

근육세포 내 Glucose 농도와 AICAR에 의한 단백질 합성 저해

박창석¹ · 김재환¹ · 오영균¹ · 김경훈¹ · 최창원² · 조은석¹ · 정용대¹ · 박성권^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²대구대학교

AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribose) Decreases Protein Synthesis in C2C12 Myotubes Cultured in High Glucose Media

Chang-Seok Park¹, Jae-Hwan Kim¹, Young-Kyoon Oh¹, Kyoung-Hoon Kim¹, Chang-Weon Choi², Eun-Seok Cho¹, Yong-Dae Jeong¹ and Sung-Kwon Park^{1*}

¹National Institute of Animal Science, R.D.A., Suwon 441-350, Korea,

²Department of Animal Resource, Daegu University, Kyongsan, Kyungbuk, 712-714, Korea

ABSTRACT

AMP-activated protein kinase (AMPK) maintains energy homeostasis in skeletal muscle. Nonetheless, its functional role on protein synthesis with different nutrient availability has not been elucidated. Therefore, the purpose of this study is to examine the effect of AMPK activity on protein content in C2C12 myotubes incubated with low (5 mM; LG) or high (25 mM; HG) glucose media. LG stimulated ($p < 0.05$) AMPK and acetyl CoA carboxylase (ACC) activity compare to those in HG group. Total protein content was higher in myotubes cultured with HG than in those cultured with LG and further increased by AICAR (5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide). Myotubes cultured with HG showed 7.5% lower UbFL (Ubiquitin Firefly Luciferase)-to-SV40 (Simian virus40) ratio compared to those in LG. Glucose level did not change the phosphorylation level of mammalian target of rapamycin (mTOR). Interestingly, administration of AICAR significantly increased phosphorylation level of mTOR in myotubes cultured with LG but not in those with HG. Overall, this data indicate that AMPK activity and protein turnover are finely regulated in response to different glucose concentration.

(Key words : AMPK, Glucose, mTOR, Protein synthesis)

서 론

AMPK는 세포 내에서 에너지 센서의 역할을 하고 그 활성화는 에너지 수준에 의해 조절된다. AMPK의 활성화는 제공되는 세포 내 ATP, ADP와 AMP의 수준에 관계없이 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribose (AICAR)에 의해서 촉진되어 질 수 있다(Merrill et al., 1997). AMPK는 낮은 ATP:AMP 비율, 즉 대사적 스트레스에 의해 활성화 되면, 에너지의 항상성 유지를 위해 에너지를 생산하는 신호를 활성화 시키고, 에너지가 소비되는 경로를 중단시킨다(Hardie, 2007). 단백질 turnover의 정도는 정해진 것이 아니라 단백질의 합성 및 분해비율에 따라 다양하게 나타난다(McKinnell and Rudnicki, 2004). Mammalian target of rapamycin (mTOR)은 에너지 수준과 성장 요소를 제어함으로써, 근육 성장을 조절하는 중요한 대사인자로 작용한다(Sarbassov et al., 2005 Wullschleger et al., 2006). 최근 흰쥐를 이용한 연구에서 AMPK는 mTOR의 상위조절 인자의 역할을 하

고 AICAR에 의한 AMPK의 활성화는 mTOR를 억제하여 단백질 합성을 저감시킨다고 알려졌다(Bolster et al., 2002 Williamson et al., 2006). 이러한 결과들은 AMPK와 mTOR는 서로 상호 작용한다는 것을 의미하고, AMPK가 대사적 스트레스 상태에서 어떻게 에너지 센서로서 항상성을 유지하는지를 보여주는 것이다. 한편 골격근 위축은 다양한 단백질 가수분해 경로에 관여하며, ATP 수준에 의해 영향을 받는 ubiquitin-proteasome 체계에 의해 조절된다(Glickman and Ciechanover, 2002). AMP의 역할을 하는 AICAR에 의해 활성화된 AMPK는 근육 세포 내 근육위축에 관련된 atrophy-related ubiquitin ligases의 발현 또한 증가시키는 것으로 나타났다(Nakashima. and Yakabe., 2007). 하지만, 영양적 수준 차이에 따른 AMPK의 활성화는 mTOR 신호전달을 통해서인지 ubiquitin-proteasome 체계인지 아직 구명되지 않고 있다. 이번 연구는 C2C12 myotubes 배양에서 다른 수준의 glucose 처리와 AICAR에 의한 AMPK의 활성화가 mTOR 인산화 및 단백질 합성에 미치는 영향을 구명하고자 수행되었다.

* Corresponding author : Sung-Kwon Park, National Institute of Animal Science, R.D.A, Suwon 441-350, Korea. Tel: 82-31-290-1657, E-mail: maiky@korea.kr

재료 및 방법

1. Cell culture

마우스 C2C12 근육세포를 각각 40,000 cell/22 mm well로 분주하고 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% FBS (fetal bovine serum)와 항생제 (1% antibiotic antimycotic solution [Sigma, St. Louis, MO, USA] and 0.1% getamycin [Gibco, Grand Island, NY, USA])를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. C2C12가 80% 자랐을 때 분화유도를 위해 2% horse serum과 항생제를 첨가한 DMEM으로 교체하였다 (differentiation media; DM). 분화유도 5일 후 (분화 완료시점) myotube에 낮은 수준 (5 mM; low glucose, LG)과 높은 수준 (25 mM; high glucose, HG)의 glucose를 처리하고, 2 mM AICAR를 처리하였다.

2. Protein assay

Glucose 처리 24시간 후 RIPA buffer (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, and phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2 [Sigma])를 이용하여 C2C12 myotube를 수집하고, 5초간 sonicate 처리한 후 4°C, 10,000 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 단백질의 농도는 BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 이용하여 측정하였다.

3. Proteasome activity measurement using luciferase reporter

C2C12 세포가 80% 정도 자랐을 때 26S firefly luciferase와 Renilla luciferase (pRL-SV40)를 포함한 proteasome activity reporter plasmid (UbFL-luc)를 Lipopectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 co-transfect 하였다. pRL-SV40는 transfection 효율측정을 위한 control로 이용하였다. 각 plasmid (1 ug)를 100 uL optiMEM에 섞고, Lipopectamine2000 4 uL를 100 uL optiMEM에 혼합한 후 상온에서 5분간 정치 하고, Plasmid와 Lipopectamine2000을 혼합하여 세포에 처리하였다. Transfection 24시간 후 DM 배양액을 이용하여 분화를 유도하였다. 근육세포의 분화가 이루어지면 AICAR와 glucose를 처리하고 세포 내 luciferase 활성을 luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

4. Western blotting

각각의 단백질 시료 30 ug으로 SDS-PAGE를 실시하여 단백질

을 분리하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 흡착하고 blocking하고, primary antibody (acetyl CoA-carboxylase; ACC, phospho-ACC, AMP-activated protein kinase; AMPK, phospho-AMPK, mammalian target of rapamycin; mTOR, phospho-mTOR, 및 α -tubulin)에 12시간 배양하였다. 이후 membrane은 PBS에 3번 씻어낸 후 horseradish peroxidase에 접목된 secondary antibody (1:1000)에 1시간 배양시키고 다시 PBS에 씻어냈다. 단백질 발현정도 확인을 위해 chemiluminescence (ECL; GE Healthcare Bioscience, Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 시각화 하였고, 밴드는 NIH의 Image J를 통해 비교하였다.

5. Statistical Analysis

데이터는 mean \pm S.E.으로 표시 되었고, SAS 프로그램 (Cary, NC, USA)의 analysis of variance (ANOVA)와 Tukey 다중비교를 이용하여 분석 하였다. P<0.05 일 때 유의적인 차이로 간주 하였다.

결과 및 고찰

이 실험에서 우리는 AMPK 활성을 위해 AMP analog인 AICAR를 이용하였고, 다른 glucose 농도 (high glucose; HG vs. low glucose; LG) 처리에서 AMPK가 mTOR 신호체계 및 ubiquitin-proteasome 활성화에 미치는 영향을 조사 하였다. AMPK의 인산화는 LG 함유 myotube 배양에서 유의적으로 높게 나타났다 (Fig. 1). 이 결과는 낮은 수준의 glucose에 의한 ATP 농도의

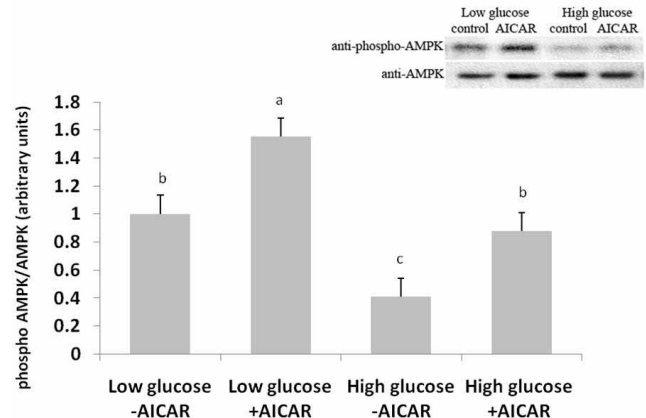


Fig. 1. Effect of 24 h incubation with AICAR (2 mM) on phosphorylation of AMPK in C2C12 myotubes incubated with low (5 mM) or high (25 mM) glucose media. Blots were first probed with antibodies specific for phospho-AMPK and then stripped and reprobbed with AMPK antibodies. Data are means \pm S.E. of 3 samples per group. Means with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

감소가 AMPK를 활성화 시킨다는 결과와 일치한다(Fulco et al., 2008). C2C12 myotubes에서 AICAR의 처리는 glucose 수준과 관계없이 AMPK 인산화를 증가 시켰다. 특히하게도, AICAR는 높은 수준의 glucose 처리구에서도 AMPK 인산화를 증가시켰다 (Fig. 1). AICAR는 세포 내 흡수되어 ZMP (AMP analog)로 대사가 되고, AMP, ADP 및 ATP 농도 변화가 없는 상태에서 AMPK의 활성을 증가 시킨다(Merrill et al., 1997). 이것은 ZMP가 AMPK γ subunit에서 시스타치오닌 베타 합성 도메인에 대해 ATP보다 더 높은 결합력을 가지고 있거나, 증가된 ZMP 농도가 AMPK의 상위 kinase들을 활성화시켜 AMPK의 인산화를 증가시키는 것을 의미한다(Hardie et al., 1998). 또는 ZMP에 의한 단백질 phosphatase 활성 저하로 AMPK의 활성에 의해 오래 유지될 가능성도 배제할 수 없다. 하지만, AICAR에 의한 특정 단백질 phosphatase의 활성 저하에 관한 정확한 기전 연구가 필요하다.

AMPK의 활성은 하위 신호인 ACC 인산화로 재확인 하였다 (Fig. 2). Low glucose에서 배양된 myotube는 HG 처리와 비교 하였을 때, 유의적으로 높은 수준의 ACC 인산화를 나타내었다. AICAR는 glucose 수준과 관계없이 ACC 인산화를 증가 시켰다 ($p < 0.05$; Fig. 2). 비록 이번 연구에서 지방산 산화율은 조사되지 않았지만, LG 처리로 인해 지방의 연소를 조절하는 인자인 ACC가 활성화되는 이러한 결과는 당 흡수의 증가가 지방의 연소를 저해한다는 'reverse Randle cycle'과 일치하는 것이다(Sidossis et al., 1996). 좀 더 정확한 결과 도출을 위해 실제 glucose와 지방산의 흡수 및 산화에 관한 보충 실험이 필요하다.

분화된 근육 세포의 총 단백질 농도는 HG 처리에 의해 유의적 ($p < 0.05$)으로 증가되었다(Fig. 3). 이 결과, glucose가 인슐린에 관계없이 근육 단백질 합성을 *in vivo*(Garlick et al., 1983)와 *in vitro*

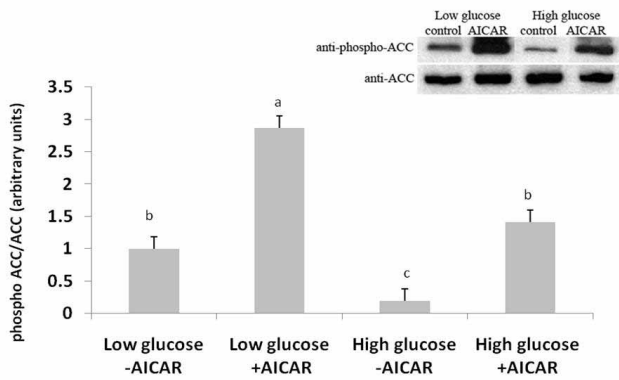


Fig. 2. Effect of 24 h incubation with AICAR (2 mM) on phosphorylation of ACC in C2C12 myotubes incubated with low (5 mM) or high (25 mM) glucose media. Blots were first probed with antibodies specific for phospho-ACC and then stripped and reprobred with ACC antibodies. Data are means \pm S.E. of 3 samples per group. Means with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

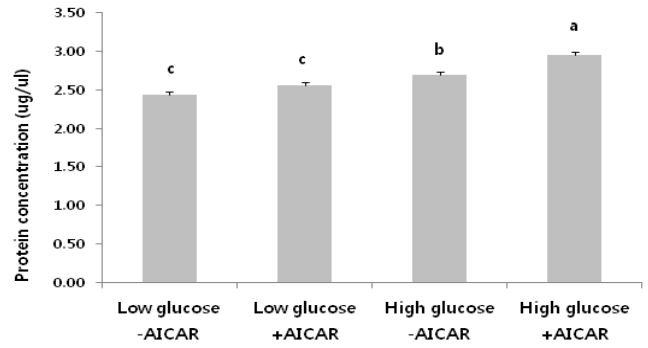


Fig. 3. Effect of 24 h AICAR treatment (2 mM) on total protein concentration from cell extracts of myotubes incubated with low (5 mM) or high glucose (25 mM) media. Data are means \pm S.E. of 3 samples per group. Means with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

에서 증가 시킨다는 이전의 연구와 일치하는 것이다. AICAR는 HG 처리구에서 총 단백질 수준을 더욱 증가시켰다 (Fig. 3; $p < 0.05$). 하지만 AICAR로 인한 단백질 농도의 증가는 앞서 언급한 AMPK를 통한 단백질 합성 억제기능과 상반되는 결과이다. 이것은 이전의 연구에서 AICAR에 의한 AMPK 활성은 C2C12 myotubes에서 근섬유세포 단백질 분해를 촉진하였다(Nakashima. and Yakabe., 2007). 이러한 AMPK의 단백질 분해 기능 확인을 위해, 우리는 firefly luciferase와 plasmid expressing Renilla luciferase (SV40)이 첨가된 reporter plasmid (UbFL)의 사용으로 세포 내 ubiquitin proteasome의 활성을 확인 하였다. UbFL-to-SV40 비율로 측정된 ubiquitin-proteasome 활성

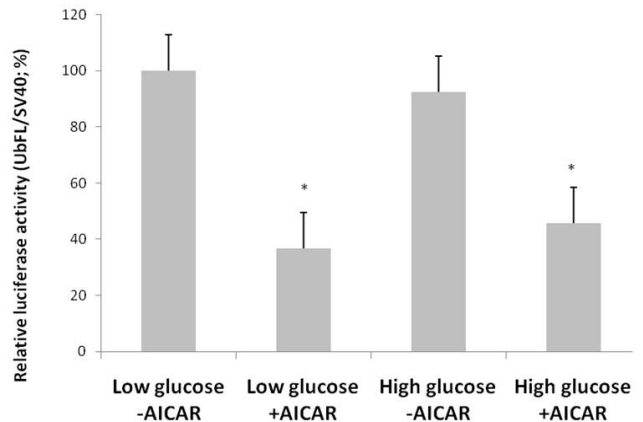


Fig. 4. C2C12 myotubes were co-transfected with 26S ubiquitin proteasome activity reporter plasmid (UbFL-luc) containing firefly luciferase and plasmid expressing Renilla luciferase (pRL-SV40) to assess transfection efficiency. A reduction in the UbFL-to-SV40 ratio represents an increase in proteasome activity. * < 0.05 vs. other groups ($n = 6$ per group).

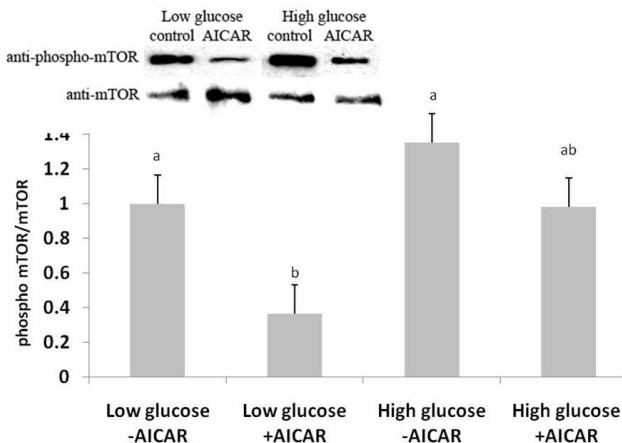


Fig. 5. Effect of 24 h incubation with AICAR (2 mM) on phosphorylation of mTOR in C2C12 myotubes incubated with low (5 mM) or high (25 mM) glucose media. Blots were first probed with antibodies specific for phospho-mTOR and then stripped and reprobred with mTOR antibodies. Data are means \pm S.E. of 6 samples per group. Means with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

은 HG 처리구에서 7.5% 감소하였다 (Fig. 4). AICAR는 HG와 LG 처리구에서 모두 ubiquitin-proteasome 활성을 50% 이상 감소시켰다 ($p < 0.05$). 이 결과는 HG 처리가 ubiquitin-proteasome 활성을 감소시킴으로써 단백질 분해를 저해하고 궁극적으로 단백질 수준을 높인다는 것을 의미한다.

AICAR는 LG 처리구에서 mTOR의 인산화를 유의적으로 감소시켰지만 ($p < 0.05$), HG 처리구에서 이러한 효과는 없었다 (Fig. 5). Glucose가 ATP : AMP 비율을 증가시켜 AMPK의 mTOR 활성을 낮추는 작용을 억제하여 Akt와 mTOR를 활성화시킨다는 기존 연구 결과와 일치하는 것이다 (Hahn-Windgassen et al., 2005). 따라서, glucose에 의한 단백질 합성의 증가는 glucose가 단백질 분해를 감소시키거나, glucose가 AMPK의 단백질 합성 저해 기능을 방해함으로써 일어나는 현상으로 사료 된다. 하지만 AICAR가 높은 수준의 glucose에서조차 AMPK 활성을 유도 한다는 결과는 여전히 설명되지 않는다. 결론적으로 이번 연구 결과는 단백질의 합성과 분해를 조절하는 AMPK와 mTOR의 활성이 에너지 수준에 따라 세밀하고 역동적으로 조절된다고 보여진다.

요 약

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 체내 에너지 수준을 감지하고 당과 지방의 대사를 조절하는 인자로 밝혀졌다. 이러한 에너지 센서로서 AMPK의 역할은 심혈관계 및 비만과 당뇨 등의 대사성 질환에 밀접한 관계가 있다.

영양적 관점에서 AMPK는 지방산의 합성 및 분해를 통해 간에서 지방대사 조절에 중요한 역할을 한다. 특히 근육의 경우 glucose 흡수를 관장하며, 근육세포 내 glucose의 유입을 증가시킨다. 하지만, AMPK의 활성이 대사기질의 흡수와 이용에 미치는 영향에 대한 정확한 기전은 아직까지 불분명하다. 또한 영양적 수준 차이에 따른 AMPK의 활성이 단백질 합성에 미치는 영향은 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구의 목적은 C2C12 myotube에서 AMPK 활성물로 알려진 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose (AICAR)가 glucose 농도차이에 따른 AMPK 활성과 단백질합량에 미치는 영향을 알아보기 위함이다.

배양된 C2C12 근육세포에서 AICAR는 glucose의 함량에 관계없이 AMPK를 활성화 시켰다. 단백질 농도는 낮은 수준 (LG)에 비해 높은 수준의 glucose (HG)가 처리된 myotube에서 증가되었고, AICAR에 의해 그 효과는 더욱 증대 되었다. C2C12 myotube에서 HG 처리는 AMPK와 acetyl CoA carboxylase (ACC)의 인산화에 영향을 주지 않았지만, LG의 처리로 인해 AMPK와 ACC의 인산화가 증가되었다 ($p < 0.05$). 또한, AICAR (2 mM)의 처리는 glucose의 수준과는 관계없이 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰다. 총 단백질 수준은 HG 처리에 의해 증가되었고, 이는 AICAR의 처리에 의해서 더 높게 증가되었다. Proteasome 활성은 HG 처리구에서 LG에 비해 7.5% 낮게 나타났고, AICAR 처리는 proteasome 활성을 LG와 HG 처리구에서 각각 63%와 54% 감소 시켰다. Glucose의 수준은 mTOR의 인산화 수준에 영향을 주지 않았다. 하지만, AICAR는 LG 처리구에서만 mTOR의 인산화 수준을 유의적으로 증가시켰고, HG 처리구에는 mTOR에 영향을 주지 않았다. 따라서, glucose 처리는 단백질을 proteasome으로부터 보호 하거나, glucose가 AMPK의 단백질 합성 저해 기능을 방해하여 세포내 단백질 합성을 증가 시키는 것으로 사료 된다. 결론적으로, 영양적 수준에 의해 AMPK 활성 및 단백질 합성과 분해가 조절된다는 것을 의미한다.

(주제어: AMPK, Glucose, mTOR, 단백질 합성)

인 용 문 헌

- Bolster, D. R., Crozier, S. J., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. 2002. AMP-activated Protein Kinase Suppresses Protein Synthesis in Rat Skeletal Muscle through Down-regulated Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling. pp. 23977-23980.
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E. P., McBurney, M. W., Sauve, A. A. and Sartorelli, V. 2008. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Namp1. *Dev. Cell* 14, 661-673.
- Garlick, P. J., Fern, M. and Preedy, V. R. 1983. The effect of insulin infusion and food intake on muscle protein synthesis in postabsorptive rats. *Biochem. J* 210, 669-676.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. 2002. The Ubiquitin-Proteasome

- Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. pp. 373-428.
- Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C. -C., Skeen, J. E., Sonenberg, N. and Hay, N. 2005. Akt activates mTOR by regulating cellular ATP and AMPK activity. p. M502876200.
- Hardie, D. G. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774-785.
- Hardie, D. G., Carling, D. and Carlson, M. 1998. THE AMP-ACTIVATED/SNF1 PROTEIN KINASE SUBFAMILY: Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67, 821-855.
- McKinnell, I. W. and Rudnicki, M. A. 2004. Molecular Mechanisms of Muscle Atrophy. *Cell* 119, 907-910.
- Merrill, G. F., Kurth, E. J., Hardie, D. G. and Winder, W. W. 1997. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273, E1107-1112.
- Nakashima, K. and Yakabe, Y. 2007. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1650-1656.
- Sarbasov, D. D., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 596-603.
- Sidossis, L. S., Stuart, C. A., Shulman, G. I., Lopaschuk, G. D. and Wolfe, R. R. 1996. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *The Journal of Clinical Investigation* 98, 2244-2250.
- Williamson, D. L., Bolster, D. R., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. 2006. Time course changes in signaling pathways and protein synthesis in C2C12 myotubes following AMPK activation by AICAR. pp. E80-89.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. 2006. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Yeshao, W., Gu, J., Peng, X., Naim, A. C. and Nadler, J. L. 2005. Elevated glucose activates protein synthesis in cultured cardiac myocytes. *Metabolism* 54, 1453-1460.

(Received Aug. 23, 2012; Revised Oct. 13, 2012; Accepted Oct. 18, 2012)