

과제번호 : 97-N1-02-04-A-11

GOVP 12016035

## 인체 기능의 분자생물학적 연구

Molecular Biologic Studies on Functions of Human Body

단백질 영양결핍이 호르몬 기능과

미토콘드리아 DNA 복제 수에 미치는 영향

The Impact of Protein Malnutrition on Hormonal Function and  
Mitochondrial DNA Copy Number

주관연구기관:

서울대학교 의과대학

과 학 기 술 부

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “인체 기능의 분자생물학적 연구”과제 (세부과제 “단백질 영양결핍이 호르몬 기능과 미토콘드리아 DNA 복제 수에 미치는 영향”) 의 보고서로 제출합니다.

2000 . 9 . 30

주관연구기관명 : 서울대 의대

주관연구책임자 : 이 홍 규

연 구 원 : 박 도 준

“ : 신 찬 수

“ : 고 재 준

협동연구기관명 : 국립보건원

협동연구책임자 : 김 영 미

# 요 약 문

## I. 제 목

단백질 영양결핍이 호르몬 기능과 미토콘드리아 DNA 복제 수에 미치는 영향

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 인구의 노령화와 식생활 변화 등에 따라 당뇨병, 비만증 등 내분비대사 질환의 발생이 우리나라에서도 급격하게 증가하고 있다. 내분비대사 질환은 대부분 만성퇴행성 질환으로 그 질병의 이해와 관리를 위해서는 체내 각 기관의 기능을 조절하고 있는 내분비 기관의 상태와 각 호르몬의 조절아래 있는 물질들의 대사상태를 평가함으로써 이해할 수 있으나 그 분자생물학적 기전은 아직까지 완전히 규명되지 않은 상태이다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

절약형질 가설에 따르면 임신 중 모체의 영양 결핍이 태아에서는 성장 장애를 초래하고, 출생 후에는 당뇨병 등 대사질환 발생의 중요한 원인이 되며, 말초 혈액과 조직 내 미토콘드리아 DNA의 양적 감소 역시 이들 대사질환 발생에 위험인자가 되므로 본 연구에서는 절약형질 가설의 분자생물학적 기전의 하나로 미토콘드리아 DNA의 양적인 변화가 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 세우고 이를 증명하고자 하였다. 그 세부적 내용으로, 1) 산모와 태아 제대혈의 IGF-I 및 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계를 조사하고, 단백질 영양 결핍 백서에서 영양 상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관 관계를 규명하고 2) 당뇨병 환자에서 mtTFA 발현 정도를 평가하고, 미토콘드리아 DNA 결핍 세포에서 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기

전을 분석하고자 하였다.

## IV. 연구개발결과

### 1) 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계

산모 정맥혈의 미토콘드리아 DNA 양은 신생아의 출생체중에 독립적으로 영향을 주는 인자였으며 태아 제대혈의 미토콘드리아 DNA 양과 유의한 상관관계가 있었다. 신생아의 출생체중은 태아 제대혈에서 측정된 IGF-1 및 IGFBP-3의 농도, 산모의 임신전 체중과 유의한 상관관계가 있었다. 제대혈의 미토콘드리아 DNA 양은 출생체중과 상관관계가 관찰되지 않았다. 산모 정맥혈과 태아 제대혈 모두 IGF-1과 IGFBP-3는 서로 유의한 상관관계가 있었다. 단백질 결핍 백서 모델을 확립하여 단백질 결핍 어미쥐에서 정상식이 대조군에 비해 간 및 근육조직에서 미토콘드리아 DNA 양이 유의하게 감소함을 확인하였다. 새끼쥐에서도 정상식이 군에 비해 단백질 결핍 군에서 간 및 근육조직에서 미토콘드리아 DNA 양이 감소함을 관찰하였다. 단백질 결핍 새끼쥐의 간조직에서 미토콘드리아 DNA 양의 감소와 함께 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) mRNA 및 cytochrome c oxidase III 발현의 유의한 감소가 관찰되었다.

### 2) 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기전 연구

미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) promoter부위의 메틸화(methylation)에 의한 mtTFA 유전자 발현 억제 여부를 알아보았으나 정상인과 당뇨병 환자 모두 관찰되지 않았다. 당뇨병 환자와 대조군의 mtTFA promoter -97, -177, -292 부위에서 다형성이 있음을 확인하였으나 당뇨병의 발병과는 무관하였다. Rat 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) cDNA 및 promoter를 cloning하여 사람 및 mouse의 그것과 비교하였다. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주를 확립하여 미토콘드리아 DNA가 결핍되었을 때, 포도당 대사 이상과 관련된 장애를 평가하였다. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포는 대조군에 비해 미토콘드리아 막전압의 결핍, mtTFA mRNA의 발현 감소, 포도당 섭취 감소, glucose transporter mRNA의 발현 감소 등이 관찰되어 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소가 당뇨병 발생과 상관관계가 높음을 관찰하

였다. 또한 미토콘드리아 DNA 결핍 세포는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화스트레스 영향을 적게 받았으며 이는 anti-apoptotic activity를 가지는 Bcl-x의 발현과 관련이 있음을 관찰하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양이 밀접하게 연관되어 있음을 관찰하고 산모의 말초혈액 미토콘드리아 DNA 양이 신생아의 출생체중에 영향을 줌으로써 출생 후 당뇨병 등 대사질환 발생의 한 원인이 될 수 있음을 알게 되어, 각종 대사질환의 병인을 밝히고 예방 및 치료법을 개발하는데 있어 중요한 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

본 연구의 결과 미토콘드리아 DNA의 정량적 PCR 방법, 단백질 결핍 백서 모델 확립, rat mtTFA cDNA 및 promoter cloning, 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주 등 많은 실험 기법을 확립하였으며, 이들은 이 분야의 각종 기초 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 특히 본 연구과정 중 확립한 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주는 포도당 대사의 장애를 보여 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소가 당뇨병 발생과 상관관계가 높음을 증명하여 새로운 당뇨병 치료제를 개발하기 위한 새로운 target으로서 미토콘드리아와 미토콘드리아 DNA가 중요함을 보여주었고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 산화스트레스에 Bcl-x 발현의 변화에 의해 영향을 적게 받음이 밝혀져 향후 미토콘드리아 DNA 결핍이 Bcl의 발현에 어떤 영향을 미치는지 연구를 계속할 예정이다. 당뇨병 모델쥐를 이용하여 S-adenosylmethionine이 미토콘드리아 DNA의 복제 수를 증가시킴이 관찰되어, 향후 당뇨병 발병의 예방 및 치료제로 사용할 수 있는 가능성에 대해 단백질 결핍 백서 모델을 이용하여 연구를 계속할 계획이다. 또한 단백질 결핍 백서에서 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소와 함께 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) mRNA 및 cytochrome c oxidase III 발현의 유의한 감소가 확인되어 앞으로 산화스트레스와 미토콘드리아 DNA 및 그 조절기전에 대해 연구할 계획이다.

본 연구 결과를 토대로 말초혈액의 미토콘드리아 DNA양의 측정이 당뇨병 환자의 지손에서 향후 당뇨병 발생의 표지자로 사용될 수 있는 것으로 기대되며, 당뇨병의

발병 기전을 지금까지와는 다른 각도에서 설명함으로써 제2형 당뇨병을 근본적으로 예방하거나 치료할 수 있는 방법을 개발하는데 기여할 수 있을 것이다.

# S U M M A R Y

## (영 문 요 약 문)

### The Impact of Protein Malnutrition on Hormonal Function and Mitochondrial DNA Copy Number

**Background** : In spite of rapid increase in incidence of metabolic disorders such as diabetes and obesity in Korea, its pathogenic mechanism has not yet been clearly defined. According to the thrifty genotype theory, fetal malnutrition is closely associated with development of insulin resistance syndrome - diabetes, obesity and hypertension in the later life in the developing countries. We have previously demonstrated that lower mitochondrial DNA(mtDNA) copy number in peripheral blood leukocytes is a marker for diabetes and other parameters of insulin resistance syndrome. Therefore, we proposed the hypothesis that decrease in mtDNA content may serve a link between fetal malnutrition and diabetes.

**Aim and Methods** : This study aimed to investigate 1) whether fetal malnutrition causes decrease in mtDNA copy number in rats and humans 2) if so, what is the regulatory mechanism of mtDNA copy number by fetal malnutrition.

In the first year of the project, we investigated the correlation of fetal malnutrition and mtDNA content in umbilical cord blood and mother's peripheral blood. We measured mtDNA content in the peripheral blood leukocytes by quantitative PCR. Fetal nutritional state was evaluated by cord blood IGF-1 levels and birth weight.

In the second year, we investigated whether fetal protein malnutrition causes decrease in mtDNA content and decrease in mtDNA content can be recovered by protein supplement after birth in rats. To investigate the possible mechanism of decrease in mtDNA content in diabetes, we investigated the expression of mtTFA, a important transcriptional factor for mtDNA and methylation in the

promotor region of mtTFA in the diabetic patients.

In the 3rd year, we investigated whether fetal malnutrition changes the expression of mtTFA and mitochondrial respiratory chain enzymes. To verify the effect of decrease in mtDNA content on cell functions,  $\rho^{\circ}$  (mtDNA depleted) cell line was established. Glucose metabolism and the susceptibility to oxidative stress were evaluated in  $\rho^{\circ}$  cell line.

**Results** : Birth weight of neonates was correlated with IGF-1 and IGFBP-3 levels in cord blood, pre-pregnant body weight of mother and mtDNA content of mother's peripheral blood. The only independent factor related to birth weight was maternal mtDNA content. There was a significant correlation in mtDNA content between cord blood and mother's peripheral blood.

In the animal models of fetal protein malnutrition, a significant decrease in mtDNA content was demonstrated in muscle and liver of mother and daughter rats. Fetal malnutrition induced significant decrease in the expression of mtTFA and activities mitochondrial respiratory chain enzyme.

There was no significant difference in the expression of mtTFA and methylation of mtTFA promotor region. The polymorphism of mtTFA promoter was found in diabetic patients, which is not associated with diabetes.

We developed cell line depleted of mtDNA ( $\rho^{\circ}$  cell) from SK-Hep1 cell line.  $\rho^{\circ}$  cell showed various functional defects such as decreased glucose uptake, decreased expression of mtTFA and glucose transporters. Percentages of apoptotic cells induced by hydrogen peroxide was smaller in  $\rho^{\circ}$  cell than in SK-Hep1 cells. Bcl-x expression by hydrogen peroxide was increased in  $\rho^{\circ}$  cell.

**Conclusion** : In this projects, we have demonstrated the causal relationship between fetal protein malnutrition and decrease in mitochondrial DNA copy number in human and rats. We previously demonstrated that people with lower mtDNA content were more susceptible to diabetes. Taken together, fetal



malnutrition decreased mtDNA content and decreased mtDNA content, in turns, induced diabetes and insulin resistance syndrome. There was no change in mtTFA expression and methylation status in mtTFA promoter region in diabetic patients. The pathogenic mechanism is needed to be further investigated.

# C O N T E N T S

(영 문 목 차)

	Pages
Chapter 1. Introduction -----	11
Chapter 2. State of the Art -----	15
Chapter 3. Methods and Results -----	20
Chapter 4. Achievement and Contribution -----	83
Chapter 5. Plan of Application -----	87
Chapter 6. References -----	90

# 목 차

쪽번호

제 1 장	서 론	-----	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	-----	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	-----	20
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도	-----	83
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	-----	87
제 6 장	참고문헌	-----	90

## 제 1 장 서 론

### 제 1 절 연구개발의 목적

내분비대사질환은 대부분 만성퇴행성 질환으로서 그 질병의 이해와 관리를 위해서 체내 각 기관의 기능을 조절하고 있는 내분비 기관의 상태와 각 호르몬의 조절아래 있는 물질들의 대사상태를 평가함으로서 이해된다. 각종 전염병들이 경제수준의 향상과 위생상태의 개선으로 감소하고, 인구가 노령화되고 식생활을 위시한 문화생활이 큰 변화를 겪음에 따라 당뇨병, 비만증 등이 범주의 질환은 선진국에서는 물론 우리나라에서도 주요 현안으로 대두되고 있다. 이 과제의 연구는 이러한 내분비 질환의 병태생리를 분자생물학적인 기법을 이용하여 밝히려는 데 목적이 있다.

### 제 2 절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적인 측면

당뇨병은 30세 이상 한국인 성인의 약 8%에서 이환되어 있고 최근의 역학조사에 의하면 연간발생율이 약 2.5%에 이르는 등 그 발생율이 증가하고 있으며 비만증의 경우 국민영양조사 결과 체질량 지수  $25\text{kg}/\text{m}^2$ 을 기준으로 하였을 경우, 인구의 약 36%가 이에 해당되며 경제수준의 향상과 영양상태의 개선에 따라 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 당뇨병 및 그 합병증에 의한 이환율, 사망률이 점차 증가하여 1995년의 경우 당뇨병을 비롯한 내분비대사 질환에 의한 사망이 약 19%를 차지하여 1985년 약 8%에 비하여 2배 이상 증가하였다.

한국에서의 대사질환 유병율은 백인 보다도 오히려 더 높으며 당뇨병 호발 민족인 피마 인디안이나 나우루 원주민 다음으로 많은 수치이다. 한국과 유사하게 급격한 대사질환의 증가를 나타내는 민족으로는 미국으로 이민간 일본인 2세들과 최근 급격한 경제성장을 이룩한 대만 등 동남아시아 민족을 들 수 있다. 따라서 한국에서의 당뇨병, 비만증 등의 발생원인은 서구인에서와는 그 병태 생리가 다를 것으로

추정되며 이를 설명하는 가설의 하나로서 소위 **절약형질 가설**이 주목받고 있다(1). **절약형질 가설**이란 기근과 궁핍의 시기에 에너지를 축적하여 절약하여야만 생존에 유리하여 영양 절약형으로 프로그램되었던 종족이 물질적 풍요를 겪으며 에너지의 축적이 오히려 대사 이상을 초래하여 당뇨병, 고지혈증, 비만증 등을 초래한다는 가설로서 우리나라에서 최근 관찰되는 급격한 당뇨병 등 대사질환의 증가 현상으로 볼 때 그 개연성이 크다. 이러한 학문적 배경에 의하여 우리의 현실에 맞는 이론으로 우리의 문제를 자체 해결할 필요가 대두되고 있다.

최근의 급속한 분자생물학의 발달로 질병의 병태 생리를 세포수준, 분자수준에서 이해하고 유전공학에 의한 세포기능과 유전자 발현의 평가가 실용화되고 있다. 세포내 미토콘드리아에는 별도의 유전자가 존재하는데 미토콘드리아에서 일어나는 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)는 췌장 베타세포에서 인슐린 분비에 결정적인 역할을 하고있기 때문에 미토콘드리아의 유전자는 대사질환의 원인 인자로 그 가능성이 매우 높을 것으로 판단되고 있다. 최근 연구결과에 의하면 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서는 미토콘드리아 유전자의 양적인 감소가 관찰되고 이는 엉덩이-허리둘레비 등 비만의 지표와도 상관관계를 보이고 있다. 따라서 절약형질 가설에 대한 분자생물학적인 기전으로서 미토콘드리아 유전자의 이상이 관여할 가능성이 매우 높으며 이는 이 가설을 분자수준에서 입증할 수 있는 중요한 이론적 근거가 될 것이다.

## 2. 경제·산업적 측면

경제적인 발전과 더불어 당뇨병을 포함한 만성 성인병의 국내 유병률은 급증하고 있으며, 이로 인한 노동력 저하와 의료비 증가가 향후 심각한 국가경제적 손실을 가져올 것으로 예상되고 있다. 우리나라 연천 지역에서의 당뇨병, 대사질환 등의 유병률 및 발생률을 조사한 결과에 따르면 향후 내분비대사 질환에 소요되는 비용은 국가 경제적 부담을 가중시킬 것으로 예상된다(2). 당뇨병과 비만과 만성 질환과 관련된 대부분의 경비는 이러한 질환에 따른 이차적인 합병증의 치료에 소요되고 있으므로, 이들 대사 질환의 발병기전을 밝히는 것은 질병을 발병 전에 예방하거나, 발병초기에 그 진행을 막는 방법을 개발함으로써 경제적인 손실을 최소화하기 위한 가장 바람직한 방법이라고 할 수 있다.

대부분의 학문적 이론이 서구인을 대상으로 개발되어 우리나라 실정에 맞지 않는 면이 많음에도 불구하고 선진국의 생명공학 산업이 앞선 기술력과 제품경쟁력을 바탕으로 국내 시장을 지배하여 막대한 외화 낭비와 학문적 오류를 범할 가능성이 있어 이에 대한 대처가 시급한 실정이다. 한국인을 대상으로 개발된 질병 모델 개발과 치료수단 연구는 바로 생명산업으로 이어질 수 있다.

### 3. 사회·문화적인 측면

노령 인구의 증가와 생활 양식의 서구화 등을 포함한 사회경제적 발달로 당뇨병 등 내분비 대사 질환의 발생은 향후 계속 증가하므로 당뇨병 및 그 합병증의 관리에 수많은 의료인력이 동원되어야 할 뿐 아니라, 당뇨병에 의한 만성 합병증으로 환자 및 환자가족의 삶의 질이 현저히 저하되어 심각한 사회적인 문제를 야기할 가능성이 높다. 따라서 한국인에 맞는 내분비 대사질환의 병태 생리를 규명함으로써 치료 및 예방법 개발로 국민 복지에 기여할 수 있을 것이다.

## 제 3 절 연구개발의 범위

본 연구의 목표는 단백질 영양 결핍이 호르몬 기능과 미토콘드리아 DNA 복제수에 미치는 영향을 규명하는 것이다. 이를 위하여 절약형질 가설의 분자생물학적 기전으로 미토콘드리아 DNA의 양적인 변화가 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 세우고, 다음과 같이 사람 및 실험동물, 배양된 세포를 이용하여 다기관 공동연구를 수행하였다.

### 1. 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계

산모와 태아 제대혈의 IGF-I 및 미토콘드리아 DNA 양과 태아 출생 체중과의 상관관계를 규명하기 위하여, 혈액으로부터 IGF, IGFBP3 등의 농도를 측정하고, 임프구를 추출하여 Quantitative PCR을 통해 미토콘드리아 DNA의 양적 분석을 시행하였다.

단백질 결핍 백서 모델을 확립하기 위하여 어미쥐를 교배 2주전부터 이유기까지

단백질 결핍 식이 또는 정상식을 주어 임신시의 영양상태에 대한 동물모델을 확립하였다. 새끼쥐도 이유 후 단백질 결핍 식이 또는 정상식을 제공하였다. 어미쥐는 이유 후 희생시켜 간과 근육조직에서 미토콘드리아 DNA 양을 측정하여 임신시의 영양 상태에 따라 미토콘드리아 DNA 양이 어떻게 변화하는지와 그 자녀들에게 미치는 영향을 분석하였다. 새끼쥐는 생후 4주, 8주 및 16주째 희생시켜 간 및 근육조직에서 미토콘드리아 DNA 양, 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) mRNA 및 cytochrome c oxidase(COX) III의 발현을 측정하였다. 어미쥐의 영양상태에 따른 새끼쥐에서의 미토콘드리아 DNA 양의 변화와 생후 영양상태에 따른 새끼쥐에서의 미토콘드리아 DNA 양, mtTFA 및 COX III의 변화를 분석하였다.

## 2. 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기전 연구

미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) promoter부위의 methylation에 의한 mtTFA 유전자 발현 억제 여부를 알아보기 위하여, 당뇨병 환자와 정상인의 혈액에서 얻은 genomic DNA를 Southern blot analysis 및 Bisulfite genomic sequencing를 이용하여 조사하였다. 당뇨병 환자와 정상인간에 mtTFA promoter 서열에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 genomic DNA를 추출하여 mtTFA promoter region을 PCR로 증폭하고 direct sequencing을 시행하였다. Rat 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) cDNA 및 genomic DNA를 cloning하고 promoter부위를 sequencing하여 사람 및 mouse의 그것과 비교하였다.

저농도의 ethidium bromide로 세포를 처리함으로써, 세포내 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 결핍시킨 세포를 제작하였다. 미토콘드리아 막전압에 의존적으로 미토콘드리아를 염색하는 Mitotracker로 mtDNA 결핍 세포를 염색하였다. mtDNA 결핍 세포에서 quantitative RT-PCR을 이용하여 mtTFA mRNA 발현을 평가하였다. 또한 18-FDG를 이용하여 포도당 섭취량과 RT-PCR 방법으로 GLUT의 mRNA를 정량하였다. MtDNA 결핍 세포를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 annexin V 염색하여 flow cytometry로 apoptosis 정도를 측정하고 Bcl-x 및 Bcl-2의 발현을 Western blot으로 정량하고 mtTFA expression을 관찰하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계

#### 1. 절약형질 가설(Thrifty phenotype hypothesis)

동물 모델을 이용하여 영양 공급을 줄였을 경우 태아의 성장 속도는 2-3일 이내에 늦어지며 다시 충분한 영양을 공급해주면 다시 정상 성장 속도를 보이게 된다. 그러나 영양 공급을 줄이기 이전에 이미 성장속도가 정상에 비하여 느렸던 일부 태아에서는 영양 공급을 줄여도 성장 속도가 더 느려지지 않는다고 한다. Harding 등은 이러한 성장률 저하가 초기 영양결핍에 의한 초기 “프로그래밍”에 의한 결과라고 한다(1, 2). 즉, 기근과 궁핍의 시기에 에너지를 축적하여 절약하여야만 생존에 유리한 종속에서는 영양절약형으로 프로그램되어 있는 데, 이들이 물질적 풍요를 겪으며 에너지의 축적이 오히려 대사 이상을 초래하여 당뇨병, 고지혈증, 비만증등을 초래한다는 것이다. 또한 이와 같은 초기 영양결핍이 인슐린 저항성, 당뇨병 또는 내당능 장애, 고지혈증, 고혈압, 비만증을 동반하는 Reaven 증후군(3)과 연관이 있음은 동물 실험 모델에서 일부 밝혀져 있다. 즉 어린 쥐를 3-6주 때부터 저단백식을 주었을 때 인슐린 분비에 장애가 생기고 췌장 베타세포의 수가 감소함이 관찰되었고, 이러한 대사 이상은 적어도 12주 이상 지속이 되었다(4). 또한 양의 태아 중 임신 말기에 느린 성장을 보이는 경우에는 인슐린:포도당 비율이 높은 것이 관찰되었고(5), 이것은 이 동물에서 인슐린 저항성이 존재할 가능성을 시사한다. 당뇨병을 비롯한 인슐린저항성 증후군이 특정 시기의 자궁내 성장 저하와 관련성이 있고, 이러한 자궁내 성장저하와 성인에서의 내당능 저하, 고혈압, 심혈관계 질환을 비롯한 인슐린 저항성 증후군과의 관련성을 설명하는 기전으로 1992년 Hales 등은 태아와 영아기의 저영양이 특정 기관과 조직의 구조와 기능에 영구적인 변화를 야기할 수 있음을 제안하였다(6-12). 즉 임신 말기의 성장률 저하는 임신 초기의 영양 상태에 의해 “프로그래밍”되어 있으며 인슐린 분비능과 인슐린 감수성 역시 임신 초기에 “프로그래밍”되었다고 말할 수 있겠다. 이러한 태아기 영양 결핍이 성인이 된 이후의 당뇨병과 비만 그리고 만성 질환의 발현과의 연관성을 보여주는 연구 결과(13, 14)는



역학연구 자료에 근거하고 있으나 아직까지 그 세포학적 혹은 분자생물학적 기전은 밝혀져 있지 않다. 즉, 절약형질 가설을 뒷받침하는 연구 결과에 비하여 그 분자생물학적 기전을 설명할 수 있는 연구가 취약하다고 하겠다.

## 2. 모체 영양상태와 태아의 IGF-1

음식물 섭취와 영양 상태는 IGF-1을 조절하는 주된 인자이며, 에너지와 단백질의 섭취가 IGF-1의 유지에 필수적이다(15). 혈청 IGF-1의 측정은 급성 중증 질환자에서 영양 공급에 대한 반응을 측정하는 민감한 방법으로 사용되며, 또한 영양 상태를 평가하는 지표로 사용될 수 있다(16, 17). 임신된 동물에서의 영양상태 변화는 태아에서 호르몬 균형의 변화와 함께 성장 및 발달의 변화를 초래하게 되는 데 이에 대한 표지자로서 가장 많은 연구가 이루어진 것은 혈중 IGF-1 이다. 특히 모체의 영양결핍은 태아의 성장장애를 초래하며 이때 혈중 IGF-1과 IGF binding protein(IGFBP)의 농도를 변화시키는 데, Gallaher 등에 따르면 암양(ewe)에서 수태 -60일에서 +30일까지 영양실조를 유발한 결과 혈중 IGFBP-1과 IGFBP-3 농도가 유의하게 감소하였으며 생후에도 계속 영양섭취를 제한시킨 결과 IGF-1, IGFBP-3, IGFBP-4는 더 감소한다고 하며 이들 성장인자의 변화는 수태전 모체의 영양결핍에 의해 program 된다고 하였다(18). 한편 Jones 등은 임신한 guinea pig의 자궁동맥을 결찰한 결과 태아의 성장 속도가 저하되었으며 이때 혈중 인슐린, IGF-1, cortisol, thyroid hormone 의 농도도 감소하는 반면 IGF-2의 농도는 증가한다고 하였다(19). Nakago 등은 백서에서 임신중 영양상태와 혈중 IGF-1의 농도에 대한 연구에서 임신한 백서에서는 nitrogen balance가 임신 13일 이후에 감소하며 이때 혈중 IGF-1 농도가 함께 감소하는 것을 관찰하여 혈중 IGF-1의 농도는 모체의 영양상태, 특히 단백질 대사 상태를 반영하는 지표로 유용하다고 보고하였다(20). 그러나, 산모의 영양결핍이 있는 경우 태아의 혈액에서 IGF-1 등 성장인자와 각종 호르몬의 농도변화가 초래되고 향후 당뇨병, 비만증과 같은 대사질환의 발생 가능성이 높아지며(21), 말초혈액내 미토콘드리아 DNA의 양적 감소도 당뇨병, 비만증 등의 예견 지표로 유용하나 이들간의 상관관계에 대한 연구는 별로 없는 상태이다. 임신과 영양에 대한 최근까지의 연구에서 밝혀진 것은 단백질 특히 아미노산의 결핍이 태아의 성장에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 아미노산은 태아의 성장에 필요

한 단백질을 합성하는데 필요할 뿐만 아니라, 흥미롭게도 에너지 생성을 위한 주된 기질로서도 중요하다(22). 태아기의 영양결핍은 또한 성인에서의 당뇨병을 비롯한 심혈관 질환과도 밀접한 관련성이 있는데, 성인에서의 당뇨병을 설명하는 기전의 하나로, 단백질 영양 결핍에 의해 췌장 베타 세포의 부분적인 형성장애로 인한 인슐린 분비의 감소가 이후의 성인에서의 당뇨병의 원인으로 작용하리라는 것이고, 실제로 여러 연구들에서 인슐린 분비의 부전을 보여주었지만(23, 24), 췌장 베타 세포의 조직학적인 변화가 생후 정상식으로 회복시켰을 때 정상화 될 지에 관해서는 아직 연구되어 있지 않다. 영양상태는 항산화체계를 결정하는 중요한 인자로 작용한다(25). 단백질 에너지 영양실조는 항산화체계의 손상, 면역기능의 감소와도 관련이 있고 항산화체계가 손상됨에도 불구하고(26-28) 식이단백질에 대한 연구는 드문 실정이다.

## 제 2 절 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기전 연구

### 1. 미토콘드리아 DNA와 대사결핍

1990년대 들어 미토콘드리아 DNA의 이상은 당뇨병의 새로운 candidate gene의 하나로 제시되었는데, 이는 1992년 모계유전이되는 당뇨병과 청력손실을 동반하는 큰 가계에서 처음으로 확인되었다(29). 이 가계에서는 미토콘드리아의 단백질 합성 능력의 전반적 결함이 있으며 이는 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에 관계하는 효소의 감소와 관련이 있었다. 분자생물학적 분석결과 모든 모계 친척은 특징적인 10.4 kb 의 미토콘드리아 DNA 결손(deletion)을 지니고 있었는데 이러한 결손은 근육과 혈액 세포의 미토콘드리아 DNA 중 40-70%에서 나타난다. 최근에는 모계 유전 양상의 당뇨병 환자 가계에서 미토콘드리아 DNA 3243번 염기의 A→G 점돌연변이가 유전되고 있음이 보고되었고 이후 이 점돌연변이는 전 세계적으로 다양한 종족에서 관찰되고 있다(30-37). 최근에는 이 점돌연변이가 지진성 인슐린 의존성 당뇨병 또는 인슐린이 부족한 인슐린 비의존성 당뇨병과의 관계가 있다는 보고가 나오고 있으며 1995년에는 당뇨병성 근병증을 보이는 환자에서 5.8kb의 새로운 결손이 확인되었다는 보고도 있다(38).

이상의 연구들이 주로 미토콘드리아 DNA의 정성적 이상 즉, 점돌연변이나 결손에 초점을 맞추었던 데 반해 본 연구자들은 미토콘드리아 DNA의 양적인 감소가 대사 질환과의 관련이 있을 것이라는 가설을 세우고 이를 검증하여 왔다. 먼저 인슐린 비의존형 당뇨병 환자와 정상 대조군의 말초혈액 백혈구를 이용하여 slot blot으로 미토콘드리아 DNA의 정량분석을 시행한 결과 당뇨병 환자군의 미토콘드리아 DNA는 평균 35% 감소되어 있었음을 알 수 있었다(39). 이 결과를 근거로 과연 미토콘드리아 DNA의 양이 당뇨병 발병 이전에 변화가 있는 지 알아보기 위하여 생명공학 기술개발사업 1단계 과제로 전향적 연구를 수행하였다. 즉, 당뇨병 유병을 및 발생을 연구에 참여한 주민을 대상으로 2년간의 추적 조사를 시행한 결과 말초혈액 백혈구에서 정량적 PCR법으로 측정된 미토콘드리아 DNA의 양은 당뇨병 발생 이전에 이미 평균 25% 감소되어 있으며 미토콘드리아 DNA의 양은 엉덩이-허리 둘레비와 음의 상관관계를 보여 미토콘드리아 DNA양이 포도당 농도뿐만 아니라 비만, 특히 각종 대사질환 및 심혈관계 질환의 위험인자인 중심성 비만과도 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한 미토콘드리아 DNA의 양은 이완기 혈압과도 음의 상관관계를 보여 미토콘드리아 DNA의 감소는 인슐린 저항성을 공통분모로 하는 대사성 증후군 (syndrome X)의 조기 표지자가 될 수 있음을 알 수 있었다(40). 미토콘드리아 DNA의 결손이나, 점돌연변이에 의한 이런 효소들의 기능적인 장애가 병을 유발하는 원인의 하나로 제시되고는 있지만, 현재 당뇨병 환자에서 미토콘드리아 DNA의 감소와 현재 본 연구에서 진행중인 단백질 제한식이에 의한 미토콘드리아 DNA의 감소가 이러한 미토콘드리아의 기능에 영향을 미쳐 병의 원인으로 작용할지, 아니면 단순한 병의 결과인지는 아직 연구되어 있지 않은 실정이다.

## 2. 미토콘드리아 DNA 복제수 조절의 기전

미토콘드리아 DNA의 복제수 감소에 의해 초래되는 질환으로 보고된 것은 영아에서 치명적인 호흡곤란 증후군이다. 이 질환에서는 호흡근을 비롯한 골격근에서 미토콘드리아 DNA의 복제수가 정상인의 10분의1에도 못 미치는 극심한 미토콘드리아 DNA의 결핍이 관찰되며 이환된 환아는 호흡곤란으로 인하여 생후 2개월 이내에 사망한다고 한다. 이 환아의 조직에 대한 연구결과에 의하면 미토콘드리아 DNA의 복제에 꼭 필요한 미토콘드리아 전사인자 A (mtTFA)의 발현과 그 단백질양이

현저히 감소되어 있다고 한다. 따라서 미토콘드리아 DNA의 복제수를 결정하는 기전의 하나로서 이 mtTFA의 중요성이 주목을 받고 있으나 아직 그 분자생물학적 특성이 완전히 규명되어 있지는 않다. 다른 가능성으로 미토콘드리아에서는 산화적 인산화가 일어나고 이 과정에서 유리 산소라디칼의 발생이 증가하므로 산화손상에 대한 감수성이 큰 미토콘드리아 DNA가 직접적인 손상을 받을 수도 있으나 이 경우의 손상은 대개 점돌연변이나 결손의 형태로 나타남이 알려져 있다. 최근에는 DNA의 메틸화(41, 42)와 미토콘드리아 DNA손상과의 관련성으로부터 mtTFA promoter 부위의 메틸화가 결국 mtTFA의 활성변화를 초래하고(43) 이에 따라 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소를 초래할 가능성이 제시되고 있다(44-46). 미토콘드리아 DNA의 복제수가 감소하는 질환과 상황은 알려져 있으며 일부 보고자에 의하면 mtTFA의 발현과 단백질 감소에 의한다고 하나 아직 확실치는 않으며 유리 라디칼에 의한 손상(47), promoter 부위의 이상 등의 가능성이 제시되고 있으나, 어느 것도 명확한 인과관계를 나타내 주지 못하고 있는 실정이다.

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계

#### 1. 이론적 배경 및 연구 내용

##### 가. 미토콘드리아 DNA 정량적 PCR 방법 확립

Competitive PCR에 사용할 internal standard를 제작하였다. 일정농도의 target DNA와 정량하여 이미 농도를 아는 competitor로서의 internal standard를 동시에 첨가하여 PCR 후 전기영동 시켜 target DNA band와 competitor band의 세기를 측정한다. 각기 다른 농도의 internal standard가 첨가되었기 때문에 internal standard의 band 세기와 같은 세기를 보이는 경우가 target DNA의 농도라고 추정할 수 있다.

##### 나. 산모와 태아의 영양상태와 미토콘드리아 DNA와의 상관관계

모체의 영양결핍은 태아의 성장장애를 초래하며 이때 혈중 IGF-1과 IGF binding protein(IGFBP)의 농도를 변화시키며, 산모의 영양결핍이 있는 경우 태아의 혈액에서 성장인자와 각종 호르몬의 농도변화가 초래되고 향후 대사질환의 발생 가능성이 높아진다. 산모와 태아 제대혈의 IGF-I 및 미토콘드리아 DNA 양과 태아 출생 체중과의 상관관계를 규명하기 위하여, 혈액으로부터 IGF, IGFBP3 등의 농도를 측정하고, 임프구를 추출하여 Quantitative PCR을 통해 미토콘드리아 DNA의 양적 분석을 시행하였다.

##### 다. 단백질 결핍 백서 모델의 확립

어미쥐는 교배 2주전부터 이유기가 끝날 때까지 정상식이(180g casein/kg diet)를 준 군과 단백질 결핍 식이(80g casein/kg diet)를 준 군으로 구성되었고, 정상食이를 먹인 어미쥐로부터 태어난 쥐는 이유 후에도 계속 정상食이를 제공한 군(Group 1), 단백질 결핍食이를 먹은 어미쥐로부터 태어난 새끼쥐들 중 이유 후에도 계속 단백질 결핍食이를 먹은 군(group 3)과 정상食이로 회복한 군(group 2) 등 모두 세 군

으로 나누었다.

### 라. 단백질 결핍 백서 모델에서 mtDNA 양, mtTFA 및 COX III의 분석

어미쥐는 정상식이군과 단백질 결핍식이군의 간 및 근육조직에서 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 측정하였다. 새끼쥐는 정상식이군과 단백질 제한식이군에서 이유 1주후(4주)와, 8주, 16주에 각각 간 및 근육조직에서 mtDNA 양, 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) mRNA 및 cytochrome c oxidase(COX) III의 발현을 측정하였다.

## 2. 연구 방법 및 결과

### 가. 산모와 태아 제대혈의 IGF-I 및 미토콘드리아 DNA양과의 상관관계

#### (1) 연구 방법

##### (가) GH, Insulin, proinsulin, C-peptide, IGF-1, IGF-II, IGFBP-3의 측정

제대혈에서 채혈한 후, IGF 농도는 혈장을 분리하여 특이 방사성 면역 측정법으로 측정하였다. 미토콘드리아의 DNA 측정은 제대혈로부터 얻은 임프구에서 sodium dodecyl sulfate(SDS)- proteinase K 방법으로 추출하였다. 제대혈 백혈구는 Histopaque를 이용하여 채취된 정맥혈로부터 임파구를 분리한다. 임파구는 부유액에 lysis buffer(10mM Tris, 400mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 10% SDS 를 첨가한 후 proteinase K와 Saturated NaCl 로 처리하여 원침 후 상층액을 따서 ethanol 로 DNA 를 침전시킨다. 추출된 DNA 를 TE (Tris/EDTA) buffer(pH 8.0) 에 녹이고 DNase-free RNase(1.0ug/ml)와 함께 37°C에서 3시간 반응시킨다. DNA 는 spectrophotometer를 이용해 260nm 에서의 흡광도를 구하여 정량한다.

##### (나) 미토콘드리아 DNA의 양적 분석(Quantitative PCR)

Genomic DNA는 제대혈로부터 얻은 임프구에서 추출하여 흡광도를 제어 그 농도를 측정하였다(Table 1).

① competitive PCR에 사용할 internal standard의 제작

㉞ Primer제작 (mtF1, mtR1, JS3, JS4)

Primers	5'-3' sequence	position
mtF1	CCTAGGGATAACAGCGCAAT	2928-2947
mtR1	TAGAAGAGCGATGGTGAGAG	3558-3539
JS3	GCCATGGGTAGGGCTCTGCCATCCTAACAA	3317-3308, 3247-3228
JS4	GGCAGAGCCCTACCCATGGCCAACCTCCTA	3238-3247, 3308-3317

㉟ Primary PCR product 제작

mtF1 과 JS3를 이용하면 mt DNA의 2928-3247bp 다음에 오는 3248-3307bp의 60bp를 건너뛰어 3308-3317bp 부분이 직접 연결되어 증폭되어 330bp의 product이 생기고 JS4와 mtR1을 사용하여 또 다른 PCR을 수행하면 3238-3247, 3308-3558부분이 증폭되어 261bp가 생성된다. 사용할 primer는 각각 tube 당 25pmole이며 dATP, dTTP, dCTP, dGTTP의 최종농도가 각기 200 $\mu$ M, Taq Polymerase는 1U이며, 최종농도 20mM Tris Cl(pH 8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.05% Tween 20, 0.001% gelatin이 들어있는 반응용액에 100ng정도의 DNA를 첨가한다. PCR조건은 94°C 3min, 60°C 1min, 72°C 1min으로 1 cycle후 94°C 40 sec, 60°C 1min, 72°C 1min 으로 34 cycles 수행하고 72°C 10min 으로 연장반응을 시킨다.

㊱ 2ndary PCR product제작 및 DNA 추출

위에서 얻은 2개의 PCR product들을 gel에 걸어 전기영동하여 size를 확인후 각기 1 $\mu$ l를 취해 mtF1 과 mtR1을 이용한 2ndary PCR을 수행한다. 사용되는 Taq Polymerase나 dNTP, PCR buffer의 조성은 1차 PCR 반응과 같다. 반응조건은 94°C 4min후 94°C 40sec, 58°C 1min, 72°C 1min으로 8 cycles 돌린후 94°C 40sec, 60 °C 1min, 72°C 1min으로 25 cycles돌리고 72 °C 10min 반응시킨다. product을 gel에 걸어 571bp에 해당하는 band 를 면도칼로 잘라 QIAEX II kit으로 DNA를 추출한다.

㉠ TA cloning

Invitrogen의 original TA cloning kit을 사용하여 cloning할 예정이다. PCR<sup>TM</sup> II vector 50ng에 대해 PCR product 20ng을 첨가하여 T4 DNA ligase로 ligation 시킨다.

㉡ Transformation과 plasmid DNA의 추출

One shot<sup>TM</sup> INVaF'competent cell 을 이용하여 transformation 시켜 이 cell을 LB agar plate (ampicillin, X-gal포함)에 spread시켜 37°C에서 overnight incubation 시킨다. Transformed cell colony인 white colony를 골라 ampicillin이 든 LB broth에서 하룻 밤 배양후 QIAGEN plasmid DNA extraction kit을 사용하여 plasmid DNA를 추출한다.

㉢ Plasmid DNA 를 정량후 여러 농도로 희석한다.

② PCR with target DNA, plasmid DNA

일정농도(10ng) 의 target DNA와 정량하여 이미 농도를 아는 competitor로서의 internal standard 를 동시에 첨가하고 tube당 2.5pmole씩 mtF1과 mtR1을 첨가하고 dNTP 의 최종농도는 125μM이며 나머지는 위의 PCR 반응 용액의 조성파 같다. 반응 조건은 94°C 3min, 65°C 40sec, 72°C 1min 반응후, 94°C 1min 65°C 40sec 72°C 1min으로 29cycles돌리고 72°C 7min 반응시킨다. 반응 생성물은 gel 에 걸쳐 전기영동 시켜 ETBr용액에 염색시킨 후 UV light하에서 intensity를 관찰후 polaroid film으로 촬영후 631bp의 target DNA band 와 571bp의 competitor band의 세기를 측정한다. 각기 다른 농도의 internal standard가 첨가되었기 때문에 internal standard 의 band 세기와 같은 세기를 보이는 경우가 target DNA의 농도라고 추정할 수 있다.

(2) 연구 결과

(가) 신생아 출생 체중과 IGF-1, IGF-2, IGFBP-3의 상관관계

제대혈에서 측정된 IGF-1의 농도는  $30.23 \pm 19.47$  ng/ml 이었으며 출생 체중이 증



가함에 따라 증가하는 양상을 보였다( $r=0.32$ ,  $p<0.01$ )(Fig 1). 산모 정맥혈의 IGF-1 농도는  $171.04\pm 102.66$  ng/ml을 보였으며 출생 체중과는 유의한 상관관계가 없었다. 제대혈과 산모 정맥혈에서의 IGF-2 농도는 각각  $301.03\pm 51.05$  ng/ml,  $566.93\pm 141.49$  ng/ml 이었으며 출생 체중과는 유의한 상관관계가 없었다. 제대혈의 IGFBP-3 농도는  $1012.63\pm 266.90$  ng/ml 로 출생체중과 유의한 상관관계( $r=0.44$ ,  $p<0.01$ )를 보였으나(Fig. 1), 산모 정맥혈의 IGFBP-3 농도는  $3865.14\pm 1084.93$  ng/ml 로 출생체중과 유의한 상관관계가 없었다. IGF-1과 IGFBP-3 의 사이에는 제대혈과( $r=0.66$ ,  $p<0.01$ ) 산모 정맥혈 모두에서( $r=0.66$ ,  $p<0.01$ ) 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다(Fig. 2).

#### (나) 신생아 출생 체중과 mtDNA양

제대혈에서 측정된 mtDNA 양은  $2.53\pm 0.60$  amol/5ng of total DNA 로 출생 체중과 유의한 상관관계가 없었으나, 산모 정맥혈의 mtDNA 양은  $2.16\pm 0.60$  amol/5ng of total DNA 로 출생체중과 유의한 상관관계를 보였다( $r=0.63$ ,  $p<0.01$ )(Fig 3). 제대혈의 mtDNA 양과 산모 정맥혈의 mtDNA 양 사이에는 유의한 상관관계가 있었다( $r=0.55$ ,  $p<0.01$ )(Fig 4).

#### (다) 신생아 출생 체중과 기타 임상지표들

신생아 출생 체중은 산모의 임신전 체중과 유의한 상관관계가 있었으나( $r=0.45$ ,  $p<0.01$ )(Fig 5), 산모의 나이나 산모의 출생당시 체중과는 유의한 상관관계가 없었다.

#### (라) 신생아 출생 체중에 영향을 미치는 요소

신생아 출생 체중에 가장 크게 영향을 미치는 인자를 알아보기 위해 단순 선형회귀 분석에서 신생아 출생체중과 통계적으로 유의한 상관계수를 보인 제대혈 IGF-1, 제대혈 IGFBP-3, 산모의 임신전 몸무게, 산모정맥혈의 mtDNA 양 등의 변수를 대상으로 다중 회귀분석을 시행하였다. 그 결과 산모 정맥혈의 mtDNA 양만이 신생아 출생 체중에 독립적으로 영향을 주는 인자로 나타났다( $p<0.01$ )(Table 2).

**Table 1. Clinical characteristics of subjects.**

There were no significant differences between total cases and cases who were mtDNA measured.

		total (n=72)	mtDNA measured (n=27)
Baby	Gestational age(ws)	39 <sup>-3</sup> ± 1 <sup>+4</sup>	39 <sup>+0</sup> ± 1 <sup>+0</sup>
	Birth weight(Kg)	3.25 ± 0.55	3.34 ± 0.53
	Sex (M:F)	39:33	12:15
Mother	Age(yrs)	30.5 ± 4.2	30.8 ± 3.8
	Prepregnancy body weight(Kg)	52.3 ± 6.9	52.4 ± 5.9

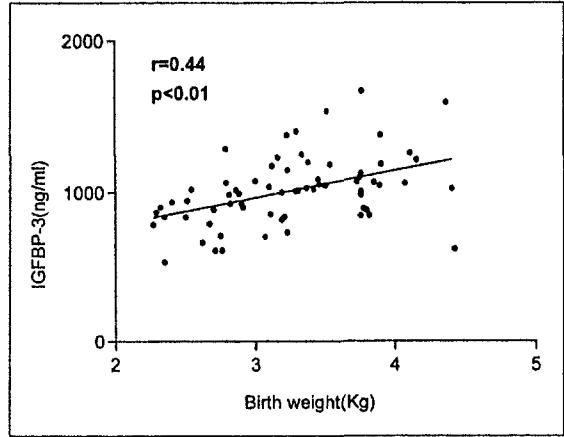
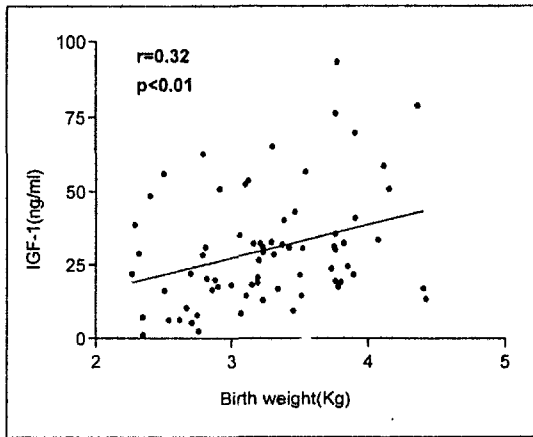
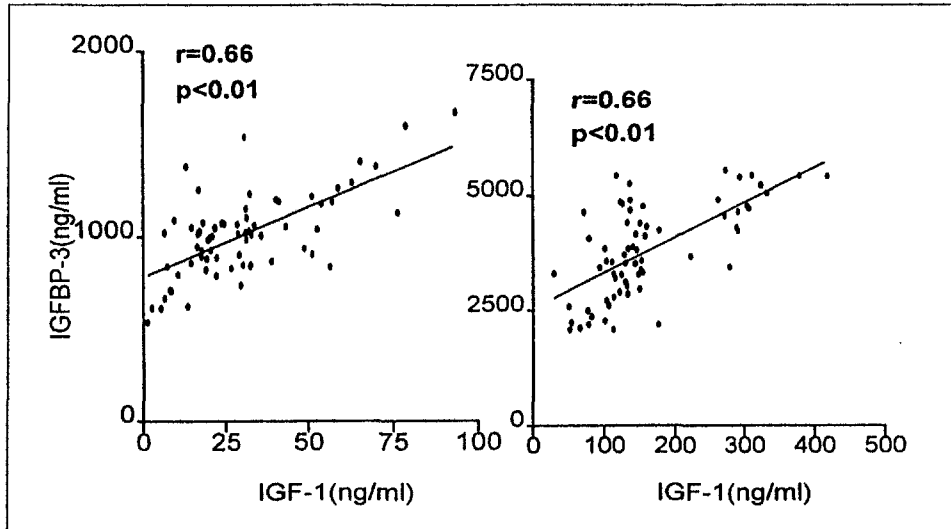
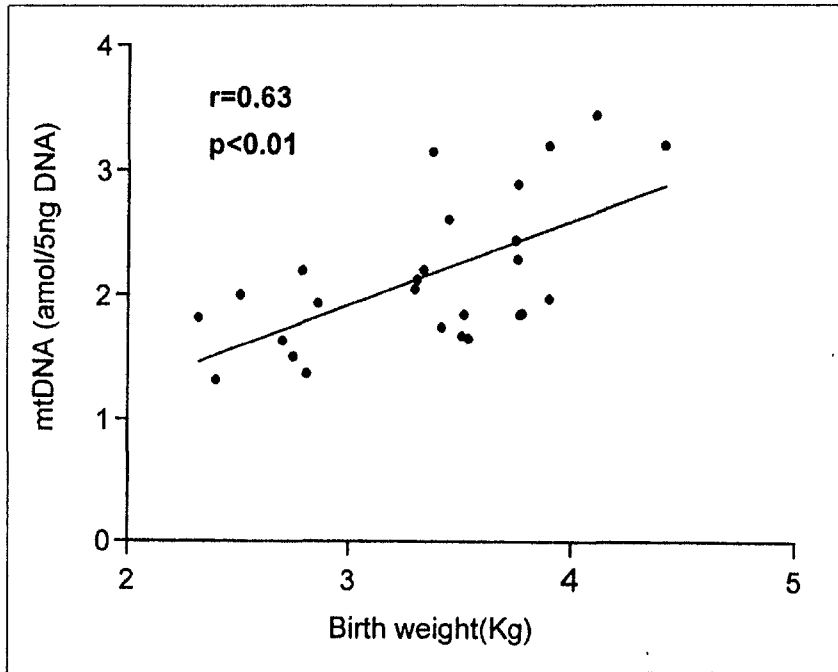


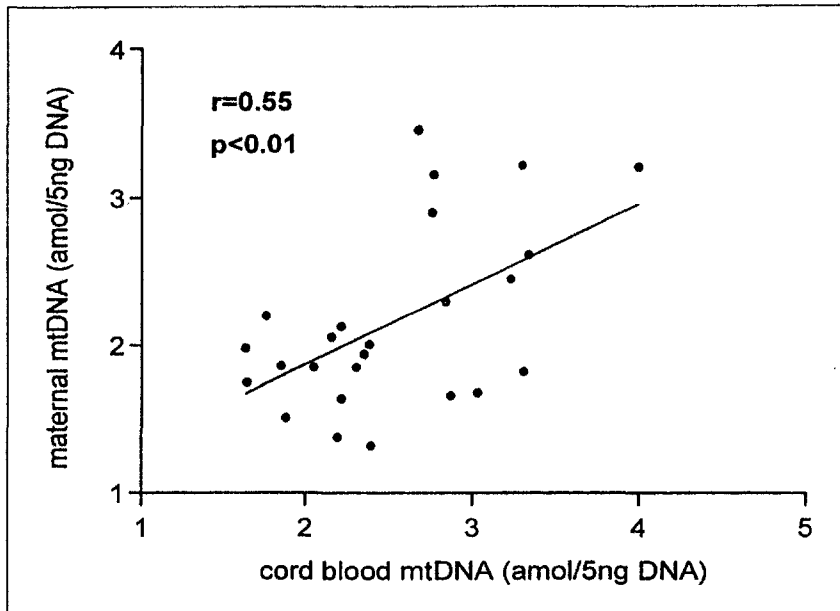
Fig 1. Relationship of cord serum IGF-1 & IGFBP-3 to birth weight



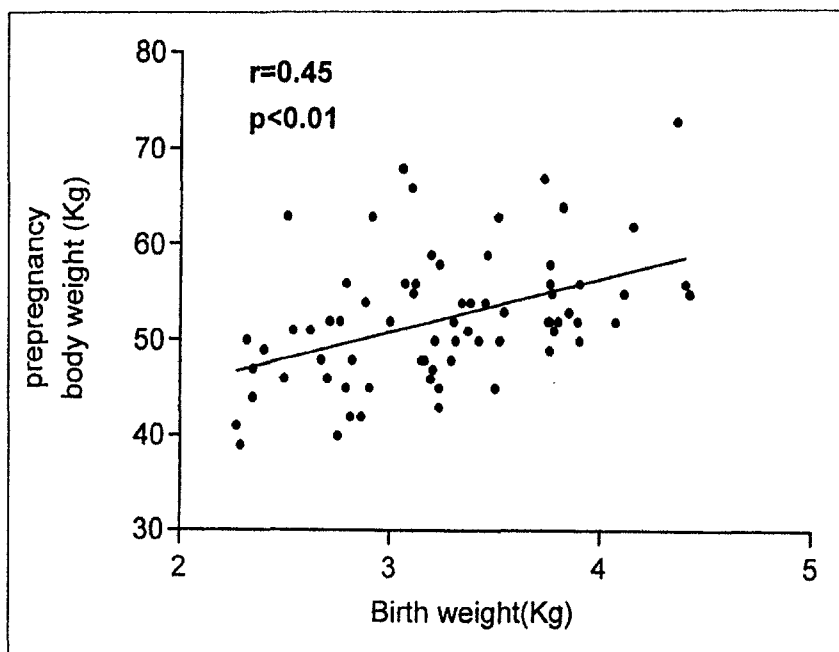
**Fig 2. Relationship of cord serum(left) and maternal(right) IGF-1 to IGFBP-3**



**Fig. 3. Relationship of maternal blood mtDNA amount to birth weight**



**Fig. 4. Relationship of cord blood mtDNA amount to maternal blood mtDNA amount**



**Fig. 5.** Relationship of maternal prepregnancy body weight to birth weight

**Table 2. Result of multiple linear regression analysis of cord blood IGF-1 and IGFBP-3, maternal prepregnancy body weight, maternal mtDNA amount to birth weight.** This shows that the only independent factor related to birth weight is maternal mtDNA amount.

Independent variables	Regression coefficient(95%CI)	<i>p</i>
cord blood IGF-1	0.002(-0.009 to 0.014)	0.683
cord blood IGFBP-3	0.0003(-0.0007 to 0.001)	0.569
pregnancy body weight	0.011(-0.026 to 0.048)	0.541
maternal mtDNA amount	0.534(0.204 to 0.863)	0.003



## 나. 단백질 결핍 백서 모델에서 미토콘드리아 DNA 양의 분석

### (1) 연구 방법

#### (가) 대상

어미쥐는 교배 2주전부터 이유기가 끝날 때까지 정상식이(180g casein/kg diet)를 준 군과 단백질 결핍 식이(80g casein/kg diet)를 준군으로 구성되었고, 정상식을 먹인 어미쥐로부터 태어난 새끼쥐는 이유후에도 계속 정상식을 제공하였고(group 1), 단백질 결핍 식이를 한 어미쥐로부터 태어난 새끼쥐는 이유후에도 계속 단백질 결핍 식이를 한 군(group 3)과, 정상식으로 resuscitation한 군(group 2)으로 나누었다. 각 군의 식이조성은 표 3과 같고 연구 일정은 그림 6과 같다. 어미쥐 두 군의 간 및 근육조직에서 mtDNA를 측정하였고, 새끼쥐는 정상식이군과 단백질 제한 식이군에서 이유 1주후(4주)와, 8주, 16주에 각각 간 및 근육조직에서 mtDNA 양, 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) mRNA 및 cytochrome c oxidase(COX) III의 발현을 측정하였다.

#### (나) 조직의 보관

희생된 쥐로부터 얻은 혈액은 EDTA tube에 보관 후 혈청과 buffey coat를 분리하였고, 골격근, 간조직의 각 부위를 액화질소로 급속 냉동하여 -70℃에 보관한다.

#### (다) DNA의 분리

각각의 조직은 해동시키고 lysis buffer(10mM Tris, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 1% SDS, 100ug/ml proteinase-K)에서 mincing후 48℃ 수조에서 14-16시간 배양하고, 37℃에서 30분 더 배양한 후 phenol/chloroform으로 DNA를 추출하였다. 10mM Tris-1mM EDTA를 가하고, DNA 농도를 측정한 후 조직 wet weight당 DNA의 양을 산출하였다. DNA는 spectrophotometer를 이용해 260nm에서의 흡광도를 구하여 정량하였다.

#### (라) 미토콘드리아 DNA의 정량 분석(Quantitative PCR)

##### ① Internal standard의 제작

▪ Primers의 제작

770 bp product

MT3 L4395 (5' AggACTTAACCAgACCCAAACACg 3', nt 4395-4418)

MT4 H5164 (5' CCTCTTTTCTgATAggCggg 3', nt 5164-5145)

694 bp Internal standard

Df1 (5' CCCTATCAAC//CCAACCAACAACA ACTCCAA 3',  
nt 4721-4730, 4807-4826)

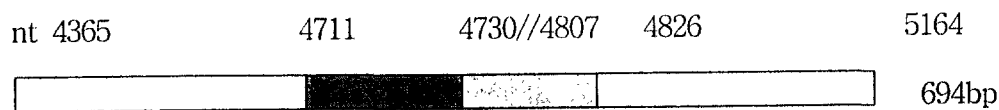
Dr1 (5' TgTTggTTgg//gTTgATAgggTTgAgCAgTT 3',  
nt 4816-4807, 4730-4711)

▪ Primary PCR product 제작

MT3와 Dr1을 이용하면, mt DNA의 4395-4730bp 다음에 오는 4730-4807bp의 76bp를 건너뛰어 4730-4807bp 부분이 직접 연결되어 증폭되어 346bp의 product이 생기고 Df1과 MT4를 사용하여 또 다른 PCR을 수행하면 4721-4730, 4807-5164부분이 증폭되어 369bp가 생성된다. 사용할 primer는 각각 tube 당 50pmole이며 dATP, dTTP, dCTP, dGTP의 최종농도가 각기 200mM, Taq Polymerase는 0.75unit이며, 최종농도 20mM Tris Cl(pH 8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.05% Tween 20, 0.001% gelatin이 들어있는 반응용액에 100ng정도의 DNA를 첨가한다. PCR 조건은 94°C 3min, 60°C 1min, 72°C 1min으로 1 cycle후 94°C 40 sec, 60°C 1min, 72°C 1min 으로 30 cycles 수행하고 72°C 7min 으로 연장반응을 시킨다.

▪ Secondary PCR product제작 및 DNA 추출

위에서 얻은 2개의 PCR product들을 gel에 걸어 전기영동하여 size를 확인후 각기 1µl를 취해 MT3 과 MT4를 이용한 secondary PCR을 수행한다. 사용되는 Taq Polymerase나 dNTP, PCR buffer의 조성은 primary PCR 반응과 같다. 반응조건은 94°C 4분후, 94°C 40초, 60°C 1분, 72°C 1분으로 30 cycles 수행하고 72°C 7분으로 반응시킨다. PCR product를gel에 걸어 694bp에 해당하는 band 를 먼도칼로 잘라 QIAEX II kit으로 DNA를 추출한다.



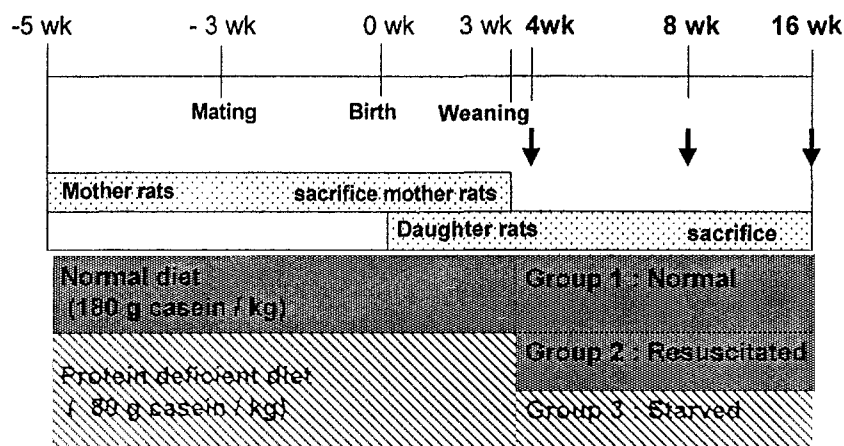
▪ Transformation과 plasmid DNA의 추출

② PCR with target DNA, plasmid DNA

일정농도(50ng)의 target DNA와 정량하여 이미 농도를 아는 competitor로서의 internal standard 를 동시에 첨가하고 tube당 5pmole씩 MT3과 MT4을 첨가하고 dNTP의 최종농도는 200mM이며 총 반응량은 20 $\mu$ L로 하였다. 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C 3분, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 40초로 반응후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 40초로 29cycles 돌리고 72 $^{\circ}$ C 5분으로 반응시킨다. 반응 생성물은 agarose gel에 걸어 전기영동 시켜 ETBr용액에 염색시킨 후 UV light하에서 intensity를 polaroid film으로 촬영후 770bp의 target DNA band 와 694bp의 competitor band의 세기를 측정한다. 각기 다른 농도의 internal standard가 첨가되었기 때문에 internal standard 의 band 세기와 같은 세기를 보이는 경우가 target DNA의 농도라고 추정할 수 있다(그림 7). 그림 8은 2군 15주령 새끼쥐의 미토콘드리아 DNA 정량을 예로 보인 것이다.

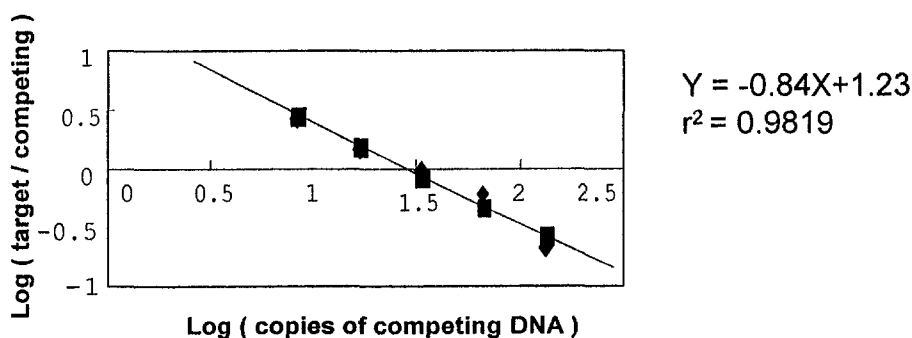
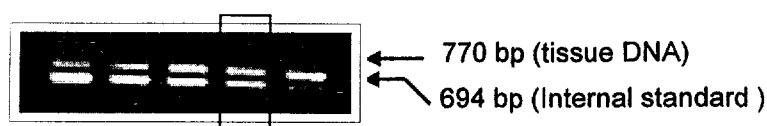
**Table 3. Compositions of diets**

	Starved rat	Control rat
	8% Casein Diet (TD 97119)	18% Casein Diet (TD 97120)
	g/kg	g/kg
Casein	80.0	180.0
DL-Methionine	2.0	0.0
Corn Starch	774.99	677.85
Peanut Oil	80.0	80.0
Cellulose	20.0	20.0
Vitamine Mix, Teklad (40060)	10.0	10.0
Mineral Mix, Ca-P Defic.(TD 79055)	13.4	13.4
Calcium Phosphate, diphasic (CaHPO <sub>4</sub> )	19.51	16.5
Calcium Carbonate (CaCO <sub>3</sub> )	0.1	2.25

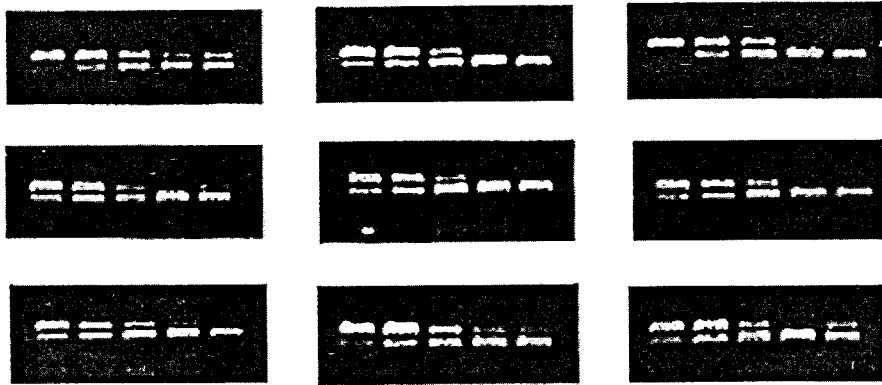


**Fig 6. Research design.** The normal and the protein deficient mothers were respectively fed 180g casein/kg diet (control) and 80g casein/kg diet (low protein) from 15 days before mating until the end of the suckling period, and then sacrificed during weaning (dashed arrow). Rats born from normal mothers were continuously fed on 180g casein/kg diet at weaning (group 1), and rats born from protein deficient mothers were randomly divided into two groups at weaning (week 4): the group fed 180g casein/kg diet (group 2) and the group fed on 80g casein/kg diet (group 3).

	1	2	3	4	5
Plasmid(ng/ $\mu$ L)	0.08X5 $\mu$ L	0.04X5 $\mu$ L	0.02X5 $\mu$ L	0.01X5 $\mu$ L	0.005X5 $\mu$ L
(amol)	133.20	66.60	33.30	16.65	8.33
Temp.DNA (50ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L(50ng)	1 $\mu$ L(50ng)	1 $\mu$ L(50ng)	1 $\mu$ L(50ng)	1 $\mu$ L(50ng)



**Fig. 7. Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA).** (A) Known numbers of copies of internal standard were introduced into the DNA samples derived from liver and muscle and amplified with primers MT3 and MT4. PCR product was electrophoresed in 1.5 % agarose gel. As indicated, two products were generated, one derived from the mtDNA (770 bp) and the other derived from the internal standard (694 bp). (B) Competition equivalence points were determined by interpolation on plots of the logarithm of the calculated ratio of the signal for the internal standard derived product to the signal for mtDNA versus the logarithm of the copy number of the added internal standard.



**Fig 8. Examples of quantitative PCR of liver mtDNA in group 2 at week 15.** In group 2, most isodense lines were met between lane 2 and 3, and its mtDNA content was 20-30 amol/50 mg DNA. Final mtDNA content was  $106 \pm 34$  amol/250 ngDNA.

## (2) 연구 결과

(가) 단백질 결핍 어미쥐에서 정상식이 군에 비해 간과 근육조직에서 미토콘드리아 DNA 양이 유의하게 감소되어 있었다(그림 9). 새끼쥐는 정상식이군(1군)에 비해 단백질 제한을 계속적으로 시행한 군(3군)에서는 4주, 16주에 미토콘드리아 DNA 양의 감소를 지속적으로 보여주었다(그림 10).

(나) 새끼쥐에서 각 군의 체중은 5주와 10주째까지는 단백질 제한을 시행한 어미쥐에서 태어난 군(2군과 3군)에서 정상식이군(1군)에 비해 감소되어 있었고, 20주째에는 2군에서 약간의 체중 회복을 보여 주었지만, 여전히 정상식이군에 미치지지는 못하였다(그림 11). 새끼쥐에서 각 군의 IGF-1은 5주령에서는 각 군간에 차이가 없었으나 10주령부터는 단백질 제한을 계속적으로 시행한 군(3군)에서 정상식이를 한 1군에 비해 유의한 감소를 보였다(그림 12).

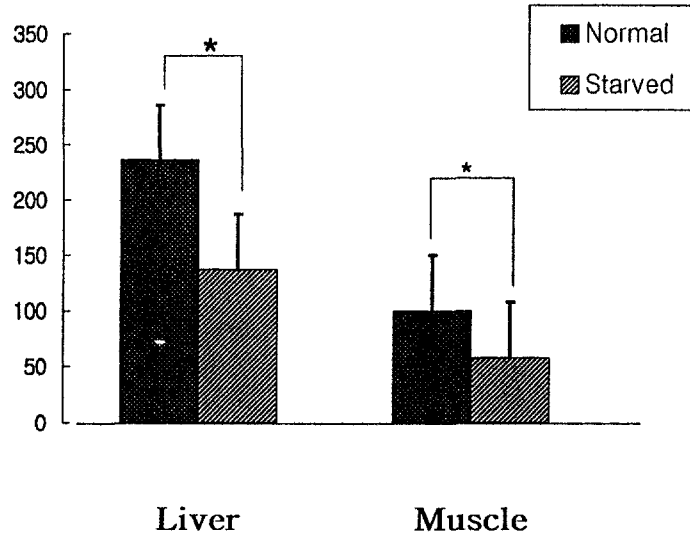
(다) 호흡사슬에서 에너지 생성에 주된 역할을 하는 cytochrome c oxidase(COX III) 효소의 발현을 간조직에서 평가하였을 때 단백질 결핍 새끼쥐(2군과 3군)에서 10주령에서는 증가하였으나 20주령에서는 의미있게 감소하였다(그림 13).

(라) 단백질 결핍 새끼쥐에서 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) mRNA의 유의한 감소가 관찰되었다(그림 14).

(마) 단백질 결핍 새끼쥐(2군과 3군)에서 미토콘드리아 DNA 양의 감소와 함께 COX III 및 mtTFA mRNA의 감소가 10주령, 15주령 및 20주령에서 관찰되었다(그림 15, 16, 17).



(amole/250ng DNA)



**Fig. 9. Mitochondrial DNA content of mother rats.**

MtDNA content of liver and muscle in the protein deficient mothers was significantly lower than those in control mothers respectively (\*  $p < 0.05$ )

(amole/250ng DNA) \* (p<0.05)

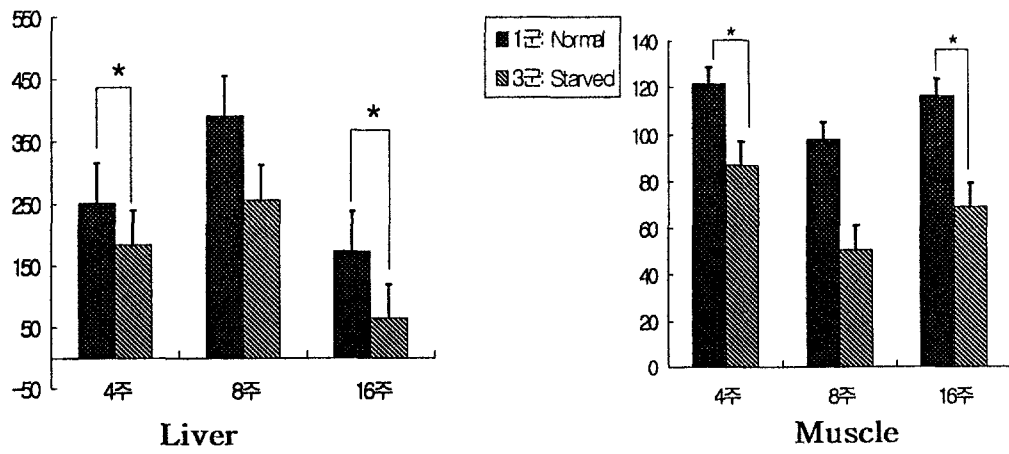
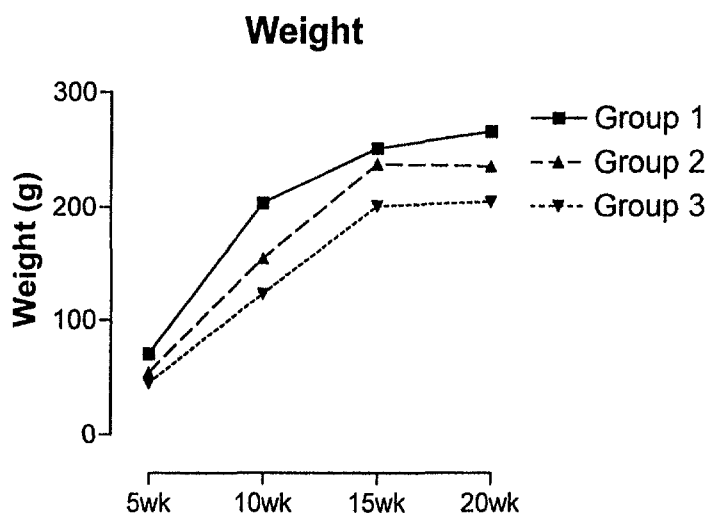
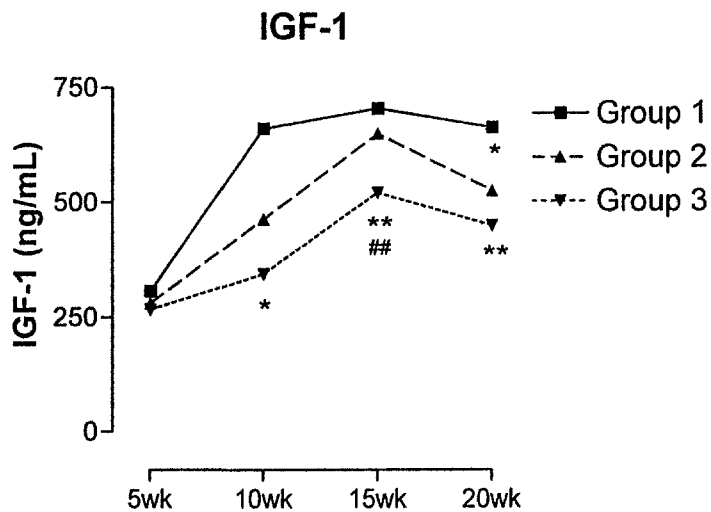


Fig. 10. Mitochondrial DNA content in starved daughter rats.



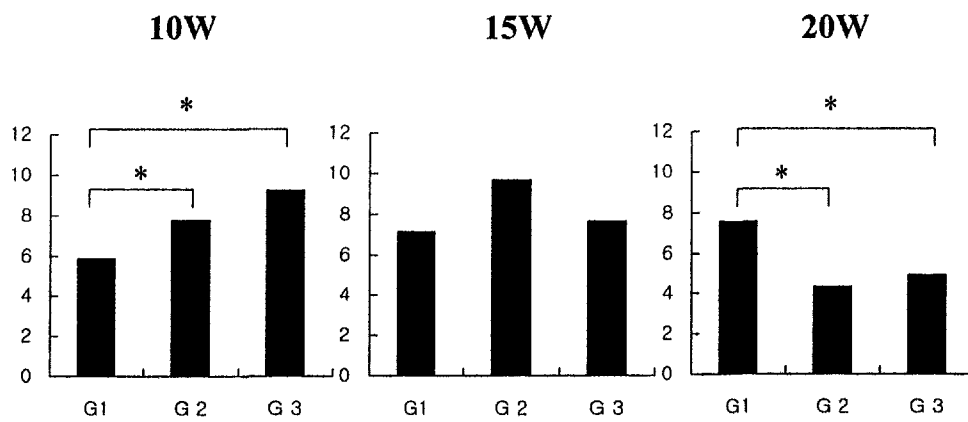
**Fig 11. Body weight of daughter rats in relation to age in control (group 1), resuscitated (group 2) and low-protein (group 3) groups.**

Body weight was lower in rats born from protein deficient mothers (group 2 and 3) at week 5 and was increased in resuscitated group (group 2) at week 10 and 15. In resuscitated group, body weight was still lower than that control group (group 1) at week 20.



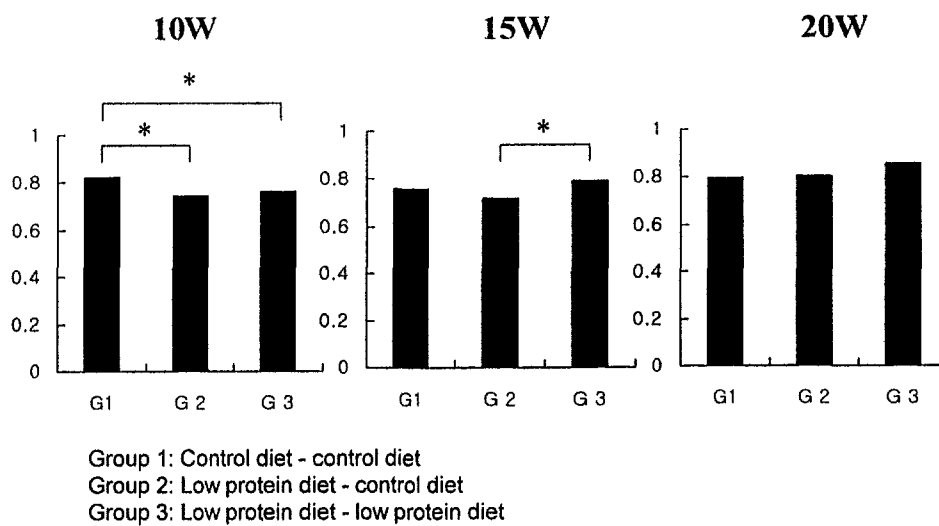
**Fig 12. IGF-1 levels of daughter rats in relation to age in control (group 1), resuscitated (group 2) and low-protein (group 3) groups.**

IGF-1 levels were not different among three groups at week 5. At week 10, IGF-1 levels were significantly lower in group 3 than in group 1 ( $p < 0.05$ ). At week 15, even than in group 2, IGF-1 levels were significantly lower in group 3 ( $p < 0.01$ ). At week 20, also in group 2, IGF-1 levels were lower than in group 1 ( $p < 0.05$ ). (\*  $p < 0.05$  vs group 1, \*\*  $p < 0.01$  vs group 1, ##  $p < 0.01$  vs group 2 at corresponding point)

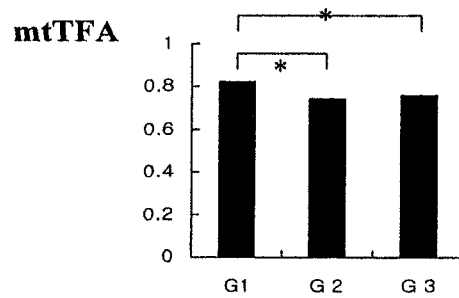
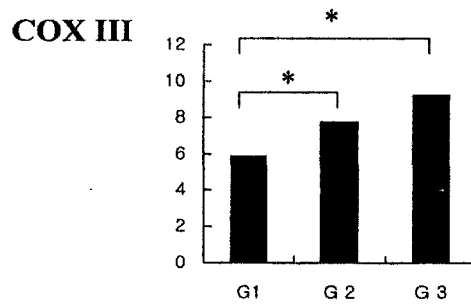
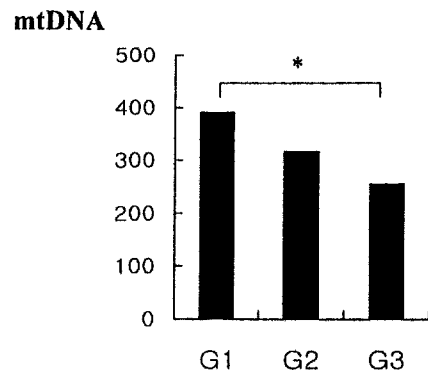


Group 1: Control diet - control diet  
 Group 2: Low protein diet - control diet  
 Group 3: Low protein diet - low protein diet

**Fig. 13. Cytochrome c oxidase III mRNA expression in rat liver(\* : p<0.05).**



**Fig. 14. Mitochondrial transcription factor(mtTFA) in rat liver(\* : p<0.05).**

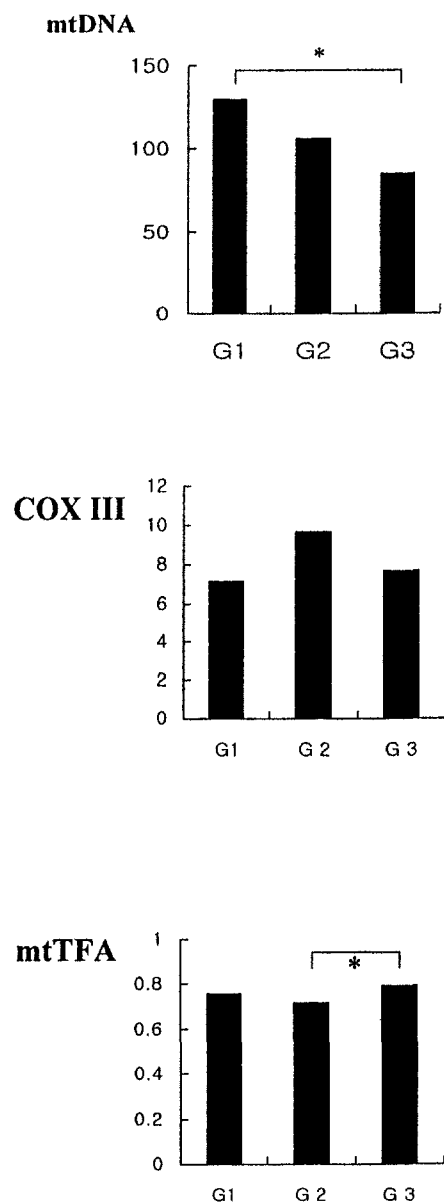


**Fig. 15. MtDNA content, COX III and mtTFA in liver of rats at week 10 (\* :  $p < 0.05$ ).**

(G1: control diet - control diet

G2: low protein diet - control diet

G3: low protein diet - low protein diet)



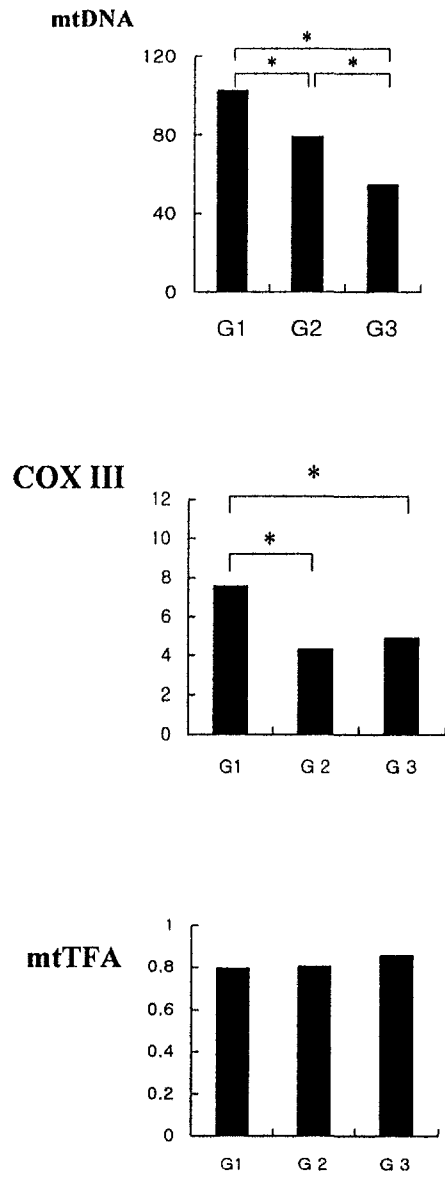
**Fig. 16. MtDNA content, COX III and mtTFA in liver of rats at week 15 (\* : p<0.05).**

(G1: control diet - control diet

G2: low protein diet - control diet

G3: low protein diet - low protein diet)





**Fig. 17. MtDNA content, COX III and mtTFA in liver of rats at week 20 (\* : p<0.05).**

(G1: control diet - control diet

G2: low protein diet - control diet

G3: low protein diet - low protein diet)

## 제 2 절 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기전 연구

### 1. 이론적 배경 및 연구 내용

#### 가. 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) 발현 및 메틸화 평가

DNA의 메틸화와 미토콘드리아 DNA손상과의 관련성으로부터 mtTFA promoter 부위의 메틸화가 결국 mtTFA의 활성변화를 초래하고 이에 따라 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소를 초래할 가능성이 제시되고 있다. 당뇨병 환자와 정상인의 말초혈액 림프구의 RNA를 추출하여 mRNA purification kit를 이용하여 mRNA를 추출한 후 1% formaldehyde gel에 전기영동후 nitrocellulose membrane에 transfer 시키고 UV crosslinking 시킨후 human mtTFA probe를 P<sup>32</sup> dCTP로 label시킨후 hybridization을 시행한 후 -70도에서 autoradiography를 시행하였다. 당뇨병 환자에 있어서 mtTFA의 methylation 여부는 Southern blot analysis 또는 methyl specific sequencing method 등을 이용하여 규명하였다.

#### 나. 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) promoter 다형성 평가

한국인 당뇨병 환자와 정상인간에 mtTFA promoter sequence에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 genomic DNA를 추출하여 mtTFA promoter region을 PCR로 증폭하고 direct sequencing하였다.

#### 다. Rat mtTFA cDNA 및 genomic DNA cloning 후 promoter 서열 확인

Rat lambda zap cDNA library의 screening을 통하여 rat mtTFA full length cDNA를 cloning하고 염기서열을 확인하였다. Rat mtTFA promoter 부위를 cloning 하여 사람 및 mouse의 그것과 비교하였다.

#### 라. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포의 획득

SK Hep-1 세포를 50 ng/ml ethidium bromide, 100 µg/ml bromouridine 그리고, 5 % FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 3-4주간 계속 배양하여 EtBr 처리후, 5 % FBS, 100 µg/ml bromodeoxyuridine 그리고, 50 µg/ml uridine을 포함하는 DMEM으로 배양하여 세포를 유지한다. 이 세포를 낮은

농도로 plating하여 하나 하나의 클론을 분리하였다. 얻어진 mtDNA-deficient SK-Hep1 cell의 genomic DNA를 분리하고 PCR을 통해 미토콘드리아 DNA(mtDNA)가 존재하지 않는 지를 확인하였다..

#### 마. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포( $\rho^0$ cell)의 특징 분석

MtDNA-deficient cell( $\rho^0$  cell)은 mtDNA가 결핍되었을 때, glucose의 utilization에 관련된 대사에 발생하는 장애를 조사하기 위한 좋은 *in vitro* model로 사용할 수 있다. MtDNA는 oxidative phosphorylation에 관여하는 4개의 complex중 3개 complex의 일부 subunit들을 code한다. MtDNA의 결핍은 이들 subunit들의 expression을 저해할 것이므로 mitochondrial membrane potential이 결핍될 것이 예상된다. 이를 확인하기 위하여 mitochondria membrane potential 의존적으로 mitochondria를 염색하는 Mitotracker(molecular probe)를 사용하여  $\rho^0$  과  $\rho^+$  세포를 염색하였다. 또한 total RNA를 추출하여 quantitative reverse transcriptase PCR을 하여 mtTFA의 mRNA 발현정도를 평가하였다. 만들어진  $\rho^0$  cell에서 포도당의 이용도를 조사하기 위해 basal level에서 FDG를 uptake하는 양을 정량하였다.

간세포에서 포도당 섭취는 glucose transporter의 활성화에 의해 조절되는데, 5개의 isoform(Glut 1-5)이 알려져 있다. 이들 isoform들은 tissue의 종류, 병적상태 등에 따라 다른 isoform이 존재하고, 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Parent SK-Hep1( $\rho^+$ )와  $\rho^0$ 에 존재하는 glucose transporter의 발현 양상을 비교하여 mtDNA의 결핍에 가장 영향을 많이 받는 type이 어느 것인지 조사하였다. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포( $\rho^0$  cell)를  $H_2O_2$ 에 노출시킨 후 annexin V 염색으로 apoptosis 정도를 flow cytometry로 측정하고 Western blot으로 anti-apoptotic activity를 가진 Bcl-x 및 Bcl-2의 발현과 mtTFA의 발현을 관찰하였다.

## 2. 연구 방법 및 결과

### 가. 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA)의 발현 및 메틸화 정도 분석

#### (1) 연구 방법

(가) mtDNA transcription factor의 발현 평가

당뇨병 환자와 정상인의 말초혈액 림프구의 RNA를 추출하여 mRNA purification kit를 이용하여 mRNA를 추출한 후 1% formaldehyde gel에 전기영동후 nitrocellulose membrane에 transfer시키고 UV crosslinking 시킨후 human mtTFA probe를 P<sup>32</sup> dCTP로 label시킨후 hybridization을 시행한 후 -70도에서 autoradiography를 시행한다. mtTFA cDNA는 Dr.Clayton (Stanford University, USA)와 Dr. Kagawa (Jichi University, Japan)에 의해 각각 clone 된 human mtTFA cDNA인 pDD102와 pBluescriptSK(-)-mtTF1를 확보하였다. mtTFA protein 발현을 위한 expression vector는 얻은 cDNA를 사용하여 제작하였다. Fig. 18은 cloning strategy를 보여준다.

(나) DNA methylation status 분석

mtTFA의 methylation이 실제 당뇨병 환자에서 발견되는지 조사하고 이 mtTFA의 DNA methylation에 의한 gene imprinting이 mtTFA의 발현에 영향을 주는 지의 여부를 다음의 strategy를 사용하여 조사한다.

① methyl accepting assay

당뇨병 환자의 혈액과 정상인의 혈액을 채취하여 Qiagen blood kit를 사용하여 genomic DNA를 분리하여 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 그리고 1 mM dithiothreitol이 있는 완충용액에 DNA (200 ng)와 M.Sss I CpG methylase 4 units, 그리고 1.5 μM의 S-adenosyl-L-[methyl-3H]methionine (80-85 Ci/mmol)과 1.5 μM의 방사성 표지가 안된 S-adenosylmethionine를 넣고 37°C에서 4시간동안 반응시킨다(총 20 μl). 이 반응은 2.5mM의 비방사성 S-adenosylmethionine을 5 μl 첨가하여 정지시킨다. 반응액을 Whatman filter paper에 점적하고 15분간 공기중에서 말린 후, 5% (wt/vol) trichloroacetic acid 6 ml과 70% (vol/vol) ethanol 6 ml로 wash후, 10 ml의 Econofluor (NEN)가 있는 vial에 넣고 liquid scintillation counter로 방사능을 측정한다. Background control로 DNA가 없는 반응액과 효소가 들어가지 않은 반응액을 위와 같이 한다.

② Gel shift assay

methylated DNA probe와 unmethylated DNA probe로 nuclear extract를 처리하여 DNA-Binding assay를 시행한다. Nuclear transcription factor-1 (NRF-1) 결합 부위인 h-mtTFA의 -76에서 -58까지의 염기서열과 NRF-2의 결합부위인 h-mtTFA의 -34에서 -13까지의 염기서열을 DNA synthesizer로 합성하고 M.Sss I CpG methylase와 S-adenosylmethionine으로 DNA를 methylation시켜 methylated DNA probe만든다. 위의 DNA를 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP와 bacteriophage T4 polynucleotide kinase로 end-labelling시킨다. Hela cell로부터 nuclear extract를 준비한 후, 10,000 cpm DNA probe와 2 $\mu$ g poly(dI-dC), 300 $\mu$ g/ml BSA 그리고, 15 $\mu$ g protein의 Hela cell extract를 넣고 30 $^{\circ}$ C에서 15분간 결합반응을 시킨다. 이 반응용액을 20% polyacrylamide gel에 loading하고 전기영동한 후, autoradiography를 수행한다.

### ③ Bisulfite genomic sequencing

Genomic DNA를 target sequence를 자르지 않는 제한효소로 잘라 linear form으로 만들고 DNA(20-200  $\mu$ l 부피에 200 pg-50  $\mu$ g 정도)를 NaOH로 0.3 M되게하여 가해준 후, 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 denature시킨다. Sodium bisulfite와 hydroquinone을 각각 3.1 M, 0.5 mM 되게 위 용액에 가하고(총 부피는 240-2400  $\mu$ l정도) 가볍게 섞어 준 후, mineral oil을 가하여 상층을 덮어주고 55 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 반응시킨다. 이 반응액 아래층에서 DNA를 회수하고, Promega Magic DNA Clean-Up System을 사용하여 물 50  $\mu$ l로 용출하면서 남아있는 free bisulfite를 제거함. 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0 buffer(DNA buffer)를 가하여 총부피 50-200  $\mu$ l 되게 한다. 위 용액에 NaOH를 0.3 M되게 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킴. 이 용액에 NH<sub>4</sub>OAc, pH 7을 3M되게 가하여 중화시킨 후, ethanol precipitation하고 DNA buffer 100  $\mu$ l로 녹여 -20 $^{\circ}$ C에 저장한다..

Bisulfite로 처리한 DNA 1-5  $\mu$ l와 200  $\mu$ M dNTPs, 1  $\mu$ M primers, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 0.5  $\mu$ l (2.5 units) AmpliTaq DNA polymerase(Cetus)를 넣고 GeneAmp PCR 9600(Perkin-Elmer)로 PCR을 하고 Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit를 사용하여 염기서열을 결정한다.

당뇨병 환자에 있어서 mtTFA의 methylation 여부를 Southern blot analysis 또는 methyl specific sequencing method (bisulfite genomic sequencing) 등을 이용하여

규명한다. Southern Blot analysis를 위해서 환자 및 정상인의 혈액에서 분리한 genomic DNA를 MspI 또는 HpaII 로 절단하고 전기영동한 후 mtTFA의 promoter region의 891bp 크기의 probe (Fig. 19)를 사용하여 분석하였다.

(다) 정상인과 당뇨병환자에서 mtTFA promoter region의 methylation mapping

정상인과 인슐린비의존성 당뇨병환자의 혈액에서 각각 genomic DNA를 뽑아 sodium bisulfite로 DNA를 modify하고 modify된 mtTFA의 promoter region에 맞는 PCR primer를 사용하여 PCR product를 얻어 nested PCR 방법으로 양을 증폭한 후, pGEM-T vector에 cloning하거나 혹은 직접 PCR fragment를 ABI 7700 automatic sequencer를 이용하여 sequencing하였다. Bisulfite modified mtTFA의 PCR primer는 아래와 같다.

For 1st PCR

a4 : 5'-GTGGTTTTAAGATTATTGATATTAGAATTT-3' (1681-1710)

a5 : 5'-AACTCTACTCCAAACCTTCCCAAAACAATC-3' (2431-2451)

For 2nd PCR (semi-nested PCR)

a2 : 5'-GAGTTTTAGTTTTGGTTTAATTGAGA-3'(1852-1878)

a5 : 5'-AACTCTACTCCAAACCTTCCCAAAACAATC-3' (2431-2450)

(라) mtTFA의 promoter부위의 메틸화에 의한 mtTFA 유전자 발현 억제 규명

mtTFA의 promoter 중 nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) 결합부위(binding site) (NRF1-BE) 와 NRF-2 결합부위 (NRF2-BE)가 있는데, 이들은 mtTFA 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(48, 49). NRF 결합부위의 sequence는 CpG island가 많이 존재하여 methylation에 의한 조절을 받을 것으로 예상된다. mtTFA promoter region의 sequence는 Fig. 20에 보여준다. NRF site의 methylation이 mtTFA의 발현에 영향을 주는지의 여부를 확인하기 위해 우선 NRF-1과 NRF-2를 포함하는 oligonucleotide를 합성하여 gel retardation assay를 시행하였다. NRF-1과 NRF-2의 oligonucleotide를 in vitro에서 methylation시킨 후, gel retardation assay를 시행하여 methylation 전과 후를 비교하여 nuclear factor의 binding activity에 변화가 있는지를 확인하였다.

(마) 한국인 mtTFA promoter region의 polymorphism 확인

당뇨병 환자와 정상인간에 mtTFA promoter sequence에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 genomic DNA를 추출하여 mtTFA promoter region을 PCR로 증폭하고 direct sequencing하였다. mtTFA promoter 증폭을 위해 사용된 PCR primer 들의 sequence는 다음과 같다.

TFA3 : 5'-CAGCCCTGGCTTGAAGTGGAG-3' (1858-1877)

TFA4 : 5'-GTCTGGAGCAGAGCTGTGCA-3' (2446-2465)

(바) Rat mtTFA cDNA 및 genomic DNA의 cloning

① Rat lambda zap cDNA library의 screening을 통한 rat mtTFA full length cDNA의 cloning

Rat testis lambda zap cDNA library (Stratagene)의  $\sim 3 \times 10^6$  plaque units를 *E coli* XL1-Blue에 transform한 후 (37 °C for 8 h) 각 phage plate를 nitrocellulose filters (Nitropure, MSI)에 transfer하여 screening 하였다. Filter는 hybridization buffer (6x SSC, 5x Denharts reagent, 0.4 % SDS 20 mM sodium phosphate, and 100 g/ml salmon sperm DNA)에서 2시간동안 68°C에서 prehybridize 하고 digoxigenin(Dig)-labeled probe를 사용하여 hybridize하였다. (for 18h at 68°C). Washing (2x SSC and 0.1% SDS for 10 min, twice, at room temperature and then twice for 30 min in 1x SSC and 0.1% SDS at 68 °C)한 후, hybridized probe 는 alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (Fab; Roche Molecular Biochemicals, 1:5000)와 CDP-star detection system(Ambion)을 사용하여 검출하였다. 검출된 positive clone으로부터 cDNA inserts 는 잘라서 using ExAssist helper phage, SOLR strain을 사용하여 다시 recirculize하였다. 이 cDNA 는 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer)를 사용하여 염기서열을 확인하였다.

② Rat lambda zap cDNA library의 screening에 사용된 probe의 생성

rat liver total RNA를 template로 하여 RT-PCR을 통해 332bp의 PCR product를 얻었다. 사용된 primer는 degenerated forward

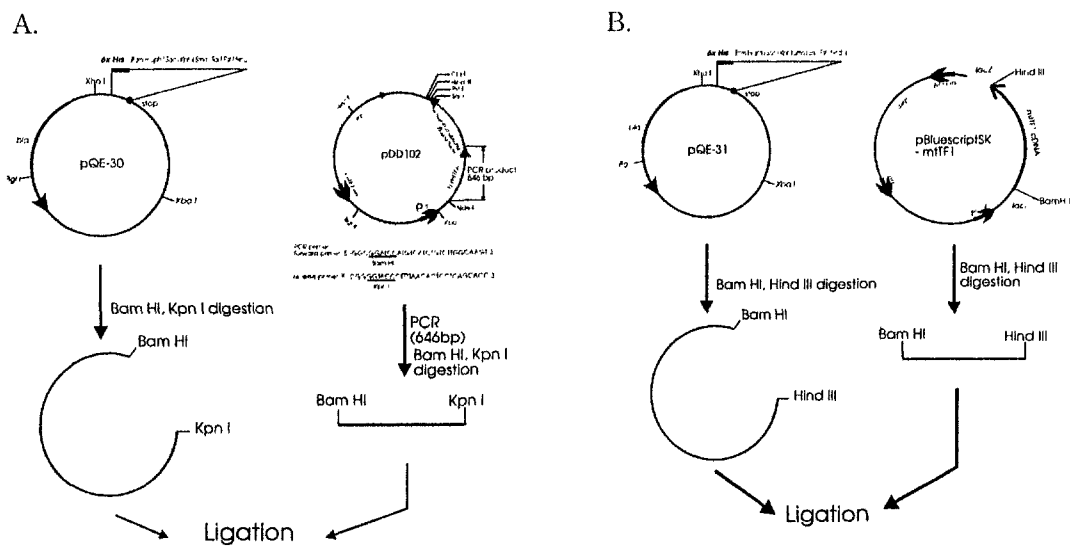
(5-CAAAGAAGCTGTGAGCAAGT-3) and reverse primers (5-GCTCTTCCCAA-GACTTCATT-3)이다. 이 probe는 random-primed Dig DNA labeling kit을 사용

하여 digoxigenin으로 label하였다. 반응 조건은 50 $\mu$ l 용액중에 0.1 mM dATP, dCTP, dGTP, 65 M dTTP, 35 M Dig-dUTP, 75 mM Tris (pH 7.6), 50 mM DTT, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100ng DNA 와 2 units of Klenow enzyme에서 37°C, 1 시간 동안 반응하고, unincorporated dNTPs는 spin column으로 제거하였다.

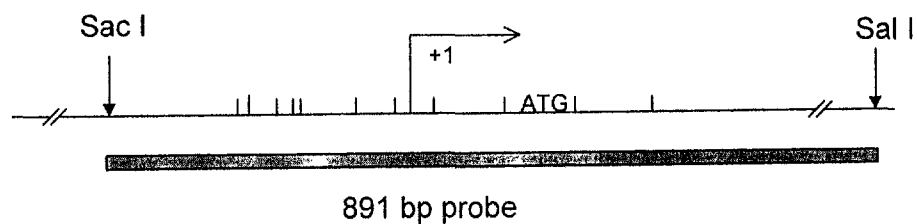
### ③ Rat mtTFA 의 upstream promoter region 동정

위에서 얻은 rat mtTFA cDNA와 Universal Genome Walker™ Kit (Clontech), a simple PCR-based method for walking genomic DNA를 사용하여 mtTFA의 upstream region을 cloning하였다. 우선 rat liver tissue (40mg)를 proteinase K로 처리하고 phenol로 추출하여 high-molecular weight genomic DNA를 얻었다. 2.5 g genomic DNA를 4가지 다른 restriction enzymes (80 units of Dra I, EcoR V, Pvu II and Stu I)로 digest하고 다시 추출하였다. 각 DNA는 GenomeWalker adaptor에 at 16°C overnight 처리하여 붙여 Genomic Walker libraries를 만들었다. library당 2가지 touchdown PCR amplifications을 실시하였는데, 처음 PCR은 outer adaptor primer (AP1, 5-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3)과 an outer, gene-specific primers (GP1, 5-ACA TTC CCC GGA ACA GCG CCA TCC CTC-3, 5-CCC TGG AGT ACC CAC GCG GGT TTC G- T-3, upstream region of rat mtTFA cDNA)를 사용하였다. 이 primary PCR mixture를 다시 template로 하여 두 번째 nested PCR을 nested adaptor primer (AP2, 5-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3) 와 a nested gene-specific primers (GP2, 5-GAC ACT GTG CCT ACA CAC AGC CAC GA-3, 5-TCG TGG CTG TGT GTA GGC ACA GTG TCG-3)를 사용하여 실시하였다. 최종 PCR 산물을 agarose gel electrophoresis로 확인하고 a TA-type cloning vector에 cloning한 후, Automatic DNA sequencer (Perkin Elmer)를 사용하여 sequencing하였다.

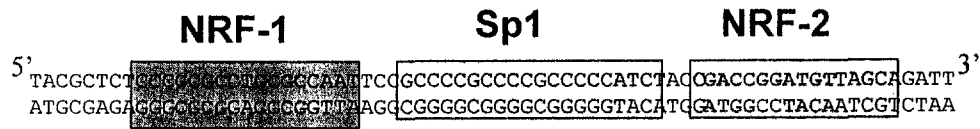




**Fig. 18. Cloning strategy of the mtTFA expression vectors.** Panel A, the mature human mtTFA (without signal peptide) cDNA was subcloned into pQE vector after PCR reaction using pDD102 as a template. Panel B, the precursor human mtTFA (with signal peptide) cDNA was subcloned into pQE vector.



**Fig. 19. The probe for southern blot analysis.** The SalI-SacI fragment (891 bp) was prepared from the cDNA obtained from Dr. Kagawa. Transcriptional start site and translational start were shown as +1 and ATG, respectively. The small lines denote for CCGG sequences which are present in the promoter region.



**Fig. 20.** The promoter region of mtTFA. Sp1, the general transcription factor, binding sites are present between two nuclear respiration factor binding sites. Both NRF-1 and NRF-2 shows CpG-rich sequences which are the sites for methylation.

## (2) 연구 결과

### (가) mtDNA transcription factor의 발현 평가

mtTFA의 mRNA expression을 측정하기 위하여 human mtTFA의 cDNA을 Dr. Clayton(Stanford University, USA), Dr. Kagawa (Jichi University, Japan)으로부터 얻었다. Dr. Clayton으로부터 얻은 clone은 coding 부분만을 포함하고 있으며, Dr. Kagawa로부터 얻은 clone은 5'-flanking region을 포함하고 있다. 두 cDNA가 ATG로부터 약 100bp까지는 동일한 sequence를 가지나, 그후 C-terminus의 sequence는 서로 달리 보고되어 확인이 필요하다.

mtTFA의 활성변화를 환자의 시료에서부터 측정하기 위해서는 항체의 사용이 필수적이다. mtTFA의 항체는 상업적으로 판매하고 있지 않으며, 현재 다른 연구자로부터 얻는 것도 용이하지 않아 항체를 제조하기로 하였다. 처음 mtTFA-GST fusion protein을 만들기 위해 시도하였으나, mtTFA가 bacteria의 성장에 toxic 하여 expression 되지 않았으며, 또한 mtTFA의 bioassay가 mtDNA의 promoter region을 이용한 gel retardation 방법 뿐으로 용이하지 않고 결합이 specific 하지 않아 실제 mtTFA protein이 발현되고 homogeneous하게 purify되었는지를 확인하기 어려웠다. 그래서 Histidine이 6개 결합되어 분리 및 확인이 쉬운 His-tag system (pQE vector, Qiagen)을 사용하였다. Dr. Clayton으로부터 얻은 cDNA에서 signal sequence를 제외한 mature protein부분만을 PCR하여 얻어진 fragment를 pGEM-T vector에 clone하고, BamHI과 KpnI으로 절단하여 pQE vector에 clone하였다. cloning을 위한 scheme은 Fig. 18A 에 나타내었다. pQE-m-mtTFA plasmid는 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer 310)을 사용하여 insert를 확인하였다. pQE-m-mtTFA를 E. coli cell에 transformation하여 OD<sub>600</sub>=0.6이 될 때까지 키우고 IPTG로 단백질 발현을 유도한 후, 6x His-tagged protein과 특이적으로 결합하는 affinity column인 Ni-NTA agarose system을 이용하여 분리 정제하였다. signal peptide를 함유한 mtTFA는 Fig. 18B의 scheme으로 cloning 하였다. Fig. 21는 IPTG 유도후 bacterial extract의 soluble fraction과 insolubel fraction을 각각 SDS-PAGE에서 분리하여 Coomassie blue로 staining 한 것으로 화살표로 표시된 것이 His-tagged-hmtTFA band이다. 동일한 gel을 nitrocellulose paper에 blot하여 anti-His antibody로 Western blot analysis를 한 결과 36.8kDa의 예상한 band가 동

정되어 mtTFA가 발현되었음을 확인하였다.

#### (나) mtTFA의 methylation status 규명

당뇨병 환자에 있어서 총 DNA의 methylation 상태의 변화를 볼 수 없어서, mtTFA의 promoter의 methylation이 변화되는지를 확인하기 위해 Southern blot analysis를 시행하였다. 그 결과 HpaII (methylation-sensitive enzyme, CCGG의 가운데 C가 methylation이 되면 절단하지 못함)를 사용하였을 때와 MspI (methylation에 상관없이 CCGG site를 절단함)을 사용하였을 때 모두 4개의 band (1.6, 1.5, 1.2, 1.0 kb)가 확인되었으며 두 효소를 사용했을 때의 band pattern간의 차이는 발견하지 못했다. 그러나 Type II 당뇨병환자 (DM)의 경우 band의 intensity가 정상 대조군 (C)에 비해 약 50% 감소되어 있었다(Fig. 22). 이 결과는 당뇨병환자의 경우 mtTFA의 promoter region이 정상인에 비해 methylation 정도가 증가되어 있을 가능성을 보여주나, pattern의 변화는 관찰되지 않았으므로, 확인 작업을 위해 bisulfite modification sequencing 시도하였다.

#### (다) 정상인과 당뇨병 환자에서 mtTFA promoter region의 methylation mapping

정상인군과 당뇨병 환자군 모두의 CpG island에서 methylation된 C (<sup>m</sup>C)를 발견할 수 없었다(Fig. 23). 따라서 두 실험군의 혈액 mtTFA promoter는 methylation이 되지 않는 것으로 잠정적 결론을 얻었다.

#### (라) mtTFA의 promoter부위의 메틸화에 의한 mtTFA 유전자 발현 억제 규명

NRFBE가 methylation이 될 경우 NRF의 binding activity의 변화가 있는지를 규명하기 위해 NRF oligonucleotide를 사용하여 gel retardation assay를 시행하였다. 사용한 oligonucleotide는 mtTFA promoter의 -49nt에서 -78nt에 존재하는 NRF-1 binding site와 -10nt에서 -35nt에 존재하는 NRF-2 binding site로, 합성된 sequence는 Fig. 24에서 나타냈다. assay 결과 NRF-1과 NRF-2 probe는 각각 specific한 band를 나타냈으며, 이 band 들은 unlabeled probe로 competition했을 때 100% 소실되어 specific binding임을 보여 주었다. 흥미롭게도 NRF-1은 methylated 되었을 때 NRF-1 band가 나타나지 않아 methylation 에 의해 NRF-1의 결합이 소실됨을 보여주었다. 반면에 NRF-2는 methylation 되었을 때

binding하였다. 이 결과로부터 NRF-1은 binding site가 methylation 되면 결합하지 못하고, NRF-2는 methylation에 상관없이 결합한다고 결론지었다.

(마) 한국인 mtTFA promoter region의 polymorphism 확인

당뇨환자와 정상인간에 mtTFA promoter sequence에 차이가 있는지를 조사하였다. Direct sequencing한 결과, 일본의 Kagawa(Jichi Univ.)가 발표한 mtTFA의 promoter sequence와 비교할 때 32명중 20명이 -97부위의 G가 A로 치환되어 있었고, 32명중 27명이 -177부위의 A가 C로 치환되어 있었으며, 32명중 31명이 -292부위의 T가 C로 치환되어 있었음을 확인하였다(Table 4). 그러나 이러한 base change는 당뇨환자는 물론 정상인에서도 똑같이 발견되므로 당뇨병의 발병과는 무관하며 한국인과 일본인의 종족차이로 생각된다.

(바) Rat mtTFA cDNA의 cloning

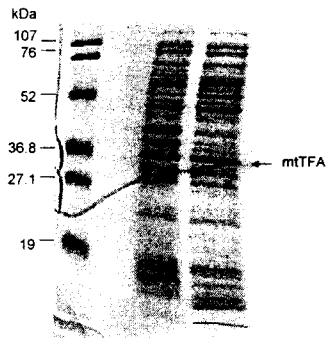
Rat testis lambda zap cDNA library 의 screening 결과 1451-bp full-length rat mtTFA cDNA를 얻었다. 이것은 nucleotide position 101에 ATG로 시작하는 244개 아미노산으로 구성된 open reading frame을 가지고 있었다(Fig. 25). Human sequence와 비교하여 볼때 N-terminus에 signal peptide를 가지고 있었으며 mature part는 25 kDa protein 이었다. human cDNA와 sequence를 비교하면, nucleotide 244에서 797은 약 74 % identity가 있었으며, 다른 region은 sequence homology를 찾을 수 없었다. 그러나, mouse cDNA sequence와 비교하면 약 90 % sequence identity 가 있었다. 아미노산 서열을 비교하였을 때, rat mtTFA가 human mtTFA에 대해서는 70 %, mouse mtTFA에 대해서는 90 % sequence homology를 보였다(Fig. 26). Rat mtTFA도 human mtTFA와 같이 DNA binding domain인 high-mobility group (HMG) boxes를 2개 가지고 있었으며 몇 개의 phosphorylation site consensus sequence를 가지고 있었다.

(사) Rat mtTFA 의 upstream promoter region

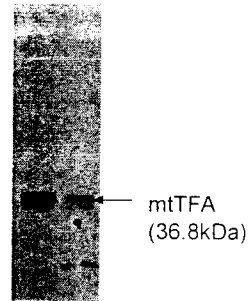
Chromosome Walking 방법을 사용하여 clone한 mtTFA의 gene을 Figure 3에서 보여주는데, 이것은 rat mtTFA gene의 5' upstream regions과 첫 번째 exon, 그리고 첫 번째 intron의 일부를 포함한다. 이 부위는 human mtTFA upstream region

과 sequence homology를 보이지 않는다. +1으로 표시한 transcription start site은 Genbank database (AB014089)에 보이는 rat brain cDNA sequence와 본 실험실에서 clone한 rat testis cDNA로부터 추론한 것이다. 5' flanking noncoding sequence와 coding region의 일부는 rat과 mouse mtTFA cDNA 결과와 정확히 일치한다. Rat mtTFA의 5' upstream region도 human 경우처럼 potential mCpG loci가 많이 존재하였다(underlined in Fig. 27). 전형적인 TATA box와 NRF-1 binding site는 관찰되지 않았다. 그러나 3개의 potential Sp1 binding site과 1개의 NRF-2 site은 존재하였다(Fig. 27). 이 결과는 GenBank에 (#AF264733)로 등록하였다.

A.

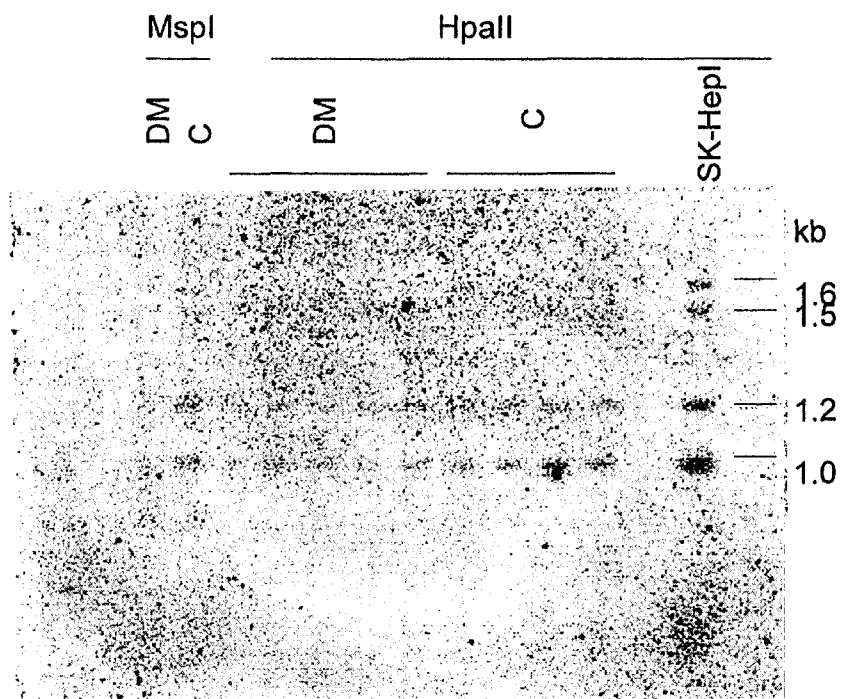


B.

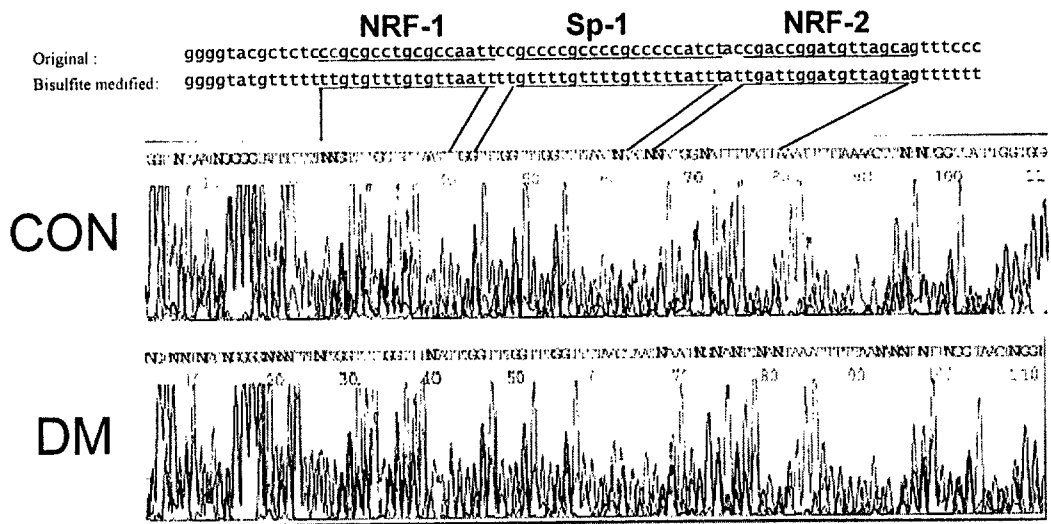


**Fig. 21. Expression of His-tagged mtTFA in *E. coli*.** Panel A. SDS-PAGE of human mtTFA with signal peptide after Coomassie blue staining. lane 1, low range protein marker; lane 2: soluble fraction of bacterial extract after IPTG induction; lane 3, insoluble fraction of bacterial extract after IPTG induction. Panel B. Western blot analysis of His-tagged mtTFA using ECL detection. Bacterial extracts were separated on 12.5% SDS-PAGE and the gel was blotted onto nitrocellulose. The paper was incubated with anti-4x His monoclonal mouse IgG antibody (2000:1 dilution), anti-mouse goat IgG antibody conjugated with HRP. (5000:1), and then developed using ECL kit (Amersham Co.).

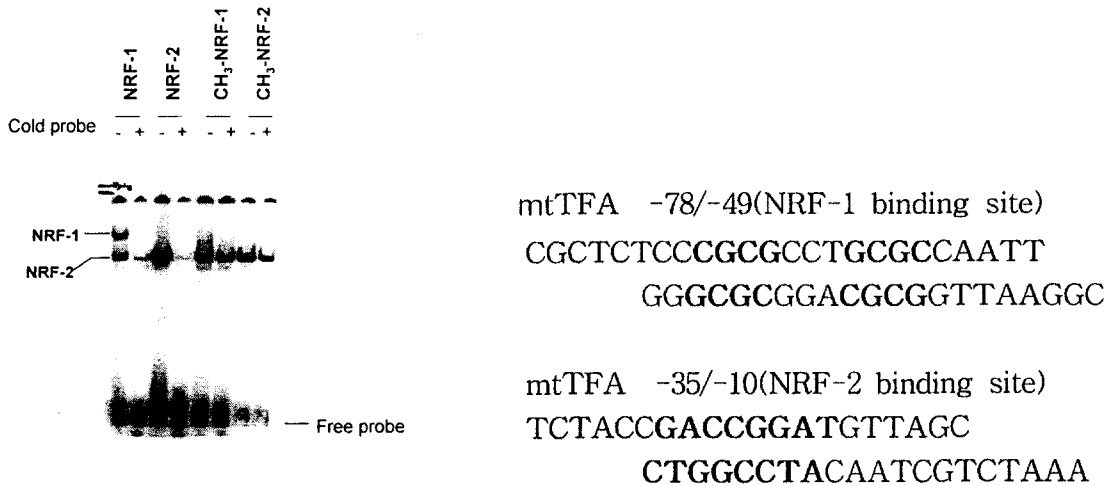




**Fig. 22. Southern blot analysis of mtTFA.** Genomic DNA was isolated from blood of DM patients (DM) or normal control(C). The DNA was digested with either MspI or HpaII and isolated on 1% agarose gel. the gel was blotted onto nylon paper and the paper was hybridized with the probe.



**Fig. 23. mtTFA promoter sequences in control and diabetic patients**



**Fig. 24. Gel retardation assay of NRF-1 and NRF-2 oligonucleotides (right) using SK-Hep1 nuclei extract.** The oligonucleotides were end labeled with T4 polynucleotide kinase in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. The labeled oligonucleotides were annealed to double strands, and incubated with SK-Hep1 nuclei extract (-). For methylated probes (CH<sub>3</sub>-NRFs), the double strand oligonucleotides were methylated with SssI methylase in the presence of S-adenosyl methionine and then incubated with the nuclear extract. Unlabeled probes (300x excess for unmethylated probes, 70x excess for methylated probes) were utilized to confirm the specificity of binding (+). The reaction mixture was analyzed onto 6% acrylamide gel electrophoresis and autoradiography (left).

Table 4. Polymorphisms of mtTFA promoter region in Koreans.

*Polymorphism of mtTFA 5' flanking region*

site	substitution	frequency
-97	G → A	30/32 <sup>a)</sup>
-177	A → C	27/32 <sup>b)</sup>
-292	T → C	31/32 <sup>c)</sup>

a) 2 persons were G/A heterozygote  
 b) 2 persons were A/C heterozygote  
 c) 1 person was T/C heterozygote

gttaaattct ggggaactcg ctaaaatgaa gattaatggg cccacatag  
 acacacggaa ttaagctctg cggtaaggcc ttggaatctg ctttttagg  
 tttgcgaatc cccgcctctc ccgttactat ttctgaactc cgagctccag  
 ccctggcttg aactgagacg ctccgctggg cgcgcagcag ccgcogacg  
 gacctggggg tcctggatgc aggactgtct gttacgtaca gcccttgtga  
 ccgtccacggg cggataccgg ccaacgccgg gttggggtga ggccgccgcc  
 ggggtcctc cctcaccctc ctggccggc agaggaacc accgtccgg  
 gcgccgggg acagaggtgg ctcaacagc ccgcctcga gccagagccc  
 tccgcaggct agaggattgc ggtttccctt cctctccgg gctctattc  
 ctccccgg aggcggcca ccgggtacg ctctcccg NRF-1 cctgagccaa  
 ttccca <sup>a</sup> Sp1 <sup>b</sup> NRF-2 cctgac cggatgttag cagattccc  
 atagtctc gctagtggg gccatgata cacacgccg aggttcgac  
 gcggttcca gttgtattg ctggattgt gtattccag gaggctctc  
 gagattggg tcgggtcact gcctcatcca ccggagc cgcggttctc

```

1 CGCCCTGGA GTACCCACGC GGGTTTCGTG GCTGTGTGTA GGCACAGTGT CGCGTGGGAC
61 GAACCCGACG GCGCCGGGCC TATAGTCGTC GCGCCGAGGG ATGGCGTGT TCCGGGGAAT
M A L F R G M
121 GTGGGGCGTG CTAAGAACAC TGGGGCGCAC GGGGTCGAG ATGTGCGCGG GCTGCGGGG
W G V L R T L G R T G V E M C A G C G G
181 CCGCATACCC TCGCCTGTCA GCCTTATCTG TATTCCGAAG TGTTTTTCCA GCTTGGGTAA
R I P S P V S L I C I P K C F S S L G N
241 TTATCAAAG AACCTATGA GTTCATACCT TCGATTTTCT ACAGAACAGC TACCCAAATF
Y P K K P M S S Y L R F S T E Q L P K F
301 TAAAGCTAAA CACCCAGATG CAAAAGTTTC AGAACTGATT AGAAAAATTG CAGCCATGTG
K A K H P D A K V S E L I R K I A A M W
361 GAGGGAGCTT CCGGAAGCAG AAAAAAAGGT GTATGAAGCG GATTTTAAAG CTGAGTGGAA
R E L P E A E K K V Y E A D F K A E W K
421 GGTGTACAAA GAAGCTGTGA GCAAGTATAA AGAGCAGCTA ACTCCAAGTC AGCTGATGGG
V Y K E A V S K Y K E Q L T P S Q L M G
481 CTTAGAGAAG GAAGCCCGGC AGAAACGCCT AAAGAAGAAA GCACAAGTCA AGAGGAGAGA
L E K E A R Q K R L K K K A Q V K R R E
541 ATTAATTTTG CTTGAAAAC CAAAAGACC TCGGTCAGCA TATAACATTT ACSTATCTGA
L I L L G K P K R P R S A Y N I Y V S E
601 AAGCTTCCAG GAGGCTAAGG ATGAGTCAGC TCAGGGGAAA TTGAAGCTTG TAAATCAGGC
S F Q E A K D E S A Q G K L K L V N Q A
661 TTGGAATAAT TGTCCTCATG ATGAAAAGCA GGCATATATT CAGCTTGCTA AAGATGATG
W K N L S H D E K Q A Y I Q L A K D D R
721 AATTCGTAT GACAATGAAA TGAAGTCTTG GGAAGAGCAC ATGGCTGAAG TTGGGCGAAG
I R Y D N E M K S W E E H M A E V G R S
781 TGATCTCATC CGTCGCAGTG TGAAGCGACC CCCGGGAGAC ATCTCTGAGA ATTAAGATTG
D L I R R S V K R P P G D I S E N *
841 AAGACAGAGT TGTCATTGGG ATTGGGCACA AGAAGCTGGT TAAGTCTCAA AGCCTTAAGT
901 TGTCAAACTT GAAAGGATAA AGGGGTTAAC CTTTGACACT CAGTTCATTT TTCTGTAGCC
961 CATGGACTTC TGCCCACTGA ATGCATTCTT GTTGACCTTT TGAGCCTTGA CGTAAATCA
1021 TGACGAGTTC TGCCGTTTGC TTAAGAACTG GAATCAAGAC TGTGCGTGCA TCTGCATGCA
1081 GTGGTGAATT GTTCTGCATT TGATGGTGTA GACAGACTGA AGTGACTTTC AACTGTGTGA
1141 CAGTTTCGTG CCGGTTTGTG AAGTCTTAC ACTGATGGCC ATTACATGTG GGTGCCCCCT
1201 TGTCCCAGGC CCAGAGCTGC TCACAGCTGT GGCAGAGCCA TTGCAGTTTC TAAGAACCTT
1261 CCGGGCTTTA CTAGATGACG TGGTTTCTAG ACATAATCAT GTGTAGAGTT GATGTTTGTA
1321 CACAATAAGT GATCATCGAT GTCCTAACAG CATTTTATAG TAGGAGAGAT TTACAAGTCT
1381 TTCTCAAATT AAGAAATTAT GTACCAGGTC TATGCATATG TTTTATATGC ATAGAATAAA
1441 AACTCTAATT TG

```

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of rat mtTFA cDNA. Nucleotide sequences are numbered in the 5 to 3 direction. The predicted amino acid sequences are indicated as one-letter code, beginning with the first Met residue and ending with Asn. The sequences corresponded to signal peptide are underlined. The TAA stop codon is marked by an *asterisk*

Fig. 25. Rat mtTFA cDNA sequence.

		*
Rat	MALFRGMWGVLRLTLGRTGVEMCAGCGGRIPSPVSLICIPKCFSS - LGNY	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PKKPMSSYLRF</span>
Human	MAFLRSMWGVLRSALGRSGAELCTGCGSRLRSPFSFVYLPRWFSSVLASC	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PKKPVSSYLRF</span>
Mouse	MALFRGMWSVLKALGRTGVEMCAGCGGRIPSSISLVCIPKCFSS - MGSY	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PKKPMSSYLRF</span>
Rat	STEQLPKFKAKHPDAKVSELIRKIAAMWRELPEAEKKVYEADFKAEWKVVYKEAVSKYKEQ	
Human	SKEQLPIFKAQNDAKTTELIRRIAQRWRELPSKKKIYQDAYRAEWQVYKEEISRFKEQ	
Mouse	STEQLPKFKAKHPDAKSELVRKIAALWRELPEAEKKVYEADFKAEWKAYKEAVSKYKEQ	
		*
Rat	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LTI</span> PSQLMGLEKEARQKRLKKAQVKRRELILL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GKPKRPRSA</span> NYVSESFQEAKDES <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AQQ</span>	
Human	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LTI</span> PSQIMSLIKEIMDKHLKRRKAMTKKKELTLL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GKPKRPRSA</span> YNVVAERFQEA <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">KGS</span> PQE	
Mouse	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LTI</span> PSQLMGMEKEARQRLKKAQVVKRRELILL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GKPKRPRSA</span> YNIYVSESFQEA <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">KDD</span> S <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AQQ</span>	
	*	*
Rat	KLKLVNQAWKNSHDEKQAYIQAKDDRIRYDNEMKSWEEHMAE	VGRSDLIRRSVKRPPG
Human	KLKTVKENWKNLSDSEKELYIQHAKEDETRYHNEMKSWEEQMI	VGRKDLLRRTIKKQRK
Mouse	KLKLVNEAWKNLSPEEKQAYIQAKDDRIRYDNEMKSWEEQMAE	VGRSDLIRRSVKRS-G
Rat	DISEN	
Human	YGAEEC	
Mouse	DISEH	

Figure 2. Alignment of rat mtTFA amino acid sequences with human and mouse mtTFA. Shaded regions indicated residues that are similar in three of the sequences. HMG boxes are represented by open boxes. Asterisks denote positions with possible phosphorylation sites.

**Fig. 26. Alignment of rat mtTFA amino acid sequences with human and mouse mtTFA**

```

-461 AAAGATTAGA TAAACAAAGC GATACATTC ATGACCCTC CTCTCTATCT CTTCACCCC
-401 TCAGTTGCC CGTGTGTTTT CCTTCGGACT CAGATGAAAC AGGCAGTTTG CTGCTGGGTC
-341 ATCAGCAGTA CCACTGATCG CTGATTCAA GAGCCACGCA CTGTGACACG AGCCGCAGAA

-281 CCGGCGTCAC GAAAGCTGAG CTGGCAGAGG AGGACCTGGC CCAGCAACAG CCTGCAGGCC
-221 TTCCAGCAGA ATACTCAGAG GGGCCTGGG CTATGGCGCG GCTCAGCAAC ACCCTTGCCA

                                     SP1
-161 AACTAAACCG GCTCTGCCTA GCGCAGGCT CCGCCCCCAG TCACCCCCGC CCACTGAACG

          SP1          SP1          NRF-2
-101 GTGGGGACA CACTCCGCTT CCGGTTGCC CCGCCTCTG CTGCAGACCG GAAGTCTGGG
                                     +1
- 41 CCTCCCACAG TGCCCCCGCG CCGCGCGGG CATGATAACA AGCCCCCTGA GTACCCACGC
+ 20 GGGTTTCGTG GCTGTGTGTA GGCACAGTGT CCGTGGGAC GAACCGGACG GCGCCGGGCC

          Exon 1
+ 80 TATAGTCGTC GGCCCGAGG ATGGCGCTGT TCCGGGAAT GTGGGGCGTG CTAAGAACAC
+140 TGGGCGCAC GGGGTGAG ATGTGCGCG GCTGCGGGG CCGCATAACC TCGCCTGTCA

          Intron 1
+200 GGTATGCCG GGGCAAGGA CGTCGTCGT CCATCATCCG TTTCTCGTT CCACCCGAAT
+260 TCTCCGGCC GCCTGGGTC TCGCGCCTT GGTACCTGA CCCACTTCT GTCCCCTTCT
+340 ACCTTCGGT GCCTAAGGC TCCTCCTCC TTCTGCCCTG AAGCGGGGC CTGCAATTTG
+400 TTGGCCCGA AAGTCCCC CTACTTTCC CTGGCTACC -----
-----

          Exon 2
---- ACGTATCTGA CATTCCGTTT CTTTAACTT GTGTGTAGCC TTATCTGTAT TTCGAAGTG
      TTTTCCAGC TTGGTAATT ATCCAAGAA ACCTATGAGT TCATACCTTC GATTTTGTAC
      AGAACAGCTA CCAAATTT

```

Figure 3. Nucleotide sequence of the upstream region of rat mitochondrial transcription factor A. These sequence corresponds to the 5-flanking region, the first exon, a part of the first intron and a part of the second exon. The coding regions in the first and second exons are shown by shadowed boxes. The transcription start site was numbered as + 1. Consensus sequences for potential Sp1 and NRF-2 binding sites are shown by open boxes. Many potential mCpG loci are underlined.

Fig. 27. Nucleotide sequence of the upstream region of rat mtTFA

## 나. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포의 특징 분석

### (1) 연구 방법

#### (가) 미토콘드리아 DNA가 없는 세포주( $\rho^0$ ) 확립

Attardy 등은 저농도의 ethidium bromide로 세포를 처리함으로써, 세포내 mtDNA를 결핍시킨 세포를 제작한 바 있다. mtDNA-deficient cell은 mtDNA가 결핍되었을 때, glucose의 utilization에 관련된 대사에 발생하는 장애를 조사하기 위한 좋은 *in vitro* model로 사용할 수 있다. 간세포는 포도당 대사의 주작용 기관이므로 SK-Hep1(human hepatoma cell)을 사용하였다. SK-Hep1 세포를 100ng/ml ethidium bromide(EtBr), 100 $\mu$ g/ml bromouridine 그리고, 10% FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 6-8주간 계속 배양하여 EtBr에 resistant 하고, uridine의 존재시에만 생존할 수 있는 세포를 얻었다. 이 조건은 Attardy 등이 mtDNA-deficient cell을 확립할 때 가장 중요시되는 조건으로 제시한 것이다. 얻어진 mtDNA-deficient SK-Hep1 cell의 genomic DNA를 분리하고 PCR을 통해 미토콘드리아 DNA(mtDNA)가 존재하지 않는 지를 확인하였다. 그 결과 정상 SK-Hep1 cell의 경우 mtDNA와 nuclear DNA control인 GAPDH 및  $\beta$ -actin의 PCR product가 얻어진 반면, mtDNA-deficient SK-Hep1 cell은 GAPDH 및  $\beta$ -actin의 PCR product는 정상적으로 만들어지나 mtDNA의 product는 만들어지지 않아 mtDNA가 확실히 결핍되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 28).

(나) 미토콘드리아 DNA가 없는 세포주( $\rho^0$ )의 mitochondria membrane potential, mtTFA mRNA 발현 정도, 포도당 섭취량, GLUT 발현 정도 평가

(다) 산화스트레스에 대한  $\rho^0$  cell의 반응성 비교

#### ① Annexin V-FITC staining에 의한 apoptosis 측정

6-well plate에서  $2 \times 10^5$ /well로 배양된 간세포 SK-Hep1은  $H_2O_2$  (250  $\mu$ M)로 각각 2, 4, 12시간씩 처리한 후, Annexin-V-FITC 방법에 따라 염색하였다. 간단히 설명하면, trypsin으로 떼어낸 세포들을 phosphate buffered saline (PBS) 으로 씻은 후, 195 $\mu$ l의 binding buffer (10mM HEPES-KOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM  $MgCl_2$ , 1.8 mM  $CaCl_2$ , and 1 mg/ml Annexin-V-FITC)와 섞어 주었다.



10분간 실온의 암실에서 incubation 후 상등액을 제거하고 다시 binding buffer로 현탁한 후, 10 $\mu$ l 의 propidium iodide를 첨가하여 혼합하였다. Sample은 flow cytometry로 측정하였다.

② H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 NO와 같은 stress를 이용하여 apoptosis, Bcl expression 등을 조사

배양된 세포를 extraction buffer (10 mM PBS buffer, pH 7.4 containing 1 $\mu$ g/ml peptsatin A, 10  $\mu$ g/ml leupeptin)로 단백질을 추출하고 원심분리하였다. 얻은 Lysate을 5분간 끓인 후, 30 $\mu$ g 단백질을 7.5% SDS polyacrylamide gel에 loading 하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membranes로 transfer 하였고 1차 항체 (anti-bcl2 and anti-bclx, Santa Cruz) 와 HRP-conjugated anti-rabbit 2차 항체로 immunoblot 하였으며 enhanced chemiluminescent detection method로 x-ray film에 exposure시키고, band density를 정량하였다.

## (2) 연구 결과

(가)  $\rho^{\circ}$  cell에서 mitochondria membrane potential의 결핍

mtDNA는 oxidative phosphorylation에 관여하는 4개의 complex중 3개 complex의 일부 subunit들을 code한다. mtDNA의 결핍은 이들 subunit들의 expression을 저해할 것이므로 mitochondrial membrane potential이 결핍될 것이 예상되었다. 이를 확인하기 위하여 mitochondrial membrane potential 의존적으로 mitochondria를 염색하는 Mitotracker (molecular probe)를 사용하여  $\rho^{\circ}$  과  $\rho^{+}$  세포를 염색하였다. 그림 29에서 보여지듯이  $\rho^{\circ}$  의 경우  $\rho^{+}$ 에서 관찰되는 뚜렷한 mitochondria 선이 보이지 않고 spot으로만 관찰되었다. 반면에 mitochondrial membrane에 specific한 lipid인 cardiolipin에 선택적으로 염색되는 Acridin Orange로는  $\rho^{\circ}$  와  $\rho^{+}$ 모두가 균일하게 염색되었다. 이 결과는 mtDNA의 결핍이 mitochondria의 structure에는 큰 영향을 주지 않지만, 기능은 손상시킴을 보여준다.

(나)  $\rho^{\circ}$  cell에서 mtTFA의 발현

SK-Hep1 cell을 ethidium bromide를 처리하여 만든 mtDNA-less cell과 대조군으로서 ethidium bromide를 처리하지 않은 SK-Hep1 cell에서 각각 total RNA를 추출

하여 quantitative reverse transcriptase PCR을 하여 mtTFA의 mRNA 발현정도를 평가한 결과 대조군에 비하여 mtDNA-less cell에서 약 20% 감소하였다(Fig. 30).

(다)  $\rho^{\circ}$  cell에서 basal glucose uptake의 감소

만들어진  $\rho^{\circ}$  cell에서 포도당의 이용도를 조사하기 위해 basal level에서 FDG를 uptake하는 양을 정량하였다. 그림 31에서 보여지듯이  $\rho^{\circ}$  cell이  $\rho^{+}$ 에 비해 basal glucose uptake가 약 30% 감소하였다( $p < 0.01$ ). 따라서 mtDNA의 감소로 인해 basal glucose의 uptake가 감소함을 확인하였다.

(라) Glucose transporter의 발현 변화

간세포에서 포도당 섭취는 glucose transporter의 활성화에 의해 조절되는데, 5개의 isoform(Glut1-5)이 알려져 있다. 이들 isoform들은 tissue의 종류, 병적상태 등에 따라 다른 isoform이 존재하고, 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. parent SK-Hep1( $\rho^{+}$ )와  $\rho^{\circ}$ 에 존재하는 glucose transporter의 발현 양상을 비교하여 mtDNA의 결핍에 가장 영향을 많이 받는 type이 어느 것인지 조사하였다. 결과를 확신하기 위해서는 조금 더 실험을 해야 하지만, 현재로는 SK-Hep1은 Glut2를 발현하지 않으며, Glut1과 Glut3 mRNA level이  $\rho^{\circ}$  cell에서 감소되어 있는 것으로 관찰되었다.

(마) Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )에 대한  $\rho^{\circ}$  cell의 반응성 비교

①  $H_2O_2$ -induced apoptosis

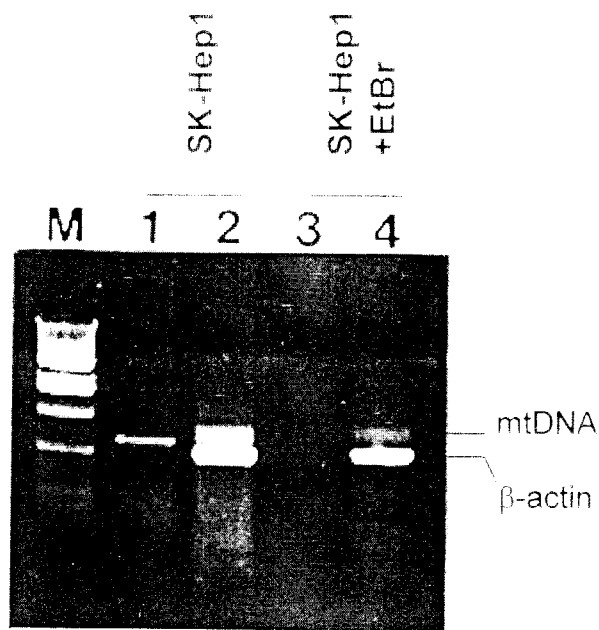
$\rho^{\circ}$  cell과 mother cell인 SK-Hep1을  $H_2O_2$ 로 처리하였을 때 유도된 apoptosis 정도에 차이가 있는지를 annexin V-propidium iodide double staining 방법으로 조사하였다. 그림 32에서 보여지는 것처럼, 정상 SK-Hep1 cell은  $H_2O_2$ 에 의해 처리한 시간이 길어짐에 따라 apoptosis가 일어나는 cell의 비율이 약 10%에서 25% (4h), 약 64% (12h)으로 증가하는데 비해, mtDNA가 결핍된  $\rho^{\circ}$  cell에서는 처리시간이 길어져도 apoptotic cell의 비율은 증가하지 않았다. 따라서 mtDNA의 결핍은  $H_2O_2$ 와 같은 oxidative stress에 세포가 저항성을 가지게 한다고 생각된다.

②  $H_2O_2$  자극에 대한 Bcl family protein의 발현 변화

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극에 의해 유도된 SK-Hep1의 apoptosis가 Bcl family protein에 의해 mediated 된 것인지를 여부를 확인하기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극후 Bcl-x와 Bcl-2의 발현을 Western blot으로 정량하였다. Bcl-x와 Bcl-2는 모두 anti-apoptotic activity를 가지는 것이 잘 알려져 있으나, 주어진 자극에 따라 작용하는 protein의 종류가 결정되어진다. SK-Hep1 cell에서는 그림 33와 34에서 보여지는 것처럼 Bcl-x와 Bcl-2의 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시간이 길어짐에 따라 감소된다. 따라서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 Bcl-x와 Bcl-2의 발현 감소로 인해 apoptosis가 유도됨을 알 수 있었다. 자세한 apoptosis 유도기전은 더 연구가 필요하다. 반면에 mtDNA가 결핍된 세포( $\rho^0$ )에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 apoptosis가 유도되지 않을 뿐 아니라, Bcl-x의 발현은 오히려 증가했으며(Fig. 33), Bcl-2는 Western으로 검출되지 않았다. 이는  $\rho^0$ 이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극에 resistant한 이유가 mtDNA 결핍에 따른 Bcl family protein의 발현 변화때문으로 추론할 수 있다.

### ③ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극에 대한 mtTFA protein의 발현 변화

mtDNA의 replication 및 transcription에 가장 중요한 factor로 알려진 mtTFA의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극에 따른 발현변화를 조사하였다. 정상 SK-Hep1 cell에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 시간이 길어짐에 따라 발현이 약 50%정도 감소하였다.  $\rho^0$  cell의 경우는 basal expression level이 정상 cell에 비해 약 20%정도였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 로 2시간 처리했을 때 부터 mtTFA protein은 검출되지 않았다(Fig. 35).



**Fig. 28. Identification of mtDNA PCR fragment on agarose gel electrophoresis.** The PCR products of mtDNA and  $\beta$ -actin are shown in control SK-Hep1 cells while only  $\beta$ -actin fragment is produced from EtBr-treated SK-Hep1 (mtDNA deficient rho 0 cells).

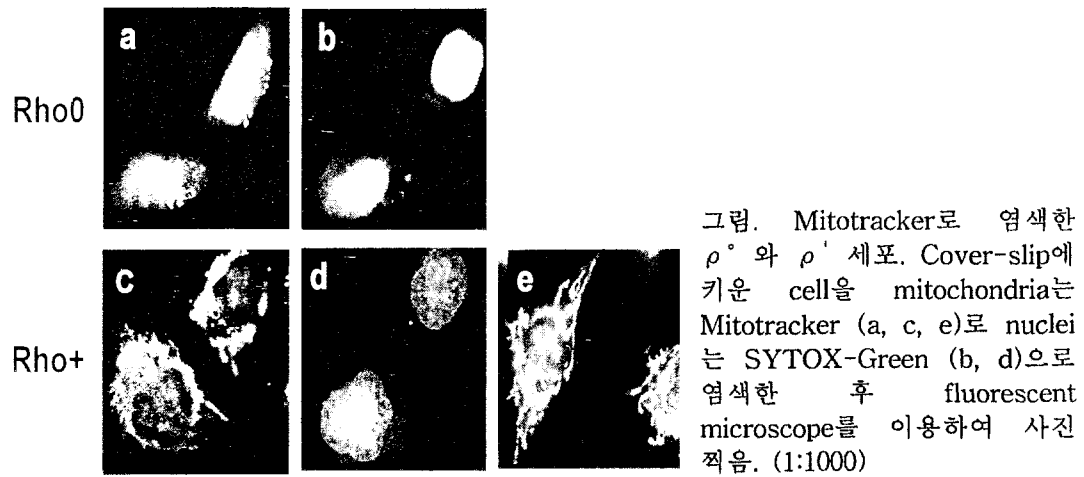


Fig. 29. Mitochondria stained with mitotracker(a, c, e) and SYTOX-Green(b, d)

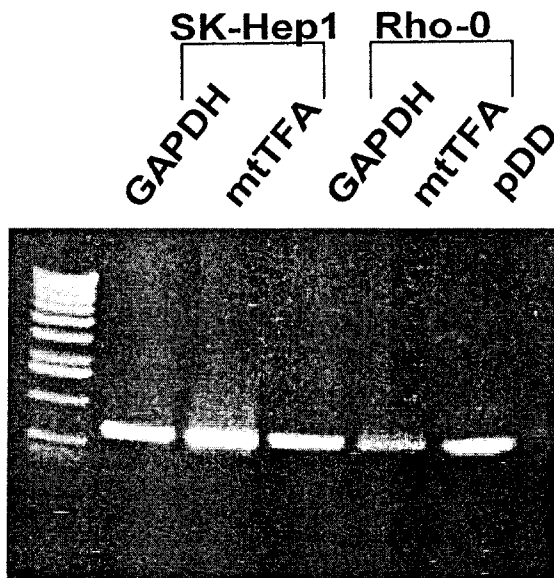


그림. Rho-0 세포에서 mtTFA mRNA의 발현 측정. pDD는 mtTFA coding cDNA를 포함하는 control vector임.

Fig. 30. Mitochondrial TFA mRNA by reverse transcriptase in mtDNA-deficient ( $\rho^0$ ) cell.

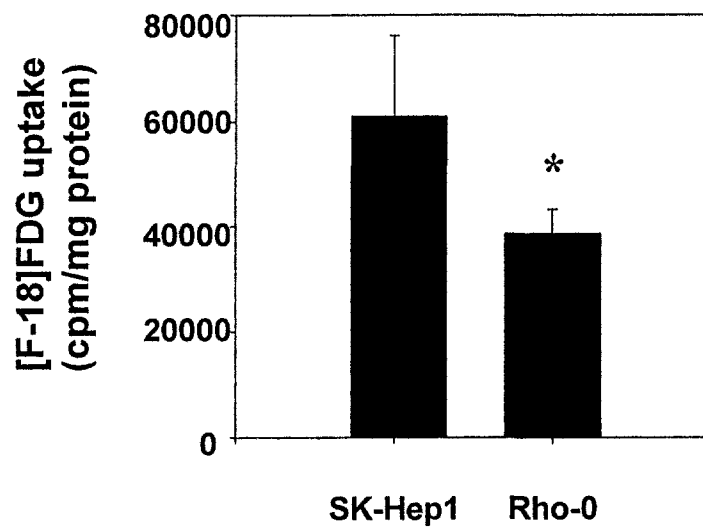


Fig. 31. Amount of basal F18-FDG uptake.

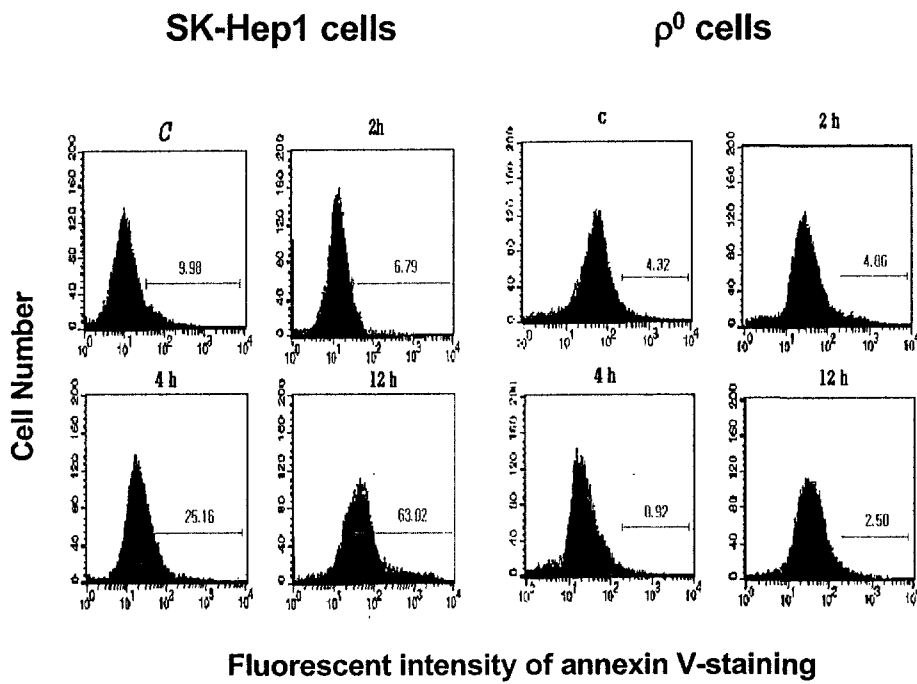


Figure 4. Phosphatidylserine externalization in  $H_2O_2$  treated SK-Hep1 or  $\rho^0$  cells. Cells were treated with various time of  $H_2O_2$  (250  $\mu M$ ). Exposure of phosphatidylserine was detected by staining cells with Annexin-V-FITC. Cells were then analyzed by flow cytometry and percentages of cells with phosphatidylserine exposure were indicated. Data are representative of three separate experiments.

Fig. 32. Flow cytometry of  $H_2O_2$ -induced apoptotic cells.



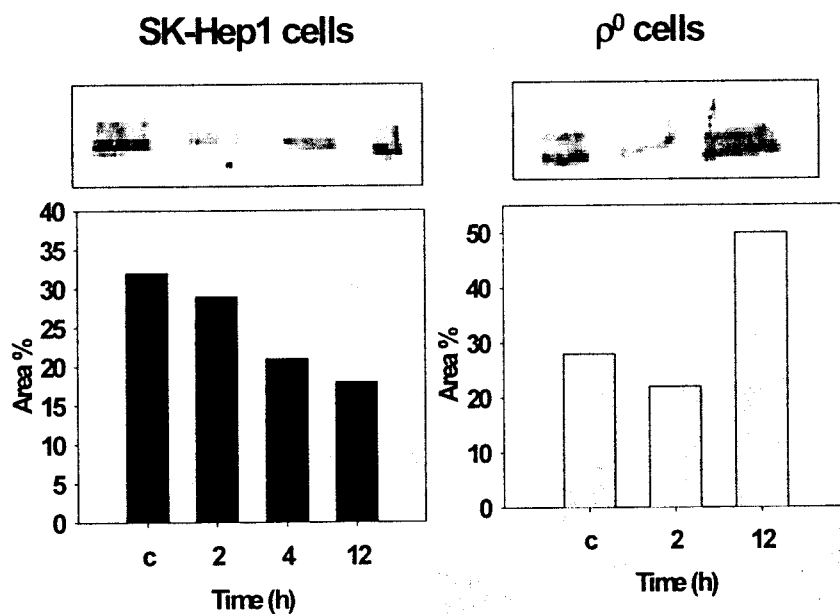


Figure 5. Protein expression of Bcl-x in the SK-Hep1 or  $\rho^0$  cells. The cells were incubated in the absence or presence of 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for the time periods indicated. The cell lysates were analyzed by Western blot using an anti-Bclx antibody.

**Fig. 33.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced Bcl-x expression in the SK-Hep1 or  $\rho^0$  cell**

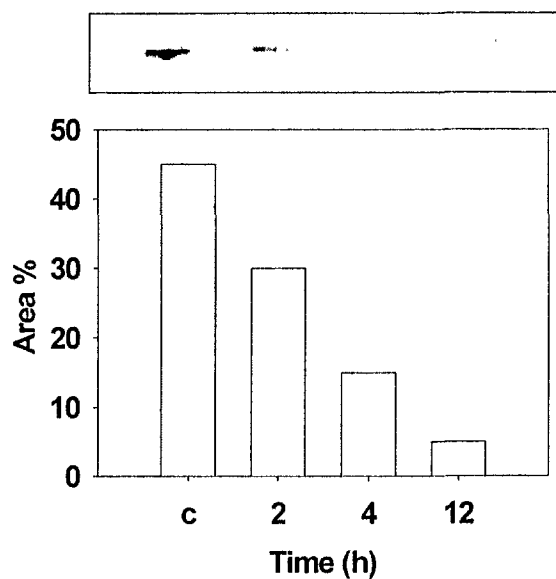


Figure 6. Protein expression of Bcl-2 in the SK-Hep1 cells. The cells were incubated in the absence or presence of 250  $\mu$ M  $H_2O_2$  for the time periods indicated. The cell lysates were analyzed by Western blot using an anti-Bcl-2 antibody.

**Fig. 34.  $H_2O_2$ -induced Bcl-2 expression in the SK-Hep1 cells**

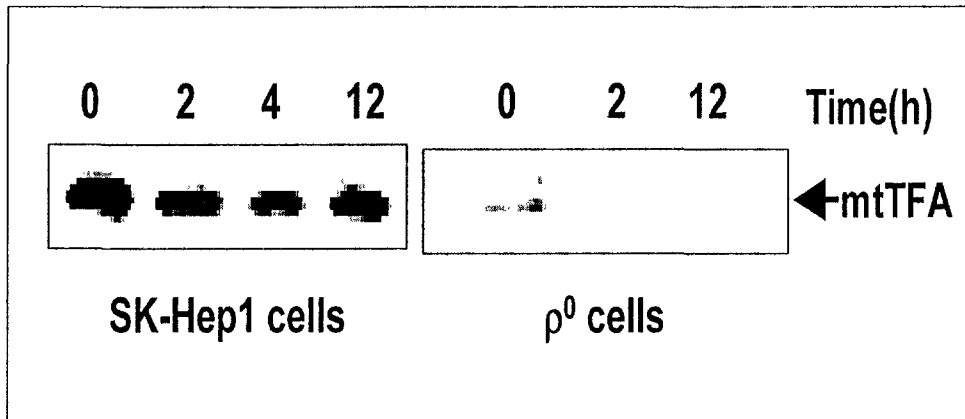


Figure 7. Protein expression of mtTFA in the SK-Hep1 and  $\rho^0$  cells. The cells were incubated in the absence or presence of  $250 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for the time periods indicated. The cell lysates were analyzed by Western blot using an anti-mtTFA antibody.

Fig. 35.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced mtTFA expression in the SK-Hep1 or  $\rho^0$  cell

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성도

본 연구과제에서는 절약형질 가설의 분자생물학적 기전으로 미토콘드리아 DNA의 양적인 변화가 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 세우고, 단백질 영양 결핍이 호르몬 기능과 미토콘드리아 DNA 복제수에 미치는 영향을 규명하기 위하여 사람 및 실험동물, 배양된 세포를 이용한 다기관 공동 연구로 그 가설을 검증하였다. 연구과정에서 미토콘드리아 DNA의 정량적 PCR 방법, 단백질 결핍 백서 모델, Rat mtTFA cDNA 및 genomic DNA cloning 및 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주 확립 등 많은 실험 기법을 확립하였다. 이들 방법을 통하여 산모의 말초혈액 미토콘드리아 DNA 양이 신생아의 출생체중에 영향을 주며, 단백질 결핍 백서 모델에서 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양이 밀접하게 연관되어 있음을 관찰하였다. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주로부터 미토콘드리아 DNA 결핍시 세포의 포도당 대사가 장애를 보임으로써 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소가 당뇨병 발생과 상관관계가 높고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화스트레스 영향을 적게 받았으며 이는 anti-apoptotic activity를 가지는 Bcl-x의 발현과 관련이 있음을 밝혀 당초 연구 목적을 90-100% 달성한 것으로 평가할 수 있다.

#### 1. 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계

미토콘드리아 DNA의 정량은 internal standard를 이용한 semiquantitative PCR법을 이용하여 확립하였고 이를 이용하여 산모 정맥혈의 미토콘드리아 DNA 양이 신생아의 출생체중에 독립적으로 영향을 주는 인자임을 확인하였다. 산모 정맥혈의 미토콘드리아 DNA 양은 태아 제대혈의 미토콘드리아 DNA 양과 유의한 상관관계가 있었다. 신생아의 출생체중은 태아 제대혈에서 측정된 IGF-1 및 IGFBP-3의 농도, 산모의 임신전 체중과 유의한 상관관계가 있었다. 산모 정맥혈과 태아 제대혈 모두 IGF-1과 IGFBP-3는 서로 유의한 상관관계가 있었다. 단백질 결핍 백서 모델을 확립하였고 단백질 결핍 어미쥐에서 정상식이 대조군에 비해 간 및 근육조직에

서 미토콘드리아 DNA 양이 유의하게 감소함을 확인하였다. 또한 새끼쥐에서도 정상식이 군에 비해 단백질 결핍 군에서 간 및 근육조직에서 미토콘드리아 DNA 양의 감소와 함께 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) mRNA 및 cytochrome c oxidase III 발현의 유의한 감소를 관찰하여, 영양 결핍에 의해 미토콘드리아 DNA가 감소할 가능성이 있음을 관찰하였다. 산모의 말초혈액 미토콘드리아 DNA 양이 신생아의 출생체중에 영향을 줌으로써 출생 후 당뇨병 등 대사질환 발생의 한 원인이 될 수 있음을 확인하였다. 이로써 당초의 연구 목적을 충분히 달성하였다고 생각된다.

## 2. 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기전 연구

미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) promoter부위의 메틸화(methylation) 정도를 Southern blot analysis 및 bisulfite genomic sequencing법을 이용하여 평가하였으나 당뇨병 환자와 정상인 모두 관찰되지 않았다. 당뇨병 환자와 대조군의 mtTFA promoter -97, -177, -292 부위에서 다형성이 있음을 확인하였으나 당뇨병의 발병과는 무관하였다. Rat 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA) cDNA 및 promoter를 cloning하여 사람 및 mouse의 그것과 비교하였다. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주를 확립하여 PCR을 통하여 미토콘드리아 DNA가 존재하지 않음을 확인하고 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주를 이용하여 포도당 대사 이상과 관련된 장애를 평가하였다. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포는 정상대조군에 비해 미토콘드리아 막전압의 결핍, mtTFA mRNA의 발현 감소, 포도당 섭취 감소, glucose transporter mRNA의 발현 감소 등이 관찰되어, 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소가 당뇨병 발생과 상관관계가 높음을 확인하였다. 또한 미토콘드리아 DNA 결핍 세포는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화스트레스 영향을 적게 받았으며 이는 anti-apoptotic activity를 가지는 Bcl-x의 발현과 관련이 있음을 관찰하였다.

## 제 2 절 대외 기여도

본 연구 결과 여러 가지 첨단 연구 기법을 확립하였고, 몇 가지 새로운 사실을 발견하여 당뇨병 등 내분비대사 질환의 분자생물학적 병태 생리 규명과 예방 및 치

료법 개발에 기여할 것이다. 대표적으로 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소가 향후 당뇨병 등 대사질환 발생의 한 원인이 될 수 있음을 밝혀 앞으로 미토콘드리아 DNA 복제 수를 증가시킬 수 있는 약제의 개발에 대한 관심과 연구가 증가할 것이다. 그리고 말초혈액의 미토콘드리아 DNA 양의 측정이 당뇨병 환자의 자손에서 향후 당뇨병 발생의 표지자로 사용될 가능성이 있어 앞으로 이에 대한 연구가 증가할 것이다.

### 1. 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계

당뇨병, 비만증, 고지혈증 등 내분비대사 질환과 관련이 있을 것으로 예상되는 미토콘드리아 DNA를 PCR 방법으로 정량화하는 방법을 확립함으로써 향후 이 분야의 연구에 많이 활용될 수 있을 것이다. 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양이 밀접하게 연관되어 있음을 발견함으로써 향후 미토콘드리아 DNA에 대한 연구에 기초 자료로 이용될 것이다. 산모의 말초혈액 미토콘드리아 DNA 양이 신생아의 출생체중에 영향을 주는 사실을 확인하여 미토콘드리아 DNA에 대한 많은 관심과 연구가 이어질 것으로 생각된다.

### 2. 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기전 연구

미토콘드리아 DNA 결핍 세포주를 이용하여 포도당 대사 이상과 관련된 장애를 평가하여 미토콘드리아 DNA 결핍 세포가 미토콘드리아 막전압의 결핍, mtTFA mRNA의 발현 감소, 포도당 섭취 감소, glucose transporter mRNA의 발현 감소 등 포도당 대사이상과 관련이 있으며, 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소가 당뇨병 발생과 상관관계가 높음을 확인하였다. 따라서 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소를 막거나 복제 수를 증가시킬 수 있는 방법을 연구하여 당뇨병 등 대사질환의 예방 및 치료법에 이용할 수 있을 것이다. 특히 S-adenosylmethionine이 미토콘드리아 DNA 복제 수를 증가시키는 것이 발견되어 향후 제2형 당뇨병의 예방 및 치료법 개발에 바탕이 될 수 있을 것이다. 또한 미토콘드리아 DNA 이상과 관련이 많은 신경계 및 근육계 질환의 연구에 본 연구가 유용한 기초 자료를 제공할 것으로 생각된다. 또한 Rat mtTFA cDNA 및 genomic DNA를 cloning하여 promoter 부위의 서열을 밝히고 사람이 그것과 비교함으로써 이 분야의 연구 기초 자료로 이용될 것이다. 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화스트레스 영향을 적게 받았으

며 이는 anti-apoptotic activity를 가지는 Bcl-x의 발현과 관련이 있음이 관찰되어 앞으로 산화스트레스와 미토콘드리아 DNA에 관한 연구에 유용한 자료로 이용될 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용

#### 1. 영양상태와 미토콘드리아 DNA 양과의 상관관계

영양상태와 미토콘드리아 DNA 양이 밀접하게 연관되어 있고 산모의 말초혈액 미토콘드리아 DNA 양이 신생아의 출생체중에 영향을 주는 사실로 미루어 미토콘드리아 DNA의 양과 기능의 상관관계에 대한 많은 관심과 연구가 이어질 것으로 생각된다. 영양결핍 상태에서 미토콘드리아 DNA가 감소하는 기전에 대해서는 산화스트레스가 증가하기 때문으로 추측할 뿐 아직까지 확실하게 밝혀지지 않은 상태이다.

미토콘드리아는 포도당과 지방산 등의 영양소가 산화되는 장소로 이들이 TCA cycle을 통하여 산화되면 그 결과 NADH, FADH<sub>2</sub>가 생성되고, 이들이 미토콘드리아를 둘러싸고 있는 두층의 막 중 내측막에 존재하는 4단계의 호흡연쇄고리(respiratory chain)의 효소복합체를 통과하면서 환원되는 과정에서 생성된 수소기(proton)가 수소기 펌프를 통하여 계속 미토콘드리아 밖으로 이동하면 그 결과 미토콘드리아 내측막의 막전압이 상승하고 이에 저장된 에너지가 호흡연쇄고리의 마지막 단계에서 ATP합성효소에 의하여 ATP를 합성하는데 전달된다. ADP로부터 ATP 합성에는 미토콘드리아내에 존재하는 ADP의 농도가 중요한데 ADP는 ATP를 소모하는 과정에서 생성된다. 휴식시에는 ATP을 소모가 감소되어 세포내 ADP 농도가 감소하여 ATP 합성 속도가 저하되나 과도한 영양섭취로 에너지 과잉상태가 지속되면 영양소 산화결과 미토콘드리아의 막전압이 높게 유지되어 호흡사슬의 중간단계에서 superoxide 혹은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 유리산소기의 발생이 증가한다. 즉 과도한 영양소의 공급과 운동량의 감소로 인한 에너지 소모의 저하는 미토콘드리아에서 유리산소기가 산화스트레스를 증가시킬 가능성이 있다.

본 연구에서 영양 결핍으로 미토콘드리아 DNA가 감소함을 관찰하였다. 또한 영양 결핍이 미토콘드리아 DNA 전사인자(mtTFA)에도 영향을 미치는 것으로 보이나 이를 확인하기 위한 연구가 더 필요하다. 따라서 영양결핍 혹은 과잉이 어떤 과정을 통해 미토콘드리아 DNA의 양과 기능에 미치는지와 이 과정에서 산화스트레스가



어떤 역할을 하는 지에 대해 연구할 예정이다.

## 2. 미토콘드리아 DNA 양의 감소 기전 연구

지난 3년간의 연구를 통해 미토콘드리아 DNA 복제 수의 감소가 당뇨병 발생과 상관관계가 높음을 확인하였다. 특히 S-adenosylmethionine이 미토콘드리아 DNA 복제 수를 증가시키는 발견되어 앞으로 단백질 결핍 백서 모델을 이용하여 S-adenosylmethionine을 투여하여 미토콘드리아 DNA 복제 수의 변화와 당뇨병의 예방 및 치료에 이용할 수 있는 지를 연구할 계획이다.

미토콘드리아는 영양소의 산화와 세포내 호흡에 중요한 역할을 수행하므로 에너지 대사 상태에 따라 미토콘드리아의 수와 기능도 변하는 것으로 알려져 있다. 추위에 노출되면 베타 교감신경계가 활성화되고 이는 갈색지방조직에 풍부하게 존재하는 베타3-아드레날린수용체를 자극하여 그 결과 cAMP가 상승하고 이는 protein kinase를 활성화시켜 그 다음 단계로 UCP, NRF-1, mtTFA 등의 유전자의 전사를 조절함으로써 미토콘드리아의 수와 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 최근 인슐린의 감수성을 증가시키는 약제인 Thiazolidinedione의 세포내 수용체로 알려진 PPAR-gamma(peroxisome proliferator activated receptor-gamma)의 cofactor인 PGC-1(PPAR gamma cofactor-1)을 과발현시킨 근육세포에서 미토콘드리아의 수의 증가, 미토콘드리아 DNA의 합성 및 호흡사슬 효소들의 발현이 증가됨이 보고되었다. PPAR-gamma는 또한 유리지방산의 수용체로 작용하므로 유리지방산(free fatty acid)의 증가와 같은 에너지대사 이상이 PPAR-gamma 및 PGC-1을 통하여 미토콘드리아의 합성과 그 기능에 관여할 가능성을 높다고 할 수 있다. 이를 검증하기 위하여 대사 이상(고혈당, 고지방, 고인슐린) 상태가 미토콘드리아 DNA의 양과 기능의 조절에 관여하는 인자인 PPAR-gamma, PGC-1, NRF-1, mtTFA, mtDNA 발현에 미치는 효과를 밝힐 계획이다. 또한 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화스트레스 영향을 적게 받았으며 이는 anti-apoptotic activity를 가지는 Bcl-x의 발현과 관련이 있음이 관찰되어 앞으로 산화스트레스가 미토콘드리아 DNA에 미치는 영향 및 미토콘드리아 DNA와 Bcl의 발현과의 관련성 등에 대해서 연구할 계획이다.

## 제 2 절 기업화 추진 방안

본 연구에서 확립한 미토콘드리아 DNA의 정량적 PCR 방법 및 미토콘드리아 DNA 결핍 세포주 등은 향후 미토콘드리아와 관련된 각종 내분비대사 질환, 신경계 및 근육 질환 등의 연구에 매우 유용할 것으로 생각된다. 특히 미토콘드리아 DNA의 정량적 PCR 방법은 당뇨병 환자의 자손이나 친척 혹은 당뇨병 위험인자가 많은 사람에게서 발생 위험도를 예측하거나, 치료 약제를 개발하는데 유용한 도구로 이용될 수 있을 것이다.

최근 우리나라에서도 경제수준의 향상과 인구가 노령화, 식생활을 위시한 문화생활이 큰 변화를 겪음에 따라 당뇨병, 비만증 등 이 범주의 질환은 선진국에서는 물론 우리나라에서도 주요 현안으로 대두되고 있다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 향후 이들 질환의 근본적인 발생기전을 규명하고 새로운 예방 및 치료법을 개발한다면 국가경제적으로도 손실을 줄이고 사회적으로 삶의 질을 향상시켜 국민 복지에 기여하고 또한 신약 개발을 통하여 국가적인 이익을 창출할 수 있을 것이다.

## 제 6 장 참고 문헌

1. Harding JE, Liu L, Evans P, Oliver M, Gluckman P Intrauterine feeding of the growth retarded fetus: can we help? *Early Hum Dev*, 29(1-3):193-7 1992.
2. Harding JE, Johnson BM. Nutrition and fetal growth. *Reprod Fertil Dev* 7:539-547, 1995.
3. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1495, 1988.
4. Bertin E, Gangnerau MN, Bailbe D, Portha B. Glucose metabolism and beta-cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy. *Am J Physiol* 277:E11-17, 1999.
5. Woodall SM, Breier BH, Johnston BM, Gluckman PD. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. *J Endocrinol* 1996 ;150(2):231-42.
6. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 4:301:259-262, 1990.
7. Barker DJ. The intrauterine origins of cardiovascular and obstructive lung disease in adult life. The Marc Daniels Lecture 1990. *J Roy Coll Phys Lond* 25:129-132, 1991.
8. Barker DJ, Meade TW, Fall CH, Lee A, Osmond C, Phipps K, Stirling Y. Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII

- concentrations in adult life. *BMJ* 18:304:148-152, 1992.
9. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Phillips EI, Sultan HY. Weight gain in infancy and cancer of the ovary. *Lancet* 29:345:1087-1088, 1995.
  10. Eckel RH. Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. *Lancet* 340:1452-1453, 1992.
  11. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 26:303:1019-1022, 1991.
  12. Hales CN, and Barker DJ. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35:595-601, 1992.
  13. Barker DJP, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition and ischemic heart disease in England and Wales. *Lancet* I:1077-1081, 1986.
  14. Barker DJP, Martyn CN, Osmond C; Fall C. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *Br Med J* 307:1524-1527, 1993.
  15. Soliman AT, Hassan AE, Aref MK, Hintz RL, Rosenfeld RG, Rogol AD. Serum insulin-like growth factors I and II concentrations and growth hormone and insulin responses to arginine infusion in children with protein-energy malnutrition before and after nutritional rehabilitation. *Pediatr Res* 1986;20(11):1122-30.
  16. Clemmons DR, Klibanski A, Underwood Le, McArthur JW, Ridgway EC, Beitins IZ, Van Wyk JJ. Reduction of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in human. *J Clin Endocrinol Metab* 53:1247-1250, 1981.

17. Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR. Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J Clin Invest* 71:175-182, 1983.
18. Gallaher BW; Breier BH; Harding JE; Gluckman PD: Periconceptual undernutrition resets plasma IGFBP levels and alters the response of IGFBP-1, IGFBP-3 and IGF-1 to subsequent maternal undernutrition in fetal sheep. *Prog Growth Factor Res*, 6(2-4):189-95 1995.
19. Jones CT; Lafeber HN; Rolph TP; Parer JT: Studies on the growth of the fetal guinea pig. The effects of nutritional manipulation on prenatal growth and plasma somatomedin activity and insulin-like growth factor concentrations. *J Dev Physiol*, 13(4):189-97 1990.
20. Nakago S; Morikawa H; Mochizuki M; Ueda Y: The relationship between the changes in insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and the nutritional states evaluated by nitrogen balance in pregnant rats? *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*, 70(2):85-94 1994.
21. Cetin I, Marconi AM, Bozzotti P et al. Umbilical amino acid and concentrations in appropriate and small for gestational age infants: a biochemical difference present in utero. *Am J Obstet Gynecol* 158:120-126,1988.
22. Battaglia FC, Meschia G. Principle substrates of fetal metabolism. *Physiol Rev* 58:499-527, 1978.
23. Swenne I, Crace CJ, Milner RDG. Persistent impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after limited period of protein

- calorie-malnutrition early in life. *Diabetes* 36:454-458, 1987.
24. Swenne I, Borg LAH, Crace CJ, Landstrom AS. Persistent reduction of pancreatic beta cell mass after a limited period of protein-energy malnutrition in the young rat. *Diabetologia* 35:939-945, 1992.
25. Chow, C. K. Interrelationships of cellular antioxidant defense systems. In: Cellular antioxidant defense Mechanism (Chow, Ck., ed.), vol II, pp.217-237, CRC Press, Boca Raton, FL.
26. Carla G. Taylor, Alan J, Potter , Peter S. Rabinovitch. Splenocyte glutathione and CD3-mediated cell proliferation are reduced in mice fed a protein deficient diet. *J Nutr.* 127:44-50, 1997.
27. Carol J. Lammi-keefe, Patricia B. Swan, P.V. J. Hegarty. Effect of level of dietary protein and total or partial starvation on catalase and superoxide dismutase activity in cardiac and skeletal muscles in young rats. *J Nutr* 114:2235-2240, 1984.
28. Susan M. Deneke, Berklilly A. Lynch, Barry L. Fanburg. Effects of low protein diets or fuel restriction on rat lung glutathione and oxygen toxicity. *J Nutr* 115:726-736, 1985.
- 29 Van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1992 ;1(5):368-71.
30. 김숙경, 신찬수, 박경수, 김성연, 조보연, 이홍규, 고창순: 한국인 인슐린비의존형

- 당뇨병 환자에서 미토콘드리아 DNA의 점돌연변이에 관한 연구. 당뇨병 21(2):147-155, 1997.
31. 이상경, 송종훈, 우정택, 김성운, 양인명, 김진우, 김영설, 최영길: 한국인 인슐린 비의존성 당뇨병의 미토콘드리아 유전자 3243 점돌연변이. 당뇨병 19:89, 1995.
32. 임성희, 김두만, 유재명, 최문기, 유형준, 박성우, 윤병수: 당뇨병 환자에서 미토콘드리아 DNA 돌연변이의 screening. 당뇨병 19:91, 1995.
33. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. Nat Genet 1:11-15, 1992.
34. Kadowaki T. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. N Engl J Med 330:962-968, 1994.
35. Kishimoto M, Hashiramoto M, Araki S, Ishida Y, Kazumi T, Kanda E, Kasuga M. Diabetes mellitus carrying a mutation in the mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) gene. Diabetologia 38:193-200, 1995.
36. Lee HC, Song YD, Li HR, Park JO, Suh HC, Lee E, Lim S, Kim K, Huh K. Mitochondrial gene transfer ribonucleic acid (tRNA)Leu(UUR) 3243 and tRNA(Lys) 8344 mutations and diabetes mellitus in Korea. J Clin Endocrinol Metab 82:372-374, 1997.
37. Reardon W, Ross RJ, Sweeney MG, Luxon LM, Pembrey ME, Harding AE, Trembath RC. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. Lancet 1992 5:340(8832):1376-9.
38. Van Tuyle GC, Gudikote JP, Hurt VR, Miller BB, Moore CA. Multiple, large

- deletions in rat mitochondrial DNA: evidence for a major hot spot. *Mutat Res* 1996 17:349(1):95-107.
39. 신찬수: 인슐린 비의존형 당뇨병 환자에서 미토콘드리아 DNA의 양적 이상. *당뇨병* 18:344-350, 1994.
40. Lee HK: Evidence that the mitochondrial genome is the thrifty genome. *Diabetes Res Clin Pract* 45:127-135, 1999.
41. Bestor, T. and Ingram, V. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5559-5563, 1983.
42. Jianjun Wu, Jean-Pierre Issa, James Herman, Douglas E. Basset, Jr., Barry D. Nelkin and Stephen B. Baylin. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8891-8895, 1993.
43. Kaneda HK, Hayashi JI, Takahama S, Taya C, Lindahl KF, Yonekawa H. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4542-4546, 1995.
44. Hauswirth WW, Laipis PJ. Transmission genetics of mammalian mitochondria: a molecular model experimental evidence. In "Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research. Vol Biogenesis" E. Quagliariello et al (Eds), Elsevier, 1985.
45. Joseph V. Virbasius and Richard C. Scarpulla Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression



in organelle biogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1309-1313, 1994.

46. Michaels GS, Hauswirth WW, Laipis PJ. Mitochondrial copy number in bovine oocytes and somatic cells. Dev Biol 94:246-251, 1982.
47. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Natl Acad Sci USA 85:6465-6467, 1988.
48. Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. Genes Dev. 4: 1023-1034, 1990.
49. Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. J. Biol. Chem. 264: 14361-14368, 1989.