

# 초파리 신경계특이적인 단일클론항체의 제작과 그 항원의 국재

윤 춘 식

생명공학연구소 분자세포생물학연구부

## Monoclonal Antibody Recognizing Nervous System Specific Protein of *Drosophila melanogaster*

Chun-Sik Yoon

Department of Molecular and Cell Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea

### Abstract

The nerve system specific protein of *Drosophila melanogaster* was produced by using heads of flies as the antigen. The monoclonal antibody 6H6 recognized the disabled molecules that a kind of tyrosine kinase substrate by expression cDNA library screening method. At the same time, the antibody also specifically recognized C-terminal region of disabled protein from 7427 to 8761bp by DNA sequencing. In early embryos, the localization of antigen appeared in the central nerve system. In adult flies, the antigen showed specific localization on the axon of optic nerve, cerebral nerve and thoracic nerve, and they also expressed on the muscular nerve. The molecules of disabled are expected to carry an important function in developing central nerve system. In adult flies, it is suggested that the disabled molecules have a role for muscular nerve as well as neural axon.

Key words : monoclonal antibody 6H6, disabled, tyrosine kinase substrate, axon

### 서 론

초파리는 무척추동물 가운데 가장 유용한 실험동물로 잘 알려져 있으며, 특히 유전학적 장점과 더불어 돌연변이체를 손쉽게 제작 할 수 있기 때문에 유전자의 기능을 연구하는데 많은 이점을 가지고 있다<sup>10</sup>. Protein tyrosine kinase의 기능에 대해서는 세포수준에서 많은 연구가 이루어졌으나<sup>7,11</sup> *in vivo*에서의 연구는 미비한 상태였다. 몇몇 연구에서는 초파리로부터 tyrosin kinase의 한종류인 *Abelson tyrosine*

*kinase(abl)*를 동정하게 되었고, 이 단백질은 배 발달과정에 있어서 중추신경계의 축색에 분포한다고 보고되었다<sup>5</sup>. 또한 tyrosin kinase substrate인 disabled가 동정되었고, 이 disabled 분자도 배 발달과정에서 중추신경계에 존재한다고 알려졌다<sup>9</sup>. 이 두 분자는 배 발달과정에서 중추신경계의 축색형성에 상호 밀접한 관계를 유지하고 있다는 것이 증명되었으며<sup>4,5</sup> *abl*과 disabled 분자는 초기배의 중추신경계에 관계하는 유전자인 *prospero*와 *failed axon connections (fax)* 분자와도 상호작용을 한다는 사실이 보고되었다<sup>6</sup>.

† Corresponding author

최근에 disabled분자는 시각계의 발달단계에서 sevenless receptor tyrosin kinase와 관계되면서 시세포의 형성에 관여한다는 사실도 밝혀졌다<sup>8)</sup>. 한편 단일항체를 이용하여 새로운 유전자를 탐색하고 그 항원분자의 국제와 기능을 밝히는 연구는 여러 방면에서 이루어지고 있으며 다양하게 이용되고 있다<sup>2,9)</sup>. 본 연구에서는 초파리의 신경계에 특이적으로 발현되는 유전자를 탐색하기 위해 단일클론항체를 제작하여 단백질 발현 cDNA library를 screen함으로써 그 항원을 동정하고 국제를 조사하였는데, 그 중 하나의 항체가 disabled 분자를 인식하는 결과를 얻어, 항원의 국제를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 초파리의 준비

正常 초파리(*Drosophila melanogaster*, C-S)의 成蟲과 胚가 실험에 사용되었으며 초파리는 일반적인 먹이를 공급하여 24~25°C에서 사육하였다.

### 2) 단일항체 제작

항원은 초파리의 頭部에서 큐티클을 제거한 나머지를 항원으로 3개월에 4번에 걸쳐 BALB/c mouse의 복부에 주사하였다. 한번 주사한 양은 두부 30~40개 정도에 해당하였다. 면역시킨 mouse의 비장세포와 Ag8.653 myeloma cells을 융합시켜 hybridomas를 만들고<sup>3)</sup>, 면역조직학적 screen을 하여 신경계특이적인 클론을 선택하고, limited dilution을 하여 단일클론항체를 만들었다.

### 3) 배의 whole-mount immunostain

산란 10~12시간된 배들을 그물에 모으고, 50% Sodium hypochloride 용액에 2분간 담구어 난의 漿膜을 분해시킨다. 고정은 4% paraformaldehyde와 heptane을 동량 혼합하여 병속에서 20분간 혼든다. 卵黃膜은 heptane과 methanol을 동량 혼합한 병속에서 강하게 흔들어서 제거한다. PBT 완충액으로 세척한 후에 5% skim milk로 block하고, 1차항체(MAb 6H6)를 bolcking 용액에 400배 희석하여 4°C에서 흔들면서 12시간 놓아 두었다. PBT 완충액으로 세척하고, biotinylated anti-mouse 2차항체를 100배 희석하여 실온에서 한시간 흔들면서 세척한 후에

ABC complex를 실온에서 한시간 배양한 후 DAB발색을 하였다.

### 4) 성충의 면역조직화학

초파리 머리와 몸통부분을 각각 분리하고 periodate-lysine-paraformaldehyde(PLP)용액에서 2시간 고정하고 PBS로 세척한 다음 4°C에서 10%와 20% sucrose 용액을 차례로 한시간씩 처리하고 30%용액에서 12시간 흔들면서 놓아두었다. 그리고 OCT compound에 포매하여, 10μm 두께로 동결절편하고 슬라이드글라스에 붙인후 건조시켰다. PBS에서 OCT compound를 제거한 후에 5% normal goat serum(NGS)으로 30분간 block한 다음 1차항체(MAb 6H6)를 5% NGS로 400배 희석하여 실온에서 한시간 배양하였다. 이것을 PBS로 세척한 후에, 2차항체는 HRP-conjugated anti-mouse 항체를 400배 희석하여 사용하였다. 발색은 DAB로 한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

### 5) λgt11 expression library screening과 DNA sequencing

하층 한천배지에 적당수의 plaque가 형성되도록 phage를 상층 한천배지와 함께 펼쳤다. 배양은 plaque가 형성되도록 37°C에서 3~4시간 하고, IPTG 용액에 적신 nitrocellulose 필터를 덮어 2-3시간 배양하여 발현된 단백질을 결합시켰다. 이 필터를 Tris-buffered saline(TBS)완충액으로 세척하고, 2% BSA 용액으로 block 한 다음 1차항체(MAb 6H6)로 처리하고, TBS-T로 세척한 후, phosphatase conjugated anti-mouse 2차항체를 처리하였다. 발색후 양성 plaque를 선택하고, 3차 screen까지하여 단일클론을 선택하였다. 그리고 pBluescrip vector에 subcloning하여 Pharmacia auto-sequencer로 sequence하였다.

## 결 과

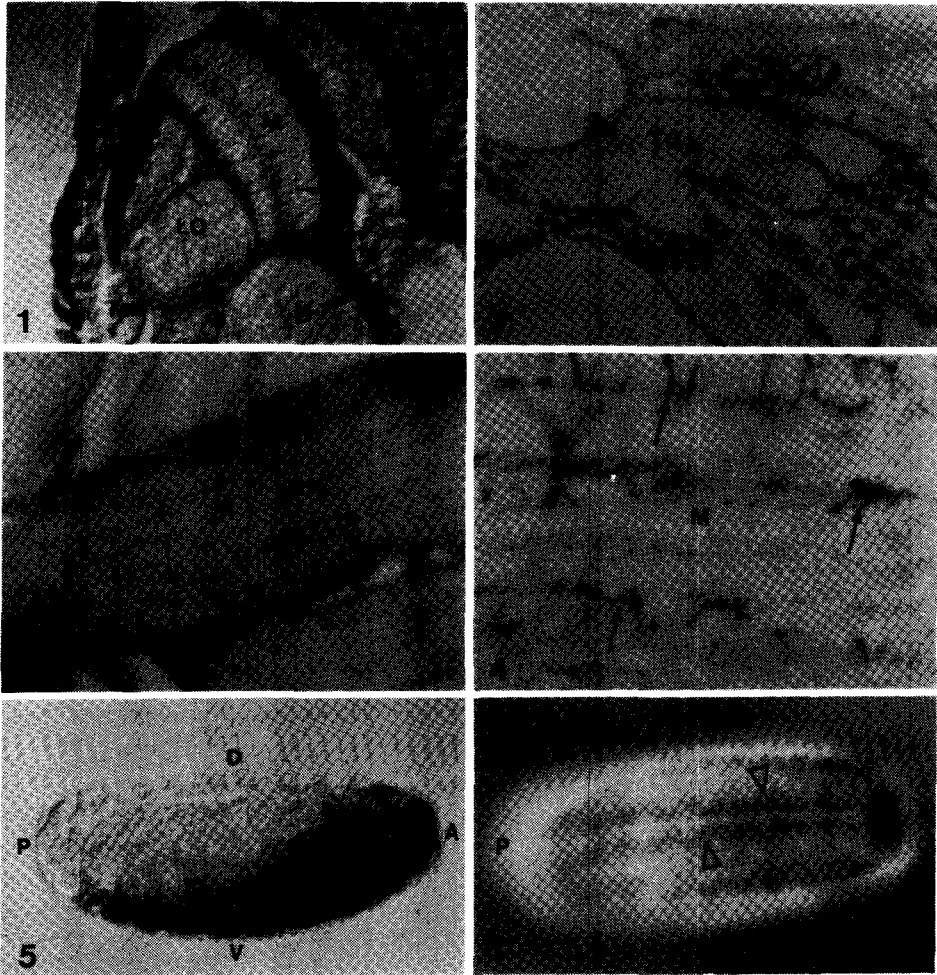
초파리의 頭部를 항원으로 사용하여 면역된 mouse의 비장세포와 myeloma 세포를 융합하여 만들어진 hybridoma 세포들의 배양상층으로 초파리 두부의 냉동절편을 면역조직학적 방법을 이용하여 신경계에 특이적으로 발현되는 항체를 선별하였다. 실험도중 여러 조직에 대해 각각 특이적으로 발현되는 항체들을 동정하게 되었는데 그 중에서 발

현페턴이 명확한 것을 택하여 단일클론화 하고, 대량제작 하였다. 그 중의 하나인 단일항체 6H6은 신경계에 특이적인 발현을 보여주었고, 항체의 종류는 IgG<sub>1</sub>형이라는 것을 타입결정 키트(Amersham)를 사용하여 알 수 있었다. 이 항체로 항원을 동정하기위해 단백질 발현 cDNA library를 screen한 결과 몇 개의 양성 plaque들을 확인하게 되었고, DNA sequence결과의 유사성을 데이터베이스상에서 평가해 본 결과 단일항체 6H6이 인식하는 분자는 disabled(tyrosin kinase substrate)라는 것을 알 수 있었다. 그리고 DNA sequence결과 이 항체는 disabled 분자의 C-말단부분인 7427-8761bp 사이에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다. 이 항체로 초파리의 두부에서 면역조직화적 방법으로 항원의 국제를 조사해본결과, 신경계의 가장자리가 특이적으로 염색되었다. 이 부분은 신경세포의 핵이 존재하고 넓은 세포질의 영역을 보여주며, 신경계의 축색이 많이 분포하고 있는 곳이다. 또한, 시신경계의 lamina와 medula 그리고 lobula의 사이에 축색이 집중적으로 분포하고 있는 부분과, 뇌 영역에서도 축색이 밀집된 부분에서 강한 발현을 보여주었다. 그리고 retina에서도 발현되는 것이 관찰된다(Fig. 1). 초파리의 몸통 부분을 면역염색해 본 결과 흉부신경절의 주변에서 강한 발현이 관찰되었다. 이 부분 역시 신경의 축색이 집중적으로 분포되어 있는 곳이다(Fig. 2). 근육에서도 약간의 발현이 관찰되는데(Fig. 3), 이 부분을 확대해 보았을 때 근신경에 염색이 된다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 그리고 발생중의 배를 염색해 보았을 때 중추신경계에 강하게 염색되는 것을 보여주었다. 배의 측면상에서 복부의 중추신경계에 강한염색이 관찰되었고, 몸의 전방부중 위쪽이 염색되어 뇌가 형성되는 부위임을 나타내 주었다(Fig. 5). Disabled 분자의 발현형태를 복면에서 관찰해 보았을 때 초파리 배의 전형적인 사다리형 중추신경계를 보여주었다(Fig. 6).

## 고 찰

단일클론항체를 이용하여 새로운 분자를 동정하고, 그 기능을 연구하는 것은 현재까지도 여러 분야에서 폭넓게 활용되고 있고, 실제로 유용한 방법으로 정착되어 있다<sup>1,12)</sup>. 이 방법의 장점은 새로운 유전자를 동정함과 동시에 직접 단일항체로 연구 할 수 있기 때문에 단백질 수준까지 연구

하기에 많은 이점을 가지고 있다. 그러나 단점으로는 결과를 예측하기가 까다롭고, 기존의 밝혀진 분자와 상치하는 경우를 초기부터 배제하기가 어렵다는 점이다. 본 연구에서는 초파리의 頭部를 항원으로 사용하여 단일항체를 제작하고, 두부의 조직절편을 배양상층으로 직접 염색하여 신경계 특이적인 항체를 선별하였고, 이 항체는 단백질발현 cDNA library screen 결과 disabled 분자를 인식하는 것을 보여주었다. 이 초파리 disabled 유전자는 P-element enhance trap 방법에 의해 동정되었는데, 초기배 발달단계에서 중추신경계의 형성에 밀접한 관계가 있고, 또한 *abl* 유전자와 밀접한 관계를 유지하면서 축색형성에 관여한다는 것이 증명되어 있고<sup>5)</sup>, 면역조직화적 실험결과로부터 초기 배발달 단계에서 중추신경계에 강하게 염색되는 것을 보여주었다<sup>4)</sup>. 본 연구에서 새롭게 제작된 MAb 6H6을 사용하여 초기배를 염색해 본 결과에서도 중추신경계를 인식하는 동일한 패턴을 나타내었다. 그러나 성체에서의 이 항원의 국제는 이전에 조사되지 않았는데, 두부의 시신경계와 뇌신경계의 축색이 밀집된 부분에 강한 염색형태를 보여주었다. 이는 disabled 분자가 초기 배 발달단계의 축색형성 뿐만 아니라 성체에서도 중요한 기능을 하고 있다는 사실을 시사하는 것이다. 그리고 성체의 몸통 부위에서의 발현을 조사해 보았을 때 흉부신경절의 주위 즉, 축색이 많이 분포하는 곳에 강한 발현이 관찰 되는 것을 보아서도 성체의 전반적인 축색에서 기능을 수행한다는 것을 알 수 있다. 근육에도 약간의 발현이 관찰되는데 이를 확대하였을 때 근신경에서의 발현이 관찰되었다. 이 사실은 이 분자가 중추신경계에서 뿐만 아니라 다른 신경에서도 어떤 역할을 담당한다는 것을 제시한다. 그리고 시각계의 시세포에서도 약간의 발현이 관찰 되는데, 이는 최근 이 분자가 시세포의 발생단계에서 sevenless receptor tyrosine kinase와 밀접한 관계를 갖는다는 보고와 연관된 결과라 생각된다<sup>8)</sup> Disabled 분자는 western blot analysis에서 약 220kD과 250kD의 크기로 나타나는데<sup>4)</sup>, 본 연구에서 MAb 6H6은 단백질 발현 cDNA library screen 결과 선택된 클론의 염기서열결정에서 disabled 단백질의 C-말단 영역인 7427-8761bp 사이를 인식하는 것으로 나타났으며, disabled 유전자의 2453bp-3091bp 사이는 alternate splice가 생기는 영역이기 때문에 이 항체는 두 크기의 단백질 모두를 인식하는 것으로 생각된다.



Figs. 1-6. Immunohistochemistry of wild-type *Drosophila* with 6H6 monoclonal antibody. The antigen localization was represented by DAB color development. Preparations on slide glasses were made by cryosection (figs. 1-4). Figs. 5-6 are whole-mount embryos.

Fig. 1. Immunostained adult head. Concentrated region of axons between medulla (M) and lobula (LO) shows strong staining reaction. The marginal zone containing the cytoplasm of neuron and the border of brain (B) show also strong expression (arrows), and the expression was also observed in retina (R). MS : muscle, open arrowhead : basement membrane.

Fig. 2. Immunostained adult thoracic region. Axons are aggregated near the thoracic ganglion (TG), and the regions are heavily stained (arrows).

Fig. 3. Immunostained indirect flight muscles (M). Staining reaction appeared along muscles (arrows).

Fig. 4. Magnification of immunostained indirect flight muscles (M). The expression is observed on muscular nerve (arrows).

Fig. 5. Lateral view of immunostained embryo at stage 15. Central nerve system (CNS) of ventral region is heavily stained (open arrow heads). Weak expression is observed in the brain forming region (arrows). A : anterior P : posterior V : ventral D : dorsal

Fig. 6. Ventral view of immunostained embryo at stage 15. Typical ladder-shaped central nerve system is observed (open arrow head).

## 요 약

초파리(*Drosophila melanogaster*)의 頭部를 항원으로 사용하여 신경계 특이적인 단일클론항체를 제작하였다. 이 항체의 항원은 expression cDNA library screen을 한 결과 tyrosine kinase substrate의 일종인 disabled 분자를 인식하고, DNA sequencing결과 disabled 단백질의 C-말단부분인 7427에서 8761bp 사이를 특이적으로 인식한다는 것을 알 수 있었다. 이 항원의 局再를 조사한 결과 초기발생단계의 胚에서는 中樞神經系에 강하게 發現되었으며 성충에서는 視神經系와 腦神經系 그리고 胸部神經系의 축색돌기가 밀집한 부분에 특이적으로 발현되었고, 또한 근육신경에서도 발현되는 것을 알 수 있었다. 따라서 disabled 분자는 배발달단계에서 중추신경계의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 예상되고, 성체에서는 신경계의 축색에서 뿐 아니라 근신경계에서도 어떤 기능을 수행하는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Bastiani, M. J., Harrelson, A. L., Snow, P. M., Goodman, C. S. : Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper, *Cell*, 51, 569 (1987)
- Bucher, E., Bader, R., Buchner, S., Cox, J., Emson, P. C., Flory, E., Heizmann, C. W., Hemm, S., Hofbauer, A., Oertel, W. H. : Cell-specific immuno-probes for the brain of normal and mutant *Drosophila melanogaster*, *Cell Tissue Res.*, 253, 357(1988).
- Fujita, S. G., Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A., Shotwell, S. L. : Monoclonal antibody the *Drosophila* nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7929(1982).
- Gertler, F. B., Hill, K. K., Clark, M. J., Hoffmann, F. M. : Dosage-sensitive modifiers of *Drosophila abl* tyrosine kinase function : *prospero*, a regulator of axonal outgrowth, and *disabled*, a novel tyrosine kinase substrate, *Genes & Development*, 7, 441(1993).
- Gertler, F. B., Bennett, R. L., Clark, M. J., Hoffmann, F. M. : *Drosophila abl* tyrosine kinase in embryonic CNS axons : a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with *disabled*, *Cell*, 58, 103(1989).
- Hill, K. K., Bedian, V., Juang, J.-L., Hoffmann, F. M. : Genetic interactions between the *Drosophila* abelson(Abl) tyrosine kinase and failed axon connections(Fax), a novel protein in axon bundles, *Genetics*, 141, 595(1995).
- Hunter, T. and Cooper, J. A. : Viral oncogenes and tyrosine phosphorylation, In the enzymes, New York : Academic Press, 17, 191(1986).
- Le, N., Simon, M. A. : Disabled is a putative adaptor protein that functions during signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase, *Mol. Cell Biol.*, 18, 4844(1998).
- Lemoine, A., Millot, C., Curie, G., Massonneau, V., Delachambre, J. : Monoclonal antibodies recognizing larval- and pupal-specific cuticular proteins of *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera), *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 203, 92(1993).
- Pak, W. L. : *Drosophila* in vision research, *Vision Res.*, 36, 2340(1995).
- Pawson, T. : Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases : regulatory elements in signal transduction, *Oncogene*, 3, 491(1988).
- Zipursky, S. L., Venkatesh, T. R., Teplow, D. B., Benzer, S. : Neuronal development in the *Drosophila* retina : Monoclonal antibodies as molecular probes, *Cell*, 36, 15(1984).