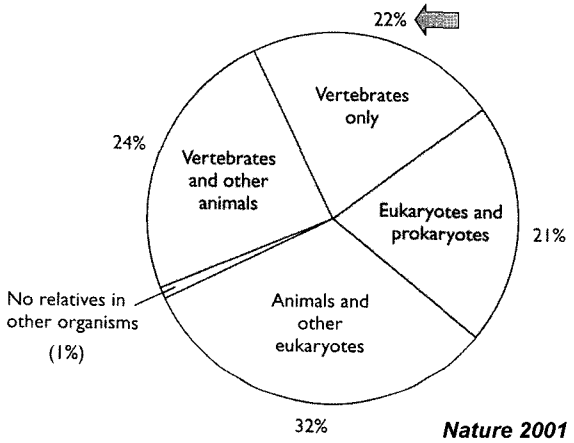
# 제브라피쉬를 이용한 인간유전체 기능분석

## Fishing novel genes: functional genomics in zebrafish

김 철 희(충남대학교 생물학과)

제브라피쉬 (zebrafish; *Danio rerio*)는 human genome project 이후의 대량의 유전자 기능 분석 즉, functional genomics의 필요성에 의하여 인위적으로 선택, 도입된 모델동물이다. 이는 특히 초파리에서 large-scale saturation mutagenesis로 대량의 돌연변이를 제작해 유전체 기능분석에 기여함으로써 노벨상 (1995년)을 수상했던 Dr. Christiane Nusslein-Volhard가 주도하였다는 사실은 곰곰이 생각해 보아야 할 것 같다. Christiane을 중심으로 한 이들 선구자들은 human genome project의 추이를 예견하고, 초파리와 같이 대량의 유전체 연구가 가능하면서도 인간유전체에 대응할 새로운 동물모델을 발굴하기 위하여 많은 고심을 하였다. 어류의 유전체 구성이 인간과 매우 유사하다는 것은 이미 유전체 연구에서 잘 밝혀지고 있었으며, 또한 대량의 유전학적 연구를 위해서는 사육이 쉽고, 작고, 세대교체가 짧고, 자손수가 많은 척추동물을 필요로 하였다. 최종적으로 일본을 중심으로 수십년간 연구가 되어오던 송사리 (Medaka)와 미국 오레곤대학에서 연구되어오던 인도 원산의 제브라피쉬가 후보로 추천되었다. 송사리는 겨울에도 노천에서 사육할 수 있는 점 등 장점도 있으나, 20-30개 정도의 적은 산자수, 알들이 어미 배에 붙어 있어 채취가 불편하고, 알의 껍질이 딱딱해 microinjection이 어려운 점, 발생이 상대적으로 늦은 점 등의 이유로 실험적으로 훨씬 유리한 제브라피쉬가 적당한 모델동물로 선정되었다.




Nature 2001

우리 속담에 '멸치도 뼈대있는 집안'이라는 말이 있듯이 제브라피쉬는 진화상, 그리고 유전체 구성면에서 볼 때 인간에 매우 가까운 척추동물에 속한다. 현재까지의 유전체 연구결과에 의하면 인간의 몸을 형성하고 있는 주요 유전자는 평균 4 copy를 가지는 것으로 밝혀지고 있다. 이는 진화 과정상 두 번의 whole-genome duplication에 의한 것이며, 이러한 현상은 뼈대있는 집안, 즉 척추동물의 진화와 함께 이루어진 것으로 추정된다. 특히 위 그림과 같이, 2001년 Nature지에 발표된 human genome의 결과를 보면 22%, 즉 25,000 인간유전체 중 5,000 이상의 유전자가 척추동물에서만 존재한다는 것이다. 현재까지 밝혀진 바에 의하면 제브라피쉬의 genome size는 1,700 Mb로 인간의 반 정도이며 25개의 염색체로 이루어져 있고 주요 유전자들은 사람, 마우스와 genomic structure

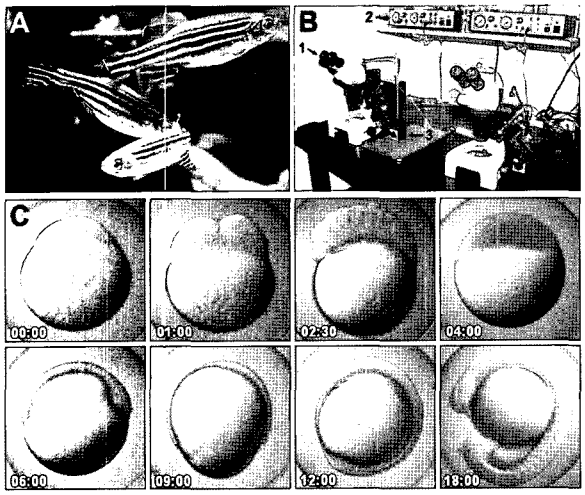
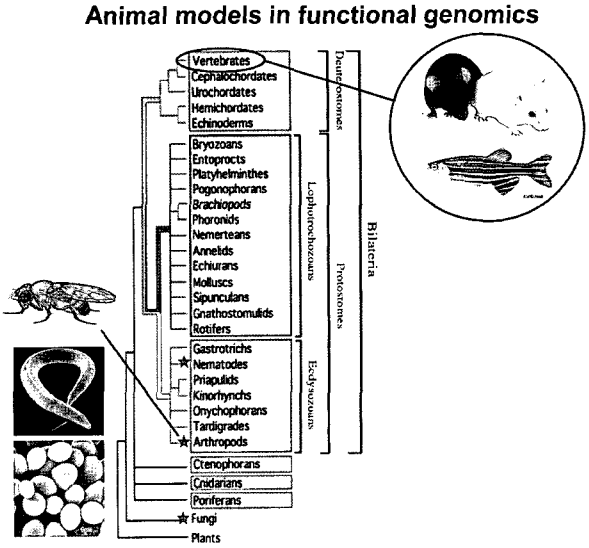



Fig. 1. A. The zebrafish (*Danio rerio*). B. Microinjection system; stereoscope (1), pico pump (2), micromanipulator (3). C. Rapid development of transparent zebrafish embryos.

가 거의 같으며, 아미노산 배열에서는 90% 정도의 높은 상동성을 보이고 있다. 아래 그림은 동물분류표이며, 진화상 어류의 상대적 위치가 효모, 선충, 초파리 등의 대표적 유전체 기능연구 모델들과 잘 비교되고 있다.

제브라피쉬는 흰색 바탕의 몸체에 가로로 검은 줄무늬를 가지는 인도 원산의 소형 열대 담수어로서 성체 크기가 3-4cm 정도이다 (Fig. 1A). 일반적인 가정용 어항을 이용해서도 쉽게 사육이 가능하며, 수명은 2년 정도이고 생후 3개월이면 번식이 가능하다. 계절에 관계없이 암컷은 일주일 간격으로 200~300개의 알을 낳을 수 있고, 체외수정을 하고 발생배가 투명하기 때문에 일반 해부현미경 하에서 쉽게 관찰 및 발생배의 조작이 가능하다. 발생이 매우 빨라 초기 세포분열은 대장균 (20분)보다도 빠르게 15분 간격으로 진행되며, 발생 6시간째 gastrulation이 시작하여 10시간째 마치며, 12시간이 지나면 눈의 형성이 이미 시작된다(Fig. 1C). 수정 후 24시간이 지나면 심장의 박동과 혈구세포의 흐름을 관찰할 수 있다. 제브라피쉬를 이용한 유전자의 기능분석은 주로 DNA나 mRNA를 수정란에 microinjection하여 발생에 미치는 영향을 관찰하게 되는데 Fig. 1B는 microinjection시




에 필요한 해부현미경, 간단한 micromanupulator, regulator 등 기본 장비들을 보여주고 있다.

제브라피쉬는 허파를 제외하고는 지라, 흉선 등 면역계를 포함한 대부분의 기관을 가지며, 특히 돌연변이 연구에서 밝혀지는 여러 사실들이 인간의 유전질환과 매우 유사하기 때문에 "canonical vertebrate"로서의 위치를 확보해 나가고 있다. 대량으로 쉽게 구할 수 있는 제브라피쉬의 수정란을 이용하여, 유전자의 기능분석이 가능한데, expression cloning, antisense oligonucleotide morpholino를 이용한 gene knock out/down, 생체기능조절물질 탐색을 위한 chemical genomics 등 다양한 분야에 이용되고 있으나, 세계적으로는 초파리에서 성공을 거두었던 saturation mutagenesis를 가장 큰 목적으로 하고 있다. Mutagenesis는 크게 ENU를 이용한 chemical muatgenesis, retrovirus나 transposon을 이용한 insertional mutagenesis 등이 있으나, 각각 장단점이 있다. Chemical mutagenesis의 경우에는 수적으로 많은 sperm (정자)을 타겟으로 하며 성체 수컷을 ENU 처리를 하게 된다. 현재까지의 연구 결과에 의하면 수컷 한 마리로부터 평균 500 종류 이상의 돌연변이체를 얻을 수가 있으나, 특정 돌연변이주의 선별, 유지 등에 많은 인력과 공간이 필요하다. 유럽과 미국의 경우에는 대규모 공동작업으로 현재까지 20만 이상의 스크리닝이 이루어졌으며,

결과적으로 7,000 종 이상의 돌연변이주를 확보하게 되었다. 이들 돌연변이주들은 독일이나 미국 오레곤 대학의 mutant bank에서 관리, 유지되고 있으며 연구자가 필요로 하는 경우 언제든지 분양을 해주기 위한 시스템을 구축하고 있다. 그동안 대부분 돌연변이들은 쉽게 관찰이 가능한 형태학적인 변화를 기준으로 선별되었으며, 2000년부터는 발생 후기의 기관형성, 행동이상을 중심으로 대량의 mutagenesis가 진행되고 있다. 돌연변이의 원인이 되는 유전자는 positional cloning으로 밝혀내게 되는데 여기에는 genetic mapping과 physical mapping이 있다. 제브라피쉬는 짧은 역사에도 불구하고 모델 동물로서의 중요성에 따라 그 동안 전 세계적으로 집중적인 연구투자가 이루어졌으며, 그 결과 5,000개 이상의 genetic marker들이 개발되었으며, physical mapping에 필요한 YAC (Yeast Artificial Chromosome), BAC (Bacterial Artificial Chromosome) 등과 20만 이상의 EST (Expressed Sequence Tag)가 database에 공개되어 있다. Zebrafish genome project도 완성되었으며 최종 정리단계에 있다.

현재 세계적인 연구실들은 positional cloning을 통하여 돌연변이체의 원인 유전자를 밝힘으로써 새로운 기능성 유전자를 확보하고 나아가 관련 질환연구, 신약개발의 타겟 발굴에 집중적인 노력을 기울이고 있다. 본 논문에서는 제브라피쉬 돌연변이주들 중에서 저자가 직접 positional cloning에 성공한 두 가지의 경우에 대하여 소개하고자 하며, 후반부에서는 인간 질환 모델로서의 제브라피쉬의 연구현황에 대하여 최근 보고된 결과들을 중심으로 살펴보기로 한다.

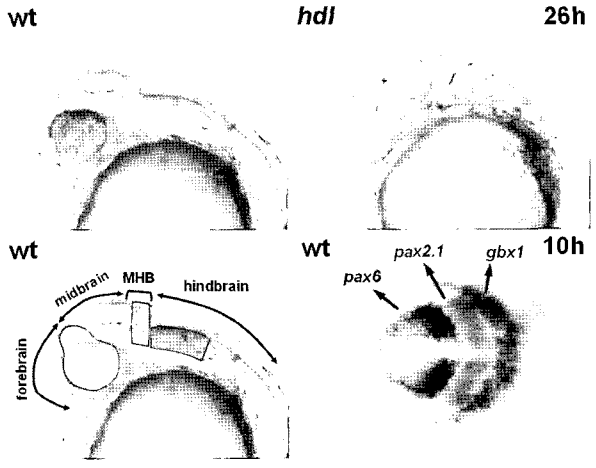



Fig. 2. Phenotype of *headless* mutant embryo. Compartment of brain structures is defined at the end of gastrulation (10h). Molecular marker genes: *pax6* (forebrain), *pax2* (MHB, midbrain-hindbrain boundary), *gbx1* (hindbrain).

## 1. 두뇌 형태형성에서 headless 유전자의 역할

두뇌형성에 이상이 있는 *headless* mutant는 ENU (ethyl nitrosourea)로 유도된 large-scale mutagenesis와 신경계 특이 유전자를 마커로 이용한 *in situ* hybridization screening 결과 발굴된 돌연변이주로서, 이름 그대로 코, 눈, 대뇌 부분의 신경계가 완전히 결실된 돌연변이로서 인간의 경우는 무뇌아 질환에 해당된다 (Fig. 2).

두뇌와 신경계의 형성에 대한 의문은 과거 수십년간 발생학 분야의 최대의 의문점의 하나였으며, 그동안 양서류를 중심으로 한 이식실험으로부터 최근의 분자생물학적 기법의 도입에 이르기까지 그 분자적 메커니즘이 하나씩 밝혀지기 시작하고 있다. '동물 몸의 형태형성에 관련되는 유전자군들에 대한 연구'로 정리되어지는 현재까지의 연구결과들을 살펴보면, 발생 최초의 정자와 난자의 만남이 이루어지는 순간에서부터 시작되고 있다. 단세포인 난자에서 정자의 진입방향 정반대쪽에 Dishevelled라는 단백질이 세포내 분포가 달라지기 시작하고, 발생의 진행과 함께 GSK-3, ß-Catenin 등 일련의 Wnt 신호전달의 분자들에 의하여 몸의 등배축 (dorsoventral axis)이 결정되어진다 (Fig. 3). Midblastula transition (MBT, 제브라피쉬의 경우에는 발생 3시간째)을 지나며 최초의 전사 (zygotic transcription)가 시작되어 Nieuwkoop center의 신호 (*siamois, twin, dharma*)를 만들며, 몸의 형성체 (organizer)를 유도하여 일련의 유전자군 organizer genes (*goosecoid, chordin, dickkopf-1*)이 발현한다.

*headless* 돌연변이의 발생배에서는 이들 초기 organizer 유전자들의 발현에는 이상이 없는 것으로 밝혀졌으며, 다음 단계로 신경유도 (neural induction)

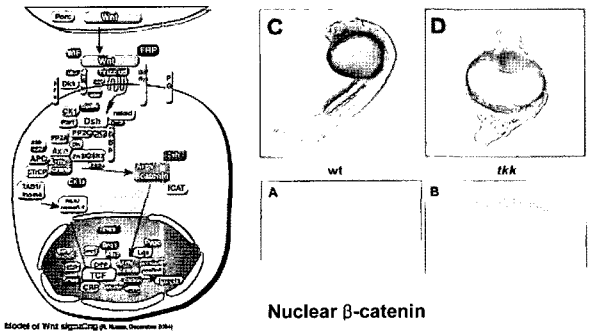



Fig. 3. Wnt signaling pathway와 *headless*, 그리고 다른 관련 mutant 도깨비, *tokkaebi* (*tkk*).

후에 형성된 신경조직상에서의 patterning에서의 변화가 관찰되었다. 뇌 발생구조상 *headless*는 forebrain이 완전히 결손되었다고 볼 수 있는데, 발생과정에 뇌구조의 영역 결정은 gastrulation 중에 이미 시작하며, neural plate 상태에서 이미 forebrain, midbrain, hindbrain 등 각 영역을 결정하는 유전자들의 발현이 결정되어지고 있다. 염색체상에서 headless locus를 확인하기 위해 single-strand length polymorphism (SSLP) marker들을 사용하여 *headless*가 chromosome 10에 위치하며 genetic marker z6183과 z9701 사이에 존재하는 것을 확인하였다. 또한 marker z14193을 이용하여 인접한 곳에서 Wnt pathway의 Tcf/lef family인 high mobility group (HMG)-box를 포함하는 전사인자 Tcf-3의 존재를 밝혀내게 되었다. Headless/Tcf-3는 암의 발생이나 세포분화에서 중요하게 작용하고 있는 Wnt 신호전달의 마지막 전사인자로 작용하고 있으며, 척추동물 유전체 내에는 4개의 Tcf, 즉 Tcf-1에서 Tcf-4까지 존재하고 있으며, *headless* 돌연변이로부터 Tcf-3가 뇌구조의 형태형성에 결정적인 역할을 하고 있다는 것을 처음으로 밝히게 된 것이다 (Kim *et al*, 2000).

## 2. 신경세포의 운명결정에 관여하는 신규유전자 mind bomb

*mind bomb* 돌연변이주는 신경세포 (mind)가 폭발적으로 (bomb)으로 늘어난 표현형을 가지며, 이는 초기 신경세포의 운명결정에 이상이 있는 것으로 밝혀졌다. 동물의 신경계는 다른 조직에 비하여 발생초기에 형성되며 제브라피쉬의 경우에는 발생 6시간째 gastrulation과 함께 neural induction이 시작되며, 발생 10시간째 gastrulation이 막 끝나는 시점의 neural plate 상에서 이미 신경전구세포 (neuronal precursor cell, 신경줄기세포)의 분화가 이루어지고 있다. 아직 평면상의 neural plate 상에서 *huC*와 같은 유전자 마커로 neuronal precursor의 검출이 가능한 데 (Kim *et al*., 1997), 몸의 중심축의 양편으로 기본적으로 세 줄의 신경세포 집단을 형성한다. 이 들 신경전구세포들은 위치에 따라, 나중에 sensory neuron, interneuron, motoneuron으로 각각 분화해 가게 된다. 제브라피쉬 발생배는 만 하루만에 심장의 박동이 시작되고, 혈관형성과 함께 혈액의 흐름을 관찰할 수 있는데, 이 때는 발생배가 자극에 반응하여 움직이기 시작하므로 이미 기본적인 neuronal network이 형성되어 있음을 뜻한다. 신경세포의 운명결정에 관여하는 분자적 메커니즘에 대한 연구는 최근 초파리에서 많은 사실들이 밝혀져 왔으며, lateral inhibition이라는 현상과 Notch 신호전달로 집약되어 진다. 특히, lateral inhibition 현상은 신경세포의 운명결정 뿐만 아니라 대부분의 조직에서 일어나고 있는 세포의 운명결정 즉, binary cell fate determination의 기본현상으로 인식되어지고 있다. 여기에는 동질의 세포집단이 분화신호를 받게 되면, 세포-세포간의 Notch 신호전달계에 의하여 신호전달의 증폭이 일어나고, 유전자 발현의 차이에 의하여 서로 다른 운명의 세포로 분화해 가게 된다. 여기에 관련되는 유전자군으로 Notch receptor, Delta ligand를 시작으로 여러 가지 관련인자들이 하나, 둘씩 밝혀지고 있으나, 흥미로운 것은 Notch 신호전달의 활성화에 직접적으로 관여하는 presenilin이 노인성 치매인 Alzheimer's Disease의 원인유전자라는 것이다 (Fig. 4).

*mind bomb* 돌연변이주는 표현형이 lateral inhibition과 Notch 신호전달에 이상이 있는 초파리의 돌연변이들과 닮았기 때문에 기존에 알려진 Notch 신호전

달계의 유전자들에 mutation이 일어났을 것으로 추정되었다. 하지만 제브라피쉬의 Notch 신호전달에 관련되는 대부분의 유전자들을 분리, 분석하였지만 별다른 이상을 전혀 발견할 수가 없었다. 결국은 positional cloning을 시도할 수밖에 없었으며 genetic mapping, physical mapping의 과정을 거쳐 최종적으로 그 원인유전자의 분리에 성공하였다. *mind bomb* 유전자 (*mib*)는 21개의 exon으로 구성되며, coding region만을 포함해서도 150kb 이상의 복잡한 genomic structure를 구성하고 있었다. *mind bomb* 유전자는 다른 동물모델에서는 전혀 언급이 되지 않았던 신규유전자로서, 인간과 마우스의 genomic atabase를 통하여

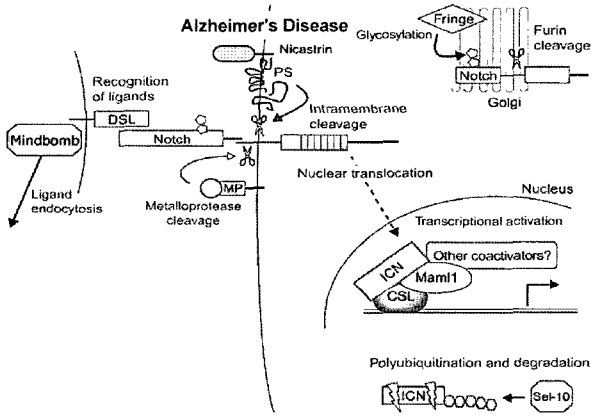



Fig. 4. The Notch signaling pathway (Nam *et al*, 2002).

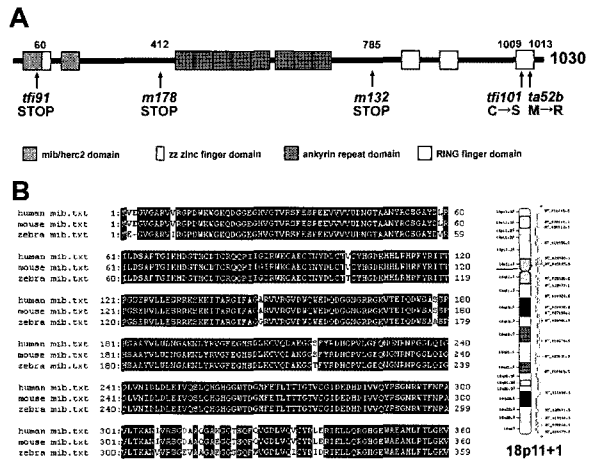



Fig. 5. A. Structure of zebrafish Mind bomb (Mib) protein. B. Mib proteins in mouse and human genome.

곧바로 상동유전자들을 밝혀낼 수 있었다. 흥미로운 것은 제브라피쉬에서 밝혀진 genomic structure가 human, mouse에서도 그대로 보존되어 있다는 사실과 아미노산 수준에서의 상동성을 살펴보면 높은 보존성을 보여주고 있다. 인간 *mib* 유전자의 지도는 18p11+1로 현재까지 등록된 관련 질환은 아직 보고되지 않고 있으나, Notch 신호전달의 유전자들이 이미 암이나, 치매 등과 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀져 있기 때문에 조만간 관련 질환의 규명이 기대되고 있다. *mib* 유전자의 기능 분석 결과, ubiquitin E3 ligase의 하나로서 Notch ligand인 Delta 단백질과 결합하여 trans-endocytosis를 통해 Notch의 활성화에 관여하는 것으로 추정하고 있다 (Fig. 5; Itoh, Kim *et al*, 2003). 현재까지 mouse *mib* 유전자에 대한 knock out이 성공하였으며, 특히 마우스에서는 conditional KO이 가능하기 때문에 다양한 조직에서의 Mib의 기능이 흥미진진하게 밝혀지고 있다 (포항공대 공영윤 교수). 이와 같이 사용하기 쉬운 동물모델인 제브라피쉬를 이용하여 먼저 중요한 신규유전자를 발굴하고, 곧바로 마우스에서 기능을 확인하고, 최종적으로 질환연구에 적용하는 유기적인 공동연구는 국가경쟁력 제고를 위해서 특히 절실하다고 본다. Ubiquitination은 과거에는 단순한 단백질의 분해 시스템으로만 알려져 왔으나, human genome project 결과, 500여 종류 이상의 ubiquitin E3 ligase의 존재가 확인되고 있으며, 이들 유전자들의 특이한 기능에 대하여 새로운 관심을 끌고 있다. 특히, Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease 등과 같은 퇴행성 뇌질환의 원인 유전자들이 protein ubiquitination/deubiquitination에 직접적으로 관여하는 것으로 밝혀지고 있으므로 이들 유전자들의 중요성이 더욱 고조되고 있다. 이상과 같은 결과들은 신경계의 노인성 질환에 직접적으로 관여하는 유전자들이 신경세포의 초기발생에 직접적으로 관여하고 있음을 나타냄으로써, 발생에 관련하는 유전자들의 연구가 질환연구에 얼마나 중요한 것인가를 단적으로 나타내고 있다. 특히, 최근에 제브라피쉬 발생배를 직접 이용한 Alzheimer's Disease의 후보치료

약에 대한 약효평가 (drug validation)는 질환모델 동물로서의 제브라피쉬의 활용도를 더욱 넓혀주고 있다 (Petit *et al*, 2003).

세계적으로는 확립된 수천의 제브라피쉬 돌연변이 주들을 대상으로 그 원인유전자를 밝히려는 연구가 경쟁적으로 진행되고 있다. 현재의 이러한 연구 분위기는 초파리 연구의 20-30년 전의 상황에 해당하며, 그동안 초파리나 선충이 생명과학의 전반에 미친 영향을 되돌아 볼 때, 향후 제브라피쉬에서의 연구결과가 생명과학의 발전에 미칠 파급효과는 짐작이 된다. 다음은 이러한 돌연변이들을 이용하여 실제 제브라피쉬를 인간의 질환연구모델로 사용하고 있는 최근의 연구결과들을 정리해보고자 한다.

## 3. 질환모델동물로서의 제브라피쉬 현황

제브라피쉬를 질환모델로 개발하고자 하는 노력은 기존의 마우스를 이용한 질환연구의 대부분을 대상으로 하고 있으며, 특히 p53 KO를 암연구모델로 개발한 것 (Berghmans, PNAS 2005)과 세계적인 제약회사인 Novartis가 제브라피쉬의 심혈관계 연구를 하고 있는 하버드 의대교수인 Dr. Mark Fishman을 미국연구소의 초대소장으로 영입했다는 사실 등으로 간단히 대변할 수 있다 (Nature Medicine 2002).

### 3-1. 심장 질환 (Heart Disease)

#### 3-1-1. 심장마비 (Heart Failure)

심장마비는 심장의 수축성 저하, 심박출량 (cardiac output)의 감소 그리고 얇아진 심실벽으로 인한 확장성 심장근육병증 (dilated cardiomyopathy)과 이와 반대로 심장의 수축성 증가와 근섬유 유전자의 돌연변이가 원인인 근섬유의 배열장애 (myofibrillar disarray)로 인한 두꺼워진 심실벽에 의한 비후성 심장근육병증 (hypertrophic cardiomyopathy)으로 나눌 수 있으며, 전체 심장마비의 대략 20% 정도가 유전적 요인에 의한 것이다. 제브라피쉬는 발생 하루만에 심장이 형성되어 박동이 시작되며 혈관내의 혈액세포의 흐름을 관찰할 수 있다. 1심방 1심실의 심장구조를 하고 있으나 이는 발생 3주째의 인간배아의 심장구조와 유사하며, 현재까지 심장장애를 일으키는 돌연변이가 약 40종류 정도 알려져 있다. 예로 심장의 수축에 결손을 보이는 *passive aggressive, hal, pickwick* 돌연변이들이 있으며, 특히 *pickwick* mutant의 원인 유전자인 *titin*은 인간의 확장성 심장근육병증의 원인 유전자로 밝혀져 있다 (Shin & Fishman, 2002. Rubinstein, 2003).

#### 3-1-2. 부정맥 (Arrhythmias)

부정맥은 심장의 박동이 정상적이지 못하여 생기며, 이는 특히 심실과 심방에서의 전기적 자극의 부정확한 전도나 심장박동의 automaticity의 장애로 인해 생긴다. 이는 모든 심장질환의 절반을 차지하며 돌연심장사 (sudden cardiac death)의 주된 원인이 된다. 제브라피쉬의 심장은 인간의 심장과 마찬가지로 electrical excitation이 동일한 양상을 나타내며 인간의 부정맥과 유사한 돌연변이로는 pacemaker에 문제를 보이는 *slow mo*와 *reggae*, 심방과 심실의 통로가 차단되는 *hiphop*과 *breakdance* 등이 있으며, 심방세동 (artrial fibrillation) 증세를 보이는 *island beat* (isl) 등의 mutant가 있다. 특히 *isl* mutant의 심장세동과 유사한 증세는 심장특이적 L-type calcium channel 유전자의 돌연변이에 의한 것이며, 이는 인간의 만성 심장세동과 관련되어 있다 (Shin & Fishman, 2002).

#### 3-1-3. 선천적 심장질환 (Congenital heart disease)

심장형성에 이상을 보이는 돌연변이로는 *heart and soul* (PKCλ)로 심방내에 심실이 형성되는 이상을 보이며, 심실이 작은 *handsoff* (bHLH dHAND)와 *pandora*, A-V valve 결손의 *jekyll* (UDP-glucose dehydrogenase) 등이 있다. Endoderm 결손에 따른 cardia bifida를 나타내는 *casanova*는 sox-related gene에 이상이 있는 것으로 밝혀져 있다 (Shin & Fishman, 2002).

### 3-2. 혈관 관련 질환 (Vascular Disease)

#### 3-2-1. 혈관형성 (vasculogenesis and angiogenesis)

발생배의 혈관형성은 큰 혈관 (동맥, 정맥)을 형성하는 vasculogenesis와 작은 혈관 (모세혈관)을 형성하는 angiogenesis의 2단계로 나눌 수 있으며, 특히

angiogenesis는 당뇨에 의한 망막의 장애 (diabetic retinopathy)나 종양의 전이 (metastasis)와 밀접하게 관련이 있기 때문에 임상적으로도 매우 중요하다. 체외발생과 투명한 제브라피쉬 발생배는 vasculogenesis와 angiogenesis를 관찰하기 위한 좋은 모델이다. *gridlock* 돌연변이 (bHLH *hey2*)는 동맥의 결손으로 혈액순환 장애를 보이는 돌연변이로써 인간의 선천적 대동맥협착증 (congenital disorder coarctation of aorta)과 결손 부위나 기능 장애가 매우 닮았다. *out of bounds* 돌연변이는 intersomitic vessel의 정상적 성장이 저해되며, 이는 angiogenesis의 억제인자를 찾기 위한 좋은 모델이라 할 수 있다. 이러한 모델은 혈관기능 저하에 따른 산소 결핍, 즉 ischemia 연구에도 이용되고 있다 (Shin & Fishman, 2002. Dooley & Zon, 2000).

### 3-3. 신장 질환 (Kidney Disease)

발생과정 동안 인간의 신장은 순차적인 kidney type (pronephros, mesonephros, 그리고 metanephros)으로 형성된다. 인간과 마찬가지로 제브라피쉬 또한 초기 발생배는 osmotic balance를 위해 필수적인 pronephric kidney를 가지고 있다. 비록 제브라피쉬의 pronephric kidney의 전체적인 구조가 metanephric kidney와 다르다 할지라도, 모든 kidney의 3가지 주된 기관 즉 glomerulus, tubules, 그리고 ducts를 가지고 있다. 제브라피쉬에서 glomerular cyst나 tubular cyst의 형성이 있는 pronephric kidney의 발생에 영향을 주는 많은 mutant들이 분리되어 있으며, 특히 *vHnf1* 유전자의 돌연변이는 MODY5 (maturity-onset diabete of the young, type Ⅴ), GCKD (glomerulocystic kidney disease)와 같은 신장질환을 나타내며, 이 유전자의 제브라피쉬 mutant 또한 간과 췌장의 장애를 나타내므로 MODY5와 GCKD의 발병기전 연구에 좋은 모델이 되며, *fleer*와 *elipsa* mutant는 신장과 망막의 장애를 보이며, 이는 인간질환 중 Senior-Loken syndrome에서 나타나는 증상과 매우 유사하다 (Shin & Fishman, 2002. Rubinstein, 2003).

### 3-4. 퇴행성 뇌질환 (Neurodegenerative Disorder)

#### 3-4-1. 알츠하이머병 (Alzehimer's Disease)

알츠하이머병은 가장 일반적인 퇴행성 뇌질환이며, 치매환자의 2/3를 차지하는 질환이다. 특히 cortex와 hippocampus 내의 신경세포가 특이적으로 결손되는 현상을 보이며, 임상학적, 병리학적 징후로는 기억 및 판단의 점차적인 상실, 언어장애, 신경세포의 죽음, peptide β-amyloid를 포함하는 extracellular senile plaque, microtubular protein tau의 hyperphosphorylation으로 인한 neurofibrillary tangle 등을 들수 있다. 유전적 요인은 amyloid precursor protein (APP), presenilin (PS)-1, presenilin-2, tau 유전자의 돌연변이가 알려져 있다. 제브라피쉬에서도 알츠하이머 병의 원인유전자들이 분리되어 있으며, 특히 frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) 환자의 뇌에서 분리한 tau의 돌연변이형을 제브라피쉬 뇌에 특이적으로 과발현시킨 형질전환동물에서 알츠하이머 환자의 뇌에서 관찰되는 것과 유사하게 제브라피쉬 뇌조직에서 neurofibrillary tangle이 관찰되었다 (Rubinstein, 2003, Tomasiewicz, 2002).

#### 3-4-2. 파킨슨씨병 (Parkinson's Disease)

파킨슨씨병은 알츠하이머병 다음으로 많이 발병하는 퇴행성 뇌질환이며, 임상적 징후로는 진전 (resting tremor), 근육강직 (rigidity), 서동 (bradykinesia), 자세불안정 (postural instability)을 보이며, 병리학적 징후로는 중뇌에 위치하는 흑색질 (substantia nigra)의 도파민성 신경세포 (dorpaminergic neuron) 내 inclusion body의 하나인 Lewy Body의 축적으로 선택적인 죽음을 보인다. 이 질환 또한 돌발성이 대부분을 차지하며, 유전적 요인으로는 α-Synuclein, Parkin, UCH-L1 등이 원인 유전자로 작용한다. 제브라피쉬에서도 이런 유전자들이 존재하며 신경세포에 특이적인 발현 양상을 보이며, 또한 인간에서 파킨슨씨병을 야기하는 화학물질인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)를 이용한 제브라피쉬 질환모델이 이용되고 있으며, 원인유전자의 돌연변이형을 이용한 파킨슨씨병을 가지는 형질전환동물을 만

드는 연구들이 진행되고 있다(Rubinstein, 2003).

### 3-5. 암 (Cancer)

최근 제브라피쉬를 이용하여 암 발생의 기초과정을 이해하기 위한 여러 시도들이 이루어지고 있다. 이런 연구들의 목적은 암 발생단계 동안 또는 전이과정 (metastasis)에 관여하는 유전자의 기능이나 새로운 유전자를 밝혀 궁극적으로 암 발생과정을 억제할 수 있는 신약을 개발하는데 있다. 암 관련 유전자 p53과 p53의 피드백 조절자의 하나인 Mdm2 유전자를 anti-sense morpholino를 이용한 knock-down 분석 결과, p53의 knock-down은 발생배에서 어떠한 표현형도 관찰할 수 없었지만 Mdm2의 knock-down은 심각한 성장저해와 p53 단백질의 증가를 유도하여 apoptosis를 보였으며, p53과 Mdm2의 double knock-down은 Mdm2의 knock-down에 의한 표현형을 완벽하게 회복시켰고, 이는 double knock-out mice에서와 동일한 결과였다 (Langheinrich *et al*, 2002). 또한 anti-cancer drug로 널리 사용되는 topoisomerase inhibitor camptothecin을 50-500 nM의 낮은 농도로 수정후 24~30시간 사이의 발생배에 처리하면 apoptosis를 유발하며 이는 포유류에서의 결과와도 동일하며, cyclin-dependent kinase inhibitor인 roscovitine을 처리할 경우, 종양세포에서 p53의 안정화와 활성을 유도하여 성장저해와 apoptosis를 일으킨다. 이렇듯 제브라피쉬에서는 암 관련 유전자의 knock-down 분석과 anti-cancer compound들을 이용한 다양한 연구를 통해 암과 관련된 새로운 유전자의 분리 및 기능분석 뿐만 아니라 small molecule들의 처리를 통해 anti-cancer drug의 개발에 유용한 모델로 사용할 수 있다.

### 3-6. 생체 리듬 (Circadian Rhythm) 및 약물 중독 (Drug Addiction)

Circadian clock이란 주위의 환경으로부터 생기는 light-dark cycle에 의해 reset되지만 외부 환경이 일정한 상태가 계속 유지될 때도 내부적인 pacemaker에 의해 일정한 리듬이 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한 리듬의 결과로 생물체의 생리, 호르몬 조절, 체온 조절, 항상성 유지 등을 조절하게 된다. 포유류에서는 time signal을 superchiasmatic necleus (SCN)에서, 제 3의 눈이라 불리는 송과체 (pineal body)로 보내어 생체시계를 제어하는 호르몬인 melatonin을 생성하여 생리적인 리듬을 조절하게 된다. 생체리듬에 관여하는 CLOCK, BMAL1, NPAS2 등의 유전자의 상동유전자들은 제브라피쉬에서도 존재하며, 특히 clock 유전자는 생체리듬의 주조절자로써 zfBMAL1과 zfBMAL2와 결합하여 생체리듬을 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한 light-dark cycle의 변화에 따라 그 발현 양상이 변하는 pineal body에 특이적으로 발현하는 유전자들에 대한 연구로 생체리듬을 이해하는데 기반을 마련하고 있다. 제브라피쉬를 이용한 약물 중독 실험은 매우 간단하다. Alcohol이나 cocaine과 같은 많은 중독성 물질들은 물에 첨가하여 발생배로 침투시킬 수 있으며, 이에 따른 행동의 변화는 해부현미경하에서 분석이 가능하며, 최근 cocaine에 반응을 보이지 않는 *dumbfish, jumpy, goody-two-shoes* 등의 돌연변이주가 분리되었으며, alcohol 중독에 관한 행동학적 그리고 유전적 연구들이 이루어지고 있다 (Shin & Fishman, 2002).

이상과 같은 질환모델로서의 연구 외에도 뼈의 형성, 즉 골다공증 (osteoporosis)의 연구에도 이용되고 있으며, 제브라피쉬에서의 calcification은 발생 5일째부터 시작된다. Chordin, CBFA1/RUNX2, FGFR3, PTH receptor, BMP, IHH 등의 유전자를 대상으로 연구가 진행되고 있다. 연골은 alcian blue, 뼈는 alizarin red로 염색하여 골형성을 관찰하고 있으나, calcein과 같은 fluorescent calcium chromophore로 살아있는 제브라피쉬 발생배를 이용할 수도 있다. 그 외에 무뇌증 (holoprosencephaly) 관련으로는 *sonic you (shh), you too (gli-2)* 등이 있으며, 두뇌형성에 이상이 있는 *cyclops* (nodal-related gene), *one-eyed pin-head* (EGF-related gene)도 알려져 있다. 아래턱의 형성에 이상이 있는 sucker는 *endothelin-1* 유전자로 밝혀졌다. Bone marrow aplasia, hematopoiesis, blood clotting 관련으로는 *cloche, weissherbst (ferroportin 1), yquem, dracula*

*(ferrochelatase), sauternes* (δ-aminolevulinate synthase) 등이 알려져 있으며, 적혈구의 모양에 이상이 있는 *riesling*은 β-spectrin 유전자에 이상이 있는 것으로 밝혀졌다.

## 4. 제브라피쉬를 이용한 형질전환동물의 제작

생명공학기술의 발달과 함께 유전자변형생물체(Genetically Modified Organism, GMO)가 개발되어 점진적으로 산업화 추세에 있다. 세계적으로는 이미 연어, 무지개송어 등의 GMO들이 개발되었다. 이들이 아직까지는 상업적 유통은 되지 않고 있지만 조만간 이들 어류 GMO들의 국가 간 이동도 피할 수 없는 실정이다. 이에 따른 어류 GMO에 대한 안전성 대책이 시급하며 여기에 제브라피쉬의 활용이 고려되고 있다. 이는 향후 해양수산생명체를 이용한 생명공학 분야에도 그 활용이 매우 기대되는 것으로서 GMO 개발 및 안전성 평가모델의 실험어로서 개발이 가능하다.

농수산물분야의 GMO는 이미 수천종 이상이 개발되었으며 상당수 산업화에 성공하고 있다. 어류 GMO의 경우에는 유전자 재조합기술을 이용해 고성장이나 질병내성 등의 특정형질을 나타내는 송어 및 연어, 잉어 등에서 성장 가속에 의한 생산기간 단축과 사료효율 개선이 보고되고 있으며 점차 그 기술들은 다양한 어종으로 확대되고 있다. 실제적으로 수산물 GMO는 90년대부터 캐나다와 미국에서 고성장, 항동결 등의 특성이 있는 연어와 송어를 개발하였고 현재 미국 FDA에서 식품승인 과정에 있다. 이런 상황에서 최근 형광제브라피쉬 Glofish가 관상용으로 미국 FDA의 승인을 받은 것은 획기적인 일이다 (FDA 2003).

GMO 제작에는 어종의 형질을 향상시키기 위한 형질전환용 유전자의 개발과 이들 유전자들을 성공적으로 이식하기 위한 발현벡터의 개발, 유전자 도입기술의 개발 및 안정된 GMO의 선별, 유지 등의 연구수행이 그 과제라 할 수 있다. 발현벡터의 경우에는 형질전환유전자를 과량 발현시키는 프로모터나 특정 조직에 선택적으로 발현시키는 프로모터, 특정한 시기에 필요에 따라 유전자 발현을 유도할 수 있는 프로모터들이 개발되고 있다. 대표적으로 beta-actin promoter와 heat shock promoter 등이 개발되어 있다. 또한 형질전환 생물체를 선별, 유지 및 통제하기 위한 모니터링 시스템이 필수적인데 여기에는 형질전환 유전자를 직접 대상으로 한 DNA 증폭 즉, PCR 방법을 이용하거나 형광단백질(GFP, Green Fluorescence Protein)유전자를 사용하는 방법이 있다.

제브라피쉬는 발생초기에는 투명하기 때문에 특히 GFP를 이용한 동물 생체 내에서, 그것도 세포수준에서의 연구를 가능하게 하고 있다. 신경세포특이적인 유전자 promoter를 이용하여 붉은색 GFP (DsRed)를 살아있는 신경세포에 발현시키고, 또한 혈관세포특이적인 유전자 promoter를 이용하여 초록색 GFP를 발현하는 double transgenic zebrafish의 제작도 가능하며, 이를 이용한 신경세포와 혈관세포 간의 상호작용에 대한 연구가 현재 본 저자의 연구실에서 진행 중이다 (Fig. 6).

그리고, 형질전환동물의 용이한 구별을 위하여 새로운 reporter system의 개발에 노력하고 있다. 여기에는 MCH (melanin-concentrating hormone) 유전자를 이용하고 있으며, 유전자 발현에 의하여 체색이 변화하므로 형질전환동물의 식별이 매우 용이하다 (Fig. 7). 이는 insertional mutagenesis에서 획기적인 방법이며, 국내 상황에서와 같이 한정된 공간과 인력에서도 mutagenesis의 접근을 가능하게 한다 (Fig. 8). 특히 transposon system과 병행한 enhancer trap, gene trap으

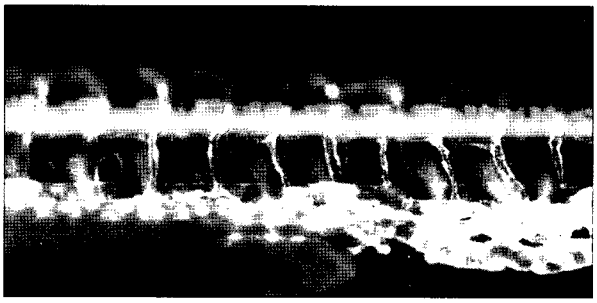


Fig. 6. Interaction between neuronal cells (red) and vessel cells in living double transgenic zebrafish.

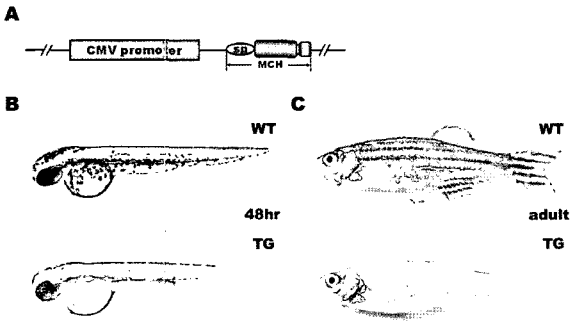



Fig. 7. Establishment of CMV-*mch* transgenic animals. A. Construction of CMV-*mch* vector. B. Early detection of transgene in zebrafish embryos. C. Easy identification of transgenic animals by body color change.

로 새로운 mutant를 효율적으로 제작하고 원인유전

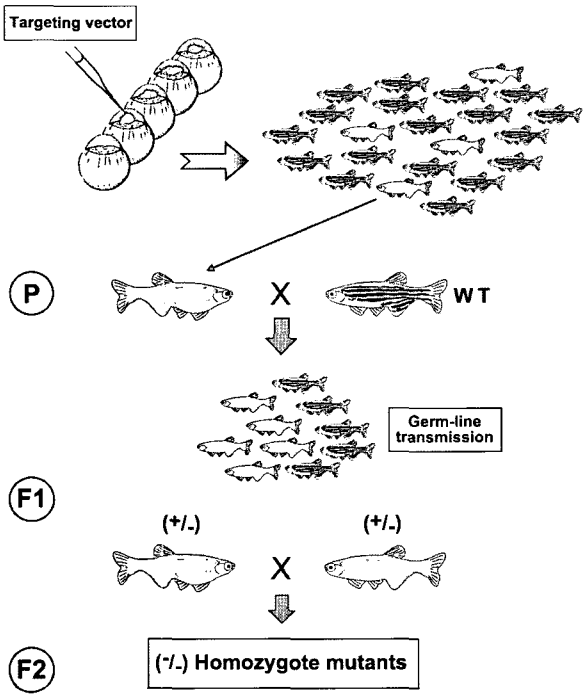



Fig. 8. A new strategy for insertional mutagenesis in zebrafish.

자를 밝혀 새로운 기능성유전자의 발굴에 커다란 도움이 될 것이다. 현재까지, *ondal, moguri, samdori, hayan-4* 등의 새로운 mutant가 분리되어 원인유전자의 규명과 함께 기능분석이 성공리에 진행되고 있다 (황금물고기 프로젝트).

## 5. Genome-wide, functional screening of human genes in zebrafish

제브라피쉬의 수정란을 대량으로 쉽게 확보할 수 있다는 것과, 발생이 매우 빨라 대부분의 조직 및 장기가 하루만에 형성된다는 것, 그리고 척추동물로서 유전체 구성이 인간과 비슷하다는 사실들을 활용하여, 인간유전자를 곧바로 제브라피쉬에 도입하여 기능분석을 하자는 시도가 진행되고 있다 (10,000 마이크로인젝션 프로젝트). Expression cloning이라고도 부르는 이 방법은 애초 *Xenopus egg*를 이용하여 새로운 유전자를 찾는데 성공적인 결과들을 얻어왔으나, 제브라피쉬에서의 차이점은 *Xenopus*의 경우처럼 수백, 수천의 유전자 clone들의 pool을 하나의 수정란에 주입하지 않고, 수정란의 취득이 쉽다는 점을 최대한 활용하여 유전자 clone 하나 하나를 제브라피쉬 수정란에 microinjection하여 그 결과를 바로 다음날 검증할 수 있다는 것이다. 특히 인간유전체 연구의 한 방향은 Unigene collection이라 하여, 인간유전체 전체인 25,000 유전자들을 full-length cDNA 형태로 clone 하나 하나씩을 확보해 가고 있다. 국내의 경우에는 10,000 여개의 인간유전자가 확보되어져 있다 (한국생명공학연구원 김남순 박사). 현재 이들 인간유전자들을 제브라피쉬에 microinjection하여 새로운 유전자원을 확보하기 위한 노력이 진행중에 있으며, 여기에는 비슷한 phenotype (synphenotype)이 유사한 molecular signaling pathway에 관여할 것이라는 추정으로 유전자 기능을 분류하고 있다 (phenotype-based screening). 분류에 사용하는 기준은 다음과 같다. 1. early embryo death (<6h), 2. gastrulation defect, 3. anterior defect (headless, small eye), 4. dorsalized, 5. double axis, 6. shortened anteroposterior axis, 7. posterior defect (ventralized), 8. midline defect (somite, notochord), 9. neuronal apoptosis, 10. circulation defect, 11. angiogenesis, 12. bending, 13. yolk extension, 14. edema, 15. pigmentation

아래는 TGF family에 속하는 BMP의 mRNA 발현의 양에 따라 달리 표현되는 phenotype의 예를 Fig.

9에 나타냈으며, 또한 이 10,000 마이크로인젝션 프로젝트 과정 중에 얻어진 #498 clone을 실제 암환자에 적용한 경우도 일부 소개하였다. 암발생의 초기단계인 stage IA, IB의 6명의 위암환자 중 4 환자에서 (67%) #498 유전자의 유의한 증가가 보여졌다 (한국생명공학연구원 김남순 박사). 이 유전자와 위암발생과의 관계여부에 대한 후속연구가 시급한 실정이다.

## 6. 제브라피쉬 홈페이지

제브라피쉬는 다른 모델동물에 비하여 최근에 도입되었으나 관련 연구실들이 전세계적으로 급속히 증가하고 있는 실정이다. 마우스를 비롯한 기존의 다른 모델동물에서 목적으로 하였던 다양한 연구분야의 적용과 함께 제브라피쉬 특유의 장점을 이용한 새로운 연구기술의 개발이 속속 보고되고 있다. 제브라피쉬 연구자들은 다른 분야에 비하여 상대적으로 젊고 진취적이고 상호협력적이라 할 수 있다. 아직 positional cloning으로 원인유전자를 밝혀야 할 수많은 돌연변이들이 mutant bank를 통하여 공유가 가능하며, 유전자마커과 같은 기본적인 실험재료들과 관련기술들이 자유로운 분위기 속에서 상호교환되고 있다. 이상과 같은 제브라피쉬에 관련된 모든 정보들은 제브라피쉬 홈페이지를 통하여 접근이 가능하다 (http://zfin.org).

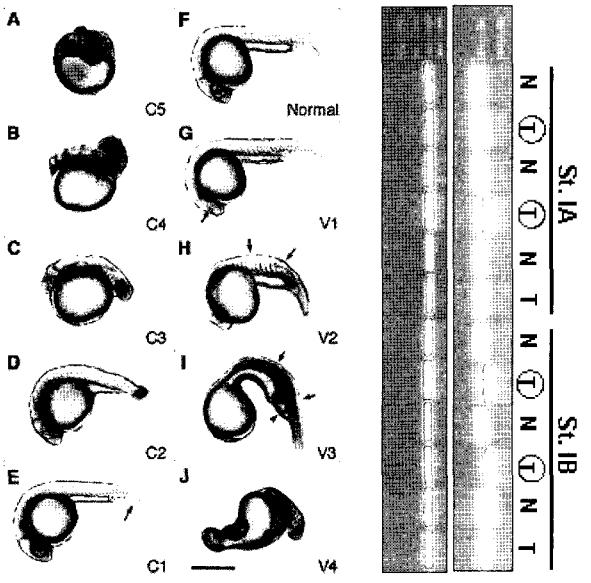



Fig. 9. Injection of BMP mRNA into swirl mutants, resulting in various morphological phenotypes from dorsalized to ventralized (*swirl*/bmp2b - *snailhouse*/bmp7 - *somitabun*/smad5 - *mini fin*/ tolloid - *lost-a-fin*/alk8 - *chordino*/chordin - *ogon*/sizzled - *tokkaebi*). Expression of #498 in early stages (St. IA and St. IB) of human stomach cancer tissues (N, normal tissue; T, tumor tissue from each patient, respectively).

## 참고문헌

Dattani MT *et al.*, (1998). *Nature genetics* 19:125-133.
Dooley K, Zon LI (2000). *Curr Opin Genet Dev* 2:49-51.
Fishman MC (2001). *Science* 294:1290-1291.
Itoh M, Kim CH *et al.*, (2003). *Dev Cell* 4:67-82.
Kim CH *et al.*, (1997). *Neurosci Lett* 239:113-116.
Kim CH *et al.*, (2000). *Nature* 407:913-916.
Kojima T *et al.*, (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci* 88:4343-4347.
Langheinrich U *et al.*, (2002). *Curr Biol* 12:2023-2028.
Mathers PH *et al.*, (1997). *Nature* 387:603-607.
Miller JR *et al.*, (1999). *J. Cell Biol* 146:427-437.
Nam Y *et al.*, (2002). *Curr Opin Chem Biol* 6:501-509.
Petit A *et al.*, (2003). *J Neurosci Res.* 74:370-377.
Rubinstein AL (2003). *Curr Opin Drug Discov Devel* 6:218-223.
Shin JT *et al.*, (2002). *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:311-340
Tomasiewicz HG *et al.*, (2002). *J Neurosci Res* 70:734-745.