

# 부신피질종양에서 신호전달체계에 연관된 Oncogenes 발현에 관한 연구

— Gsa, Gia, CREB 단백질의 변이에 대하여 —

연세대학교 의과대학 내과학교실, \*연세대학교 병리학교실, \*\*목암연구소

임승길 · 정은경 · 이은직 · 박형천 · 김경래 · 이현철  
허갑범 · 정우희 \* · 신동환 \* · 이현숙 \*\* · 윤영대 \*\*

## Signal Transduction Related Oncogenes in Human Adrenal Cortical Tumor; Gsa, Gia, CREB

Sung-Kil Lim, M.D., Eun Kyung Jung, M.S., Eun Jig Lee, M.D., Hyung Chun Park, M.D.  
Kyung Rae Kim, M.D., Hyun Chul Lee, M.D., Kap Bum Huh, M.D., Woo Hee Jung, M.D.  
Dong Whan Shin, M.D., Hyun Suk Lee, M.D., Yung Dae Yoon, Ph.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea \*Department of Pathology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea \*\*MorkAm Research Institute, Korea

### ABSTRACT

Functioning adrenal cortical tumors are originated from a distinct zone(zona glomerulosa, zona fasciculata or zona reticularis) or the transitional zone of adrenal gland. Each zone of the gland is regulated by their specific hormones or cytokines, and their signal transduction systems are different. The oncogenes of many endocrine tumors were mutated proteins involved in signal transduction, however *gip* is the only reported oncogene in adrenal cortical tumors. Therefore we decided to reevaluate whether *gsp* might be detected as an oncogene in several different functioning adrenal tumors, and we also tested whether CREB protein is a tentative oncogene or not. In our study, *gsp* was not detected in 13 patients, however *gip* was not also detected unexpectedly. There were no mutations in the phosphorylation site of CREB ("P" box) in adrenal cushing syndrome. We concluded that *gip* was not a oncogene detected frequently in adrenal cortical tumor, and CREB protein was not considered as a tentative oncogen, because there might be no amplification of the signals due to its extreme distal component of PKA or PKC system. (J Kor Soc Endocrinol 9:350-357, 1994)

**Key Words:** Adrenal cortical tumor, *gsp*, *gip*, CREB

### 서 론

부신피질은 Zona glomerulosa, Zona fasciculata 및 Zona reticularis로 분할 된다. 각 층을 자극하는 물

질들도 층마다 각기 달라 Zona glomerulosa는 angiotensin II에 의하여 주로 조절되고, Zona fasciculata 및 Zona reticularis는 ACTH에 의하여 주로 조절된다[1,2].

Ligand 결합에 따른 각 층의 신호전달체계도 제각기 달라, protein kinase A 활성도와 protein kinase C의 활성도를 조사해 보면 Zona glomerulosa에는 protein kinase A의 활성도가 매우 높은 반면에 pro-

이 논문은 1992년도 교육부지원 학술진흥재단의 자유 공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구 되었음

tein kinase C의 활성도는 매우 낮다. 그러나 zona glomerulosa로 부터 zona fasciculata 및 zona reticularis층으로 내려갈 수록 protein kinase A 활성도는 점차 약해지고, protein kinase C의 활성도는 점차 높아지는 것을 알 수 있다[3,4]. 좀더 구체적으로 기술하면 ACTH는 수용체에 결합후  $G_{\alpha}$ 와 거클플링된 후에 adenylyate cyclase의 활성도를 높여 세포내 cAMP를 증가시키며, 증가된 cAMP는 PKA를 인산화시켜 세포내 많은 효소들을 활성화 시키거나 또는 비활성화 시킨다. 한편 인산화된 PKA의 catalytic unit는 regulatory unit로 부터 분리되어 핵내로 옮겨져 CREB이라는 단백질을 인산화 시키고, 인산화된 CREB은 CRE에 결합하여 전사를 조절케 된다[5]. 한편 최근에 크로닝된 Angiotensin II 수용체(AT1)는 angiotensin II와 결합을 할 경우  $G_{i2}$ 가 커플링이 되어 adenylyate cyclase의 활성화를 억제한다[6]. AT1에 angiotensin이 결합하면  $G$ 단백질 외에도 다른  $G$ 단백질 ( $G_p$  or  $G_q$ )이 결합되어 PPC가 활성화되고 [6], 활성화된 LC는  $PIP_2$  및 PC (phosphatidyl cholin)로 부터  $IP_3$ 와 DG를 생성케 한다. 이때 생성된  $IP_3$ 는 세포내 칼슘의 농도를 증가시키고, DG는 세포막의 PKC를 활성화 시킨다. 또한 angiotensin II 수용체 중에도 쥐의 부신, 사람의 자궁조직 및 난소의 granulosa cell등에서만 발견되며, dithiothreitol에는 잘 반응하지 않고,  $G$  단백질과도 커플되지 않는 수용체( $AT_2$ )가 있는데[6],  $AT_2$ 는 쥐의 뇌조직 neuronal cell에서 cGMP를 감소시킨 다든지, astrocyte에서 PG의 분비를 억제한다든지 함으로써, 쥐 부신의 granulosa cell 또는  $PC_{12}$  세포에서는 phosphotyrosine phosphatase를 활성화 시켜 특이 guanylate cyclase를 활성화 함으로써 표적세포들을 조절한다 [7]. 종합하면 부신조직세포들은 각 zone마다 신호전달체계가 다르고, 상기 나열한 것을 포함한 매우 다양한 자극들을 받아 자기 다른 신호전달체계를 거쳐 조절된다 하겠다.

최근들어 내분비종양의 상당부분이 신호전달체계의 이상과 연관됨이 밝혀졌다[8]. Lyons등은 부신종양에서  $G_{\alpha}$ 와  $G_{i2\alpha}$  단백질의 돌연변이를 조사하였던 바 흥미롭게도 다른 내분비종양들과는 달리  $G_{i2\alpha}$  단백질의 돌연변이만이 발견되었다[9]. 그러나 부신피질의 각 zone에 따라 신호전달체계가 다름에도 불구하고,

부신종양에서 단지  $G_{i2\alpha}$  단백질의 돌연변이(*gip*)만이 발견된다는 Lyons등의 결과는 매우 특이하다 하겠다. 이에 본 연구에서는 부신종양조직으로 부터 PKA 신호전달체 즉  $G_{\alpha}$   $G_{i2\alpha}$ 의 돌연변이 여부를 재 검토하고, 더 나아가 최근에 크로닝되어 기능이 일부 밝혀진 CREB 단백질의 돌연변이 여부도 조사해 보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 및 재료

임상적으로 증상이 뚜렷한 기능성 부신피질종양 13예를 대상으로 하였다. 종양조직은 11예의 고 알도스테론혈증과 2예의 쿠싱징후군 이었다. 실험에 사용된 oligonucleotide들은 기초과학연구원 센터에 의뢰하여 합성하였다. [ $^{32}P$ ] ATP(5000Ci/mmol) 및 T4 polynucleotide kinase는 Amersham으로 부터 구입하였으며, TA cloning vector는 invitrogen 회사로 부터, sequenase kit는 invitrogen 회사로 부터 구입하였으며, direct sequencing kit는 promega로 부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 부신피질 종양조직

파라핀에 embedding된 부신피질종양환자의 조직을 얻어서, 약 6개의 5um 절편 조직을 얻은 후, 절편을 H-E 염색을 하여 정상조직과 종양조직의 경계를 알아낸 후 나머지 절편에서 정상조직을 제거 하였다. 이렇게 준비된 절편들로부터 다음과 같은 방법으로 DNA를 추출하였다.

#### 2) DNA의 분리

종양조직의 얇은 절편들을 튜브에 넣고 65°C에서 15분 동안 방치한 후에 각 튜브에 xylene을 넣어서 파라핀을 녹여내고, SDS 음이온 계면활성제가 포함된 lysis 완충용액과 단백질 분해효소인 proteinase-K를 넣어주고 56°C에서 충분히 용해시켜 주었다. 이어서 phenol을 처리하고 chloroform-isoamylalcohol를 처리하여 DNA를 추출하였다.

#### 3) Taq 효소를 이용한 PCR법에 의한 DNA 증폭

Exon 7-Exon 10에 이르는 게노믹 DNA 상의  $G_{\alpha}$  유전자의 증폭을 위한 2쌍의 primer는 아래와 같이

만들었다.

5'-GOG CTG TGA ACA CCC CAC GTG TCT-3'

5'-CGC AGG GGG TGG GCG GTC ACT CCA-3'

일차 증폭된 상기 DNA를 갖고 exon7-exon 8 (228 base)을 nested PCR 증폭키 위한 primer와 exon 9-exon 10(241 base)을 증폭키 위한 primer들은 다음과 같이 만들었다.

exon 7-exon 8

5'-GTG ATC AA<sub>g</sub> CAG GCT GAC TAT GTG-3'

5'-TC CAC CTG GAA CTT GGT CTC AAA G-3'

enon 9-exon 10

5'-CCA GTC CCT CTG GAA TAA CCA GCT-3'

5'-GCT GCT GGC CAC CAC AAG GAG-3'

G $\alpha$ 를 증폭키 위한 primer는 아래와 같이 만들었다.

5'-ATT GCA CAG AGC TAC ATC CCC-3'

5'-GGC GCT CAA TAC GAA-3'

CREB유전자의 P box(E부위와 F부위) 중 인산화가 될 것으로 예상하는 부위 및 E 및 F부위의 증폭은 다음과 같이 하였다.

E부위 aa(34 aa)에서 인산화에 관여될 것으로 보는 부위

AES DSQ WSV DSV TD S QKR R EI LS

(PKA계에 의한 인산화)

R RPS TRK ILMD

(PKA and PKC계에 의한 인산화)

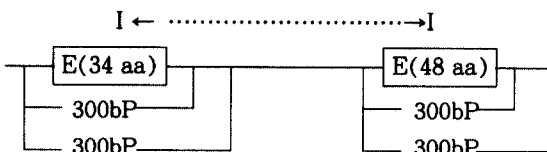
F부위 aa(48 aa)에서 인산화에 관여될 것으로 보는 부위

LSS DAP GVP RI E EEK SEE E TS APA ITT

(casein kinase II에 의한 인산화)

VITV PTP IYQ TSS GQY IAI SQG

2Kb



outer primer of E region

5'-TGG TGT GGT TGT CTC CCA TAA GAA-3'

5'-CTG GTC TTG GAC ATC TCT CTT TAT CTG C-3'

inner primer of E region

5'-TGG TGT GGT TGT CTC CCA TAA GAA-3'

5'-CTT TAT ACA TGG TTC AGT AGA-3'

outer primer of F region

5'-GTA TTT AGC CAG TAA ATT GTA CTT A-3'

5'-GCT TTT TCT CCT CAC TTT TTT GTC CTC ACA-3'

inner primer of F region

5'-GTA TTT AGC CAG TAA ATT GTA CTT A-3'

5'-GAA ATT GTC TAT TAC TCA CTA TAC TGT-3'

이들을 이용하여 약간의 차이는 있지만 각각의 DNA들은 다음과 같은 조건에서 증폭하였다.

1. 변성(denaturation) : 95°C에서 1분

2. Annealing : 55°C에서 2분

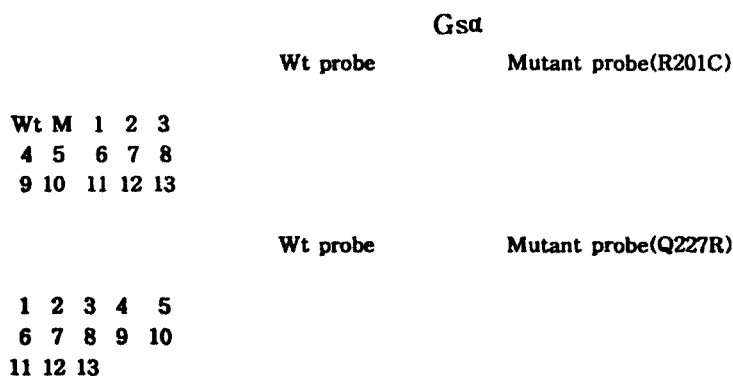
3. Extension : 72°C에서 3분으로 하고 단 첫번째 사이클에서 변성시간을 5분으로 하고 마지막 사이클의 extension 시간을 10분으로 하였다.

사용된 완충용액은 10mM Tris-HCL(25°C에서 pH8.3), 50mM KCL, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin으로 하였고 dNTP의 농도는 100uM로 하였다. primer는 각각 20pmol로 하였으며, Taq polymerase는 2.5 units로 하였다. 증폭된 DNA는 아가로스젤 전기영동상에서 분자량에 따른 분리를 한 후에 EtBr로 염색을 한 후 확인된 위치의 겔을 잘라 낸 후 이 겔로부터 원하는 DNA 만을 순수 분리 하였다.

#### 4) Dot Blotting과 Hybridization

##### (1) Dot blotting

각기 정제된 DNA 40μl에 0.4M NaOH, 25mM EDTA가 포함된 100μl 용액을 첨가 하였다. 이와 같이 처리된 혼합물을 중류수와 SSC 완충 용액으로 전처리된 나이론막에 흡착시켰다. 2시간 이상 80°C 전조기에서 충분히 말려서 hybridization을 행하였다.



**Fig. 1.** Dot blotting of *Gsa* gene. All 13 tumor samples are shown in the left panel. "W" indicates wild type DNA and "M" indicates mutant DNA.

이때 종양조직으로부터 추출된 DNA를 증폭한 DNA들 외에, 대조군으로 말초 림파구를 증폭한 것(WT)과 201번째 아미노산이 arginin으로 부터 cystein으로 바뀐 mutant DNA(M) oligopeptide를 함께 사용하였다.

한편 227번의 경우는 종양조직으로부터 얻은 DNA와 대조군으로 말초림파구를 증폭한 것(WT)만을, WT DNA probe와 glutamin을 arginin으로 바꾼 mutant DNA probe로 각각 hybridization 시켰다.

### (2) End Labelling

합성표지인자들을 각각 30pmol(30 $\mu$ l)씩 준비하고 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치한 후 10X T4 polinucleotide kinase완충용액 10 $\mu$ l, kinase 2 $\mu$ l을 넣어 주고 [p32] ATP(5000 Ci/mmol)을 2.5 $\mu$ l 넣어준 후 총 100 $\mu$ l가 되게 ddH2O로 채워준다. 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 68 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 반응을 중지시켜 hybrid의 표지인자로 사용하였다.

### (3) Hybridization and Washing

5X SSPE, 5x Denhardt's, 0.5% SDS와 10mM sodium pyrophosphate(pH 7.5)가 포함된 용액에 증폭 DNA가 흡착된 나이론막을 넣고 2시간 동안 56 $^{\circ}$ C에 두었다. 2시간 후 [ $r$ - $^{32}$ P]ATP로 표지된 표지인자용액 100 $\mu$ l를 첨가하였다. 표지인자가 나이론막에 붙어 있는 증폭 DNA에 충분한 반응할 수 있도록 2시간 동안 68 $^{\circ}$ C에 방치시킨 후 6X SSC 완충용액으로 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 세척한 후 TMAC 세척 용액(3M tetramethylammonium chloride, 50 mM Tris pH 8.0,

0.2 mM EDTA, 0.1 SDS)을 사용하여 비특이적으로 부착된 표지인자들을 67-68 $^{\circ}$ C에서 1-2시간 세척하여 모두 제거 하였다.

### (4) Subcloning of *Gi2 $\alpha$* to TA Cloning Vector

PCR로부터 얻은 DNA를 전기영동 시킨 후 아가 로즈젤 상에 전기영동하여 원하는 504 base의 DNA만을 절제하여 TA cloning vector에 subclone하였다.

### (5) Sequencing of Subcloned DNA

subclone시킨 DNA를 rapid boiling method에 의하여 DNA preparation을 한 후 알카리 처리하고 standard-double strand DNA sequencing 방법에 의하여 sequencing을 시행하였다.

### (6) Direct Sequencing of CREB

E, F부위를 각각 증폭시켜 증폭된 320bp와 800bp를 각각 템프레이트로 하여 fmol<sup>TM</sup> DNA sequencing system을 이용하여 sequencing 하였다. 간단히 요약하면 primer labelling, Extension and termination reaction, gel running procedure에 의하여 수행하였다. primer의 end labelling은 0.5ml microcentrifuge tube에 primer를 10pmol 넣고, r-labelled ATP 10 pmol, T4 polynucleotide kinase 10X buffer 1 $\mu$ l, T4 polynucleotide kinase (5-10 unit/ $\mu$ l) 5 $\mu$ l 및 sterile H2O 5 $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리한 후 90 $^{\circ}$ C에서 2분간 처리하여 효소를 불활성화 시켰다.

Extension과 termination reaction은 다음과 같이 시행하였다. 즉 G, A, T, C 라벨된 0.5ml micro-



**Fig. 2.** Sequencing of *Gi2α*

Case	#1	#2	#3
Domain	E F	E F	E F
	CATG	CATG	CATG

quencing grade Taq DNA polymerase를 넣은 후 파이프팅 하였다. 이들을 앞서 준비한 d/ddNTP 용액에 4μl 씩 분주하여 넣었다. 약 20μl의 mineral oil을 넣고 다음과 같이 PCR법으로 증폭하였다.

95°C 30초

42°C에서 30초

70°C에서 1분으로 하여 총 30cycle을 하였다.

PCR 후 즉시 4°C로 옮겨서 3μl의 stop 용액을 넣고 간단히 침전시켰다. 영동직전에는 70°C에 2분간 처리후 3ul씩 영동하였다.

## 결 과

### 1. *Gsa* 단백질의 돌연변이

순수분리 정제된 증폭 DNA를 나일론에 흡착시킨 후, [<sup>32</sup>P]-ATP로 표지된 표지 DNA로 나일론의 증폭시킨 DNA와 반응을 시킨 결과는 Fig. 1과 같다.

*Gsa*의 201번 아미노산기에 돌연변이는 전혀 발견할 수 없었으며, 단지 대조군으로 사용하였던 mutant oligonucleotide에만 표지인자 DNA와 흡착반응함을 알 수 있었고, 모든 종양조직의 DNA와는 전혀 반응치 않았다. 동시에 227번 아미노산기의 경우에는 mutant oligonucleotide를 대조군으로 사용하지 않고 단지 mutant probe만 사용하였던 바, 종양조직의 DNA들과 조금도 반응하지 않음을 알 수 있었다. 즉 상기결과는 부신종양조직 모두에서 *Gsa* 단백질의 돌연변이가 발견되지 않았다는 것을 시사한다 하겠다.

**Fig. 3.** Direct Sequencing of CREB by Thermal Cycling

entrifuge tube에 2μl의 d/ddNTP 혼합액을 각각 넣어 0°C에 둔다. template DNA 40 fmol, sequencing 5X buffer 5μl, labelled primer 1.5μl, sterile H<sub>2</sub>O to final volume 16μl를 넣고 잘 섞어준 후 1μl의 se-

## 2. *G $\alpha$* 단백질의 돌연변이

*G $\alpha$* 의 경우 상기 probe를 이용하여 PCR하였으나 *G $\alpha$* 와 같이 원하는 정도의 충분한 DNA를 얻을 수 없어 PCR후 TA cloning vector에 subclone시켜 sequencing토록 하였다. Lyon L. 등의 보고와는 달리 부위와 부위 모두에 돌연변이는 발견할 수 없었다(Fig. 2).

## 3. CREB 단백질의 “p” Box 부위의 돌연변이 여부

CREB 단백질의 “p” box부위를 Cushing syndrome을 보였던 환자들에서 시행하였으나 돌연변이를 찾을 수가 없었다(Fig. 3).

## 고 안

내분비선종의 대부분이 단일크론날 종양이고[10], 다른 조직의 종양들과는 다르게 양성종양이 대부분을 차지하며, 종양화에 직접적으로 관여하는 물질들의 상당부분이 신호전달체계와 연관되었던 것임이 밝혀지면서[11], 이들 일련의 연구들은 역으로 정상 내분비선 세포들의 신호전달체계를 보다 정확하게 이해하는 데 기여하게 되었다.

일반세포들에서 세포증식을 일으키는 외부자극들과 연계된 신호전달체계로는 PKC, protein kinase (serine/threonin kinase) 및 protein phosphatase가 주로 관여하고, PKA 계는 오히려 증식을 억제하는 기능을 갖는 것으로 알려졌다[12]. 그러나 말단비대증환자의 종양조직에서 *gsp*(*G $\alpha$* 의 돌연변이)가 발견되면서 내분비세포들에서는 PKA계의 과자극도 내분비세포들의 과증식을 유도할 수 있음을 알게 되었다[13]. 뒤이어 뇌하수체종양, 기능성 갑상선종양(hot nodule)들에서도 유사한 결과를 얻게됨에 따라서 상기 이론들을 확인할 수 있게 되었다[9].

Lyons등은 내분비종양들을 조사하면서 흥미로운 결과를 보고하게 되었다. 즉 부신종양의 경우 *gsp*가 아니라 *gip*(*G $\alpha$* 의 돌연변이)가 종양화에 관여된다는 것이다[9]. 뇌하수체를 제거한 쥐에서 부신의 위축이 서서히 오는 것으로 미루어 부신피질은 ACTH 보다도 angiotensin II에 의존하여 세포의 증식이 조절될 것 같다던지[13,14], Angiotensin 11 수용체(AT1)에

angiotensin II가 결합을 할 경우 활성화된 수용체는 *Gi2*와 커플링이 되어 adenylylate cyclase의 활성화를 억제하는 등 *Gi*단백질이 신호전달에 관여하고 있어, *Gi* 단백질의 돌연변이도 종양화를 초래할 수 있다는 Lyons의 가설을 뒷받침해 줄 수 있는 소견들이라 하겠다[4]. 그러나 *Gi* 단백질의 기능적인 측면에서 보면 Lyons의 이론은 매우 흥미롭다. 즉 *Gi* 단백질은 adenylylate cyclase를 억제하는데, 만일 *Gi* 단백질에 내재적으로 존재하는 GTPase가 활성화를 나타내는 즉 GTP hydrolysis에 관여하는 부위의 중요 아미노산기에 돌연변이가 발생하였을 경우(*gip*), *Gi* 단백질은 GTP와 결합후 비활성화가 못되어 활성형으로 계속 존재케 된다. 결국 수용체에 ligand binding 없이도 adenylylate cyclase의 활성이 억제되어 c-AMP의 생성이 지속적으로 억제된다. 따라서 Lyons의 보고는 부신종양의 경우 흔히 관찰되는 다른 내분비 종양들의 종양화와는 다르게 c-AMP/PKA/CREB계의 amplification에 의한 세포의 과증식에 의한 것이 아니라는 주장이다.

그러나 거의 대부분의 내분비 종양이 *gsp*와 연관된 경우가 많고, 그 빈도도 말단비대증의 경우에는 약 40%에 이르르며, *gip* 또한 Lyons등이 보고한 부신 종양(27%) 및 난소종양의 다른 종양에서는 거의 보고되지 않는 실정이다[9]. 본 연구에서 저자들은 *gip*만이 발견된다는 Lyons의 주장과는 달리 열세 증례 모두에서 *gsp*는 물론 *gip*도 발견할 수 없었다. Lyons의 보고와 달리 본 연구에서 *gip*가 전혀 발견되지 않은 이유는 설명키 어려웠고, 다만 방법상의 문제로 Lyons의 실험에서는 단지 dot blotting에 그친 반면에, 본 연구에서는 sequencing을 하였다. 그러나 본 연구의 증례가 불과 열세 증례에 그쳐 아직 다소 미흡하고 속단키는 어렵다 할지 모르겠다.

기능적인 측면을 고려해 볼때 *Gi*단백질이 adenylylate cyclase를 억제하는 것 이외에도 K<sup>+</sup> 채널의 muscarine regulation이라든지, 세포막의 칼슘채널을 억제하여 세포외로 부터 내로의 이동을 억제하는 기능도 있다고는 하나[15], 아직 특정세포에서 또는 Lyons그룹에서 보고한 것의 다른 종양조직들에서 *Gi* 단백질이 상기 과정을 거쳐 세포증식에 관여한다는 증거는 아직 미미하다[16]. 동시에 *Gi* 단백질의 돌연변이가 세포증식에 어떻게 영향을 줄지도 밝혀진 바도

거의 없다[16]. 물론 최근에 Gi 단백질이 같은 세포 내에서 Gs를 거쳐 adenylyate cyclase의 자극에 의한 c-AMP/PKA/CREB 계와 Gp or Gq를 거쳐 PLC/DG/PKC계로의 자극전달과의 균형을 조절하는 기능이 있다는 설도 있으나, Gi단백질이 균형을 조절한다는 견해도 일부 그룹의 주장일 뿐이다[16]. 따라서 부신종양화에 있어서 *gip*의 역할에 관하여도 재고가 있어야 할 것으로 사료되며, 설명 *gip*가 관여된다 하여도 그 명확한 기전을 밝히는 일련의 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료되었다.

CREB은 핵내에 존재하는 단백질로서 인산화되면 유전자의 5' upstream 부위에 작용하여 전사를 조절하게 된다[17]. CREB의 구조를 보면 9개의 exon으로 구성되고, "H"부위는 leucin zipper를 형성하는 부위로서 basic amino acid가 많다. CREB 단백질의 활성화는 "H"부위 상방부 N-terminus 부위에 인산화가 집중적으로 이루어지므로서 가능하다. 이 부위를 "p" box 부위(E 및 F domain)라고도 불러지는데, 이 부위를 좀더 세분화하여 보면, Ser-Gln-Lys-Arg-Arg 부위는 PKA의 catalytic unit에 의하여 인산화가 이루어지고, Arg-Arg-Pro-Ser-Tyr-Arg-Lys부위는 PKA와 PKC에 의하여 인산화가 이루어지며, Glu-Glu-Glu-Lys-Ser-Glu-Glu-Glu 부위는 casein kinase II에 의하여 인산화가 이루어진다고 알려져 있다[17]. 따라서 CREB이 활성화 되는데 중요한 "p" box 부위에 돌연변이가 생겼을 경우 CRE에 대한 결합력의 변화로 인해 세포증식 정도의 변화를 초래할 가능성을 예측할 수 있겠다. 물론 증거가 적어 단언키 어려웠으나 아마도 *gsp* 또는 *gip*와 달리 CREB의 인산화과정은 PKA 및 PKC 신호전달체계의 맨끝 부위에 해당되므로, 신호전달계에서 흔히 보이는 amplification 과정이 전혀 없어 돌연변이가 있다손 치더라도 종양화에는 크게는 기여치 못할 것으로 추측되었다.

### 결 론

결론적으로 이전의 보고와는 달리 부신종양에서 *gip*는 흔하게 발견되지 않으며 동시에 *gsp* 및 CREB 단백질의 돌연변이도 발견되지 않았다. 따라서 부신종양의 원인을 밝히기 위하여서는 향후 Gp 또는 Gq 단백질들의 돌연변이 여부는 물론 다른 유전자들의 이상등

에 관한 연구가 더 필요할 것으로 사료되었다.

### REFERENCES

1. Nelson DH: *Regulation of glucocorticoid release. Am J Med* 53:590-594, 1972
2. Oparil S and Haber E: *Renin-angiotensin system. N Engl J Med* 291:389-401, 1974
3. Shima S, Kawashima Y and Hirai M: *Studies on cyclic nucleotides in the adrenal gland. Effects of ACTH on cyclic AMP and steroid production by zona fasciculata, reticularis of the adrenal cortex. Acta Endocrinol* 90:139-146, 1979
4. McAllister JM and Hornsby PJ: *Dual regulation of 3 beta hydroxy steroid dehydrogenase, 17 alpha-hydroxylase and dehydroepiandrosterone sulfotransferase by 3' 5'-monophosphate and activators of protein kinase C in cultured human adrenal cortical cells. Endocrinology* 123:2012-2018, 1988
5. Hershey AD, Dykema PE, Krause KE: *Organization, structure and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. J. Biol. Chem.* 266:4366-4374, 1991
6. Panca CW, Andrew TCk, John VD, William FH, Ronald DS, Pieter BM and Timmermans WM: *Angiotensin II receptor antagonists and receptor subtypes. Trends Endocrinol Metab* 3:211-217, 1992
7. Pucel AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A: *Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2 angiotensin II receptor. Endocrinology* 128:1947-1959, 1991
8. Alexander JM, Biller BMK, Bikka H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A: *Clinically non functioning pituitary tumors are monoclonal in origin. J Clin Inves* 86:336-340, 1990
9. Lyons J Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grumewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR, McCormick F: *Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. Science* 249:655-659, 1990
10. Vallar L, Soada A and Gianattasio G: *Altered Gs and adenylyate cyclase activity in human GH secreting pituitary adenomas. Nature* 330:566-568, 1987
11. Dumont JE, Jauniaux JC and Roger PP: *The cyclic AMP mediated stimulation of cell prolifera-*

- tion. *Trends in Biochemical Science*:14, 67-71, 1989
12. Landis CA, Master SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR and Vallar L: *GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylate cyclase in human pituitary tumors. Nature* 340:692-696, 1989
  13. Puvis JL, Canick JA and Mason JI: *Life time of adrenal cytochrome P-450 as influenced by ACTH. Ann NY Acad Sci* 212:319-342, 1973
  14. Kimura T: *Effects of hypophysectomy and ACTH administration on the level of adrenal cholesterol side-chain desmolase. Endocrinology* 85:492-499, 1969
  15. Spada A, Vallar L, Gaglia G: *G protin oncogene in pituitary tumors. Trends Endocrinol Metab* 3: 355-360, 1992
  16. Kohn LD, Ban T, Okakima F, Shimura H, Shimura Y, Hidaka A, Guiliani C, Napolitano G, Kosugi D, Ikuuyama S, Saji M: *Relationship of the structure, function and regulation of the thyroidotropin receptor to its role in thyroid autoimmune disease. In: Polli EE(9ed) Molecular Bases of Human Diseases. Excerpta Medica International Congress Congress Series 818. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 1-286, 1993*
  17. Lee CQ, Yun Y, Hoeffler JP, Habener JF: *Cyclic AMP-responsive trnascriptional activation of CREB-327 involves interdependent phosphorylated subdomains. Embo* 9:445-4465, 1990
-