

Expressional Analysis of Two Genes (*Got1* and *Mat1*) Up-regulated by Starvation Stress

Junseok Park¹, Young-Sook Kwon², Eunryoung Lee³ and Kisang Kwon^{3*}

¹Department of Emergency Medicine, Inje University Ilsan-Paik Hospital, Goyang 411-706, Korea

²Department of Nursing, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

³Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health & Welfare, Kyungwoon University, Gumi 730-739, Korea

Received March 28, 2014 / Revised June 18, 2014 / Accepted June 20, 2014

Restricted supply of nutrients may affect genes at the molecular level as well as physiological functions. Understanding the cellular responses during starvation is necessary for developing strategies to reduce damage caused by starvation stress. After 1 h of starvation, *Got1* gene expression was increased but its expression returned to the normal state after 24 h. *Mat1* gene expression continuously increased with starvation from 1 h until 24 hr. Rats starved for 1-3 days showed significant changes in expression of the *Got1* and *Mat1* genes, which were significantly reduced in the cerebral cortex and cerebellum. In the lung, gene expression was increased by starvation for 1-2 days but decreased on the third day. No differences were observed in gene expression in the heart. Strong *Got1* lung gene expression was seen in the starvation group one day after restoration of the food supply. Muscle mass was significantly reduced at the start of starvation and remained the same after two days of starvation and one day after the food supply was restored. The *Mat1* gene expression did not change. The *Got1* was induced by NaCl and showed strong expression in the lung and the thymus, but the apparent decrease of the remaining changes were not observed in male rats. The *Mat1* gene was not as sensitive as the *Got1* gene to induction by NaCl. However, differences in gene induction by NaCl were evident between males and females, indicating that diet control of gene expression is associated with hormones.

Key words : Glutamic oxaloacetic transaminase I (*Got1*), Methionine adenosyltransferase I (*Mat1*), starvation stress

서 론

비만(obesity)이란 지방이 체내에 병적으로 축적된 상태를 말한다. 체내에서 사용되지 않은 지방이 피하층(hypoderm) 혹은 내장 사이에 쌓이면 대사질환에 쉽게 노출되어 당뇨병(diabetes mellitus), 고혈압(hypertension), 고지혈증(hyperlipidemia), 동맥경화(atherosclerosis), 퇴행성관절염(osteoarthritis), 수면 무호흡(sleep apnea), 담석증(cholelithiasis), 지방간(fatty liver), 암(cancer) 등의 원인이 될 수 있다[5]. 1997년 세계보건기구(WHO)에서는 비만을 '치료를 해야 하는 질병'으로 규정하고 적극적인 치료를 권장하고 있다[24]. 우리나라도 1970년대 후반부터 급격하게 경제가 발전하면서 소득이 늘어났고 기름진 음식을 많이 섭취하면서도 운동량이 상대적으로 감소하면서, 현재는 성인 10명 중 3명 정도가 비만에 노출되고 있다. 비만해진 사람들은 어느 정도까지는 크게 자각

하지 않고 생활하지만, 주위에서 일어나는 diet열풍에 자신의 비만을 자각하게 되면 급속한 원상회복을 원하게 된다. 그래서 짧은 시간 안에 체중을 감량할 수 있는 방법에 관심을 가지게 된다. 단시간의 집중적인 체중감소를 위한 다이어트는 비타민, 무기질 등 필수 영양소를 섭취할 수 없고 근육량이 줄어들 질병에 대한 저항력이 떨어지게 된다. 그 결과 빈혈, 탈모, 생리불순, 위염 등 발병의 위험에 노출된다[6].

현대의 식단과 생활습관은 급격하게 신체대사에 원하지 않은 비만과 심장병계통의 질환을 유발하는 결과를 초래하게 되었다. 비록 비만과 관련된 대부분의 대사질환은 높은 수준의 phenylalanine을 포함하고 있는 음식물을 피하는 적절한 다이어트를 통해서 극복할 수 있으며 습식 칼로리를 제한하는 것은 분명한 효과가 있다. 그러나 이와 같은 다이어트과정에서 일어나는 생리적반응의 분자기전은 불분명하다[7]. 본 연구는 다이어트가 질병과 노화와 같은 급속한 대사변화의 진행에 미치는 영향을 이해하기 위하여, 급속한 영양상태의 변화가 조절하는 유전자 및 신호전달 기전에 관련된 실마리를 제공하는 것이다.

본 연구의 목적을 달성하기 위한 실험전략은 다음과 같다. 포유 실험동물에 비해서 사육조건과 분석이 용이한 누에(*Bombyx mori*, silkworm)를 사용하여 만들었다. 누에의 fat body는 포유동물의 liver에 해당하는 기능을 가지고 있으며 대사적으로 중요한 대부분의 유전자와 대사기전을 공유하고

*Corresponding author

Tel : +82-54-479-1284, Fax : +82-54-479-1280

E-mail : pppkising@empal.com

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.

있다. 누에의 fat body를 현미경하에서 분리하여 glucose free medium에서 24시간 배양한 후에 total RNA를 분리하고 differential display-polymerase chain reaction (DD-PCR)을 실시하여 차별적으로 발현이 상승하는 유전자를 분리하였다. 이렇게 분리된 유전자 중 *Got1*과 *Mat1*을 대상으로 *in vivo/in vitro*에서 유전자 발현을 조사하고 그들 조직의 변화를 관찰한다.

Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)는 세포질 내에 존재하며 사람 세포에서는 9개의 exon으로 구성된 *Got1* gene에 코딩되어 있으며 chromosome 14에 위치하고 있다[23]. *Got1*은 amino acid metabolism에 중요한 효소로서 aspartate에서 glutamate에게 α -amino group의 reversible transfer를 촉매한다[14]. 많이 존재하고 있는 조직으로는 liver, heart, skeletal muscle, kidneys, brain, red blood cells이며 liver health의 임상마커로 사용된다. 1977년에 Arnone et al.에 의해서 3D구조가 결정되고[1], 1989년에 Nagashima et al.에 의해 돼지에서 처음으로 유전자가 cloning되었다[17]. 최근의 연구에 의하면 *Got1*은 fatty acid homeostasis에서 중요한 역할을 하며[22] ischemic injury [21]로부터 보호 작용도 한다. 그리고 *Got1*의 활성 저하는 crush syndrome의 원인이 되는 것도 보고되어있다[4]. *Got1*의 대표적인 inhibitor는 2-Oxoglutaconate [12], N-5'-Phosphopyridoxyl L-aspartate [11], L-a-Methylaspartic acid [15]가 알려져 있다. *Got1*은 아미노산 대사에 중요한 효소로서 지금까지 여러 종에서 분리되었고 유전적으로 잘 보존되어있다. 특히 mammalian에서는 세포내기능이 아주 중요하여 진화적으로 기본적인 기능을 담당하는 domain들은 잘 보존되어져 안정적인 상태를 보인다[25].

Methionine adenosyltransferase I (*Mat1*)는 염색체 10q22에 위치하며 395 amino acid (4,3648 Da)로 구성되어 있다[18]. $ATP+L\text{-methionine}+H_2O \rightarrow \text{phosphate}+\text{diphosphate}+S\text{-adenosyl-L-methionine}$ 와 같은 화학반응을 촉매한다[8]. *Mat1* 유전자를 조절하는 전사인자로는 LHX3b/Lhx3b, AML1a, Nkx2-2, Brachyury, C/EBPalpha, FOXO1a, LHX3a/Lhx3a, Zic3, FOXO1이 알려져 있다[10]. Two divalent ion (magnesium, cobalt, potassium)이 결합하며 HIST1H4A~E, ubiquitin C, heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin), cystathionase (cystathionine gamma-lyase), ClpX caseinolytic peptidase X homolog와 같은 결합단백질에 의해서 조절된다[16]. *Mat1*의 비활성화에 의해서 methionine adenosyltransferase deficiency (MATD)가 유발되며 hypermethioninemia, homocystinuria, superior mesenteric artery syndrome, hepatocellular carcinoma와도 깊은 관계가 있는 것이 알려져 있다[3]. 1994년에 Bera et al.에 의해서 mammalian liver *Mat1* 유전자가 처음으로 cloning되었다[2]. 최근 연구에 의하면 microRNAs로 hepatocellular carcinoma를 조절할 수 있다는 것과 cell invasion에 thyroid hormone receptor가 관여하여 *Mat1* 유전자가 조절될 수 있다는 결과가 보고되어있다[26].

*Mat1*은 아미노산대사에 중요한 효소로서 지금까지 여러 종에서 분리되었고 유전적으로 잘 보존되어있다. 특히 mammalian에서는 세포내 기능이 아주 중요하여 진화적으로 기본적인 기능을 담당하는 domain들은 잘 보존되어져 안정적인 상태를 보인다[13].

재료 및 방법

실험동물 & 세포배양

Rat는 200 g 정도의 암, 수를 사용하였으며, 실험 전날 공급 받아 하룻밤 안정화시켰다. Rat의 각종 장기는 도살 후 즉시 냉각된 각각의 buffer (4% paraformaldehyde 용액; 조직실험, RNAzol™ B; total RNA분리)에 보관하였으며, 누에(*Bombyx mori*)는 충남 잠사곤충사업장(장장 최택용)에서 공급받았으며, 누에의 fat body는 광학현미경하에서 순수하게 분리하여 rat과 동일하게 total RNA를 분리하였다. PCCL3 배양세포(rat thyroid cell line)는 5% 우혈청을 포함한 Coon's modified media에서 배양하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂, 95%이상의 적당한 습도를 유지하였다. 신선한 배지를 2일 간격으로 교체하며 배양하였으며, 1주일에 한 번씩 계대 배양하였다. 실험에 쓰이는 세포는 70~90%의 충실도를 보이는 세포를 사용하였다.

Total RNA 분리

Total RNA 분리에는 RNAzol™B kit (Tel-Test, Inc. TX, USA)를 사용하였다. Fat body 조직을 RNAzol™B 800 ml와 함께 1.5 ml tube에 넣고 얼음 위에서 덩어리가 없어질 때까지 homogenization 시킨 다음 RNA 추출 용액 200 ml를 첨가하여 약 30초 간 교반 후 상온에서 5분 간 방치하였다. 12,000xg (4°C)에서 15분 간 원심 분리하여 얻은 500 ml의 상층액에 500 ml의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 15분 간 방치 후 다시 12,000xg (4°C)에서 15분 간 원심 분리하여 튜브의 바닥에서 백황색의 침전물을 얻었다. 이 침전물에 75% ethanol 500 ml를 첨가하고 잘 교반하여 7,500x 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 EDTA (pH 7)를 함유한 DW에 보관하였다.

DD-PCR

mRNA level의 발현 정도에 차이를 보이는 것을 찾기 위해서 GeneFishing DEG premix kit (Seegene Co.)를 이용하여 DD-PCR을 시행한다. Harvest 한 세포에서 얻은 total RNA 3 μ g 을 10 μ M의 dT-ACPI 2 ml와 함께 80°C에서 3분간 가열하여 denature 시킨 후, cold ice에서 급랭한다. 4 ml의 5 \times RT buffer, 4 ml의 dNTP (each 2.5 mM), 0.5 ml의 RNase inhibitor

(40 u/ml), 1 unit M-MLV reverse transcriptase (200 u/ml)를 가하고 총 반응액이 20 ml가 되도록 조절한 후 42°C에서 90분 동안 반응시켜 cDNA를 합성한다. GeneFishing PCR를 위하여 dT-ACP2와 각각의 arbitrary ACP를 primer로 하여 cDNA를 증폭시키고 2%의 agarose gel에서 PCR product를 agarose gel에서 전기영동하여 차별적으로 발현하는 fragment를 확인 후 subcloning, sequencing과정을 거쳐 유전자를 확인한다.

RT-PCR

역전사반응은 42°C에서 90분 간, RTase 비활성화 반응은 94°C에서 2분 간 수행하였으며 이후 4°C에서 보관하였다. 위의 과정에 의해 합성된 cDNA는 MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) PCR 기기를 이용하여 RT-PCR을 수행하였으며 사용된 primer는 모두 바이오니아(대전)에서 합성하여 사용하였다. RT-PCR의 반응 조건은 94°C에서 5분 동안 초기 변성을 시켜준 후 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 40초로 29회 반복한 후 마지막 합성은 72°C에서 5분으로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에 전기 영동시켜 확인하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 아래와 같다. 실험에서 특별하게 언급하지 않은 시약은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며 최소 3회 최대 6회 동일한 실험을 반복하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 다음과 같다. *Got1-F*; 5'-acacagagtacttgcctac-3', *Got1-R*; 5'-catcgcctcaagaagtcagc-3', *Mat1-F*; 5'-gctatgccactgacgagaca-3', *Mat1-R*; 5'-ataatcttgccgctgtgac-3'.

Western blotting

Protein electrophoresis kit (ATTO Co., Japan)를 사용하여 12% SDS-PAGE에 준비된 sample을 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 transfer kit (Bio-RAD, USA)를 사용하여 gel의 protein을 PVDF cell membrane (PALL corporation, USA)에 transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)를 사용하여 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 membrane을 PBST (PBS, 0.05% Tween20)와 5% skim milk를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝난 후 1차 반응 시킬 때에는 PBST와 5% skim milk에 1:500~1:2000의 비율로 희석하여 4°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 membrane을 PBST로 10분씩 5회 상온에서 shaker를 사용하여 세척하였다. 세척이 끝난 후 2차 항체를 반응 시킬 때에는 PBST에 1:2,000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응 시켰으며, 반응이 끝난 후 membrane을 PBST로 10분씩 5회 상온에서 shaker를 사용하여 세척하였다. 세척이 끝난 후 West save (Lab Frontier, Korea)를 사용하여 발색반응을 유도한 후 X-ray film에 감광하여 결과를 분석하였다.

Immunofluorescence

Paraffin section tissue를 Deparaffin (Zylene 15 min, 2 time)과 rehydration (EtOH 100%-95%-90%-80%-70% 1 min)한 다음에 DW로 5분간 washing한다. 0.01 M Citrate buffer (pH 6.0) 4 min, 20분 동안 antigen retrieval을 실시한 후에 0.05 M PBS로 3회 각 10분간 washing한다. 비특이적 반응을 억제하기 위해서 normal serum blocking을 30분간 실시한다. 조직이 마르지 않게 해야 하여 조직 크기에 알맞게 dakopen으로 테두리를 두껍게 그려 dakopen을 말린 후 각 슬라이드에 50~100 ml씩 분주한다. 반응액 (3% triton 100 ml, serum 50 ml, PBS 850 ml/1l) 1st Ab와 overnight 반응시킨 후 0.05 M PBS로 10분 간 3회 washing한다. Cy-biotin Rb (1/500), 2 hr [Cy-conjugated anti-rabbit IgG] 후에 위의 반응액으로 10분간 3회 washing한다. 2nd Ab와 overnight 반응시킨 후 0.05 M PBS로 10분간 3회 washing한다. Biotinylated Anti-M IgG [1/200]을 2시간 반응시킨 후에 0.05 M PBS로 다시 10분간 3회 washing한다. DW로 수세 후 70%-80%-90%-95%-100% EtOH washing을 각각 1분간 실시한 다음에 Zylene을 15분간 처리한 후 mounting을 한다.

결 과

Starvation이 세포생리 변화의 원인 제공 유무를 판단하기 위하여, starvation에 의한 세포형태 변이를 관찰하였다. 각각의 세포를 1, 3, 5, 7시간 동안 starvation시킨 후에 위상차현미경(phase contrast microscope)으로 관찰하였다. Starvation 1 시간에서는 특이한 형태적 변화가 없으나 3, 5, 7시간이 지나면서 죽어서 떨어져 나오는 세포 숫자가 증가하였다. 누에 5령 1일의 몸무게는 0.8 g이지만, 뽕잎을 먹는 양이 급격히 늘면서 2일째는 1 g, 5일-2.8 g, 6일-3 g, 8일-4.5 g로 급격하게 증가한다. Starvation 실험은 5령 3일되는 누에를 사용하였다. 하룻밤 동안 뽕잎을 공급하지 않는 starvation 처리를 하면, 아래와 같이 누에는 왜소해져서 약 30%의 몸무게 감소를 보였다(Fig. 1).

이후의 실험은 누에의 fat body 조직을 사용하여 필요한 단백질과 total RNA 분리하였다. 아래와 같이 누에를 핀으로 고정하여 움직이지 못하게 한 다음에 등 쪽의 피부를 longitudinal section한다. 몸의 대부분을 차지하고 있는 장을 제거한 후에 피부에 붙어있는 신경관을 핀셋으로 제거한다. 누에의 꼬리피부에 붙어있는 fat body 조직을 yellow chip으로 끌어 모은 다음에, 실제현미경으로 cold PBS 속에서 fat body 조직 이외의 물질을 제거하여 순수한 누에 fat body 조직을 모아 -80°C에서 다음 실험 때까지 보관한다. RNAzol™B kit를 사용하여 누에 total RNA를 정제 후에 GeneFishing DEG premix kit (Seegene Co.)를 사용하여 DD-PCR을 시행하였다. GeneFishing DEG premix kit는 mammalian 유래의 genome을 대상을 만든 것이지만 예비실험 결과 누에에서도 신뢰할

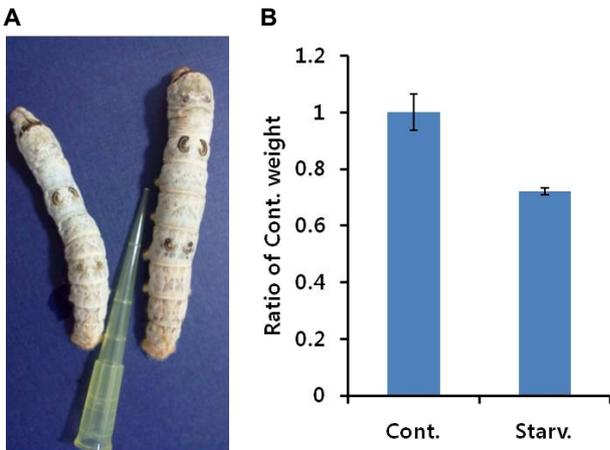


Fig. 1. Silkworm weight loss by starvation. (A) One day starvation losses about 30% weight in the 5th silkworm. (B) A bar graphic is the result of Fig. 1A. Silkworms of 50 number were used in the experiment.

수 있을 정도로 up-/down-regulation이 확인되어 본 실험에 사용하게 되었다. Differential하게 발현하는 DNA단편을 cloning하여 염기서열을 결정한 다음에 상동성 포유동물 유전자를 최종적으로 reverse PCR로 확인하였다. Starvation에 의해서 up-regulation되는 유전자 8개 (*Gadk15b*, *Got1*, *seppina 6*, *Mat1a*, *Apoa4*, *Pte2a*, *IGFBP1*, *Cyp4a14*)를 얻었다. 이들 대부분이 인간의 liver에서 강하게 발현하는 것들 이었다. 이것을 확인하기 위하여 rat의 각종장기에서의 발현을 관찰하였다. Fig. 2와 같이 8개의 유전자 모두가 liver에서 발현하였다, 특히 *sep-*

pina 6, *Mat1a*, *Apoa4*, *IGFBP1*, *Cyp4a14*은 starvation에 의해서 rat liver 특이적으로 발현하였다. 세포실험에서 *Got1*, *Mat1a*, *Apoa4*가 4시간 starvation에서 강하게 발현하여 이후의 실험에서는 aspartate aminotransferase (*Got1*), methionine adenosyltransferase I (*Mat1*)를 대상으로 정하였다. Western blotting 과 immunofluorescence분석으로 *Got1*과 *Mat1*은 단백질변역수준에서도 동일한 발현양상을 보이는 것을 확인하였다(data not shown). Starvation에 의한 *Got1*, *Mat1* 유전자의 발현이 liver에서 강하게 발현하는 것을 알았다. 이때에 liver가 받는 stress정도를 알기 위하여 endoplasmic reticulum (ER) stress chaperone, apoptosis (*Bax*, *Bal2*)와 autophagy (*LC3a*, *Beclin*)관련 인자들의 발현 변화를 측정하였다. 각각의 암수 rat를 물을 공급하는 군과 물을 공급하지 않는 군으로 나누어 2일간 starvation하였다. ER stress chaperone의 변화는 thioredoxin reductase 기능을 가진 ER luminal chaperone인 protein disulfide isomerase (*PDI*), endoplasmic reticulum protein 29 (*ERp29*)는 암수 상반된 발현 차이를 보였으나 유의한 결과는 아니었다. Apoptosis와 autophagy 관련 인자들의 발현 변화는 관찰되지 않았다(data not shown).

Rat를 1-3일간 starvation 시킨 뒤에 각종 장기에서 *Got1*, *Mat1* 유전자의 발현을 조사하였다(Fig. 2). 유전자 *Got1*의 발현은 큰 변화를 보이지 않았지만, 유전자 *Mat1*의 발현은 조직별 유전자 변화가 관찰되었다. Cerebral cortex는 starvation에 의해서 유전자 발현이 현저하게 줄어들었다. Cerebellum과 lung에서는 1-2일간의 starvation에 의해서 유전자 발현이 증가하다가 3일째는 발현이 줄어드는 양상을 보였다. Heart에서는 starvation에 의해서 유전자 발현이 관찰되지 않을 정도로 줄어들었다.

간헐 starvation에 의한 *Got1*, *Mat1* 유전자의 발현 양상을 관찰하였다(Fig. 3). 2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 것과 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation한 군으로 나누었다. 유전자 *Got1*의 발현은 lung에서만 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군에서 아주 강한 발현을 보였다. Liver의 경우는 2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군에서 발현이 약해진 후 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation한 군에서 강한 발현을 보였다. Muscle에서는 starvation 시작과 동시에 발현이 현저히 감소 후 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급하면 정상 상태로 돌아왔다. 유전자 *Mat1*의 발현은 유전자 *Got1*와 같은 다양한 발현 양상을 보이지 않았다.

Starvation 중 물 공급에 의한 *Got1*, *Mat1*유전자의 발현 양상을 관찰하였다(Fig. 4). 물과 함께 homeostasis를 유지하기 위하여서는 NaCl이 필수적이다. 물 공급과 NaCl 공급에 의한 발현 차이를 암수 구별하여 관찰하였다. 유전자 *Got1*의 발현은 상의 경우 NaCl 공급에 의해서 lung에서는 강한 발현을

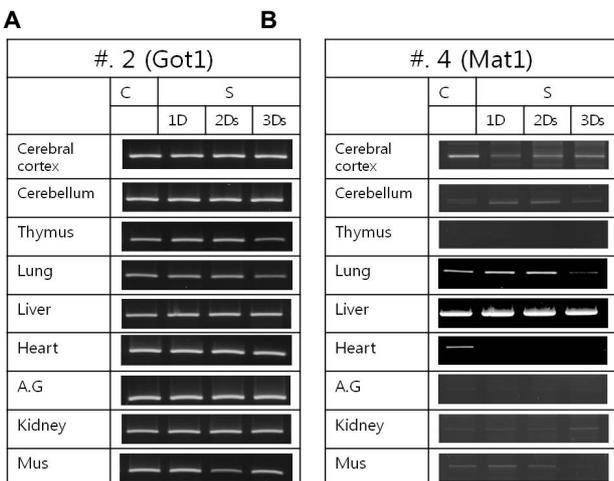


Fig. 2. Starvation changes the expression of two genes in the various rat organs. (A) Starvation (1-3 day) changes *Got1* mRNA expression in the various rat organs. (B) Starvation (1-3 day) changes *Mat1* mRNA expression in the various rat organs. The experiments were performed three times and represent resulting above fig is one of them.

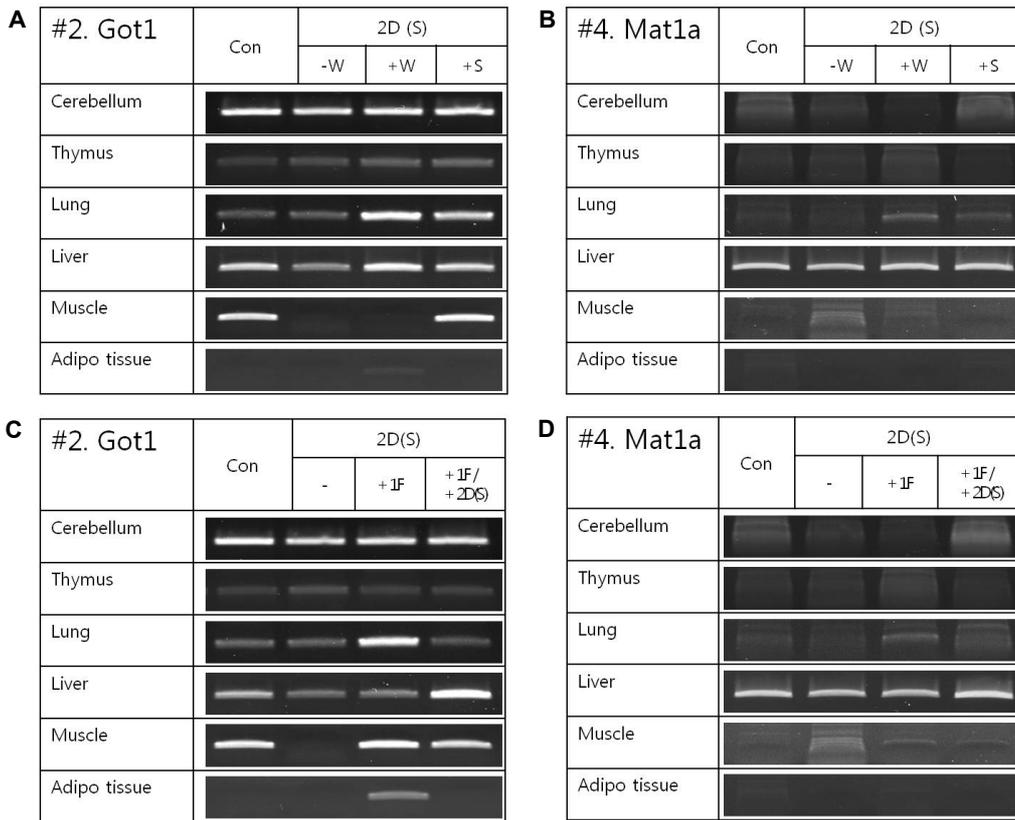


Fig. 3. Starvation conditions by a variety of changes in the mRNA expression of two genes. (A), (B) Starvation with water (+W) or without (-W) and 1% sugar water changes *Got1/Mat1* mRNA expression in the various rat organs. (C), (D) Intermittent starvation (2 day starvation, 2 day starvation + 1 day feed, 2 day starvation + 1 day feed + 2 day starvation) changes *Got1/Mat1* mRNA expression in the various rat organs. The experiments were performed three times and represent resulting above fig is one of them.

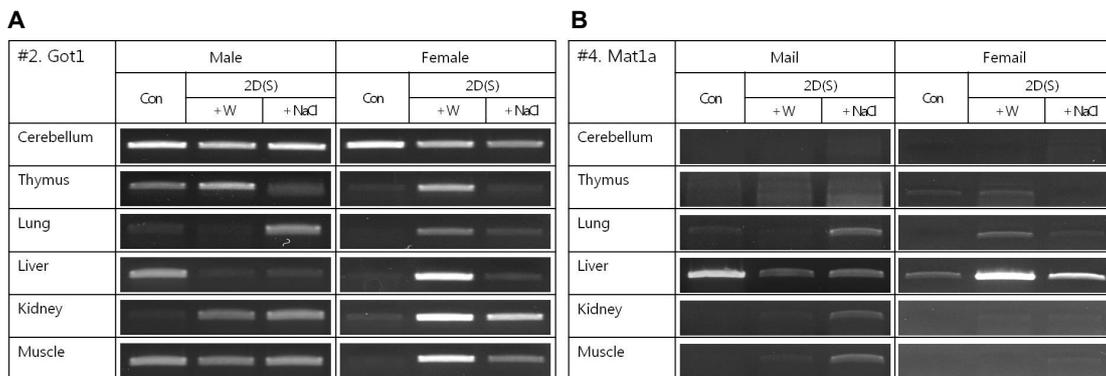


Fig. 4. The effect of NaCl on the starvation in male and female. (A), (B) Starvation with water only (+W) or water including 1% +NaCl (+NaCl) changes *Got1/Mat1* mRNA expression in various rat organs of the male and female. The experiments were performed three times and represent resulting above fig is one of them.

보이고 thymus에서는 감소하였고, 나머지에서는 뚜렷한 발현 변화가 관찰되지 않았다. ♀의 경우는 물 공급보다 NaCl 공급에 의해서 모두 약한 발현 양상을 보였다. 유전자 *Mat1*의 발현은 ♂의 경우 NaCl 공급에 의해 lung, kidney, muscle에서 약하지만 상승 발현이 관찰되었다. ♀의 경우는 NaCl공급에

의해 상승발현 하는 것이 관찰되지 않았다.

위의 결과를 정리하면 다음과 같다. *Got1* 유전자의 발현은 starvation 1시간부터 발현이 증가하다가 24시간에서 정상상태로 돌아왔다. *Mat1* 유전자의 발현은 starvation 1시간부터 24시간까지 지속적으로 발현이 증가하였다. Starvation stress

에 의한 ER stress chaperone의 발현 변화, apoptosis와 auto-phage 관련 인자들의 유의적 발현 변화는 관찰되지 않았다. Rat를 1-3일간 starvation에 의해서는 *Got1* 유전자의 발현은 큰 변화를 보이지 않았지만, *Mat1* 유전자의 발현은 cerebral cortex에서 현저하게 줄어드는 반면에 cerebellum과 lung에서는 1-2일간의 starvation에 의해서 유전자 발현이 증가하다가 3일째는 발현이 줄어들었다. Heart에서는 starvation에 의해서 유전자 발현이 관찰되지 않을 정도로 줄어들었다. 간헐 starvation (2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 것과 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation한 군)으로 나누었다. *Got1* 유전자의 발현은 lung에서만 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군에서 아주 강한 발현을 보였다. liver의 경우는 2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군에서 발현이 약해진 후 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation한 군에서 강한 발현을 보였다. Muscle에서는 starvation 시작과 동시에 발현이 현저히 감소 후 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급하면 정상상태로 돌아왔다. *Mat1* 유전자는 의미 있는 발현 변화가 없었다. *Got1* 유전자 발현은 ♂의 경우 NaCl 공급에 의해서 lung에서는 강한 발현을 보이고 thymus에서는 감소하였고 나머지에서는 뚜렷한 발현 변화가 관찰되지 않았다. ♀의 경우는 물 공급 보다가 NaCl 공급에 의해서 모두 약한 발현 양상을 보였다. *Mat1* 유전자의 발현은 ♂의 경우 NaCl 공급에 의해서 lung, kidney, muscle에서 약하지만 상승 발현이 관찰되었다. ♀의 경우는 NaCl 공급에 의해서 상승 발현하는 것이 관찰되지 않았다.

고 찰

일반적으로 modern diet (restricting caloric intake)는 oxidative stress, genome integrity, endocrine signaling이 관여하여서 급격한 aging을 피할 수 있고 life span을 연장할 수 있다는 많은 증거가 제시되고 있다[9]. 비록 어떤 종류의 대사 결함은 식사량을 제한(특히, 높은 수준의 phenylalanine)하는 적절한 dietary modification에 의해서 향상될 수도 있지만, 근본적으로 starvation을 바탕으로 하는 modern diet는 질병은 아닌 원하지 않는 대사불균형을 초래하는 경우가 많다. 이런 상태가 지속적, 반복적으로 일어나면 malnutrition 상태가 되어 obesity와 cardiovascular diseases가 될 수 있다. Malnutrition의 정의는 에너지, 단백질, 타 영양분이 몸의 기능과 의학적 문제를 일으킬 수 있을 정도로 과다하거나 부족한 경우를 말한다. Malnutrition은 over nutrition 결과 obesity가 되는 것과, under nutrition 결과 marasmus와 Kwashiorkor-like malnutrition으로 구별한다[19]. BMI [body mass index, weight(kg)/body height²(m²)] 1.85 이하는 severely under weight, 20 이하는 under weight, 20~25는 건강한 상태, 25~30

은 overweight, 30~35는 obesity I, 35~40은 obesity II, 40 이상은 obesity III군으로 분류한다[20]. 일반적으로 short starvation은 ≤72시간이며 long starvation은 ≥72시간을 의미한다. Short starvation 동안에는 먼저 근육이 분해되어 liver의 gluconeogenesis에 의해서 만들어진 glucose가 brain에 사용되며 glycogen 분해에 의해서 생성된 glucose와 fat 분해에 의해서 생성된 fatty acid와 glycerol이 말단에 전달된다. Long starvation 동안에는 short starvation 동안과 같이 근육이 분해되어 liver의 gluconeogenesis에 사용되며 liver에서 ketogenesis가 일어나 생성된 glucose와 ketone body가 brain에 전달되며 더욱 많은 양의 fat이 분해되어서 말단과 liver에 FA와 glycerol 형태로 전달된다. 몸은 short- & long-term starvation에 탄수화물, 단백질, 지질을 전환시켜서 adaptation한다. 더욱 효율적인 적응법은 에너지 사용을 최적화하여 탄수화물, 단백질, 지질의 전환을 감소시키는 것이다. Dietary modification이 어떤 분자기작이 작동하여 aging을 억제하고 질병을 촉진시키는지를 규명할 수 있는 실마리를 제공하는 것이 본 연구의 큰 목표중의 하나이다.

지방 분해와 함께 단백질 분해에 의해서 생성된 아미노산은 에너지 생산과 대사에 재배치됨으로서 대사를 유지할 수 있다. 이때의 유전자 발현 변화는 아미노산 대사와 함께 urea cycle에 직접적으로 관여하는 것들이 대부분이다. *Got1*은 urea cycle과 맞물려있는 아미노산 대사 중 aspartate cycle에서 가역적으로 L-aspartate를 2-oxoglutarate전환을 촉매하며 생체 중의 amino acid와 keto acid 간에 amino기를 전이를 촉매하는 효소의 총칭이다. Liver, kidney, skeletal muscle, cardiac muscle등에 많이 존재하지만 혈중에는 극히 미량이 존재한다. 따라서 이것이 상승하면 이들이 분포하는 장기의 세포변성 및 괴사를 반영하며, 특히 간질환[급성간염(acute hepatitis), 만성간염(chronic hepatitis), 간경변(liver cirrhosis), 간암(liver cancer)]과 심장 질환의 유력한 지표로 널리 이용된다. *Got1*은 급성 간염의 조기 진단과 만성 간염의 경과 관찰에 꼭 필요한 검사이다.

Got1 유전자 발현이 starvation에 의해서 상승하여 이하의 여러 실험을 수행하였다. Starvation에 의한 각종 장기에서의 *Got1* 유전자 발현은 liver 정도의 높은 발현이 heart/muscle에서 관찰되었으며 starvation에 의한 세포반응에서는 4시간에서 발현이 상승하였다. Starvation에 의해 *Got1*이 아미노산 대사와 urea cycle에서 직접적으로 작용하기 때문에 유전자 발현이 일정 시간 동안(7시간) 상승 조절되는 것으로 보인다. Rat을 1-3일간 starvation 시킨 뒤에 장기별 유전자의 발현을 조사하였으나 큰 변화를 보이지 않았다. 그리고 이때에 물 공급은 유전자 발현에 중요하지 않았다. 간헐 starvation 실험(2일간 starvation 군, 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 것, 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation) 결과 liver는 2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간

먹이를 공급한 군에서 발현이 약해진 후 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation한 군에서 강한 발현을 보였으며, muscle에서는 starvation 시작과 동시에 발현이 현저히 감소 후 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급하면 정상 상태로 돌아왔다. 그러나 lung에서만 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군에서 아주 강한 발현을 보인 것은 새로운 결과로서, 왜 lung에서 간헐 starvation에 의해서 *Got1* 유전자 발현이 상승하는지는 새로운 과제이다. 물 공급과 NaCl 공급에 의한 발현 차이를 암수 구별하여 관찰하였다. ♂의 경우 NaCl 공급에 의해서 lung에서는 강한 발현을 보이고 thymus에서는 감소하였다. ♀는 물 공급 보다 NaCl 공급에 의해서 모두 약한 발현 양상을 보였다. Starvation에 의해서 *Got1* 유전자 발현이 ♂, ♀에서 각각 다른 장기에서 발현 차이를 보인 것은 *Got1* 유전자 발현이 starvation에 의해서 ♂, ♀ 호르몬이 관련될 수 있는 가능성을 제시한다. S-adenosylmethionine (SAM) cycle은 methyl transfer 반응에서 아주 중요한 역할을 하여 liver 기능을 적절하게 유지하기 위하여 필수적이다. 이때에 *Mat1*은 methionine + ATP를 SAM으로의 생합성을 촉매하는 기능을 담당하고 있다. 포유동물 세포에는 세 종류의 MAT (*MatI*, *MatII*, *MatIII*)이 존재한다. 이중 *MatI*의 발현은 liver에서만 일어나고 나머지는 모든 장기에서 발현된다. Liver에서 methylation reaction의 약85%가 일어나는 것을 생각하면, liver는 blood methionine 조절에 아주 중요한 기능을 하며 stress에 의한 liver regeneration/differentiation에 깊이 관여하는 장기이다. 본 실험에서 starvation에 의해서 *Mat1* 유전자 발현이 강하게 상승하였다. Starvation에 의한 각종 장기에서의 *Mat1* 유전자 발현은 liver에서만 높은 발현이 관찰되었으며, starvation에 의한 세포 반응에서는 4시간에서 발현이 가장 상승하였다. Rat를 1-3일간 starvation 시킨 뒤 장기별 유전자의 발현은, cerebral cortex는 starvation에 의해서 유전자 발현이 현저하게 줄어들었으며 cerebellum과 lung에서는 1-2일간의 starvation에 의해서 유전자 발현이 증가하다가 3일째는 발현이 줄어들었다. 그러나 heart에서는 starvation에 의해서 유전자 발현이 관찰되지 않을 정도로 줄어들었다. 이 결과는 starvation이 blood methionine 조절 이상을 의심할 수 있는 가능성 위에 혈액 소모가 많은 brain에 영향을 크게 주는 것으로 보인다. 간헐 starvation 실험(2일간 starvation 군, 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 것, 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation) 결과 변화가 없는 것은 *Mat1* 유전자 발현이 re-feeding에 의해서 아주 빠르게 원상회복되는 것으로 보인다. ♂의 경우 NaCl 공급에 의해서 lung, kidney, muscle에서 약하지만 상승 발현이 관찰되고, ♀는 NaCl 공급에 의해서 상승 발현하는 것이 관찰되지 않았다. *Mat1* 유전자 발현은 ♂의 경우 각종 장기에서 민감하게 반응하는 반면, ♀의 경우는 각종 장기에서 항성을 유지하는 것으로 보인다.

References

1. Arnone, A., Rogers, P. H., Schmidt, J., Han, C., Harris, C. M. and Metzler, D. E. 1977. Preliminary crystallographic study of aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase from pig heart. *J Mol Biol* **112**, 509-513.
2. Bera, T. K., Guzman, R. C., Miyamoto, S., Panda, D. K., Sasaki, M., Hanyu, K., Enami, J. and Nandi, S. 1994. Identification of a mammary transforming gene (MAT1) associated with mouse mammary carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9789-9793.
3. Chou, J. Y. 2000. Molecular genetics of hepatic methionine adenosyltransferase deficiency. *Pharmacol Ther* **85**, 1-9.
4. Desai, S. N. and Desai, P. V. 2008. Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities of rat brain during crush syndrome. *Neurosci Lett* **447**, 58-61.
5. Egger, G. and Dixon, J. 2014. Beyond Obesity and Lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int* **2014**, 731685.
6. Fardet, A. and Boirie, Y. 2013. Associations between diet-related diseases and impaired physiological mechanisms: a holistic approach based on meta-analyses to identify targets for preventive nutrition. *Nutr Rev* **71**, 643-656.
7. Flydal, M. I. and Martinez, A. 2013. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life* **65**, 341-349.
8. Furujo, M., Kinoshita, M., Nagao, M. and Kubo, T. 2012. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: neurological manifestations and relevance of S-adenosylmethionine. *Mol Genet Metab* **107**, 253-256.
9. Green, J. L., Sawaya, F. J. and Dollar, A. L. 2011. The effects of caloric restriction on health and longevity. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **13**, 326-334.
10. Igarashi, K. and Katoh, Y. 2013. Metabolic aspects of epigenome: coupling of S-adenosylmethionine synthesis and gene regulation on chromatin by SAMIT module. *Subcell Biochem* **61**, 105-118.
11. Izard, T., Fol, B., Pauptit, R. A. and Jansonius, J. N. 1990. Trigonal crystals of porcine mitochondrial aspartate aminotransferase. *J Mol Biol* **215**, 341-344.
12. Kato, Y., Asano, Y., Makar, T. K. and Cooper, A. J. 1996. Irreversible inactivation of aspartate aminotransferase by 2-oxoglutaconic acid and its dimethyl ester. *J Biochem* **120**, 531-539.
13. Lai, C. Q., Parnell, L. D., Troen, A. M., Shen, J., Caouette, H., Warodomwicht, D., Lee, Y. C., Crott, J. W., Qiu, W. Q., Rosenberg, I. H., Tucker, K. L. and Ordovas, J. M. 2010. MAT1A variants are associated with hypertension, stroke, and markers of DNA damage and are modulated by plasma vitamin B-6 and folate. *Am J Clin Nutr* **91**, 1377-1386.
14. Marion, V., Sankaranarayanan, S., de Theije, C., van Dijk, P., Hakvoort, T. B., Lamers, W. H. and Köhler, E. S. 2013. Hepatic adaptation compensates inactivation of intestinal arginine biosynthesis in suckling mice. *PLoS One* **8**, e67021.
15. Melander, W. R. 1975. Effect of aggregation on the kinetic properties of aspartate aminotransferase. *Biochim Biophys*

- Acta* **410**, 74-86.
16. Mudd, S. H. 2011. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **157C**, 3-32.
 17. Nagashima, F., Tanase, S., Fukumoto, Y., Joh, T., Nomiya, H., Tsuzuki, T., Shimada, K., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. and Morino, Y. 1989. cDNA cloning and expression of pig cytosolic aspartate aminotransferase in *Escherichia coli*: amino-terminal heterogeneity of expressed products and lack of its correlation with enzyme function. *Biochemistry* **28**, 1153-1160.
 18. Rodríguez, J. L., Boukaba, A., Sandoval, J., Georgieva, E. I., Latasa, M. U., García-Trevijano, E. R., Serviddio, G., Nakamura, T., Avila, M. A., Sastre, J., Torres, L., Mato, J. M. and López-Rodas, G. 2007. Transcription of the MAT2A gene, coding for methionine adenosyltransferase, is up-regulated by E2F and Sp1 at a chromatin level during proliferation of liver cells. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 842-850.
 19. Sidransky, H. 1976. Nutritional disturbances of protein metabolism in the liver. *Am J Pathol* **84**, 649-668.
 20. Skullerud, K. 1985. Variations in the size of the human brain. Influence of age, sex, body length, body mass index, alcoholism, Alzheimer changes, and cerebral atherosclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* **102**, 1-94.
 21. Southwell, J. L., Yeagans, G. S., Kowalewski, C. and Seidler, N. W. 2002. Acrolein modifies and inhibits cytosolic aspartate aminotransferase. *J Enzyme Inhib Med Chem* **17**, 19-23.
 22. Tordjman, J., Leroyer, S., Chauvet, G., Quette, J., Chauvet, C., Tomkiewicz, C., Chapron, C., Barouki, R., Forest, C., Aggerbeck, M. and Antoine, B. 2007. Cytosolic aspartate aminotransferase, a new partner in adipocyte glyceroneogenesis and an atypical target of thiazolidinedione. *J Biol Chem* **282**, 23591-23602.
 23. Wang, C. Y., Davoodi-Semiromi, A., Shi, J. D., Yang, P., Huang, Y. Q., Agundez, J. A., Moran, J. M., Ochoa, B., Hawkins-Lee, B. and She, J. X. 2003. High resolution mapping and mutation analyses of candidate genes in the ur-ofacial syndrome (UFS) critical region. *Am J Med Genet* **119A**, 9-14.
 24. WHO. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894) (ISBN: 92 4 120894 5).
 25. Winefield, C. S., Farnden, K. J., Reynolds, P. H. and Marshall, C. J. 1995. Evolutionary analysis of aspartate aminotransferases. *J Mol Evol* **40**, 455-463.
 26. Wu, S. M., Huang, Y. H., Lu, Y. H., Chien, L. F., Yeh, C. T., Tsai, M. M., Liao, C. H., Chen, W. J., Liao, C. J., Cheng, W. L. and Lin, K. H. 2010. Thyroid hormone receptor-mediated regulation of the methionine adenosyltransferase 1 gene is associated with cell invasion in hepatoma cell lines. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1831-1843.

초록 : 영양고갈-스트레스에 의해서 상승 발현하는 유전자(*Got1*과 *Mat1*)의 분석

박준석¹ · 권영숙² · 이은령³ · 권기상^{3*}

(¹인제대학교 일산백병원 응급의학과, ²중부대학교 간호학과, ³경운대학교 임상병리학과)

영양분의 제한공급은 인체에 큰 스트레스중의 하나로서, 분자수준의 유전자발현과 생리기능에 영향을 미친다. 영양고갈-스트레스 동안에 일어나는 세포반응을 이해하는 것은 다이어트를 실시할 때에 일어나는 부작용을 최소화할 수 있는 실마리를 제공해준다. *Got1* 유전자의 발현은 starvation 1시간부터 발현이 증가하다가 24시간에서 정상상태로 돌아왔다. *Mat1* 유전자의 발현은 starvation 1시간부터 24시간까지 지속적으로 발현이 증가하였다. Rat를 1-3일간 starvation에 의해서는 *Got1* 유전자의 발현은 큰 변화를 보이지 않았지만, *Mat1* 유전자의 발현은 cerebral cortex에서 현저하게 줄어드는 반면에 cerebellum과 lung에서는 1-2일간의 starvation에 의해서 유전자 발현이 증가하다가 3일째는 발현이 줄어들었다. Heart에서는 starvation에 의해서 유전자 발현이 관찰되지 않을 정도로 줄어들었다. 간헐 starvation (2일간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 것과 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation 군)으로 나누었다. *Got1* 유전자의 발현은 lung에서만 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군에서 아주 강한 발현을 보였다. liver의 경우는 2일 간 starvation 군과 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급한 군에서 발현이 약해진 후 2일간 starvation + 1일간 먹이를 공급 + 2일간 starvation 군에서 강한 발현을 보였다. Muscle에서는 starvation 시작과 동시에 발현이 현저히 감소 후 2일간 starvation 후 1일간 먹이를 공급하면 정상상태로 돌아왔다. *Mat1* 유전자는 의미 있는 발현 변화가 없었다. *Got1* 유전자 발현은 ♂의 경우 NaCl 공급에 의해서 lung에서는 강한 발현을 보이고 thymus에서는 감소하였고 나머지는 뚜렷한 발현 변화가 관찰되지 않았다. ♀의 경우는 물 공급 보다가 NaCl 공급에 의해서 모두 약한 발현 양상을 보였다. *Mat1* 유전자의 발현은 ♂의 경우 NaCl 공급에 의해서 lung, kidney, muscle에서 약하지만 상승 발현이 관찰되었다. ♀의 경우는 NaCl 공급에 의해서 상승 발현 하는 것이 관찰되지 않았다.