Z-3

Functional Genomics의 새로운 동물모델로서의 제브라피쉬 (zebrafish)

김 철 희
충남대학교 생물학과

제브라피쉬 (zebrafish, *Danio rerio*)는 인도산의 열대담수어이며 성체가 3-4cm 정도로 송사리 (medaka, *Oryzias latipes*)와 비슷한 크기이나 실제는 잉어과 (Cyprinidae)에 속한다 (http://www-igbmc.u-strasbg.fr:82/). 일반 시중의 수족관에서 쉽게 접할 수 있으며 은빛 바탕에 줄무늬를 가지는 사육이 매우 쉬운 관상어이다. 최근 제브라피쉬가 생명과학분야 전반에 급속히 도입되고 있는 가장 큰 이유의 하나는 인간유전체사업 (human genome project)의 완성과 함께 필연적으로 뒤따르는 대량의 유전자 기능해석 (functional genomics)을 체계적으로 수행하기 위해서이다. 제브라피쉬는 '멸치도 뼈대있는 집안'이라는 우리 선조의 과학적인 선견지명에서 볼 수 있듯이 인간, 마우스와 함께 척추동물에 속한다. 유전체구성을 살펴보면 초파리는 1 copy의 유전자를 가지는 경우가 많은데, 척추동물은 유전자중복 (gene duplication)에 의하여 대체적으로 4 copy의 유전자를 가지며 진화과정에서 이들의 기능적 세분화가 이루어졌을 것으로 추정된다. 금년 중으로 완성될 것으로 보이는 zebrafish genome project (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/) 결과를 기다려보아야겠지만, 현재까지의 연구결과에 따르면 제브라피쉬는 인간과 거의 비슷한 수의 유전자를 가지고 있는 것으로 여겨지며 상당수의 유전자가 인간과 매우 높은 상동성을 보여주고 있다. 제브라피쉬는 25개의 염색체, 1700 Mb의 genome으로 이루어져 있으며, 생후 3개월이면 생식능력을 가지고 수명은 2년 정도로 마우스와 비슷하다. 하지만 계절에 상관없이 암컷이 1-2주에 한번 꼴로 200-300개의 알을 낳으므로 가정용어항에 수십마리의 제브라피쉬를 사육한다면 거의 매일 수정란을 이용할 수 있다. 그리고 발생이 빠르고 투명하기 때문에 하루만에 심장박동, 혈액순환, 신경계구조 등의 형성을 살아있는 동물 내에서 관찰할 수 있다. 이러한 장점은 초파리에서 수행되었던 대량의 돌연변이체작성 (saturation mutagenesis)을 시도하게 하였고 5,000 여종 이상의 다양한 돌연변이체가 분리되었다 (1). 이러한 세계적 제브라피쉬 연구사업은, 초파리에서 동일한 연구방법으로 1995년 노벨상을 수상했던 Max-Planck 연구소의 Christiane Nusslein-Volhard 교수에 의해 추진되었음은 그 중요성을 새삼 느끼게 한다. 인간이나 마우스에 매우 가까운 유전자구성을 보이면서도 초파리에서나 가능한 대량의 유전학적 연구를 할 수 있는 제브라피쉬는 유전자의 기능해석뿐만 아니라 암, 치매 등 인간질환의 직접적 동물모델로서 다양한 형태의 연구에 응용되어지고 있다.

제브라피쉬를 이용한 functional genomics에의 접근은 대량의 돌연변이체를 통한 새로운 질환관련유전자의 발굴, 대량의 발현시스템 (expression cloning)를 이용한 신규유전자의 기능해석, 빠른 발생배를 이용한 생체기능조절물질의 탐색 (chemical genomics) 등의 예가 있다.

1. 돌연변이체를 이용한 질환관련유전자의 발굴

제브라피쉬의 돌연변이유도는 수컷을 ENU (ethly nitrosourea) 처리하여 그 정자를 사용하게 되므로 대량의 돌연변이체를 쉽게 만들 수 있는데 어떠한 종류의 돌연변이를 선별할 것인가가 중요한 관건이라 할 수 있다. 이미 밝혀진 5,000 여종 이상의 돌연변이체는 대부분 상대적으로 연구가 쉬운 초기발생에 관계한 것이 많으나, 현재 진행되고 있는 돌연변이체분리는 장기형성을 비롯해 면역, 암, 비만, 치매 등 인간질환관련유전자의 발굴을 목적으로 하고 있다. 특히 2000년부터 새롭게 시작된 대대적인 돌연변이체작성사업 (Tubingen 2000 Screen)의 결과가 기대되나, 이미 새로운 수천종 이상의 돌연변이체를 분리하였고 혈관형성 (angiogenesis)에 관련한 돌연변이체만도 700여 종에 이른다는 정보이다 (http://www.artemis-pharmaceuticals.de/information.html). 이와는 별도로 미국 MIT를 중심으로는 retrovirus를 이용한 insertional muatgenesis도 진행중이며 현재까지 700종류 이상의 돌연변이가 분리되었다고 한다. ENU에 의한 돌연변이의 원인유전자 클로닝은 주로 positional cloning방법으로 접근하게 되는데 여기에는 크게 genetic mapping과 physical mapping이 필요하다. 현재까지 원인유전자의 위치를 1cM (600 kb) 이하로 좁힐 수 있는 유전자 마커 (SSLP markers)가 3,845개 이상 확보되어 있으며(http://zebrafish.mgh.harvard.edu/mapping/ssr_map_index.html), YAC, BAC, PAC, radiation hybrid panel 등의 개발과 95,326개의 zebrafish ESTs (http://zfish.wustl.edu/)에 대한 정보는 원인유전자의 클로닝에 소요되는 시간을 나날이 단축시키고 있다 (2).

1) Headless/Tcf3와 두뇌형성 (3)

동물신경계의 근간이 되는 두뇌형성에 관한 연구는 최근 수년간에 분자생물학적인 방법에 의해 주요유전자들이 하나둘 밝혀짐에 따라 많은 진전이 이루어지고 있다. 지금까지의 연구에 의하면 TGF-beta 신호전달, FGF 신호전달, Wnt 신호전달 등이 주요하게 작용하고 있다. headless는 발생초기에 두뇌의 형태형성에 이상이 있는 돌연변이로 분리되었으며 positional cloning의 결과 Wnt 신호전달의 최종조절인자인 Tcf3로 판명되었다. headless는 직접적으로 무뇌증의 연구모델로 이용될 수 있으며, 또한 상당수의 암이 Wnt 신호전달과 연관이 있기 때문에 간접적으로는 세포의 운명결정, 분화등의 연구에 이용될 수 있다. 구체적으로 headless는 두뇌형성에 있어서 하나의 organizer로 작용하는 midbrain-hindbrain boundary (MHB)의 영역의 결정에 관여하고 있으며 MHB는 진화상 척추동물이상에서만 존재하고 있다. 뒤에 언급하는 chemical genetics 부분과 관련하여, 초기발생에 리튬 (Li)을 처리하면 headless와 유사한 형태를 유발할 수 있는데 그 분자적 타겟이 같은 Wnt 신호전달의 GSK-3로 밝혀짐으로써 저분자화합물을 이용한 타겟유전자의 발굴에 대한 하나의 예가 되고 있다.

2) mindbomb과 신경세포운명결정

초파리에 있어서는 신경세포의 운명결정과 분화에 관여하는 분자적 메커니즘이 최근 많이 연구되고 있으나 척추동물에 있어서는 상대적으로 많은 어려움이 있다. 제브라피쉬의 신경계는 발생 9-10 시간째 neuronal stem cell에 해당하는 세포들이 검출되며 24시간째 기본적 신경계를 갖추며 상대

적으로 매우 단순한 신경계를 이루고 있으므로 척추동물의 신경계형성을 연구하기에 좋은 연구재료이다. mindbomb은 신경세포 (mind)가 폭발적 (bomb)으로 증가한 돌연변이로 신경세포의 운명에 관여하는 유전자에 이상이 있는 것으로 추정되어 왔으며 최근 원인유전자의 동정에 성공하였다 (미발표). mindbomb유전자는 Notch신호전달에 관여하는 새로운 유전자로 초파리, 생쥐, 및 인간의 유전자도 분리하게 되었다. Notch단백질을 직접적으로 활성화하는 presenilin유전자는 알쯔하이머의 원인유전자로 이미 잘 알려져 있고, 인간의 경우 notch3유전자가 가계성 혈관성치매인 CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)의 원인유전자로 밝혀짐에 따라 치매연구의 모델로서의 연구가 기대되고 있다 (4). 특히 mindbomb돌연변이가 신경계 외에도 혈관형성에도 이상이 있는 것으로 밝혀짐에 따라 그 연관성이 더욱 높아지고 있다 (5).

3) 심봉사 (simbongsa)

심봉사는 퇴행성뇌질환의 모델로 고려되고 있는 새로운 돌연변이체로서 발생 3일째부터 신경계가 특이적으로 퇴화하여 (neural cell apoptosis), 5-6일째가 되면 눈이 퇴화해 버린다. 아직 신경특이적 세포사 (apoptosis)외에는 기초연구도 진행되지 않은 상태이지만 향후 positional cloning으로 원인유전자를 밝히고 신경계 (눈)을 회복하겠다는 취지에서 심봉사라는 이름을 붙이게 되었다 (미발표).

이상과 같은 positional cloning방법을 이용한 원인유전자의 발굴은 1998년을 기점으로 가속도가 붙고 있으며 많은 새로운 유전자를 밝히기 시작하고 있다. 제브라피쉬의 현재상황이 20년전의 초파리에서의 large scale mutagenesis초기에 비교되는 시점이고, 현재 초파리의 유전학적 연구가 생명과학전반의 발전에 미치고 있는 영향을 본다면 향후 제브라피쉬 돌연변이체들에게서 얻게될 파급효과는 상상이 가리라 본다.

2. 제브라피쉬 수정란을 이용한 유전자의 발현 및 기능분석

제브라피쉬의 유전체 구성이 인간, 생쥐와 유사하다는 것은 유전자의 높은 상동성 외에도 실제 기능적 호환성을 들 수 있다. 일반적으로 포유동물세포의 유전자 발현에 이용되고 있는 CMV promoter가 zebrafish에서도 발현되며, 심지어 transgenic mice에 많이 이용되고 있는 마우스의 신경특이 neurofilament gene promoter (6), 혈관특이 tie-2 promoter 등이 제브라피쉬에서도 조직특이적 발현을 보이고 있다는 것이다. 이는 최근 인간, 마우스 등을 이용한 다양한 형태의 유전체연구에서 쏟아지고 있는 수많은 신규유전자에 대한 기능해석에 제브라피쉬가 곧바로 이용될 수 있음을 뜻한다. 작은 공간에서 제브라피쉬를 사육하며 매일 수백개의 수정란을 손쉽게 얻을 수 있고, 수정란이 0.7 mm 정도로 크기 때문에 간단한 기구를 이용한 유전자미세주입 (microinjection)이 가능하고, 발생속도가 매우 빠르기 때문에 하루만에 신규유전자의 기능을 유추할 수 있다는 장점이 있기 때문에 단기간에 대량의 유전자 기능해석이 진행될 수 있다. *dharma* (달마대사) 유전자는 cDNA library를 대상으로 한 대량의 유전자발현검색 (expression cloning)에 의해 분리된 새로운 homeobox 유전자로서 초기발생에서 중요한 역할을 하고 있다 (7).

3. 제브라피쉬 발생배를 이용한 생체기능조절물질의 탐색

동물의 발생은 다수의 유전자가 관여하는 여러가지 신호전달에 의해 매우 정교하게 진행되고 있다. 최근 수십만 종류의 저분자화합물을 합성하는 기술이 개발되었고, 이들 chemical library들로부터 생체기능조절물질을 스크리닝하여 신약개발의 토대로 삼으려는 노력들이 확산되고 있다. 특히 이러한 저분자화합물이 특이한 유전자산물의 기능을 조절할 수 있기 때문에 chemical genomics는 과거 어느 때보다도 신약개발에 매우 중요한 분야로 부각되고 있다. 제브라피쉬는 쉽게 대량의 동물개체를 얻을 수 있고, 발생이 빠르고 투명한 장점을 이용하여 생체기능조절물질의 스크리닝의 값싼 동물모델로 이용될 수 있다. 실제 96-well microplate의 한 well당 3마리의 동물을 넣어 저분자화합물을 처리한 후 그 효과를 연구하는 실험이 진행되고 있다 (8). 특히 살아있는 개체의 외부에서 쉽게 관찰할 수 있는 심장박동이나 혈관형성이 좋은 타겟이 되고 있다.

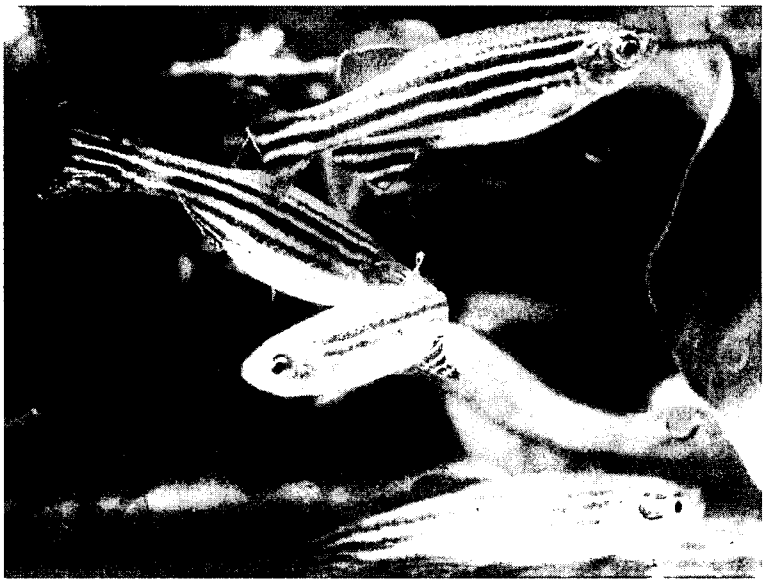
이상과 같이 제브라피쉬를 통한 새로운 질환관련유전자의 발굴, 유전자의 대량 기능연구, 새로운 생체기능조절물질의 탐색 등의 가능성에 대해 언급하였으나, 이 손쉬운 동물모델의 활용은 앞으로 더욱 더 다양하게 전개되리라 본다. 제브라피쉬 발생배는 작고 투명하기 때문에 whole-mount in situ hybridization법이 용이하다. 모든 반응이 E. tube내에서 가능하기 때문에 발현패턴에 따른 대량의 유전자 검색이 가능하다 (in situ hybridization screening, http://zf.nichd.nih.gov/pubzf/). 또한 투명한 발생배에 형광단백질 (GFP)를 이용한 형질전환동물의 연구가 가능하다. 살아있는 동물내에서 신경계나 혈관, 생식세포 (germ cells) 등의 조직형성을 실시간대에 관찰이 가능하다 (9). 또한 초파리에서 많이 이용되고 있는 GAL4-UAS system도 성공적으로 이용되고 있다 (10). 더욱이 heat shock promoter (hsp)-GFP를 이용하여 원하는 시간, 공간에 위치한 단 하나의 세포에서도 레이저나 빛를 쬐어 유전자발현을 유도할 수 있는 기술이 개발되었다 (11). 동물모델로서의 짧은 역사로 인하여 아직 embryonic stem cell (ES)이 개발되지 못하여 'knockout'은 할 수 없으나 대체의 방법으로 새로운 형태의 antisense oligo인 morpholino가 도입되어 'knockdown'실험이 성공적으로 진행되고 있다 (12). 이는 조만간 밝혀질 zebrafish genome project와 함께 대량의 유전자 기능해석에 효과적으로 이용되리라 보며, satuartion mutagenesis, expression cloning, chemical genetics와 함께 functional genomics의 주요한 수단이 될 것이며, 이를 바탕으로 한 인간유전체의 기능해석은 더욱 더 가속화 될 것이다.

참 고 문 헌

1. Haffter et al., The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio. Development. 1996 Dec;123:1-36.
2. Talbot WS, Hopkins N., Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. Genes Dev. 2000 Apr 1;14(7):755-62.
3. Kim CH, Oda T, Itoh M, Jiang D, Artinger KB, Chandrasekharappa SC, Driever W, Chitnis AB. Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature.*

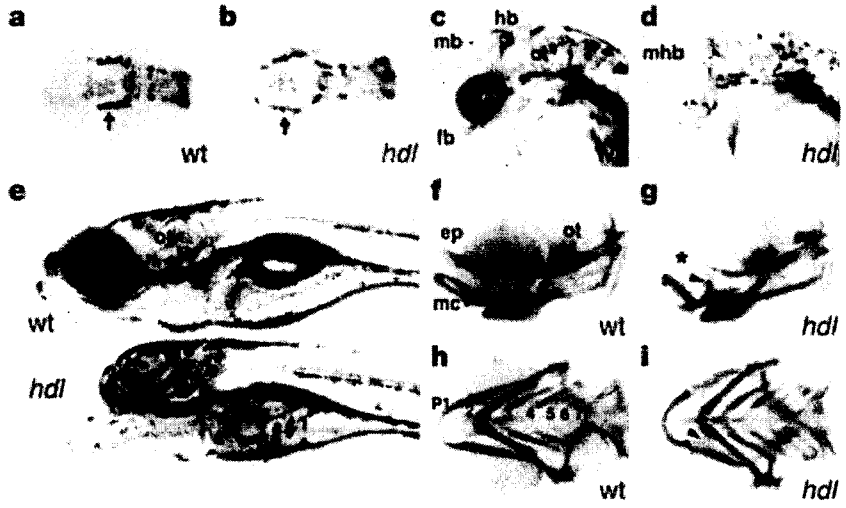
2000 Oct 19;407(6806):913-6.
4. Joutel A. et al., Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. Nature. 1996 Oct 24;383(6602):707-10.
5. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development.* 2001 Oct;128(19):3675-83.
6. Kim CH, Taira E, Kuo CH, Li BS, Okamoto H, Nakahira K, Ikenaka K, Higuchi H, Miki N. Neuron-specific expression of a chicken *gicerin* cDNA in transient transgenic zebrafish. *Neurochem Res.* 1996 Feb;21(2):231-7.
7. Yamanaka Y, Mizuno T, Sasai Y, Kishi M, Takeda H, Kim CH, Hibi M, Hirano T., A novel homeobox gene, *dharma*, can induce the organizer in a non-cell-autonomous manner. *Genes Dev.* 1998 Aug 1;12(15):2345-53.
8. Peterson RT. et al., Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 21;97(24):12965-9.
9. Park HC, Kim CH, Bae YK, Yeo SY, Kim SH, Hong SK, Shin J, Yoo KW, Hibi M, Hirano T, Miki N, Chitnis AB, Huh TL., Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):279-93.
10. Scheer et al., Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. Mech Dev. 1999 Feb;80(2):153-8.
11. Halloran et al., Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. Development. 2000 May;127(9):1953-60.
12. Heasman J., Morpholino oligos: making sense of antisense? Dev Biol., 243:209-14, 2002.

1. 제브라피쉬 (zebrafish, *Danio rerio*)



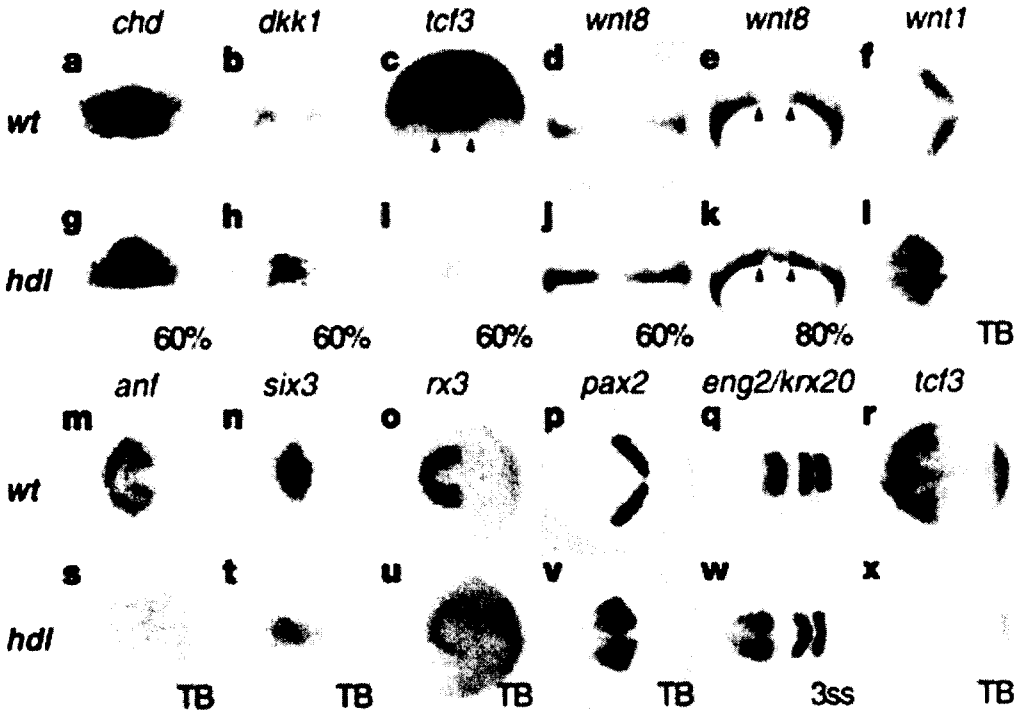
---

2. Morphological analysis of headless mutant.



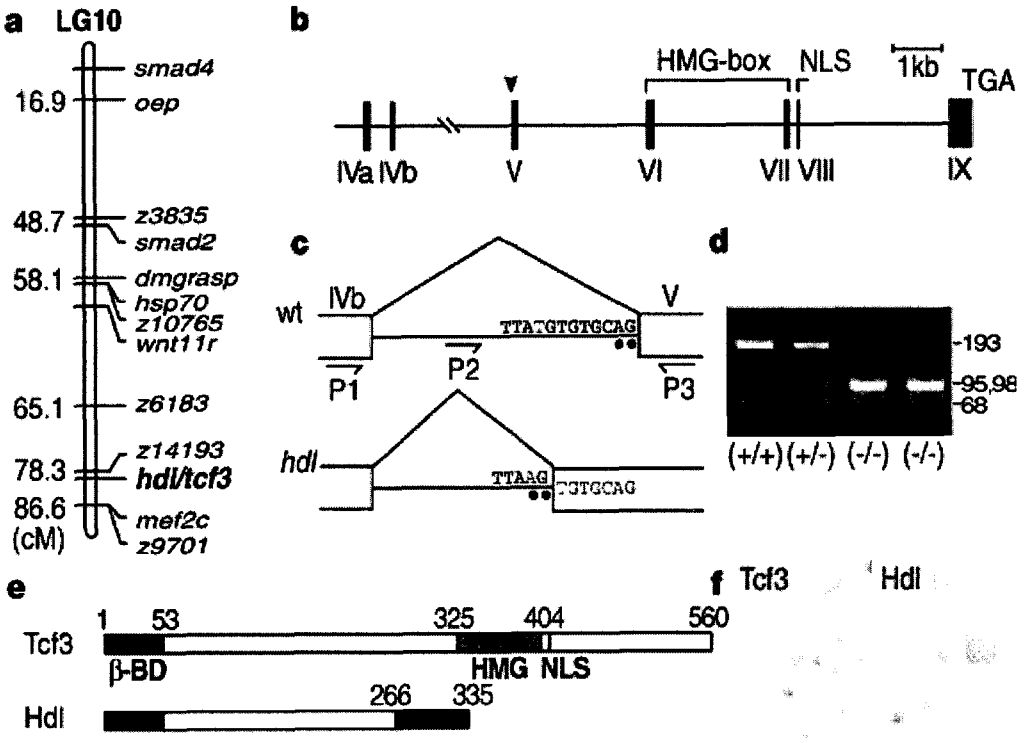
a, b, huC expression at the neural plate stage shows abnormal rostral extension of trigeminal neurons (arrow). Dorsal-anterior view. c, d, 34-hour embryos show complete loss of eye, forebrain (fb) and part of the midbrain in hdl. mb, midbrain; hb, hindbrain; mhb, midbrain?hindbrain boundary; ot, otic vesicle. e, hdl larvae at 8 days show a severe head defect. f-i, Skeletal preparations of day-5 larvae stained with Alcian blue. In mutants, the ethmoid plate (ep) is reduced (asterisk), whereas ventral pharyngeal arches (p1-p7), including Meckel's cartilage (mc), are less affected. Fused pterygoid process of the palatoquadrate (pq) in hdl (arrowhead).

3. Gene expression analyses.



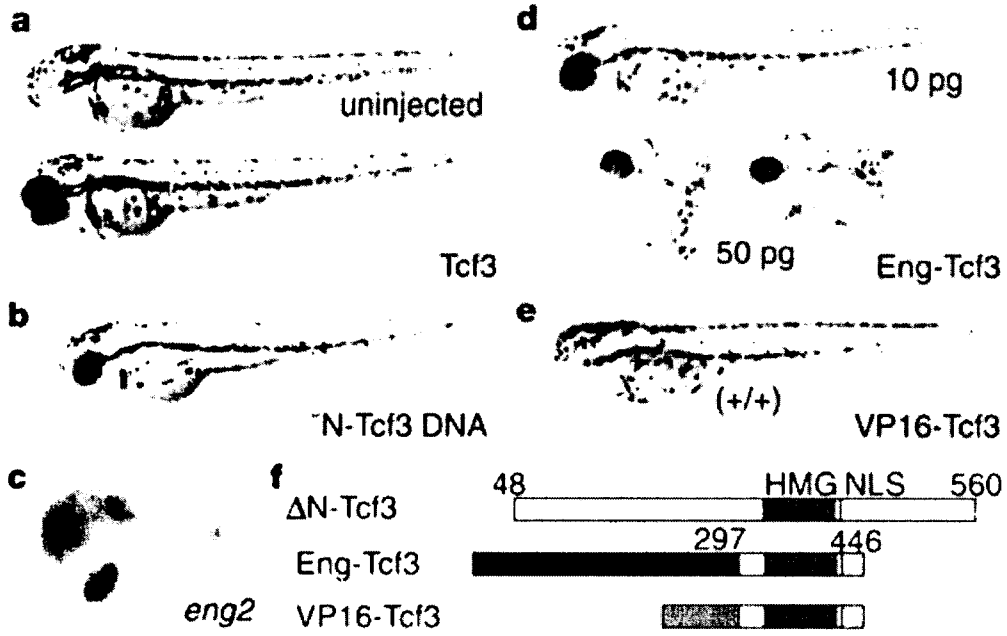
Animal pole is to the top for 60-80% epiboly embryos. Anterior is to the left for tail bud (TB) and 3-somite-stage embryos (3ss). a, g, chd is relatively unaffected in the organizer. b, h, increased dkk1 expression in hdl. c, i, Widespread tcf3 expression, excluded from the ventrolateral margin in the wild type and reduced in hdl. Arrowheads indicate the organizer region. d, e and j, k, wnt8 is excluded from the dorsal margin (arrowheads) in the wild type but not in hdl. f, l, Anterior expansion of wnt1 expression in hdl. m-o and s-u, Reduced expression of anterior neural markers in hdl. p, q and v, w, Anterior expansion of MHB markers. q, w, krox20 is relatively unaffected in hdl. r, x, Graded anterior neural plate tcf3 expression, reduced in hdl.

4. Mapping of the hdl/tcf3 gene.



a, Genetic map of linkage group 10 (LG10) showing position of hdl in relation to previously mapped genes and SSLP markers. b, Structure of the tcf3 gene. Arrowhead indicates the site of the hdl mutation. c, T-to-A transversion (green) produces an aberrant splice acceptor site (AG). The 7-bp insertion is indicated in red. d, Mse I digestion of the genomic PCR product (P2-P3), showing a polymorphism. e, Structure of Headless (Hdl). The truncated Hdl protein lacks the high mobility group (HMG) box DNA-binding motif as well as the nuclear localization signal (NLS). f, Subcellular localization of the wild-type Tcf3 and truncated Hdl proteins is changed from nuclear to cytoplasmic.

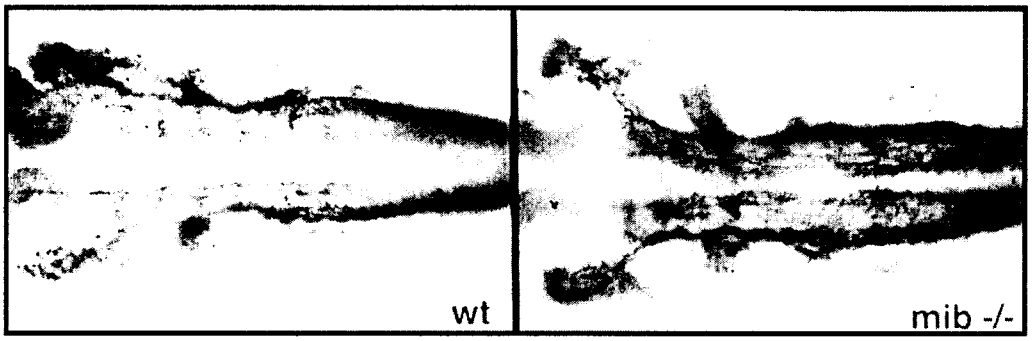
5. Rescue by Tcf3 expression.



a, Two-day-old hdl mutant injected with wild-type Tcf3 RNA (bottom). Top, uninjected control mutant. b, An hdl mutant injected with the N-Tcf3 plasmid DNA which is expressed after the MBT. c, N-Tcf3 suppresses expression of eng2. Blue X-gal staining shows the injected side of embryo. d, Rescue of hdl by Eng-Tcf3 RNA injection. Higher doses (>50 pg) cause trunk defects. e, Opposite effects of VP16-Tcf3 on head formation. A wild-type embryo injected with VP16-Tcf3 RNA, showing a headless phenotype. f, Structure of proteins used for injection experiments.

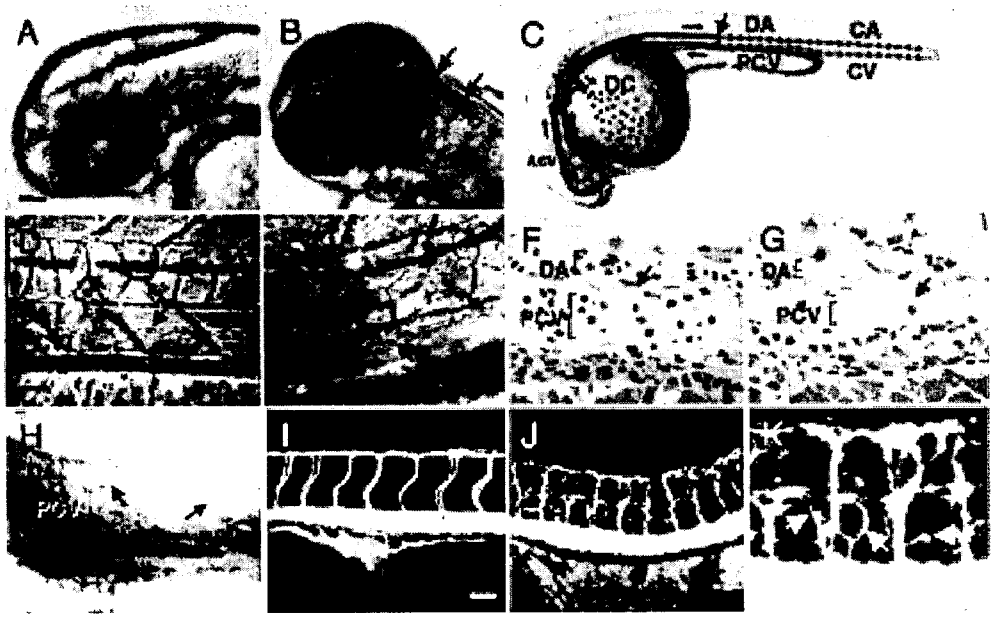
---

6. Neurogenic phenotype in mindbomb mutant



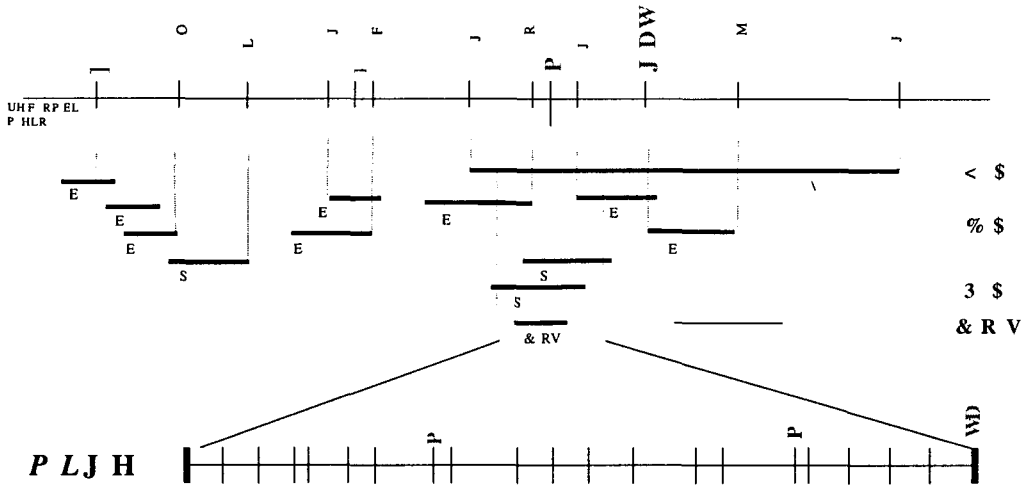
24시간째 제브라피쉬 발생배를 신경특이항체로 염색한 결과

7. Vascular defects in mindbomb embryos.

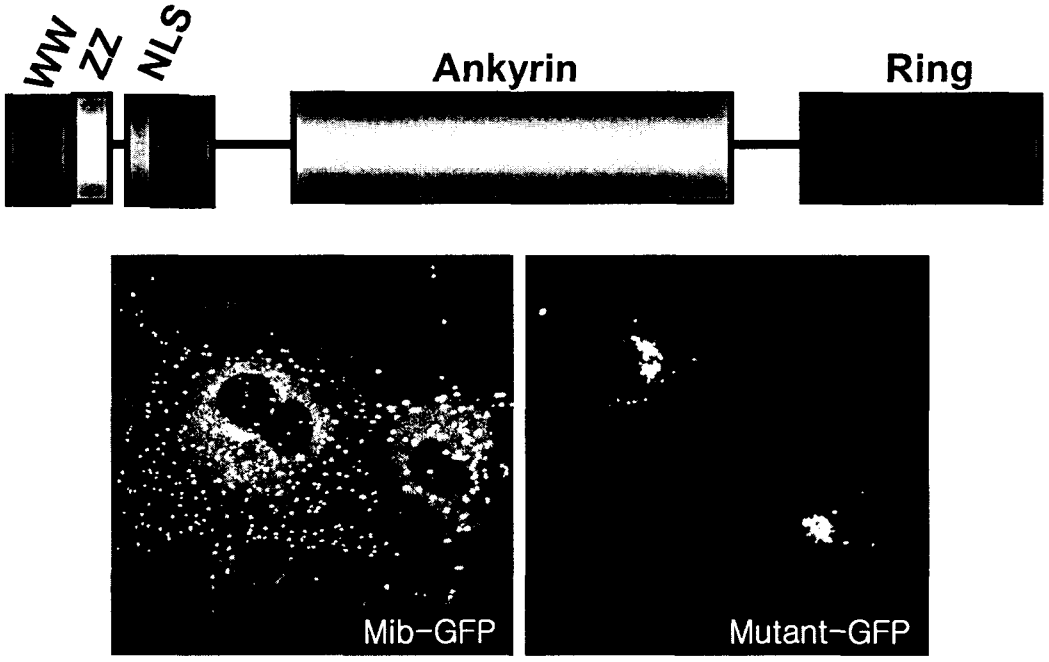


(A) Head of a wild-type sibling at 60 hpf. (B) Cranial hemorrhage in a mutant embryo at 60 hpf (black arrows). (C) Schematic drawing of the trunk circulatory loop in a zebrafish embryo. Red and blue are arterial and venous vessels respectively, with the direction of blood flow indicated. DIC image of the mid-trunk of a live wild-type (D) and mutant (E) displaying a shunt (black arrow) between the DA and PCV. Longitudinal histological section through the trunk of a wild-type (F) and mutant embryo (G). (H) DIC image of a mib embryo showing a disorganized boundary between the DA and PCV (arrows) and lack of a properly remodeled PCV. Confocal microangiogram of the trunk of a wild-type (I) and mutant (J) at 55 hpf. Disorganization of the normal intersomitic vessel structure is apparent. (K) Higher magnification confocal microangiogram of the trunk of the mutant in J. Ectopic sprouts from the main branches of the intersomitic vessels are visible (white arrows) penetrating the somite. DA, dorsal aorta; CA, caudal artery; ACV, anterior cardinal vein; PCV, posterior cardinal vein; CV, caudal vein.

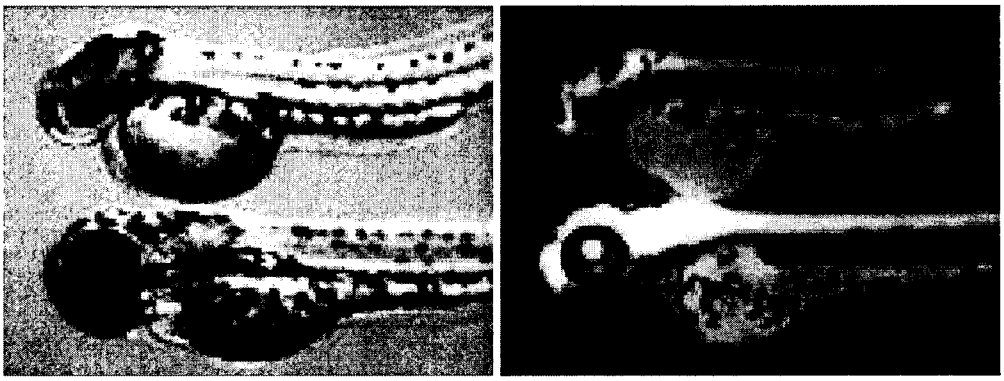
8. Positional cloning of mindbomb



9. Protein structure and subcellular localization of mindbomb



10. Neural specific apoptosis in simbongsa mutant



아래가 정상 대조군, 위 심봉사 돌연변이에서 눈의 심한 퇴화가 보여지고 있음; 오른쪽 그림은 왼쪽과 같은 embryo들이나 신경계가 GFP발현을 통해구분됨 (심봉사를 신경특이프로모터 (HuCP)-GFP transgenic line과 교배하였음)