

Glycerol-Phosphate Acyltransferase Gene Expression의 호르몬에 의한 조절

손승렬¹ · 신동훈*

고려대학교 식량공학과, ¹단국대학교 미생물학과

Hormonal Regulation of Glycerol-Phosphate Acyltransferase Gene Expression

Son, Seung-Yeol¹ and Dong-Hoon Shin*

Dept. of Food Science and Industry, Korea University, Chochiwon 339-800, Korea

¹Dept. of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

Abstract — Both glycerol-phosphate acyltransferase (GPAT) and 7.2 kb mRNAs were present at the highest level in liver. Glycerol-phosphate acyltransferase and 7.2 kb mRNA levels increased dramatically when fasted mice were refed a high carbohydrate diet. In mature 3T3-L1 adipocytes, insulin increased both glycerol-phosphate acyltransferase and 7.2 kb mRNA levels 2.6 to 3-fold while dibutyryl cAMP decreased mRNA levels by 50% and 80%, respectively. These results indicate positive regulation by insulin and negative regulation by dibutyryl cAMP of both glycerol-phosphate acyltransferase and 7.2 kb mRNA.

Glycerol-phosphate Acyltransferase(GPAT)(EC 2.3.1.15)는 포유동물 내에서 triacylglycerol과 phospholipid 생합성에서의 lysophosphaditic acid를 생성하는 반응을 촉매작용한다(1, 2). GPAT는 glycerolipid 합성의 중요한 장소가 되는 microsome(세포질 미립체)의 생체막에 존재하며 또한 미토콘드리아 외부의 생체막에도 존재한다(3-5). 간 조직 내에서는, GPAT 총 활성도의 50% 정도가 미토콘드리아 부분에서 발견되지만, 반면에 대부분의 다른 조직들의 microsome의 GPAT 활성도는 미토콘드리아 부분의 10배 정도가 된다(3, 6).

GPAT에 의하여 지방산의 에스터화가 수행되어지며, 이 또한 영양소 및 호르몬에 의하여 조절되어 진다고 알려져 있다. GPAT의 활성도는 insulin에 의하여 증가되고, 단식에 의하여 감소되어 지는것으로 여겨지며, 이 효과는 N-ethylmaleimide에 반응하지 않는 미토콘드리아에 존재하는 효소들에게 더 크게 작용되어지는 것으로 생각된다(7, 8). 여러가지 중요한 작용에도 불구하고, GPAT는 triacylglycerol과 인지질 생합성의

조절에 중요한 역할을 한다. 포유류의 GPAT는 아직 까지 정제되거나 특성화 되어지지 않고 있다. 그러나, 83-kDa *E. coli sn-glycerol-phosphate acyltransferase* (pls B)의 structural gene은 확인되었고 sequencing되었다(9, 10).

본 연구에서는 GPAT mRNA의 gene expression과 호르몬에 의한 조절에 대하여 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

영양소의 효과 연구를 위하여 6~8 주령의 CD-1 male mouse를 48시간 동안 단식시킨 후에 지방질이 없는 고탄수화물 사료(Sigma Co.)를 급식시켰다. 이 생쥐들에 streptozotocin을 사용하여 당뇨병을 유발시켰다(11). Regular insulin(3 U/체중 100 g)이 복막의 내부로 주사되고 Lente insulin(30 U/체중 100 g)이 피하주사 되어졌다.

Key words: Glycerol-phosphate acyltransferase (GPAT), insulin

*Corresponding author

세포 배지

3T3-L1 세포가 Horse serum 배지에 배양되고 adi-

pocyte에 변이시켰다(12). 변이된 3T3-L1 세포들은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린 혹은 1 mM dibutyryl cAMP+1 mM theophylline이 첨가되기 이전에 24시간 동안 serum이 없는 배지에서 정치되어진다. 세포들은 처리후 16시간만에 수확되어진다.

Northern Blot 분석법

Phenol 추출법(13)을 사용하여 poly(A⁺) RNA가 생쥐세포들 혹은 3T3-L1 세포들로부터 얻어진 total RNA에 의하여 준비되어졌다. Northern blot hybridization이 pGPAT와 p7.2를 probe로 사용하여 nick-translation(14) 혹은 random priming에 의하여 label되어진 후에 수행되어진다(15). Actin cDNA sequence(pAM-91)가 각 시료의 동등한 mRNA 성분을 확인하기 위하여 사용되어졌다.

전사 Run-on 분석법

세포핵들이 sucrose cushion법(16)을 이용하여 간 조직 추출물의 침전에 의하여 얻어졌다. Run-on 분석법은 [α -³²P] UDP로 label된 10⁸ 세포핵을 사용하여

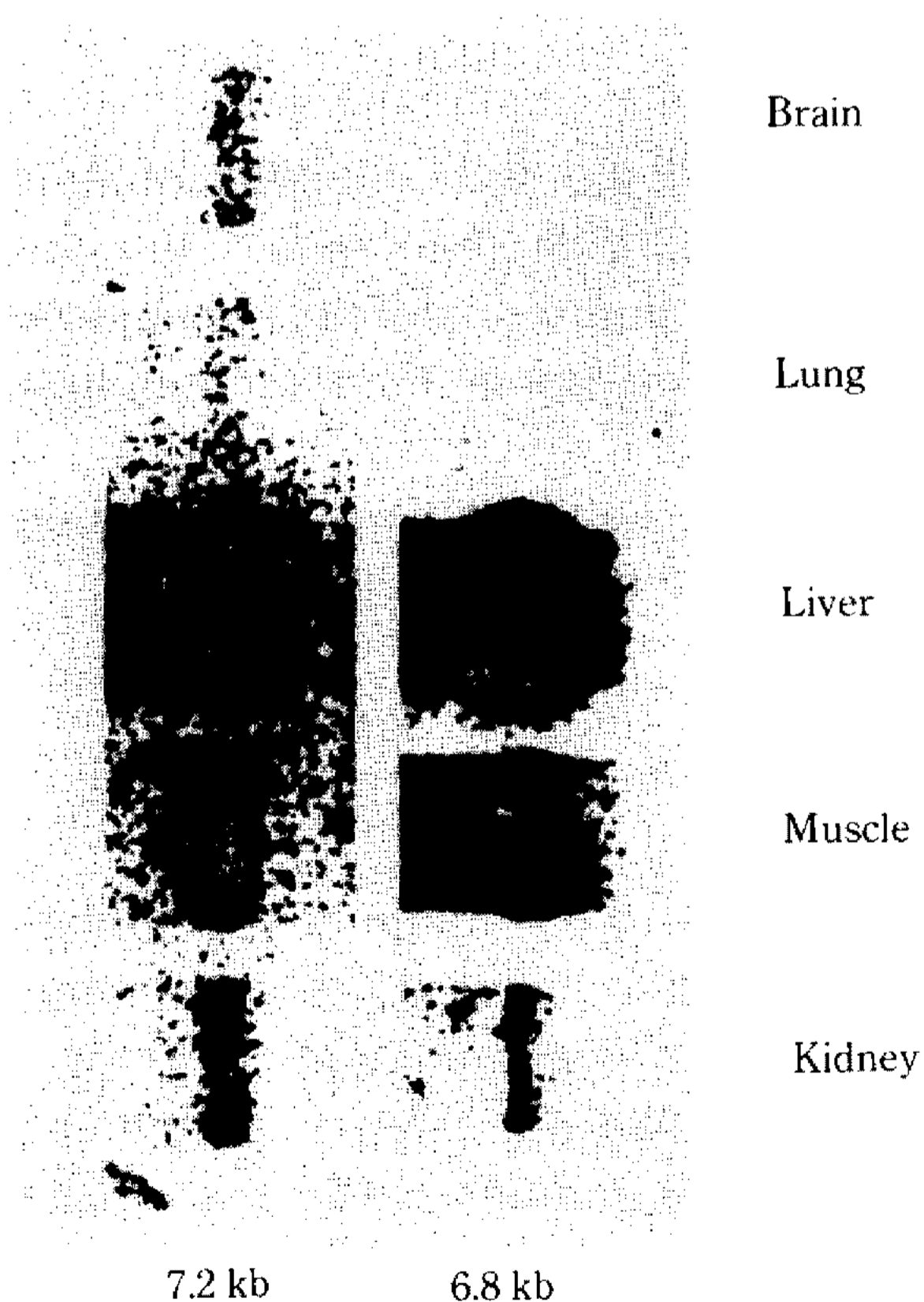


Fig. 1. Tissue distribution of GPAT and 7.2 kb mRNA. Poly (A⁺) RNA (4 μg) was subjected to denaturing agarose gel electrophoresis, blotted to nitrocellulose and probed with ³²P-labeled pGPAT or p7.2.

수행되었고 또한 5 μg 의 변성된 pGPAT 혹은 p7.2와 함께 hybridizing에 의하여 수행되어졌고 nitrocellulose filter에 고정되었다(11).

결과 및 고찰

Fig. 1에서와 같이 6.8 kb 크기를 가진 GPAT mRNA는 신장, 근육, 또한 간 등의 세포조직에 존재하는 것이 관찰되었다. GPAT mRNA 농도는 간 조직에서는 다른 조직에 존재하는 양보다 약 2배 정도 높았는데 그 이유는 조직에서의 mRNA는 단식시킨 생쥐에게 고탄수화물의 사료를 재급식함으로써 얻어지기때문에 inducibility의 차이에 의하는 것으로 여겨진다.

생체내에서의 GPAT와 7.2 kb mRNA의 인슐린에 의한 조절

간 조직의 GPAT와 mRNA 농도는 미리 단식된 생쥐들에게 지방질이 없는 고농도의 탄수화물을 급식할 경우에 극적으로 증가되었다. 초기에는 인슐린에 의한 7.2 kb mRNA의 유도가 약간 활발하였으나, 시간이 경과할수록 7.2 kb mRNA 농도는 GPAT mRNA 농도보다 적게 증가되었다(Fig. 2). 단식/재급식에 의하여 발생한 증가된 인슐린은 아마도 이러한 mRNA들의 유도를 유발시켜주는 것으로 여겨진다. GPAT gene

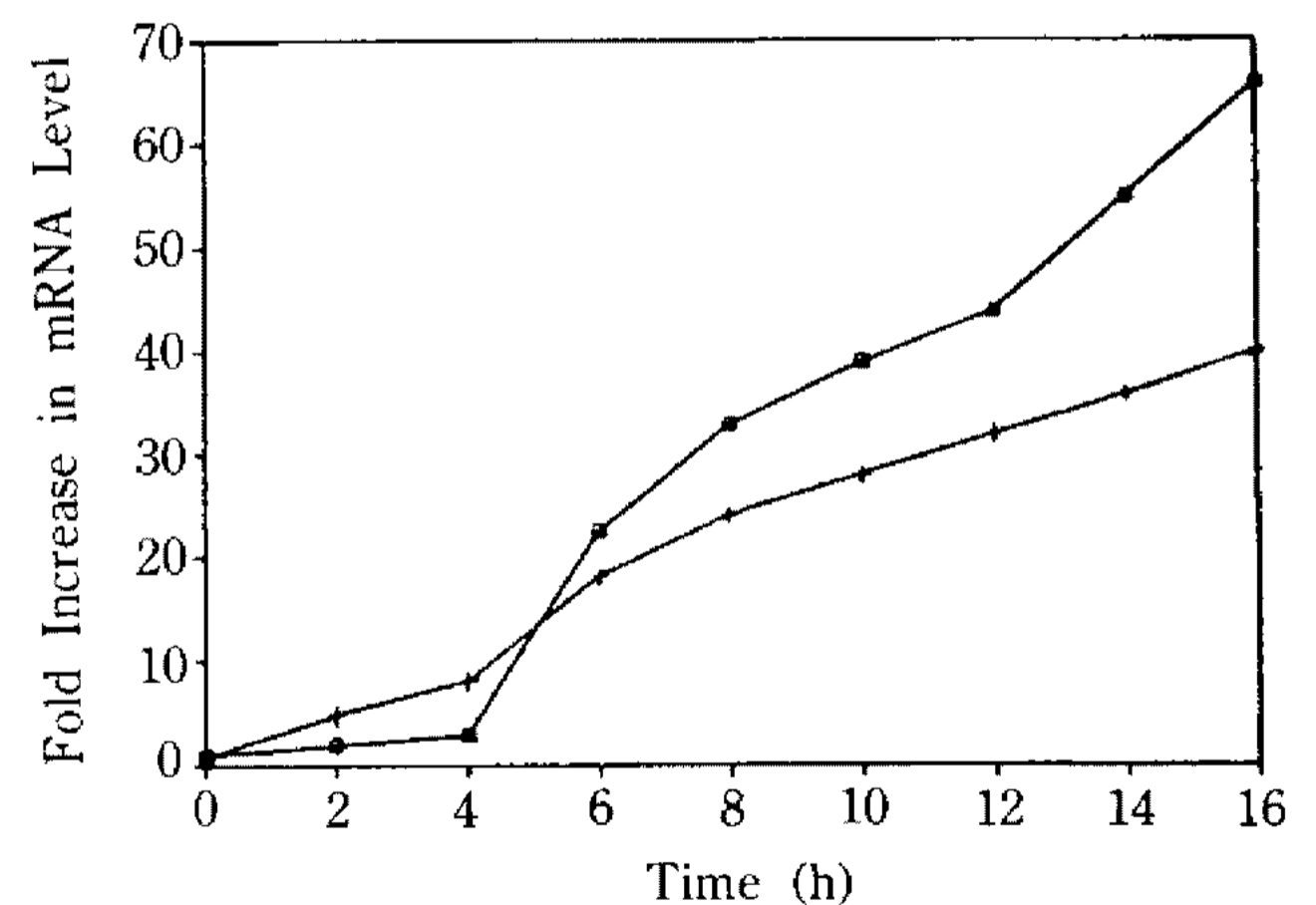


Fig. 2. Time course of induction of mouse liver GPAT and 7.2 kb mRNA by fasting/refeeding.

Poly (A⁺) RNA prepared from livers of mice fasted 48 h and then refeed a fat-free, high carbohydrate diet for the time indicated were used in Northern blot analysis for GPAT (□) and 7.2 kb mRNA (+), as described in Fig. 1. Autoradiograms were quantitated by densitometric scanning and data normalized to values obtained for fasted animals.

Table 1. Effect of insulin on steady-state mRNA levels and transcription rates for glycerol-phosphate acyltransferase (GPAT) and 7.2 kb mRNA in streptozotocin-diabetic mouse liver*

mRNA Level ^a			Transcription Rate ^b			
Time (h)	GPAT	7.2 kb	Time (h)	GPAT	7.2 kb	Actin
0	1.0	1.0	0	1.0	1.0	1.0
6	22.3	18.2	2	6.3	5.8	1.3
6 Control	1.5	1.0				

*Poly (A⁺) RNA or whole nuclei were isolated from livers of streptozotocin-diabetic mice prior to and after insulin administration. Data were normalized to values obtained before insulin treatment and are presented as fold-increases. ^aPoly (A⁺) RNA was resolved on denaturing agarose gels, Northern-blotted, probed with pGPAT or p7.2, and autoradiograms scanned densitometrically.

^bRun-on transcription and hybridization with pGPAT, p7.2 and pAM-91 (actin) were carried out as described in "Materials and Methods".

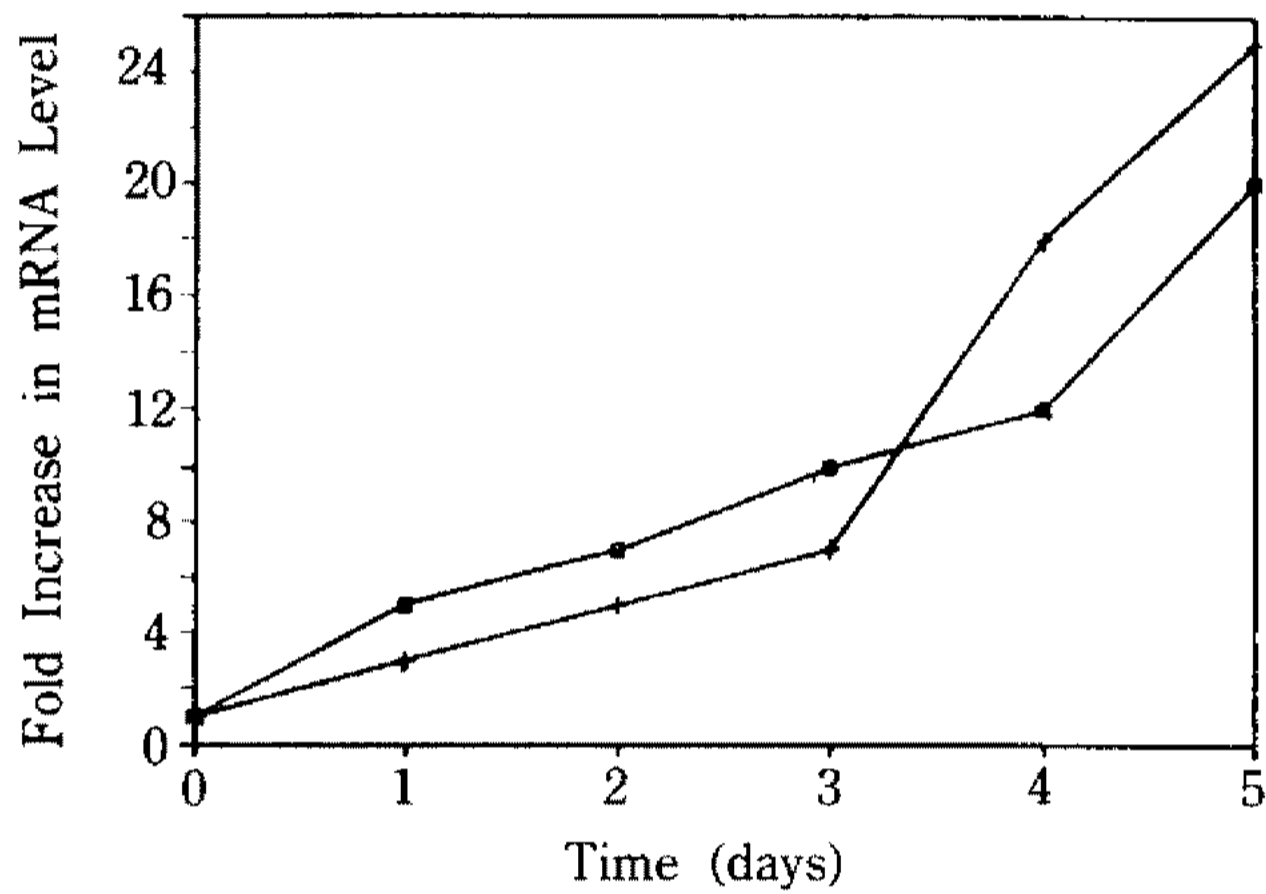


Fig. 3. Relative levels of GPAT and 7.2 kb mRNA during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

Poly (A⁺) RNA prepared from confluent preadipocytes (day 0) and from developing adipocytes following treatment with 1-methyl 3-isobutylxanthine and dexamethasone were used in Northern blot analysis for GPAT (□) and 7.2 kb (+) mRNA, as described in Fig. 1. Autoradiograms were quantitated by densitometric scanning and data normalized to values obtained for day 0.

expression에 대한 인슐린의 효과는 streptozotocin을 사용하여 당뇨병을 유발시킨 생쥐들에서 연구되었다 (Table 1). 당뇨병을 가진 생쥐에게 인슐린을 투여한 후에는 steady-state mRNA 농도가 6 시간 만에 약 20배 정도 증가하였다. GPAT 유전인자의 전사속도는 인슐린을 투여한 후 2시간 만에 약 6배로 증가하였다. 7.2 kb mRNA에 있어서도 Table 1에서 보여주듯이 인슐린에 의한 조절이 비슷하게 나타났다.

3T3-L1 Adipocytes에서의 GPAT와 7.2 kb mRNA의 인슐린에 의한 조절

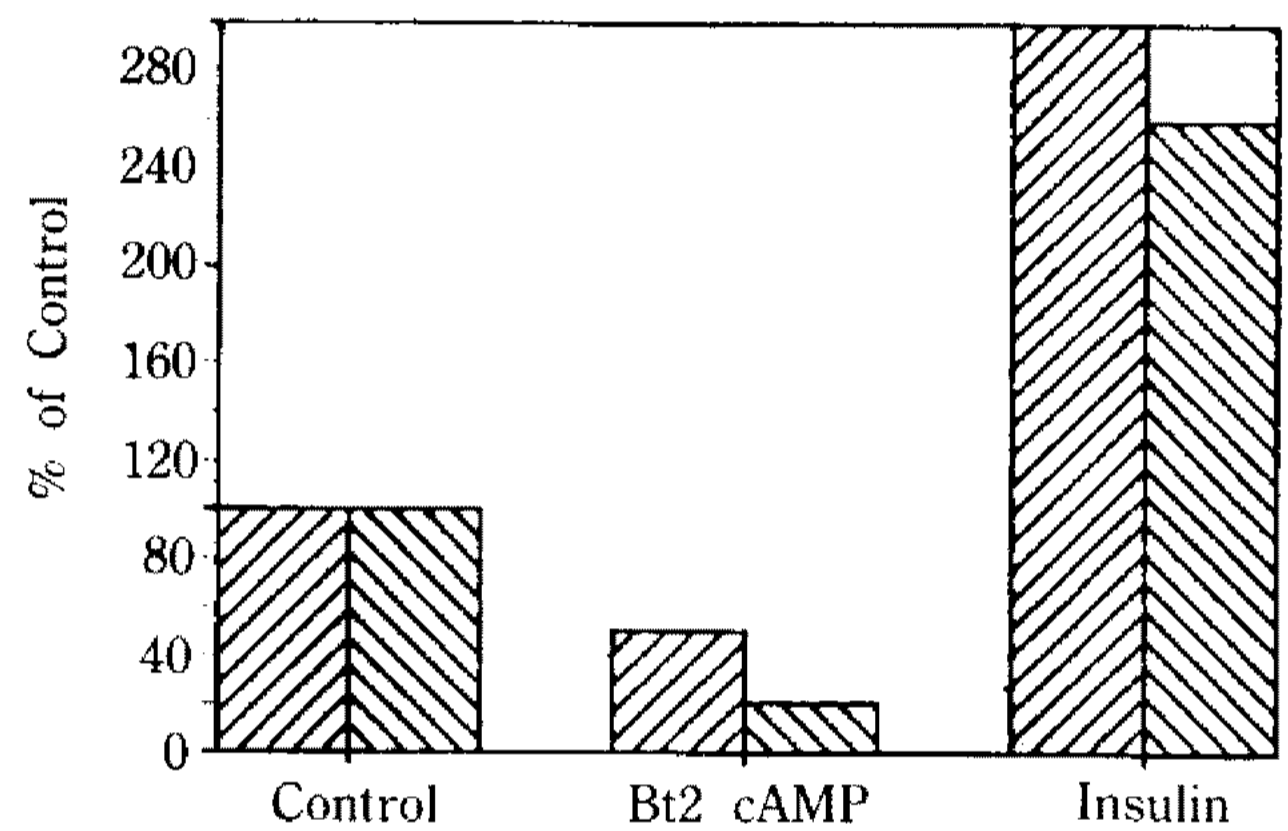


Fig. 4. Effects of insulin and cAMP on GPAT and 7.2 kb mRNA levels in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated as in Fig. 3 and cultured in serum-free medium 24 h prior to treatment of insulin or dibutyl cAMP plus theophylline. Poly (A⁺) RNA was prepared and Northern blot analysis were carried out as described in Fig. 1. Autoradiograms were quantitated by densitometric scanning and data normalized to values obtained for control cells without treatment. Results for GPAT and 7.2 kb mRNA represent the mean of duplicate determinations from a single experiment.

(GPAT: ▨, 7.2 kb mRNA: ▩)

GPAT와 7.2 kb mRNA들은 세포들이 lipogenic 형태일 때 유도되기 때문에, steady-state mRNA 농도는 adipocyte가 분화될 때 관찰되어졌다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, 초기에는 GPAT mRNA의 증가가 약간 높았으나, GPAT와 7.2 kb mRNA 농도는 3T3-L1 preadipocyte가 분화하는 동안에 각각 20배, 25배 증가하였다. 성숙한 3T3-L1 adipocyte에서는 7.2 kb와 GPAT mRNA 농도가 16시간동안 인슐린을 처리할 경우에 2.6~3배로 증가하였다. Lipogenesis를 조절하는데 있

어서 glucagon은 상반되는 역할을 하므로 cAMP의 효과도 관찰하였다. 16시간 동안 dibutyryl cAMP를 3T3-L1 adipocyte에 처리한 경우에는 GPAT와 7.2 kb mRNA 농도는 각각 50%, 80% 감소되었다. 이러한 결과들은 이 두 유전인자들의 독립적인 인슐린에 의한 positive regulation(조절) 및 cAMP에 의한 negative regulation을 보여준다(Fig. 4).

비록 인슐린이 여러 유전인자들의 전사속도를 증가시켜 준다고 알려져 있고(17-19), phosphoenolpyruvate carboxykinase에 있어서는 전사속도를 감소시킨다고 할지라도(20, 21), 인슐린에 의한 조절에 있어서의 cis-trans system들은 아직도 잘 특성화 되어지지 않아왔다.

그러므로, GPAT 유전인자들은 인슐린에 의한 gene expression의 positive regulation의 기초가 되는 분자 생물학적 기작을 연구하는데 있어서 좋은 model system이 될 수 있을 것이다.

요 약

Glycerol-phosphate acyltransferase와 7.2 kb mRNAs 모두가 간 조직에 가장 많이 존재하였다. Glycerol-phosphate acyltransferase와 7.2 kb mRNA 농도가 단식시킨 생쥐들에게 고농도 탄수화물 사료를 재급식할 경우에 상당히 증가 되었다. 성숙된 3T3-L1 adipocytes에서는 인슐린이 glycerol-phosphate acyltransferase와 7.2 kb mRNA의 농도를 2.6~3배 증가시켰고, 반면에 dibutyryl cAMP는 mRNA 농도를 각각 50%, 80% 정도 감소시켰다. 이러한 결과들은 glycerol-phosphate acyltransferase와 7.2 kb mRNA에 대하여 인슐린에 의하여는 positive regulation(조절)이 되고 cAMP에 의하여는 negative regulation이 되는 것을 보여준다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 지방대학 육성과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Brindly, D.N. 1985. In D.E. Vance and J.E. Vance (Eds), *Biochemistry of Lipids and Membranes*, Pp. 213-241. Academic Press, New York.

2. Bell, R.M. and R.A. Coleman. 1983. In P.D. Boyer (Ed), *The Enzymes*, Pp. 87-89. Academic Press, New York.
3. Schlossman, D.M. and R.M. Bell. 1976. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. *J. Biol. Chem.* **251**: 5738-5744.
4. Coleman, R.A. and R.M. Bell. 1980. Selective changes in enzymes of the *sn*-glycerol 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate pathways of triacylglycerol biosynthesis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* **255**: 7681-7687.
5. Monroy, G., F.H. Rola, and M.E. Pullman. 1972. A substrate- and position-specific acylation of *sn*-glycerol 3-phosphate acyltransferase by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **247**: 6884-6894.
6. Bremer, J.K., S. Bjerve, B. Borrebaek, and R. Christiansen. 1976. The glycerophosphate acyltransferases and their function in the metabolism of fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.* **12**: 113-125.
7. Bates, E.J. and E.D. Saggerson. 1979. A study of the glycerol phosphate acyltransferase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities in rat liver mitochondrial and microsomal fractions. *Biochem. J.* **182**: 751-762.
8. Saggerson, E.D. and C.A. Carpenter. 1987. Effects of streptozotocin-diabetes and insulin administration *in vivo* or *in vitro* on the activities of five enzymes in the adipose-tissue triacylglycerol synthesis pathway. *Biochem. J.* **243**: 289-292.
9. Lightner, V.A., R.M. Bell, and P. Modrich. 1983. The DNA sequences encoding *plsB* and *dgk* loci of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**: 10856-10861.
10. Green, P.R., T.C. Vanaman, P. Modrich, and R.M. Bell. 1983. Partial NH₂- and COOH-terminal sequence and cyanogen bromide peptide analysis of *Escherichia coli sn*-glycerol 3-phosphate acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **258**: 10862-10866.
11. Paulauskis, J.D. and H.S. Sul. 1989. Hormal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J. Biol. Chem.* **264**: 574-577.
12. Paulauskis, J.D. and H.S. Sul. 1988. Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. *J. Biol. Chem.* **263**: 7049-7054.
13. Towle, H.C., C.N. Mariash, and J.H. Oppenheimer. 1980. Changes in the hepatic levels of messenger ribonucleic acid for malic enzyme during induction by thyroid hormone or diet. *Biochemistry* **19**: 579-585.
14. Thomas, P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 5201-5205.
15. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein. 1983. A technique

- for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
16. Marzluff, W.F., E.C. Murphy, and R.C.C. Huang. 1974. Transcription of the genes for 5S ribosomal RNA and transfer RNA in isolated mouse myeloma cell nuclei. *Biochemistry* **13**: 3689-3696.
17. Alexander, M.C., M. Lomanto, N. Nasrin, and C. Ramaika. 1988. Insulin stimulates glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5092-5096.
18. Vaultont, S., A. Munnich, J.F. Decaux, and A. Kahn. 1986. Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J. Biol. Chem.* **261**: 7621-7625.
19. Stumpo, D.J., T.N. Stewart, M.Z. Gilman, and P.J. Blackshear. 1988. Identification of c-fos sequences involved in induction by insulin and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **263**: 1611-1614.
20. Cimbala, M.A., W.H. Lamers, K. Nelson, J.E. Monahan, H. Yoo-Warren, and R.W. Hanson. 1982. Rapid changes in the concentration of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in rat liver and kidney. *J. Biol. Chem.* **257**: 7629-7636.
21. Magnuson, M.A., P.G. Quinn, and D.K. Granner. 1987. Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-chloramphenicol acyltransferase fusion gene. *J. Biol. Chem.* **262**: 14917-14920.

(Received August 20, 1993)