

저밀도 리포단백질 수용체 관련 단백질 5(LRP5) 유전자 적중 생쥐의 개발

박효영 · 김철민 · 이상미 · 정영희 · 문승주 · 강만중[†]

전남대학교 농업생명과학대학, 농업과학기술연구소, 동물자원학부

초 록

저밀도 리포단백질 수용체 관련 단백질 5(LRP5)는 간과 췌장을 포함하여 많은 조직에서 발현하며 아포리포단백질 E와 결합한다. 이와 같은 LRP5 유전자의 체내 기능을 규명하기 위하여 LRP5 유전자가 결손된 생쥐를 개발하였다. 먼저 LRP5 genomic DNA는 TT2 ES 세포로부터 분리하였으며 LRP5 유전자의 엑손 18에 neo 유전자를 삽입한 vector를 구축하고 TT2 ES 세포에 도입하였다. 178개의 G418 내성을 보인 세포 중 상동유전자 재조합에 의하여 targeting vector가 LRP5 유전자 위치에 삽입된 clone은 3개였다. 키메라 생쥐는 상설배기 수정을 ES 세포와 응집시켜 생산하였으며 생산된 키메라 생쥐는 C57BL/6 생쥐와 교미를 유도하여 heterozygous를 얻었다. 또한 이들 heterozygous간의 교배에 의하여 LRP5 유전자 결손 생쥐를 생산하였다. 이러한 생쥐는 LRP5 유전자의 체내 기능연구에 있어서 모델로 이용될 것으로 생각한다.

(주제어 : LRP5, Gene targeting, ES cell, Knock-out mouse)

서 론

콜레스테롤은 항상성을 유지하기 위하여 필요한 스테로이드 호르몬 및 담즙산의 전구체 그리고 세포막의 구성성분으로 중요한 역할을 수행한다. 이와 같은 콜레스테롤의 조절 기구는 세포내 콜레스테롤 생합성과 세포외로부터 도입되는 균형에 의존하고 있다. 세포내로 도입되는 콜레스테롤은 혈중 리포단백질에 포함되어 세포막에 존재하는 특이적인 저밀도 리포단백질(low-density lipoprotein, LDL) 수용체 의하여 도입된다(Brown과 Goldstein, 1986). 이러한 혈중 리포단백질은 칼로마이크론(chylomicron), 초저밀도 리포단백질(very low-density lipoprotein, VLDL), 중간밀도 리포단백질(intermediate density lipoprotein, IDL), 저밀도 리포단백질(low-density lipoprotein, LDL), 고밀도 리포단백질(high-density lipoprotein, HDL)로 분류되며 여러 종류의 수용체가 세포내 도입에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Brown과 Goldstein, 1986). 이러한 수용체들은 리간드 결합영역, EGF (epidermal growth factor) 전구체 상동영역, O 당쇄영역, 막관통영역, 세포질영역의 5개의 기능영역으로 구성되어 있으며 초저밀도 리포단백질 수용체(very low-density lipoprotein receptor, VLDLR), 저밀도 리포단백질 수용체(low-density lipoprotein receptor, LDLR), 고밀도 리포단백질 수용체(high-density lipoprotein receptor, SR-BI) 등이 보고되고 있다(Yamamoto와 Bujo, 1996). 특히, apolipoprotein E 2 수용체(apoER2), 저밀도리포단백질 수용체, 초저밀도 리포단백질 수용체는 apolipoprotein E(apoE)을 많이 포함하는 칼로마이크론, IDL, VLDL과 같

은 리포단백질을 인식하고 수용체 매개 세포내 도입에 의하여 세포내로 수송한다(Yamamoto와 Bujo, 1996). 한편 저밀도리포단백질 수용체는 apolipoprotein E(apoE)와 apolipoprotein B-100 (apoB-100)을 인식하며 간장을 포함하여 여러 조직에서 발현하고, 초저밀도 리포단백질 수용체과 apoER2은 간장에서 발현하지 않은 것으로 보고되고 있다. 특히, 저밀도 리포단백질 수용체는 간장에서 콜레스테롤을 포함하는 LDL의 유입 및 분해에 중요한 기능을 수행하는 것으로 보고되고 있다(Brown과 Goldstein, 1986; Yamamoto와 Bujo, 1996).

이와 같은 리포단백질 수용체 이외에 저밀도 리포단백질 수용체(LDLR)와 매우 유사한 구조를 가지고 있으며 저밀도 리포단백질 수용체군에 속하는 단백질을 저밀도 리포단백질 수용체 관련 단백질(LDL receptor-related protein, LRP)라고 한다(Herz와 Strickland, 2001). 특히 이와 같은 수용체 중에 있어서 사람 저밀도 리포단백질 수용체 관련 단백질 5(LRP5)은 염색체 11q13에 존재하며 1형 당뇨병과 연관된 위치에 존재하는 것으로 보고되어 있다(Hey 등, 1998). 또한 LRP5는 간장과 췌장을 포함하여 거의 모든 조직에서 발현하고 있으며 apolipoprotein E를 인식하는 것으로 보고하고 있다(Kim 등, 1998). 이러한 결과는 LRP5가 식사 유래의 콜레스테롤을 포함하는 중요 혈청 리포단백질인 칼로마이크론의 간장내 유입에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

Gene targeting을 이용한 knock-out 생쥐의 개발은 포유동물 유전자의 기능연구에 있어서 중요한 방법으로 이용되고 있으며 (Melton, 1994), 리포단백질 대사에 관한 유전자의 연구에도 다양한 knock-out 생쥐가 개발되고 있다

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2000-000-00222-0)지원으로 수행되었음.

[†] Corresponding author : M. J. Kang, Department of Animal Science, Institute of Agriculture Science and Technology, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University. E-mail: mj kang@chonnam.ac.kr

(Ishibashi 등, 1993; Frykman 등, 1995). 그러므로 본 연구의 목표는 콜레스테롤 대사에 관여하고 있을 것으로 생각되는 저밀도 리포단백질 수용체 관련 단백질 5(LRP5) 유전자의 발현이 결손된 knock-out 생쥐를 개발하는데 있다.

재료 및 방법

기본적인 분자생물학적 방법은 Sambrook와 Russell (2001)의 Molecular cloning을 참고하였다.

유전자적중 벡터의 제조

유전자 적중 벡터는 TT2 ES 세포로부터 동정한 엑손 17과 18을 포함하는 LRP5 genomic DNA를 이용하여 다음과 같이 제조하였다(그림 1). Positive selection marker로는 phosphoglycerate kinase-1 프로모터에 의하여 발현될 수 있도록 제조된 neomycin 저항성 유전자(PGK-neo)를 사용하였으며 negative selection marker로는 diphtheria toxin A fragment 유전자를 사용하였다. 먼저 LRP5 genomic DNA의 엑손 18에 있는 Xho I 제한 효소 site을 절단한 후 각각 EcoR V와 Hind III Linker을 결합시킨 다음 이 위치에 positive selection marker로서 PGK-neo 유전자를 삽입하였다. 그리고 LRP5 genomic DNA의 3'쪽 BstX I site을 Sal I으로, 5' 쪽의 Kpn I site을 Not I으로 치환하였으며 이렇게 구성된 전체 DNA 영역을 pMCDT-A 플라스미드(GIBCO/BRL)의 Not I과 Sal I site에 결합시켜 negative selection marker인 DT-A 유전자를 연결하여 벡터를 제조하였다. 이렇게 제조된 벡터는 ES 세포에 transfection 하기 위하여 제한효소 Not I으로 절단하여 직선화하였다.

ES 세포의 배양과 유전자적중 벡터의 Transfection

ES 세포의 배양과 유전자적중 벡터의 transfection은 Yagi 등(1993)의 방법을 조금 변형하여 실시하였다. 본 연구에서 ES 세포는 TT2 ES 세포를 사용하였으며 배양은 20% fetal calf serum(GIBCO BRL, Japan), 10^4 unit/ml leukemia inhibitory factor(AMRAD, ESGRO), 10^{-4} M β -mercaptoethanol, nonessential amino acid(Flow Lab.)과 sodium pyruvate (GIBCO BRL, Japan)을 포함하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose)을 이용하여 배양하였다(ES medium). 일반적으로 TT2 ES cell(8×10^5 cells)은 mitomycin C가 처리된 primary embryonic fibroblast feeder가 배양되어 있는 25-cm²의 culture flask(Falcon)에 접종하고 매일 medium을 교환하였으며 2 내지 3일 후에 계대 하였다.

유전자적중벡터의 transfection을 위해서 제조된 벡터를 Not I으로 처리하여 직선화한 후 Phenol/chloroform으로 두 번 처리한 다음 60 nM이 되도록 HBS buffer(Hepes 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.7 mM D-Glucose 6 mM)에 녹였다. Electroporation을 위한 ES 세포는 Electroporation 2~4시간 전에 새로운 ES medium으로 배지 교환한 다음 Trypsin 처리로 세포를 회수한 후 차가운 HBS 20 ml로 원심하여 wash 하였다. 최종적으로 2.5×10^7 cell/ml이 되도록 차가운 HBS로 suspension하여 사용 전까지 얼음 위에 보존하였다. 위에서 준비한 60

nM DNA 0.1 ml를 tube에 분주한 다음 2.5×10^7 cell/ml의 ES세포 0.4 ml를 DNA가 있는 tube에 넣고 가볍게 혼합한 후 미리 얼음 위에서 냉각시킨 0.4 cm cuvette으로 옮겨 ECM 2001 electroporation system(BTX)에 장착하여 electroporation을 실시하였다. Electroporation 조건은 200 V, 40 ms으로 하였으며 electroporation 후 얼음 위에서 cuvette를 10분간 방치한 후 33 ml의 ES medium으로 suspension하였다. Suspension한 세포는 PF medium을 제거한 9 cm feeder에 10 ml(3×10^6 cell/9 cm dish)씩 접종한 다음 하루 밤 동안 배양한 후 medium을 교환하였다. 접종 2일째부터 G418(150 μ g/ml)로 9일간 selection하였으며 전체 1회 실험에 있어서 약 100~150개의 colony를 Pick-up 하였다.

Colony pick up은 다음과 같이 실시하였다. 세포를 EDTA-PBS로 1회 wash한 후 dish에 10 ml의 EDTA-PBS을 넣은 다음 현미경 하에서 미분화된 colony를 찾아서 관찰한 후 yellow tip의 끝으로 pick up하고자 하는 colony 주변을 따라 긁어서 feeder와 colony를 분리하고 colony의 한 쪽을 tip의 끝으로 밀어 dish로부터 분리시킨 다음 흡입함으로써 pick up을 하였다. pick-up된 colony는 50 μ l 0.25% trypsin을 5분 처리한 다음 150 μ l의 ES medium을 첨가하여 suspension한 후 100 μ l는 PCR 분석에 나머지 100 μ l는 24well feeder에 접종하였다. 24 well에 접종된 세포는 6시간 후 medium을 교환하였으며 세포가 자라는 정도에 따라 2~3일 배양하여 6well로 계대하였다. 이들 세포는 6 well에서 2일 배양 후 25T bottle로 passage하였으며 25T bottle에서 2일간 배양한 다음 동결 보존하였다.

Positive Colony의 선별

Positive colony의 선별을 위하여 다음과 같이 PCR을 하였고 최종적으로는 southern blotting으로 검증하였다. 먼저 회수된 PCR용 세포를 10,000 rpm에서 5분 원심하여 세포를 회수하였다. 여기에 40 μ l의 멸균 증류수를 넣고 95 °C, 10분 처리한 다음 10mg/ml의 Proteinase K 10 μ l를 첨가한 후 55°C에서 120분 처리하였다. Proteinase K를 처리한 다음은 95°C에서 다시 10분 처리하여 Proteinase K의 활성을 제거한 후 상층액을 cell extract로 하여 PCR에 이용하였다.

PCR 반응은 Takara Ex Taq(Takara사)을 사용하여 다음과 같이 준비하였다. Ex Taq Buffer 5 μ l, dNTP(각 2.5 mM) 4 μ l, Ex Taq polymerase 0.5 μ l, Primer neo 1 μ l (20pmole, GCCTGCTGCCGAATATCATGGTGAAAAT), primer LRP5 TV 1 μ l(20pmole, AAGTGGCAGCCAGCATCTGAGTCATTGAAA), 멸균수 28.5 μ l, cell extract 10 μ l 전체 50 μ l로 0.2 ml PCR tube에 넣었다. PCR 반응은 95°C 1분 1 cycle, 98°C 20초, 68°C 5분 35 cycle, 72°C 15분 1 cycle로 하여 2-step PCR로 실시하였다. PCR 반응 종료 후 각 반응액 10 μ l를 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 positive colony 여부를 확인하였다.

Genome DNA의 정제와 Southern Blotting

Genome DNA의 추출을 ES cell 또는 생쥐 꼬리 약 1cm를 절단하여 Hogan 등 (1986)의 방법에 따라 수행하였다.

Southern blotting은 정제한 genome DNA 10 μ g을 제한 효소 Hind III으로 절단한 후 0.8% agarose gel에서 전기영

동한 다음 Nylon membrane (Zeta-Probe membrane: Bio-Rad사)에 transfer 하였다. Probe는 Targeting vector에 포함되지 않은 5'영역 600bp를 이용하였으며 [α - 32 P]dCTP (110TBq/mmol:Amersham사)와 radiprime II random prime labelling system(Amersshar Pharmacia Biotech)을 이용하여 labelling한 후 hybridization에 사용하였다. Hybridization은 5×SSPE, 5×Denhardt's solution, 1% SDS (W/V), 50% Formamide(W/V), 0.2mg/ml denatured salmon sperm DNA를 포함하는 hybridization solution에서 42°C, 15시간 동안 실시하였다. Hybridization 후 membrane은 0.2×SSC, 0.1% SDS(W/V)으로 68°C, 30분, 3회 wash하고 autoradiography를 실시하였다.

ES 세포를 이용하여 키메라 생쥐의 생산

키메라생쥐의 생산은 조 등(2000)의 방법에 의하여 다음과 같이 실시하였다. 암컷 ICR mouse에 5IU의 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin)와 5IU의 HCG (human chorionic gonadotropin을 48시간 간격으로 복강 주사한 후 슛컷 mouse와 교미를 유도하였다. 교미유도 후 72시간에 mouse를 도살하여 난관으로부터 8세포기 수정란을 회수하였다. 8세포기 수정란은 Tyrode's solution (100 ml 당 NaCl 0.8g, KCl 0.02g, CaCl₂·2H₂O 0.024g, MgCl₂ 6H₂O 0.01g, Glucose 0.1g)을 처리하여 투명대를 제거하였으며 이들 수정란을 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 회수한 TT2 ES cell(1×10⁶ cell/ml)의 M16 drop(20 μ l)에 넣어 3시간 동안 공배양함으로써 응집을 유도하였다. 응집이 된 수정란은 새로운 M16 drop으로 옮겼으며 하루 밤 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 가임신 3일째 암컷 생쥐의 자궁에 이식하였다. 키메라의 생산 여부는 coat color로 구별하였다. 또한 태어난 키메라 생쥐는 3주~4주령에 이유하고 꼬리로부터 genome DNA를 추출하여 PCR 또는 southern blotting으로 확인하였다.

키메라 생쥐의 Germ Line Transmission

Heterozygous 생산을 위해서는 비교적 coat color로 구별하여 ES 세포 유래의 유전능력이 높은 것으로 생각되는 개체를 선택하여 실시하였다. 가능한 coat color가 야생 생쥐모색으로 되어 있는 키메라 생쥐(100% 키메라)를 C57-BL/6와 교배시켜 F₁ 생쥐를 얻었으며 이들 생쥐로부터 genome DNA를 추출하여 PCR 또는 southern blotting으로 heterozygous(+/-)의 여부를 검증하였다. Homozygous(-/-)의 생산은 앞에서 획득한 heterozygous(+/-) 간의 교배에 의하여 생산하였으며 PCR 또는 southern blotting으로 wild type(+/+), heterozygous(+/-), homozygous(-/-)을 구별하였다.

결과 및 고찰

TT2 ES 세포에 있어서 LRP5 유전자 적중 벡터의 상동유전자 재조합효율

LRP5 유전자의 엑손 18에 positive selection vector를 삽입하고 negative selection marker로는 DT 유전자를 사용

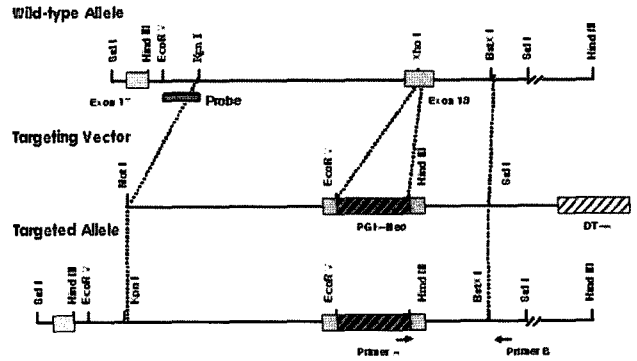


Fig. 1. Diagram of the targeting vector, wild-type allele, and targeting allele.

Table 1. Frequency of targeting at the LRP5 locus

No. of ES cells electroporated	No. of neo-positive ES cells analyzed by PCR	No. of homologous recombination
5 × 10 ⁷	178	3

하여 유전자 적중 벡터를 구축하였다(Fig. 1). 직선화된 벡터 60 nM를 이용하여 TT2 ES cell 5 × 10⁷에 electroporation한 후 150 μ g/ml G418로 9일간 선별한 결과 neo 양성 반응을 보인 178개의 세포 중에 PCR 분석에 의하여 상동유전자 재조합이 일어난 세포를 확인하였다. 그 결과 Table 1과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 3개의 세포에서 상동유전자 재조합이 일어났으며 이와 같은 결과는 같은 선별 방법을 이용한 Yagi 등(1993a)의 결과보다 약간 낮은 결과였지만 유전자 적중 벡터가 정상적으로 LRP5 유전자좌에 상동유전자 재조합에 의하여 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

LRP5 키메라 생쥐의 생산

Table 1에서 얻은 LRP5 유전자좌에 상동재조합이 일어난 ES 세포 3개의 clone 중 2개의 clone을 이용하여 키메라 생쥐를 생산하고자 조 등(2000)의 방법에 따라 ICR 8세포기 수정란과 응집하여 가임신 생쥐에 이식하였다. 그 결과 Table 2에서 나타낸 바와 같이 전체 282개의 응집된 수정

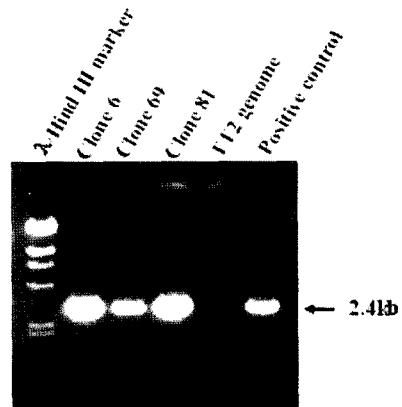


Fig. 2. PCR analysis of homologous recombination at LRP5 locus. Primers are indicated in Fig. 1. Homologous recombinants yielded 2.4 kb fragment in PCR analysis.

Table 2. Production of LRP5 chimeric mice

ES cells	No. of embryos transferred	No. of offspring (%) ^a	No. of chimeras (%) ^b			
			<50	50~70	70~90	90~100
Clone 6	133	35 (24)	0	0	2	4
Clone 69	149	21 (14)	0	0	3	2
Total	282	56 (20)	0	0	5	6

^a indicates the % of newborns compared with embryos transferred.

^b indicates the % of coat color of the chimerase.

란을 이식하여 56마리의 산자를 얻었으며 이들 중 모색으로 판단하였을 경우 70~80% 키메라 생쥐가 5마리, 90~100% 키메라 생쥐가 6마리로 11마리 모두 70% 이상의 키메라를 나타내는 생쥐를 얻을 수 있었다. 그리고 두 clone 간에서 임신율의 차이는 있었으나 키메라 생산 효율에 있어서는 큰 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 8세포기 ICR 수정란에 TT2 ES 세포를 주입하였을 때 높은 효율의 키메라 생쥐를 얻을 수 있다고 하는 Yagi 등(1993b)결과와 일치하는 결과였다.

LRP5 Knock-out 생쥐의 생산

Heterozygous 생쥐를 얻고자 본 연구에서 생산된 100% 키메라 수컷 생쥐를 C57BL/6 암컷과 교미를 유도하였다. Table 3에 나타낸 바와 같이 2 마리의 100% 키메라 생쥐를 각각 2마리의 C57BL/6 암컷과 교미를 유도하여 전체 37마리의 F₁ 생쥐를 얻을 수 있었다. 이들 생쥐의 litter size는 9.2로 생쥐의 평균 산자수와 별 차이가 없었다. 또한 암컷

19마리, 수컷 18마리로 암수 비에도 차이가 없었다. Heterozygous 생쥐를 확인하기 위하여 이들 전체 37마리로부터 genomic DNA를 정제한 후 southern blotting 분석을 실시하여 13마리가 heterozygous 생쥐임을 확인하였다. 이와 같은 결과는 TT2 ES 세포를 이용하여 생산된 키메라 생쥐는 TT2 ES 세포 유래의 형질을 그 자손에 매우 효율 좋게 전달한다는 Yagi 등(1993b)의 결과와 일치하는 경향이 있었다.

LRP5 유전자의 발현이 결손된 homozygous 생쥐를 생산하고자 앞에서 확인된 heterozygous 생쥐 간에 교배를 유도하였다. 그 결과 Table 4에 나타낸 바와 같이 5쌍에서 전체 10마리의 homozygous, 24마리의 heterozygous, 23마리의 wild-type을 얻을 수 있었다. 그러나 전체 산자 수에 대한 암수 성비와 wild-type, heterozygous, homozygous 출현율은 멘델법칙을 따르지 않은 경향을 보였다. 그러나 전체 7회 분만에 평균산자수가 8.1마리로 정상적인 산자수를 나타내고 있다. 그러므로 멘델법칙을 따르지 않은 경향

Table 3. Germ line transmission of LRP5 chimeric mice

Chimeric mice	No. of pregnancy (litter size)	No. of F1 mice (M:F)	No. of heterozygous mice (M:F)
LRP5 No 1	2 (8.5)	17 (9: 8)	1 (1:0)
LRP5 No 2	2 (10)	20 (9:11)	12 (5:7)
Total	4 (9.2)	37 (18:19)	13 (6:7)

(M:F) indicates males and females.

Table 4. Production of LRP5 homozygous mice

Heterozygous mice		No. of F ₂ mice (M:F)	No. of <+/+> (M:F)	No. of <+/-> (M:F)	No. of <-/-> (M:F)
♂	♀				
F1-18	F1-28	17 (8: 9)	5 (2: 3)	8 (3: 5)	4 (3:1)
F1-21	F1-32	7 (6: 1)	3 (3: 0)	3 (2: 1)	1 (1:0)
F1-22	F1-34	7 (2: 5)	3 (1: 2)	3 (1: 2)	1 (0:1)
F1-24	F1-35	8 (4: 4)	6 (3: 3)	1 (1: 0)	1 (0:1)
F1-26	F1-37	18 (3:15)	6 (1: 5)	9 (2: 7)	3 (0:3)
Total		57 (23:34)	23 (11:13)	24 (8:16)	10 (4:6)

<+/+> indicates wild-type, <+/-> indicates heterozygous, <-/-> indicates homozygous.

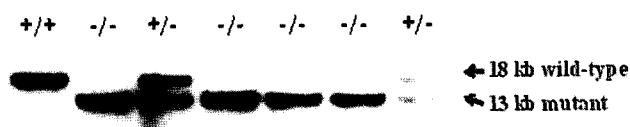


Fig. 3. Southern blotting analysis of Hind III digested DNA from wild-type, heterozygous, homozygous mice. Southern blotting was performed with the probe indicated in Fig. 1. Hind III digestion resulted in an 18-kb fragment in wild-type DNA and 13-kb fragment in heterozygous and homozygous mice.

을 보이는 것은 전체 산자수가 57마리로 적어 분석치를 얻을 수 없는데 기인하는 것으로 생각된다.

이와 같이 생산된 wild-type, heterozygous, homozygous는 southern blotting 분석에 의하여 Fig. 3와 같이 검증하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 targeting 벡터제조에 있어서 엑손 18의 Xho I site에 PGK-neo 유전자를 positive selection marker로 삽입하면서 EcoR V와 Hind III 제한효소 site로 치환하였다. 그러므로 genomic DNA를 제한효소 Hind III로 처리하면 wild-type allele를 가지고 있는 개체는 18 kb의 Hind III 절단 단편을 생성하게 되고 상동유전자 재조합에 의하여 targeting 벡터가 삽입된 개체는 PGK-neo 유전자의 3' 위치에 있는 Hind III 위치가 절단되어 13 kb의 단편을 생성하게 된다. 그리고 이러한 단편의 검출을 위하여 targeting 벡터에는 포함되지 않는 5' 쪽 EcoR V와 Kpn I으로 절단한 단편을 probe로 사용하면 Fig. 3에서와 같이 wild-type(+/+)은 18 kb의 band만을, heterozygous(+/-)에서는 18 kb의 wild-type band와 13 kb의 mutant band를 동시에 검출할 수 있었으며, homozygous(-/-)에서는 13 kb의 mutant band만을 얻을 수 있었다.

이와 같은 연구에 의하여 정상적으로 LRP5 유전자의 엑손 18위치에 PGK-neo 유전자가 삽입되어 LRP5 유전자의 발현이 결손될 수 있는 생쥐를 개발하였다. 이러한 생쥐는 앞으로 리포단백질 대사 연구에 중요한 모델로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Development of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Gene Targeted Mouse

Park, H. Y., C. M. Kim, S. M. Lee, Y. H. Jeoung, S. J. Moon and M. J. Kang

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University

ABSTRACT

The low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) highly expressed in many tissues, including hepatocytes and pancreatic beta cells, can bind to apolipoprotein E. To evaluate *in vivo* roles of LRP5, we generated LRP5-deficient mice. LRP5 genomic DNA was isolated from TT2 embryonic stem (ES) cells. Targeting vector was constructed to disrupt an exon 18 of the mouse LRP5 gene and transfected into ES cells. Three homologous recombinants at LRP5 locus were identified from 178 G418-resistant clones. Chimeric males

generated by morula aggregation technique were mated to C57BL/6 female mice. After achieving germ-line transmission, LRP5^{+/-} females were crossed with LRP5^{5+/-} males to obtain LRP5-deficient mice. One line of mice lacking LRP5 gene was confirmed by Southern blotting. Such knock-out mice may serve as an effective animal model to study *in vivo* function of LRP5 gene.

(Key words : LRP5, Gene targeting, ES cell, Knock-out mouse)

인용문헌

1. Brown MS, Goldstein JL (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
2. Cho YY, Moon SJ, Kang MJ (2000): Simple methods for production of chimeric mice by coculture with TT2 embryonic stem cells. *Korean J Animal Reprod* 24: 451-455.
3. Frykman PK, Brown MS, Yamamoto T, Goldstein JL, Herz J (1995): Normal Plasma Lipoproteins and Fertility in Gene-Targeted Mice Homozygous for a Disruption in the Gene Encoding Very Low Density Lipoprotein Receptor. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 92: 8453-8457.
4. Hogan B, Constantini F, Lacy E (1986): Manipulating the mouse embryo. pp. 174-176. Cold Spring Harbor Laboratory.
5. Hey PJ, Twells RCJ, Phillips MS, Nakagawa Y, Brown SD, Kawaguchi Y, Cox R, Xie G, Dugan V, Hammond H, Metzker ML, Todd JA, Hess JF (1998): Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene* 216: 103-111.
6. Herz J, Strickland D (2001): LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108: 779-784.
7. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993): Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92: 883-893.
8. Kim DH, Inagaki Y, Suzuki T, Ioka RX, Yoshioka SZ, Magoori K, Kang MJ, Cho Y, Nakano AZ, Liu Q, Fujino T, Suzuki H, Sasano H, Yamamoto TT (1998): A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E. *J Biochem* 124:1072-1076.
9. Melton DW (1994): Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 16:633-638.
10. Yamamoto T, Bujo H (1996): Close encounters with apolipoprotein E receptors. *Curr Opin Lipidol* 7: 298-302.
11. Yagi T, Tokunaga T, Furuta Y, Nada S, Yoshida M,

Tsukada T, Saga Y, Taketa N, Ikawa Y, Aizawa S (1993a): A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem* 214: 70-76.

12. Yagi T, Tokunaga T, Furuta Y, Nada S, Yoshida M,

Tsukada T, Saga Y, Takeda N, Ikawa Y, Aizawa S (1993b): A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem* 214: 70-76.

(접수일자: 2005. 2. 2. / 채택일자: 2005. 2. 28.)