

구리가 Ferroportin-1 유전자 발현 조절에 미치는 영향*

박보연·정자용[§]

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effect of Copper on the Regulation of Ferroportin-1 Gene Expression*

Park, Bo-Yoen · Chung, Jayong[§]

Department of Food & Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-710, Korea

ABSTRACT

Ferroportin-1 (FPN) is a transporter protein that is known to mediate iron export from macrophages. The purpose of this study was to investigate the effect of copper on the regulation of FPN gene expression in J774 mouse macrophage cells. J774 cells were treated with various concentrations of CuSO₄ and RT-PCR analyses were performed to measure the steady-state levels of mRNAs for FPN and divalent metal transporter 1 (DMT1, an iron importer). Copper treatment significantly increased FPN mRNAs in a dose-dependent manner, but didn't change the levels of DMT1 mRNA. Experiments with transcriptional inhibitor actinomycin D (0.5 µg/mL) revealed that copper treatment did not affect the half-life of FPN mRNAs in J774 cells. On the other hand, results from luciferase reporter assays showed that copper directly stimulated the promoter activity of FPN. In summary, our data showed copper induced FPN mRNA of macrophages via a transcriptional rather than post-transcriptional mechanisms. (Korean J Nutr 2009; 42(5): 434~441)

KEY WORDS: ferroportin-1, copper, macrophages.

서론

철분은 생체 pH에서 2가지 산화가 (Fe²⁺, Fe³⁺)를 가지는 전이 금속으로, 다양한 산화·환원 반응에 관여하며 거의 모든 생물의 생존에 요구되는 필수 영양소이다. 하지만, 과량의 철분은 fenton reaction에 의해 활성 산소종 생성을 촉진하여 지질 산화, 단백질 및 DNA 손상 등을 초래한다. 체내 철분의 과량 축적은 당뇨병, 심장병, 간 손상 및 이와 관련된 암의 발생, 알츠하이머와 파킨슨씨 병과 같은 각종 신경 퇴행성 질환 등 다양한 종류의 만성 질환의 유발과 관련됨이 잘 알려져 있다.¹⁾ 따라서 철분으로 인한 손상을 방지하기 위한 적정량의 체내 항상성 유지 (homeostasis)가 매우 중요하다. 철분은 다른 무기질과 대조적으로 뚜렷한 배설 경로가 없고, 소장에서의 철분 흡수와 대식 세포 (mac-

rophage)에서의 철분 재이용 (recycling) 과정을 조절함으로써 체내 항상성을 유지한다. 특히, 대식 세포는 식세포 작용을 통해 노쇠한 적혈구의 철분을 세포내에 저장해 두었다가 체내 철분 요구량이 증가되면 혈액으로 철분을 방출 (export)한다. 대식 세포로부터 하루에 공급되어지는 철분의 양은 약 20 mg으로 이는 하루 체내 철분 요구량의 90% 이상을 차지하며, 소장에서의 철분 흡수량 1~2 mg의 10배 이상에 해당한다. 따라서 대식 세포로부터의 철분 방출은 체내 철분 이동에 매우 중요한 역할을 한다.²⁾

Ferroportin-1 (FPN)은 세포막에서 철분의 세포외 방출에 작용하는 단백질로, 현재까지 알려진 유일한 iron exporter 단백질이다. Ireg1 (iron regulated protein 1), MTP1 (metal transport protein 1), 혹은 SLC40A1 (solute carrier family 40A1)이라고도 불리는 이 단백질은 9개의 transmembrane domain을 가지고 있으며, 세포막을 구성하는 대식 세포에서는 물론, 간, 소장, 신장 등 철분의 대사에 주요하게 관여하는 조직에서 다량 발현된다.³⁾ FPN 유전자는 2번 염색체 (2q32)에 위치하며 8개의 exon과 intron으로 구성되어 있고, FPN mRNA의 5'-UTR 부위에는 iron-responsive element (IRE)를 보유하고 있다.^{4,5)} FPN 유전자를 과량 발현 시킨 마우스 대식 세포주의 경우 적혈구 처

접수일 : 2009년 5월 27일 / 수정일 : 2009년 6월 26일
채택일 : 2009년 7월 14일

*This research was supported by grants from Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD) (KRF-2004-204-C00091).

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jchung@khu.ac.kr

리 후 철분의 방출이 70% 이상 증가됨이 보고 되었으며,⁶⁾ 반대로 FPN 발현을 결여시킨 knock-out mice는 간과 비장의 대식 세포에 철분의 과잉 축적이 발견되었다. 또한, 현재까지 사람에게서 FPN 유전자에 대한 missense 돌연변이가 약 20 종류가 보고 되었으며 이들 돌연변이를 보유하고 있는 경우 공통적으로 대식 세포의 철분 과잉 축적이 관찰된다.^{7,8)}

이상의 연구 결과들은 FPN이 대식 세포에서 철분의 세포의 방출에 필수적으로 요구되며 FPN 발현 조절이 체내 철분 항상성 유지와 밀접한 관련이 있음을 제시한다.

FPN 유전자의 발현 수준에 영향을 주는 요인으로 세포 내 철분 농도가 많이 연구되어 왔는데, 대식 세포에 철분을 처리하여 주었을 때 처리 농도와 시간에 비례하여 FPN mRNA 및 FPN 단백질이 증가하는 것으로 나타났다. 앞서 언급된 바와 같이 FPN mRNA는 5'-UTR에 IRE를 보유하고 있으므로, 세포내 철분 수준에 증가함에 따라 IRP (iron regulatory protein)의 IRE 결합 활성이 낮아지고, 이로 인해 FPN 단백질 수준이 증가하는 것으로 생각되고 있다.^{9,10)} 철분 이외에 저산소증 (hypoxia)과 같이 체내 철분 요구도가 높아지는 경우 FPN 발현이 촉진되는 것으로 알려져 있으며,¹¹⁾ 이와 반대로 염증을 유발하는 사이토카인의 분비는 FPN 발현 수준을 낮추는 것으로 보고되었다.¹²⁻¹⁴⁾ 본 연구자는 이전의 선행연구에서 구리의 첨가가 대식 세포에서 FPN mRNA 및 단백질 수준을 증가시킴을 보고한 바 있다.¹⁵⁾ 하지만, 아직까지 구리가 어떤 작용 기작을 통해 FPN 발현을 조절하는지 잘 알려져 있지 않다.

따라서, 본 연구는 FPN 유전자의 전사 과정 및 전사 후 조절 과정에 구리가 어떤 영향을 미치는 지 알아보고자 수행되었다.

재료 및 방법

세포 배양 및 처리

실험에 사용한 J774 세포와 HeLa 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였다. 배양액은 α -minimum essential medium (Gibco, USA)을 사용하였으며, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin을 포함시켜 5% CO₂와 95% 습도 조건으로 37°C에서 배양하고, 80~90%의 confluency에 도달하면 계대 배양 하였다.

구리가 FPN mRNA와 divalent metal transporter 1 (DMT1) mRNA의 수준에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서는 J774 세포를 6-well plate에 배양하고 약 60%

confluency에 이르렀을 때, 0, 25, 100 μ M CuSO₄를 20시간 처리하였다.

구리가 FPN mRNA의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서는 FPN mRNA의 발현을 최대한 높이기 위하여 J774 세포에 200 μ M의 CuSO₄를 선처리 하였다. 즉, J774 마우스 대식 세포를 6-well plate에서 10% FBS와 penicillin/streptomycin이 첨가된 α -MEM에 배양하고, 약 40%의 confluency에 이르렀을 때, 최종 농도가 200 μ M가 되도록 CuSO₄를 첨가하고 20시간 처리해 주었다. 이 후 Cu-군 (control set)은 PBS로 여러 번 세척해 남아있는 구리를 최대한 없애고 새로운 media로 갈아준 후 actinomycin D (0.5 μ g/mL)만 처리해 주고, Cu + 군은 PBS로 세척하고 새로운 media로 갈아준 후, 계속해서 같은 농도의 구리와 함께 actinomycin D (0.5 μ g/mL)를 처리해 주었다.

Reverse transcription (RT)-PCR

처리가 끝난 세포에 500 μ L의 TRIzol® reagent (Invitrogen, USA)를 첨가하여 제조사의 지침에 따라 total RNA를 추출하고, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Total RNA 1 μ g로부터 reverse transcription master premix (5X) (ELPIS biotech, Korea)를 이용해 cDNA를 합성하고, primer를 이용하여 MJ mini gradient thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 사용된 PCR 조건은 denaturation 95°C에서 15초, annealing은 65°C에서 30초 동안 실시하였고, 72°C에서 1분간 elongation 과정을 거쳤다. DMT1과 FPN 24 cycle, β -actin은 18 cycle로 실시하였다. PCR product는 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기 영동하였다. 각 band는 Gel Doc XR system (Bio-Rad, USA)으로 영상을 찍은 후 Quantity one 1-D analysis software (Bio Rad, USA)를 사용하여 정량하였다.

MTT assay

다양한 농도의 구리 처리가 J774 세포에 미치는 독성 여부를 파악하기 위하여, MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 환원 방법을 이용하여 J774 세포 생존률을 측정하였다.

즉, J774 세포를 96-well plates에 각 well당 5×10^3 개의 세포를 분주한 뒤 24시간 배양한 후, 0, 50, 100, 200 μ M CuSO₄을 20시간 처리하였다. 처리가 끝난 세포에 MTT 시약 (5 mg/mL in PBS)를 가하여 주고 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시킨 후 상층액을 제거하였다. 이후 DMSO (100%)를 분주하여 shaking 한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Luciferase reporter assay

Plasmids 제작

구리가 FPN 프로모터 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 FPN 프로모터 부위에 luciferase 리포터 부위를 부착한 plasmids를 이용하여 luciferase reporter assays를 실시하였다. 본 조사에는 FPN-Luc과 FPN/IRE-Luc의 두 가지 reporter gene construct를 사용하였다. FPN-Luc plasmid는 firefly luciferase gene 발현 벡터인 pGL3-Control vector (Promega, USA)에 FPN 5' upstream의 2514 bp와 5'-UTR 전체 (transcription start site로부터 +322 bp까지)를 subcloning시킨 plasmid로 IRE (+69 bp부터 +103 bp까지)를 포함하고 있다. FPN/IRE-Luc plasmid는 FPN-Luc 벡터에서 BamHI-SmaI 절단 부위를 제거하여 5'-UTR 전체 부위를 제외시킨 plasmid로 IRE를 포함하지 않는 plasmids이다 (Fig. 1). 이들 plasmid들에 대해 restriction enzyme mapping과 DNA sequencing을 통해 sequence를 확인하였다.

Transient cell transfection과 구리 처리

J774 세포는 대식 세포의 특성상 transfection 효율이 매우 낮은 문제가 있어, transfection 효율이 높은 세포로 대체하여 reporter assay를 실시하였다.¹⁶⁾ 즉, transfection 효율이 비교적 높고 endogeneous한 FPN 발현이 매우 낮은 장점을 갖고 있는 HeLa 세포를 6-well plate에서 배양한 후 세포가 약 40% 정도 confluent 되었을 때, FPN-Luc plasmid, FPN/IRE-Luc plasmid 혹은 empty vector인 pGL3 Control vector를 cationic liposome인 Lipofectamine (Gibco, USA) reagent를 이용하여 transfection 시켰다. Transfection 한 지 12시간이 지난 후 시점에서, CuSO₄, Fe-(NTA)₄ 혹은 desferrioxamine (DFO)를 첨가한 후 20시간 동안 배양했다. 처리가 끝난 세포는 얼음위에서 PBS로 1번 세척한 다음 차가운 1x lysis buffer (25 mM Tris-phosphate (pH 7.8), 2 mM DTT, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)를 넣고 흔들여 준 후 cell scraper로 세포를 긁어 microcentrifuge tube로 옮겨 담았다. 세포 용

액을 15초 이상 세게 vortexing 한 후 12,000 g, 4°C에서 2분간 원심분리한 후 상층액 (cell lysate)을 얻었다. Cell lysates를 luciferase substrate reagent (Promega, USA)와 반응시키고 luminometer로 10초간 luminescence를 측정하였고, cell lysates의 단백질 농도는 Bradford assay (Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였다. 각 샘플의 luciferase 활성은 cell lysates의 단백질 농도값으로 나누어 보정한 후, control에 대한 fold change로 나타내었다. 각 실험은 3회 반복하여 결과를 분석하였다.

통계분석

모든 실험의 결과는 Statistical Analysis System version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 분석하였다. 모든 결과는 평균 (mean)과 표준편차 (s.d.)로 표시하였으며, 실험군간의 차이는 ANOVA를 이용하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

결 과

구리가 FPN mRNA 수준에 미치는 영향

구리의 첨가에 의해 FPN mRNA 수준이 변화하는지 확인하기 위하여, J774 세포에 0, 25, 100 μ M CuSO₄를 20시간 처리한 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 FPN mRNA 수준을 측정하였다. 그 결과, 구리의 첨가 농도에 비례하여 FPN mRNA 농도가 유의적으로 증가하였으며 100 μ M CuSO₄ 처리한 경우 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 약 4배 가량 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 한편, 철분, 구리 등 2가 이온의 세포내 수입 (import)에 관여하는 것으로 알려진 transmembrane 단백질인 divalent metal transporter 1 (DMT1)에 대한 mRNA의 수준은 구리의 처리에 의해 변화하지 않았다. 또한, loading control로 사용된 β -actin mRNA의 수준은 구리의 처리 농도에 따라 다르지 않은 것으로 나타나, 본 RT-PCR 분석에서 각 lane마다 사용된 초기 total RNA의 양은 동일함을 제시한다.

한편, 구리의 처리가 J774 세포에 독성을 미치는 지 여부를 파악하기 위하여 MTT assay를 이용하여 구리 처리 후

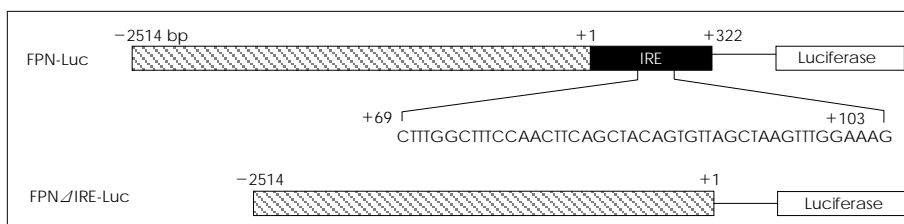


Fig. 1. Diagrams of two reporter DNA constructs used in the present study.

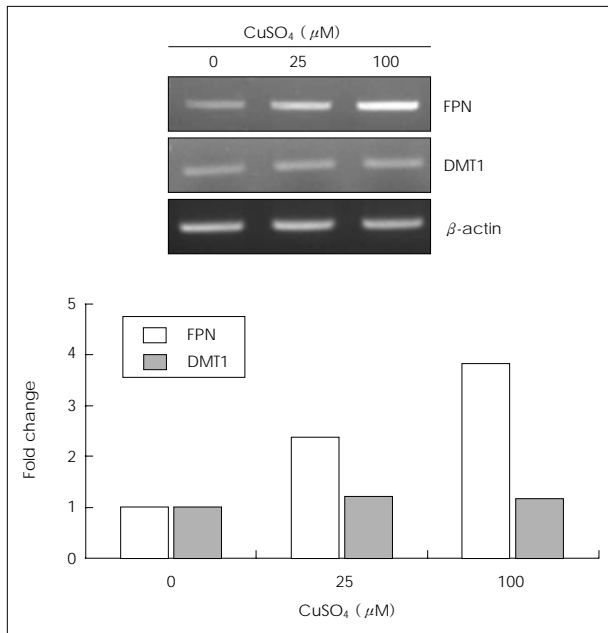


Fig. 2. Effect of copper on the levels of mRNA for ferroportin (FPN) and for divalent metal transporter 1 (DMT1) in J774 macrophage cells. RT-PCR analyses were performed to determine mRNA for FPN, DMT1, and β -actin (upper panel). Levels of FPN and DMT1 mRNA were normalized to β -actin mRNA levels (lower panel).

세포 생존률을 측정하였다. 그 결과, CuSO₄를 50, 100, 200 μ M 농도로 20시간 처리하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 세포 생존률에 유의적인 변화가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 또한, 현미경으로 관찰한 J774 세포의 형태에 위 조건의 구리 처리는 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이런 결과를 바탕으로, 최대 200 μ M 농도까지의 CuSO₄ 처리는 J774 세포에 독성이 없음을 확인하였고 0~200 μ M CuSO₄ 농도 범위에서 이후의 실험을 수행하였다.

구리가 FPN mRNA의 half-life에 미치는 영향

구리가 FPN mRNA의 분해 (degradation) 정도에 영향을 미치는 지 알아보기 위하여, 다음의 실험을 수행하였다. J774 세포의 FPN mRNA 기저 수준 (basal level)은 낮은 편이므로, 우선 J774 세포에 200 μ M CuSO₄를 20시간 선 처리하여 FPN mRNA 수준을 높게 유도하였다. 이 후 RNA polymerase inhibitor인 actinomycin D를 처리하여 새로운 mRNA의 생성을 억제한 상태에서 Cu의 처리 여부가 FPN mRNA의 분해 속도에 변화를 주는지 측정하였다.

그 결과, 구리를 첨가하지 않은 대조군의 경우, actinomycin D 처리 직후 (time 0)에 비하여 2, 6, 9시간 경과시 FPN mRNA 수준이 각각 93%, 87%, 63%로 감소하였다. 한편, actinomycin D와 200 μ M CuSO₄를 함께 처리한 경우도, 9시간 후의 FPN mRNA 수준이 처음 수준 (time 0)

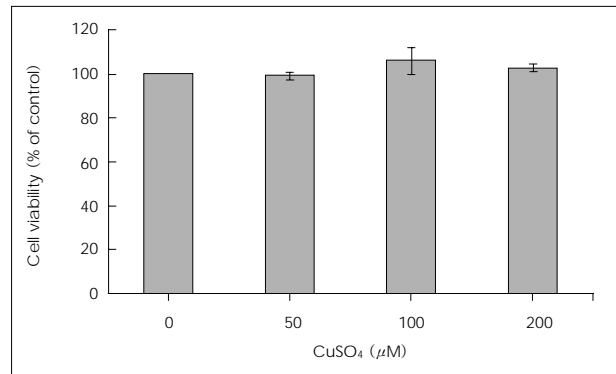


Fig. 3. Effects of varying doses of copper on the viability of J774 macrophage cells. Cell viability were measured by MTT assays. Results are the mean \pm s.d. of three independent experiments.

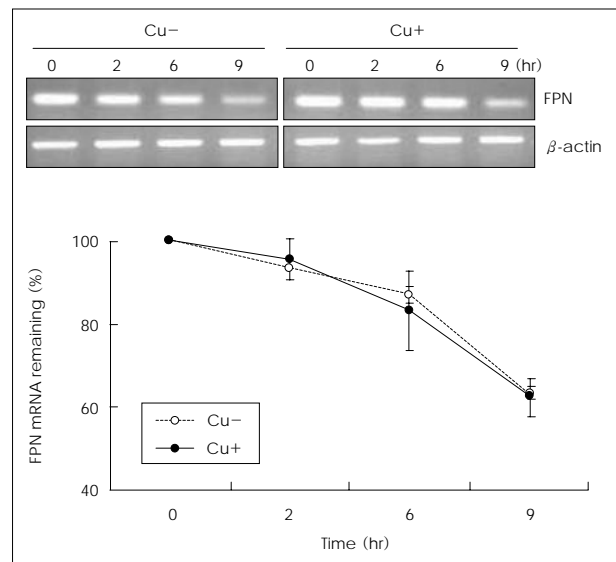


Fig. 4. Effects of copper on FPN mRNA stability in J774 macrophage cells. J774 cells were pretreated with 200 μ M CuSO₄ for 20 hr and thoroughly washed. Then actinomycin D (0.5 μ g/mL) was added with CuSO₄ (Cu+) or with medium alone (Cu-). Total RNA was isolated at 0, 2, 6, 9 hours after actinomycin D treatment, and RT-PCR analyses were performed (upper panel). The rate of FPN mRNA decay of untreated and copper-treated cells was determined after normalization with β -actin mRNA. Results are the mean \pm s.d. of three independent experiments.

의 ~60%로 감소하는 것으로 나타나, 구리의 첨가 여부는 FPN mRNA가 소멸되는 정도에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

구리가 FPN 프로모터의 활성에 미치는 영향

구리가 FPN 프로모터의 전사 개시 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 luciferase reporter assay를 수행하였다. 본 실험에서는 FPN 프로모터 -2.4 kb 부위와 5'-UTR 전체 부위를 포함하는 plasmid (FPN-Luc)와 FPN-Luc에서 5'-UTR에 위치하는 IRE 부위를 제외시킨 plasmid (FPN Δ IRE-Luc)의 두 가지 종류의 reporter construct를 사용

하였다.

우선, FPN-Luc을 삽입한 HeLa 세포의 경우, 100 μ M CuSO₄를 20시간 처리하였을 때 아무런 처리를 하지 않은 대조군 (control)에 비해 luciferase 활성이 2배 가량 증가하는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 한편, 철분을 처리한 경우 control에 비해 luciferase 활성이 약 3배 정도 증가하여 구리보다 그 증가 정도가 높은 것으로 나타났다. 반대로 철분 chelator인 desferrioxamine (DFO)을 처리하여 세포

내 철분 농도를 낮추었을 때는 luciferase 활성이 control의 60% 정도 수준으로 낮게 나타났다 (Fig. 5).

FPN 5'-UTR에 위치하는 IRE 부위를 제외시킨 FPN Δ IRE-Luc plasmid를 삽입된 HeLa 세포의 경우, 100 μ M CuSO₄를 20시간 처리하였을 때 luciferase 활성이 유의적으로 증가하였으며 그 증가 정도는 FPN-Luc plasmid를 삽입한 세포에서와 매우 비슷하게 나타났다. 이와 대조적으로 철분이나 DFO를 처리한 경우 FPN Δ IRE-Luc plasmid를 삽입된 HeLa 세포의 luciferase 활성에는 변화를 주지 않는 것으로 나타났다. Negative control 실험으로 FPN 프로모터 부위와 5'-UTR 부위가 subcloning되지 않은 empty vector인 pGL3 control vector가 삽입된 세포에서는 같은 조건의 CuSO₄, Fe-(NTA)₄, 및 DFO의 처리가 luciferase 활성에 영향을 주지 않음을 확인하였다 (Fig. 5).

고 찰

대식 세포는 노쇠한 적혈구로부터 철분을 흡수하여 저장하였다가 체내 요구량이 증가되면 혈액으로 철분을 방출 (export)함으로써 체내 철분 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 즉, 대식 세포는 체내 철분의 주요 저장 장소이며 철분의 혈액으로 방출에 가장 큰 부분을 차지한다. FPN은 대식 세포에서 철분의 세포외로의 방출에 작용하는 단백질로, 본 연구는 FPN의 유전자 발현 조절 과정에 구리가 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 수행되었다.

J774 대식 세포에 구리를 처리하였을 때, 처리 농도에 비례하여 FPN mRNA 수준이 증가함을 확인하였다. 이에 반해, 철분의 세포 내 이입에 관여하는 DMT1 mRNA 수준에는 구리의 처리가 영향을 미치지 않는 것으로 나타나, 구리가 FPN 유전자에 대해 특이적인 조절 작용이 있으며 이를 통해 철분의 세포외 방출 과정에 주로 영향을 주는 것으로 생각된다.

구리가 대식 세포의 FPN mRNA의 수준을 높이는 작용 기작을 규명하기 위하여, actinomycin D 처리를 이용하여 구리의 처리가 FPN mRNA 안정성에 미치는 영향을 살펴 보았다. 그 결과, 배양액에 구리를 첨가한 경우 그렇지 않은 대조군과 비교하여 FPN mRNA의 분해 속도에 유의적인 차이가 없었으며, 두 경우 모두 actinomycin D 처리 후 9시간이 지났을 때 처음 FPN mRNA 양의 60% 수준으로 감소하였다. 이로 볼 때, 앞서 RT-PCR 분석 결과 나타난 구리에 의한 FPN mRNA steady-state 수준 증가는 FPN mRNA의 half-life 증가에 의한 것이 아님을 알 수 있다.

한편, 본 연구에서 FPN 프로모터 부위에 의해 조절되는

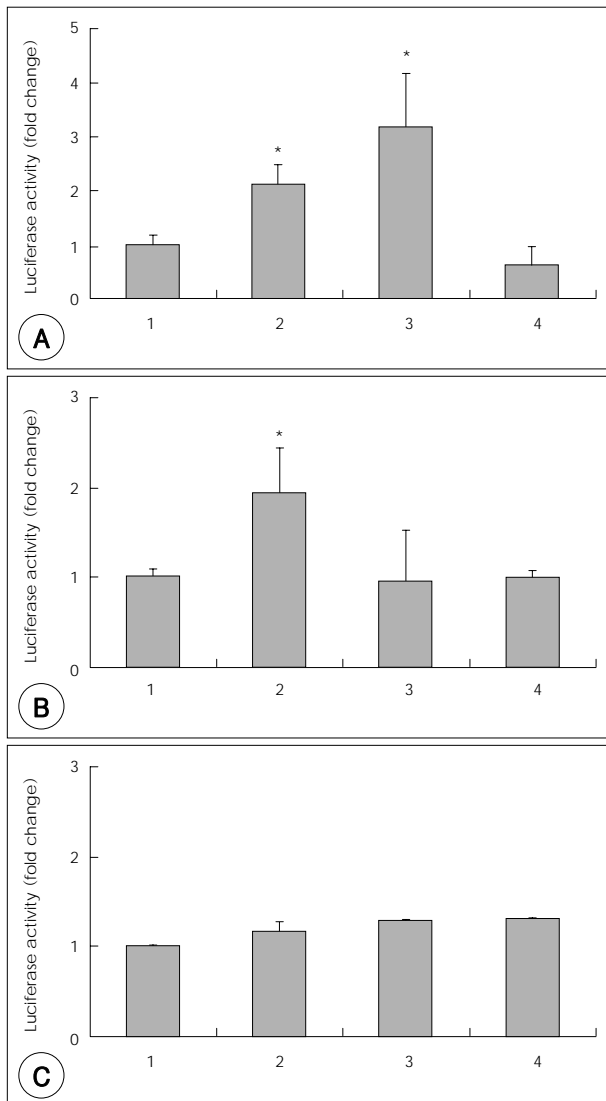


Fig. 5. Effects of copper on FPN promoter/5'-UTR driven luciferase reporter activity. HeLa cells were transiently transfected with A: FPN-Luc, B: FPN Δ IRE-Luc, or C: pGL3-control (empty) vector. Twelve hours later, cells were exposed to various agents for 20 h, and cell lysates were assayed for luciferase activity. Luciferase activities were normalized to protein concentration of cell lysates and expressed as fold changes compared to untreated controls. 1, untreated; 2, copper; 3, iron; 4, iron chelator. Results are the mean \pm s.d. of three independent experiments. *: $p < 0.05$ vs. untreated controls.

luciferase reporter construct를 이용한 실험 결과, 구리가 FPN 프로모터 활성을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, J774 세포에 transcription inhibitor인 actinomycin D를 선처리 하였을 때 구리에 의한 FPN의 유도 발현이 억제됨이 보고된 바 있다.¹⁵⁾ 따라서 이들의 결과를 종합해 볼 때, 구리는 대식 세포 FPN 유전자의 전사 과정 (transcription)을 촉진시켜 FPN mRNA의 새로운 (de Novo) 합성을 증가시키는 것으로 생각된다. 이는 대식 세포에서 철분, 인터페론- γ , lipopolysacchride 등의 인자들이 FPN의 전사 후 (post-transcription) 과정보다는 전사 과정에 대한 조절 효과가 있음을 보고한 선행 연구^{9,13)}들의 결과와 유사하다. 또한, 구리는 최근의 여러 연구에서 다양한 유전자의 발현을 조절하는 인자로 작용함이 보고되고 있다.¹⁷⁾ 한 예로 Muller 등¹⁸⁾은 microarray analysis를 통해 HepG2 세포에 구리를 24시간 처리했을 때 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 50여종의 유전자 발현이 상승되었음을 밝혔다. 뿐만 아니라, 쥐에게 구리가 보강된 식이를 공급한 후, 간에서의 여러 유전자 발현 정도를 정상 식이를 공급한 쥐와 비교한 in vivo 실험에서도 다양한 대사 과정에 관여하는 22종의 유전자 발현 정도가 증가한 것으로 나타났다. 특히 구리를 보강한 쥐의 경우 간에서 철분 대사의 조절에 관여하는 호르몬인 hepcidin에 대한 유전자 *HAMP1*의 발현 수준이 대조군에 비해 2.6배 증가한 것으로 나타나 구리가 철분 대사 관련 유전자의 발현 조절에 관여함을 보였다. 하지만, Muller 등¹⁸⁾의 연구에 사용된 microarray matrix에 FPN 유전자의 포함 여부는 확인할 수 없어 간세포 (hepatocyte)에서 구리가 FPN 유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지에 대한 추후 연구가 요구된다.

본 연구 결과 구리는 대식 세포에서 FPN 유전자의 프로모터 전사 개시 활성을 높이는 것으로 나타나, 구리가 FPN 유전자의 발현 조절에 관여하는 전사조절인자 (transcription factor)의 DNA 반응 부위 (response element)에 대한 결합 활성을 증가시킬 수 있음을 시사한다. 구리에 의해 DNA 결합 활성이 증가하는 전사조절인자의 예로는 metal transcription factor (MTF)가 잘 알려져 있다. 즉, MTF는 구리에 의해 DNA와의 결합 활성이 증가하므로, metallothionein 유전자와 같이 프로모터 부위에 metal response element (MRE)를 가지는 유전자의 전사를 증가시킨다.¹⁹⁾ 최근에는 Atox1 (antioxidant-1)이라는 전사조절인자의 활성이 구리에 의해 증가됨이 밝혀졌으며, 이로 인해 프로모터 부위에 Atox1 반응 부위를 가지는 extracellular superoxide dismutase (SOD3), cyclin D1 등의 유전자 발현이 구리에 의해 민감하게 조절됨이 보고되었다.²⁰⁻²²⁾ FPN 유

전자의 프로모터가 MTF 혹은 Atox1에 의해 활성이 변화하는지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

구리가 철분의 대사와 밀접하게 관련되어 있음은 매우 오래전부터 알려져 왔다. Hart 등²³⁾은 구리가 결핍된 랫트에서 철결핍성 빈혈인 저색소성, 소적혈구성 빈혈이 유발됨을 처음으로 보고했으며, 이후 다양한 실험 동물을 이용한 연구들에서, 구리의 결핍이 혈액의 철분 농도를 낮추 빈혈을 유발하지만, 이와는 역설적으로 간이나 spleen 등의 세망 내피계 대식 세포에는 오히려 철분을 과량 축적시킴이 발견되었다.^{24,25)} 이는 구리가 철분의 저장 조직에서 혈액내로의 방출에 결정적인 역할을 함을 제시한다. 이와 같이 구리가 철분의 대사 과정, 특히 세포내에서 혈액으로부터의 방출에 밀접하게 관련되어 있음은 오래전부터 인식되어 왔지만, 구체적인 작용 기작에 대해서는 정확하게 밝혀지지 않았으며, 이제까지의 선행 연구는 구리를 보조인자 (cofactor)로 사용하는 효소인 ceruloplasmin (Cp)의 역할에 대해서만 제한적으로 이루어져 왔다. Cp는 혈액 중에 순환하는 단백질로, 구리와 결합해 있을 때 ferrous ion (Fe^{2+})을 ferric ion (Fe^{3+})으로 산화시키는 ferroxidase 활성을 가지는 반면, 구리가 결핍되어 생기는 apo-Cp는 산화 효소로서의 활성이 없을 뿐 아니라, 쉽게 분해되어 혈중 효소 농도가 매우 낮아진다. 혈액 중 철분의 이동에 관여하는 단백질인 transferrin은 Fe^{3+} 과만 선택적으로 결합하므로, Cp의 ferroxidase 활성은 철분의 세포내로부터 혈액으로의 방출에 도움이 된다. 하지만, Cp의 결핍만으로 구리가 철분의 세포의 방출에 미치는 역할을 모두 설명하지는 못하는 것으로 보인다. 그 예로, 구리가 결핍된 랫트의 경우 심각한 철결핍성 빈혈을 유발되는 것과는 크게 대조적으로 Cp knockout mice의 경우 혈액 내 철분의 수준은 정상이며 헤마토크릿 치수나 헤모글로빈의 혈중 농도 역시 모두 정상 범위에서 크게 벗어나지 않았다.^{26,27)} 이와 비슷하게, Cp 유전자의 돌연변이로 인해 혈중 Cp 단백질이 없거나 농도가 매우 낮은 aceruloplasminemia 환자의 경우에도 심각한 빈혈 증상은 나타나지 않았다.²⁸⁾ 이는, 구리가 결핍된 경우와는 다르게 Cp 결핍의 경우에는 일정 혈액 수준을 유지하기 위한 대식 세포로부터의 철분의 방출이 일어남을 제시한다. 이밖에도, 철분의 세포외 방출에 Cp가 반드시 필요하지는 않음을 보여주는 연구 보고들이 있다. 예를 들어, apo-transferrin 존재 시 철분은 쉽게 자동 산화하여 Cp의 작용을 요구하지 않았다.²⁹⁾ 또 다른 몇몇 연구에서 K562세포나 HepG2세포에서 철분의 방출이 Cp에 의해 촉진되지 않음을 보였으며 실험 조건에 따라서는 Cp의 첨가가 오히려 철분의 세포내로의 흡수를 돕는 것으로 나타났다.^{30,31)} 또한, Sarkar 등³²⁾은

세포가 hypoxic한 조건에 처했을 때에만 제한적으로 Cp이 철분의 방출을 촉진시키는 것으로 보고했다. 이상의 기존 연구들을 요약하면, Cp의 보조인자로서의 역할과는 독립적으로 구리가 철부의 세포외 방출에 작용함을 알 수 있다. 본 실험에서 나타난 구리에 의한 FPN 발현 수준의 증가는 구리가 철분 방출에 관여하는 새로운 경로를 제시하며 이에 주목할 필요가 있다.

요 약

본 연구는 J774 대식세포에서 FPN 유전자 발현 조절에 구리가 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행되었으며 그 결과는 다음과 같다.

J774 대식 세포에 구리를 처리하였을 때, iron exporter FPN의 mRNA 수준이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 반면, iron importer DMT1의 mRNA 수준은 구리 처리에 의해 영향을 받지 않았다. Actinomycin D를 이용하여 mRNA 합성을 억제한 상태에서 FPN mRNA 분해 정도를 시간별로 추적한 결과, actinomycin D 처리 후 9시간 경과시 FPN mRNA 수준이 처음 수준의 약 60% 정도로 감소하였다. 배양액에 구리를 첨가한 경우에도 FPN mRNA의 분해 정도는 아무것도 처리하지 않은 대조군과 유의적인 차이가 없었으며, 이로 볼 때 구리는 FPN mRNA의 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 한편, reporter assay 실험 결과 구리의 첨가는 FPN 프로모터 활성을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타나, 구리가 FPN mRNA의 전사 과정을 직접적으로 촉진함을 알 수 있었다. 또한, FPN 5'-UTR에 위치하는 IRE (iron response element)의 존재 여부는 구리에 의한 FPN 전사 개시 활성에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 이로 볼 때 구리는 철분과는 독립적인 작용 기작에 의해 FPN 유전자 발현을 조절하는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 구리는 대식 세포에서 전사 개시 과정을 활성화함으로써 농도 의존적으로 FPN 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각되며, 이는 구리가 철분의 대사에 미치는 새로운 작용 기작을 제시한다. 앞으로, 구리와 철분의 상호 작용이 FPN의 철분 및 다른 무기질 이온의 세포 내·외 수송 (transport)에 어떤 영향을 미치는지에 대한 기능적 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Conrad ME, Umbreit JN. Iron Absorption and Transport-an Update. *Am J Hematol* 2000; 64 (4) : 287-298
- 2) Ganz T, Nemeth E. Regulation of Iron Acquisition and Iron Distribution in Mammals. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763 (7) : 690-699
- 3) Chua AC, Graham RM, Trinder D, Olynyk JK. The Regulation of Cellular Iron Metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007; 44 (5-6) : 413-459
- 4) Abboud S, Haile DJ. A Novel Mammalian Iron-Regulated Protein Involved in Intracellular Iron Metabolism. *J Biol Chem* 2000; 275: 19906-19912
- 5) Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive element/iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 197-213
- 6) Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron Release from Macrophages After Erythrophagocytosis is Up-Regulated by Ferroportin 1 Overexpression and Down-Regulated by Hpcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (5) : 1324-1328
- 7) Beutler E. Hemochromatosis: Genetics and Pathophysiology. *Annu Rev Med* 2006; 57: 331-347
- 8) Pietrangelo A. Hemochromatosis: An Endocrine Liver Disease. *Hepatology* 2007; 46 (4) : 1291-1301
- 9) Knutson MD, Vafa MR, Haile DJ, Wessling-Resnick M. Iron Loading and Erythrophagocytosis Increase Ferroportin 1 (FPN1) Expression in J774 Macrophages. *Blood* 2003; 102 (12) : 4191-4197
- 10) Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Haile DJ, Pietrangelo A. The Role of the Iron Responsive Element in the Control of ferroportin1/IREG1/MTP1 Gene Expression. *J Hepatol* 2003; 39 (5) : 710-715
- 11) McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Mol Cell* 2000; 5: 299-309
- 12) Liu XB, Hill P, Haile DJ. Role of the Ferroportin Iron-Responsive Element in Iron and Nitric Oxide Dependent Gene Regulation. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29 (3) : 315-326
- 13) Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-Mediated Regulation of Iron Transport in Human Monocytic Cells. *Blood* 2003; 101 (10) : 4148-4154
- 14) Yang F, Liu XB, Quinones M, Melby PC, Ghio A, Haile DJ. Regulation of Reticuloendothelial Iron Transporter MTP1 (Slc11a3) by Inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277 (42) : 39786-39791
- 15) Chung J, Haile DJ, Wessling-Resnick M. Copper-Induced Ferroportin-1 Expression in J774 Macrophages is Associated with Increased Iron Efflux. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101 (9) : 2700-2705
- 16) Sareila O, Hämäläinen M, Nissinen E, Kankaanranta H, Moilanen E. Orlistat inhibits activation of inflammatory transcription factors nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription 1 and decreases inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in response to inflammatory stimuli. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324 (2) : 858-866.
- 17) Gonzalez M, Reyes-Jara A, Suazo M, Jo WJ, Vulpe C. Expression of Copper-Related Genes in Response to Copper Load. *Am*

1) Conrad ME, Umbreit JN. Iron Absorption and Transport-an Up-

- J Clin Nutr* 2008; 88(3): 830S-834S
- 18) Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LW. Gene Expression Profiling of Liver Cells After Copper Overload in Vivo and in Vitro Reveals New Copper-Regulated Genes. *J Biol Inorg Chem* 2007; 12(4): 495-507
 - 19) Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. *J Nutr* 2000; 130(5): 1085-1088
 - 20) Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of Antioxidant-1 in Extracellular Superoxide Dismutase Function and Expression. *Circ Res* 2005; 96(7): 723-729
 - 21) Itoh S, Ozumi K, Kim HW, Nakagawa O, McKinney RD, Folz RJ, Zelko IN, Ushio-Fukai M, Fukai T. Novel Mechanism for Regulation of Extracellular SOD Transcription and Activity by Copper: Role of Antioxidant-1. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(1): 95-104
 - 22) Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, Akram K, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T. Novel Role of Antioxidant-1 (Atox1) as a Copper-Dependent Transcription Factor Involved in Cell Proliferation. *J Biol Chem* 2008; 283(14): 9157-9167
 - 23) Hart EB, Steenbock H, Waddell J, Elvehjem CA. Iron in Nutrition. VII. Copper as a Supplement to Iron for Hemoglobin Building in the Rat. 1928. *J Biol Chem* 2002; 277(34): e22
 - 24) Owen CA Jr. Effects of Iron on Copper Metabolism and Copper on Iron Metabolism in Rats. *Am J Physiol* 1973; 224(3): 514-518
 - 25) Williams DM, Kennedy FS, Green BG. Hepatic Iron Accumulation in Copper-Deficient Rats. *Br J Nutr* 1983; 50(3): 653-660
 - 26) Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted Gene Disruption Reveals an Essential Role for Ceruloplasmin in Cellular Iron Efflux. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(19): 10812-10817
 - 27) Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, Takeda S. Quantitative Evaluation of Expression of Iron-Metabolism Genes in Ceruloplasmin-Deficient Mice. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588(3): 195-202
 - 28) Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 439-458
 - 29) Bates GW, Workman EF Jr, Schlabach MR. Does Transferrin Exhibit Ferroxidase Activity? *Biochem Biophys Res Commun* 1973; 50(1): 84-90
 - 30) Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL. Role of Ceruloplasmin in Cellular Iron Uptake. *Science* 1998; 279(5351): 714-717
 - 31) Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, Tripoulas NA, Fox PL. Ceruloplasmin Ferroxidase Activity Stimulates Cellular Iron Uptake by a Trivalent Cation-Specific Transport Mechanism. *J Biol Chem* 1999; 274(2): 1116-1123
 - 32) Sarkar J, Seshadri V, Tripoulas NA, Ketterer ME, Fox PL. Role of Ceruloplasmin in Macrophage Iron Efflux during Hypoxia. *J Biol Chem* 2003; 278(45): 44018-44024