

# 필수아미노산 결핍에 의한 섭식반응과 Methionine 결핍이 흰쥐의 뇌내 *c-fos* 발현에 미치는 영향

김 창 혁

강원대학교 동물자원공동연구소

## Effect of Essential Amino Acid Deficient Diets in Feeding Response and *c-fos* Expression in Rats Brain in Response to Methionine Deficiency

C. H. Kim

Institute of animal resources, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of essential amino acid(EAA) deficient diets on short-term feeding response and the Fos expression in brain area when methionine deficiency diet fed, and thereby to know the mechanism of feed intake regulation. In all trials, experimental diets were formulated with pure amino acid mixture to level of 15% nitrogen. Rats were adapted to a 6-hr single-meal feeding per day(17:00~21:00). Feed intake and body weight were monitored every hour after 7-day of feeding of individual EAA deficient diets in Exp. I. In Exp. II, Fos immunohistochemistry was determined in various regions of brain to identify the regions that is related to suppressed feed intake following feeding methionine-deficient diet. Fos expression was examined to know the initial sensitive region in the brains of rats at 3h after feeding of the control and methionine deficient diet(-Met).

Initial response to EAA deficiency diets was severely depressed in methionine deficiency diet, but the depression was low in threonine deficiency diet. However, the feed intake at 3rd day in rats was depressed in the order of His(71%), Leu(68%), Ile(66%), Thr(63%), Trp(61%), Val(55%), Phe(52%), Met(51%), Lys(44%) and Arg(24%). Fos immunoreaction in neural regions(PPC, amygdala and EPC) of pyriform cortex was increased in the -Met group more than in the control diet group, but those in LH, VMH and PVM were similar. Thus, based on these data, the PPC was identified as the initial response area in the -EAA diet.

(Key words : Fos protein, Essential amino acid, PPC, Brain, Feeding response)

### I. 서 론

단위동물의 사료섭취량은 사료내 필수아미노

산의 과부족, 사료단백질의 질적 변화 또는 체내 생리적 변화 등 여러 가지 요인에 의하여 영향을 받는다(Gietzen 등, 1989; Rogers와

Corresponding author : C. H. Kim, Institute of animal resources, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea. TEL; 032-250-7693.

Leung, 1973; Meliza 등, 1981; Bellinger 등, 1995; Jiang과 Gietzen, 1994; 김과 이, 1998). 실험동물에 단백질원으로서 zein의 급여는 사료섭취량과 체내 아미노산 이용효율이 감소하지만(Kim 등, 1996), 부족한 아미노산 보충은 사료섭취량, 증체량 및 체내 아미노산의 이용효율을 개선시킨다(김 등, 1998; Kim 등, 1998). 또한 사료단백질의 질적 변화나 lysine 결핍에 따른 해당 아미노산이 뇌의 PPC와 혈중 아미노산 농도에 영향을 주어 섭취량이 감소되는 것으로 알려져 있다(김과 이, 1998; 김, 2002).

Kumuta와 Harper(1962)는 threonine 결핍사료 급여 후 4시간까지 사료섭취량의 감소는 혈중 아미노산 농도와 높은 상관성이 있으며, tryptophan 불균형사료에 의한 가금의 사료섭취량 감소는 prepyriform cortex(PPC)와 관련(Firman과 Kuenzel, 1988)이 있다고 하였다. 한편 뇌 각부위를 전기자극으로 손상시킨 후 아미노산 불균형 사료를 급여한 시험에서 PPC와 amygdala에 손상을 주었을 때에는 사료섭취를 회피하지 않았다(Firman과 Kuenzel, 1988; Leung과 Rogers, 1987). Tryptophan 불균형 사료를 급여한 rat의 tryptophan 농도는 PPC에서는 감소한 반면 amygdala에서는 감소하지 않았다는(Gietzen, 1993) 것과 PPC에 threonine 용액을 주입한 rat은 threonine 불균형사료는 회피하지 않지만 isoleucine 불균형 사료는 회피(Beverly 등, 1991) 하였다. 또한 수탉의 뇌에 제한 아미노산을 주입하였을 때 사료섭취량이 회복되었다고 보고(Tobin과 Boorman, 1979)한 일련의 시험결과로 미루어 아미노산 결핍에 의한 사료섭취량의 감소는 적어도 뇌내 PPC가 깊이 관련되어 있다는 점을 의심할 여지가 없다.

필수아미노산 결핍에 의한 사료섭취량 감소 정도는 각 아미노산에 따라 다르게 반응한다. Said와 Hegsted(1970)에 의하면 필수아미노산 과잉에 따른 사료섭취의 억제 정도는 비필수아미노산 보다 강하며 그 중에서도 methionine, tryptophan, histidine, leucine 순으로 억제 정도는 강하다고 하였다. 그러나 저분자 중성 아미노산인 threonine, 염기성 아미노산인 lysine의 과잉섭취로 인한 섭식억제 정도는 비교적 약하

지만 lysine 결핍사료를 급여시 lysine 수용액을 급수하면 섭취량이 증가하고, 뇌하수체 전엽에서는 강한 뇌파가 관찰(Torii 등, 1987)되는 점으로 미루어 뇌는 동물의 섭식행동 및 섭식생리와 매우 밀접한 관계를 갖고 있다고 볼 수 있다.

외부로부터의 특정 생리적 자극에 대하여 반응하는 신경세포집단의 동정 또는 검색에는 여러 가지 방법이 있으나, 최근 외부로부터의 자극에 반응하는 초기응답 유전자 산물의 하나인 *c-fos*를 이용한 면역조직화학적 방법이 유용하게 이용되고 있다. Fos 단백질은 뇌내 여러 부위에서 외부로부터의 생리적 자극에 대하여 특이적으로 5분내에 발현하는 초기응답 유전자 산물(Sheng과 Greenberg, 1990)의 하나로 생리적으로 활성화되는 신경세포의 동정에 이용가능(Micheal과 Bernstein, 1994; Hanley, 1988)한데, Sheng과 Greenberg(1990)는 *c-fos*가 뇌신경 영역에서 외부 자극에 대하여 초기에 발현하는 이유에 대하여 잘 설명하였다.

따라서 본 연구에서는 각 필수아미노산 결핍에 따른 섭식패턴을 관찰하고, 혈중 아미노산 감소와 사료섭취량 감소와 관련지을 수 있는 기구가 뇌내에 존재한다고 가정하여 methionine 결핍 사료 급여에 따른 초기 섭식억제 반응에 대한 뇌내 인식부위를 Fos 단백질을 이용하여 면역조직화학적 방법에 의해 가시화함으로써 이 부위에 대하여 입증하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 사육조건

#### (1) 실험 1

실험 1은 아미노산완전균형 사료(complete diet) 및 각 필수아미노산 결핍사료(-EAA diet)의 급여가 사료 섭취 패턴에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 수행되었다. 실험동물은 개시체중이 140g 전후의 Wistar계 숫쥐 44두(Doken Co. Shimodate, Japan)를 1군 4두씩 분리하여 실험에 이용하였다. 시험에 사용된 흰쥐는 개별 Stainless steel wire-mesh cage에 분리하여

사육하였고, 사육실 조건은 일정한 온도( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ )를 유지하도록 하였으며, 12시간 명암사이클(05:00~17:00)로 조절하였다. 실험동물은 구입 직후부터 스트레스 절감 및 사육환경에 적응시키기 위하여 3일간 시판사료(Oriental, 효모 K.K., Type MF, 조단백질 24%)로 예비사양하였다. 시험개시부터 Table 1에 제시한 complete diet를 오후 17:00~23:00까지 6시간 동안 meal-feeding 방법에 의하여 10일간 급여한 후 11일째부터 각 -EAA 사료로 교체하여 급여하였으며, 사료급여 7일째부터 4일간 매시간 사료섭취량을 측정하고, 체중은 사료급여 1시간 전에 측정하였다. 사료섭취량은 시험 6일째까지는 23:00시에 급이기로부터 사료를 제거하여 섭취량에서 잔량을 제하여 구하였으며, 7일째부터는 매시간 잔량과 사료섭취량을 측정하였으며, 시험기간중 음수는 자유급수하였다.

## (2) 실험 2

-Met 사료 급여에 따른 뇌내 아미노산 결핍에 대한 반응 부위를 알기 위하여 면역조직화학적 방법을 이용하였다. 본 시험을 위하여 10일간 대조구 사료를 급여한 후 실험 11일째 -Met구와 대조구로 각각 4두씩 나누어 사료를 3시간 동안 자유급여하였다. 사료급여 후 3시간 동안의 사료섭취량은 시험 1과 동일하게 조사하였다. 사료급여 3시간 후 즉시 pentobarbital Na(0.1ml/100g B.W.)로 마취를 한 후 복부를

절개하여 심장에 ringer액(NaCl, 9.0 : KCl, 0.42 :  $\text{CaCl}_2$ , 0.24 :  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1g/1000ml) 약 500ml를 주입하여 체내 모든 혈액을 제거한 즉시 zamboni액(200 ml 10% paraform aldehyde, 750 ml 0.2M phosphate buffer, 2.1g 2,4,6-trinitrophenol, 150 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )으로 관류고정을 하였다. 관류 고정된 실험동물은 뇌를 적출하여 zamboni액에 1일간 냉장저장하였고, 그 후 30% sucrose를 함유한 PBS액(8g NaCl, 0.4g KCl, 0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.89g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1,000ml  $\text{H}_2\text{O}$ )에 3일간 침지시켰다. 침지시킨 뇌는 전자냉각식 microtom(Komatsu Electronics Ins., MCE 802A)을 이용하여 취각부로부터 시상하부 하단까지  $30\mu\text{m}$  두께로 절편을 만들었다. 동결 절편은 PBS용액으로 2회 세정하고 PBST액(20% Triton-X, 15ml : PBS, 1,000ml)에 20분간 incubation하였다. 절편은 사람 Fos 단백질을 백색토끼를 이용하여 얻은 polyclonal 항체(N말단측 3-16번째 14개 아미노산잔기, Ser-Gly-Phe-Asn-Ala-Asp-Tyr-Glu-Ala-Ser-Ser-Ser-Arg-Ala, Santa Cruz, SC-52, lot No. 1196T)에 48시간 incubation하였다. 다음으로 500배로 희석한 goat anti-rabbit IgG에 20분간 incubation하고 rabbit peroxidase anti-peroxidase 복합체(Organon Technika, USA)를 첨가하여 과산화수소 존재하에서 diaminobenzidine(WAKO Co, Japan)으로 가시화하여 광학현미경(Optiphoto, Nikon Co., Japan)으로 관찰하였다.

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	(g/kg)										
	Complete	-Lys	-His	-Thr	-Phe	-Trp	-Met	-Leu	-Ile	-Val	-Arg
EAA mix <sup>1)</sup>	72.0	60.8	68.3	65.7	61.9	70.1	64.5	62.7	65.1	64.5	64.1
NEAA mix <sup>2)</sup>	78.0	89.2	81.7	84.3	88.1	79.9	85.5	87.3	84.3	85.5	85.9
$\alpha$ -cornstarch, 464.7; Sucrose, 232.3; Cellulose, 50.0; Corn oil, 50.0; Mineral <sup>3)</sup> , 40.0; Vitamin <sup>3)</sup> , 10.0; $\text{NaHCO}_3$ , 3.0											

<sup>1)</sup> A single EAA was subtracted from EAA mixture : Met+Cys, 7.5; His, 3.7; Trp, 1.9; Phe+Tyr, 10.1; Lys, 11.2; Val, 7.5; Leu, 9.3; Ile, 9.3; The, 6.3; Arg, 7.5(g/16g N).

<sup>2)</sup> Nonessential amino acid mixture : Asp, 22.5; Ser, 17.2; Glu, 30.0; Pro, 9.1; Gly, 7.7; Ala, 13.5(g/16g N).

<sup>3)</sup> From Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan.

2. 시험사료의 제조

실험 1과 2에서 사용된 시험사료의 단백질원은 정제 아미노산(Ajinomoto, K.K., Japan) 혼합물을 이용하였으며, 사료내 단백질 수준은 15% (필수아미노산+비필수아미노산)로 하였다. 시험사료의 필수아미노산 조성은 NRC(1974) 사양표준에 준하여 배합하였고 비필수아미노산은 전란단백질의 비필수아미노산 함량에 준하여 배합하였다. 또한 본 시험사료는 아미노산 혼합사료이기 때문에 glutamic acid와 aspartic acid로 기인되는 산염기 평형을 보정하기 위하여 NaHCO<sub>3</sub>를 3% 첨가하였다. 아미노산 결핍 사료 제조시의 결핍분은 비필수아미노산 혼합물로 단백질수준을 보정하였다.

3. 통계분석

모든 분석치들은 각 실험군별 평균의 표준편

차로서 제시하였다. 실험군에 따른 각 실험군 간의 평균 차이에 대한 유의성 검증은 분산분석 후 분산분석 결과가 p<0.05인 경우에 Duncan의 다중검정법을 이용하여 통계처리 하였다. 이러한 통계검증은 SAS package(1985)를 이용하여 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

실험 1은 각 필수아미노산 결핍(-EAA) 사료 섭취에 따른 섭식 반응을 관찰하기 위하여 수행하였다. Table 2에 제시된 10일째의 성적은 대조구 사료 급여의 결과이며, 11일은 각 필수아미노산 결핍 사료를 교체한 1일째(이하 1일째), 12일은 각 필수아미노산 결핍 사료로 교체한 2일째(이하 2일째) 및 13일은 각 필수아미노산 결핍 사료로 교체한 3일째(이하 3일째)를 나타낸 것으로 모든 성적은 매일 6시간 meal-feeding(17:00~23:00)으로 측정하였다. 필수아

Table 2. Effects of individual essential amino acid deficiency on feed intake

Dietary group	Days(g/6hr)				Diff. (p<0.05)
	10th	11th	12th	13th	
Complete	17.2 ± 0.7	19.2 ± 1.2	20.1 ± 1.0	20.0 ± 1.0	NS
- Lys	16.8 ± 0.7	12.2 ± 1.0	12.2 ± 1.2	9.4 ± 0.5	3.4
- His	18.4 ± 1.2	11.7 ± 0.9	6.6 ± 1.0	5.3 ± 0.2	4.5
- Thr	16.0 ± 1.4	17.4 ± 0.8	6.3 ± 0.8	5.9 ± 0.8	4.6
- Phe	17.4 ± 1.1	14.6 ± 1.2	9.0 ± 0.4	8.3 ± 0.5	3.5
- Trp	17.3 ± 0.7	12.8 ± 0.9	7.9 ± 0.5	6.8 ± 0.7	3.2
- Met	17.2 ± 0.5	9.7 ± 1.0	7.3 ± 0.6	8.4 ± 0.6	2.9
- Leu	18.3 ± 0.4	13.6 ± 0.8	6.1 ± 1.1	5.9 ± 0.9	3.3
- Ile	17.2 ± 1.1	14.9 ± 0.5	5.4 ± 1.7	5.9 ± 0.6	4.4
- Val	17.2 ± 0.7	14.1 ± 0.7	8.2 ± 1.0	7.8 ± 1.0	3.4
- Arg	18.0 ± 0.8	13.5 ± 0.5	16.6 ± 1.3	13.7 ± 1.1	3.9
Diff.(p<0.05)	NS	4.3	6.2	3.9	

The values are means ± SD for four rats.

The data was based on a analysis of single sample of each rats.

Tukey's test(Diff.) was taken as the criterion of statistical significance with a probability levels of 0.05.

NS : not significant.

미노산 결핍사료 섭취에 따른 각 아미노산별 단기간의 사료섭취량은 급여 1일째 -The구만이 대조구와 유의적인 차이( $p < 0.05$ )가 나타나지 않았을 뿐, 그 외의 모든 처리구에서는 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 낮았고, 특히 -Met구의 사료섭취량 저하가 가장 심하게 나타났다. 그러나 2일째의 사료섭취량은 -Arg구만이 대조구와 차이 ( $p > 0.05$ )가 없었고, 그 외의 처리구에서는 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 낮았다. 특히 1일째 섭취량 억제 정도가 가장 낮았던 -Thr구가 2일째에 감소한 점이 특이하다고 볼 수 있다. Said와 Hegsted(1970)는 저분자 중성 아미노산인 threonine의 과잉섭취로 인한 섭식억제 정도는 비교적 약하다고 보고하였는데 본 시험에서도 threonine 결핍으로 인한 섭식 억제는 다른 아미노산에 비하여 약간 지연된 반응을 나타내 비슷한 경향을 보여주었다. 또한 아미노산 결핍사료 급여 3일째에는 모든 처리구가 대조구의 사료섭취량 보다 유의적으로 낮았으나( $p < 0.05$ ), -Arg구의 사료섭취량은 다른 필수아미노산 결핍구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

필수아미노산 결핍사료 급여한 1일째의 섭취량 억제 정도는 -Met구가 44%의 감소한 반면, -The구가 9% 정도로 감소로 억제 정도가 가장 약하였다. Peng(1979)은 각 아미노산을 과잉으로 공급하였을 경우 과잉중독에 의한 사료섭취량 억제 정도는 고분자 중성아미노산 중 methionine 과잉중독에 의한 억제정도가 현저하였음을 지적한 것으로 미루어 methionine은 결핍뿐만 아니라 과잉에 의해서도 사료섭취량을 억제할 수 있는 역할을 갖다고 볼 수 있다. 한편, -EAA사료 급여 3일째에는 histidine 결핍구가 71%로 사료섭취 억제정도가 가장 강하게 나타났으며 leucine(68%), isoleucine(66%), threonine(63%), tryptophan(61%), valine(55%), phenylalanine(52%), methionine(51%), lysine(44%), arginine(24%) 순으로 억제정도가 교체 1일째와는 다른 양상을 나타냈다. -His구의 섭취량 억제 정도가 가장 강하게 작용한 것은 histidine이 뇌내 흥분성 신경전달 물질중 하나인 histamine을 합성하는 전구체로서 이용되기 때문에 아민

류와 같은 신경전달 물질의 변화에 의하여도 사료섭취량에 영향을 미칠 수도 있다(Sheiner 등, 1985)는 것을 암시한다. 이와 관련하여 Anderson(1979)은 사료 단백질과 에너지 수준이 뇌내 monoamine의 농도를 유의적으로 변화시킨다고 하였으며, Mercer 등(1989)은 아미노산 불균형 사료 급여가 뇌내 monoamine형 중추신경계에 변화를 일으킬 수 있다는 보고하였다. 그러나 Sugahara 등(1999)은 닭에 lysine 결핍 사료를 급여한 1, 3 및 7 시간 후에 뇌내 monoamine 농도를 조사한 결과 어떠한 유의적인 변화도 나타나지 않았다고 하여 아직도 사료섭취량과 뇌내 monoamine과의 관계에 대하여는 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Fig. 1은 Table 2에 제시한 10일과 11일째 사료섭취량을 매 시간대별로 측정된 결과이다. 모든 처리구에서 급여 1시간째에 시간당 사료섭취량이 높게 나타났는데 이는 사료 급여 방법이 6시간 meal-feeding으로 사양하였기 때문에 18시간 동안 절식으로 인한 공복감 때문이거나, 18시간 동안의 절식 상태에서 소비된 부족분의 에너지를 보충하기 위하여 사료섭취가 높았다고 사료된다. 사료섭취량에 있어서 -Met, -Lys, 및 -Phe구의 경우 급여 1시간째 사료섭취량은 대조구 사료 섭취에 비하여 유의적으로 감소( $p < 0.05$ )한 반면, 다른 -EAA구에서는 대조구와 유의적인 차이가 나타나지 않았다( $p > 0.05$ ). 그러나 -His구의 사료섭취량은 급여 1시간째에는 대조구와 비슷한 경향을 보였으나, 이후에는 유의적으로 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ).

Fig. 2는 각 -EAA사료를 섭취하였을 때의 체중 변화에 대한 결과이다. 그림에 제시한 바와 같이 필수아미노산 결핍 사료 섭취시 나타나는 체중변화의 패턴을 세 부분으로 구분할 수 있다. 첫째로 methionine, histidine, tryptophan, phenylalanine 및 lysine과 같이 아미노산 결핍사료 교체 첫날에 체중이 감소하는 민감 그룹, 둘째로는 valine, leucine, isoleucine 및 threonine과 같이 성장이 지연되다가 2일째에 급격히 반응하는 저민감 그룹 및 마지막으로 arginine과 같이 계속 성장이 되기는 하나 성장속도가 매우 느린 지연 그룹으로 나눌 수 있다. 이와 같

### Hours after meal-feeding

Fig. 1. Hourly feed intake following the initiation of feeding a complete diet or individual EAA deficient diet.

▣ : Complete EAA mix diet (10th day).

⊗ : Individual EAA deficient diet (11th day)

Each value represents the mean for four rats, and the vertical bars indicate standard errors.

(\* :  $p < 0.05$ ).

이 각 필수아미노산의 결핍에 따른 반응패턴이 각 아미노산에 따라 다르게 나타나며, 필수아미노산의 결핍에 대한 섭식응답 및 성장 속도도 각기 다르게 반응하는 것으로 미루어 가축 사료에 아미노산을 공급할 경우에는 이러한 요인을 고려하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

실험 2에서는 필수아미노산 중에서도 민감하게 반응한 -Met 사료 섭취시 사료내 아미노산 함량에 따른 혈중 유리아미노산 농도 변화에 반응하는 뇌내 세포영역을 *c-fos*를 이용한 면역조직화학적 방법으로 확인하고자 실시하였다. 3시간 동안의 사료섭취량(g/100g B.W.)은 -Met구가  $5.63 \pm 0.21$ g로 대조구의  $8.21 \pm 0.45$ g에 비하여 낮았다(data not shown).

본 시험은 혈액과 뇌의 유리아미노산 농도가 사료섭취 2시간 후부터 감소하기 시작하여 사료급여 3시간 후에 사료섭취량이 감소한다는

보고(Beverly 등, 1991; Gietzen, 1993; 김, 2002)에 근거하여 관류고정 시간을 사료급여 3시간 후로 정하였다. -Met 사료 섭취에 따른 뇌내 각 부위의 Fos 면역활성은 Fig. 3~9와 같으며, 본 시험은 시험 특성상 반응부위를 알기 위한 목적이었기 때문에 IR(Immunoreactivity) score는 검토하지 않았다. 그림에서 a는 대조구사료를 섭취한 rat 뇌의 절편에 Fos 발현 사진이며, b는 -Met 사료를 섭취한 뇌절편의 Fos 발현 사진이다. Fig. 3은 rat의 뇌내 PPC 부분으로 Fos 면역활성은 대조구에 비하여 -Met구에서 매우 강하게 나타냈다. Gietzen(1993)은 anterior piriform cortex(APC) 부분을 전기자극한 rat는 아미노산 불균형사료를 회피하지 않으며, APC로 제한 아미노산을 주입하면 불균형사료에 대한 섭식회피 현상이 나타나지 않지만, 다른 영역에 대한 효과는 전혀 없었다고 하여 APC 또는 PPC 부분이 아미노산 결핍을 인식하는 화학센

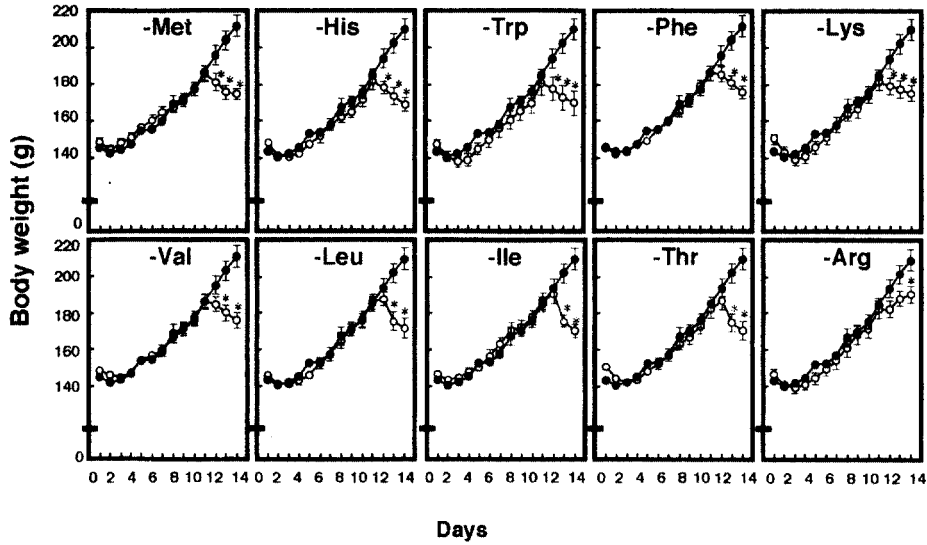


Fig. 2. Effects of feeding individual EAA deficient diets on body weight in rats.

- : Rats fed on complete EAA mix. diet for for entire period of experiment (14 days).
  - : Rats fed on complete EAA mix diet for 10 days, and thereafter switched to the corresponding individual EAA deficient diet for 4 days.
- Each point represents the mean for four rats, and the vertical bars indicate standard errors. (\* :  $P < 0.05$ ).

Fig. 3. Immunoperoxidase photomicrograph of 30 $\mu$ m coronal sections of propyriiform cortex area.

Allowhead indicate cells immunoreactive to Fos antibody.  
 a, Control diet; b, methionine deficient diet.  
 ol, olfactory tract.( $\times 100$ ).

서로 역할을 한다고 주장하였다. 또한, Wang 등(1996)은 threonine 불균형 사료를 급여한 rat 에 Fos 면역조직화학적 검사 결과 APC에 사료 섭취 1시간 후에 강한 *c-fos* 활성이 나타났으

며, 그 활성은 3시간까지 지속되었지만 이후 6 시간째에는 대조구와 비슷한 수준으로 감소하였다고 보고하고, APC 또는 PPC가 아미노산 결핍을 인식하는 화학센서 부위로서 역할을 하

고 있다고 하여 본 시험의 결과도 이들과 일치하는 것으로 나타났다. Fig. 4는 amygdala에 Fos 면역활성을 조사한 결과로 -Met구가 대조구에 비하여 매우 높은 활성을 나타냈다. Wang 등(1996)은 APC가 아미노산 결핍을 인식하는 최초의 화학센서이고, 취각정보를 중계하는 영역으로 알려진 amygdala는 부적합한 사료에 대하여 섭취회피를 학습 또는 인지하는 2차 센서 역할을 한다고 하였다. 따라서 본 시험의 결과, amygdala에 강한 Fos 활성은 이 부분이 아미노산 결핍을 인식하였기 때문에 나타난 결과이기 보다는 Wang 등(1996)의 보고로 미루어

amygdala가 섭취회피에 관여하는 영역이기 때문에 강한 Fos 활성을 나타냈다고 보는 것이 바람직할 것이다. 포유동물에 있어서 반복중추로 알려져 있는 ventromedial hypothalamus nuclear (VMH)와 섭취중추로 알려져 있는 lateral hypothalamus area(LH)에 대한 Fos 활성은 Fig. 5와 6에 나타내었다. -Met 사료 급여에 따른 VMH와 LH 부분의 Fos 활성은 대조구와 처리구에서 비슷한 활성을 보였다. 즉 VMH와 LH가 공복 및 반복중추로서 역할을 담당한다고 할지라도 본 시험의 결과로 미루어 이 두 부분이 아미노산 결핍사료의 섭취로 인한 인식

Fig. 4. Immunoperoxidase photomicrograph of 30 $\mu$ m coronal sections of amygdala. Allowhead indicate cells immunoreactive to Fos antibody. a, Control diet; b, methionine deficient diet. opt, optic tract.( $\times 100$ ).

Fig. 5. Immunoperoxidase photomicrograph of 30 $\mu$ m coronal sections of ventromedial hypothalamus nucleus. Allowhead indicate cells immunoreactive to Fos antibody. a, Control diet; b, methionine deficient diet. 3V, third ventricle.( $\times 100$ ).



Fig. 6. Immunoperoxidase photomicrograph of 30 $\mu$ m coronal sections of lateral hypothalamus area.

Allowhead indicate cells immunoreactive to Fos antibody.

a, Control diet; b, methionine deficient diet.

mfb, medial forebrain bundle.( $\times 100$ ).

Fig. 7. Immunoperoxidase photomicrograph of 30 $\mu$ m coronal sections of anterior commissure.

Allowhead indicate cells immunoreactive to Fos antibody.

a, Control diet; b, methionine deficient diet.

aca, anterior commissure.( $\times 100$ ).

부위와는 관련된 부분이 아니라고 판단할 수 있다. Fig. 7에는 paraventricular thalamus nucleus (PVN) 부분에 대한 Fos 활성을 검사한 결과이다. 이 부분도 VMH나 LH와 동일하게 Fos 활성은 대조구와 -Met 구간의 차이가 없이 약한 Fos 활성이 나타났다. Gietzen 등(1993)은 threonine 불균형 사료를 급여한 2시간 후 뇌의 여러 부위의 threonine 농도를 조사하여 PPC, anterior cingulate cortex, locus ceruleus 및 solitary tract에서는 해당 아미노산의 농도가 감소하였으나, VMH, LH, PVN, hippocampus 및

septum에서는 변화가 없었다고 한 보고와 본 시험의 결과로 미루어 보아도 PVM, LH 및 VMH는 아미노산 결핍을 인식하는 부위와는 무관한 것. Wang 등(1996)도 threonine 불균형 사료를 섭취한 rat의 PVN과 LH에 대한 Fos 발현을 검토한 결과 대조구와 처리구간에 유의적인 차이가 없었다고 보고한 바 있다. Fig. 9는 dorsal endopyriform cortex(EPC) 영역에 대한 Fos 활성을 검토한 결과이다. 대조구와 처리구 모두 Fos 활성을 나타냈으나, -Met구가 보다 강한 활성을 보였다. Wang 등(1996)도 thre-

Fig. 8. Immunoperoxidase photomicrograph of 30 $\mu$ m coronal sections of paraventricular thalamus nucleus.  
Allowhead indicate cells immunoreactive to Fos antibody.  
a, Control diet; b, methionine deficient diet.  
D3V, Dorsal third ventricle.( $\times 100$ ).

Fig. 9. Immunoperoxidase photomicrograph of 30 $\mu$ m coronal sections of dosal endopyriform cortex.  
Allowhead indicate cells immunoreactive to Fos antibody.  
a, Control diet; b, methionine deficient diet.  
ec, external capsule.( $\times 100$ ).

onine 불균형사료를 급여한 후 6시간 동안 Fos 활성을 검토한 결과 사료섭취 3시간까지는 활성이 지속되었지만 그 이후로는 점차적으로 감소하여 6시간째에는 대조구와 비슷한 수준으로 감소하였다고 하여 EPC도 아미노산 결핍을 인식하는 부위와 관련이 있음을 제시하였다.

이상의 결과로 미루어 각 아미노산이 사료섭취량에 미치는 영향은 각기 다르지만 Fos를 이용한 면역조직화학적 검사 결과로 미루어 아미노산 결핍에 대한 뇌내 초기 인식부위가 PPC라는 것이 보다 확실시 되었다.

#### IV. 요 약

본 시험은 각각의 필수아미노산 결핍사료 섭취에 의한 단기간의 섭식반응과 methionine 결핍(-Met) 사료 섭취시 뇌내 각 부위에 나타나는 Fos 면역반응을 조사하여 아미노산 결핍이 뇌내 섭식반응과 관련있는 부위를 명확히 알고자 수행하였다. 실험사료의 단백질원은 정제아미노산을 이용하였다. 시험에 이용된 모든 사료의 질소원은 순수 아미노산 혼합물을 이용하였으며, 사료내 단백질 함량은 15%로 하였다.

사료는 하루 6시간 동안 섭취하도록 적응을 시켰으며(17:00~21:00, meal feeding method), 사료섭취량과 증체량은 사료급여 7일째부터 매시간 측정하였다. 실험 1에서는 각 필수아미노산 결핍사료가 사료섭취량, 체중 변화 및 섭식패턴에 미치는 영향을 관찰하였고, 실험 2에서는 Fos 면역조직 화학적 방법을 사용하여 methionine 결핍사료에 대하여 회피 반응을 나타내는 동안에 활성을 보이는 뇌의 영역을 확인하였다. 각 필수아미노산 결핍사료 섭취에 따른 초기 섭식 억제 정도는 methionine이 가장 강하게 나타난 반면 threonine이 가장 약하였다. 결핍사료 급여 3일째의 사료섭취량은 대조구 사료에 비하여 histidine(71%), leucine(68%), isoleucine(66%), threonine(63%), tryptophan(61%), valine(55%), phenylalanine(52%), methionine(51%), lysine(44%), arginine(24%) 순으로 억제되었다. 뇌 신경 영역에 Fos 면역활성은 PPC, amygdala 및 endopyriform cortex(EPC) 부분이 대조구에 비하여 강한 활성을 나타냈으나, LH, VMH 및 PVM에서는 대조구와 처리구가 비슷하게 나타났다. 따라서 본 연구의 결과로 미루어 뇌내 PPC는 필수아미노산 결핍에 반응하는 초기 인식부위라는 것을 확인할 수 있었다.

## VI. 인 용 문 헌

- Anderson G. H. 1979. control of protein and energy intake: Role of plasma amino acids and brain neurotransmitters. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57:1043.
- Bellinger L. L., Williams, F. E., Rogers, Q. R. and Gietzen, D. W. 1995. Liver denervation attenuates the hypophagia produced by an imbalanced amino acid diet. *Physiol. Behav.*, 59: 925.
- Beverly, J. L., Gietzen, D. W. and Rogers, Q. R. 1991. Protein synthesis in the prepyriform cortex: Effects on intake of an amino acid-imbalanced diet by sprague-dawley rats. *J. Nutr.*, 121:754-761.
- Firman, J. D. and Kuenzel, W. J. 1988. Neuroanatomical regions of the chick brain involved in monitoring amino acid- deficient diets. *Brain. Res. Bull.* 21:637.
- Gietzen, D. W., Leung, P. M. B. and Rogers, Q. R. 1989. Dietary amino acid imbalance and Neurochemical changes in the three hypothalamic areas. *Physiol. Behav.*, 46:503.
- Gietzen D. W. 1993. Neural metabolisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.*, 123:610.
- Hanley, M. R. 1988. Proto-oncogenes in the nervous system. *Neuron*, 175.
- Jiang, J. C. and Gietzen, D. W. 1994. Anorectic response to amino acid imbalance : A selective serotonin 3 effect? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 47:59.
- Kim, C. H., Tanaka, H. and Ogura, M. 1996. Metabolism of lysine, threonine, and leucine in growing rats on gluten or zein diets at various dietary protein levels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60:1580.
- Kim, C. H., Sugahara, K. and Tanaka, H. 1998. Utilization of amino acid carbons in growing rats fed on the zein diets supplemented with graded levels of lysine. *Anim. Sci. Technol.(Jpn)*, 69: 1004.
- Kumuta U. S. and Harper, A. E. 1962. Amino acid imbalance and balance. IX. Effect of amino acid imbalance on blood amino acid pattern. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 110:512.
- Leung, P. M. B. and Rogers, Q. R. 1987. The effect of amino acids and protein on dietary choice.(Y. Kawamura and M. R., Kare. eds), pp. 560. Marcel Dekker, New York, NY.
- Meliza, L. L., Leung, P. M. B. and Rogers, Q. R. 1981. Effect of anterior prepyriform and medial amygdaloid lesions on acquisition of taste avoidance and reponse to dietary amino acid imbalance. *Physiol. Behav.*, 26:1031.
- Mercer, L. R., Dodds, S. J., Schweisthal, M. R. and Dunn, J. D. 1989. Brain histidine and food intake in rats fed diets deficient in single amino acids. *J. Nutr.* 119:66-74.
- Michael, W. S. and Bernstein, I. L. 1994. *c-Fos* induction in response to a conditioned stimulus after single trial taste aversion learning. *Brain rearch*, 636:202.

16. NRC, "Nutrient requirements of laboratory animal", National Academy of Science -National Research Council, Nutrient Requirements of Domestic Animals, No. 10, 1974, p. 84.
  17. Peng, Y. 1979. Studies on the severity of various amino acid imbalances in young male rat. J. Nutr., 109:1916.
  18. Rogers, Q. R. and Leung, P. M. B. 1973. The influency of amino acids on the neuroregulation of food intake. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 32:1709.
  19. Said, A. K. and Hegsted, D. M. 1970. Response of adult rats to low dietary levels of essential amino acids. J. Nutr., 100:1363.
  20. Sheng, M. and Greenberg, M. E. 1990. The regulation and function of *c-fos* and other immuniate early genes in the nervous system. Neuron, 477.
  21. SAS Institute Inc. 1985. SAS user's guide. Verson 5 ed. Cary, NC.
  22. Sheiner, J. B., Morris, P. and Anderson, G. H. 1985. Foodintake suppression by histidine. Pharmacol. Biochem. Behav. 23:721-726.
  23. Sugahara, K., Shimoyama Y., Kato, H. and Kubo, T. 1999. Feeding a lysine-free diet decreases food intake without changes in hypothalamic monoamine concentrations in growing chicks. Amin. Sci. J. 70:484-489.
  24. Tobin, G. and Boorman, K. N. 1979. Carotid or jugular amino acid infusions and food intake in the cockerel. Br. J. Nutr. 41:157-162.
  25. Torii, K., Mimura, T. and Yugari, Y. 1987. "Biochemical Mechanism of Umami taste perception and effect of dietary protein on the taste preference for amino acid and sodium chloride in rats."(Y. Kumura and M.R. Kare, eds.), P. 513. Marcel Dekker, New York, NY.
  26. Wang, Y., Cummings, S. L. and Gietzen, D. W. 1996. Temporal-spatial pattern of *c-fos* expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency. I. The initial recognition phase. Molecular brain research. 40:27-34.
  27. Wang, Y., Cummings, S. L. and Gietzen, D. W. 1996. Temporal-spatial pattern of *c-fos* expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency. II. The learned taste aversion. Molecular brain research. 40:35-41.
  28. 김창혁. 2002. Lysine 결핍에 따른 섭식반응과 뇌의 역할. 동물자원지. 44(2):221.
  29. 김창혁, 이영철. 1998. 사료단백질의 질적 변화에 따른 단기간의 섭식응답. 한영사지. 22(4):217-228.
  30. 김창혁, 田中秀幸, 이영철. 1998. 소맥단백질에 lysine 첨가수준이 성장중인 흰쥐에서 <sup>14</sup>C-lysine, <sup>14</sup>C-threonine 및 <sup>14</sup>C-leucine의 체내대사에 미치는 영향. 한영사지. 22(1):39-48.
- (접수일자 : 2002. 10. 1 / 채택일자 : 2002. 12. 11)