

신경세포에서 소포체 스트레스에
의한 ischemia-responsive protein
(irp94)의 발현조절

연세대학교 대학원

의 학 과

김 승 환

신경세포에서 소포체 스트레스에
의한 ischemia-responsive protein
(irp94)의 발현조절

지도 김 승 호 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 승 환

김승환의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

경험과 능력이 부족한 제가 이 논문을 준비하는데 많은 격려와 조언을 아끼지 않으신 연세대학교 응급의학교실 김승호 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 교정을 하여주신 김승민 교수님, 허지희 교수님, 권오유 교수님, 백자현 교수님께도 지면을 빌려 감사의 말을 전합니다.

생소한 분자생물학분야의 실험을 통하여 저에게 부족한 지식을 쌓을 수 있었고, 응급의학측면에서도 다양한 분자생물학적 실험 및 응용분야가 있음을 일깨워 주신 관계된 모든 분께 영광을 돌리겠습니다.

마지막으로 저의 든든한 후원자이자 항상 격려와 힘을 주시는 친가 및 처가 부모님과 이 기쁨을 함께하고 싶습니다. 또한, 나의 사랑하는 아내 도희와 아들 태범이와 영광을 함께 하고 싶습니다.

저자 씀

5. Northern blotting

9

6. irp94 mRNA 의 발현

특이성 10

7. irp94 mRNA 의 세포내

반감기 11

8. irp94 mRNA 의 소포체 스트레스 유도약물에 대한 발현 정도

11

9. irp94 mRNA 의 열충격에 대한

발현 12

10. 소포체와 세포질간의 의사소통에서 irp94 mRNA 의

역할

12

III. 결과

13

1. 일과성 전뇌 허혈/재관류 후 gerbil 뇌조직에서의 irp94

국문요약

신경세포에서 소포체 스트레스에 의한 ischemia-responsive protein (irp94)의 발현조절

신경세포의 허혈성 손상시에 발현되는 소포체 샤페론 (endoplasmic reticulum chaperone)인 94 kDa 의 분자량을 가진 ischemia-responsive protein 94 (irp94) 유전자가 소포체 스트레스에서 담당하는 역할을 규명하고자 하였다.

일과성 전뇌 허혈 유도 후 재관류 하였을 때에 Mongolian gerbil 의 중추신경계에서의 irp94 mRNA 발현부위를 조사하였다. 백서의 갈색세포종에서 유래한 PC12 세포를 사용하여 irp94 유전자의 발현조절 단계, mRNA 의 세포내 반감기, 소포체 스트레스 약물과 열 충격에 대한 발현반응, 세포질 프로테오솜과의 관계에 대해 연구하였다.

irp94 mRNA 는 30 분 허혈 후 3 시간동안 재관류 시킨 Mongolian gerbil 의 대뇌피질과 해마 부위에서 가장 강하게 발현하였다. PC12 세포에서 irp94 mRNA 의 발현 조절은 전사단계에서 이루어지며, mRNA 의 세포내 반감기는 약 5 시간 이었다. 소포체 스트레스 유도약물 중 신생단백질의 당쇄형성을 차단하는 tunicamycin 과 산화적 스트레스를 유도하는 H₂O₂ 에 의해서 현저히 강한 발현을 보였고 시간이 경과할수록 증가하였다. 열충격 (heat shock)에 대해서는 열충격 후 수복과정에서 발현이 증가하는 소견을 보였고, 세포질 프로테오솜 (proteasome)이 비활성화될 때에도 발현은 증가하였다.

이상의 결과에서 irp94 는 신경세포의 허혈손상시 특이적으로 발현하는 단백질로서 소포체 스트레스 중 단백질의 당화붕쇄 및 산화 스트레스에

의해서 발현이 촉진됨을 알 수 있었다. 그리고 열충격 후 세포의 회복기에 단백질 수복과정등에 관여함을 알 수 있었다. 또한 기능적으로 endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) 유지에도 매우 중요하게 작용함을 간접적으로 확인할 수 있었다.

핵심되는 말 : irp94, 샤페론, 소포체, 허혈, 신경세포

신경세포에서 소포체 스트레스에 의한 ischemia-responsive protein
(irp94)의 발현조절

<지도교수 김 승 호>

연세대학교 대학원 의학과

김 승 환

I. 서 론

허혈 (ischemia)이란 조직에 혈류공급이 중단되어서 세포손상이 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 전 뇌허혈증 (global cerebral ischemia), 전뇌 허혈증 (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.^{1,2} 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.³ 즉, 일과성 전뇌 허혈 유도 후 immediate early genes, apoptosis-related gene, epidermal growth factor (EGF), faciogenital 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.⁴⁻¹⁷

그러나 이 같은 각종 인자들이 허혈 유도과정에서 어떤 역할을 하는지, 신경세포의 방어수단으로서 어떻게 작용하는지, 허혈의 진행과정에서 단백질분해에 어떻게 작용하는지, 이웃한 신경세포에게 어떤 종류의 신호를 어떻게 전달하는지 등과 같은 문제는 아직까지 분명하게 밝혀져 있지 않고 있다.⁵ 이들 중 일부 유전자는 신경세포의 괴사를 촉진시키지만, 반면에 어떤 유전자들은 일과성 전뇌 허혈에서 신경세포의 생존을 돕기도 한다.¹⁸ 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 보고 되었다.^{6,7} 그러나 많은 연구보고에도 불구하고 허혈로 유도되는 신경세포의 변성과 방어에 대해서는 아직도 분자 생물학적인 기전이 명확히 밝혀지지 않고 있다.

1999 년 Yagita 에 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 family 에 속하지만 지금까지 보고된 것과는 전혀 다른 분자특성을

보인다.^{19,20} 백서의 정상조직 중 irp94 의 발현이 확인되는 곳은 폐, 위, 간, 비장, 신장, 고환, 뇌로 알려져 있다. irp94 는 백서의 총경동맥을 임시로 결찰하여 허혈을 유도했을 경우 15 분째에 가장 강하게 발현하며, 10 분 허혈 후 재관류를 시켰을 때에는 12 시간째까지 발현이 증가한다.²¹ 배양세포를 대상으로 irp94 의 샤페론 (chaperone) 성질을 알아 본 ATP-depletion 실험에서는, ATP 결핍 2 시간째부터 강한 발현을 보였으며, 소포체 (endoplasmic reticulum; ER) 샤페론으로 잘 알려진 Erp72 보다 민감한 반응을 보여 허혈상태가 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 stimulating hormone; TSH)에 의해 더욱 강하게 유도되는 것으로 밝혀졌다.²² 지금까지의 irp94 에 관해서는 유전자의 발현위치, 호르몬 및 소포체 스트레스에 의한 발현 등이 연구되었지만, 실제로 irp94 가 허혈성 손상으로 유도된 세포성 외부환경의 변화에 반응하여 어떤 시기와 위치에 발현하는지는 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

뇌 허혈에 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 결함이 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 (folding)

및 조합 (assembly)이 비정상적으로 되는 것이 중요한 원인으로 밝혀지기 시작하였다. 이러한 관점에서 신경세포 내의 UPR 에 의한 irp94 유전자의 발현변화가 허혈유도와 진행과정에 어떤 영향을 미치는지를 분명하게 하는 것이 뇌허혈 손상의 기전을 이해하는데 큰 도움을 줄 것이다.

본 연구에서는 백서의 irp94 cDNA 의 501 bp DNA 단편을 분자탐색자 (molecular probe)로 사용하여 Northern blotting 방법을 통해 irp94 mRNA 의 열충격 및 각종 소포체 스트레스 유발 약물들에 대한 발현 정도, mRNA 의 세포내 반감기, 발현조절 특이성, 허혈 후 재관류때의 뇌 조직에서의 발현변화, 프로테오좀 억제제에 대한 반응 등을 관찰하여 irp94 유전자가 신경세포의 소포체 스트레스에서의 역할을 규명하고자 하였다. 실험의 결과는 허혈손상과 관련한 irp94 의 역할에 대한 정보제공과 함께 허혈손상의 진단과 치료에서 새로운 가능성을 여는데 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법

1. Gerbil 의 뇌허혈 유도

대동맥에서 분지되는 척추동맥이 없어서 뇌허혈 실험에 많이 사용되는 수컷 Mongolian gerbil 을 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 30 분 동안 결찰하여 일과성 전뇌 허혈을 유도하였다. 협자로는 약 60 g 의 압력을 가진 신경외과에서 혈관수술에 사용하는 Sugita mini-temporary clip 을 사용하였다. 마취상태에서 30 분 간의 허혈과 3 시간 동안의 재관류 과정을 거친 gerbil 의 뇌를 신속하게 적출하여 대뇌피질, 소뇌, 해마, 척수 부위에서 total RNA 를 추출하였다. 대조군과 실험군으로는 각각 세 마리씩의 gerbil 을 사용하였고 대조군은 허혈 및 재관류 과정을 제외한 모든 마취, 실험조작을 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 penicillin 을 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 serum 과 0.25% fetal bovine serum 이 포함된 DMEM 에서 하루 동안 배양시켜 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약 중에서 특별하게 언급하지 않은 시약류는 모두 Sigma Chemical Co. (MO, USA) 의 것을 사용하였다.

3. Total RNA 분리

Gerbil 의 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 μ l와 함께 1.5 ml tube 에 넣고 얼음 위에서 덩어리가 없어질 때까지 균질화 (homogenization) 시킨 다음 RNA 추출 용액 200 μ l를 첨가하여 약 30 초간 교반 후 상온에서 5 분간 방치하였다. PC12 세포는 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)으로 3 회 세척 후 PBS 800 μ l와 함께 상온에서 5 분간 방치하여 용해시켰다. 이후 12,000 x g (4°C)에서 15 분간 원심 분리하여 얻은 500 μ l의 상층액에 500 μ l의 isopropanol 을 첨가하여 4°C에서 15 분간 방치 후 다시 12,000 x g (4°C)에서 15 분간 원심 분리하여 튜브의 바닥에서 백황색의 침전물을 얻었다. 이 침전물에 75% ethanol 500 μ l를 첨가하고 잘 교반하여 7,500 x g (4°C)에서 8 분간 원심 분리하여 RNA 를 얻었으며 total RNA 의 질량은 분광광도계 (spectrophotometer)로 측정하였다. RNA 를 다룰 때는 항상 장갑을 착용하고 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 물을 사용하였으며, -20°C에서 1 mM 의 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (pH 7)를 함유한 멸균 증류수에 보관하였다.

4. 역전사 증합효소연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)

Northern blotting 을 위해 irp94 유전자 (GenBank accession No. AF077354)의 단편을 RT-PCR 방법으로 얻은 501 bp 를 random primer kit 로

사용하여 ^{32}P 를 표식하여 분자표식자 (molecular probe)로 사용하였다. PCR primer 로는 irp94 유전자의 coding region 중 PCR 산물이 501 bp 가 만들어지도록 앞길잡이 (forward primer) (20-mer); 5'-CAGGATTTGCCCTATCCAGA-3', 뒷길잡이 (reverse primer) (20-mer); 5'-GTCATTCGGTTCCTTCTCCA-3'를 제작하였다. Gerbil 뇌조직의 total RNA 를 주형으로 사용하여 전술한 두 길잡이를 이용하여 31 회의 중합효소연쇄반응을 시행하여 501 bp DNA 단편을 얻었다. 이것을 TA 플라스미드 (Promega, WI, USA)에 연결 (ligation)하여 JM109 competent bacteria 100 μl 와 10 ng 의 재조합 플라스미드를 섞은 후 얼음 위에 10 분 방치하고, 42°C에서 50 초 동안 열 충격을 준 다음 다시 2 분 동안 얼음에 방치하였다. 이후 상온의 SOC 배지 900 μl 를 첨가하여 60 분간 37°C에서 225 rpm 으로 원심분리하여 JM109 를 X-gal 과 IPTG 가 포함된 ampicillin 우무평판 (agar plate)에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양균주에서 white colony 를 분리 배양하여 플라스미드의 유무를 확인하고, 제한효소로 소화시켜 우무겔 (agarose gel)에 전기영동하여 501 bp 의 irp94 DNA 단편을 가진 플라스미드임을 확인하고, 탐색자로 사용하기 위하여 플라스미드를 Wizard Miniprep Kit (Promega, WI, USA)로 대량 분리하였다. 삽입된 irp94 DNA 의 재확인을 위해서는 DNA 염기순서분석을 시행하여 irp94 임을 재확인하였다.

5. Northern blotting

Total RNA 를 변성시켜 formaldehyde gel 에서 분획하였다. 즉, 50% formamide / 2.2 M formaldehyde 가 포함된 1 x MOPS buffer (20 mM MOPS,

5 mM Sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0)에 RNA 20 μg 을 용해시킨 다음 65°C에서 5 분간 가열하여 상온에서 방치한 후 1% formaldehyde gel 에서 분석하였다. 전기영동은 gel 을 물로 여러 번 닦아서 formaldehyde 를 제거하고 PVDF Western Blotting Membrane (Schleicher & Schuell BioScience, NH, USA)에 모세관 현상을 이용하여 하룻밤 동안 시행하였다. PVDF membrane 은 5 x SSC 로 희석시킨 20 x SSC [174 g NaCl (3 M), 88.2 g sodium citrate (0.3 M), pH 7]로 가볍게 세척하고, 68°C에서 2 시간 동안 열을 가하여 RNA 를 고정시켰다. 이후 Quick hybridization solution (Stratagen, WA, USA)으로 62°C에서 30 분간 전부합화 (prehybridization)시키고, ^{32}P 로 표식한 변성탐색자를 사용하여 62°C에서 12 시간 동안 중합반응을 마친 다음 20 x SSPE (1L) [175.3 g NaCl (3 M), 27.6 g NaH_2PO_4 (0.2 M), 40 ml 0.5 M EDTA]를 6 x SSPE 로 희석하여 0.5% SDS 를 섞어 15 분 동안 2 회, 1 x SSPE / 0.5% SDS (37°C)로 2 회 세척하고 0.1 x SSPE / 0.1% SDS 로 60 분간 60°C에서 세척하였다. 필름 감광은 Kodak-OMAT AR 을 사용하여 -80°C에서 하룻밤 동안 실시하였다.

6. irp94 mRNA 의 발현 특이성

배양한 PC12 세포에 전사의 특이적 억제제인 actinomycin D (AD) 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 유전암호해석의 특이적 억제제인 cycloheximide (CH) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 2 시간, 10 시간 씩 처리한 후 total RNA 를 얻어 Northern blotting 을 시행하였다.

7. irp94 mRNA 의 세포내 반감기

배양한 PC12 세포에 전사 효소인 RNA polymerase II 의 특이적 억제제인 5,6-dichlo-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) 25 μg/ml 을 처리하여 mRNA 의 합성을 저지시킨 후 8 시간까지 2 시간 간격으로 세포 내에 남아 있는 total RNA 의 양을 Northern blotting 으로 측정하여 시간에 따른 감소 정도를 통해 반감기를 산출하였다.

8. irp94 mRNA 의 소포체 스트레스 유도약물에 대한 발현 정도

PC12 세포에 소포체 내의 칼슘을 교란시켜서 단백질의 정상적인 접힘 (folding)을 방해하는 Ca⁺⁺ 이온운반체 (ionophor)인 A23187 10 μM, 소포체에서 Golgi complex 로 신생분비단백질의 이동을 차단하는 brefeldin A (BFA) 10 μg/ml, 신생분비단백질의 당쇄부가 (N-glycosylation)를 방해하여 단백질 접힘을 방해하는 tunicamycin 2 μg/ml, 강력한 환원제로서 신생단백질의 각 thiol 기 (-SH)가 이황화결합 (-S-S-)으로 형성되는 것을 방해하는 dithiothreitol (DTT) 3 mM, 소포체 내의 산화 스트레스를 유도하여 정상적인 단백질의 접힘 및 조합을 방해하는 H₂O₂ 23 μl/ml 의 5 가지 소포체 스트레스 유도약물을 처리하여 37℃에서 3 시간 동안 배양하였다. 이후 차가운 PBS 로 3 회 세척한 후 RNeasyTM B Kit 을 사용하여 total RNA 를 얻어 Northern blotting 을 시행하였다. 그리고 발현이 증가하는 약물에 대해서는 다양한 약물처리 시간에 따른 발현 양상을 알아보는 추가 실험을 하였다.

9. irp94 mRNA 의 열충격에 대한 발현

PC12 세포에 45°C에서 15 분 동안의 열 충격을 가한 뒤에 37°C에서 0 시간, 1 시간, 5 시간 경과 후 각각의 total RNA 를 얻어 Northern blotting 을 시행하였다.

10. 소포체와 세포질 간의 의사소통에서 irp94 mRNA 의 역할

PC12 세포의 세포질 프로테오솜 (proteasome) 억제제인 N-acetyl-leucyl-norleucinal (ALLN) 25 μm 과 methylguanidine (MG 132) 25 μm 를 각각 37°C에서 30 분씩 처리하여 total RNA 를 얻어 Northern blotting 을 시행하였다.

III. 결 과

1. 일과성 전뇌 허혈/재관류 후 gerbil 뇌조직에서의 irp94 mRNA 발현 부위

총경동맥의 일시 결찰에 의한 30 분 간의 일과성 전뇌 허혈 및 3 시간 재관류의 결과, 대조군에서는 특이적인 발현 양상을 관찰할 수 없었으나 실험군에서는 대뇌피질과 해마 부위에서 irp94 mRNA 의 강한 발현을 관찰할 수 있었다 (그림 1).

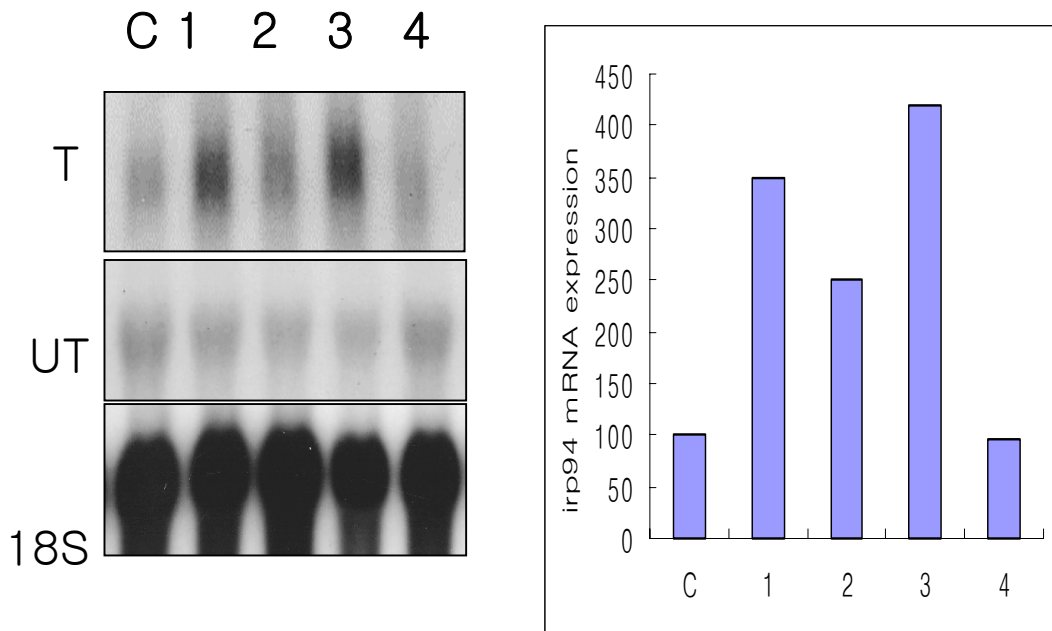


그림 1. 허혈/재관류 후 gerbil 의 중추신경계 부위별 irp94 mRNA 의 발현.

T: 허혈/재관류 (실험군), UT: sham 군, 18S: 18S rRNA (control),

C:대조군, 1:대뇌피질, 2:소뇌, 3:해마, 4:척수

2. irp94 mRNA 의 발현 특이성

전사 억제제인 AD, 유전암호해독 억제제인 CH 처리 모두가 PC12 세포의 irp94 mRNA 발현을 약화시켰다. 또한 이러한 발현 약화는 AD 처리군에서 더욱 현저하여 irp94 mRNA 의 발현은 유전암호해독 수준보다는 전사 수준에서 조절됨을 알 수 있었다. CH 처리군에서 보인 대조군보다 약한 irp94 mRNA 의 발현은 PC12 세포의 전체적인 유전암호해독단계의 저하로 인한 부작용으로 사료된다 (그림 2).

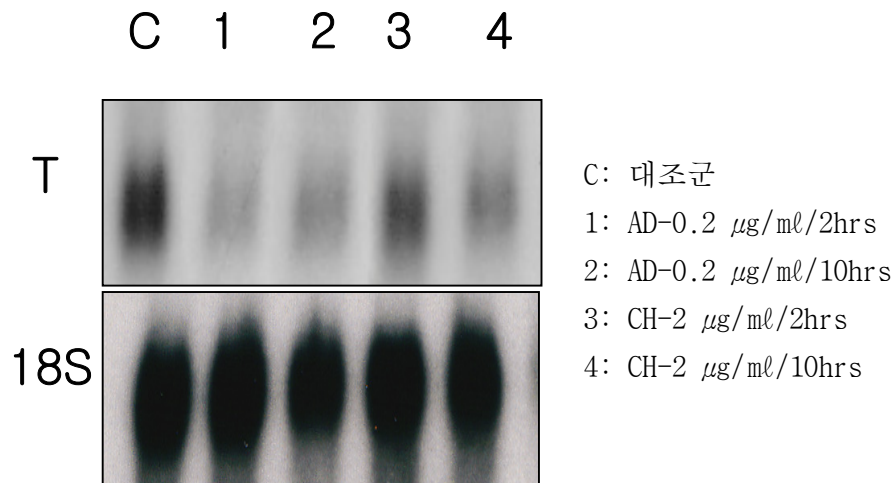


그림 2. PC12 세포에서 irp94 mRNA 의 발현 특이성.

T: AD 와 CH 처리한 PC12 세포, 18S: 18S rRNA (control), AD: actinomycin D, CH: cycloheximide.

3. irp94 mRNA 의 세포내 반감기

irp94 mRNA 는 시간이 경과하면서 점점 약한 발현을 보였다. DRB 처리 전의 발현 정도를 100%로 하여 시간에 따른 발현 정도를 도표로 표시할 때, 세포내 반감기는 약 5시간임을 알 수 있었다 (그림 3).

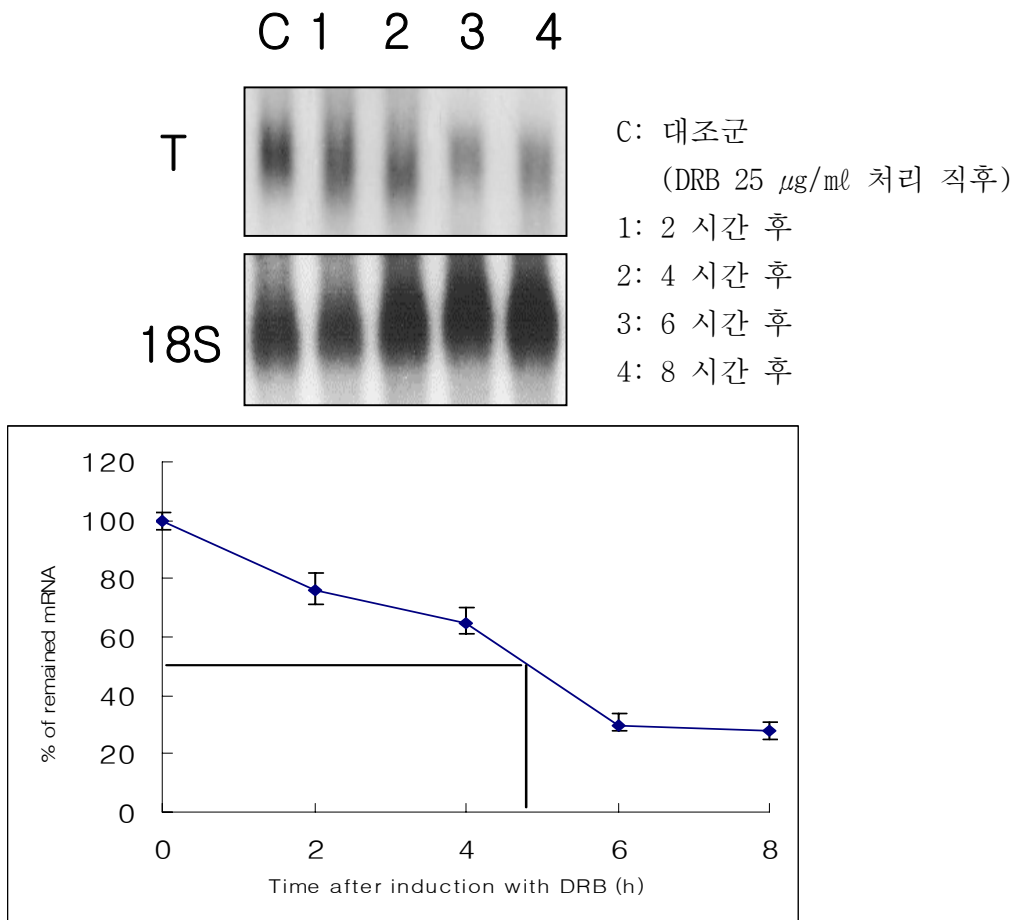


그림 3. PC12 세포에서 irp94 mRNA 의 세포내 반감기.

T: DRB 처리된 PC12 세포, 18S: 18S rRNA (control), DRB: 5,6-dichlo-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole.

4. 소포체 스트레스 유도약물에 대한 irp94 mRNA 의 발현

PC12 세포는 5 가지 약물 중 tunicamycin 처리에 가장 강한 irp94 mRNA 의 발현을 보였다. H₂O₂ 에도 발현이 증가하였으나 나머지 약물에서는 대조군에 비해 괄목할 만한 발현을 보이지 않았다 (그림 4).

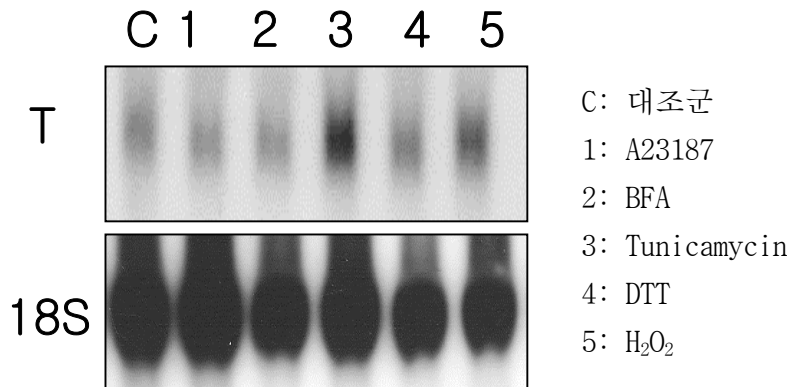


그림 4. PC12 세포에서 소포체 스트레스 유도약물에 의한 irp94 mRNA 발현.
T: 소포체 스트레스 유도약물 처리군, 18S: 18S rRNA (control), A23187: Ca⁺⁺ ionophor, BFA: brefeldin A, DTT: dithiothreitol.

5. 신생분비단백질의 당쇄부가 방해에 대한 irp94 mRNA 의 발현

신생단백질의 당쇄부가 (N-glycosylation)를 특이적으로 방해하는 tunicamycin 4 μ l/ml를 1 시간, 3 시간, 5 시간, 12 시간 동안 처리하였을 때 irp94 mRNA 는 점점 강하게 발현되었다 (그림 5).

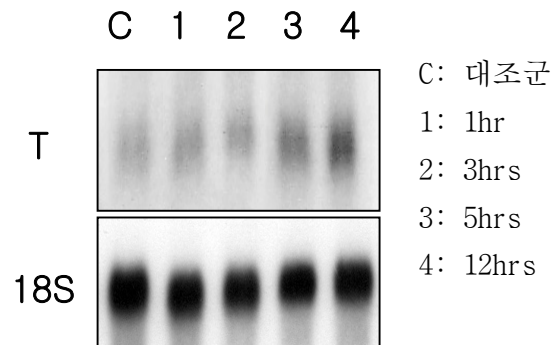


그림 5. PC12 세포에서 신생분비단백질의 당쇄부가 방해에 대한 irp94 mRNA 의 발현.

T: tunicamycin 4 μ l/ml 처리군, 18S: 18S rRNA(control)

6. 산화 스트레스에 대한 irp94 mRNA 의 발현

대조군에 비해 H₂O₂ 처리 3 시간 경과시 irp94 mRNA 가 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 6).

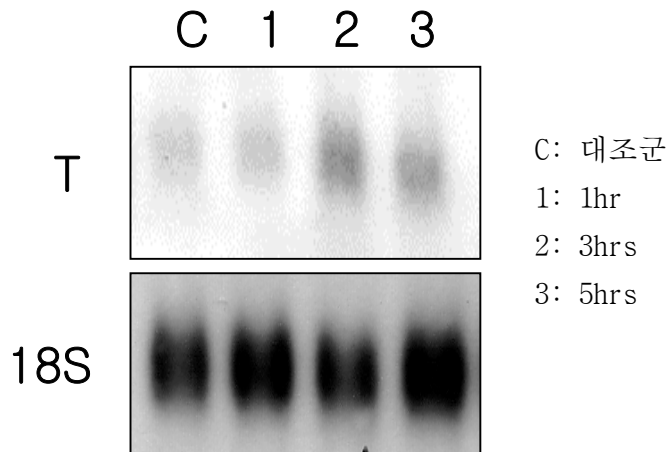


그림 6. PC12 세포에서 산화 스트레스에 대한 irp94 mRNA 의 발현.

T: H₂O₂ 23 μ l/ml 처리군, 18S: 18S rRNA (control)

7. 열 충격에 대한 irp94 mRNA 의 발현

열 충격 (45°C에서 15 분) 처리 직후에 비하여 일정한 시간 (1 시간, 5 시간) 이 경과할수록 irp94 의 발현은 더욱 강해졌다 (그림 7).

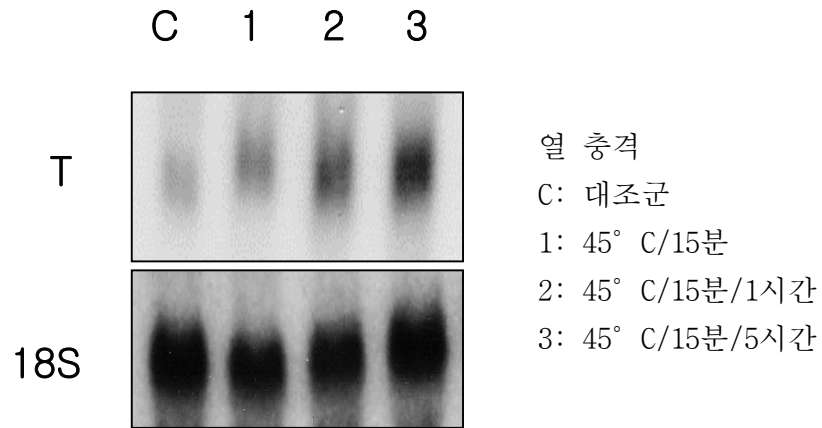


그림 7. PC12 세포에서 열 충격에 대한 irp94 mRNA 의 발현.

T: 열 충격 처리군, 18S: 18S rRNA (control).

8. 세포질 프로테오솜 억제제에 대한 irp94 mRNA 의 발현

대조군에 비하여 ALLN, MG 132 투여군 각각에서 강한 발현이 관찰되었다 (그림 8).

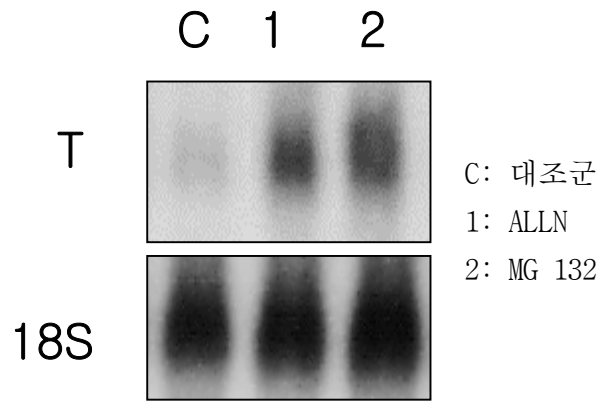


그림 8. PC12 세포에서 세포질 프로테오솜 억제제에 대한 irp94 mRNA 의 발현.

T: ALLN 과 MG 132 처리군, 18S: 18S rRNA (control), ALLN: N-acetyl-leucyl-norleucinal, MG 132: methylguanidine.

IV. 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 응답현상으로 이해할 필요성이 제기되었다. 허혈은 여러 종류의 화학 스트레스로 구성된 복합 스트레스로서 각각 다른 세포내 소기관들을 표적으로 하고 있다. 예를 들어, 생체반응으로 발생하는 활성산소와 자유기체 (free radical compound)는 DNA 장애를 유발하며 세포내의 ATP 감소와 세포질의 단백질변성을 유발하여 세포질의 기능을 상실하게 만든다. 이러한 허혈 스트레스에 대응하기 위하여 세포는 각각의 세포내 소기관에서 다양한 스트레스 단백질의 발현을 유도한다.

그러나, 신경세포의 허혈손상에 대한 방어 메커니즘은 아직 명확하게 밝혀지지 못했다. 지금까지의 연구를 살펴보면 세포내 칼슘의 항상성 (homeostasis) 유지가 중요하여 세포내 칼슘의 교란은 허혈손상과 깊은 관계를 가진다는 것을 알 수 있었다. 신경세포의 허혈손상시 항상성의 장애가 발생하는 곳인 세포질과 mitochondria 의 칼슘이온의 농도변화에 기인한 세포의 항상성의 장애가 중요한 시발점으로 여겨졌지만, 최근의 연구에 의하면 정상적인 기능을 위하여 세포질보다 몇 배의 활동도 (activity)가 필요한 소포체내의 칼슘농도의 저하로 인한 소포체단백질의 정상적인 접힘 (folding)과 공정화 (processing)의 장애로 신경세포의 사멸이 유도된다는 것이 대체적인 통설이다.²³⁻²⁷ 또한 현재까지의 분자세포생물학적 연구 결과에 따르면 허혈손상시 소포체내의 환경변화 (단백질의 당쇄합성 저해, 단백질의 이황화결합 형성 저해, 칼슘고갈,

분비단백질의 소포체에서 Golgi 복합체로의 이동 저해, ATP 고갈유도)에 의한 소포체내 분비단백질의 접힘 (folding) 및 조합 (assembly)과정의 불량이 결정적인 원인으로 밝혀지기 시작하였다. 이상의 과정에서 허혈자극이 소포체의 기능이상을 초래하게 되는 기전을 종합적으로 살펴보면 정상시에는 에너지가 소모되는 과정으로 세포질에서 소포체내강 (ER lumen)으로 칼슘이온을 역으로 이동시키는 능동적인 ER Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 에 의해서 소포체와 세포질사이에 급격한 칼슘이온농도의 차이가 존재하게 되는데, 허혈손상이 발생하면 소포체내의 칼슘항상성의 이상에 직접적인 영향을 끼치게 되고 소포체내에 저장되어 있던 칼슘이 유리되면서 oxygen/glucose-deprivation (OGD) 작용에 의해서 세포질내에 존재하는 칼슘이온의 활성도의 증가를 유발하여 허혈손상에 대한 일련의 다양한 유전자의 발현 및 억제 작용을 촉발한다는 것이다.²⁸

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 복합스트레스는 세포내 에너지대사를 저해하여 ATP 의 고갈, 혐기성 해당작용에 의한 산성도 (pH) 저하, 활성산소의 발생을 유도하고 이러한 자극이 더욱 세포내 단백질변성을 촉진시키게 된다. 이러한 환경변화에 대한 방어인자로서 소포체 샤페론이 유도되어 세포내 분비단백질과 막 단백질의 비가역적인 변성을 억제하게 된다. 신경세포에 일과성 뇌허혈 손상이 가해진 상황하에서, 허혈로 인한 유전암호해독과정의 억제 (shut-down)가 초기 재관류시에는 unfolded protein 의 합성을 봉쇄하고 응집 (aggregation)을 억제하여 신경세포를 보호하는 방향으로 나타나고, 재관류의 기간이 길어질수록 신경세포보호 단백질 (neuroprotective protein)인 XBP1^{proc} 와 GRP78 과 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.²⁸ 또한 최근의 연구에 의하면 소포체 스트레스가 유도되면 소포체내에 축적되는 비정상적인 단백질들이 일정 비율로 분해된다는 개념인 endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD)이 확립되었다. 소포체내에서 유전암호해독되는 단백질의 약 30%가 비정상적으로 접힌 (unfolded, misfolded, or malfolded) 단백질이지만 내, 외부의 자극에 의해서 과도하게 축적되지 않으면 질병으로 이어지지 않는다. 그 이유는 소포체내에서 정상적인 단백질로 접혀지지 못한 것들은 세포질의 프로테오좀과 긴밀한 관계를 유지하여 분해되어버림으로써 일정 수준 이하로 유지된다. 이러한 ERAD 메커니즘이 정상적으로 작동되지 못하면 과도한 비정상적인 단백질이 소포체내에 축적됨으로써 유발되는 endoplasmic reticulum storage disease (ERSD)가 된다.

본 연구의 대상인 irp94 가 허혈 스트레스의 방어인자로서의 가능성을 보여준다고 할 수 있는데, 이 것은 irp94 는 허혈이라는 세포의 손상 원인에 대해 신경세포의 변성을 억제하는 신생단백질의 생산을 동반하는 역동적인 항스트레스 반응의 일부를 담당하고 있기 때문이다.

본 연구 결과에서 얻은 irp94 의 허혈손상에서의 역할은 다음과 같이 정리할 수 있다. irp94 가 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 이루어 지며 세포내의 반감기는 약 5 시간이라는 것도 알 수가 있었다. 소포체 스트레스 유도약물 중에서 신생단백질의 당쇄부가형성을 특이적으로 억제하는 tunicamycin 에 대해 가장 강한 발현을 보인 것은 당단백질이 소포체내에서 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. 허혈 손상시에는 많은 자유기 (free radical)가 생산되고 소포체가 각종 스트레스를 받을 때도 자유기들이 생체 고분자들과 반응하여 괴사 혹은 세포고사에 이르게 되나 실질적으로 산화 스트레스가 세포내에서 어떤 기능을 조절하는 지는 정확히 알 수 없는 상태이다. 특히 PC12 세포에서는 아무 것도 확인된 것이 없었는데 이번 연구에서 irp94 유전자가 강한 발현을 보인 것은 irp94 와 세포고사 과정에서의 어떠한 연관성을 유추해 볼 수 있게 하였다. 열 충격 후에 일정한 시간이 지날수록 강한 발현을 보인 것은 irp94 가 소포체 스트레스로부터 세포를 보호하는 샤페론 기능 보다는 일단 변성이 된 혹은 일부 변성된 단백질의 수복 (repair)과정에 관여하기 때문이지 않을까 하는 추정을 가능하게 한다. 정상적이지 못한 단백질 접힘을 보이는 분비단백질들이 세포내에 계속 축적되는 것은 세포자신에게는 심각한 세포 독성으로 작용한다. 일반적인 세포의 경우 약 30% 정도는 정상적이지 못한 단백질 접힘 현상이 소포체내에서 일어난다고 한다. 그렇다면 이들 세포독성으로부터 어떻게 세포가 생존을 유지할 수 있을까 하는 것이 의문이다. 이에 대한 새로운 개념이 endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD)이다. 즉, 소포체내에 축적되는 비정상적인 단백질의 축적이 세포질에 존재하는 프로테오솜과 밀접한 관계를 가짐으로써 소포체내를 항상 일정하게 유지한다는 것이다. 본 실험에서 확인된 것은 세포질에 존재하는 프로테오솜을 불활성화시켰을 때에 소포체내에 존재하는 irp94 의 발현이 증가한다는 사실이었다. 이는 소포체 샤페론인 irp94 의 분자생리적 특성을 고려할 때에 세포질의 프로테오솜의 불활성화로 인하여 소포체내에

비정상적인 단백질 접힘을 보이는 단백질들이 분해되지 못하고 계속 축적되기에 이를 처리하기 위하여 irp94 의 발현이 증가하는 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과는 irp94 가 뇌 허혈의 유도 및 방어기전에 어떤 기능을 가지는지를 알기 위한 기본적인 분자생물학적 정보를 제공한다. 이는 뇌 허혈의 예방 및 치료제의 개발에 새로운 가능성을 줄 것이다. 특히, 응급의학적으로 흔한 외상에 의한 뇌 손상을 포함한 다양한 형태의 뇌 병변시에 관찰 할 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.^{29,30} 이와 같은 허혈성 손상조직에서 대사장애가 다르게 나타나는 영역별로 손상기전의 차이가 있으므로 단계별 손상에 초점을 맞추어야 효과적으로 신경조직손상을 최소화할 수 있는 기전을 밝힘과 동시에 손상기전을 억제할 수 있는 새로운 방법도 개발될 수 있을 것이다.

V. 결 론

허혈손상 유발 시 신경세포 및 조직의 소포체내에서 발현되는 샤페론으로 알려진 94 kDa 분자량을 가진 irp94 의 성격과 기능을 규명하기 위해서 Mongolian gerbil 에서 허혈/재관류 손상을 유발하였고, 백서의 갈색세포종에서 유래한 PC12 세포에 허혈손상과 유사한 자극을 가하여 irp94 mRNA 의 발현양상을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Mongolian gerbil 에 대한 30 분 간의 일과성 전뇌 허혈 및 3 시간 동안의 재관류 후 irp94 mRNA 는 대뇌피질과 해마 부위에서 강한 발현을 보였다.
2. PC12 세포에서 irp94 mRNA 의 발현은 유전암호해독 단계보다 전사 단계에서 조절되었다.
3. 스트레스 상태에 있지 않은 PC12 세포에서 irp94 mRNA 의 세포내 반감기는 약 5시간이었다.
4. PC12 세포의 소포체의 항상성을 교란하는 여러 자극 중, 신생단백질의 당쇄형성 장애와 산화 스트레스가 강한 irp94 mRNA 의 발현을 유도하였다.
5. PC12 세포는 신생단백질의 당쇄부가형성 장애로 인한 소포체 스트레스에 대해 12 시간째에 가장 강한 irp94 mRNA 의 발현을 보였다.
6. PC12 세포는 산화 스트레스에 대해 3 시간 이후부터 강한 irp94 mRNA 의 발현을 보였다.
7. PC12 세포는 열 충격에 대해 시간이 진행될수록 강한 irp94 mRNA 의 발현을 보였다.
8. PC12 세포는 세포질 프로테오좀 억제제에 대해 irp94 mRNA 의 발현이 증가하였다.

참고문헌

1. Wolf PA, Cobb JL, D'Agostino RB. Epidemiology of stroke: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1992. pp.23-27.
2. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982;11:491-498.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
 9. 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.
 10. Xue JH, Fukuyama H, Nonoguchi K, Kaneko Y, Kido T, Fukumoto M, et al. Induction of apg-1, a member of the heat shock protein 110 family, following transient forebrain ischemia in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:796-801.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampus neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:299-307.
19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull* 2000;53:409-413.
26. 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.

27. 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.
28. Paschen W. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* 2003;34:365-383.
29. Paschen W. Mechanism of neuronal cell death: diverse roles of calcium in the various subcellular compartments. *Cell Calcium* 2003;34:305-310.
30. 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.

Abstract

Molecular characterization of ischemia-responsive protein 94
(irp94) response to unfolded protein response in neuron

Seung Whan Kim

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung Ho Kim)

I have studied the molecular biological functions of the ischemia-responsive gene (*irp94*), which encodes a 94 kDa protein and has endoplasmic reticulum (ER) chaperone activity in ischemic injury. 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