 내의 반감기는 약 5시간이라는 것도 알 수가 있었다. 소포체 스트레스 유도 약물 중에서 신생단백질의 당쇄부가형성을 특이적으로 억제하는 tunicamycin에 대해 가장 강한 발현을 보인 것은 당단백질이 소포체 내에서 정확한 구조를 가지기 위해서는 단백질에 부가되는 당쇄가 필수적이라는 것을 의미한다. 소포체 내에서 정상적인 단백질 접힘이 일어나지 않으면 이들이 계속적으로 축적됨으로 인하여 더욱 강한 샤페론의 발현이 유도되는 것으로 보인다. 허혈손상시에는 많은 자유기 (free radical)가 생산되고 소포체가 각종 스트레스를 받을 때도 자유기들이 생체 고분자들과 반응하여 피사 혹은 세포고사에 이르게 되나 실질적으로 산화 스트레스가 세포 내에서 어떤 기능을 조절하는 지는 정확히 알 수 없는 상태이다. 특히 PC12 세포에서는 아무 것도 확인된 것이 없었는데 이번 연구에서 강한 발현을 보인 것은 irp94의 세포고사와의 연관성도 유추해 볼 수 있게 하였다. 열 충격 후에 일정한 시간이 지날수록 강한 발현을 보인 것은 irp94가 소포체 스트레스로부터 세포를 보호하는 샤페론 기능 보다는 일단 변성이 된 혹은 일부 변성된 단백질의 수복 (repair)과정에 관여하기 때문이지 않을까 하는 추정을 가능케 한다. 정상적이지 못한 단백질 접힘을 보이는 분비단백질들이 세포 내에 계속 축적되는 것은 세포자신에게는 심각한 세포독성으로 작용한다. 일반적인 세포의 경우 약 30% 정도는 정상적이지 못한 단백질 접힘 현상이 소포체 내에서 일어난다고 한다. 그렇다면 이들 세포독성으로부터 어떻게 세포가 생존을 유지할 수 있을까 하는 것이 의문이다. 이에 대한 새로운 개념이 ERAD이다. 즉, 소포체 내에 축적되는 비정상적인 단백질의 축적이 세포질에 존재

하는 프로테오솜과 밀접한 관계를 가짐으로써 소포체 내를 항상 일정하게 유지한다는 것이다. 본 실험에서 확인된 것은 세포질에 존재하는 프로테오솜을 불활성화시켰을 때에 소포체 내에 존재하는 irp94의 발현이 증가한다는 사실이었다. 이는 소포체 샤페론인 irp94의 분자생리학적 특성을 고려할 때에 세포질의 프로테오솜의 불활성화로 인하여 소포체 내에 비정상적인 단백질 접힘을 보이는 단백질들이 분해되지 못하고 계속 축적되기에 이를 처리하기 위하여 irp94의 발현이 증가하는 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과는 irp94가 뇌허혈의 유도 및 방어기전에 어떤 기능을 가지는지를 알기 위한 기본적인 분자생물학적 정보를 제공한다. 이는 뇌허혈의 예방 및 치료제의 개발에 새로운 가능성을 줄일 것이다. 특히, 응급의학적으로 흔한 의상에 의한 뇌손상을 포함한 다양한 형태의 뇌 병변시에 관찰할 수 있는 반응인 spreading depression (SD)은 초점성 허혈손상시 조직손상의 정도를 심화시키고 손상조직에서 포도당이 풍부한 세포외액의 축적과 알칼리성의 부종액이 형성되면서 신경조직의 비가역적인 손상을 유도하게 된다 (Hermann et al., 1998; Paschen, 2003). 이와 같은 허혈성 손상조직에서 대사장애가 다르게 나타나는 영역별로 손상기전이 차이가 있으므로 단계별 손상에 초점을 맞추어야 효과적으로 신경조직손상을 최소화할 수 있는 동시에 손상기전을 억제할 수 있는 방법도 개발될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 충남대학교병원 공동연구비에 의하여 수행되었음.

REFERENCES

- Blumenfeld KS, Welsh FA, Harris VA, Pesenson MA. Regional expression of c-fos and hsp70 mRNA following hypoxia-ischemia in immature injury in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992. 12: 987-995.
- Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA et al. Expression of the apoptosis-effector gene, bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem.* 1996. 67: 64-71.
- Hermann DM, Mies G, Hossmann KA. Effects of a traumatic neocortical lesion on cerebral metabolism and gene expression of rats. *Neuroreport.* 1998. 9: 1917-1921.
- Higashi T, Nakai A, Uemura Y, Kikuchi H, Nagata K. Activation of heat shock factor-1 in rat brain during cerebral ischemia or after heat shock. *Mol Brain Res.* 1995. 34: 262-270.
- Kawahara N, Mishima K, Higashiyama S, Taniguchi N, Tamura

- A, Kirino T. The gene heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is stress-inducible: its role in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999. 19: 307-320.
- Kim SW, Yoo IS, Koh HS, Kwon OY. Ischemia-responsive protein (irp94) is up-regulated by endoplasmic reticulum stress. *Z naturforsch [C]* 2001. 56: 1169-1171.
- Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampus neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991. 11: 299-307.
- Koh HS, Moon IS, Lee YH, Shong M, Kwon OY. Expression of an HSP110 family, ischemia-responsive protein (irp94), in the rat brain after transient forebrain ischemia. *Z Naturforsch [C]* 2000. 55: 449-454.
- Mochizuki R, Takeda A, Sato N, Kimpara T, Onodera H, Itoyama Y, et al. Induction of midkine expression in reactive astrocytes following rat transient forebrain ischemia. *Exp Neurol.* 1998. 149: 73-78.
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Postischemic stress response in brain. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. pp. 553-575.
- Nowak TS Jr. Localization of 70 kDa stress protein mRNA induction in gerbil brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991. 11: 432-439.
- Ohtsuki T, Kitagawa K, Yamagata K, Mandai K, Mabuchi T, Matsushita K, et al. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA in gerbil hippocampal neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1996. 736: 353-356.
- Paschen W. Disturbances in calcium homeostasis within the endoplasmic reticulum may contribute to the development of ischemic cell damage. *Med Hypoth.* 1996. 47: 283-288.
- Paschen W, Doutheil J. Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J Cereb Blood Flow Metabol.* 1999. 19: 1-18.
- Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull.* 2000. 53: 409-413.
- Paschen W. Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium level: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium* 2001. 29: 1-11.
- Paschen W, Frandsen A. Endoplasmic reticulum dysfunction: a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J Neurochem.* 2001. 79: 719-725.
- Paschen W. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* 2003. 34: 365-383.
- Paschen W. Mechanism of neuronal cell death: diverse roles of calcium in the various subcellular compartments. *Cell Calcium* 2003. 34: 305-310.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982. 11: 491-498.
- Sommer C, Gass P, Kiessling M. Selective c-JUN expression in CA1 neurons of gerbil hippocampus during and after acquisition of an ischemia-tolerant state. *Brain Pathol.* 1995. 5: 135-144.
- Takami K, Iwane M, Kiyota Y, Miyamoto M, Tsukuda R, Shiosaka S. Increase of basic fibroblast growth factor immunoreactivity and its mRNA level in rat brain following transient forebrain ischemia. *Exp Brain Res.* 1992. 90: 1-10.
- Takami K, Kiyota Y, Iwane M, Miyamoto M, Tsukuda R, Ogarashi K, et al. Upregulation of fibroblast growth factor-receptor messenger RNA expression in rat brain following transient forebrain ischemia. *Exp Brain Res.* 1993. 97: 185-194.
- Tsukahara T, Iihara K, Hashimoto N, Nishijima T, Taniguchi T. Increase in levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and its promoters after transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurochem Int.* 1998. 33: 201-207.
- Yabuuchi K, Minami M, Katsumata S, Yamazaki A, Satoh M. An in situ hybridization study on interleukin-1 beta mRNA induced by transient forebrain ischemia in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994. 26: 135-142.
- Yagita Y, Kitagawa K, Taguchi A, Ohtsuki T, Kuwabara K, Mabuchi T, et al. Molecular cloning of novel member of the HSP110 family of genes, ischemia-responsive protein 94 kDa (irp94), expressed in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem.* 1999. 72: 1544-1551.
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Tanaka S, Hori M, Matsumoto M. Induction of the HSP110/105 family in the rat hippocampus in cerebral ischemia and ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001. 21: 811-819.
- Wiessner C, Back T, Bonnekoh P, Kohno K, Gehrmann J, Hossmann KA. Sulfated glycoprotein-2 mRNA in the rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993. 20: 345-352.
- Wolf PA, Cobb JL, D'Agostino RB. Epidemiology of stroke. In: *Stroke: pathophysiology, diagnosis, and management.* 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1992. pp. 23-27.
- Xue JH, Fukuyama H, Nonoguchi K, Kaneko Y, Kido T, Fuku-

moto M, et al. Induction of apg-1, a member of the heat shock protein 110 family, following transient forebrain ische-

mia in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998
247: 796-801.