

과제번호 FPR-02-A-5

## 프로테오믹스이용기술개발사업

### Lipid raft 프로테오믹스를 통한 제 2형 당뇨병 단백질의 탐색 및 조절 기작 이해

Young-Kyu Ko

고려대학교

과학기술부

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “21세기 프론티어 연구개발사업”과제 (세부과제 “Lipid raft 프로테오솜을 통한 제 2형 당뇨병 단백질의 탐색 및 조절 기작 이해”) 의 보고서로 제출합니다.

2005. 5.

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 고영규

협동연구기관명 : (주)코메드

협동연구책임자 : 윤병수

## 보고서 초록

과제관리번호	FPR-02-A-5	해당단계 연구기간	2002.10.1- 2005.3.31	단계 구분	(1단계) / (총3단계)
연구사업명	중 사업명	21세기 프론티어 연구개발사업			
	세부사업명	프로테오믹스이용기술개발사업			
연구과제명	중 과제명	Lipid raft 프로테오믹스를 통한 제 2형 당뇨병 단백질의 탐색 및 조절 기작 이해			
	세부(단위)과제명				
연구책임자	고영규	해당단계 참여연구원수	총 : 69명 내부 : 29명 외부 : 40명	해당단계 연구비	정부: 355,000천원 기업: 174,169천원 계: 529,169천원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교 생명과학대학		참여기업명	(주)코메드	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>지방세포와 근육세포의 분화 과정 중에 여러 미토콘드리아 단백질이 원형질막의 lipid raft에서 많이 증가함을 2D를 통한 differential proteomics로 확인하였다. 실제로 ATP synthase complex와 oxidative respiratory chain들이 지방세포, 근육세포, 간세포 등의 표면에 존재하며 세포 밖에서 ATP를 합성하는 데 필요한 단백질을 증명하였다. 특히 지방세포의 분화 과정 중에 ATP synthase complex는 엄청나게 증가하는 데, 이는 미토콘드리아 생성이 활발하게 일어남을 전자현미경으로 확인할 수 있었다. 특히 wild type, ob/ob, db/db 쥐들의 지방조직에서 ATP synthase complex의 양을 측정하였을 때, ob/ob에서 그 양이 급속하게 떨어져 있음을 관찰할 수 있었다. ob/ob의 지방조직에서의 미토콘드리아의 상실은 전자현미경, mtDNA에 대한 PCR등으로 다시 확인할 수 있었다. rosiglitazone으로 처리된 db/db 쥐의 지방조직에서는 미토콘드리아의 숫자가 다시 많아짐을 알 수 있었는데, 이는 제 2형 당뇨병은 지방조직에서 미토콘드리아 상실에 의하여 일어나는 질병임을 확인할 수 있게 하였다. 이것으로 지방조직에서의 미토콘드리아의 역할을 증대시키는 약제의 개발이 제 2형 당뇨병에 대한 치료책일 수 있음을 알게 되었다.</p> <p>또한 지방세포 유래의 호르몬인 adiponectin 및 resistin의 수용체를 발굴하였다. adiponectin에 결합하는 단백질로는 p120이 resistin에 결합하는 단백질은 p110, RELB β 결합단백질이 p90, p85, p55임을 확인하였다. 이들 단백질들은 막성단백질들로서 수용체 일 가능성이 높다고 보여 진다.</p>					88
색인어 (각 5개 이상)	한 글	리피드래프트, 제 2형 당뇨병, 지방조직, 미토콘드리아, 아디포넥틴			
	영 어	lipid rafts, type 2 diabetes, adipose tissue, mitochondria, adiponectin			

# 요 약 문

## I. 제목: Lipid raft 프로테오솜을 통한 제 2형 당뇨병 단백질의 탐색 및 조절 기작 이해

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

현대사회에서 제 2형 당뇨병의 발병률은 급속히 증가하고 있어 한국인의 약 12%가 제 2형 당뇨병을 앓고 있다. 이는 서구화된 음식문화와 거의 운동을 하지 않는 좌식문화에 기인하고 있다. 제 2형 당뇨병 환자들의 간, 근육, 지방조직 등은 인슐린 저항성을 가지고 있어서 이 병이 심화되면 신장이 작동하지 않거나, 눈이 멀거나, 다리를 절단하거나, 심장마비 등이 일어난다. 게다가 제 2형 당뇨병은 노인성 치매인 알츠하이머병을 유발하기도 한다. 제 2형 당뇨병에 대한 유전적 소인을 밝히기 위한 노력으로 AKT1, PGC-1 $\alpha$  유전자에 돌연변이를 발견하였다. 그러나 아직까지 제 2형 당뇨병의 원인을 설명할 수 있는 보편적이며 결정적인 유전적 소인을 밝혀내지는 못하고 있다.

지방조직은 트리글리세라이드와 콜레스테롤로 구성된 지방방울 (lipid droplets) 을 가짐으로서 에너지 저장소의 역할을 수행할 뿐만 아니라 혈당량의 항상성을 유지하기 위한 중요한 기관이다. 또한 지방조직은 다양한 사이토카인 (leptin, resistin, adiponectin, TNF)을 합성하고 분비하는 내분비조직으로서의 역할도 수행하고 있다. 즉 인슐린 저항성은 복부지방의 증가에 의하여 사이토카인들의 항상성이 깨짐으로서 일어나는 것으로 믿어진다. 예를 들면 leptin은 식욕을 조절하게 하여 지방조직이 인슐린에 잘 작동되도록 한다. Adiponectin은 근육세포에 작용하여 AMPK를 활성화시킴으로서 지방산을 산화시키도록 하지만 resistin과 TNF는 인슐린 저항성을 증가시킨다. 따라서 제 2형 당뇨병을 앓는 환자들 중 일부는 혈액에 낮은 adiponectin 양을 또는 높은 resistin과 TNF양을 갖는 것으로 알려져 있다. 이는 이러한 사이토카인들이 제 2형 당뇨병의 발병과 관련됨을 암시하는 것이다.

Lipid rafts (=caveolae)는 콜레스테롤과 당지질로 구성된 원형질막의 일부분으로 많은 세포신호전달을 관장하는 곳이다. lipid rafts에 caveolin-1 단백질이 존재하게 되면 이 막은 함입되어 caveolae를 형성할 수 있다. 특히 지방조직에서는 caveolae가 많이 발견된다. caveolae는 insulin receptor, GLUT4등 인슐린 신호전달에 결정적인 역할을 수행하고 있기 때문에 caveolae에 존재하는 단백질을 이해할 수 있다면 인슐린 신호전달의 기작과 제 2형 당뇨병의 원인을 이해할 수 있을 것이다. 따

라서 지방조직에서 lipid rafts (=caveolae)에 존재하는 단백질을 다양한 프로테오믹스 기술로 확인한 후 이 단백질들이 제 2형 당뇨병과 미치는 영향을 밝히려 한다. 또한 그 균형이 깨졌을 때 비만과 제 2형 당뇨의 원인이라고 믿어지는 adiponectin 및 resistin의 수용체를 확인함으로써 수용체를 표적하는 약제의 개발에 원천적 정보를 제공하려 한다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발 목표
1년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 정상인의 지방세포로부터 lipid raft 프로테옴 분석</li> <li>◎ 정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 지방세포의 lipid raft 프로테옴 분석</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin과 lipid raft와의 상호작용 연구</li> </ul>
2년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 제 2형 당뇨병 표식 단백질로서의 ATP synthase의 기능 연구</li> <li>◎ 분화된 지방세포의 lipid raft 프로테오믹스</li> <li>◎ 제 2형 당뇨병 원인 단백질 후보군에 대한 유전자 확보 및 항체 제작</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin에 결합하는 단백질의 동정</li> </ul>
3년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 발견된 유전자 후보군의 세포생물학적 연구를 통한 인슐린 저항성 기작 규명</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin 수용체 및 수용체 신호전달 단백질 유전자 발굴</li> </ul>
1단계 (종합)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 제 2형 당뇨병 원인 단백질 동정 및 기능 연구</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin 수용체 및 그 결합 단백질 동정</li> </ul>

구분	추진 전략
1년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ lipid raft 단백질의 2D를 통한 differential proteomics 기술 개발</li> <li>◎ LC/MS/MS를 통한 지방세포와 간세포의 lipid raft 단백질의 동정</li> <li>◎ recombinant adiponectin-Fc 및 resistin-Fc의 생리활성도 검증</li> <li>◎ adiponectin 또는 resistin에 결합하는 세포주 조사</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin이 lipid rafts에 결합 여부 조사</li> </ul>
2년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ lipid rafts에 ATP synthase가 존재하는 지 조사</li> <li>◎ 제 2형 당뇨병 환자의 간, 근육, 지방조직에서의 ATP synthase의 발현 양상 조사</li> <li>◎ preadipocyte와 adipocyte의 differential proteomics</li> <li>◎ 제 2형 당뇨병 원인 단백질 후보군 선정</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin에 결합하는 단백질의 동정 및 특성 연구</li> </ul>
3년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 제 2형 당뇨병 원인 단백질의 세포생물학적 연구 및 당뇨병과의 연관성 조사</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin 수용체 유전자 발굴 및 이 수용체에 결합하는 단백질의 동정. 수용체 및 수용체 결합 단백질의 세포분자생물학적 연구</li> </ul>
1단계 (종합)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 지방세포의 lipid raft 프로테옴을 통한 제 2형 당뇨병 원인 단백질 발굴</li> <li>◎ adiponectin 및 resistin의 수용체 동정 및 그 결합 단백질 발굴</li> </ul>

#### IV. 연구개발결과

구분	연구내용	연구결과
1 년 차	<p>◎lipid raft 단백질의 2D를 통한 differential proteomics 기술 개발</p>	<p>◎lipid raft를 분리하는 방법에 따라서 서로 다른 단백질들이 lipid raft에서 동정됨. 예를 들면 인슐린 수용체는 Brij 35로 이용하였을 때에만 lipid rafts에서 발견됨.</p> <p>◎raft 분리과정동안 계면활성제와 온도의 영향을 살피기 위하여 각기 다른 방법으로 분리된 raft 단백질을 2-D 전기영동으로 분석.</p> <p>◎보다 많은 raft 단백질들이 TX-100 보다 Brij 35로 분리하였을 때, 4°C에서 보다도 37°C에서 분리하였을 때 발견되었음. 이는 계면활성제가 있을 때에 lipid rafts가 37°C에서도 안정적으로 존재할 수 있음을 보여주는 것임.</p> <p>◎실제로 37°C에서 raft를 분리하여도 Src과 Lyn은 lipid rafts에서 발견되었음.</p> <p>◎detergent-free 방법으로 정제된 raft를 2D로 분석하였을 때, 보다 많은 raft 단백질들이 발견되었으나 이들 대부분은 콜레스테롤을 제거하여도 raft에 발견되었기 때문에 detergent-free 방법으로 추출된 대부분의 raft 단백질들은 다른 세포소기관으로부터 온 오염된 단백질임으로 판명되었음.</p> <p>◎Proteomics 4, 3527, 2004. 이 방법의 개발로 보다 효율적으로 lipid raft를 분리할 수 있었고 lipid raft의 프로테오믹 연구가 가능할 수 있게 되었다.</p> <p>◎이 결과는 논문으로 출판되었음. Proteomics 4, 3527, 200</p>
	<p>◎MS/LS/LS를 통한 간세포와 지방세포의 lipid raft 단백질의 동정</p>	<p>◎lipid rafts를 집쥐의 간으로부터 분리하여 모세관 액체 크로마토그래피와 병렬 질량분석기를 통하여 분석하였음.</p> <p>◎196종의 단백질이 확인되었고 이 중 32%는 raft 또는 원형질막, 24%는 미토콘드리아, 20%는 microsome, 그리고 나머지 17%는 미확인 단백질이었음.</p> <p>◎기대치 않게 많은 미토콘드리아 단백질들이 raft에서 발견되었음. 미토콘드리아 단백질인 ATP synthase α와 β가 실제로 표면단백질임을 면역형광반응, 세포표면 biotinylation, 세포막 분리 등으로 확인할 수가 있었음. 이들 단백질들이 raft에 존재함을 생화학적으로 확인하였음 .</p> <p>◎이 결과를 논문으로 출판하였음. Proteomics 4, 3536, 2004</p> <p>◎인간의 지방조직 세포를 확보하여 위와 동일한 방법으로 프로테오믹 분석 수행. (현재 원고 준비 중)</p>

구분	연구내용	연구결과
1 년 차	<p>◎ 정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 지방세포로부터의 lipid raft 단백질의 differential proteomics</p>	<p>◎ 정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 지방세포를 확보하지 못하여 동물 모델로 대체하였음. 이는 3년차에 수행되었음.</p>
	<p>◎ adiponectin 및 resistin이 lipid rafts에 결합 여부 조사</p>	<p>◎ adiponectin, resistin family 등의 chimeric ligands 대량 발현, 정제 및 생물학적 활성 규명  ◎ 정성적 혹은 정량적 binding assay를 통한 adiponectin, resistin family 수용체 발현 세포주 선별 : HUVEC, C2C12, Cos7, 3T3L1, HepG2 cell lines  ◎ 여러 detergent를 사용한 막 단백질 (lipid raft fraction) 및 pull down assay 확립</p>
2 년 차	<p>◎ lipid rafts에 ATP synthase가 존재하는 지 조사</p>	<p>◎ 프로테옴 분석을 통해 많은 미토콘드리아 단백질들이 lipid rafts에서 동정되었음. 이 미토콘드리아 단백질들이 실제로 원형질막의 lipid raft에 존재하는 것인지 미토콘드리아 단백질이 lipid raft에 오염된 것인지에 대한 의문을 제기할 수 있음.  ◎ 미토콘드리아 오염을 배제시키기 위하여 먼저 세포표면을 membrane-impermeable biotin으로 표식한 후 lipid raft를 분리하였음. 이 lipid raft를 다시 avidin-conjugated agarose beads로 침전시켜 세포막 lipid rafts를 분리하였음. 이 세포표면 lipid raft 단백질들은 LC/MS/MS를 통하여 동정하였음.  ◎ 110개의 단백질이 동정되었는데, 이중 40개는 원형질막, 4개는 미토콘드리아, 27개는 미동정 단백질이었음.  ◎ 특히 ATP synthase와 cytochrome c oxidase subunits는 세포막 lipid rafts를 심하게 세척하였을 때에도 발견되었다. 이는 미토콘드리아 단백질들이 실제로 세포막 lipid rafts에 있음을 강력하게 증명하는 것임.  ◎ 실제로 oxidative respiratory chain이 lipid raft에 있음을 증명하였음(in manuscript)  ◎ 이 결과는 현재 원고 작성중임</p>



구분	연구내용	연구결과
2 년 차	<p>◎ 제 2형 당뇨병 환자의 간, 근육, 지방조직에서의 ATP synthase의 발현 양상 조사</p>	<p>◎ 제 2형 당뇨병 환자의 간, 근육, 지방조직을 얻기가 거의 불가능하여 3년차 때 당뇨병 모델 동물로 실험을 대체하였음.</p>
	<p>◎ 근육세포, 지방세포의 분화시 lipid raft에서 differential proteomics</p>	<p>◎ NIH3T3 L1세포로부터 adipocyte를 C2C12 세포로부터 myocyte를 분화시켜 lipid raft 추출</p> <p>◎ 비분화세포와 분화세포의 lipid raft를 2D differential proteomics로 양적으로 차이 나는 단백질을 선택하였음.</p> <p>◎ 근육세포 분화시 desmin, G<math>\beta</math>, ATP synthase <math>\beta</math>, Metaxin, Mitofilin, Ryanodine receptor, Myosin A1 light chain, Annexin V, Annexin II, VDAC1, 그리고 한 종의 미동정 단백질이 lipid raft에서 과량발현되었음.</p> <p>◎ 지방 세포분화시 Hsp70, Hsp90, Grp78, Hsp60, Mitofilin, Mortalin, prolyl 4-hydroxylase, gclqR, dihydrolipoamide transacylase E2, VDAC, NAD<sup>+</sup> isocitrate dehydrogenase, Ubiquinol reductase complex, SPFH2 등이 lipid raft에서 과량발현되었음.</p>
	<p>◎ adiponectin 및 resistin에 결합하는 단백질의 동정 및 특성 연구</p>	<p>◎ 선별된 세포주로부터 최적의 detergent를 사용한 대량 pull down 수행</p> <p>◎ 1D 수행 후 potential 수용체 단백질 확인 : adiponectin receptor (p120), resistin receptors (p110, p35), RELM beta (p60, p85, p80)</p>

구분	연구내용	연구결과
3 년 차	lipid raft에 존재하는 ATP synthase complex의 생리학적 기능 연구	<p>◎미토콘드리아 증식은 지방조직은 ATP와 acetyl-CoA를 필요로 하기 때문에 지방세포 분화는 미토콘드리아의 증식을 요구함. 실제로 지방세포 분화과정 중에 미토콘드리아 단백질인 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>, cytochrome c등은 급격하게 증가하였다.</p> <p>◎전자현미경관찰에서도 미토콘드리아가 지방세포를 가득 채우고 있었음.</p> <p>◎ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>는 미토콘드리아만이 아니라 세포표면에서도 과량발현됨을 면역형광법, 세포막 분획, 세포막 biotinylation등으로 확인.</p> <p>◎지방세포의 밖에서도 ADP와 Pi만 공급되어도 ATP가 합성됨이 관찰되었고 ATP synthase inhibitor (oligomycine)이나 uncoupler (CCCP)등을 처리하였을 때 세포 밖에서의 ATP 합성은 중지되었음.</p> <p>◎세포배양액의 pH가 올라가게 되면 세포 밖 ATP 합성이 증가하게 되는 데, 이는 세포 밖 ATP 합성은 proton gradient를 사용함을 보여주는 것임.</p> <p>◎이 결과는 출판되었음 (Exp. Mol. Med., 36, 476, 2004)</p>
	제 2형 당뇨병쥐의 지방조직에서의 미토콘드리아 상실	<p>◎제 2형 당뇨병 환자의 근육세포는 정상인의 그것에 비해서 호흡률이 현저하게 떨어져 있기 때문에 미토콘드리아 손상은 제 2형 당뇨병을 설명하는 데 매우 중요한 화두가 되었음.</p> <p>◎제 2형 당뇨병과 미토콘드리아의 관련성을 살피기 위해서 wild type, obese (ob/ob), diabetes (db/db) mice의 간, 근육, 지방조직에서의 미토콘드리아 단백질의 발현양을 조사하였음. 간, 근육에서는 쥐에 따른 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>의 발현양의 차이는 없었으나 db/db 지방조직에서 그 발현양이 급속하게 감소하였음.</p> <p>◎mitochondrial DNA양과 genomic DNA양을 비교하였을 때 db/db 지방조직에서 그 비율이 급속하게 떨어져 있었음.</p> <p>◎전자현미경으로 관찰하였을 때에도 db/db지방조직에서는 미토콘드리아가 거의 없었음.</p> <p>◎db/db에 rosiglitazone을 처리하였을 때 glucose tolerance가 완화되는 데, 이 쥐의 지방조직에서 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>의 양은 상당히 증가한 것으로 관찰되었음. 또한 전자현미경상으로 rosiglitazone 처리한 ob/ob 지방조직은 많은 미토콘드리아를 가지고 있었음. 더불어 caveolae (=lipid rafts)의 양도 증가함을 관찰할 수 있었음.</p>

구분	연구내용	연구결과
	제 2형 당뇨병쥐의 지방조직에서의 미토콘드리아 상실	<p>◎ 또 다른 제 2형 당뇨병 모델인 OLETF 집쥐의 지방조직에서도 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>의 발현이 감소함이 관찰되었음.</p> <p>◎ 이러한 결과들은 제 2형 당뇨병은 지방조직에서의 미토콘드리아의 상실과 밀접한 관련이 있음을 처음으로 규명하는 것임.</p> <p>◎ 현재 원고 작성중임</p>
3 년 차	adiponectin 및 resistin 수용체 유전자 발굴 및 이 수용체에 결합하는 단백질의 동정. 수용체 및 수용체 결합 단백질의 세포분자생물학적 연구	<p>◎ adiponectin-Fc, FLAG-adiponectin, SEAP-adiponectin을 이용한 in situ binding assay를 이용한 expression cloning 개발 : C2C12, HUVEC, Cos7, 3T3L1 cell line의 expression cDNA library 제조</p> <p>◎ 수용체 후보 단백질 규명을 위한 affinity chromatography 및 Q TOF 수행중</p>

구분	연구내용	연구결과
3 년 차 1단계 (종합)	<p>◎shot gun proteomics와 differential proteomics를 이용한 제 2형 당뇨병 원인 단백질 발굴</p>	<p>◎ 간, 근육, 지방조직으로부터 lipid rafts를 분리하여 2D를 통한 differential proteomics 분석; 근육과 지방세포에서 분화에 필요한 새로운 타겟 단백질을 찾았음.</p> <p>◎LC/MS/MS를 이용하여 간과 지방조직의 lipid raft 단백질 목록을 완성하였음. 특히 ATP synthase a와 b가 lipid raft 단백질임을 다양한 각도로 증명하였음.</p> <p>◎ATP synthase complex가 세포표면의 lipid raft에 존재함을 관찰하였고 세포 밖에서 ATP 합성에 필요함을 증명하였음. 더불어 respiratory oxidative chain 역시 lipid raft에 있음을 증명하였음.</p> <p>◎제2형 당뇨병 동물들의 지방조직에서 미토콘드리아가 상실되어 있는 것을 다양한 각도로 관찰하였음. 이는 제 2형 당뇨병의 원인이 지방조직에서 미토콘드리아의 상실과 밀접한 연관이 있음을 증명하는 것임.</p>
	<p>◎adiponectin 및 resistin 수용체 동정 및 그 결합 단백질 발굴</p>	<p>◎ adiponectin, resistin family 수용체 후보군 확인</p> <p>◎ expression cloning 기술 확보로 지속적인 수용체 유전자 스크리닝 프로세스 개발</p>

## V. 연구개발결과의 활용계획

국내 비만 및 당뇨병 연구 분야에서 지방세포 유래의 호르몬인 에디포카인 (adipokines)에 대한 연구는 처녀지이다. 외국의 연구 경향은 에디포카인은 당, 지방대사 조절인자인 인슐린과 같이 중요한 호르몬으로 인정받고 있다. 본 연구에서 개발된 많은 재조합 에디포카인, 항체, 및 수용체 후보군의 확인은 에디포카인의 연구 분야에서 경쟁적 관계에서 연구를 가능케 하고 진단체계 및 치료제 개발의 원천 정보를 제공하여 2형 당뇨의 진단 및 치료 시장에 진출할 수 있다.

## S U M M A R Y

Since detergent-resistant lipid rafts are involved in pathogen invasion, cholesterol homeostasis, angiogenesis, and neurodegenerative diseases as well as signal transduction, protein identification in the rafts could provide important information to study their function. Here, we analyzed detergent-resistant raft proteins isolated from rat liver by capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Out of 196 proteins identified, 32% belonged to raft or plasma membrane, 24% to mitochondrial, 20% to microsomal, 7% to miscellaneous, and 17% to unknown proteins. For example, membrane-bound receptors, trimeric GTP-binding proteins, ABC transporters, and GPI-anchored proteins were identified in this analysis. Unexpectedly, there were many mitochondrial proteins, raising a new issue for the presence of mitochondrial rafts or the localization of mitochondrial proteins into plasma membrane rafts. We confirmed that ATP synthase a, and b were expressed on the surface of plasma membrane in HepG2 hepatocyte by immunofluorescence, cell surface biotinylation, and cellular fractionation. They had two distinct biochemical properties such as detergent insolubility and low density, suggesting that ATP synthase complex might be located in plasma membrane rafts as well as in mitochondria.

Mitochondrial impairment could may be a pivotal factor in type 2 diabetes, because as mitochondrial respiration is greatly reduced in the muscles of patients with type 2 diabetes. In order to confirm the connection of between mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes, the expression levels of mitochondrial proteins, as well as mitochondrial morphology, were investigated from assessed in the liver, muscles, and adipose tissues of wild type, obese (ob/ob), and diabetic (db/db) mice. The expression levels of mitochondrial proteins were found to be very similar in the liver, and muscles of all of the studied mice. However, their expression was greatly decreased in the adipocytes of db/db mice, but not in those of the wild type and ob/ob mice, suggest Mitochondrial DNA content was also found to be considerably reduced in the adipocytes of db/db mice. The mitochondria disappeared from the adipocytes of db/db mice by mitotracker staining and under electron microscopy. Interestingly, mitochondrial proteins were highly expressed, and their numbers were markedly increased, in the adipocytes of db/db mice administrated with rosiglitazone, an agent which enhances insulin sensitivity. Taken together all these data, we can suggesting that mitochondrial loss in the adipose tissue is correlated with the development of type 2 diabetes.

This study was designed to identify the protein factors involved in insulin resistance, which reside in the lipid-raft compartments of the metabolic cells such as adipocytes and muscle cells. Major emphasis was placed upon identification of the

receptors of the hormones derived from adipocytes, collectively termed adipokines, that have been thought to play pivotal roles in glucose or fat metabolism presumably by modulating insulin function. Adiponectin and resistin family members, resistin and RELM b were brought into focus of the present study. To this end, a variety of chimeric protein ligands in the forms of Fc-fusion, FLAG-tagged form, and SEAP (heat stable alkaline phosphatase)-fusion were generated and used for discovery of potential receptor-bearing cells and signaling readouts, calculation of binding affinity constants, pull-down receptor complex from membrane fractions, and expression cloning technology. We discovered a potential adiponectin receptor candidate whose molecular weight is 120kDa. This molecular mass would be distinguished from two reported adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. By using chimeric resistin family protein probes, we were able to identify p110 specifically reacting with resistin-Fc fusion protein whereas three protein species, p90, 085, and p55 were specifically pull downed by RELM b fusion protein. These receptor candidates were affinity-purified in mass and resolved on protein gel. Their protein natures were determined by QTOF. Most proteins remained ambiguous, which need to be further identified.

# C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1. Summary of Research Developmental Project-----	18
Chapter 2. Stands of International Technique Development -----	24
Chapter 3. Subject and Result of Research Developmental Execution ---	33
Chapter 4. Achievement of Purpose and Contribution of Related Field --	78
Chapter 5. Application Plan of Research developmental Result -----	84
Chapter 6. Acquired International Intelligence of scientific techniques during Research development-----	87
Chapter 7. Reference -----	88



# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	18
* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술	
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	24
* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황 에서 차지하는 위치 등을 기술	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	33
* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	78
* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분 야의 기술발전예의 기여도 등을 기술	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	84
* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술	
* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함	
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	87
제 7 장 참고문헌-----	88
* 보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다	

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 2형 당뇨병 (type II diabetes / insulin-independent diabetes): 호발성 대사병

급속한 산업사회로의 전환으로 말미암은 현대사회는 fast food, 고지질 음식섭취 같은 음식문화의 변화 적절한 운동부족으로 인한 당, 지질대사의 변화는 비만을 초래하여 2형 당뇨, 고혈압, 고지질, 동맥경화와 같은 심혈관계의 병인을 제공함으로써 국민 보건학적 해결되어야 될 숙제로 남아있음. 인슐린 비의존적 당뇨병 (insulin-independent diabetes) 즉, 제 2형 당뇨병 (Type II diabetes)은 인슐린 저항성 같은 신호전달의 문제로 파생되는 병으로서 혈당 (blood glucose)의 근육세포(muscle cells), 지방세포 (adipocytes)로의 유입 혹은 간세포에서의 당합성 과정(Gluconeogenesis) 이나 당의 혈관으로 유출 (glucose output)을 차단 못 하여 혈당 증가로 인한 기관 파괴(multiorgan failure), 고혈압, 동맥경화, 백내장, 족부 궤양과 같은 합병증으로 죽음에 이르게 하는 무서운 성인병임. 2형 당뇨병의 원인들로는 diet pattern, 운동부족과 같은 환경적 요인과 유전적인 인자들이 작용한다고 믿어지고 있는데 유전적 인자들은 유전자 소실 생쥐 (gene deficient mouse) 혹은 특정 인종의 유전학을 이용하여 genetic susceptibility gene들을 발견하였는데 Table I에서 보듯 약 10개정도의 인슐린 신호전달 단백질들, 전사 단백질 (transcription factors), 그리고 지방세포에서 분비되는 **adiponectin**, **resistin**과 같은 사이토카인 혹은 호르몬 등이 중요하다고 받아들여지고 있음.

## 2절. 인슐린 저항성 (insulin resistance)

인슐린 수용체를 통한 신호전달은 크게 1) IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1)과 같은 adaptor 단백질의 인산화, MAPK, AKT와 같은 여러 serine/threonine 단백질 인산화 효소의 활성화로 인한 cell proliferation의 증가 및 간세포에서는 당 합성에 관여하는 효소를 인산화 시켜 당합성을 저해하는 것과 2) insulin sensitive cell에서는 혈중으로 당을 유입하기 위하여 세포 내 vesicle에 있는 glucose transporter인 GLUT4를 lipid raft라는 분획화된 세포막으로 이동하는데 여기에는 Cbl, CAP(Cbl-associated protein), C3G, TC10 (small GTPase)등의 신호전달 단백질이 발견되어지며 (Chiang *et al.* 2001. Nature. 410:944-948) 이들의 활성화를 통하여 혈당을 조절하는 것으로 알려짐. 인슐린 저항성은 전반적인 adaptor 단백질, 단백질 인산화 효소들의 인산화 정도의 감소를 초래하여 세포표면으로의 글루코스 transporter (GLUT4) 이동이 현저하게 떨어져 글루코스 tolerance를 유발한다고 믿어짐. 특히 이러한 신호전달과 당대사의 이상은 지방세포 (adipocyte), 근육세포, 간세포의 생리에 영향을 주어 비만이 동반되고 반대로 비만이 오는 경우 제2 당뇨병도 동반된다는 많은 보고가 있어 비만과 2형 당뇨병은 같은 병리학적 원인을 공유하고 있음을 알 수 있음.

2형 당뇨 관련유전자

돌연변이 유전자	역 할	효 과	연관성
HNF-4- $\alpha$ , HNF-1- $\beta$ IPF-1, NeuroD1	Transcription factors	↓insulin secretion	MODY(human)
HNF-1- $\alpha$	Transcription factors	↓insulin secretion	MODY Oji-Cree diabetes
Glucokinase	Glucose metabolism	↓insulin secretion	MODY
Calpain-10	Protease	Unknown	Diabetes 2 in Mexican and African Americans
PPAR- $\gamma$	Transcription factors	↓insulin sensitivity	Diabetes 2
Insulin receptor	Transmits insulin signals into cell	↓insulin sensitivity and secretion	Human diabetes (rare);mouse models
IRS1 and-2	insulin signaling	↓insulin sensitivity	Mouse models
AKT2	insulin signaling	↓insulin sensitivity	Mouse models
11- $\beta$ -HSD	Glucocorticoid synthesis	↑Blood lipids, ↓insulin sensitivity	Mouse models
UCP2	↓ATP synthesis	↓insulin secretion	Mouse models
Resistin	Fat cell "hormone"	↓insulin sensitivity	Mouse studies
Adiponectin	Fat cell "hormone"	↓insulin sensitivity	Mouse, human studies

3절. 지방세포 (adipocytes): insulin 신호전달 조절 사이토카인을 분비하는 2형 당뇨의 원인세포

최근의 여러 내분비학적 고찰은 지방세포 (adipocyte)가 단순히 에너지 저장의 기능만이 아니고 에디포카인 (adipokines) 이라 하는 여러 사이토카인을 분비하여 이들 상호간의 신호전달이 insulin 신호전달을 조절하여 당의 항상성을 유지함을 보여줌. 이러한 에디포카인의 종류에는 TNF $\alpha$ , adipon, leptin등이 보고되어 있고 이중에서 leptin은 쥐에서 자연적인 유전자 변형이 일어난 ob/ob mice 혹은 leptin수용체의 돌연변이를 갖는 db/db mice에서 경우에서와 같이 비만과 동시에 인슐린 저항성을 보이는 동물모델이 있어 에디포카인의 하나인 leptin의 중요성을 시사해 주고 있음. 그러나 실제 leptin의 사람의 2형 당뇨병에서의 임상적 중요성은 쥐에서와 같이 중요하다고 생각되어 지지 않고 최근 분화된 지방세포에서 분비되는 에디포넥틴(adiponectin), 리지스틴(resistin) 등의 사이토카인이 2형 당뇨병과 깊은 관계가 있다는 많은 유전학적, 역학적, 임상적 보고가 있음 (Berg *et al.* Trends in Endocrinol. & Meta. 2002:84-89). 가장 최근, 미국의 Indian 종족중 전 인구의 50% 이상이 2형 당뇨 및 비만인 Pima indian을 대상으로 한 임상 역학 조사에서 혈중 adiponectin의 감소와 2형 당뇨 및 비만은 통계적으로 깊은 유의성이 있음을 보고 하였음 (Lindsay *et al.* Lancet. 2002. 360:57-58). 실제로

adiponectin 유전자 소실 생쥐는 insulin 저항성 및 glucose tolerance를 보이고 (Maeda et al. Nature Med. 2002, 8:731-737) 실제로 viral vector를 사용한 adiponectin 유전자의 유입은 insulin 저항성과 glucose tolerance를 극복함으로써 adiponectin이 2형 당뇨의 원인 인자임을 증명하였음. resistin의 경우 혈장농도의 증가가 인슐린 저항성을 올리고 GLUT4의 세포표면으로의 이동을 차단하고 동물실험에서의 resistin 중화항체의 투여가 인슐린 신호전달을 회복한다는 보고 (Steppan et al. Nature 2001:307-312)가 있어 adiponectin과 함께 leptin 이후 가장 주목을 받고 있는 사이토카인임.

#### 4절. 인슐린 신호전달은 lipid raft를 통하여 일어난다.

세포 신호전달 과정은 매우 복잡한 단계를 거치기 때문에 신호전달 물질들을 한 장소에 모이게 하는 전략은 매우 중요하다. 즉 신호전달 물질들이 세포막 또는 세포질에 이리저리 흩어져 있다면 라이겐드, 수용체, 신호전달 단백질, 이차 전령 물질로 이루어지는 일련의 신호전달 과정은 그 짝을 찾기 위하여 에너지와 시간을 낭비할 것이다. 그러나 신호전달 물질들이 한 군데, 특히 원형질막의 분획화된 부분에서 모이게 된다면 신호전달은 매우 효율적이고 빠르게 진행될 수 있을 것이다. 이와 같이 신호전달 물질들이 일정한 장소로 모이도록 유도하는 전략은 lipid raft에 의하여 이루어질 수 있다. 많은 신호전달 물질들은 콜레스테롤과 당지질로 구성된 lipid raft에 농축되어 세포 신호전달을 수행하고 있는 것이다. 콜레스테롤과 당지질로 구성된 원형질막의 일부분인 lipid raft는 여러 신호전달 물질들을 포함하고 있기 때문에 신호전달이 일어나는 장소이다.

인슐린에 의한 혈중 글루코스 저하는 주로 근육세포와 지방세포에 존재하는 GLUT4를 포함하는 vesicle이 원형질막 특히 lipid raft와 융합함으로써 일어날 것으로 보여진다. 다음은 인슐린 신호전달이 lipid raft에서 일어남을 보여주는 일련의 증거들이다.

◎ 1994년 Harvard 대학의 Lodish 그룹은 지방질세포의 GLUT4가 인슐린의 작용으로 lipid raft로 이동함을 관찰하였다. 또한 인슐린의 자극에 의하여 GLUT4가 lipid raft의 표식단백질인 caveolin-1과 강한 상호작용함을 관찰함으로써 인슐린 신호전달과정이 lipid raft에서 전개됨을 최초로 증명한 바가 있다.

◎ insulin receptor (IR), insulin receptor substrate (IRS)등은 항상 lipid raft에 존재하고 있고 lipid raft의 선택적 파괴는 IR과 IRS의 인산화를 억제하기 때문에 인슐린 신호전달은 lipid raft에 의하여 일어남이 확실시되고 있다. 또한 최근에 PI-3 kinase는 물론 그 산물인 PIP3 역시 lipid raft에 존재하기 때문에 IR, IRS,

PI-3 kinase, PIP3 generation, PDK, AKT 등의 신호전달 역시 lipid raft에서 일어날 수밖에 없을 것이다.

- ◎ 지방세포와 근육세포는 IR, CAP, Cbl, C3G, TC10을 통한 GLUT4의 lipid raft로의 위치 변화를 통하여 혈중 글루코스 양을 감소시킬 수 있다. 특히 Cbl-CAP 복합체는 인슐린 자극으로 lipid raft로 재빨리 이동됨이 관찰되었다.
- ◎ GLUT4를 포함하는 vesicle이 lipid raft와 융합되기 위해서는 v-SNARE와 t-SNARE의 상호작용이 필수적이다. 최근에 vesicle trafficking 과정 역시 lipid raft를 통하여 일어남이 증명되고 있다. 즉 t-SNARE 복합체는 lipid raft에 존재하기 때문에 lipid raft는 vesicle이 도킹될 수 있는 자리인 것이다.

이러한 일련의 lipid raft에서의 인슐린 신호전달 연구는 인슐린에 저항성을 가지는 제 2형 당뇨병의 원인기작을 이해하는 데 큰 도움이 될 것이다. 예를 들면, 인슐린 신호전달에서의 이상으로 생기는 당뇨병의 경우 IR, IRS, PI3(K), AKT2 등의 돌연변이에서 관찰되었듯이 lipid raft에서의 인슐린관련 신호전달물질을 총체적으로 이해할 수만 있다면 제 2형 당뇨병과 인슐린 신호전달 이상과의 명확한 관련성을 찾아낼 수 있을 것으로 믿어진다. 새로운 인슐린 신호전달물질의 확인은 이 물질에 대한 억제제 또는 활성제를 찾음으로써 새로운 유형의 당뇨병 치료제 개발을 촉진시킬 수 있을 것이다.

## 5절. Lipid Raft 단백질 목록화를 위한 효율적 프로테오믹스 기술

현재 세계적으로 프로테오믹스 연구의 대부분은 profiling proteomics에 초점이 맞추어져 있다고 할 수 있을 것이다. 프로테오믹스 시료내의 단백질 목록의 확보와 이들 중 특정 질병 관련 단백질의 규명과 같은 작업은 질량치로제 개발에 있어 매우 중요한 기초자료라 할 수 있다. 지난 십수 년간 이 profiling proteomics의 중심에는 2DE/MS가 있었다. 이 방법은 복잡한 단백질 혼합물, 즉 프로테오믹스 시료를 각 단백질의 크기(혹은 단백질의 분자량)와 등전점(isoelectric point, pI)값에 따라 2차원 겔상에서 분리하고, 각 분리점(이하 spot)을 silver 나 fluorescent stain을 통해 나타내고, 이를 통해 프로테오믹스 시료내의 단백질의 수와 differential expression의 정성적 데이터를 제공하고 있다. 이렇게 분리된 각 spot의 단백질들은, MALDI-TOF나 LC/MS 등의 질량분석방법을 통해 그 정체를 규명하게 된다. 이 기술의 최대 장점은 2DE기술의 막강한 분리능력을 최대한 활용할 수 있다는 것이다. Kobalz 등은 2DE로 최고 10,000개의 단백질들을 단일 겔상에 나타내었으며(*Electrophoresis* 16, 1034, (1995)), 일반적으로도 약 500에서 2000개의 단백질 혼합물을 2D 겔상에 나타낼 수

있다. 최근 Le Naour등은 이 기술을 이용하여, breast carcinoma proteins들을 성공적으로 밝혀낼 수 있었다(*Clinical Cancer Research*, 7, 3328, (2001)).

막대한 연구비와 시설을 앞세운 외국의 거대 연구 기업과 경쟁하여, 질병 치료제 개발에 성공하기 위해서는 세포내의 전체 프로테오미를 모두 망라하는 whole-proteome method 보다는, 관심 프로테오미의 특화와 정확한 정의를 통한 interest-oriented method를 사용해야 할 것이다. 본 연구는 2형 당뇨병의 원인 단백질들이 다수 포함되어 있다고 보여지는 lipid raft 프로테오미의 목록화와 그 중에서 2형 당뇨병 관련 표적 단백질의 발굴 및 관련 기작에 참여하는 수용체단백질의 판명에 그 연구목표를 가지고 있다. Lipid raft내의 구성단백질의 수는 많게는 1000여 개로 추정되며, complete tryptic digestion을 가정했을 경우에도, 약 십 수만 여종의 서로 다른 펩티드들이 얻어질 수 있을 것으로 예측된다. 따라서 전체 프로테오미에 비해 매우 단순화된 system이지만, 여전히 현대 프로테오믹스 기술의 한계로부터 자유롭지 못한 것이 사실이다. 이에 본 연구에서는 2형 당뇨병 프로테오미 시료의 효율적 분석을 위해 크게 다음의 두 가지 접근 방법을 병행하여 수행할 것을 제안하며, 그 자세한 내용은 2장의 “연구개발의 목표 및 내용” 그리고 4장의 “추진전략 및 방법” 부분에 정리할 것이다.

- ◎ 이차원 전기영동법과 capillary LC/MS/MS 의 결합 (2DE/c-RPLC/MS/MS technique)
- ◎ 초고분해능, 고효율 capillary LC/MS (또는 LC/MS/MS)을 바탕으로 한 global proteome analysis (Global lipid raft proteome analysis to enhance sensitivity, throughput and information contents based on ultrahigh resolution/high sensitive capillary LC/MS)

이러한 프로테오미 분석법의 효과적인 수행에는, 초고감도의 capillary RPLC기술, NanoESI 기술, ion funnel과 같은 최첨단 이온 전달 기술 등의 개발 또는 채용 등의 연구를 필요로 하고 있다. 본 연구의 수행을 통해 국내 프로테오믹스 기술의 전반적인 재점검과 발전을 이룩할 수 있을 것으로 기대되며, 개발되는 새로운 기술들은 본 세부과제 뿐만 아니라, 당 프론티어 사업의 전반적인 프로테오믹스 기술 발전에 이바지할 수 있을 것으로 기대한다.

## 6절. 면역학적 tolerance를 극복하는 기술로 고질의 단 클론항체 개발: 2형 당뇨 원인 단백질 진단법 개발

본 세부과제와 총괄과제의 연구를 통하여 규명된 단백질의 진단을 위해 high quality 의 단 클론항체 (monoclonal antibody)의 개발은 필수적임. 그러나 깊이 병과 연관된 단

백질들은 종과 종사이의 (예를 들어 사람과 생쥐) 아미노산 서열이 유사할 수 있어 사람의 단백질에 대한 면역반응을 일으키는 생쥐의 면역세포들이 소위 “immunological tolerance”를 일으켜 항체생성을 저해할 수 있음. 실례로 GLUT4의 세포막 이동에 필수적인 단백질 TC-10은 사람과 생쥐사이에 오직 1개의 아미노산의 차이가 있어 현재까지 이 단백질에 대한 항체는 상업적으로 존재하지 않음. 이러한 병목을 극복하기 위해 (주) 코메드 생명과학 연구소 자체 기술의 vaccination 방법을 통하여 생쥐에서 단 클론 항체를 만들어 monoclonal antibody array와 같은 단백질 chip제조에 사용될 수 있음. 자세한 내용은 국내 연구 현황에서 기술함.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. adiponectin과 resistin 국외연구

gelatin-binding protein 28 (GBP28)로서 처음 사람 혈장에서 발견된 후 미국, 일본 여러 연구진들에 의해서 분화된 쥐 지방세포 3T3-L1에서 특이하게 발현이 증가되는 유전자로서 AdipoQ, Acrp30의 다른 이름으로 명명되었고 이들의 인간 counterpart인 adiponectin 유전자는 지방세포 cDNA library의 large scale random sequencing으로부터 확인되었음. 그 이후 2형 당뇨병 환자의 adiponectin 혈장 농도가 정상인과 비교해 볼 때 현저하게 떨어지고 이들 환자를 PPAR gamma의 agonist인 Rosiglitazone으로 치료했을 때 증세의 회복과 동시에 adiponectin의 혈장농도의 증가가 병행되어 그 임상적 중요성이 인식되었음. ob/ob mice나 인위적으로 당뇨와 비만을 발생시킨 쥐를 사용한 동물실험에서도 adiponectin의 투여가 현저하게 인슐린 저항성을 완화시키고 체중 감소를 유발하고 간세포에서의 글루코스 합성을 저해하여 adiponectin의 치료제로서의 가치를 입증하였음(Yamauchi *et al.* Nature Med. 2001. 7:941-946).

최근 프랑스를 포함한 유럽의 제2 당뇨병 환자의 유전, 역학적 조사에서 염색체 3q27이 병의 원인이 된다는 보고가 있었고, 그 이후 adiponectin 유전자의 위치가 이와 동일함이 밝혀져 adiponectin 유전자의 변이가 제2 당뇨병과 깊이 연관된다는 사실을 확인하였으며 (Kissebah *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2000. 97:14478-14483) 독일의 한 연구에서 adiponectin exon 2에서의 한 T-G single nucleotide polymorphism (SNP)의 변이가 비만과 인슐린 저항성과 관계가 있고 (Stumvoll *et al.* Diabetes 51:37-41) 일본의 경우 exon 2와 intron 2 각각 한 G-G SNP가 에디포넥틴의 혈장농도의 감소, 인슐린 저항성 증가, 비만유발과 통계적으로 의미 있는 연관성을 보임으로서 (Hara *et al.* Diabetes 2002. 51:536-540) adiponectin의 혈장농도의 측정, SNP 검사가 비만/2형 당뇨병의 예후 및 예방의학적 진단에 중요함을 시사해줌 (Counuzie *et al.* J. Clin. Endocrinol., & Meta. 2001. 86:4321-4325).

resistin은 여러 연구팀에 의하여 독자적으로 여러 이름으로 발견되었는데 지방 전구 세포 (preadipocyte)에서 지방세포로 분화할 때 발현 되는 유전자로도 발굴되었고 resistin이라는 이름은 분화된 지방세포를 insulin-sensitizing drug인 rosiglitazone으로 처리하였을 때 발현 수준을 떨어지는 유전자를 differential display 기술로 발견되었고 실제 재조합 resistin은 insulin의 신호전달을 막아 당의 세포내 유입을 막는 소위 insulin resistance (인슐린 저항성)를 유발하는 기능의 사이토카인으로 명명되었음 (Steppan *et al.* Nature 2001. 409:307-312). 또한 분화된



쥐의 지방세포에서 발현되는 유전자로 발견되었고 단백질의 아미노산 서열에서 cysteine residue가 전체의 10%를 차지하는 분자량이 12.5-kDa 인 cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor (ADSF)로 명명되었고 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 differentiation inhibitory factor로 기능이 알려짐 (Kim et al. J. Biol. Chem. 2001. 276:11252-11256). 현재 미국 Albert Einstein 의대의 Dr. Phillip Scherer (personal communication) 실험실 및 biotech company인 Genentech에서 resistin 수용체의 규명이 진행되고 있고 adiponectin 수용체 규명도 MIT의 Harvey Lodish group, Osaka 의대의 Yuzi Matsuzawa group에서도 진행하고 있음

## 2절. lipid raft를 통한 인슐린 신호전달에 대한 국외연구

- ◎ CAP-Cbl-TC100 복합체가 인슐린 자극에 의하여 lipid raft에서 형성되어 GLUT-4가 lipid raft로 이동하는 세포 내로의 글루코스 유입에 대한 분자적 기작이 새로이 밝혀지고 있다 (Nature, 407, 203, 2000; Nature, 410, 944, 2001; JCB, 154, 829, 2001).
- ◎ GLUT-4를 포함하고 있는 vesicle이 원형질막과 융합하기 위해서는 v-SNARE와 t-SNARE간의 단백질 상호작용이 필요한 데, t-SNARE가 lipid raft에 존재함이 발견됨으로써 lipid raft는 vesicle이 원형질막에 융합될 수 있는 docking site임이 점차로 증명되고 있다 (EMBO J., 20, 2202, 2001; PNAS, 98, 5619, 2001).
- ◎ IR, IRS 등이 lipid raft에 의존적으로 활성화됨이 증명되었고 lipid raft의 골격단백질인 caveolin-1이 인슐린에 의하여 인산화될뿐만 아니라 인슐린 신호전달을 강화시킬 수 있다 (JBC, 273,26962, 1998; FASEB J, 13, 1961, 1999; JBC, 276, 9670, 2001).
- ◎ preadipocyte에서 adipocyte로의 분화과정동안 caveolin-1이 과량발현되어 인슐린 신호전달을 촉진시킨다. (JBC, 272, 20706, 1997; MCB, 21, 4553, 2001).
- ◎ caveolin-1이 상실된 생쥐는 white adipose tissue가 존재하지 않으며 제 2형 당뇨병 현상을 보여줌 (JBC, 277, 8635, 2002).

### 3절. 국내 adiponectin 및 resistin 연구 수준

◎ 현재 adiponectin 및 resistin에 대한 임상학적, 역학적, 유전학적, 생리 활성적 국내 연구는 전무함.

◎ adiponectin 및 resistin 수용체 발굴을 위한 chimeric ligand 제조:

본 연구팀은 adiponectin 및 resistin을 목적화한 치료제 개발의 첫걸음으로서 이들 수용체 유전자를 발굴키 위하여 대장균, 동물세포를 이용하여 여러 종류의 재조합 adiponectin을 생산 완료함.

◎ 면역학적 tolerance를 극복한 인간 adiponectin 인식 단 클론항체 개발

본 연구팀은 adiponectin 인식 단 클론항체를 제작하여 adiponectin ELISA kit를 개발하였음. 이 kit를 2형 당뇨병의 진단 kit로 개발하기 위하여 노력중임

### 4절. 국내 lipid raft 연구 수준

인슐린 신호와 관련하여 lipid raft의 연구는 진행되지 않았으나 lipid raft에 대한 연구는 국내에서 특히 본 연구 그룹에서 활발하게 연구되어 JBC, JI 등의 논문 등을 발표할 정도로 상당한 세계적 수준의 경쟁력을 갖추고 있음으로 사료됨. 다음은 3년 동안 본 연구그룹에 의하여 이루어진 성과물이다.

◎ TNF에 의한 세포자살이 lipid raft (=caveolae-like domain)에서 시작됨 (J. Immunol., 162, 7217, 1999).

◎ 열 또는 고장액 충격 (heat or hypertonic shock)에 의하여 caveolae가 세포 내부로 들어감을 증명. caveolae가 다양한 스트레스를 인지할 수 있는 장소임을 주장 (Exp. Cell Res., 255, 221, 2000).

◎ 노화된 세포에서는 caveolin-1의 발현이 증가하며 caveolae의 숫자도 늘어남을 증명. 특히 과발현된 caveolin-1에 의하여 EGF 수용체가 불활성화 됨으로써 노화세포가 왜 여러 성장호르몬에 의하여 반응을 보이지 않음을 설명 (J. Biol. Chem., 275, 20847, 2000)

◎ 혈관형성억제제인 p43의 신호전달이 lipid raft에서 시작됨 (한국 세포분자 생물학회에서 발표됨, 2001).

- ◎ p43과 같은 orphan ligand는 lipid raft에 강한 결합을 보여주는 데, 이는 lipid raft가 다양한 orphan ligands에 대한 수용체 연구에 중요한 전기를 만들어 줄 것으로 기대된다. (Fig. 1).

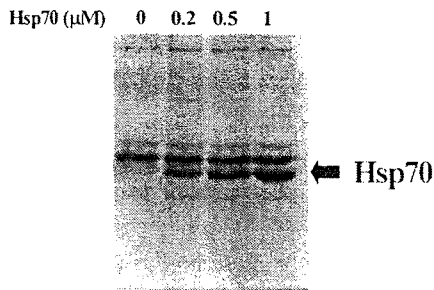


그림 1. Raw264.7 세포로부터 lipid raft를 분리한 후 Hsp70 (0, 0.2, 0.5, 1 uM)을 4. C에서 20분 동안 반응시킨 후, 100,000 x g로 초 원심 분리하여 침전물을 전기영동한 후 Ponceau staining 하였다. lipid raft는 막성 구조이기 때문에 초 원심 분리 시 침전된다. 그림에서 보듯이 Hsp70은 lipid raft에 강한 결합을 보여준다.

이는 Hsp70의 신호전달은 물론 세포 내 함입이 lipid raft를 통하여 이루어질 수 있음을 암시하는 것이다.

당뇨병 관련 표적단백질에 대한 기능연구에 대한 경험은 이 프로젝트의 성사여부에 상당히 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구팀은 단백질의 기능을 오랫동안 다양한 각도로 연구하여 JCB, PNAS, JBC 등의 학술지에 논문을 게재한 경험을 가지고 있다. 다음은 본 연구단 다양한 연구경험을 가지고 있음을 증명하는 것이다.

- ◎ 단백질합성효소 복합체의 구성단백질인 p38을 knock out 하여 그 기능을 밝혔다. p38은 단백질합성효소복합체를 이루게 하는 골격단백질이다 (PNAS, 99, 7912, 2002). Functional genomic에 대한 풍부한 경험과 기술 보유
- ◎ Methionyl-tRNA synthetase가 핵의 인에 존재하고 rRNA 합성을 조절하는 기능을 밝힘 (JCB, 149, 567, 2000). 세포생물학과 분자생물학적 기법에 대한 완벽한 이해 및 기술 보유
- ◎ 단백질합성효소 복합체의 구성단백질인 p43이 면역세포를 활성화시키는 싸이토카인임을 증명 (JBC, 276, 23028, 2001). 면역학과 분자생물학적 기법에 대한 완벽한 이해 및 기술 보유
- ◎ ASK1을 통한 Daxx의 세포위치 변화에 따른 기능변화를 증명 (JBC, 276, 39103, 2001). transcription factor와 kinase 연구에 필요한 기술 보유
- ◎ Glutaminyl-tRNA synthetase가 ASK1을 억제함으로써 세포자살을 방지함을 증명 (JBC, 276, 6030, 2001). Hsp70이 세포자살을 억제하는 기작을 밝힘 (JBC,

275, 25665, 2000). 세포자살에 필요한 여러 연구 기술 보유

◎ 단백질합성효소 복합체 형성의 생화학적 기작에 대한 연구 (JBC, 275, 21768, 2000; JBC, 275, 31682, 2000). 단백질-단백질 상호작용 연구에 필요한 모든 기법 (yeast two hybrid, in vitro binding assay, immunoprecipitation 등)에 익숙함

## 5절. 국외 프로테오믹스 연구

인간질병 원인규명에 대한 원천정보를 제공하고 신약개발에 대한 실제적 방법을 제시할 수 있는 유력한 방법으로서의 proteomics 연구의 동력은 복잡한 단백질을 분리 정제하는 기술의 발전과 electrospray 등의 생고분자 이온화법의 개발을 시발로 한 질량분석기술의 거듭된 혁신을 통해 얻어지고 있다. 여기서는 최근 질량분석학을 중심으로 하는 프로테오믹스 기술의 연구 동향을 대표적인 프로테오믹스 그룹인 John Yates III의 Scripps proteomics lab, 워싱턴주의 Institute of Systems Biology (ISB)의 proteomics 그룹, Richard Smith에 의해 주도되고 있는 Pacific Northwest National Laboratory (PNNL)의 proteomics 그룹 그리고 Steve Hofstadler와 Richard Griffey 등에 의해 주도되고 있는 ISIS<sup>TM</sup> Pharmaceuticals, Inc.의 프로테오믹스 기술을 이용한 신약개발 그룹의 활동을 통해 소개하고자 한다. 곧 드러나겠지만, 최근의 해외 프로테오믹스는 점차 “gel-free” methods 즉 2DE 기술을 배제한 high throughput LC/MS 또는 LC/MS/MS 기술 쪽으로 점차 그 무게중심이 옮겨가고 있다.

Yates 그룹의 proteomics 연구는 multidimensional liquid chromatography 기술을 이용한 펩티드 분리와의 이 분리기술과 electrospray를 통해 tandem mass spectrometry와 연계를 통한 펩티드 분석을 그 요체로 가지고 있다. 오랜 시간을 요하는 2DE와는 달리 Yates 그룹의 MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) 방법은 cation exchange chromatography와 RPLC를 하나의 column에 집약시킴으로써 분리기술의 peak capacity를 극대화할 수 있었으며, 시료처리과정에서 수작업과정을 대부분 제거하여, throughput을 높이는데 유용하다. Yates 그룹은 MudPIT을 이용, 약 1,484 종의 Yeast 단백질을 규명하였으며, 특별히 2DE 방법에 의한 분석에 어려움을 주는 low abundant proteins나 극단적인 등전점이나 분자량을 가지는 단백질, 그리고 비수용성 단백질 등을 비교적 bias없이 측정할 수 있음을 보인 바 있다 (Nat. Biotechnol., 19, 242 (2001)).

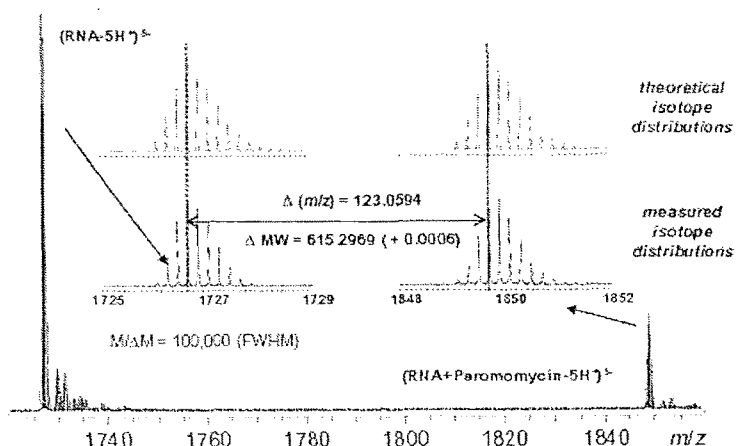
Yates 그룹의 proteomics 연구가 large-scale proteome의 단백질 목록화에 주력하고 있다면, Gygi와 Aebersold의 ISB proteomics 그룹은 ICAT labeling을 통한 differential proteomics에 연구 역량을 집중하고 있다 (Nat. Biotechnol., 10, 994 (1999)). 최근 이들은 ICAT labeling에 의한 isotope pair 중에서 세기 차가 크게

나타나는 펩티드쌍만 선택적으로 분석하는 새로운 방법을 제시함으로써, 질량분석학에 의한 표적단백질 발굴의 효율을 크게 증가시킬 수 있음을 보인 바 있다(J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12, 1238 (2001)). 이 방법은 기존의 "펩티드규명 후 differential expression 정보 획득"이라는 일반적인 프로테오믹스 방법의 정반대의 개념을 사용한 것이다. 즉 질량분석을 통해 differential expression 정보를 먼저 얻고, 이를 바탕으로, 관심 있는 (즉 큰 세기차를 나타내는 펩티드쌍) 펩티드를 선택적으로 MS/MS하여 sequence information을 얻고, 이를 후에 데이터베이스 탐색에 이용, 펩티드 판명을 하는 것이다.

최근 PNNL 그룹의 proteomics 연구의 key aspect는 고성능 FTMS를 적극적으로 이용, online capillary LC separation에 의해 분리, 용출되는 수십만 개의 proteolytic 펩티드를 매우 높은 MMA로 측정하는 것이다. 즉 proteome 시료의 절대적 복잡성(예로 약 6,500개의 단백질로 구성된 Yeast 세포단백질로부터 가능한 트립틱펩티드(트립신효소에 의한)의 수는 이론적으로 약 350,000개)을 고분리분해능의 LC에 의해 단순화하는 질량분석 전단계를 돕으로써 실험전체의 dynamic range를 최대화하려는 것이다. 이를 통해 약 1000배 이상 향상된 dynamic range를 실현한 바 있다. PNNL 그룹은 초기 단백질 판명과 이후 프로테오믹스 시료분석의 효율성(throughput)을 극대화 시켜줄 accurate mass tags(AMTs)를 생산해내고 있다. 충분히 높은 질량측정정확도(mass measurement accuracy, 이하 MMA)의 실험을 하였을 때, 이로부터 측정되는 펩티드의 질량은 각각 단일 단백질과 고유하게 일대일의 대응관계를 가지게 되고, 결국 AMT화된 펩티드는 일종의 그 단백질에 대한 "biomarker"로 기능할 수 있게 된다. 이러한 높은 MMA에 의한 펩티드질량을 AMT라하고, 이는 마치 백화점 내의 모든 상품에 바코드가 있어 이를 통해 각 상품에 대한 정보를 얻을 수 있듯이, 세포내의 모든 단백질들을 그로부터 얻어지는 펩티드의 질량으로 바코드화하는 것이라 할 수 있다. 따라서 일단 세포내 모든 단백질에 대한 AMT들을 데이터베이스화하면, 질량스펙트럼에 나타난 펩티드의 질량 측정만으로도 사용 중인 시료내에 존재하는 proteome의 정체를 알아낼 수 있게 된다. 따라서 proteome 연구와 그 분석의 속도를 크게 향상시킬 수 있으며, 더 중요한 것은 그 구성단백질들을 정량화할 수 있는 수단을 얻게 된다는 것이다.

정통적인 프로테오믹스 연구와는 좀 거리가 있으나, 미국 캘리포니아 샌디에고에 위치한 ISIS<sup>TM</sup> Pharmaceuticals, Inc.의 프로테오믹스 그룹은 질병과정에 참여하고 있는 target RNA에 직접 결합하는 저분자량의 유기분자를 찾아냄으로써 치료약을 개발하고 있다. 이들은 신약기술개발의 돌파구를 combinatorial libraries의 고전적 high-throughput screening 과정을 고분해능 FTMS에 의해 대체함으로써 찾아냈다. Multitarget affinity/specificity screening(MASS)라고 명명된 이 기술은 FTMS의 초고분해능, 초정확도, 초고감도를 적극 이용함으로써, 첫째, target RNA에 결합하는 저분자량 유기화합물 혹은 리간드의 정확한 화학적 성분을 밝혀내고, 둘째, 다양한 리간드들과 target RNA 사이의 분해상수를 측정함으로써 결합의 세기

를 측정하고, 셋째, 리간드가 target RNA에 결합하는 위치를 알아내고, 넷째, 여러 RNA들이 섞여 있을 때, 리간드의 target RNA와의 결합의 특이성(specificity)을 매우 높은 효율로 분석해 내고 있다. 이때 각각의 단계는 FTMS에 의해서만 가능하거나, 또는 FTMS에 의해 최고의 효율과 정확도로 그 결과를 얻을 수 있다. MASS의 첫단계인 리간드의 화학적 성분 분석은 높은 MMA를 통해서만 가능한 것이다. 그 예로 분자량 615 Da에 해당하는 유기화합물은 수천수만 개가 존재하지만, 분자량 615.2963012에 해당하는 유기화합물은 오직 하나 밖에 존재하지 않는다. 이러한 원리에 의해 아래의 그림에 나타난 RNA와 복합체를 이룬 리간드를  $C_{23}H_{45}N_5O_{14}$ 의 화학성분을 가진 paromomycin인 것으로 판명할 수 있었다.



이밖에도 이 그룹은 FTMS의 장점들을 적극 이용함으로써 RNA-리간드 복합체의 결합세기, 리간드의 결합위치, 그리고 결합의 특이성(specificity) 등에 대한 정보를 매우 높은 속도로 얻어내고 있다. 이에 의해, 이들은 분당 약 100개의 리간드를 5개의 target RNA에 대해 screening하는 높은 효율성의 실험을 수행함으로써, 신약 개발을 전혀 없는 빠른 속도로 이루어내고 있다. 이러한 고효율 실험은 시료준비 과정과 데이터처리과정의 자동화를 요구하고 있으며, 그 근간은 FTMS의 고기능 질량분석능이라 할 수 있다.

## 6절. 국내 프로테오믹스 연구

그동안 국내 프로테오믹스 연구는 주로 2DE/MALDI-TOF 기술에 의존하여 진행되어 왔다. 실례로 서울대 김희준 교수팀은 최근 Hepatocellular carcinoma에 관련하는 것으로 보이는 21개의 표적단백질을 발굴하였으며, 이 중에는 4개의 신규 표적단백질이 포함되어 있음을 보인바 있다(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1031 (2002)). 이외에도 현재 많은 연구팀들이 프로테오믹스 기술을 이용 다양한

연구를 진행하고 있다. 또한 국내 번역학이나 분자생물학은 이미 세계적인 수준에 도달하였으며, 이 분야의 뛰어난 인력을 확보하고 있다. 그러나 이를 지원, 질병 원인 단백질의 목록을 제시할 프로테오믹스 기술의 국내 기술 수준은 아직 도입 단계에 머물고 있으며, 고감도 online separation 기술, electrospray source 기술, dynamic range의 향상을 위한 ion transfer system 개발 기술, 질량분석데이터의 효율적 운용 기술, data mining 기술 등 프로테오믹스 핵심기술의 효율적 활용능력이나 자주적 기술 개발력은 세계적인 수준에 훨씬 미치지 못하고 있는 실정이다. 또한 이를 진행시킬 국내 프로테오믹스 전문인력은 현재 절대 부족 상태이다.

## 7절. 본 연구팀의 프로테오믹스 연구

제3세부과제 연구팀에서는 현재 효율적인 프로테오믹스 분석을 위한 다양한 연구를 진행하고 있다. 본 제3세부과제 책임연구자는 미국 에너지부 소속 Pacific Northwest National Laboratory(PNNL)의 세계적인 proteomics 그룹에서 지난 2년간 연구자로 일하면서, 주요 핵심사업에 참여 많은 프로테오믹스 실무경험을 가지고 있다. 또한 user facility라는 PNNL의 특성상 미국 전역에서 들어오는 각종 공동연구에 참여할 기회를 가졌으며, 이를 통해 다양한 프로테오믹스 시료들을 분석한 경험을 가지고 있다. 본연구실에서는 프로테오믹스의 질량분석학적 기술에 있어 핵심기술의 하나인 dynamic range enhancement를 위한 ion funnel기술을 PNNL로부터 확보 현재 질량분석계에 설치를 위한 준비단계에 있다. 이 기술은 질량분석계의 감도를 크게는 100배 이상 향상시킬 수 있는 기술로, 현재 전 세계적으로 PNNL과 본 연구실에서만 보유하고 있다. 또한 복잡한 프로테오믹스의 효과적 분석을 위한 핵심기술인 고분해능 초고압 capillary LC기술을 가지고 있으며, 이를 질량분석계와 효과적으로 연계할 수 있는 NanoESI기술을 개발하고 있다.

본 연구실에서는 국내에서는 처음으로  $50\ \mu\text{m}$ 이하의 내부반경을 가지고 있는 미세관 충전칼럼(길이 1m 이상)을 자체 제작하였으며, 이를 현재 제작중인 초고압 액체 크로마토그래피 장치와 효과적 연계하기 위한 연구를 수행하고 있다. 참고로 현재 상용 미세관 충전칼럼 중 가장 작은 내부반경을 가지고 있는 칼럼은 Vydac사의 미세관 충전칼럼으로,  $75\ \mu\text{m}$  크기의 내부반경과 20 cm의 길이를 가지고 있으며, 개당 미화 500달러에 판매되고 있다. 물론 이보다 작은 내부반경의 미세관 충전칼럼이나 1 m이상의 긴 칼럼은 구입할 수 없다. 본 연구실에서는 이러한 충전칼럼의 효과적이고, 재현성 있는 제작을 위해, 5만 psi의 초고압 액체를 전달할 수 있는 slurry packing device를 자체 제작하였으며, 이를 통해 초고압 하에서 미세관 충진을 이루어내고 있다(이 장치의 핵심기술에 대한 특허출원을 준비하고 있다.). 다음 그림은 본 연구실에서 사용하고 있는 미세관 칼럼 충전 장치의 사진을 보여주

고 있다. 본 연구실에서는 이 장치를 이용, 30  $\mu\text{m}$  이하의 내부반경을 갖는 초미세 관  $\mu$ -capillary column의 제작을 현재 시도하고 있다. 이러한  $\mu$ -capillary column을 사용한 액체크로마토그래피 기술과 MS/MS기술을 효과적으로 연계함으로써, 질량 분석의 감도를 극대화할 수 있을 것으로 기대하고 있다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. 이차원 전기영동을 통한 lipid raft 단백질 분석

Lipid Raft란 세포막에 존재하는 cholesterol, sphingolipid-rich micro domain으로서, 다양한 신호전달 물질이 모이게 되는 signaling platform의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 특이구조의 존재는 insulin signaling, cholesterol-homeostasis 등의 다양한 signaling event 들이 세포 내에서 보다 효율적으로 매개, 조절되는 것을 가능하게 하며, 이를 뒷받침하는 다양한 연구결과들이 보고되어 있다. 반면, 연구를 위한 이들의 분리정제 방법에 있어서 여러 가지 논란이 야기되고 있는데, 그 중 가장 큰 논란이 되는 점은 이들의 분리가 세포막의 구성분간의 결합양상을 변질시킬 수 있는 4°C 에서 이루어진다는 것이다. 또한 분리에 사용되는 Detergent에 따라서 raft내의 단백질 조성이 다르게 나타나는 사실 또한 관련 연구진행의 난점으로 지적되고 있다. 상기 주제에 대한 연구를 위해, HepG2 cell line내에 존재하는 raft의 분리 정제를 다양한 방법을 통해 진행하였으며, 각 방법을 통해 추출한 raft들로부터 내부의 단백질만을 분리한 뒤, 이차원전기영동을 통해 각각의 분리 방법에 따른 단백질 profile들의 차이점을 비교 분석하였다. 그 결과, 현재 이용되고 있는 TX-100을 사용한 raft의 저온(4°C)분리 법에 비해, brij35를 이용한 분리방법이 보다 많은raft protein들을 보존시키고 있음을 확인하였다. 또한 2차원 전기영동 결과를 토대로 raft에 존재하는 lipid modified 단백질들인 Ras, Src, Fyn들의western blot을 수행한 바, 기존의 보고와는 달리 저온의 분리조건에 비해 생리활성 조건인 37°C<sup>o</sup> 에서 정성적으로, 정량적으로 더 많은 raft protein들이 안정화 되어있다는 사실을 알 수 있었다. 이와 같은 방법으로 분리한 raft 단백질들은, raft내의 cholesterol 을 제거시킴에 따라 대부분 raft로부터 분리되는 양상을 보였으며, 이를 통해 Brij 35를 이용한 생리활성 조건에서의 분리결과가 외부 단백질의 contamination에 의해 야기된 것이 아님을 증명할 수 있었다.

반면 detergent를 이용하지 않고, 세포막의 pH변화를 야기시켜 raft를 분리시키는 Detergent Free 방법의 경우, 다수의 protein들이 cholesterol 제거 시 별다른 영향을 받지 않은 채, raft에 그대로 상존하였는데, 이러한 결과는 상기의 분리법이 raft의 연구에 적절치 않을 수도 있음을 암시하는 것으로 볼 수 있을 것이다. 이들 연구결과를 종합해 볼 때, raft의 고유한 liquid-ordered structure는 생리 활성조건에서도 유지가 될 수 있으며, Brij 35를 이용한 raft의 분리방법이 기존의 방법에 비해 보다 정확한raft의 연구를 가능케 한다는 결론을 내릴 수 있었다.

## 1. Solubilization of lipid raft proteins

본 연구를 진행하기 위해, 가장 먼저 raft protein의 용해에 영향을 미치는 각각의 계면활성제 및 온도의 효과를 이해하기 위해 human hepatocyte cell line인 HepG2 cell로부터 raft를 분리한 후, 다양한 종류의 계면 활성제를 사용하여 raft의 재 용해도를 측정하였다(figure 1). 4°C 와 37°C 두 온도 조건 하에서의 raft의 재 용해도를 확인한 결과, 예상과는 달리 1% TX-100은 raft의 구성지질의 일부를 녹여내는 것을 확인할 수 있었고, 1% Brij 35의 경우 두 조건 모두 대부분의 raft성분을 보존시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는, Brij 35가 raft를 생화학적으로 분리해내는 데 있어 보다 효과적인 도구가 될 가능성을 보여주고 있다. 이와는 반대로 lipid raft내에 존재하는 protein들의 정확한 분석을 위해서는 분리해낸 raft를 효과적으로 용해시키는 방법이 필요할 것이다. 이에 대한 답을 구하기 위해, 같은 방법으로 분리해낸 raft를 이차원 전기영동에 이용하는 sample lysis buffer (4% Chaps, 8M urea)를 처리해 보았다. 그 결과, raft의 많은 부분이 효과 적으로 용해되었는데, 이러한 효과는 lysis buffer 내의 urea 및 thio urea의 농도를 높이고 여기에 중성 계면 활성제의 일종인 60mM octylglucoside를 첨가해 준 경우에 더욱 증가하여 거의 대부분의 raft가 용해됨을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 이후의 raft proteome에 대한 효과적인 분석이 가능하게 되었는데, 기존에 90% 이상의 raft 용해도를 갖는다고 알려진 60mM octylgulcoside 용액은 독립적으로 사용된 경우, 오히려 raft의 용해효과가 미미한 것으로 판명되었다.

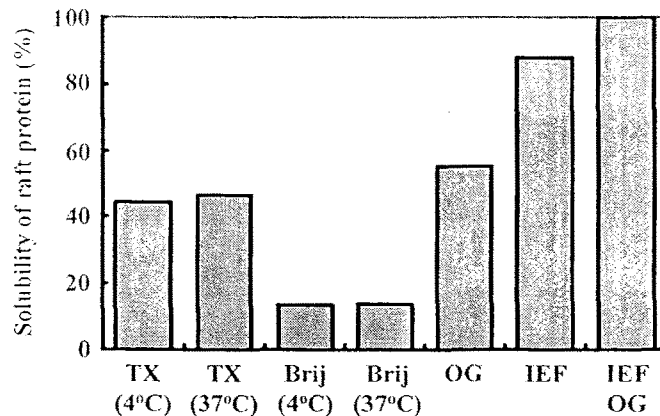


Fig. 1.

Figure 1. Solubilization of detergent-resistant lipid raft proteins. Lipid rafts were isolated from HepG2 cells by Triton X-100, collected, and suspended in various solutions with different detergents at 4°C, and 37°C, respectively. After ultracentrifugation at 20 000 rpm at 4°C for 30 min, the protein concentration from the supernatant was determined by the Bradford method. The results were found to be reproducible in three separate experiments. TX, Triton X-100; Brij, Brij 35; OG, octyl glucoside; IEF, isoelectric focusing buffer.

## 2. More raft proteins were isolated in the presence of Brij35 at physiological temperature

첫 번째 실험결과를 토대로, 다음으로는 가장 효과적인 lipid raft의 분리 조건을 찾기 위해, 다양한 온도 조건하에서 전 실험에서 이용한 두 종류의 계면활성제 (TX-100, Brij 35)를 사용하여 HepG2 cell line으로부터 raft를 분리해낸 뒤, 각 raft sample의 protein 농도를 측정해보았다(figure 2A). 모든 온도 조건에 있어 raft의 band가 사라지지 않고 30% sucrose 층 위에 부유하고 있음을 확인 할 수 있었는데, 이것은 37°C 조건에서 중성 계면활성제가 첨가되는 경우 raft가 완전 용해된다는 기존의 보고와는 상반된 결과였다. 그러나 각 sample들의 protein농도는 실험에 이용된 계면활성제 및 온도조건에서 차이를 보였는데, TX-100 보다는 Brij 35를 사용하여 분리한 raft의 Protein 농도가 상대적으로 높았으며, 온도가 증가함에 따라 그 농도가 약간씩 증가하는, 예상과는 다른 결과를 보여 주었다.

또한, 전자 현미경의 관찰결과는 이용된 계면활성제에 따라 분리된 raft들이 구조적으로 차이가 있음을 보여주었는데(figure 2B), TX-100으로 분리해낸 raft의 경우는 기존에 알려진 바와 같은 상동의 원형형태를 보여주고 있는 반면, Brij 35의 경우 구형의 단면형태는 TX-100의 그것과 유사하나 크기에 있어서는 매우 다양한 양상을 나타내고 있었다. 이러한 결과는 최근에 보고된 바와 같이 Brij 계열의 계면활성제가 TX-100보다 다양한 비 동질 raft군을 분리해내는 데 효과적이라는 사실을 뒷받침 해주는 것으로 볼 수 있었다.

다음으로, 위와 같은 다양한 분리 조건을 통해 추출해낸 lipid raft 들의 보다 명확한 정성분석을 위해, Western blotting을 수행 하였다(figure 3C). 잘 알려진 lipid raft marker protein 인 Flotilin-1의 경우, 주어진 온도 조건에 상관없이 TX-100을 이용하여 분리한 raft에 내재하고 있음을 확인하였으나 다른 raft 내재 protein으로 보고된바 있는 Insulin receptor는 많은 양이 lipid raft fraction으로부터 용해되어 fractionation 의 기저부에 남아있는 것으로 나타났다. Brij 35를 사용하여 얻어낸 lipid raft sample위의 결과와는 차이를 보이는 western blotting 양상을 나타내었는데, 이 경우 Insulin receptor는 온도 조건에 무관하게 많은 양이 raft층에 남아 있음을 보여주었고, Flotilin-1의 경우도 대부분 raft층에 남아있음을 확인하였다. 다만 37°C의 분리조건에서는 Flotilin의 일부가 용해되어 sucrose gradient의 하단부로 이탈하는 것으로 나타났는데, 그럼에도 불구하고 더 많은 양의 protein이 37°C에서 확인 되고 있는 점과, 육안으로 보이는 raft fraction의 양이 온도조건 차이에 영향을 받지 않고 거의 동일한 수준을 보이는 점을 고려 할 때, 고온에서의 계면 활성제 처리가 raft 와 내재 protein들의 결합상태에 영향을 줄 수는 있지만, lipid raft 자체의 구조적 강성을 약화시키지는 않는 것으로 결론 지을 수 있었다. 또한, Brij 계열

의 계면 활성제가 정성적으로도 더 많은 종류의 raft associated protein들을 보존, 분리시킬 수 있다는 최근의 보고를 비추어볼 때, 상기 실험에서 사용된 Brij 35도 그와 유사한 결과를 보여주고 있다고 추론해 볼 수 있었다. 이 같은 결과들을 종합해 볼 때, Brij 35가 정량적으로나 정성적으로 보다 많은 raft들을 시료로부터 분리해 낼 수 있음이 확인 되었다.

전 실험의 결과를 확장하여, 각각의 온도 및 계면활성제의 차이가 raft분리에 주는 영향을 보다 통합적으로 연구하기 위해 동일한 방법으로 준비한 raft sample의 proteome profile을 이차원 전기영동을 통해 전개시켜 보았다. Figure 3에 나타난 바와 같이, 각각의 proteome 분포는 상당히 유사한 양상을 보이고 있으나 각 protein spot의 밀도나, 그 수에 있어서는 각각의 분리조건 별로 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. 사용된 계면활성제에 따른 proteome 전개양상의 비교 시, 예상대로 Brij 35로 분리된 raft의 proteome 전개결과는 TX-100의 그것에 비해 정량 정성적으로 더 많은 protein을 포함하고 있었는데, 이러한 결과는 Brij 35가 분리과정 전반에 걸쳐 더 많은 세포내의 Raft군을 안정화 시켜주고 있다는 유력한 증거가 될 수 있을 것이다. 이러한 전개상의 차이는 온도차에 의한 분리조건 비교에서는 그리 명확하게 드러나지 않는 것을 확인 할 수 있었다.

Lipid raft에 존재하는 protein들의 많은 수는 acetylation 이나 farnesylation등의 modification이 일어난 lipid linker를 가져 raft에 특이적으로 결합하는 것이 가능하다고 알려져 있다. 기존의 보고에 따르면 이러한 결합은 고온의 상태나, 계면활성제의 첨가에 의해 심각하게 약화되어지는 것으로 알려져 왔는데, 본 연구의 진행과정 중에서 확인 된 여러 실험결과는 그러한 보고와는 상반되는 정황을 보여주었다. 이러한 상이점을 보다 정확히 확인하고자 lipid modified anchor를 가지는 raft protein 들인 Src, Lyn에 대한 immunoblotting을 서로 다른 온도조건(4°C, 24°C)에서 분리한 raft에 대해 시행해 보았다. 그 결과, 분리시의 온도나 이용된 계면활성제의 차이에 상관없이 Src이나 Lyn 모두 raft fraction내에 존재하고 있음을 확인 할 수 있었다. 이러한 실험들의 결과들을 모두 종합해 볼 때, 중성 계면활성제 비 용해성 lipid raft는 생리활성 조건에서도 충분히 존재 할 수 있다는 결론을 도출 할 수 있었다.

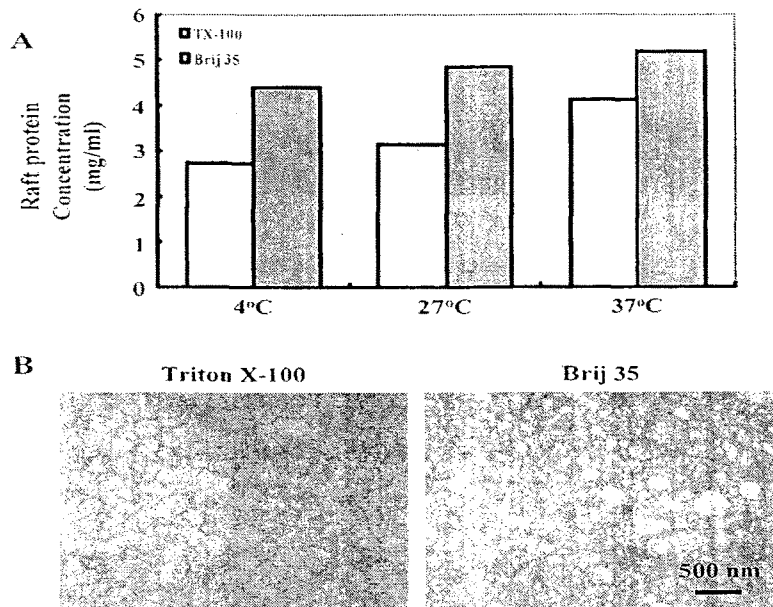


Fig. 2A and B.

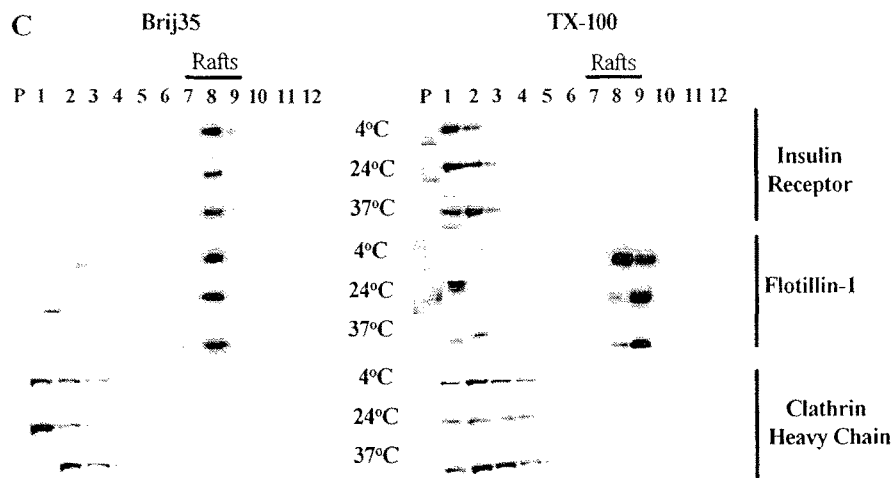
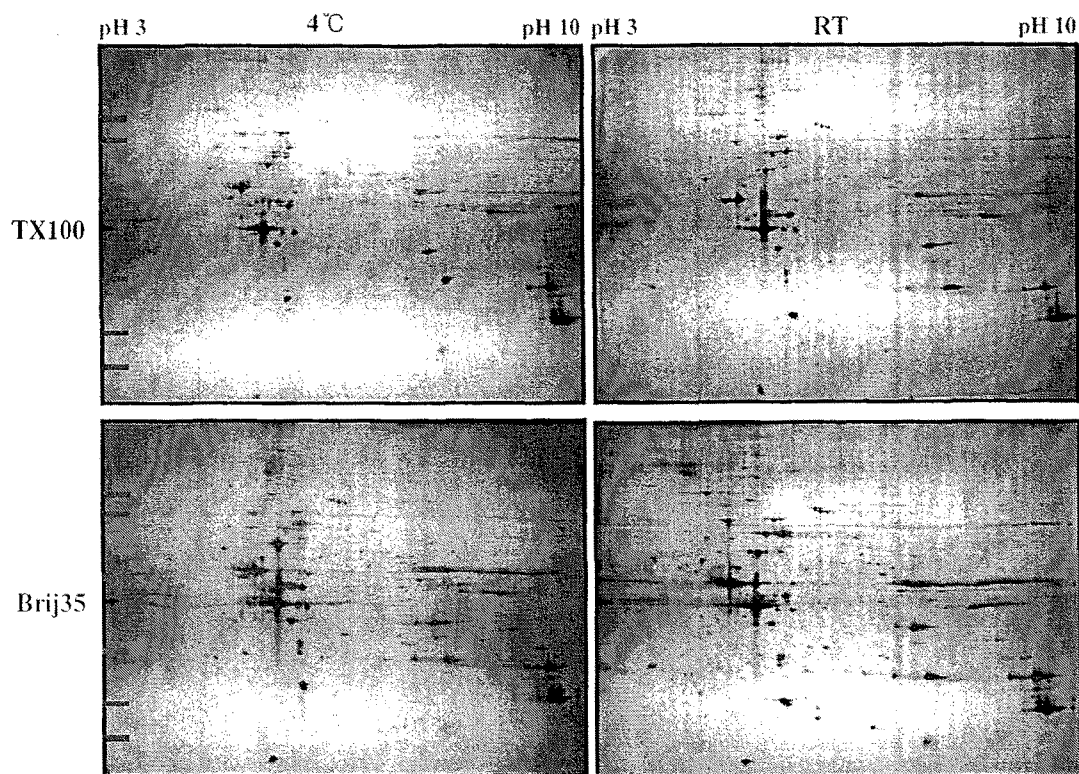


Fig. 2C

Figure 2. Insulin receptor is predominantly found in raft fractions isolated by Brij 35 but not found at all in raft fractions isolated by Triton X-100. Lipid rafts were isolated from HepG2 cells under various conditions with Triton X-100 or Brij 35 at 4°C, room temperature (24°C), or 37°C. Each buoyant lipid raft was collected, and its protein concentration was determined by the Bradford method (A). The results were found to be reproducible in three separate experiments. (B) Morphology of lipid rafts under the electron microscopy. Detergent-resistant lipid rafts, isolated by Triton X-100 (left panel) or by Brij 35 (right panel), were collected and observed under the electron microscopy. (C) Each fraction from the sucrose gradient was analyzed by immunoblotting with anti-insulin receptor, flotillin-1, and clathrin heavy chain antibodies. RT, room temperature.



**Fig. 3**

Figure 3. More proteins are found in rafts isolated by Brij 35 at room temperature (24°C) than by Triton X-100 at 4°C. Lipid rafts were isolated from HepG2 cells grown in four 150mm dishes using either Triton X-100 or Brij 35, at 4°C and room temperature respectively. The rafts were washed with washing buffer and resuspended with 300 mL IEF buffer. Anequal volume (50 mL) of raft proteins from each sample was subjected to 2-D gel electrophoresis, and protein spots were visualized by silver staining. (A) 2-D electrophoresis profiles of lipid raft proteins. (B) Protein spots in a representative box from (A) were further analyzed to find different protein spots in different lipid rafts. Black arrows indicate protein spots that appeared in lipid rafts isolated at room temperature but were absent in the lipid rafts isolated at 4°C. It should be noted that more protein spots were found in lipid rafts isolated by Brij 35 at room temperature.



raft가 Methyl- $\beta$ -cyclodextrin에 더욱 민감하게 영향을 받는 것으로 나타났다.

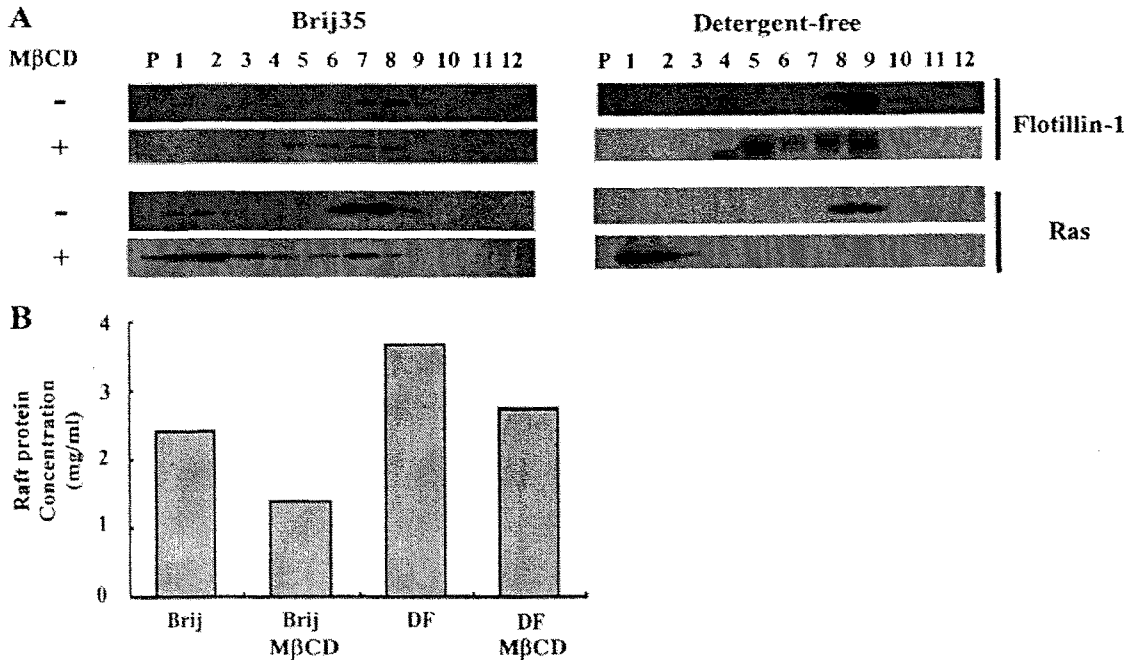


Figure 5. High-pH/carbonate-resistant lipid rafts are insensitive to cholesterol depletion. (A) HepG2 cells were serum-starved for 24 h and then either treated with 10 mM MβCD for 30 min to deprive cellular cholesterol or not treated with 10mM MβCD. Lipid rafts were isolated from the cells by using Brij 35 or a high-pH/carbonate (detergent-free) method, and analyzed by immunoblotting with anti-flotillin-1 and Ras antibodies. (B) The protein concentration from each raft was determined. The results were found to be reproducible in three separate experiments. Brij, Brij 35; DF, detergent-free method, MβCD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

이러한 결과는, 각조건 of raft sample을 이차원 전기영동으로 전개하여 비교한 경우 더욱 극명하게 들어 났는데 (Figure 6A, B) Brij 35로 분리한 raft proteome의 경우, Methyl- $\beta$ -cyclodextrin에 반응하여 정상조건에 비해 많은 수의 protein spot들이 유실되고 있음을 보여주는 반면, sodium-carbonate/high-pH기법으로 분리한 raft의 경우에는 Methyl- $\beta$ -cyclodextrin의 처리 전후의 protein spot의 차이가 거의 없어, 이들 중 많은 수의 protein이 이질 단백질에 의한 오염일 가능성을 강력하게 뒷받침해 주었다. 이러한 사실은 본 연구에서 시행된 Brij 35를 이용한 lipid raft의 생화학적 분리가 기존의 여러 다른 분리기법에 비해서 오염이 없는 온전한 raft의 proteome 분석을 가능케 하는 효과적인 방법임을 강력히 증명해 주는 것이었다.



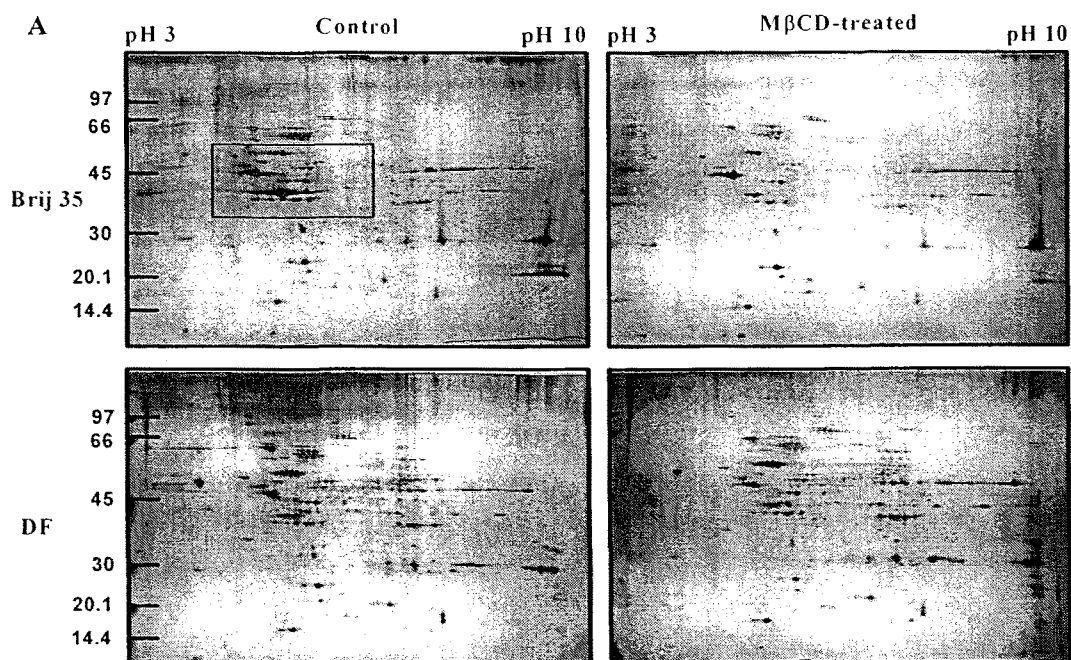


Fig. 6A

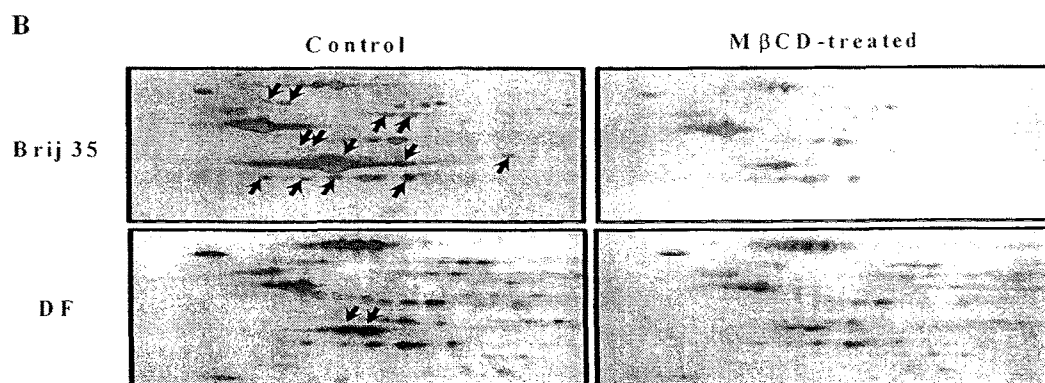


Fig. 6B

Figure 6 High-pH/carbonate-resistant lipid rafts contain many protein contaminants that are not sensitive to cholesterol depletion. HepG2 cells were treated with or without M $\beta$ CD for 1 h, and their lipid rafts were isolated by using Brij 35 or high pH/carbonate. The rafts were resuspended with 300  $\mu$ L IEF buffer. An equal volume (50  $\mu$ L) of raft proteins in each sample were subjected to 2-D gel electrophoresis, and protein spots were visualized by silver staining. (A), 2-D electrophoresis profiles of lipid raft proteins. (B) Protein spots in a representative box from (A) were further analyzed to find different protein spots in different lipid rafts. Black arrows indicate protein spots that disappeared from the lipid rafts after M $\beta$ CD treatment. It should be noted that less protein spots disappeared from lipid rafts isolated by the detergent-free method after cholesterol removal via M $\beta$ CD treatment.

## 2절. LC/MS/MS를 이용한 lipid raft 프로테옴 분석

리피드 래프트는 병원균 침투, cholesterol 항상성 유지, 혈관 형성, 알츠하이머 병, 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있으므로 리피드 래프트에 위치한 단백질을 검증하는 것은 이들의 기능에 중요한 정보를 줄 것임. 이에 본 실험실은 집쥐 간으로부터 리피드 래프트를 추출하여 그 단백질을 capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry로 분석하였음.

총 196개의 단백질이 확인되었으며, 그 중 32%는 리피드 래프트 혹은 세포막에, 24%는 미토콘드리아, 20% 마이크로조옴, 7%는 기타, 그리고 나머지 17%는 기능미상의 단백질이었음. 예를 들어 receptor, G protein, ATP-binding cassette, GPI-anchored protein등이 본 실험실에서 확인됨. 그러나 많은 미토콘드리아 단백질이 세포 표면 막에서 검출되었는바 이에 우리는 미토콘드리아 중요 단백질 중 하나인 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$ 가 간유래 세포인 HepG2의 세포 표면에 위치한다는 현상을 면역형광법, biotinylation, 세포 소기관 분리법을 통해 검증하였음.

Fluid mosaic model에 따르면 세포막의 주요 구성 성분인 인지질은 그 상호작용이 느슨하고 측면확산이 빠르기 때문에 유동성이 상당히 크다. 즉 이 인지질의 바다에 떠 있는 단백질 역시 유동성이 상당히 클 수밖에 없음. 신호전달물질들이 유동성이 큰 원형질막에 제멋대로 위치한다면 신호전달과정자체의 효율성과 속도는 상당히 떨어질 수밖에 없음. 따라서 이러한 신호전달물질들을 일정한 장소에 모이게 하여 조직화시킬 수 있는 전략이 필요한 데, 이 신호전달물질들은 '인지질의 바다'에 떠 있는 뗏목, 즉 리피드 래프트 또는 caveolae라고 불리는 분획화된 구조가 원형질막에 존재함으로써 신호전달과정이 효율적으로 이루어질 수 있음.

리피드 래프트는 대체적으로 콜레스테롤과 당지질로 이루어져 있고 이러한 지질사이의 상호작용은 매우 강하여 여러 계면활성제가 녹지 않는 성질을 가지고 있음. 또한 설탕구배 초원심분리 시 뜨게 되는 성질, 즉 낮은 밀도를 가지고 있음. 따라서 리피드 래프트는 detergent-insolubility와 low density의 생화학적 성질을 지니고, 이 성질을 이용하여 여러 세포 소기관으로부터 분리 정제할 수 있음.

Lipid rafts에는 EGF, PDGF, insulin, IGF, VEGF, TNF 등에 대한 수용체뿐만 아니라 여러 신호전달물질을 독점적으로 지니고 있으므로 lipid rafts는 신호전달과정의 중심지라 할 수 있음. 따라서 본 연구진은 리피드 래프트를 순수 정제하여 그에 속한 단백질체를 고감도 액체 크로마토그래피로 분석한 후 여러 실험 기법을 이용하여 제 2형 당뇨병환자의 근육에서 그 발현 양이 급격하게 감소하는 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$ 가 리피드 래프트에 존재함을 증명함

## 1. 집쥐의 간으로부터 리피드 래프트의 추출

계면활성제 불용해성과 낮은 밀도의 성질을 이용하여 리피드래프트를 분리하기 위하여 쥐의 간을 1% Triton X-100을 포함하는 lysis buffer로 처리한 후 설탕구배 초원심분리 하여 리피드래프트를 분리한다. 이 리피드래프트를 수거하여 전자현미경으로 관찰하였을 때, 소낭 구조를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 리피드래프트의 표식단백질들인 caveolin-1, flotillin-1, Fyn 이 리피드래프트에만 배타적으로 존재함을 western blot으로 확인하였다. (figure 7.B)

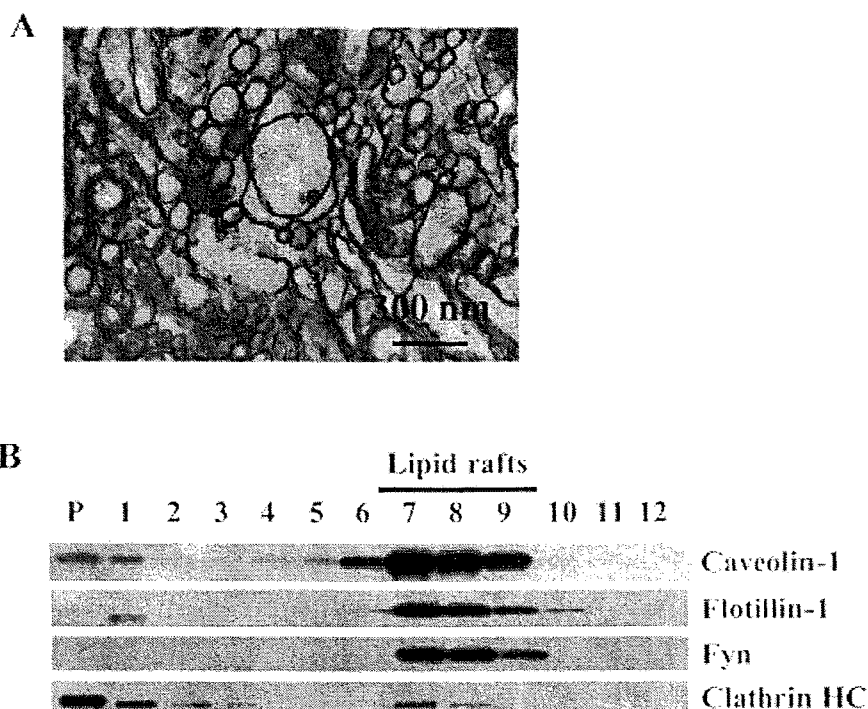


Figure 7. Isolation of detergent-resistant rafts from rat liver. Lipid rafts from rat liver were isolated after discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation. A buoyant and opaque band after ultracentrifugation was analyzed by electron microscopy and immunoblotting. (A) Electron microscopic analysis of detergent-resistant rafts showed that rafts were composed of membrane vesicles of different sizes. (B) identification of raft fractions by immunoblotting with anticaveolin-1, flotillin-1, fyn, and clathrin heavy chain antibodies. After ultracentrifugation, the sucrose gradient was fractionated from the bottom to the top. Each fraction from the sucrose gradient was analyzed by immunoblotting. P indicates pellet after ultracentrifugation.

## 2. 리피드 래프트의 트립신 분해

Figure 7A에서 보듯이 리피드래프트는 소낭으로 구성되어 있기 때문에 소낭 안쪽에는 트립신과 같은 단백질분해효소가 작용할 수 없음. 따라서 리피드래프트에 트립신을 넣은 후 짧은 시간동안 초음파 분쇄하여 트립신이 리피드래프트 소낭에 들

어가도록 유도하였음. 그림 2는 트립신으로 처리된 단백질들이 거의 완벽하게 분해되었음을 보여주고 있음. 본 실험실에서는 트립신과 LysC를 동시에 처리하였을 때에도 단백질이 거의 완벽하게 분해되었음을 확인하였음.

### 3. 리프트 래프트 펩타이드의 LC/MS/MS 적용

트립신으로 분해된 리프트래프트 펩타이드를 미세소관 역상 액체 크로마토그래피 (capillary reverse-phase liquid chromatography, 혹은 cRPLC)에 적용하였음.

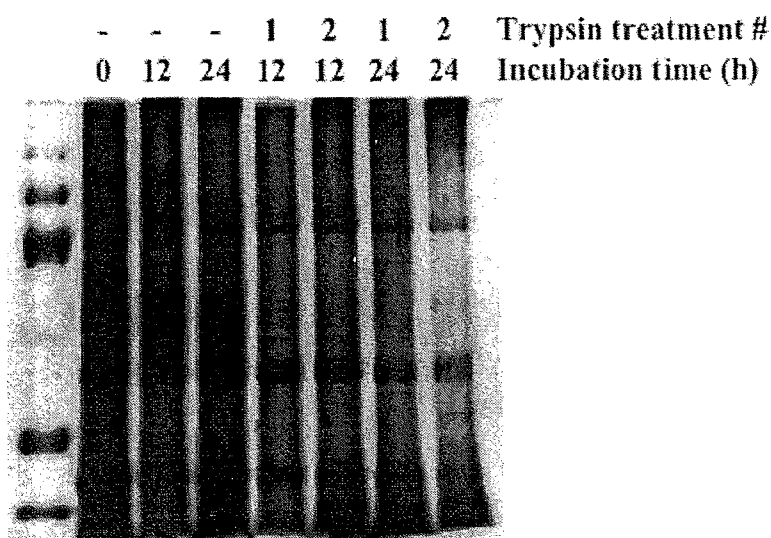


Figure 8. Trypsin digestion of raft proteins. Raft proteins were mixed with trypsin once or twice, and incubated for 12 h or 24 h after brief sonication. The trypsinized raft proteins were analyzed by SDS-PAGE, and visualized by silver-staining

Figure 9에서 보듯이 수많은 래프트 펩티드들을 LC/MS/MS를 통해 측정하였으며, 동시에 제시된 텐덤질량분석 스펙트럼들에서 알 수 있듯이 측정되는 펩티드의 아미노산 서열정보를 다수 획득함으로써, 펩티드와 이후의 단백질 동정의 신뢰도를 높일 수 있었다.

특히 이 실험을 통해 figure 10에 나타낸 asialoglycoprotein을 동정할 수 있었는데, transmembrane domain을 제외한 세포막 내부와 외부 쪽의 단백질 서열 정보를 본 연구단이 개발한 방법을 통해 얻을 수 있음을 알 수 있다. 이는 초음파분쇄와 트

립신 소화의 병행처리가 리피드래프트 단백질의 소화에 매우 효과적임을 잘 보여주는 것이다.

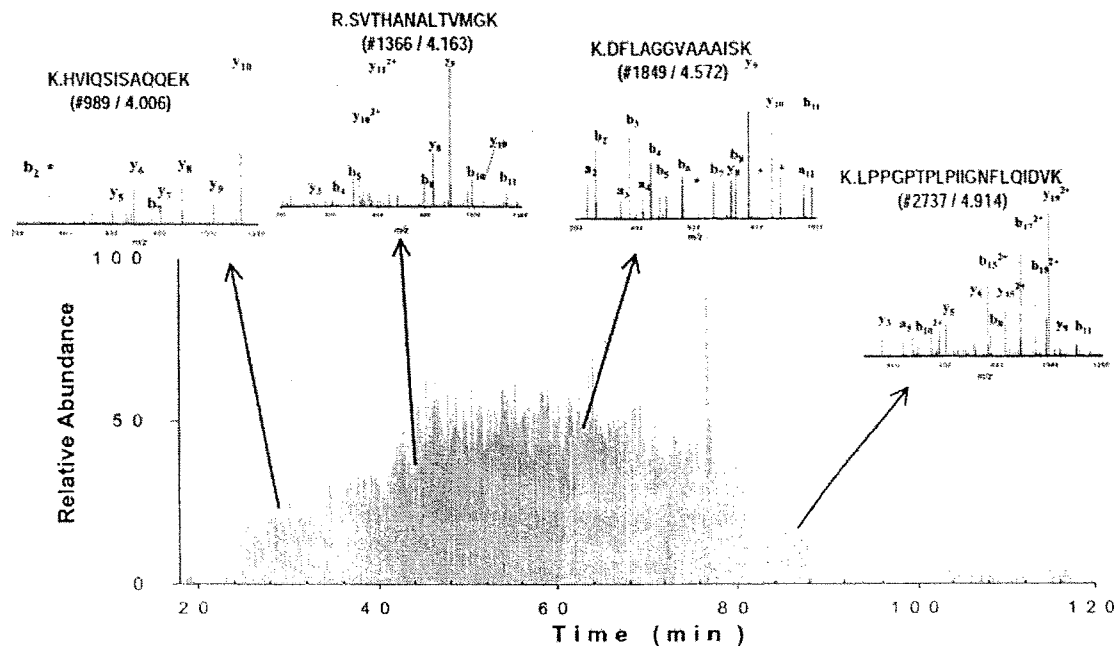


Figure 9. Total ion chromatogram of an LC/MS/MS experiment using tryptic peptides of raft proteins from rat liver. Confident peptide assignments were exemplified by a few representative MS/MS spectra.

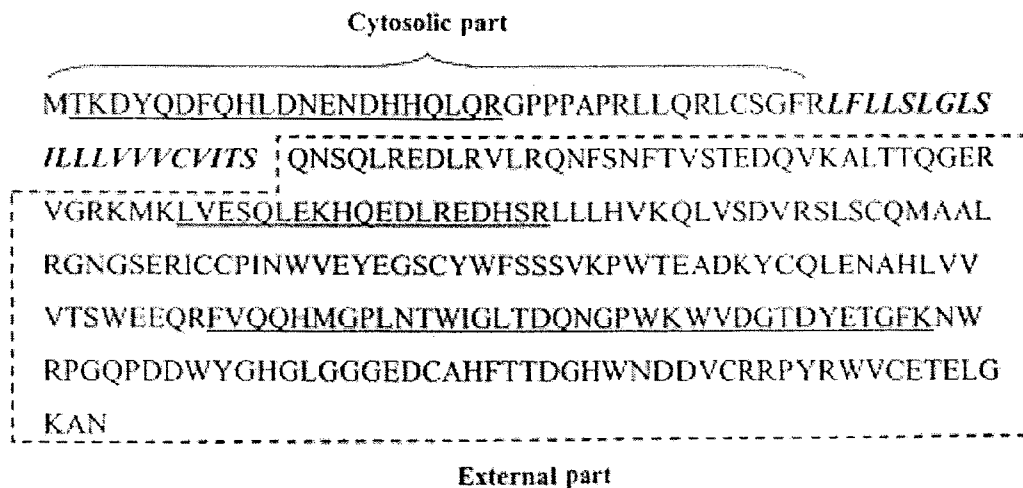


Figure 10. The sequence coverage of asialoglycoprotein receptor1. The transmembrane portion is designated by bold and italic fonts. The peptide sequences observed in the experiments are noted by underline.

Protein list	
3-oxo-5- $\alpha$ -steroid 4-dehydrogenase 1	G $\alpha$ 12, G( $\beta$ )/G(S)/G(O) $\gamma$ 12 and G(S) $\alpha$ extra large
5'-nucleotidase	G2/mitotic-specific cyclin B1
acidic ribosomal protein P0	glucose-6-phosphatase, transport protein 1
antigen peptide transporter 2	hemoglobin $\alpha$ 1 and $\alpha$ 2 chains
apslysis ras-related homolog A2	hypothetical protein : NP_599237, XP_224969 and XP_220451
arachidonic acid epoxygenase	integral membrane protein, Tmp21-1 (p23)
asialoglycoprotein receptor 1 and 2	kidney aminopeptidase M
ABC transporter : B11, C2 and D3	kynurenine 3-hydroxylase
ATP synthase: $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , $\gamma$ , b, d, e, F6 and O	lectin, mannose-binding, 1
ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting: $\alpha$ 1, $\beta$ 1 and $\beta$ 3	low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor 2
ATPase H <sup>+</sup> transporting $\beta$ 2	low molecular mass ubiquinone-binding protein
Basigin	Membrane associated progesterone receptor component 1
betaine-homocysteine S-methyltransferase	microsomal glutathione S-transferase 1
bile acid CoA ligase	mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein
calnexin precursor	monoamine oxidase: A and B
carbamoyl-phosphate synthetase 1	multidrug resistance-associated protein 6
carboxyl ester lipase	multidrug resistance protein 2
CD36 antigen-like 2	myosin 1b
cytochrome b5	oxidative 17 $\beta$ hydroxysteroid dehydrogenase type 6
cytochrome c oxidase: 2, 4a, 5a, 5b, 6a1, 6c and 7a3	P450 (cytochrome) oxidoreductase
cytochrome P450: 1A2, 2A1, 2A3, 2B3, 2C11, 2C22, 2C39, 2E1, 4A1, 4A2, 4A3 and PCN	paraoxonase 1
DAPIT protein	PI3-kinase $\beta$
diaphorase 1	phosphoinositide phosphatase SAC1
dipeptidase 1	phospholipase B
ectonucleotide-pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 and 3	plasminogen activator inhibitor 2 type A
epoxide hydrolase 1	prohibitin
estrogen sulfotransferase	putative N-acetyltransferase Camello 4
fatty-acid amide hydrolase	ribophorin: 1 and 2
fatty acid Coenzyme A ligase, long chain: 2 and 5	RT1 class I histocompatibility antigen, AA $\alpha$ chain
fatty aldehyde dehydrogenase	sequences not having NCBI accession number (IPI00382258.1, IPI00382300.1, IPI00188033.1, IPI00204793.1, IPI00203538.1, IPI00188906.1, IPI00209714.1 and IPI00206021.1)
flotillin 2	SH3 domain protein 2A
sideroflexin: 1 and 3	similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1
similar to adenine nucleotide translocase	similar to NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ 10-like protein
similar to adenylate kinase 7	similar to nicotinamide nucleotide transhydrogenase
similar to alcohol dehydrogenase Pan1b	similar to nuclear domain 10 protein
similar to alcohol dehydrogenase Pan1b-like protein	similar to o-methyltransferase family member (5C530)
similar to ankyrin	similar to olfactory receptor MOR183-2
similar to ABC transporter : A6 and A8a	similar to oligosaccharyltransferase
similar to Atp6v1e1 protein	similar to oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase
similar to ATPase, V1A1	similar to ATPase class I type 11C
similar to B-cell receptor-associated protein 31	similar to protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 5
similar to brain apoptosis-associated tyrosine kinase	similar to putative transmembrane protein PTG
similar to CG6105-PA	similar to RIKEN cDNA : XP_215413, XP_217211, XP_214926, XP_214457, XP_214994, XP_341407, XP_217417, XP_222995 and XP_236574
	similar to serine beta lactamase-like protein LACT-1
similar to cytochrome c-1	similar to signal recognition particle, 72 kDa subunit
similar to DC6 protein	similar to solute carrier family 25a13
similar to expressed sequence A1788959	similar to stromal interaction molecule 1
similar to Fliih protein	similar to transmembrane protein TM9SF3
similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	similar to ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein
similar to gp25L2 protein	
similar to histidine-rich membrane protein KE4	similar to ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein 1 and 2
similar to hypothetical protein:XP_225987, XP_217094, XP_224605, XP_232840	smooth muscle-specific 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3
similar to LRG-47	solute carrier family: 4a1, 10a1, 16a1, 16a7, 21a3, 21a10, 22a2, 25a1, 25a3, 25a5, 25a10, 25a20, 26a1, 27a2 and 38a3
similar to Lrrc5 protein	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
similar to microsomal glutathione S-transferase 3	trifunctional enzyme $\alpha$
similar to mitochondrial carrier homolog 2	UDP-glucuronosyltransferase: 1A1, 2B1, 2B2, 2B3, 2B6
similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit	vesicle-associated membrane protein-associated protein A
similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1: $\alpha$ 6, $\alpha$ 9 and $\beta$ 10	voltage-dependent anion channel 1

Table 1. Detergent-insoluble lipid raft proteins identified by capillary LC and MS/MS

#### 4. 리피드래프트 단백질의 카테고리

본 연구단은 이미 위와 같은 방법으로 리피드래프트 시료에서 197 개의 단백질을 동정할 수 있었다. (Table 1) 특히 많은 단백질들이 여러 개의 펩타이드 정보에 의해 동정되는 등 신뢰도 높은 동정을 실현할 수 있었다. 이 단백질 중 32%는 이미 래프트에 존재하는 것이 알려지거나, 또는 원형질 세포막에 존재하는 것으로 알려진 단백질들이고, 24%는 미토콘드리아, 20%는 마이크로조움, 7%는 기타, 그리고 나머지 17%는 기능미상의 단백질이었다. (figure 11)

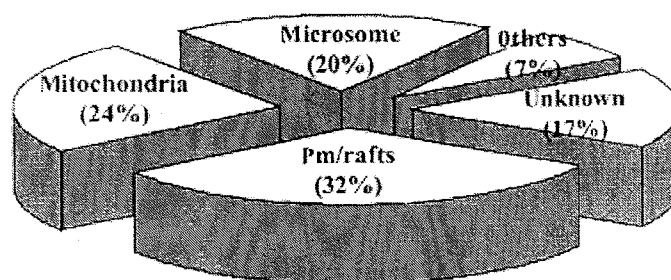


Figure 11. Functional categorization of detergent-resistant raft proteins. One hundred ninety-seven detergent-resistant raft proteins were categorized to pm/rafts (plasma membrane and rafts), mitochondria, microsome, others, and unknown depending on their cellular localization.

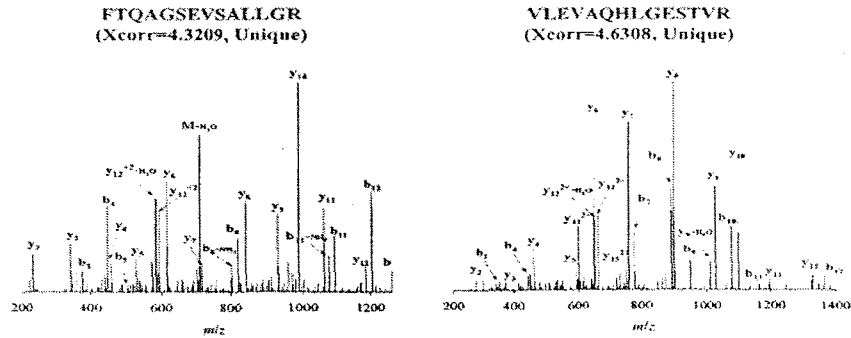
#### 5. 세포 표면과 리피드래프트에서 ATP synthase complex의 확인

이렇게 확인된 단백질 중 특히 미토콘드리아 단백질이 많이 동정되었는데, 이는 여러 가지로 해석될 수 있을 것이다. 즉, 리피드래프트의 오염, 미토콘드리아 단백질의 리피드래프트에의 존재 등으로 그 가능성을 예측할 수 있음. 특히 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$ 는 상당히 높은 펩타이드 coverage로 확인되었음. (figure 12)

이러한 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$ 는 미토콘드리아에서 만이 아니라 세포표면에서도 발현됨을 다양한 실험방법으로 확인하였음.

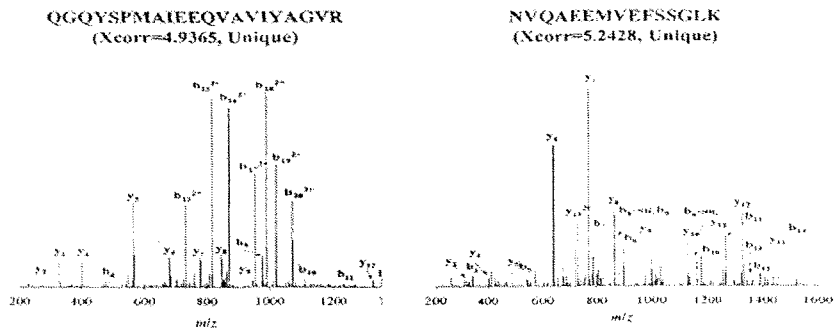
가. 세포 permeabilization 없이 면역형광법을 시행. Figure 13에서 보듯이 ATP 합성효소  $\alpha$ 와  $\beta$ 는 각각 세포표면에서 발현되었음. 특히 lipid raft 표식 단백질인 5'-nucleotidase와 placental alkaline phosphatase와 같이 발현되었음. 이는 ATP 합성효소들이 세포표면의 lipid raft에서 발현됨을 증명하고 있음.

ATP synthase  $\beta$  (Coverage 50.3 %)



MLSLVGRVASASAGALRGLNPLAALPQAHLLLRTAPAGVHPARDYAAQSSAPKAGTATGQIV  
AVIGAVVDVQFDEGLPILNALEVQGRESRLVLEVAQHLGESTVRTIAMDGTGLVRCQKVLDS  
GAPIKIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKTKQFAPHAEAFEFIEMSVEQEILVTGIKYYDLLAP  
YAKGGKIGLEGGAGVGKTVLIMELINNAKAHGGYSVFAGVGERTREGNDLYHEMIESGVINL  
KDATSKVALVYGOMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDOEGQDVLFFIDNIFRFTQAGSEVSALL  
GRIPSAVGYQPTLATDMGMTMQRITTTKKSITSVQAIYVPADDLTDPAPATFFAHLDAITVLSR  
AIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIYGSEHYDVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDLSEEDKLT  
YSRARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHMGLVPLKTIKGFQQLAGDYDHLPEQAFYVMVGPIEEAV  
AKADKLAEEHGS

ATP synthase  $\alpha$  (Coverage 41.6 %)



MLSVRIAAAVARALPRRAGLVSKNALGSSFVGYRNLHASNTRLQKTGTAEMSSILFEERILGADTSVD  
LEETGRVLSIGDGIARVHGLRNVQAEEMVEFSSGLKGMNLNLEPDNVGVYVFGNDKLIKEGDIVKR  
TGAIVDYPVGDPELLGRVYDAIGNAIDGKGPVGSKIRRRVGLKAPGHPRIYSYREPMOTGKAVDSLY  
PIGRGQRELHGDRQTGKTSIAIDTIINOKRENDGTDEKKKLYCIYVAIGQKRSTVAQLVKRLTDADA  
MKYTIIVSATASDAAPLQYLAPYSGCSMGEYFRDNGKHALHYDDLKQAVAVYRMSIILRRPPGR  
EAYPGDVYFYLHSRLLERAAMNDSFEGGSLTALPVIETQAGDVSAYIPTNVISITDCQIFLETIFYK  
GIRPAINVGLSVSRVCSAAQTRAMKQVAGTMKLELAQYREVAFAAQFGSDLDAATQQLLSRGVRL  
TELLKQGOYSPMAIEEQVAVIYAGVRGYLDKLEPSKITKFESAFLSHVYSOHOSLLGNIRSDGKISEQ  
SDAKLKEIVTNFLAGFER

Figure 12. Protein sequence coverages of ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  obtained by the identified peptides (denoted by underlines) after LC/MS/MS experiments on the whole raft proteome. Some representative MS/MS spectra demonstrate highly confident protein identifications for these proteins.

나. HepG2 세포를 먼저 막을 통과할 수 없는 biotin으로 처리하였음 (surface biotinylation). 이 세포는 RIPA buffer로 처리한 후 그 lysate를 avidin-cojugated agarose bead와 반응시켰다. 이 때 침전물을 anti-ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$  항체로 western blot하였다. 그림 14A에서 보듯이 biotinylation 후 ATP 합성효소  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 밴드가 분명하게 나타남. 이는 ATP 합성효소  $\alpha$ 와  $\beta$ 가 세포표면에 있음을 명확하게



증명하는 것임 또한 cell surface biotinylation 후, Anti-ATP synthase  $\alpha$ 항체로 면역침전 후 avidin-cojugated HRP로 western blot 하였음. Figure 14B에서 보듯이 세포표면에 ATP synthase  $\alpha$ 와 결합하는 몇 개의 단백질을 관찰할 수 있음. 이는 세포표면에 ATP synthase  $\alpha$ 의 복합체가 있음을 증명하는 것임.

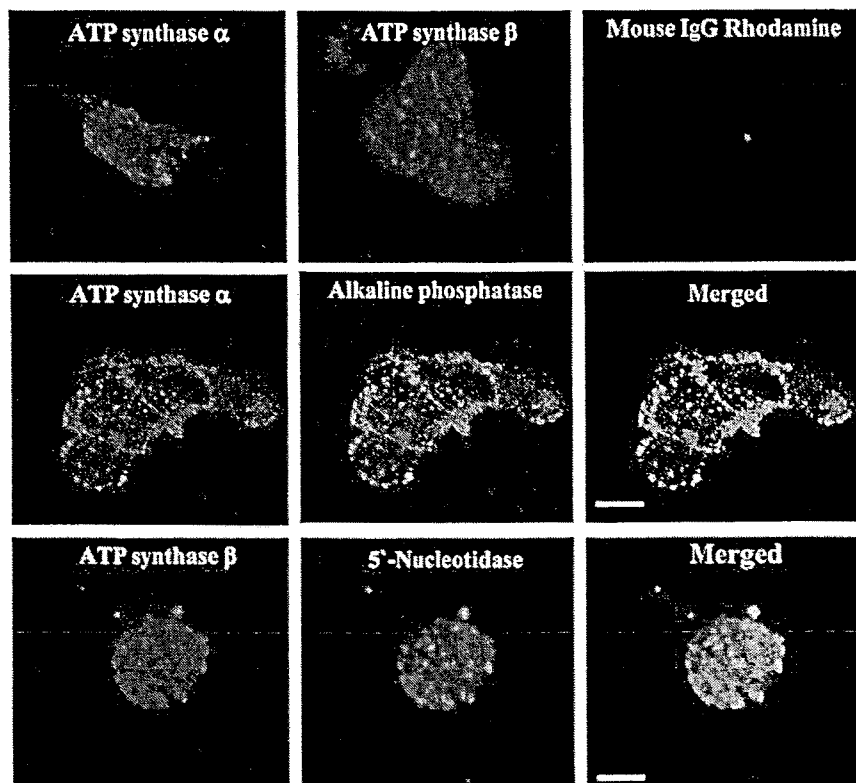


Figure 13. The surface expression of ATP synthase complex on HepG2 cells. Immuno fluorescence of ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ . HepG2 cells were immuno stained with antiATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  antibodies and mock IgG (top panel). HepG2 cells were co immunostained with antiATP synthase  $\alpha$  and placental alkaline phosphatase (middle panel). HepG2 cells were coimmunostained with antiATP synthase  $\beta$  and 5'-nucleotidase antibodies (bottom panel).

다. 세포 소기관 분리법을 이용, 생쥐의 간에서 분리된 원형질막과 미토콘드리아의 western blot 실험에서 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$ 가 원형질막에도 존재함을 증명. (figure 14C)

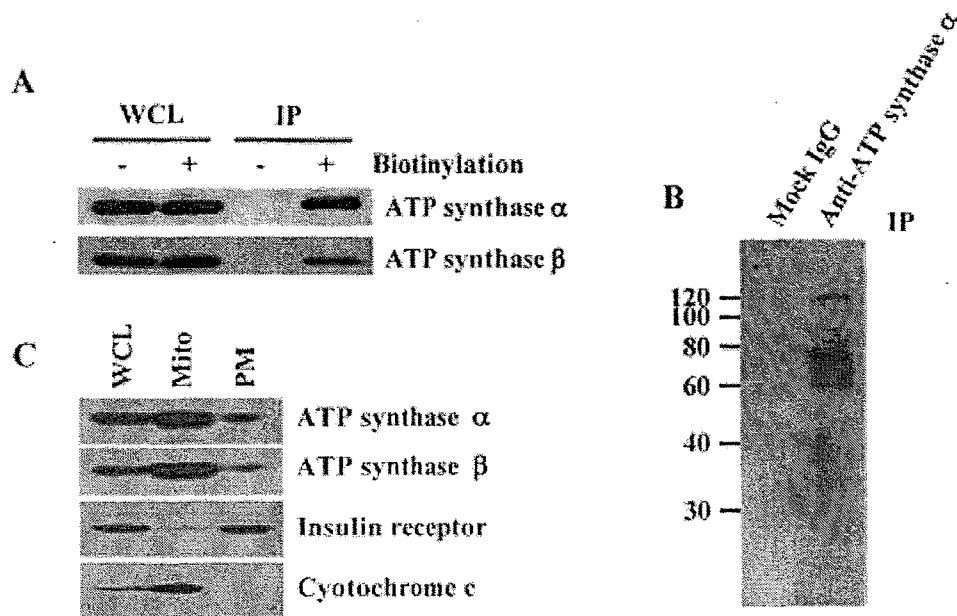


Figure 14. ATP synthase complex is expressed on the outer leaflet of the plasma membrane. (A) HepG2 cells were labeled with membrane impermeable biotin and lysed with SDS lysis buffer. The lysates were precipitated with avidin-conjugated agarose beads and the precipitates were analyzed with antiATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  antibodies. (B) Biotin-labeled HepG2 cells were lysed with octylglucoside lysis buffer. The lysates were immunoprecipitated with antiATP synthase  $\alpha$  antibody, and the immunoprecipitates were analyzed with avidin-conjugated HRP. (C) Plasma membrane and mitochondria were prepared from mouse liver. Proteins (5 mg) from whole cell lysates (WCL), plasma membrane (PM), and mitochondria (Mito) were analyzed by immunoblotting with antiATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ , insulin receptor, and cytochrome c antibodies.

라. HepG2세포에서 리피드 래프트를 분리한 후 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$ 로 western blot 하였음. Figure 15A에서 보듯이 이 단백질들은 리피드 래프트에 있음. 또한 NIH 3T3, HeLa, 293T, HepG2 세포들을 1% Triton X-100으로 용해시킨 후 detergent-soluble과 insoluble로 나눴음 (figure 15B). HepG2와 HeLa에서는 이 단백질들이 detergent-insoluble fraction에도 나타났음. 이는 ATP synthase가 이들 세포에서는 리피드 래프트에 있음을 보여주는 것임.

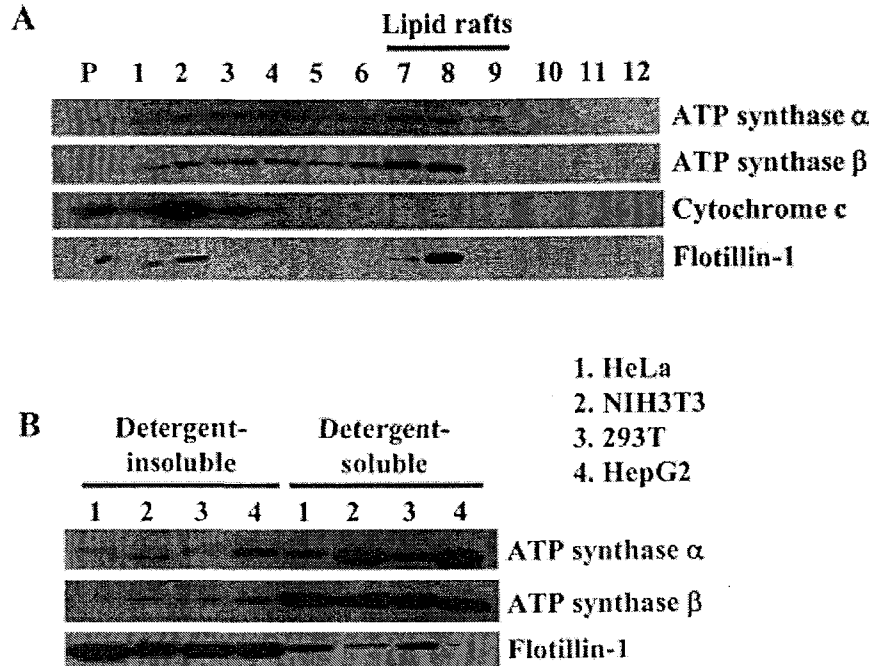


Figure 15. ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  are localized in lipid rafts. (A) Lipid rafts were isolated from HepG2 cells by sucrose gradient ultracentrifugation. Each fraction after sucrose gradient ultracentrifugation was immunoblotted with antiATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ , flotillin-1, and cytochrome c antibodies. (B) Detergentinsolubility of ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ . HeLa, NIH3T3, 293T, and HepG2 cells were lysed with Triton X-100 lysis buffer. After microcentrifugation at 0°C for 10 min, the pellet and supernatant were analyzed by immunoblotting with antiATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ , cytochrome c and flotillin-1 antibodies.

이와 같은 실험 결과들을 종합해 볼 때 미토콘드리아 단백질로 알려졌던 ATP synthase  $\alpha$  와  $\beta$ 가 세포의 원형질 막 특히 리피드 래프트에 존재하고 있다는 현상을 확인할 수 있음.

### 3절. Lipid raft에 존재하는 ATP 합성 효소의 기능연구

세포 내 존재하는 많은 단백질들은 본래의 기능 외에도 다른 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 기능은 그 단백질의 세포내에서 존재하는 위치에 의존하기도 한다. 최근 연구들에 의하면 이러한 단백질 중 mitochondria에만 존재하는 것으로 알려져 있던 ATP synthase complex가 세포막에도 존재하여 혈관 형성을 억제하는 것으로 알려진 endostatin에 결합하거나, 간세포에서는 콜레스테롤을 수송하는 HDL의 수용체로서 기능할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 지방세포에서 Mitochondria는 lipid 생합성 과정 중에 필요한 acetyl-CoA와 ATP를 공급해주는 세포소기관으로 알려져 있고, ATP synthase가 mitochondria의 내막에 존재하여 세포내 ATP를 공급해주는 기능을 하고 있다. 하지만 최근에 의하면 지방세포의 밖에도 ATP가 존재하고 있고 이러한 세포 밖 ATP는 지방세포의 분화과정을 촉진시키거나 세포막에 존재하는 ATP 혹은 ADP, adenosine 수용체에 결합하여 세포활성을 증가시키는 것으로 알려졌다.

본 실험에서는 먼저 지방세포의 세포막에 ATP synthase 가 존재하는지 확인하기 위해 지방세포의 일종인 3T3L1 세포를 분화시키면서 ATP synthase complex 구성 성분인  $\alpha$ 와  $\beta$  subunit의 발현을 western blotting으로 확인하였고, 다양한 방법을 통해 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$  subunits이 mitochondria 뿐만 아니라 세포막에 존재하고 있음을 확인하였다. 흥미롭게도 이러한 세포막 ATP synthase는 세포신호전달에 중요한 기능을 하고 있는 세포막 구성성분 중의 하나인 lipid rafts에 존재하고 있었다. 세포막에 존재하고 있는 ATP synthase가 실제로 세포 밖 ATP를 생성할 수 있는지 확인하기 위해 ADP와 phosphate를 외부에서 처리하였고 ATP synthase를 억제하는 것으로 알려진 oligomycin과 carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone를 처리하였다. 예상했던 대로 이러한 억제제를 처리하였을 때 ATP 생성이 억제되었고, 또한 세포 외부의 PH에 의존하여 ATP 생성이 조절되었다. 따라서 세포막에 존재하는 ATP synthase가 세포 밖 ATP를 생성할 수 있음을 밝혀내었다. 지방세포가 분화하는 과정 동안 mitochondria의 변화를 확인하기 위해 지방세포의 일종인 3T3L1 세포를 분화 유도하였고 전자현미경 사진으로 분화 전 후를 비교하였다. 지방세포가 분화하게 되면 mitochondria의 수가 20배 이상 증가하였고 세포 내부를 대부분 차지하게 되었음을 확인하였다. 또한 분화 후의 mitochondria는 분화 전에 비해서 더 길어졌고 내막구조도 더 거대해 졌음을 알 수 있다.(figure 16A) 또한 western blotting을 수행하여 지방세포의 분화과정 중에 ATP synthase  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits의 발현이 분화 직후 시간이 지날수록 증가하고 있음을 확인하였다. 지방세포 marker 단백질로서 PPAR $\gamma$ 가 사용되었다.(figure 16B)

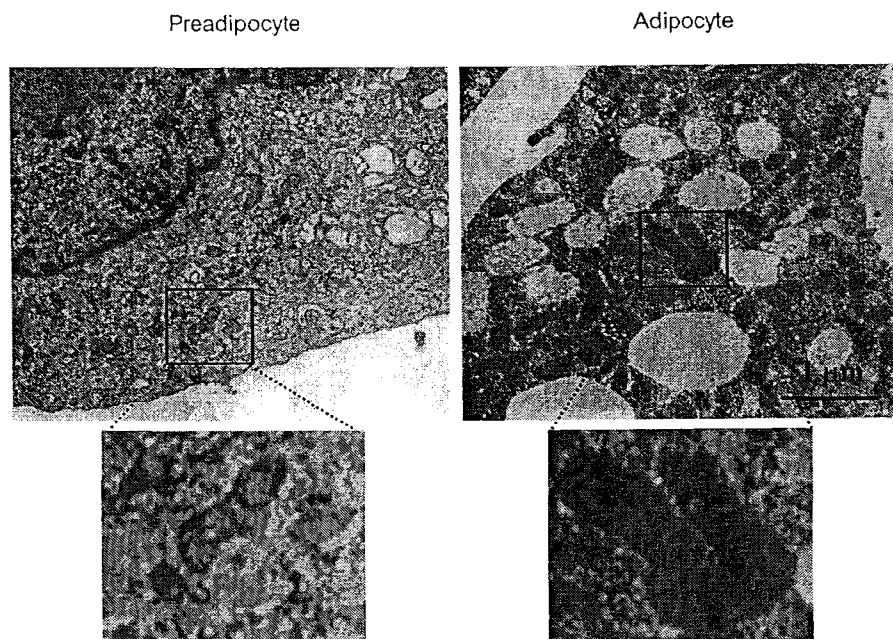


Figure 16A. Mitochondria are packed full in fully - differentiated adipocytes. On day 8 of differentiation, 3T3-L1 cells were used as fully - differentiated adipocytes. 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes were prepared for electron microscopy (magnification,  $\times 25,000$ ). Insets in upper panels were enlarged in bottom panels to see mitochondrial morphologyn detail.

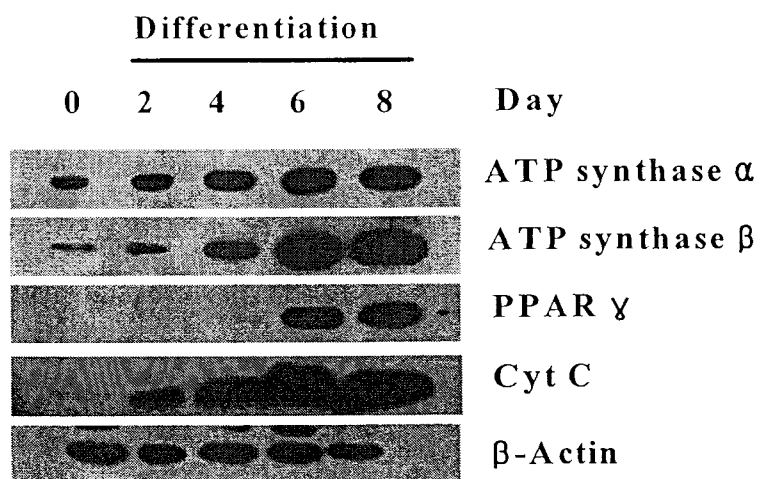


Figure 16B. The expression of ATP synthase complex is highly induced during 3T3-L1 adipogenesis. 3T3-L1 preadipocytes were differentiated to adipocytes for 0, 2, 4, 6, and 8 days. The differentiated adipocytes were lysed with SDS lysis buffer, and the lysates were analyzed by immunoblotting with anti-ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ , cytochrome c, PPAR $\gamma$ , and insulin receptor antibodies.

과거의 연구들에 의하면 ATP synthase가 내피세포(endothelial cells)와 간세포(hepatocyte)의 세포막에 존재하여 angiostatin, EAMP II, 혹은 Apo-AI 과 결합할 수 있다. 하지만 이러한 세포 이외의 세포에서는 ATP synthase의 세포막 존재가 거의 알려져 있지 않다. 지방세포에서 ATP synthase가 세포막에 존재하는지 확인하기 위해 3T3L1의 분화 전과 분화 후의 세포를 ATP synthase  $\alpha$ ,  $\beta$  antibody로 면역형광염색을 수행하였다.(figure 17A) 또한 지방세포를 biotin으로 세포 표면을 코팅한 후에 세포를 파괴시킨 후 biotin에만 특별하게 결합하는 avidin agarose beads로 biotin이 붙어 있는 단백질을 isolation 한 후, ATP synthase complex를 western blotting으로 확인하였다.(figure 17B) 이외에도 ATP synthase  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits이 세포표면에 존재하고 있음을 입증하기 위해 세포의 mitochondria와 세포막을 설탕농도구배 원심분리를 이용하여 분리하였다.(figure 17C) 그림에서 보이는 것처럼 지방세포가 분화된 뒤 세포 표면에서 ATP synthase  $\alpha, \beta$ 가 분화 전 세포에 비해 더 많이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

Figure 17C에서 보면 insulin 수용체는 세포막에만 존재하고 있는 반면 cytochrome C는 mitochondria에만 존재하고 있는 것으로 보아 mitochondria의 단백질 중 ATP synthase complex 만이 세포막에 특별하게 존재하고 있음을 알 수 있다.

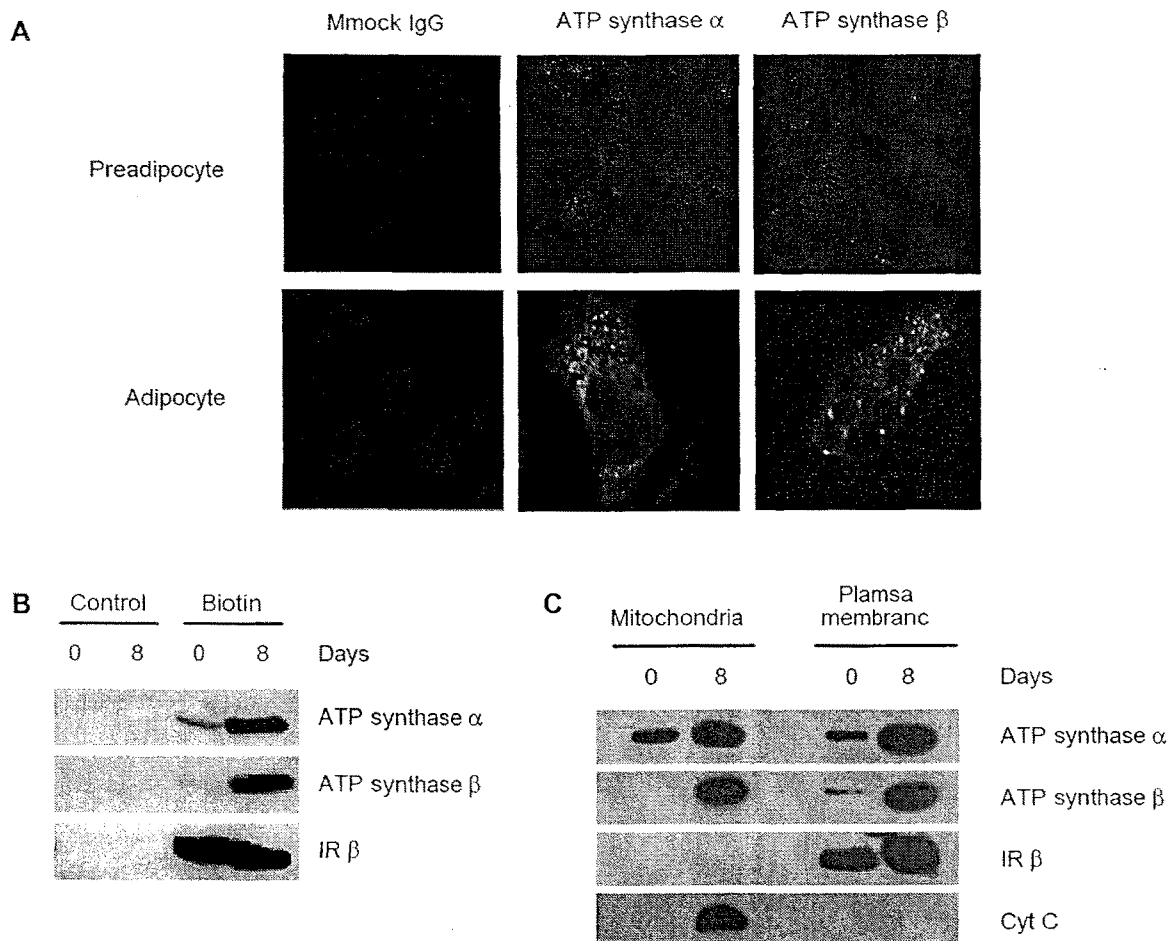


Figure 17. ATP synthase complex is expressed on the outer leaflet of the plasma membrane. On day 8 of differentiation, 3T3-L1 cells were used as fully-differentiated adipocytes. (A) 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes were immunostained with anti-ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  antibodies, and mock IgG. It should be noted that permeabilization step was skipped out for visualizing the surface expression of ATP synthase complex. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes were labeled with membrane-impermeable biotin and lysed with lysis buffer. The lysates were precipitated with avidin-conjugated agarose beads and the precipitates were analyzed with anti-ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  antibodies. (C) Plasma membrane, and mitochondria were prepared from 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes. Each protein (5  $\mu$ g) from plasma membrane, and mitochondria were analyzed by immunoblotting with anti-ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  antibodies. IR, insulin receptor.

Figure 17A에서의 ATP synthase complex의 염색 경향은 lipid rafts의 punctate staining pattern과 매우 유사하기 때문에 실제로 이 단백질들이 lipid rafts에 존재하고 있는지 확인하기 위해 lipid rafts marker protein인 cholera toxin B와 co-immunostaining을 수행하였다.(figure 18A) 그림에서 보이는 것처럼 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$  subunits이 cholera toxin B와 거의 일치하고 있을 뿐만 아니라 설탕 농도구배 초원심분리법(sucrose gradient ultracentrifugation)에 의한 rafts 분리 방법을 통해서도 대부분의 ATP synthase  $\alpha$ 와  $\beta$  subunits이 rafts에 존재하고 있음을 확인하였다. Lipid rafts를 확인하기 위한 marker 단백질로서 기존에 알려진 flotillin-1과 caveolin-1이 사용되었다.(figure 18B) 또한 사람의 지방조직을 분리해 내어 똑같은 방법으로 rafts를 뽑아낸 후 확인한 결과 사람의 지방세포에서도 ATP synthase complex가 lipid rafts에 존재하고 있음을 확인하였다.



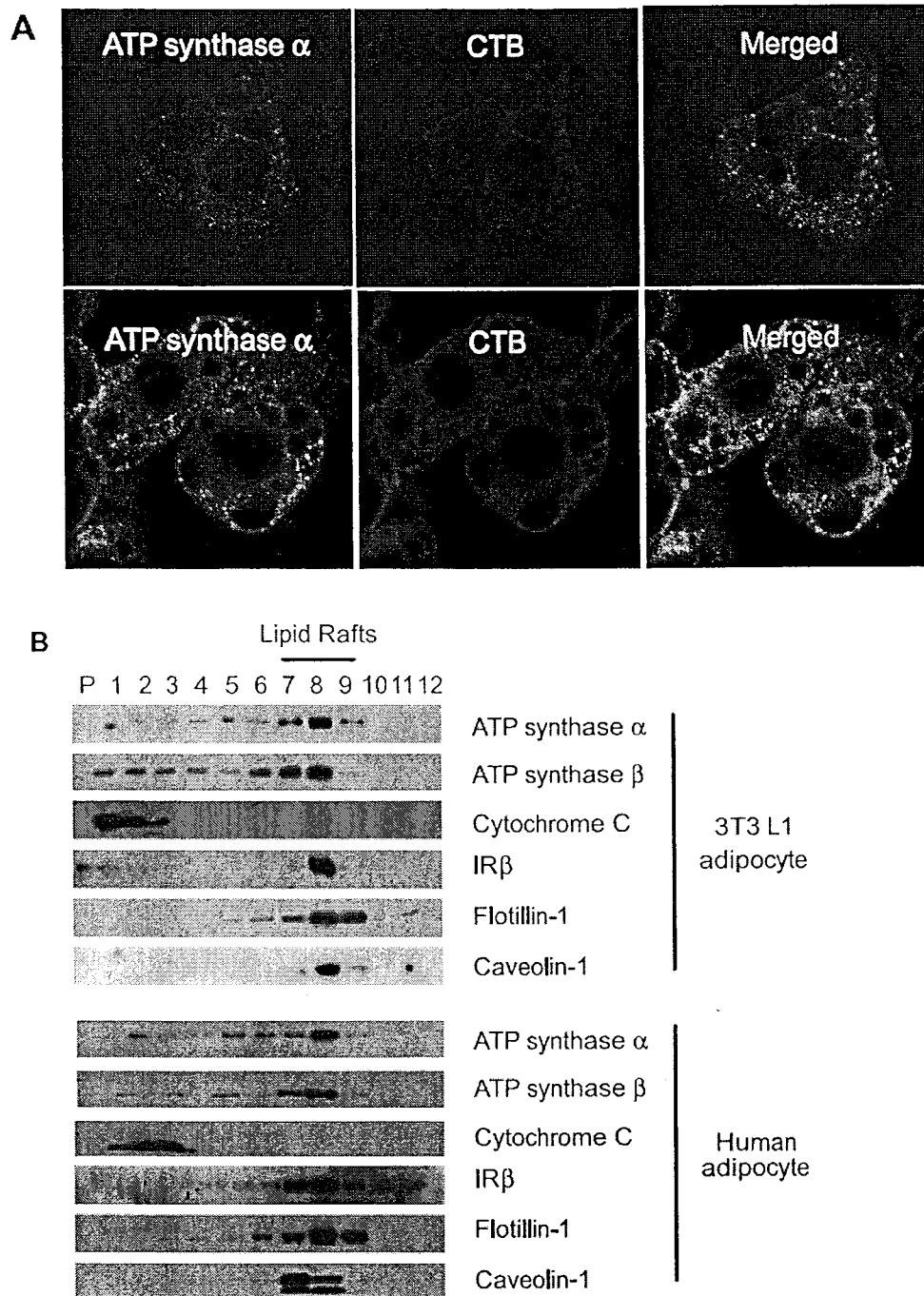


Figure 18. ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  are enriched in lipid rafts of adipocytes. (A) ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  are co-localized with CTB in fully-differentiated adipocytes, indicating that the complex is present in the plasma membrane rafts. 3T3-L1 adipocytes were immunostained with anti-ATP synthase  $\alpha$  or  $\beta$  antibody and rhodamine-conjugated CTB. It should be noted that permeabilization step was skipped out for immunofluorescence. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Detergent-resistant lipid rafts were isolated from 3T3-L1 adipocytes and human adipocytes as outlined in Materials and Methods. Each fraction from the sucrose gradient was blotted with anti-ATP synthase  $\alpha$ , and  $\beta$ , cytochrome c, insulin receptor (IR), flotillin-1, and caveolin-1 antibodies.

세포막에 존재하는 ATP synthase complex의 기능을 알기 위해 세포의 배지에 ADP와 phosphate(Pi)를 처리하고 생성된 ATP의 양을 조사하였다. 세포 밖 ATP의 양은 ADP와 Pi가 처리된 1분 동안 급속히 증가하였고 8분 후부터 일정한 양을 유지하였다. 생성된 ATP가 ATP synthase에 의한 것인지 확인하기 위해 ATP synthase를 억제하는 oligomycin과 carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)를 처리한 후 ATP 생성이 50% 감소함을 확인하였다. 그러므로 실제로 세포막에 존재하는 ATP synthase complex가 세포 밖 ATP를 만들어 내고 있다. 또한 세포 밖 ATP의 양은 외부 배지의 PH에 의존적으로 변하고 있다. 즉 낮은 PH에서는 30%로 감소하였고 높은 PH에서는 150% 정도로 증가하였다. 이것은 세포막에서의 ATP 생성이 세포의 안과 밖의 수소(H<sup>+</sup>) 농도에 의해 일어나고 있음을 말해준다.(figure 19) 이러한 결과들로 추론해 본 결과, 기존에 mitochondria의 내막에만 존재한다고 알려져 있던 ATP synthase complex가 지방세포의 세포막에도 존재하고 있을 뿐만 아니라 mitochondria에서와 마찬가지로 ATP를 생성할 수 있음이 밝혀졌다. 이렇게 생성된 세포 밖 ATP는 세포막에 존재하는 수용체에 결합하여 지방세포의 세포활성을 증가시키는 것으로 보여진다.

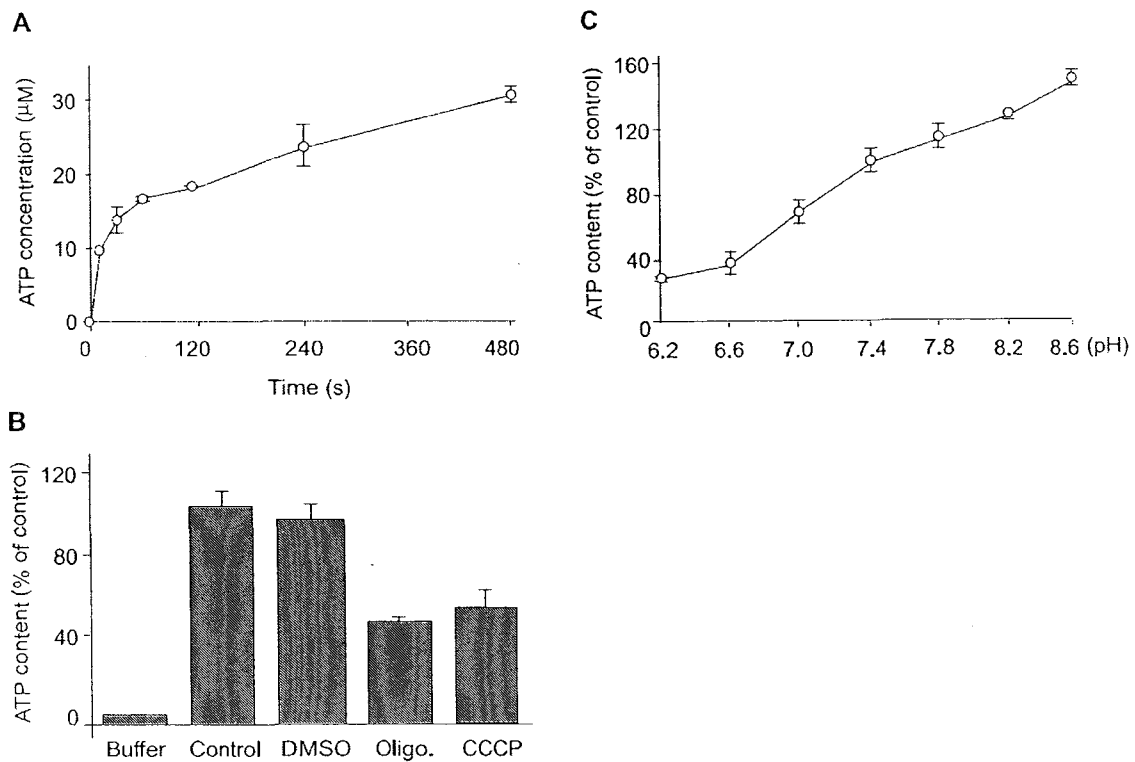


Figure 19. Extracellular ATP synthesis by surface ATP synthase complex. On day 8 of differentiation, 3T3-L1 cells were used as fully-differentiated adipocytes. (A) Extracellular ATP synthesis was initiated by the addition of ADP and Pi to a culture of adipocytes. At the indicated time, the extracellular media were collected, and the ATP content in those pools was determined. (B) The effects of oligomycin and CCCP in extracellular ATP synthesis. Adipocytes were pretreated with 0.5% DMSO, oligomycin 10 µg/ml, or CCCP (0.4 µg/ml) for 5 min. Extracellular ATP content from media was measured 1 min after adding ADP and Pi. Control indicates the extracellular ATP content generated in the absence of any drug. DMSO, dimethyl sulphoxide; oligo., oligomycin; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. (C) The pH effect of cell media in extracellular ATP synthesis. Adipocytes were washed twice, and then extracellular ATP content was measured 1 min after adding ADP and Pi into media of different pH. Control indicates the extracellular ATP content generated in pH 7.4.

#### 4절. 비만과 제 2형 당뇨 쥐의 지방세포에서 미토콘드리아 장애 연구

제 2형 당뇨병은 좌식문화와 풍부한 음식공급으로 인해 현대사회에 급속히 퍼져가고 있는 질환이다. 제 2형 당뇨병에서 간, 근육, 지방조직은 주요한 인슐린 저항성을 보이는 주요장기들이며, 이러한 저항성은 결국 여러 가지 심각한 질환을 야기한다. 예를 들면 당뇨병성 신장질환, 안질환, 수족손상으로 인한 절단과 높은 심장병과

발작의 발병위험들이 있다. 게다가 최근 당뇨병과 알츠하이머병의 연관관계가 대두되고 있는 실정이다. 당뇨병에 대한 많은 연구에도 불구하고 당뇨병유전자는 거의 밝혀지지 않았다.

미토콘드리아의 기능이상은 제 2형 당뇨병의 발생과의 연관성이 대두되고 있다. 그 예로, 제2형 당뇨병환자의 골격근의 미토콘드리아에 의한 호흡감소와 호흡관련 단백질 발현 감소가 있다. 정상인의 골격근과 비교 시 미토콘드리아의 크기감소와 더불어 수의 감소 또한 발견되었다. 따라서 제 2형 당뇨병환자의 골격근에서 지방산 산화 감소에 의한 근육 내 지방축적이 야기된다.

지방세포는 체내의 에너지 저장고임과 동시에 혈당을 유지하는 중요한 기관이다. 예를 들면, 지방세포의 GLUT4가 없는 쥐의 경우 인슐린 저항성과 고혈당증이 유도된다. 이외에도 지방세포는 여러 사이토카인을 분비하는 내분비기관이다. 인슐린 저항성이 과도한 지방의 사이토카인(렙틴, 리지스틴, 아디포넥틴, TNF등)의 비정상적인 분비에 의해 유도될 수도 있을 것이다. 렙틴과 아디포넥틴은 인슐린 저항성을 완화시킨다고 알려져 있으며, 리지스틴과 TNF는 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 결국 이러한 지방의 사이토카인이 제 2형 당뇨병의 발생에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

지방세포의 미토콘드리아는 여러 지방 물질 대사에 관여하고 있다. 3T3-L1이라는 지방전구세포가 지방세포로 분화하면서 미토콘드리아의 생성이 급격히 증가되고 있다. 주목할 만한 사실은 로지글리타존이라는 PPAR $\delta$  유도체를 처리하게 되면 지방세포의 분화와 기능이 촉진되면서 더불어 미토콘드리아의 증식도 늘어나는데 이 약에 의해 인슐린 저항성이 완화되고 혈당이 낮아진다는 것이 보고되어있다. 이것은 PPAR $\delta$  유도체가 지방세포의 미토콘드리아 생성을 촉진시켜서 나타난 효과일 수도 있다는 것을 말해준다.

미토콘드리아와 제2형 당뇨병 그리고 비만과의 연관관계를 확인하기 위해 미토콘드리아의 단백질과 유전자 발현양상 그리고 미토콘드리아 자체의 형태에 대해 관찰을 하였고 이것은 정상쥐를 대조군으로하여 당뇨쥐와 비만쥐의 간, 근육, 지방조직에서 각각 수행되었다.

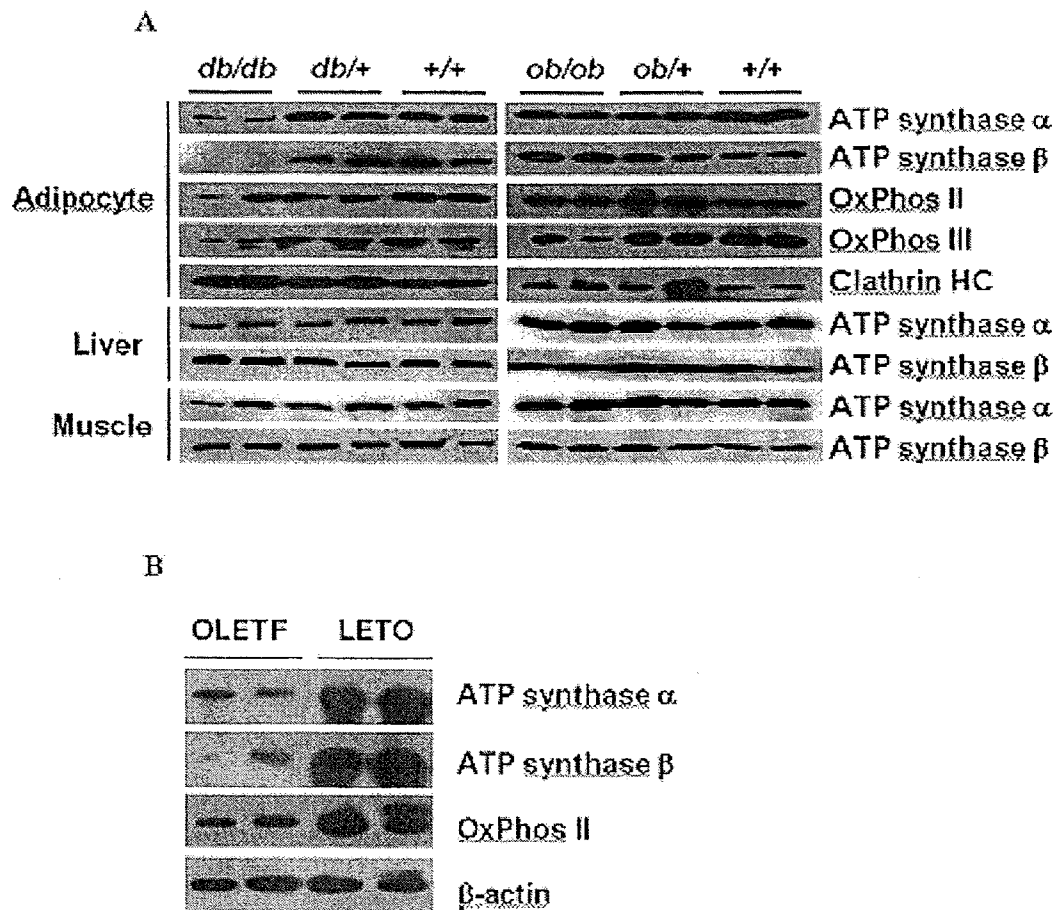


Figure 20. The low expression of mitochondrial proteins in the adipocytes of *db/db* mice. A. Adipocytes were isolated from visceral adipose tissue from each 12-old-week mouse. Proteins (30  $\mu$ g) from livers, muscles, and adipocytes were lysed, then analyzed by immunoblotting with anti-ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ , OxPhos complex II (flavoprotein), OxPhos complex III (core I), and clathrin heavy chain antibodies. The livers and muscles of five mice were analyzed, and the adipocytes of 17 mice were analyzed. Among 17 mice, the adipocytes of 15 mice exhibited low levels of ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  expression, but those from the other 2 mice exhibited normal expression. Two cases from 17 mice were represented for immunoblotting. B. Adipose tissues from LETO and OETF rats were lysed, and then analyzed by immunoblotting with anti-ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$ , OxPhos complex II, and  $\beta$ -actin antibodies.

당뇨병쥐와 비만쥐의 인슐린 주요 작용조직인 간, 근육, 그리고 지방조직을 적출하여 미토콘드리아 단백질의 발현을 조사하였다. Figure 20의 A에서 보면 당뇨병쥐(*db/db*)나 비만쥐(*ob/ob*)와 각각의 정상쥐에서 간과 근육에서의 미토콘드리아 단백질 발현에 변화가 없는 것으로 관찰된다. 그러나 지방세포에서의 미토콘드리아 단백질 발현이 *db/db* 쥐에서만 줄어들어 있는 것이 보여진다. 이 현상은 다른 당뇨

모델 쥐인 OLETF쥐에서도 발견되었는데, Figure 20B에서 정상 쥐(LETO)와 당뇨 쥐(OLETF)의 지방조직에서 미토콘드리아 단백질 발현량이 정상 쥐(LETO)에 비해 감소하는 것을 알 수 있다. 이러한 지방조직에서 미토콘드리아의 감소는 미토콘드리아 유전자 감소에 의해서도 증명되었다. (Figure 21)

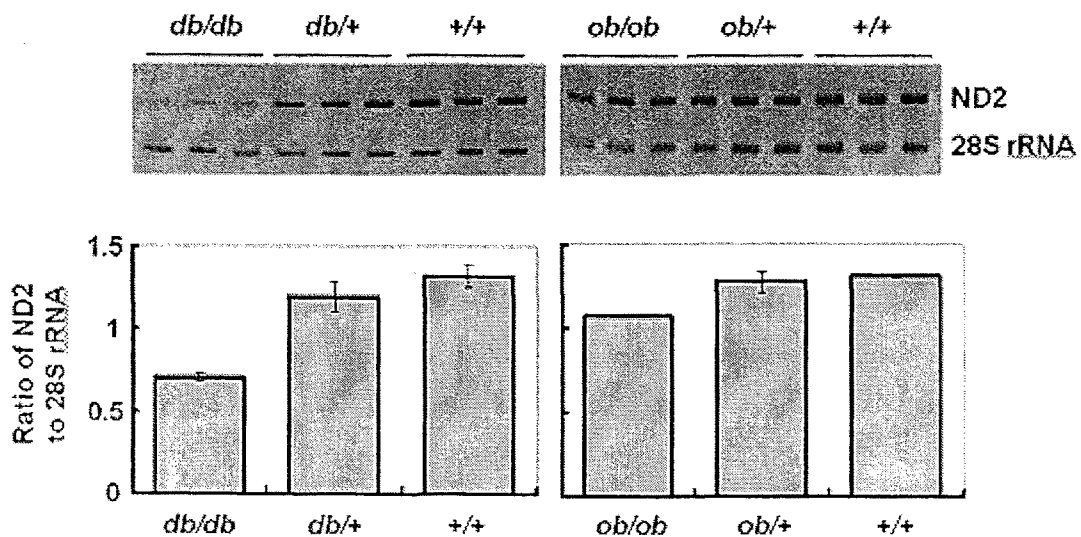


Figure 21. Mitochondrial DNA content is reduced in adipocytes of db/db mice. Genomic and mitochondrial DNA (mtDNA) were monitored from adipocytes (n=6) by PCR analysis. Primers for 28s rDNA, and the ND2 gene (subunit 2 of complex I) were used for PCR, in order to determine the contents of genomic DNA and mtDNA, respectively. The final PCR products were ultimately electrophoresed on 1.5% agarose gel. The ratio of ND2 level to 28s rRNA was obtained by measuring the intensity of each band.

Figure 21에서 미토콘드리아 유전자의 감소를 수치화 하기위해 28S rRNA의 DNA 양과 ND2(미토콘드리아의 복합체I의 세부구조2)의 DNA양을 비교한 그래프를 통해 db/db 쥐의 미토콘드리아의 DNA가 정상쥐에 비해 반 정도 감소하였음을 알 수 있다. ob/ob 쥐도 정상에 비해 약간 감소하였으나 감소정도가 db/db 쥐에 비해 작은 것을 알 수 있다.

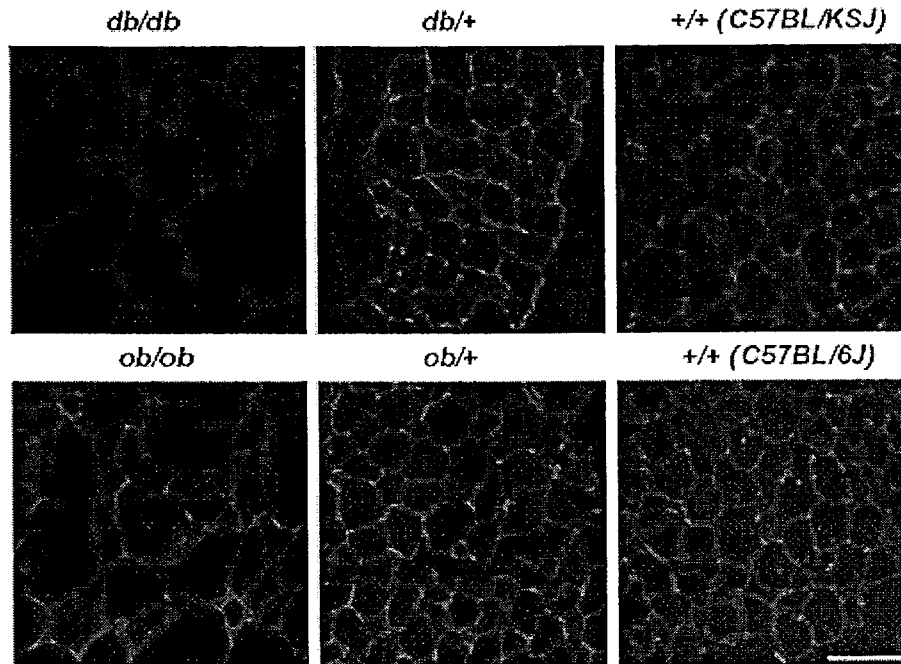


Figure 22. Mitochondria disappear in the adipocytes of *db/db* mice as determined by mitotracker. Adipocytes were isolated from visceral adipose tissue from each 12-old-week mouse. The adipocytes were stained with mitotracker. The black bar indicates 100  $\mu$ m.

*db/db* 쥐의 지방세포에서 미토콘드리아의 단백질과 유전자의 감소를 통해 간접적으로 미토콘드리아의 감소를 예상할 수 있다. Mitotracker라는 염색약을 이용하여 직접적으로 미토콘드리아의 감소를 확인해 보았다. Figure 22를 통해 *db/db* 쥐의 지방세포에서 미토콘드리아의 염색정도가 줄어들어 있음을 알 수 있다. *ob/ob* 쥐의 지방세포의 미토콘드리아의 염색도 정상군에 비해 약하나 *db/db* 쥐의 지방세포보다는 강한 것을 알 수 있다. 즉, *ob/ob* 쥐도 *db/db* 쥐보다는 약하지만 지방세포의 미토콘드리아에 이상이 있음을 알 수 있다.

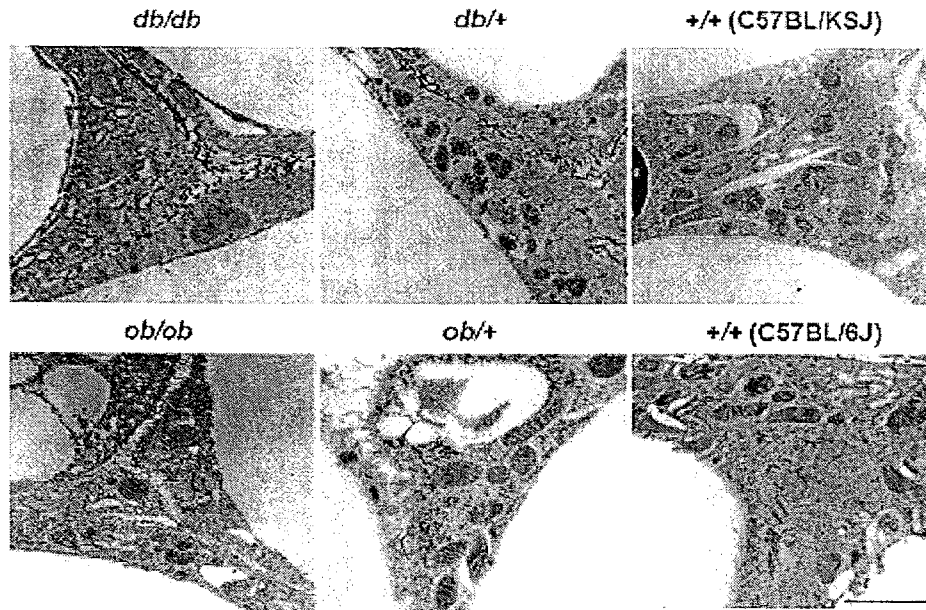


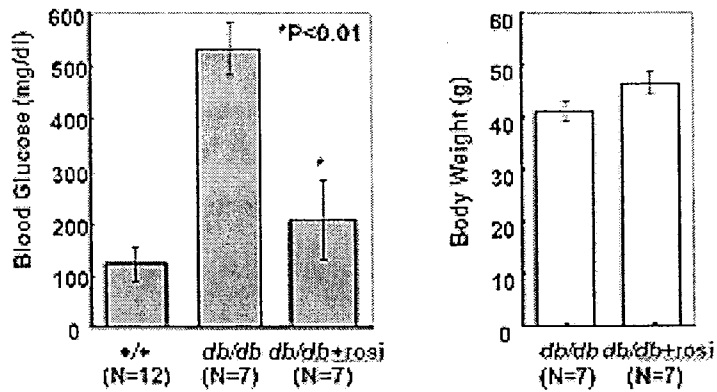
Figure 23. Mitochondria are rarely found in the adipocytes of *db/db* mice under electron microscopy. For ultrastructural examination, epididymal adipose tissues were observed in each 12-week-old mouse. The black bar indicates 1  $\mu$ m.

*db/db* 쥐의 지방세포의 미토콘드리아의 수가 감소하는 것을 단백질과 DNA, 그리고 염색을 통해 확인하였다. 미토콘드리아의 형태변화를 보기위하여 전자현미경으로 관찰하였는데(Figure 23) *db/db* 쥐의 지방세포에서는 거의 미토콘드리아를 관찰할 수 없었고 *ob/ob* 쥐의 지방세포에서는 정상쥐의 지방세포의 미토콘드리아에 비해 크기가 작은 미토콘드리아가 관찰되었다.

앞서 말한 로지글리타존이 지방세포의 미토콘드리아에 미치는 영향을 알아보기 위해 30mg/kg의 로지글리타존을 10일 동안 *db/db* 쥐에게 먹인 후 실험을 수행하였다. 로지글리타존은 *db/db* 쥐의 혈당을 효과적으로 낮추었으나 몸무게는 더 증가시키는 부작용을 보였다(Figure 24A). 미토콘드리아에 미치는 로지글리타존의 효과를 알아보기 위해 지방세포와 간, 근육을 적출하여 미토콘드리아 단백질의 발현을 알아보았다(Figure 24B). 로지글리타존에 의해 줄어들었던 *db/db*의 지방세포의 미토콘드리아의 단백질 발현이 다시 증가된 것을 볼 수 있다. 그러나 근육과 간의 미토콘드리아의 생성에는 영향이 없는 것으로 보아 로지글리타존의 표적조직은 지방세포이며, 지방세포의 미토콘드리아의 증가가 약의 효과와 관련이 있는 것을 알 수 있다.



A



B

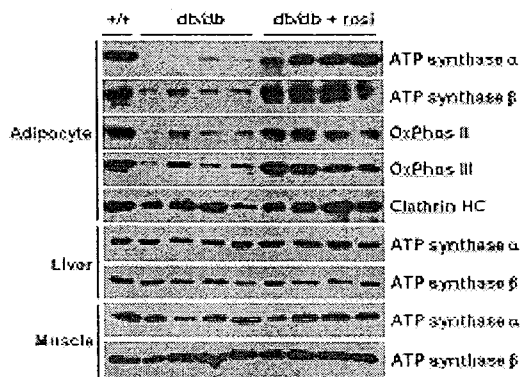


Figure 24. Mitochondria are increased in the adipocytes of db/db mice after rosiglitazone treatment. A,B. Rosiglitazone (30 mg/kg) was administered in 12 old-week db/db mice (n=7) for 10 days by oral treatment with gavage. Control db/db mice (n=7) were treated with the vehicle, 1% carboxymethyl-cellulose. The mice were weighed and bled via the tail vein, in order to measure blood glucose. C. Proteins (30  $\mu$ g) from adipocytes (n=7) were lysed, and analyzed by immunoblotting with anti-ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  OxPhos II (flavoprotein), OxPhos III (core I), and clathrin heavy-chain antibodies.

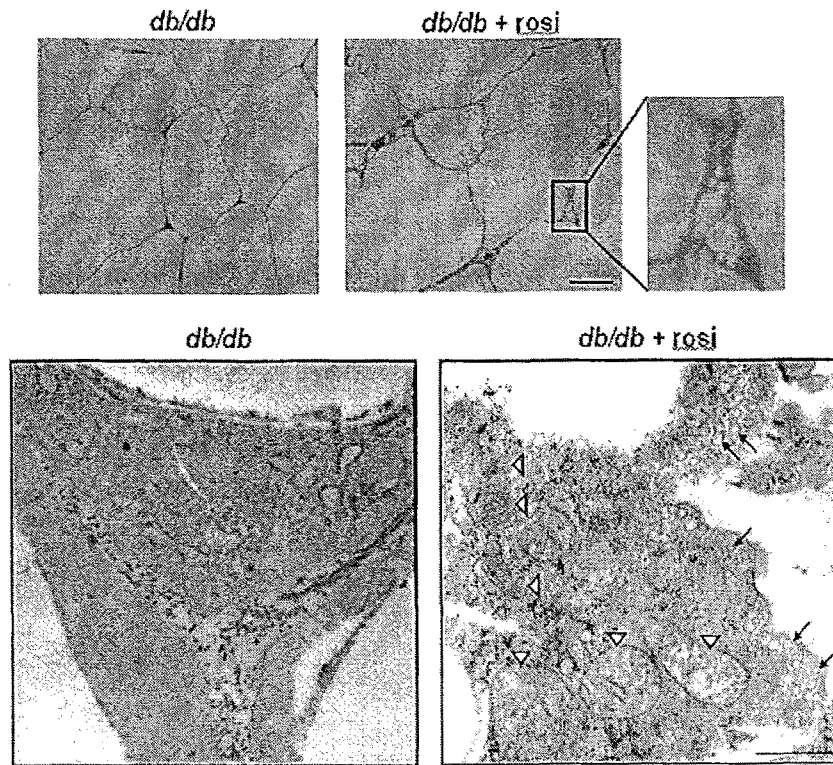


Figure 25. Mitochondria and caveolae are abundant in the adipocytes of *db/db* mice after rosiglitazone treatment. Rosiglitazone (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) was administered to 12 week-old *db/db* mice ( $n=7$ ) by oral treatment using a lavage for 10 days. Control *db/db* mice ( $n=7$ ) were treated with the vehicle, 1% carboxymethyl-cellulose. For ultrastructural examinations, epididymal adipose tissues were observed. White arrows represent mitochondria, and black arrows represent caveolae. The black bar in the upper panel represents 25  $\mu\text{m}$ . The black bar in the lower panel indicates 0.5  $\mu\text{m}$ .

이 현상은 전자현미경실험을 통해 다시 한번 증명되었는데(figure 25) 로지글리타존을 처리한 지방조직에서 미토콘드리아의 수가 증가되는 것은 물론이고 캐비올리 구조도 발견되었는데 이것은 지방분화시 캐비올리 구조의 역할이 중요함을 보여주는 것으로 생각된다.

*db/db* 쥐의 지방세포의 미토콘드리아의 수의 감소와 더불어 기능저하에 대해서도 조사해 보았다. Figure 26에서 미토콘드리아의 기능 중 하나인 지방산화의 활성을 조사해 보았다. 예상대로 *db/db* 쥐에서 지방산화의 활성이 떨어진 것을 알 수 있으며 *ob/ob* 쥐에서도 지방산화가 감소한 것을 알 수 있다.

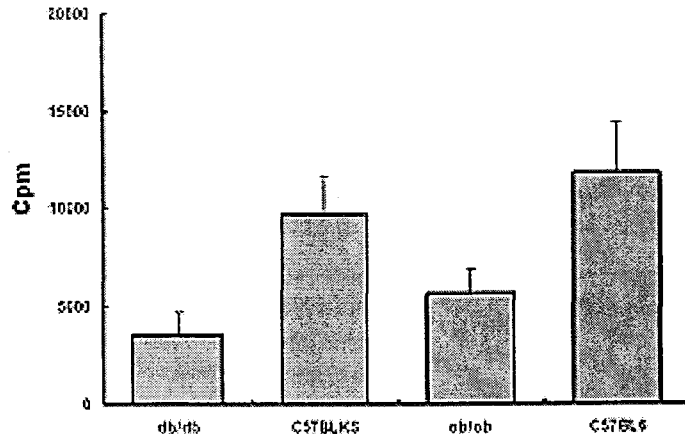


Figure 26. Impaired fatty acid oxidation in diabetic, obese model mice

종합하면, 정도의 차이는 있지만 당뇨병 모델과 비만 모델의 지방세포의 미토콘드리아의 수와 기능감소로 인한 손상이 관찰된다.

## 5절. adiponectin 및 resistin 수용체 동정 및 그 결합 단백질 발굴

### 1. 동물세포에서 adiponectin 및 resistin family 재조합 chimeric ligand 대량 발현

- 수용체 및 신호전달 단백질 발굴을 위한 단백질 ligands :
  - \* pull down assay
  - \* affinity chromatography
  - \* binding assay
- 수용체 유전자 발굴 expression cloning을 위한 단백질 probes

### 2. 재조합 chimeric ligands의 생리 활성 규명

- chimeric ligands들의 native form과 같은 생리활성능을 갖느냐 확증이 필요함
- \* adiponectin ligands : AMPK (AMP-activated protein kinase) 혹은 AKT 인산화

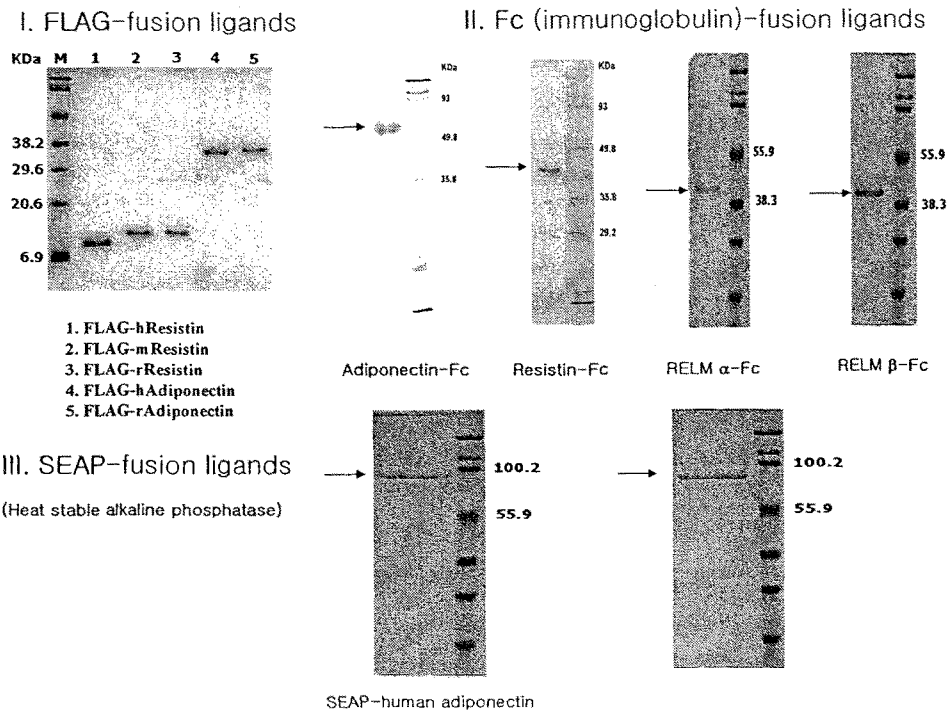


Figure 27 adiponectin, resistin, RELMa, RELMb 유전자에 FLAG epitope, Fc portion (immunoglobulin heavy chain), SEAP (heat stable alkaline phosphatase)에 융합시켜 HEK293 세포에 발현 후 conditioned medium을 회수하여 anti-FLAG, Protein A, anti-SEAP을 사용하여 affinity column chromatography를 수행함.

Phosphorylation of ACC1 in C2C12 cells stimulated with the KOMED recombinant adiponectin proteins

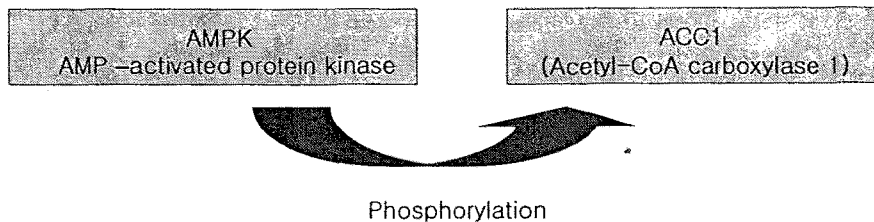
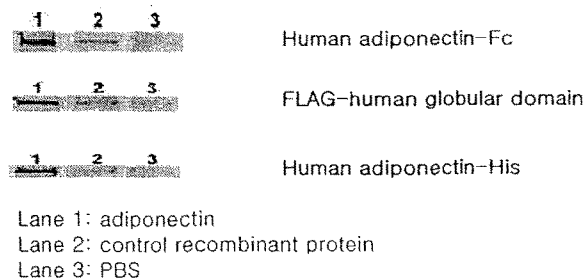


Figure 28 adiponectin ligands를 쥐 근육세포주, C2C12, 에 처리 후 cell lysate를 회수하여 활성화 AMPK의 기질인 ACC1의 인산화 정도를 western blot으로 확인 함.

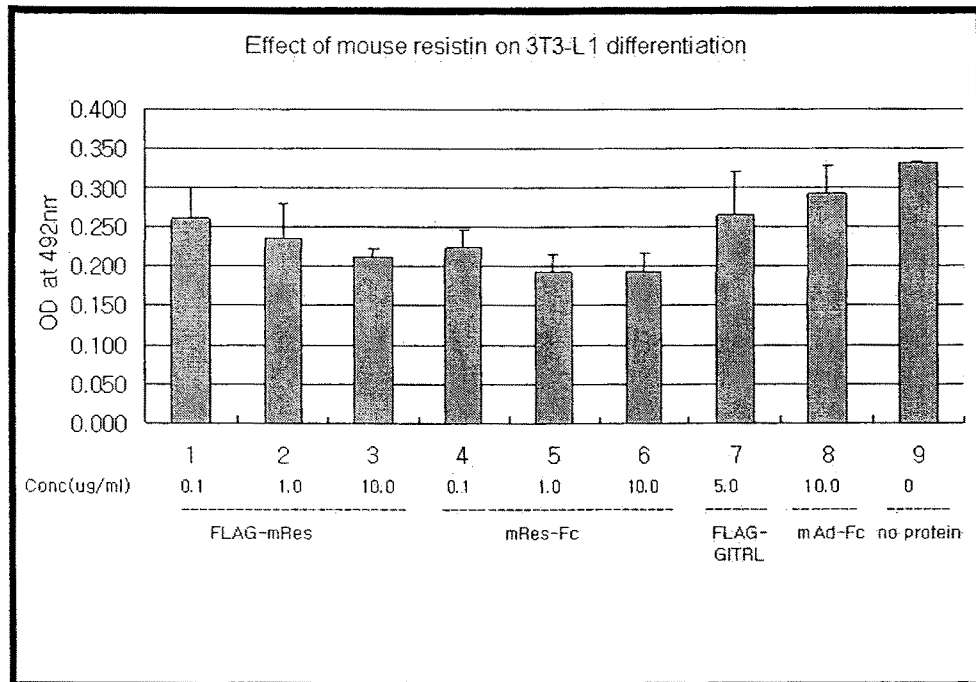
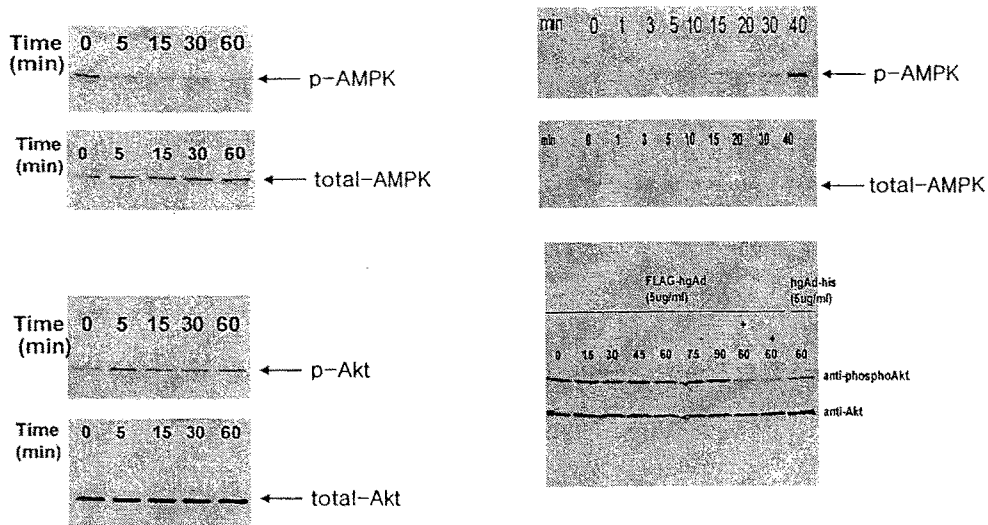


Figure 29 인간 혈관내피세포 (HUVEC)에 full length adiponectin (FLAG-fAd) 및 COOH-terminal globular domain (FLAG-gAd)을 처리 후 cell lysate를 회수하여 활성화 AMPK 및 AKT 인산화 정도를 western blot으로 확인 함. FLAG-fAd는 AKT를 FLAG-gAd는 AMPK를 활성화시킴.

\* resistin ligands : resistin은 지방전구 세포 (preadipocyte)를 지방세포 (adipocyte)로의 분화를 강력하게 억제하는 anti-adipogenic factor로 알려져 있다. 제조한 FLAG-resistin, resistin-Fc를 mouse preadipocyte 세포주인 3T3L1 cell에 처리 후 adipocyte로 분화를 유도하여 분화억제능을 측정 하였다. Figure. 4에서 보듯이 dose-dependent 방식으로 지방세포로의 분화를 억제하고 있음을 알 수 있어서 resistin chimeric ligands가 생리활성이 있음을 알 수 있다.

### 3. 재조합 chimeric ligands를 사용한 수용체 발현 세포주 선별

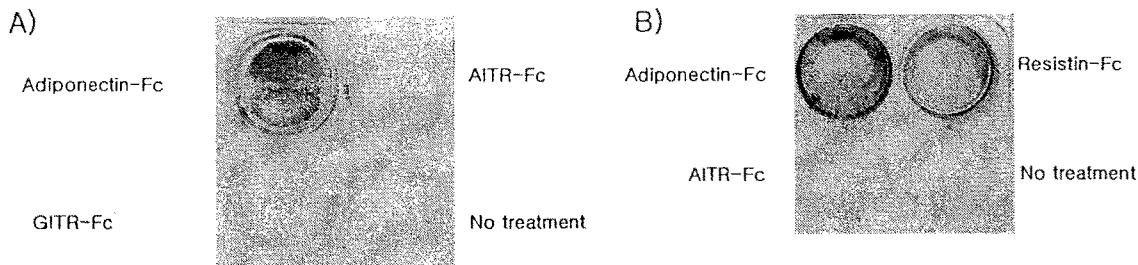
- 정성적 binding assay : FACS 및 cell ELISA를 통하여 chimeric ligands 와 특이하게 결합하는 세포주 확인



FLAG-fAd  
(human full length adiponectin)

FLAG-gAd  
(human globular adiponectin)

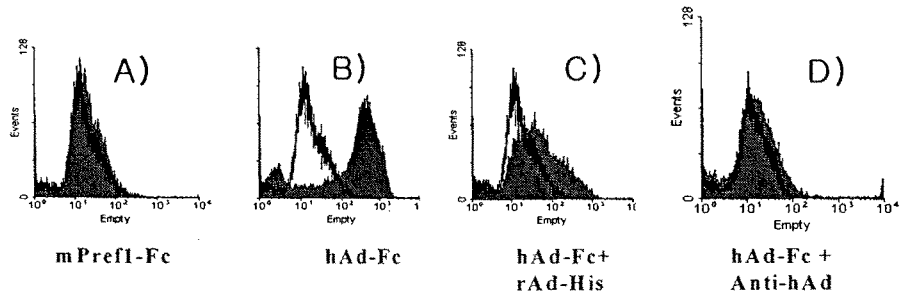
Figure 30 mouse preadipocyte cell line인 3T3L1 cell에 Mix / Max / insulin 및 다른 농도의 FLAG-resistin, resistin-Fc 와 control protein으로 FLAG-GITRL (TNF ligand의 한 종류), mouse adiponectin-Fc (mAd-Fc)를 처리하여 지방세포로 분화 시킨 후 분화억제능을 측정하였음.



Cell ELISA

Figure 31 C2C12에 adiponectin-Fc, resistin-Fc 와 control protein 으로 AITR-Fc 및 GITR-Fc를 결합 시킨 후 anti-Fc-HRP로 반응 시켜 image analyzer로 cell ELISA를 수행함. C2C12 세포주에 adiponectin-Fc 및 resistin-Fc가 특이하게 결합하는 것을 확인할 수 있음.

### Adiponectin binding to Cos7 cells



### Resistin family binding to Cos7 cells

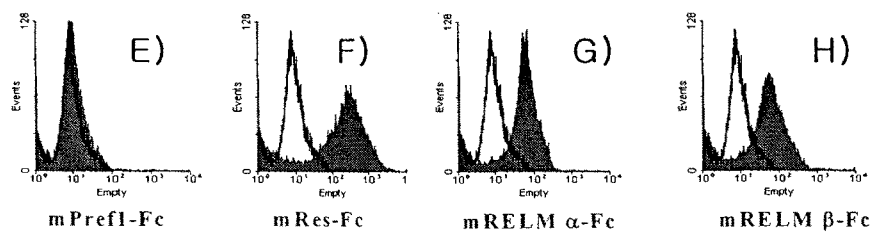


Figure 32 Cos7 세포에 adiponectin-Fc (B) 와 resistin family (mouse resistin-Fc (F), mouse RELM alpha-Fc (G), mouse RELM beta-Fc (H))를 첨가 후 FACS를 수행하여 정성적 수용체 결합을 측정하였다. 또한 control protein으로 Pref-1-Fc를 사용하여 FACS shift background로 사용하였고 adiponectin-Fc의 경우 경쟁 단백질로 재조합 full length adiponectin (C) 과 adiponectin 항체 (D)를 사용하여서 blocking 되었기에 adiponectin 특이한 수용체가 Cos7 cell에 있음을 알 수 있다. 또한 resistin family의 경우에 Cos7 cell에 잘 결합하나 resistin-Fc 가 mean fluorescence intensity (MFI)가 400으로 가장 수용체와 결합력이 강함을 알 수 있음.

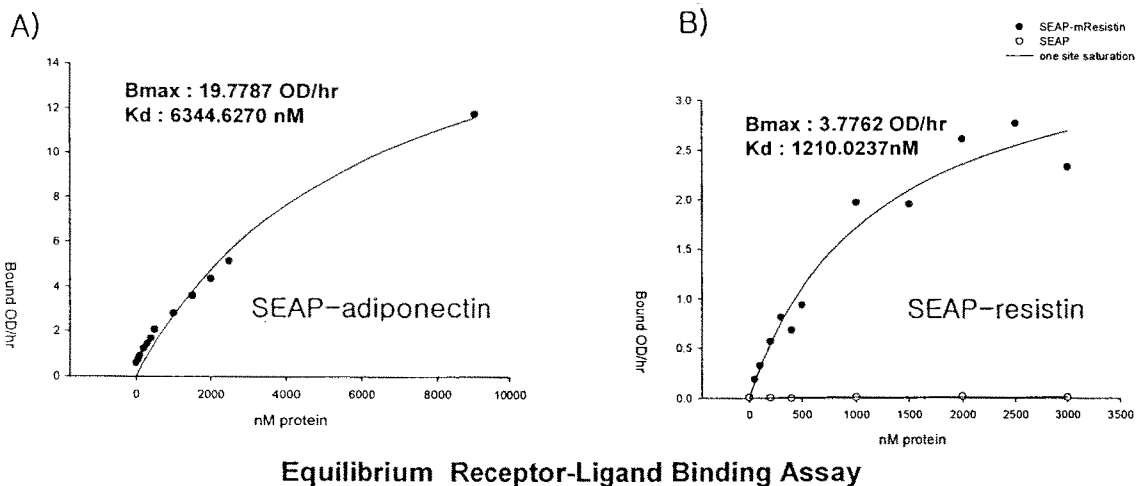


Figure 33 C2C12 세포에 정제된 SEAP-adiponectin, SEAP-resistin, 및 SEAP alone을 첨가하여 상온에서 각각 1시간 반응시킨 후 세척하여 70°C에서 30분 반응 후 SEAP assay를 실시하여 효소 반응을 측정하였다. 얻어진 SEAP 값에서 SEAP alone (background)상쇄하여 OD를 구하였다.

- 정량적 binding assay : equilibrium binding assay를 통해 affinity constant를 구함

- 위의 정성적, 정량적 binding assay 결론 : 2003 년, 2004 년에 3가지의 adiponectin receptor가 C2C12 세포에서 expression cloning 방법으로 발굴되었는데 본 연구의 결과와 일치하지 않은 점이 관찰되었다.

\* **AdipoR1 / AdipoR2 (Yamauchi et al. 2003. Nature 423:762-768)** : AdipoR1 은 globular domain의 high affinity receptor 이고 AdipoR2는 full length adiponectin의 high affinity receptor 이다. 293T 세포에 발현시 45 kDa되는 크기의 G-protein coupled receptor이다. 본 연구 C2C12 세포에 발현 되는 adiponectin 결합 수용체는 Kd 값이 6 mM 정도 되는 low affinity receptor이다.

\* **T-cadherin (Hug et al. 2004. PNAS 101:10308-10313)** : globular domain 및 bacterially expressed full length adiponectin 과는 결합하지 않고 동물세포에서 발현된 hexamer 이상의 full length adiponectin 과만 결합하여 NF-kb 활성을 시키는 80 kDa 정도의 GPI link된 adhesion 단백질이다. 본 연구의 FLAG-globular domain을 사용한 cell ELISA (data not shown) 와 adiponectin-Fc fusion protein을 사용한 FACS data에서 FACS shift가 bacterially expressed full length adiponectin (Figure. 6), globular domain (data not shown)과도 competition을 하는 것으로 보아 Cos 세포에 발현하고 있는 adiponectin 수용체는 T-cadherin이 아님을 짐작할 수 있다.

#### 4. adiponectin, resistin, RELM beta 수용체 후보 확인

- adiponectin 수용체 후보군 확인 : Cos7 cell에서 hAd-Fc 에 결합하면서 대장균에서 발현한 full length adiponectin 및 FLAG-globular domain과 FACS에서 경쟁을 하는 T-cadherin 과 구별되는 수용체 후보를 확인 하였다. 동시에 FLAG-adiponectin 및 FLAG-globular domain에 반응하는 혈관내피세포 HUVEC을 사용하여 확인함.



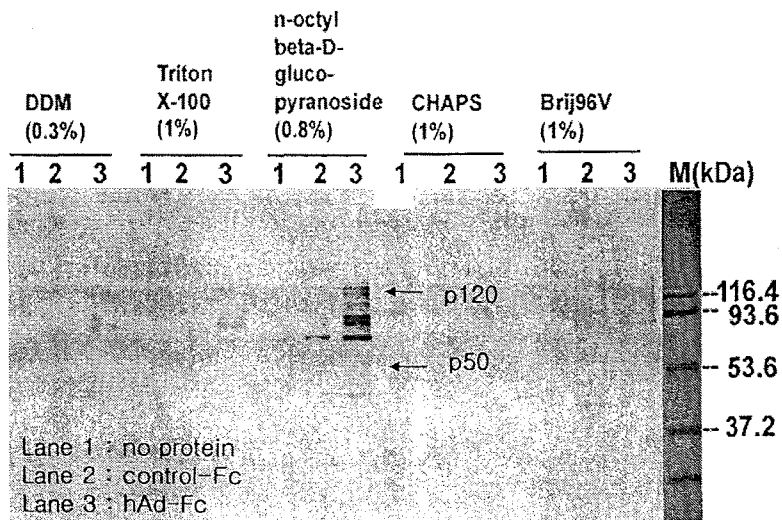
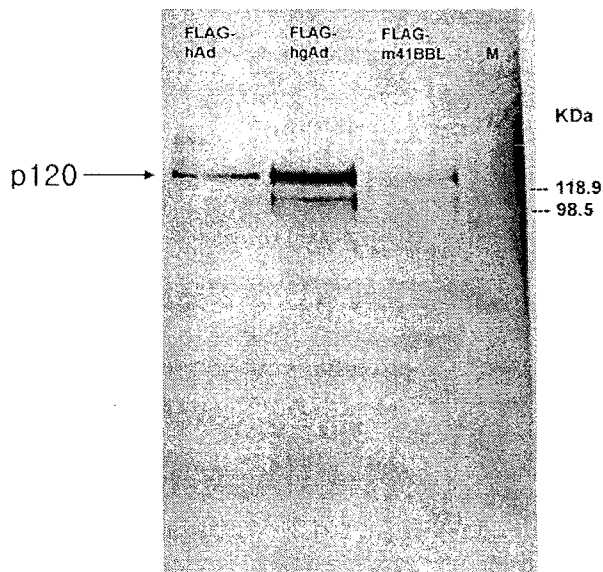


Figure 34 Cos7 cell을 biotinylation을 한 후 여러 가지 종류의 detergent를 사용하여 막 단백질을 정제하여 human adiponectin-Fc (hAd-Fc) 및 GTR-Fc (control-Fc)와 결합 후 Protein A bead를 넣어 침전 회수 후 streptavidin-HRP를 사용하여 biotinylation 된 막 단백질을 발굴 하였다.



Molar ratio of used ligands

FLAG-human fAd : FLAG-gAd : FLAG-m4BBL = 4 : 1 : 2

Figure 35 HUVEC cell을 biotinylation을 한 후 DDM을 사용하여 막 단백질을 정제하여 FLAG- full length adiponectin (FLAG-human fAd), FLAG-globular domain (FLAG-gAd), control FLAG protein (FLAG-m41BBL) 결합 후 anti-FLAG bead를 넣어 침전 회수 후 streptavidin-HRP를 사용하여 biotinylation 된 막 단백질을 발굴 하였다.

- <결론> Cos7 cell에서 hAd-Fc 와 반응하는 p120, p50 두 가지 수용체 후보군을 발견 하였으며 n-octyl beta-D-gluco-pyranoside가 효과적인 detergent였다. HUVEC cell 에서도 DDM lysate에서 p120 위치의 globular domain에 preferential binding 하는 수용체 후보 군을 확인 하였다.

- resistin 수용체 후보군 확인 : mouse resistin-Fc와 결합하는 Cos7, C2C12 세포주 및 지방세포 분화억제 실험에 사용하였던 mouse preadipocyte 세포주인 3T3L1 세포주를 사용하여 DDM detergent를 사용 하여 막 단백질을 회수 후 결합하는 수용체 후보 군을 확인 하였다.

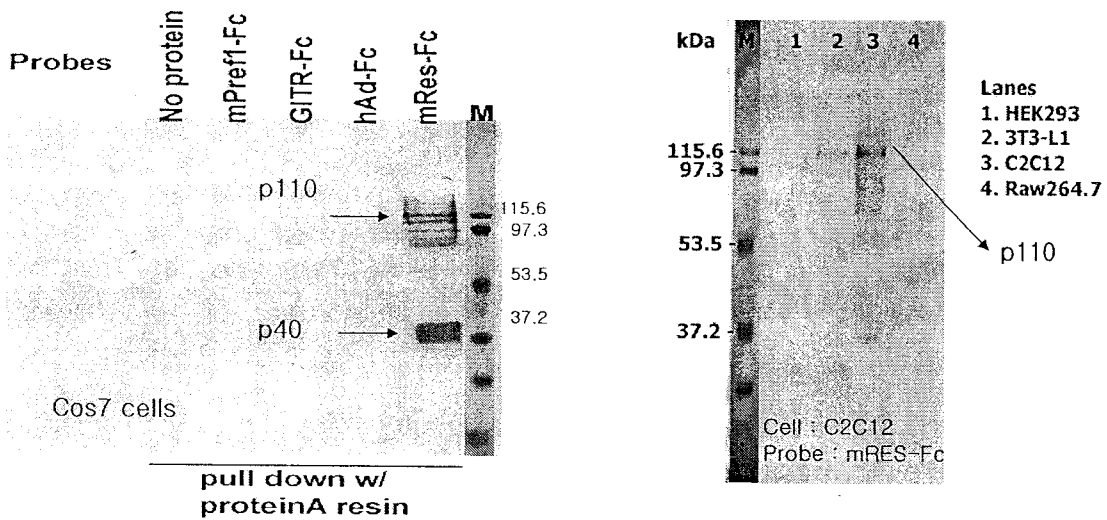


Figure 36 Cos7, C2C12 cell을 biotinylation을 한 후 여러 가지 종류의 Fc 융합단백질을 사용하여 DDM 막 단백질을 정제하여 결합 후 Protein A bead를 넣어 침전 회수 후 streptavidin-HRP를 사용하여 biotinylation 된 막 단백질을 확인 하였다.

- <결론> Cos7 cell 에서는 p110, p40 위치에서 강한 band 가 확인 되었고 약한 여러 가지 band들이 보였는데 이것들이 proteolytic cleavage 에 의한 것인지 현재 알 수는 없다. 여러 가지 protease inhibitors를 사용하여 DDM lysate를 만들었기 때문에 이 가능성은 낮다고 생각 된다. C2C12 cell 에서는 역시 여러 band 위에 p110 정도에서 확인 되었고 3T3L1 cell 에서는 p110 위치에서 가장 강하게 잡혀 전반적으로 resistin 수용체는 p110 일 가능성이 높다.

- Resistin-like Molecule b (RELM b) 수용체 후보군 확인 : RELM b는 간세포에 작용하여 인슐린 저항성을 나타내는 기작이나 3차원적 구조가 resistin과 유사하기 때문에 수용체가 있다면 공유할 가능성이 있거나 유사한 수용체 family 일 수 있다. Cos7 cell에서 RELM b-Fc와 결합하였기 때문에 Cos7 cell, 그리고 resistin에 반응하는 C2C12, 3T3L1, HepG2 cell등에서 막 단백질을 정제하여 결합 수용체 후보군을 확인 하였다.

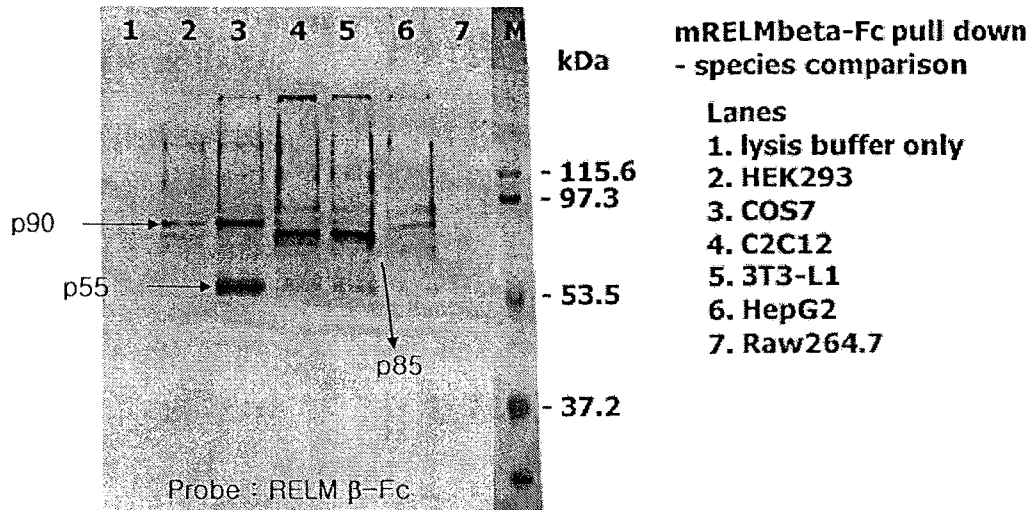


Figure 37 : 여러 종류 cell을 biotinylation을 한 후 RELM b-Fc 용합단백질을 사용하여 DDM 막 단백질을 정제, 결합 후 Protein A bead를 넣어 침전 회수 후 streptavidin-HRP를 사용하여 biotinylation 된 수용체 후보군을 확인 하였다.

- <결론> Cos7, 293T, HepG2 cell에서 p90 공통 band를 확인 하였고 특별히 Cos7 cell 에서는 p55 정도의 가장 강한 band가 보였고 그 위치에서 HepG2 cell에서도 보였다. mouse cell line 에서는 p85 위치에서 강하게 band가 확인 되었고 p55위치에서도 약하게 band가 확인 되었다.

## 5. adiponectin 수용체 유전자 발굴을 위한 expression cloning 기술 확립

- 프로테오믹스 방법의 보완으로서 2차 년도에 분자 생물학적 방법인 expression cloning 방법을 제안 하였다. 이미 adiponectin 수용체가 발현 되는 C2C12, HUVEC, Cos7 세포주를 확인 하였고 293T 세포에서는 adiponectin-Fc, FLAG-full length adiponectin, FLAG-globular domain 등이 binding을 안하기 때문에 background가 없는 transfection host로 사용할 수 있다. adiponectin 수용체가 발현

되는 위의 세포주에서 unidirectional expression cDNA library를 제조하여 세포주 당 10만개의 clone을 500 개 colony로 나누어 약 200개 pool 로 만들어 plasmid를 정제하여 293T cell에 transfection 하였다. 우리가 개발한 screening 방법은 in situ binding assay 인데 먼저 정제된 adiponectin-Fc, FLAG-full length adiponectin, FLAG-globular domain에 biotinylation 하여 protein probe를 만들고 이 probe를 transfection 시킨 293T cell에 넣고 binding 시키고 세척 한다. 70°C에서 30분 열처리 하여 endogenous alkaline phosphatase를 제거 한다. 여기에 Neutravidin에 heat stable alkaline phosphatase (SEAP) conjugation 시킨 complex를 넣고 반응시킨 후 기질을 가하여 purple color의 cell을 현미경으로 관찰하여 positive pool을 확인 한다. control protein으로 biotinylated GITR-Fc을 사용하였고 GITRL (GITR ligand, a TNF family) full length gene을 293T cell 에 transfection 하여 reaction control 로 사용하였고 Nature에서 보고한 AdipoR1을 역시 transfection 하여 biotinylated adiponectin protein과 결합하는 control gene으로 사용하였는데 보고와는 틀리게 binding을 안 하였다.

### Expression cloning of adiponectin receptor (s)

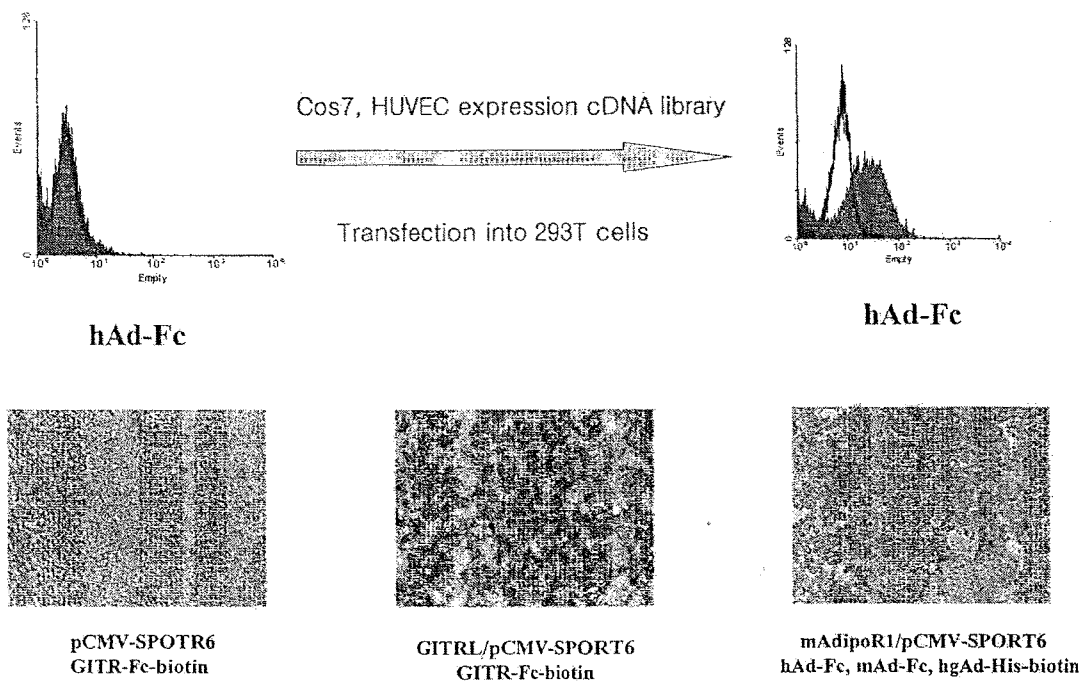


Figure 38 C2C12, Cos7, HUVEC cell에서 expression cDNA library를 제조하여 293T cell에 transfection 한 후 adiponectin ligands와 반응하는 clone을 SEAP를 사용하여 확인 하였다. GITR-Fc / GITRL interaction을 reaction positive control로 AdipoR1을 adiponectin ligand들의 수용체 control gene으로 사용 하였다.

- <결론> biotinylated ligand 와 그 수용체와 결합하는 interaction chemistry를 개발하였고 GTR / GITRL 간의 specific interaction으로 검증하였다. 이 방법으로 현재 여러 expression cDNA library를 screening 중에 있다. 본 연구에서 생물학적 활성이 있는 adiponectin ligands 들은 Nature 보고와는 달리 AdipoR1에 결합하지 않았다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구내용	연구 결과	달성도 (%)
1년 차	<p>◎lipid raft 단백질의 2D를 통한 differential proteomics 기술 개발</p>	<p>◎lipid raft를 분리하는 방법에 따라서 서로 다른 단백질들이 lipid raft에서 동정됨. 예를 들면 인슐린 수용체는 Brij 35로 이용하였을 때에만 lipid rafts에서 발견됨.</p> <p>◎raft 분리과정동안 계면활성제와 온도의 영향을 살피기 위하여 각기 다른 방법으로 분리된 raft 단백질들을 2-D 전기영동으로 분석.</p> <p>◎보다 많은 raft 단백질들이 TX-100 보다 Brij 35로 분리하였을 때, 4°C에서 보다도 37°C에서 분리하였을 때 발견되었음. 이는 계면활성제가 있을 때에 lipid rafts가 37°C에서도 안정적으로 존재할 수 있음을 보여주는 것임.</p> <p>◎실제로 37°C에서 raft를 분리하여도 Src과 Lyn은 lipid rafts에서 발견되었음.</p> <p>◎detergent-free 방법으로 정제된 raft를 2D로 분석하였을 때, 보다 많은 raft 단백질들이 발견되었으나 이들 대부분은 콜레스테롤을 제거하여도 raft에 발견되었기 때문에 detergent-free 방법으로 추출된 대부분의 raft 단백질들은 다른 세포소기관으로부터 온 오염된 단백질임으로 판명되었음.</p> <p>◎Proteomics 4, 3527, 2004. 이 방법의 개발로 보다 효율적으로 lipid raft를 분리할 수 있었고 lipid raft의 프로테오믹 연구가 가능할 수 있게 되었다.</p> <p>◎이 결과는 논문으로 출판되었음. Proteomics 4, 3527, 2004</p>	100%
	<p>◎MS/LS/LS를 통한 간세포와 지방세포의 lipid raft 단백질의 동정</p>	<p>◎lipid rafts를 집쥐의 간으로부터 분리하여 모세관 액체 크로마토그래피와 병렬 질량분석기를 통하여 분석하였음.</p> <p>◎196종의 단백질이 확인되었고 이 중 32%는 raft 또는 원형질막, 24%는 미토콘드리아, 20%는 microsome, 그리고 나머지 17%는 미확인 단백질이었음.</p> <p>◎기대치 않게 많은 미토콘드리아 단백질들이 raft에서 발견되었음. 미토콘드리아 단백질인 ATP synthase α와 β가 실제로 표면단백질임을 면역형광반응, 세포표면 biotinylation, 세포막 분리 등으로 확인할 수가 있었음. 이들 단백질들이 raft에 존재함을 생화학적으로 확인하였음.</p> <p>◎이 결과를 논문으로 출판하였음. Proteomics 4, 3536, 2004</p> <p>◎인간의 지방조직 세포를 확보하여 위와 동일한 방법으로 프로테오믹 분석 수행. (현재 원고 준비 중)</p>	100%

구분	연구내용	연구 결과	달성도 (%)
1년차	◎정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 지방세포로부터의 lipid raft 단백질의 differential proteomics	◎정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 지방세포를 확보하지 못하여 동물 모델로 대체하였음. 이는 3년차에 수행되었음.	100%
	◎adiponectin 및 resistin이 lipid rafts에 결합 여부 조사	◎ adiponectin, resistin family등의 chimeric ligands 대량 발현, 정제 및 생물학적 활성 규명 ◎ 정성적 혹은 정량적 binding assay를 통한 adiponectin, resistin family 수용체 발현 세포주 선별 : HUVEC, C2C12, Cos7, 3T3L1, HepG2 cell lines ◎ 여러 detergent를 사용한 막 단백질 (lipid raft fraction) 및 pull down assay 확립	100%
2년차	◎lipid rafts에 ATP synthase가 존재하는 지 조사	◎프로테옴 분석을 통해 많은 미토콘드리아 단백질들이 lipid rafts에서 동정되었음. 이 미토콘드리아 단백질들이 실제로 원형질막의 lipid raft에 존재하는 것인지 미토콘드리아 단백질이 lipid raft에 오염된 것인지에 대한 의문을 제기할 수 있음. ◎미토콘드리아 오염을 배제시키기 위하여 먼저 세포표면을 membrane-impermeable biotin으로 표식한 후 lipid raft를 분리하였음. 이 lipid raft를 다시 avidin-conjugated agarose beads로 침전시켜 세포막 lipid rafts를 분리하였음. 이 세포 표면 lipid raft 단백질들은 LC/MS/MS를 통하여 동정하였음. ◎110개의 단백질이 동정되었는데, 이중 40개는 원형질막, 4개는 미토콘드리아, 27개는 미동정 단백질이었음. ◎특히 ATP synthase와 cytochrome c oxidase subunits는 세포막 lipid rafts를 심하게 세척하였을 때에도 발견되었다. 이는 미토콘드리아 단백질들이 실제로 세포막 lipid rafts에 있음을 강력하게 증명하는 것임. ◎실제로 oxidative respiratory chain이 lipid raft에 있음을 증명하였음 (in manuscript) ◎이 결과는 현재 원고 작성중임	100%

구분	연구내용	연구 결과	달성도 (%)
2년 차	<p>◎ 제 2형 당뇨병 환자의 간, 근육, 지방조직에서의 ATP synthase의 발현 양상 조사</p>	<p>◎ 제 2형 당뇨병 환자의 간, 근육, 지방조직을 얻기가 거의 불가능하여 3년차 때 당뇨병 모델 동물로 실험을 대치하였음.</p>	100%
	<p>◎ 근육세포, 지방세포의 분화시 lipid raft에서 differential proteomics</p>	<p>◎ NIH3T3 L1세포로부터 adipocyte를 C2C12 세포로부터 myocyte를 분화시켜 lipid raft 추출          ◎ 비분화세포와 분화세포의 lipid raft를 2D differential proteomics로 양적으로 차이 나는 단백질을 선택하였음.          ◎ 근육세포 분화시 desmin, Gβ, ATP synthase β, Metaxin, Mitofilin, Ryanodine receptor, Myosin A1 light chain, Annexin V, Annexin II, VDACL1, 그리고 한 종의 미동정 단백질이 lipid raft에서 과량발현되었음.          ◎ 지방 세포분화시 Hsp70, Hsp90, Grp78, Hsp60, Mitofilin, Mortalin, prolyl 4-hydroxylase, gclqR, dihydrolipoamide transacylase E2, VDAC, NAD<sup>+</sup> isocitrate dehydrogenase, Ubiquinol reductase complex, SPFH2 등이 lipid raft에서 과량발현되었음.</p>	100%
	<p>◎ adiponectin 및 resistin에 결합하는 단백질의 동정 및 특성 연구</p>	<p>◎ 선별된 세포주로부터 최적의 detergent를 사용한 대량 pull down 수행          ◎ ID 수행 후 potential 수용체 단백질 확인 : adiponectin receptor (p120), resistin receptors (p110, p35), RELM beta (p60, p85, p80)</p>	100%



구분	연구내용	연구 결과	달성도 (%)
3년 차	lipid raft에 존재하는 ATP synthase complex의 생리학적 기능 연구	<p>◎미토콘드리아 증식은 지방조직은 ATP와 acetyl-CoA를 필요로 하기 때문에 지방세포 분화는 미토콘드리아의 증식을 요구함. 실제로 지방세포 분화과정 중에 미토콘드리아 단백질인 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>, cytochrome c등은 급격하게 증가하였다.</p> <p>◎전자현미경관찰에서도 미토콘드리아가 지방세포를 가득 채우고 있었음.</p> <p>◎ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>는 미토콘드리아만이 아니라 세포표면에서도 과량발현됨을 면역형광법, 세포막 분획, 세포막 biotinylation등으로 확인.</p> <p>◎지방세포의 밖에서도 ADP와 Pi만 공급되어도 ATP가 합성됨이 관찰되었고 ATP synthase inhibitor (oligomycin)이나 uncoupler (CCCP)등을 처리하였을 때 세포 밖에서의 ATP 합성은 중지되었음.</p> <p>◎세포배양액의 pH가 올라가게 되면 세포 밖 ATP 합성이 증가하게 되는 데, 이는 세포 밖 ATP 합성은 proton gradient를 사용함을 보여주는 것임.</p> <p>◎이 결과는 출판되었음 (Exp. Mol. Med., 36, 476, 2004)</p>	100%
	제 2형 당뇨병쥐의 지방조직에서의 미토콘드리아 상실	<p>◎제 2형 당뇨병 환자의 근육세포는 정상인의 그것에 비해서 호흡률이 현저하게 떨어져 있기 때문에 미토콘드리아 손상은 제 2형 당뇨병을 설명하는 데 매우 중요한 화두가 되었음.</p> <p>◎제 2형 당뇨병과 미토콘드리아의 관련성을 살피기 위해서 wild type, obese (ob/ob), diabetes (db/db) mice의 간, 근육, 지방조직에서의 미토콘드리아 단백질의 발현양을 조사하였음. 간, 근육에서는 쥐에 따른 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>의 발현양의 차이는 없었으나 db/db 지방조직에서 그 발현양이 급속하게 감소하였음.</p> <p>◎mitochondrial DNA양과 genomic DNA양을 비교하였을 때 db/db 지방조직에서 그 비율이 급속하게 떨어져 있었음.</p> <p>◎전자현미경으로 관찰하였을 때에도 db/db지방조직에서는 미토콘드리아가 거의 없었음.</p>	100%

구분	연구내용	연구 결과	달성도 (%)
3년 차	제 2형 당뇨병쥐의 지방조직에서의 미토콘드리아 상실	<p>◎db/db에 rosiglitzone을 처리하였을 때 glucose tolerance가 완화되는 데, 이 쥐의 지방조직에서 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>의 양은 상당히 증가한 것으로 관찰되었음. 또한 전자현미경상으로 rosiglitzone 처리한 ob/ob 지방조직은 많은 미토콘드리아를 가지고 있었음. 더불어 caveolae (=lipid rafts)의 양도 증가함을 관찰할 수 있었음.</p> <p>◎ 또 다른 제 2형 당뇨병 모델인 OLETF 집쥐의 지방조직에서도 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>의 발현이 감소함이 관찰되었음.</p> <p>◎이러한 결과들은 제 2형 당뇨병은 지방조직에서의 미토콘드리아의 상실과 밀접한 관련이 있음을 처음으로 규명하는 것임.</p> <p>◎현재 원고 작성중임</p>	100%
	adiponectin 및 resistin 수용체 유전자 발굴 및 이 수용체에 결합하는 단백질의 동정. 수용체 및 수용체 결합 단백질의 세포분자생물학적 연구	<p>◎adiponectin-Fc, FLAG-adiponectin, SEAP-adiponectin을 이용한 in situ binding assay를 이용한 expression cloning 개발 : C2C12, HUVEC, Cos7, 3T3L1 cell line의 expression cDNA library 제조</p> <p>◎수용체 후보 단백질 규명을 위한 affinity chromatography 및 Q TOF 수행중</p>	100%

구분	연구내용	연구 결과	달성도 (%)
3년차 1단계 (종합)	<p>◎shot gun proteomics와 differential proteomics를 이용한 제 2형 당뇨병 원인 단백질 발굴</p>	<p>◎간, 근육, 지방조직으로부터 lipid rafts를 분리하여 2D를 통한 differential proteomics 분석; 근육과 지방 세포에서 분화에 필요한 새로운 타겟 단백질을 찾았음.</p> <p>◎LC/MS/MS를 이용하여 간과 지방조직의 lipid raft 단백질 목록을 완성하였음. 특히 ATP synthase <math>\alpha</math>와 <math>\beta</math>가 lipid raft 단백질임을 다양한 각도로 증명하였음.</p> <p>◎ATP synthase complex가 세포표면의 lipid raft에 존재함을 관찰하였고 세포 밖에서 ATP 합성에 필요함을 증명하였음. 더불어 respiratory oxidative chain 역시 lipid raft에 있음을 증명하였음.</p> <p>◎제2형 당뇨병 동물들의 지방조직에서 미토콘드리아가 상실되어 있는 것을 다양한 각도로 관찰하였음. 이는 제 2형 당뇨병의 원인이 지방조직에서 미토콘드리아의 상실과 밀접한 연관이 있음을 증명하는 것임.</p>	100%
	<p>◎adiponectin 및 resistin 수용체 동정 및 그 결합 단백질 발굴</p>	<p>◎ adiponectin, resistin family 수용체 후보군 확인</p> <p>◎ expression cloning 기술 확보로 지속적인 수용체 유전자 스크리닝 프로세스 개발</p>	80%

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- \* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

### 가. 국내외 시장 현황 및 전망

◎세계 비만 시장의 규모는 1조 달러 이상이며, 비만에 의하여 유도되는 제 2형 당뇨병은 전체 인류의 10% 이상이 앓고 있으며, 앞으로도 그 비율이 계속 증가될 것으로 예상된다. 특히 PPAR $\gamma$  agonist의 시장규모만으로도 약 10억 달러 이상이다. 본 연구에 의하여 PPAR $\gamma$  agonist인 rosiglitazone이 미토콘드리아의 증식을 도와줌으로서 제 2형 당뇨병을 완화시킬 수 있다는 사실이 밝혀짐으로서 PPAR $\gamma$  agonist 이외에도 다른 미토콘드리아 증식 촉진제-아마도 PPAR $\delta$  agonist가 가장 강력한 후보일 것임-들도 당뇨병 치료제로서 사용될 수 있을 것으로 믿어진다.

◎국내 비만 및 당뇨병 연구 분야에서 지방세포 유래의 호르몬인 에디포카인(adipokines)에 대한 연구는 처녀지이다. 외국의 연구 경향은 에디포카인은 당, 지방대사 조절인자인 인슐린과 같이 중요한 호르몬으로 인정받고 있다. 본 연구에서 개발된 많은 재조합 에디포카인, 항체, 및 수용체 후보군의 확인은 에디포카인의 연구 분야에서 경쟁적 관계에서 연구를 가능케 하고 진단체계 및 치료제 개발의 원천 정보를 제공하여 2형 당뇨의 진단 및 치료 시장에 진출할 수 있다.

나. 사업성과(분야별로 작성하되 평가가 용이하도록 기업의 의견을 반영하여 구체적으로 작성)

#### 1) 성과(기업화, licensing, pilot plant 및 활용도 등)

- 재조합 에디포카인 개발 : 연구 및 진단키트 개발에 이용
- 동물 세포내 대량 재조합 단백질 발현 및 정제
- 라이건드 / 수용체 결합 반응 확인 및 수용체 및 신호전달 단백질 확인 방법 구축
- 수용체 유전자를 분자 생물학적 방법으로 발굴하는 expression cloning 구축

#### 2) 향후 실용화 및 활용계획

- large scale affinity chromatography , Q-TOF 방법을 통한 수용체 및 신호전달 단백질 발굴
- 발굴된 수용체-adiponectin / resistin family 결합 mode 및 신호전달 read-out 규명으로 수용체 functional assay 및 drug screen 용 high

throughput assay 개발

### 1) 기술적 응용잠재력

- 과학기술적 성과 측면 포함

- lipid raft 프로테옴 기술을 제 2형 당뇨병 이외에 다른 알츠하이머스 병, 광우병, 암등에 적용할 수 있음
- 세포표면에 oxidative respiratory chain이 있음을 발견함으로써 세포막을 통한 ATP 합성 연구와 ROS 생성연구에 새로운 개념을 줄 수 있었음
- 제 2형 당뇨병과 지방조직의 미토콘드리아의 관련성을 밝힘으로서 미토콘드리아를 증식 시킬 수 있는 약제의 개발에 대한 토대를 구축하게 하였다.
- 동물 세포내 재조합 라이건드 단백질 발현 및 정제 기술 확보
- 라이건드 / 수용체 결합의 정성적, 정량적 assay 기술 확보
- 막 단백질 정제 및 주어진 라이건드를 orphan 수용체 존재 규명
- expression cloning 기술 개발로 새로운 라이건드 및 수용체 유전자 발굴

### 2) 사업화로서의 활용가능성

- 기업화 등 경제적 성과 측면을 포괄적으로 기술

- 미토콘드리아의 증식을 도와주는 약제의 개발을 통하여 경제적 부가가치를 높일 수 있다.
- native conformation을 유지하는 재조합 호르몬, 사이토카인 대량 발현으로 therapeutic drug 개발 가능성
- adiponectin, resistin family 수용체 후보군의 확인은 앞으로 affinity chromatography 및 프로테오믹스 기술을 이용해 실제 수용체 단백질 발굴로 인해 이 두 호르몬을 표적으로 하는 치료제 개발에 원천적인 정보를 제시하여 다국적 제약회사와 공동으로 2형 당뇨 치료제 개발을 가능케 할 수 있다.

## 나. 연구개발성과의 산업·공공분야 파급효과

### 1) 산업분야

- 프로티오믹스, gene discovery 분야의 인프라 구축에 기여

### 2) 공공분야

- 제 2형 당뇨병의 원인이 지방세포의 미토콘드리아 상실에 기인함을 밝혀냄으로서 당뇨병 예방에 가장 중요한 것이 운동을 통한 지방세포 미토콘드리아 복원임을 상기시킴으로서 국민보건에 기여할 수 있음

## 다. 관련분야 연구개발 인프라 구축 (인력양성, 기자재 등)

- 이 과제를 통하여 본 실험실은 7명의 학생이 박사과정에 입문하게 되어 괄목

할 만한 인력양상 효과를 거두고 있음.

- 생리활성 단백질 대량 발현 기술
- human genome 상에 있는 수백 개의 orphan immunoglobulin supergene family 의 라이겐드 / 수용체 pairing을 가능케 하여 면역, 신경, 대사 질환의 새로운 drug target 선별을 가능케 한다.

라. 기대하지 않은 두드러진 연구개발 성과

- 세포표면에 ATP를 합성하기 위한 모든 machinery가 있음을 증명함으로써 ATP와 ROS 생성 연구에 새로운 관점을 제공하고 있음.
- 제 2형 당뇨병의 보편적인 원인이 지방세포의 미토콘드리아의 상실임을 증명함으로써 당뇨병 연구와 당뇨병 약제에 대한 새로운 관점을 제공하고 있음.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 참고문헌

- Diabetes. 51, 536 (2002)  
Electrophoresis 16, 1034, (1995)  
EMBO J., 20, 2202, (2001)  
Exp. Mol. Med., 36, 476, (2004)  
FASEB J, 13, 1961, (1999)  
J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12, 1238 (2001)  
JCB, 154, 829, (2001)  
JCB,149, 567, (2000)  
J. Cli. Endocrinol., & Meta. 86, 4321 (2001)  
JBC, 272, 20706, (1997)  
JBC, 273,26962, (1998)  
JBC, 275, 20847, (2000)  
JBC, 275, 21768, (2000)  
JBC, 275, 25665, (2000)  
JBC, 275, 31682, (2000)  
JBC, 276, 23028, (2001)  
JBC, 276, 6030, (2001)  
JBC, 276, 9670, (2001)  
JBC, 277, 8635, (2002)  
JBC. 276, 11252 (2001)  
J. Immunol., 162, 7217, (1999).  
Lancet. 360, 57, (2002)  
MCB, 21, 4553, (2001)  
Nature, 407, 203, (2000)  
Nature, 410, 944, (2001)  
Nature. 409, 307, (2001)  
Nature. 410, 944, (2001)  
Nat. Biotechnol., 10, 994 (1999)  
Nat. Biotechnol., 19, 242 (2001)  
Nature Med. 7, 941, (2001).  
Nature Med. 8, 731, (2002)  
PNAS . 97, 14478 (2000)  
PNAS, 98, 5619, (2001).  
PNAS, 99, 7912, (2002)  
Proteomics 4, 3527, (2004)  
Proteomics 4, 3536, (2004)