PPAR β / δ 과발현은 PGC-1 α ubiquitination의 감소를 통해 PGC-1 α 단백질을 증가시킨다

고진호¹⁾, 김홍수²⁾, 김기진^{3)*}

¹⁾Washington University School of Medicine ²⁾계명문화대학교, ³⁾계명대학교

Jin-Ho Koh, Hong-Soo Kim, Ki-Jin Kim (2015). PPAR β / δ Overexpression Increase PGC-1 α Protein through the Decreased PGC-1 α Ubiquitination in Mouse Skeletal Muscle. *Exercise Science*, 24(4): 407-414.

PURPOSE: The aim of this study was to find mechanism with which PPAR β / δ control PGC-1 α protein stability in mouse skeletal muscle.

METHODS: Tibialis anterior (TA) muscles of rat were dissected at 18h after 2 weeks swimming exercise. PPAR β / δ was over-expressed in mouse tibialis anterior (TA) muscle using electrical pulse-mediated gen transfer (electroporation; EPO) method. To evaluate, PGC-1 α mRNA and protein, PPAR β / δ , ubiquitin and mitochondrial enzyme protein expression in mouse skeletal muscle, TA muscle were dissected at 2wk and 4wk after EPO. To evaluate binding between PGC-1 α and ubiquitin, we conducted V5-PGC-1 α Immunoprecipitation.

RESULTS: PPAR β / δ and PGC-1 α in swimming skeletal muscle for 2 weeks were increased 2.1 and 2.5 fold respectively than sedentary muscle. PGC-1 α mRNA in PPAR β / δ over-expression skeletal muscle were not different at 2 wk and 4wk when compared to an empty vector (EV) treated group. Endogenous and exogenous PPAR β / δ in PPAR β / δ over-expression skeletal muscle were increased 2.5 and 3.8 fold respectively when compared to an EV treated group. We identified binding between PGC-1 α and ubiquitin, and ubiquitin were decreased 60% in PPAR β / δ transfected C2C12 when compared to an EV treated group. PGC-1 α were increased 3 fold in muscle that ubiquitin were decreased 60% when compared to an EV treated muscle and COXI and CYTO C were increased 2.27 and 1.75 fold respectively in muscle when compared to an EV treated muscle.

CONCLUSIONS: PPAR β / δ overexpression increases PGC-1 α protein through the decreased PGC-1 α ubiquitination without the increased PGC-1 α mRNA in mouse skeletal muscle.

Key words: endurance exercise, PPAR β / δ , PGC-1 α , ubiquitin, mitochondrial enzymes

주요어: 지구성 운동, PPAR β / δ , PGC-1 α , ubiquitin, 미토콘드리아 효소

I. 서론

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator alpha(PGC-1 α)는 골격근의 미토콘드리아 생합성과 세포 에너지 대사 조절 유전자들의 발현을 관리하는 핵심 전사 보조인자이다 [21]. PGC-1 α 는 지구성 운동에 의하여 빠르게 증가되며 최고 수준에 도달한 후 더 이상 운동자극이 없을 시에는 안정시 수준으로 감소하는데 [2,5,8,11,12,25,26,30], 이는 PGC-1 α 유전자의 전사에 따른 합성과 후 전사기전에 의한 분해 조절이 매우 빠르고 능동적으로 조절되기 때문이다 [22,26]. 지구성 운동에 의한 PGC-1 α 생합성 연구가 많이 진행된 것에 비하여 후전사기전에 대한 것은 많이 알려지지 않았다. 그러나 몇몇 연구들이 인산화(phosphorylation) [20], 아세틸화(acetylation) [3] 그리고 ubiquitina-

tion [23,27]이 PGC-1 α 의 후전사 기전의 조절과 관련이 있다고 제시하였다.

최근 Koh et al [13]은 유리지방산을 리간드로 활성화되는 핵수용체인 Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ)의 4주 이상 과발현이 PGC-1 α 의 단백질을 증가시키는데, PPAR β/δ 의 활성화 또는 과발현이 PGC-1 α 의 mRNA를 증가시키지 않으므로 [6,29] PPAR β/δ 에 의한 PGC-1 α 단백질 증가는 후전사 기전에 의한 것으로 추정하였다 [13]. 또한 Koh et al [12]은 PPAR β/δ 의 과발현이 지구성 운동으로 증가된 PGC-1 α 단백질의 분해를 지연시키며 이로 인한 미토콘드리아 효소의 발현을 높은 수준으로 유지시킬 수 있다는 것을 보여주었다 [16]. 이러한 결과는 PPAR β/δ 의 과발현으로 인한 PGC-1 α 의 증가가 PGC-1 α 의 분해가 지연되어 나타나는 상대적 증가이며, PPAR β/δ 가 후전사 기전에 의한

PGC-1 α 의 분해조절에 영향을 미칠 수 있다는 가설을 성립시킨다. 그러나 Koh et al [12,13]의 연구에서 PPAR β/δ 가 어떠한 기전을 통하여 PGC-1 α 의 분해를 지연시키지는지 확인되지 않았다.

세포 연구를 통하여 PGC-1 α 의 단백질은 ubiquitin proteasome system에 의하여 분해되며, 반감기가 매우 짧은 것으로 나타났는데 [23,27], 이러한 연구는 지구성 운동에 의하여 증가한 골격근의 PGC-1 α 가 어떠한 기전으로 분해될 수 있는지를 보여준다. 단백질 기질에 ubiquitin의 접합은 3 단계를 거쳐 진행된다. 먼저, ubiquitin은 E1에 의하여 활성화 되며, 활성화된 ubiquitin은 E2 효소(ubiquitin-conjugating enzymes)의 에스코트로 E3(ubiquitin protein ligase family)의 일원에 특이적으로 결합하여 ubiquitin을 단백질에 접합시킨다. 이전에 결합된 ubiquitin 분자에 활성화된 ubiquitin을 추가로 누적 전달하여 polyubiquitin chain이 형성되며, 이 polyubiquitin chain이 단백질을 분해시키는 26S proteasome을 위한 인식 인자이다 [24].

PPAR β/δ 가 외부자극으로 증가된 PGC-1 α 의 감소를 지연시킨다면 분해조절과 관련된 ubiquitin proteasome system과 관련이 있을 가능성이 매우 높다. PGC-1 α 의 N-terminus에는 PPARs가 결합할 수 있는 부위가 존재하며 [32], ubiquitin은 PGC-1 α 의 N-terminus에 결합하여 [27] polyubiquitin을 형성함으로써 PPAR β/δ 가 PGC-1 α 의 N-terminus에 결합하여 ubiquitin의 결합을 방해할 가능성이 있다. 따라서 본 연구는 PPAR β/δ 가 어떠한 기전으로 PGC-1 α 의 ubiquitination을 억제시켜 PGC-1 α 단백질의 안정성을 증가시키는지 확인하는 것이다. 이를 위하여 지구성 운동에 의하여 PPAR β/δ 와 PGC-1 α 의 발현이 동반되는지 확인하였다. 또한 Ubiquitin이 PGC-1 α 에 결합하는지 확인하였으며, PPAR β/δ 과발현에 의해서 PGC-1 α 가 증가된 시점의 PGC-1 α ubiquitination이 어떠한 양상을 나타내는지 확인하였다.

II. 연구 방법

1. 실험동물

실험동물은 3주령 수컷 흰쥐(wistar rat) 12마리와 6주령 된 수컷 C57BL/6J 생쥐(mouse) 16마리를 구입하였다. 실험 동물은 1주일의 환경 적응을 실시하였다. 흰쥐 12마리는 각각 6마리씩 무작위 분류하여 좌업 그룹(sedentary; SED)과 2주 운동 그룹(exercise; EX)으로 무작위 분류하여 운동 그룹은 1일 6시간 수영 운동을 2주간 실시하였다. 마지막 운동을 마친 직후부터 18시간 후에 tibialis anterior(TA) 근육을 적출하였다. 생쥐는 전기자극을 이용한 유전자 전이법(electroporation, EPO)을 이용하여 PPAR β/δ

와 empty vector(EV)를 각각 좌우측 Tibialis Anterior(TA) 근육에 과발현 시켰으며, 3주 후에 근육을 적출하여 분석에 사용하였다. 본 연구는 Animal Studies Committee of Washington University School of Medicine에 의해 승인되었다.

2. 사육 환경

동물은 한 우리에 3마리씩 넣어 사육하였으며, Purina chow (Purina, USA)를 물과 함께 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사육실 온도는 21 ℃로 유지하였으며, 명기(06:00-18:00)와 암기는 각각 12시간으로 조절하였다.

3. 동물 운동 프로그램

흰쥐를 대상으로 한 1회 수영 운동은 Terada et al [25]의 방법을 이용하였다. 물에 대한 적응훈련은 하루 15분씩 2일간 실시하였으며, 본 운동의 강도는 속도 13 m/min, 경사도 0%의 트레드밀 달리기와 유사한 저강도 장시간 지구성 운동이다 [25,26]. 흰쥐는 수영을 3시간씩 2회 분할하여 총 6시간 실시하였으며, 1회 실시 후 45분간 휴식과 함께 물과 사료를 자유롭게 섭취토록 하였다. 원통형 수조(80 cm × 120 cm, 수심 50~60 cm)의 수온은 35 ℃로 일정하게 유지하였다. 운동종료 후 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다 [9,12].

4. V5-PPAR β/δ 와 flag-PGC-1 α plasmid 그리고 Ad-V5-PPAR β/δ 제작과정

Table 1. primer

PPAR β/δ	F: 5' -TTGCACCTAGTAAAAATGGCTAGCAAAGGAGAAGAA-3'
	R: 5' -GAGTGGCGCGCGATATCTTATTTGTAGAGCTCATCCAT-3'
PGC-1 α	F: 5' -GTGCAGCAAGACTCTGTATGG-3'
	R: 5' -GTCCAGGTCATTCACATCAAGTTC-3'

V5-PPAR β/δ 와 flag-PGC-1 α plasmid 그리고 V5-PPAR β/δ adenovirus 제작은 human full length cDNA (Invitrogen, USA)를 템플릿(template)으로 하여 <Table 1>에 제시된 primer로 PGC-1 α 또는 PPAR β/δ 분절부위를 PCR 한 후 pcDNA3-flag 또는 pcDNA3.1-V5-His vector (Invitrogen, USA)에 각각 PGC-1 α 와 PPAR β/δ PCR 생성물을 삽입하여flag-PGC-1 α 와 V5-PPAR β/δ plasmid를 제작하였다. Adenovirus를 제작하기 위한 PPAR β/δ PCR 생성물을 pENTR/D-Topo vector에 삽입하였다. cDNA는 LR clonase(Invitrogen, USA)를 이용하여 pAd/CMV/V5-DEST vector(Invitrogen, USA)에 전위하였다. 제작된 pAd-V5-PPAR β/δ 는 염기서열을 확인 하여 cloning 성공

유·무를 확인하였다. HA-ubiquitin plasmid는 Addgene(USA)에서 구매하였다.

Cloning 산물은 E.coli(One Shot®TOP10 Competent Cell, Invitrogen, USA) 공급 업체의 프로토콜에 따라서 형질전환 한 후 SOC media에 넣어 1시간 동안 배양(37 °C)하였다. 배양된 E.coli는 aga-plate에서 이튿날 까지 배양(37 °C)하여, 하나의 colony를 ampicillin을 첨가된 LB broth에 넣어 이튿날 까지 배양하였다. 배양된 E.coli는 plasmid mini-prep kit(Qiagen, USA)으로 정제하였다.

DNA는 HEK293A 세포에 이입하여 PPAR β/δ , PGC-1 α , ubiquitin 및 각 plasmid의 태그(flag, V5, HA) 단백질의 발현유무를 확인한 후 실험에 이용되었다.

5. 세포배양 및 유전자 형질전환

Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM)(Sigma, USA)에 10% Fetal bovin serum(FBS)(Gibco, USA), penisillin G(100 uU/ml), streptomycin(100 uU/ml), 0.5% Chick Embryo Extract(US Biological, USA)를 첨가하여 C2C12 세포의 성장 배지로 사용하였다. 세포의 배양은 5% CO₂와 37 °C의 환경이 제공되는 배양기(incubator)를 이용하였다. 세포는 6well culture plate 3개(EV: n=9, PPAR β/δ : n=9)에 분주(약 0.3 × 10⁶/well)한 후 약 70% confluence에 도달하였을 때 Lipofectamine transfection reagent(Invitrogen, USA)를 이용하여 모든 well에 flag-PGC-1 α 와 HA-ubiquitin을 형질주입 하였다. Myotube로 분화를 유도한 24시간 후 Ad-V5-PPAR β/δ 또는 Ad-GFP를 각각 9 well 씩 형질주입 하였다. 36시간 후 배지를 제거하고 배양한 세포를 수확하였다.

6. 전기자극 유전자 전이(Electroporation)

Isoflurane gas로 생쥐를 마취시킨 후 주사기를 이용하여 50 μ g의 V5-PAR β/δ 와 GFP plasmid(PPAR β/δ 가 없는 empty vector)를 각각 좌측과 우측 Tibialis anterior(TA) 근육에 주입하였다 [1]. 주입 직후 근육에 전기자극(100-ms duration, 1 Hz frequency, 200 volts/cm amplitude)을 주어 plasmid DNA가 근육의 핵 속으로 유입되도록 하였다 [1].

7. Semiquantitative-PCR

15 mg의 근육 샘플을 1 ml TRIzol(invitrogen)을 이용하여 균질화하여 200 μ l chloroform을 첨가하였다. Phage seperating Gel tube(Phase-Lock-Gel, 5Prime, USA)로 옮겨 담아 5분간 상온에서 배양하여 11,000 g 4 °C에서 10분간 원심분리 하였다. 분리된 샘플

은 새로운 tube로 옮겨 isopropyl alcohol 0.4 ml을 첨가하여 10분간 상온에서 배양 후 11,000 g 4 °C에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 75% EtOH로 pellet을 세척하기 위하여 9000 g 4 °C에서 5분간 원심분리 하였다. Alcohol을 제거하고 50 μ l DNase digestion reagents(Ambion, USA)를 첨가하여 37 °C에서 30분간 배양하였다. 0.1 volume DNase 비활성 시약을 첨가하여 2분간 배양하여 10,000 g 4 °C에서 2분간 원심분리 하였다. Alcohol precipitation을 실시한 후 RNA 농도(260/280 $\leq$ 1.8, 230/260 $\leq$ 2.0)를 측정하였으며, PGC-1 α Primer를 이용하여 PCR을 실시한 후 전기 영동하였다.

8. Western blotting

동결된 근육은 막자사발을 이용하여 분말로 만들고 lysis buffer [12]를 이용하여 균질화 하였다. 균질화된 시료는 미토콘드리아를 파괴하기 위하여 동결과 해동 과정을 3회 반복하였으며, 원심분리(1500 xg, 4 °C)하여 상층액을 사용하였다 [12]. 단백질 농도는 Lowry et al [15]의 방법으로 측정하였다.

시료가 동일한 단백질 농도가 되도록 lysis buffer를 이용하여 희석하였으며, laemmli sample buffer를 첨가한 후 5분간 100 °C 물에 가열하여 용해하였다. 준비된 시료는 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 하였으며, 단백질을 nitrocellulose membrane에 전이(transfer)시킨 후 Membrane은 다음의 일차항체와 함께 이튿날 까지 배양하였다 [12]. PPAR β/δ (Thermo scientific, USA), PGC-1 α (Millipore, USA), ubiquitin(Affymetrix Bioscience, USA), flag bio M2(Sigma, USA), V5(Thermo scientific, USA), cytochrome c(CYTO C, BD Biosciences, USA), cytochrome oxidase subunit I(COX I, Lifetechnologies, USA), β -actin(Sigma, USA). 이차항체는 Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-rabbit IgG(PPAR β/δ , PGC-1 α), donkey anti-mouse IgG(flag, V5, COX I, CYTO C, β -actin) 그리고 HRP-streptavidin(ubiquitin)은 Jackson ImmunoResearch Laboratories(USA)에서 구매하였다. 각각의 항체가 결합된 단백질의 시각화를 위하여 ECL kit(Sigma, USA)을 이용하였다 [12].

9. Immunoprecipitation

PGC-1 α 와 ubiquitin이 접합하는지 확인하기 위하여 C2C12에 flag-PGC-1 α 와 HA-ubiquitin 형질 전환 후 Ad-PPAR β/δ 또는 Ad-GFP와 함께 생쥐의 골격근 세포인 C2C12에 형질전환 하였다. Myotube에서 추출된 200 μ g의 단백질은 flag antibody (Sigma-Aldrich, USA)를 침투하여 4 °C에서 밤새 배양하였다. 다

음날 streptavidin magnetic beads(Thermo Fisher Scientific, USA)을 첨부하여 4 °C에서 4시간 배양하였다. Magnetic beads를 세척하고, 단백질을 beads와 분리하기 위해 laemmli sample buffer를 첨가하여 5분간 100 °C 물에서 배양하였다. Western blotting 은 anti-ubiquitin antibody(Affymetrix Bioscience, USA)를 이용하였다.

10. 자료처리

수집된 자료는 SigmaPlot 12.0 통계패키지를 이용하여 측정 항목별 평균 및 표준편차를 산출하였다. 그룹 간 평균의 차이를 분석하기 위하여 t-test를 실시하였다. 모든 통계적 유의수준은 5%미만으로 설정하였다.

III. 연구 결과

1. 지구성 운동에 의한 PPAR β/δ 와 PGC-1 α 의 발현

지구성 운동에 의한 골격근 PPAR β/δ 와 PGC-1 α 단백질의 발현을 살펴보기 위하여 흰쥐는 2주간 지구성 운동을 실시하였으며, 결과는 <Fig 1>에 나타난 바와 같다. 2주간 지구성 운동은 골격근 PPAR β/δ 와 PGC-1 α 단백질 발현을 각각 2.1배($p<.001$)와 2.5배($p<.01$) 증가시켰다(Fig 1).

2. PPAR β/δ 과발현에 따른 PGC-1 α mRNA의 수준

PPAR β/δ 가 후전사 기전을 통하여 PGC-1 α 단백질을 증가시킨다는 것을 증명하기 위하여 먼저 PPAR β/δ 과발현이 PGC-1 α mRNA의 증가를 통한 생산량을 증가시키는지 확인할 필요가 있다. 따라서 골격근에 PPAR β/δ 를 2주와 4주 과발현시킨 후 PGC-1 α mRNA를 분석하였다(Fig 2A, 2B). 2주(Fig 2A)와 4주간(Fig. 2B) PPAR β/δ 가 과발현 된 근육에서 PGC-1 α mRNA는 EV를 처리한 그룹과 차이가 없는 것으로 나타났다.

3. PPAR β/δ 과발현에 따른 PGC-1 α ubiquitination 결합

Ubiquitin이 PGC-1 α 에 결합하는지 확인하고, PPAR β/δ 과발현에 따른 PGC-1 α 결합에 차이가 있는지 확인하기 위하여 골격근 세포에 flag-PGC-1 α , HA-ubiquitin 및 V5-PPAR β/δ 의 과발현을 유도한 후 PGC-1 α 에 tagging된 flag를 IP하였다(Fig 2C, 2D). 외인성(exogenous) PGC-1 α 에 태깅 된 flag으로 IP 하였기 때문에 내인성(endogenous) PGC-1 α 의 ubiquitination은 IP 결과에 나타나지 않았다(Fig 2C). Ubiquitin은 PGC-1 α 에 결합하는 것으로 나타났으며

Fig. 1. PPAR β/δ and PGC-1 α expression following 2 weeks swimming exercise. SED: sedentary, EX; exerciser. * $p<.01$ significantly different from SED.

(Fig 2C), PPAR β/δ 과발현이 PGC-1 α 에 결합하는 ubiquitin을 약 60%($p<.001$) 감소시킨 것으로 나타났다(Fig 2D).

4. 골격근 PPAR β/δ 과발현에 따른 PGC-1 α ubiquitination과 미토콘드리아 효소의 발현

생쥐의 골격근에 PPAR β/δ 를 전기자극 유전자 전이를 실시한 후 4주간 과발현을 유도하였으며, 내인성과 외인성 PPAR β/δ 단백질 수준을 분석하였다(Fig 3A, 3B). PPAR β/δ 가 과발현된 그룹의 내인성 PPAR β/δ 는 EV를 처리한 그룹보다 2.5배($p<.01$) 유의하게 증가하였으며, 외인성 PPAR β/δ 는 3.8배($p<.001$) 유의하게 증가하였다. PPAR β/δ 과발현 된 근육은 대조 그룹의 근육보다 총 6.3배 PPAR β/δ 가 과발현 된 것으로 나타났다. 특히 외인성 PPAR β/δ 과발현으로 내인성 PPAR β/δ 의 발현이 증가한 것은 PPAR β/δ 의 자가 조절능력이 있음을 나타낸다(Fig 3A, 3B).

PGC-1 α 의 ubiquitination과 PGC-1 α 단백질 수준을 분석한 결과(Fig 3A, 3C, 3D), PPAR β/δ 가 과발현 된 그룹의 골격근 PGC-1 α ubiquitination은 약 60%($p<.01$) 유의하게 감소하였으며(Fig 3A, 3C), PGC-1 α 단백질은 약 3배($p<.001$) 유의하게 증가한 것으로 나타났다(Fig 3A, 3C). 또한 PGC-1 α 에 따른 ubiquitination의 비율은 PPAR β/δ 가 과발현 된 근육에서 약 87%($p<.001$) 유의하게 감소한 것으로 나타났다(Fig 3D).

PPAR β/δ 의 과발현에 따른 미토콘드리아 효소의 발현 수준을 살펴본 결과(Fig 4), PPAR β/δ 가 과발현 된 근육의 COX I과 CYTO C는 EV를 처리한 근육보다 각각 2.27배($p<.01$)와 1.75배($p<.01$) 배 유의하게 증가하였다(Fig 3E).

Fig. 2. PGC-1 α mRNA expression and PGC-1 α ubiquitination by PPAR β/δ overexpression. A, PGC-1 α mRNA expression in skeletal muscle after 2week after PPAR β/δ EPO. B, PGC-1 α mRNA expression in skeletal muscle after 4week after PPAR β/δ EPO. C & D, Difference of ubiquitin bound to PGC-1 α by PPAR β/δ overexpression in C2C12. EV: Empty Vector. * $p < .01$ significantly different from EV.

IV. 논의

지구성 운동은 PGC-1 α 와 PPAR β/δ 의 발현을 증가시킨다(Fig 1). PPAR β/δ 의 발현이 감소된 골격근은 2주간 지구성 운동을 실시하더라도 PGC-1 α 가 증가되지 않으며, 이는 PGC-1 α 의 ubiquitination과 관련이 있는 것으로 나타났다 [9]. 그러나 선행연구들은 PPAR β/δ 가 어떠한 기전으로 PGC-1 α ubiquitination 감소시키는 지 직접적인 증거는 제시하지 않았다.

PGC-1 α 의 N-terminus에 PPARs 결합부위가 존재하며 [32], PPAR β/δ 는 PGC-1 α 와 결합한다 [27]. 또한 선행연구들 [23,27]은 ubiquitin이 PGC-1 α 의 N-terminus에 결합한다고 하였다. Ubiquitin은 세포내에서 PGC-1 α 를 분해하기 위해 26S proteasome을 유도하는 신호 물질이다. 따라서 PPAR β/δ 가 PGC-1 α 의 N-terminus에 결합하면 PGC-1 α ubiquitination이 물리적으로 차단되어 PGC-1 α 의 분해가 억제될 가능성이 있다.

Koh et al [12] 등의 연구에서 PPAR β/δ 의 과발현 유무와 관계없이 PGC-1 α 가 1회 지구성 운동으로 2배 이상 증가하였으나, 운동 54시간 이후에 EV를 처치한 근육의 PGC-1 α 는 비운동 그룹의 수준으로 회복되었다. 그러나 PPAR β/δ 과발현 근육에서는 PGC-1 α 의 감소가 억제되어 운동 54시간 이후에도 여전히 최고 수준의 PGC-1 α 단백질 농도를 유지하였다. 따라서 1회 지구성 운동 후 54시간 이후에도 PGC-1 α 농도가 높은 수준을 유지한 것은 PPAR β/δ 가 PGC-1 α 의 ubiquitination을 차단했을 가능성이 매우 높다. 따라서 본 연구는 PPAR β/δ 과발현에 의한 PGC-1 α 단백질의 증가가 생산에 의한 것인지 분해지연을 통한 것인지 확인하기 위하여 전기자극 유전자 전이로 생쥐의 골격근에 2주와 4주간 PPAR β/δ 과발현을 유도하였는데 두 시기 모두에서 PGC-1 α mRNA는 증가하지 않았다(Fig 2A, 2B). 이러한 결과는 PPAR β/δ 가 PGC-1 α 의 생합성을 증가시키지 않는다는 증거이다.

PPAR β/δ 가 PGC-1 α 의 ubiquitination을 차단하는 억제 기전으

Fig. 3. PPAR β/δ , PGC-1 α , PGC-1 α ubiquitination and mitochondrial enzymes in skeletal muscle after 4 week post PPAR β/δ overexpression. A, Western blot image by each antibody. B, PPAR β/δ expression in skeletal muscle. C, PGC-1 α ubiquitination and PGC-1 α expression. D, Ratio of PGC-1 α ubiquitination / PGC-1 α . E, Mitochondrial enzyme expression. CYTO C; cytochrome c, COX I; cytochrome oxidase subunit I, EV: Empty Vector. * $p < .01$ significantly

로 PGC-1 α 의 단백질 분해를 감소시킨다는 연구의 가설을 증명하기 위하여 세포 및 골격근 연구를 각각 실시하였다. 먼저 생쥐의 골격근 세포 연구를 통하여 PGC-1 α 에 ubiquitin이 결합하며, PPAR β/δ 과발현이 PGC-1 α 에 ubiquitin의 결합을 60% 감소시킨다는 것을 확인하였다(Fig 2C, 2D). 또한 골격근 PPAR β/δ 과발현으로 인하여 PGC-1 α 가 증가된 4주에 PGC-1 α ubiquitination 수준을 확인한 결과, EV를 처치한 그룹보다 60% 감소하였다. 이 시점에 PPAR β/δ 과발현 그룹의 PGC-1 α 의 발현이 대조군에 비하여 3배 이상 증가하였으므로 PGC-1 α 의 특이적 ubiquitination은 약 ~90%가 감소하였음을 의미한다(Fig 3A, 3C, 3D). 따라서 본 연구는 PPAR β/δ 가 후전사 기전으로 PGC-1 α 의 단백질 분해를 억제시켜 PGC-1 α 의 단백질 안정성을 증가시키며, 이는 PGC-1 α 단백질의 상대적 증가를 유도한다는 것을 확인하였다.

본 연구에서 PPAR β/δ 를 생쥐의 골격근에 과발현시킨 결과 외인성 PPAR β/δ 에 의하여 내인성 PPAR β/δ 가 유의하게 증가하였는데(Fig 3A, 3B), 이는 PPAR β/δ 가 자가 조절기능이 있음을 보여주는 새로운 정보이다. 지구성 운동은 PPAR β/δ 의 발현을 증가시키는(Fig 1), 증가된 PPAR β/δ 가 스스로 자신의 발현을 더 증가시킨다면 PGC-1 α 의 ubiquitination을 더 차단시켜 미토콘드리아 생합성을 증가시킬 수 있기 때문이다. 이러한 관점에서 장기간

지구성 운동으로 증가되는 PGC-1 α 단백질이 PGC-1 α mRNA의 증가에 의한 것인지 PPAR β/δ 증가에 의한 PGC-1 α ubiquitination 감소로 증가된 것인지 확인할 필요가 있으며, 이는 장기간 지구성 운동에 의한 골격근 적응을 이해하는데 필요할 것이다.

미토콘드리아의 기능은 에너지 요구에 따라서 유기적으로 조절된다 [10]. 미토콘드리아 생합성은 미토콘드리아 구조, 대사 및 증식과 관련된 유전자의 발현 조절 신호와 전사 조절기전과 관련이 있는데, PGC-1 α 가 이러한 전사 조절과 관련된 분자 조절 기전을 통합하여 증폭시킨다 [9,21]. 특히 전신 에너지 대사의 항상성 조절 및 글루코스 대사에 PGC-1 α 가 영향을 미치며 [7,14,19,31], 인슐린 저항성 또는 당뇨병을 가진 인간의 골격근은 PGC-1 α 의 발현 장애가 나타날 수 있으므로 [16,17,18], 골격근 PGC-1 α 를 적절한 수준으로 유지하는 것이 바람직하다.

지구성 운동에 의하여 증가한 PGC-1 α 의 반감기는 매우 짧기 때문에 지속적인 미토콘드리아 기능을 유지하기 위해서는 적절한 강도로 규칙적이고 지속적인 지구성 운동 트레이닝이 요구된다. 그러나 근 기능 약화나 노화로 인하여 운동 강도, 빈도 및 시간을 적절하게 유지할 수 없는 대상자에게는 적극적인 대안이 요구되는데, 본 연구에서 PPAR β/δ 가 후전사 기전을 통하여 PGC-1 α 의 반감기를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. PPAR β/δ

δ 는 지방산과 같은 리간드(ligand)로 활성화되는 핵수용체성 전사인자이므로 운동 모방효과를 낼 수 있는 운동 보조제나 약제 개발에 목표로 활용될 수 있는지 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 PPAR β/δ 가 PGC-1 α 에 결합하여 PGC-1 α 의 ubiquitination 억제를 통한 단백질 분해를 억제시키며, 이는 단백질 안정성 증가에 따른 PGC-1 α 의 상대적 증가를 유도한다는 것을 확인하였다. 따라서 지구성 운동에 의한 PPAR β/δ 의 발현 증가는 후전사 기전에 의한 PGC-1 α 단백질 안정성을 증가시킨다.

References

- [1] Akimoto T, Sorg BS, & Yan Z (2004). Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α promoter activity in skeletal muscles of living mice. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287(3): C790-796.
- [2] Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA et al (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(14): 1879-1886.
- [3] Dominy JE Jr, Lee Y, Gerhart-Hines Z, & Puigserver P (2010). Nutrient-dependent regulation of PGC-1 α 's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(8): 1676-1683.
- [4] Garcia-Roves P, Huss JM, Han D-H, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E et al (2007). Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25): 10709-10713.
- [5] Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T et al (2000). cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(2): 350-354.
- [6] Hancock CR, Han D-H, Chen M, Terada S, Yasuda T et al (2008). High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22): 7815-7820.
- [7] Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R et al (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852): 179-183.
- [8] Higashida K, Kim SH, Higuchi M, Holloszy JO, & Han D-H (2011). Normal adaptations to exercise despite protection against oxidative stress. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301(5): E779-784.
- [9] Jung SR, Kim KJ, & Koh JH (2015). PGC-1 α concentration in skeletal muscle by exercise is controlled by PPAR β/δ through post-transcriptional mechanism: the effects of PPAR β/δ silence on PGC-1 α ubiquitination and stability. *Exercise Science*, 24(3): 289-295.
- [10] Kelly DP & Scarpulla RC (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & Development*, 18(4): 357-368.
- [11] Kim SH, Asaka M, Higashida K, Takahashi Y, Holloszy JO et al (2013). -Adrenergic stimulation does not activate p38 MAP kinase or induce PGC-1 in skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 304(8): E844-E852.
- [12] Koh JH, Kim HS, Ahn NY, & Kim KJ (2015). PPAR β/δ activation or overexpression attenuate PGC-1 α protein degradation. *Exercise Science*, 24(1): 49-57.
- [13] Koh JH, Kim SH, Jung SR, & Kim KJ (2014). The Role of PPAR δ δ on Mitochondrial Biogenesis of Mouse Skeletal Muscle. *Exercise Science*, 23(4): 315-322.
- [14] Koo S-H, Satoh H, Herzig S, Lee C-H, Hedrick S et al (2004). PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB-3. *Nature Medicine*, 10(5): 530-534.
- [15] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, & Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- [16] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S et al (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, 34(3): 267-273.
- [17] Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R et al (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14): 8466-8471.
- [18] Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R & Shulman GI (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 350(7): 664-671.
- [19] Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC et al (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*, 423(6939): 550-555.
- [20] Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC et al (2001). Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. *Molecular Cell*, 8(5): 971-982.

- [21] Puigserver P & Spiegelman BM (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24(1): 78-90.
- [22] Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M et al (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6): 829-839.
- [23] Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C et al (2007). Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35): 25970-25980.
- [24] Schwartz AL & Ciechanover A (2009). Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49(1): 73-96.
- [25] Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T et al (2002). Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(2): 350-354.
- [26] Terada S & Tabata I (2004). Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *American Journal of Physiology*, *Endocrinology and Metabolism*, 286(2): E208-16.
- [27] Trausch-Azar J, Leone TC, Kelly DP, & Schwartz AL (2010). Ubiquitin Proteasome-dependent Degradation of the Transcriptional Coactivator PGC-1 via the N-terminal Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(51): 40192-40200.
- [28] Wang Y-X, Lee C-H, Tiep S, Yu RT, Ham, J et al (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113(2): 159-170.
- [29] Wang Y-X, Zhang C-L, Yu RT, Cho HK, Nelson MC et al (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biology*, 2(10): e294.
- [30] Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguère V, & Kelly DP (2005). PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24): 10684-10694.
- [31] Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z et al (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852): 131-138.
- [32] Zhang Y, Huypens P, Adamson AW, Chang JS, Henagan TM et al (2009). Alternative mRNA splicing produces a novel biologically active short isoform of PGC-1alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(47): 32813-32826.