



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

갈색지방조직에서의 자가포식작용의 기능  
연구

Study on the function of autophagy in brown adipose  
tissue

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 동 환

갈색지방조직에서의 자가포식작용의 기능  
연구

지도교수      송 영 섭

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2018년 12월

울산대학교대학원

의학과

김동환

김동환의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 이 명 섭 인

심사위원 송 영 섭 인

심사위원 강 상 옥 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2018 년 12 월

## 국문 요약

급격한 식생활양식의 변화로 인한 비만인구의 급증에 따라 2016 년 기준 국내 비만인구는 34.5 %에 육박하게 되었다. 비만은 인체에서 흡수된 에너지와 소비된 에너지의 불균형이 계속적으로 지속되는 상황에서 인체 잉여에너지가 지방조직에 과다하게 축적되어 생기는 의학적 현상으로 알려져 있다. 이러한 비만의 예방 및 치료를 위하여 에너지 섭취와 에너지 소비의 조절 기전 이해에 연구의 관심이 집중되고 있다. 본 연구에서는 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 자가포식작용 (autophagy)의 갈색지방에서의 에너지 대사 조절에 초점을 맞춘 연구를 진행하였다. 아직 분화된 갈색지방 (brown adipose tissue)에서의 자가포식작용을 억제하였을 때 어떠한 변화가 일어나는지 알려지지 않았기에 갈색지방 특이적 자가포식작용 억제를 통한 에너지 소비의 변화를 알아보기 위해 autophagosome 형성에 필수적인 유전자로 알려진 ATG knockout(KO) 생쥐를 모델로 연구를 진행하였다. 흥미롭게도 갈색지방에서 특이적으로 자가포식작용을 억제하였을 때 생쥐의 몸무게 감소를 보였으나 사료섭취량은 대조군과 변화가 없었다. 메타볼릭 케이지 실험을 통한 대사작용을 측정된 결과 자가포식작용이 억제된 생쥐에서 산소 소비량, 이산화탄소 배출량, 에너지 소비량이 증가하는 것을 확인하였다. 갈색지방에서 자가포식작용을 억제시켰을 때 에너지 소비량이 증가한다고 확인하여 조직을 통한 분석을 진행하였고 자가포식작용이 억제된 생쥐의 갈색지방에서 미토콘드리아 관련 mRNA 와 단백질들이 증가하는 것을 확인하였다. 연구결과로 유추해 보았을 때 갈색지방에서 자가포식작용은 기능을 다한 미토콘드리아 뿐만 아니라 온전한 미토콘드리아까지도 제거하는 것으로 보여지며 따라서 자가포식작용의 억제에 의해 미토콘드리아의 제거가 줄어들어 미토콘드리아 막 단백질인 uncoupling protein 1 (UCP1)의 열발생에 의한 에너지 소비가 증가되었을 것으로 사료된다.

계속되는 연구를 통하여 갈색지방에서의 자가포식작용 억제에 의한 에너지 대사 변화의 정확한 메커니즘을 파악하는 것이 중요할 것으로 보인다.

(중심단어) 비만, 갈색지방, ATG7, UCP1, 자가포식작용, 미토콘드리아

## 차례

국문 요약 .....	i - ii
차례 .....	iii - iv
그림 목차 .....	v - vi
서론 .....	1 - 8
연구방법 .....	9 - 17
1. 실험 동물 .....	9
2. 타목시펜 투여 .....	10
3. Glucose Tolerance Test (GTT), Insulin Tolerance Test (ITT) .....	11
4. 메타볼릭 케이지 연구 .....	11
5. 조직 파라핀 블록 제작 .....	12
6. 조직 H&E 염색 .....	12
7. western blot .....	13
8. mRNA 측정 .....	14
9. 통계 분석 .....	17
결과 .....	18 - 22

1. ATG7 fl/fl;UCP1-CRE <sup>ERT</sup> 돌연변이 생쥐 구축.....	18
2. 타목시펜 투여를 통한 갈색지방조직에서의 ATG7 유전자의 KO.....	18
3. 대조군과 실험군간의 대사작용.....	19
4. 대조군과 실험군간의 인슐린 민감성.....	20
5. 대조군과 실험군간의 조직 Morphology.....	20
6. 대조군과 실험군간의 단백질 및 mRNA 측정.....	21
고찰.....	23-26
참고문헌.....	41-44
Abstract.....	45



## 그림 목차

그림 1. 자가포식작용 형성.....	2
그림 2. 자가포식작용 종류.....	3
표 1. Genotype primer sequence.....	9 - 10
표 2. Primer sequence.....	15 - 16
그림 3. ATG7 fl/fl;UCP1-CRE <sup>ERT</sup> 모델 생쥐 구축.....	27
그림 4. 두 그룹의 tail genotype.....	28
그림 5. 갈색지방 특이적 ATG7 KO 확인.....	29
그림 6. 타목시펜 사료를 제공한 생쥐의 몸무게 분석.....	30
그림 7. 타목시펜 경구투여를 이용한 생쥐의 몸무게 분석 .....	31
그림 8. 두 그룹간의 조직 무게 분석.....	32
그림 9. 두 그룹의 갈색지방 비교 분석 .....	33
그림 10. 두 그룹간의 몸무게와 사료섭취량 분석 .....	34
그림 11. 두 그룹간의 대사불리 케이지 실험 비교 분석.....	35
그림 12. 두 그룹간의 인슐린 민감성 비교 분석.....	36
그림 13. 두 그룹간의 갈색지방 morphology 분석 .....	37
그림 14. 두 그룹간의 미토콘드리아 관련 단백질 western blot.....	38

그림 15. 두 그룹간의 mRNA 측정 .....39

그림 16. 갈색지방에서의 특이적 *ATG7* KO에 대한 메커니즘 .....40

## 서론

### 자가포식작용 (Autophagy)

자가포식작용 (Autophagy)이란, 그리스어로 ‘auto’ (스스로)와 ‘phagy’ (먹는다)라는 단어를 합성한 것으로 우리말로 자가포식이라는 말로 번역되어 사용된다. 일반적으로 세포 내에서 여러 원인으로 손상되어 더 이상 필요하지 않거나 수명이 다한 단백질이나 소포체, 미토콘드리아, 퍼옥시좀, 핵이나 라이보솜 같은 세포소기관을 스스로 분해하고 분해된 산물을 재활용 하는 세포의 항상성, 생존에 중요한 기전으로 알려져 있다. 자가포식작용은 특히 공복상태나 스트레스 상태에서 활발히 이루어진다고 알려져 있다<sup>[1]</sup>.

### 자가포식작용의 형성

자가포식작용은 autophagosomal membrane으로 알려진 이중막의 phagophore 형성에 의해 시작된다. 이 phagophore가 불필요한 제거하려는 세포내의 성분이나 세포소기관들을 에워싸기 시작하고 완전히 에워싸 형성된 autophagosome은 lysosome으로 운반되어 lysosome과 autophagosome의 융합 (fusion)으로 인해 형성되는 autolysosome에서 분해가 이루어진다<sup>[2]</sup>. 이 phagophore 이중막의 연장에 의한 autophagosome의 형성에는 Autophagy-related gene (ATG)라 불리는 유전자가 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. *ATG5*와 *ATG12*은 융합을 통해 이중막을 중합 연장시키며 *ATG7*은 *ATG5*와 *ATG12*의 융합 조절에 관여하는 유전자로 autophagosome의 형성 및 기능에 필수적인 역할을 한다. 또한 불필요한 단백질이나 세포소기관을 autophagosome으로 에워싸 lysosome으로 운반하기 위해서는 그것을 구분 지을 수 있어야 하기 때문에 제거하려는 단백질에는 ubiquitin-proteasome system (UPS)를 이용한 유비퀴틴화에 의해 인식되거나 자가포식작용 수용체인 P62 단백질에 의해 인식되어

autophagosome의 이중막으로 이동하여 결합시키고 손상된 세포소기관은 ATG 단백질들이 결합하여 autophagosome의 이중막으로 운반한다<sup>[3]</sup>. 또 다른 자가포식작용 관련 유전자인 LC3도 ATG4B에 의해 LC3-1으로 잘리게 되는데 LC3-1이 phosphatidylethanolamine (PE)와 결합하면 LC3-2 형태가 되어 autophagosome 형성에 관여하고 autophagosome 막에 박히게 되어 cargo 수용체 역할을 하는데 LC3-1을 LC3-2로 활성화 시키는 것도 *ATG7* 유전자다<sup>[4,5]</sup>(그림 1). 이런 자가포식작용에 의해 세포 내의 불필요한 단백질과 세포소기관들을 제거하며 몸의 균형을 맞추어 줌으로써 몸의 대사활동을 조절하여 주는데 자가포식작용이 많이 일어나거나 적게 일어났을 때에는 질병이 발생하게 된다.

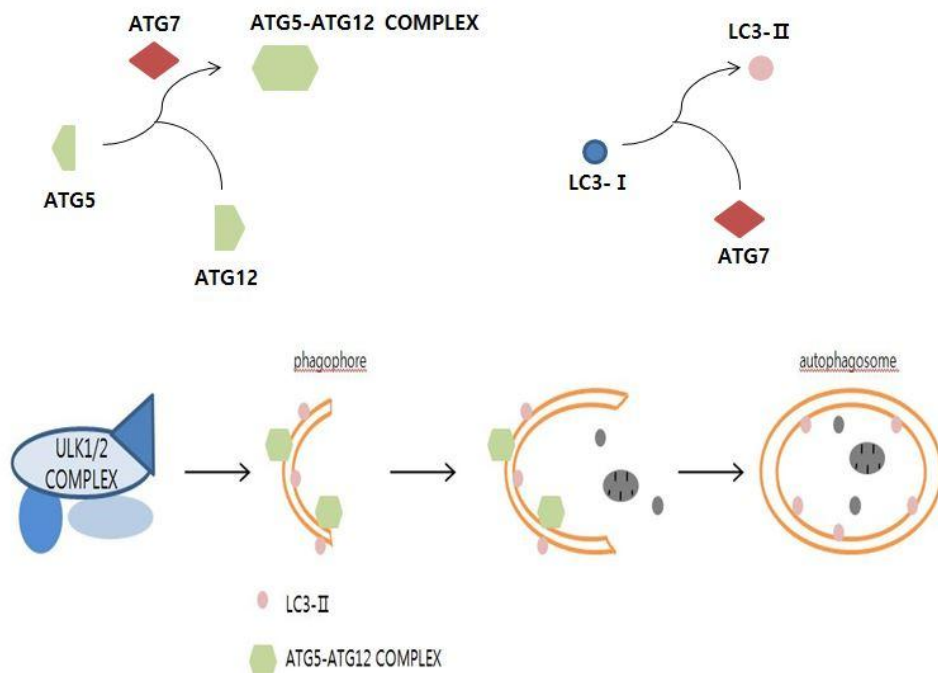


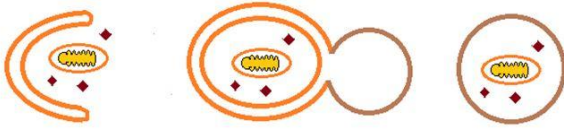
그림 1. 자가포식작용 형성<sup>[6]</sup>. *ATG7*은 *ATG5-ATG12* 복합체 형성과 *LC3-I*을 *LC3-II*로 활성화시켜 phagophore 막을 연장시키고 autophagosome을

형성하는 데 중요한 역할을 하는 유전자이다.

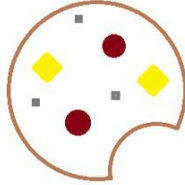
### 자가포식작용의 종류

자가포식작용은 불필요한 단백질과 세포, 세포소기관들을 분해하는 방식에 따라 macroautophagy, microautophagy, chaperone-mediated autophagy (CMA)로 나뉘게 된다. Macroautophagy는 위에서 설명한 것처럼 일반적인 자가포식작용을 나타내는 것으로 autophagosome 형성을 통한 lysosome과의 융합으로 자가포식을 하는 자가포식작용을 일컫는다. 에너지가 부족할 때에는 영양분을 분해하기 위하여 발생하게 되어 에너지를 생산하며 세포의 생존에 관여하고 일반적인 경우에는 손상된 세포나 세포소기관들을 제거하는데 관여한다. Microautophagy는 autophagosome 형성을 하지 않고 직접적으로 lysosome이 분해하고자 하는 cargo를 lysosome membrane에서 함입을 통한 섭취를 하여 직접 분해하는 자가포식작용이다. 다른 하나인 CMA는 chaperon이 직접적으로 분해하고자 하는 단백질에 결합하여 복합체를 형성하는데 이 복합체가 LAMP-2A (Lysosome-associated protein 2A)와 결합하여 lysosome 내부로 함입시켜 분해하는 자가포식작용이다<sup>[6]</sup>(그림 2). 본 연구는 이 세가지 자가포식작용 중 ATG 유전자에 의해 형성되는 autophagosome과 연관 있는 자가포식작용인 macroautophagy에 관련하여 연구하였다. ATG7은 ATG5-ATG12 복합체를 형성하는데 중요하며 기존에 발표된 연구결과에서 ATG7 유전자를 제거하였을 때 macroautophagy의 형성 및 기능을 저해하는 점에 착안하여 본 연구에서는 ATG7 유전자 제거를 이용하여 연구를 진행하였다.

### macroautophagy



### microautophagy



### Chaperon mediated autophagy

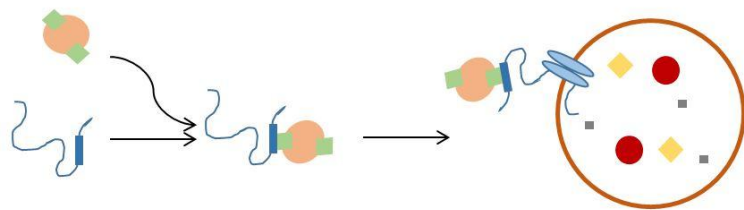


그림 2. 자가포식작용 종류 [6]. 불필요한 세포소기관, 단백질을 분해하는 중요한 역할을 하는 자가포식작용의 분해방식에 대한 3가지 분류를 나타낸 그림이다. Macroautophagy는 autophagosome 형성을 통해 lysosome과의 융합으로 분해하며 microautophagy는 lysosome 단독적인 함입을 통한 분해, chaperon mediated autophagy는 분해하고자 하는 단백질, 세포소기관에 chaperon의 결합을 통해 lysosome으로 운반되어 분해되는 방식을 나타낸다.

### 자가포식작용의 조절

자가포식작용은 매우 중요한 세포의 생존과 유지에 관련된 작용으로 자가포식작용의 기능장애는 여러 질병으로 이어질 수 있기에 우리 몸에서는 과하지도 덜하지도 않게 조절되고 있다. 자가포식작용은 불필요한 세포나 세포소기관을 제거하기 위해서도 일어나지만 공복으로 인해 부족해진 에너지의 보충을 위해 작동하기도 한다. 에너지가 부족하게 되면 ATP의 양이 줄고 AMP의 양이 늘어나기 때문에 AMP와 결합하는 AMP-activated protein kinase (AMPK)가 활성화 되

고 활성화된 AMPK는 mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)의 인산화를 유도하여 mTORC1의 기능을 억제한다. 그리하여 활성화된 자가포식작용에 의해서 세포 분해를 통한 영양분을 공급 받다가 AMP의 양이 줄어들면 AMPK의 활성화도 줄어들고 발생한 저산소증에 의한 산소부족, growth factor의 부족, 아미노산에 의해 mTORC1이 활성화 되어진다<sup>[7,8]</sup>. mTORC1이 활성화 되면 phagophore 형성에 관여하는 unc-51-like kinase family (ULK1/2)와 ATG13을 인산화시켜 결합하여 복합체를 형성해 자가포식작용을 억제시킨다<sup>[9,10]</sup>.

### 자가포식작용의 불균형에 의한 질환

앞서 언급한 바와 같이 macroautophagy는 autophagosome과 lysosome의 결합을 통해 분해하고자 하는 세포의 구성물질이나 세포소기관을 분해하는데 autophagosome-lysosome 융합에 문제가 생기면 autophagosome의 수가 증가, 축적되고 손상을 입은 단백질이나 세포소기관들이 축적되어 독성을 일으켜 질병이 발생하게 된다<sup>[6]</sup>. 또한 autophagosome 형성에 필수적인 beclin-1은 잘 알려진 tumor-suppressor protein으로 자가포식작용과도 연결되어 있다. 다른 자가포식작용 유전자들도 자가포식작용 발생을 통해 불필요한 단백질을 제거하며 미토콘드리아의 항상성을 유지시켜 주기에 암 발생을 억제하는 역할을 하기도 한다. 그런 자가포식작용 관련 유전자를 제거하면 자가포식작용의 억제에 의해 기능 저하된 미토콘드리아의 제거와 불필요한 단백질의 제거가 이루어지지 않아 축적되며 산화 스트레스가 증가하여 DNA에 손상이 가해져 암이 발생할 수 있는 여건이 된다. 또한 자가포식작용 수용체 단백질인 P62가 축적되면 NF- $\kappa$ B나 mTORC1같은 종양형성 신호들과 교감하여 종양형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>[5,11]</sup>. 자가포식작용 유전자 중 하나인 ATG7이 종양 억제 유전자인 p53과도 연관되어 있어서 영양분이 부족한 상태일 때 ATG7이 종양 억제 유전

자인 *p53*과 결합하여 cell cycle과 세포사멸을 조절하지만 *ATG7*을 제거한 상태에서는 *p53*에 의존적인 cell cycle도 증가하게 되고 cell cycle inhibitor인 p21 단백질의 발현도 감소시켜 암세포의 발현 가능성을 더 증가시킨다<sup>[12]</sup>. 하지만 자가포식작용이 손상된 세포소기관을 제거함으로써 산화 스트레스 등 세포에 독성을 나타낼만한 요소들을 제거하여주기 때문에 대사 스트레스를 받아가며 살아가는 종양세포의 생존과 종양의 생성을 이로운 방향으로 이끌어내기도 한다<sup>[13]</sup>. 비만과도 관련 있는 식욕 억제 작용을 나타내는 신경세포로 알려진 pro-opiomelanocortin (POMC)-expressing neuron에서도 자가포식작용 관련 유전자인 *ATG12*를 제거하였을 경우 high-fat diet (HFD)를 섭취시킨 생쥐에서 사료섭취량과 운동부족 등에 의한 몸무게 증가와 혈당조절의 문제점이 나타났으며<sup>[14]</sup> 노화된 생쥐의 시상하부 POMC neuron에서의 자가포식작용 억제는 당 (glucose)의 항상성과 지방분해의 저하 및 지방과다의 증가를 나타낸다는 연구로 보아 자가포식작용의 비만과의 연관성도 보고되어있다<sup>[15,16]</sup>.

### ***ATG7* knockout 생쥐 모델을 이용한 자가포식작용관련 질환 연구**

본 연구에서 자가포식작용의 모델로 다루고 있는 *ATG7* 유전자에 관해서도 많은 연구가 있었다. 상피세포에서 특이적으로 *ATG7* 유전자를 제거하였을 때에는 자가포식작용 기능의 억제에 의해 혈전증을 유발하는 유전자의 발현을 억제하여 혈전증의 유발을 억제하였고<sup>[17]</sup>, 난모세포에서 특이적으로 *ATG7* 유전자를 제거한 연구에서는 난모세포를 냉동하였다가 녹이는 단계에서 생기는 온도 변화 스트레스를 자가포식작용이 회복시킨다는 연구결과가 발표되었다<sup>[18,19]</sup>. 또한 뇌의 상피세포 특이적으로 *ATG7* 유전자를 제거한 *ATG7* KO 생쥐는 뇌 미세혈관의 밀도가 감소되어 자가포식작용의 억제에 의한 뇌의 혈관신생 활성 조절에 관한 연구결과가 보고 되었다. 에너지 항상성과 음식 섭취 조절 하는데 중요한 시상하부의 agouti-related peptide (AgRP) neuron



에서 *ATG7*의 발현을 억제하였을 때 공복시 발현되는 AgRP의 감소로 생쥐가 야위는 결과를 나타낸 연구도 있었다<sup>[20,21]</sup>. 백색지방 (white adipose tissue)에서의 자가포식작용의 기능에 관한 연구도 보고되어 있다. 백색지방 특이적 *ATG7* KO 생쥐의 백색지방은 일반적으로 하나의 지질방울 형태를 띄고 있는 백색지방 세포가 갈색지방과 유사하게 여러 개의 작은 지질방울로 형태가 변형되었고 미토콘드리아의 함량 증가와 인슐린 민감성 또한 향상되었다<sup>[22-24]</sup>. 인슐린 분비를 하는 췌장의 beta-cell 특이적 *ATG7* KO 생쥐는 세포사멸 (apoptosis) 증가로 인한 beta-cell의 증식, beta-cell양의 감소로 인하여 인슐린 분비 저하를 유발하여 당뇨병을 유발하였다<sup>[25]</sup>. 간에서 특이적으로 *ATG7* 유전자를 제거한 경우 자가포식작용의 억제에 의해서 인슐린 저항성이 증가하고 ER stress가 촉진되는 결과를 나타내 자가포식작용이 인슐린 민감성에 중요한 역할을 한다는 것을 밝히기도 하였고<sup>[26]</sup>, 골수세포에서 특이적으로 *ATG7* 유전자를 제거 하였을 때에는 인터루킨 (IL-1 $\beta$ )의 증가로 인한 염증반응이 증가하여 reactive oxygen species (ROS)의 증가와 미토콘드리아의 기능장애로 대장염 같은 대사증후군이 발병하기도 한다<sup>[27]</sup>. 하지만 아직 신체의 열발생 및 에너지 소비의 주 기관 중 하나인 갈색지방에서 자가포식작용의 기능에 관한 연구는 현재까지 제대로 다루어 지지 않았다. 열발생과 관련된 미토콘드리아의 UCP1뿐만 아니라 미토콘드리아 관련 단백질, 유전자들이 자가포식작용 관련 유전자인 *ATG7* 유전자를 갈색지방에서 특이적으로 제거 하였을 때 어떤 결과를 나타낼지 연구를 진행하였다.

## 지방 (Adipose tissue)

지방조직은 형태나 기능에 따라 크게 백색지방과 갈색지방으로 분류된다.

백색지방은 일반적인 지방으로써 triglyceride의 형태로 에너지를 저장하고 있는

지방을 일컫는다. 흔히 알고 있는 지방으로 세포 하나에 매우 커다란 하나의 지질방울을 포함하고 있어서 세포의 크기가 커다란 특징을 가지고 있다. 몸의 에너지가 부족하게 되면 triglyceride가 lipolysis되어 fatty acid와 glycerol로 분해되어 다른 조직의 에너지원으로 사용된다. 하지만 이 백색지방이 많이 축적되면 비만이 발생하게 된다 [29].

갈색지방은 포유류, 인간이 가지고 있는 조직 중 하나로 백색지방들과는 달리 이름 그대로 갈색을 띠며 당, 지방 등의 에너지를 산화하여 열발생을 통한 몸의 체온을 유지시켜주는 기관 중 하나이다. 갈색지방은 nonshivering thermogenesis (NST)에 의해 열발생을 일으키는 유일한 신체내의 기관이며 이 열발생은 미토콘드리아에 ATP를 생성하기 위해 만들어진 전자(proton)가 미토콘드리아의 inner membrane에 존재하는 ATP synthetase channel을 통과하면서 ATP를 생성하는 것 대신 UCP1 channel을 통과하며 에너지를 열에너지로 방출한다[30]. UCP1은 미토콘드리아의 내막에 존재하며 갈색지방에 특이적으로 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 갈색지방에서만 특이적으로 *ATG7* 유전자를 제거하기 위하여 UCP1 promoter에 의해 *CRE* (이 이후로는  $CRE^{ERT}$ 로 사용) 유전자의 발현이 조절되도록 만든 UCP1- $CRE^{ERT}$  transgenic 생쥐와 *ATG7* 유전자 exon 14번 사이에 LoxP site를 달아놓은 *ATG7-fl/fl* 생쥐를 교배시켜 갈색지방 특이적으로 *ATG7* 유전자를 제거할 수 있는 *ATG7 fl/fl;UCP1- $CRE^{ERT}$*  돌연변이 생쥐를 구축하여 갈색지방에서의 자가포식작용의 기능 연구를 수행하였다[31].

## 연구 방법

### 실험 동물

*ATG7* 유전자는 자가포식작용 관련 중요한 유전자로 태어날 때부터 신체 전체에서 제거되는 wholebody KO 생쥐 모델의 경우 박테리아 감염에 취약해지고 뇌와 간에 유비퀴틴화된 단백질들과 데미지를 입은 세포나 세포소기관들의 축적에 의해 생존하지 못한다. 본 실험은 갈색지방조직이 충분히 분화되어진 상태에서의 실험을 위하여 conditional KO을 사용하였고 어느 정도 성숙을 하여 자가포식작용 억제에도 살아갈 수 있을 정도의 성체이며 충분히 갈색지방조직이 분화되어진 상태에서 (6-7주) 갈색지방 특이적 *ATG7* KO (*ATG7*BKO) 모델의 구축을 위하여 *ATG7* fl/fl 모델의 생쥐와 UCP1-CRE<sup>ERT</sup> transgenic 모델 생쥐의 교배를 유도하여 *ATG7* fl/fl;UCP1-CRE<sup>ERT</sup>를 얻었고 이를 다시 *ATG7* fl/fl 모델의 생쥐와의 교배를 통하여 대조군 (*ATG7* fl/fl)과 실험군 (*ATG7* fl/fl;UCP1-CRE<sup>ERT</sup>)을 확보하였으며 꼬리를 이용한 genotyping을 통해 확인하였다(표 1). 연구에 사용한 생쥐는 아침 8시-저녁 8시까지는 조명아래에서, 저녁 8시-아침 8시 까지는 암실에서 키워졌으며 일반사료 (normal chow (Purina Rodent Chow, 38057))와 멸균된 물을 제공하였다.

표 1. Genotype primer sequence

PRIMER	Sequence (5' - 3' )
ATG7 - 1	5' CAT CTT GTA GCA CCT GCT GAC CTG G 3'

ATG7 - 2	5' CCA CTG GCC CAT CAG TGA GCA TG 3'
ATG7 - 3	5' GCG GAT CCT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT 3'
UCP1 - F	5' CAT TTG GGC CAG CTA AAC AT 3'
UCP1 - R	5' CCC GGC AAA ACA GGT AGT TA 3'

F : Forward R : Reverse

#### 타목시펜 투여

*ATG7* 유전자를 갈색지방에서 원하는 시기에 제거하기 위하여 타목시펜 (TAMOXIFEN, Sigma Aldrich, St.Louis, USA; T5648)을 생쥐에 투여하였다. Estrogen receptor T(ERT) motif 가 결합 되어 있는  $CRE^{ERT}$  유전자를 사용하였기에 평소에는 UCP1 promoter가 활성화 되면 ERT motif가 붙어있는  $CRE^{ERT}$ 가 생성되어 세포질에 존재하는 HSP90에 붙어 핵 내로의 이동이 방지되지만 estrogen의 일종인 타목시펜을 몸 안으로 투여하면 ERT motif에 타목시펜이 결합하여  $CRE^{ERT}$ 가 HSP90에서 유리되어 핵 안으로 들어갈 수 있게 되고 핵 안으로 들어간  $CRE^{ERT}$ 는 *ATG7* 유전자 사이의 LoxP site를 재조합하여 갈색지방 특이적으로 exon 14번이 제거된 *ATG7* KO가 만들어 지게 된다. 타목시펜은 일반적으로 사용되는 타목시펜을 함유시킨 사료를 제공하는 방식과 타목시펜을 경구투여 하는 방식 두 가지를 사용하였으며 타목시펜을 함유하는 사료는 7일간 제공하였으며 타목시펜 경구투여는 20 mg/ml 의 농도로 마리당 하루 200  $\mu$ l씩 총 5일간 투여하였다. 존대는 쇠로 만들어진 존대를 사용하여 경구 투여를 진행하였다. 경구투여 시 타목시펜은 corn oil (Sigma Aldrich, St.Louis, USA;

C8267)에 녹여 vortexing한 후 homogenizer를 이용하여 타목시펜 결정을 균질화 하여 투여하였고 투여 후 6주가 지나게 되면 새로운 갈색지방이 줄기세포와 갈색지방 전구세포로부터 생성되기 때문에<sup>[32]</sup> 4주마다 타목시펜 사료는 7일간, 경구투여는 5일간 반복적으로 타목시펜을 투여하였다.

### Glucose Tolerance Test, Insulin Tolerance Test

Glucose tolerance test (GTT)는 15시간 금식 후 D-(+)-Glucose (sigma Aldrich, St.Louis, USA; G8270)을 생리식염수(0.9% saline solution)에 희석하여 10 % glucose (glucose 1 g 당 증류수 10 ml)로 만들어 1.5 mg/g 의 농도로 복강투여 전과 투여 후 30, 60, 90, 120 분에 혈당측정기 (Accu-Chek, Sanmina corporation, San Jose, USA)를 사용하여 혈당의 변화를 측정하였다.

Insulin tolerance test (ITT)는 4시간 금식 후 Humulin R (Lilly HI-210, Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA)을 생리식염수에 1 unit/kg 농도로 희석하여 생쥐에 복강 투여 전과 30, 60, 90, 120 분에 혈당을 측정하였다.

### 메타볼릭 케이지 연구

메타볼릭 케이지 측정장치를 이용하여 생쥐의 대사작용인 산소 소비량 ( $VO_2$  (Oxygen in/out)), 이산화탄소 배출량 ( $VCO_2$  (Carbon dioxide in/out)), 호흡교환비율 (RER (Respiratory Exchange Ratio)), 에너지 소비량 (HEAT (kcal/hr/kg)), 사료 섭취량을 측정하였다. 생쥐 한 마리당 한 케이지를 사용하였고, 아침 8시-저녁 8시는 조명 아래에서, 저녁 8시-아침 8시는 암실에서 메타볼릭 케이지 측정장치를 작동하였다. 결과분석을 위하여 측정 시 초기에 케이지 적응 단계를 거치는 과정에서의 데이터 값은 제거 하였으며 안정된 수치를 되찾았을 때부터의 값을 사용하여 총 48시간동안 대조군과 실험군에서 에너지

대사 변화를 측정하였다.

### 조직 파라핀 블록 제작

4 % paraformaldehyde (PFA)를 조직 사이사이에 침투시키기 위하여 하루에서 이틀간 4 % PFA에 조직을 고정 시켜준 뒤 파라핀 블록에 조직을 넣고 조직에 남아있는 수분을 탈수 시켜주기 위하여 1× PBS에 10분간 3번 세척한 뒤 차례대로 50 % 에탄올, 70 % 에탄올, 80 % 에탄올, 90 % 에탄올, 95 % 에탄올에 상온에서 1시간씩 교반 (shaking)하여 조직을 골고루 탈수 시켜 준 뒤 100 % 에탄올에서 밤새 (약 15시간) 동안 4 °C 저온실에서 조직을 교반시켜 주었다. 그 다음으로 xylene을 사용하여 조직에 침투시켜 파라핀이 조직에 잘 침투 할 수 있는 상태로 만들어 주기 위하여 50 % xylene (xylene + ethanol)에 1시간, 100 % xylene에 1시간 동안 상온에서 교반시켜 주고 파라핀 용액에 1시간 동안 담가 조직에 파라핀을 침투 시켜주었다. 그렇게 조직 사이사이에 파라핀을 침투시켜준 뒤 embedding 기계를 이용하여 파라핀 블록을 제작하였다.

### 조직 H&E 염색

조직 파라핀 블록을 이용하여 5  $\mu$ m의 두께로 section한 조직 슬라이드를 핵과 세포질을 염색하기 위하여 haematoxylin과 eosin (BioGnost, Zagreb, HR)으로 염색하여 주었다. 우선 염색 전 파라핀 블록을 microtome으로 5  $\mu$ m의 두께로 조직절편을 만들어 슬라이드에 붙여주었다. 붙인 조직 절편 슬라이드를 하루 동안 말려준 뒤 말린 슬라이드의 조직 절편을 염색하기 위하여 세포에 수분을 넣어주는 함수 과정을 진행하였다. 조직 슬라이드를 60 °C 오븐이나 slide warmer에 30분~1시간 동안 두어 조직 절편 단면의 파라핀을 녹여 조직 단면이 슬라이드에 더욱 달라붙게 해준 뒤 100 % xylene에서 5분간 3번씩 조직 슬라이드

라이드를 담가 남은 파라핀을 완벽히 제거한 뒤에 100 % 에탄올부터 95 %, 90 %, 80 %, 70 % 에탄올로 5분씩 2회에 걸쳐 순차적으로 조직을 함수 시켜 주었다. 그 뒤 물에서의 세척을 통해 묻어 있는 에탄올을 제거하고 haematoxylin에 1분간 염색 후 물로 세척하고 eosin에 20초간 염색 후 물에 세척하여 주었다. 염색이 끝난 조직은 70 % 에탄올부터 차례대로 80 %, 90 %, 95 %, 100 % 에탄올 순서로 각 5분간 1회의 탈수과정을 거친 후 xylene에서 5분간 1회 처리한 뒤 슬라이드에 permount (Fisher scientific, USA; Fisher chemical permount mounting medium) 1-2방울을 떨어뜨려 주고 커버 슬라이드로 덮어주어 염색을 완료하였다. 이때 조직에 기포가 들어가 현미경 촬영 시 문제가 있을 수 있으므로 커버 슬라이드를 덮어줄 때 공기방울이 남아있지 않게 제거해주었다.

### Western blot

부검 후 deep freezer에 보관한 조직을 액체질소를 사용하여 녹지 않게 막자 사발로 잘게 갈아준 뒤 갈아준 조직에 100X protease (Tech & innovation, BioPrince, KOREA)와 PMSF (Tech & innovation, BioPrince, KOREA)를 첨가한 lysis buffer (1M hepes pH 7.5, 5M NaCl, 0.5M EDTA, 0.1M EGTA, 10% Triton X-100, 0.2M Na-pyrophosphate, 1M b-glycerophosphate, 1M NaF)에 1:1:100의 비율로 섞은 용액을 이용하여 조직에 넣고 homogenizer를 이용하여 조직이 protease와 잘 섞이게 균질화 시켰다. 약 1시간가량 얼음에서 반응 시킨 뒤 13000 rpm, 4 °C에서 15분 동안 원심분리기를 이용하여 분리하고 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 이 과정을 3번 반복하여 조직의 지방층과 조직 찌꺼기들을 분리하였다. 분리된 단백질은 BSA PROTEIN ASSAY KIT (Thermo Scientific, Rockford, IL)를 통한 단백질 정량을 하여

7~12 % SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리하였다. 분자 크기 별로 분리된 단백질은 nitrocellulose (NC) membrane을 사용하여 wet transfer system (Bio-Rad, USA)로 transfer 하였다. Membrane은 1시간 동안 상온에서 3 % BSA (MP biomedical, USA; cat no.160069) in TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.1 % Tween 20)로 blocking 하였고 1차 항체인 HSP90 (Santa Cruz Biothchnology, Santa Cruz, CA; catalog no. sc-7947, 1:1000), UCP1 (abcam, cambridge, UK; catalog no. ab10983, 1:1000), ATG7 (cell signaling technology, Danvers, MA; catalog no. 2643s, 1:1000), P62 (cell signaling technology, Danvers, MA; catalog no. 5114s, 1:1000), SDHA (cell signaling technology, Danvers, MA; catalog no. 8674s, 1:1000), Pyruvate Dehydrogenase (cell signaling technology, Danvers, MA; catalog no. 3205s, 1:1000)를 3 % BSA in 1x TBST 에 희석하여 밤새 (약 15시간) 반응시켰고, TBST로 10분간 3번 세척하여준 다음 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체를 1시간동안 반응시켰다. 마지막으로 TBST로 10분간 3번 세척 후에 PROTEIN DETECTOR는 GE Healthcare-Amersham의 ECL WESTERN BLOTTING DETECTION REAGENTS를 사용하여 X-ray film에서 단백질의 발현을 확인하였다. 본 실험에서 housekeeping 단백질로는 HSP90을 사용하였다.

### **mRNA 측정**

-80 °C에 보관한 조직을 막자 사발로 가루로 갈아낸 뒤 Blood/ Cultured Cell Total RNA Purification Mini kit (FAVORGEN, Taiwan)을 사용하여 mRNA를 추출하였다. 분리된 mRNA는 nanodrop 2000(Thermo fisher scientific, USA)



을 이용하여 농도를 측정한 뒤 550 ng의 mRNA를 이용하여 cDNA를 제작하였다. mRNA를 65 °C에서 5분간 heating 하여주고 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 추가하여 37 °C에서 1시간 반응시킨 뒤 95 °C에서 5분 끓여준 다음 증류수 290 μl을 추가해 총 300 μl 볼륨의 cDNA를 제작하였다. 만들어진 cDNA를 가지고 quantitative real-time PCR을 이용하여 mRNA의 발현을 비교하였는데 이때 SYBR Green(Toyobo, Osaka, Japan) 6 μl, 표 1에 표기되어 있는 forward primer 1 μl, reverse primer 1 μl, cDNA 4 μl을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR cycle은 Pre-incubation을 95 °C에서 5분, amplification을 95 °C 10 초, 60 °C 10초, 72 °C 15초로 40 cycle, melting curve는 95 °C 5초, 65 °C 1분, cooling을 40 °C 30초 수행하였다.

**표 2. Primer sequence of the quantitative real time PCR**

Primer	Sequence (5' – 3' )
Mouse L32 – F	5' AGA TCC TGA TGC CCA ACA TC 3
Mouse L32 – R	5 CAG CTC CTT GAC ATT GTG GA 3
Mouse Cytochrome B – F	5' TTT TAT CTG CAT CTG AGT TTA ATC CTG T 3'
Mouse Cytochrome B – R	5' CCA CTT CAT CTT ACC ATT TAT TAT CGC 3'

Mouse UCP1 – F1	5' GGA TTG GCC TCT ACG ACT CA 3'
Mouse UCP1 – R1	5' TGC CAC ACC TCC AGT CAT TA 3'
Mouse ATG7 – F	5' GCT GGT ACC TTG GGG TGT AA 3'
Mouse ATG7 – R	5' CAC GGG ATT GGA GTA GGA GA 3'
Mouse VDAC1 – F	5' TTC GTC ATT CTC GCC GAA CA 3'
Mouse VDAC1 – R	5' CCA ACC CTC ATA GCC AAG CA 3'
Mouse SDHA – F1	5' ACC CAG ACC TGG TGG AGA CC 3'
Mouse SDHA – R1	5' GGA TGG GCT TGG AGT AAT CA 3'
Mouse ND5 – F1	5' AGC ATT CGG AAG CAT CTT TG 3'
Mouse ND5 – R1	5' TTG TGA GGA CTG GAA TGC TG 3'
Mouse COX1 – F1	5' GCC TTT CAG GAA TAC CAC GA 3'
Mouse COX1 – R1	5' AGG TTG GTT CCT CGA ATG TG 3'
Mouse ATP6 – F1	5' GGC ACC TTC ACC AAA ATC AC 3'
Mouse ATP6 – R1	5' CGG TTG TTG ATT AGG CGT TT 3'

Mouse CIDEA - F1	5' CTC GGC TGT CTC AAT GTC AA 3'
Mouse CIDEA - R1	5' TCC TTA ACA CGG CCT TGA AC 3'
Mouse ND2 - F	5' GCC TGG AAT TCA GCC TAC TAG C 3'
Mouse ND2 - R	5' GGC TGT TGC TTG TGT GAC GA 3'
Mouse COX2 - F	5' ACC TGG TGA ACT ACG ACT GCT 3'
Mouse COX2 - R	5' CCT AGG GAG GGG ACT GCT CA 3'

F : Forward R : Reverse

### 통계 분석

모든 데이터는 평균±표준편차로 표현하였으며 GraphPad Prism을 이용하여 통계 분석을 진행하였다. 그래프는 mean with s.e.m.을 사용하여 나타내었으며 unpaired student' s t-test 방법에 의해 p value 값을 나타내었고 p<0.05, p<0.01, p<0.001을 각각 \*, \*\*, \*\*\*를 이용하여 표시하였다.

## 연구결과

### ATG7 fl/fl;UCP1-CRE<sup>ERT</sup> 돌연변이 생쥐 구축

갈색지방에서의 특이적인 *ATG7* 유전자의 KO을 시키기 위하여 갈색지방에 대량으로 존재하는 미토콘드리아의 관련 단백질인 UCP1의 전사 프로모터 뒤에 CRE<sup>ERT</sup> 발현 site를 달아 놓은 유전자 변형 생쥐인 UCP1-CRE<sup>ERT</sup>transgenic 생쥐와 *ATG7* 유전자의 14번 exon 사이에 LoxP site를 달아 놓은 ATG7-fl/fl 생쥐<sup>[33]</sup>를 교배시켜 ATG7 fl/fl;UCP1-CRE<sup>ERT</sup> 돌연변이 생쥐를 구축하였다(그림 3). genotyping PCR을 수행하여 genotype을 확인하였다(그림 4). 이 실험에서 대조군으로는 ATG7 fl/fl 생쥐를 사용하였고 실험군으로는 ATG7 fl/fl;UCP1-CRE<sup>ERT</sup> 생쥐를 사용하였다.

### 타목시펜 투여를 통한 갈색지방조직에서의 *ATG7* 유전자 KO

UCP1이 존재하는 갈색지방조직에서 발현된 CRE<sup>ERT</sup>를 활성화하기 위하여 타목시펜을 투여하였다. 타목시펜 사료를 이용한 타목시펜의 주입과 경구투여를 통한 타목시펜의 주입 방법 두 가지를 사용하였다. 타목시펜 사료를 사용하였을 때와 타목시펜 경구투여를 사용하였을 때 모두 갈색지방에서만 특이적으로 *ATG7* 단백질이 줄어드는 것을 확인 하였고 *ATG7*의 결핍으로 인한 자가포식작용의 억제에 의해 p62 단백질 또한 갈색지방에서만 특이적으로 축적된 것을 western blot을 통하여 확인 하였다(그림 5). 하지만 타목시펜 사료를 사용하였을 때 사료의 바뀜에 의해 생쥐들의 사료 섭취량이 줄어들었고 그 결과 몸무게가 크게 줄어드는 것을 확인하였다(그림 6). 타목시펜 경구투여 또한 생쥐의 몸무게 감

소를 나타내었지만 타목시펜 사료보다는 현저히 몸무게의 감소가 줄어들었기에 타목시펜 경구투여를 사용하여 실험을 진행하였다(그림 7). 타목시펜 경구투여는 생후 8주에 5일간 20 mg/ml의 농도로 corn oil에 녹여 결정이 다 녹을 때까지 균질화하여 마리당 200  $\mu$ l씩 투여하였고 13주부터 대조군과 실험군간의 몸무게 차이가 나타나기 시작하였다(그림 7). 타목시펜을 투여하여 갈색지방에서 특이적으로 *ATG7*이 KO되어 생기는 변화로 몸무게의 증가가 대조군에 비해 더딘 것을 나타냈다.

대조군과 실험군 생쥐들을 부검하여 조직 무게를 측정하였다. 조직 무게는 두 그룹간에 차이는 나타나지 않았다(그림 8). 조직 중에서 *ATG7*을 특이적으로 KO시킨 갈색지방을 대조군과 실험군에서 비교하였을 때 실험군의 갈색지방이 더 붉은 색을 띠는 것을 나타냈다(그림 9). 또한 두 그룹에서의 몸무게 차이는 나타나지만 사료 섭취량은 차이를 나타내지 않았다(그림 10).

### 대조군과 실험군간의 대사작용

사료 섭취량은 같으나 몸무게의 차이를 보이는 두 그룹간의 에너지 대사작용을 비교하고자 메타볼릭 케이지 실험을 통하여 생쥐의 산소 소비량, 이산화탄소 배출량, 에너지 소비량을 측정 비교하였다. 총 3일간 케이지 실험을 진행하였으며 첫 날은 생쥐들의 적응을 위한 시간을 주었고 나머지 이틀간 측정된 대사작용을 모니터 하였다. 두 그룹 모두 낮 (08:00-20:00)보다 설치류가 주로 활동하는 밤 (20:00-08:00)에 산소 소비량이나 이산화탄소 배출량, 에너지 소비량이 높은 것을 나타냈다. 또한 대조군보다 실험군이 밤, 낮 모두 에너지 소비량, 이산화탄소 배출량, 산소 소비량이 약간씩 높았다. 낮 동안에는 실험군의 산소 소비량은 대조군보다 약 7.8 % 높았으며, 이산화탄소 배출량은 약 10 %, 에너지 소

비량은 8.6 % 더 높은 수치를 나타내었으며 밤 동안에는 실험군이 대조군보다 산소 소비량은 6.7 %, 이산화탄소 배출량은 11.9 %, 에너지 소비량은 7.8 % 더 높은 수치를 나타내었다. 하지만 활동량은 두 그룹간의 차이가 없는 것으로 보아 에너지 소비량의 증가가 활동량에 의한 것은 아닌 것으로 분석되었다(그림 11).

### 대조군과 실험군간의 인슐린 민감성

자가포식작용은 세포의 항상성 유지 뿐만 아니라 지질 대사작용의 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며<sup>[34,35]</sup> 지방이 축적되어 발생하는 비만은 2형 당뇨병과 연관 되어져 있다. 갈색지방에서의 자가포식작용 억제가 당 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 두 그룹간의 인슐린 민감성을 ITT 실험을 통하여 비교하였다. 인슐린 투여 후 혈당을 측정해 본 결과 갈색지방에서 실험군이 대조군의 생쥐들보다 인슐린을 투여하였을 때 더 낮은 혈당을 유지하는 것을 통해 혈당을 낮추어 주는 역할을 하는 인슐린에 대한 민감성이 실험군이 대조군보다 더 높다는 것을 확인하였다. 또한 호흡을 통한 몸의 에너지를 공급할 때 어떤 연료를 쓰는지 확인하는 데 쓰이는 호흡교환비율은 대조군이 실험군보다 낮았다(그림 12). 0.7에 가까울수록 지방을, 1에 가까울수록 당을 소비하는 측정값에 따라서 실험군이 대조군보다 에너지 공급을 위해 당을 더 선호하는 것을 확인하였다.

### 대조군과 실험군간의 조직 Morphology

두 그룹간의 갈색지방 조직 morphology 확인을 위하여 H&E 염색을 통한 조직 염색을 진행하였다. H&E 염색 결과 대조군 생쥐들이 실험군의 생쥐들보다 갈색

지방의 지질방울이 더 커다란 것을 나타내었고 실험군의 갈색지방에서는 자잘한 지질방울이 더 많이 존재하는 것을 확인하였다(그림 13).

### 대조군과 실험군간의 단백질 및 mRNA 측정

대조군과 실험군간의 갈색지방 조직의 색 차이와 조직의 morphology에서 확인한 지방방울 크기 차이가 발생한 원인을 알아보기 위하여 western blot과 mRNA qRT-PCR (quantitative real time PCR)을 진행하였다. 우선 갈색지방에서 특이적으로 *ATG7*을 KO 시켰기에 갈색지방에서의 *ATG7* 양을 확인하였고 자가포식작용이 억제되었을 때 증가되는 p62 단백질도 우선적으로 확인하였다(그림 14). *ATG7*이 갈색지방에서 KO 된 것을 western blot으로 확인한 후 갈색지방에서만 *ATG7*이 KO 된 것인지 확인하기 위하여 다른 백색지방인 epididymal white adipose tissue (eWAT)와 inguinal white adipose tissue (iWAT)에서도 western blot을 통해 단백질의 발현을 비교하였고 eWAT과 iWAT에서는 대조군과 실험군에서 모두 *ATG7*이 비슷하게 존재하는 것을 확인하였다. 부검을 통해 확인한 두 그룹간의 갈색지방의 색 차이가 미토콘드리아가 존재하는 양의 차이라고 생각되어 western blot을 통해 미토콘드리아 관련 단백질의 발현을 확인하였다. 미토콘드리아 내막 단백질인 succinate dehydrogenase complex flavin protein subunit A (SDHA)뿐만 아니라 미토콘드리아내의 TCA 회로가 ATP 에너지를 생성하는데 필요로 하는 pyruvate를 산화시켜주는 pyruvate dehydrogenase (PDH)효소가 갈색지방에서만 특이적으로 대조군보다 실험군에서 더 많이 존재하는 것을 나타냈고 미토콘드리아 막에 박혀서 전자를 이용하여 열 에너지를 발생시키는 UCP1 또한 갈색지방에서만 대조군보다 실험군에서 더 많이 존재하는 것을 확인하였다. eWAT과 iWAT에서는

미토콘드리아가 거의 존재하지 않기에 UCP1 은 나타나지 않았다(그림 14).

또한 갈색지방조직의 미토콘드리아 관련 mRNA 발현을 비교하기 위해서 qRT-PCR을 진행하였고 우선적으로 ATG7 RNA 양의 차이를 확인하여 ATG7이 특이적으로 갈색지방에서만 KO 되었는지 확인하였다(그림 15). 갈색지방에서의 ATG7 RNA 양은 실험군의 생쥐들이 대조군의 생쥐들에 비해 확연하게 감소되어 있는 것을 나타냈다. ATG7이 제대로 KO 된 것을 RNA 양에서도 확인한 뒤에 두 그룹간의 갈색지방 색의 차이가 미토콘드리아의 양이 증가한 것인지 확인하기 위하여 미토콘드리아 transcript RNA들과 nuclear-encoded RNA들을 구분 지어서 qRT-PCR을 진행하였다. 미토콘드리아 transcript RNA 중 cytochrome c oxidase 1 (COX1)은 대조군과 실험군의 생쥐들의 차이가 나타나지 않았지만 그 외의 ATP6와 NADH dehydrogenase subunit 5 (Nd5), cytochrome B, NADH dehydrogenase subunit 2 (Nd2), cytochrome c oxidase 2 (COX2)는 대조군보다 실험군 생쥐들이 더 높은 것을 나타냈다. nuclear-encoded RNA인 UCP1은 대조군이 실험군의 생쥐들보다 높았으나 다른 chromosome 내의 미토콘드리아 marker RNA인 CIDEA, SDHA, VDAC1은 두 그룹간의 차이가 나타나지 않았다. RNA 양의 차이를 통해 미토콘드리아에 존재하는 RNA양이 갈색지방에서 더 많이 존재한다는 것을 확인할 수 있었으며 또한 western blot을 통해 확인하였던 UCP1은 qRT-PCR 결과 RNA 양은 단백질 양과는 달리 실험군이 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났다.



## 고찰

비만인구의 세계적 급증추세에 비례하여 2016년 기준 한국의 남성, 여성 비만인구도 각 42.3 % , 26.4 %에 육박하게 되었다. 비만은 인체에서 흡수된 에너지와 소비된 에너지의 불균형이 계속적으로 지속되는 상황에서 인체 잉여에너지가 지방조직에 과다하게 축적되어 생기는 의학적 현상으로 자체로는 질환이 아니지만 당뇨, 고혈압, 우울증과 같은 정신적 육체적인 합병증의 유발 및 악화의 가장 큰 요인으로 알려져 있다. 비만의 예방 및 치료를 위하여 에너지 섭취의 감소에 초점을 맞추어 많은 연구가 진행되었고 이를 바탕으로 여러 식욕억제제가 개발되었으나 효능이 미미하거나 약물의 부작용으로 대부분의 약물이 임상적 허가가 취소되고 있다. 때문에 최근에는 에너지 섭취의 감소보다는 에너지 소비의 증가를 통한 비만 치료법 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 신체 내의 지방은 백색 지방, 갈색지방 두 종류로 나뉘어진다. 백색지방 조직의 주 기능이 에너지 저장소임에 반하여 갈색지방은 미토콘드리아에 존재하는 UCP1 channel을 이용하여 당, 지방 산화에 의해 생성되는 에너지를 열로 발생시키는 에너지 소비기관으로 최근 비만 치료제 개발을 위한 새로운 표적으로 대두되고 있다. 또한 자가포식작용은 세포내의 구성 성분 등에 문제가 생겼을 때 이를 제거하고 재활용하는 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 주 대사관련 조직에서의 연구를 통하여 인체 대사과정의 조절에 있어서의 자가포식작용의 중요성이 보고되고 있다. 특히 근섬유 전구세포인 myf5<sup>+</sup> 세포에서도 자가포식작용 관련 유전자의 제거를 통해 myf5<sup>+</sup> 세포에서 유래되는 갈색지방이나 근육의 변화를 관찰 하였을 때에도 갈색지방의 분화, 기능의 결함에 따른 백색지방분해 증가에 의해 열발생이 더 일어나고, 근육세포의 분화 손상 및 근육량 감소, 당 과민성을 나타냄으로 myf5<sup>+</sup> 세포에서 자가포식작용이 갈색지방과 근육의 에너지 유지와 당 항상성에 중요한

역할을 한다는 사실을 알 수 있다<sup>[28]</sup>. 하지만 분화된 갈색지방에서의 자가포식작용의 역할과 자가포식작용 결핍에 따른 에너지 당 대사의 변화 및 자가포식작용이 에너지 소비 조절을 기반으로 한 비만치료제 개발에의 이상적인 표적인지에 관한 연구는 전무한 상태이다. 본 연구에서는 갈색지방에서의 특이적인 자가포식작용 억제를 위한 생쥐 모델을 만들기 위해 autophagosome 형성에 중요한 역할을 하는 *ATG7* 유전자를 갈색지방 선택적으로 제거하는 생쥐 모델을 구축하였다. *ATG7* fl/fl;UCP1-CRE<sup>E<sup>RT</sup></sup> 생쥐는 타목시펜을 투여함으로써 *ATG7* 유전자 KO되는 conditional KO 모델로서 *ATG7* 유전자를 KO 시키기 위하여 대증화된 타목시펜 사료를 제공한 주입과 경구투여를 통한 주입을 이용하였다. 하지만 타목시펜 사료의 제공은 사료의 바뀜으로 인한 사료섭취량이 감소하면서 약 10 g 정도의 몸무게 감소를 나타내었고 경구투여 역시 몸무게의 감소는 나타났지만 타목시펜 사료에 비해서는 현저히 몸무게 감소율이 떨어진 것을 확인하였으며 western blot을 통한 *ATG7* 단백질 양의 확인 결과 경구투여에서 *ATG7* 단백질의 양이 실험군에서 대조군에 비해 더 줄어든 것을 확인하였다. 그 결과 타목시펜 경구투여가 대사질환에 관한 연구를 하기에 더 적합하다고 판단하였고 경구투여를 통해 실험을 진행하였다. 경구투여 후 생후 13주부터 실험군과 대조군간의 몸무게 차이가 발생하였고 몸무게의 차이가 에너지 소비의 증가인지 에너지 섭취의 감소인지 알아보기 위하여 두 그룹간의 사료섭취량을 비교하여 두 그룹간의 체중의 차이는 에너지 섭취량의 차이에서 기인하지 않음을 확인하였다. 에너지 섭취는 같으나 발생한 몸무게의 차이로 보아 갈색지방에서 특이적으로 자가포식작용이 억제되었을 때 에너지 소비량이 증가한다는 가설을 세웠다. 따라서 두 그룹에 대한 대사작용 실험을 진행하였고 가설대로 산소 소비량, 이산화탄소 배출량, 에너지 소비량이 대조군에 비해 실험군이 더 증가한 것을 확인하였다. 두 그룹간의 대사활동이 단순한 활동량의 차이에 의해 나타나는 것인지 확인하기 위해 활동량도 측정하였으나 활동량은 두 그룹에서 차이를 나

타내지 않았다. 또한 비만에 의해 발생하는 질병인 2형 당뇨병은 인슐린의 저항성이 증가하여 생기는 질병으로 2형 당뇨병과의 연관성도 조사해보기 위하여 인슐린 민감성을 측정하였고 대조군에 비해 실험군이 인슐린 신호에 더 민감하게 반응하는 것을 확인하였다. 호흡교환비율을 통해서도 실험군이 대조군에 비해 당의 민감성도 높은 것을 확인한 결과 실험군의 인슐린, 당의 항상성이 더 잘 유지되고 있다는 것을 확인하였다. 앞서 발생한 두 그룹의 몸무게 차이가 에너지 소비량의 증가 외에도 조직 무게의 차이에 인한 결과일 수 있으므로 부검을 통해 조직 무게를 측정하였지만 두 그룹간의 조직 무게 차이는 나타나지 않았으며 부검 시 두 그룹간의 갈색지방 색의 차이를 확인한 결과 더 붉은 색을 띠는 실험군의 갈색지방이 더 많은 양의 미토콘드리아를 가지고 있다고 보았고 갈색지방의 morphology를 확인한 결과 실험군의 지질방울들이 대조군에 비해 크기가 작은 것을 나타내었는데 실험군의 갈색지방에 더 많이 존재하는 미토콘드리아에 의한 지방 소모 에너지 소비를 증가시켰을 것이라 보았다. 미토콘드리아의 존재량 차이가 나는지 확인하기 위해 미토콘드리아 관련 단백질과 mRNA의 양을 측정하기 위한 western blot과 qRT-PCR을 진행하였다. Western blot 결과로 미토콘드리아 관련 단백질인 UCP1과 Pyruvate dehydrogenase, SDHA가 실험군에서 갈색지방에서만 특이적으로 증가된 것을 확인하였으며 qRT-PCR을 통한 mRNA의 양 측정 결과 미토콘드리아 전사 RNA들은 실험군에서의 증가를 나타냈으며 chromosome에서 유래하는 미토콘드리아 관련 RNA의 발현은 두 그룹간의 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이로써 chromosome에 존재하는 미토콘드리아 관련 RNA는 변화가 없으나 미토콘드리아에서 유래하는 미토콘드리아 관련유전자의 전사 RNA의 양만 증가한 것으로 보아 미토콘드리아의 새로운 생성이 활성화되는 것이 아닌 미토콘드리아의 제거가 감소하여 미토콘드리아의 존재량 차이가 나타나는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 기능이 다한 미토콘드리아 외에도 온전한 미토콘드리아를 자가포식작용이 제거하는 반면 자가포

식작용을 억제하였을 때 온전한 미토콘드리아도 더욱 오래 존재하게 되어 에너지 소비를 증가시켜 몸무게의 증가를 억제하였으며 인슐린, 당의 항상성을 유지시키고 있다는 결론 내렸다(그림 16). 본 연구는 자가포식작용을 갈색지방 조직에서 억제시킨 뒤 자가포식작용이 억제되었을 때 에너지 대사 변화의 형질 분석에 초점을 맞추어 진행하였기 때문에 후속 연구에서는 자세한 분자생물학적 기전에 관한 연구를 진행하는 것이 필요하다고 본다.

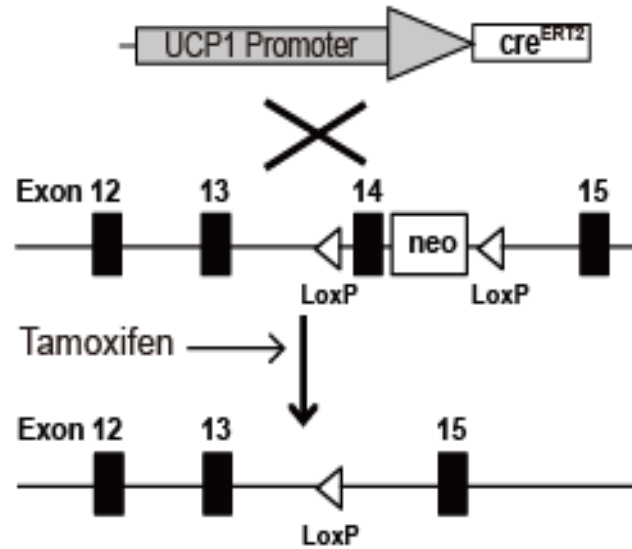


그림 3. ATG7 fl/fl;UCP1-CRE<sup>ERT</sup> 모델 생쥐 구축.

UCP1-CRE<sup>ERT</sup> 모델과 ATG7 fl/fl 모델의 교배를 통하여 ATG7 fl/fl;UCP1-CRE<sup>ERT</sup> 모델의 생쥐를 구축하였다. 구축된 실험군은 conditional KO 모델로 타목시펜의 주입을 통해 활성화된 Cre 단백질에 의한 LoxP의 재조합을 유도하여 ATG7 유전자를 KO시키는 방식을 이용하였다.

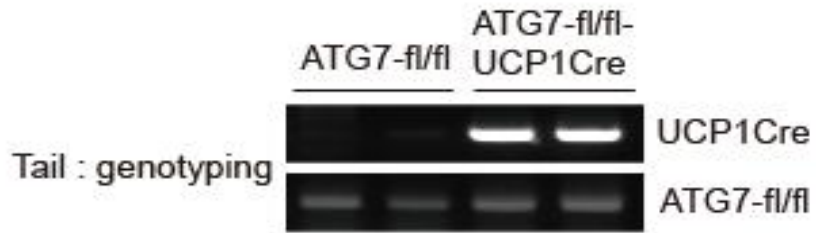


그림 4. 두 그룹의 tail genotype.

UCP1, ATG7 primer 를 이용한 genotype 을 통하여 대조군과 실험군의 유전자형을 확인하였다. Genotype 은 생쥐의 꼬리에서 얻은 DNA 를 사용하여 0.8 % agarose gel 을 이용한 전기영동을 통해 진행하였다.

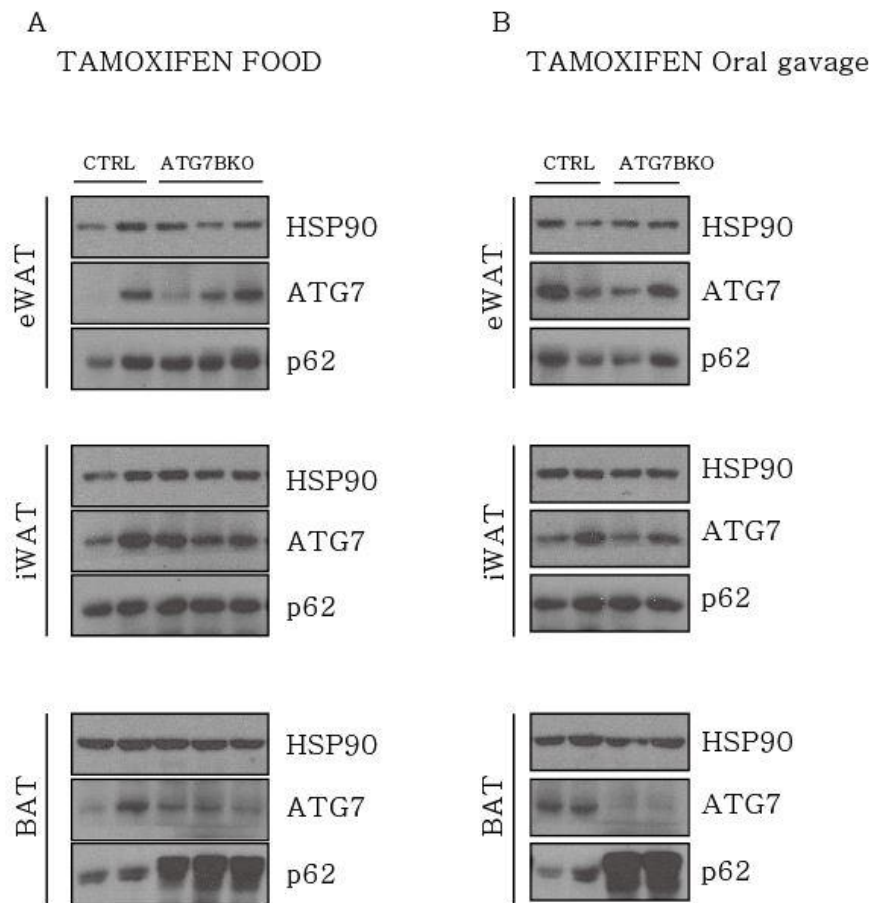


그림 5. 갈색지방 특이적 *ATG7* KO 확인.

타목시펜 사료 (A)와 타목시펜 경구투여 방법 (B)을 이용하여 타목시펜을 주입하였으며 *ATG7* KO 을 확인하기 위해 western blot 을 진행하였다. Housekeeping 단백질로는 HSP90 을 이용하였고 실험군에서만 특이적으로 갈색지방에서 *ATG7* 단백질이 KO 된 것을 확인하였고 *ATG7* KO 에 의한 자가포식작용의 억제로 인해 자가포식작용 수용체인 p62 단백질도 축적된 것을 확인하였다. 또한 갈색지방 특이적으로 *ATG7* 이 KO 되었는지 확인하기 위해 다른 백색지방인 eWAT, iWAT 에서도 western blot 을 통한 *ATG7* 단백질을 확인하였다.

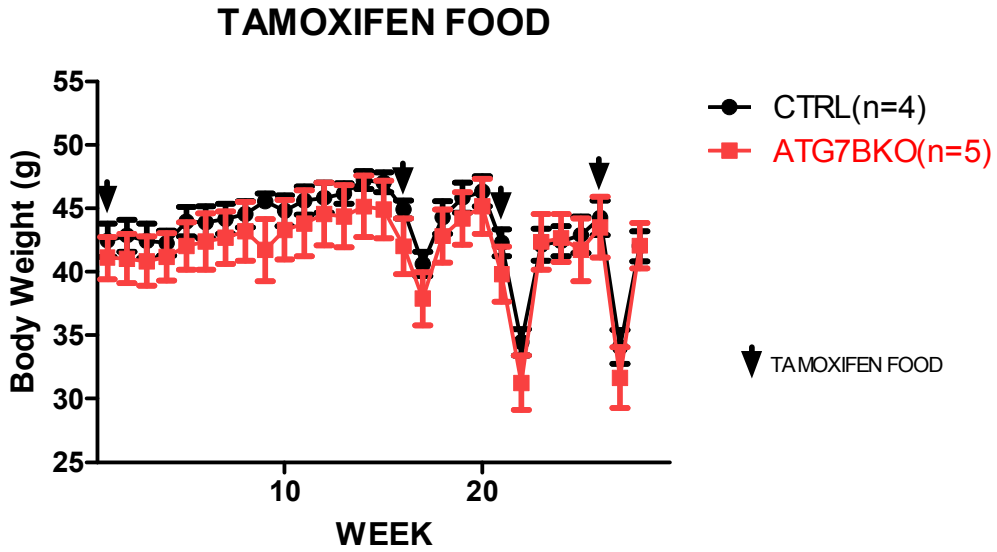


그림 6. 타목시펜 사료를 제공한 생쥐의 몸무게 분석.

타목시펜을 통한 *ATG7* 유전자를 KO 시키기 위해 대중적으로 사용되는 타목시펜 사료를 제공하였다. 갈색지방 전구세포의 분화에 의해 새로운 갈색지방세포가 형성되므로 주기적으로 타목시펜 사료를 제공하였고 한번 제공 시 일주일간 일반사료에서 타목시펜 사료로 사료를 바꾸어 주었다. 타목시펜 사료를 주지 않는 기간에는 일반사료를 사용하여 사육하였고 일주일마다 몸무게 측정을 하였다.



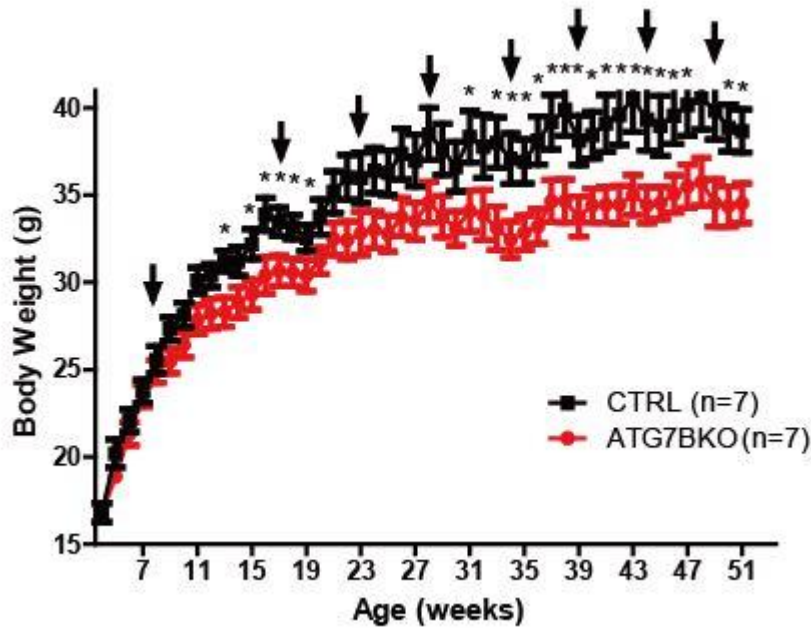


그림 7. 타목시펜 경구투여를 이용한 생쥐의 몸무게 분석.

타목시펜을 통한 *ATG7* 을 KO 시키기 위해 타목시펜을 20 mg/ml 의 농도로 corn oil 에 녹여 경구투여 하였다. Vortex 만으로는 타목시펜 결정이 완전히 녹지 않아 homogenizer 를 이용하여 타목시펜 결정을 균질화 하여 사용하였다. 투여는 5 일간 마리당 200  $\mu$ l 씩 경구투여 하였으며 갈색지방 전구세포의 분화에 의해 새로운 갈색지방세포가 형성되므로 주기적으로 타목시펜을 경구투여 하였다. 사료는 일반사료를 제공하였으며 생후 51 주까지 일주일마다 몸무게를 측정하였다.

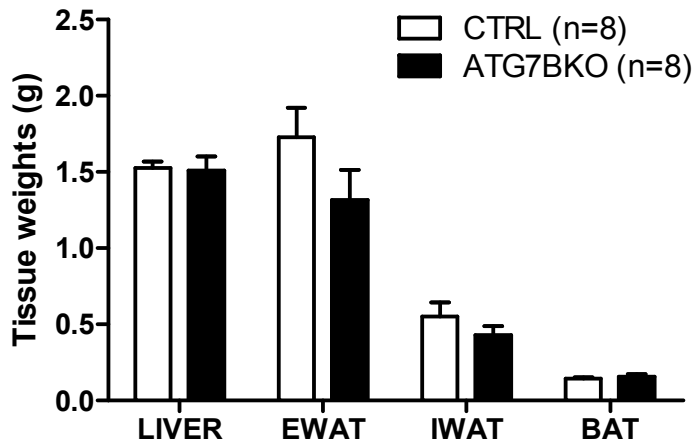


그림 8. 두 그룹간의 조직 무게 분석.

일반사료를 제공한 51 주령의 대조군 (n=8)과 실험군 (n=8)간의 부검을 통한 조직 무게를 측정하여 비교하였다. 두 그룹간의 liver, eWAT, iWAT, BAT 모두 p value 값이 0.05 이상으로 유의한 무게 차이를 나타내지 않았다.

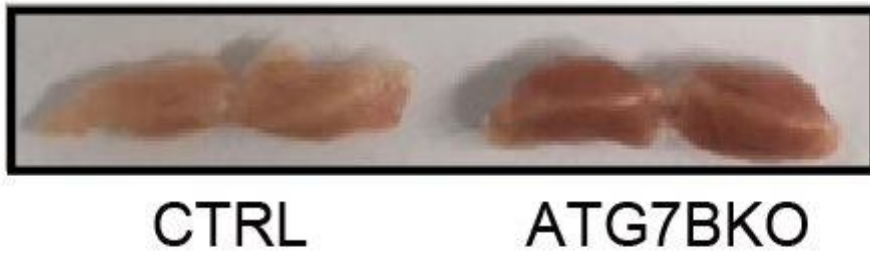


그림 9. 두 그룹의 갈색지방 비교 분석.

대조군과 실험군의 갈색지방을 부검하여 비교하였다. 실험군이 대조군보다 갈색지방의 색이 더 붉은 것을 확인하였다.

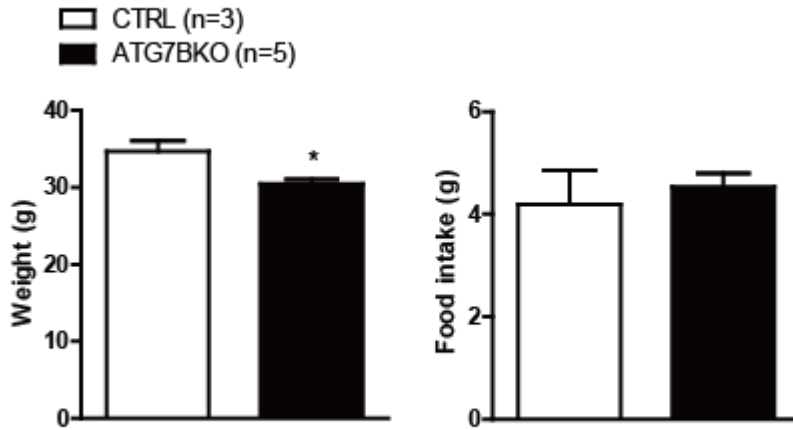


그림 10. 두 그룹간의 몸무게와 사료섭취량 분석.

20 주령에서의 대조군 (n=3)과 실험군 (n=5)간의 몸무게를 측정한 값과 두 그룹간의 하루 사료섭취량을 분석하여 나타낸 그래프이다. 몸무게는 저울을 이용하여 측정하였으며 사료섭취량은 메타볼릭 케이지 실험을 통하여 측정하였다. 두 그룹간의 몸무게는 p value 값이 0.05 이하로 유의한 차이를 나타내지만 사료섭취량은 p value 값이 0.05 이상으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

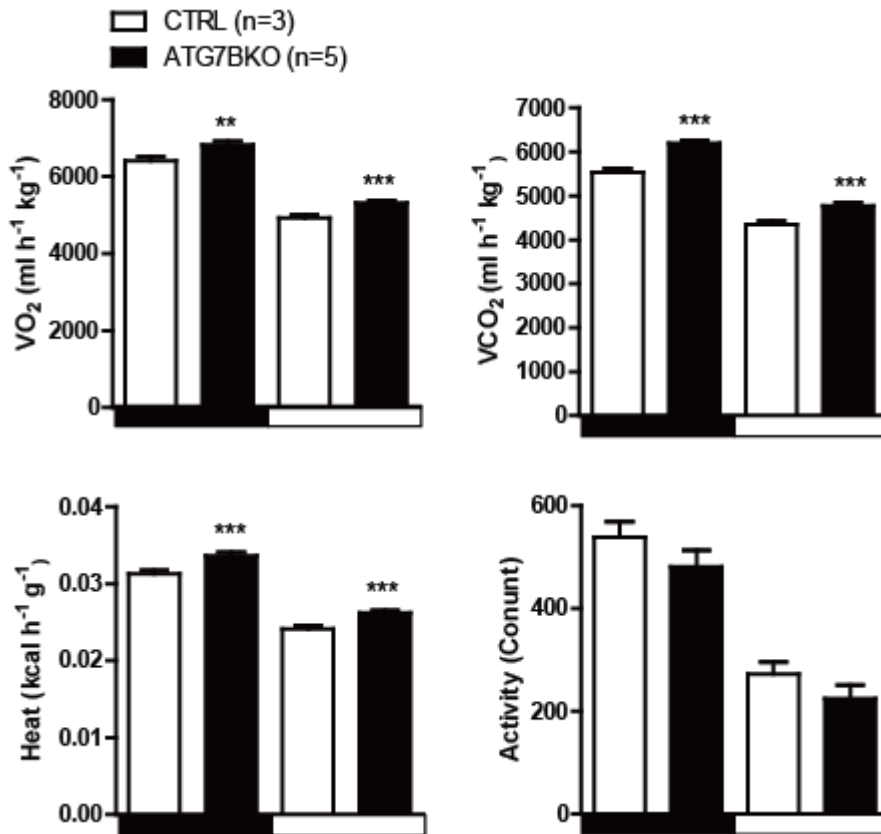


그림 11. 두 그룹간의 메타볼릭 케이지 실험 비교 분석.

20 주령에서의 대조군 (n=3)과 실험군 (n=5)간의 메타볼릭 케이지 실험을 통하여 VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, Heat, Activity 값을 측정하였다. 낮보다 활동량이 높은 밤에 수치가 전체적으로 높았으며 낮에서의 실험군의 산소 소비량은 대조군보다 약 7.8 % 높았으며, 이산화탄소 배출량은 약 10 %, 에너지 소비량은 8.6 % 더 높은 수치를 나타내었으며 밤 동안에는 실험군이 대조군보다 산소 소비량은 6.7 %, 이산화탄소 배출량은 11.9 %, 에너지 소비량은 7.8 % 더 높은 수치를 나타내었다. 두 그룹간의 활동량 차이는 p value 값이 0.05 이상으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

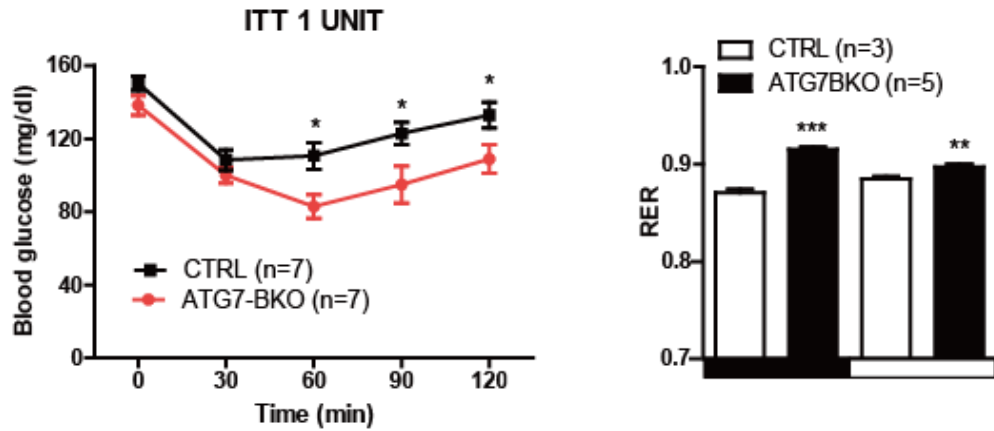


그림 12. 두 그룹간의 인슐린 민감성 비교 분석.

19 주령에서 대조군 (n=7)과 실험군 (n=7)간의 인슐린 민감성 비교를 위해 4 시간 금식 후 Humulin R 을 1 unit/kg 의 농도로 복강투여 하였다. 30 분마다 혈당을 측정하였으며 120 분까지 측정하였다. 60 분 측정부터 실험군과 대조군의 p value 값이 0.05 이하를 나타내며 유의한 차이를 보였으며 RER 값도 대조군 (n=3)과 실험군 (n=5)간의 차이를 알아보기 위해 20 주령 때 메타볼릭 케이지 실험을 통해 측정하였다. RER 값 측정 결과 밤 동안에는 실험군과 대조군과의 p value 값이 0.001 이하였으며 낮 동안에도 p value 값이 0.01 이하로 유의한 차이를 나타내었다.

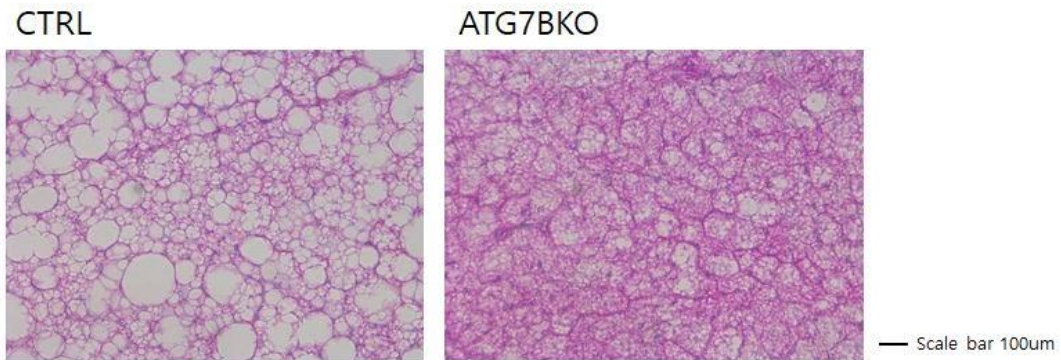


그림 13. 두 그룹간의 갈색지방 morphology 분석.

일반사료를 제공한 51 주령의 대조군과 실험군의 부검을 통해 갈색지방을 채취하였다. 고정한 갈색지방을 파라핀 블록으로 제작하여 section 한 슬라이드를 H&E 염색을 통하여 확인한 결과이다. 400 배의 배율을 이용하여 촬영하였다.

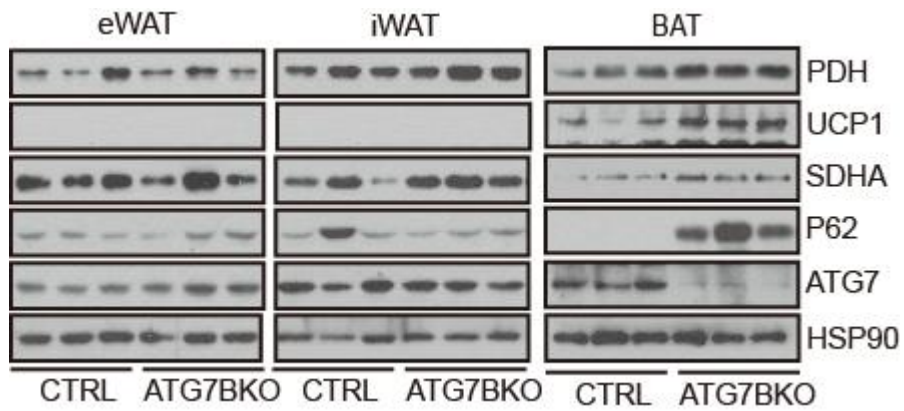


그림 14. 두 그룹간의 미토콘드리아 관련 단백질 western blot.

50 주령의 대조군과 실험군의 조직 내의 단백질 양을 비교 분석하기 위하여 western blot 하였다. Housekeeping 단백질로는 HSP90 을 이용하였고 갈색지방에서 특이적으로 ATG7 이 KO 된 것을 확인하기 위해 다른 백색지방인 eWAT, iWAT 도 같이 western blot 하여 비교하였다. (PDH = Pyruvate dehydrogenase)



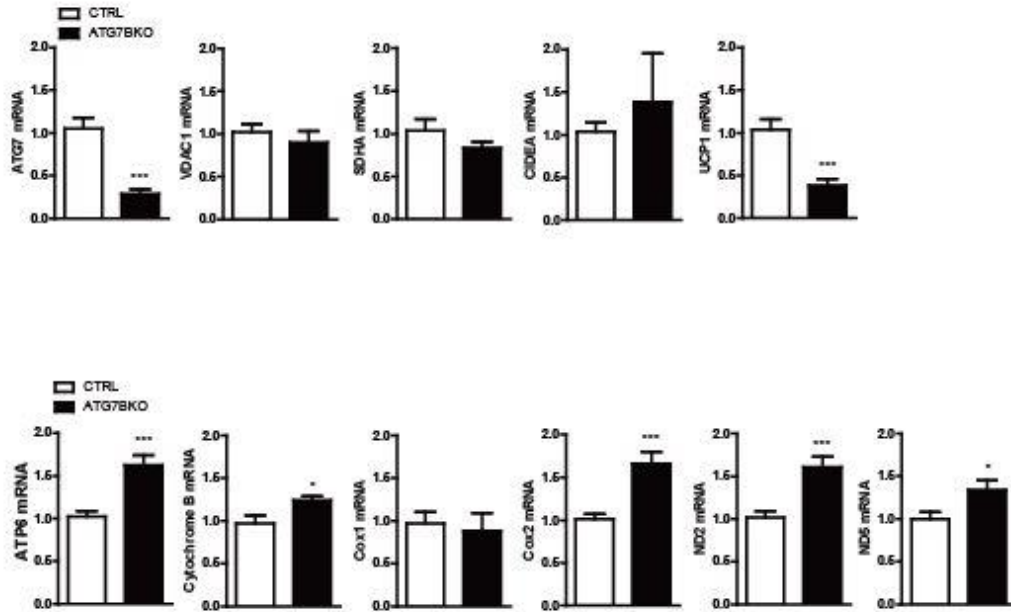


그림 15. 두 그룹간의 mRNA 측정.

50 주령에서의 대조군과 실험군 간의 qRT-PCR 을 통해 mRNA 양을 분석하였다. 미토콘드리아에 존재하는 전사 RNA 와 Chromosome 에 존재하는 미토콘드리아 관련 RNA 를 비교하여 미토콘드리아 관련 mRNA 양을 확인하였다. Chromosome 에 존재하는 미토콘드리아 관련 RNA 인 VDAC1, SDHA, CIDEA 는 p value 값이 0.05 이상으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며 미토콘드리아에 존재하는 전사 RNA 인 ATP6 (p value<0.001), Cytochrome B (p value<0.05), Cox2 (p value<0.001), ND2 (p value<0.001), ND5 (p value<0.05)는 유의한 차이를 나타냈다.

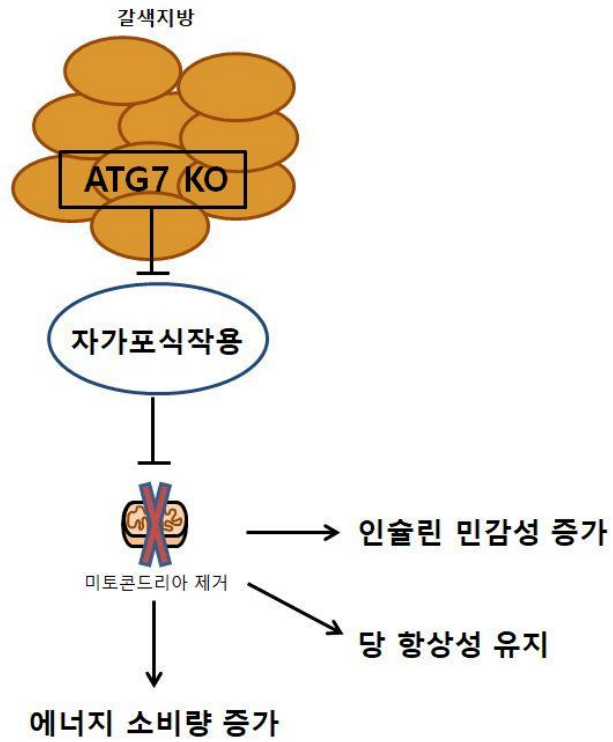


그림 16. 갈색지방에서의 특이적 ATG7 KO에 대한 메커니즘. 갈색지방에서의 ATG7 KO에 의하여 자가포식작용이 억제되고 자가포식작용의 억제에 의하여 미토콘드리아의 제거가 감소하여 미토콘드리아에 의한 에너지 소비량 증가, 인슐린 민감성 증가, 당 항상성 유지를 나타내는 것을 확인하였다.

## 참고문헌

- [1] Kaur J, Debnath J et al. (2015) Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism *Nat Rev Mol Cell Biol*;16(8):461–72
- [2] Zang Y et al. (2009) Adipose-specific deletion of autophagy-related gene7 (ATG7) in mice reveals a role in adipogenesis *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106(47):19860–5
- [3] White E et al. (2015) Autophagy, Metabolism, and Cancer *Clin Cancer Res*;21(22):5037–46
- [4] Yamashita SI et al. (2016) Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy *J Cell Biol*;215(5):649–665
- [5] Mathew R et al. (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 *Cell*;137(6):1062–75
- [6] Parzych KR et al. (2014) An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation *Antioxid Redox Signal*;20(3):460–73
- [7] Meley D et al. (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis *J Biol Chem*;281(46):34870–9
- [8] Gwinn DM et al. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint *Mol Cell*;30(2):214–26
- [9] Hosakawa N et al. (2009) Nutrientdependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13– FIP200 complex required for autophagy *Mol Biol Cell*;20(7):1981–91
- [10] Jung CH et al. (2009) ULK–Atg13–FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery *Mol Biol Cell*;20(7):1992–2003

- [11] Moscat J et al. (2009) p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer *Cell*;137(6):1001–4
- [12] Lee IH et al. (2012) ATG7 Modulates p53 Activity to Regulate Cell Cycle and Survival During Metabolic Stress *Science*;336(6078):225–8
- [13] Choi AM et al. (2013) Autophagy in Human Health and Disease *N Engl J Med*;368(7):651–62
- [14] Malhotra R et al. (2015) Loss of , but not , in pro-opiomelanocortin neurons exacerbates diet-induced obesity *Autophagy*;11(1):145–54
- [15] Kaushik S et al. (2011) Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis *EMBO Rep*;13(3):258–65
- [16] Coupe B et al. (2012) Loss of Autophagy in Pro-opiomelanocortin Neurons Perturbs Axon Growth and Causes Metabolic Dysregulation *Cell Metab*;15(2):247–55
- [17] Yau JW et al. (2017) Endothelial-specific deletion of autophagy-related 7 (ATG7) attenuates arterial thrombosis in mice *J Thorac Cardiovasc Surg*;154(3):978–988
- [18] Bang S et al. (2014) Autophagic activation in vitrified-warmed mouse oocytes *Reproduction*;148(1):11–9
- [19] Bang S et al. (2016) Vitrification, in vitro fertilization, and development of ATG7 deficient mouse oocytes *Clin Exp Reprod Med*;43(1):9–14
- [20] Zhuang SF et al. (2017) ATG7 Regulates Brain Angiogenesis via NF- $\kappa$ B-Dependent IL-6 Production *Int J Mol Sci*;18(5)
- [21] Kaushik S et al. (2011) Autophagy in Hypothalamic AgRP Neurons Regulates food Intake and Energy Balance *Cell Metab*;14(2):173–83

- [22] Zhang Y et al. (2009) Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (ATG7) in mice reveals a role in adipogenesis Proc Natl Acad Sci U S A;106(47)
- [23] Goldman S et al. (2010) Autophagy and adipogenesis Implications in obesity and type II diabetes Autophagy;6(1):179–81
- [24] Tanaka G et al. (2015) Endurance exercise training induces fat depot-specific differences in basal autophagic activity Biochem Biophys Res Commun;466(3):512–7
- [25] Jung HS et al. (2008) Loss of Autophagy Diminishes PanCREatic b Cell Mass and Function with Resultant Hyperglycemia Cell Metab;8(4):318–24
- [26] Yang L et al. (2010) Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance Cell Metab;11(6):467–78
- [27] Lee HY et al. (2016) Autophagy deficiency in myeloid cells increases susceptibility to obesity-induced diabetes and experimental colitis Autophagy;12(8):1390–403
- [28] Martinez-Lopez N et al. (2013) Autophagy in Myf5<sup>+</sup> progenitors regulates energy and glucose homeostasis through control of brown fat and skeletal muscle development EMBO Rep;14(9):795–803
- [29] Ryden M et al. (2016) Impaired atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in obesity Int J Obes (Lond);40(4):714–20
- [30] Bal NC et al. (2017) Both brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis processes are activated during mild to severe cold

adaptation in mice *J Biol Chem*;292(40):16616–16625

[31] Kang YH et al. (2016) Impaired macrophage autophagy induces systemic insulin resistance in obesity *Oncotarget*;7(24):35577–35591

[32] Rosenwald M et al. (2013) Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes *Nat Cell Biol*;15(6):659–67

[33] Kamatsu M et al. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice *Nature*;441(7095):880–4

[34] Levine B et al. (2004) Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy *Dev Cell*;6(4):463–77

[35] Sitenstra R et al. (2014) Autophagy in adipose tissue and the beta cell: implications for obesity and diabetes *Diabetologia*;57(8):1505–16

## Abstract

Obesity is one of the world's most widespread diseases, and the obesity population in Korea is close to 34.5%. Obesity is a medical phenomenon that is caused by excessive accumulation of body surplus energy in fat tissue in a situation where the imbalance between the energy absorbed by the human body and the energy consumed continuously continues. The research focuses on the reduction of energy intake and the increase of energy consumption for the suppression or treatment of obesity. We also conducted experiments involving autophagy and increased energy consumption, which play an important role in cell homeostasis. Interestingly, when specifically inhibited autophagy in brown adipose tissue, weight loss was observed in mice, and feed intake was not changed in the control group. In addition, metabolic activity was measured by the metabolic cage experiment, and oxygen consumption, carbon dioxide emission, and energy consumption were increased in the mice in which the autophagy knockout group. We observed the increase of energy consumption when inhibited the autophagy in brown adipose tissue. We observed that when autophagy was inhibited, mitochondrial related proteins and mitochondrial related mRNA were increased in brown fat. Therefore, we believe that the increase in mitochondria caused an increase in the heat generation of the mitochondrial membrane protein *ucp1* causing energy consumption. But Since it is only a phenotypic result when the autophagy is suppressed, it is important to understand the other side effects and precise mechanism.

(Keyword) : Obesity, Brown fat, ATG7, UCP1, Autophagy, Mitochondria