



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

갈색지방 특이적 CRT3 발현 조절을 통한 비만
저해 효과 연구

CRTC3 expression regulates obesity in Brown Adipose
Tissue

울산대학교 대학원

의과학과

김제성

갈색지방 특이적 CRT3 발현 조절을 통한 비만 저해 효과 연구

지도교수 송 영 섭

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2021년 6월

울산대학교 대학원

의 과학과

김 제 성

김제성의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원

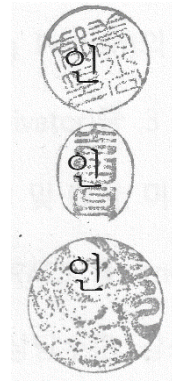
강 상 욱

심사위원

송 영 섭

심사위원

강 민 지



울 산 대 학 교 대 학 원

2021년 6월

국문요약

시대가 발달함에 따른 식생활양식의 풍족화 및 일일 섭취 권장량 이상의 과영양화는 전세계 인구의 1/3 이상을 비만인구로 만들어 놓았다. 비만은 그 자체로는 건강에 큰 악영향은 없지만, 그 상태가 지속됨에 따라서 당뇨병, 이상지질혈증, 뇌 심혈관 질환, 지방간 등의 여러 대사질환을 야기한다. 이런 비만을 해결하기 위해 체내에 축적되는 에너지를 줄이면서 에너지 소비를 늘리는 방향으로 연구들이 진행되어 왔고, 최근에는 체온조절 및 열 발생을 통해 에너지를 소모하는 기관인 갈색지방의 기능 향상 및 지질 대사 기전에 대한 연구에 관심이 집중되었다. 그 중 CREB (cAMP Response Element-Binding Protein)의 전사 활성 보조자로 알려져 있는 CRTC (CREB Relative Transcription Co-activator)중 3 번째 동형 단백질인 CRTC3 는 주로 지방조직에 많이 분포하며, 중성지질의 합성 및 대사, 미토콘드리아 단백질의 전사 조절 등의 역할을 가지고 있다. 이전 연구에서 *CRTC3* 를 Knock-out 한 마우스에서 주령과 식이요법에 따른 비만화가 대조군에 비하여 상당수준 감소하였으며, 인슐린 민감성 및 해당능의 증가와 에너지 대사량 증가 등을 통해 *CRTC3*의 억제제가 비만, 당뇨를 개선하는 효과가 있음을 밝혔다. 이에 따라 본 연구는 *CRTC3*의 조직 특이적인 역할과 그의 하위 기전에 대해 연구하기 위해 에너지 대사에서 주요한 기관으로 알려진 갈색지방에서 *CRTC3*의 발현양을 증가 혹은 감소시켰을 때 이전 연구에서 보인 *CRTC3*의 조절을 통해 비만을 조절할 수 있는가에 대한 가설을 검증하기 위해 연구를 진행하였다. 갈색지방 특이적 *CRTC3* 발현 억제 모델에서는 대조군과 실험군 간의 표현형의 차이를 보이지 않았지만, *CRTC3* 과발현 마우스는 식이요법에 관계없이 공통적으로 대조군에 비하여 체중 감소, 인슐린 민감성, 해당능의 증가, 에너지 소모량 증가, 추위에 대한 저항성 등의 효과를 보였고, *CRTC3*의 발현이 증가함에 따라 CREB의 타겟으로 알려진 PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha)가 증가하였다. 추가적으로 *CRTC3* 과발현 마우스에서 미토콘드리아 관련 단백질인 UCP1, SDHA, PDHA1,

mtFAM 등이 증가함을 확인하였다. 이 연구에서는 CRTC3 를 전신에서 Knock-out 했을때와는 달리 갈색지방에서 CRTC3 를 과발현 했을 때 미토콘드리아의 수를 증가시킴을 통해 에너지 소모가 증가해 비만에 저항하는 현상을 보임을 통해 CRTC3 에 의한 효과는 단일 기관이 아닌 여러 기관에 의한 효과임을 보였고, 후속연구에서는 간, 근육과 같은 다른 대사기관에서의 CRTC3 의 역할 또한 파악하는 것이 중요하다고 생각된다.

키워드: 비만, 갈색지방, 에너지 대사, *CRTC3*, *PGC1 α* , 인슐린 저항성, 미토콘드리아, 추위 저항성

차례

국문 요약.....	i
차례.....	iii
그림 목차.....	v
서론.....	1
재료 및 연구방법.....	7
1. 실험동물.....	7
2. 당부하 시험, 인슐린 저항성 시험.....	8
3. 대사불릭 케이지.....	8
4. 추위 저항성 시험.....	8
5. 조직 표본 제작.....	9
6. 조직 H&E 염색.....	10
7. 웨스턴 블롯.....	10
8. mRNA 측정.....	12
9. 세포 배양.....	13
10. 지방 일차세포 분리.....	14
11. 지방 분화.....	15
12. 통계 분석.....	15
결과.....	16
1. 갈색지방 특이적 CRTC3 과발현 확인.....	16
2. CRTC3 과발현 마우스에서 체중 감소 효과.....	16

3. 인슐린 저항성 및 당 부하도	17
4. 에너지 소모 증가 효과	18
5. 추위 저항성 증가	19
6. 갈색지방의 세포 용적 감소	20
7. 미토콘드리아 단백질 및 mRNA 발현 증가	21
고찰	23
참고문헌	49
Abstract	55

그림 목차

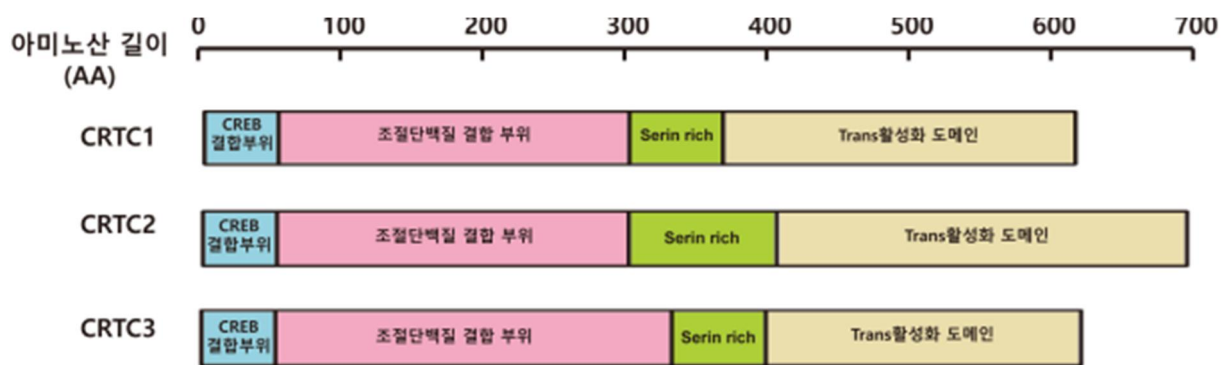
표1. CRTC 동형 단백질의 종류와 분포	2
표2. 지방조직의 형태 및 기능에 따른 분류	3
표3. 지노타이핑 프라이머 시퀀스	7
표4. qPCR 프라이머 시퀀스	12
그림1. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 scheme	26
그림2. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 지노타이핑	27
그림3. 갈색지방 특이적 <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 <i>CRTC3</i> 확인	28
그림4. <i>CRTC3</i> 과발현 일반사료 섭식 마우스 무게 추이	29
그림5. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 조직 무게 비교	30
그림6. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 갈색지방 차이 비교	31
그림7. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 갈색지방 조직 H&E	32
그림8. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 당부하, 인슐린 저항성 시험	33
그림9. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 메타볼릭 케이지 실험	34
그림10. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 무게에 따른 에너지 소비량 분석	35
그림11. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 추위 저항성 시험	36
그림12. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 웨스턴 블롯	37
그림13. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 mRNA 발현량 비교	38

그림14. <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 고지방 섭취 마우스 무게 추이	39
그림15. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 조직 무게 비교	40
그림16. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 갈색지방 차이 비교	41
그림17. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 갈색 지방 조직 H&E	42
그림18. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 당 부하, 인슐린 저항성 시험	43
그림19. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 대사불리 케이지 실험.....	44
그림20. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 에너지 소비량 차이 분석	45
그림21. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 추위 저항성 시험.....	46
그림22. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 웨스턴 블롯.....	47
그림23. 고지방 식이) <i>CRTC3</i> 과발현 마우스 mRNA 발현량 비교.....	48

서론

비만은 많은 유전적, 환경적인 요인으로 발생하는 질환으로 주요 원인으로는 영양섭취과다로 인한 에너지 소비와 저장의 불균형이며, 그로 인해 생긴 만성적 과잉영양이 지방의 형태로 체내에 축적되어 생긴다. 비만은 제2형 당뇨, 심혈관질환, 이상지질혈증, 신장질환 등과 같은 많은 대사질환 및 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있으며 [1-3], 통계에 따르면 세계 전체 인구의 30% 이상이 비만과 그에 의한 합병증으로 고통받고 있다. 비만의 근본적인 해결을 위하여 과거의 연구들은 지방조직의 생성 억제를 주로 연구해왔다. 과거 연구에서는 지방은 단순 비만의 척도 정도로만 강조되었지만, 지방이라는 기관이 연구가 진행됨에 따라 지방의 기능에 따라 여러 종류의 지방으로 분류되며 지방의 기능연구를 통해 비만을 억제할 수 있다는 사실을 또한 발견하게 되었다. 그리하여 최근에는 지방조직에서 여러 당 및 지질의 대사 유전자, 에너지 소모에 관련된 유전자를 조절함을 통해 비만을 억제시키는 연구가 많이 진행되었는데, 그 중 CREB (cAMP Responsive Element Binding protein)은 전사조절자의 일종이며, DNA상의 cAMP Response Element에 결합하여 하위의 유전자의 전사를 조절하는 역할을 가지고 있다. CREB은 인간을 포함한 포유류 등에서 발견되며, 체내 곳곳에 고루 분포되어있으며, 수많은 단백질들의 발현을 조절하는데 특히 당, 지질 합성 및 분해 등과 같은 에너지 대사에 중요한 단백질들 (SREBP1c (Sterol regulatory element-binding transcription factor 1c), FAS (Fatty acid synthase), G6PC (glucose 6-phosphatase alpha), PPAR family 등등)의 발현 또한 조절하는 것으로 알려져 있다 [18-19, 21]. CREB과 비만과의 상관관계에 대한 연구가 계속 진행되어 갈 무렵 CREB의 전사 활성보조자인 CRTC (CREB Relative Transcription Co-activator)의 발견과 핵 내에서 CREB을 포함한 여러 전사인자와 함께 지방 및 당의 대사, 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성, 세포주기, 세포 일주기 시계와 같은 많은 기능을 담당한다는 것이 알려지게 되었다 [18]. 그 중에서도 CRTC3는 3가지 CRTC 동형 단백질들 중에서도 지방 조직에 많이 분포하는 단백질로, 이전 체내에서 CRTC3 억제 연구에서 전 주령에서 체중의

감소, 에너지 소모 증가, 인슐린 저항성 감소 등의 효과가 관측되었다. 이러한 CRTC3 감소에 의한 효과가 이후 비만 및 당뇨와 같은 대사질환의 치료연구에서 치료제로써 사용할 가능성을 확인 하기위해 에너지의 소모와 밀접하게 관계 되어있는 갈색 지방조직에서의 CRTC3 발현에 따른 그의 효과를 관찰하고자 하였고, 이 연구를 말미암아 CRTC3의 효과가 국소적인 효과인지 아니면 다른 여러 장기에서 보이는 시너지 효과인지 확인하고자 실험을 진행하였다. 또한, 이전 연구에서 확인하지 못했던 갈색지방에서 CRTC3에 의해 조절되는 타겟 유전자 등을 밝혀 내는 것이 목표이다. 각 실험 마우스는 갈색 지방에 특이적으로 CRTC3의 발현을 억제 혹은 과발현 시키는 마우스 모델이다.






CRTC	번역 후 변형	위치	활성도	분포
CRTC1 (634AA)	탈 아세틸화	K13, K20, K33, K178	활성화	뇌, 신장, 갑상선
	아세틸화	K13, K20, K33, K178	불활성화	
	인산화	s64, s113, s149, s151	불활성화	
CRTC2 (693AA)	메틸화	R51, R99, R120, R123, R161, R168	활성화	전 조직 고루 분포 (간, 췌장, 골수 등에서 특히 분포)
	탈 아세틸화	K629	불활성화	
	아세틸화	K629	활성화	
	인산화	S70, S169, S171, S192, S306, S368	불활성화	
	유비키틴화	K629	분해	
CRTC3 (619AA)	인산화	S62, S162, S273, S329, S370	불활성화	지방, 피부, 생식소
	유비키틴화	P444	분해	

<표 1> CRTC 동형 단백질의 종류와 분포 [32, 39, 40].

지방조직

지방조직은 크게 백색지방과 갈색지방으로 분류되며 [4,9], 두 지방조직은 에너지의 저장과 소비에 따른 차이와 각각의 지방세포의 크기, 분비하는 아디포카인의 종류가 다르다. 백색

	백색 지방	베이지 지방	갈색 지방
형태			
분포	피하 내복부 장기 주변부 생식선 근처부위	백색지방 조직 내부에서 주위 혹은 다른 분화 자극에 의해 분화	견갑골 사이 공간 경추 및 척추 주변부 송골능 신장 주변부 쇄골 상부
역할	과잉섭취된 영양분을 중성지질로 저장 영양 결핍시 저장된 중성지질을 다른 장기로 제공 내분비 기관으로써 아디포카인 및 사이토카인 분비 신생 지질합성, 당 항상성 유지, 지질분해 등 체내 에너지 대사		주위에 저장하기 위한 열 발생 당 항상성 유지, 지질 분해 등 에너지 대사 활발
특징	하나의 커다란 지질방울을 가지고 있음 (세포 용적의 90%까지 차지) UCP1 발현량이 매우 적거나 없음	백색지방조직에서 주위에 의한 자극으로 갈색지방과 비슷하게 분화 함으로써 갈색지방의 특징을 가짐(미토콘드리아 수 증가, 작은 여러개의 지질방울 등) UCP1 발현량이 증가 베이지 지방 특이적인 전사조절인자 발현	미토콘드리아 수가 많음 (산소소비량이 높음) 작은 여러개의 지질방울 함유 UCP1 발현량 많음 백색지방과 달리 주변에 혈관이 많이 분포 태아에서는 많이 분포하지만 나이 들어감에 따라 전체적인 갈색지방세포 감소
대표적 표지자	ASC-1 HOXC8 HOXC9 Leptin Adiponectin	CD40 CD137 UCP1 Zic1 TBX family PAT2	UCP1 CIDEA Eva1 PRDM16 P2RX5 Ebf3

<표 2> 지방조직의 형태 및 기능의 분류 [4, 9, 31].

지방조직은 체내에 가장 많이 분포하고 있는 지방조직으로, 주로 피하, 복부, 내장, 생식기 주변부에 많이 위치 하고 있으며, 섭취된 잉여 에너지를 중성지질의 형태로 바꾸어 저장하는 역할을 수행한다. 이렇게 저장된 형태의 중성지방은 영양결핍상황에서 간, 심장, 근육 등과 같은 조직에 에너지를 공급하는 형태를 가진다.

백색지방세포의 형태학적 특징으로는 Lipid droplet(지질 방울)을 커다란 하나의 방울로 가지고 있는 것이 특징이며, 백색지방의 주요 표지자로는 ASC-1 (Asc-type amino acid transporter 1), HOXC8 (Homeobox protein Hox-C8), HOXC9 (Homeobox protein Hox-C9), adiponectin 등으로 지방 전분화 세포에서 분화자극시 PPAR γ (Peroxisome Proliferation-Activated Receptor Gamma)에 의해 발현되어 백색지방에 분화에 필요한 단백질들의 발현을 조절한다고 알려져 있다 [4, 31, 39, 40]. 백색지방은 다른 지방과는 달리 지방의 저장과 호르몬 및 분비물질(아디포카인)의 분비에 특화되어 있다. 많이 알려진 아디포카인으로는 시상하부, 췌장, 심장에 주로 작용하여 식욕이나, 에너지 대사 당 항상성을 유지하도록 하는 Leptin과 각 기관에 지방을 전달해 주는 FABP4 (Fatty acid binding protein 4) 그리고 심장, 근육, 간, 췌장 등에 작용하여 지방의 분해나 당의 분해 등 이화작용에 활성화를 시키는 adiponectin 등이 잘 알려져 있다. 이러한 아디포카인들 중 leptin은 비만에 의해 지방 과다증식 될 경우 혈중

에 과다하게 존재하게 되고 그 결과 leptin 자체의 기능이상이나 각 기관의 탈 감작으로 인해 식욕저하 및 지질 대사관련 조절체들의 기능 향상 효과가 저해가 나타난다는 연구 결과도 있다 [4, 9]. 갈색지방은 인간과 포유동물에서 발견되는 갈색을 띠는 지방으로 갈색을 띠는 까닭은 미토콘드리아의 수가 많기 때문이다 [6]. 다른 기관 및 백색지방과는 달리 미토콘드리아 내막에 UCP-1 (uncoupling Protein 1)을 유일하게 발현하며, 당과 지질을 에너지 원으로써 사용해 ATP 합성없이 즉각적인 체온조절 및 신체 내 에너지 소모를 한다 [10-11, 14]. 이러한 일련의 연구에서는 갈색지방의 기능 향상이 비만이나 기타 대사질환의 개선에서 갈색지방의 에너지 소모 조절이 핵심요소로서 작용할 것이라 보고 있다. 갈색지방세포의 형태학적 특징으로는 지질 방울을 여러 개의 작은 방울 형태로 보관하고 있으며 주위의 많은 미토콘드리아가 지질방울을 감싸는 형태이고, 주요 표지자로는 UCP1, 세포막에 위치 한 TMEM26 (Transmembrane protein), PRDM16 (PR domain containing 16), 지질 대사를 조절하는 CIDEA (Cell death activator CIDE-A), 갈색지방으로의 분화에 필요한 Ebf3 (Early B-Cell Factor3), EVA1A (Eva-1 homolog A) [39-41] 등이 있다. 갈색지방 그리고 베이지색 지방은 백색 지방과는 달리 많은 종류의 아디포카인을 분비하지 않지만 운동 및 추위 노출과 같은 에너지를 사용할 때 에너지대사 활성을 증가시켜주는 물질들을 분비한다. 그 중 잘 알려진 물질은 12,13-DiHOME (12,13-Dihydroxy-(9Z)-octadecenoic acid) 와 follistatin이다 [4, 6, 7, 9, 12-13]. 12,13-DiHOME는 근육, 간에 작용하여 지질의 흡수와 분해를 활성화시켜 체내 에너지를 발생하게 하며, 최근의 연구에서는 12,13-DiHOME를 주사하였을 시 추위 노출시 더 높은 열발생을 보였으며, 갈색 지방내로 지질 흡수와 분해가 모두 증가함을 관측하였다 [9]. Follistatin의 경우에는 TGF β , GDF8 등의 신호를 저해하여 세포주기에서 세포 분열신호를 멈추고 myf5+인 세포의 분화를 촉진하는 효과가 있으며 골격근과 갈색지방 등이 이에 포함되는데 이를 통해 갈색지방의 용적을 늘려 비만을 억제하는 효과를 본 연구 또한 있었다 [7, 12-13]. 이러한 이유로 갈색지방의 활성화가 갈색지방 자체적인 에너지 소모와 더불어 분비 물질들에 의한 영향으로 간, 근육 이화작용이 활발한 장기 등에서의 지질의 분해와 배출, 그리고 에너

지 소모를 증가시켜 비만을 포함한 다른 대사 질환과 합병증 등을 예방할 수 있음을 보였다 [4, 16].

지방조직은 색에 따라 백색지방과 갈색지방으로 나뉘어지지만, 추위와 같은 자극이나 백색지방이 특이적인 전사조절인자의 발현에 의해 종종 갈색화 반응이 일어나게 된다. 이러한 갈색화 반응이 일어난 백색지방의 경우 베이지색 지방이라 불리는데, 백색지방 전구세포에서 분화하였지만 지방의 형태나 단백질의 발현양상 및 기능이 백색지방이 아닌 갈색지방과 유사해지며 미토콘드리아 수의 증가와 UCP1 단백질의 발현에도 변화를 보인다. 이러한 백색지방의 갈색화 또한 갈색지방의 기능 향상과 마찬가지로 항 비만연구에서 중요한 현상으로 사료되지만 아직 현재의 연구단계에서는 많이 밝혀지지 않았다. 베이지색 지방은 백색지방 조직 내부에 분포하고, 갈색화 자극의 여하에 따라 세포의 수가 증가 혹은 감소하는데, 갈색지방 내에서 분비하는 Follistatin등이 백색지방에 갈색화에 영향을 준다는 연구 또한 있었다. 이런 베이지색 지방세포의 주요 표지자로는 백색지방의 갈색화를 진행시킨다고 알려진 TBX1 (T-box transcription factor1), TBX15 (T-box transcription factor15), 세포막 단백질인 TMEM26 (Transmembrane protein 26), PAT2 (Proton-coupled amino acid transporter2), CD40, CD137등이 있다 [9, 12-13, 39, 41].

지질의 생합성과 분해

지방세포에서 지질을 합성하는 경로는 크게 두가지로 나뉘어지는데, 첫 번째는 음식섭취와 소화로 인해 흡수된 자유지방산을 합성하는 방법과, 두번째 체내에 포화된 단당류를 지질로 바꾸는 방법으로 나뉜다 [4]. 음식으로 섭취된 지질은 소화기에서 소화를 거쳐 간을 통해 저밀도 지질단백질 (LDL)의 형태로 말단부위로 이동한다. 이때 이동되는 저밀도 지질 단백질을 지방세포에서 분비한 지질단백질 분해 효소가 분해하여 자유지방산 형태로 지방세포로 유입되게 되고 유입된 자유지방산은 DGAT (diacylglycerol acyltransferase)가 triacyl glyceride (TAG)로 합성해 저장한다. 두번째 생합성 과정은 신생 지질 생합성이라고도 불리는데,

GLUT4에 의해 흡수된 포도당을 acetyl-CoA, malonyl-CoA와 같은 조효소를 통해서 자유지방산으로 변환시킨 뒤 변환된 자유지방산을 통해 TAG로 합성해 저장한다 [4, 21]. 지질의 분해는 운동, 추위에 의한 체온조절, 교감신경 활성화, 부신피질 호르몬, 음식 등 여러 자극에 의해서 cAMP 신호가 활성화된다. cAMP 신호는 PKA (protein kinase A)를 걸쳐 ATGL (Adipose triglyceride lipase), HSL (Hormone-sensitive lipase), LPL (Lipoprotein lipase)등 지질분해 효소를 활성화시켜 TAG를 diacyl glyceride, monoacyl glyceride 등으로 단계적으로 분해하여 최종적으로 1 분자의 글리세롤과 3 분자의 자유지방산 형태로 분해시켜 ATP 합성 과정을 통해 필요한 에너지로 사용한다 [14-16].

UCP1 (uncoupling Protein 1)

UCP1은 미토콘드리아 내막에 존재하는 단백질로써 유일하게 갈색지방에서 관측되지만 때때로 추위에 의해 갈색화 된 베이지 지방에서 종종 관측된다 [14, 40]. UCP1에 의한 열 발생 경로는 일반적인 ATP합성과 유사하지만 다른 양상을 보이는데, 미토콘드리아 내막에서 전자 전달계를 통해 생성된 막 사이 공간의 수소 이온 농도고배가 ATP 합성 채널을 통하지 않고 UCP1 채널을 통함으로써 수소 이온의 위치 에너지를 열 에너지로 치환하는 방식으로 열을 생산하고 이렇게 만들어진 열 에너지는 체온을 조절하는데 주로 사용된다. 이러한 UCP1에 의한 에너지 발생은 갈색 지방에서 에너지 소모에서 가장 많은 부분을 담당하고 있다. 최근 연구에서 UCP1의 발현을 억제할 경우 미토콘드리아에 기능이상과 함께 체중 증가, 추위 저항성 약화와 같은 표현형을 보이고, 놀에피네프린과 같은 아드레날 수용체 활성화제 처리시 그 활성도가 감소함을 확인하였다 [46].

연구방법

실험동물

실험에 사용된 모든 동물은 성숙된 갈색지방 특이적인 형질을 관찰을 위해 6주령 마우스에 Tamoxifen (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI USA; #13258)을 옥수수 기름 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA; C8267-500 ml)에 20 mg/ml로 녹여 200 μ l씩 주3일 간격으로 4주마다 경구 투여를 통해 conditional K.O 시키는 방법으로 만들어졌으며 [42], 사용한 마우스는 *CRTC3^{fl/fl}*와 *UCP-1 CRE^{ERT2}* 유전자 변형 마우스와 교배한 마우스, *Rosa CRTC3^{fl/fl}*와 *UCP-1 CRE^{ERT2}* 마우스를 교배한 마우스를 사용하였다. 각각의 유전자형의 확인은 지노타이핑 (표 2)과 qRT-PCR (표 3)을 통해 확인하였다. 연구에 사용된 마우스는 멸균된 물과 함께 자율 섭식 환경에서 12시간 밝은 환경, 12시간 어두운 환경 (오전 8시 점등, 오후 8시 소등)에서 사육됐으며, 일반 사료는 (Normal chow (Purina Rodent Chow, 38057)), 특수 고지방 사료는 (60% High Fat Research Diets, D12492)를 사용했다. 사료 교체 시기는 고지방사료 섭식 모델의 경우에만 생후 8주령에 사료 교체해 주었다.

Rosa-Left-F	5' GCA CTT GCT CTC CCA AAG TC 3'
Rosa-Right-R	5' GGC GGA TCA CAA GCA ATA AT 3'
Rosa <i>CRTC3</i> -F	5' AAG AAG AGC TGC AGA TCG AA 3'
CSD- <i>CRTC3</i> -F	5' AAA CTA ACT GGG CCT GAG TCC ATC C 3'
CSD- <i>CRTC3</i> -R	5' CTT CTG AAG TGT TGG GAT TGC AGG C 3'
CSD- <i>CRTC3</i> -ttR	5' TTC ATG GAT GCC ACT CTC AGA AGC C 3'
UCP1 CRE ER -F	5' CAT TTG GGC CAG CTA AAC AT 3'
UCP1 CRE ER -R	5' CCC GGC AAA ACA GGT AGT TA 3'

표2. 지노타이핑 프라이머 시퀀스.

당부하 시험, 인슐린저항성 시험

당부하 시험 (Glucose Tolerance Test)은 실험 15시간 이전에 사료 제거 및 케이지를 교체, 금식 후 D-(+)-Glucose (Sigma Aldrich, St. Louis, USA; G8270)을 생리식염수 (0.9% NaCl 수용액)에 희석하여 10% 글루코오스 (생리식염수 1 ml당 글루코오스 0.1 g w/w)로 만들어 1.5 mg/g (일반사료 섭취군) 혹은 1.0 mg/g (고지방사료 섭취군)의 농도로 복강투여를 통해 주사하였으며, 주사 전, 주사 후 30, 60, 90, 120분 총5회 Accu-Check 혈당측정기 (Sanmina corporation, San Jose, USA)를 이용 마우스 혈당변화 정도를 측정하였다 [19, 20, 28].

인슐린 저항성 시험 (Insulin Tolerance Test)은 실험 5시간 이전에 사료 제거 및 케이지를 교체하여 금식 시켰으며, 5시간의 금식 후 0.9% 생리식염수에 Humulin R (Lilly HI-210, Eli Lilly and company, Indianapolis, USA)을 1 unit/kg로 희석한 주사액을 마우스의 복강에 투여 후 주사 전, 주사 후 30, 60, 90, 120분 총 5회의 혈당을 측정하였다 [19, 20, 28].

메타볼릭 케이지

생체의 대사작용의 지표인 산소 소비량 (vO_2 , ml/kg/hr), 이산화탄소 배출량 (vCO_2 ml/kg/hr), 호흡률 (Respiratory Exchange Ratio), 열 발생량 (에너지 소비량, Kcal/hr/kg)을 측정하기 위해 OXYMAX CLAMS (Columbus instrument, Columbus, USA)를 이용 측정하였다. 마우스 1 마리 당 1케이지를 사용하였으며, 측정 오류를 줄이고자 초기 적응단계에서 측정값 (Day-1)을 제외하였으며 안정화 후 3일간 측정해 주었다 [19, 43].

실험군과 대조군의 β -아드레날린 수용체의 활성도를 알아보기 위하여 해당 실험 2일차에 소등이 되기 바로 전 시간대에 β_3 -아드레날린 수용체 활성제인 CL-316,243 (0.1 mg/kg)을 복강투여를 통해 주사했으며, 야간기간 동안의 대사 활성도를 추가로 측정해 주었다.

추위 저항성 시험

마우스를 4°C로 맞춰진 냉장실에 넣어 한 마리 씩 케이지에 넣어두고 30 분마다 직장 체온계를 이용해 체온을 측정하였다. 여러 마리를 한 케이지에 두면 마우스 간의 밀착에 의해 서로의 체온을 통한 체온 증가가 있을 수 있기에 한 마리 씩 따로 케이지에 넣어 진행하였고 식수를 제공하였을 때 차가운 공기에 의하여 식수가 차가워진 상태에서의 음수를 통한 체온 저하나 몸에 묻은 식수에 의한 직접적인 체온 저하를 막기 위하여 물은 제공하지 않았으며 추운 환경에서의 땀 배출 대신 배출하는 소변에 의해 몸이 젖어 체온이 떨어지는 것을 막기 위해 최소한의 깔짚을 깔아 주었다. 또한 직접적인 차가운 바람을 맞으면 마우스의 온도가 냉장실의 온도보다 바람의 영향을 더 받을 수 있으므로 모든 면이 막혀진 케이지를 사용하였다. 마우스의 체온이 30°C 이하로 떨어지면 저체온증에 의한 마우스의 죽음이 발생할 수 있으므로 체온 측정 시 30°C 이하로 떨어지게 되면 실험을 끝마쳤고 실험을 끝마친 뒤에는 상온에서 데워져 있는 케이지로 여러 마리를 함께 넣어주어 저체온증으로 인한 사망을 막아주었다 [16, 19].

조직 표본 제작

각 군의 조직학적 차이점을 확인하기 위하여, 마우스를 부검 후 4% 파라 포름알데히드 (4% PFA)에 일정한 크기로 자른 조직을 담가 4°C에 보관 후, 고루 침투시키기 위하여 하루에서 이틀간 고정시켜준 뒤 고정액을 씻어내기 위해 1X PBS에 10분간 3번 수세 한 뒤 소수성인 파라핀 블록에 조직을 embedding 하기 위해 조직에 남아있는 수분을 탈수한다. 50% 에탄올, 70% 에탄올, 80% 에탄올, 90% 에탄올, 95% 에탄올에서 1시간씩 상온에서 교반 하여 조직을 골고루 탈수시켜 준 뒤 100% 에탄올에서 밤새 동안 4°C 냉장실에서 조직을 교반 하였다. 그 다음으로 자일렌을 사용하여 조직에 침투시켜 파라핀이 조직에 잘 침투할 수 있는 상태로 만들어 주기 위하여 50% 자일렌 (자일렌 + 에탄올)에 1시간, 100% 자일렌에 1시간 동안 상온에서 교반하고, 파라핀 용액에 1시간 동안 담가 조직에 파라핀을 침투시켜준다. 그렇게 조직 사이사이에 파라핀을 침투시켜준 뒤 파라핀 블록 제작을 위해 embedding center를 이용하

여 조직 크기에 맞는 틀을 사용하여 파라핀 블록을 제작하여 준다.

조직 H&E염색

용이한 관찰하기 위하여 조직 파라핀 표본을 5 μm 의 두께로 절편 후 얻어낸 절편을 슬라이드에 붙여준다. 붙인 조직 절편 슬라이드를 하루동안 말려준 뒤 말린 슬라이드의 조직 절편을 수용성인 염료인 헤마톡실린과 에오신으로 염색하기 위하여 세포에 수분을 넣어주는 함수 과정을 진행한다. 조직 슬라이드를 60°C 오븐에 30분~1시간 동안 두어 조직 절편 단면의 파라핀을 녹여 준 뒤 100% 자일렌에서 5분간 3번씩 조직 슬라이드를 담가 남은 파라핀을 완벽히 제거, 수화 시키기 위해 탈수화 반응의 역순으로 100% 에탄올부터 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올로 차례대로 3분간 2회에 걸쳐 조직을 함수 시킨다. 그 뒤 1차 증류수에서 수세해 에탄올을 전부 제거하여 준 뒤 헤마톡실린 용액에 30초간 담가 준 뒤 수세하여 염료를 씻어내 준 후 에오신에 30초간 담가준 후 수세를 반복해준다. 이렇게 염색한 조직은 보관을 위해 함수 과정의 반대로 탈수를 70% 에탄올부터 차례대로 80%, 90%, 95%, 100% 에탄올 순서로 3분간 1회 처리하고 마지막으로 자일렌에서 3분간 1회 처리하여 준 뒤 슬라이드에 paramount (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA, Fisher chemical Permount mounting medium, SP15-500) 1-2방울을 떨어트려 주고 커버 슬라이드로 기포가 생기지 않도록 잘 덮어준다. 이후 광학현미경을 통해 조직표본을 관찰하였다 (x40, x100, x200, x400)

웨스턴 블롯

대조군과 실험군의 단백질 발현의 변화를 관찰하기 위해, 각각의 조직을 실험 동물에게서 채취하여 액체질소에 급속 냉동하여 보관 후 필요한 조직을 녹지 않도록 액체질소를 부어 주며 막자 사발로 잘게 갈고, 갈린 조직에 100X Protease inhibitor (프로테아제 저해제, Tech&innovation, Bio Prince, Chuncheon, Korea, BPI-9000-1 ml)와 PMSF (Tech&innovation, Bio Prince, Chuncheon, Korea, BPI-9000-1 ml)가 1:1:100 비율로 첨가된 Protein lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM

Na-pyrophosphate, 20 mM β -glycerophosphate, 50 mM NaF)를 일정량 넣어 준 후 균질기를 이용 균질화 시켰다. 균질화 된 조직 검체를 얼음에서 1시간의 반응 시간을 가진 뒤 13,000 RPM, 4°C, 15분간 원심 분리해준 뒤 상층액을 새로운 에펜도르프 튜브에 옮겨 주었다. 이 과정을 2회 추가 반복하여 불순물을 제거하였고, 정제된 검체는 BSA PROTEIN ASSAY KIT (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA, No.23227)를 이용하여 정량 후 동일 농도가 되도록 희석해 준 뒤 5X 샘플 버퍼 (60 mM Tris-HCL pH 6.8, 25% Glycerol, 4% SDS, 5% β -mercapto ethanol, 0.05% Bromophenol blue, DW)를 검체 양에 맞게 넣어준 후, 100°C에서 10분간 vortexing 해주며 끓여주었다.

이후 단백질의 상대적인 양을 관찰하기 위하여 적절 한 농도 (5~12%)의 SDS 겔을 이용해 전기 영동 (Bio-Rad, Biomedicals, CA, USA; CAT NO.160069)을 통해 단백질을 분자량 별로 분리해 냈다. 이렇게 분리된 단백질은 Nitro Cellulose membrane (NC Membrane, 0.2 μ m (AE-6667-N, ATTO))을 사용하여 Wet transfer 방법을 이용하여 transfer 해 주었고, 필요 부분을 자르기 위해 Ponceau S (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA, No. BP103-10)를 이용해 염색해준 후 원하는 범위만큼 잘라, 10분간 1X TBS-T Buffer (Tris Buffered Saline with Tween 20)를 이용해 3회 세척해준 후, TBS-T 용액에 녹인 3% BSA (Bovine Serum Albumin, BOVOGEN Biologicals, Keilor East, Australia, No. BSAS 0.1)로 1시간 Blocking 해 주었다. 이후 3% BSA에 희석한 1차 항체 (HSP90 (Santa Cruz Biotechnology Texas, Dallas, USA; sc-13119), CRT3 (Cell signaling Technology Massachusetts, Danvers, USA; #2720s), UCP1 (abcam, Cambridge, UK; ab10983), SDHA (Cell signaling Technology Massachusetts, Danvers, USA; #11998), PDHA1 (Cell signaling Technology Massachusetts, Danvers, USA; #3205), VDAC (Cell signaling Technology Massachusetts, Danvers, USA; #4661), Cyt.C (Santa Cruz Biotechnology Texas, Dallas, USA; sc-13156), DUSP10 (Santa Cruz Biotechnology Texas, Dallas, USA; sc-374276), MAPK Family Antibody Sampler Kit (Cell signaling Technology Massachusetts, Danvers, USA #9926))^[24]에 밤새 (약 16시간) 반

응시킨 뒤 다음날 TBS-T를 이용해 10분간 3회 세척 후, 1차 항체에 맞는 HRP결합된 2차 항체에 1시간 반응시켜 주었다. 반응이 끝난 2차 항체를 TBS-T 용액에 10분간, 3번 세척 뒤 Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, NY, USA, RPN2109)를 membrane에 5~10분간 묻혀준 후, 암실에서 X-Ray 필름 (AGFA, Mortsel, Belgium, CP-BU New)을 사용하여 현상 후 실험군과 대조군의 차이를 확인하였다.

mRNA 측정

각 군 간의 mRNA 의 변화량 관찰을 위해, 갈린 조직을 Blood/cultured cell total RNA purification mini kit (FAVORGEN, Ping-Tung, Taiwan, FABRK 001-2)을 사용하여 mRNA 를 얻어낸 후. 그렇게 얻어낸 mRNA 를 Nanodrop 2000 (Thermo fisher scientific)을 이용하여 측정 한 뒤 500 ng 의 mRNA 로 cDNA 를 제작하였다. 65°C에서 5 분간 가열 과정을 거친 후 RT enzyme 0.5 µl (Toyobo, Osaka, Japan), 5x RT buffer 2 µl (Toyobo, Osaka, Japan), primer mix 0.5 µl (Toyobo, Osaka, Japan)를 추가해 10 µl 로 맞추어 주고, 37°C에서 1 시간 반응시킨 뒤 95°C에서 5 분간 끓여 잔여 mRNA 를 제거해 준다. 다음 증류수 190 µl 을 추가해 총 200 µl 볼륨의 cDNA 를 합성하였다. 만들어진 cDNA 를 이용 2X SYBR Green (Toyobo, Osaka, Japan) 6 ul, primer forward 1 ul, primer reverse 1 µl, cDNA 4 µl 을 사용하여 PCR 을 돌려주었다. PCR 은 pre-incubation 을 95°C에서 5 분, amplification 을 95°C 10 초, 60°C 10 초, 72°C 15 초 로 45 cycles, melting curve 는 95°C 5 초, 65°C 1 분, cooling 을 40°C 30 초 이다. 데이터의 분석은 LC480 light cyler 내부 프로그램을 이용해 분석하였다

Mouse <i>L32</i> – F	5' AGA TCC TGA TGC CCA ACA TC 3'
Mouse <i>L32</i> – R	5' CAG CTC CTT GAC ATT GTG GA 3'
Mouse <i>CRTC3</i> -F	5' GAA GTT CAG TGA GAA GAT CGC
Mouse <i>CRTC3</i> -R	5' CCC CGT GGT ACT GGG TAA G 3'
Mouse <i>PGC1α</i> -F	5' TTG CCC AGA TCT TCC TGA AC 3'
Mouse <i>PGC1α</i> -R	5' TTG GTC GCT ACA CCA CTT CA 3'

Mouse <i>UCP1</i> -F	5' GGA TTG GCC TCT ACG ACT CA 3'
Mouse <i>UCP1</i> -R	5' TGC CAC ACC TCC AGT CAT TA 3'
Mouse <i>SDHA</i> -F	5' ACC CAG ACC TGG TGG AGA CC 3'
Mouse <i>SDHA</i> -R	5' GGA TGG GCT TGG AGT AAT CA 3'
Mouse <i>PDHA1</i> -F	5' TTA CCG CTA CCA TGG ACA CA 3'
Mouse <i>PDHA1</i> -R	5' TTG CAA GAT TGC TGT TCA CC 3'
Mouse <i>PRDM16</i> -F	5' AGG GCA AGA ACC ATT ACA CG 3'
Mouse <i>PRDM16</i> -R	5' GGA GGG TTT TGT CTT GTC CA 3'
Mouse <i>TMEM26</i> -F	5' GCT CAC CCT CAA GTT CAA GC 3'
Mouse <i>TMEM26</i> -R	5' GGG TGC TGC AAT ACT GGT TT 3'
Mouse <i>mtFAM</i> -F	5' CCG AAG TGT TTT TCC AGC AT 3'
Mouse <i>mtFAM</i> -R	5' GGC TGC AAT TTT CCT AAC CA 3'
Mouse <i>DUSP10</i> -F	5' CGC CTA CTT GAT GAA GCA CA 3'
Mouse <i>DUSP10</i> -R	5' AGG TTC GGG GAA ATA ATT GG 3'
Mouse <i>COXII</i> -F	5' ACC TGG TGA ACT ACG ACT GCT 3'
Mouse <i>COXII</i> -R	5' CCT AGG GAG GGG ACT GCT CA 3'
Mouse <i>CIDEA</i> -F	5' CTC GGC TGT CTC AAT GTC AA 3'
Mouse <i>CIDEA</i> -R	5' TCC TTA ACA CGG CCT TGA AC 3'
Mouse <i>NuDNA</i> -F	5' ATG GAA AGC CTG CCA TCA TG 3'
Mouse <i>NuDNA</i> -R	5' TCC TTG TTG TTC AGC ATC AC 3'
Mouse <i>mtDNA</i> -F	5' CCT ATC ACC CTT GCC ATC AT 3'
Mouse <i>mtDNA</i> -R	5' GAG GCT GTT GCT TGT GTG AC 3'

표3) qPCR 프라이머 시퀀스. F : Forward R : Reverse

세포배양

배지는 Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM, Corning, NY, USA, 10-013-CVR) 제품에 Fetal Bovine Serum (FBS, Corning, NY, USA, No.35-015-CV) 10%가 되도록 첨가하였으며 추가적으로 박테리아 오염을 방지하기 위해 Penicillin-streptomycin (Hyclone, Logan, Utah, USA, SV30010)를 1%가 되도록 추가로 첨가하였다. 각 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

일차세포분리

마우스에서 보이는 표현형이 세포에서도 유사하게 나타나는지 보기 위해 지방에서 유래한 일차세포를 분리하였다. 3~7주령의 마우스 5마리를 CO₂ 안락사기에 안락사 시킨 후 갈색지방 영역을 분리 1X PBS에 수세 후 1% BSA, 200 mM D-(+)-Glucose (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, G8270-100G) 가 첨가된 1XKRBH 버퍼 (12 mM NaCl, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.1 mM MgSO₄, 1 mM NaHCO₃, 3 mM HEPES)에 조직이 마르지 않도록 담귀 둔 후 면도날 혹은 해부용 가위를 이용하여 조직을 다져 준다. 이후 다져진 조직을 1X KRBH 버퍼에 20 mg/ml로 녹인 collagenase I (Gibco, NY, USA, 17100-017-1 g)에 1:1로 섞어 준 후, 37°C, 5% CO₂, 200 RPM 교반 배양기에 40분간 배양한다. 40분간 콜라겐분해 효소에 의해 분해된 조직이 크림색을 띠면 10% FBS, 1% P/S 가 첨가된 DMEM을 넣어 잘 섞어주어 효소에 의한 분해를 멈춘다. 그 후 50 ml tube에 100 µm nylon cell strainer (FALCON, NY, USA, #352360)을 놓고 상층액을 내려 걸러 준 후 배지를 20 ml 추가로 부어준다. 이후 300 g, 10분간 원심분리 후 기름층을 포함한 상층액을 제거해 준다. 이 과정을 2 회 더 반복한 후 SVF (Stromal Vesicular Fraction)을 제외한 상층액을 모두 제거 후 배지 10 ml에 잘 피펫팅 후 10 cm² Plate에 균일하게 하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양한다. 분리 24시간 뒤 배지를 바꾸어 지방 일차세포가 아닌 세포들을 제거해 준다. 배지는 3~4일마다 교환해 주며 세포가 80%~90%가 차오르면 계대 배양해 주었다.

계대 배양은 1X PBS 5 ml로 세포를 수세해 준 후 제거한다. 세포가 마르기 전에 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, NY, USA, T4049-500 ml)을 1 ml 추가해 준 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에 3분간처리 해 주었다. 처리 후 3분이 지나면 배지를 4 ml 추가하여 추가적인 분해를 막고 1000 RPM, 5분간 원심 분리 후 상층액을 제거한 뒤 배지 10 ml에 잘 피펫팅 후 1:2 비율로 나누어 계대 배양해 주었다.

지방분화

일차 분리세포가 실험하기에 충분한 양으로 자라면 지방으로 분화했을 때에 군 간의 차이를 확인하기 위하여 배양한 세포를 24 well plate (SPL, Seoul, Korea, 30024)에 칸당 1.2×10^5 개로 배양해 주었다 (D-2). 24 well에 세포를 배양 한지 2일 후 지방 분화를 유도하기 위해 10% FBS, 1% P/S DMEM에 $2 \mu\text{M}$ Dexamethasone (Enzo life science, NY, USA, 89157-624-1 g), 0.124 mM Indomethacin (Sigma Aldrich, NY, USA, I7378-1 g), $0.5 \mu\text{M}$ IBMX (Sigma Aldrich, NY, USA, 15879-1 g), $0.5 \mu\text{M}$ Rosiglitazone (Cayman, Michigan, USA, 71740-50 mg), 2 nM T3(Sigma Aldrich, NY, USA, T2877), 0.5 U/ml Insulin을 첨가해 주었고 (D+0). 그로부터 2일 후에 10% FBS, 1% P/S DMEM + $0.5 \mu\text{M}$ Rrsiglitazone, 2 nM T3, 0.5 unit/ml Insulin으로 교체 후 매 2일마다 D+5가 될 때까지 교체해 주었다.

통계 분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, GraphPad Prism5을 이용하여 통계 분석을 진행하였다. 그래프는 평균 \pm 표준편차를 사용하여 나타냈으며, p-value 값은 unpaired student's test (and Non parametric tests) 방법으로 분석하였고, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였다.

결과

갈색지방 특이적 *CRTC3* 과발현 확인

모든 실험 마우스는 *CRTC3*의 과발현이 식이요법 및 주령에 따른 생리학적 차이가 있는지 확인하기 위하여 실험군과 대조군 마우스의 꼬리에서 gDNA를 채취하여 PCR을 통해 지노타임을 확인 후 (그림 2), 분리 사육하였다. Tamoxifen 투여에 의한 *CRTC3*의 발현이 갈색지방 특이적이게 활성화됨을 확인하기 위하여, Rosa *CRTC3*^{fl/fl} (이하 대조군)와 Rosa *CRTC3*^{fl/fl} UCP-1 CRE^{ERT2} (이하 실험군)마우스에서 각각 간, 백색지방 (Inguinal WAT, epididymal WAT), 갈색지방에서 단백질 시료를 채취해 HSP90을 로딩 컨트롤로 웨스턴 블롯을 통해 *CRTC3*의 단백질 양의 증가를 확인하였고 (그림 3.A), 갈색지방 내에서 실험군 마우스의 *CRTC3* 단백질 발현량이 증가하였지만, 다른 장기에서는 그렇지 않은 것을 확인하였다. 또한, Rosa *CRTC3*^{fl/fl}와 Rosa *CRTC3*^{fl/fl} UCP-1 CRE^{ERT2} 마우스에서 Tamoxifen 투여 유무에 따른 *CRTC3*에 발현량 변화를 확인하기 위해 qRT-PCR을 통해 갈색지방 내 *CRTC3*의 발현 증가를 확인하였을 때, Tamoxifen을 투여한 실험군 마우스의 경우 투여하지 않거나 (Tamoxifen X로 표기) 대조군인 마우스에 비하여 *CRTC3* 발현량이 3.2배 이상 증가하였고, Rosa 26 FL-*CRTC3* S126A의 발현이 되어 마우스 모델이 작동하는 것이 맞는지 확인하기 위해 FL-*CRTC3*의 mRNA 발현을 확인하였을 때에도 FL-*CRTC3*의 발현량이 2배 이상 증가함을 확인하였다 (그림 3.B). 이러한 Tamoxifen에 의하여 마우스 모델이 정상적으로 작동함을 확인하였고 이렇게 과 발현된 *CRTC3*의 효과를 알아보기 위하여 비만에 척도로써 가장 눈으로 확인하기 쉬운 체중변화를 확인하였다.

CRTC3 과발현 마우스에서 체중 감소 효과

CRTC3 발현 차이에 따른 체중 조절 효과를 보기 위하여 일반 사료 섭식마우스의 체중의

변화 (그림 4)와 60% 고지방 사료 섭취 마우스의 체중 변화 (그림14)를 4주령에서부터 각각 측정하였으며, 일반 식이 섭취 마우스는 8주령부터 유의미하게 체중 증가에 차이를 보이기 시작해 20주령 기준 대조군과 비교하여 $17.8 \pm 3.7\%$ 체중 차이를 보였다. 고지방 식이 마우스의 경우 생후 8주령부터 고지방 식이를 시작하였고, 고지방 식을 시작한지 7주 이후인 15주령에서부터 무게 차이를 보이기 시작했으며, 20주령 기준 대조군과 실험군 간에 $16.7 \pm 1.2\%$ 의 체중 차이를 보였다. 두 실험군 모두 대조군에 비하여 뚜렷하고 일관적인 체중의 감소 효과를 보였다. 이는 이 연구에서 처음 제시한 가설에 반대되는 양상을 보였는데, CRT3의 효과가 에너지 소모 특이적인 갈색지방에서는 오히려 비만을 억제하는 효과를 보일 수도 있다고 예상된다. 또한, 이러한 체중감소 효과는 주령에 따른 비만 및 당뇨를 포함한 기타 다른 대사질환에서 또한 저항성을 보일 것이라 예측된다. 그리하여 비만에 의해 생기는 합병증 중 가장 밀접하며 비만의 지속성과 유병률의 증가의 상관관계를 가진 당뇨에 대한 저항성을 알아보기 위해 당뇨병 진행의 척도인 인슐린과 당 저항성을 측정하였다.

인슐린 저항성 및 당 부하도

각각의 실험 마우스는 무게차이가 유의미하게 나타나기 시작한 16주령에서 6시간의 금식 후 혈당을 검사하였으며, 금식에 의한 스트레스가 이후 다른 실험에 주는 영향을 차단하기 위하여 혈당 검사 후 일주일간의 휴지기를 준 후 다음 실험을 진행하였다. 실험은 인슐린 저항성 검사, 당 부하 검사 순서로 각 주사액을 복강으로 투여 후 30분 간격으로 측정하였다. 일반 사료 섭취 군에서는 인슐린 저항성 검사, 당부하 검사 모두에서 대조군 간의 유의미한 차이는 없었으며 (그림 8.A), 그래프의 AUC (Area under the curve) (그림 8.B)를 분석해 보았을 때에도 대조군 간의 유의미한 차이는 없었다. 하지만 고지방사료 섭취 군에서는 대조군에 비하여 인슐린 저항성 검사의 경우 투여 후 30분부터 실험 종료시까지 인슐린 저항성이 유의미하게 감소하는 결과를 보였고, 당 부하도 검사는 포도당 투여 후 30분에 유의미하게 해

당능이 증가 하는경향을 보였다 (그림 18.A). 또한, 각 도표의 AUC를 계산해 나타냈을 때에도 대조군에 비하여 인슐린 민감도는 28% 증가하였고, 당 부하도는 22% 감소하였다 (그림 18.B). 일반사료 섭식 군에서 실험군과 대조군에서 무게가 증가하였지만 각실험에서 혈당에서 차이를 보이지 않은 까닭은 대조군 마우스가 인슐린 저항성이 생길 만큼 비만이 유도되지 않아 이러한 차이를 보이는 것이라 생각이 되며, 고 지방 사료 군에서는 대조군이 체중 증가에 의한 인슐린 민감도 및 해당능에 차이를 보였다. 이러한 차이는 갈색 지방 특이적인 CRTC3 발현 증가에 따른 지방의 소모가 크게 증가하여 비만이 억제되고 그에 따른 마우스 인슐린에 대한 민감도 및 해당능이 더 커져 당 항상성 유지가 더 좋아진 것으로 보인다. 앞선 두 실험 결과에서는 갈색지방에서 CRTC3의 변화가 비만과 당뇨에 저항하는 결과를 보였다. 하지만 이러한 체중 감소의 원인은 에너지 소모의 증가 와 에너지 섭취 감소 크게 두가지가 원인이 될 수 있는데, 두 마우스 그룹 모두 실험군과 대조군 마우스 간의 사료 섭취량의 차이는 없었다. 따라서 에너지 섭취가 아닌 에너지 소모적인 측면에서 이러한 차이가 있을 것이라 사료되어 기초에너지 소모량을 변화시키는지 여부를 확인하는 실험을 진행하였다.

에너지 소모 증가 효과

갈색지방의 주된 역할인 지방 분해를 통한 에너지 발생을 측정하기 위해 생후 18~20주령의 마우스를 실험동물실 내에 설치된 OXYMAX CLAMS를 이용하여 산소 소비량 (ml/kg/hr), 이산화탄소 배출량 (ml/kg/hr), 열 발생량 (Kcal/kg/hr) 등을 측정하였으며, 기기는 일반 대기조성 (산소 20.98%, 이산화탄소 0.5%) 기준에 맞게 영점 측정되었다. 실험은 4일간 진행되었으며, 하루 간의 적응 기간동안 (Day -1)측정 값을 도표에서 제외하였다. 또한, 갈색지방의 활성화에 따른 에너지 소모량 변화를 측정하기 위하여 둘째 날 소등 이전 β_3 -아드레날린 수용체의 작용체인 CL-316,243 (0.1 mg/kg)을 복강 투여해주었다. 일반사료 섭식군에서 산소 소비량, 이산화탄소 배출량, 열 발생량 모두 대조군에 비하여 유의미하게 증가하였으며, CL-316,243

투여 시 대조군 보다 실험군에서 각 지표들의 상승 효과의 차이성을 보였다 (그림 9.A). 또한, 각각의 지표가 야행성인 마우스의 활동이 가장 활성화된 시간인 22:00~02:00의 영역 값을 막대 도표 화하였을 때도 각각 산소 소비량은 1.23배, 이산화탄소 배출량은 1.24배, 열 발생량은 1.28배 증가하였다 (그림 9.B). 고지방 사료 섭식군에서 또한 일반사료 섭식군과 마찬가지로 각각의 지표가 유의미하게 상승하였고, CL-316,243 투여 시에는 일반사료 섭식 군 보다 더 큰 차이를 보였다 (그림 19.A). 22:00~02:00에서의 수치 또한 산소 소비량은 1.18배, 이산화탄소 배출량은 1.22배, 열 발생량은 1.28배 증가로 대조군과의 차이는 더 커졌지만, 일반 사료 섭식 군과 비교하였을 때에는 더 적은 수치를 기록하였다 (그림 19.B). 이는 체중 증가에 따른 비만화에 영향으로 인한 에너지 소모량 감소로 사료되며, 이에 따라 체중에 따른 피크 시간대의 열 발생량을 점 분산 도표를 통하여 그림으로 나타냈다. 일반 사료 군 (그림 10) 과 고지방 사료 군(그림 20)에서 각각 에너지 발생량이 체중과 β_3 -아드레날린 수용체의 활성화에 따라 유의미한 차이가 있음을 보였다. 이 실험을 통해 얻은 결과인 CRT3 발현에 의한 에너지 소모 증가가 갈색지방에 의한 효과인지 확인 해보기 위하여 단기간 추위 노출 상황에서 체온 조절 능력을 확인하였다.

추위 저항성 증가

변온동물에서 추위에 저항하기 위하여 보이는 큰 특징은 갈색지방에서 UCP1에 발현 증가와 그에 의한 NST 반응이며 이를 알아보기 위해 생후 20주령 이상의 마우스를 6시간 동안 금식 후 4°C 냉장실에서 체온 변화를 관찰하였다. 여러 마리의 마우스가 뭉쳐 서로의 체온을 보존시키는 변인을 제거하기 위해 칸막이가 있는 아크릴 케이지를 사용하였고, 깔짚을 제거했고, 체온은 직장 체온계를 이용하여 5시간 동안 1시간 간격으로 측정하였다. 일반사료 섭식 군 (그림 11)과 고지방 사료 섭식 군 (그림 21) 모두 대조군과 실험군에서 추위에 대한 저항성을 보였다. 추위 노출 5시간 기준 일반사료 섭식 군에서는 실험군과 대조군의 체온 차이

는 약 1.2 °C, 고지방 사료 섭식 군에서는 약 2 °C의 차이를 보였고, 상온에서 체온을 측정하였을 때에도 두 그룹 모두 대조군과 실험군에서 기초 체온에 차이를 보였다 (결과 값 보이지 않음). 이는 위에서 확인한 열 발생량에서의 이어지는 결과를 보였다. 이러한 에너지 소모의 증가는 갈색지방에서 조직학적인 차이점을 낼 것이라 생각되어 갈색지방의 조직 표본을 만들어 조직학적인 차이점을 관찰하였다.

갈색지방의 세포 용적 감소

앞서 실험한 결과에서 보이는 갈색지방의 활성 감소가 어떤 조직학적 특징을 보이는지 확인하기 위해, 대사 실험이 모두 종료된 마우스를 안락사 후 해부하여 4 mm 두께로 자른 갈색 지방조직 표본을 얻었고, 표본은 4 μm 두께로 관찰하였다. 일반사료 섭식 군에서 마우스 해부 후 갈색지방의 백색화 및 크기를 확인하였을 때 크기에서는 별다른 차이가 관찰되지는 않았지만, 대조군에 비하여 주변부의 백색지방의 양이 적었으며, 갈색지방의 색 또한 더 갈색을 띄는 것을 확인하였다 (그림 6), 고지방 사료 섭식 군에서는 일반사료 섭식 군과 마찬가지로 크기에 눈에 띄는 변화는 없었지만, 일반사료 섭식군에 비하여 두 군간의 지방의 백색화 및 주변부의 백색지방 양의 증가가 더 두드러지게 나타났다 (그림 16). H&E를 통하여 본 갈색지방 또한 비슷한 양상을 보였는데, 광학 현미경을 이용하여 200배율로 확대하여 봤을 때 대조군에 비하여 실험군에서 지질 방울의 크기가 감소하는 경향성을 보였고 (그림 7.A) Image J를 통하여 갈색지방 세포의 크기를 측정하였을 때, 실험군에서는 상대적으로 크기가 작은 세포 (0-400, 400-800 μm^2)가 대조군에서는 상대적으로 크기가 큰 세포 (1200~1600 μm^2)가 많이 존재하였다 (그림 7.B). 고지방 사료 섭식 군 또한 일반사료 군과 마찬가지로 실험군이 대조군에 비하여 지질방울의 크기가 감소하는 경향성을 보였으며 (그림 17.A), 상대적으로 작은 크기의 세포의 빈도 수가 유의미하게 증가하였고, 크기가 큰 세포는 유의미하게 감소하는 경향을 보였으며, 고지방 사료 군에서는 면적이 2000 μm^2 이상의 크기를 가진 세

포의 수가 증가하였다 (그림 17.B), 두 실험군 모두에서 대조군에 비하여 갈색지방에서의 CRT3의 발현양의 증가가 갈색 지방내의 에너지 소모량을 증가시켜 지방 축적을 감소시키고 더 나아가 지방의 백색화를 방지함을 확인할 수 있었다. 이러한 갈색지방의 백색화의 감소 효과는 갈색지방에서 미토콘드리아 단백질 및 mRNA의 증가와 여러 다른 지질대사 관련 단백질 등이 증가하였을 것이라 예상이 되어 분자생물학적 실험 방법인 웨스턴 블랏과 qRT-PCR을 통해 확인하였다.

미토콘드리아 단백질 및 mRNA 발현 증가

앞서 확인한 CRT3 과발현에 의한 갈색지방의 백색화 감소 및 에너지 소모량 증가 등의 효과가 미토콘드리아 증가에 의한 효과인지를 알아보기 위하여 염색체 내에서 발현하는 미토콘드리아 단백질과 mRNA 발현 그리고 미토콘드리아 내재적으로 발현하는 단백질과 mRNA 발현을 각각 웨스턴 블랏과 qRT-PCR 방법을 통하여 확인하였다. 웨스턴 블랏에서는 HSP90을 로딩 컨트롤로 사용하였고, qRT-PCR 에서는 L32를 로딩 컨트롤로 사용하였다. 일반사료 섭취 군에서 대조군에 비하여 실험군에서 CRT3의 단백질 발현량이 증가함에 따라 미토콘드리아 양을 대변할 수 있는 미토콘드리아 내막 단백질인 SDHA (Succinate dehydrogenase complex flavin protein subunit A)와 해당과정 및 Krebs cycle에서 피루브산을 Acetyl Co-A로 변환시키는데 중요한 PDHA1 (Pyruvate dehydrogenase alpha 1)의 양이 증가하였고, ATP 비 의존적으로 체온을 조절하는 내막 단백질인 UCP1 또한 발현이 증가함을 보였다 (그림 12). 갈색지방의 mRNA를 이용한 qRT-PCR에서 또한 SDHA, PDHA1, UCP1을 포함한 미토콘드리아 관련 유전자인 COXII, CIDEA, ATP 합성효소 등이 일괄적으로 유의미하게 증가함을 확인하였다 (그림 13). 고지방 사료 섭취 군에서도 일반사료 섭취 군과 같은 결과를 보이는지 확인했을 때, CRT3의 발현이 증가함에 따라 미토콘드리아 관련 단백질의 발현 (그림 22)과 유전자의 발현이 (그림 23) 일반사료 섭취군과 같은 경향성을 보이며 증가하였으며, 특히

UCP1의 발현이 더 두드러지게 차이남을 확인하였다. 또한, 미토콘드리아 단백질 전사조절자인 mtFAM 또한 증가하였다. 갈색지방의 CRTC3 과발현에 의한 미토콘드리아 단백질, mRNA 발현 증가 효과가 다른 조직에 또한 영향을 미치는지 확인을 해보았을 때, 백색지방 (iWAT, eWAT) 모두에서 SDHA, PDHA1, UCP1 등의 발현량의 차이는 확인되지 않았다 (결과 값 보이지 않음). 이런 변화는 오로지 CRTC3의 과발현에 의한 갈색지방 단독적인 미토콘드리아 수 및 기능의 증가라고 여겨진다.

고찰

삶의 질이 향상함에 따라 건강에 대한 관심은 높아졌지만 영양 섭취의 과다, 에너지 소모의 감소 등의 이유로 생긴 에너지 불균형으로 인해 전세계적으로 비만인구는 점점 증가하고 있다. 비만은 질병 그 자체라 볼 수는 없지만 비만으로 인한 당뇨, 이상지질혈증 등의 여러 합병증을 야기하기 때문에 비만은 큰 질병의 전조증상 그 이상의 느낌을 주고 있다. 과거의 연구는 지방의 생성억제에 초점을 두고 진행이 되었지만, 지방의 역할 및 분류 (백색지방, 베이지색 지방, 갈색지방)등 이 밝혀 짐에 따라 백색지방이 분비하는 항 비만성 아디포카인 분비에 관한 연구, 베이지색지방의 분화 촉진 및 갈색지방의 활성화 연구 등의 지방의 기능과 그의 조절 유전자에 관한 연구에 초점이 맞춰졌다. 이전 연구에서 마우스의 CRTC3 유전자를 K.O 하였을 때 체중감소와 그에 따른 체지방양 감소, 인슐린 민감성, 당 내성, 에너지 소모량 증가 등을 관찰하였다. 그에 따라 에너지 소모에 중추적인 역할을 하는 기관인 갈색지방에서 CRTC3 를 억제 혹은 과발현 시킴으로써 CRTC3 K.O 의 영향이 여러 기관들의 시너지효과 인지 혹은 단일 기관에 의한 효과인지 알아보기 위하여 갈색지방 특이적 CRTC3 조절을 실시하였다. 현재의 연구에서 결과를 포함하지 않았지만, 갈색지방 특이적 CRTC3 를 억제시킨 모델 마우스에서는 이전 연구와 같은 표현형의 차이가 관찰되지 않았으며 체중의 변화, 인슐린 저항성 및 조직학적인 차이 또한 관찰되지 않았다. 하지만, 예상과는 달리 CRTC3 과발현 모델에서는 초기 세웠던 갈색지방 특이적으로 CRTC3 의 발현이 증가 시 비만에 취약할 것이라는 가설과는 반대되게 일반사료, 고지방 사료 섭취 마우스의 대조군에 비하여 유의미한 체중 감소 (그림. 4, 그림. 14), 인슐린 민감도 증가 및 해당능의 증가 (그림. 8, 그림. 18) 갈색지방내 지질 함량 감소 (그림. 6, 그림. 7, 그림. 16, 그림. 17), 에너지 소모량 증가 (그림. 9, 그림. 10, 그림. 19, 그림. 20)와 같은 이전 연구에서 사용한 CRTC3 K.O 모델과 같은 표현형을 보였다. 본 연구에서는 공통적으로 CRTC3 과발현

마우스에서 미토콘드리아 단백질과 mRNA 발현양의 증가가 있었는데, 이는 CREB 과 CRTC3 의 공통적인 타겟으로 알려진 PGC1 α 의 발현의 증가가 그 이유로 보여 진다. PGC1 α 는 지방분화에 있어 PPAR gamma 의 공동전사체로 알려져 있으며 지방분화에 관련된 여러 유전자의 발현을 조절할 뿐만 아니라 NRF 와 같은 미토콘드리아 생합성 효소등과도 결합하여 미토콘드리아 수 증가 및 미토콘드리아 단백질 합성에도 영향을 주는 것으로 알려져 있는데 [45], CRTC3 발현량 증가로 인한 PGC1 α 증가 효과로 미토콘드리아 단백질 발현 및 수를 증가시켜, 같은 양의 사료를 섭취하고 운동량의 차이가 없음에도 불구하고 에너지 소모량을 증가시켜 비만을 억제하는 효과를 보이는 것이라 사료된다.

CRTC3의 타겟 유전자

cAMP 신호체계에서 CREB과 CRTC3의 상호작용으로 대사기능의 조절을 한다는 연구는 많이 진행되고 있고, 위의 결과를 통하여 CRTC3의 갈색지방 내에서 과발현이 미토콘드리아의 수와 기능에 영향을 줌을 확인하였지만, 어떠한 경로를 통하여 조절하는지는 아직 알려진 바가 많이 없었다. 따라서, 우리는 CRTC3의 타겟 유전자를 발굴하기 위하여, CRTC3의 타겟 유전자라고 예상되는 후보군의 mRNA의 발현양을 이전 CRTC3 억제연구에서 qRT-PCR을 통해 확인하였고, 그 중 타겟 유전자의 mRNA의 발현이 CRTC3의 발현과 연관된다고 생각하는 유전자를 갈색지방 특이적 CRTC3 과발현 마우스에서 교차검증을 통해 확인한 결과 *Letmd1*, *KCNK5*, *ARRDC3* 등의 유전자의 발현이 증가 혹은 감소하였는데, 그 중 *DUSP10*을 유력한 후보로써 정하였다 (그림 12, 그림 22). MAPK 탈 인산화 효소인 DUSP family 중 하나인 DUSP10은 MAPK 중 p38과 JNK를 탈 인산화 시킴으로써 활성을 억제시키는 단백질로 알려져 있다. DUSP10의 mRNA 발현 증가에 따른 MAPK 억제 효과와 DUSP10 단백질 발현 양상 확인하기 위해 일반사료 섭취 군 (그림 12)과 고지방 사료 섭취 군 (그림 22)에서 대조군과 실험군의 p38, JNK의 인산화를 확인하였을 때, 두 그룹 모두 DUSP10의 단백질 발현의 증가

와, p-p38, p-JNK의 band 감소를 각각 확인할 수 있었다. 또한, 최근 JNK와 당뇨와의 상관관계에 대한 분석 연구들에서 공통적으로 JNK의 활성화 및 단백질이 증가함에 따라 인슐린 자극에 의한 하위 신호 전달 체계가 감소하여 막 단백질인 GLUT4의 발현량이 감소한다는 결과가 관측되고 있다. 그를 통해 우리는 CRTC3가 과 발현됨에 따라 DUSP10의 발현이 증가하고 그에 따른 JNK-IRS 1- GLUT4 신호 전달 체계 중 JNK의 활성화를 억제함을 통해 GLUT4의 발현량을 증가시켜 인슐린 저항성을 감소시키는 것이라 가설을 세웠지만, 현 연구에서는 그 가설을 검증하기에는 아직 세포내에서 DUSP10의 발현 조절에 대한 실험이 미흡하여 검증하지 못하였다. 이후의 연구에서는 DUSP10과 JNK 그리고 GLUT4와 당뇨와의 상관관계를 분석하여 CRTC3의 하위의 DUSP10에 의해 당뇨를 억제한다는 연구가 필요할 것이라고 생각된다.

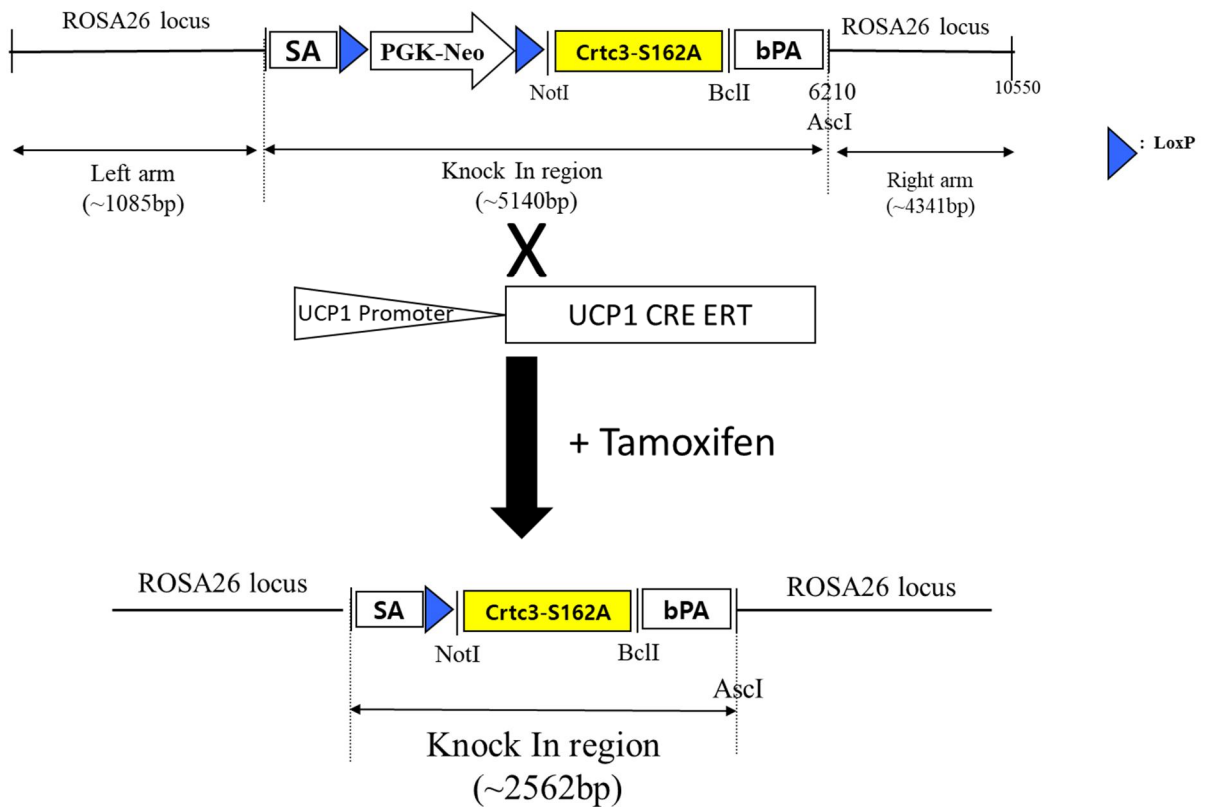


그림 1. *CRTC3* 과발현 마우스 유전자 도표.

CRTC3 과발현 마우스는 Rosa26 유전자의 위치에 *CRTC3*의 항시 활성화 형인 FL-*CRTC3* S162A를 삽입한 마우스이며, UCP1 CRE^{ERT2} 마우스와 교배를 통해서 갈색지방 특이적으로 *CRTC3*를 발현하게 한 모델로서, 식용유에 녹인 Tamoxifen (2 mg/kg)을 경구 투여를 통해 *CRTC3*의 발현 시기를 조절할 수 있다.

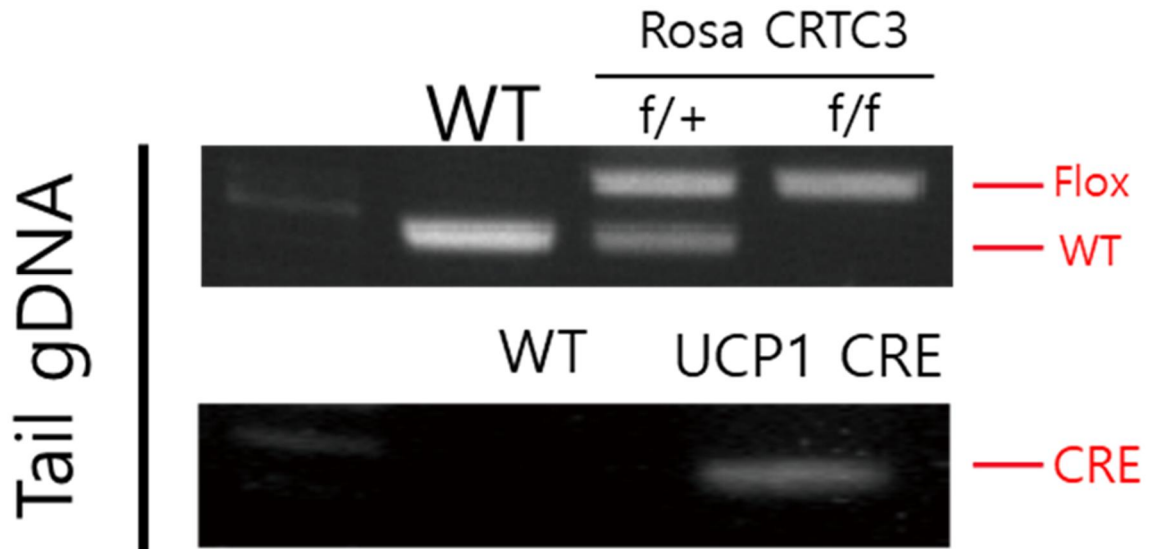


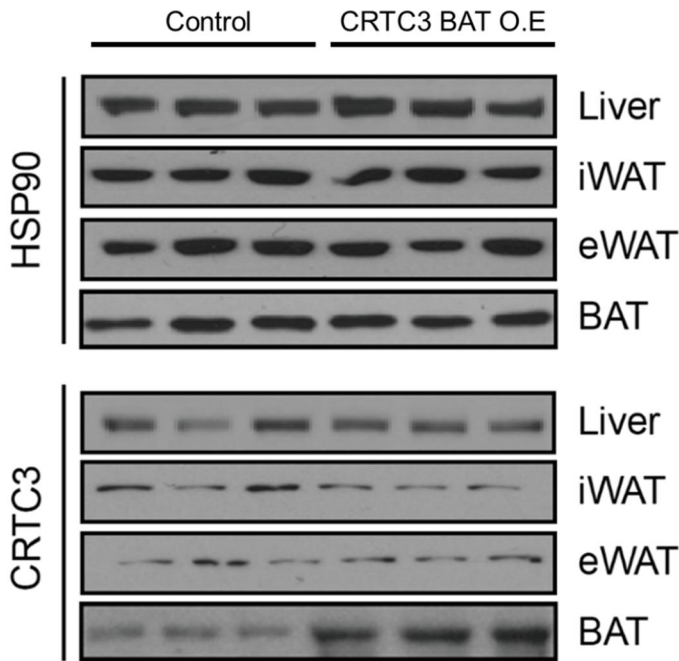
그림 2. *CRTC3* 과발현 마우스 지노타이핑.

CRTC3 과발현 마우스의 지노타입을 확인하기 위하여 각 마우스의 꼬리에서 추출한 gDNA 를 PCR 방법을 통해 지노타이핑을 하였다.

상단 lane1: 1 Kb DNA 마커, lane2: 야생형 마우스 (약 470bp), lane3: Rosa *CRTC3*^{f/+} 마우스, lane4: Rosa *CRTC3*^{f/f} 마우스 (약 540bp).

하단 lane1: 1 Kb DNA 마커, lane2: 야생형 마우스, lane3: Rosa *CRTC3*^{f/f} UCP1 CRE^{ERT2+/-} 마우스 (453 bp).

A.



B.

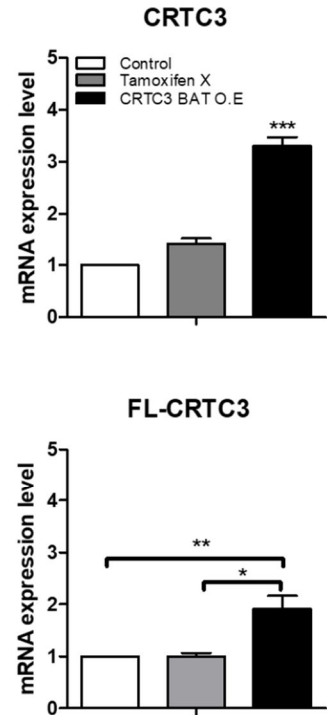


그림 3. 갈색지방 특이적 *CRTC3* 과발현 확인.

실험군 마우스가 갈색지방 특이적으로 *CRTC3* 를 과발현 하는지 확인하기 위하여 간, 백색지방, 갈색지방에서 *CRTC3* 단백질 발현양을 확인하였으며 (그림 3.A), Tamoxifen 투여 여부에 따른 갈색지방 특이적 *CRTC3* 증가를 확인하기 위하여 qPCR 을 통하여 *CRTC3* mRNA 발현양을 확인하였다 (그림 3.B).

대조군 (Rosa *CRTC3*, Tamoxifen 투여), Tamoxifen X (Rosa *CRTC3* UCP-1 CRE^{ERT2}, 식용유 투여), *CRTC3* BAT O.E (Rosa *CRTC3* UCP-1 CRE^{ERT2}, Tamoxifen 투여).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음.

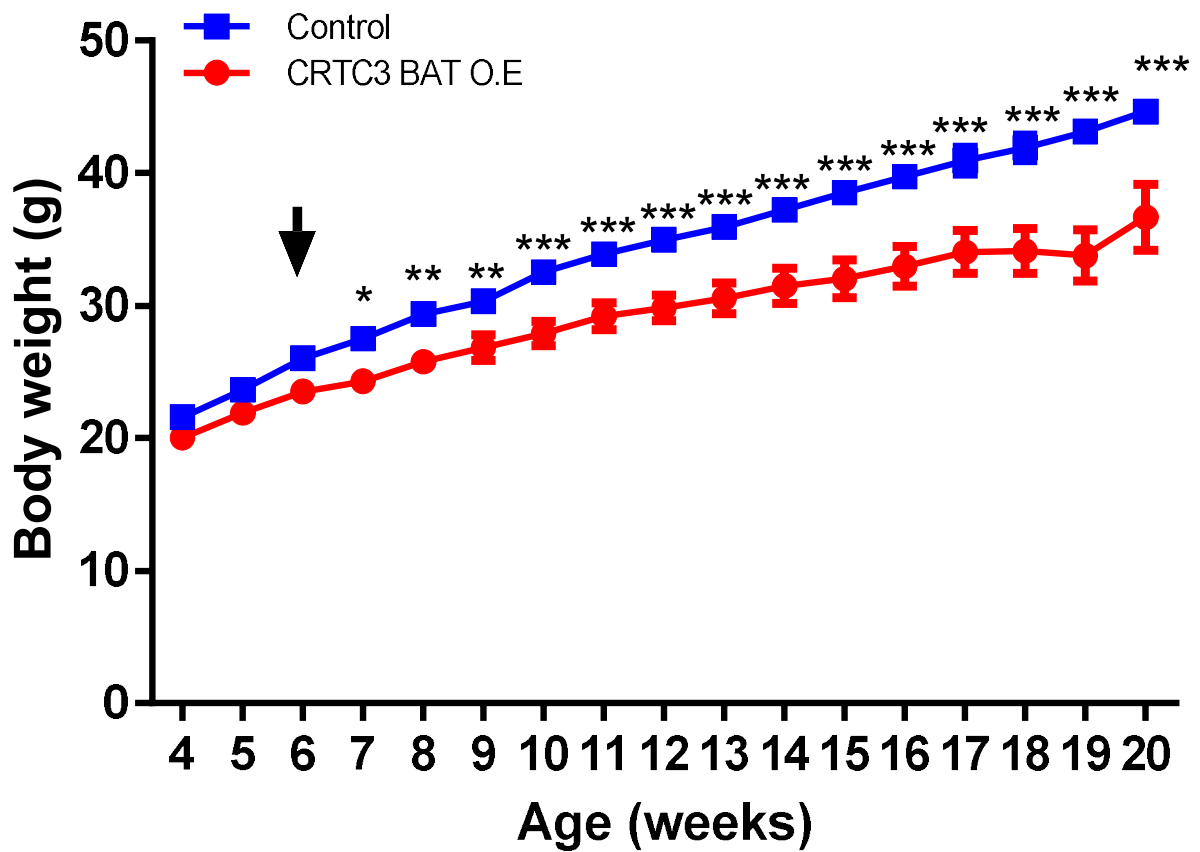


그림 4. *CRTC3* 과발현 일반사료 섭식 마우스 무게 추이

대조군과 실험군에서 주령에 따른 무게의 차이를 비교하기 위해 일반사료 섭식 마우스를 4 주령부터 매주 무게를 측정하여 비교하였다. 마우스가 6 주령이 되었을 때 Tamoxifen 을 4 주마다 주 3 회 경구로 투여해 주었다. 대조군 (n=15), *CRTC3* BAT O.E (n=17).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음.

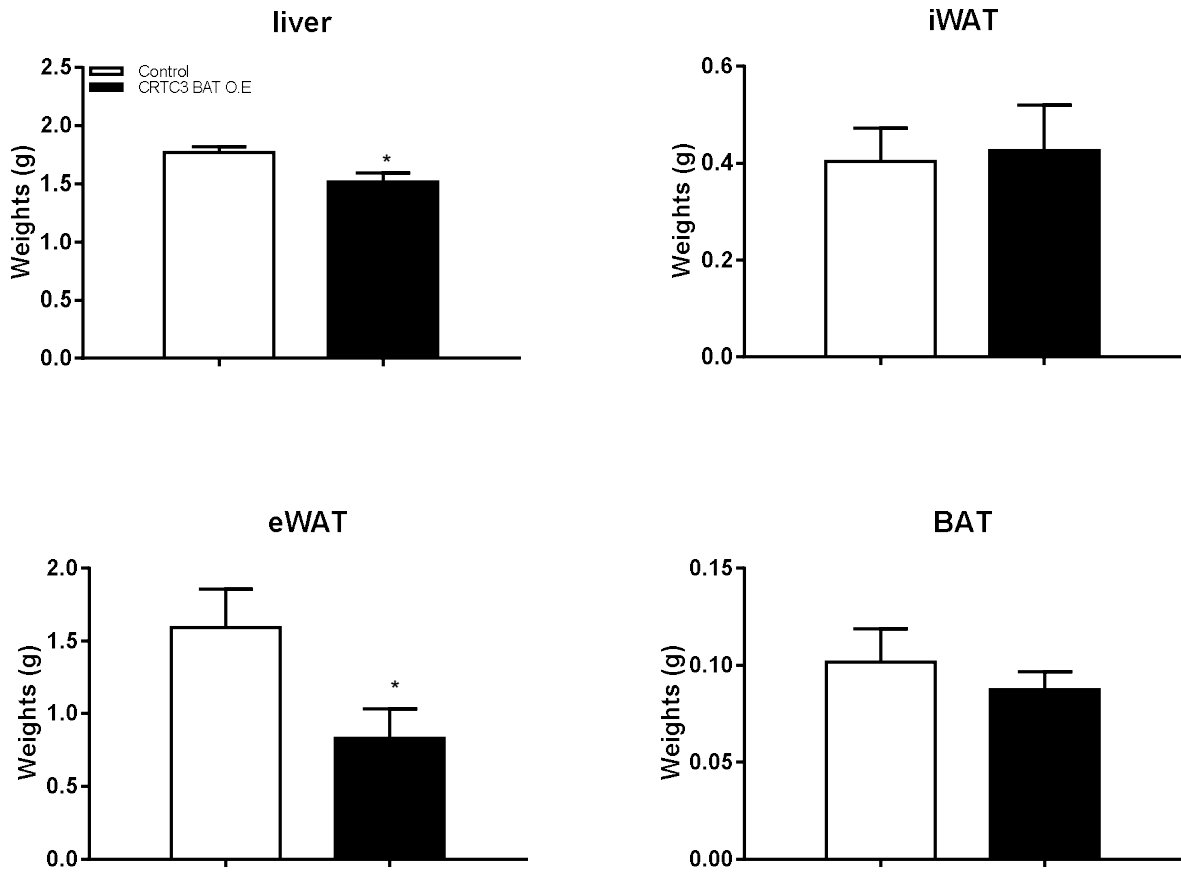


그림 5. *CRTC3* 과발현 마우스 조직 무게 비교

실험군과 대조군에서 에너지 대사와 관련된 장기인 간, 백색지방, 갈색지방의 무게를 안락사 후 해부하여 측정하였다. 대조군 (n=6), *CRTC3* BAT O.E (n=8).

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음.

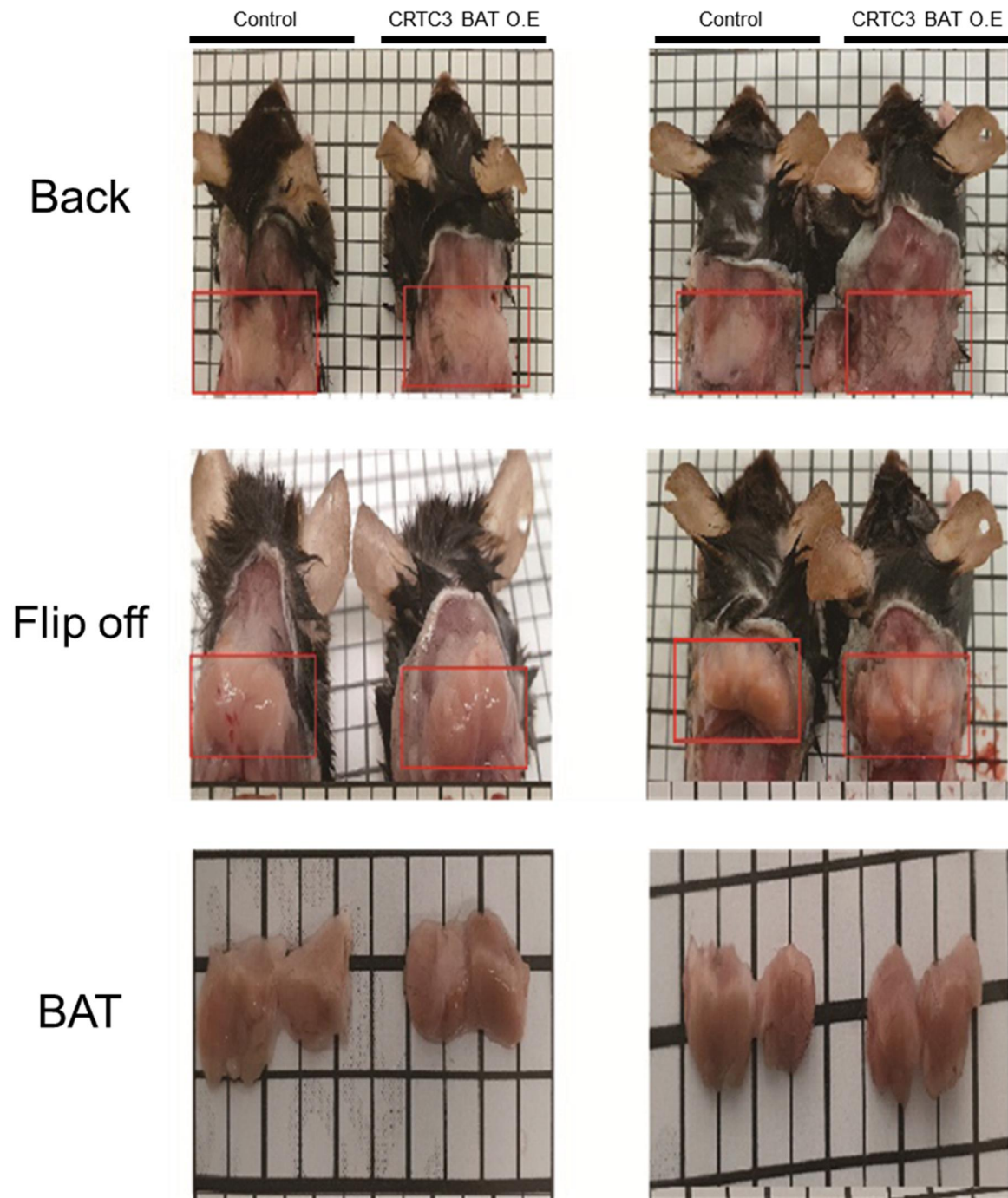


그림 6. *CRTC3* 과발현 마우스 갈색지방 차이 비교

갈색지방 특이적인 *CRTC3*의 발현이 갈색지방의 표현형의 차이를 보이는지 확인하기 위하여 군 간의 갈색지방의 크기, 색깔 차이를 비교하였다. 실험의 사용한 모눈의 크기는 각 0.25 cm²이다

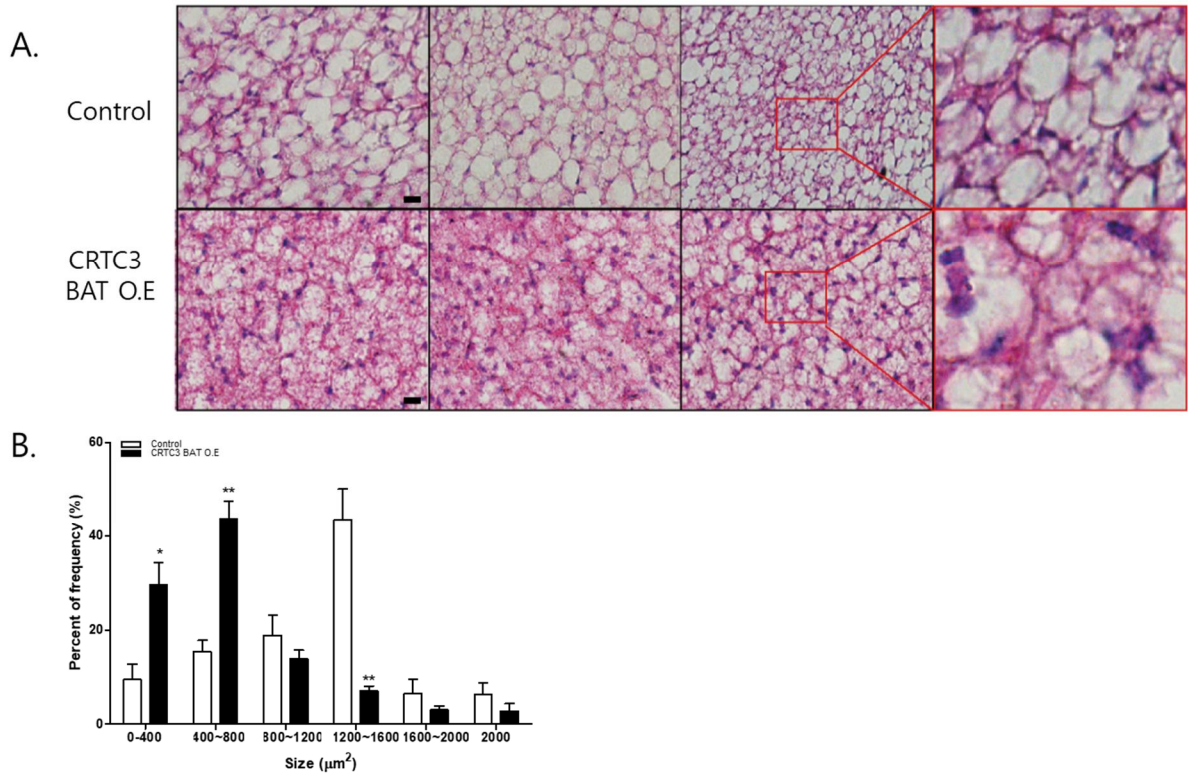


그림 7. CRTC3 과발현 마우스 갈색지방 조직 H&E

실험군 간의 조직학적 차이를 확인하기 위해 파라핀에 포매한 조직 절편을 Hematoxylin & Eosin 염색을 통해 확인하였다. (그림 6.A) 또한, 지방세포의 크기를 비교하기 위하여 Image J의 플러그인을 이용하여 확인하였다. 대조군 (n=3), CRTC3 BAT O.E (n=3).

스케일 바 크기: 100 μm , 배율: 400 배

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음.

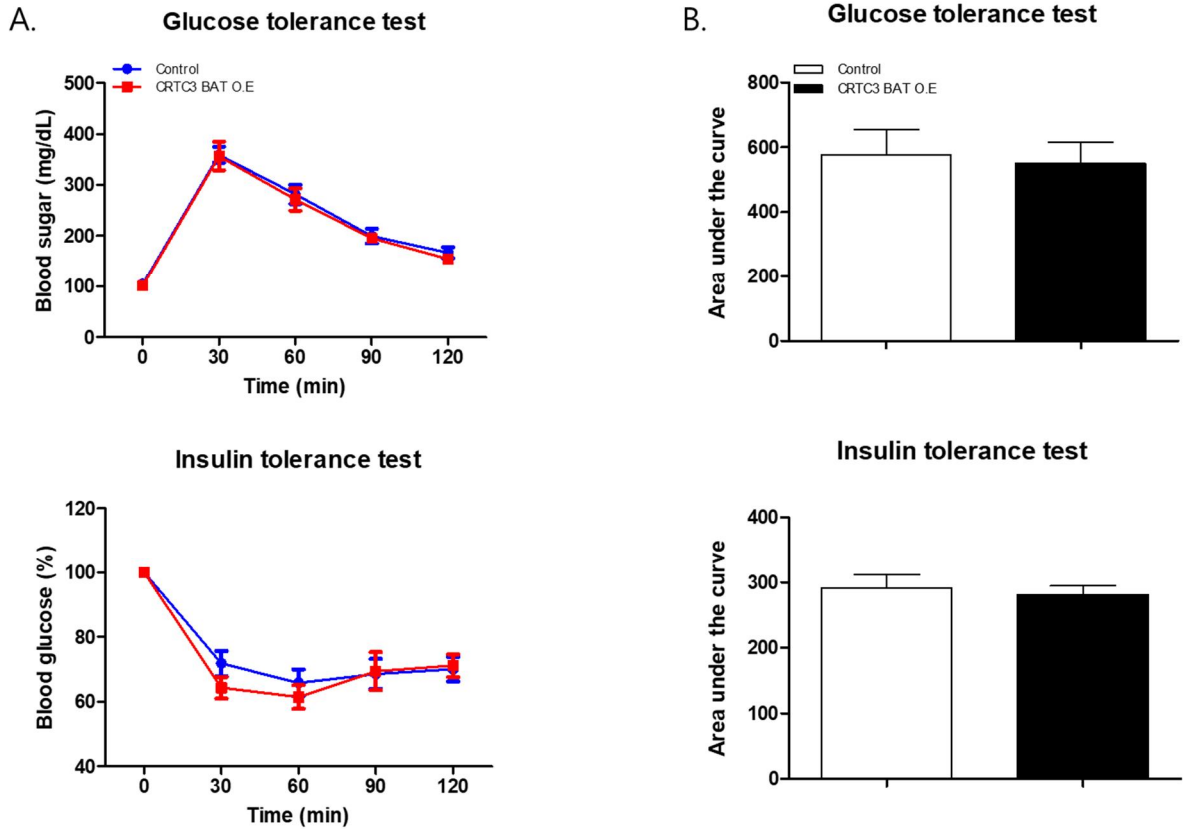


그림 8. CRTC3 과발현 마우스 당부하, 인슐린 저항성 시험

두 그룹 간의 당 항상성의 차이를 확인하기 위하여, 당부하 검사 (그림 7.A 상단) 및 인슐린 저항성 검사 (그림 7.A 하단)을 하였으며, 두 그룹 모두 16 주령 이후에 마우스를 사용하였고, 6 시간의 금식 후 꼬리 정맥에서 채혈한 혈액으로 혈당을 측정하였다. 대조군 (n=14), CRTC3 BAT O.E (n=6).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음.

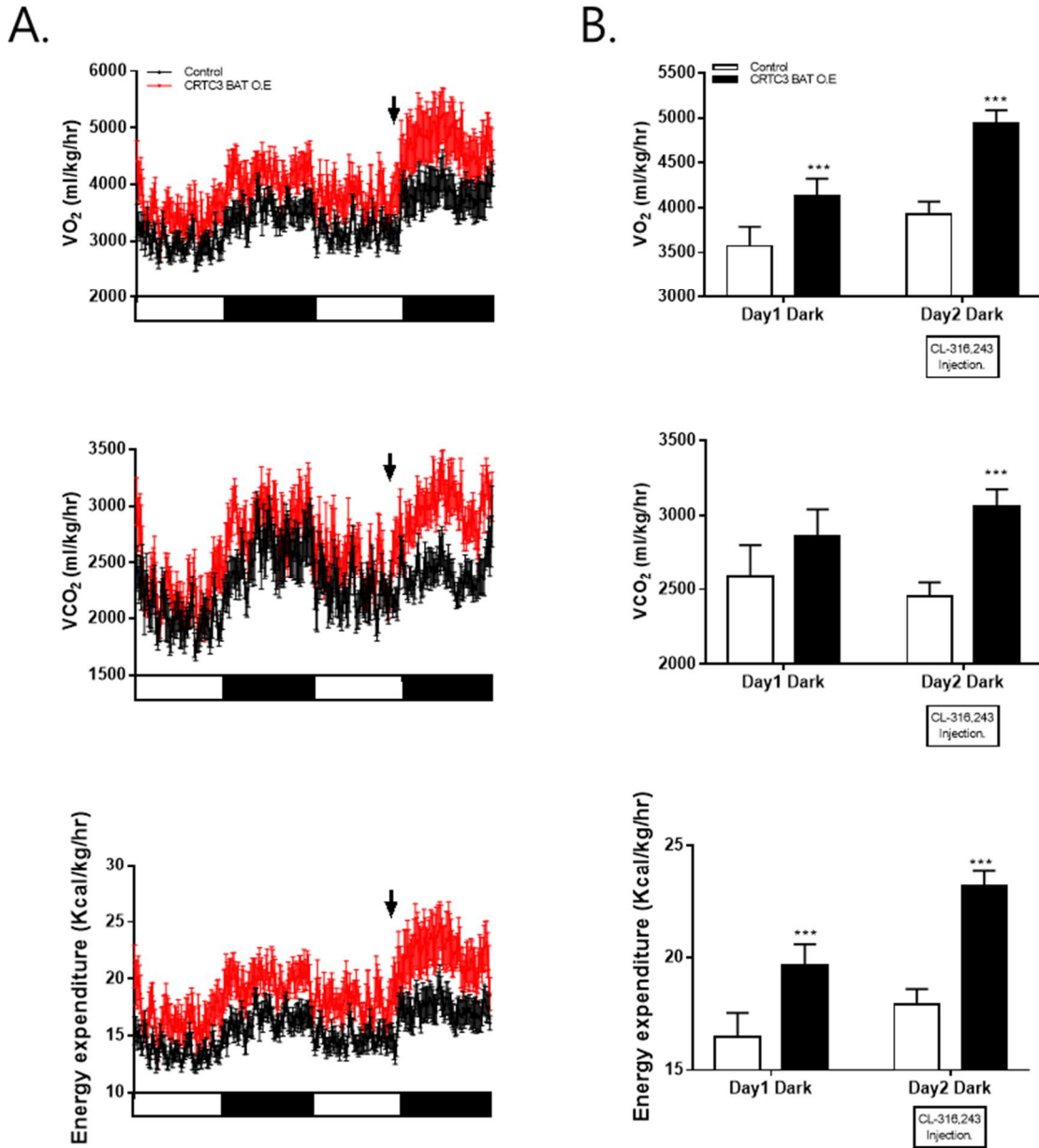
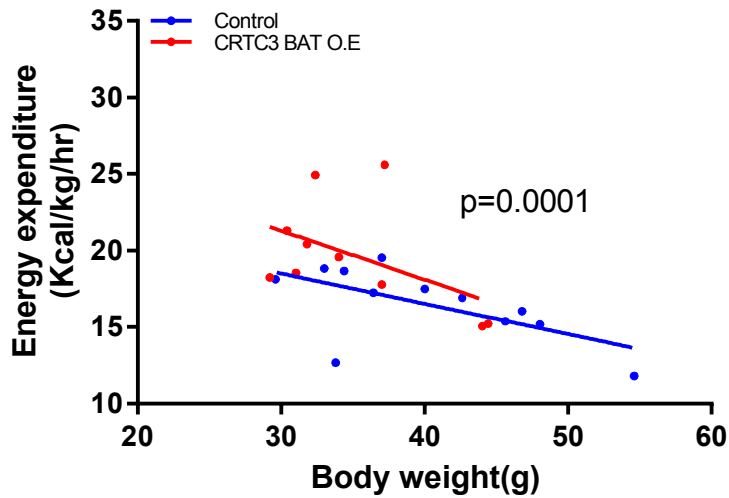


그림 9. *CRTC3* 과발현 마우스 메타볼릭 케이지 실험

갈색지방 특이적인 *CRTC3*의 발현양의 차이가 에너지 대사량의 차이를 보이는지 확인하기 위하여 18~20 주령의 마우스의 에너지 대사정도를 OXYMAX CLAMS 를 이용하여 측정하였으며, 마우스가 기계에 적응하는 기간은 제외하였다. 실험 개시 후 둘째 날 밤이 시작될 때 CL-316,243 (0.1 µg/g)을 복강투여 하였다. (그림 8.A 화살표) 각각의 지표는 마우스 활동이 최고조에 달하는 시간대를 막대 도표화 (오전 12~4 시) 하였다 (그림 8.B). 대조군 (n=12), *CRTC3* BAT O.E (n=10).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, p<0.05, p<0.01, p<0.001 을 각각 *, **, ***로 표기하였음.

CL-316,243 주사 이전



CL-316,243 주사 이후

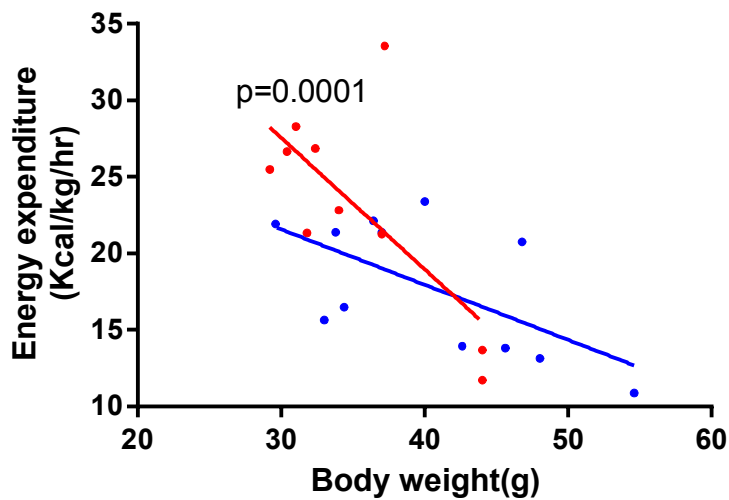


그림 10. *CRTC3* 과발현 마우스 무게에 따른 에너지 소비량 분석

에너지 대사와 마우스의 무게와의 상관관계를 분석하기 위하여 OXYMAX CLAMS를 이용해 측정된 결과 값을 실험에 사용한 마우스의 체중 및 CL-316,243의 투여 여부에 따라 확인하였다. CL-316,243 처리 전 (20:00~08:00) (상단), CL-316,243 처리 후 (20:00~08:00) (하단). 대조군 (n=12), *CRTC3* BAT O.E (n=10).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

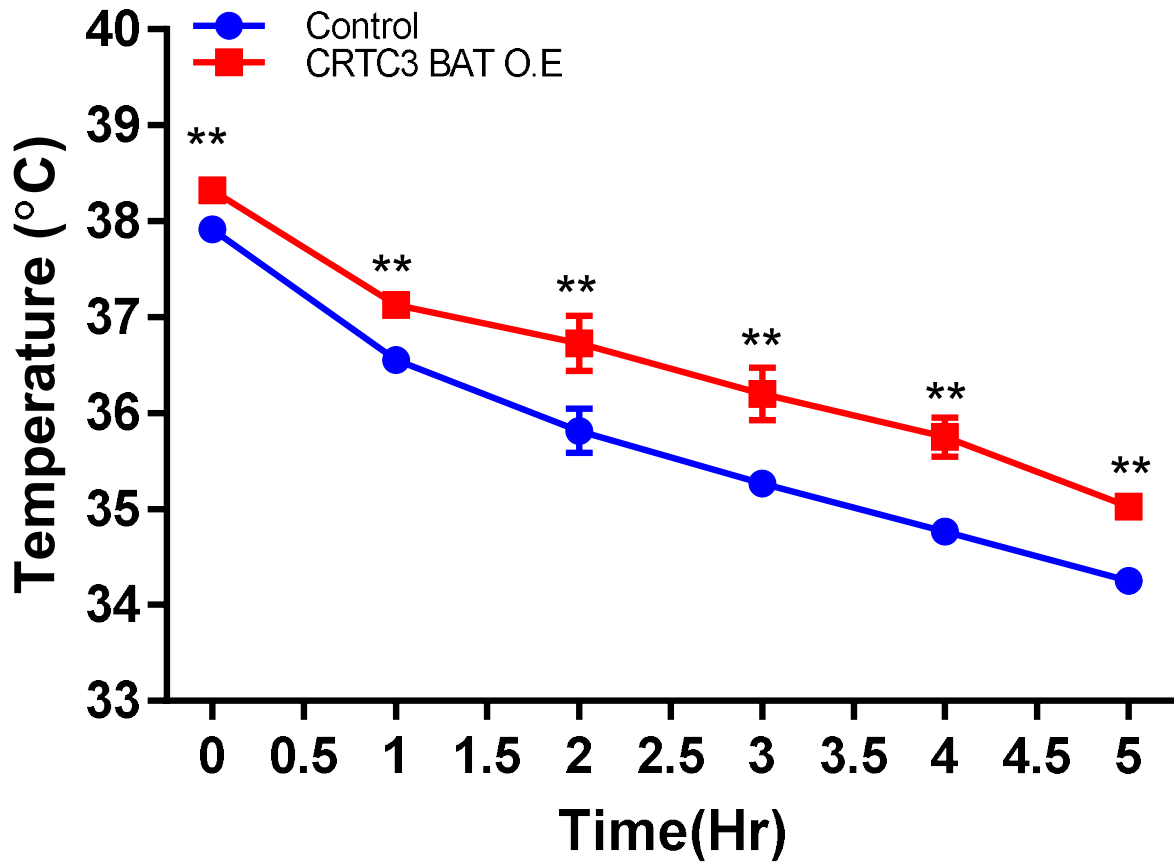


그림 11. *CRTC3* 과발현 마우스 추위 저항성 시험

두 그룹간 에너지 대사량의 차이를 보는 또 하나의 지표인 체온조절을 확인하기 위하여, 금식 후 6 시간이 지난 20 주령의 마우스를 4°C 콜드 룸에서 직장 체온계를 이용하여 체온을 측정하였으며, 변인 통제를 위하여 깔짚을 모두 제거하였다. 마우스의 저체온에 의한 쇼크사를 방지하기 위하여 체온이 30°C 이하로 내려가지 않도록 하였다. 대조군 (n=6), *CRTC3* BAT O.E (n=4).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, p<0.05, p<0.01, p<0.001 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

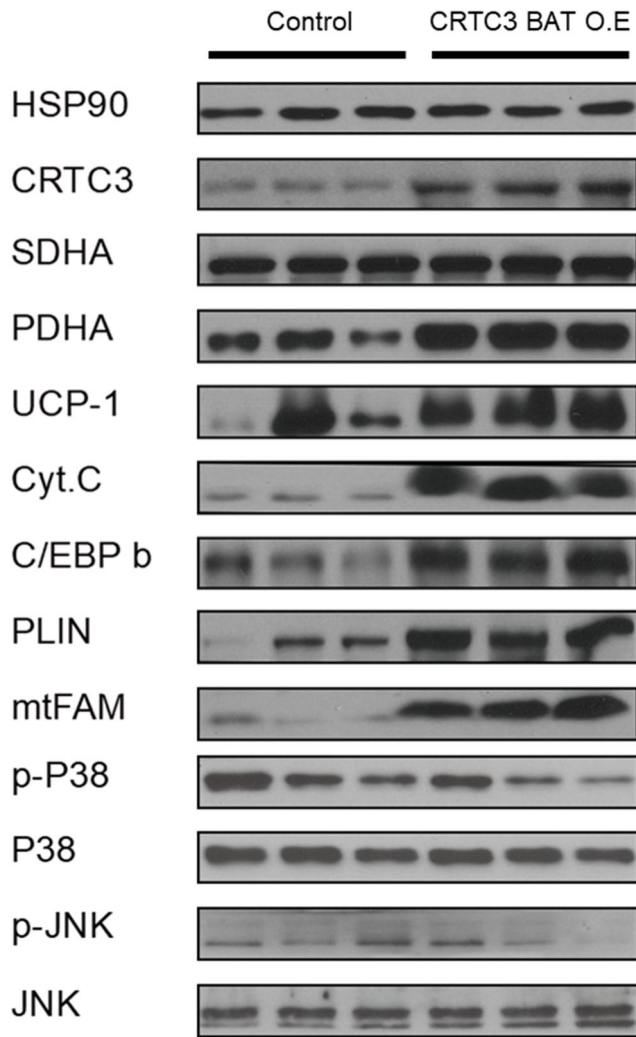


그림 12. *CRTC3* 과발현 마우스 웨스턴 블롯

대사실험을 완료한 마우스의 단백질 발현량을 확인하기 위해 일반사료 섭식 군의 대조군과 실험군의 갈색지방 시료를 이용하여 웨스턴 블롯을 하였으며 HSP90 를 로딩 컨트롤로 사용하였다.

(Cyt.C: Cytochrome C, C/EBP b: CCAAT/ enhancer binding protein beta, PLIN: perilipin, mtFAM: mitochondria transcription factor, tfa)

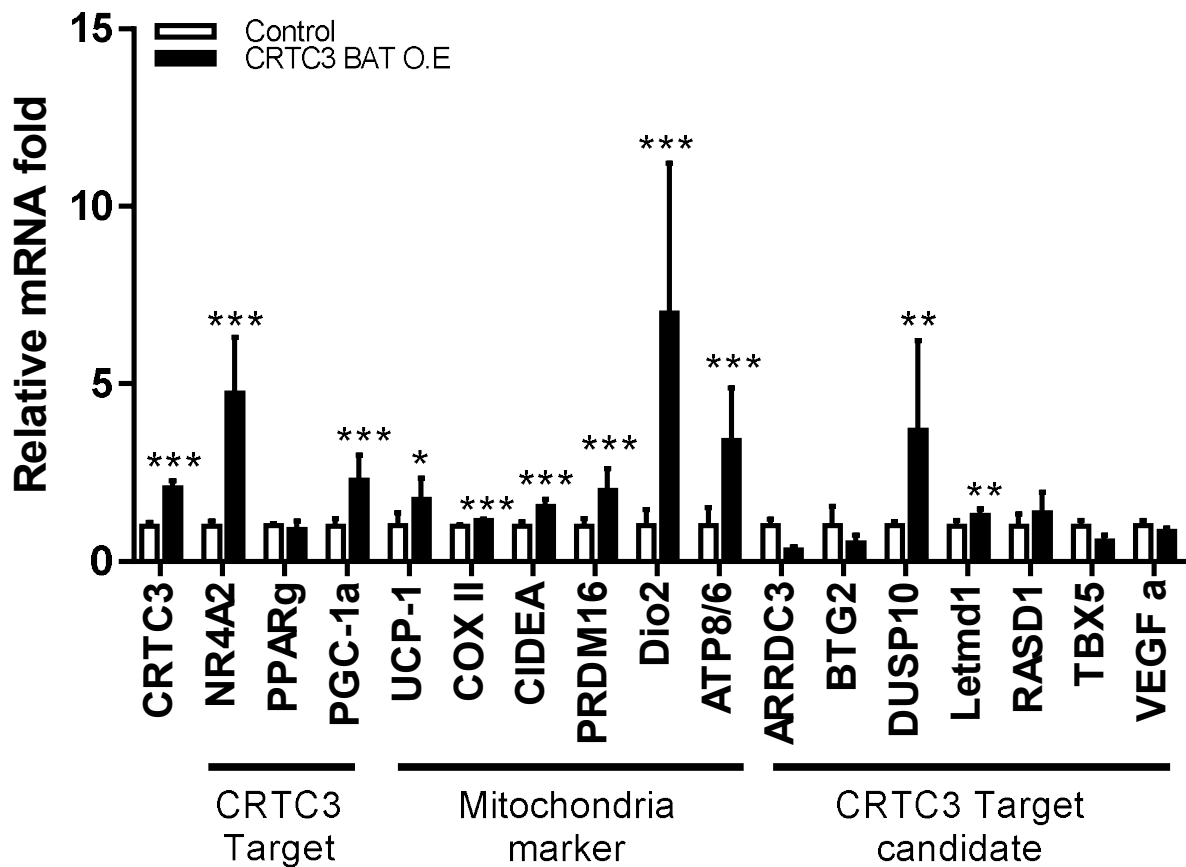


그림 13. *CRTC3* 과발현 마우스 mRNA 발현량 비교

CRTC3 과발현에 따른 미토콘드리아 유전자 및 *CRTC3* 타겟 후보군의 발현량을 확인하기 위해 qRT-PCR 을 통해 확인하였으며 L32 를 로딩 컨트롤로 사용하였다. 대조군 (n=3), *CRTC3* BAT O.E (n=3).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, p<0.05, p<0.01, p<0.001 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

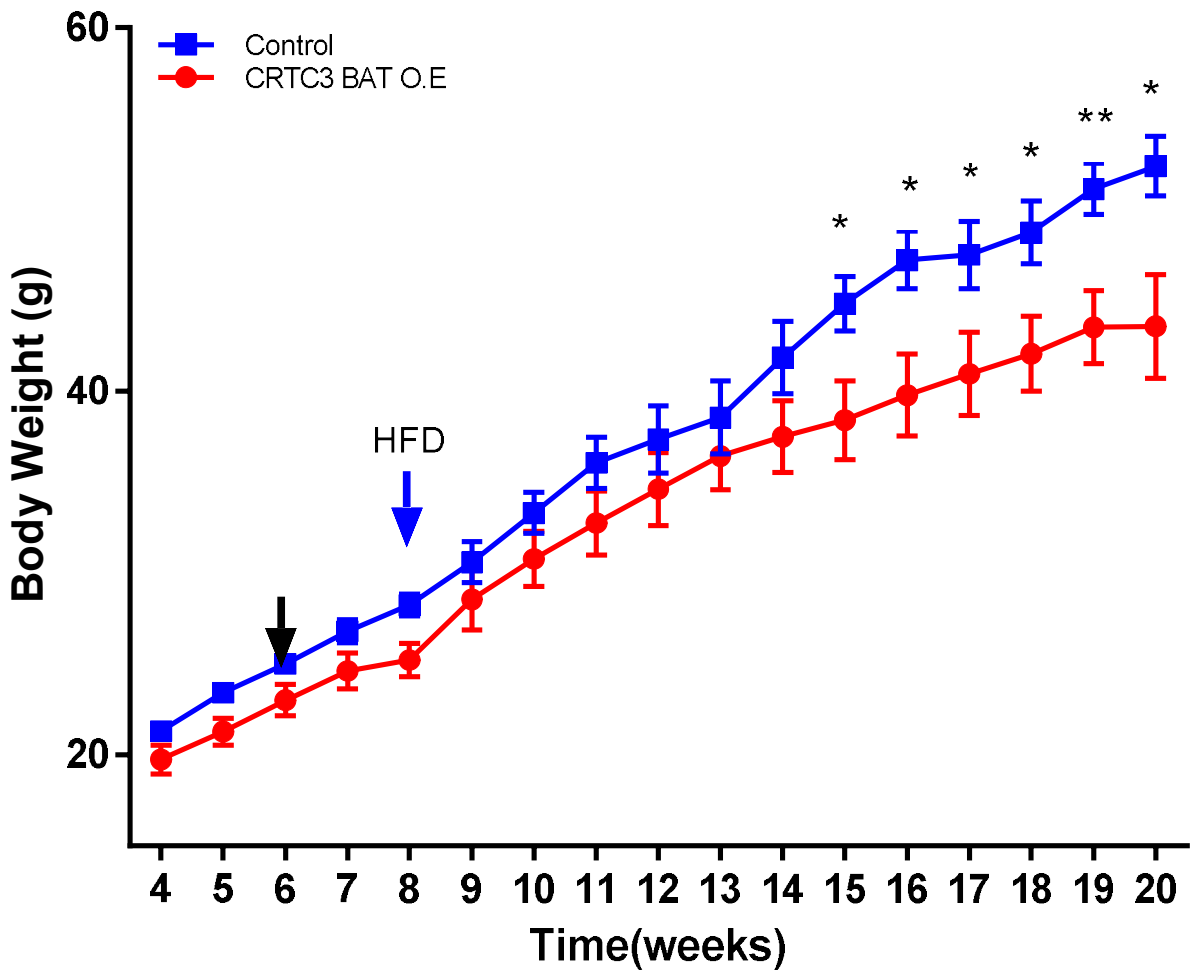


그림 14. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 고지방 섭식 마우스 무게 추이

60% 고지방 식이가 두 그룹에 주는 영향과 주령에 따른 무게의 차이를 비교하기 위해 4 주령부터 매주 무게를 측정하여 비교하였다. 마우스가 6 주령이 되었을 때 Tamoxifen 을 4 주마다 주 3 회 경구로 투여해 주었으며, 고지방 사료는 생후 8 주령부터 자율 섭식방식으로 제공하였다. 대조군 (n=16), *CRTC3* BAT O.E (n=16).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

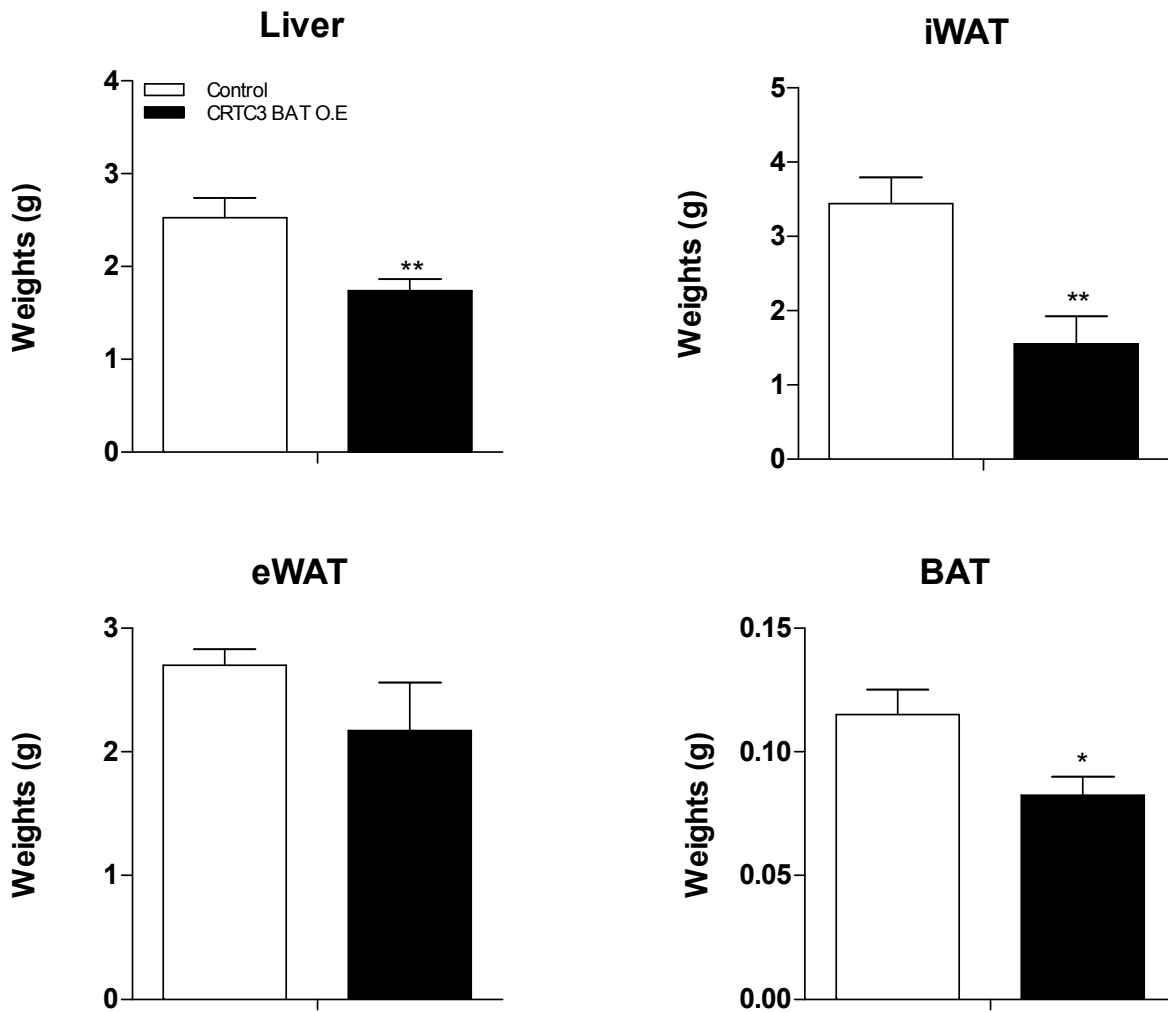


그림 15. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 조직 무게 비교

실험군 간의 고지방 식이에 의한 비만유도의 차이를 확인하기 위하여 24 주령 이후의 마우스를 해부 이후 간, 백색지방, 갈색지방 등의 무게를 측정하였다. 대조군 (n=6), *CRTC3* BAT O.E (n=8).

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

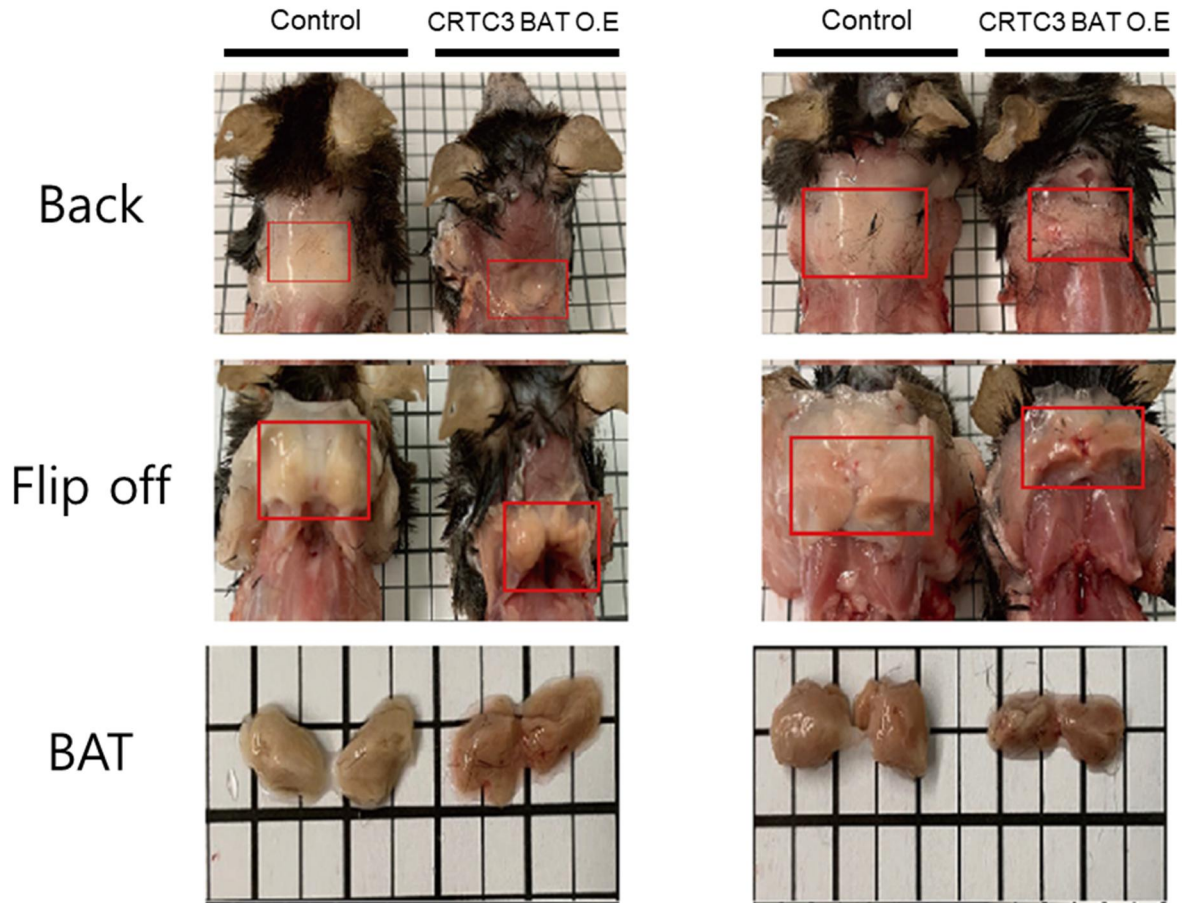
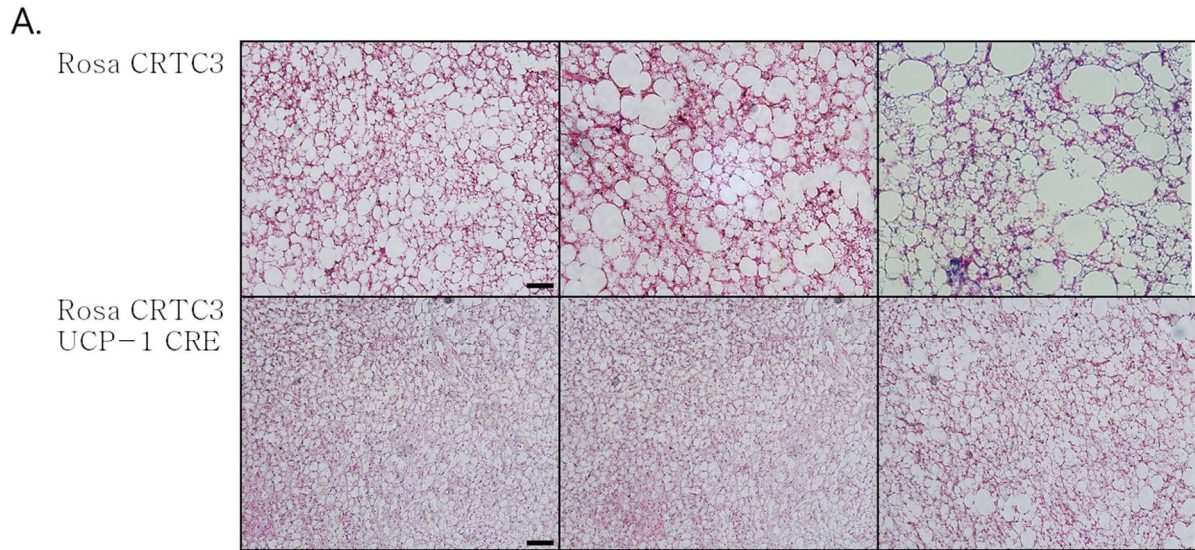


그림 16. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 갈색지방 차이 비교

두 그룹간의 고지방식으로 인한 비만 유도 후 갈색지방의 색깔, 크기 등의 차이를 확인하였다. 실험의 사용한 모눈의 크기는 각 0.25 cm²이다.



B.

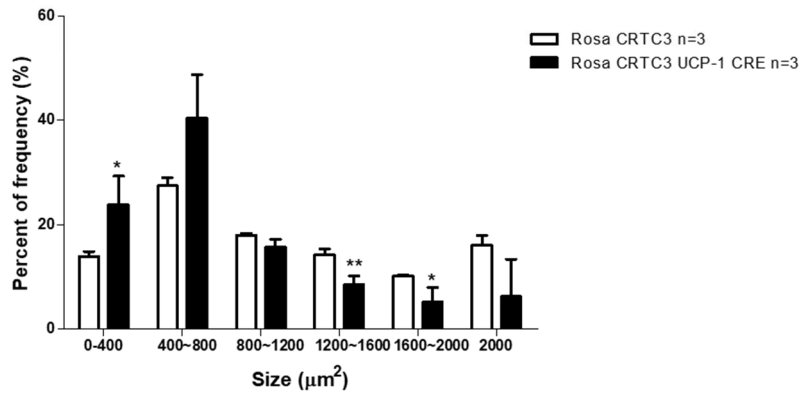


그림 17. 고지방 식이) *CRTc3* 과발현 마우스 갈색 지방 조직 H&E

고지방식이로 인한 갈색지방의 백색지방 침투가 확인이 되어 갈색지방의 조직학적 차이를 확인하기 위하여 파라핀에 포매한 조직 절편을 H&E 염색을 통해 관찰하였으며 (그림 16.A), 군 간의 지방세포의 크기를 확인하기 위해 ImageJ 플러그인을 통하여 확인하였다. (그림 16.B) 대조군 (n=3), *CRTc3* BAT O.E (n=3).

스케일 바 크기: 100 μm , 배율: 400 배

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

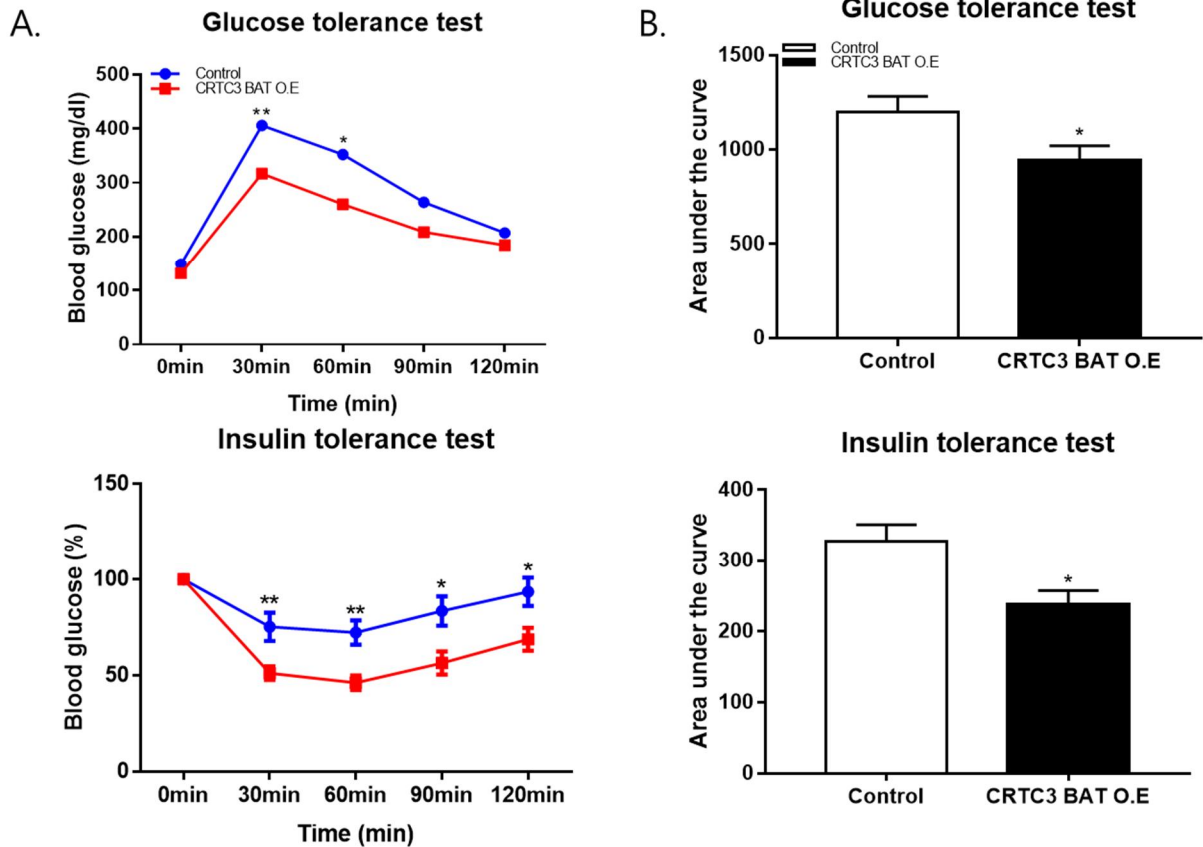


그림 18. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 당 부하, 인슐린 저항성 시험

고지방식이에 의한 비만유도가 당 항상성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 16 주령의 마우스를 6 시간 금식 후 꼬리 채혈을 통해 혈액을 채취해 당부하 검사 (그림 17.A 상단), 와 인슐린 저항성 검사 (그림 17.B)를 하였다. 대조군 (n=6), *CRTC3* BAT O.E (n=9).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

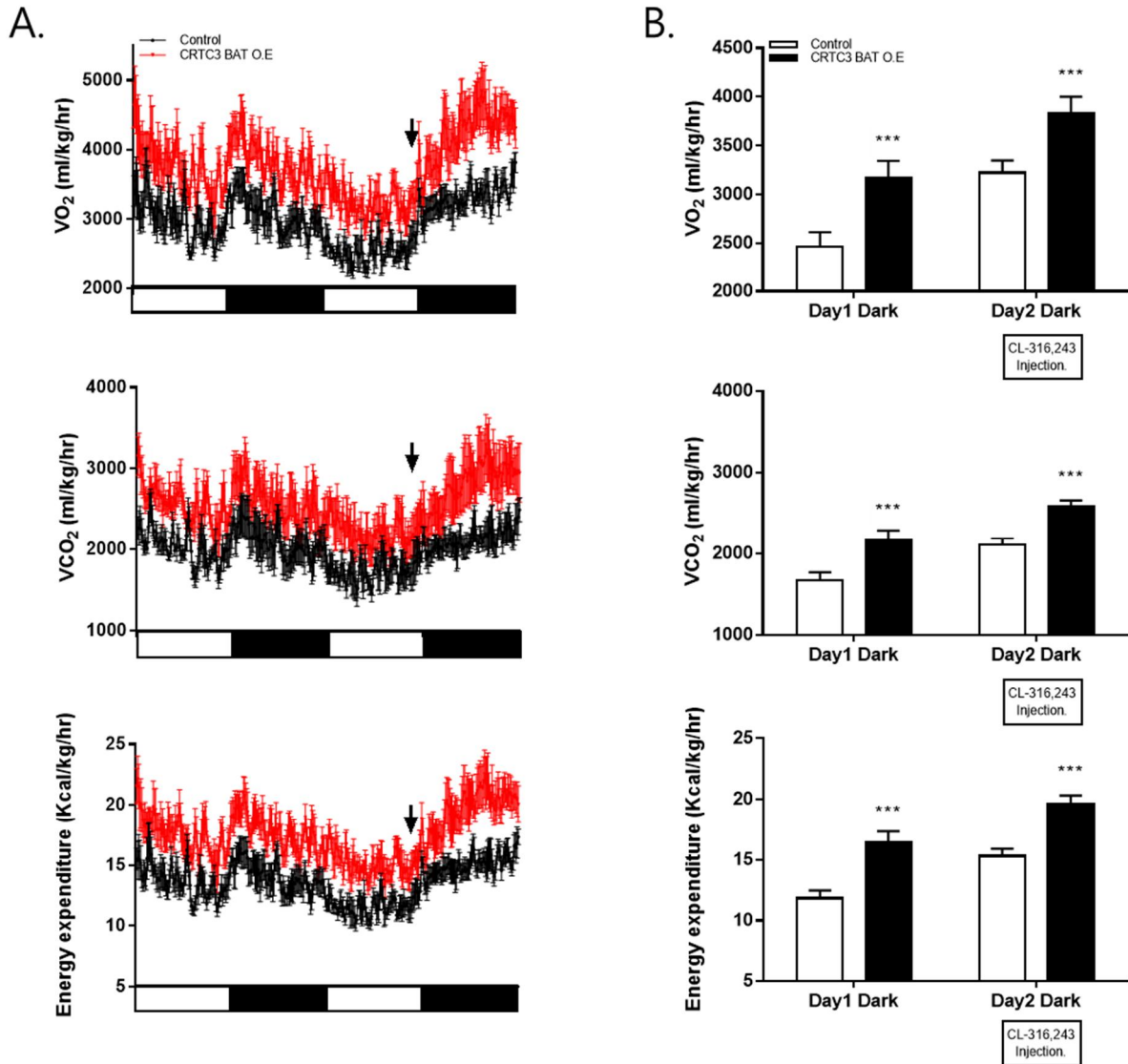
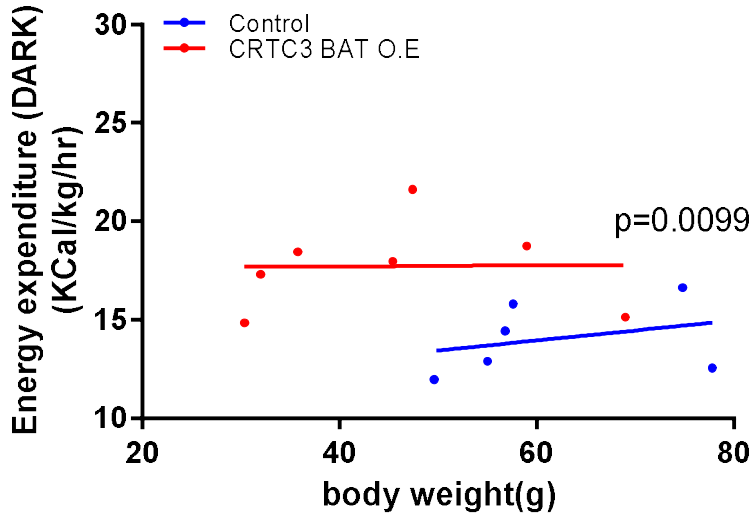


그림 19. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 메타볼릭 케이지 실험

두 그룹간의 비만에 따른 에너지 대사능의 차이를 확인하기 위하여, 20 주령의 마우스를 OXYMAX CLAMS 를 이용하여 측정하였고 마우스가 기계에 적응하는 기간은 제외하였다. 실험 개시 후 둘째 날 밤이 시작될 때 CL-316,243 (0.1 μ g/g)을 복강투여 하였다. (그림 18.A 화살표) 각각의 지표는 마우스 활동이 최고조에 달하는 시간대를 막대 도표화 (오전 12~4 시) 하였다. (그림 18.B) 대조군 (n=6), *CRTC3* BAT O.E (n=7).

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

CL-316,243 주사 이전



CL-316,243 주사 이후

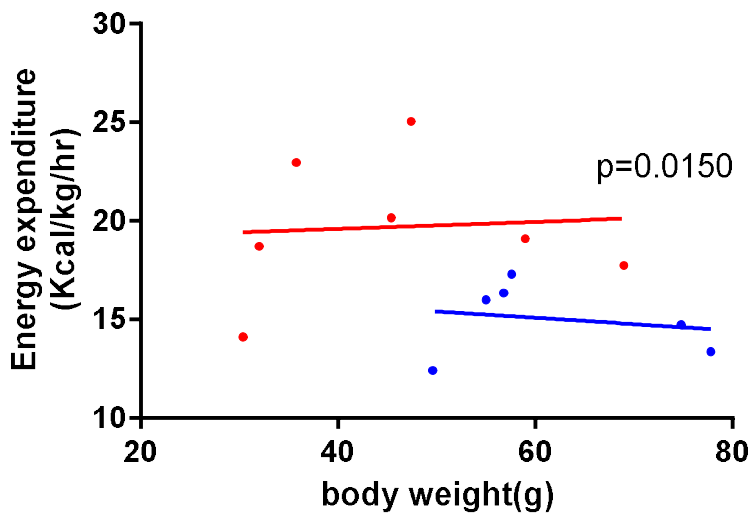


그림 20. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 무게당 에너지 소비량 차이 분석

비만이 유도된 마우스의 에너지 대사와 무게의 상관관계를 분석하기 위하여 OXYMAX CLAMS를 이용해 측정된 결과 값을 실험에 사용한 마우스의 체중 및 CL-316,243의 투여 여부에 따라 확인하였다. CL-316,243 처리 전 (20:00~08:00) (상단), CL-316,243 처리 후 (20:00~08:00) (하단). 대조군 (n=6), *CRTC3* BAT O.E (n=7).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

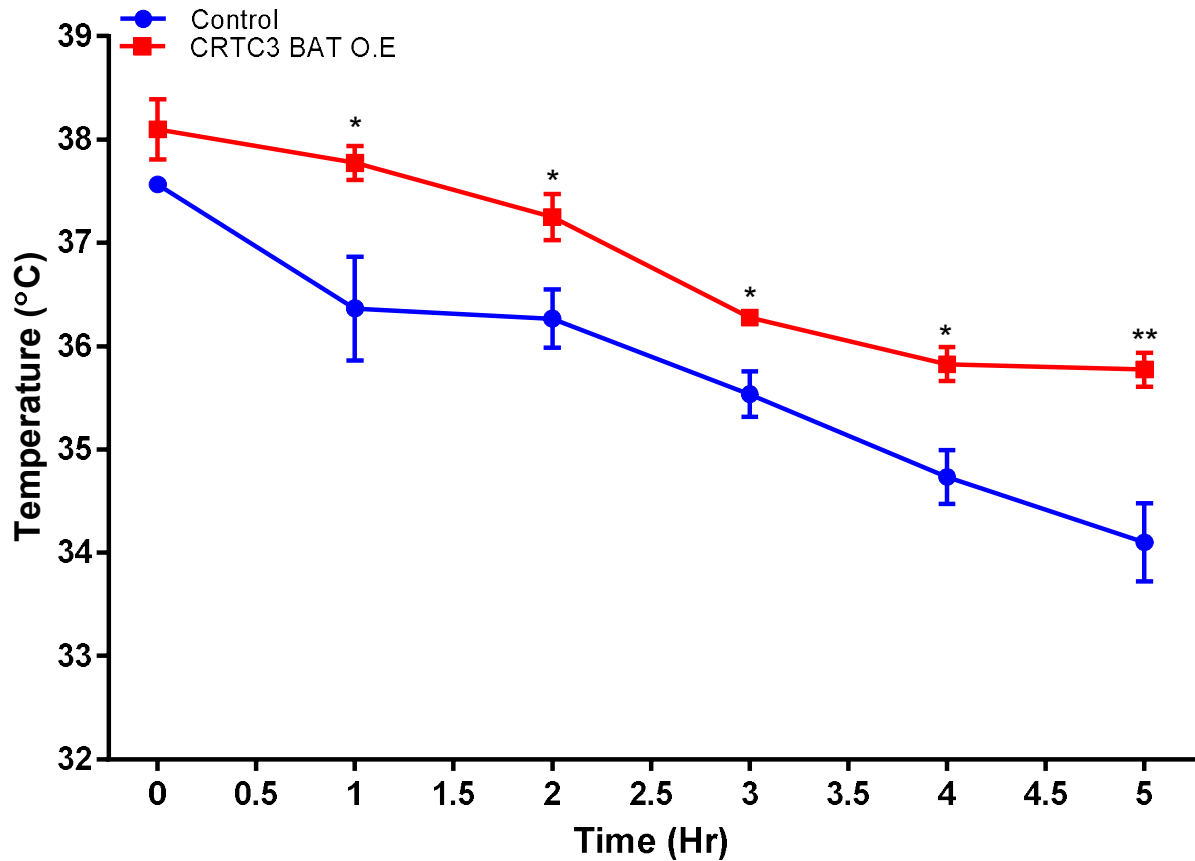


그림 21. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 추위 저항성 시험

비만에 따른 갈색지방의 활동성의 차이가 체온조절에 미치는 영향을 확인하기 위하여 4°C 콜드 룸에서 6시간 이상 금식한 마우스의 직장체온을 측정하였으며, 마우스의 저체온으로 인한 쇼크사를 방지하기 위하여 체온이 30°C 이하가 되지 않도록 하였다. 대조군 (n=3), *CRTC3* BAT O.E (n=4).

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음

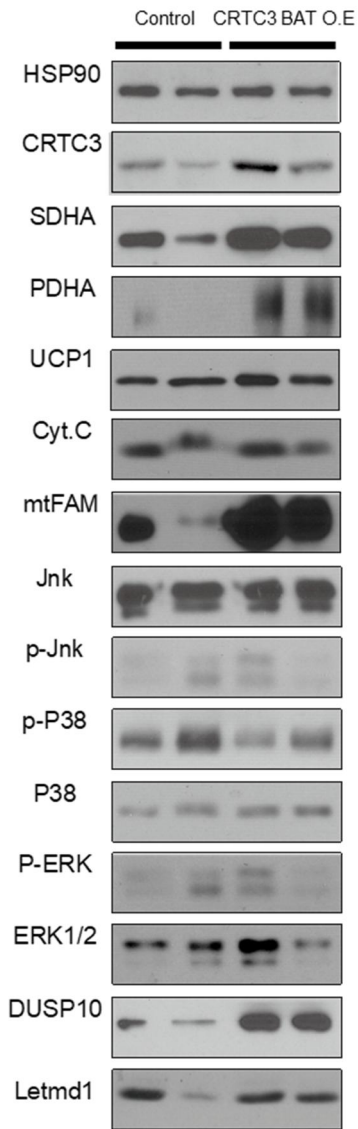


그림 22. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 웨스턴 블롯

대사실험을 완료한 마우스의 단백질 발현량을 확인하기 위해 고지방 사료 섭식 군의 대조군과 실험군의 갈색지방 시료를 이용하여 웨스턴 블롯을 하였으며 HSP90를 로딩 컨트롤로 사용하였다.

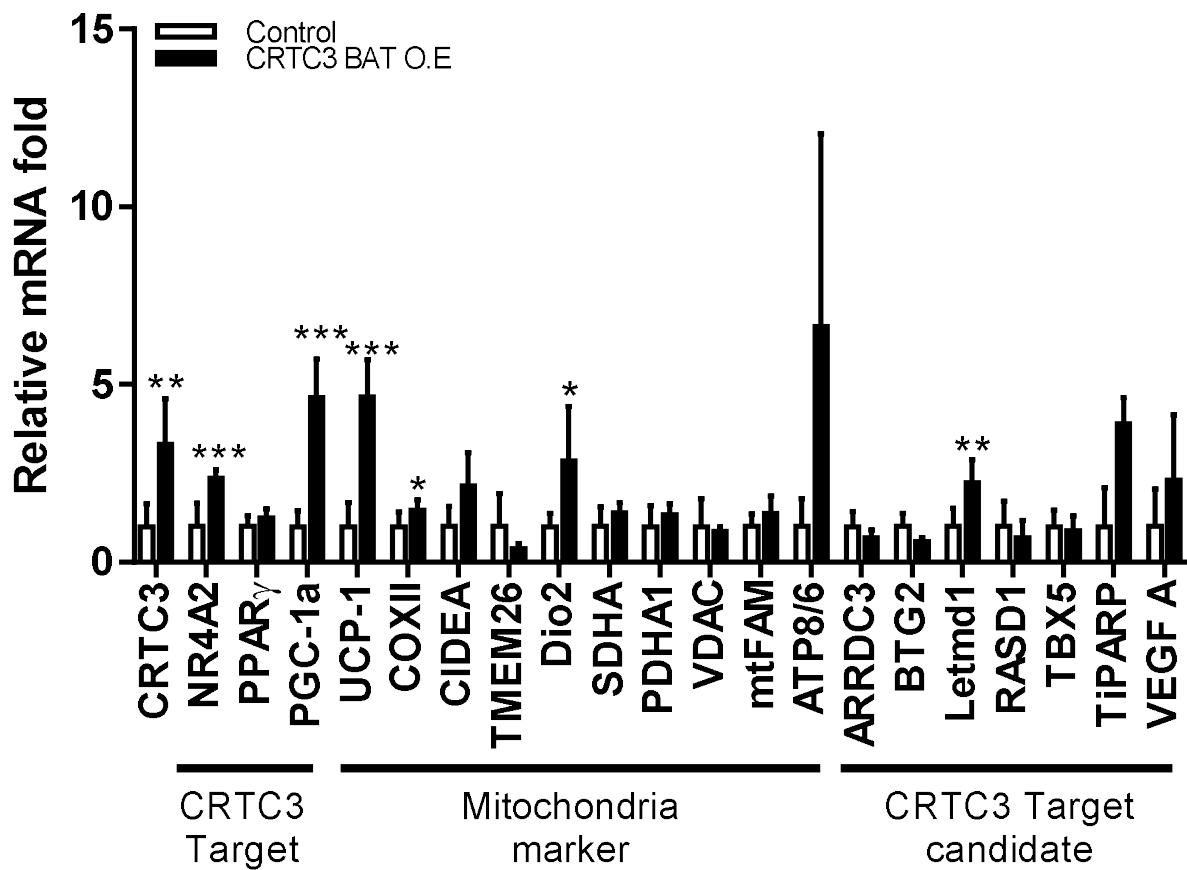


그림 23. 고지방 식이) *CRTC3* 과발현 마우스 mRNA 발현량 비교

고지방 사료 섭식 군에서 일반사료 섭식 군과 미토콘드리아 유전자 및 *CRTC3* 타겟 후보군의 발현량 변화에 유사성을 보이는지 확인하기 위해 qRT-PCR을 통해 확인하였으며 L32를 로딩 컨트롤로 사용하였다. 대조군 (n=3), *CRTC3* BAT O.E (n=3).

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 각각 *, **, ***로 표기하였음.

참고 문헌

- [1] Ershow A. G. (2009). Environmental influences on development of type 2 diabetes and obesity: challenges in personalizing prevention and management. *Journal of diabetes science and technology*, 3(4), 727–734.
- [2] Scheen A. J. (2003). Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta clinica Belgica*, 58(6), 335–341.
- [3] Al-Goblan, A. S., Al-Alfi, M. A., & Khan, M. Z. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, metabolic syndrome, and obesity : targets and therapy*, 7, 587–591.
- [4] Richard AJ, White U, Elks CM, et al. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. [Updated 2020 Apr 4]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.
- [5] Kajimura, S. Advances in the understanding of adipose tissue biology. *Nat Rev Endocrinol* 13, 69–70 (2017).
- [6] Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J. et al. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 13, 26–35 (2017).
- [7] Kajimura, Shingo & Seale, Patrick & Spiegelman, Bruce. (2010). Transcriptional Control of Brown Fat Development. *Cell metabolism*. 11. 257-62. 10.1016/j.cmet.2010.03.005.
- [8] Sanchez-Gurmaches, J., Guertin, D. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun* 5, 4099 (2014).

- [9] Scheja, L., Heeren, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* 15, 507–524 (2019).
- [10] C.J. Gordon, *Autonomic Nervous System: Central Thermoregulatory Control*, Editor(s): Larry R. Squire, *Encyclopedia of Neuroscience*, Academic Press, 2009, Pages 891-898, ISBN 9780080450469.
- [11] Oelkrug, R., Polymeropoulos, E. T., & Jastroch, M. (2015). Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 185(6), 587–606.
- [12] Singh Rajan, Braga Melissa, Pervin Shehla, Regulation of brown adipocyte metabolism by myostatin/follistatin signaling, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2, 2014, page 60.
- [13] sidro ML, Cordido F. Drug treatment of obesity: established and emerging therapies. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2009 Jun;9(6):664-673.
- [14] Lowell, B., Spiegelman, B. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652–660 (2000).
- [15] Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual review of nutrition*, 27, 79–101.
- [16] Chechi K, Nedergaard J, Richard D (2014) Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev* 15:92–106.
- [17] Seale P, et al. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454: 961–967

- [18] Bittinger MA, et al. (2004) Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. *Curr Biol* 14:2156–2161.
- [19] Song, Y., Altarejos, J., Goodarzi, M. et al. CRTC3 links catecholamine signalling to energy balance. *Nature* 468, 933–939 (2010).
- [20] Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L. & Curtin, L. R. Prevalence, and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *J. Am. Med. Assoc.* 303, 235–241 (2010)
- [21] Lafontan, M. & Langin, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* 48, 275–297 (2009)
- [22] Conkright, M. D. et al. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol. Cell* 12, 413–423 (2003)
- [23] Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16–23 (2007)
- [24] Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Go“rgu“n, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336.
- [25] Han, M.S., Jung, D.Y., Morel, C., Lakhani, S.A., Kim, J.K., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity induced insulin resistance and inflammation. *Science* 339, 218–222.
- [26] Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007b). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16–23.

- [27] Carlson, C. J., Koterski, S., Sciotti, R. J., Poccard, G. B., & Rondinone, C. M. (2003). Enhanced Basal Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Adipocytes from Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 52(3), 634-641. Accessed April 25, 2021.
- [28] Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K. et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182–186 (1994).
- [29] Zhang Y, Nguyen T, Tang P, et al. (2015). Regulation of Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance by MAPK Phosphatase 5. *The Journal of biological chemistry*, 290(24), 14875–14883.
- [30] Cannon, B., Nedergaard, J. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). *Int J Obes* 34, S7–S16 (2010).
- [31] Poulsen, L. I., Siersbæk, M., & Mandrup, S. (2012). PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(6), 631–639.
- [32] Tasoulas, J., Rodon, L., Kaye, F. J., Montminy, M., & Amelio, A. L. (2019). Adaptive Transcriptional Responses by CRTC Coactivators in Cancer. *Trends in cancer*, 5(2), 111–127.
- [33] Shan, T., Xiong, Y., Zhang, P. et al. Lkb1 controls brown adipose tissue growth and thermogenesis by regulating the intracellular localization of CRTC3. *Nat Commun* 7, 12205
- [34] Altarejos, J. Y., & Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(3), 141–151.
- [35] Jaeschke, A., Czech, M. P., & Davis, R. J. (2004). An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes & development*, 18(16), 1976–1980.

- [36] Bennett, B.L., Satoh, Y., and Lewis, A.J. 2003. JNK: A new therapeutic target for diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 420–425.
- [37] Lee, Y.H., Giraud, J., Davis, R.J., and White, M.F. 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 278: 2896–2902.
- [38] Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pagès, G., Pouyssegur, J., Le Marchand-Brustel, Y., & Binétruy, B. (2005). The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes*, 54(2), 402–411.
- [39] Ussar S, Lee K, Dankel S, Boucher J, Haering M, Kleinridders A, et al. ASC-1, PAT2, and P2RX5 are cell surface markers for white, beige, and brown adipocytes. *Sci Transl Med.* 2014; 6:247ra103
- [40] Petrovic N, Walden T, Shabalina I, Timmons J, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adi. *J Biol Chem.* 2010; 285:7153-64
- [41] Wu J, Boström P, Sparks L, Ye L, Choi J, Giang A, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012; 150:366-76
- [42] Joan Sanchez-Gurmaches, David A. Guertin, Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume

1842, Issue 3, 2014, Pages 340-351, ISSN 0925-4439,
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.027>.

[43] Feriod, C.N., Gustavo Oliveira, A., Guerra, M.T., Nguyen, L., Mitchell Richards, K., Jurczak, M.J., Ruan, H.-B., Paulo Camporez, J., Yang, X., Shulman, G.I., Bennett, A.M., Nathanson, M.H. and Ehrlich, B.E. (2017), Hepatic inositol 1,4,5 trisphosphate receptor type 1 mediates fatty liver. *Hepatology Communications*, 1: 23-35.
<https://doi.org/10.1002/hep4.1012>

[44] Lu Y, Ma J, Zhao J, Song Z, Zhou C, Liu X, Teng W, Wang W, Zhang Q, Yan W, Jiao P: The Role of MKP-5 in Adipocyte-Macrophage Interactions during Obesity. *Obes Facts* 2020; 13:86-101. doi: 10.1159/000505343

[45] Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 15;79(2):208-17. doi: 10.1093/cvr/cvn098. Epub 2008 Apr 22. PMID: 18430751.

[46] Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP, et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1 [published correction appears in *Nature*. 2016 Aug 18; 536(7616):360]. *Nature*. 2016; 532(7597):112-116.

Abstract

Obesity is the common disease in the world. More than 1/3 of the world's population is obese, increasing year by years. It caused by an imbalance in energy consumption and storage due to over-nutrition, that chronic excess nutrients accumulating in the body in the form of fat. Obesity is known to cause many metabolic diseases and complications such as type 2 diabetes, cardiovascular disease, dys-lipidemia, kidney diseases. Recently many studies are focused on at reducing energy intake and increasing energy consumption rate. Our recent study has revealed that deletion of CRTC3, transcription co-factor of CREB, can prevent obesity and T2D (Type 2 diabetes). So, this study investigates the hypothesis that obesity can be controlled by regulating CRTC3, shown in previous studies, when the expression of CRTC3 is increased or decreased in brown fat, known as a major organ in energy metabolism, to study the tissue-specific role of CRTC3 and its sub-mechanism. We show no difference in phenotypes between controls and experimental groups in brown fat-specific CRTC3 Knock- out models, but CRTC3 over-expression mice show loss of weight gain, increased insulin sensitivity, glucose tolerance, energy consumption, and cold tolerance. In addition, we confirmed that mitochondrial-related proteins such as UCP1, SDHA, PDHA1, and mtFAM were increased in CRTC3 over-expressed mice. In this study, CRTC3 increased the number of mitochondria in brown, compared to knock-out in the whole body, indicating that the effect of CRTC3 was not caused by a single organ, but by several organs, such as the liver and muscle.

Keyword: Obesity, Type 2 diabetes, CRTC3, CREB, Mitochondria, PGC1 α , UCP1, Energy expenditure.