

Transcriptional Regulation of MicroRNA-17 by PPAR γ in Adipogenesis

In-Seon Bae¹, Hyun-Ji Kim¹, Ki Yong Chung², Inho Choi³ and Sang Hoon Kim^{1*}

¹Department of Biology, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Hanwoo Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Pyeongchang 232-950, Korea

³School of Biotechnology and Bovine Genome Resources Bank, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Received November 22, 2013 / Revised February 13, 2014 / Accepted February 18, 2014

MicroRNAs comprise a family of small noncoding RNAs that modulate physiological processes, including adipogenesis. MicroRNA-17 (miR-17) promotes adipocyte differentiation and enhances lipid accumulation. The transcriptional regulation of miR-17 during adipogenesis remains unknown. In this study, we investigated whether miR-17 is a target of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), which is a key regulator of adipogenesis. The levels of miR-17 and the expression of PPAR γ increased after the induction of adipocyte differentiation. Three putative peroxisome proliferator response elements (PPREs) were identified in the miR-17 promoter region. Using chromatin immunoprecipitation and luciferase reporter assays, we observed the interaction of PPAR γ with the miR-17 promoter. Mutagenesis experiments showed that the -677/-655 region of the miR-17 promoter could function as a PPRE site. These results suggest that PPAR γ is essential for transcriptional activation of the miR-17 gene, thereby contributing to understanding the molecular mechanism of adipogenesis in adipocytes.

Key words : Adipogenesis, microRNA, peroxisome proliferator-activated receptor γ , 3T3-L1 cells

서 론

비만은 체내 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다 섭취할 경우 에너지 불균형으로 발생하는 대사성 질환으로 제 2형 당뇨병, 심혈관계 질환, 암 등의 여러 성인병을 유발시킬 가능성이 높은 위험 요소로 지목되고 있다[12]. 비만은 지방세포의 과도한 분화와 중성지방의 체내 축적 등에 의해 발생한다[8, 19]. 지방세포의 분화 과정은 유전자 발현 변화에 의해 일어나는 복합적인 과정으로 지방세포의 비대 및 지방구 축적에 의하여 유도된다[13].

Peroxidase proliferation activated receptor γ (PPAR γ)는 retinoic acid 수용체인 retinoid X receptor α (RXR α)와 heterodimer를 형성하여 표적 유전자의 프로모터 부위에 위치한 PPAR responsive element (PPRE)로 알려진 DR1 (5'-AGGTCA-3') 부위에 결합하여 표적 유전자의 발현을 증가시킨다[1]. 다른 핵수용체인 전사인자와 마찬가지로 PPAR 단백질도 리간드와 결합하면 표적 유전자의 전사 활성을 촉진시킨다[5]. PPAR의 리간드로는 지방산 등이 알려져 있으며 합성 리간드로는 thiazolidinediones이 주로 사용되고 있다. 지방세포의 분

화 유도는 CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs)와 PPAR γ 에 의해 조절된다[2, 16]. 지방세포의 분화 초기에 전사인자인 C/EBP β 와 C/EBP δ 가 먼저 발현하면 이를 통해 지방분화의 중추적인 역할을 하는 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 유도되어 상호작용하면서 상승효과를 일으켜 fatty acid binding protein 4 (FABP4), lipoprotein lipase, fatty acid synthetase 등의 지방분화 마커 유전자들의 발현을 촉진한다[1, 3].

MicroRNAs는 21-25개의 뉴클레오티드를 함유한 non-coding RNAs로 세포질에서 다른 유전자의 발현을 조절하여 세포의 분화, 증식, 세포사멸, 대사 등 다양한 생명현상에 직·간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며, 몇몇 microRNA들은 지방분화 과정에도 참여한다. 예를 들어, miR-103과 miR-143은 간접적으로 PPAR γ , FABP4와 GLUT4 등 지방분화를 촉진하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 지방전구세포의 분화를 유도한다[4, 18]. 또한, miR-26도 지방분화를 촉진한다고 알려져 있다[14]. 이와는 반대로, let-7a와 miR-27은 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 제어하여 지방분화를 억제시킨다[11, 15]. 이렇게 microRNA들은 지방세포에 작용하여 지방분화를 촉진시키거나 억제하는 역할을 한다. 따라서, 본 연구에서는 지방분화를 촉진하는 microRNAs 중 하나인 miR-17을 대상으로 PPAR γ 가 miR-17의 전사활성을 증가시킬 수 있는지 조사하였다.

재료 및 방법

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 지방분화 유도

3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC,

*Corresponding author

Tel : +82-2-961-9208, Fax : +82-2-964-1079

E-mail : shkim@khu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% calf serum과 1% penicillin 및 streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone, Logan, UT, USA) 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 마다 배지를 교환하면서 배양하였다. 지방전구세포의 분화를 유도하기 위해 먼저 6-well plate에 well 당 1×10⁶ 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집된 다음 이를 후에 지방분화 배양액으로 교체하였다(day 0). 지방분화 배양액의 조성은 10% fetal bovine serum (FBS), MDI solution [1 μM dexamethasone, 10 μg/ml Insulin, 0.5 mM isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)]을 포함한 DMEM 배지로 지방세포로의 분화를 위해서 지방분화용 배양액으로 교체하고 이를 후에 다시 10% FBS와 10 μg/ml 인슐린을 포함한 DMEM으로 교체하여 세포를 며칠 동안 배양하였다.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

수거한 세포에 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 반응시켜 total RNA를 분리하였다. 역전사 반응을 실시하기 위하여 1 μg RNA에 dNTP, M-MLV reverse-transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) 등을 첨가한 다음 37°C 에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PPAR_γ mRNA 발현을 측정하기 위해 SYBR Green PCR Master mix (M.Biotech, Seoul, Republic of Korea)를 이용하여 real-time qPCR을 수행하였다. 특정 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조건은 다음과 같이 시행하였다. 95°C에서 10분간 반응시킨 다음, 15초 95°C, 15초 60°C, 72°C 15초를 한 주기로 하여 40 cycle 동안 증폭하였다. 표적 유전자 mRNA 발현량은 GAPDH 발현량에 대한 상대적인 발현량으로 정량하여 보정하였다. miR-17 발현 정도는 TaqMan MicroRNA assay (Applied biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. TaqMan reverse transcription kit (Applied biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 100 ng RNA에서 cDNA 를 합성한 다음 miR-17 primer (Qiagen, Hilden, Germany)와 TaqMan Master mix kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)을 이용하여 Rotor gene Q PCR 기기(Qiagen, Hilden, Germany)로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C 10분 반응시킨 다음 95°C 15초, 60°C 1분을 40 cycle 동안 실시하여 microRNA를 증폭하였다. 각 시료는 U6를 보정유전자로 사용하였다.

Western blot

지방전구세포와 지방분화세포의 lysates를 8% SDS-PAGE 로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 비특이적인 단백질들의 결합을 방지하기 위해 5% skim milk가 첨가된 PBST 용액으로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. PPAR_γ (Abcam, Cambridge, MA, USA)와 actin (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA) 항체를 희석하여 4°C에서 overnight한 다음, 다시 10분 간격으로 PBST로 3회 세척하고 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체로 실온에서 1시간 반응하였다. 3회 세척 후, enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany)를 사용하여 각 단백질들의 발현 변화를 관찰하였다.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 분석기법

분화된 3T3-L1 세포는 분화 6일째(D6)에 18.5% 포름알데히드를 첨가하여 10분 동안 상온에서 고정화시키고, 125 mM 글리신을 처리하여 중화시켰다. 세포 추출물은 PBS로 세척한 후 초음파 분해를 이용하여 500 bp 크기의 염색질 단편을 생성하기 위해 파쇄하였다. 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 후, 절단된 염색질 단편은 PPAR_γ 항체(Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 면역침전 반응을 실시하였다. 면역 침전물들은 Protein A resin (Milipore Upstate, Lake Placid, NY, USA)를 이용하여 항체에 결합한 단편들만 elution buffer로 분리하였다. DNA-protein crosslinks는 10% chelex를 첨가하여 95°C에서 10분 동안 반응시키고, 이후 proteinase K (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 55°C에서 30분 동안 반응시켰다. 침전된 염색질 단편에서 PPAR_γ 결합부위(PPRE1; 5'-GGT TGC CCT TTT TCT CTA GCT TG-3', PPRE2; 5'-GAG TGG GTG AGT ATA TTC TAG TT-3', PPRE3; 5'-TTG AGA CCT TTG GTT TTC ACT TT-3')를 조사하기 위해 PCR 반응을 실시하였다. 증폭된 유전자는 전기영동을 실시하여 관찰하였다.

Luciferase 활성 분석

miR-17 프로모터의 PPRE2와 PPRE3 부위를 함유한 단편을 pGL3-Basic 벡터에 삽입하여 재조합 벡터(pGL3-miR-17)를 구축하였다. QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)을 활용하여 pGL3-miR-17 (895 bp)의 PPRE2 부위와 PPRE3 부위를 각각 돌연변이시켰다. Cos7 세포주를 4×10⁴ cells/well로 분주하여 24 well plate에서 배양하였다. miR-17 프로모터 단편(100 ng)과 PPAR_γ 벡터(50 ng), RXR_α 벡터(50 ng) lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포에 주입하여 형질전환을 유도하였다. PPAR_γ antagonist GW9662 (50 nM)도 세포에 주입하였다. 각 시료의 형질전환 효율을 보정하기 위하여 pRL-TK 벡터를 함께 첨가하였다. 형질전환 세포는 2일간 배양한 후 TD-20/20 Luminometer (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 dual luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, USA)로 luciferase 활성을 측정하였다.

통계 분석

모든 자료의 통계 분석은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 평균 및 표준편차를 산출하였다. 실험군

간의 유의적인 차이는 분산분석 및 Duncan's multiple range test를 사용하여 조사하였다. 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하여 통계 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

지방분화시기와 PPAR γ 과발현에 의한 miR-17 유전자 발현 조사

지방분화에서 PPAR γ 는 중요한 전사인자로 알려져 있으나 microRNA 유전자의 전사조절에 대해서는 알려진 것이 없다. 따라서, 본 연구에서는 지방분화에 관여하는 miR-17과 PPAR γ 간의 상호 연관성을 조사하였다. 먼저 지방전구 세포가 성숙한 세포로 분화되는 과정 중에 miR-17과 PPAR γ 의 발현 패턴

을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 PPAR γ 유전자의 발현은 예상대로 지방 전구세포(Day 0) 보다 성숙한 지방세포(Day 6)에서 mRNA와 단백질 발현이 모두 증가하였다. 이와 유사하게 miR-17 발현도 분화 전에 비해 지방 분화 6일째에 약 1.5배 증가하였다(Fig. 1A). 또한, PPAR γ 를 과발현시킨 세포주에서 miR-17 발현을 조사한 결과, 지방전구 세포에서 인위적으로 PPAR γ mRNA 발현이 증가하게 되면 miR-17 발현이 대조군에 비해 약 1.6배 증가 하였다(Fig. 2). 지방전구 세포에서 PPAR γ 에 의한 miR-17 발현 증가는 지방 분화 전과 후의 miR-17 발현 증가량과 거의 일치하였다. 이러한 결과는 성숙한 지방세포에서 miR-17 발현 증가가 PPAR γ 에 의하여 유도될 가능성이 있음을 나타낸다고 하겠다.

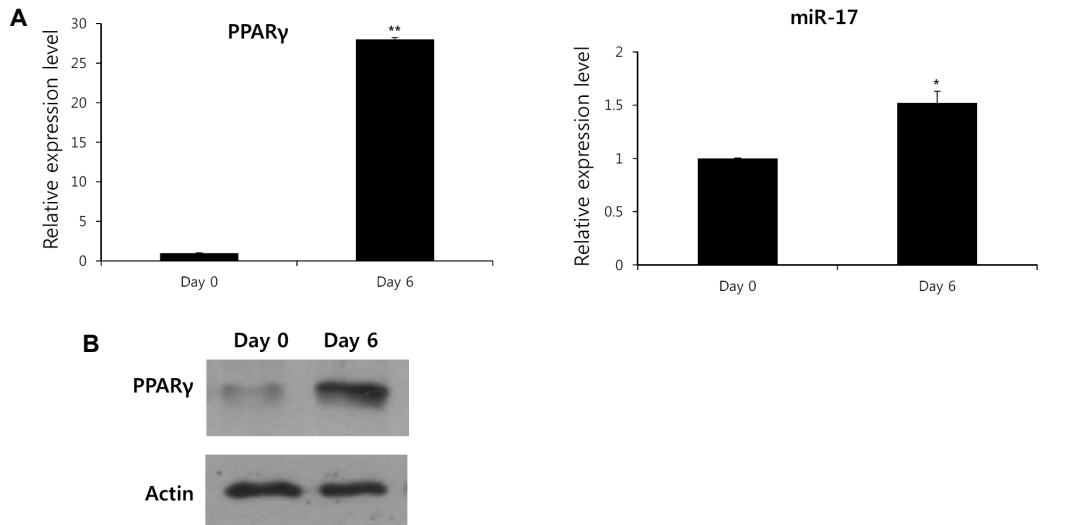


Fig. 1. The expression of PPAR γ and miR-17 in 3T3-L1 cells during adipogenesis. (A) Cytoplasmic RNA was isolated from preadipocyte (day 0) and differentiated cells (day 6). The mRNA levels of PPAR γ and miR-17 were quantified by real-time qPCR. Quantities of mRNA were normalized with GAPDH or U6, respectively. The data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) After the induction of adipocyte differentiation, cells were lysed for SDS-PAGE. Western blot analysis was conducted. Data are a representative example of 3 independent experiments.

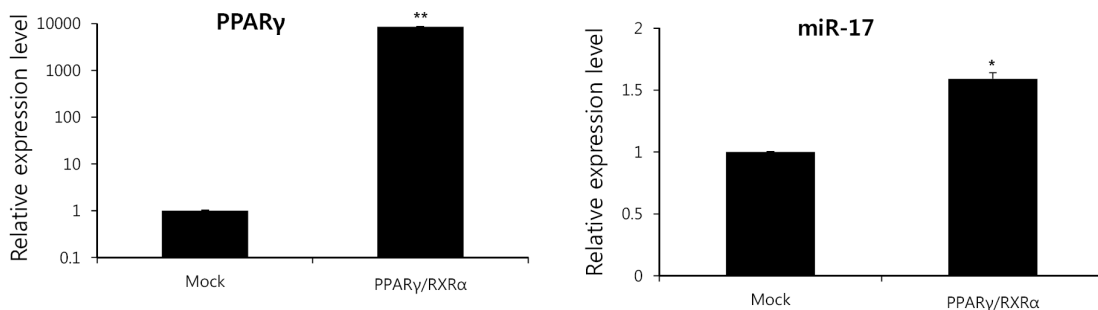


Fig. 2. The level of miR-17 expression in PPAR γ overexpressed 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocyte cells were transfected with empty vector (Mock) or both pSG5-PPAR γ and pCMV-RXR α (PPAR γ /RXR α). Total RNA was isolated and real-time qPCR was performed in triplicate. The levels of PPAR γ and miR-17 were normalized to GAPDH or U6, respectively. The data are showed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

PPAR γ 에 반응하는 miR-17 프로모터 결합 부위 조사

PPAR γ 에 의한 직접적인 miR-17 발현 조절 여부를 조사하기 위하여 먼저 PPAR γ 에 반응하는 부위(PPRE)가 miR-17 프로모터 부위에 존재하는지 조사하였다. 그 결과 miR-17 프로모터의 -2kb 범위 내에서 3개의 잠정적인 PPRE 부위[-1133/-1118 (PPRE1), -718/-696 (PPRE2), -677/-655 (PPRE3)]가 관찰되었다(Fig. 3A). 이러한 자료를 토대로 PPAR γ 단백질과 miR-17 프로모터 간의 상호결합 여부를 조사하기 위해 chromatin immunoprecipitation (ChIP) 실험을 수행하였다. 그 결과, 대조군인 IgG 항체에서는 PPRE 부위에서 PCR 밴드가 관찰되지 않았다(Fig. 3B). PPAR γ 항체에서는 miR-17 프로모터의 PPRE2/PPRE3 부위에서 PCR 밴드가 관찰되었지만, PPRE1 부위에서는 PPAR γ 항체와 결합하지 않았다. 이러한 결과는 PPAR γ 가 miR-17 프로모터의 PPRE2/PPRE3 부위에 직접 결합하여 전사 활성을 유도할 수 있음을 나타낸다.

PPAR γ 에 의한 miR-17 프로모터 활성 조사

ChIP 실험을 통해 PPRE2 부위와 PPRE3 부위가 모두 PPAR γ 와 반응하였기 때문에 두 부위 중에서 어느 부위가 PPAR γ 에 의해 기능적으로 프로모터가 활성화되는지 조사하기 위해 luciferase 활성을 이용한 reporter assay를 실시하였다. 이를 위해 두 종류의 miR-17 프로모터 단편으로 구성된 벡터들을 구축하여 Cos7 세포에 주입하였다. 구축된 벡터는 miR-17 프로모터의 PPRE2와 PPRE3을 모두 함유한 pGL3-miR-17 (895 bp) 벡터와 PPRE3만을 포함하는 pGL3-miR-17 (686 bp) 벡터이다(Fig. 4A). Reporter assay 결과, PPRE2와 PPRE3을 모두 포함한 pGL3-miR-17 (895 bp) 벡터가 주입된 세포는 대조군에 비해 약 4.5 배 이상 활성이 증가하였고,

PPRE3만 가진 pGL3-miR-17 (686 bp) 벡터를 함유한 세포에서는 약 3.5 배 이상 luciferase 활성이 증가하였다(Fig. 4B). 다음으로 PPRE2와 PPRE3 부위 중에서 어느 부위가 PPAR γ 에 의한 전사활성에 더 중요한지 조사하기 위해 site-directed mutagenesis를 실시하여 PPRE2와 PPRE3 부위를 각각 돌연변이시켰다. 그 결과, Fig. 4C에 보는 바와 같이 PPRE3 돌연변이 세포(miR-17-PPRE3-mu)에서는 PPAR γ 에 의해 luciferase 활성이 증가하지 않았다. 그렇지만, PPRE2 돌연변이체(miR-17-PPRE2-mu)에서는 PPAR γ 에 의해 luciferase 활성이 크게 증가하였으며, PPAR γ antagonist에 의해 활성이 다시 감소하였다. 즉, miR-17 프로모터의 PPRE3 부위가 PPAR γ 에 의한 전사활성에 중요하다는 것을 의미한다. 따라서, PPAR γ 에 기능적으로 반응하여 miR-17의 전사활성을 유도하는 중요 프로모터 부위는 -677/-655 (PPRE3) 부위임을 알 수 있다. 이러한 결과는 PPAR γ 전사인자가 지방세포에서 microRNA의 전사조절에도 관여하고 있음을 나타낸다.

PPAR γ 는 지방분화에 관여하는 전사인자로서 aP2 등의 발현을 증가시켜 지방분화와 합성(adipogenesis)를 유도한다[1]. PPAR γ 의 번역 후(post-translation) 과정에는 인산화, 아세틸화, sumoylation, ubiquitination 등이 포함되지만, 최근 연구에 의하면 microRNA이 PPAR γ 의 전사 후(post-transcription) 과정에 관여하고 있다. miR-27과 miR-130은 PPAR γ 발현을 억제하여 adipogenesis 과정을 저해한다[6, 7, 9]. 그렇지만, 지방분화에 대표적인 전사인자인 PPAR γ 가 전사를 조절하는 표적 microRNA는 아직 보고된 바가 없다. 지방분화 시 발현이 증가하는 microRNA들이 우선적으로 PPAR γ 에 의해 전사가 조절될 가능성이 높다. 본 연구에서 발굴한 miR-17도 지방분화 시 발현이 증가하는 유전자이다. 특히 miR-17은 지방분화

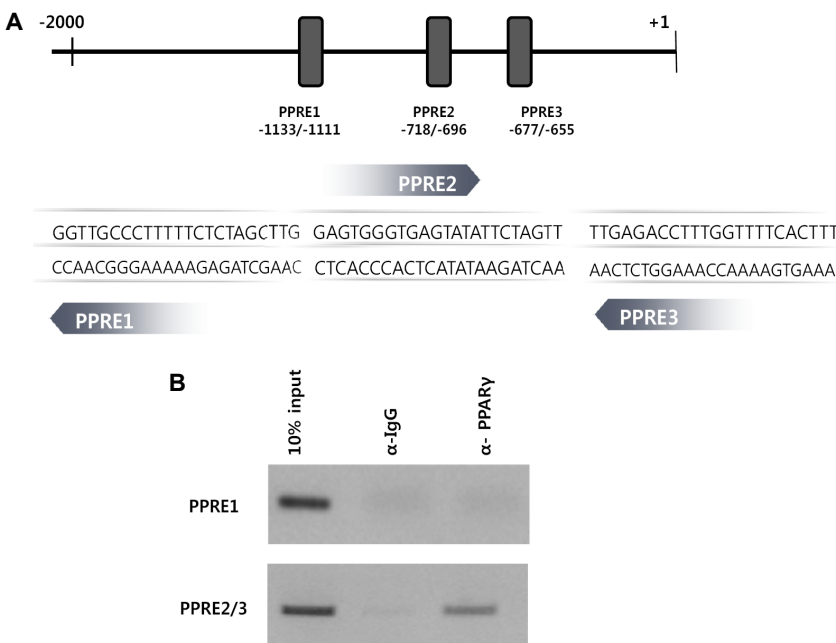


Fig. 3. Interaction between PPAR γ and putative PPRE regions in miR-17 promoter. (A) Location of the putative PPAR γ -binding sites is shown in -2 kb of the miR-17 promoter. The schematic structure and sequence of three putative PPREs were indicated. Arrows show the strand containing PPRE. (B) The binding of PPAR γ to PPRE regions of the miR-17 promoter was analyzed by ChIP assay. Cross-linked chromatin was immunoprecipitated with PPAR γ antibody and then amplified by PCR reaction. Total chromatin was indicated as "input". Pre-immune IgG was used as a negative control.

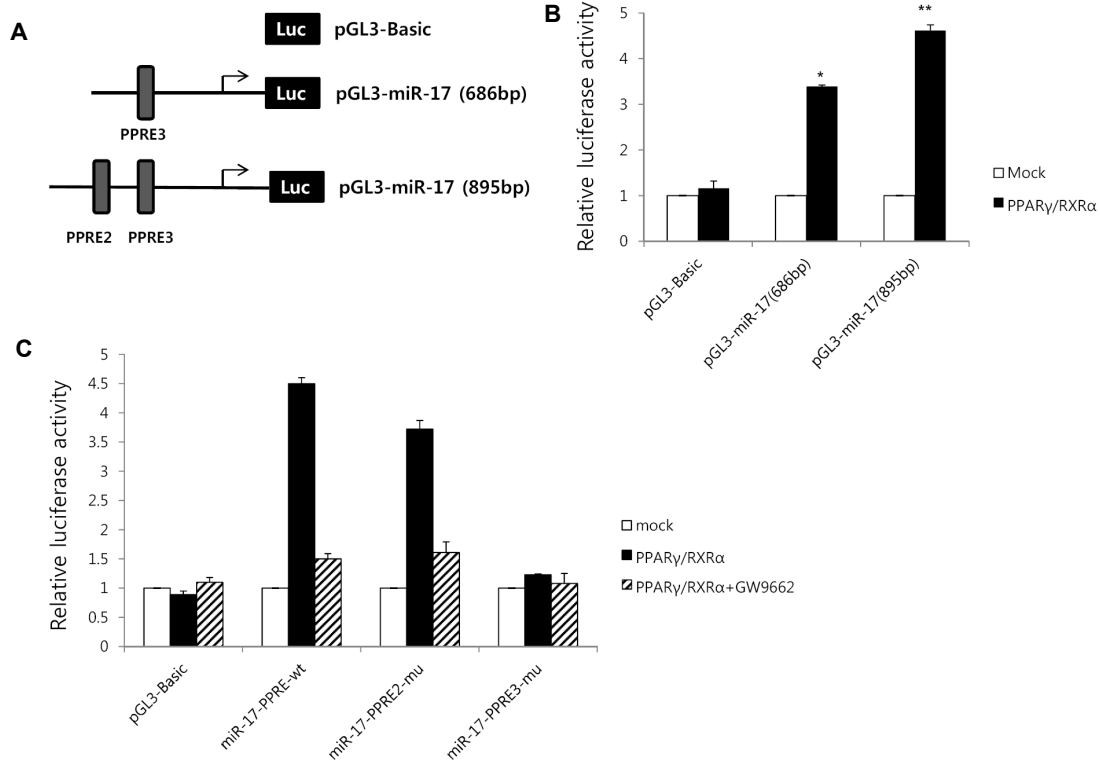


Fig. 4. Identification of the functional PPRE regions in the miR-17 promoter. (A) Schematic structure of various PPRE deleted mutants in the miR-17 promoter. The PPRE deleted constructs for the miR-17 promoter were designed as pGL3-miR-17 (686 bp) and pGL3-miR-17 (895 bp). The pGL3-Basic vector is used as a control. (B) Truncated mutants were transfected into Cos7 cells with or without both PPAR γ vector and RXR α vectors. After 48 h, luciferase activities were measured in triplicate. The data are showed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) PPRE2 and PPRE3 sites were mutated by site-directed mutagenesis. PPRE mutant constructs in pGL3-miR-17 (895 bp) was transfected into Cos7 cells and measured luciferase activity. PPAR γ antagonist GW9662 was treated in Cos7 cells. The data are a representative example of 3 independent experiments. ** $p < 0.01$.

초기단계에 Rb2/p130 발현을 제어하여 지방세포의 분화를 유도한다[10, 17]. 이 시기는 PPAR γ 발현이 이미 높기 때문에 miR-17 발현 증가에 PPAR γ 가 직접 관여하고 있음을 본 연구를 통해 알 수 있다. 향후 보다 체계적으로 PPAR γ 에 대한 표적 microRNA를 대량 발굴한다면 PPAR γ 에 의한 지방 분화 및 대사 기전을 규명하는데 중요한 실마리를 제공할 수 있으며, 비만과 관련한 분자생물학적 원인을 규명하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호 PJ008191)과 한국연구재단 일반연구지원사업(과제번호 2012R1A1B3001134)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M. and Evans, R. M. 2013. PPAR γ signal-

ing and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* **19**, 557-566.

2. Brun, R. P., Tontonoz, P., Forman, B. M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R. M. and Spiegelman, B. M. 1996. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* **10**, 974-984.

3. Cristancho, A. G. and Lazar, M. A. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 722-734.

4. Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., Dean, N. M., Freier, S. M., Bennett, C. F., Lollo, B. and Griffey, R. 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **279**, 52361-52365.

5. Heinaniemi, M. and Carlberg, C. 2008. Screening for PPAR responsive regulatory modules in cancer. *PPAR Res* **2008**, 749073.

6. Karbiener, M., Fischer, C., Nowitsch, S., Opriessnig, P., Papak, C., Ailhaud, G., Dani, C., Amri, E. Z. and Scheideler, M. 2009. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR γ . *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 247-251.

7. Kim, S. Y., Kim, A. Y., Lee, H. W., Son, Y. H., Lee, G. Y.,

- Lee, J. W., Lee, Y. S. and Kim, J. B. 2010. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 323-328.
8. Krautbauer, S., Neumeier, M., Eisinger, K., Hader, Y., Dada, A., Schmitz, G., Aslanidis, C. and Buechler, C. 2013. LDL but not HDL increases adiponectin release of primary human adipocytes. *Exp Mol Pathol* **95**, 325-329.
9. Lee, E. K., Lee, M. J., Abdelmohsen, K., Kim, W., Kim, M. M., Srikantan, S., Martindale, J. L., Hutchison, E. R., Kim, H. H., Marasa, B. S., Selimyan, R., Egan, J. M., Smith, S. R., Fried, S. K. and Gorospe, M. 2011. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol* **31**, 626-638.
10. Li, H., Li, T., Wang, S., Wei, J., Fan, J., Li, J., Han, Q., Liao, L., Shao, C. and Zhao, R. C. 2013. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* **10**, 313-324.
11. Lin, Q., Gao, Z., Alarcon, R. M., Ye, J. and Yun, Z. 2009. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J* **276**, 2348-2358.
12. Richard-Devantoy, S., Garre, J. B. and Gohier, B. 2009. Metabolic complications of bypass surgery for morbid obesity. *Clin Med Case Rep* **2**, 55-58.
13. Shillabeer, G., Forden, J. M. and Lau, D. C. 1989. Induction of preadipocyte differentiation by mature fat cells in the rat. *J Clin Invest* **84**, 381-387.
14. Song, G., Xu, G., Ji, C., Shi, C., Shen, Y., Chen, L., Zhu, L., Yang, L., Zhao, Y. and Guo, X. 2014. The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. *Gene* **533**, 481-487.
15. Sun, T., Fu, M., Bookout, A. L., Kliever, S. A. and Mangelsdorf, D. J. 2009. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* **23**, 925-931.
16. Tontonoz, P. and Spiegelman, B. M. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu Rev Biochem* **77**, 289-312.
17. Wang, Q., Li, Y. C., Wang, J., Kong, J., Qi, Y., Quigg, R. J. and Li, X. 2008. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2889-2894.
18. Wilfred, B. R., Wang, W. X. and Nelson, P. T. 2007. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* **91**, 209-217.
19. Yang, H., Cheng, J., Song, Z., Li, X., Zhang, Z., Mai, Y., Pang, W., Shi, X. and Yang, G. 2013. The anti-adipogenic effect of PGRN on porcine preadipocytes involves ERK1,2 mediated PPAR γ phosphorylation. *Mol Biol Rep* **40**, 6863-6872.

초록 : 지방분화시 PPAR γ 에 의한 microRNA-17의 발현 조절

배인선¹ · 김현지¹ · 정기용² · 최인호³ · 김상훈^{1*}

(¹경희대학교 생물학과, ²농촌진흥청 국립축산과학원, ³영남대학교 생명공학부 소유전체은행)

MicroRNA는 21~25개의 뉴클레오티드로 이루어진 단일 염기 가닥의 RNA로 지방분화를 포함한 세포내 여러 생리학적 기전에 영향을 미친다. MicroRNA-17 (miR-17)은 지방전구세포의 지방분화를 촉진하고, 세포 내 지방을 축적시킨다. 그렇지만, 지방분화시 miR-17 전사조절 기전은 알려진 것이 없다. 본 연구에서는 PPAR γ 전사인자가 miR-17의 전사를 조절하는지 여부를 조사하였다. 먼저 지방전구세포의 분화를 유도한 다음 PPAR γ 와 miR-17의 발현을 조사한 결과 두 유전자 모두 분화 이후 발현이 증가하였다. 또한 miR-17 프로모터 부위에는 PPAR γ 반응하는 부위(PPRE)가 세 군데 발견되었다. Chromatin immunoprecipitation과 luciferase assay을 실시한 결과, miR-17 프로모터의 PPRE3 (-677/-655) 부위가 PPAR γ 와 직접 결합함을 관찰하였다. 이러한 연구 결과는 3T3-L1 세포주에서 PPAR γ 가 miR-17의 전사를 활성화 시키고 있음을 나타낸다. 향후 PPAR γ 에 의한 표적 microRNA을 대량 발굴한다면 비만과 관련한 PPAR γ 의 기능을 보다 구체적으로 파악하는데 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.