

인간 신장질환 유발인자가 발현하는 형질전환 초파리 구축

구태원 · 권기상¹ · 권오유^{1*}

농업과학기술원 농업생물부, ¹충남대학교 의과대학 해부학교실

Received April 16, 2007 / Accepted April 26, 2007

Construction of the Transgenic *Drosophila melanogaster* Expressing a Human Megsin Gene. Tae Won Goo, Ki sang Kwon¹ and O Yu Kwon^{1*}. Department of Agricultural Biology, Rural Development Administration, Suwon 441-853, Korea. ¹Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-747, Korea – IgA nephropathy (IgAN) is considered to be a multifactorial disease with genetic and environmental factors contributing to its pathogenesis. The genes involved in susceptibility and progression of the disease have not yet been clearly elucidated. Megsin is an important candidate gene, predominantly expressed in glomerular mesangium and upregulated in IgAN. To understand biological function of megsin, in this work we have produced transgenic *D. melanogaster* fly overexpressing human megsin (*actin-gal4>UAS-Megsin* fly). Introduced human megsin was confirmed by RT-PCR and Western blotting, respectively. Its phenotype is melanin deficiency-abdomen and the megsin gene is stably transferred to the next generations.

Key words – IgA nephropathy (IgAN), *Drosophila melanogaster*, megsin

서 론

IgA 신증 (IgA nephropathy; IgAN)은 면역글로불린A (IgA)가 신장 사구체 (kidney glomerulus)에 침착되는 사구체신염으로서 혈뇨, 단백뇨가 나타난다[5]. 정확한 원인은 아직 완전히 알려지지 못했지만 IgA의 구조 이상이나 과다한 IgA가 생산되어 사구체에 침착되어 병변이 일어나는 것으로 알려지고 있다[7]. IgAN의 특징은 비교적 젊은 남자에 많고, 가족력이 있으며, 우리나라를 포함한 동양권 국가에 가장 흔한 사구체신염으로 10년 생존율은 80%정도이며 우리나라 혈액투석환자의 7-10%는 이 IgAN으로 인한 말기 신부전이다. 그러나 현재로는 확실한 진단 및 치료방법이 없는 상태이다. 지금까지 축적된 IgAN의 원인은 mesangium 세포의 증식에 의한 사구체혈류 저해가 주요인이라고 생각하고 있다 [11]. 이런 이유로 사람의 mesangium 세포에서 특이적 유전자를 발견할 수 있으면, 질환 진단과 치료에 매우 유익한 것으로 생각된다.

최근에 일본 Tokai University School of Medicine의 Kurokawa 박사팀은 Mesangium-predominant gene (Megsin)을 새로운 고속 DNA 염기배열해석법과 컴퓨터-데이터 프로세싱을 이용해, 신장 이외 조직 및 세포와 비교하는 방법으로 분리하였다[4]. Megsin이란 이름은 mesangial cell-specific gene with homology to serpin에서 유래되었다. Computer modeling 분석결과 다른 종류의 serpin과 아주 유사한 구조를 가지며, 사람 megsin cDNA는 1,140 nt로 380 aa를 코드

하고 있으며 염색체 18q21.3의 위치에 존재한다. 염기서열을 비교분석한 결과 새로운 serpin (serine protease inhibitor) family로서 사람 신장 사구체 mesangium 세포에 특이적으로 발현하는 것과 함께 IgAN에서 mesangium의 증식과 동반하여 발현하고 있음을 증명하였다. 이는 세계에서 처음으로 megsin이 사람 mesangium 증식성 IgAN의 주원인일 가능성을 제시한 것이다[10]. 특히, 이때에 mesangium 세포의 소포체 (endoplasmic reticulum; ER)내에 inclusion body가 형성하는 것과 소포체내에 존재하는 ER chaperone의 발현이 함께 증가하는 것으로 보아 IgAN은 ER stress와 밀접한 관계를 가지고 있음을 알았다[8]. 즉, 사람 IgAN은 serpinopathy로서 ERSD (ER storage disease)와 밀접한 관계를 가질 것이라는 가능성을 제시하였다. 본 연구자는 megsin의 억제 및 조절인자를 찾는다면 IgAN의 진단 및 치료에 획기적인 전기가 될 것으로 판단하여 megsin 관련인자를 찾기 결정하였다. Mesangium 세포를 사용한 실험도 생각할 수 있지만, 실제로 동물조직에서 mesangium 세포를 100%순수하게 분리할 수 없으며 세포수준의 실험에서 많은 장애가 있다. 그래서 초파리의 Gal4-UAS system을 이용하여 megsin이 overexpression 하는 유전자 변형 초파리를 만드는 것이 먼저 이루어져야한다[2].

사람 megsin cDNA를 Kurokawa 박사로부터 분양받아 *Drosophila*의 Gal4-UAS system을 이용한 megsin이 과발현하는 transgenic *Drosophila*를 만들었다[2]. 외형적인 특징은 WT에 비하여 *actin-gal4>UAS-Megsin*은 약한 복부에 melanin deficiency를 보였다. 실제로 사람 megsin이 초파리에 발현하는지는 RT-PCR로 확인하였으며, megsin 단백질의 확인은 anti-megsin antibody로 확인하였다. 그리고 megsin 유전

*Corresponding author

Tel : +82-42-580-8206, Fax : +82-42-586-4800

E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

자는 다음세대에도 안정적으로 전달되었다.

재료 및 방법

Gal4-UAS system

Yeast transcriptional activator인 Gal4는 *Drosophila*에서 upstream activating sequence (UAS)와 유전자를 삽입하고 Gal4가 UAS에 결합함으로써 유전자 발현을 조절할 수 있다. Gal4 gene은 *Drosophila* genome에 enhancer-trap line을 생성하기 위해 random position으로 삽입되고 가까운 곳에 있는 genomic enhancer의 조절 하에 Gal4가 발현된다. Gal4의 발현은 tissue-specific pattern으로 일어난다. 그러므로 유전자의 발현은 적절한 Gal4 enhancer-trap line과 crossing 함으로써 UAS-gene transgene 유도함으로 일어난다.

Transgenic *Drosophila* 만들기

Kurokawa 박사로부터 받은 사람의 megsin cDNA는 kozakATG로 시작하여 C-Myc+His로 제조되어 있으며 이를 Kpn I 과 Xba I 으로 자른 후 pUAST vector로 서브클로닝 하였다. 클로닝 된 plasmid를 1~1.5 µg/µl 로 정제하여 10 µl을 GenExel(주)에 transgenic fly generation service를 의뢰하였고, 이를 transposon-mediated mutagenesis를 통해 transgenic *Drosophila*를 제작 선별하였다. Transposon-mediated mutagenesis는 두 개의 plasmid (defective P element와 helper P element)를 w1118의 embryo에 injection하여 G0 세대의 adult를 모두 각각의 w1118과 crossing 하여 G1세대에서 눈의 색에 색깔을 띠는 adult를 선별하는 방법이다. 이러한 방법으로 32개 line의 color eye line을 확보하였다.

Megsin의 발현 및 발현 확인

UAS-megsin line을 각각 enhancer-trap Gal4 line (*w-;Actin5c-gal4/CyO;+/+*)과 crossing 하여 Megsin이 발현되는 form인 *w-;Megsin/Actin5c-gal4;+/+(actin-gal4 > UAS-megsin)*와 발현되지 않는 control, *w-;Megsin/CyO;+/+(UAS-megsin)*을 얻었다. WT과 더불어 *actin-gal4 > UAS-megsin*, UAS-megsin의 초파리 adult를 harvest 하여 RNA와 단백질을 분리하여 각각 RT-PCR과 Western blotting 을 통해 megsin이 발현됨을 확인하였다.

항체제작

사람의 Megsin 단백질로 polyclonal 항체를 만들기 위해 *E. coli* 과잉발현 vector (pET28a, novagene)에 kozakATG로 시작하여 C-Myc+His로 제조된 사람의 Megsin을 코딩하고 있는 cDNA를 삽입하였다. 다량의 단백질을 얻기 위하여 1L 배양하고 여기에서 얻어진 단백질을 정제하여 항체제작

서비스 (랩프린티어)를 통해 항체를 제작하였다. 또한 megsin peptide 1 (aa 72-86) region을 항원으로 정하고 인공 합성하여 항체제작 서비스 (랩프린티어)를 통해 항체를 제작하였다.

결과 및 고찰

Mesangial 세포는 kidney glomerulus의 모세혈관주위에 존재하는 특수화된 세포이다[3]. Fenestrate의 glomerular filtration 조절, extracellular matrix, phagocyte의 기능을 담당한다. 그리고 distal convoluted tubule의 macula densa와 juxtaglomerular apparatus 만들어 kidney의 혈류를 조절 (renin-angiotensin-aldosterone system)기능도 가진다[6]. 이와 같이 kidney가 정상적인 kidney의 기능을 가지기 위해서는 건강한 mesangial 세포가 존재하는 것이 가장 중요하다.

Megsin이 과발현하는 transgenic mice는 심각한 glomerular abnormality를 보인다[9]. 특히 glomerulus가 정상보다 커지는 것과 함께 mesangial cell에서 megsin이 강한 발현을 보인다. 환자의 신자에서는 정상인의 신장에 비하여 megsin이 약 30%정도 과발현된다. Mesangial cell을 ER stress inducible 상태 (당쇄저해, 칼슘교란, NO donor, oxidative stress, 과포도당)를 만든 결과 ER chaperone이 정상에 비하여 높은 발현을 보였다[1]. 이런 세포반응을 UPR (unfolded protein response)라고 하며 전형적인 ER stress 상태를 보인다. Anti-megsin antibody를 사용한 immunoelectron microscopy의 관찰 결과 megsin이 electron-dense inclusion bodies에 집중되었다. IgA 신증환자의 mesangial 세포는 serpin의 변성구조로 인한 세포내 retention과 inclusion body가 나타나는 것이 특징인 serinopathy와 변성단백질이 소포체내의 ER chaperone에 retention되는 ERSD의 공통적인 세포병리현상을 보인다. 그런 의미에서 IgA 신증환자에서 특이적으로 발현하는 megsin 단백질의 연구는 학문적으로 단백질 conformation의 변화에 의해서 유발되는 serinopathy와 ERSD이 공통된 분자메카니즘을 가진다는 것을 증명할 수 있다고 생각된다.

Megsin의 생물학적 기능을 이해하기 위하여 *Drosophila* Gal4-UAS system을 이용하였다 (Fig. 1). 그 이유는 동물의 kidney에서 mesangium 세포를 순수하게 분리할 수 없으며, 계속적인 계대배양도 곤란한 상태이다. 전체대사와 밀접한 관계를 거치는 kidney 연구를 위하여서는 세포수준의 실험에서 많은 장애가 있다. 그래서 *Drosophila* Gal4-UAS system을 이용하여 megsin이 overexpression 하는 유전자 변형 *Drosophila*를 만드는 것이 필요하다. 인간형 megsin이 과발현하는 transgenic *Drosophila* (*actin-gal4 > UAS-Megsin* fly)를 만들었다. 이 형질전환체의 유전적 표현형은 melanin deficiency-abdomen을 보였다 (Fig. 2), 후세대에서 형질전환체

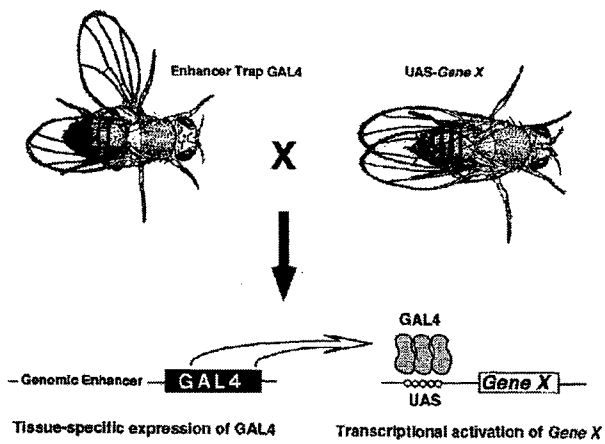


Fig. 1. The UAS/GAL4 system in *D. melanogaster*. When males carrying a GAL4 which controlled by the tissue-specific genomic enhancer are mated to females carrying UAS connected with Gene X (in this here human megsin). Expressed GAL4 recognizes UAS and then finally Gene X is expressed in the next generation fly.

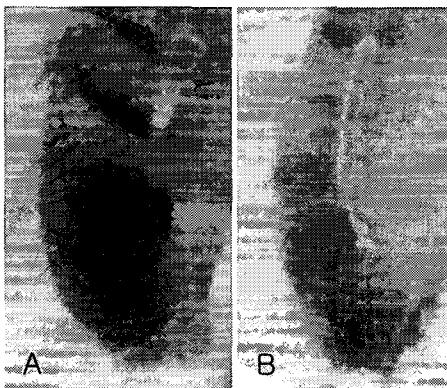


Fig. 2. Phenotype of the transgenic *D. melanogaster* expressing human megsin. The phenotypes of the wild type fly (A) and *actin-gal4>UAS-Megsin* fly (B). In the only male F1 progeny of *actin-gal4>UAS-Megsin* fly has the melanin deficiency-abdomen phenotype.

를 고르기 위하여 육안 표식으로도 사용된다. 인간형 megsin 이 도입된 형질전환체에서 발현하는 megsin의 mRNA를 RT-PCR방법으로 확인하였다 (Fig. 3). 비록 유전자가 도입되어있어도 *actin-gal4*로 induction 시키지 않으면 Fig. 3의 lane 2와 같이 아주 약한 존재가 확인될 뿐이지만 *actin-gal4*로 induction되면 Fig. 3의 lane 3과 같이 강한 발현이 확인되었다. 이처럼 발현된 인간형 megsin 유전자가 *Drosophila* 체내에서 정상적으로 translation되어 단백질로 만들어지는 것을 Western Blotting으로 확인하였다 (Fig. 4). Fig. 3에서와 같이 *actin-gal4*로 induction된 형질전환체에서 megsin밴드가 확인되었다.

앞에서 설명한 것과 같이 IgA 신증환자의 mesangial 세포에 megsin의 강한 발현과 inclusion이 관찰되는 것으로 보아

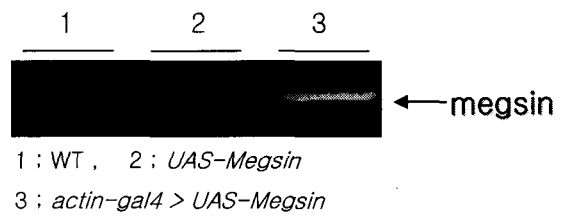


Fig. 3. Detection of human megsin mRNA from the transgenic *D. melanogaster* by RT-PCR. Human megsin transcript levels of WT (lane 1), *UAS-Megsin* (lane 2) and *actin-gal4>UAS-Megsin* (lane 3), respectively, were determined by RT-PCR. The actual amounts of human megsin transcripts were detected in *UAS-Megsin* fly (weak) and *actin-gal4>UAS-Megsin* fly (strong).

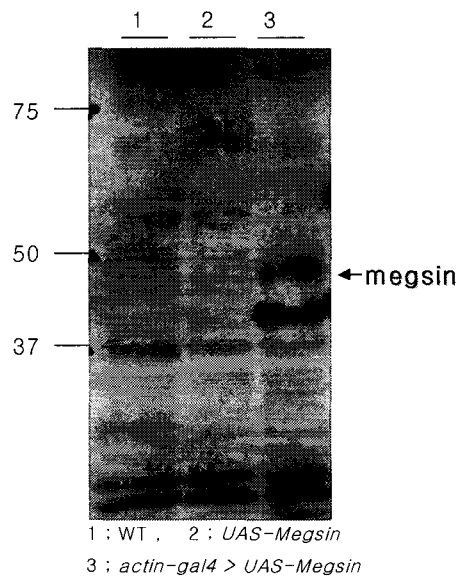


Fig. 4. Detection of human megsin from the transgenic *D. melanogaster* by Western blotting. Transgenic *D. melanogaster* expressing human megsin was detectable as an 48 kDa band with anti-human megsin antibody. Soluble homogenates from 10 wild-type fly whole bodies (lane 1; WT), 10 transgenic fly bodies (lane 2; *UAS-Megsin*), and 10 transgenic fly bodies (*actin-gal4>UAS-Megsin*) are shown after SDS-PAGE in an immunoblot detected with anti-human megsin antibody.

megin 단백질이 병태생리학적으로 관여하고 있다는 것을 시사한다. 그래서 megsin 단백질은 IgA 신증환자의 치료를 위한 신약개발의 중요한 target이 되는 분자로 생각되어 아주 흥미를 모으고 있다. 본 연구자 역시 megsin이 신장질환 치료 약의 신약개발의 중심에 있다는 것에 주목하여 megsin의 유전자활성/억제 혹은 단백질활성/억제를 조절할 수 있는 단백질을 탐색하려고 한다. 연구시설과 인력 등을 고려하여 대규모의 단백질해화합물질을 screening 하는 것은 어려운 상태라서, 우선 작은 실험실에서 할 수 있는 접근방법으로 *Drosophila Gal4-UAS* system을 사용하기로 하였다. 특히

megsin 유전자는 WT *Drosophila*가 가지고 있지 않으며 transgenic *Drosophila*는 눈으로 식별할 수 있는 phenotype을 나타내는 장점을 가지고 있어 사람 megsin의 분자생물학적 접근이 아주 용이하다. 결국 사람 megsin 유전자 산물과 interaction 하는 인자를 screening하여 mesangial 세포내에서 직접 그 작용을 이해함으로써 megsin을 통한 IgA 신증환자를 위한 신약으로 사용 할 수 있을 것이다.

요 약

IgA nephropathy (IgAN)의 정확한 병리적 기전은 아직 완전히 알려지지 못했지만 유전적 혹은 환경적요인인 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근엔 IgA의 구조 이상이나 과도한 IgA가 생산되어 사구체에 침착되어 병변이 일어나는 것이 보고되고 있다. Megsin은 glomerular mesangium에서 지배적으로 발현되며 IgAN에서 과발현된다. Megsin의 생물학적 기능을 이해하기 위하여 인간형 megsin이 과발현하는 *D. melanogaster* 형질전환체 (*actin-gal4>UAS-Megsin* fly)를 만들었다. 이 형질전환체의 유전적 표현형은 melanin deficiency-abdomen이며 도입된 유전자와 단백질의 발현은 각각 RT-PCR과 Western blotting을 로 확인되었으며 megsin 유전자는 안정적으로 자손에게 유전되었다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 논 문

1. Cheng, D. W., Y. Jiang, A. Shalev, R. Kowluru, E. D.

- Crook and L. P. Singh. 2006. An analysis of high glucose and glucosamine-induced gene expression and oxidative stress in renal mesangial cells. *Arch. Physiol. Biochem.* **112**, 189-218.
2. Duffy, J. B. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.
3. Herrera, G. A. 2006. Plasticity of mesangial cells: a basis for understanding pathological alterations. *Ultrastruct. Pathol.* **30**, 471-479.
4. Inagi, R., M. Nangaku, T. Miyata and K. Kurokawa. 2003. Mesangial cell-predominant functional gene, megsin. *Clin. Exp. Nephrol.* **7**, 87-92.
5. Lai, A. S. and K. N. Lai. 2005. Molecular basis of IgA nephropathy. *Curr. Mol. Med.* **5**, 475-487.
6. Lai, K. N., L. Y. Chan, S. C. Tang, A. W. Tsang, F. F. Li, M. F. Lam, S. L. Lui and J. C. Leung. 2004. Mesangial expression of angiotensin II receptor in IgA nephropathy and its regulation by polymeric IgA1. *Kidney Int.* **66**, 1403-1416.
7. Lai, K. N., L. Y. Chan and J. C. Leung. 2005. Mechanisms of tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* **94**, S110-115.
8. Miyata, T., R. Inagi, S. Sugiyama and N. Usuda. 2005. Serpinopathy and endoplasmic reticulum stress. *Med. Mol. Morphol.* **38**, 73-78.
9. Onogi, H., R. Inagi, M. Nangaku, Y. Ueda, T. Miyata and K. Kurokawa. 2004. Accelerated glomerular injury in hemi-nephrectomized transgenic mice of mesangial cell-predominant serpin, megsin. *Nephron Exp. Nephrol.* **96**, 127-133.
10. Onogi, H., R. Inagi, T. Miyata, M. Nangaku and K. Kurokawa. 2004. Proteomics and mesangial cell: serpin, megsin and plasmin. *Contrib. Nephrol.* **141**, 212-220.
11. van der Boog, P. J., C. van Kooten, J. W. de Fijter, and M. R. Daha. 2005. Role of macromolecular IgA in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **67**, 813-821.