

Molecular Characterization of an Arachidonate Preferring Acyl-CoA Synthetase, ACS4

국립독성연구소 병리부

조 용 연

1. 서 론

Acyl-CoA synthetase (ACS)는 지방산과 Coenzyme A (CoA)를 ATP를 이용하여 결합시키는 효소로 최종산물은 Acyl-CoA이다. 포유동물에서는 지방산 생합성의 최종산물이 유리 지방산이기 때문에 본 효소가 없이는 지방산을 대사·이용할 수 없다. 또한 지방세포 및 근육세포 등에서 지방산 transporter 역할을 수행하여 지방산 대사의 핵심적인 역할을 담당한다.

본 효소에 의해 생성되는 Acyl-CoA는 1) mitochondria 및 peroxisome에서 베타-산화에 의한 에너지 생산계, 2) 소포체 등에서 triglyceride, 인지질 및 cholesteryl ester 등의 지방산 생합성계, 3) 지방산 생합성의 feedback 억제 등의 신호전달계 등에서 폭넓게 이용되는 중요한 대사 중간체이다.

1990년 Suzuki 등에 의해 ACS1 cDNA가 처음으로 클로닝된 이후 현재까지 조직특이성과 기질특이성이 다른 5종류의 ACS (ACS1~5)가 본 연구실에서 클로닝되어 해석되어 왔다. 이들 ACS는 구조와 기질특이성에 의해 2개의 subfamily로 분류된다. ACS1, ACS2 및 ACS5는 palmitic acid를 중심으로 폭넓은 지방산을 기질로 사용하며, ACS1은 간, 심장, 지방조직에서, ACS2는 뇌에서, ACS5는 소장에서 가장 높게 발현한다. ACS3과 ACS4는 arachidonic acid (AA) 및 eicosapentaenoic acid (EPA)에 높은 기질특이성을 갖고 있으며, ACS3은 뇌에서, ACS4는 부신, 난소, 정소 등 steroid hormone 생산조직에서 가장 높게 발현한다.

사람에서 5종류의 ACS는 각각 다른 염색체에 존재하며, 여러 종류의 유전병과 물리적으로 연관되어 있다. ACS2와 ACS5는 각각 5번 및 10번 염색체의 장암에 존재하며, 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 glioma의 유전자와 높은 연관성을 갖고 있다. 또한 ACS4 유전자는 X염색체의 q22-23 영역에 존재하며, Alport 증후군의 원인유전자인 collagen type IV $\alpha 5$ 유전자에 근접하여 있으며, ACS4가 동시에 결손된 환자가계도 존재한다.

AA와 EPA는 prostaglandin 및 leukotriens 등 생리활성을 갖고 있는 eicosanoid의 전구체로 세포막의 인지질로부터 hormone 감수성의 phospholipase A2에 의해 유리된다. 과량의 prostanoid 합성을 억제하기 위해서 유리된 AA와 EPA의 대부분은 재 ester화 되어 세포내 농도는 극히 낮게 유지된다. ACS4는 steroid 생산조직에서 높게 발현하고 AA 및 EPA에 기질특이성이 높기 때문에 steroid 생산계 및 prostanoid 생산계의 양면에서 중요한 역할을 담당할 것으로 사료되나 그 기능은 현재까지 불분명하다.

본 연구에서는 ACS4의 발현조절 기작을 밝히고, 유전자 결손 mouse를 작제하여, ACS4의 개

체내에서 생리기능의 해명을 목적으로 하고 있다.

II. 결 과

1. Mouse ACS4 cDNA의 단리와 구조해석

- 1) Mouse ACS4 cDNA는 2010 bp의 coding 영역에 670 아미노산, 분자량 7만4천의 단백질을 coding하고 있다.
- 2) Human과 rat, mouse 종간의 아미노산은 92% 이상의 동일성을 보여주었다.
- 3) Human, rat와 동일하게 mouse ACS4 mRNA (4.9 kb)는 폭넓은 조직에서 검출되었고, 부신 및 난소 등 steroid 생산조직에서 높게 검출되었으며, 뇌에서는 약 0.3 kb 높게 검출되었다.
- 4) 5' RACE 방법을 이용하여 뇌의 ACS4 mRNA를 해석한 결과 5'상류 영역이 다른 3종류의 분자종을 발견하였으며, 개시코돈 ATG의 5'에 41아미노산이 연장되어 coding되어 있는 것을 확인하였다.
- 5) TT2 ES 세포를 이용한 Western blotting에서 41아미노산이 긴 78 kDa은 74 kDa와 동시에 검출되어 단백질로서도 존재함을 밝혔으며, RT-PCR에 해석한 결과 78 kDa는 뇌에서 특이적으로 높게 발현하여 뇌의 AA와 EPA 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

2. ACS4의 발현조절

- 1) Mouse의 복강내에 부신피질자극 hormone (ACTH) 및 Dexamethassone을 주사 후 부신, 난소 및 간의 ACS4를 면역 blotting에 의해 분석한 결과 ACTH에 의해 부신에서 2배, 난소에서 1.5 배 증가하였으며, dexamethasone에 의해서는 각각 1/2 및 2/3으로 감소하였다.
- 2) Mouse 부신피질 유래의 Y-1 세포를 이용하여 ACTH, forskolin 및 dBt-cAMP의 영향을 Western blotting으로 분석한 결과, ACS4는ACTH에 의해 1.8배, forskolin에 의해 2배, dBt-cAMP에 의해 4배 증가하였다.
- 3) Y-1 세포에 palmitic acid, AA 및 EPA의 영향을 Western blotting 및 Northern blotting으로 분석한 결과, ACS4 mRNA는 AA에 의해 증가하였으며 AA의 농도 증가에 따라 단백질도 증가하였다.
- 4) 이상의 결과로부터, steroid 생산세포의 경우, ACTH의 자극에 의해 증가한 cAMP protein kinase A를 활성화하고, cholesteryl ester 가수분해효소가 인산화된다. 그 결과 cholesteryl ester의 분해가 증대하고, 유리된 cholesterol이 steroid hormone 생산에 이용되어 이 반응이 steroid 생산의 핵심적인 역할을 한다. ACS4가 ACTH, cAMP 및 AA에 의해 유도되는 것은 ACS4가 cholesteryl ester 가수분해에 의해 유리된 AA의 세포내 재이용을 담당한다는 저희들이 제시한 모델과 일치한다.

III. ACS4 결손 mouse 작제와 표현형

1. Mouse exon2-3을 포함하는 유전자 단편을 cloning하였으며, 개시코돈을 포함하는 exon2의 EspI 부위에 PGK-neo 카세트를 3' 말단에 테프테리아독소 A (DT-A) 유전자를 삽입한 targeting

vector를 구축하였다.

2. TT2 ES 세포에 도입한 후, G418 내성 ES colony에서 3 line의 homologouse recombination된 세포를 획득하였으며, Southern blotting에 의해 7.8 kb의 변이 allele를 갖고 있었으며, 면역 blotting에 의해 ACS 단백질이 검출되지 않음을 증명하였다.
3. ACS4를 결손시킨 3 line의 ES 세포를 이용 응집법으로 chimeric mice를 작제하였다. 총 1,244개의 배를 위임신 mouse의 자궁에 이식하여, 276마리의 산자를 얻었으며, 그 중 54마리의 음성 chimeric mice를 획득하였다.
4. 음성 chimera와 자성 야생형 mouse를 교배하여 98마리의 F1 이형접합체를 얻었으며, 그 중 86마리를 이용하여 음성 야생형과 교배 329마리의 F2를 획득하였다.
5. F2에서의 평균 동복태아수 (litter size)는 3.8마리로 야생형의 1/2이었으며 329마리 중 자성 이형접합체는 3마리, 반성접합체 (hemizygouse)는 얻을 수 없었다. 이 결과는 멘델의 유전 법칙에 의해 기대되는 출현빈도 (1/2)의 1/50로, 선택적으로 ACS4 변이 allele가 배제되는 것으로 사료된다.
6. 자성 이형접합체에 PMSG 및 hCG를 이용하여 과배란을 유도하여 교배한 결과, 동복태아수는 음성 야생형의 경우 7.4마리, chimera의 경우는 6.9마리로 거의 정상치로 회복하였으며, 자성 이형접합체 12마리, 자성 동형접합체 1마리, 음성 반성접합체 4마리를 획득하였다. 그러나 태어난 산자의 1/3이 사산이었으며 임신유지에 장애가 있는 것으로 사료되었다.
7. 한편, 태어난 음성 반성접합체 4마리는 외형, 성장, 행동, 생식 등에 이상을 발견할 수 없었다.
8. 자성 이형접합체를 이용하여 여러 종류의 생화학적 검사를 실시한 결과 혈중 TG의 농도가 야생형보다 1.5배 증가하였으며, cholesterol 및 glucose는 변화를 보이지 않았다.
9. 뇨중의 progesterone 및 estradiol치는 변화가 없었으며, cortisol은 야생형의 2/3로 감소하였다. 그러나 PGF2 α 는 야생형의 약 1/2로 감소하였으나 유의차는 없었다.
10. 자성 이형접합체의 부신, 난소 및 자궁의 조직화학적 검사를 시행한 결과 자궁내막의 비후 및 낭포 (cyst)가 관찰되어 자궁 기능의 저하가 밝혀졌다.
11. 자성 이형접합체의 난소는 외형적으로는 이상을 발견하지 못하였으나, 난소안에 존재하는 황체의 수가 야생형의 3배로 증가되어 있었다. 그러나 예상에 반하여 부신은 현저한 차이를 볼 수 없었다.
12. 이상의 결과로부터 자성 이형접합체에서는 자궁내막의 장애로 인해 임신이 정상적으로 유지되지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, ACS4는 자궁내막의 발생과 황체의 퇴화과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구에 의해 Arachidonoyl-CoA synthetase (ACS4)에 관하여 이하의 것을 증명하였다.

1. Mouse ACS4 cDNA와 단백질을 분석한 결과 뇌에 특이적으로 발현하는 새로운 78 kDa의 ACS4 분자종을 발견하였다.
2. Steroid 생산세포에서 ACS4는 cAMP와 AA에 의해 유도되는 것을 증명하였다.
3. ACS4의 결손은 음성 반성접합체에서 외견, 성장, 행동, 생식에 영향을 주지 않지만, 자성 이

형접합체에서는 자궁내막의 비후와 낭포 (cyst)를 발생시켜 자궁기능을 저하시키는 것을 입증하였다.

4. ACS4는 자궁내막의 발생과 황체의 퇴화과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 사료된다.