

## 임신일령에 따른 생쥐 태아 뇌조직의 단백질 발현 양상 분석

한영훈<sup>1</sup> · 김홍래<sup>1</sup> · 조운비<sup>1</sup> · 우제석<sup>2</sup> · 진동일<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 동물자원생명과학과, <sup>2</sup>국립축산과학원

### Analysis of brain protein expression in developing mouse fetus

Rong-Xun Han<sup>1</sup>, Hong-Rye Kim<sup>1</sup>, Yun-Fei Diao<sup>1</sup>, Je-Seok Woo<sup>2</sup>, Dong-Il Jin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Science & Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

<sup>2</sup>National Institute of Animal Science, Suwon, Gyeonggi-do, 441-706, Korea

Received on 6 February 2011, revised on 28 February 2011, accepted on 9 March 2011

**Abstract** : Development of mouse fetus brains can be defined morphologically and functionally by three developmental stages, embryo day (ED) 16, postnatal stage one week and eight weeks. These defined stages of brain development may be closely associated with differential gene expression rates due to limited cellular resources such as energy, space, and free water. Complex patterns of expressed genes and proteins during brain development suggests the changes in relative concentrations of proteins rather than the increase in numbers of new gene products. This study was designed to evaluate early protein expression pattern in mouse fetus brain. The mouse brain proteome of fetus at ED 15.5, and 19.5 was obtained using 2-dimensional gel electrophoresis (DE). Analysis of the 2-DE gels in pH 3-10 range revealed the presence of 15 differentially expressed spots, of which 11 spots were identified to be known proteins following MALDI-TOF analysis; 3 spots were up-regulated and 8 spots were down-regulated in the mouse fetus brain at ED 15.5. UP-regulated proteins were identified as MCG18238, isoform M2 of pyruvate kinase isozymes M1/M2, isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2, creatine kinase B-type, 40S ribosomal protein SA and hemoglobin subunit beta-H1. Down-regulated proteins were putative uncharacterized protein, lactoylglutathione lyase and secreted acidic cysteine rich glycoprotein. Our results revealed composite profiles of mouse fetus brain proteins related to mouse fetus development by 2-DE analysis implying possible roles of these proteins in neural differentiation.

**Key words** : Mouse fetus, Brain proteins, 2-DE.

## I. 서론

뇌는 동물의 신경계를 통합하는 최고의 중추로서 형태적·기능적으로 가장 상위차원에서의 통합을 실행하는 부분으로서 뇌의 무게는 신체의 2%를 차지한다. 생쥐 뇌 발달의 경우 출생 전인 임신 16일, 출생 후 일주일과 8주에 형태적으로 뚜렷한 3개의 발육단계를 가지고 있다(Seefeldt 등, 2006). 마우스에서 태아의 뇌 발육은 다능성을 가진 외배엽 유래 간세포로부터 신경원세포와 신경아교세포로 분화되는 단계로 나눌 수 있다. 생쥐의 대뇌발육의 초기단계에 신경전구세포가 유사분열을 통하여 세포수가 증가되는데

임신 11.5일에 신경전구세포로부터 신경세포로 분화될 뿐만 아니라 동시에 비대칭분열을 통하여 자아갱신(self-renewal)을 한다. 이후의 단계에는 신경전구세포는 다시 대칭분열을 시작하는데 이때부터는 신경세포만을 생산한다. 대부분의 신경아교세포의 발생은 출산 후 일어나지만 신경아교세포는 임신 17일에 나타나기 시작한다(Hirabayashi 등, 2005; Gotz 등, 2005; Qian 등, 2000). 따라서 신경세포의 분화와 증식은 임신초기에 동시적으로 진행되고, 그 후 신경전구세포의 분화와 증식에 관계되는 많은 복잡한 세포의 구조와 구성에서의 변화가 일어난다(Guillemot 등, 2007). 하지만 이러한 변화들은 모체의 영양상태와 신진대사상태뿐만 아니라 산소공급상태 등에도 영향을 받는다(Kaindl 등, 2006). 대뇌신경세포메커니즘에 대한 연구는 파킨슨병과 알츠하이머병 그리고 헌팅턴 무도병과 같은 신

\*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5876

E-mail address: dijin@cnu.ac.kr

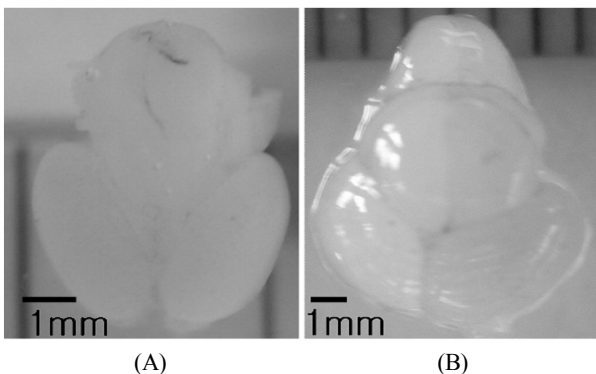
경계통 질병의 진단 등 이유로 이미 많이 진행되어 있는 상태이다(Greenberg 등, 2006). Kagami와 Furuichi(2001)은 RNA수준에서 임신18일과 출생 후 1, 14, 21, 56일 생쥐 뇌조직을 Genechip을 이용하여 분석한 결과 출생 후 81.6%(12,654개중의 10,321개)의 유전자가 생쥐 소뇌에서의 발현되었다고 보고하였다. 그 외에도 Matsuki 등(2005)은 임신 12, 15, 18일과 출생 첫날 생쥐 태아 뇌조직에서의 유전자 발현에 대하여 분석을 진행하였는데 11.4%(총 12,422개 중 1,413)의 유전자들이 유의적인 발현차이를 보였다고 보고하였다. 단백질수준에서는 2006년에 Seefeldt 등이 출생 전후 생쥐 태아 뇌조직 단백질발현 패턴에 대하여 비교 분석하였으며 2008년에는 Hartl 등이 임신초기 각 단계의 생쥐 태아 뇌조직 단백질발현 패턴에 대하여 연구하였다. 하지만 아직까지 임신중기와 임신후기 생쥐 태아 뇌조직 단백질 발현차이에 대한 연구가 보고되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 태아 신경계의 발육메커니즘을 단백질 수준에서 이해하기 위해 생쥐 임신중기인 15.5일과 후기인 19.5일의 태아 뇌조직을 이용하여 2차원 전기영동과 MALDI-TOF 실험을 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 수집

충남대학교 실험 동물 사육장에서 생후 7~8주되는 ICR 암컷 생쥐에 5 IU의 PMSG를 주사한 다음 48시간 후에 5 IU의 HCG를 주사하여 배란유도 처리를 한 다음 성숙 수컷 생쥐와 합사하였다. 다음날 아침 플러그를 체크하여 교배



**Fig. 1.** Mouse fetus brain at embryonic day (ED) 15.5 (A) and ED 19.5 (B).

여부를 확인하여 플러그가 있는 마우스를 따로 분리하여 관리하며 교배 후 15.5일과 19.5일에 마우스 태아뇌조직을 적출하였다(Fig. 1). 채취된 생쥐 태아 뇌조직을 SDS sample buffer로 조직 1 mg당 1 ul로 부유시키고, 1 mM PMSF와 1x protease inhibitor를 첨가한 후 조직을 초음파 분쇄를 실시하였다. 다음 희석용액을 원액의 7~8배를 넣어 주고 실온에서 1시간 가량 정치하였고, 15,000 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하고 상층액을 수집하여 endonuclease를 150 unit을 넣고 실온에서 30분간 정치하였다. 단백질정량을 한 다음 1 mg씩 나누어 담은 후 분석 시까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하였다.

## 2. 등전점전기영동(IEF)

### 2.1. 샘플준비

뇌단백질 용액을 1 mg이 되도록 준비하여, 2% IPG로 처리하여 modify buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 2.5% DTT, 10% isopropanol, 5% glycerol, 2% v/v IPG buffer; pH 3-10)로 총 450  $\mu\text{l}$ 가 되도록 조절하였다(Görg 등, 2000). 준비된 샘플을 rehydration tray에 넣고 IPG strip(pH 3-10;  $180 \times 3 \times 0.5$  mm)에 기포가 없도록 잘 적하시키고 그 위에 oil을 덮고 12시간 정치시켰다.

### 2.2. 등전점 전기영동

IPG strip을 3차 증류수로 한번 씻은 후 물기를 잘 닦고 gel 부분이 위로 향하게 하고, strip 양쪽 끝 1 cm 정도에 IEF electrode strip을 3~4 cm로 잘라 물에 적신 후 물기를 제거한 것을 겹쳐 놓는다. 이후 oil로 덮은 다음 집게로 IEF electrode strip과 paper가 strip에 잘 붙도록 겹쳐진 부분을 살짝 눌러주고 50 V로 100분, 100V 100분, 300 V 100분, 600 V 100분, 1000 V 100분, 3000 V 100분, 5000V 100분 및 8000 V 100분으로 전기영동을 실시하였다.

## 3. SDS-PAGE에 의한 분리

1차 전기영동을 실시한 strip을 equilibration buffer(6 M urea, 2% SDS, 50% v/v glycerol, 2.5% acrylamide, 1.5 M Tris-HCl; pH 8.8)에 Isopropanol 474  $\mu\text{l}$ 를 넣어 다음 15분간 정치하고 equilibration buffer에 DTT를 1% 넣어 15분간 처리하였다. equilibration된 strip의 물기를

제거한 후 미리 만들어진 8~16% gradient gel에 기포 없이 strip을 넣고 stacking gel를 부어 넣어 strip을 고정하였다. ISO-DALT system(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA)에 buffer를 채우고 gel당 10-15 mA로 12시간 정도 전기영동을 실시하였다.

**4. Coomassie blue를 이용한 gel 염색 및 image 분석**

SDS-PAGE가 끝난 gel을 분리하여 증류수에 넣었다가, 물기를 제거한 다음 고정용액에 1시간가량 두었다. 고정용액을 제거한 다음 Coomassie blue 염색액을 넣고 24시간 이상 염색한 다음 scanner를 이용하여 gel image의 scan을 실시하였다. 얻어진 image는 ImageMaster 5.0 소프트웨어를 이용하여 단백질의 발현차이를 이용하여 gel 중 각 spot에서 분석하였다.

**5. MALDI-TOF 단백질동정**

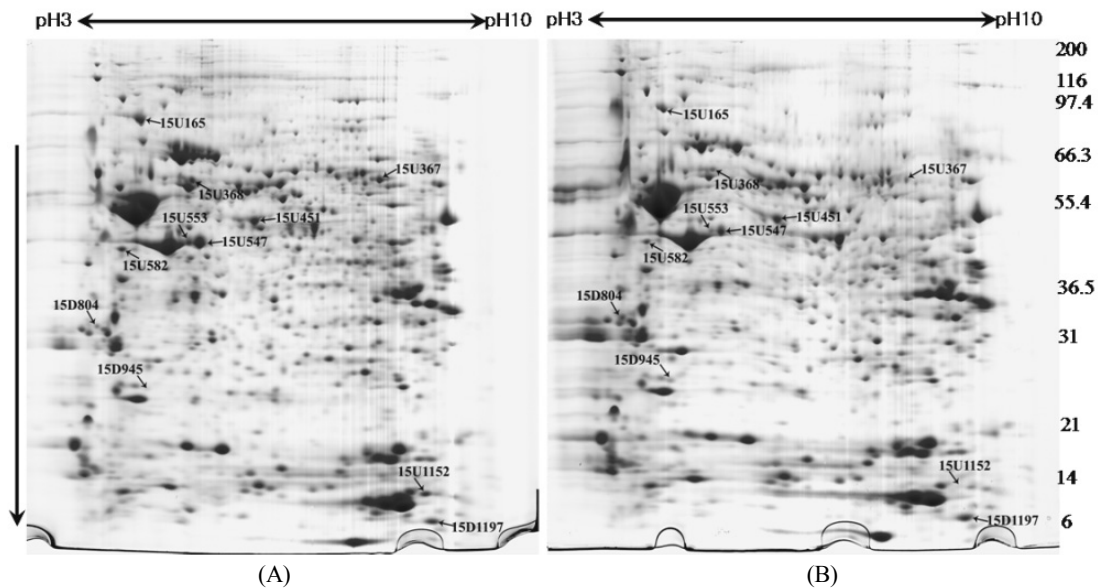
gel에서 발현차이를 보이는 spot를 gel에서 떼어낸 다음 washing solution을 이용하여 destaining한 다음 진공건조기를 이용하여 gel을 말린 다음 trypsin solution 5 µl 넣고 30분 뒤에 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 5 µl를 넣고 37°C에서

12~16시간 처리하였고, 나머지 solution을 제거한 후 5 µl의 Extraction Buffer를 넣고 수중초음파(Water Sonic)에서 38°C에서 30분~1시간 동안 sonication하여 trypsin에 의해 나온 peptide를 추출하였다(Shevchenko 등, 1996). 추출된 peptide용액은 MALDI-TOF를 실시하였는데 Mass spectrometric 분석은 Voyager-DE STR MALDI-TOF-MS(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA)를 이용하여 peptide mass fingerprinting sample 자료를 수집하였다. 펩타이드 자료는 DataExplorer™ 소프트웨어를 이용하여 peak 데이터를 수집하고 온라인 단백질서열 데이터베이스에서 검색하였다(SWISS-PROT and/or NCBI [20 10/02/01, Data Bank]).

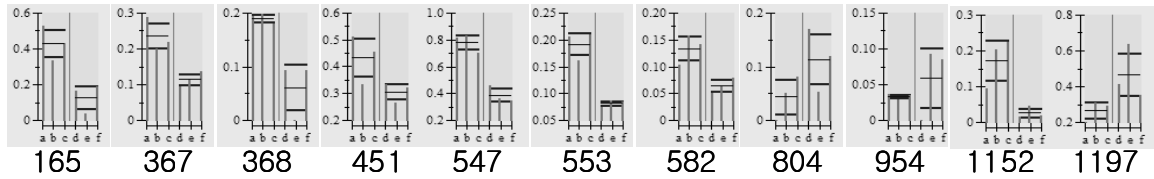
**III. 결과 및 고찰**

**1. 2차원 전기영동에 의한 생쥐 태아 뇌조직 Proteomes 분석**

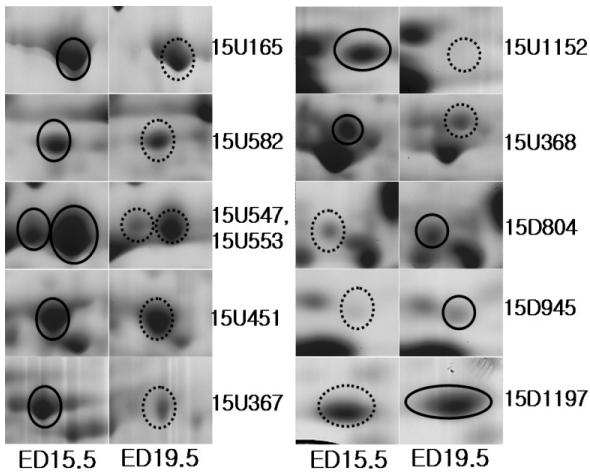
임신 15.5일과 19.5일된 마우스 태아 뇌조직에서 단백질을 추출하여 gel당 1 mg씩 loading하여 multiphorII와 SDS-PAGE를 통하여 전기영동을 실행한 뒤 Coomassie staining으로 생쥐 태아 뇌조직의 2-DE gel image를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 총 뇌단백질들이 각자의 등전점과 분자



**Fig. 2.** 2-D PAGE protein separation of ED 15.5 and ED 19.5 mouse fetus brain protein, as visualized with Coomassie brilliant blue staining. The first dimension was in 18cm 3~10 IPG, and the second dimension was in an 8~16% gradient gel. A mean of spots was enumerated with ImageMaster 5.0 software. (A) ED 15.5 fetus brain proteome, (B) ED 19.5 fetus brain proteome.



**Fig. 3.** Differential expression of proteins in percent-volume histograms. 165, 367, 368, 451, 547, 553, 582 and 1152: up-regulated spots in ED15.5. 804, 954 and 1197: down-regulated spots in ED15.5.



**Fig. 4.** Protein spots differentially expressed in mouse fetus brain, between ED15.5 and ED19.5. A black dotted line represents down-regulation and a solid line represents up-regulation. 15.U: up-regulated spots in ED15.5 mouse fetus brain, 15.D: up-regulated spots in ED19.5 mouse fetus brain.

량에 따라 spot로 분리되어 있는 것을 gel image에서 확인할 수 있었다. 이 image들을 ImageMaster 5.0 소프트웨어를 이용하여 분석한 결과 각 gel에서 약 800~1000개의 spot들이 나타나는 것을 확인할 수 있었고 각 spot에 대해 통계분석을 실시하였으며 임신 15.5일과 19.5일된 뇌의 단

백질 spot에 발현차이를 보이는 것들의 퍼센트 볼륨과 그들의 평균값은 Fig. 3에 표시하였다. 임신 15.5일과 19.5일 생쥐 태아뇌조직에서 발현 차이를 보이는 단백질 spot에 대한 분석에서 모두 15개의 spot이 2배 이상의 차이를 나타내었는데 그 중에서 11개의 spot이 임신 15.5일에 많이 발현되고 4개의 spot이 임신 19.5일에 많이 발현되는 것으로 분석되었다. Fig. 4에서 임신 15.5일과 19.5일 생쥐 태아뇌조직에서 단백질 발현 차이를 보이는 spot들은 나타내고 있다.

## 2. 단백질발현에 차이를 나타내는 spot의 동정

발현에 차이가 나는 spot들이 어떤 단백질인지를 판단하기 위하여 spot를 gel에서 도려내어 트립신으로 단백질을 처리하여 peptide상태로 만든 다음 MALDI-TOF/MS를 실시하였고, DataExplorer™ 소프트웨어로 peptide masses 데이터를 수집하여 검색소프트웨어 ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>)에서 후보 단백질을 검색하였다. 15개 spot에서 11개가 SWISS-PROT와 NCBI database에서 검색되었으며 동정된 단백질은 Table 1에 보여주고 있다. 임신 15.5일과 19.5일 생쥐

**Table 1.** Mouse fetus brain proteins differentially expressed between ED 15.5 and ED 19.5 as identified by MALDI-TOF.

| Spot ID* | Est'd | Accession No  | Protein Information                                    | Coverage% | pI  | kDa   |
|----------|-------|---------------|--|-----------|-----|-------|
| 15U165   | 1.85  | IPI00229080.7 | ab1 MCG18238   | 24        | 5   | 83.69 |
| 15U367   | 1.49  | IPI00407130.4 | Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2           | 39        | 7.2 | 58.54 |
| 15U368   | 1.36  | IPI00224575.1 | Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K | 36        | 5.2 | 51.37 |
| 15U451   | 1.84  | IPI00108143.1 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2             | 34        | 5.9 | 49.62 |
| 15U547   | 1.57  | IPI00136703.1 | Creatine kinase B-type                                 | 55        | 5.4 | 43.05 |
| 15U553   | 1.29  | IPI00136703.1 | Creatine kinase B-type                                 | 49        | 5.4 | 43.05 |
| 15U582   | 1.88  | IPI00123604.4 | 40S ribosomal protein SA                               | 42        | 4.8 | 32.96 |
| 15U1152  | 1.48  | IPI00407504.3 | Hemoglobin subunit beta-H1                             | 57        | 8.7 | 16.55 |
| 15D804   | 1.16  | IPI00132089.2 | Putative uncharacterized protein                       | 22        | 5.6 | 83.92 |
| 15D945   | 1.76  | IPI00321734.7 | Lactoylglutathione lyase                               | 57        | 5.2 | 21    |
| 15D1197  | 2.43  | IPI00650029.1 | Secreted acidic cysteine rich glycoprotein             | 27        | 4.8 | 35.37 |

태아뇌조직 단백질에 대해 비교 분석한 결과 15개 spot이 발현 차이를 보였는데 그 중에서 11개가 동정되었으며 그 중 8개는 임신 15.5일에 많이 발현 되는 단백질이었고 3개는 19.5일에 더 많이 발현되는 단백질이었다. 이렇게 발현차이를 보이는 단백질들은 MCG18238, Isoform M2 of pyruvate kinase isozymes M1/M2, Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2, creatine kinase B-type, putative uncharacterized protein, 40S ribosomal protein SA, lactoylglutathione lyase, hemoglobin subunit beta-H1과 secreted acidic cysteine rich glycoprotein 과 같은 단백질들이었다.

이중에서 Isoform M2 of pyruvate kinase isozymes M1/M2는 embryonic stem cells과 embryonalcarcinoma cells에 존재하는 당 분해에 관여하는 효소의 한가지로서 ADP와 ATP생성에 필요한 phosphoryl group을 phosphoenolpyruvate에서 가져오는 역할을 하는 효소이고(Ikeda 등, 1998) creatine kinase B-type은 ATP와 다양한 phosphogens사이에서 phosphate의 상호전달을 촉진하는 촉매작용을 하는 단백질로서 대량의 에너지가 필요한 뇌, 심장, 골격근과 같은 조직에서 에너지대사에서 중요한 작용을 한다. 이 2개의 단백질들은 모두 15.5일에 많이 발현되는 단백질로서 생쥐 태아 뇌 발육을 형태적으로는 3개의 발육단계(임신 16일, 출생 후 1주와 8주)로 구분한 Seefeldt 등(2006)의 보고와 부합된다. 또한 임신 19.5일에 발현 양이 증가하는 secreted acidic cysteine rich glycoprotein은 세포증식의 주기를 조절하고, 세포주기 억제 및 extracellular matrix의 합성억제 등의 기능을 수행하는 단백질로서(Bradshaw 등, 2003) 출생 전 태아발육을 억제함으로써 출산을 용이하게 하는 것으로 사료되는데 이 역시 Seefeldt 등(2006)이 분석한 결과와 일치한다.

#### IV. 결론

본 연구에서는 생쥐에서 임신중기인 15.5일과 후기인 19.5의 태아 뇌조직을 이용하여 임신중기와 후기에 뇌에서 발현되는 단백질의 차이를 보기 위하여 2차원 전기영동기법을 이용하여 발현에 차이를 나타내는 단백질들을 분석하여 차후에 태아 신경계 발육메커니즘을 분석하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단(No. 2010-0001356)과 농업진흥청 바이오그린21(No. 20070401034031) 및 공동연구사업(No. PJ007793) 지원으로 연구되었음.

#### 참고 문헌

1. Bradshaw AD, Graves DC, Motamed K, Sage EH. 2003. SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 6045-6050.
2. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.
3. Gotz, M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 777-788.
4. Greenberg DA, Jin K. 2006. Neurodegeneration and neurogenesis: Focus on Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 3: 25-28.
5. Guillemot F. 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog. Neurobiol.* 134: 3771-3780.
6. Hartl D, Irmeler M, Römer I, Mader MT, Mao L, Zabel C, de Angelis MH, Beckers J, Klose J. 2008. Transcriptome and proteome analysis of early embryonic mouse brain development. *Proteomics* 8: 1257-1265.
7. Hirabayashi Y, Gotoh Y. 2005. Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci. Res.* 51: 331-336.
8. Ikeda Y, Noguchi T. 1998. Allosteric regulation of pyruvate kinase M-2 isozyme involves a cysteine residue in the intersubunit contact. *J. Biol. Chem.* 273: 12227-12233.
9. Kagami Y, Furuichi T. 2001. Investigation of differentially expressed genes during the development of mouse cerebellum. *Brain Res. Gene Expr. Patterns* 1: 39-59.
10. Kaindl AM, Siffringer M, Zabel C, Nebrich G, Wacker MA, Felderhoff-Mueser U, Endesfelder S, Hagen M, Stefovskaya V, Klose J, Ikonomidou C. 2006. Acute and long-term proteome changes induced by oxidative stress in the developing brain. *Cell Death Differ.* 13: 1097-1099.
11. Matsuki T, Hori G, Furuichi T. 2005. Gene expression profiling during the embryonic development of mouse brain using an oligonucleotide-based microarray system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 136: 231-254.
12. Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S. 2000. Timing of CNS cell generation: A programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28: 69-80.

13. Seefeldt I, Nebrich G, Römer I, Mao L, Klose J. 2006. Evaluation of 2-DE protein patterns from pre- and postnatal stages of the mouse brain. *Proteomics* 6: 4932-4939.
14. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.