

Organ-Specific Expression Profile of *Jpk*: Seeking for a Possible Diagnostic Marker for the Diabetes Mellitus

Eun Young Lee, Hyoung Woo Park and Myoung Hee Kim[†]

Department of Anatomy, Embryology Lab., Brain Korea 21 Project for Medical Science
Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

A novel gene *Jpk*, originally isolated as a trans-acting factor associating with the position-specific regulatory element of murine *Hox* gene has been reported to be expressed differentially in the liver of diabetic animals. Therefore, in an attempt to develop a possible diagnostic marker and/or new therapeutic agent for the Diabetes Mellitus, we analysed the expression pattern of *Jpk* among organs of normal and diabetic Sprague-Dawley (SD) rats. Total RNAs were isolated from each organs (brain, lung, heart, liver, spleen, kidney, muscle, blood, and testis) of diabetic and normal rats in both normal feeding and after fasting condition. And then RT (reverse transcription) PCR has been performed using *Jpk*-specific primers. The *Jpk* gene turned out to be expressed in all organs tested, with some different expression profiles among normal and diabetes, though. Upon fasting, *Jpk* expressions were reduced in all organs tested except kidney, muscle and brain of normal rat. Whereas in diabetes, *Jpk* expressions were increased in all organs except heart, muscle and testis when fasted. Compared to the normal rat, the *Jpk* expression level in blood was remarkably upregulated (about 15~30 times) in diabetic rat whether in normal feeding or fasting condition, suggesting that the *Jpk* could be a candidate gene for the possible blood diagnostic marker for the Diabetes Mellitus.

Key Words: Diabetes mellitus, *Jpk*, Expression profile

서 론

당뇨병 (Diabetes Mellitus)은 현대인에게 가장 많이 발생되는 비전염성 만성질환으로, 혈액 속에 당 (혈당)이 너무 많아져 정상과는 다르게 소변으로 당이 흘러 나오는 것을 말한다. 당뇨의 경우 식사를 통하여 섭취된 당분이 간장이나 근육 또는 지방세포 등에 적절히 저장되지 못하고 혈액 중에 축적되며, 따라서 정상보다 훨씬 높은 혈당을 유지하게 되고 이 과다한 양의 혈당은 체내 여러 부위에서 합병증을 유발하는 한편 신사구체를 손상시켜 당분이 그대로 통과하여 오줌으로 배설되므로 당뇨병자는 비정상적인 기아 상태에 있게 된다 (Rand et al., 2004). 혈당을 적절히 조절해 주는 것은 췌장의 베타세포에서 생산되는 인슐린이라고 하는 호르몬이다. 이것이 부족하거나 작용에 이상이 생기게 되면 당뇨병이 된다 (Levine and Leibowitz, 1999). 인슐린은 몸 속

의 영양소가 원활히 대사되는데 필요한 호르몬이므로 인슐린이 부족하면 섭취한 영양소를 원활히 이용하지 못하게 된다.

당뇨병은 발병 원인에 따라 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 하나는 인슐린의 부족에 의해 생기는 제 1형 당뇨병이고 다른 하나는 인슐린 작용에 대한 저항성 때문에 발병된다고 생각되는 제 2형 당뇨병이다. 제 1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병이라고도 불리는데 주로 자가 면역질환이나 다양한 유전적 환경적 요소들로 인하여 췌장의 베타세포가 파괴되어 인슐린의 분비가 전혀 이루어지지 않거나 감소하기 때문에 발생한다 (Lee et al., 2000; Rand et al., 2004). 제 2형 당뇨병은 전체 당뇨병의 90% 이상을 차지하며, 인슐린 비의존성 당뇨병이라고도 하는데 유전적 요소들과 환경의 상호작용으로 인해 발병되며 나이가 들수록 병에 걸릴 위험성도 증가한다 (Rand et al., 2004). Islet의 이식, β -cell의 재생, 인슐린 유전자 치료 등 오랫동안 몇몇 다른 접근 방법으로 당뇨병의 치료가 연구 되어져 왔으나 아직까지 적절한 운동과 식이요법 외에 만족스러운 치료 방안은 발견되지 않고 있는 실정이다 (Levine and Leibowitz, 1999; Lee et al., 2000).

본 실험실에서는 생쥐 (mouse)의 발생과정 중 형태형성에 관여하는 *Hox* 유전자 (Gehring, 1985; Akam 1989)의 발현

* 논문 접수: 2004년 10월 11일
수정재접수: 2004년 12월 2일

[†] 교신저자: 김명희, (우) 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지, 연세대학교 의과대학 해부학교실
Tel: 02-361-5173, Fax: 02-365-0700
e-mail: mhkim1@yumc.yonsei.ac.kr

을 공간 특이적으로 조절하는 인자를 분석하던 중 *Jpk* 유전자를 분리하였으며 (Cho et al., 1997) 염기서열을 분석한 결과 흰쥐 (rat)에서 분리된 *Tanis*라고 하는 유전자와 homologous한 유전자로 분석되었다 (Kim et al., 2002). 흥미롭게도 *Tanis* 유전자는 제 2형 당뇨병의 모델로 사용하는 이스라엘 모래쥐 (*Psammomys obesus*)에서 24시간 굶긴 경우 간에서 정상과는 달리 매우 높게 발현하는 유전자로 분리되었으며, 이것은 글루코즈에 의해 발현이 조절되고 당뇨병에서는 그 발현이 비정상적으로 조절되는 것으로 보고되었다 (Walder et al., 2002; Gao et al., 2003).

따라서 본 연구에서는 당뇨병의 새로운 치료제 혹은 새로운 diagnostic marker로서의 가능성을 모색하기 위하여 당뇨와 정상 생쥐에서 *Jpk* 유전자의 발현양상을 각 기관별로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 태어난 지 6주째인 Sprague-Dawley (SD) 종 수컷 쥐를 동일한 조건으로 사육하여 사용했다. 당뇨병의 경우 kg 당 55 mg의 Streptozotocin (STZ, dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 5.5)을 꼬리 정맥에 주사하여 당뇨모델 쥐를 만들었다. 정상 쥐와 당뇨 쥐는 각각 정상 먹이군과 24시간 금식군으로 나누어 실험하였으며 실험쥐는 CO₂ 가스를 이용하여 sacrifice하였다. 실험에 사용할 기관 (brain, lung, heart, liver, spleen, kidney, muscle, blood, and testis)은 적출한 다음 액체 질소에서 급냉 하였고 RNA를 추출할 때까지 -70°C에 보관하였다.

2. 총 RNA의 분리

총 RNA는 Acid Phenol-Guanidinium Thiocyanate-Chloroform Extraction 방법을 이용하여 추출하였다. 액체질소를 소량 넣은 막자사발에 조직을 넣고 파쇄한 후, denaturing 용액 (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sodium lauryl sarcosinate, 0.1 M β-mercaptoethanol) 3 ml를 첨가한 다음 homogenizer를 이용하여 실온에서 30초간 분쇄하였다. 조직을 15 ml 튜브로 옮기고, 2 M NaOAc (pH 4.0) 0.3 ml, phenol (pH 4.0) 3 ml, chloroform-isoamylalcohol (49:1)을 0.6 ml 첨가한 후 잘 혼합하였다. 얼음에 15분 간 방치한 뒤 3500 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하고 상층액을 1.5 ml eppendorf 튜브로 옮긴 다음 동량의 isopropanol을 첨가하였다. -20°C에서 하룻밤 방치한 다음 3500 rpm, 4°C에서 40분 간 원심분리하여 침전시키고 70% EtOH로 세척 후 건조시켰다. 침전된 RNA는 DEPC를 처리한 증류수에 녹여 UV-spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK)를 이용해서 정량하였다.

3. RT-PCR

M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 다음과 같이 first strand cDNA를 제조하였다. RNA 2 μg을 PCR 튜브에 넣고, oligo-dT (100 pmole/μl) 1 μl와 5x Reverse transcriptase buffer 5 μl, 2.5 mM dNTP 5 μl, RNase inhibitor (40 U/μl) 1 μl를 첨가한 다음 DEPC를 처리한 증류수로 총 25 μl를 만들었다. Thermal cycler (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용하여 70°C에서 5분간 RNA를 변성시킨 다음 M-MLV Reverse transcriptase (100 units)를 첨가하고 4°C에서 10분, 37°C에서 60분, 이어 4°C로 셋팅하여 cDNA를 제조하였다. 총 25 μl 반응물 중 1 μl를 취하여, 10x PCR buffer 2.5 μl, 2.5 mM dNTP 2 μl, 그리고 forward와 reverse primer를 각각 10 pmole씩 첨가한 다음 Excel Taq polymerase를 첨가하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 95°C에서 5분간 반응한 뒤 95°C에서 1분 동안 denaturation step을, 각 primer에 적합한 반응 온도에서 1분간 annealing step을, 72°C에서 1분간 extension step을 one cycle로 하여 총 35 cycle 반응시키고, 72°C에서 10분간 final extension을 하여 반응을 종료하였다. 사용한 *Jpk* 와 β-actin primer는 다음과 같다: *Jpk* primer 쌍 (forward primer, 5'-GGG GCA GGA AGA TCT AAA TG-3'; reverse primer, 5'-GTG AAA GTG TGC GTA AGG C-3'), β-actin primer 쌍 (forward primer, 5'-CAT GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC-3'; reverse primer, 5'-GCC ATC TCC TGC TCG AAG TCT AG-3').

4. *Jpk* 유전자의 발현 정도 측정

각각의 PCR 반응물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 분리한 다음 LAS-1000 plus (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 DNA band를 이미지화 했으며, TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt, Germany) program을 이용하여 band의 density를 측정하였다. *Jpk* 유전자의 발현 측정값은 β-actin 값으로 normalize하였다.

결과 및 고찰

당뇨병의 새로운 치료제 그리고 새로운 diagnostic marker로서의 가능성을 모색하기 위하여 당뇨와 정상 생쥐에서 *Jpk* 유전자의 발현양상을 각 기관별로 분석하였다. 당뇨모델은 재료 및 방법에서와 같이 Sprague-Dawley (SD) rat에 스트렙토조토신을 처리하여 만들었다. 스트렙토조토신은 항종양 (antitumor) 종양형성 (oncogenic) 당뇨병형성 (diabetogenic)의 성질을 가지는 넓은 범위의 항생물질로 알려져 있는데, 특히 체장의 β-cell을 선택적으로 파괴시켜 당뇨를 유발시킨다고 보고되어 있다 (Like et al., 1978; Bonnevie et al., 1981; Kim et al., 2001). 본 실험에서는 스트렙토조토신을 주입하고 3일 후에

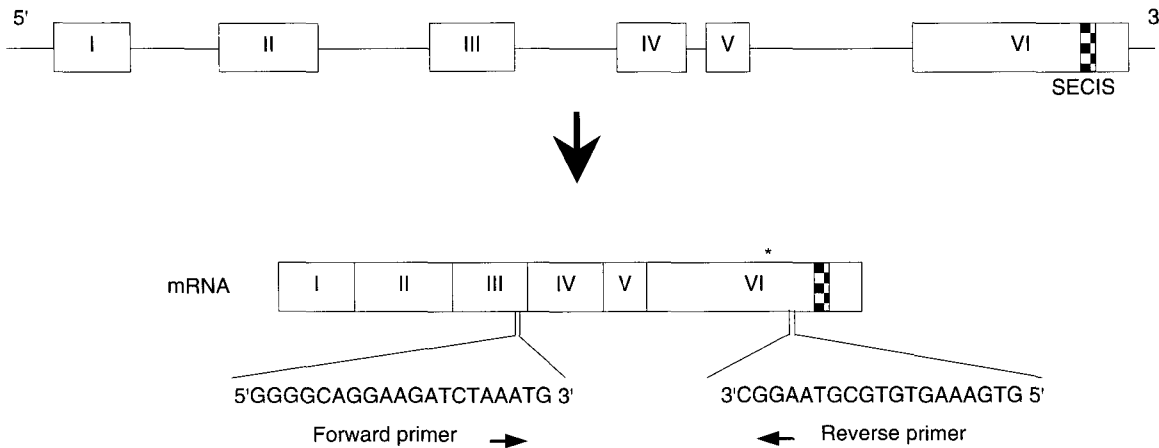


Fig. 1. Genomic and mRNA structure of the *Jpk*. The *Jpk* gene consists of six exons (I-VI). The stop codon (*) and the selenocysteine insertion sequence (SECIS) are marked. The forward and reverse primer sequences for the PCR reactions are presented below the exons III and VI, respectively.

측정된 혈당량이 500 mg/dl 보다 높은 수치를 보인 SD rat만을 선별하여 당뇨 모델로 사용하였다. 동물은 24시간 동안 굶긴 군과 먹이에 제한을 두지 않은 군으로 구별하여 관리한 뒤 기관을 적출하였으며, 또 24시간 동안 금식을 했을 때 변화된 *Jpk*의 발현 수준이 금식에 의한 것임을 증명하기 위해 금식 후 먹이를 재섭취하도록 한 뒤 그 시점으로부터 각각 24시간, 51시간, 72시간 후에 각 기관을 적출하여 실험에 사용하였다.

각 기관으로부터 RNA를 분리한 후 Reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였으며 이를 PCR용 template로 사용하였다. *Jpk* 유전자의 발현 양을 분석하기 위한 PCR 증폭용 primer는 세 번째 exon에 위치하는 염기서열과 상보적인 forward primer와 6번째 exon에 위치하는 3'-UTR의 염기서열과 상보적인 reverse primer를 디자인하여 총 393 bp가 증폭되도록 고안하였다 (Fig. 1).

Jpk 유전자는 실험에 사용한 모든 기관 (간, 혈액, 신장, 비장, 심장, 근육, 뇌, 정소 및 폐)에서 발현하였다 (Fig. 2). 그러나 발현 양상에 있어서는 정상과 당뇨쥐에서 그리고 금식과 정상 먹이군에서 현저한 차이를 나타내었다. 금식하였을 경우 정상쥐에서는 신장 근육 뇌를 제외한 모든 기관에서 *Jpk*의 발현이 감소한 반면 당뇨쥐에서는 굶졌을 때 심장 근육 정소를 제외한 모든 기관에서 *Jpk*의 발현이 증가하였다. 정상쥐에서의 이런 변화가 금식에 따른 것인지를 확인하기 위하여 금식 후 24, 51, 72 시간에 걸쳐 먹이를 재섭취케 한 후 몇몇 조직을 분리하여 *Jpk*의 발현을 분석하였으며, 음식의 재섭취 기간이 경과함에 따라 금식 이전의 수준으로 발현 정도가 회복되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A-D). 당뇨쥐의 경우 먹이를 제한하지 않은 경우와 비교하

여 24시간 동안 먹이를 제한했을 때 심장 근육 정소를 제외한 모든 기관에서 *Jpk*의 발현이 증가하였다. 흥미로운 것은 간, 비장, 폐에서 정상쥐의 경우는 굶졌을 때 *Jpk*의 발현이 감소한 데 비해 당뇨쥐에서는 반대로 발현이 증가되었으나 (Fig. 2A, D, J), 뇌, 정소 등 다른 기관에서는 이와 같은 정상과 당뇨시 음식 섭취 유무에 따른 상반된 발현 현상이 관찰되지 않았다.

탄수화물을 글라이코젠 형태로 저장하며 혈당의 항상성 유지에 중요한 기관인 간의 경우 *Jpk*의 발현이 정상에서와는 달리 당뇨쥐의 경우 24시간 금식 후에 증가하였다 (Fig. 2A). 이 결과는 2002년 Walder 등이 보고한 *Tanis*의 발현양상과 매우 유사하였다. Walder 등은 제 2형 당뇨모델인 이스라엘 모래쥐 (*Psammomys obesus*)에서 혈중 포도당과 인슐린 양에 반비례하여 그러나 혈중 triglyceride 농도에는 정비례하여 발현한다고 보고하였고 *in vitro* 실험에서는 glucose가 *Tanis/Jpk*의 발현을 억제한다고 보고 하였는데 (Gap et al., 2003) 이 결과는 *Tanis/Jpk*가 glucose에 의해 발현이 조절되나 당뇨상태에서는 이 조절이 훼손되었다는 것을 의미한다고 볼 수 있다. 그리고 이상의 결과는 *Jpk/Tanis*가 제 1형 및 2형 당뇨 모두에서 조절이 비정상적으로 일어나는 간 (liver)에서의 당뇨 마커로 사용될 수도 있음을 시사한다.

Walder 등은 더 나아가 Yeast-two-hybrid 방법을 통해 *Tanis/Jpk*와 Serum amyloid A (SAA)가 서로 결합할 것이라고 시사하였다. SAA는 급성 염증반응에 관여하는 단백질로 염증 유발시 혈액에서 약 1000배 정도 그 농도가 증가하는 것으로 알려져 있으며, 심혈관계 질환 유발인자로도 주목 받고 있으므로 *Tanis/Jpk*가 SAA를 매개하여 당뇨병과 염증, 그리고 심혈관계 질환을 하나로 연결하는 단백질 중 하나일 가능성이 매우 높을 것으로 유추된다. 본 실험에서는 혈액의 경

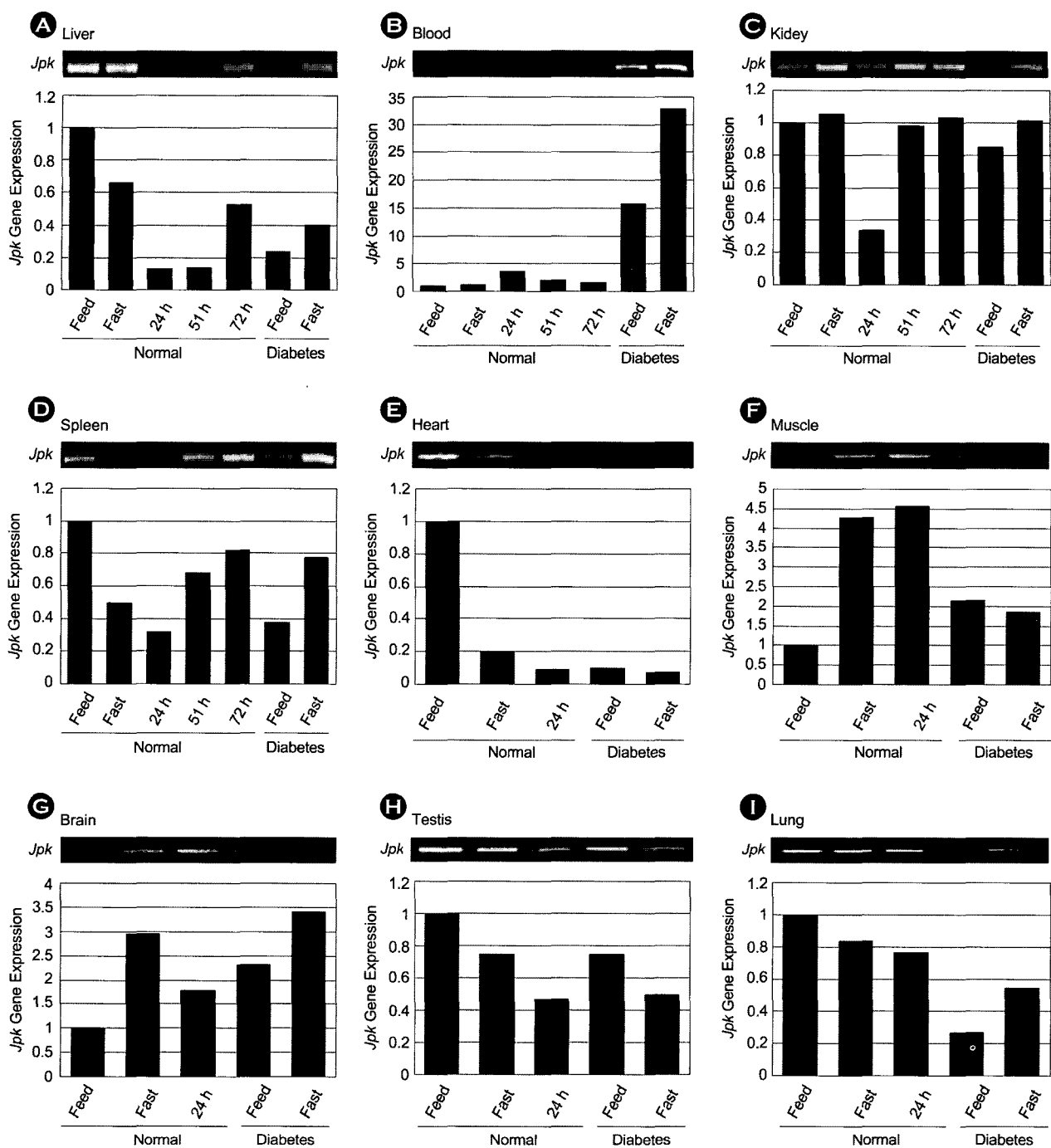


Fig. 2. The expression pattern of *Jpk* gene among different organs (liver, blood, kidney, spleen, heart, muscle, brain, testis, and lung) of both normal and diabetic rats. Rats in feeding and fasting or refeeding for 24 (24 h), 51 (51 h) or 72 hours (72 h) are indicated. Each PCR product samples were run on the 1.2% agarose gel. The level of *Jpk* expression was quantified by scanning laser densitometry and normalized with those of β -actin product as written in the Materials and Methods. Experiments were repeated 3 times and data were average values.

우 *Jpk*의 발현이 음식 섭취 유무를 떠나 정상쥐에 비해 당뇨병에서 약 15~30배 정도 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 2B). *Tanis/Jpk*가 SAA의 receptor로 작용하여 염증반응의 신호를 전달할 것으로 생각되나 당뇨병의 blood에서 왜 이런 현저

한 양의 *Jpk*가 발현되는지는 명확치 않다. 그러나 혈액에서의 발현 차이는 당뇨 진단을 위한 마커로서의 응용에 용이하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

최근 염기서열 분석을 통해 *Jpk*가 셀레노 단백질, SelS라

고 보고되었으며 (Kryukov et al., 2003), SelS가 glucose에 의해 조절 받는 단백질족, 즉 glucose-regulated protein (GRP) family에 속하는 새로운 단백질로 밝혀졌다 (Gao et al., 2004). 특히 제 2형 당뇨의 특징은 insulin resistance를 들 수 있는데, 이것은 또 oxidative stress와 관련이 있다고 알려져 있다. 그러나 당뇨 발병시 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 작용 기작이나 특히 이에 작용하는 항산화효소에 대한 연구는 미미한 편이다. 최근 많은 셀레노 단백질들이 항산화효소 작용을 한다는 보고가 있으며 (Kryukov et al., 2003) 특히 셀레노 단백질 중의 하나인 glutathione peroxidase (GPX1)가 생체 내에서 과산화수소의 양을 감소시킨다고 알려져 있는데, GPX1을 과발현시켰을 경우 생체 내 활성산소종을 과다하게 제거함으로써 인슐린의 기능을 방해하고 궁극적으로 인슐린 resistance를 유발시킬 것이란 보고가 있다 (McClung et al., 2004). 그러나 최근 *Jpk*의 경우 F9 murine teratocarcinoma cell을 이용한 실험에서는 과발현이 오히려 ROS를 생성하여 궁극적으로 세포를 사멸시키는 결과를 얻었다 (Kong et al., 2003). 셀레노 단백질로 분류되는 *Jpk*가 생체에서 당뇨 발병시 GPX1과 같이 항산화기능을 할지 아니면 *in vitro* cell line을 이용한 실험에서와 같이 ROS를 생성할지 현 시점에서 예측하기 어려우나, 생체 내 redox potential의 유지에 관여할 가능성은 매우 높다고 본다. 어떤 상황이건 *Jpk*가 정상과 당뇨에서 현저하게 다른 양상으로 발현되며 특히 혈액에서는 정상쥐와는 다르게 당뇨쥐에서 음식섭취 유무와 상관없이 높게 발현하는 것으로 보아 새로운 당뇨 마커로의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수여성과학자 도약지원연구비 (R04-2001-000-00156-0)의 지원에 의해 이루어졌으며 이은영 대학원생은 BK21장학금을 받는 수혜자로 이에 감사드립니다. 또 초기 연구에 많은 도움을 주신 박성도님께도 감사드립니다.

REFERENCES

- Akam M. *Hox* and *HOM*: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell*. 1989. 57: 347-349.
- Bonnevie-Nielsen V, Steffes MW, Lernmark A. A major loss in islet mass and β -cell function precedes hyperglycaemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes*. 1981. 30: 424-429.
- Cho M, Shin C, Min W, Kim MH. Rapid analysis for the isolation of novel genes encoding putative effectors to the position-specific regulatory element of Murine *Hoxa-7*. *Mol Cells*. 1997. 7: 220-225.
- Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress-SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Letters*. 2004. 563: 185-190.
- Gao Y, Walder K, Sunderland T, Kantham L, Feng HC, Quick M, Bishara N, De Silva A, Augert G, Tenne-Brown J, Collier GR. Elevation in Tanis expression alters glucose metabolism and insulin sensitivity in H4IIE cells. *Diabetes*. 2003. 52: 929-934.
- Gehring WJ. The homeobox: a key to the understanding of development? *Cell*. 1985. 40: 3-5.
- Kim BM, Han YM, Shin YJ, Min BH, Park IS. Clusterin expression during regeneration of pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2001. 44: 2192-2202.
- Kim H, Park S, Park HW, Kim MH. Isolation and characterization of a novel gene, *Jpk*, from murine embryonic cDNA library. *Korean J Genetics*. 2002. 24: 197-203.
- Kong KA, Park S, Park H, Kim MH. A novel gene, *Jpk* induces apoptosis in F9 murine teratocarcinoma cell through ROS generation. *Ann NY Acad Sci*. 2003. 1010: 433-436.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehntab O, Guigo R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003. 300: 1439-1443.
- Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 2000. 408: 483-488.
- Levine F, Leibowitz G. Towards gene therapy of diabetes mellitus. *Mol Med Today*. 1999. 5: 165-171.
- Like AA, Appel MC, Williams RM, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies. *Lab Invest*. 1978. 38: 470-486.
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101: 8852-8857.
- Rand JS, Fleeman LM, Farrow HA, Appleton DJ, Lederer R. Canine and feline diabetes mellitus: Nature or nurture? *J Nutr*. 2004. 134: 2072S-2080S.
- Saudek CD, Felig P. The metabolic events of starvation. *Am J Med*. 1976. 60: 117-126.
- Walder K, Kantham L, McMillan JS, Trevaskis J, Kerr L, De Silva A, Sunderland T, Godde N, Gao Y, Bishara N, Windmill K, Tenne-Brown J, Augert G, Zimmet PZ, Collier GR. Tanis: A link between type 2 diabetes and inflammation? *Diabetes*. 2002. 51: 1859-1866.