

**Tonicity responsive enhancer binding protein (TonEBP) knockout mice를 만들기 위한
cDNA cloning과 유전자구조에 관한 연구**

김지윤¹, 권혁무², ¹고신의과대학 생리학, ²JohnsHopkins의과대학 신장내과학

신 수질 세포는 요 농축 기능을 수행하기 위하여 고장성 환경에 노출되어 있지만, 세포내에 compatible osmolyte를 축적함으로써 세포의 용적을 정상적으로 유지한다. Compatible osmolyte의 세포내 축적은 sodium/myo-inositol 운반체(SMIT), sodium/chloride/betain 운반체, 그리고 aldose reductase (AR)의 작용에 의해 조절되는데, 이들 유전자의 전사 촉진은 Tonicity-responsive enhancer (TonE)에 결합하는 전사인자인 TonE binding protein (TonEBP)에 의해 조절된다. 이 전사인자의 생체내 역할을 보다 명확히 밝히기 위해서는 이 유전자에 결정적인 결함을 지닌 knockout mouse를 만들어 연구하는 것이 절실히 요구된다. TonEBP knockout mouse를 만들기 위해서는 쥐 TonEBP의 아미노산 서열과 DNA상의 유전자 구조를 정확히 알아야한다. 본 연구에서는 쥐의 TonEBP 아미노산 서열을 밝히기 위하여 mouse kidney cDNA library를 human TonEBP cDNA probe로 screening하여 핵산서열이 사람의 TonEBP와 92%의 상동성을 보이고, 1458개의 아미노산 정보를 암호화하고 있는 쥐의 TonEBP cDNA 서열을 밝혔다. 쥐의 TonEBP 유전자 구조는 bacterial artificial chromosome (BAC) 운반체에 들어있는 mouse TonEBP genomic DNA (BAC I)를 제한효소로 잘라 subcloning 한 다음 쥐의 TonEBP cDNA를 probe로 만들어 southern blotting하여 exon의 위치를 찾았다. 그 결과 200 kb의 BAC I 유전자는 12개의 다양한 크기의 exon들로 구성되어 이 exon들은 적어도 33 kb이상, 54 kb이하의 범위에 분포함을 밝혀내었다. 그리고 Open reading frame은 exon II에서 exon XII에, Rel homology DNA binding domain (RHD)은 exon III, IV, V에 위치함을 확인하였다. 이를 바탕으로 TonEBP knockout mice를 만들기 위한 targeting site인 RHD를 포함한 Exon I-V의 부분적 유전자 지도를 완성하였다.

D2

**흰쥐 콩팥에서 Tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP)의
발현양상에 대한 Hydration과 Dehydration의 영향**

차정호, 한기환, 임선우, 정주영, 임경미, S.K. Woo*, H.M. Kwon*, 김진

가톨릭대학교 의과대학 해부학교실,

Division of Nephrology, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA*

포유류 콩팥의 속질은 일반적으로 고삼투압상태에 있으며, myo-inositol, betaine 과 sorbitol 같은 소위 compatible osmolytes를 세포 내에 축적함으로써 고삼투압상태의 환경을 이겨나간다. Tonicity-responsive enhancers (TonE)는 고삼투압상태로 인한 이러한 osmolytes의 세포내 축적에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 TonE의 전사를 촉진하는 tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP)이 고삼투압조건에서 활성화되며 핵으로의 이동이 배양세포계에서 관찰되었다. 본 실험에서는 생체 내에서도 TonEBP가 삼투압의 변화에 따라 조절되는지를 연구하기 위하여 흰쥐의 대조군(3일간 자유로운 수분섭취), hydration군(3일간 3% sucrose 용액을 섭취) 및 dehydration군(3일간 수분섭취제한)의 콩팥에서 TonEBP의 발현양상을 면역조직화학법으로 관찰하였다.

실험을 시작한 3일 후에 hydration군 및 dehydration군에서 오줌의 삼투압은 각각 564 ± 254.1 mosm/L과 3686 ± 570.8 mosm/L로서, 대조군(1719 ± 252.7 mosm/L)에 비하여 유의한 차이를 보였다. 면역조직화학법의 결과, 결절과 바깥속질의 바깥층에서는 모든 동물군에서 TonEBP 면역반응성이 미약하였고 별다른 차이를 찾아볼 수 없었다. 바깥속질의 안층에서는 모든 동물군에서 thin limb of Henle's loop (TL)에는 강한 면역반응성이, thick ascending limb (TAL), outer medullary collecting duct (OMCD), vasa recta 및 interstitial cells에는 미약한 반응성이 관찰되되, TL, TAL 및 OMCD 세포들에서는 면역반응성의 세포내 위치에 차이를 보였다. 즉, 대조군에서는 이들 세포의 핵과 세포질이 비슷한 정도로 면역염색되되, dehydration군에서는 세포질에 비하여 핵이 보다 강하게 염색되었으며, hydration군에서는 반대의 양상이 관찰되었다. 안속질의 경우, 대조군에서 TL, inner medullary collecting duct, interstitial cells 및 vasa recta 등 거의 모든 세포의 핵이 강하게 면역염색되었으며, dehydration군에서는 핵의 염색정도가 더욱 강하였다. 반면에 hydration군에서 핵의 염색정도는 매우 미약하였으며 세포질의 강하게 염색되었다.

본 실험의 결과로 보아 TonEBP는 삼투압의 조건에 따라 세포내에서 세포질과 핵 사이를 이동하는 것으로 보이며, 또한 고삼투압조건에서 콩팥속질세포를 보호하는데 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다.