

Proteomic Analysis of Circadian Clock Mutant Mice

Joon-Woo Lee, Han-Gyu Kim and Kiho Bae[†]

Department of Life Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

Circadian rhythms, time on a scale of about 24 hours, are present in a number of organisms including animals, plants, and bacteria. The control of the biochemical, physiological and behavioral processes is regulated by endogenous clocks in the suprachiasmatic nucleus (SCN). At the core of this timing mechanism is molecular machinery that are present both in the brain and in the peripheral tissues throughout the body, and even in a single cultured cell. In this study, we performed two-dimensional gel electrophoresis to figure out any correlation between protein expression patterns and the requirement of two canonical clock proteins, either *mPER1* or *mPER2*, by comparing global protein expression profiles in livers from wildtype or *mPer1/mPer2* double mutant mice. We could identify several differentially expressed protein candidates with respect to time and genotypes. Further analysis of these candidate proteins in detail *in vivo* will lead us to the better understanding of how circadian clock functions in mammals.

Key Words: Circadian clock, *mPer* mutant mice, Two-dimensional gel electrophoresis

서 론

주기적으로 변하는 외부 환경에 대처하며 생명을 유지하기 위한 대응방안으로 생명체는 체내의 환경을 일정하게 유지하려는 많은 노력을 기울이며, 이를 위해 다양한 형태의 생물학적 리듬 (biological rhythms)을 진화시켜 왔다. 이러한 생물학적 리듬의 대표적인 예로 "일주기 리듬 (circadian rhythm)" 또는 "생체시계 (circadian clock)"라 불리는 리듬이 있다. 일주기 리듬은 지구의 자전현상에 의해 약 24시간의 주기로 반복되는 밤낮의 변화에 적응하여 살아가려는 지구상 생물체들의 고유리듬으로, 세균에서부터 인간을 포함한 포유동물에 이르기까지 광범위하게 존재하고 있다 (Weaver, 1998; Reppert and Weaver, 2001). 이러한 일주기 리듬의 대표적인 특징을 들면 다음과 같다. 첫째, 이 리듬은 일정한 주기성을 갖고 반복하는 외부의 환경인자에 대응하여 계속 재조정 또는 동기화 (synchronized)될 수 있다. 둘째, 외부 환경 인자가 없어도 생명체는 체내의 고유한 박동조정자 (pacemaker)의 작동으로 자발적인 리듬을 계속 유지할 수 있다. 셋째, 물질대사 작용이 가능한 생리적 온도범위 내에서는 리듬의 주기 길이가 변하지 않고 일정하다. 넷째, 단일 배양세

포 내에서도 주기적인 분자수준의 리듬이 존재한다 (Balsalobre et al., 2000). 즉, 생체시계가 세포내 분자들의 상호조절 작용을 통해 체내의 생리활동을 일정하게 유지시키고 이를 한 개체의 행동리듬으로 전체적으로 통합, 발현하는 타이밍 기작임을 시사한다.

행동리듬이 유전자의 변이로 조절 가능할 것이라는 가정 하에 Ron Konopka는 과실파리를 실험대상으로 이용하여 일 주기 리듬의 분자유전학 및 행동학적 연구를 처음 시도하여, 최초의 시계리듬 돌연변이 개체 *period (per)*를 성공적으로 분리, 확인하였다 (Konopka and Benzer, 1971). 과실파리에서 거둔 성과를 토대로 미국 노스웨스턴 대학의 Joe Takahashi 그룹은 forward genetics방법을 *Balb/c* 마우스에 적용하여 시계리듬 돌연변이체를 스크리닝하여 *Clock (Clk)*이라 명명한 돌연변이를 얻었으며 그 유전자를 클로닝하였다 (King et al., 1997). 이 유전자의 발현 산물은 basic Helix-Loop-Helix (bHLH) type의 DNA 결합 motif를 가지며, Glutamine-rich 부위를 가진 전형적인 전사유발 단백질이었다. CLOCK의 결합 상대자로 BMAL1이라는 또 다른 bHLH type의 전사 단백질이 Yeast two-hybrid 스크리닝 방법으로 확인되었다 (Gekakis et al., 1998). CLOCK과 BMAL1 두 단백질은 서로 결합한 dimer로 DNA 조절부위의 E box (CANNTG)라 불리는 염기 서열에 결합하여 마우스의 세 가지 *Period (mPer1, mPer2, mPer3)* 유전자들을 포함한 여러 시계유전자들의 발현을 유도한다고 밝혀지고 있다 (Zylka et al., 1998). 이들 시계유전자가 표현하는 포유류 시계리듬의 조절중추로 밝혀진 곳인 뇌의 시상하부 말단에 위치하고 있는, 각각 만 여개의 신경

*논문 접수: 2005년 10월 1일

수정재접수: 2005년 11월 5일

[†]교신저자: 배기호, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 배기리 234,

연세대학교 생명과학과

Tel: 82-33-760-2280, Fax: 82-33-760-2183

e-mail: kbae@dragon.yonsei.ac.kr

세포들로 구성된 좌우 한 쌍의 시교차상핵 (suprachiasmatic nucleus, SCN)이다 (Weaver, 1998).

빛은 개체의 시계리듬에 절대적인 영향을 미치는 강력한 환경인자로, 광주기와 빛의 세기, 파장 등이 시계리듬에 미치는 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 빛의 작용은 생체리듬의 시간대에 따라 서로 다르게 나타난다. 이러한 빛에 의한 시계리듬의 변화를 "시계리듬의 위상이동 (phase shift)"이라고 하며 시계리듬의 진행이 각각 늦춰지거나 (phase delay) 또는 빨라지는 (phase advance) 방향으로 나타나게 된다. 사람을 포함한 포유동물의 경우, 밤 시간대에 빛에 노출되면 뇌 속 시계중추 SCN내에 *mPer1*과 *mPer2* 유전자들의 발현을 급격히 유도한다 (Albrecht et al., 1997; Shigeyoshi et al., 1997). 하지만, 빛에 의한 신호를 SCN내 신경세포들에 relay 하는 이들 upstream 신호전달경로에 의해서 유도되는 *mPer*의 발현과 이를 시작으로 한 시계리듬의 작동이 정작 어떻게 개체수준의 리듬의 새로운 phase shift를 유발하는지, 이들 간의 직접적인 연관성이 있는지에 대한 downstream 신호전달경로의 연구는 아직까지 미약한 실정이다.

포유류에서 시계유전자들의 생체내 역할을 규명하기 위해 유전자적중 (gene knockout) 마우스를 이용한 실험들이 많이 진행되어 왔다 (van der Horst et al., 1999; Bunge et al., 2000; Shearman et al., 2000; Bae et al., 2001). 이전 실험을 통해 포유류의 세 가지 *mPer* 유전자가 SCN내 생체시계리듬의 생성 및 유지면에서 서로 다르게 작용함이 보고되었다 (Bae et al., 2001). 지금까지 보고된 시계유전자의 knockout 마우스들 중에서 그 표현형으로 시계리듬의 완전한 상실- 유전자들의 분자적 순환 및 개체행동리듬의 주기성 둘 다- 을 보인 예는 *Bmal1*, *mCry1/mCry2* double, 그리고 *mPer1/mPer2* double knockout 마우스 등의 세 가지 경우이다 (van der Horst et al., 1999; Bunge et al., 2000; Bae et al., 2001). 본 연구에서는 생체 시계리듬을 완전히 상실한 *mPer1/mPer2* double knockout 마우스를 실험동물로 사용하여, 포유류에서 생체시계의 정상적인 작동 유무에 따라 차별적으로 발현되는 시계 단백질 및 관련된 새로운 단백질들의 변화 양상을 이차원 전기영동 방법과 질량분석을 이용하여 screening하였다. 이를 통해 포유류에서 시계리듬의 존재 여부가 시계 단백질 및 기타 단백질의 발현에 어떠한 역할을 수행하는 지 시험하고, 이들 유전자들의 생체시계작동과의 관련 가능성을 탐색해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험동물은 태어난 지 8주가 지난 129/sv 수컷 마우스를 사용하였다. *mPer1*과 *mPer2* 유전자를 동시에 녹아웃시킨 마

우스 (Bae et al., 2001)와 야생형, 두 동물 군으로 나누어 12L:12D (LD) 광주기 조건에서 2주 이상 사육하여 각 개체의 시계리듬을 광주기에 동조화시키는 과정을 거친 다음 본 실험에 사용하였다. LD에서 entrainment 후 ZT2 (ZT 0를 lights-on time으로, ZT12를 lights-off time으로 정의함)와 ZT-14에서 간 조직을 채취하였고, 암조건 (DD) cycle로 바꾼 다음 같은 시간대에 조직을 추출하였다. 실험동물의 사육 온도는 $23.5 \pm 2^\circ\text{C}$ 와 습도 60%를 유지하였다.

실험에 사용한 마우스의 유전인자가 맞는지 알아보기 위해서는, 조직 적출 후 꼬리를 잘라 Proteinase K (20 mg/ml)와 TES buffer (100 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA)를 1:100으로 섞은 용액 500 μl 에 넣어서 52°C 의 항온수조에서 6시간 이상 반응시켜 꼬리의 단백질을 분해하고 $14,000 \times \text{rpm}$, 4°C 에서 10분간 원심분리 후 얻은 상층액에 등량의 isopropyl alcohol을 넣어 다시 같은 조건에서 원심분리하면 genomic DNA가 침전물로 남게 되는데 이 genomic DNA에 TE buffer를 넣고 항온수조에서 52°C , 6시간 이상 보관해서 DNA를 elution하였다. 그 다음 야생형과 knockout 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 (Bae et al., 2001) polymerase chain reaction (PCR)을 한 후 1% agarose gel에 전기영동하여 생쥐들의 유전인자를 확인하였다.

2. 행동리듬실험

Exercise wheel을 장착한 cage에 야생형과 *mPer1/2* double 녹아웃 마우스를 한 개체씩 넣고 LD 조건에서 2주 이상 키워 먼저 이들의 리듬을 동조화하였다. 이를 monitoring software로 컴퓨터에서 확인한 후, 이들을 빛이 없는 DD 조건에서 계속 키우며 wheel의 회전 정도를 관찰하여 개체행동리듬의 완전한 소실 여부를 결정하였다. 일정 시간 동안 빛 (형광등, 200 lux)의 유무에 따른 각 개체의 행동리듬이 변화하는 양상을 관찰하고 actogram으로 double plot하였다 (Acti-View v1.3, Mini Mitter Co, USA).

3. 이차원 전기영동분석 (2-dimensional gel electrophoresis)

이차원 전기영동의 isoelectric focusing (IEF)에 사용된 Immobilized pH gradient (IPG) dry strip (Amersham Pharmacia, 24 cm 길이)은 pH 3~10 범위의 것을 사용하였고 isoelectric focusing을 위해서 Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia)를 사용하였으며 Electrophoresis Power Supply model EPS 601 (Amersham Pharmacia)를 전기 공급하는데 이용하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Ettan DALT six Electrophoresis unit (Amersham Pharmacia)를 사용하였고 젤의 이미지 분석을 위해 PowerLook 110 scanner (UMAX Technology)를 사용하였다.

1) 샘플 채취

LD와 DD에서 ZT2와 ZT14에서 8주 정도 자란 129/sv 생쥐를 드라이아이스에서 발생하는 CO₂ 가스로 질식시킨 후 조직을 적출하여 영하 80°C에 보관하였다. 미리 액체질소 (LN₂)로 얼려둔 막자사발에 적출한 조직과 완충액 (sample buffer; 7 M urea, 2 M thiourea, 65 mM DTT, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 0.5% IPG buffer [pH 3~10], 0.05% SDS, 0.002% bromophenol blue) 1 ml을 넣고 간 다음 1시간 이상 상온에서 반응시킨 뒤 14,000 × rpm 4°C에서 30분간 원심분리하고 상층액을 새 Eppendorf tube로 옮기고 endonuclease (Sigma, 250 unit)를 처리, DNA를 분해하였다. 같은 조건에서 원심분리하여 상층액을 떠낸 후 Bradford method (Bio-Rad Protein Assay Kit)에 따라 단백질을 정량하였으며, 표준 단백질로는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. Protein 100 µg에 완충액을 넣어 450 µl로 맞춘 후 다음 과정에 사용하였다.

2) Isoelectric focusing (IEF)

준비한 시료 450 µl를 dry strip holder에 loading한 다음, dry strip (Amersham Pharmacia, pH 3~10)을 올려놓고 cover fluid oil로 덮은 후 Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia)에 놓고 Table 1의 조건대로 running하였다 (Table 1).

3) Equilibration

Isoelectric focusing이 끝난 dry strip을 뚜껑이 있는 긴 튜브에 TBP (tributyl phosphine) equilibration (6 M urea, 2% SDS, 50 mM tris-HCl [pH 8.8], 30% glycerol, 5 mM TBP, 0.002% bromophenol blue) 용액을 넣고 shaker에서 15분간 반응시켰다.

4) 2-dimensional gel electrophoresis

Equilibration이 끝난 후, 6~7시간 전에 미리 굳혀둔 12% polyacrylamide gel (Acrylamide/bis solution 29:1, 1.5 M Tris-HCl [pH 8.8], 10% SDS, 10% APS, TEMED; 20×24 cm)에 dry strip을 올려놓고 1% agarose gel로 sealing한 후 agarose gel이 굳으면 Ettan DALT six Electrophoresis unit (Amersham Pharmacia)에 넣고 running하였다. Dry strip에서 dye가 완전히 빠질 때까지 gel 당 100 mV 15 mA, 그 이후 acrylamide gel에서는 gel 당 100 mV 30 mA로 dye가 다 빠질 때까지 전개하였다.

5) Gel staining

먼저 45% (v/v) methanol, 5% (v/v) phosphoric acid, 50% (v/v) deionized distilled water (ddH₂O)를 섞어 최소 6시간 이상 gel을 고정한다. 다음, 17% (w/v) ammonium sulfate, 3.6% (v/v) phosphoric acid, 0.1% (w/v), 34% (v/v) methanol, CBB G-250이 함유된 염색용액에서 6시간 염색하였다. 염색이 완료된 gel은 1% (v/v) acetic acid, 15% (v/v) methanol, 84% (v/v) ddH₂O를 사용하여 2시간 동안 탈색하고 탈색이 완료된 gel은 ddH₂O를

Table 1. Experimental condition of isoelectric focusing

Step	Voltage mode	Voltage	Voltage-hour (Vhr) for 24 cm
1	step and hold	60	12 hr (rehydration)
2	step and hold	200	200 Vhr
3	step and hold	500	500 Vhr
4	step and hold	4000	4000 Vhr
5	gradient	8000	6000 Vhr
6	step and hold	8000	80000 Vhr

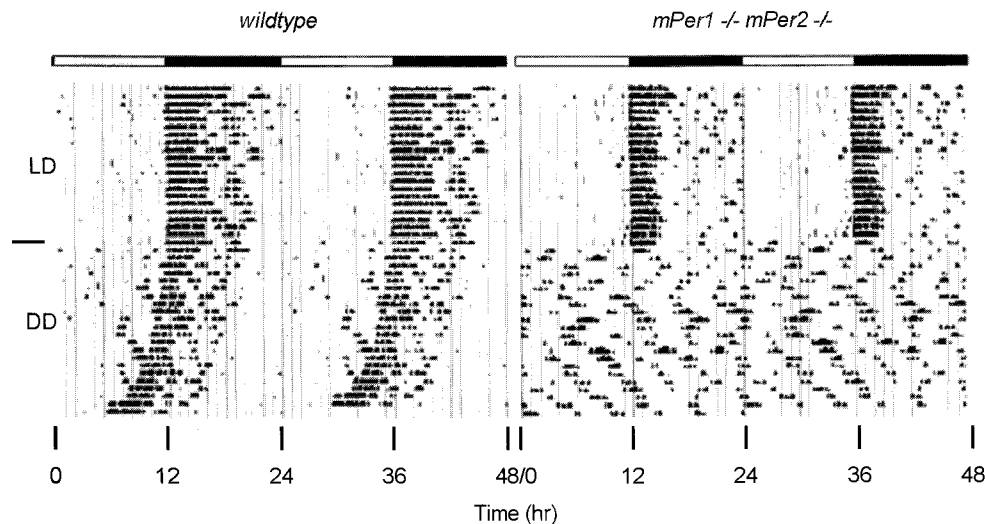


Fig. 1. Representative actograms from wildtype (left) and *mPer1/mPer2* double knockout (right) mice. The mice were transferred from LD to DD, and maintained in DD for three weeks to observe the behavioral rhythmicity, measured by wheel running activity. In contrast to wildtype, *mPer1/mPer2* double knockout mouse clearly shows its complete loss of rhythmicity when released to DD. A tick mark on the left indicates the LD to DD transition, and rectangular bars on top represent light (white) and dark (black) hours in a daily cycle. The actograms are plotted in the double plot format.

이용해 1시간 동안 세척하였다. Silver staining 방법을 이용하여 gel을 염색할 경우에는, 먼저 고정액 (10% acetic acid [v/v], 40% ethanol [v/v])으로 30분 이상 고정한 다음, sensitization 용액 (30% ethanol [v/v], 0.2% sodium thiosulfate [w/v], 17 g sodium acetate)에 30분간 반응시키고 ddH₂O로 5분씩 3번 씻어낸 다음 silver reaction 용액 (0.25% silver nitrate [w/v])에 20분간 반응시키고 ddH₂O로 1분씩 두 번 씻어주었다. 그리고 현상액 (6.25 g sodium carbonate, 100 µl formaldehyde)을 섞어 spot이 보일 때까지 develop한 다음 정지 용액 (3.65 g EDTA, 1 L ddH₂O)을 첨가하였다. 이 gel들을 ddH₂O로 5분씩 3번 세척하였고, 4°C에 보관하였다.

6) Spot analysis

Staining한 gel은 PowerLook 110 scanner (UMAX techno-

logy)를 사용하여 스캔하여 이미지 data로 전환한 다음, 2-DE image master program인 ImageMaster™ analysis software (Amersham Pharmacia)를 사용하여 이미지를 비교 분석하였다. 분석 결과 발현의 차이가 있는 spot들을 2-D reference map database를 통해 확인하였으며 (Sanchez et al., 2001), matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)를 통해서 단백질들을 동정하고 이를 근거로 유전자서열을 예측하였다.

결과 및 고찰

본 연구의 목적은 생체시계리듬의 작동에 의해 발현이 결정되는 유전자를 확보하고 이들이 각 조직의 고유한 대사 작

Table 2. Proteins identified using 2-dimensional gel analysis of the liver from WT in ZT2

Spot no.	Protein identification	pI	MW
1	Major urinary protein 2 (MUP2)	4.86	18512
2	Cytochrome B5	4.88	14567
3	Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial	5.06	12381
4	Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex 11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial hinge protein)	4.99	12075
5	Superoxide dismutase (Cu-Zn)	6.14	14537
6	Thioredoxin (ATL-derived factor [ADF])	4.91	12433
7	Unidentified		
8	60 kDa Heat Shock Protein, Mitochondrial(HSP60)	5.29	58144
9	Serum Albumin	5.49	65673
10	Protein disulfide-isomerase	4.86	55496
11	Unidentified		
12	Unidentified		
13	Translationally controlled tumor protein (TCTP)	4.81	24050
14	Protein disulfide-isomerase A3	5.83	56422
15	78 kDa glucose-regulated protein (Immunoglobulin heavy chainbinding protein)	5.04	69426
16	Ketohexokinase (Hepatic fructokinase)	5.68	30614
17	Unidentified		
18	Unidentified		
19	Unidentified		
20	Senescence marker protein30 (Regucalcin)	5.08	33929
21	Unidentified		
22	Cytochrome C Oxidase Polypeptide Vb, Mitochondrial	5.96	12748
23	Unidentified		
24	40S ribosomal protein SA (34/67 kDa laminin receptor)	4.85	40985
25	Peroxiredoxin 6 (non-selenium glutathione peroxidase)	6.26	26266
26	Unidentified		
27	Unidentified		
28	Selenium-binding protein 1	5.79	52662
29	60 kDa Heat Shock Protein, Mitochondrial (HSP60)	5.31	58000
30	ATP synthase beta chain, Mitochondrial	5.05	49152
31	Protein disulfide-isomerase A3	5.70	56442

용에 관여하는 방식을 규명하여 조절 가능성을 확인할 수 있는 후속 연구를 기약하고자 함이다. 이를 위해 먼저, 정상 마우스와 *mPer1/mPer2* double knockout 마우스를 이용한 비교 실험을 통해 이들 유전자의 발현과 정상적인 시계리듬의 존재 여부가 어떻게 작용할 지 알아보았다. *mPer* 유전자들은 특히 지금까지 알려져 있는 이른바 시계유전자들 중에서 빛의 자극에 의해 SCN에서 발현이 유도되어 시계리듬의 위상 이동에 역할을 담당할 것으로 여겨지고 있다. 이들은 또한 빛 이외에도 여러 다른 신호전달경로에 의해 말단 조직 내 발현이 복합적으로 조절되는 공통적인 최종 표적유전자일 가능성이 높다. 포유류에서 이러한 환경 자극에 의한 개체의 반응과정을 분자수준에서 이해하는데 일조하고자, 정상 마우스와 이들 시계유전자 돌연변이 마우스의 간 조직을 적출하여 생화학적인 프로테오믹스 실험을 수행하여 시계리듬의 유무에 의해 차별적으로 발현되는 단백질들의 변화 양상을 확인할 수 있었다.

1. 행동리듬실험

생체시계의 특징은 외부 환경요인에 끊임없이 재조정된다는 사실이다. 특히, 광주기의 변화는 포유류의 두 시계유전자 *mPer1*과 *mPer2*의 급속한 발현과 연관되어 있으며, *mPer1*이

나 *mPer2*의 소실로 인해 개체의 행동리듬이 변함은 이미 보고된 바 있다 (Bae et al., 2001). 이러한 빛에 의한 행동리듬의 변화가 *mPer*의 발현이 없는 *mPer* double knockout 마우

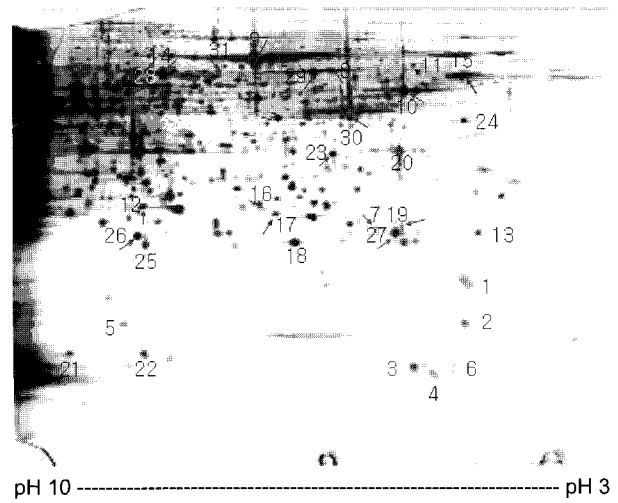


Fig. 2. A representative two-dimensional polyacrylamide gel image of the liver from WT in ZT2 using pH range IPG strips. Thirty-one protein spots marked by the number are further analyzed and listed in Table 2.

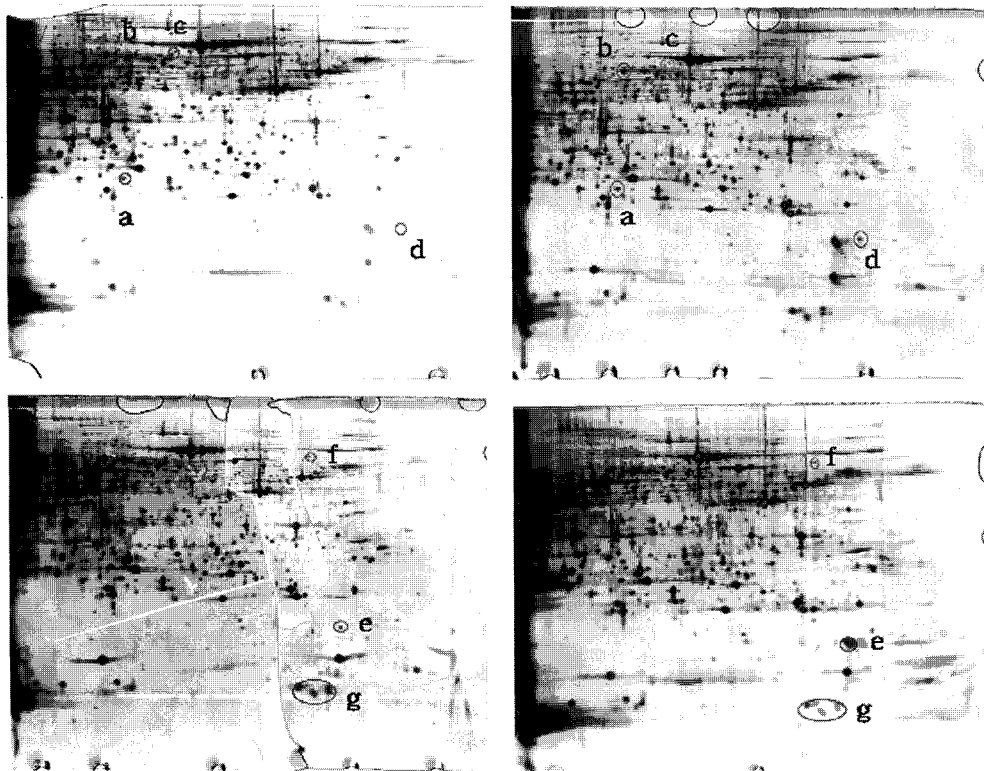


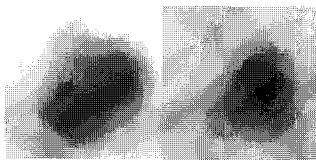
Fig. 3. The results of two-dimensional gel electrophoresis of liver proteins from WT and dKO collected in two time points. (Top left) WT at ZT2. (Top right) WT at ZT14. (Bottom left) dKO at ZT2. (Bottom right) dKO at ZT14. Protein spots showing clear difference are marked as a to g, and compared side by side in Figure 4 (a, b, c, d) and Figure 5 (e, f, g), respectively.

스에서 일어나는지 알아보고자 이들 개체의 행동리듬을 표준실험방법인 wheel running 정도의 변화로 살펴보았다. DD 조건에서 일정한 리듬을 보이는 야생형과 달리 *mPer1/mPer2* double knockout 마우스의 경우 바로 행동리듬을 상실하였다 (Fig. 1). 그러므로 생체시계의 발현에 이들 두 유전자가 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

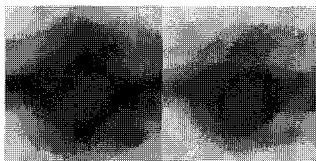
2. 2차원 전기영동을 통한 *mPer1/mPer2* double knockout 마우스 (dKO)와 야생형 마우스 (WT)의 단백질 발현 양상 비교

WT과 dKO 두 genotype을 가진 마우스의 간에서 각각 추출한 단백질 발현 양상을 이차원 전기영동방법을 이용하여 차이를 비교, 분석해 보았다 (Fig. 2 and Table 2). 이들 단백질의 발현 양상을 시간대 별로 비교해 보면, 동일한 genotype을 가진 생쥐에서 시간대의 차이에 따른 단백질의 발현 양상이 다르고, 한편, 다른 genotype에서 시간대가 같더라도 단백질 발현 양상이 다르다는 것을 알 수 있었다. 시간대나

a. Unknown Protein



b. Protein Disulfide-isomerase A3 (pI 5.83)



c. Protein Disulfide-isomerase A3 (pI 5.70)



d. Unknown Protein

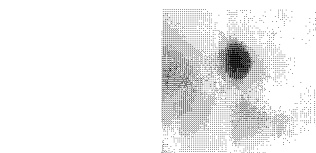


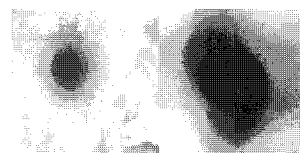
Fig. 4. Difference in the protein expression with time points in WT. (a) Unknown protein, (b) Protein disulfide-isomerase A3 (pI 5.83), (c) Protein disulfide-isomerase A3 (pI 5.70), (d) Unknown protein. ZT2 at left, ZT14 at right.

genotype에 따른 단백질 발현 양상은 발현의 유무뿐만 아니라 발현 양의 정도에서 뚜렷한 차이를 관찰할 수 있었다.

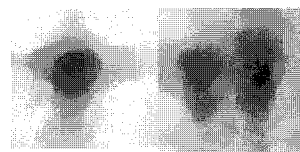
우선, 시간대에 따른 변화를 비교해 보았을 때 (Fig. 3), WT에서는 Protein disulfide-isomerase A3 (pI 5.83)와 Protein disulfide-isomerase A3 (pI 5.70)이 ZT14보다 ZT2에서 더 많이 발현되었고, 미 동정 단백질은 ZT14에서 더 많이 발현되었다 (Fig. 4). dKO에서 Major urinary protein 2 (MUP2)는 ZT14에서, Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial, Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex 11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial hinge protein), Thioredoxin (ATL-derived factor [ADF]) 등은 ZT2에서 각각 더 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 ZT2에서 하나의 점으로 보인 단백질이 ZT14에서 두 개의 점으로 나누어진 모습도 관찰되었다 (Fig. 5).

Genotype에 따라 비교해 보았을 때 (Fig. 6), ZT2에서 Major urinary protein 2 (MUP2)는 WT에서, Translationally controlled tumor protein (TCTP) (Lens epithelial protein)와 Superoxide dismutase (Cu-Zn)는 dKO에서 더 많이 발현되었으며 (Fig. 7), ZT14에서는 Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial, Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex

e. Major Urinary Protein 2 (MUP2)



f. Unknown Protein



g. Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial, Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex 11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial Hinge Protein), Thioredoxin (ATL-derived Factor [ADF])

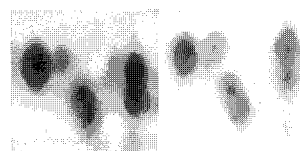


Fig. 5. Difference in the protein expression with time points in dKO. (e) Major urinary protein 2 (MUP2), (f) Unknown protein, (g) Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial, Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex 11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial hinge protein), Thioredoxin (ATL-derived factor [ADF]). ZT2 at left, ZT14 at right.

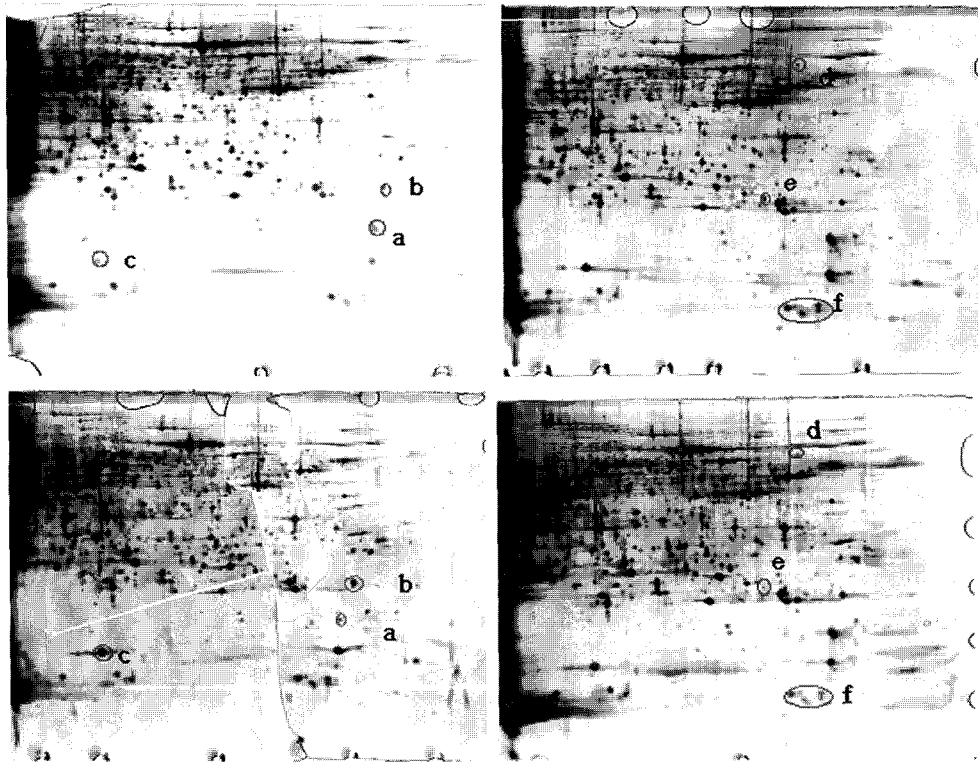


Fig. 6. The results of two-dimensional gel electrophoresis of liver proteins from WT and dKO. Compare top with bottom gels in different genotypes. (Top left) WT at ZT2. (Top right) WT at ZT14. (Bottom left) dKO at ZT2. (Bottom right) dKO at ZT14. Protein spots showing clear difference are marked as a to g, and compared side by side in Figure 7 (a, b, c) and Figure 8 (d, e, f), respectively.

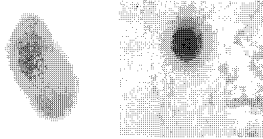
11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial hinge protein), Thioredoxin (ATL-derived factor [ADF])과 미 동정 단백질 등이 WT에서 더 많이 발현되었다 (Fig. 8). 그리고 Major urinary protein 2 (MUP2), Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial, Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex 11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial hinge protein), Thioredoxin (ATL-derived factor) (ADF) 등의 단백질은 시간대에 따라 다르게 발현될 뿐만 아니라 genotype에 따라서도 다르게 발현되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4, 5, 7과 8). 따라서 WT와 이중 녹아웃 마우스 간에서 발현되는 단백질의 발현 양상에는 발현의 양상이나 유무에 분명한 차이가 있었다.

본 연구에서 확인한 단백질들은 생체시계 관련 단백질이거나 보조적으로 생체시계의 기작에 의해 조절되는 단백질 일 것이다. Major urinary protein은 여러 isoform을 가지는데, 신장에서 다른 단백질들의 운반 및 분비에 관여하며, 이의 과도한 축적은 특히 열성유전 신장질환과 연관되어 있다는 보고가 있다. 이 중에서 MUP2는 특히 성장호르몬이 매개하는 신호전달경로에 의해 그 발현이 증가하고, 방향족 탄수화물 대사경로에 의해 제어되어 체중조절 등에 관여하리라 여겨지는 단백질이다 (Nukaya et al., 2004; Valkova et al., 2005). TCTP는 small chaperone 단백질 군에 속하는데, 스트레스와

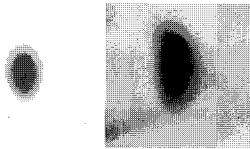
세포사멸에 대항하고 세포의 성장 및 세포주기의 진행에 관여하여 발암과정에 역할을 수행하리라 생각된다 (Chung et al., 2000; Bommer and Thiele, 2004). 한편, Superoxide dismutase (Cu-Zn)는 항산화효소로 중추신경계 뇌의 여러 부위와 송과선, 간 등에서 그 활성이 생체시계의 직접적인 조절을 받는다고 이미 알려진 단백질이다 (Hodoglugil et al., 1995; Baran et al., 2000). Cytochrome C Oxidase나 Reductase, Thioredoxin 등도 산화 환원반응에 작용하리라 생각된다. 유전인자형과 생체시계 시간대별로 차이를 보이는 아직 확인하지 못한 새로운 단백질들도 동정하고 그 기능에 대한 연구를 추가적으로 진행하면 생체시계를 구성하는 기작들에 대한 이들의 새로운 역할을 이해할 수 있을 것으로 사료된다.

생체시계의 궁극적인 이해를 위해서는 무엇보다도 각 단계별로 역할을 담당하리라 여겨지는 새로운 후보유전자들을 발굴하는 기반 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다. 일부 연구그룹이 유전체학 (Genomics), 생물정보학 (Bioinformatics) 등의 기술 분야를 활용하여 high-density oligonucleotide probe array (GeneChip)를 이용한 새로운 시계유전자들의 발굴을 보고하였다 (Storch et al., 2002; Rudic et al., 2005). 이들에 의하면, 세포내 전체유전자의 10% 정도가 약 24시간의 주기로 발현을 반복한다고 하며, 기존에 알려진 시계유전자

a. Major Urinary Protein 2 (MUP2)



b. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP)
(Lens Epithelial Protein)



c. Superoxide Dismutase (Cu-Zn)

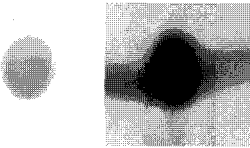
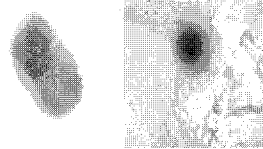


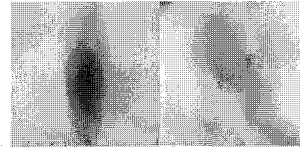
Fig. 7. Difference in the protein expression with genotypes in ZT2. (a) Major urinary protein 2 (MUP2), (b) Translationally controlled tumor protein (TCTP) (Lens epithelial protein), (c) Superoxide dismutase (Cu-Zn). WT at left, dKO at right.

들 뿐 아니라 전사인자, 세포주기, 세포증식 및 분화, 대사 작용, 스트레스 반응, 신호전달, 이온통로, 수용체, 면역기능 등 실로 광범위한 세포내 기능을 수행하는 다수의 유전자들을 포함하고 있다. 하지만 선행 연구의 문제점은, 이들 GeneChip 방법을 통해 동일한 실험동물과 배양 조건을 이용한 독립된 연구그룹간의 결과에서 상이한 후보유전자군이 보고되고 있다는 점이다. 이는 유전체 연구방법이 시료의 준비, 분석기법의 차이 등에 따라 매우 다른 결과가 도출될 수도 있음을 시사한다. 더구나, 이러한 실험에 흔히 대조군으로 사용하는 Clock 돌연변이 마우스는 시계리듬을 완전히 상실한 null mutant가 아니라 불완전한 리듬을 유지하는 deletion mutant이다 (King et al., 1997). 또한, 기능이 서로 상이한 각 조직별로 그 특수기능에 알맞게 관여하는 후보유전자군이 판이하게 다를 수도 있음에 유의하여 이들 후보유전자의 시계리듬 관여 정도를 다른 기능 조직들에도 적용하여 일반화시키는 오류를 범하지 말아야 할 것이다. 따라서 유전체 수준에서의 후보유전자 스크리닝은 궁극적으로 본 연구에서와 같이 실제 역할을 담당하는 단백질체의 수준에서 그 발현 및 변화 여부가 파악되고 재검증되어야 할 것이다. 실제로, 여러 시계유전자들은 전사 및 해독 작용을 통해 단백질로 합성된 후에도 인산화, 당화 등과 같은 posttranslational 변형, 특정 시간대별 세포내 존재 위치, 존재하는 양 및 결합상대자 등 여러 단계에서 다양한 수준의 조절을 받고 있음이 알려져

d. Unknown Protein



e. Unknown Protein



f. Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial, Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex 11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial hinge protein), Thioredoxin (ATL-derived factor [ADF])

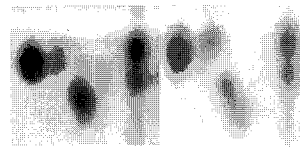


Fig. 8. Difference in the protein expression with genotypes in ZT14. (d) Unknown protein, (e) Unknown protein, (f) Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrial, Ubiquinol-Cytochrome C Reductase complex 11 kDa Protein, Mitochondrial (Mitochondrial hinge protein), Thioredoxin (ATL-derived factor [ADF]). WT at left, dKO at right.

고 있다 (Edery, 1999; Reppert and Weaver, 2001). 이러한 조절의 한 예로, 시계유전자의 전사인자인 CLOCK이 핵 속으로 주기적으로 운반되어 그 기능을 담당하는 과정에 그 결합상대자인 BMAL1의 역할이 필수적이며, 이들 단백질은 둘 다 또한 인산화과정을 거쳐 그 담당기능을 수행함이 보고된 바 있다 (Sehgal, 2004).

시계리듬은 뇌 중추 뿐 아니라 몸의 각 조직에서도 작동하고 있다. 후속 연구에서는, 본 연구에서 확인한 이들 유전자를 표준 분자생물학적 실험방법으로 클로닝하고, 포유류의 시계중추인 뇌의 시교차상행과, 근육 등의 말단 조직 내에서 이들 유전자나 그 산물인 단백질의 발현 및 변화 여부를 검증하여 이들이 포유류의 생체시계 작동과 각 조직 교류의 기능과 관련하여 어떠한 역할을 하는 지 살펴보고 있는 중이다. 연구의 성공적인 수행에 기초하여 장기적으로 시계리듬의 작동기작을 확인하여 각 단계별 맞춤 조절이 가능한 지 여부를 시험하고, 또한, 생체리듬의 조절에 관여하는 신기능 유전자발견을 토대로 한 신약이나 천연 화합물의 탐색을 통해 이의 실용화와 산업에의 활용 등 많은 파급효과를 기대한다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 과학기술부 지역대학우수과학자지원 사업의 연구비 지원 (R05-2004-000-10567-0)에 의해 수행되었으며, 연구에 도움을 준 조 준형, 김 동용에게 감사드립니다.

REFERENCES

- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 1997. 91: 1055-1064.
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. Differential functions of *mPer1*, *mPer2* and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 2001. 30: 525-536.
- Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured rat-1 fibroblasts. *Curr Biol*. 2000. 10: 1291-1294.
- Baran D, Paduraru I, Saramet A, Petrescu E, Haulica I. Influence of light-dark cycle alteration on free radical level in rat CNS. *Rom J Physiol*. 2000. 37: 23-38.
- Bommer UA, Thiele BJ. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol*. 2004. 36: 379-385.
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000. 103: 1009-1017.
- Chung S, Kim M, Choi W, Chung J, Lee K. Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer Lett*. 2000. 156: 185-190.
- Edey I. Role of posttranscriptional regulation in circadian clocks: lessons from *Drosophila*. *Chronobiol Intl*. 1999. 16: 377-414.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998. 280: 1564-1569.
- Hodoglugil U, Ongun O, Guney Z, Altan N, Zengil H. Temporal variation in hepatic superoxide dismutase activity in mice. *Chronobiol Intl*. 1995. 12: 152-155.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS. Positional cloning of the mouse circadian Clock gene. *Cell* 1997. 89: 641-653.
- Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1971. 68: 2112-2116.
- Nukaya M, Takahashi Y, Gonzalez FJ, Kamataki T. Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of GH receptor and Janus kinase 2 expression in mice. *FEBS Lett*. 2004. 558: 96-100.
- Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann Rev Physiol*. 2001. 63: 647-676.
- Rudic RD, McNamara P, Reilly D, Grosser T, Curtis A-M, Price TS, Panda S, Hogenesch JB, FitzGerald GA. Bioinformatic analysis of circadian gene oscillation in mouse aorta. *Circulation* 2005. 112: 2716-2724.
- Sanchez J, Chiappe D, Converset V, Hoogland C, Binz P, Paesano S, Appel RD, Wang S, Sennitt M, Nolan A, Cawthorne MA, Hochstrasser DF. The mouse SWISS-2DE PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity. *Proteomics* 2001. 1: 136-163.
- Sehgal A. Molecular biology of circadian rhythms. 2004. pp 3-16 and pp 93-140. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 2000. 288: 1013-1019.
- Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, Moriya T, Shibata S, Loros JL, Dunlap JC, Okamura H. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 1997. 91: 1043-1053.
- Storch KF, Lipan O, Laykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 2002. 417: 78-83.
- Valkova N, Yunis R, Mak SK, Kang K, Kultz D. *Nek8* mutation causes overexpression of galectin-1, sorcin, and vimentin and accumulation of the major urinary protein in renal cysts of *jck* mice. *Mol Cell Proteomics*. 2005. 4: 1009-1018.
- van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 1999. 398: 627-630.
- Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms* 1998. 13: 100-112.
- Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 1998. 20: 1103-1110.