

## 세포주와 마우스 조직에서 타우린수송체의 발현분석

안혜숙<sup>1</sup> · 한희창<sup>1</sup> · 김하원<sup>1\*</sup> · 현진원<sup>2</sup> · 이은방<sup>3</sup>

<sup>1</sup>서울시립대학교 생명과학과, <sup>2</sup>제주대학교 의과대학, <sup>3</sup>서울대학교 천연물과학연구소

## Expression of Taurine Transporter in Cell Lines and Murine Organs

Hye Suk AN<sup>1</sup>, Hee Chang HAN<sup>1</sup>, Ha Won KIM<sup>1\*</sup>, Jin Won HYUN<sup>2</sup> and Eun Bang LEE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743

<sup>2</sup>Cheju National University, Jeju 690-756

<sup>3</sup>Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

(Received February 5, 2002 ; accepted May 25, 2002)

**Abstract** – Taurine (2-ethaneaminosulfonic acid,  $^+NH_3CH_2CH_2SO_3^-$ ) is endogenous amino acid with functions as modulator of osmoregulation, antioxidation, detoxification, transmembrane calcium transport, and a free radical scavenger in mammalian tissues. Taurine transporter(TAUT) contains 12 transmembrane helices, which are typical of the  $Na^+$ - and  $Cl^-$ -dependent transporter gene family, and has been cloned recently from several species and tissues. To analyze the expression of TAUT mRNA, one step RT-PCR was performed from human and mouse cultured cell lines and from various mouse tissues. The primers were designed to encode highly conserved amino acid sequences at the second transmembrane domain and at the fourth and fifth intracellular domains. RT-PCR analysis showed both of the human intestine HT-29 and mouse macrophage RAW264.7 cell lines expressed mRNA of TAUT. To define the expression patterns of the TAUT mRNA in the murine organs, RT-PCR was performed to detect cDNA representing TAUT mRNA from seven different mouse tissues. The TAUT was detected in all of the mouse tissues analyzed such as heart, lung, thymus, kidney, liver, spleen and brain. A large amount of transcript was found from heart, liver, spleen, kidney, and brain, while lung contained a very small amount of transcript.

**Key words:** Murine tissue, RT-PCR, HT-29, RAW264.7, taurine transporter

타우린은 1901년 Hammerstein이 황소의 담즙으로부터 분리하였기 때문에 붙여진 이름이며  $\beta$ -아미노산의 일종으로 포유동물의 세포에 과량으로 존재하는 물질이다. 체내에서 타우린이 결핍되었을 때 안과영역에서는 눈의 망막에 이상을 유발하여 시력저하를 일으키며, 산부인과 영역에서는 유산이나 사산을 일으킨다는 보고도 있다. 면역체계에서는 백혈구의 비율과 기능변화를 유발시킬 뿐만 아니라 면역세포 생성을 담당하는 기관인 비장의 형태와 기능변화를 일으킨다. 또한 순환기관중 심장의 기능이상도 유발된다는 보고도 있다.

타우린은 세포내에서 다양한 기능을 하는 물질로 알려져 있다. 타우린은 스트레스에 의한 자극으로부터 면역세포를 보호한다. 타우린을 첨가한 배지에서 임파구는 열자극치사작용에 저항하는 작용이 강력하며, 고온처리한 mouse embryo의 분화억제도 회복시키는 작용을 가지고

있다(Ealy *et al.*, 1992; Malayer *et al.*, 1992). 타우린의 또 다른 기능중의 하나는 신경전달물질로서의 작용이다. 왕새우의 후각수용체에는 타우린결합부위가 존재함이 밝혀져 타우린이 감각신호를 전달하는 신경전달기능이 있음이 밝혀졌다(Olson *et al.*, 1992; Olson and Derby, 1995). 또한 타우린은 시상하부(hypothalamus)에서 dopamine의 농도를 증가시킬 뿐만 아니라 시상하부의 noradrenalin의 농도감소도 일으켜 신경조절작용을 나타낸다(Panula-Lehto *et al.*, 1992). 또한 타우린은 시신경세포의 기능에도 영향을 미친다. 눈의 망막상피세포에서 타우린은 DNA합성을 촉진시켜 세포성장주기의 S-phase로 전환시킴으로써 세포를 증식시킨다(Gabrielian *et al.*, 1992; Kasuya *et al.*, 1992). 세포내에서 타우린의 신호전달기능은 세포내 특정 단백질의 인산화와 관련이 있다(Lombardini, 1992).

타우린의 또 다른 중요한 기능으로는 항산화작용을 들 수 있다. 타우린은 세포내에서 항산화작용이 있어서 폐섬

\*To whom correspondence should be addressed.

유증을 억제시킨다(Giri and Wang, 1992; Wang *et al.*, 1992). 또한 블레오마이신을 투여할 때 타우린을 병용하면 폐의 염증반응이 감소하여 침윤면역세포수가 감소하며 acid phosphatase의 활성도 저하된다(Wang *et al.*, 1992). 그 외의 타우린의 기능으로는 collagenase 억제, 간지질 감소 등이 있다. 랫트의 mesangial 세포(신장세포)에 타우린을 처리하면 lipid peroxidation을 억제시킬 뿐만 아니라 fibrosis와 관련된 collagen생성도 억제시키므로 당뇨병에 의한 사구체신염의 치료에 타우린의 사용 가능성을 제시하였다(Trachtmann *et al.*, 1993). 또한 N-chloro-aurine은 collagenase의 활성을 억제하여 염증성 관절염환자의 연골 조직 파괴를 억제하는 작용이 있다(Davies *et al.*, 1994).

타우린을 세포내로 수송하는 타우린수송체는 소수성을 가진 12개의 막 통과 부위를 가지고 있으며 개의 신장, 랫트의 뇌, 마우스의 뇌뿐만 아니라 사람의 갑상선, 태반, 망막에서 클로닝되었다(Uchida *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992; Jhiang *et al.*, 1993; Rama-moorthy *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1995). 타우린수송체는 세포외부의 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup> 이온을 반드시 요구하며 타우린, Na<sup>+</sup> 및 Cl<sup>-</sup> 이온은 동시에 수송된다. 사람의 대장암세포주인 HT-29도 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup> 이온 의존적으로 타우린을 세포내로 이동시킨다. 이들 이온과 타우린은 cotransport에 의하여 이동되는데 Na<sup>+</sup>:타우린은 2:1의 비율로, Cl<sup>-</sup>:타우린은 1:1의 비율로 이동된다(Tirupathi *et al.*, 1992). 타우린은 태아의 발육과 신경조직발달에도 영향을 미치기 때문에 태반을 통해서 타우린이 태아에게 전달되는 것은 중요하다. 태반에서 타우린수송은 Cl<sup>-</sup>이온 의존적이며, Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>/타우린은 2:1:1의 비율로 수송된다고 보고되었다(Moyer *et al.*, 1992).

타우린수송체는 조직별로 발현정도가 다르다. 이는 타우린수송체가 많이 발현되는 조직에서는 타우린의 역할이 중요함을 의미한다. 따라서 타우린수송체를 다량 발현하는 조직을 정확하게 분석해내는 작업은 타우린수송체의 기능이나 메커니즘을 밝혀내기 위해 필수적이다. 본 연구에서는 세포주와 마우스 조직에서 타우린수송체의 발현을 분석해 보고자 하였다. 마우스와 사람의 타우린수송체 유전자에서 동일한 서열 부위에 대해 primer를 합성하고 RT-PCR을 통해 타우린수송체 cDNA를 생산하였다. 전기영동 분석을 통해 사람의 소장세포와 마우스의 대식세포에서 타우린수송체 mRNA의 발현을 확인하였고 마우스 조직별로 타우린수송체의 발현을 비교하였다.

## 실험방법

### 세포주 및 시약

사람의 소장상피 세포주인 HT-29와 마우스 대식세포 암

세포주인 RAW264.7은 American Type Culture Collection (Rockville, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, [2-<sup>3</sup>H(N)]-taurine은 NEN (Boston, MA, USA)에서 구입하였다. One step RT-PCR kit은 Takara Biomedicals (Japan)에서 구입하였고 PCR primer는 TaKa-Ra-Korea Biomedical Inc. (Korea)에서 합성하였다. BALB/c 마우스와 사료는 Dae-Han Laboratory Animal Research Center Co., LTD. (Korea)에서 구입하였다.

### 세포배양

HT-29와 RAW264.7 세포는 각각 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI-1640과 DMEM 배지에서 배양하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56°C water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2 μm membrane filter로 여과 후 사용하였다. HT-29와 RAW264.7 세포는 부착해서 자라며 5 ml 배지를 넣은 T-25 culture flask에서 배양하였다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml을 가하여 37°C에서 5분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml을 넣고 원심분리(1000 rpm, 5분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 타우린수송체의 활성 측정

타우린수송체는 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup> 의존성이 있으므로, Na<sup>+</sup> 함유배지와 Na<sup>+</sup> 비함유배지를 사용하여 세포내로 수송된 타우린 동위원소의 양을 비교함으로써 타우린수송체의 활성을 측정하였다(Kulanthaivel *et al.*, 1991). Na<sup>+</sup> 함유배지는 25 mM-HEPES/Tris (pH 7.5), 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM D-glucose로 구성되며 Na<sup>+</sup> 비함유배지는 25 mM-HEPES/Tris (pH 7.5), 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM D-glucose, 140 mM sucrose로 구성된 buffer를 사용하였다. 12 well plate에서 monolayer로 성장시킨 세포에 1 μCi [2-<sup>3</sup>H(N)]-taurine을 첨가하고 37°C에서 30분간 배양함으로써 세포내로 [2-<sup>3</sup>H(N)]-taurine이 이동하도록 하였다. 상등액을 제거하고 ice-cold Na<sup>+</sup>-deficient buffer로 3회 세척한 후 0.01 mM NaOH과 1 mM EDTA을 1 ml 첨가하여 세포를 lysis시켰다. 1 ml lysate을 3 ml cocktail solution에서 잘 섞은 후 luminometer (Berthold Lumat LB501)로 측정하였다. 동일한 조건의 시료를 3회 측정 후 평균값을 산출하였다.

Placenta	1	atg gcc acc aag gag aag ctg cag tgt ctg aaa gat ttc cac aag gac atc ctg aag ccc
Retina	1	atg gcc acc aag gag aag ctg cag tgt ctg aaa gat ttc cac aag gac atc ctg aag ccc
Thyroid	1	atg gcc acc aag gag aag ctg cag tgt ctg aaa gat ttc cac aag gac atg gtg aag ccc
(중략)		
Placenta	183	ttg ggc aac gtc tgg cgc ttc ccg tac ctc tgc tac aag aat ggt gga ggt gcg ttt ctc
Retina	181	ttg ggc aac gtc tgg cgc ttc ccg tac ctc tgc tac aag aat ggt gga ggt gcg ttt ctc
Thyroid	183	ttg ggc aac gtc tgg cgc ttc ccg tac ctc tgc tac aag aat ggt gga ggt gcg ttt ctc
Placenta	243	<u>ata ccg tat ttt att ttc ctg ttt</u> ggg agc ggc ctg cct gtg ttt ttc ttg gag atc atc
Retina	241	<u>ata ccg tat ttt att ttc ctg ttt</u> ggg agc ggc ctg cct gtg ttt ttc ttg gag atc atc
Thyroid	243	<u>ata ccg tat ttt att ttc ctg ttt</u> ggg agc ggc ctg cct gtg ttt ttc ttg gag atc atc
		tcgc ggatcc ata ccg tat ttt att ttc ctg ttt → : <b>primer 1</b>
Placenta	303	ata ggc cag tac acc tct gaa ggg ggc atc acc tgc tgg gaa aag atc tgc ccc ttg ttc
Retina	301	ata ggc cag tac acc tct gaa ggg ggc atc acc tgc tgg gaa aag atc tgc ccc ttg ttc
Thyroid	303	ata ggc cag tac acc tct gaa ggg ggc atc acc tgc tgg gaa aag atc tgc ccc ttg ttc
(중략)		
Placenta	843	gac atc acc cgc ctt gag gac cca cag gtg tgg att gac gct ggg act cag ata ttc ttc
Retina	841	gac atc acc cgc ctt gag gac cca cag gtg tgg att gac gct ggg act cag ata ttc ttc
Thyroid	843	gac atc acc cgc ctt gag gac cca cag gtg tgg att gac gct ggg act cag ata ttc ttc
Placenta	903	tct tat gcc atc tgc ctg ggg gct atg acc tcg ctg ggg agc tac aac <u>aag tac aag tat</u>
Retina	901	tct tat gcc atc tgc ctg ggg gct atg acc tcg ctg ggg agc tac aac <u>aag tac aag tat</u>
Thyroid	903	tct tat gcc atc tgc ctg ggg gct atg acc tcg ctg ggg agc tac aac <u>aag tac aag tat</u>
		← ttc atg ttc ata
Placenta	963	<u>aac tcg tac agg</u> gac tgt atg ctg ctg gga tgc ctg aac agt ggt acc agt ttt gtg tct
Retina	961	<u>aac tcg tac agg</u> gac tgt atg ctg ctg gga tgc ctg aac agt ggt acc agt ttt gtg tct
Thyroid	963	<u>aac tcg tac agg</u> gac tgt atg ctg ctg gga tgc ctg aac agt ggt acc agt ttt gtg tct
		ttg agc atg tcc ctt aag atct : <b>primer 2</b>
Placenta	1023	ggc ttc gca att ttt tcc atc ctg ggc ttc atg gca caa gag caa ggg gtg gac att gct
Retina	1021	ggc ttc gca att ttt tcc atc ctg ggc ttc atg gca caa gag caa ggg gtg gac att gct
Thyroid	1023	ggc ttc gca att ttt tcc atc ctg ggc ttc atg gca caa gag caa ggg gtg gac att gct
Placenta	1083	gat gtg gct gag tca ggt cct ggc ctg gcc ttc att gcc tac cca aaa gct gtg aca atg
Retina	1081	gat gtg gct gag tca ggt cct ggc ctg gcc ttc att gcc tac cca aaa gct gtg aca atg
Thyroid	1083	gat gtg gct gag tca ggt cct ggc ctg gcc ttc att gcc tac cca aaa gct gtg aca atg
Placenta	1143	atg ccg ctg ccc aca ttt tgg tcc att ctt ttt ttt att atg ctt ctc ttg ctt gga ctg
Retina	1141	atg ccg ctg ccc aca ttt tgg tcc att ctt ttt ttt att atg ctt ctc ttg ctt gga ctg
Thyroid	1143	atg ccg ctg ccc aca ttt tgg tcc att ctt ttt ttt att atg ctt ctc ttg ctt gga ctg
Placenta	1203	gat agc cag ttt gtt gaa gtt gaa gga <u>cag atc aca tcc ttg gtt gat ctt</u> tac cca tcc
Retina	1201	gat agc cag ttt gtt gaa gtt gaa gga <u>cag atc aca tcc ttg gtt gat ctt</u> tac cca tcc
Thyroid	1203	gat agc cag ttt gtt gaa gtt gaa gga <u>cag atc aca tcc ttg gtt gat ctt</u> tac cca tcc
		<b>primer 3</b> ← gtc tag tgt agg aac caa cta gaa ctt aag agag
Placenta	1263	ttc cta agg aag ggt tat cgt cgg gaa atc ttc atc gcc ttc gtg tgt agc atc agc tac
Retina	1261	ttc cta agg aag ggt tat cgt cgg gaa atc ttc atc gcc ttc gtg tgt agc atc agc tac
Thyroid	1263	ttc cta agg aag ggt tat cgt cgg gaa atc ttc atc gcc ttc gtg tgt agc atc agc tac
(중략)		
Placenta	1803	cgc acc gtc atg aac ggc gct ctc gtg aaa ccg acc cac atc att gtg gag acc atg atg
Retina	1801	cgc acc gtc atg aac ggc gct ctc gtg aaa ccg acc cac atc att gtg gag acc atg atg
Thyroid	1803	cgc acc gtc atg aac ggc gct ctc gtg aaa ccg acc cac atc att gtg gag acc atg atg

Fig. 1. Human taurine transporter cDNA sequences and design of primers.

### RNA 분리

BALB/c 마우스는 경추탈골법을 이용하여 희생시킨 후 해부하여 각 장기를 분리하였다. 마우스 장기인 경우는 sonicator를 이용하여 조직을 분쇄함으로써 단일한 세포를 준비하였다. 세포나 장기는 PBS로 2-3회 세척한 후 1 ml

Trizol을 넣고 lysis시켰다(Ausubel *et al.*, 1990). 100  $\mu$ l phenol과 100  $\mu$ l chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리하였다. 상층액과 같은 양의 chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 첨가하고 다시 원심분리를 하여

상층액을 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시켰다. RNAase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 처리하고 -70°C에서 보관하였다.

**Primer design과 RT-PCR**

마우스 장기별로 타우린수송체 mRNA의 발현정도를 비교하기 위해 RT-PCR을 하였다. Primer 제작을 위해 NCBI Genebank를 검색하여 기존에 알려진 타우린수송체의 cDNA sequence들을 비교·분석하였다(Fig. 1). 사람과 마우스에서 공통적으로 사용할 수 있는 primer를 합성하기 위해 타우린수송체의 cDNA 서열을 비교 분석하여 서열이 동일한 부위에서 primer를 디자인하였다. 하나의 forward primer (primer-1)와 두 개의 reverse primer (primer-2, 3)로부터 두 가지의 PCR product를 얻을 수 있도록 primer를 디자인하였다. Primer-1과 primer-2로부터 합성된 cDNA는 TAUT-A, primer-1과 primer-3으로부터 합성된 cDNA는 TAUT-B라 명명하였다. 각 primer는 34개의 nucleotide로 구성되어 있으며 primer-1의 Tm값은 73.1, primer-2의 Tm값은 63, 그리고 primer 3의 Tm값은 71.4로 나타났다. Annealing temperature는 이보다 6-7°C 정도 낮은 온도에서 결정하였으며 TAUT-A는 60°C, TAUT-B는 65°C로 결정하였다.

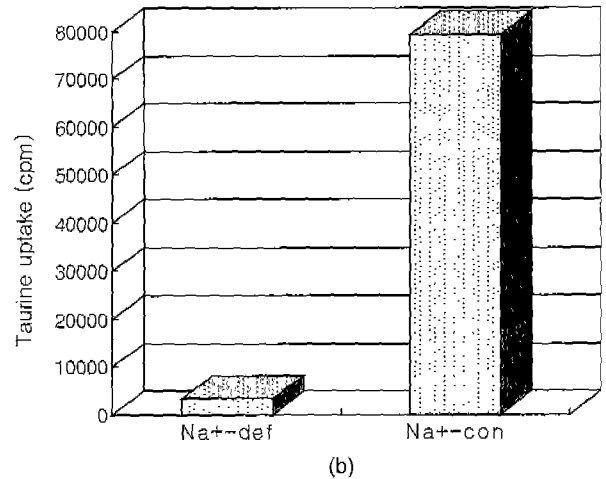
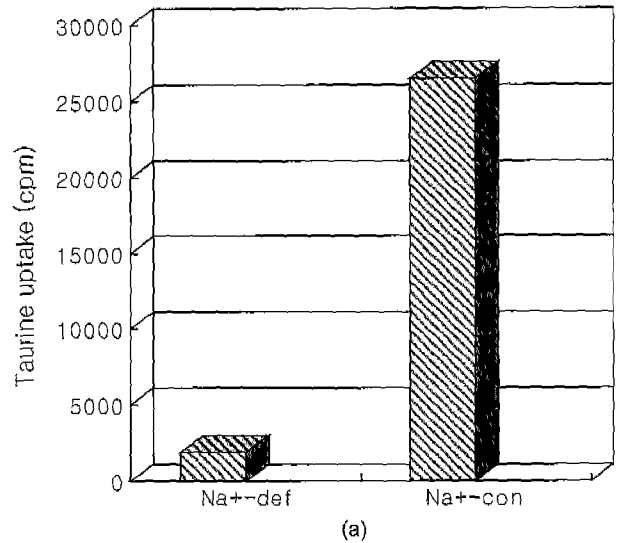
- primer-1 (forward primer) : 5'-tcgcggatccataccgtattttatttctcgtttt-3'
- primer-2 (reverse primer) : 5'-tctagaattccctgtacgagttatactgtactt-3'
- primer-3 (reverse primer) : 5'-gagagaattcaagatcaaccaaggatgtgatctg-3'

One step RT-PCR kit(#RR024A, Takara Shuzo Co. Ltd)을 이용하여 타우린수송체 mRNA의 발현을 분석하였다. AMV reverse transcriptase을 이용하여 reverse transcription을 수행함으로써 mRNA로부터 cDNA을 합성하였다 (Manufacture's instructions). 타우린수송체의 cDNA 서열에 특이적으로 결합하는 primer-1, 2, 3과 Taq DNA polymerase을 이용하였으며, 94°C에서 30초간 denaturation→60°C에서 30초간 annealing →72°C에서 1분간 polymerization하는 과정을 30회 반복하여 PCR을 함으로써 TAUT-A (732 bp)와 TAUT-B (1011 bp) PCR product를 생산하였다. 합성한 cDNA는 아가로오스 겔 전기영동으로 확인하였다.

**실험결과**

**세포주에서 타우린수송체의 활성 분석**

사람의 소장상피세포 HT-29와 마우스의 대식세포

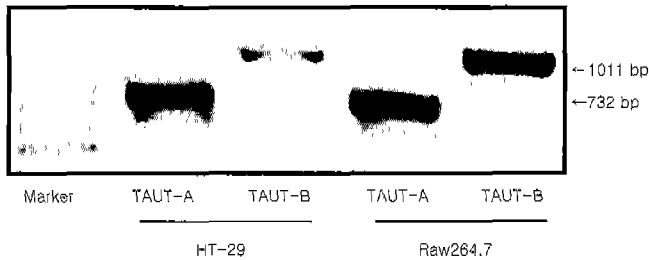


**Fig. 2.** Comparison of taurine transporter activities in human intestinal epithelial HT-29 cells (a) and in mouse macrophage RAW264.7 cells (b) in the presence or absence of Na<sup>+</sup> ion in transportation buffer.

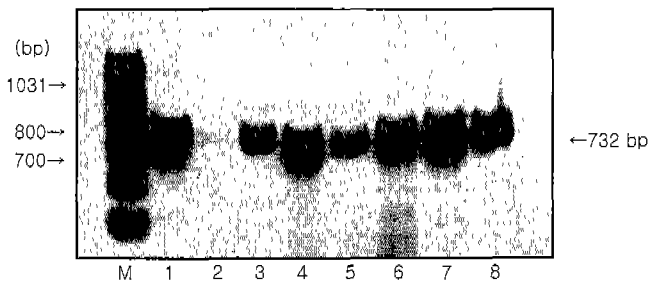
RAW264.7에서 동위원소로 표지된 타우린의 세포내 수송량을 측정하여 Na<sup>+</sup> 함유배지와 Na<sup>+</sup> 비함유배지에서 타우린수송체의 활성을 비교하였다. HT-29 세포의 타우린수송체는 Na<sup>+</sup> 비함유배지(1,929 cpm)보다 Na<sup>+</sup> 함유배지(26,455 cpm)에서 14배만큼 더 많은 타우린을 세포내로 수송하였다(Fig. 2(a)). RAW264.7 세포는 Na<sup>+</sup> 비함유배지(3,386 cpm)보다 Na<sup>+</sup> 함유배지(79,293 cpm)에서 23배만큼 더 높은 타우린수송체 활성을 나타냈다(Fig. 2(b)). 따라서 HT-29와 RAW264.7 세포는 모두 Na<sup>+</sup> 농도에 의존적으로 타우린을 세포내로 수송하는 활성을 가진 타우린수송체를 발현하고 있다는 사실을 확인하였다.

**세포주에서 타우린수송체의 발현 분석**

사람과 마우스 타우린수송체에서 동일한 DNA 서열 부



**Fig. 3.** Analysis of taurine transporter cDNA synthesized by RT-PCR from the human intestinal epithelial HT-29 cells and the mouse macrophage RAW264.7 cells in 1% agarose gel electrophoresis.



**Fig. 4.** Analysis of TAUT cDNA produced by RT-PCR from various tissues of BALB/c mouse in 1% agarose gel electrophoresis. M:  $\lambda$ HindIII, lane 1: heart, lane 2: lung, lane 3: thymus, lane 4: liver, lane 5: spleen, lane 6: kidney, lane 7: cerebral cortex, lane 8: cerebral medulla.

위에 특이적으로 결합하도록 primer를 합성하였다. HT-29와 RAW264.7 세포에서 타우린수송체 mRNA의 발현을 분석하기 위해 one step RT-PCR을 이용하였다. HT-29와 RAW264.7 세포로부터 mRNA를 분리한 후 reverse transcription과정을 거쳐 cDNA를 합성하고 Taq DNA polymerase를 이용하여 PCR함으로써 증폭시켰다. Primer-1과 primer-2를 이용하여 TAUT-A PCR product를 얻었고 primer-1과 primer-3를 이용하여 TAUT-B PCR product를 얻었다. 1% 아가로오스 겔 전기영동 결과에서, TAUT-A는 732 bp 위치에서 나타났고 TAUT-B는 1011 bp 위치에서 관찰되었다. 따라서, HT-29와 RAW264.7 세포는 타우린수송체 mRNA를 발현하고 있음을 증명하였다(Fig. 3). 94°C에서 30초간 denaturation → 60°C에서 30초간 annealing → 72°C에서 1분간 polymerization하는 과정을 30회 반복하는 PCR 조건에서 타우린수송체 cDNA를 효율적으로 합성하였으므로 합성된 primer는 타우린수송체 mRNA의 발현을 분석하기 위해 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

#### 마우스 조직별 타우린수송체 발현 분석

마우스의 다양한 조직 세포에 따른 타우린수송체의 발현 정도를 비교하기 위해 RT-PCR을 한 후 타우린수송체



**Fig. 5.** Quantitative analysis of taurine transporter mRNA transcripts in various organs of BALB/c mouse.

mRNA 발현량을 분석하였다. 마우스에서 심장, 폐, 흉선, 간, 비장, 신장, 뇌의 피질부와 수질부를 분리한 후 각각의 조직 세포로부터 RNA를 분리하였다. Reverse transcription과정을 통해 mRNA로부터 cDNA를 합성하고 primer-1과 primer-2를 이용하여 PCR을 하였다. TAUT-A PCR product는 1% 아가로오스 겔 전기영동으로 확인하였으며(Fig. 4) densitometer를 이용하여 PCR product의 양을 측정하여 비교하였다(Fig. 5). 타우린수송체 발현은 대뇌 피질부(357.2), 심장(320.5), 간(303.5), 비장(288.8), 신장(260.5), 대뇌 수질부(207.4), 흉선(178.8), 폐(10.82) 순서로 높게 나타났다(Fig. 5). 타우린수송체는 실험을 실시한 마우스의 모든 조직 세포에서 발현되는 것으로 나타났으며 특히, 뇌, 심장, 간, 신장, 비장에서 높게 발현되는 것으로 확인되었다. 다른 조직에서 검출된 타우린수송체의 mRNA 양에 비해 폐에서는 매우 적은 양의 타우린수송체 mRNA가 검출되었다.

## 고 찰

사람의 소장상피세포 HT-29와 마우스의 대식세포 RAW264.7에서 동위원소로 표지된 타우린의 세포내 수송량을 측정하였다. 타우린수송체의 활성이  $\text{Na}^+$  비함유배지보다  $\text{Na}^+$  함유배지에서 훨씬 높게 나타난 결과로부터 HT-29와 RAW264.7 세포가  $\text{Na}^+$  농도에 의존적인 타우린수송체를 발현하고 있음을 확인하였다(Fig. 2). 사람과 마우스에서 공통적으로 사용할 수 있도록 primer를 합성한 후, HT-29와 RAW264.7 세포에서 분리한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 하였다. 이 연구결과로부터 타우린수송체의 발현 분석을 하기 위한 RT-PCR 조건을 확립하였을 뿐만 아니라 HT-29와 RAW264.7 세포에서 타우린수송체의 발현을 증명하였다(Fig. 3). 마우스의 심장, 폐, 흉선, 간, 비장, 신장, 뇌로부터 장기를 분리하여 각 조직 세포

로부터 RNA를 분리한 후, RT-PCR 분석법을 이용하여 타우린수송체 mRNA 발현량을 비교하였다. 실험에 이용한 마우스의 모든 조직 세포에서 타우린수송체가 발현되는 것으로 나타났으며 특히 뇌, 심장, 간, 신장, 비장에서 많은 양의 타우린수송체 전사체가 검출되었고 이에 비해 폐에서는 매우 적은 양의 타우린수송체 전사체가 검출되었다(Fig. 4, 5).

1992년에 최초로 마우스와 랫트에서 타우린수송체 유전자가 클로닝되었다. 마우스의 타우린수송체는 590개의 아미노산을 가진 단백질을 생성시키며, Na<sup>+</sup> 의존성인 다른 신경전달물질의 수송체와 아미노산서열의 유사성이 클 뿐만 아니라 입체구조도 유사하다. 마우스의 간, 신장, 소뇌, 대뇌피질, 뇌간, 뇌의 나머지 부분의 조직세포로부터 RNA를 분리하여 Northern blot으로 분석한 결과, 실험을 한 모든 조직에서 타우린수송체의 발현을 확인하였고 특히, 신장에서는 다량의 타우린수송체 전사체를 검출하였고 이에 비해 간에서는 소량의 전사체가 검출되었다. 마우스 뇌조직 중에서는 소뇌와 대뇌피질에서 타우린수송체가 풍부한 것으로 나타났다. 뇌조직에서 타우린수송체의 발현위치는 타우린이 신경전달물질로서 기능할 수 있다는 사실을 뒷받침해 주었다(Liu *et al.*, 1992). 랫트의 뇌에서 클로닝된 타우린수송체의 유전자는 621개의 아미노산을 가진 단백질을 생성시키며 막을 12회 통과하는 영역을 나타낸다. 랫트의 조직에 따라 타우린수송체의 분포를 비교하기 위해 PCR과 Northern blot으로 분석하였다. PCR 결과, 측정된 모든 조직 뇌, 망막, 간, 신장, 심장, 비장, 췌장에서 타우린수송체는 검출되었다. Northern blot 분석결과, 타우린수송체는 뇌와 폐에서 높게 발현되었고 신장과 심장, 비장에서는 중간 정도로 발현되었으며 간과 췌장에서 발현량이 가장 낮게 나타났다(Smith *et al.*, 1992). 개의 신장세포인 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 세포에서 클로닝된 타우린수송체 유전자의 단백질은 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup> 이온 의존성을 나타내며, 655개의 아미노산으로 되어있다. 각 장기에 대한 타우린수송체 mRNA의 분포는 신장>장막>뇌>간>심장>부고환 등의 순서로 나타났다고 보고되었다(Uchida *et al.*, 1992).

사람의 타우린수송체 유전자는 1993년에 갑상선세포에서 분리되었는데, 619개의 아미노산을 가진 단백질을 생성시키며, 계산상의 분자량은 69.6 kDa이다. 이 수송체는 개 또는 랫트의 타우린수송체와 아미노산 서열이 매우 유사하다. 이 연구에서 RT-PCR 결과, 사람의 유방, 결장, 심장, 신장, 간, 근육, 난소, 태반, 비장, 갑상선에서 타우린수송체 mRNA가 검출되었다(Jhiang *et al.*, 1993). 사람의 태반에서 클로닝된 타우린수송체의 유전자는 3번 염색체의 p25부근에 존재한다고 보고되었다. 사람의 여러 가지 조직으로 Northern blot 분석을 한 결과, 심장, 뇌,

태반, 폐, 간, 근육, 신장, 췌장에 타우린수송체 전사체(6.9 kb)가 존재함을 밝혔다. 타우린수송체 전사체는 태반과 근육에서 가장 높게 검출되었고, 심장, 뇌, 폐, 신장, 췌장에서는 중간 정도였으며 간에서는 낮게 검출되었다. 타우린수송체 활성을 가진 것으로 알려져 있는 사람의 세포주-placental choriocarcinoma (JAR and BeWo), colon carcinoma (HT-29), cervical carcinoma (HeLa), retinal pigment epithelium (HRPE)에서도 타우린수송체 전사체가 검출되었다(Ramamoorthy *et al.*, 1994).

본 연구에서 사람의 소장상피 세포주 HT-29와 마우스 대식세포 RAW264.7에서 RT-PCR 분석법에 의해 타우린수송체 mRNA를 검출하였다. 본 연구에서 확립된 RT-PCR 분석법은 다양한 외부 요인에 대해 다른 신호를 세포내로 전달함으로써 타우린수송체의 활성을 조절하는 소장상피세포나 대식세포에서 타우린수송체 발현의 조절 기전을 연구하는데 유용할 것이다. 또한, 본 연구에서는 RT-PCR 분석법을 이용하여 이미 타우린수송체가 존재한다고 보고된 마우스의 여러 가지 조직에서 타우린수송체의 분포와 발현 정도를 비교하고자 하였다. Liu 등은 마우스의 신장에서 타우린수송체 발현이 높았고 간에서는 소량만 발현되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 신장과 간의 발현 정도가 비슷했으며 오히려 간에서 약간 더 높게 발현되는 것으로 분석되었다. 또한 Smith 등은 랫트의 뇌와 폐에서 타우린수송체 발현이 높았고 간과 췌장에서는 낮게 발현되었다고 보고하였다. 그래서 본 연구에서 마우스의 폐에서 타우린수송체 전사체가 가장 적게 검출된 결과와 많은 차이를 보였다. 이처럼 조직별로 타우린수송체의 분포와 발현을 분석한 그동안의 연구 결과들은 상충되는 부분이 존재하였다. 그럼에도 불구하고 대체적인 공통점은 포유동물에서 대부분의 조직에 타우린수송체는 존재하고 있으며 특히 뇌, 심장, 신장, 태반, 망막, 갑상선, 근육, 간, 폐, 비장, 췌장 등에서 높게 발현된다는 점이었다. 앞으로 타우린수송체의 분포와 발현에 관한 연구는 타우린수송체에 대한 항체를 이용하여 더욱 다양한 방법으로 시도되어야 할 것이며 이로부터 더욱 정확한 결론을 도출해 내야 할 것이다. 또한, 타우린수송체가 다량 분포하는 것으로 보고되는 조직세포에서는 더욱 구체적으로 타우린수송체의 활성과 조절기전에 관한 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(1999-2-209-013-5)지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 타우린수송체 유전자분석, 실험동물, 동위원소분석을 도와주신(주)동아제약에도 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ausubel, F. M. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc.
- Davies, J. M., Horwitz, D. A. and Davies, K. J. (1994). Inhibition of collagenase activity by N-chlorotaurine, a product of activated neutrophils. *Arthritis & Rheumatism*, **37**(3), 424-427.
- Ealy, A. D., Drost, M., Barros, C. M. and Hansen, P. J. (1992). Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell Biol. International Reports*, **16**(2), 125-131.
- Gabrielian, K., Wang, H. M., Ogden, T. E. and Ryan, S. J. (1992). In vitro stimulation of retinal pigment epithelium proliferation by taurine. *Current Eye Res.*, **11**(6), 481-487.
- Giri, S. N. and Wang, Q. (1992). Taurine and niacin offer a novel therapeutic modality in prevention of chemically-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **315**, 329-340.
- Jhiang, S. M., Fithian, L., Smanik, P., McGill, J., Tong, Q. and Mazzaferrri, E. L. (1993). Cloning of the human taurine transporter and characterization of taurine uptake in thyroid cells. *FEBS Letters*, **318**(2), 139-144.
- Kasuya, M., Itoi, M., Kobayashi, S., Sunaga, H. and Suzuki, K. T. (1992). Changes of glutathione and taurine concentrations in lenses of rat eyes induced by galactose-cataract formation or ageing. *Exp. Eye Res.*, **54**(1), 49-53.
- Kulanthaivel, P., Cool, D. R., Ramamoorthy, S. (1991). Transport of taurine and its regulation by protein kinase C in the JAR human placental choriocarcinoma cell line. *Biochem. J.*, **277**, 53-58.
- Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Nelson, H., Mandiyan, S. and Nelson, N. (1992). Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **89**(24), 12145-12149.
- Lombardini, J. B. (1992). Effects of taurine on the phosphorylation of specific proteins in subcellular fractions of the rat retina. *Neurochem. Res.*, **17**(8), 821-824.
- Malayer, J. R., Pollard, J. W. and Hansen, P. J. (1992). Modulation of thermal killing of bovine lymphocytes and preimplantation mouse embryos by alanine and taurine. *Am. J. Veterinary Res.*, **53**(5), 689-694.
- Miyamoto, Y., Liou, G.I. and Sprinkle, T.J. (1995). Isolation of a cDNA encoding a taurine transporter in the human retinal pigment epithelium. *Curr. Eye Res.*, **15**, 345-349.
- Moyer, M. S., Insler, N. and Dumaswala, R. (1992). The role of chloride in taurine transport across the human placental brush-border membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **1109**(1), 74-80.
- Olson, K. S., Trapido-Rosenthal, H. G. and Derby, C. D. (1992). Biochemical characterization of independent olfactory receptor sites for 5'-AMP and taurine in the spiny lobster. *Brain Res.*, **583**(1-2), 262-270.
- Olson, K. S. and Derby, C. D. (1995). Inhibition of taurine and 5'AMP olfactory receptor sites of the spiny lobster *Panulirus argus* by odorant compounds and mixtures. *J. Comparative Physiol. A-Sensory Neural & Behavioral Physiol.*, **176**(4), 527-540.
- Panula-Lehto, E., Makinen, M. and Ahtee, L. (1992). Effects of taurine, homotaurine and GABA on hypothalamic and striatal dopamine metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **346**(1), 57-62.
- Ramamoorthy, S., Leibach, F. H. Mahesh, V. B. Han, H., Yang-Feng, T., Blakely, R. D., and Ganapathy, V. (1994). Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochem. J.*, **300**, 893-900.
- Smith, K. E., Borden, L. A., Wang, C. H., Hartig, P. R. and Brancheck, T. A., Weinshank, R. L. (1992). Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol. Pharmacol.*, **42**(4), 563-569.
- Tiruppathi, C., Brandsch, M. Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Leibach, F. H. (1992). Constitutive expression of the taurine transporter in a human colon carcinoma cell line. *Am. J. Physiol.*, **263**(5 Pt 1), G625-631.
- Trachtman, H., Futterweit, S. and Bienkowski, R. S. (1993). Taurine prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **191**(2), 759-765.
- Uchida, S., Kwon, H. M., Yamauchi, A., Preston, A. S., Marumo, F. and Handler, J. S. (1992). Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **89**(17), 8230-8234.
- Wang, Q., Hyde, D. M. and Giri, S. N. (1992). Abatement of bleomycin-induced increases in vascular permeability, inflammatory cell infiltration, and fibrotic lesions in hamster lungs by combined treatment with taurine and niacin. *Laboratory Investigation*, **67**(2), 234-242.