creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

약학석사 학위논문

시상하부에서 발현되는 Dax1/NR0B1이 체온조절에 미치는 영향

Role of Hypothalamic Dax1/NR0B1 in Regulating Mice Thermogenesis

2022년 02월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

차 주 선

시상하부에서 발현되는 Dax1/NR0B1이 체온조절에 미치는 영향

지도 교수 이 승 희

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함
2021년 11월

서울대학교 대학원
약학과 약물학전공
차 주 선

차주선의 약학석사 학위논문을 인준함
2021년 12월

위 원 장 강 건 욱 (인)

부위원장 구 자 현 (인)

위 원 이 승 희 (인)

초 록

시상하부 궁상핵(Arcuate Nucleus)에서 agouti-related peptide(AgRP) 신경전달물질을 분비하는 AgRP 신경세포는 소마토스타틴(Somatostatin) 양성 그리고 Gm8773 양성($AgRP^{SST+}$, $AgRP^{Gm8773+}$)두 가지 신경세포 하위 유형(Subtype)으로 분화된다고 보고되었다. 두 가지 유형들 중 $AgRP^{SST+}$ 신경세포 하위 유형에서 Dax1을 암호화하는 NR0B1 유전자가 높은 발현양을 보이고 있으며, 전사조절에도 높은 수준으로 관여하고 있다는 연구 결과가 보고되었다. 본 연구는 시상하부 궁상핵 특이적으로 Dax1 유전자가 녹아웃 된 생쥐(Dax1-cKO)를 제작하여 AgRP 신경세포 분화의 차이와 그에 따른 표현형을 관찰했다.

실험결과 Dax1이 시상하부에서 녹아웃 된 생쥐의 궁상핵 부위에서 AgRP 신경세포의 발현에는 큰 차이가 없지만, $AgRP^{SST+}$ 신경세포 하위 유형으로의 분화가 감소되는 것을 확인하였다. AgRP 신경세포는 체내 에너지 항상성 및 교감신경계 활성과 밀접한 관계를 갖는 신경세포로 알려져 있어 Dax1이 녹아웃 된 생쥐의 섭식, 체온, 생식 능력의 차이를 관찰하였다. 그 결과, Dax1이 녹아웃 된 생쥐의 평균 체온이 대조군 생쥐에 비해 높게 유지되는 것을 확인하였다. 더 나아가 저온 환경에 노출되었을 때 나타나는 저온 내성이 개선되는 것을 확인하였다. 포유류 체온 조절에 중추적인 역할을 하는 갈색지방세포(Brown Adipose Tissue)와 서혜부 백색지방세포(inguinal White Adipose Tissue)의 교감신경 섬유와 체온조절 관련 유전자들의 발현양을 측정해본 결과, 녹아웃 생쥐에서 체온조절 관련 유전자들이 높게 발현되는 것을 확인하였다.

렙틴 호르몬에 의한 AgRP 신경세포의 활성의 차이가 교감신경계 활성에 변화를 주는지 확인하고자, 단기간 렙틴 호르몬을 주입하여 AgRP 신경세포 활성을 측정하였다. 그 결과, 녹아웃 생쥐의 AgRP 신경세포의 활성이 대조군 생쥐에 비해 줄어드는 것을 관찰하였다. 이를 통해 시상하부 특이적 Dax1이 AgRP 신경세포의 활성을 조절하며 전체적인 교감신경계 및 에너지 소비량에 변화를 주는 것을 확인하였다.

본 연구를 통해 Dax1이 시상하부 궁상핵 내에서 AgRP 신경세포의 분화과정에 미치는 영향을 규명하였으며, AgRP 신경세포의 활성에 Dax1이 전사인자로써 어떠한 영향을 주는지 확인하였다.

주요어 : Dax1, 체온조절, 시상하부, AgRP, 교감신경계
학 번 : 2020-21676

목 차

I. 서 론 1

1. Dax1의 기능 1
2. 시상하부 궁상핵 신경세포 4
3. AgRP 신경세포 분화과정 6

II. 연구재료 및 방법 9

1. 실험동물 9
2. 체온측정 방법 9
3. 면역형광염색법 10
4. 동소보존법 및 형광동소보존법 11
5. RNA추출 및 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR) 12
6. Hematoxylin & Eosin 염색 14
7. 통계분석 14

III. 연구 결과 15

1. Nkx2.1-cre 유전자에 의한 궁상핵에서의 Dax1 발현억제 15
2. Dax1-cKO 생쥐에서의 $AgRP^{SST+}$신경세포 아형 발현양 감소 18
3. Dax1-cKO 생쥐에서의 몸무게 변화 및 음식물 섭취량 21
4. Dax1-cKO 생쥐의 체온 상승 24
5. Dax1-cKO 생쥐 지방세포 미토콘드리아 활성 증가 27
6. Dax1의 cKO로 인한 $AgRP^{CRFR1+}$신경세포 증가 31
7. 렙틴 호르몬에 의한 AgRP 신경세포 자극 촉진 34

IV. 고찰 39

1. 실험결과에 대한 고찰 39
2. 추가실험 필요성에 대한 고찰 44

V. 참고문헌 47

Abstract 51

List of Figures

Table 1. Antibodies used in Immunofluorescence 11

Table 2. Primers used in qRT-PCR..... 13

Figure 1. Schematic representation of producing Brain-specific Dax1 knock-out mice and its effect on Reproductive capability. 17

Figure 2. Deletion of Dax1 in Hypothalamus shows repressed SST-expressing neurons and $AgRP^{SST+}$ neuronal subtype.19

Figure 3. No significant difference between Control and Dax1 cKO mice in Body weight, Food intake and Tissue Weight upon High-fat Diet..... 22

Figure 4. Dax1-cKO mice shows elevated body temperature. 26

Figure 5. Thermogenesis and Mitochondrial activity marker gene is elevated in Dax1 cKO mouse Brown (BAT)and inguinal White Adipose Tissue(iWAT) 29

Figure 6. Deletion of Dax1 in Hypothalamus ARC shows elevated hypothalamic expression of $AgRP^{CRFR1+}$..... 33

Figure 7. Leptin-induced AgRP neuron activation is repressed in Dax1 cKO mice hypothalamus 37

Figure 8. Working model of the role of Dax1 in mice hypothalamus 39

List of Abbreviations

ARC	Arcuate nucleus
AgRP	Agouti-related peptide
AHC	Adrenal hypoplasia congenita
BAT	Brown Adipose Tissue
cKO	conditional Knock-out
CRFR1	Corticotropin Releasing Factor Receptor, 1
CRH	Corticotrophin Releasing Hormone
CytC	Cytochrome C
Dax1	DSS, AHC, Critical region on X chromosome, Gene 1
Dio2	Iodothyronine Deiodinase 2
DSS	Dosage Sensitive Sex-reversal
eWAT	epididymal White Adipose Tissue
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GnRH	Gonadotrophin Releasing Hormone
GTT	Glucose Tolerance Test
H&E	Hematoxylin & Eosin
HFD	High-Fat Diet
HSP70	Heat Shock Protein 70
I.P.	intraperitoneal injection
IF	Immunofluorescence

IgG	Immunoglobulin G
ISH	In Situ Hybridization
ITT	Insulin Tolerance Test
iWAT	inguinal White Adipose Tissue
Kiss1	Kisspeptin 1
NPY	Neuropeptide Y
NR0B1	Nuclear Receptor Superfamily 0, Subtype B, Member 1
OTP	Orthopedia homeobox
PVN	Paraventricular nucleus
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
Shh	Sonic Hedgehog
SST	Somatostatin
TH	Tyrosine Hydroxylase
Ucp	Uncoupled Protein
WT	Wild-Type

I. 서 론

1. Dax1의 기능

Dax1 (Dosage sensitive sex-reversal(DSS), adrenal hypoplasia congenita(AHC) critical region on the X chromosome, gene 1, 단백질은 X 성염색체에 특이적으로 존재하는 *NR0B1(Nuclear Receptor Superfamily 0, Subtype B, Member 1)* 유전자에 암호화되어 발현한다(*1*). Dax1은 nuclear receptor superfamily로 분류되어있지만, 일반적인 nuclear receptor에 비해 간단한 구조를 띄고 있다고 알려져 있는 orphan receptor로 분류된다. Dax1 단백질은 nuclear receptor에 존재하는 리간드-결합 영역(Ligand binding domain)이나 DNA-결합 영역(DNA-binding domain), Hinge domain과 Modulator domain이 결여되어 있으며, 현재까지 Dax1 단백질과 결합해 활성화시키는 리간드는 밝혀진 바 없다(*2*). 비교적 간단한 구조적 특징을 갖는 Dax1 단백질은 LXXLL motif-like 서열이 포함된 N-terminal 영역과, AF-2 transactivation domain을 포함한 C-terminal 영역이 존재한다. 지금까지 밝혀진 연구에 의하면, Dax1은 N-terminal domain의 LXXLL motif 서열을 통해 다른 단백질과의 상호작용을 통해 heterodimer를 이루며, C-terminal domain의 AF-2 domain을 이용해 상호작용하는 단백질의 활성을 직접적으로 억제시키거나, 다른 repressor를 recruit하는 corepressor로

작용한다고 알려져 있다(*3*).

Dax1은 포유류의 시상하부-뇌하수체-부신-생식샘 축(HPAG axis)의 발달과정에 영향을 주는 조직에 발현되는 것으로 알려져 있다(*4*). 지금까지 알려진 연구에 의하면, Dax1이 결여된 수컷생쥐는 정소결정인자 *Sry(Sex-determining Region Y)* 유전자 존재유무와 별개로 정소 형성에 장애가 일어나는 동시에 난소 형성이 나타나는 DSS(Dosage Sensitive Sex-reversal) 현상이 나타나는 것으로 알려져 있다(*5, 6*). Dax1은 또 다른 orphan nuclear receptor인 SF-1(steroidogenic factor 1) 과 상호작용하여 repressor로 작용한다고 알려져 있다(*5*). SF-1 유전자는 포유류 내분비계 조직들: 시상하부, 뇌하수체 전엽 그리고 부신피질 등에서 발현되어 포유류 배아 발달과정에서 조직들의 발생과 스테로이드 형성 세포의 분화에 관여하고 있다고 알려져 있다(*7, 8*). Dax1은 SF-1과의 상호작용을 통해 N-CoR(nuclear receptor corepressor)의 recruitment를 야기하여 SF-1의 활성을 억제한다는 연구 결과가 보고되어 있다. X-염색체의 Dax1 유전자의 돌연변이가 일어난 AHC(Adrenal Hypoplasia congenital)환자는, Dax1이 SF-1과 상호작용하여 N-CoR 인자의 recruitment를 막는다. 그로 인해 N-CoR에 의한 SF-1 활성도에 불균형이 일어난다(*9*). 사춘기에 접어든 AHC 환자들은 시상하부, 뇌하수체 전엽과 부신피질의 발달에 돌연변이가 일어난다(*10*). 특히 시상하부에서 내분비계를 조절하는 GnRH 신경세포에 의해 분비되는

gonadotrophin 호르몬 분비가 저해되며, 그에 따른 FSH와 LH의 분비에 불균형이 일어난다(*11*). 따라서 하위 조직인 부신피질 발달이 저해되며 체내 성 호르몬 분비 항상성에 치명적인 오류가 생긴다. 현재까지 Dax1에 의해 밝혀진 연구는 내분비계 조절에 의한 성 호르몬과 생식기능에 미치는 영향에 국한되어 있다. Dax1이 시상하부에서 발현되는 것은 확인되었지만, 시상하부 신경세포 발생, 활성 그리고 분화 과정에 어떠한 영향을 주는지에 대한 연구는 진행되지 않았다.

2. 시상하부 궁상핵 신경세포

시상하부는 섭식, 체온, 호르몬 균형, 에너지 소비를 조절하는 뇌의 부위이다(*12-14*). 시상하부 궁상핵(Arcuate nucleus, ARC)은 혈액-뇌장벽(Blood-Brain Barrier, BBB)에 의한 영향이 불완전하여 혈액 내를 순환하는 호르몬들과 직접적인 상호작용을 한다(*13*). 체내 에너지 항상성 유지에 불균형이 생길 경우, 다양한 장기들에서 분비되는 호르몬들이 신경세포 수용체와 결합하여 신경세포 활성을 조절하는 신호로 작용하며, 최종적으로 체내 항상성을 유지시킨다. 섭식과 에너지 소비와 연관된 지방조직에서 유래된 렙틴, 위에서 유래된 그렐린, 그리고 비장과 췌장에서 분비된 인슐린과 같은 호르몬을 인식하는 궁상핵 내 다양한 신경세포들의 신호전달에 의해 체내 에너지 항상성에 기여한다(*15, 16*). 궁상핵 내에 대표적으로 알려진 신경세포는 AgRP/NPY expression 신경세포와 POMC/CART expressing 신경세포가 존재한다(*17*). 활성화된 AgRP/NPY 신경세포에서 유래된 신경전달물질은 뇌실옆핵(Paraventricular nucleus, PVN)에 MC4R receptor에 길항적으로 결합해 식욕증진 현상을 나타냄과 동시에 에너지 소비를 줄이는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(*18, 19*). 그와 POMC/CART 뉴런은 식욕억제 현상을 나타내는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 과도한 음식물 섭취로 인한 체내 에너지원이 과다하게 존재할 경우, POMC 신경세포가 활성화 된다. POMC 뉴런은 a-MSH(a-melanocyte-stimulating hormones)를 분비하게 된다. AgRP

신경세포의 PVN MC4R 수용체의 길항적 작용하지만, a-MSH는 MC4R 수용체와 결합하여 촉진에 역할을 한다. 이처럼 AgRP 신경세포의 활성은 생명현상 유지에 중추적인 체내 항상성 유지에 높은 수준으로 관여하고 있지만 아직까지 AgRP 신경세포 활성 mechanism에 관여하는 전사인자들과 분자적 기전에 관련된 연구는 완벽히 연구되지 않았다.

3. AgRP 신경세포의 분화과정

앞서 언급하였듯, 시상하부 궁상핵에 존재하는 신경세포들은 생명현상 유지에 필수적인 항상성 조절을 수행하는 역할을 하고 있다. 항상성 조절의 불균형은 비만, 당뇨, 심혈관질환, 성장 장애 등 다양한 합병증을 유발한다. 따라서 궁상핵 신경세포들의 역할과 활성을 나타내는 전사인자들에 대한 연구는 호르몬 불균형을 예방하거나 치료하는데 중요한 지표가 된다. 하지만 신경세포 발생과 분화과정에 관여하는 인자들에 대한 연구는 최근에서 진행되기 시작하였다.

이러한 신경세포들의 발생과 활성을 조절하는 전사인자들을 밝히고자 하는 목적을 통해 최근 생쥐 시상하부 궁상핵 유래 신경세포를 이용한 unbiased transcriptome analysis와 single-cell(sc)RNA-sequencing 연구가 진행되어 발달과정 중 시상하부 신경세포에 영향을 주는 전사인자들을 밝히기 시작하였다(*20, 21*). 위 연구에 언급된 결과를 살펴보면, 궁상핵 내 신경세포들은 단독적인 역할을 수행하지 않고, 서로 상호작용하며 다른 분류의 신경세포들에 동일한 전사인자들이 공존하는 neural cluster를 형성하는 것을 밝혔다. 이 같은 neural cluster를 토대로 각 신경세포는 다른 신경세포와 비슷한 하위전사인자(transcriptional subtype)을 바탕으로 다양한 신경 하위 유형으로 나뉜다고 보고하였다. 특히 AgRP 신경세포 분화과정들 중, AgRP 신경세포는 소마토스타틴(Somatostatin, SST) 양성의

하위유형과 Gm8773 양성의 하위유형(AgRP^{SST+}, AgRP$^{Gm8773+)}$, 2개의 신경 하위 유형(neuronal subtype)으로 나누어 지는 것이 확인되었다(*21*). 나뉘어진 하위 유형은 AgRP 신경세포이나, 작용하는 전사인자가 다르며, 다른 뇌 부위와 연결된 신호전달체계에 차이점이 있다는 것을 확인하였다. 전체적인 AgRP 신경세포의 약 9%에 해당하는 AgRP^{SST+} 하위 유형 분화과정에 관여하는 전사인자들과 전사조절을 진행하는 유전자들을 분석한 결과, Dax1을 암호화하고 있는 NR0B1과 AgRP 신경세포의 활성을 조절하여 교감신경계 활성과 체온을 조절한다고 알려진 CRFR1 유전자가 가장 높은 수준으로 발현되며 전사 조절을 유도한다는 점을 확인하였다(*22*). 반대로 AgRP$^{Gm8773+}$ 하위 유형 분화과정에는 Sgk1과 Jun 유전자가 높은 수준으로 발현되는게 알려져 있다. 특히 Jun은 중추신경계에서 JNK1 신호전달계를 활성화하는 인자로 알려져 있다.(*23*) JNK1 신호전달계는 중추신경계에 전반적으로 존재하며 비만 연관 인슐린 저항성의 지방세포 축적을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 AgRP 신경세포는 하위 유형으로 나뉘어 지며, 각각의 하위 유형이 각기 다른 방법으로 에너지 항상성 조절에 기여할 것이라 생각한다.(*24*)

본 연구는 Dax1을 시상하부에서 특이적으로 발현되는 Nkx2.1-cre 형질전환 생쥐를 이용해 Dax1 conditional Knock-out(cKO) 생쥐모델을 제작해 연구를 진행하였다. 그 결과, 시상하부에서 Dax1이 결손 되었을 때, AgRP^{SST+} 신경세포 하위유형의 발현이 줄어드는 것을

확인하였다. 또한 Dax1의 결손이 같은 AgRP 하위 유형 분화에 관여하는 인자인 CRFR1의 발현을 증가시켜 궁상핵 내 AgRP 신경세포 활성화를 저해하여 전체적인 체온과 에너지 소비량을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험 동물

동물 실험은 '실험 동물 관리 및 이용에 관한 지침' 에 따라 시행되었다. 실험동물로 사용된 생쥐는 55±5%의 습도, 22±2℃의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약대 동물실험 연구동에서 1주 이상 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 대조군 생쥐 C57BL/6 Dax1^{floxed} (The Jackson Laboratory; #007006)생쥐는 Nkx2.1-cre 유전자를 가지는 생쥐와 교배하여 Dax1-cKO(Dax1^{floxed}, Nkx2.1-cre) 생쥐를 실험군으로 이용해 동물실험을 진행하였다. 고지방식이 실험을 위해 8주령 생쥐를 12주에 거쳐 고지방사료(Research diet; D12491)를 공급하였다. 렙틴 주입 실험은 생쥐에 렙틴(PROSPEC, Cyt-351)호르몬을 3mg/kg(in 1 X PBS)용량으로 복강투여 하였다.

2. 체온측정 방법

생쥐 등 쪽 피하에 IPTT-300 implantable ID transponder를 삽입한 후 1주일 이상 적응 기간을 주었다. XPT/IPTT Non-contact Reader, DAS 8027IUS을 이용하여 24시간 동안 2시간 당위로 체온 측정을 진행했다. 저온 내성 체온측정을 위해 케이지, 사료, 음용수를 먼저 4℃ 환경에 측정 시작 24시간 전 노출시켰다. IPTT Transponder가 삽입된 생쥐들은 각 케이지 당 한 마리 씩 넣고 7시간동안 1시간 주기로 IPTT Reader로 측정하였다.

3. 면역형광염색법

성체 생쥐에 Avertin 10mg/kg를 주입해 마취시킨 후, 4% paraformaldehyde/PBS를 이용한 심장관류를 통해 조직을 고정한 후 추출하였다. 추출된 뇌 조직은 하룻밤동안(~16시간) 4% paraformaldehyde/PBS 로 고정한 후 다음날 5%(1시간)-10%(1시간)-15%(조직이 가라앉을 때까지)-30%(~16시간) 농도의 Sucrose로 cryoprotect를 진행하였다. 그 후 O.C.T. compound에 침전하여 드라이아이스 위에서 급속 동결하여 -80℃ 보관하였다. 성체 생쥐에서 추출된 지방조직은 포르말린으로 고정한 뒤 파라핀 블록을 만들어 상온에 보관하였다.

준비된 뇌 조직은 동결시료세단기(Cryostat Microtome)을 이용해 12μM 두께로 절단하여 면역형광염색법을 진행하였다. 지방조직은 5μM 두께로 절단하여 EtOH과 Xylene을 이용해 Deparaffinization을 진행한 후 면역형광염색법을 진행하였다.

면역형광염색법에 사용된 항체는 Table 1. 에 명시되었다

Table 1. Antibodies used in Immunofluorescence

Antibody	Host	Reference
α-OTP	Guinea Pig	Homemade
α-CRFR1	Goat	LSBio
α-cFos	Rabbit	Abcam
α-Dax1	Rabbit	Homemade
α-Jun	Rabbit	Cell signaling
α-Ucp1	Mouse	Alpha Diagnostic
α-TH	Chicken	Abcam

4. 동소부합법과 형광동소부합법

동소부합법(In situ hybridization, ISH)을 위해 생쥐 시상하부 cDNA에서 전사된 AgRP, SST, Dax1, Kiss1, POMC cDNA를 pBluescript 벡터에 클로닝한 플라스미드를 사용하였다. 동소보합법은 digoxigenin-labeled riboprobe(Roche Diagnostics)를 사용하여 hybridization을 거친 후, NBT/BCIP substrate를 이용해 염색을 진행하였다.

형광동소보합법(Fluorescence In situ hybridization, FISH)은 Fluorescein RNA Labeling Mix(Roche Diagnostics)과 digoxigenin-labeled riboprobe(Roche Diagnostics)를 사용하여 hybridization을 거친 후, Anti-Fluorescein-POD(Roche)/TSA Plus Fluorescein system(Akyoya Bioscience)와 Anti-Digoxigenin-POD(Roche)/TSA Plus Cyanine 5 system(Akoya Bioscience)를 이용해 형광염색을 진행하였다.

5. RNA 추출 및 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)

생쥐에서 추출된 지방조직은 Trizol(Invitrogen) 용액에 옮긴 후 RNA를 분리하였다. 추출된 RNA는 1000ng/ul의 농도로 Super Script III First-Strang Synthesis System(Invitrogen)을 이용한 역전사를 이용해 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 SYBR Green(Enzynomics)을 이용해 qRT-PCR을 진행하였으며, 얻은 결과는 CyclophilinA Ct값을 이용해 Normalization을 진행한 후 분석하였다. qRT-PCR에 사용된 primer는 Table 2. 에 명시되었다.

Table 2. Primers used in qRT-PCR

Gene		Nucleotide Sequence	Species
CyclophilinA	Sense	GTTCCTTCGAGCTGTTTGC	Mouse
	Antisense	GATGCCAGGACCTGTATGCT	
CytC	Sense	AAATCTCCACGGTCTGTTCGG	Mouse
	Antisense	GGGTATCCTCTCCCCAGGTG	
Dax1	Sense	CAGTGGAGAACCCAGCAGAT	Mouse
	Antisense	CTTTGCACAGAGCATCTCCA	
Dio2	Sense	AATTATGCCTCGGAGAAGACCG	Mouse
	Antisense	GGCAGTTGCCTAGTGAAAGGT	
Hsp70	Sense	TGGTGCTGACGAAGATGAAG	Mouse
	Antisense	AGGTCGAAGATGAGCACGTT	
Prdm16	Sense	GCGGTCTGTTAGCTTTGGAG	Mouse
	Antisense	GAGGAGTGTCTTCGGAAAGGG	
Ucp1	Sense	CACCTTCCCGCTGGACACT	Mouse
	Antisense	CCCTAGGACACCTTTATACCTAATGG	
Ucp2	Sense	ACCATTGCACGAGAGGAAGG	Mouse
	Antisense	TCTTGACCACATCAACGGGG	
Ucp3	Sense	CCTACGACATCATCAAGGAGAAGTT	Mouse
	Antisense	TCCAAAGGCAGAGACAAAGTGA	

6. Hematoxylin & Eosin 염색

뇌조직은 얻는 심장관류 과정 중 갈색지방과 백색지방조직, 간조직을 채취하여 10% Normal Buffered Formalin에 보관 후 파라핀 블록 형태로 상온에 보관하였다. 파라핀 블록은 시료세단기(microtome)을 이용하여 5μM 두께로 절단하여 슬라이드 글라스에 부착하였다. 절단된 조직은 EtOH과 Xylene을 이용해 Deparaffinization을 진행한 후 Hematoxylin과 Eosin을 이용해 염색을 진행하였다.

7. 통계 분석

대조군과 Dax1-cKO군 사이의 유의성은 Student's T-Test를 통해 확인하였으며 p-value로 표시한다. (*P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ***P< 0.0001). 값은 그룹 내 평균과 표준오차로 나타내었다.

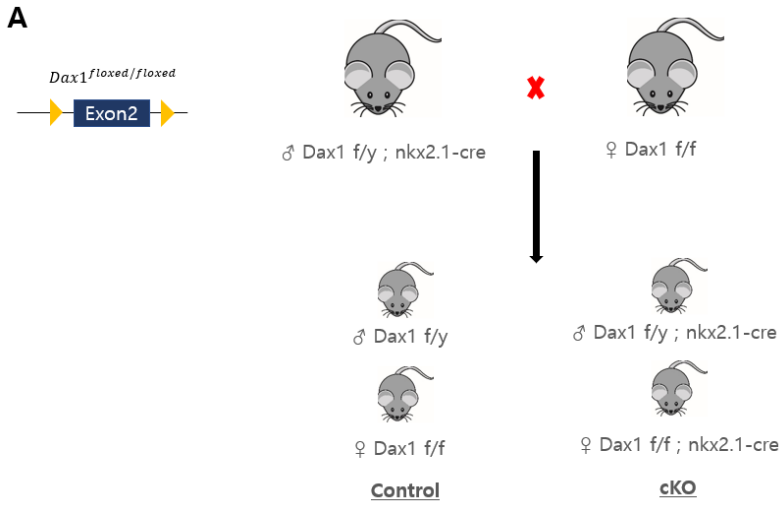
III. 연구결과

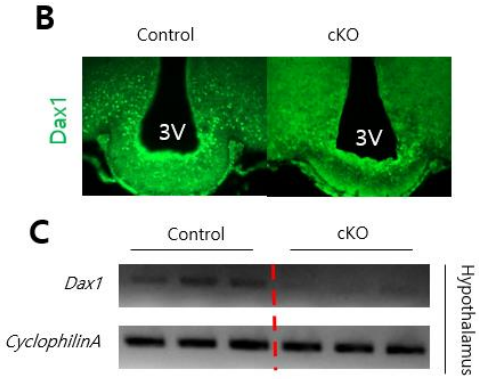
1. Nkx2.1-cre유전자에 의한 궁상핵에서의 Dax1 발현억제

시상하부 궁상핵에서 발현되는 Dax1의 기능을 밝히기 위해, 시상하부에서 Dax1이 특이적으로 결여된 생쥐를 생산하였다. 이와 같은 생쥐를 생산하기 위해 중추신경계 형성에 영향을 주는 Sonic hedgehog(Shh) 신호전달계에 특이적으로 관여하는 전사인자인 Nkx2.1(*25*)에 cre 가 결합되어 형질전환 된 생쥐와 Dax1유전자의 exon2에 loxP-site가 형질전환 되어 Floxed된 생쥐를 교배하였다(Figure 1A).

실험에 들어가기에 앞서 Dax1의 발현이 생쥐 시상하부 궁상핵 부위에서 발현을 하는지 확인하였다. 또한 Nkx2.1-cre 유전자에 의해 Dax1의 발현이 시상하부 궁상핵 특이적으로 억제되는지 확인하였다. 이를 확인하기 위해 형광동소부합법 (Fluorescence ISH)과 생쥐 시상하부에서 추출된 cDNA를 이용한 qRT-PCR 실험들을 통해 대조군 생쥐와 Dax1-cKO생쥐의 시상하부 궁상핵 절편에서 Dax1의 발현 패턴을 관찰해 보았다. 관찰결과, 시상하부 궁상핵에서 Dax1이 높은 수준으로 발현되고 있음을 확인하였으며, Dax1의 발현이 Dax1-cKO 생쥐 시상하부 궁상핵에서는 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 1B,C).

기존 연구에서 Dax1이 시상하부-뇌하수체-부신-생식샘 축 형성과 수컷 생식기 형성에 중요한 역할을 한다는 점이 밝혀졌다(*26*). Dax1이 녹아웃 된 생쥐를 연구한 논문에 의하면 Dax1이 녹아웃 될 경우 생식기 변형을 야기하며 생식능력이 저해된다는 점이 밝혀졌다. 따라서 Dax1이 시상하부에서 선택적으로 발현이 감소하게 될 경우, 생식기 변형에 의한 생식능력에 저해가 나타나는지 확인하기 위해 Dax1-cKO생쥐와 대조군 생쥐의 교배로 인해 태어난 생쥐 태아의 유전자형과 성별의 비율을 관찰해보았다. 관찰결과, 유전자형과 성별의 비율이 멘델 비율과 큰 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였으며, Dax1의 발현이 시상하부에서 감소되어도 생식능력에는 큰 영향을 미치지 않는다는 점을 확인하였다(Figure 1.D).





D

	Male	Female
# of Littermates	88	86
Dax1 f/f	48	44
Dax1 f/f; nkx2.1-cre	40	42

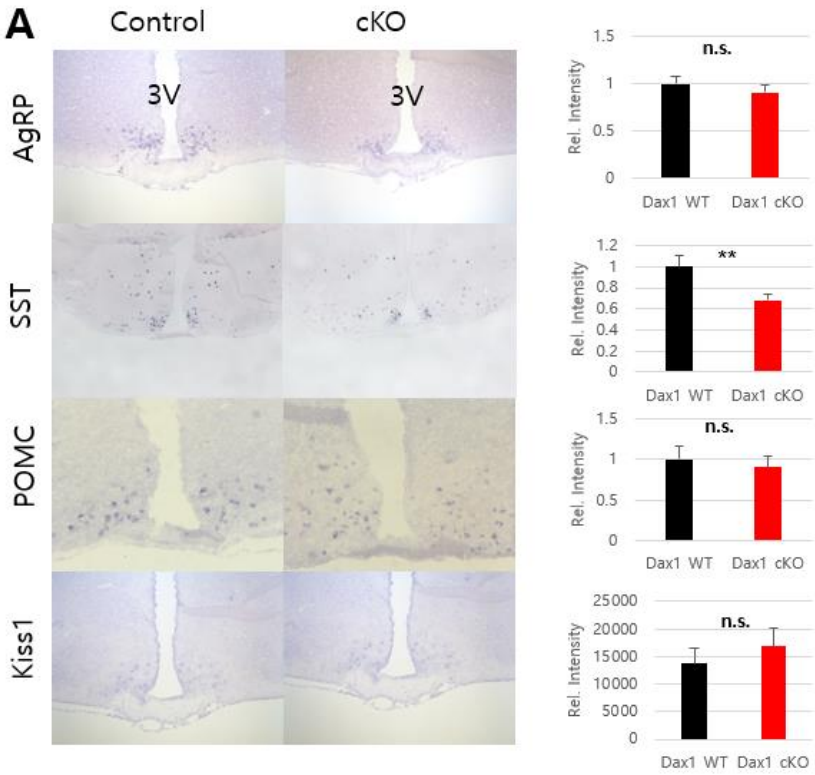
Figure 1. Schematic representation of producing Brain-specific Dax1 knock-out mice and its effect on Reproductive capability.

(A) Schematic representation of Dax1 conditional knock-out mouse model with nkx2.1-cre. (B) Fluorescence ISH analysis of Dax1 expression in Dax1 WT and cKO mic hypothalamic ARC. (C RT-PCR result of Dax1 expression in Dax1 WT and cKO hypothalamus cDNA. (D) Sex ration of Littermates in consecutive cages.

2. Dax1-cKO 생쥐에서 AgRP^{SST+} 신경세포 아형 발현양 감소

실제로 Dax1이 시상하부의 궁상핵 내에서 cKO되면, 궁상핵 내 신경세포들의 발현패턴에 어떠한 변화를 일으키는지 동소부합법(ISH assay)를 이용해 관찰하였다. 시상하부 궁상핵 내에서 발현되는 SST 신경세포의 발현양이 Dax1-cKO 생쥐 시상하부 궁상핵에서 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2A). 체내 항상성 유지에 중추적인 역할을 하는 신경세포인 AgRP와 POMC 신경세포의 발현양을 관찰한 결과, 두 그룹간 큰 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다. 시상하부에서 뇌하수체-부신-생식 축을 조절하는 GnRH 신경세포 전사인자인 Kiss 1(*27, 28*)의 발현 양 또한 두 그룹간 큰 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다(Figure 2A).

AgRP 신경세포가 AgRP^{SST+}과 AgRP$^{Gm8773+}$, 2가지 하위 유형(Subtype)으로 분화된다는 과정 중 AgRP^{SST+} 분화과정에 Dax1이 높은 수준의 전사 조절에 관여한다고 알려져 있다(*21*). 실제로 Dax1이 시상하부 궁상핵에서 발현이 저해될 경우, AgRP 신경세포의 분화과정에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 대조군과 Dax1-cKO 생쥐의 시상하부에 AgRP의 전사인자인 OTP(*29*)와 SST 신경세포를 함께 관찰한 결과, Dax1-cKO 생쥐 시상하부 궁상핵에서 AgRP^{SST+} 신경세포 하위 유형의 발현이 감소되는 것을 관찰하였다(Figure 2B). 위의 결과를 바탕으로 Dax1이 AgRP 신경세포의 분화과정에 중요한 역할을 하는 것을 밝혔으며, 특히 AgRP^{SST+} 신경세포 하위 유형의 발현을 조절하는 전사인자임을 확인하였다.


A
Control
cKO
AgRP
SST
POMC
Kiss1
3V
3V
Rel. Intensity
n.s.
**
n.s.
n.s.
Dax1 WT
Dax1 cKO

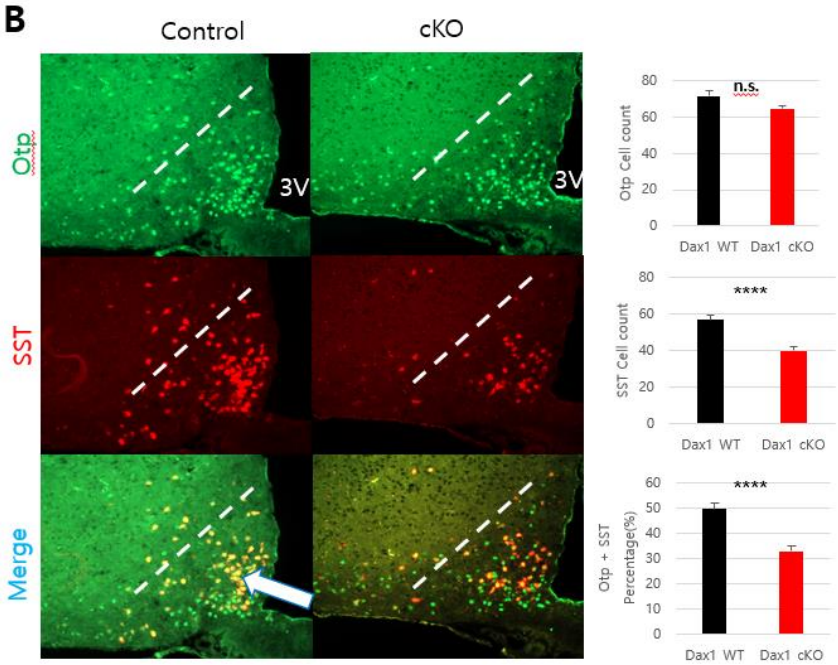

B
Control
cKO
Otp
SST
Merge
3V
3V
Otp Cell count
SST Cell count
Otp + SST Percentage(%)
n.s.
****
****
Dax1 WT
Dax1 cKO

Figure 2. Deletion of Dax1 in Hypothalamus shows repressed SST-expressing neurons and AgRP^{SST+} neuronal subtype.

(A) ISH analysis of AgRP, SST, POMC, Kiss1 neurons in Control(n=3) and Dax1 cKO(n=5) hypothalamus ARC. (B) IF(OTP) and FISH(SST) analysis of control and Dax1 cKO mice hypothalamus. *P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ***P< 0.0001

3. Dax1-cKO 생쥐에서의 몸무게 변화 및 음식물 섭취량

Dax1에 의한 AgRP 신경세포 분화과정의 변화가 AgRP 신경세포로 인한 섭식 조절에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 8주령 하위유형과 Dax1-cKO 생쥐를 12주랑 고지방식이 섭취를 진행하며 몸무게 변화와 음식물 섭취량 변화를 관찰하였다. 관찰결과, 두 생쥐 그룹 간 몸무게 변화울과 음식물 섭취량에는 유의미한 차이가 나타나지 않았다(Figure 3A, B) 12주 고지방식이가 끝난 생쥐들의 지방조직과 간 조직의 무게를 측정한 결과, 마찬가지로 유의미한 차이가 나타나지 않았다(Figure 3E). 따라서 시상하부 Dax1-cKO에 의한 AgRP 신경세포 분화과정의 변화는 AgRP 신경세포의 식욕증진(Orexigenic) 현상(*17*)과 연관성이 없다는 것을 확인하였다.

식욕증진 이외에 AgRP 신경세포는 체내 에너지 소비율에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. Dax1-cKO 생쥐의 에너지 소비율을 간접적으로 확인하기 위해 혈당 포도당 항상성을 측정하기 위해 Glucose Tolerance Test(GTT)와 Insulin Tolerance Test(ITT)를 진행하였다. 그 결과, 두 그룹 간, 인슐린 저항성은 유의미한 차이가 나타나지 않았지만(Figure 3D), 혈당 포도당 분해능이 Dax1-cKO 생쥐에서 개선되는 것을 확인하였다(Figure 3C). Dax1의 cKO에 의한 AgRP 신경세포 분화의 변화는 섭식조절에 관여하지는 않지만, 포도당 분해능 개선에 따른 에너지 소비량이 증가하는 되는 것을 확인하였다.

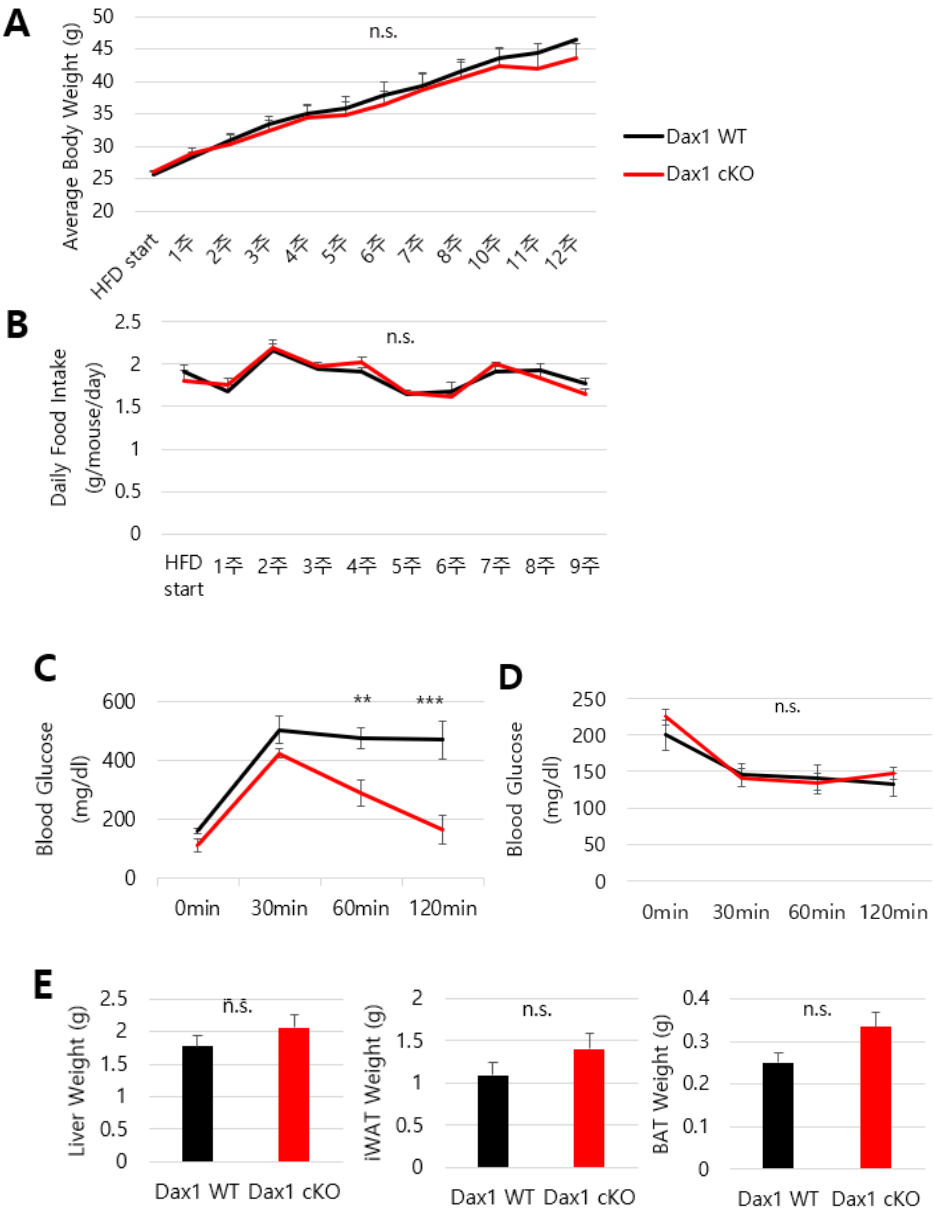


Figure 3. No significant difference between Control and Dax1 cKO mice in Body weight, Food intake and Tissue Weight upon High-fat Diet.

(A), (B). Body weight and Food intake measured upon HFD. Control(n=8), Dax1-cKO(n=6). (C),(D). Glucose Tolerance

Test(GTT) and Insulin Tolerance Test(ITT) result between Control and Dax1 cKO mice. (E). Liver, iWAT, BAT tissue weight. *P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ***P< 0.0001

4. Dax1-cKO 생쥐에서 체온 상승

Dax1-cKO의 에너지 소비량의 차이가 체온 조절로 이어질 수 있다는 점을 확인하기 위해, 포유류의 체온조절을 담당하는 갈색지방세포(BAT)가 위치한 부위에 체온측정을 위한 IPTT ID Transponder를 삽입시킨 후 Non-contact Reader를 이용해 다양한 환경에서 체온을 측정하였다. 음식물 섭취가 자유로운 환경에서 두 생쥐 그룹의 체온을 측정한 결과, Dax1-cKO 생쥐의 평균 체온이 대조군 생쥐에 비해 높다는 점을 확인하였으며, 특히 생쥐가 가장 활동적인 밤 주기 동안 Dax1-cKO 생쥐의 체온이 더욱 높아진다는 점을 확인하였다(Figure 4A). 이를 통해 시상하부에서 Dax1의 발현이 줄어들면, 전체적인 에너지 소비량이 증가하게 되어 높은 체온이 나타난다는 것을 확인하였다.

이러한 체온의 차이가 생쥐 에너지 소비량의 차이로 인한 현상임을 확인하고자 생쥐의 음식물 대사 활성을 최소화하기 위해, 24시간 동안 생쥐를 단식한 후 다시 자유로운 음식물 섭취를 진행하였을 때 체온을 측정하였다. 그 결과 음식물 섭취가 자유로웠을 때 나타났던 체온의 차이가 단식하는 동안 사라지는 것을 확인하였다(Figure 4B). 그리고 음식물 섭취가 자유로워져 대사 활성이 나타날 때 다시 Dax1-cKO의 높은 체온이 회복되는 것을 확인하였다(Figure 4C).

높은 에너지 소비량에 의한 Dax1-cKO 생쥐의 높은 체온이 저온 환경에서도 유지되어 저온 내성에도 기여하는 지 확인하고자, 4℃

환경에 생쥐를 7 시간 동안 노출시키는 동안의 체온을 측정하였다. 저온에 노출되었을 시 상온 환경과 마찬 가지로, Dax1-cKO 생쥐의 체온이 대조군 생쥐보다 높다는 것을 확인하였다(Figure 4D) 이를 통해 Dax1-cKO 생쥐에서 저온 내성이 개선된다는 점을 확인하였다.

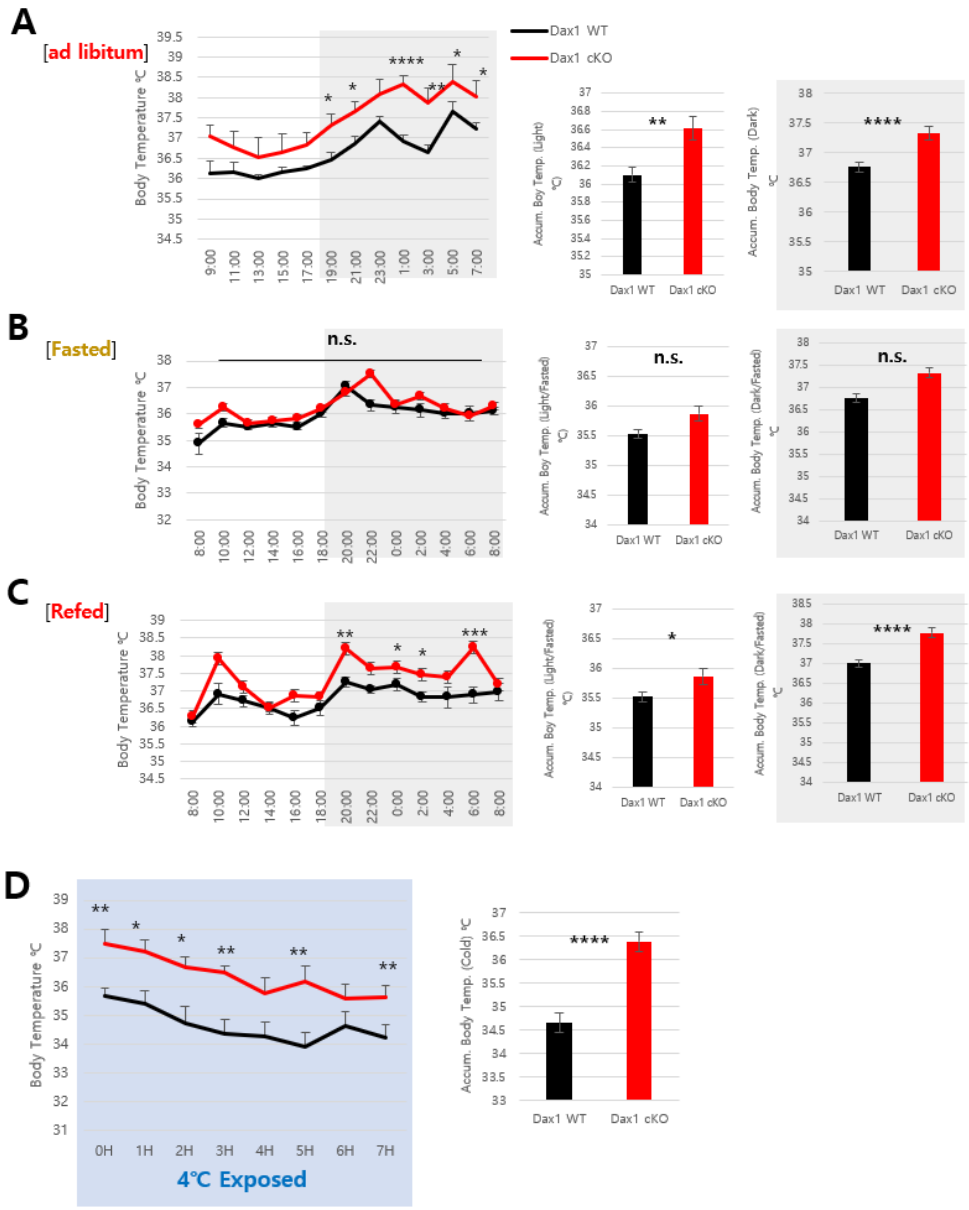


Figure 4. Dax1−cKO mice shows elevated body temperature.

(A),(B),(C) Temperature measured at Room temperature at Ad Libitum, Fasted. And Refed state, respectively. (D)Temperature measured at 4℃. *P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ***P< 0.0001

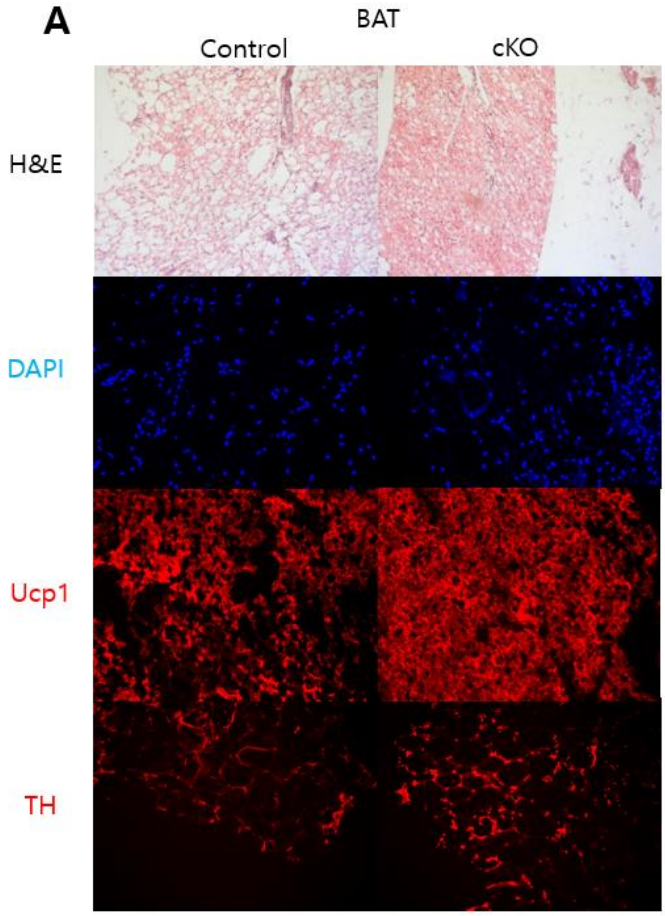
5. Dax1-cKO 생쥐 지방세포 미토콘드리아 활성 증가

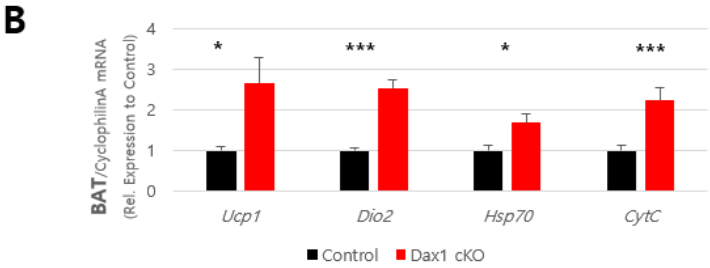
포유류의 체온은 지방세포, 특히 갈색지방세포(Brown Adipose Tissue, BAT)와 갈색화 현상(beiging effect)이 나타난 서혜부 백색지방세포(inguinal White Adipose Tissue, iWAT)의 미토콘드리아 활성에 의해 조절된다(*30, 31*). Dax1-cKO 생쥐의 높은 체온과 지방세포 미토콘드리아 활성에 의한 현상임을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다.

생쥐 갈색지방세포를 이용한 Hematoxylin & Eosin 염색을 진행한 결과, Dax1-cKO 생쥐의 갈색지방세포가 대조군 생쥐의 갈색지방세포보다 더 높은 세포 밀도를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5A) 높은 세포 밀도를 통해 전체적인 갈색지방세포의 미토콘드리아 활성이 더 높다는 점을 확인하였다. 갈색지방세포 미토콘드리아 기저막 단백질로 알려진 Uncoupled Protein subtype 1(Ucp1)은 기저막 내외의 H^+이온 농도구배에 의해 활성화되어 열 생성을 담당한다(*32-34*). 또한 갈색지방세포의 열 생성 및 열 항상성은 시상하부 AgRP 신경세포로부터 조절된 교감신경계 활성 tyrosine hydroxylase(TH) 섬유에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(*35*). 실제로 갈색지방세포에서 발현되는 Ucp1과 TH 섬유를 확인하기 위해 Ucp1과 TH를 면역형광염색(immunofluorescence staining)하여 관찰하였다. 관찰결과, Dax1-cKO의 갈색지방세포에서 Ucp1과 TH 모두 대조군 생쥐의 갈색지방세포에 비해 높은 수준으로 발현되고 있음을 확인하였다(Figure 5A). 지방세포에서 열 발생을 담당하는 유전자와 미토콘드리아 활성을 담당하는 유전자들의 차이를

확인하고자, 갈색지방세포와 서혜부 백색지방세포에서 추출된 cDNA를 이용해 qRT-PCR을 진행하였다. 그 결과 Dax1-cKO 생쥐의 갈색지방세포(Figure 5B)와 서혜부 백색지방세포(Figure 5C)에서 Ucp 유전자 발현양이 유의미하게 증가하는 것을 확인하였으며, 미토콘드리아 활성 또한 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다.

결과적으로 시상하부 궁상핵에서 Dax1-cKO에 의한 AgRP 신경세포의 분화과정의 변화는 체내 교감신경계의 활성을 향상시킨다는 것을 확인하였다. 높은 교감신경계의 활성으로 인해, 지방세포의 세포밀도와 미토콘드리아의 양과 활성이 높아지는 것을 확인하였으며, 더 나아가 지방세포 미토콘드리아 기저질막의 Uncoupled Protein의 발현양이 증가하는 것을 확인하였다. 이와 같은 변화로 인해 전체적인 체온 상승을 야기하며, 저온 내성이 나타난다는 점을 확인하였다.


A
BAT
Control
cKO
H&E
DAPI
Ucp1
TH


B
BAT/CyclophilinA mRNA
(Rel. Expression to Control)
4
3
2
1
0
*
***
*
***
Ucp1
Dio2
Hsp70
CytC
Control
Dax1 cKO

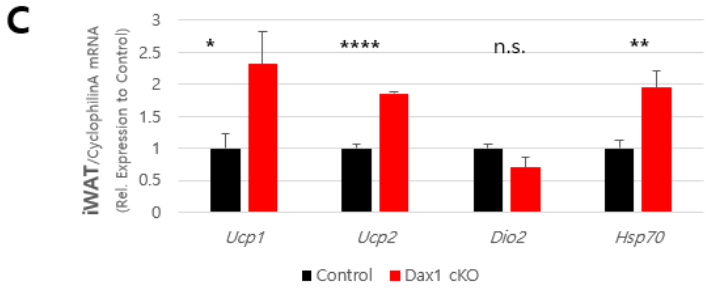

C
iWAT/CyclophilinA mRNA
(Rel. Expression to Control)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
****
n.s.
**
Ucp1
Ucp2
Dio2
Hsp70
Control
Dax1 cKO

Figure 5. Thermogenesis and Mitochondrial activity marker gene is elevated in Dax1 cKO mouse Brown (BAT) and inguinal White Adipose Tissue (iWAT)

(A). Hematoxylin & Eosin, IF (Ucp1, TH) image analysis of Control and Dax1 cKO mice BAT. (B),(C) Quantitative RT-PCR result of Thermogenesis marker gnee (Ucp1, Ucp2, Dio2) and Mitochondrial activity marker gene (Hsp70, Cytc) in BAT and iWAT cDNA, respectively. Control (n=4), Dax1 cKO (n=4). *P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ***P< 0.0001

6. Dax1의 cKO에 인해 AgRP^{CRFR1+} 신경세포 증가

AgRP^{SST+} 신경세포 아형으로의 AgRP 신경세포 분화과정에 관여하는 전사인자들 중, Dax1과 함께 높은 수준으로 발현되는 CRFR1(Corticotropin-releasing factor Receptor 1)은 시상하부 뇌실옆핵(Paraventricular nucleus,PVN)에서 유래된 CRH(Corticotropin-releasing hormone)에 의해 활성화 되는 수용체이다. AgRP 신경세포의 CRFR1 수용체 활성화는, AgRP 활성을 감소시켜, 교감신경계 활성을 높이는 인자로 밝혀져 있다(*22, 36*). 앞선 결과들을 토대로, 시상하부 궁상핵에서의 Dax1의 결여가 AgRP 신경세포와 교감신경계의 활성을 조절하는 CRFR1 신경세포의 발현에 어떠한 변화를 야기하는지 확인해보고자 하였다.

면역형광염색법을 이용해 AgRP 신경세포의 전사인자인 OTP와 CRFR1을 시상하부 궁상핵에 함께 염색하여 관찰하였다. 관찰결과, 두 그룹간 시상하부의 OTP 발현양에는 유의미한 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다(Figure 6A, B). 하지만 CRFR1과 함께 염색된 OTP 발현양이 Dax1-cKO 생쥐 시상하부 궁상핵에서 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(Figure 6A, C).

결과적으로 AgRP 신경세포 내에서 Dax1과 CRFR1은 경쟁적인 발현 패턴을 보이는 것을 확인하였으며, Dax1의 결여는 CRFR1의 과발현을 야기한다는 점을 확인하였다. 이는 생쥐 궁상핵의 AgRP 신경세포 활성이 낮아질 것을 암시하며, 이로 인해 전체적인 교감신경계 유출이 높아져 체온 상승을 야기한다는 점을 밝혔다.

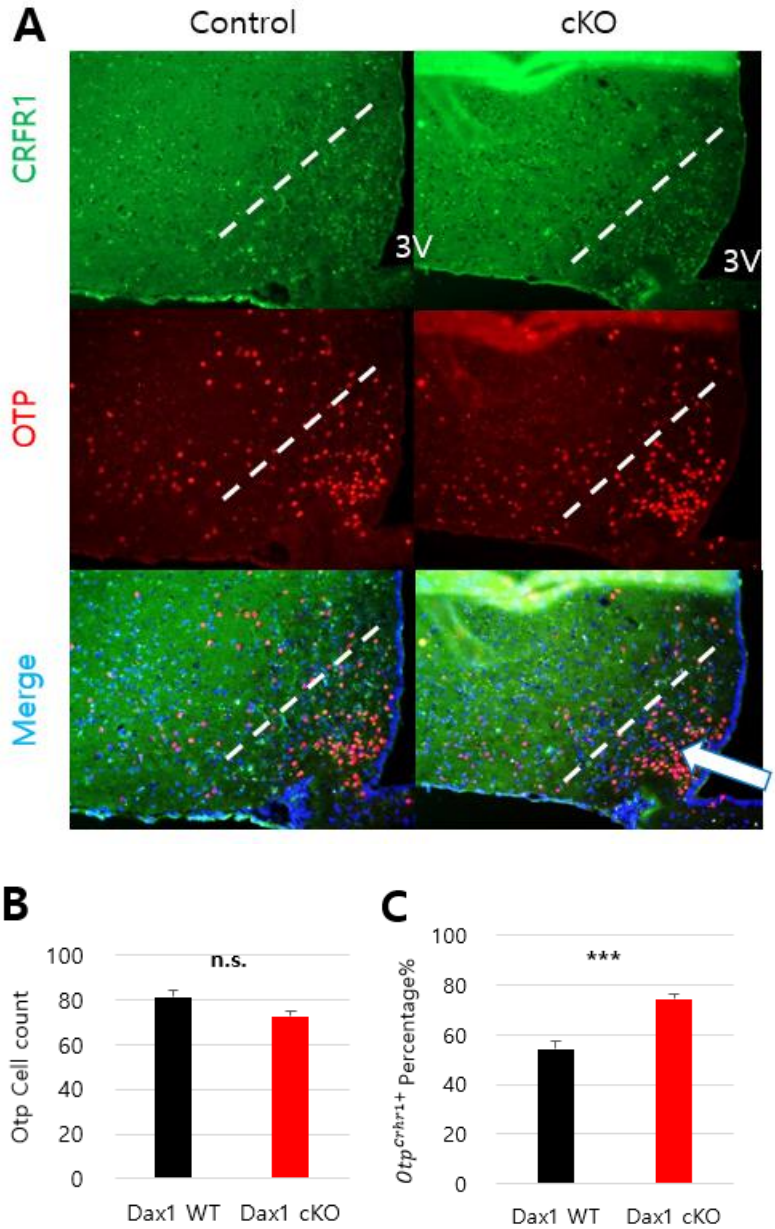


Figure 6. Deletion of Dax1 in Hypothalamus ARC shows elevated hypothalamic expression of AgRP^{CRFR1+}

(A).IF analysis of CRFR1 and Otp in Control and Dax1 cKO mice hypothalamus. (B), (C). Cell counting result of Otp and Otp^{CRFR1+}

percentage in Otp cell population, respectively. Control(n=4), Dax1 cKO(n=4). *P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ***P< 0.0001

7. 렙틴 호르몬에 의한 AgRP 신경세포 자극 촉진

시상하부 궁상핵 내의 AgRP 신경세포는 체내에서 분비되는 다양한 호르몬들에 의해 자극된다. 지방세포에서 유래된 렙틴(Leptin) 호르몬은 AgRP 신경세포의 렙틴 수용체에 결합해 활성화를 띄게 된다. 렙틴 호르몬 자극에 의해 활성화된 AgRP 신경세포는 에너지 축적을 목표로 음식물 섭취를 증가하는 식욕증진(Orexigenic) 현상을 나타냄과 동시에, PVN으로 뻗은 신경섬유를 통해 교감신경계 활성을 낮춰 전체적인 에너지 소비율과 체온을 낮추는 현상을 초래한다(*37*). 앞서 언급된 실험내용을 바탕으로, Dax1이 시상하부에서 cKO되었을 때 나타나는 높은 체온과 궁상핵 $AgRP^{CRFR1+}$ 신경세포 발현양의 증가는 교감신경계 활성의 촉진에서 유래되었다는 점을 확인하였다. 이와 같은 교감신경계 활성의 촉진이 AgRP 신경세포 자극의 변화에서 유래되었음을 확인하고자 다음과 같이 실험하였다.

생쥐의 음식물 섭취를 24시간 동안 제한시킨 뒤, 렙틴 호르몬(3mg/kg)을 각각 생쥐에 복강 주사(intraperitoneal injection, I.P)로 주입하였다. 복강 주사 주입 1시간 후 생쥐 뇌 조직은 심장 관류를 통해 고정시켜 분석하였다(Figure 7A). 렙틴 호르몬에 의한 AgRP 신경세포 활성화를 확인하기 위해, 신경세포 활성 지표인 cFos를 AgRP 신경세포 전사인자 OTP와 함께 면역형광염색을 진행하였다. 이전 실험결과와 동일하게 OTP 발현양은 두 그룹간 유의미한 차이가 나타나지 않았지만(Figure 7B, D), cFos가 함께 발현되는 OTP 발현양이 Dax1-cKO 생쥐 궁상핵에서 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 7B,E).

따라서, Dax1이 시상하부에서 cKO 될 경우, 렙틴 호르몬에 의한 AgRP 활성화가 감소되어 에너지 소비량이 높아진다는 것을 확인하였다. 이를 통해 교감신경계 활성이 촉진되어 전체적인 에너지 소비율과 체온이 상승되는 것을 확인하였다.

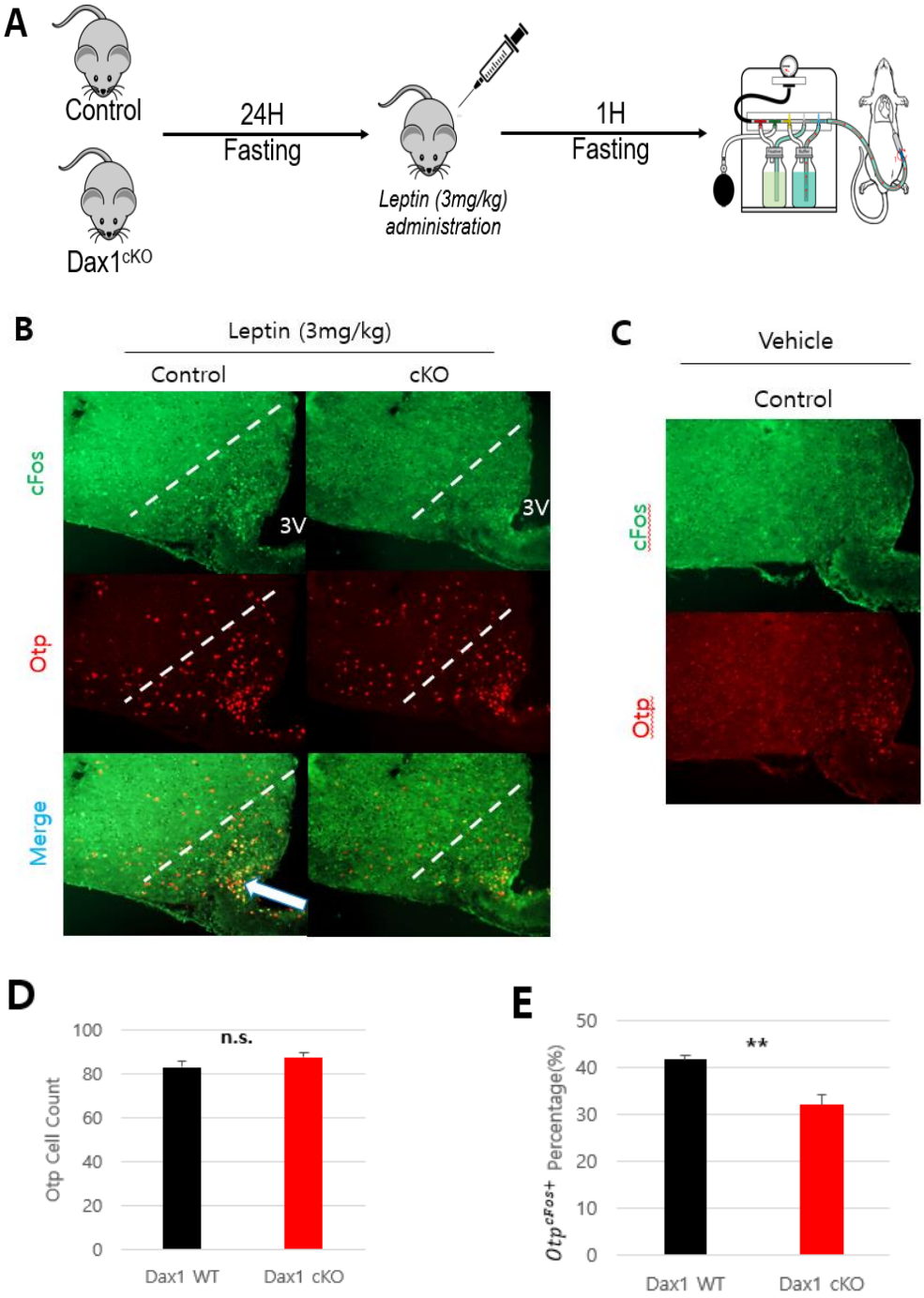

A
Control
Dax1cKO
24H
Fasting
Leptin (3mg/kg)
administration
1H
Fasting
B
Leptin (3mg/kg)
Control
cKO
cFos
Otp
Merge
3V
3V
C
Vehicle
Control
cFos
Otp
D
n.s.
Otp Cell Count
100
80
60
40
20
0
Dax1 WT
Dax1 cKO
E
**
Otp cFos+ Percentage(%)
50
40
30
20
10
0
Dax1 WT
Dax1 cKO

Figure 7. Leptin-induced AgRP neuron activation is repressed in Dax1 cKO mice hypothalamus

(A). Schematic representation of Leptin administration plan. (B), (C). Immunofluorescence staining (cFos, OTP) analysis of (B)Leptin(3mg/kg) injected Control and Dax1 cKO mice hypothalamus, and (C)Vehicle injected Control mice hypothalamus. respectively. (D), (E). Cell counting result of OTP and Otp^{cFos+} percentage in Otp cell population, respectively. Control(n=3), Dax1 cKO(n=3). *P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ***P< 0.0001

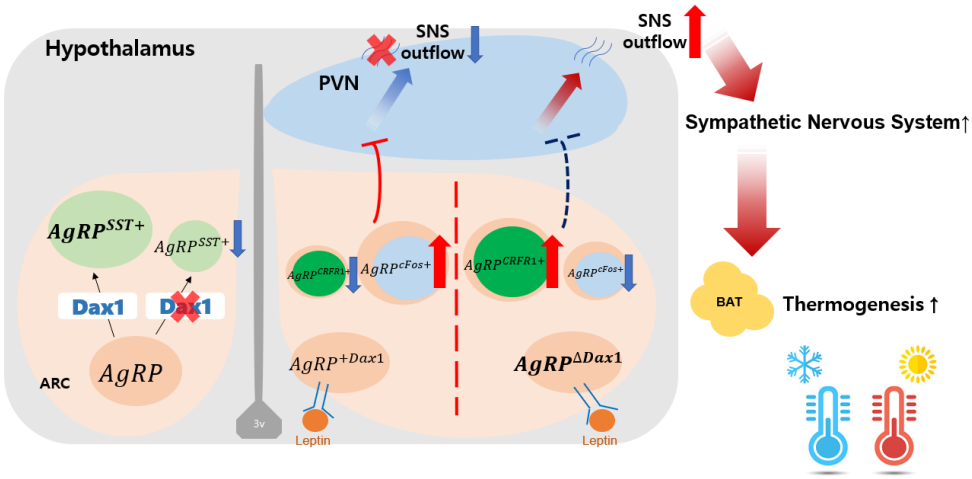


Figure 8. Working model of the role of Dax1 in mice hypothalamus

Ablation of Dax1 in mice hypothalamus decreases AgRP^{SST+} neuronal subtype population. Changes in Leptin-induced AgRP stimulation in Dax1-cKO mice result in elevated thermogenesis level.

IV. 고찰

1. 실험 결과에 대한 고찰

Dax1은 전사인자로써 시상하부-뇌하수체-부신-생식샘 축 형성에 중요한 역할을 한다(*4*). Orphan receptor로 알려진 Dax1은 다른 단백질과 heterodimer를 형성해 repressor로 작용한다고 알려져 있으며, 뇌하수체, 부신, 생식샘 등 다양한 전사인자들과 상호작용하는 것으로 알려져 있다(*2*). 뇌하수체와 생식샘에서 발현되는 Dax1에 의해 DSS(Dosage sensitive Sex-reversal) 현상이 일어나며, Dax1에 결여는 수컷 생식샘과 정소의 형태 변화를 일으킴과 동시에 난소 형성을 유발하는 것으로 알려져 있다(*5, 6*). 하지만 Dax1이 중추신경계 발달과정 중 시상하부 궁상핵의 신경세포 활성을 조절하는 전사인자로써 어떠한 역할을 하는지에 대해서 아직까지 알려진 바 없다. 최근 생쥐 시상하부 신경세포를 타겟으로 한 Transcriptome분석(*21*)과 scRNA-seq분석(*20*) 결과를 통해 Dax1이 AgRP 신경세포의 분화과정에 밀접하게 연관되어 있다는 점을 확인하였다. 이와 같은 연구들을 바탕으로 Dax1이 AgRP 신경세포 분화과정에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 밝히고자 하였다. 더 나아가 시상하부 궁상핵 특이적으로 Dax1이 결여되었을 때 나타나는 신경세포 활성의 변화와 그에 따른 표현형의 변화를 기반으로 에너지 소비에 중요한 역할을 하는

시상하부 내의 Dax1의 기능을 밝히고자 연구를 진행하였다.

실험결과, Nk2.1-cre 유전자에 의해 Dax1이 cKO 되면(Figure 1) 시상하부 궁상핵 신경세포들 중 소마토스타틴(SST) 신경세포의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 그 밖에 내분비계 장기형성과 성 호르몬 분비를 조절하는 GnRH 신경세포를 표적 하는 Kisspeptin 1 신경세포와 POMC 신경세포 발현에도 유의미한 차이가 나타나지 않음을 확인하였다. 그 밖에, AgRP 신경세포의 발현에는 큰 차이가 나타나지 않았다. 하지만 예상한대로, AgRP 신경세포 하위 유형 중 하나인 $AgRP^{SST+}$ 신경세포 아형의 발현이 Dax1-cKO 생쥐 시상하부 궁상핵에서 유의미한 감소율을 보이는 것을 확인하였다(Figure 2). 이를 통해 Dax1은 AgRP 신경세포 분화과정에 전사인자로 관여한다는 점을 확인할 수 있었다. 시상하부 궁상핵에서 AgRP 신경세포는 섭식작용과 에너지 소비의 항상성을 조절하는 신경전달물질을 분비하는 세포로 알려져 있다. 따라서, Dax1의 전사인자 활성으로 의한 분화과정의 변화가 섭식작용과 에너지 소비에 어떠한 변화를 일으키는지 확인하고자 하였다. 우선 섭식작용에 미치는 영향을 확인하고자 12주간 고지방식이를 진행하며 그에 따른 음식물 섭취량의 변화, 생쥐 몸무게의 변화, 그리고 간과 지방 조직 무게의 변화를 측정하였다(Figure 3). 그 결과 Dax1-cKO 생쥐와 대조군 생쥐의 음식물 섭취, 몸무게, 그리고 간과 지방세포 등 조직 무게의 변화에는 유의미한 변화가 나타나지 않는 것을 확인하였다. 그 다음으로 섭취한 음식물을 이용한 에너지 소비에

변화를 간접적으로 확인하고자 Glucose Tolerance Test와 Insulin Tolerance Test를 진행하였다. GTT 실험 결과, Dax1-cKO 생쥐의 혈당 포도당 분해능이 개선되는 것을 확인하였고, 이를 통해 시상하부에서 Dax1의 결여는 에너지 소비율에 변화를 야기한다는 점을 확인하였다. 에너지 소비의 변화를 직접적으로 확인하기 위해, 음식물 섭취 여부와 저온 환경 등, 다양한 환경에서 두 그룹의 생쥐에 체온 변화를 측정하였다(Figure 4). 측정결과, Dax1-cKO 생쥐의 체온이 음식물 섭취가 자유로울 때 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 하지만 음식물 섭취가 제한되었을 때, 기존에 나타났던 체온의 차이가 살아지는 것을 확인하였다. 음식물 섭취가 다시 자유로울 때 체온 차이의 변화가 다시 나타나는 것을 확인하였다. 더 나아가 저온 환경에 노출되었을 때도, 저온 내성이 더욱 개선되는 것을 확인하였다. 이를 통해 Dax1 이 시상하부 궁상핵에서 결여되었을 때, 에너지원 유무에 따른 에너지 소비량의 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이 같은 에너지 소비량의 증가가 저온 환경에서도 체온 유지를 더욱 원활하게 할 수 있다는 점을 확인하였으며, 저온 환경에 대한 내성이 개선되는 것을 확인하였다. Dax1-cKO 생쥐의 높은 체온에 기여하는 조직을 histological하게 분석하기 위해, 포유류 체온조절에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려진 갈색지방세포와 서혜부 백색지방세포의 미토콘드리아 활성과 열 발생을 조절하는 유전자의 발현양을 측정하였다(Figure 5). 포유류 열 발생에 대표적으로 작용하는 미토콘드리아 기질 막단백질인 Ucp(*32-34*)의 발현양을

형광면역염색법과 qRT-PCR로 지방세포에서 측정한 결과, Dax1-cKO 생쥐에서 증가한다는 점을 확인하였다. 또한 시상하부와 지방세포 미토콘드리아 활성을 조절하는 교감신경계 TH 섬유(*35*)가 Dax1-cKO 생쥐 갈색지방세포에 더 많이 존재한다는 것을 형광면역염색법을 통해 확인하였다. 따라서 시상하부에서 Dax1의 결여는 체내 에너지 소비량을 증가시키며, 갈색지방세포로 이어지는 교감신경계 섬유가 더 많이 존재한다는 점을 확인하였다. 결과적으로, 체온 조절에 변화가 나타나는 것을 확인하였다.

$AgRP^{SST+}$ 신경세포 분화과정에서 Dax1과 함께 전사 조절에 관여하는 CRFR1은 PVN에서 유래된 CRF를 리간드로 인식하여 활성화된다(*36*). 활성 된 CRFR1은 AgRP 신경세포의 활성을 감소시켜, PVN으로 전달되는 AgRP 신경세포에 의한 신경전달물질을 줄인다(*22*). 그 결과, 교감신경계 활성과 에너지 소비량이 증가한다고 알려져 있다. 실험결과, 시상하부에서 Dax1의 결여는 CRFR1의 발현양을 증가시킨다는 점을 확인하였다(Figure 6). 이를 통해 Dax1은 CRFR1의 활성을 감소시키는 현상 초래한 다는 점을 확인하였다. CRFR1의 존재 유무는 AgRP 신경세포의 활성에 변화를 야기한다는 선행 연구를 바탕으로 AgRP 신경세포의 활성을 초래하는 렙틴 호르몬을 대조군과 Dax1-cKO 생쥐에 주입하여 신경세포의 활성을 관찰하였다(Figure 7). 렙틴 호르몬에 의한 AgRP 신경세포의 활성이 Dax1의 발현양과 비례하게 Dax1-cKO 생쥐에서 감소하는 것을 확인하였다. 따라서

Dax1의 결여가 시상하부 AgRP 신경세포의 활성을 줄여, 전체적인 교감신경계의 활성과 에너지 소비량을 증가하는 역할을 한다는 점을 밝혔다. 실험결과를 정리하자면, Dax1은 AgRP 신경세포의 하위 유형 분화과정을 조절하는 전사인자임을 확인하였다. 또한 Dax1이 시상하부에서 결여된다면, AgRP 신경세포의 활성을 조절하여 교감신경계 활성을 높여, 체온 상승의 표현형을 일으킨다는 점을 확인하였다(Figure 8).

2. 추가 실험의 필요성에 대한 고찰

시상하부 궁상핵에 존재하는 다양한 신경세포들은 생물의 생명유지에 가장 중추적인 체내 항상성 유지를 조절하는 역할을 한다(*12, 13, 30, 38*). 하지만 이러한 신경세포들의 분화과정에 대한 기전이나, 관련된 전사인자들의 유무와 기능에 대한 연구가 부족한 상황이다. 본 연구는 앞서 말한 신경세포 분화과정에 관여하는 전사인자인 Dax1이 어떠한 기능을 수행하는지 밝혀내는데 의미가 있다. 또한 Dax1이 전사인자로써 시상하부 궁상핵 내 다른 신경세포나 전사인자에 어떠한 변화를 나타내며, 그에 따른 표현형을 확인함을 통해 체내 항상성 유지에 Dax1이 미치는 영향에 대해 밝혀내는데 의미가 있다. 하지만 전사인자로써 신경세포 활성을 조절하는 기전과 상호작용하는 전사인자를 밝히는 연구가 부족한 상황이다. 이를 보완하기 위해서는 추가적인 실험들이 필요하다.

먼저 AgRP 신경세포 분화과정에 Dax1이 특이적으로 관여하는지 추가적인 실험이 필요한 상황이다. 본 연구에 사용된 Dax1-cKO 생쥐는 시상하부 조직 특이적으로 발현되는 Nkx2.1-cre 유전자를 이용해 Dax1의 발현을 선택적으로 제거하여 진행하였다. Dax1이 시상하부 내 다른 어떠한 신경세포에 어떠한 영향도 주지 않는 상태에서 AgRP 신경세포 분화과정에 영향을 주는지 확인하기 위해, AgRP 신경세포 특이적으로 발현되는 AgRP-IRES-cre 유전자(*39, 40*)를

이용해 Dax1 발현을 AgRP 신경세포에서만 억제시킨 생쥐를 이용한 연구가 필요성이 있다. 시상하부 내 신경세포들은 독단적으로 활성을 나타내지 않고, 서로 상호작용하는 네트워크를 형성하여 체내 항상성 유지를 수행하고 있다. 본 연구를 통해 나타낸 AgRP 분화과정에 Dax1이 미치는 영향이 다른 신경세포에서 Dax1의 기능이 포함되어 나타나는지에 대한 추가적인 확인이 필요하다.

생쥐 시상하부의 Dax1 특이적 cKO에 의한 $AgRP^{SST+}$ 신경세포 아형의 발현 감소로 인해 분화과정에 영향을 주는 인자임을 확인하였다. 하지만 Dax1 단백질이 전사인자로 어떠한 다른 인자와 상호작용하며, 어떠한 분자적 기전을 통해 이와 같은 분화과정을 야기하는지에 대한 연구가 부족한 상태이다. 기존 연구에 의하면 Dax1은 다른 전사인자와 heterodimer를 이루어 직접으로 repression을 시키거나, 다른 repressor를 recruit한다고 알려져 있다.(*2*) 이와 같은 연구를 바탕으로 다른 AgRP 신경세포의 하위 아형인 $AgRP^{Gm8773+}$ 신경세포 하위 유형 분화를 조절하는 인자들과 상호작용 여부 및 분자적 기전에 대한 연구를 진행할 필요성이 있다. 특히 $AgRP^{Gm8773+}$ 신경세포 하위 유형 전사에 특이적으로 발현되는 전사인자인 Jun과의 상호작용을 예상하고 있다(*21*). Dax1이 Jun을 포함한 다른 $AgRP^{Gm8773+}$ 신경세포 하위 유형에 관여하는 전사인자들과 결합하여 그 활성을 repression 시킨다는 가설을 바탕으로 연구를 진행한다면, AgRP 신경세포의 분화과정의 기전을 더 확실히 밝힐 수 있을 것이라고 생각한다.

본 연구를 통해 시상하부 궁상핵에서 Dax1의 결여는 AgRP 신경세포의 활성을 줄이며, 그로 인해 교감신경계의 활성을 향상시키는 표현형을 관찰하였다. 궁상핵 신경세포에 의한 교감신경계 활성의 변화는 시상하부 PVN와의 시냅스 형성에 변화에 의해서 나타난다. PVN 또한 궁상핵에서 유래된 GABAergic input에 의해 활성을 나타낸다.(*41*) 한가지 예로, AgRP 신경세포에 의한 음식물 섭취의 변화는 AgRP/NPY 신경전달물질이 PVN의 MC4R 수용체에 길항적 작용에 의해서 나타나는 것으로 밝혀졌다. 이처럼 시상하부 궁상핵의 Dax1 결여로 인한 $AgRP^{SST+}$ 신경세포 아형의 발현 감소가 PVN에 어떤 신경세포나 전사인자와 시냅스 형성의 변화를 야기하는지에 대한 연구가 부족하다. 시상하부에서 발현되는 AgRP 신경세포 뿐 만 아니라 SST을 발현하는 신경세포 모두 PVN의 신경세포와 시냅스를 형성하여 기능을 한다는 점은 선행 연구를 통해 밝혀졌다(*42*). 하지만 두 신경세포가 공통적으로 시냅스 상호작용을 하는 PVN 신경세포는 밝혀지지 않았으며, 특히 SST 신경세포에 의한 PVH 신경세포의 전사조절의 변화에 대해서는 더 추가적인 연구가 필요한 상황이다. 우선 AgRP와 SST 신경세포가 PVH에 공통적으로 영향을 주는 신경세포나 전사인자를 밝히는 동시에 $AgRP^{SST+}$ 신경세포 하위 유형이 PVN 신경세포와 시냅스 형성을 통한 상효작용 유무와 그에 따른 PVN 신경세포의 변화를 밝혀낼 필요가 있다.

V. 참고 문헌

1. N. KK, M. ER, DAX1 origin, function, and novel role. *Molecular genetics and metabolism* 86, (2005).
2. I. AK, M. ER, Molecular mechanisms of DAX1 action. *Molecular genetics and metabolism* 83, (2004).
3. S. T, K. M, Y. H, M. K, U. K, LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Molecular and cellular biology* 23, (2003).
4. E. P. Sablin *et al.*, The structure of corepressor Dax-1 bound to its target nuclear receptor LRH-1. (2008).
5. C. PA, D. C, S. Y, M. J, Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Molecular and cellular biology* 18, (1998).
6. B. GJ *et al.*, Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development (Cambridge, England)* 132, (2005).
7. I. Y, L. X, A. R, N. JH, P. KL, The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 9, (1995).
8. I. Y, S. WH, I. HA, P. KL, Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 8, (1994).
9. M. F *et al.*, Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372, (1994).
10. U. Boehm *et al.*, European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism—pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology* 11, 547-564 (2015).
11. Frontiers | Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Role in the Enteric Nervous System | Endocrinology. (2021).
12. S. MW, W. SC, P. D, S. RJ, B. DG, Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, (2000).
13. S. CB, L. BB, The hypothalamus. *Current biology : CB* 24, (2014).
14. M. B, Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitamins and hormones* 59, (2000).
15. W. SC, S. RJ, P. D, S. MW, Signals that regulate food intake

and energy homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* 280, (1998).
16. C. RD *et al.*, The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 Suppl 5, (2001).
17. P. M *et al.*, Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 23, (2009).
18. S. CJ *et al.*, Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27, (2003).
19. K. MJ *et al.*, An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature* 507, (2014).
20. C. Huisman *et al.*, Single cell transcriptome analysis of developing arcuate nucleus neurons uncovers their key developmental regulators. *Nature Communications* 10, 1-12 (2019).
21. J. N. Campbell *et al.*, A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci* 20, 484-496 (2017).
22. Y. Kuperman *et al.*, CRFR1 in AgRP Neurons Modulates Sympathetic Nervous System Activity to Adapt to Cold Stress and Fasting. *Cell Metab* 23, 1185-1199 (2016).
23. H. J *et al.*, A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, (2002).
24. B. BF *et al.*, Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, (2010).
25. X. Q, T. M, A. SA, Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *The Journal of comparative neurology* 506, (2008).
26. P. JK, M. ER, Mutations in NR0B1 (DAX1) and NR5A1 (SF1) responsible for adrenal hypoplasia congenita. *Human mutation* 18, (2001).
27. K. UB, K. W, KiSS-1 and GPR54 as new players in

gonadotropin regulation and puberty. *Endocrine* **26**, (2005).
28. Frontiers | The Role of Kiss1 Neurons As Integrators of Endocrine, Metabolic, and Environmental Factors in the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis | Endocrinology. (2021).
29. B. Lee *et al.*, Dlx1/2 and Otp coordinate the production of hypothalamic GHRH- and AgRP-neurons. *Nat Commun* **9**, 2026 (2018).
30. Z. W, C. MA, G. ER, Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism. *Nutrition & metabolism* **11**, (2014).
31. C. C, N. R, D. C, M.-G. G, L. M, Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Molecular and cellular endocrinology* **438**, (2016).
32. J. Liang *et al.*, Prdm16-Mediated Browning is Involved in Resistance to Diet-Induced and Monosodium Glutamate-Induced Obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes* **14**, 4351-4360 (2021).
33. L. Kazak *et al.*, UCP1 deficiency causes brown fat respiratory chain depletion and sensitizes mitochondria to calcium overload-induced dysfunction. (2017).
34. K. S, S. BM, S. P, Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell metabolism* **22**, (2015).
35. S. YC *et al.*, Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell metabolism* **17**, (2013).
36. A. K, Y. DA, S. H, S. N, B. GA, Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *The American journal of physiology* **255**, (1988).
37. v. d. W. E *et al.*, Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* **149**, (2008).
38. M. LL, C. KE, C. H, G. JL, Control of Energy Expenditure by AgRP Neurons of the Arcuate Nucleus: Neurocircuitry, Signaling Pathways, and Angiotensin. *Current hypertension reports* **20**, (2018).
39. J. D. Deem *et al.*, Cold-induced hyperphagia requires AgRP neuron activation in mice. (2020).
40. C. Blouet, S. M. Liu, Y. H. Jo, S. Chua, G. J. Schwartz, TXNIP in Agrp neurons regulates adiposity, energy expenditure, and central leptin sensitivity. *J Neurosci* **32**, 9870-9877 (2012).
41. C. RL, S. PE, Neurotransmitter regulation of cellular activation

and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, (2002).

42. M. MM, S. CB, Neuropeptide-immunoreactive neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 346, (1994).

Abstract

Role of Hypothalamic Dax1/NR0B1 in Regulating Mice Thermogenesis

Jooseon Cha
Department of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

The hypothalamus is an important organ in maintaining organism's homeostasis by regulating appetite, body temperature, reproduction and hormone sensitivity. Dosage sensitive sex-reversal (DSS) Adrenal hypoplasia congenita (AHC) critical region on chromosome X gene 1(Dax1), an orphan nuclear receptor, encoded by nuclear receptor superfamily 0 group B member 1(NR0B1) gene is known to play a role in determining sexual differentiation through hypothalamus-pituitary-adrenal-gonadal axis in mammal. However, the molecular mechanism of Dax1 expressed in hypothalamic neurons regulating body homeostasis has not been studied well. This study shows that Dax1 deletion specifically in hypothalamic arcuate nucleus (ARC) mice resulted in

elevated body temperature in both room temperature and cold temperature. We also found that Brown Adipose Tissue from Dax1 conditional knockout(cKO) mice exhibited fewer lipids and increased expression on canonical thermogenic genes, rendering these mice more resistant to cold exposure. On the other hand, lipogenesis in liver and adipose tissue is down-regulated. In summary, this study shows that Dax1 modulates thermogenesis and overall energy expenditure by possibly controlling neuronal innervation of adipose tissue depots through its action in the brain.

Keywords : Dax1, Thermogenesis, Hypothalamus, AgRP, Sympathetic Nervous System

Student Number : 2020-21676