

BACE1 촉진염기서열 동정 및 STAT1에 의한 활성 조절 기전 규명

조현진*[†] · 이지연* · 묵인희*

서울대학교 의과대학 생화학교실*
아주대학교 신경과학 협동과정[†]

Identification of BACE1 Promoter Sequence and Its Regulation by STAT1

Hyun-Jin Cho*[†], Ji-Yeon Lee*, Inhee Mook-Jung*, Ph.D.

Department of Biochemistry* & Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul; Neuroscience Program[†], Ajou University, Suwon, Korea

Background: Beta amyloid ($A\beta$) peptide is one of the major causes in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). $A\beta$ is derived from amyloid precursor protein (APP) with sequential cleavages by β -secretase (BACE1) and γ -secretase. BACE1 is mainly expressed in neurons in the brain. We have previously reported that interferon- γ (IFN- γ) stimulates BACE1 expression in astrocytes, which is mediated by JAK/STAT signaling pathway. **Methods:** In the present study, a putative BACE1 promoter was cloned and the relationship between BACE1 promoter and STAT1 was examined using luciferase activity assay. Since the BACE1 promoter region contains a putative STAT1 binding sequence, we performed EMSA assay to examine whether STAT1 binds to the BACE1 promoter directly. **Results:** The BACE1 promoter was down-regulated by an inhibitor of JAK/STAT signaling, AG490, in a dose dependent manner, which was recovered by the expression of wild type STAT1. The expression of a dominant negative mutant of STAT1 suppressed the BACE1 promoter activity, which was rescued by transfection of wild type STAT1. EMSA assay showed that STAT1 indeed binds to the BACE1 promoter. We also found that the phosphorylated form of STAT1 protein was not located in cytosolic, but in nuclear fraction. **Conclusions:** Taken together, the present results suggest that IFN- γ stimulates JAK/STAT signaling pathway and that phosphorylated STAT1 enters the nucleus and directly binds to the BACE1 promoter region to modulate BACE1 expression. This may be a link between brain inflammation and $A\beta$ generation in AD.

Key Words: $A\beta$, Astrocyte, BACE1, IFN- γ , Promoter, JAK/STAT

Address for correspondence

Inhee Mook-Jung, Ph.D.
Department of Biochemistry, Seoul National
University College of Medicine,
28 Yeongseon-dong, Jongno-gu, Seoul 110-799,
Korea
Tel: +82.2-740-8245
Fax: +82.2-744-4534
E-mail: inhee@snu.ac.kr

서론

알츠하이머병(Alzheimer's Disease: AD)은 노인성 치매를 야기하는 대표적인 퇴행성 신경질환으로 노인반점(senile plaques)과 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle)가 병리학적 특징으로 나타난다. 노인반점의 주요 구성 물질인 독성의 베타 아밀로이드($A\beta$)는 그 전구단백질(amyloid precursor protein: APP)로부터 생성된다. 유형 I 막 당단백질인 APP의 대사에는 알파 시크리타제, 베타 시크리타제 그리고 감마 시크리타제라는 단백질 분해효소가 관여하는데, 그 중 베타 시크리타제와 감마 시크리타제가 작용하여 APP를 차례로 자를 경우 베타 아밀로이드가 생성된다. 따라서 이 두 가지 효소의 활성저해는 베타 아밀로이드 생성을 막기 위한 좋은 표적이 될 수 있다[1]. 이전의 많은 연구자들이 베타 시크리타제와 감마 시크리타제의 발현 또는 활성을 억제하면 독성 물질인 베타 아밀로이드의 생성이 감소한다

는 사실을 보고하였으나[3], 감마 시크리타제는 APP의 대사 뿐 아니라 발생과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는 Notch의 대사와 CD44, E-, N-, P-cadherin, LRP 등과 같은 여러 인체 기능 수행에 주요한 단백질의 대사에도 관여하고 있다. 따라서 생쥐에서 해당 유전자를 knock out 시킨 경우 발생 단계에서 사망하는 등 발현 또는 활성 저해에 따른 부작용이 심각한 것으로 보고되어 APP의 대사만을 특이적으로 저해하고자하는 시도들이 이루어지고 있다. 반면 베타 시크리타제를 knock out 시킨 생쥐의 경우에는 정상적인 발생 과정을 걸쳐 성체로 성장할 수 있을 뿐 아니라, 정상 쥐와 비교 시 표현형의 차이가 없는 것으로 보고되고 있어 베타 시크리타제의 발현 및 활성 조절이 베타아밀로이드 생성을 억제하기 위한 약물 개발에 좋은 표적으로 부각되고 있다[4]. 베타 시크리타제는 1999년에 켈스 계열과 상동성을 갖는 아스파르트산 단백질 분해효소로 밝혀진 후 베타-위치 APP 절단 효소 1 (β -site APP cleaving enzyme 1;

BACE1), Asp2 등으로 불려지고 있다. BACE1은 유형 I 막 단백질로 501개의 아미노산으로 이루어지며 93-96, 289-292번째 아미노산 부위에 아스파르트산 단백질 분해효소의 활성 부위 모티프를 갖고 있다. BACE1은 세포내 소기관 중 산성을 나타내는 골지체(golgi body)와 내포체(endosome)에 많이 존재하며, pH 4.5 정도의 산성 조건에서 최적의 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[2, 3].

BACE1은 다른 조직에 비해 뇌에 특이적으로 많이 존재하며 뇌조직중 신경세포에서 주로 발현되는 반면, 비신경세포인 성상교세포에서는 거의 발현되지 않는 것으로 알려져 왔다[6-8]. 그러나 홍 등[9]은 최근 AD 동물모델에서 노인반점 주위의 활성화된 성상교세포에서 BACE1이 발현됨을 관찰하였고, 이러한 성상교세포 내 BACE1 발현은 노인 반점 주위에 존재하는 여러 가지 염증반응 물질과 산화 스트레스 유발 물질들에 의해 유도되었을 것으로 생각되어 진다[5, 10, 11, 14]. 또한 황 등에 의하면 성상교세포종 세포주인 U373MG 세포에 BACE1 단백질을 과다발현 시키면 APP가 BACE1에 의해 잘려서 생성되는 C-말단부위인 C99와 이것이 다시 감마 시크리타아제에 의해 잘려서 생성되는 A β 가 증가하는 것이 관찰되었다(황 등, 미발표자료). 이러한 결과는 병리학적 조건에서 BACE1의 발현 증가를 보이는 성상교세포가 베타 아밀로이드의 생성 및 축적을 가속시킬 수 있음을 의미한다. 이러한 가설에 기초한 최근 연구에서 성상교세포에 전염증 싸이토카인인 인터페론 감마(Interferon- γ ; IFN- γ)를 처리하면 BACE1의 mRNA 및 단백질의 발현이 증가하고 이때 전사 인자인 STAT1 (signal transducers and activators of transcription 1)이 활성화되며 여기에 STAT1을 인산화 시켜 활성화를 유발하는 Janus Kinase (JAK)에 대한 특이적 활성 저해제를 처리하면 IFN- γ 에 의한 BACE1의 발현증가가 저해됨이 보고되었다[9, 13, 14]. 본 연구에서는 이와 같은 BACE1의 발현 조절 기전을 규명하기 위해 BACE1 유전자의 촉진염기서열(promoter) 부위를 밝히고 염증성 싸이토카인인 IFN- γ 에 의한 JAK/STAT 신호전달기작을 통하여 BACE1 촉진염기서열이 전사단계에서 조절됨을 확인하고자 하였다.

대상과 방법

1. 세포배양 및 시약

U373MG (인간 성상교세포종 세포주), HEK293 (인간 배아 신장 세포주)은 10% 소 태아 혈청(Fetal Bovine Serum: FBS, HyClone, Irvine, CA)과 100 units/mL 페니실린과 100 μ M/mL 스트렙토마이신이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone, Salt lake city, Utah) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포는 24시간 이상 무혈청 배지에 배양한 후 AG490 (Tocris, London, UK)을

30분간 전 처리한 후, 제조함 인간 IFN- γ (R&D system, Minneapolis, MN)를 24시간 동안 처리하였다.

2. BACE1 촉진염기서열 클로닝

HEK293 세포에서 게놈 DNA를 추출한 후 BACE1 유전자의 상류 부분을 클로닝하기 위해 제한효소 인식 부위를 삽입한 시발체(primer)를 제작하였다. 제작된 시발체의 염기서열은 다음과 같다. uBACE-1Ka: forward 5'-caacgcgtgttgacagacttgagacc-3' (MluI/-994~-977), reverse 5'-gcctgagggcggaagacttgtgg-3' (HindIII/-17~-1), uBACE-1Kb: forward 5'-atcgctcattttctctaatacga-3' (KpnI/-1876~-1848), reverse 5'-tttga-aaagagacttgctctgtca-3' (BglII/-955~-930), uBACE-2K: forward 5'-cggggtaccagtcacaaatccatccag-3' (KpnI/-2060~-2045), reverse 5'-cccaagcttagccaccataatccagctc-3' (HindIII/-14~+3) HEK293 세포에서 추출한 DNA를 위 시발체를 이용하여 PCR하고 그 산물을 분리한 후 각각 명기된 제한효소로 절단하여 동일한 제한효소로 절단된 pGL3-Basic 벡터(Promega, Madison, WI)에 삽입하였다.

3. 유전자 도입 및 정보제공 유전자 측정

6 well 세포배양접시에 3×10^5 개의 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 1 mL의 혈청/항생제 무첨가 DMEM으로 교환했다. Well당 혈청/항생제 무 첨가 DMEM 500 μ L에 BACE1 상류 유전자(uBACE) DNA 1 μ g, pRL-TK plasmid 0.5 μ g, Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) 6 μ g을 혼합하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 배양중인 세포에 첨가하여 4시간 동안 CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 혈청을 첨가하였다. 18시간 후 다시 무혈청 배지로 교체하고 시약을 처리하였다. 명시된 시간이 경과한 후 세포를 용해하여 단백질을 추출하고 그 추출물 내에 존재하는 luciferase의 양을 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 luminometer로 측정하였다. 이때 동일한 단백질 추출물에 대해 Renilla luciferase 활성에 의한 발광을 측정하여 유전자 도입 효율을 보정하였다. STAT1 유전자를 함께 도입하는 경우 BACE1 상류유전자 벡터와 1:1의 농도비율로 사용하였다.

4. Western Blotting

세포를 생리식염수로 2회 세척한 후 단백질 분해효소 저해제(100 mg/mL phenylmethyl sulfonyl fluoride, 2 mg/mL leupeptin, and 2 mg/mL aprotinin; all from Sigma)를 첨가한 RIPA 완충액(150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 7.4)을 넣고 세포를 모아 얼음에서 10분간 방치한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여

상층액을 분리하였다. 얻어진 상층액을 BCA assay kit (Sigma)로 정량하여 동일량을 8-10%의 SDS-폴리아크릴 아마이드 겔(SDS-PAGE)에서 전개시킨 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA)에 전달하고 특정 일차 항체 및 호스라디쉬-페록시다제(Horseradish peroxidase: HRP)가 결합된 이차항체(Amersham Pharmacia, Arlington Heights, IL)와 순차적으로 배양한 후 ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 용액을 처리하여 나타나는 신호를 Bio-Imaging analyzer (LAS-3000; Fuji, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

5. 항체

항-BACE1 항체(CHEMICON, Temecula, CA)는 단일클론항체로 BACE1의 C-말단 부위를 인지하며 항-STAT1 항체(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)는 STAT1의 C-말단 부위를, 항-인산화-STAT1 항체(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)는 STAT1의 인산화된 701번째 Tyr을 인지하는 다 클론항체를 사용하였다.

6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

BACE1 촉진염기서열내의 STAT1이 결합할 것으로 예상되는 염기서열(-1857bp~-1865bp)에 대한 탐침(probe)을 제작하기 위해 바이오틴이 표지된 상보적인 두개의 단일나선 올리고

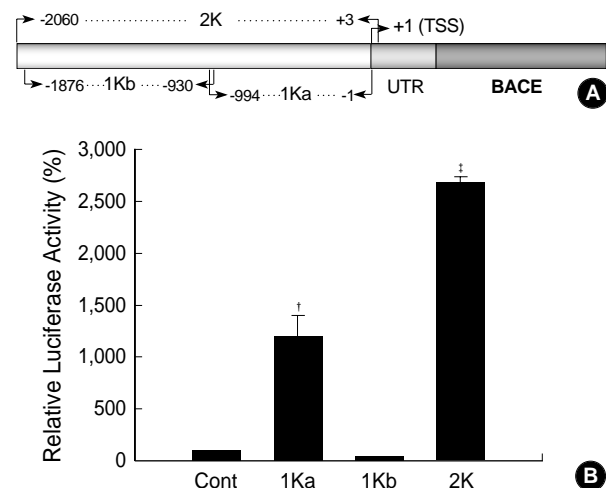


Fig. 1. Identification of human BACE1 gene promoter region. (A) Cloning of putative human BACE1 gene promoter region. TSS means the transcription start site. We followed the numbering of the previous report by Ge *et al.* (Ge YW. 2004; GenBank accession number AY542689). (B) Promoter assay of BACE1 upstream plasmids using luciferase reporter gene assay system. Three cloned constructs, uBACE-1Ka, -1Kb, -2K, were examined in HEK293 cells. Cont: pGL3-Basic vector. Results from a representative experiments are expressed as the mean (\pm S.E.) of triplicate measurements. $^{\dagger}p<0.01$, $^{\ddagger}p<0.005$.

핵산(5'-biotin-gcgtccattttcctctaatacga-3', 5'-biotin-tcgtatta-gaggaaaatggacgc-3')을 이중나선으로 결합시킨 후 50 ng/mL의 IFN- γ 를 처리한 U373MG 세포의 핵 단백질 추출물(3 mg/mL) 및 poly (dI-dC) (Sigma) (1.5 mg/mL)과 상온에서 20 분간 반응시켰다. 이때 경쟁결합 분석을 위해 표지되지 않은 탐침을 핵 단백질 추출물과 상온에서 10분간 미리 반응시킨 후 이를 5% 비변성 PAGE에서 전개하고 나일론 막으로 전달한 후 module kit (Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 제조사의 권고에 따라 나타나는 신호를 검출하였다.

7. 통계 처리

각 처리군은 triplicate로 실험 후, 실험군과 대조군과의 차이 또는 실험군 간의 차이에 대해 Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test로 유의성을 검정하였다(* $p<0.05$, $^{\dagger}p<0.01$, $^{\ddagger}p<0.001$).

결 과

1. 인간 BACE1 유전자의 촉진염기서열 클로닝

세포에서 BACE1 촉진염기서열의 활성을 측정하기 위해 정보 제공 유전자인 luciferase와 인간의 BACE1의 촉진염기서열 부위를 포함하는 재조합 벡터를 제작하기 위해 인간 세포인 HEK293에서 계놈 DNA를 추출하여 BACE1 유전자의 상류 부분 중 세 부분을 클로닝하기 위해 BACE1의 전사 시작부위로부터 -994~-1, -1876~-930, -2060~+3 염기서열에 대한 시발체를 제작하여 PCR을 수행한 후 증폭된 3가지의 PCR 산물을 각각 pGL3-Basic 벡터에 삽입하였다(Fig. 1A). 이 세 가지 재조합 벡터는 각각 uBACE-1Ka, uBACE-1Kb, uBACE-2K로 명명하였으

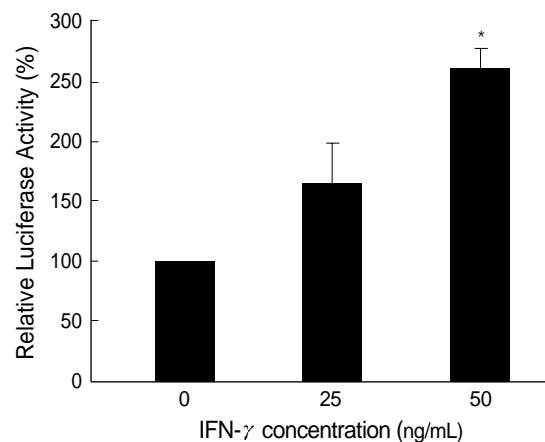


Fig. 2. Effect of IFN- γ on BACE1 promoter activity. IFN- γ dose-dependently increased BACE1 promoter activity in U373MG cells. Results from representative experiments are expressed as the mean (\pm S.E.) of triplicate measurements. * $p<0.05$.

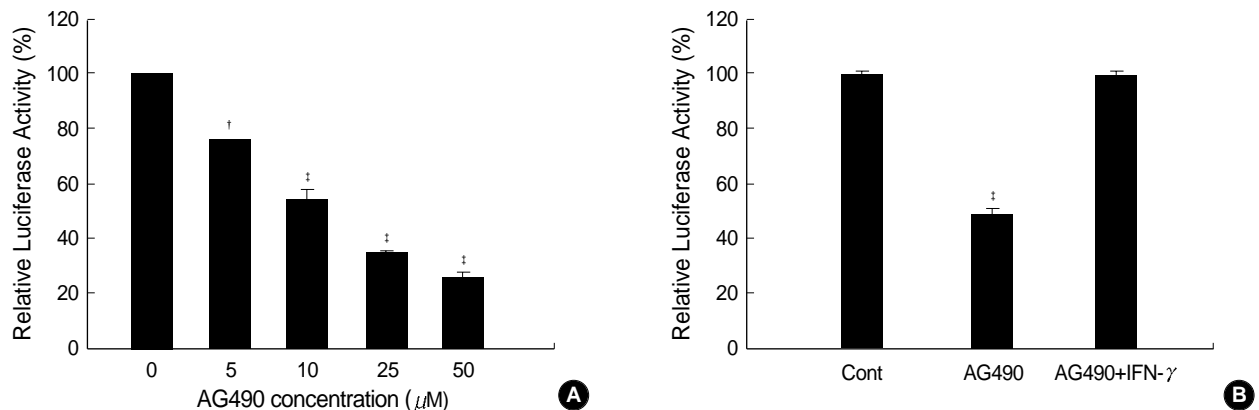


Fig. 3. AG490 effects on BACE1 promoter activity. (A) BACE1 promoter activity was inhibited by AG490 in a dose dependent manner in HEK293 cells. (B) AG490 (25 μM)-induced decrease of BACE1 promoter activity was recovered by IFN-γ (50 ng/mL) treatment in HEK293 cells. Cont (control) cells were treated with vehicle (DMSO). Results from a representative experiments are expressed as the mean (± S.E.) of triplicate measurements. * $p < 0.01$, † $p < 0.005$

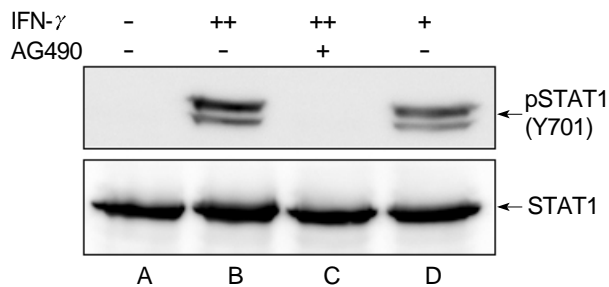


Fig. 4. AG490 inhibits IFN-γ-induced phosphorylation of STAT1 (Y701). IFN-γ induced phosphorylation of STAT1 in U373MG cells. B lane; 50 ng/mL of IFN-γ, D lane; 25 ng/mL of IFN-γ. This is the representative of three experiments conducted independently.

며 U373MG 세포와 HEK293 세포에 각 벡터를 유전자 도입하고 72시간 후 luciferase 발현을 측정하였다(Fig. 1B). 그 결과 uBACE-1Ka보다 uBACE-2K가 더 큰 촉진염기서열 활성을 보였고 uBACE-1Kb는 전혀 작용하지 않았다. 이를 통해 uBACE-1Ka는 BACE 촉진염기서열의 핵심 부분을 포함하고 있으며 이를 포함한 uBACE-2K는 다른 조절 인자에 의해 더 큰 촉진염기서열 활성을 나타낼 수 있는 부분으로 생각되어 이후 BACE1 촉진염기서열 활성 조절 실험에는 uBACE-2K를 사용하였다.

2. JAK2를 통한 IFN-γ의 BACE1 촉진염기서열 활성 증가 효과

정상 쥐 뇌 조직의 성상교세포는 BACE1을 거의 발현하지 않는다고 알려져 있었으나 최근 알츠하이머병의 동물 모델인 Tg2576 생쥐의 경우 면역조직화학염색 실험 결과 베타 아밀로이드 반점 주위의 활성화된 성상교세포에서 BACE1 발현이 관찰되었고 반점 주위에 다량 분비되어 있는 염증성 사이토카인 중 하나인 IFN-γ를 성상교세포에 처리한 경우 BACE1 mRNA와 단백질이 발현된다는 결과가 보고된 바 있다[9]. 따라서 IFN-γ에 의

해 BACE1 발현이 유도될 수 있음이 추정되어 이를 확인하기 위해 인간의 성상교세포종 세포주인 U373MG 세포에 IFN-γ를 처리하고 BACE1 촉진유전자의 활성변화를 측정하였다. 클로닝한 BACE1 촉진염기서열인 uBACE-2K를 U373MG 세포에 유전자 도입한 뒤 IFN-γ를 25 ng/mL, 50 ng/mL의 농도로 처리했을 때, BACE1 촉진염기서열 활성이 IFN-γ의 농도에 의존적으로 증가함이 관찰되었다(Fig. 2). 반대로 IFN-γ에 의한 BACE1의 발현을 억제시킨 것으로 최근 보고된 JAK2의 특이적 억제제인 AG490을 처리하면 BACE1 촉진염기서열의 활성이 AG490의 농도에 의존적으로 감소하였고(Fig. 3A), AG490에 의해 감소된 촉진염기서열의 활성은 IFN-γ를 부가적으로 처리하면 다시 회복되었다(Fig. 3B). JAK2는 IFN-γ에 의해 활성화되는 대표적인 인산화효소로 전사 조절 인자인 STAT1을 활성화시켜 특정 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이는 IFN-γ가 BACE1 촉진염기서열 활성을 증가시켜 BACE1의 발현을 유도하며 JAK2 신호체계가 이에 관여하고 있음을 나타낸다.

3. IFN-γ에 의한 STAT1의 활성화

STAT1은 전사인자로 IFN-γ에 의한 세포내 신호전달과정을 통해 활성화되는 것으로 알려져 있다. IFN-γ가 세포막의 수용체에 결합하면 먼저 JAK2가 활성화되어 STAT1을 인산화시킨다. 인산화된 STAT1은 이합체를 이루어 핵 안으로 이동하여 특정 유전자의 촉진염기서열에 결합하여 발현을 조절한다. 이러한 JAK/STAT 신호전달 경로가 본 연구에 사용된 세포주에서도 동일하게 일어남을 확인하기 위해 50 ng/mL의 IFN-γ를 U373MG 세포에 처리하여 인산화된 STAT1의 양을 조사한 결과, STAT1의 인산화가 증가하였고(Fig. 4) 이러한 효과는 HEK293 세포에서도 동일하게 나타났다.

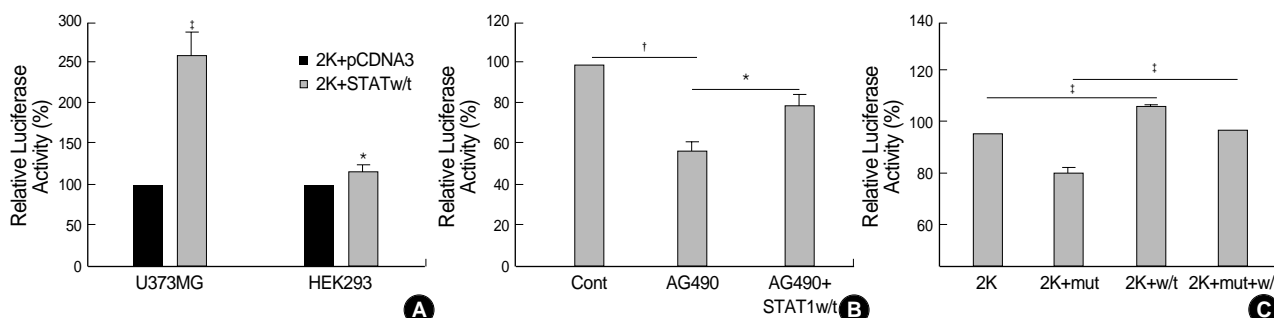


Fig. 5. Regulation of BACE1 promoter activity by overexpression of STAT1 wild type (STAT1 w/t) and dominant negative mutant of STAT1 (STAT1 mut). (A) Overexpression of STAT1 w/t increased BACE1 promoter activity both in U373MG cells and HEK293 cells. (B) AG490-induced decrease of BACE1 promoter activity was recovered by overexpression of STAT1 w/t in U373MG cells. (C) BACE1 promoter activity was attenuated by overexpression of STAT1 mut and recovered by STAT1 w/t in U373MG cells. Results from a representative experiments are expressed as the mean (\pm S.E.) of triplicate measurements. * $p < 0.05$, [†] $p < 0.01$, [‡] $p < 0.005$.

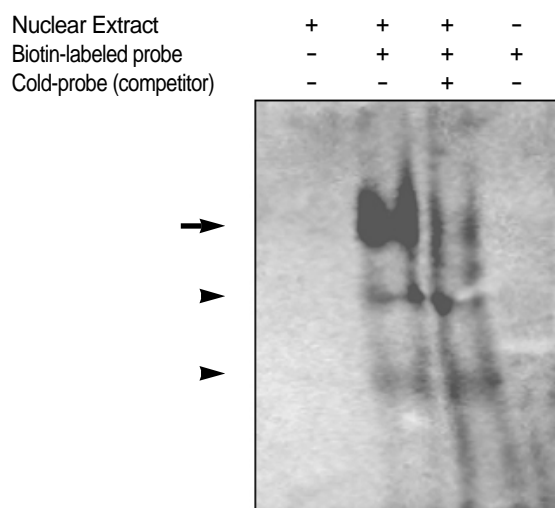


Fig. 6. Binding of STAT1 to specific sequences within the BACE1 promoter region. Gel shift assay showed direct binding of STAT1 to putative STAT1 binding sequence (-1,857~-1,865 bp) within BACE1 gene upstream region. Arrow: shifted band, arrow heads: non-specific bands. This is the representative of three experiments conducted independently.

4. STAT1에 의한 BACE1 촉진염기서열 활성 조절

BACE1 촉진염기서열의 활성이 STAT1에 의해 조절됨을 확인하기 위해 STAT1 cDNA가 pcDNA3에 삽입되어 있는 재조합 벡터인 pcDNA3-STAT1 혹은 비활성형 STAT1 돌연변이가 삽입된 pcDNA3-STAT1Y701M을 BACE1 촉진염기서열인 uBACE-2K와 세포에 동시에 유전자 도입하여 BACE1 촉진염기서열의 활성을 측정하였다(Fig. 5). U373MG, HEK293 세포 모두 야생형의 STAT1을 과발현 시킨 경우 BACE1 촉진염기서열의 활성이 증가되었다(Fig. 5A). HEK293 세포에서의 증가율이 U373MG 세포에 비해 적게 나타나는 것은 세포에 따른 특이성으로 생각된다. AG490에 의해 억제된 촉진염기서열 활성도 STAT1 과발현으로 회복되었다(Fig. 5B), 또한 JAK2

에 의해 인산화되는 것으로 알려져 있는 STAT1의 701번 아미노산인 Tyr이 치환된 비활성형의 STAT1을 과발현 시키면 BACE1 촉진염기서열의 활성이 감소되고 이 또한 야생형 STAT1 과발현에 의해 다시 회복되었다(Fig. 5C). 비활성형 STAT1 과발현 시 촉진염기서열 활성의 감소율이 적은 것은 세포내 내인성 STAT1이 과발현 시킨 외인성 STAT1에 의해 완전하게 치환되지 못한 것으로 생각된다.

5. STAT1의 BACE1 촉진염기서열 결합

BACE1 촉진염기서열에 STAT1이 직접 결합하는지 확인하기 위해 STAT1의 결합서열을 포함하는 oligonucleotide를 제작하여 EMSA를 수행하였다. STAT1 결합서열을 조사한 결과 -1857~-1865 bp에 TTCCTCTAA의 STAT1이 결합할 가능성이 높은 서열이 있음을 확인하여 바이오틴이 표지된 탐침을 제작하고, 이를 IFN- γ 에 의해 인산화된 STAT1이 다량 존재하는 U373MG 세포의 핵 단백질 추출물과 반응시킨 후 전기 영동하여 STAT1이 BACE1 촉진염기서열의 예상 결합서열에 결합하는지를 EMSA 방법을 통해 확인하였다. 그 결과 STAT1이 제작한 탐침과 결합함을 확인하였으며, 바이오틴이 없는 탐침을 과량으로 첨가한 처리군에서는 DNA-단백질 복합체가 사라져 위의 결합이 염기서열에 특이적인 반응임을 확인하였다(Fig. 6).

고 찰

알츠하이머병 환자의 뇌에서 공통적으로 볼 수 있는 노인성 반점은 알츠하이머병의 주요 병인 중 하나로 독성 단백질인 베타 아밀로이드가 축적되어 형성되고 따라서 베타 아밀로이드의 생성 기전과 이에 관여하는 물질들에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 베타 아밀로이드는 그것의 전구 단백질인 APP가 베타 시크리테아제와 감마 시크리테아제에 의해 순차적으로 대사되어

생성되므로 베타 시크리타제의 작용이 독성의 베타 아밀로이드 생성에 결정적 단계임을 알 수 있다[1].

BACE1은 최근 베타 시크리타제로 밝혀진 단백질로 뇌 조직 중 신경세포에서 주로 발현되어 베타 아밀로이드의 생성에 관여한다. 그러나 뇌조직의 대부분을 차지하는 비신경세포인 성상교세포에서는 BACE1의 발현이 관찰되지 않아 성상교세포에서는 베타 아밀로이드가 생성되지 않는 것으로 알려져 왔다[2, 3, 6]. 그러나 최근 알츠하이머병의 동물 모델인 Tg2576 생쥐에서 베타 아밀로이드 반점 주위의 활성화된 성상교세포가 BACE1을 발현한다는 결과가 보고되었고[7, 9, 14], 이때 반점 주위에 여러 염증성 사이토카인과 산화 스트레스에 관여하는 물질들이 다량 분비되어 있음이 밝혀졌다. 이러한 물질들은 세포내 여러 신호전달과정을 유발하여 이를 통해 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있는 물질들로 성상교세포 내 BACE1의 발현 또한 이들 의해 유도되었을 가능성이 있다[5, 10, 11]. 이 후 실제로 성상교세포에 전 염증 사이토카인인 IFN- γ 처리에 의해 BACE1의 mRNA와 단백질 발현이 증가됨이 보고되어 이 과정에 IFN- γ 에 의한 대표적인 신호전달체계로 알려져 있는 JAK/STAT signal이 이에 관여할 가능성이 제시된 바 있다[9].

본 실험에서 luciferase assay 방법을 통해 규명한 BACE1의 촉진염기서열 부위는 이전의 보고에서 제시된 BACE1의 핵심 촉진염기서열을 포함하고 있다[15-17]. 이 보고들에서 Sp1, AP2 등의 전사인자가 BACE1 촉진염기서열에 결합함을 보이고 있으나 이를 유도할 수 있는 병리학적 요인이나 이를 매개하는 세포내 신호전달 체계에 대한 논의는 이루어지지 않았다. 본 저자들의 논문에서는 알츠하이머 질환 환자의 뇌에서 염증 반응이 중요하게 작용하는 것으로 보고되어 있는 전염증 사이토카인인 IFN- γ 를 성상교세포에 처리하였을 때 BACE1의 촉진염기서열 활성이 증가됨을 확인하였으며 JAK2의 특이적 억제제인 AG490에 의해 이러한 효과가 감소되는 것으로 보아 JAK/STAT 신호전달 경로가 BACE1 촉진염기서열의 활성 조절에 관여할 수 있음을 추정하였다. 이 후 수행한 STAT1 과발현 실험 결과, 야생형의 STAT1을 과발현 시킨 경우 BACE1의 촉진 유전자 활성이 크게 증가되었고 AG490에 의한 감소효과가 극복되었다. 반대로 JAK2에 의해 인산화 되지 못하는 변형된 STAT1을 과발현 시킨 경우 촉진염기서열 활성이 감소되었고 이것은 야생형 STAT1의 과발현을 통해 회복되었다. 궁극적으로 전사 인자인 STAT1이 BACE1 촉진염기서열에 직접 결합하는지 확인하기 위해 본 연구에서 사용된 촉진염기서열에 STAT1의 DNA 결합서열이 존재하고 있음이 확인되어 이를 포함하는 표지된 탐침을 이용하여 EMSA 실험을 수행한 결과 IFN- γ 에 의해 활성화된 성상교세포의 STAT1 단백질이 BACE1 촉진염기서열내의 예상 결합 서열에 특이적으로 결합함을 확인하였다. 이상의 결과를 종합해보면 비신경세포인 성상교세포에 전염증 사이토카인인 IFN- γ 를 처리하면 세포내 JAK2가 활성화되어 전사인자인 STAT1을 인산화 시키고 이로 인해 활성화된 STAT1이 핵 안

으로 이동하여 결국 BACE1의 촉진 유전자에 직접 결합해 BACE1의 발현을 유도함을 알 수 있다.

성상교세포는 뇌 조직 중 가장 큰 비율을 차지하는 세포로서, 뇌 조직에서 일어나는 염증반응에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는 IFN- γ 로 인해 본 연구 결과와 같이 BACE1의 발현이 유도되면 이제까지 신경세포에서만 일어나는 현상으로 알려져 있던 APP 대사가 비신경세포인 성상교세포에서도 일어나게 될 것으로 추측되며, 이로 인해 생성되는 베타 아밀로이드의 양은 적은 수의 신경세포로부터 생성되는 것보다 훨씬 많은 양으로 이로 인해 병의 진행이 더욱 가속화될 수 있다. 따라서 이후의 연구를 통해 전염증 사이토카인에 의한 성상교세포에서의 BACE1 발현 유도가 실제 환자에 있어서 알츠하이머병의 발병과 진행과정에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 작업이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건장학회 학술연구비(이지연 수혜)와 한국과학기술부 뇌기능 프론티어 연구비 및 한국과학재단 목적기초연구사업의 지원으로 수행되어 졌다.

참고문헌

1. Selkoe DJ. *Alzheimer's disease: a central role for amyloid*. J Neuropathol Exp Neurol 1994; 53: 438-47.
2. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature 1999; 402: 537-40.
3. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science 1999; 286: 735-41.
4. Roberds SL, Anderson J, Basi G, Michael J, Bienkowski MJ, Branstetter DG, et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain : implications for Alzheimer's disease therapeutics Hum mol genet 2001; 10: 1317-24.
5. Apelt J, Schliebs R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. Brain Res 2001; 894: 21-30.
6. Bigl M, Apelt J, Luschekina EA, Lange-Dohna C, Roner S, Schliebs. Expression of beta-secretase mRNA in transgenic Tg2576 mouse brain with Alzheimer plaque pathology. Neurosci Lett 2000; 292: 107-10.
7. Roner S, Apelt J, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. Neuronal and glial beta-secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology. J Neurosci Res 2001; 64: 437-4.

8. Satoh J, Kuroda Y. Amyloid precursor protein beta-secretase (BACE) mRNA expression in human neural cell lines following induction of neuronal differentiation and exposure to cytokines and growth factors. *Neuropathology* 2001; 20: 289-96.
9. Hong HS, Hwang EM, Sim HJ, Cho HJ, Boo JH, Oh SS, et al. Interferon- γ stimulates beta-secretase expression and sAPP β production in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 922-7.
10. Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, et al. Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* 2002; 10: 279-88.
11. Woodroffe MN. Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 1995; 45: 6-10.
12. Dell'Albani P, Santangelo R, Torrisi L, Nicoletti VG, de Vellis J, Giuffrida Stella AM. JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures. *J Neurosci Res* 2001; 65: 417-24.
13. Ramana CV, Gil M P, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol* 2002; 23: 96-101.
14. Hartlage-Rubsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gartner U, Franke H, Stahl T, et al. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia* 2003; 41: 169-79.
15. Christensen MA, Zhou W, Qing H, Lehman A, Philipson S, Song W. Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 865-74.
16. Sambamurti K, Kinsey R, Maloney B, Ge YM, Lahiri DK. Gene structure and organization of the human beta-secretase (BACE) promoter. *FASEB J* 2004; 18: 1034-6.
17. Ge YW, Maloney B, Sambamurti K, Lahiri DK. Functional characterization of the 5' flanking region of the BACE gene: identification of a 91 bp fragment involved in basal level of BACE promoter expression. *FASEB J* 2004; 10.1096/fj.03-1379fje.