

Positional Cloning of Mutated Gene in the Gracile Axonal Dystrophy (*gad*) Mice

한림대학교 의과대학 의학유전학교실

서 준 교

I. 서 론

질환의 원인이 되는 유전자의 단리법은 Figure 1에서 나타내는 바와 같이 원인유전자 산물(원인유전자에 의해 생산되는 단백질)에 관한 정보의 유무에 따라 크게 구분되어 진다. 원인유전자 산물에 관한 정보를 가지고 있다면 일반적으로 알려진 유전자 단리법 (functional cloning)을 이용한다. Functional cloning법은 원인유전자 산물을 정제하고, 그 아미노산 배열을 결정하여, 아미노산 배열에 상응하는 oligonucleotide를 합성하여, 이를 probe로 genomic DNA library 혹은 cDNA library에서 원인유전자를 단리하는 방법과 정제한 유전자 산물을 항원으로 항체를 만들어 cDNA expression library에서 유전자를 단리하는 방법이 유용하게 사용되고 있다. 그러나 후자의 방법은 항체 제작의 번거로움이 따른다.

원인유전자에 관한 정보가 전혀 없는 경우는 위에서 설명한 방법을 이용할 수 없었으므로 최근 까지 유전자 단리는 거의 불가능하였다. 그러나 분자유전학의 발달 및 유전체 계획 (genome project)의 눈부신 진전으로 원인유전자에 관한 정보가 전혀 없는 경우에도 유전자를 단리할 수 있는 방법이 몇 가지 확립되었다. 여기에는 positional cloning법, subtraction법, 동종항체를 이용한 질환 유전자 단리법 등이 있다. 본고에서는 이들 중 positional cloning법의 원리를 설명하고, 본인이 이

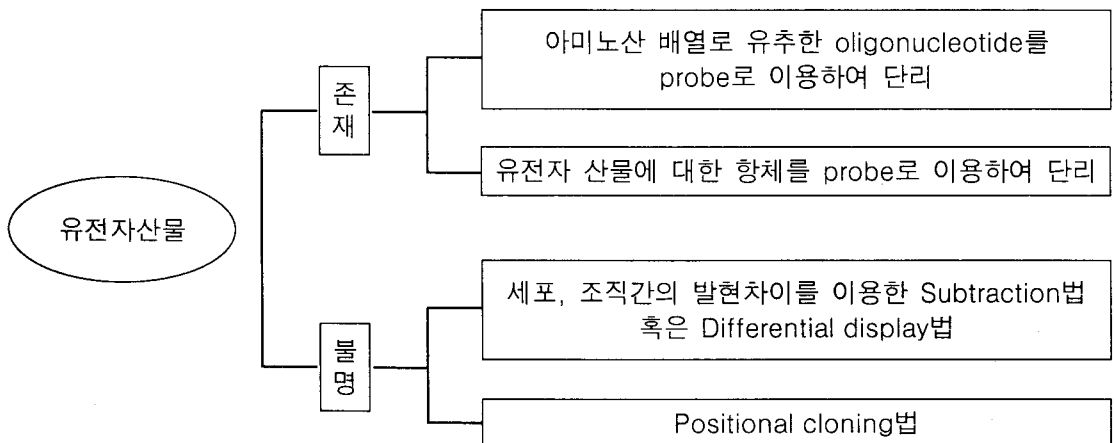


Figure 1. 유전자의 단리법

러한 방법을 이용하여 원인유전자를 단리한 *gracile axonal dystrophy* (GAD) 마우스를 예로 설명하고자 한다.

II. Positional cloning

1. 원리

Positional cloning법은 유전학적 방법을 이용하여 원인유전자의 위치를 결정한 후 염색체 *working*에 의해 원인유전자를 단리하는 방법이다. 이 방법은 유전체 계획의 일환으로 개발된 기술의 응용과 많은 양의 정보가 축적되면서 급속하게 보급되고 있다. 특히 Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 유전학적 *mapping* 기술이 발달하여 고해상도의 유전자 *mapping*이 용이하게 된 점과 효모 인공 염색체 (Yeast artificial chromosome) 및 박테리아 인공 염색체 (Bacteria artificial chromosome)의 개발이 positional cloning 발전에 많은 기여를 하고 있다.

Positional cloning법을 사용하여 원인유전자를 단리할 수 있는 질환은 다음과 같은 조건이 필요하다. 첫째 질환이 단일유전자에 의해 지배되어야 하고, 둘째 원인유전자의 위치가 어느 정도 알려져 있어야 한다. 셋째 원인유전자에 의한 표현형이 유전적 배경에 영향을 받지 않고 100%의 침투도를 나타내어야 한다. Positional cloning법은 단리하고자 하는 원인유전자 위치를 연관분석에 의해 염색체상 위치를 결정하고, 이러한 유전학적 위치를 근거로 *physical mapping*, 후보유전자의 탐색으로 이루어진다 (Figure 2). Positional cloning에 의해 단리되는 질환유전자의 수는 유전체 계획의 발달과 더불어 점점 증가하고 있으며 (Figure 3) 지금까지 이 방법에 의해 단리된 질환 원인유전자를 정리하여 보면 Table 1과 같다.

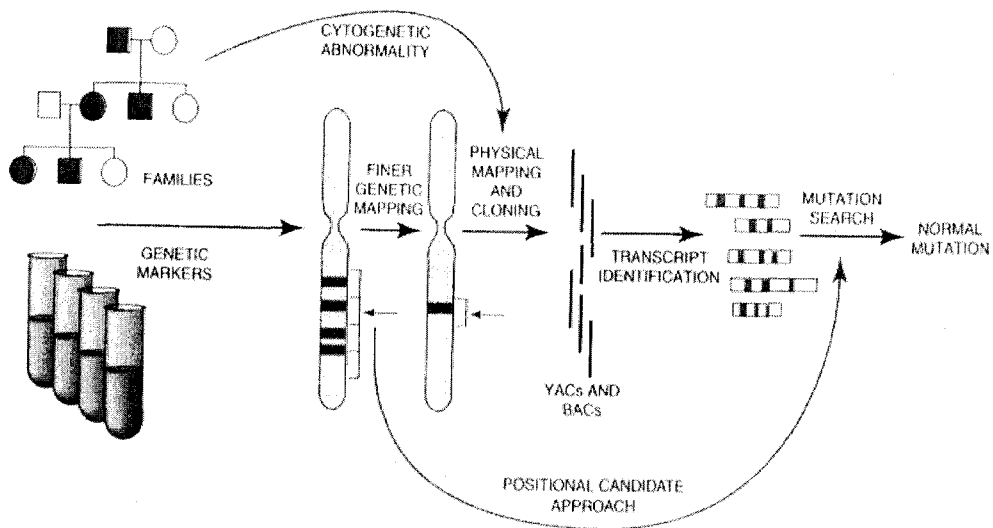


Figure 2. Positional cloning의 원리

2. 원인유전자의 유전학적 mapping

Positional cloning의 첫 단계는 원인유전자의 염색체 위치를 결정하는 것이다. 원인유전자의 염색체 위치를 결정하기 위해서는 역교배 panel을 만들고, 연관분석에 의해 단리하고자 하는 원인유전자 주위를 고해상도로 mapping하여, 염색체 working의 출발점이 되는 표지유전자를 결정한다. 역교배의 상대로는 최근 야생마우스로부터 근교계화된 *Mus spretus*, *Mus musculus molossinus*, *Mus musculus castaneus* 등을 주로 사용한다. 단리하고자 하는 원인유전자 주위에 이미 알려진 표지유전자가 있어도 역교배에 사용한 두 계통간에 차이(다형)가 없으면 mapping에는 사용할 수 없으나, 위에서 열거한 야생마우스는 다형 검출이 쉽고, 이용 가능한 DNA 표지유전자를 최대한 이용할 수가 있다. 하지만 야생마우스 유래 근교계 마우스는 번식이 어렵다는 단점도 있다. 질환을 가지고 있는 질환모델마우스는 일

반적으로 번식 가능한 기간이 짧아서, 야생마우스 유래 근교계 마우스를 역교배의 상대로 사용하는 것이 곤란할 때도 있다. *Mus spretus*를 역교배 상대로 사용할 경우 다형 검출은 가장 좋으나, F1의 수컷은 불임이 되므로 암컷에 대한 교차 빈도만을 구할 수 있다.

역교배를 이용하여 두 개의 계통간에 DNA 다형 검출에는 1) restriction fragment length polymorphism: RFLP, 2) single strand conformation polymorphism: SSCP, 3) simple sequence length polymorphism: SSLP, 4) restriction landmark genomic scanning: RLGS 등이 주로 사용된다. 이 중에서도 SSLP법은 microsatellite (핵산 CA 등의 단순 반복 배열)의 다형을 PCR로 간단하게 검출하는 것이 가능하므로 가장 많이 이용하고 있다. Microsatellite는 핵산 CA 등 2-3염기로 구성된 nucleotide 반복배열로 마우스 염색체 위에 매 10 Kb마다 1~2개씩 존재한다. 이러한 다형을 검출하는 microsatellite 표지유전자는 미국의 MIT genome center를 중심으로 개발하고 있으며, 현재 마우스의 표지유전자는 약 6,000개 정도 발표되어 있다.

Microsatellite 표지유전자의 급속한 발전은 역교배의 대상으로 근교계 마우스의 사용을 가능하게 하였다. 역교배 상대로 근교계 마우스의 사용은, 고해상도의 mapping을 하기 위해서는 많은 수의 N2마우스가 필요하다는 점을 감안하면 역교배 panel을 작성하는데 시간적으로도 유리하다. 고해상도 mapping에서 해상도는 분석하는 N2마우스의 숫자에 의해 결정되며, N2마우스의 수가 많으면 많을수록 physical mapping이 쉬워진다. Positional cloning을 수행하기 위해서는 최저 1,000마리의 N2마우스가 필요하다. 이 경우 mapping의 해상도는 0.1 cM 즉 평균하여 200 Kb가 된다(마우스의 전체 염색체 길이는 약 3,000 Mb이고, 유전학적 거리는 1,500 cM이므로 마우스의 1 cM은

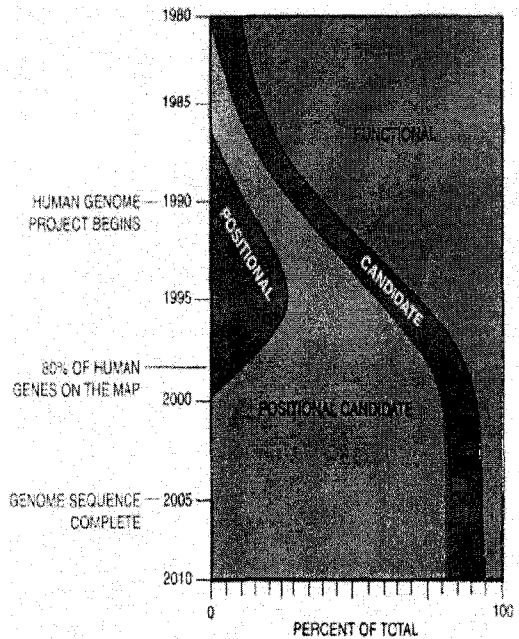


Figure 3. Positional cloning법의 사용 추세

Table 1. Positional cloning법에 의해 단리된 질환관련 유전자

Disease Genes Identified by Positional Cloning	
1986	
Chronic granulomatous disease	Dentatorubral pallidoluysian atrophy
Duchenne muscular dystrophy	Fragile X RES
Retinoblastoma	Achondroplasia
	Wiskott Aldrich syndrome
1989	Early onset breast/ovarian cancer (BRCA1)
Cystic fibrosis	Diastrophic dysplasia
	Aarskog-Scott syndrome
1990	Congenital adrenal hypoplasia
Wilms tumor	Emery-Dreifuss muscular dystrophy
Neurofibromatosis type 1	Machado-Joseph disease
Testis determining factor	
Choroideremia	1995
	Spinal Muscular atrophy
1991	Chondrodysplasia punctata
Fragile X syndrome	Limb-girdle muscular dystrophy
Familial polyposis coli	Ocular albinism
Kallmann syndrome	Ataxia telangiectasia
Aniridia	Alzheimer disease (chromosome 14)
1992	Alzheimer disease (chromosome 1)
Myotonic dystrophy	Hypophosphatemic rickets
Lowe syndrome	Hereditary multiple exostoses
Norrie syndrome	Bloom syndrome
	Early onset breast cancer (BRCA2)
1993	
Menkes disease	1996
X-linked agammaglobulinemia	Friedreich's ataxia
Glycerol kinase deficiency	Progressive myoclonic epilepsy
Adrenoleukodystrophy	Treacher Collins syndrome
Neurofibromatosis type 2	Long QT syndrome (chromosome 11)
Huntington disease	Barth syndrome
Von Hippel-Lindau disease	Simpson-Golabi-Behmel syndrome
Spinocerebellar ataxia 1	Werner syndrome
Lissencephaly	X-linked retinitis pigmentosa (PR3)
Wilson disease	Polycystic kidney disease, type 2
Tuberous sclerosis	Basal cell nervous syndrome
	X-linked myotubular myopathy
1994	Anhidrotic ectodermal dysplasia
McLeod syndrome	Hemochromatosis
Polycystic kidney disease, type 1	Chediak-Higashi. syndrome
	Rieger syndrome
	Maturity-onset diabetes of the young (chromosome 12)

평균하여 2 Mb에 상응한다).

3. 유전학적 고해상도 mapping에서 physical mapping

이 단계는 고해상도 연관분석의 결과를 이용하여 염색체 working의 출발점이 되는 표지유전자를 포함하는 yeast artificial chromosome (YAC) clone을 단리하여, 목적으로 하는 원인유전자를 포함하는 최소 영역을 결정하는 것이다. YAC은 효모의 인공 염색체를 cloning vector로서 이용하는 기술로 종래의 cosmid vector보다 훨씬 큰 insert를 cloning하는 것이 가능하다. YAC clone의 insert크기는 100 kb에서 1 Mb가 되는 것도 있다. 따라서 염색체 working을 하기 위해서는 목적의 원인유전자에서 1 cM 이내에 mapping되어 있는 표지유전자를 발견하는 것이 필요하다. YAC library의 screening에는 colony hybridization법과 PCR법이 일반적으로 이용된다. Colony hybridization법은 비교적 쉽게 대량의 clone을 screening하는 것이 가능하나 hybridization 기술의 특성에 의한 유사 clone을 단리하는 문제점 (false positive clone)이 있다. PCR법은 screening 과정이 다소 복잡하지만, 방법은 간단하고 비교적 정확한 결과를 얻을 수 있다.

각종 표지유전자를 이용하여 선택한 YAC clone이 marker 영역을 포함하는 것은 확실하나 각각의 YAC clone이 얼마만큼 DNA 영역을 가지고 있는지는 알 수가 없다. 원인유전자를 포함하는 완전한 physical mapping을 하기 위해서는 실제 염색체 위의 배열에 따라서 YAC clone을 나열할 필요가 있다 (YAC contig 작성). 질환유전자를 포함하는 최소 영역의 결정은 YAC clone에서 cosmid clone (Insert 크기 30~40 Kb) 혹은 phage clone (Insert 크기 15~20 Kb)의 sub-library를 작성하여 YAC clone의 insert 전체를 포함하는 contig를 제작하는 것이 필요하다.

4. 후보유전자의 탐색

이 단계는 목적으로 하는 원인유전자를 포함하는 최소 영역의 clone에서 원인유전자를 단리하는 것이다. 후보유전자 탐색에는 1) genomic DNA clone에서 probe를 만들어 northern, southern blot를 반복하여 유전자를 찾아 나가는 방법 (시간과 노력이 필요), 2) genomic DNA clone을 probe로 만들어 cDNA library를 screening하는 법, 3) exon-trapping법, 4) CpG island를 mapping하여 부근의 유전자를 찾아 나가는법, 5) 전체 cDNA을 genomic DNA clone에 hybridization하여 특이적으로 결합하는 cDNA를 cloning하는 법 등이 있다.

이러한 방법에 의해 단리된 후보유전자가 정상마우스에서 단리한 후보유전자와 다른 점이 있을 때 후보유전자는 질환을 일으키는 원인유전자일 가능성이 높아진다. 최종적으로는 transgene방법을 이용하여 질환마우스에 정상유전자를 도입하여 표현형이 개선되는지 혹은 gene targeting법으로 질환이 유발되는지를 확인해야 한다.

III. Positional cloning법을 이용한 GAD 마우스의 원인유전자 단리

1. GAD 마우스의 유래 및 임상 증상

GAD 마우스는 근교계인 CBA 및 RFM 마우스의 F2 세대에서 발견된 자연발증 돌연변이 마우스로 태어날 때는 정상이나 생후 약 30일부터 sensory ataxia가 일어나고, 생후 약 80일 전후하여 motor paresis가 일어난다 (Figure 4). 생후 80일이 되면 뒷다리의 발바닥이 하늘 방향으로 향하게

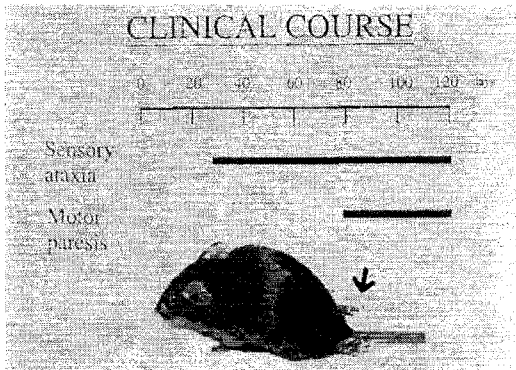


Figure 4. GAD 마우스의 임상 증상

되고 (drop feet), 이후 앞다리만을 이용하여 생활을 하다가 생후 5~6개월이 되면 죽게 된다. 발병한 개체에서 암, 수 모두 번식 능력은 있으나, 발병한 개체를 암컷으로 사용하는 경우에는 산자수가 감소하며, 출생 이후에도 새끼를 돌보는데 어려움이 많아 새끼의 폐사율도 높다.

2. GAD 마우스의 병리학적 관찰

육안적으로는 뇌, 척추, 말초신경 등 신경계 통에는 이상은 없다. 광학현미경으로 관찰한 결과 연수(숨뇌)의 박속핵 (*gracile nucleus*)과 척수내의 박속 (*gracile fasciculus*)에 현저한 변성이 보인다. 변성의 정도는 연수의 박속핵이 가장 심하고 경수, 흉수, 요수의 박속 순이다. 이러한 부위에는 유수신경섬유의 소실, 신경교세포 (*neuroglia*)의 증식 등이 관찰된다. 또한 신경축삭에는 팽대되어 있는 염주알 모양의 구조물 (*spheroids*)이 다수 관찰된다. 전자현미경으로 위에서 언급한 *spheroid*를 자세히 살펴보면 *neurofilament*, *mitochondria*, 변성된 막구조물 등으로 채워져 있다. 이러한 *spheroids*는 생후 30일령부터 연수 박속핵에 출현하여 병변이 진전되어 경수, 흉수, 요수의 박속에서도 관찰된다. 이 외에도 척수축삭 (*lateral funiculus*) 및 전삭에도 나타나고, 전삭보다는 축삭에서 고빈도로 관찰된다. 척수회백질에서는 요수의 후각 (*posterior horn*), 흉수의 중간대 (*intermediate zone*)에서 집중적으로 관찰된다. 소뇌 백질에도 *spheroids*가 관찰되며 주로 하소뇌각, 전엽의 제1-3소엽, 후엽의 제4소엽에서 많이 관찰된다. 이러한 분포는

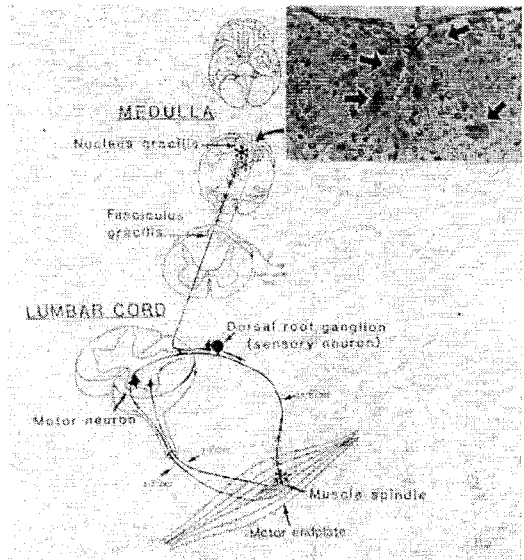


Figure 5. GAD 마우스의 병리학적 특징

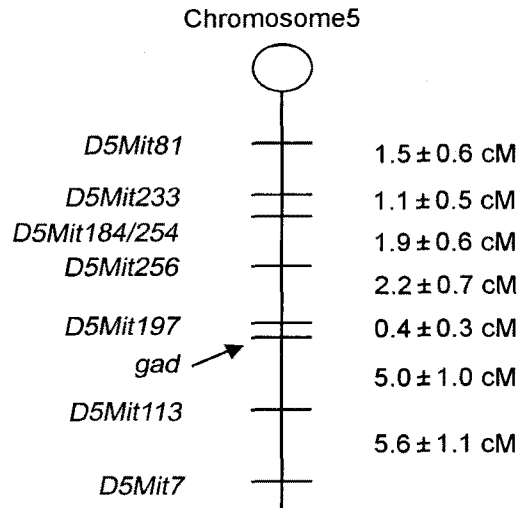


Figure 6. *Gad* 유전자의 고해상도 mapping

후척수소뇌로 (posterior spinocerebellar tract)와 거의 일치한다. 근방추를 지배하는 유수지각신경섬유는 생후 30일령부터 축삭의 위축, 나선구조의 소실을 보인다. 생후 60일령이 되면 신경-근육접합부에서 운동신경축삭은 위축, 탈락된다. GAD 마우스에서 축삭변성은 박속로를 구성하는 일차감각신경세포의 중추 및 말초의 말단부터 세포체로 향하는 dying back 현상을 보이는 것으로 관찰되었다 (Figure 5).

RT-PCR Analysis of *Uchl1* Transcripts

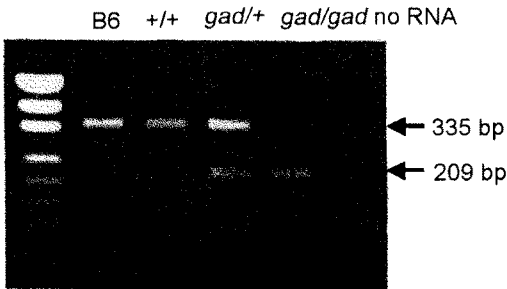


Figure 7. GAD 및 정상 마우스에서 *Uchl1* 유전자의 RT-PCR 결과

3. GAD 마우스의 유전 및 원인유전자의 단리

유전분석 결과 GAD 마우스의 원인유전자는 열성유전을 하며, 유전 형질을 좌우하는 유전자 수는 한 개이며, 상염색체에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 형질의 침투도는 발병 개체간

Human	MQLKPMEINP	EMLNKVLSRL	GVAGQWRFVD	VLGLEEESLG	SVPAPACALL	50
Rat	-----	-----AK-	-----A-	-----I--	---S-----	50
Mouse	-----	-----AK-	-----A-	-----T--	---S-----	50
Human	LLFPLTAQHE	NFRKKQIEEL	KGQEVSPKVY	FMKQTIGNSC	GTIGLIHAVA	100
Rat	-----	-----	-----	-----	-----M-----	100
Mouse	-----	-----	-----	-----	-----I-----	100
Human	NNQDKLEFED	GSVLKQFLSE	TEKMSPEDRA	KCFEKNEAIQ	AAHDAVAQEG	150
Rat	---N-G---	-----	---L-----	-----	---S-----	150
Mouse	---K-E---	-----	---L-----	-----	---S-----	150
Human	QCRVDDKVNF	HFILFNNVDG	HLYELDGRMP	FPVNHGASSE	DTLLKDAAKV	200
Rat	-----	-----	-----	-----	---S-Q-----	200
Mouse	-----	-----	-----	-----	-----	200
Human	CREFTEREQG	EVRFSAVALC	CAA			223
Rat	-----	-----	---			223
Mouse	-----	-----	---			223

Figure 8. GAD 및 정상 마우스에서 *Uchl1* 유전자의 RT-PCR 결과

의 교배에서 발병 개체만이 나타나는 것으로 미루어 보아 100%의 유전자 침투도를 나타냄으로서 위에서 언급한 positional cloning을 수행하기 위한 조건들을 만족하였다. GAD 마우스의 원인 유전자의 염색체상 위치 결정을 위해 제작한 intraspecific backcross panel은 C57BL/6J를 사용하였으며, microsatellite 표지유전자를 이용하여 고해상도 mapping을 수행한 결과, *gad* 유전자는 마우스 5번 염색체에 존재하며 *D5Mit197* 표지유전자 밀접한 연관이 있는 것으로 밝혀졌다 (Figure 6).

Gad 유전자를 단리하기 위한 염색체 working은 고해상도 mapping에서 가장 가까운 표지유전자로 밝혀진 *D5Mit197*을 이용하여 YAC library에서 screening을 수행하고, *D5Mit197*를 포함하는 YAC clone에서 YAC-end 배열을 이용하여 YAC clone 상호간의 위치를 결정하였다 (YAC contig의 제작). 이런 과정을 수행하던 중 *D5Mit197* 보다 *gad* 유전자에 가까운 표지유전자 *D5Mit100*을 발견하였고, 이를 이용하여 BAC library를 screening하여 274B15 및 281G17 BAC clone을 선발한 다음 BAC-end 배열을 이용하여 최종적으로 *gad* 유전자를 포함하고 있으리라고 예상되고 최소 영역을 지난 473N8, 538O24 BAC clone을 발견하였다. 이후는 exon trapping방법을 이용하여 473N8, 538O24 BAC clone에 포함되어 있는 exon을 subcloning하여 핵산배열 분석을 통하여 원인유전자를 찾았다. 약 50개의 exon 배열을 분석한 결과 ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozyme (*Uch-11*) 유전자의 이상이 GAD 마우스의 형질에 관계하는 것으로 밝혀졌다. 발병한 GAD 마우스에서는 *Uch-11* 유전자의 Exon 7-8을 포함하는 일부가 결실됨으로서 정상적인 *Uch-11*의 기능을 할 수 없는 것으로 밝혀졌다 (Figure 7-8).

IV. 결 론

사람의 난치병을 연구하는 입장에서는 흥미 있는 자연발증 돌연변이는 많다. 그 대부분은 임상 증상, 조직병리학적 해석, 유전양식, 유전자의 침투율, 유전자 위치 등이 알려져 있음에도 불구하고 원인유전자가 알려져 있지 않는 것이 대부분이다. 유전자 산물의 1차적 작용과 형질 발현사이에는 많은 단계가 있으며, 돌연변이의 원인이 되는 유전자 산물의 생화학적 혹은 생물학적 활성이 반드시 쉽게 알려지지는 않는다. 이러한 경우에 유용하게 이용되는 것이 positional cloning법이다. 이 방법은 많은 노력과 경제적인 투자를 필요로 하지만 사람과 마우스간에 존재하는 유전자 배열의 상동성 (synteny)을 이용하여, 마우스의 질환유전자에서 사람의 난치병 유전자의 탐색 및 질환 원인의 해석과 치료법의 개발에 큰 역할을 하고 있는 점을 감안하면 그 정도의 가치는 충분하다고 볼 수 있다. 예를 들면 Parkinson 병을 가진 독일 가계에서 *Uch-11* 유전자에 이상이 있다는 보고가 최근에 발표되었다. GAD 마우스도 *Uch-11* 유전자에 이상이 있으므로 이러한 가계에서 Parkinson병을 연구하는데 매우 유용한 질환모델동물이 되리라 사료된다.

V. 참 고 문 헌

1. Wang Y, Saigoh K, Osaka H, Yamanishi T, Suh J, Kiyosawa H, Sakai Y, Wakana S, Wada K. YAC/BAC-based physical and transcript mapping around the gracile axonal dystrophy (*gad*) locus identifies *Uchl1*, *Pmx2b*, *Atp3a2*, and *Hip2* genes. *Genomics* 2000; 66(3): 333-6.
2. Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S,

- Kikuchi T, Wada K. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in *gad* mice. *Nat Genet* 1999; 23(1): 47-51.
3. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395(6701): 451-2.
 4. Suh JG, Yamanishi T, Matsui K, Tanaka K, Wada K. Mapping of the gracile axonal dystrophy (*gad*) gene to a region between *D5Mit197* and *D5Mit113* on proximal mouse chromosome 5. *Genomics* 1995; 27(3): 549-51.
 5. Ichihara N, Wu J, Chui DH, Yamazaki K, Wakabayashi T, Kikuchi T. Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of amyloid beta-protein in ascending gracile tract of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. *Brain Res* 1995; 695(2): 173-8.
 6. Chandran AP, Oda K, Shibasaki H, Kikuchi T, Pisharodi M. Stimulus induced repetitive muscle potentials in the gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 1995; 35(4): 225-30.
 7. Suh JG, Yamazaki A, Tomita T. Breeding of the *gad-mdx* mouse: influence of genetically induced denervation on dystrophic muscle fibers. *Lab Anim Sci* 1994; 44(1): 42-6.
 8. Matsui K, Furukawa S, Suh JG, Wada K. Developmental changes of nerve growth factor levels in the gracile axonal dystrophy mouse. *Neurosci Lett* 1994; 177(1-2): 116-8.
 9. Miura H, Oda K, Endo C, Yamazaki K, Shibasaki H, Kikuchi T. Progressive degeneration of motor nerve terminals in GAD mutant mouse with hereditary sensory axonopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993; 19(1): 41-51.
 10. Oda K, Yamazaki K, Miura H, Shibasaki H, Kikuchi T. Dying back type axonal degeneration of sensory nerve terminals in muscle spindles of the gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1992; 18(3): 265-81.
 11. Kikuchi T, Mukoyama M, Yamazaki K, Moriya H. Axonal degeneration of ascending sensory neurons in gracile axonal dystrophy mutant mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* 1990; 80(2): 145-51.
 12. Yamazaki K, Wakasugi N, Tomita T, Kikuchi T, Mukoyama M, Ando K. Gracile axonal dystrophy (GAD), a new neurological mutant in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187(2): 209-15.