

사람 M21 유전자 과발현 형질전환생쥐에서의 심근비후증

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내과학교실 순환기내과,¹ 병리학교실 진단병리학과,²
동경의치대 의과학부,³ 경북대학교 유전공학과,⁴ 부산대학교 자연과학대학⁵

배성원¹ · 이원하⁴ · 김철홍^{1,5} · 박행기¹ · 이상철¹

고영혜² · 박승우¹ · Takuro Arimura³ · Akinori Kimura³ · 박정의¹

Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice with Overexpressed Small-Subunit of Human Myosin Light Chain Phosphatase

Sung Won Bae, PhD¹, Won Ha Lee, PhD⁴, Chul Hong Kim, MS^{1,5}, Haing Kee Park, BS¹,
Sang-Chol Lee, MD¹, Young Hye Ko, MD², Seung-Woo Park, MD¹,
Takuro Arimura, MD³, Akinori Kimura, MD³ and Jeong Euy Park, MD¹

¹Division of Cardiology, ²Pathology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul,
³Department of Molecular Pathogenesis, Division of Adult Diseases, Medical Research Institute, Tokyo Medical and
Dental University, Tokyo, Japan ⁴College of Natural Sciences, Department of Genetic Engineering, Kyungpook National
University, Daegu, ⁵College of Natural Science, Busan National University, Busan, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Recent reports have demonstrated that perturbation of the balance between myosin light chain (MLC) phosphorylation and the dephosphorylation status is associated with the development of cardiac hypertrophy. Myosin light chain phosphatase (MLCP) is a key enzyme that regulates the phosphorylation status of the MLC, but its functional roles in cardiac muscle have not been well investigated. Especially, the functions of the small-subunit of MLCP in cardiac muscles are not well elucidated. Here, whether the human heart-specific small-subunit (M21) of MLCP is associated with hypertrophic responses in a transgenic mice model were assessed. **Materials and Methods** : The transgenic mice, overexpressing the human M21, were generated from a cardiac-specific transgenic construct. Cardiac tissues from the transgenic mice were subjected to histology for their morphological examination. The echocardiographic parameters of the murine heart were examined with transgenic mice aged 1, 2 and 3 months, and compared with their non-transgenic littermates. To determine whether the transgenic heart was sensitive to stress, the echocardiographic examination was also performed at the baseline, both before and after the administration of isoproterenol, at a dosage of 30 µg/g/day, for 2 weeks. **Results** : The histological analysis of the transgenic heart revealed myocyte disarray and nuclear hypertrophy. No significant differences were observed between the transgenic and non-transgenic mice in relation to the echocardiographic determinants, such as the left ventricular dimensions and the wall thickness. Chronic cardiac stress, induced by isoproterenol infusion, also failed to show any significant differences in relation to the same determinants. **Conclusion** : Overexpression of the human M21 in the murine heart induced myocyte hypertrophy. However, the overall cardiac functions were not affected under normal and stressed conditions. (Korean Circulation J 2003;33(12):1165-1173)

KEY WORDS : Cardiomyopathy, hypertrophic ; Phosphatase, myosin light chain ; Calcium sensitivity ; Mice, transgenic ; Protein subunits.

논문접수일 : 2003년 5월 30일

심사완료일 : 2003년 7월 4일

교신저자 : 박정의, 135-710 서울 강남구 일원동 50 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내과학교실 순환기내과

전화 : (02) 3410-3416, 3419 · 전송 : (02) 3410-3849 · E-mail : jepark@smc.samsung.co.kr

서론

Ca^{2+} 은 미오신(myosin)과 액틴(actin)의 상호작용을 통한 근수축 기작에 있어서 매우 중요한 조절 인자이다. 미오신 경사슬(myosin light chain, MLC)의 인산화 상태가 근수축의 Ca^{2+} 감수성(Ca^{2+} sensitivity)과 연관되어 있음은 잘 알려져 있으며,¹⁾²⁾ 이러한 MLC 인산화 상태의 조절에는 주로 미오신 경사슬 인산화효소(myosin light chain kinase, MLCK)와 미오신 경사슬 탈인산화효소(myosin light chain phosphatase, MLCP)라는 두 효소가 관여함이 또한 알려져 있다. MLCK의 기능과 역할은 잘 조사되어 온 반면,³⁾⁴⁾ MLCP 및 이와 관련된 주제의 경우에는 최근에서야 주목 받기 시작하였다.⁵⁾⁶⁾

평활근의 경우, MLCP는 약 38 kDa 정도의 type 1 단백질 탈인산화효소의 catalytic subunit(PP1c)⁷⁻¹⁰⁾과, 110~130 kDa 정도의 myosin binding subunit(MBS)¹¹⁾과 20 kDa 정도의 작은 regulatory subunit(M20)으로 구성된다.¹²⁻¹⁴⁾ MBS는 PP1c, 미오신 중사슬(myosin heavy chain, MHC), MLC와 결합하고¹³⁾¹⁵⁻¹⁹⁾ 이로써 MLCP 복합체를 형성하는 것으로 보고되고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ PP1c에 의한 미오신 사슬들의 탈인산화는 MBS 존재 하에 증가되며, 따라서 MBS는 PP1c의 탈인산화 활성을 미오신 사슬쪽으로 증진시키는 조절작용을 한다.¹⁵⁻¹⁷⁾

반면, MLCP의 small subunit(M20)에 관한 정보는 많이 알려져 있지 않다. M20은 C-말단에 루신지퍼 모티프(leucine zipper motif)를 갖고 있으며 그 전체가 MBS C-말단의 3분의 1과 매우 큰 상동성을 보인다.²⁰⁾ 미오신과 상호작용한다는 보고와 MBS의 C-말단과 결합한다는 보고가 있으며,¹⁷⁾¹⁸⁾ 그 기능에 관한 연구 결과로는 혈관 평활근세포의 근수축 기관의 Ca^{2+} 감수성을 증가시킨다²¹⁾는 것이 알려져 있다. 특히 이 M20의 혈관 평활근이 아닌 다른 근육에서의 그 존재와 기능은 거의 밝혀진 것이 없다.

심근에서도 몇몇 단백질 탈인산화효소들의 특성이 밝혀지고 있지만,²⁰⁾²²⁾²³⁾ MLCP에 관한 보고는 거의 없는 실정이다.²⁴⁾²⁵⁾ 더욱이, 심근과 같은 횡문근 수축시의 Ca^{2+} 감수성은 주로 troponin에 의한 조절 작용으로 알려져 있으며,²⁶⁾ MLC의 인산화에 의한 Ca^{2+} 감수성은 아직 증명되지 않고 있다. 그러나, 최근 발표된 보고는 심근

비후증 발생에 MLC 인산화가 관여할 가능성을 보여주고 있다.²⁷⁾

최근 심근에 특이적으로 발현되는 새로운 유전자 선별 과정에서, MLCP의 M20 small subunit의 심장 특이 isoform인 M21이 발견되어 클로닝 되었으며, M21에 의한 근수축의 Ca^{2+} 감수성 증가가 permeabilized 된 돼지 심장 동맥과 백서 심근세포로부터 관찰됨으로써, 근수축에 있어서의 Ca^{2+} 감수성 조절 작용이 제시되고 있다.²⁸⁾ 이러한 M21의 심근 수축에 대한 조절 작용이 미치는 영향을 in vivo에서 밝히고자 본 연구에서는, 사람 M21이 심장에서 광량 발현되는 형질전환생쥐를 제조하였으며, 그로 인한 심장 비후성 반응(hypertrophic responses)의 유도 여부를 심초음파검사(echocardiography)와 병리조직학적 검사를 통하여 조사하였다.

재료 및 방법

Polymerase Chain Reaction(PCR)

유전자 증폭은 10 mM Tris/HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs의 50 μL 의 volume 안에서 Taq DNA polymerase(Takara, Tokyo, Japan)를 이용하여 각 50 pmole의 sense/anti-sense primer 쌍으로부터 수행되었다. 각 PCR cycle은 초기 1분간의 94°C에서의 denaturation 후 모두 25번의 94°C에서의 50초, 60°C에서의 50초, 72°C에서의 50초가 반복되었으며, 그 후 72°C에서의 elongation 과정이 7분간 이어짐으로써 이루어졌다. 본 연구에 사용된 primer는 모두 4종으로, pCR2.1-Not1'5F(5'-CTA GCG GCC GCT CTG CAG AAT TC-3'), HSM-Hind3'R(5'-GGG CCA CCT TCT CAA GTT TGG-3'), HSM-Hind5'F(5'-AGC AGA TAT AAA GTC CAA ACT TG-3'), 그리고 pCR2.1-Kpn1'3R(5'-CTA GGT ACC AGT GTG CTG GAA TTC G-3')이다. PCR의 결과적 산물은 1.2% 아가로스겔에서 전기영동으로 분석되었으며, 겔로부터의 순수분리에는 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN, Hiden, Germany)가 사용되었다.

인간 M21 발현 벡터 제조

사람 M21의 cDNA(HS602-2, major type A)는 일본 동경의치대 교수 Kimura박사로부터 얻을 수 있었

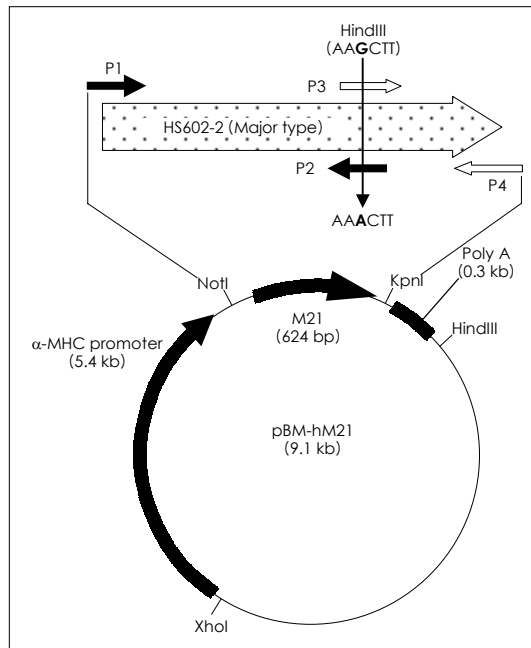


Fig. 1. Expression vector construction. A transgenic construct encoding human M21 protein was linked to the cardiac-specific α -myosin heavy chain (α -MHC) promoter and used to generate transgenic mice. P1, P2, P3, and P4 represent primer pCR2.1-Not1'5F, HSM-Hind3'R, HSM-Hind5'F, and pCR2.1-Kpn1'3R respectively.

다.²⁸⁾ Transfection 과정시의 편의성을 위하여 M21 유전자의 139번째 코돈(codon)에 silent mutation(AAG→AAA)을 도입함으로써 유전자 내부의 HindIII site를 제거하였다(Fig. 1). 이 과정에는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 primer쌍인 pCR2.1-Not1'5F/HSM-Hind3R과 HSM-Hind5F/pCR2.1-Kpn1'3R을 이용한 2번의 PCR 증폭과 각 PCR 반응에서 증폭된 두 PCR 단편을 template로 진행된 pCR2.1-Not1'5F/pCR2.1-Kpn1'3R의 primer쌍에 의한 또 한번의 PCR 증폭 과정이 수행되었다. 이 마지막 PCR 단편은 NotI과 KpnI으로 처리 후 같은 제한효소로 처리된 pBM20 벡터에 클로닝되었고, 삽입된 transgene의 염기서열을 확인 후, 형질전환생쥐 제조에 사용되었다.

형질전환생쥐(Transgenic mice) 제조

Transgenic construct는 XhoI/Hind III로 처리 후 M21 발현 단위가 포함되어 있는 6.7 kb의 절편을 분리하였다. 이 단편은 FVB mice의 수정된 난자 내의 전핵(pronuclei)에 미세주입되었고, 그 후 일련의 표준화된

절차²⁹⁾에 따라 배아 이식이 진행되었다. Founder mice는 꼬리로부터 분리된 DNA로부터 M21에 상응하는 PCR 단편의 증폭을 확인함으로써 선별되었다. 안정적인 형질전환생쥐의 계보는 이 founder mice와 FVB mice의 교배를 통하여 만들어졌다.

형질전환생쥐의 Transgene 발현 확인

Reverse transcription-PCR(RT-PCR)

형질전환된(Tg) 또는 그렇지 않은(non-Tg) 자손 생쥐군으로부터의 RNA의 추출에는 TRIzol(Invitrogen, NY, USA)을 이용하였다. 분리된 RNA에서의 random hexamer(CLONTECH, CA, USA)를 이용한 1차 cDNA 합성에는 SuperScript™ II reverse transcriptase(Invitrogen)가 사용되었고, 이 역전사 반응물의 20분의 1과 pCR2.1-Not1'5F/pCR2.1-Kpn1'3F primer쌍을 이용한 PCR 증폭 결과물을 관찰함으로써 transgene의 transcript를 확인하였다.

Western blot analysis

심장 및 기타 다양한 조직 샘플들을 20% SDS과 10% β -mercaptoethanol이 함유된 용액에서 homogenation시켰다. 단백질 정량은 각 homogenate의 일정 소량을 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 수행되었다. 이를 바탕으로 동량의 단백질을 12% SDS-PAGE 상에서 전기영동 후, PVDF membrane으로 transfer하였다. Human M21 단백질의 탐침에는 rabbit polyclonal anti-human M21(1 : 1,000) antibody가 사용되었다.

심장초음파 검사(Echocardiography)

심장의 형태적 및 기능적 변화는 심초음파 검사로 확인하였다. 이면성 및 M-형 심초음파 검사는 2.5% avertin(15 μ L/g)으로 전신마취 후 실시하였다. 한달 간격으로 3달동안 형질전환생쥐의 분당 심박동수(heart rate)와 확장기 및 수축기말의 심실 중격의 두께(IVSd, IVSs)와 좌심실 내경(LVIDd, LVIDs) 및 좌심실 후벽의 두께(LVPWd, LVPWs)를 측정하여 transgene을 갖지 않은 littermate과 비교하였다. 좌심실 단축분획율(per cent fractional shortening)은 $[(LVIDd - LVIDs) / LVIDd] \times 100$ 으로 계산되었고, IVS/LVPW는 $(IVSd / LVPWd) \times 100$ 으로 계산되었다. 또 isoproterenol에 의한 만성 심

박동수 증가가 transgenic heart에 미치는 영향을 살펴 보고자, 견갑골 인근에 삽입된 Alzet® miniosmotic pumps를 이용하여 약 30 $\mu\text{g/g/day}$ 속도로 isoproterenol을 2주간 주입 후 심조음과 측정 결과를 비교하였다. 자료 분석을 위하여 비디오 테이프에 녹화하였으며 모든 측정치는 5 cycle에서 5회 측정하여 그 평균을 구하였다.

조직병리학(Histopathology)적 검사

조직병리학적 분석을 위하여 일부에서 15% KCl을 심장에 직접 주입하여 심장이 이완기 상태에서 멈추게 한 후 적출하였다. 10% 포르말린으로 24 시간 고정한 후 사진을 찍고 파라핀에 포매한 후 5 μm 두께로 연속적인 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin(H & E) 염색을 하였다.

통계처리

모든 자료의 값은 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 통계분석은 SPSS ver 7.0을 사용하였고, 형질전환군과 비형질전환 대조군간의 측정값의 차이 및 유의성은 Students t-test를 통해 검증하였으며, $p<0.05$ 인 경우를 통계적으로 의미가 있는 것으로 하였다.

결 과

인간 M21의 생쥐 심근에서의 특이 발현을 위하여 α -미오신 중사슬 전사조절 부위(α -MHC promoter)가 이용된 pBM20-hM21 벡터가 제조되었다(Fig. 1). 이 M21의 과발현으로 인한 심장의 질병과 관련된 반응을 살펴보기 위하여 형질전환생쥐(transgenic mice)가 개발되었으며, 형질전환 여부는 꼬리 DNA를 이용한 M21 유전자의 PCR 증폭 결과물로 확인하였고(data not shown), 안락사 후 적출된 심장 조직에서의 인간 M21 transcript의 발현은 RT-PCR로 확인하였다(Fig. 2A). 또 M21 특이 항체를 이용한 주요 조직에서의 M21의 발현을 조사한 결과 심장에서만 특이적으로 발현되고 있음을 관찰하였다(Fig. 2B). M21의 발현을 형질전환생쥐 세 마리와 정상쥐 세 마리의 심장 조직에서 Western blot으로 분석한 결과 발현 정도가 같음을 관찰하였다(data not shown).

M21의 과발현이 심근 세포에 미치는 영향을 측정하

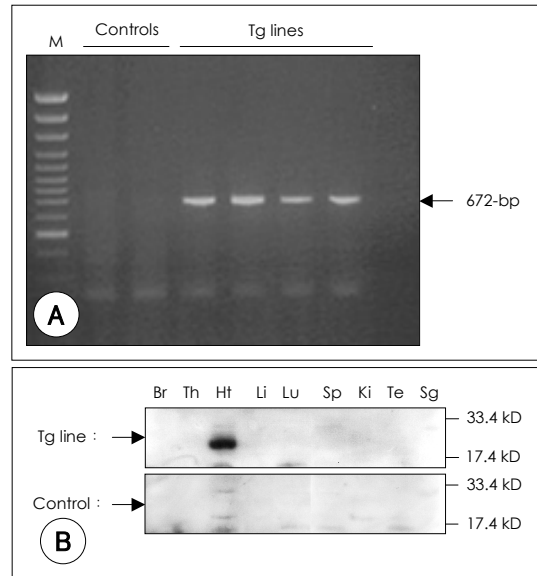


Fig. 2. Human M21 expression in transgenic mice. A : RT-PCR analysis of transgene transcript in total RNA isolated from hearts of transgenic (Tg) lines and non-transgenic littermates (controls). A 672-bp product corresponding to the M21 transcript, was amplified using primers pCR2.1-NotI'5F and pCR2.1-KpnI'3R. lane M, 100bp DNA ladder (O'RangeRuler™, MBI fermentas). B : western blot analysis of M21 transgene expression in various organs from a euthanized transgenic (Tg) mouse and a nontransgenic littermates (controls) by using rabbit polyclonal antibody raised against human M21 proteins. Br : brain, Th : thymus, Ht : heart, Li : liver, Lu : lung, Sp : spleen, Ki : kidney, Te : testis, and Sg : salivary gland, RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction.

기 위해 안락사 시킨 3개월령의 형질전환생쥐와 정상쥐의 심장을 조직병리학적으로 관찰하였다(Fig. 3). 심근 세포의 배열이 정상 대조군에 비해 흐트러져 있음이 관찰되었으며, Fig. 3에서 적혈구 면적에 비례한 심근 세포 핵의 면적을 이미지 분석을 통해 확인한 결과 형질전환생쥐의 심근 세포 핵의 면적(3.22 ± 2.42 , $n=100$)은 정상 대조군(1.99 ± 1.42 , $n=100$)보다 약 1.6배 증가한 것을 알 수 있었다($p<0.000012$).

M21의 과발현이 심장기능에 미치는 영향을 확인하기 위해 심조음파를 이용하여 형질전환생쥐 심장의 기능 및 구조적 특성 분석을 시행한 결과 형질전환생쥐의 측정치들은 대조군과 유의한 차이를 보여주지는 못하였다(Table 1). 한달 간격으로 3달간 조사된 형질전환생쥐의 분당 심박동수(Heart rate, beat per min) 및 IVSd, IVSs, LVIDd, LVIDs, LVPWd, LVPWs, LVFS, IVS/LVPW 등의 측정치들은 non-transgenic(non-Tg) 자손

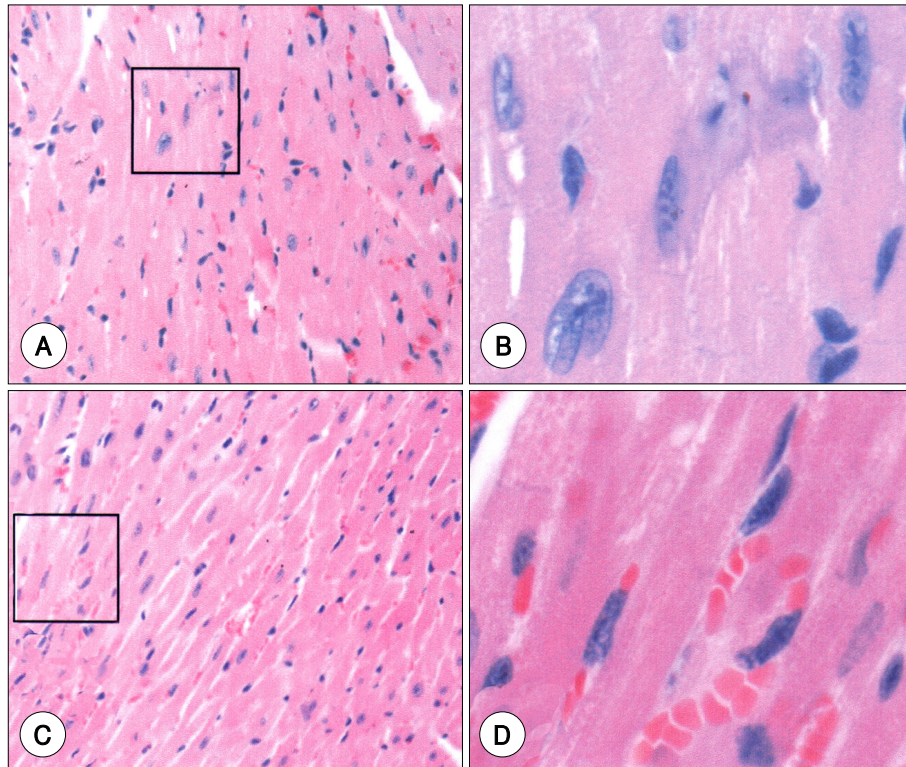


Fig. 3. Myocardial histology in transgenic mice (top) and non-transgenic littermate (bottom) aged 3 months. Myocyte hypertrophy and disarray are present in the left ventricle of transgenic mouse. Sections were stained with H & E. Magnification was $\times 200$ for A and C, and $\times 800$ for B and D. Boxes in panels A and C indicate the regions illustrated by the high-magnification pictures.

(littermates)에서의 값들과 비슷한 결과를 나타내었다.

스트레스가 인간 M21이 과발현된 생쥐 심장에 미치는 영향을 알아보기 위한 2주간의 isoproterenol 처리는, transgenic (Tg)와 non-Tg 군의 분당 심박동수 및 체중에 대한 심장의 무게비(heart to body weight ratio)의 상승을 유발하였고, LVIDs의 증가, LVIDd의 감소 등의 변화를 야기하였지만 형질전환생쥐와 대조군 사이에 유의한 차이점을 찾을 수는 없었다(Table 2).

고 찰

미오신 경사슬(MLC)의 인산화 상태는 근조직의 수축 기작에 있어 중요한 역할을 하며 칼슘과 밀접한 관계를 갖고 있는데, 그 이유는 미오신 경사슬의 인산화 경로에 미오신 경사슬 인산화 효소(MLCK)라는 칼슘/칼모듈린(Ca^{2+} /calmodulin) 의존적 효소가 관여하기 때문이다. 하지만, 세포 내의 유리 칼슘과 MLCK 활성화

에 따른 미오신 경사슬의 인산화는 상황에 따라 변하며 고정되어 있지 않다. 그 예로, MLCK의 활성화에 필요한 최적의 칼슘 농도보다 낮은 환경에서도 미오신 경사슬의 인산화와 이에 따른 근수축이 증가할 수 있는데, 이를 Ca^{2+} sensitization이라 한다. 이러한 현상은 미오신 경사슬 인산화에는 미오신 경사슬 탈인산화 효소라는 또 다른 요소가 작용하기 때문이며, angiotensin II 나 endothelin-1 등의 agonist에 의하여 그 활성이 감소하기 때문에 일어난다. 이렇듯 주위 상황에 따른 미오신 경사슬의 인산화/탈인산화는 유기적으로 근조직 기능에 반영되며, 따라서 그 불균형은 해당 근조직에 심각한 문제를 야기할 수 있다.

심근조직에 있어 미오신 경사슬의 인산화와 탈인산화의 불균형은 심근 비후증 발생에 관여할 가능성이 보고되었으며, 또한 최근 클로닝된 인간 MLCP의 심장 특이 small-subunit인 M21이 MLCP의 large-subunit에 결합함으로써 Ca^{2+} 감수성을 증가시키는 심근 수축

Table 1. Echocardiographic characteristics of transgenic (Tg) and non-transgenic (control) mice aged 1, 2, and 3 month(s)

Parameter	1-month-old mice		2-month-old mice		3-month-old mice	
	Control	Tg	Control	Tg	Control	Tg
No. studied	7	9	12	14	7	5
BW (g)	25.00± 3.96	24.44± 3.42	26.58± 3.55	26.50± 3.72	30.57± 3.87	31.50± 3.42
HR (bpm)	447.14±24.60	463.78±46.11	458.92±61.76	462.71±64.05	468.57±40.19	502.40±60.92
IVSd (cm)	0.08± 0.01	0.09± 0.02	0.08± 0.01	0.09± 0.01	0.10± 0.02	0.09± 0.02
IVSs (cm)	0.14± 0.02	0.15± 0.02	0.14± 0.01	0.14± 0.03	0.14± 0.02	0.14± 0.02
LVIDd (cm)	0.33± 0.04	0.34± 0.04	0.33± 0.04	0.31± 0.04	0.31± 0.04	0.31± 0.05
LVIDs (cm)	0.15± 0.04	0.15± 0.03	0.16± 0.04	0.12± 0.05	0.15± 0.03	0.13± 0.05
LVPWd (cm)	0.09± 0.01	0.09± 0.01	0.09± 0.02	0.10± 0.02	0.10± 0.02	0.09± 0.02
LVPWs (cm)	0.14± 0.03	0.15± 0.01	0.14± 0.02	0.15± 0.02	0.14± 0.02	0.14± 0.02
LVFS (%)	53.96± 9.25	56.56± 7.30	52.87± 8.57	60.54±10.86	51.10± 6.35	59.22± 7.93
IVS/LVPW	0.92± 0.09	0.96± 0.11	0.90± 0.12	0.92± 0.12	0.92± 0.10	0.92± 0.20

BW : body weight, HR : heart rate (bpm, beat per minute), IVSd : interventricular septum thickness in diastole, IVSs : interventricular septum thickness in systole, LVIDd : left ventricular internal diameter in end-diastole, LVIDs : left ventricular internal diameter in end-systole, LVPWd : left ventricular posterior wall thickness in diastole, LVPWs : left ventricular posterior wall thickness in systole, LVFS : left ventricular fractional shortening, IVS/LVPW : ratio of the IVS to the LVPW

조절 작용을 갖고 있음이 발표되었다. 따라서 이러한 M21의 과발현이 심기능에 미치는 영향의 형질전환생쥐를 이용한 조사는 심장 질환의 새로운 동물 모델을 제시할 수 있을 것이다.

예상대로, 인간 M21의 과발현이 심근세포에 미치는 영향을 측정하기 위해 안락사 시킨 3개월령의 형질전환생쥐와 정상쥐의 심장의 조직병리학적 관찰 결과는 심근 세포의 비후(myocyte hypertrophy)를 보여주었다(Fig. 3). 심근 세포의 배열이 흐트러져 있음(disarray)을 알 수 있었으며 세포의 크기와 핵의 크기가 증가한 것을 알 수 있었다. Myocyte hypertrophy와 disarray는 심근 비후증(hypertrophic cardiomyopathy)의 주요 병리 조직학적 특징이며, 특히 myocyte hypertrophy는 허혈성 심장 질환, 심판막성 심장 질환, 선천성 심장 질환, 심근염성 심장 질환, 고혈압성 심근증, 비후성 심근증, 특발성 심근증 등 거의 모든 심장 질환과 연관되어 있다. 처음에는 심근 과부하에 대해 적응하기 위한 장점을 보이기도 하지만, 심근 세포 비후는 결국 심부전과 종종 심근 괴사를 야기한다. 따라서 M21의 과발현에 의한 심근 세포 비후 기작의 조명은 중요한 의학적 의미를 포함한다.

하지만, M21의 과발현이 심장 기능에 영향을 주었는지를 조사하기 위하여 시행된 심초음파를 이용한 형질

전환생쥐 심장의 기능 및 구조적 특성 분석 결과들은 대조군과의 유의한 차이를 보여주지는 못하였다(Table 1). 3달간 형질전환생쥐의 심실 중격의 두께와 좌심실 내경 및 좌심실 후벽의 두께, 그리고 분당 심박동수를 측정하여 transgene을 갖지 않은 littermate과 비교하였지만 심장의 구조적 이상을 찾을 수는 없었다. 이는 M21의 과발현이 심근세포의 형태에는 영향을 미쳤으나 심장의 기능에까지는 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

또 스트레스가 인간 M21이 과발현된 생쥐 심장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 transgenic(Tg)와 non-Tg 군에 isoproterenol 처리 전과 후의 심초음파를 이용한 분석 결과는 역시 형질전환생쥐와 대조군 사이에 유의한 차이점을 보여주지 못하였다(Table 2). 이와 같은 결과는 M21의 과발현이 심장기능에 영향을 미치지 않는다는 것을 재확인하는 결과이다. 그러나 실험에 사용한 isoproterenol의 양을 변화시킬 경우 심장기능 및 심근 비후증에 미치는 영향에 관한 연구도 앞으로 필요하다고 할 수 있다.

비록 형질전환된 심장의 심초음파를 통한 구조적, 기능적 관찰은 형질전환되지 않은 정상 심장에 비하여 큰 차이를 보이지는 않았지만, 안락사 시킨 3개월령의 형질전환생쥐 심장의 조직병리학적 관찰은 심근 세포에서의 비후증을 보여주고 있으며, 4개월령 형질전환생쥐 심

Table 2. Echocardiographic characteristics of isoproterenol-infused mice

Parameter	Isoproterenol-infused		Vehicle-infused	
	Control	Tg	Control	Tg
No. studied	2	2	4	4
HW/BW	0.57 ± 0.04	0.56 ± 0.11	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.07
HR (bpm)	668.00 ± 76.37	751.00 ± 33.94	461.50 ± 32.71	505.25 ± 66.51
IVSd (cm)	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02
IVSs (cm)	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.03
LVIDd (cm)	0.24 ± 0.05	0.26 ± 0.03	0.34 ± 0.06	0.35 ± 0.06
LVIDs (cm)	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.06
LVPWd (cm)	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.02
LVPWs (cm)	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.02
LVFS (%)	70.70 ± 5.94	79.20 ± 2.55	47.73 ± 4.74	43.60 ± 8.93
IVS/LVPW	0.81 ± 0.02	0.77 ± 0.10	0.90 ± 0.05	0.96 ± 0.13

HW/BW : heart to body weight ratio, HR : heart rate (bpm, beat per minute), IVSd : interventricular septum thickness in diastole, IVSs : interventricular septum thickness in systole, LVIDd : left ventricular internal diameter in end-diastole, LVIDs : left ventricular internal diameter in end-systole, LVPWd : left ventricular posterior wall thickness in diastole, LVPWs : left ventricular posterior wall thickness in systole, LVFS : left ventricular fractional shortening, IVS/LVPW : ratio of the IVS to the LVPW

장의 유전자 발현 profile의 non-Tg littermate과의 비교 분석 결과 역시 atrial natriuretic factor (ANF), 미오신 경사슬 2, skeletal α -actin 등의 잘 알려진 비후성 세포 반응 유전자의 증가를 보여주었다(일본 기무라 박사 연구팀 결과). 결론적으로, 과발현된 M21은 심근 세포의 미오신 경사슬 인산화/탈인산화 상태에 불균형을 초래할 것이고, 때문에 심근 세포의 비후성 반응이 유도되었을 것이다. 형질전환생쥐의 심근 세포가 보여준 hypertrophy와 disarray는 심장의 이완 기능 장애를 초래할 가능성이 있으며, 3개월내의 어린 형질전환생쥐의 심초음파 분석 결과로는 심장의 구조적 기능적 결함을 발견할 수는 없었지만 좀더 노쇠한 형질전환생쥐의 심기능 분석시에는 M21 과발현으로 인한 좌심실 비후 및 수축기 이상이 발생할 가능성을 배제할 수 없다.

요 약

배경 및 목적 :

최근 발표된 보고들에 의하면, 미오신 경사슬의 인산화와 탈인산화의 불균형이 심비후증 발생에 관여할 가능성을 보여주고 있다. 미오신 경사슬 탈인산화효소 (MLCP)는 이러한 미오신 경사슬의 인산화 상태를 조절하는 요소 중 하나임이 알려져 있음에도 불구하고 심근에서의 기능적인 면에 대한 조사는 거의 이루어지지

않고 있다. 특히 MLCP의 subunit 중 하나인 small-subunit의 기능은 혈관 평활근세포에서 근육축 기관에서의 Ca^{2+} 감수성(sensitivity)을 증가시킨다는 것 외의 다른 근육에서의 그 존재와 기능은 거의 밝혀진 것이 없다. 최근 MLCP의 심근에서의 small-subunit에 해당하는 M21이 클로닝되었고, 따라서 본 연구에서는, 형질전환생쥐를 이용하여 사람 M21의 심장 특이 발현에 따른 비후성 반응(hypertrophic responses)의 유도 여부를 알아보고자 하였다.

방 법 :

사람 M21이 심장에서 과량 발현되는 형질전환생쥐를 제조하였으며, 꼬리 DNA를 이용한 PCR로서 transgenic(Tg) mice를 선별하였고, western 분석을 이용하여 M21의 심장 특이 발현을 확인하였다. M21의 과발현이 심근세포에 미치는 영향은 심장의 조직병리학적 관찰로 조사되었다. 심장기능의 이상을 확인하기 위해 심초음파 분석법으로 분당 심박동수, 좌심실중격 두께, 좌심실후벽 두께, 좌심실내경 크기 등의 심장 구조 및 기능의 차이점을 1개월, 2개월 3개월령 형질전환생쥐군에서 조사하여 비형질전환 자손군의 측정치와 비교하였다. 또한 심장에 자극을 가하였을때의 반응을 분석하기 위해 isoproterenol을 30 μ g/g/day의 속도로 2주간 처리하여 심근비후증을 유발하고 형질전환생쥐군과 비교군을 심초음파로 분석하였다.

결 과 :

형질전환생쥐의 심장을 조직병리학적으로 조사한 결과 심근 세포의 비후증(myocyte hypertrophy)이 관찰되었다. 그러나 형질전환된 생쥐군과 비형질전환 대조군 사이의 좌심실벽 두께, 좌심실내경의 직경 등의 심초음파적 분석 결과들은 유의성 있는 차이를 보여주지 못 하였다. Isoproterenol 주입을 통한 심장의 만성 스트레스 유발도 두 군 사이의 유의한 변화를 야기하지 못하였다.

결 론 :

생쥐를 이용한 인간 M21 단백질의 과발현은 심근 세포에서의 비후성 반응을 유도하였으나, 심장 구조 및 기능 상의 심각한 심근비후증을 유발하지는 못하였다.

중심 단어 : 비후성 심근증 ; 미오신 경사슬 탈인산화효소 ; 칼슘 감수성 ; 형질전환생쥐 ; Protein subunits.

본 논문은 1999년 대한순환기학회 산학협동연구비지원사업과 2001년 과학재단 국제공동연구과제(F01-2001-000-20019-0) 연구비 지원으로 이루어졌으며, 2001년 대한순환기학회 춘계학술대회에서 구연발표한 논문임.

REFERENCES

- Hartshorne DJ, Ito M, Ikebe M. Myosin and contractile activity in smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 1989;255:269-77.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994;372:231-6.
- Gallagher PJ, Herring BP, Stull JT. Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil* 1997;18:1-16.
- Morano I. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med* 1999;77:544-55.
- Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 1998;19:325-41.
- Hartshorne DJ, Hirano K. Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem* 1999;190:79-84.
- Ingebritsen TS, Cohen P. The protein phosphatases involved in cellular regulation: 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem* 1983;132:255-61.
- Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1989;58:453-508.
- Bollen M, Stalmans W. The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992;27:227-81.
- Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, Hartshorne DJ. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:871-7.
- Takahashi N, Ito M, Tanaka J, Nakano T, Kaibuchi K, Odai H, Takemura K. Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21. *Genomics* 1997;44:150-2.
- Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M, Cohen P. The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits: the major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 1992;210:1023-35.
- Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ, Nakano T. Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 1994;269:30407-11.
- Shirazi A, Iizuka K, Fadden P, Mosse C, Somlyo AP, Somlyo AV, Haystead TA. Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme: the differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *J Biol Chem* 1994;269:31598-606.
- Haystead CM, Gailly P, Somlyo AP, Somlyo AV, Haystead TA. Molecular cloning and functional expression of a recombinant 72.5 kDa fragment of the 110 kDa regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett* 1995;377:123-7.
- Ichikawa K, Hirano K, Ito M, Tanaka J, Nakano T, Hartshorne DJ. Interactions and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochemistry* 1996;35:6313-20.
- Hirano K, Phan BC, Hartshorne DJ. Interactions of the Subunits of Smooth Muscle Myosin Phosphatase. *J Biol Chem* 1997;272:3683-8.
- Johnson D, Cohen P, Chen MX, Chen YH, Cohen PT. Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem* 1997;244:931-9.
- Tanaka J, Ito M, Feng J, Ichikawa K, Hamaguchi T, Nakamura M, Hartshorne DJ, Nakano T. Interaction of myosin phosphatase target subunit 1 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. *Biochemistry* 1998;37:16697-703.
- Chen YH, Chen MX, Alessi DR, Campbell DG, Shanahan C, Cohen P, Cohen PT. Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett* 1994;356:51-5.
- Zhou Y, Nishimura J, Hirano K, Kanaide H. The exogenously added small subunit of smooth muscle myosin phosphatase increases the Ca^{2+} sensitivity of the contractile apparatus in the permeabilized porcine renal artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:158-63.
- Mumby MC, Russell KL, Garrard LJ, Green DD. Cardiac contractile protein phosphatases. Purification of two enzyme forms and their characterization with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem* 1987;262:6257-65.
- Chisholm AA, Cohen P. The myosin-bound form of protein phosphatase 1 (PP-1M) is the enzyme that dephosphorylates native myosin in skeletal and cardiac muscles. *Biochim Biophys Acta* 1988;971:163-9.
- Nishio H, Ichikawa K, Hartshorne DJ. Evidence for myosin-binding phosphatase in heart myofibrils. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:570-5.
- Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, Ito M. A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 1998;49:

- 59-68.
- 26) Ebashi S. Ca^{2+} and the contractile proteins. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:129-36.
- 27) Aoki H, Sadoshima J, Izumo S. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat Med* 2000;6:183-8.
- 28) Arimura T, Suematsu N, Zhou YB, Nishimura J, Satoh S, Takeshita A, Kanaide H, Kimura A. Identification, characterization, and functional analysis of heart-specific myosin light chain phosphatase small subunit. *J Biol Chem* 2001;276:6073-82.
- 29) Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4438-42.