

Shh^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 뼈형태형성단백질 대항단백질의 발현

오세옥, 문용석¹, 배수경, 윤 식, 백선용, 김봉선, 김재봉
부산대학교 의과대학 해부학교실, ¹대구가톨릭대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : Sonic hedgehog (Shh)는 배쪽신경관 발생에 있어 형태형성인자(morphogen)로 작용하여 운동신경세포의 생성에 중추적인 역할을 한다. 하지만 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 혹은 *Gli2*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서는 Shh 신호전달체계의 활성이 사라졌음에도 불구하고 배쪽신경관에서 운동신경세포가 생성된다.

본 연구에서는 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포의 회복에 관여하는 보상 신호전달체계를 찾기 위해서 뼈형태형성단백질 (bone morphogenetic protein, BMP) 대항단백질의 발현과 레티노산 (retinoic acid) 신호전달체계의 활성을 조사하고자 하였다.

뼈형태형성단백질 대항단백질의 발현을 조사하기 위하여 제자리부합법을 시행하였고, 레티노산의 활성을 측정하기 위해서 레티노산 반응 염기서열 형질전환생쥐에서 β-galactosidase의 활성도를 측정하였다. 뼈형태형성단백질 대항단백질 중 *follistatin*의 발현은 *Shh*^{-/-} 생쥐의 팔다리수준치에서 감소하였다. *Follistatin*의 발현은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 팔수준치에서는 상당한 회복을 보였으나, 다리수준치에서는 정상 생쥐에 비해서 감소하였다. *Flik*의 발현은 *Shh*^{-/-} 생쥐의 팔다리수준치에서 정상 생쥐와 유사하였다. *Flik*의 발현은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 팔수준치에서 정상 생쥐와 유사하였으나 다리수준치에서는 감소하였다. *Noggin*의 발현은 *Shh*^{-/-}에서 정상 생쥐에 비해서 증가하였다. 레티노산 신호전달체계의 활성은 *Shh*^{-/-} 생쥐나 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 정상 생쥐와 유사하게 유지되었다.

이상의 결과들은 *follistatin*과 *flik*은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포의 생성에 관여하지 않으나 레티노산은 관여할 것이라는 사실을 시사한다.

찾아보기 낱말 : 뼈형태형성단백질 대항단백질, *Follistatin*, *Flik*, *Noggin*, Sonic hedgehog, 레티노산

서 론

중추신경계통은 발생 중 4 단계를 거쳐 형성된다 (Jessell 2000). 외배엽에서 신경관(neural plate)이 만들어지고 그 후 신경주름(neural fold)을 거쳐 신경관이 형성된다 (Jessell 2000). 신경관으로부터 뇌와 척수가 생성된다. 신경관에서 신경관이 형성되는 동안 두 개의 중요한 축 즉 입꼬리쪽축(rostrocaudal axis)과 등배쪽축(dorsoventral axis)이 형성된다. 입

꼬리쪽축이란 신경관의 입꼬리쪽의 지역에 따라 다른 신경조직 즉, 입쪽에서는 앞뇌, 중간뇌, 마름뇌 등이, 꼬리쪽에서는 척수가 생성된다는 것이다. 이러한 입꼬리쪽축의 형성에 관여하는 신호전달체계로는 원시선(primitive streak)에서 분비되는 섬유모세포성장인자(fibroblast growth factor: FGF)나 중배엽에서 분비되는 레티노산 (retinoic acid) 등이 있다 (Muhr 등 1999). 등배쪽축이란 신경관의 등쪽에서는 신경능선세포(neural crest cell)와 감각신경세포가, 배쪽에서는 운동신경세포와 사이신경세포가 생성되는데, 그 등배쪽축의 위치에 따라 다른 종류의 감각신경세포나 사이신경세포가 생성되는 것을 의미한다. 등쪽에서는 주변의 외배엽이나 지붕판(roof plate)에서

*이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연수지원비에 의하여 연구되었음.

교신저자: 김재봉(부산대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: kimjb@pusan.ac.kr

여러 가지 신호전달물질들이 분비되어 등쪽형태형성에 중심적인 역할을 한다. 특히 뼈형태형성단백질 (bone morphogenetic protein, BMP)이 형태형성인자 (morphogen)로 알려져 그 농도경사에 따라 다른 종류의 등쪽신경세포가 생성된다. 배쪽신경관에서는 척삭 (notochord)과 바닥판 (floor plate)에서 분비되는 Sonic hedgehog (Shh)가 중요 형태형성인자로 작용하여 Shh 농도에 따라서 운동신경세포와 각종 사이신경세포가 유도된다 (Briscoe 등 2000, Jessell 2000, Caspary와 Anderson 2003).

바닥판과 척삭에서 분비되는 Shh는 신경주름에 작용하여 신경관의 배쪽화 (ventralization)를 유도하는데 이는 등쪽 신경세포의 생성을 억제하고 배쪽 신경세포의 형성을 위한 영역을 확보하는 과정이다 (Ericson 등 1996). *Shh*^{-/-} 생쥐에서는 이러한 배쪽화가 제대로 이뤄지지 않아, V0, V1 사이신경세포를 제외하고 나머지 배쪽신경관 신경세포들이 발생하지 않는다 (Chiang 등 1996). 그 후 신경관의 배쪽에서 등쪽으로 형성되는 Shh 단백질의 농도경사에 따라 다른 종류의 신경세포들인, V3 사이신경세포와

운동신경세포 (VMN), V2, V1, V0 사이신경세포가 발생한다 (Fig. 1). Shh의 농도경사에 따른 각종 신경세포의 형성에는 일련의 homeoprotein 들이 관여하는 것으로 알려져 있지만, Shh의 농도경사가 신경전구세포에서 어떻게 번역되어지는가에 대해서는 아직 명확하지 않다 (Jessell 2000, Ingham과 McMahon 2001).

분비되어진 Shh는 목표세포로 이동한 후 Patched (Ptch)라는 수용체와 결합을 한다. Ptch는 Shh가 존재하지 않을 경우 Smoothed (Smo)라는 세포막 단백질의 활성을 억제하고 있다. 그런데 Shh가 Ptch에 결합하면 그 억제가 풀려 Smo가 활성화되고 Shh 신호전달체계가 활성화된다. 활성화된 Smo는 Gli 전사인자의 활성도를 조절한다. Shh가 존재하지 않을 경우 Gli는 단백질해되어 전사억제인자로서 작용하고, Shh가 존재할 경우 단백질해가 억제되어 Gli는 전사활성인자로 작용하게 된다 (Ingham과 McMahon 2001). 척추동물에서는 3종류의 Gli 분자가 알려져 있다 (Gli1, Gli2, Gli3). Gli1은 단백질해가 되지 않고 전사활성인자로서만 작용할 수 있고, 그 발현이 Shh에 의해 조절된다 (Dai 등 1999, Park 등 2000). 그리고 *Gli1*^{-/-} 생쥐의 신경관에서는 뚜렷한 발생장애는 관찰되지 않았다. *Gli2*를 초파리에 과발현시켰을 때, Gli2의 단백질해가 관찰되었으나 척추동물에서 정상적인 상황아래서는 그 단백질해가 관찰되지 않았다 (von Mering과 Basler 1999, Aza-Blanc 등 2000). 그리고 *Gli2*를 *Gli1*으로 대체한 생쥐에서 *Gli2*^{-/-} 생쥐에서 나타나는 발생장애가 대부분 사라지기 때문에 전사억제인자로서의 Gli2는 별 의미를 가지지 못한다 (Bai와 Joyner 2001). *Gli2*^{-/-} 생쥐에서는 바닥판과 V3 사이신경세포의 발생이 상당히 감소한다 (Ding 1998, Matise 등 1998). Gli3는 Shh 단백질의 농도에 따라 그 단백질해가 조절된다 (Wang 등 2000). 즉 Shh가 존재할 경우에는 전사활성인자로 작용하고, Shh가 존재하지 않을 경우 강력한 전사억제인자로서 작용한다. 이러한 Shh에 의한 Gli3의 활성 조절의 중요성은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 잘 보였다. 즉 *Shh*^{-/-} 생쥐에서는 전혀 발생되지 않은 운동신경세포가 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서는 회복된다. 이는 Shh가 존재하지 않을 경우 Gli3가 강력한 전사억제

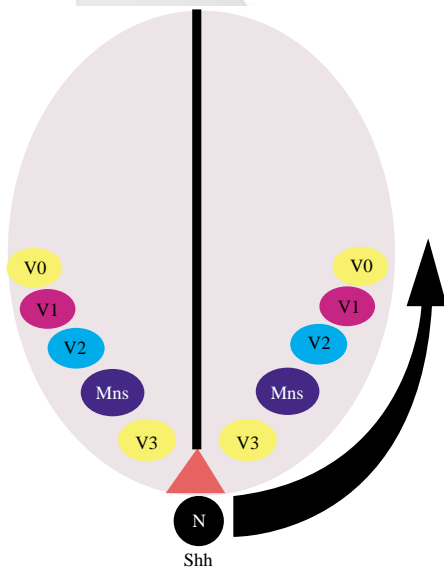


Fig. 1. Shh concentration gradient derived from the notochord (N) and the floor plate (FP) patterns the distinct cell types in the ventral spinal cord. These cell types express regional specific transcription factors.

인자로 작용하여 운동신경세포의 발생을 저해하지만, Gli3가 함께 제거된 생쥐에서는 운동신경세포의 발생저해가 풀리게 되는 것이다(Litingtung과 Chiang 2000). 그런데 운동신경세포의 회복은 다리수준치에서 나타나며 팔수준치에서는 거의 나타나지 않는다. Gli 전사인자의 활성화와 Shh 신호전달체계의 활성이 완전히 사라진 *Gli2^{-/-}*; *Gli3^{-/-}* 생쥐에서도 운동신경세포가 생성된다(Bai 등 2004). 운동신경세포의 회복을 포함하여 *Gli2^{-/-}*; *Gli3^{-/-}* 생쥐에서 나타나는 신경관의 발생장애는 *Shh^{-/-}*; *Gli3^{-/-}* 생쥐의 발생장애와 유사하다. 이러한 결과는 Shh 신호전달체계가 Gli2와 Gli3의 기능에 전적으로 의존하고 있음을 의미한다(Bai 등 2004).

Shh^{-/-}; *Gli3^{-/-}* 생쥐에서의 중요한 의문은 회복된 운동신경이 신경전구세포로 부터 디폴트(default)로 생성되는 것인지 또는 다른 보상 신호전달체계에 의해 생성되는지 명확하지 않다. 배아줄기세포를 이용한 실험에 근거하면, 운동신경세포는 디폴트경로에 의해 생성되지 않으므로 또 다른 보상 신호전달체계가 있음을 나타낸다(Wichterle 등 2002). 신경관 주위에는 여러 가지 신경전달물질이 분비되고 있다. 그 중 중요한 신호전달물질로서는 뼈형태형성단백질 대항단백질과 레티노산이다. 뼈형태형성단백질은 주로 등쪽신경관 형성에 작용하는 것으로 알려져 있지만, 배쪽신경관 형성에도 관여할 수 있다는 증거가 제시되었다. 뼈형태형성단백질은 Shh에 의한 바닥판이나 운동신경세포의 형성을 억제할 수 있다(Basler 등 1993, Arkell과 Beddington 1997). 또한 뼈형태형성단백질의 작용을 억제하는 단백질인 follistatin의 처리는 신경관을 보다 배쪽화시켰다(Liem 등 2000). 즉 follistatin은 뼈형태형성단백질의 작용을 억제하여 Shh에 의한 배쪽신경세포의 형성을 보다 용이하게 하였다. 레티노산은 중배엽에서 분비되어 외배엽으로부터 신경조직으로의 분화를 유도할 수 있으며 또한 신경관의 꼬리쪽화(caudalization)를 유도할 수 있다(Durstun 등 1998, Muhr 등 1999). 그리고 최근 섬유모세포성장인자와 더불어 운동신경세포의 생성에 중요한 Olig2를 유도할 수 있는 것으로 보고되었다(Novitch 등 2003).

본 연구에서는 *Shh^{-/-}*; *Gli3^{-/-}* 생쥐에서 운동신경

세포의 회복에 관여하는 신호전달체계를 확인하고자 하였다. *Shh^{-/-}* 생쥐에서는 신경관 배쪽화가 일어나지 않았으며 운동신경세포가 전혀 생성되지 않았기 때문에, 보상 신호전달체계가 억제되어 있다고 생각할 수 있다. 그러나 *Shh^{-/-}*; *Gli3^{-/-}* 생쥐에서는 Gli3 전사억제인자에 의한 억제가 풀려 신경관의 배쪽화와 운동신경세포의 생성을 유도할 수 있다고 생각되어진다. 따라서 본 연구에서는 *Shh^{-/-}*; *Gli3^{-/-}* 생쥐에서 보상 신호전달체계가 작용할 가능성이 있는 뼈형태형성단백질 대항단백질과 레티노산 신호전달체계의 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 생쥐의 유지

Shh^{-/-} 생쥐의 유지와 확인은 이미 알려진 방법을 따랐다. *Gli3^{-/-}* 생쥐는 *Gli3* 유전자의 zinc finger domain을 포함하는 3' 지역에 결손이 있는 생쥐인데 Jackson lab으로부터 얻었다. *Gli3^{-/-}* 생쥐는 난황주머니(yolk sac) DNA를 채취하여 PCR을 통해 확인하였다. *Shh^{+/-}*; *Gli3^{+/-}* 생쥐는 C3H/129/C57 또는 CD1/C3H 등의 혼합된 배경(background)으로 유지되었다. *Shh^{+/-}*; *Gli3^{+/-}* 생쥐의 교배를 통해 *Shh^{-/-}*, *Gli3^{-/-}*, *Shh^{-/-}*; *Gli3^{-/-}* 등의 다양한 생쥐를 구할 수 있었다. *Shh* (230 bp), *Gli3* (500 bp), *Neo* (550 bp) 등의

Table 1. PCR primers used for genotyping of mutant mice

| Primer | Forward/ Reverse | Sequence (5'-3') | Size |
|-------------|---------------------|--------------------------|--------|
| <i>Shh</i> | Forward | GACCATGTCTGACACTTAGGTTTC | 230 bp |
| | Reverse | GAAGGCCAGGAGGAGAAGGCTCAC | |
| <i>Gli3</i> | Forward | GGGTGAACAGCATCAAATGGAG | 500 bp |
| | Reverse | TCCGATAGCCATGTTGGTGG | |
| <i>Neo</i> | Forward | CTGTGCTCGACGTTGCTACTG | 550 bp |
| | Reverse | GATCCCCTCAGAAGAAGCTCGT | |
| <i>Nog1</i> | Forward | GCATGGAGCGCTGCCCCAGC | 211 bp |
| | Reverse | GACAGCGAGCGCAGCAGCG | |
| <i>Gall</i> | Reverse | AAGGGCGATCGGTGCGGGCC | 160 bp |
| <i>LacZ</i> | Forward | CTGTGCTCGACGTTGCTACTG | 220 bp |
| | Reverse | GATCCCCTCAGAAGAAGCTCGT | |

유전자를 확인하기 위하여 아래의 PCR 길잡이 (primer)를 이용하였다. *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서는 *Shh*와 *Gli3* 두 유전자가 모두 없으나 *Neo* PCR 산물은 발견되었다(Litingtung과 Chiang 2000).

Nog 생쥐 유지를 위해 PCR을 시행하였는데 정상 배아와 돌연변이 배아를 확인하기 위해 두 종류의 PCR을 시행하였다. 정상 배아를 위해서는 *nog1*과 *nog2* 길잡이를 이용하였고(211 bp), *Nog* 생쥐를 위해서는 *nog1*과 *gall* 길잡이를 이용하였다(160 bp). *Nog*^{+/-} 생쥐와 *Shh*^{+/-} 생쥐를 교배하여 *Nog*^{+/-}; *Shh*^{-/-} 생쥐를 구하였다(McMahon 등 1998).

RARE-LacZ 생쥐는 레티노산 반응 염기서열 (retinoic acid response element, RARE)을 *Hsp68* 유전자

의 전사촉진염기 서열에 합성시켜 *LacZ* 유전자를 발현하도록 한 형질전환 생쥐인데, 조직에 레티노산이 있을 경우 반응하여 활성을 나타낸다. 이 생쥐의 유지를 위해 *LacZ*에 대한 PCR을 시행하였다. *RARE-LacZ* 생쥐와 *Shh*^{+/-} 혹은 *Shh*^{+/-}; *Gli3*^{+/-} 생쥐와 교배시켜, *RARE*; *Shh*^{+/-} 혹은 *RARE*; *Shh*^{+/-}; *Gli3*^{+/-} 생쥐를 구하였다(Rossant 등 1991).

2. 절편제자리부합법 (Section RNA *in situ* hybridization)

자궁목마개 (cervical plug)를 관찰한 날을 0.5일로 하여 9.5일이 경과한 뒤 (E9.5) 어미를 희생하였다. 모든 실험을 위해 3마리 이상의 정상 배아와 돌연

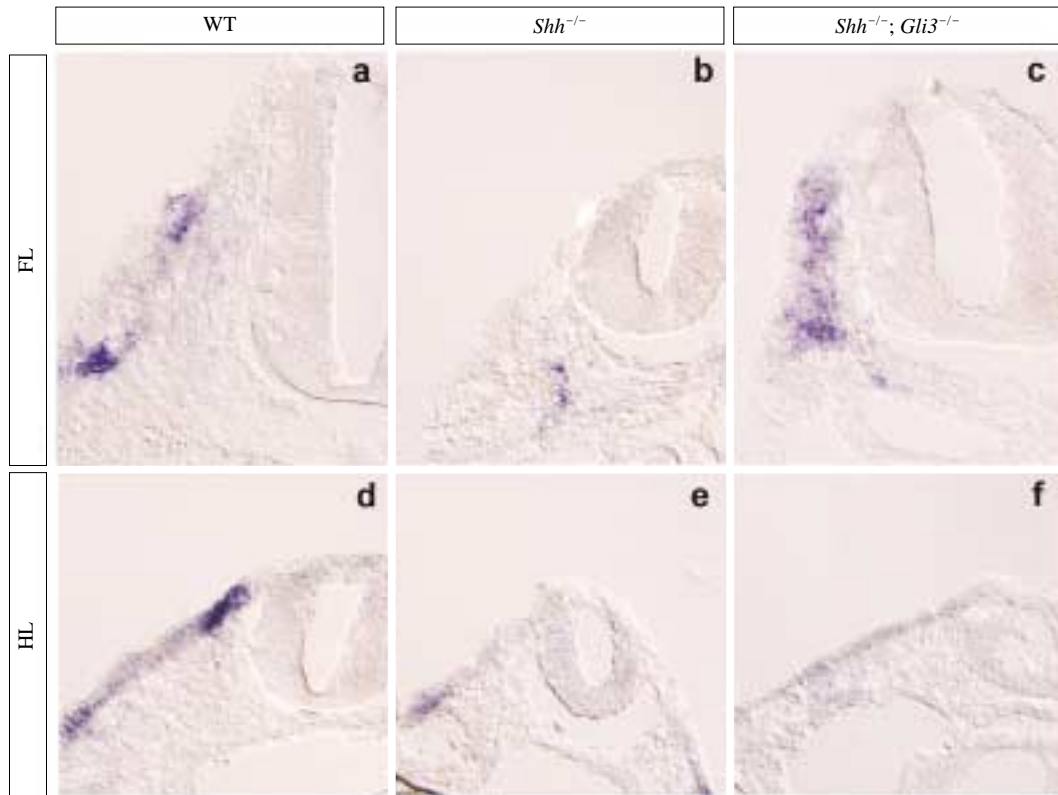


Fig. 2. Expression of *follistatin* in E10.5 wild type (WT; a, d), *Shh* mutant (*Shh*^{-/-}; b, e), and *Shh* and *Gli3* double mutant (*Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-}; c, f). Cross-sections of neural tube at the level of forelimb (FL; a-c) and hindlimb (HL; d-f) are shown. *Follistatin* expression is reduced compared to wild type in *Shh*^{-/-} however restored in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutants at the level of forelimb. *Follistatin* expressions are reduced compared to wild type in *Shh*^{-/-} and *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutants at the level of hindlimb. Magnification × 100.

변이 배아를 이용하였으며, 같은 어미에서 나온 정상 배아를 대조군으로 이용하였다. 어미를 희생한 후 배아를 적출한 후 고정없이 바로 OCT 블록으로 만든 뒤 -80°C 에 보관하였다. 본 실험을 위하여 15 μm 동결절편 후 4% paraformaldehyde (PFA)로 고정하였다. 그 후 proteinase K를 처리한 후 60°C 에서 부합액 (hybridization solution)으로 전처리 부합반응을 하였다. 그 후 RNA 탐색자를 첨가한 후 14시간 동안 60°C 에서 반응하였다. 그 후 SSC로 슬라이드를 씻은 후 NBT/BCIP로 발색하였다. *Follistatin* (IMAGE Clone 3711215)과 *flik* (Shibanuma 등 1993) cDNA가 RNA 탐색자를 만들기 위해 사용되었다.

3. β -galactosidase 활성도 측정

배아를 어미로부터 적출한 후 0.5% 글루타르알데

히드 용액으로 얼음 위에서 30분간 고정한 후 인삼 염원충용액으로 씻었다. 그 후 배아를 FeNa 용액 (10 mM NaPO_4 pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 3 mM $\text{K}_4(\text{FeII}(\text{CN})_6)$, 3 mM $\text{K}_3(\text{FeIII}(\text{CN})_6)$, 0.3% Triton X-100, 0.27% Xgal)에서 발색반응을 시행하였다. 반응 후 배아를 4% PFA로 다시 고정한 후 OCT 블록을 만들고, 동결절편을 시행하였다.

결 과

*Follistatin*은 정상군에서는 신경관의 주변에 위치한 외배엽 및 몸체질성 중배엽에 발현하였다 (Fig. 2). 몸체질성 중배엽에서도 특히 피부근육분절 (dermatomyotome) 영역에 발현정도가 높았다. 그런데 *Shh*^{-/-} 생쥐에서는 그 발현이 의미있게 감소하였

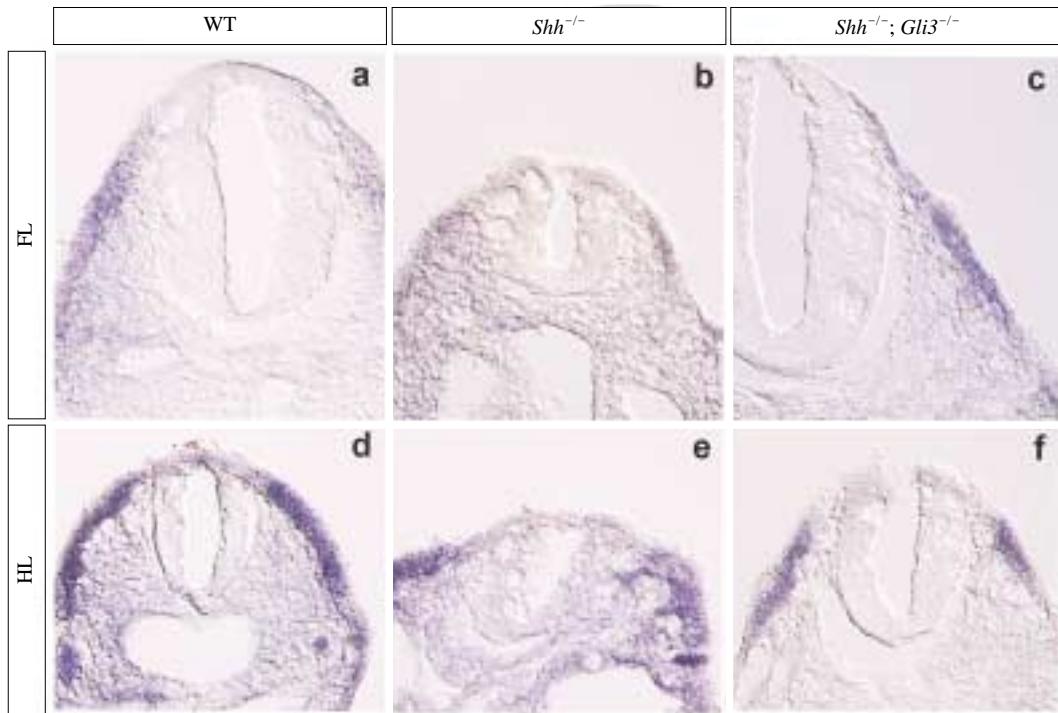


Fig. 3. Expression of *flik* in E10.5 wild type (WT, a, d), *Shh* mutant (*Shh*^{-/-}, b, e), and *Shh* and *Gli3* double mutant (*Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-}, c, f). Cross-sections of neural tube at the level of forelimb (FL; a-c) and hindlimb (HL; d-f) are shown. *Flik* expression is similar with wild type in *Shh*^{-/-} and *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutants at the level of forelimb. *Flik* expressions is similar with wild type in *Shh*^{-/-} mutant however reduced in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutant at the level of hindlimb. Magnification $\times 100$.

는데, 팔수준치에서 외배엽의 *follistatin*은 발현되지 않았으며 몸분절 중배엽에서 소량 발현되었다(Fig. 2b). 다리수준치에서는 정상 생쥐에 비해서 그 발현이 감소하였으나 외배엽에서 더 낮은 발현을 보였다(Fig. 2e). *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐 팔수준치에서는 *follistatin*의 발현이 정상 생쥐에 비해 비슷하거나 오히려 증가하였다(Fig. 2c). 특히 몸분절 중배엽에서는 정상 생쥐보다 발현이 증가하였다. 다리수준치의 신경관 부위에서는 정상 생쥐에 비해서 감소된 발현 양상을 보였다(Fig. 2f).

*Flik*은 정상 생쥐에서, 신경관 주위의 외배엽 및 몸분절 중배엽에 발현되었다(Fig. 3). 이러한 분포는 *follistatin*과 거의 유사하였다. *Shh*^{-/-} 생쥐에서는 *flik*의 발현이 팔다리수준치에서 정상 생쥐와 유사한

발현정도를 보였다(Fig. 3b, e). *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 경우 팔수준치에서 정상 생쥐와 유사한 발현 양상을 보였으나 다리수준치에서는 정상 생쥐에 비해서 감소하였다(Fig. 3c, f).

Noggin (*Nog*)의 발현양상을 관찰하기 위하여 *LacZ* 유전자가 *noggin* 유전자를 대체한 생쥐를 이용하였다. 이 생쥐와 *Shh*^{+/-} 생쥐를 서로 교배하여 *Nog*^{+/-}; *Shh*^{+/-}, *Nog*^{+/-}; *Shh*^{-/-}, *Nog*^{-/-}; *Shh*^{-/-} 생쥐를 구하였다. *Nog*^{+/-}; *Shh*^{-/-} 생쥐나 *Nog*^{-/-}; *Shh*^{-/-} 생쥐는 *Nog*^{+/-}; *Shh*^{+/-} 생쥐에 비해서 배아의 크기가 전반적으로 의미 있게 작았으며 신경관의 크기 또한 작았다(Fig. 4, data not shown). *Nog*^{-/-}; *Shh*^{-/-} 생쥐의 경우 배아의 모양이 정상적인 배쪽굽이대신, 등쪽굽이양상을 보였다(data not shown). *LacZ* 염색

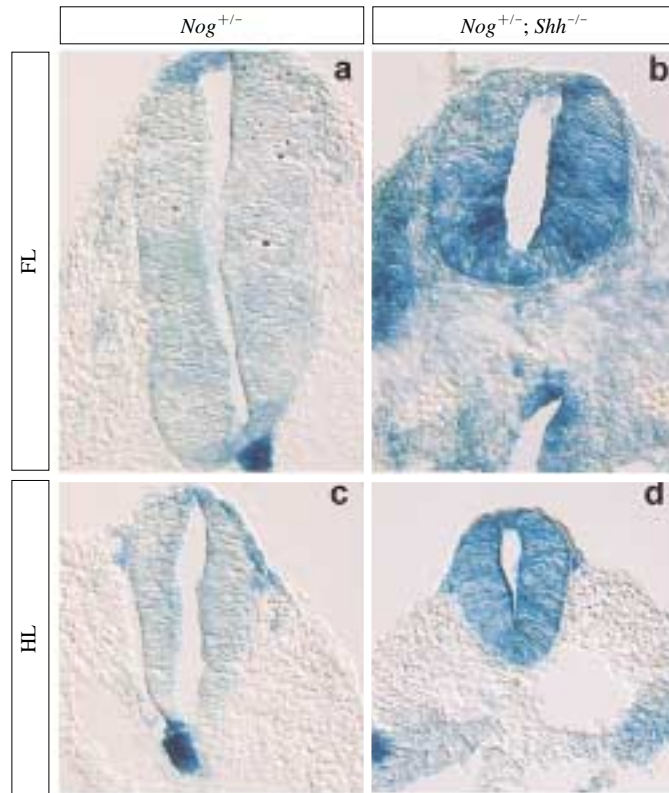


Fig. 4. Expression of *noggin* is increased in *Shh*^{-/-} mutant. β -galactosidase activity in embryos heterozygous (*Nog*^{+/-}) for a targeted allele of *noggin* in which *noggin* coding sequences were replaced by the *LacZ* gene. Cross-sections of neural tube at the level of forelimb (FL; a, c) and hindlimb (HL; b, d) are shown. Magnification $\times 100$.

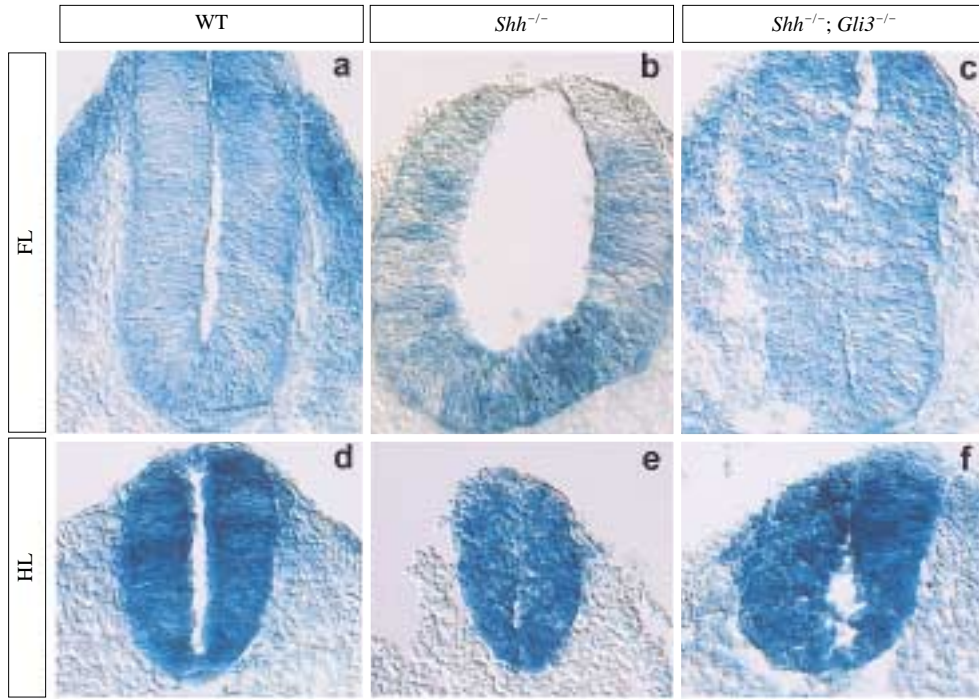


Fig. 5. Retinoic acid signaling is not affected by *Shh* mutation. Retinoic acid response element linked with Lac Z, was introduced into wild type (WT, a, d), *Shh*^{-/-} (b, e) and *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} (c, f) mutants. Cross-sections of neural tube at the level of forelimb (FL; a-c) and hindlimb (HL; d-f) are shown. Magnification × 100.

을 통하여 *Nog*의 발현을 확인하였을 때, *Nog*는 척삭과 신경관 주변부위의 외배엽에서 관찰되었다. 신경관 자체에서도 아주 낮은 정도의 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). *Nog*^{+/-}; *Shh*^{-/-} 생쥐를 염색하였을 때 *Nog*의 발현은 전반적으로 증가되어 있었다. 특히 신경관 자체에서의 발현이 증가하였다. 이러한 변화 양상은 팔다리수준치에 상관없이 나타났다. 재미있는 현상은 *Nog*를 발현하고 있는 척삭을 *Nog*^{+/-}; *Shh*^{-/-} 생쥐에서는 찾을 수가 없었다 (Fig. 4b, d). 왜 척삭이 형성되지 않았는지에 대해서는 조사하지 않았다.

Shh 신호전달체계에 의해 레티노산 신호전달체계의 활성이 조절되는지를 확인하기 위하여 레티노산 반응 염기서열을 가지고 있는 형질전환 생쥐를 이용하였다. 이 생쥐는 레티노산이 분비되어 작용하는 부위에서 β-galactosidase 활성을 나타낸다. 레티노

산 반응 염기서열 형질전환생쥐와 *Shh*^{+/-}; *Gli3*^{+/-} 생쥐를 교배하여 *RARE*⁺; *Shh*^{+/-}; *Gli3*^{+/-} 생쥐를 구한 뒤에 이 생쥐들을 서로 교배하여 *RARE*⁺; *Shh*^{-/-} 생쥐와 *RARE*⁺; *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐를 획득하였다. 레티노산 신호전달체계의 활성은 신경관 전체에서 균일하게 나타났다 (Fig. 5). 팔수준치에 비해서 다리수준치에서 레티노산 신호전달의 활성이 의미 있게 높았다. 그리고 이러한 활성은 *RARE*⁺; *Shh*^{-/-} 생쥐나 *RARE*⁺; *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 비슷한 양상으로 나타났다 (Fig. 5). 이는 레티노산 신호전달체계가 *Shh* 신호전달체계에 의해 조절받지 아니함을 의미한다.

고 찰

신경관 주위에는 많은 신호전달물질이 있어 신경

관에서의 신경세포 생성을 조절하고 있다. 뼈형태형성단백질과 Shh 신호전달체계는 등쪽과 배쪽에서 각각 신경관형성에 있어 주도적인 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 그런데 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서는 Shh 신호전달체계가 완전히 사라졌는데도 불구하고 운동신경세포가 생성된다. 이는 다른 보상 신호전달체계가 작용했을 가능성을 제기한다. 본 연구에서는 뼈형태형성단백질 대항단백질인 follistatin과 *flik*은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포의 회복에 기여하지 않으나, 레티노산 신호전달체계가 기여할 가능성이 있음을 밝혔다.

척삭과 바닥판에서 분비되는 Shh 단백질의 농도경사에 따라 배쪽신경관에서는 각기 다른 신경세포가 생성된다 (Fig. 1). 그런데 이러한 신경세포의 생성이 Shh 단백질만의 농도경사에 의해서만 순수하게 형성될 가능성도 있지만, 또 다른 단백질도 관여함으로써 복잡한 양상으로 형성될 가능성도 있다. 예를 들어 뼈형태형성단백질이 관여할 가능성도 있다. 뼈형태형성단백질은 주로 등쪽신경관 형성에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있지만 (Caspary와 Anderson 2003), 배쪽신경관 형태형성에도 관여할 수 있다. Shh에 의한 바닥판과 운동신경세포의 형성이 뼈형태형성단백질에 의해 차단될 수 있다 (Basler 등 1993, Arkell과 Beddington 1997). 신경관 세포배양 실험에서 신경전구세포의 Shh에 대한 감수성이 뼈형태형성단백질에 의해 조절될 수 있음이 보였다 (Liem 등 2000). 즉 일정한 농도의 Shh에 의해 생성되어져 나오는 각종 신경전구세포와 신경세포의 종류가 뼈형태형성단백질을 함께 처리하게 되면 달라진다는 것이다. Follistatin은 뼈형태형성단백질5-7과 activin의 작용을 선택적으로 억제하는 단백질로 알려져 있다 (Zimmerman 등 1996, Lee와 Jessell 1999). 이러한 follistatin을 처리할 때, 신경전구세포들의 Shh에 대한 감수성이 증가하였다. Follistatin의 작용은 신경관 세포 배양에서 뿐만 아니라 닭 신경관을 이용한 생체실험에서도 증명되어졌다. 발생과정 중 배쪽신경관이 뼈형태형성단백질 신호전달체계에 노출될 충분한 가능성이 있다. 외배엽으로부터 신경관이 형성될 무렵 신경관에서는 뼈형태형성단백질이 높이 발현되고 그 후 배쪽신경

관에서도 뼈형태형성단백질이 발현된다 (Fainsod 등 1994, Jones 등 1991, Streit 등 1998, Streit와 Stern 1999). 이러한 증거들은 배쪽신경관이 단순한 Shh 단백질의 농도경사에만 의존하여 형성되는 것이 아니라, 뼈형태형성단백질과 뼈형태형성단백질 대항단백질의 작용에 의해 조절될 수 있음을 의미한다.

Shh^{-/-} 생쥐의 팔수준치 신경관에서 *follistatin*의 발현이 정상 생쥐에 비해 의미있게 감소하였다 (Fig. 2b). 이러한 감소는 뼈형태형성단백질 활성의 증가를 야기할 수 있다. 그러나 *Nog*의 발현은 오히려 증가하였다 (Fig. 4b). *Nog*은 뼈형태형성단백질2/4, GDF5-7의 작용을 선택적으로 억제하는 단백질로 알려져 있다 (Nakamura 등 1990, Yamashita 등 1995, Liem 등 1997, Iemura 등 1998). 닭 신경관 실험에서 *Nog*은 배쪽신경관 신경세포형성의 패턴에 커다란 영향을 미치지 않는다고 (Liem 등 2000). *Shh*^{-/-} 생쥐에서 *Nog*의 발현이 증가하지만 신경관의 배쪽화가 이뤄지지 않으며, 운동신경세포도 생성되지 않았다. 따라서 이러한 결과들은, 닭 신경관의 실험결과와 함께, *Nog*은 신경관의 배쪽화와 운동신경세포의 생성에 관여하지 않음을 의미한다. 하지만 이러한 결과들과는 달리 *Nog*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포가 생성되지 않았다 (McMahon 등 1998). 본 연구에서는 알 수 없는 원인으로 *Nog*^{+/-}; *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐를 구하는데 실패하였다. *Nog*의 역할을 보다 명확히 구명하기 위해서는 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다. Follistatin은 닭 신경관에서 배쪽신경세포의 형성을 확장시켰다 (Liem 등 2000). 이것은 신경관형성에 있어 follistatin에 의해 억제되는 뼈형태형성단백질이 작용할 가능성이 높음을 의미한다. *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 팔수준치 신경관에서 *follistatin*이나 *flik*의 발현이 정상 생쥐와 유사하거나 약간 증가된 양상을 보였다 (Figs. 2c, 3c). 따라서 *Shh*^{-/-} 생쥐에서 증가되었던 뼈형태형성단백질 신호전달체계의 활성이 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서는 감소될 가능성이 있다. 그런데 이러한 뼈형태형성단백질 대항단백질의 발현증가로 인한 뼈형태형성단백질 신호전달체계의 활성 감소는 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 생성되는 운동신경세포는 관련이 없다. 그것은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포는 팔수준치의 신경관에서는 거

의 회복되지 않고 다리수준치의 신경관에서만 주로 회복되기 때문이다(Litingtung과 Chiang 2000). 하지만 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐 팔수준치에서의 *follistatin*이나 *flik*의 발현은 신경관의 배쪽화에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 다리수준치에서, *follistatin*과 *flik*은 정상 생쥐에 비해서 발현이 감소되어 있다(Figs. 2f, 3f). 따라서 *follistatin*과 *flik*은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포의 생성에 기여할 수 없을 것으로 사료된다.

배쪽신경관에서 *Shh* 신호전달체계가 형태형성에 있어 중추적인 역할을 하지만 *Shh*^{-/-} 생쥐에서 V0과 V1 사이신경세포가 비록 그 수는 감소하였지만 생성되었다(Litingtung과 Chiang 2000). 레티노산은 신경관 주변 증배엽에 높게 발현되고 있으며(Niederreither 등 1997, Swindell 등 1999) 신경관전구세포의 특수화(specification) 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Muhr 등 1999). 신경관 배양 실험에서 레티노산은 V0와 V1 사이신경세포를 *Shh* 신호전달체계와는 무관하게 유도할 수 있었다(Pierani 등 1999). 그런데 팔다리발생에 있어서는 레티노산은 *Shh* 신호전달체계를 조절할 수 있다(Helms 등 1994, Pierani 등 1999). 레티노산이 운동신경세포의 생성에 관련이 있다는 보고가 있다. 배아줄기세포 배양에서 레티노산은 운동신경세포를 유도할 수 있다(Renoncourt 등 1998). 그리고 레티노산은 팔다리수준치에서만 생성되는 운동신경세포 생성에 관련이 있다. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH-2)를 닭 신경관에 과발현시켰을 때, 사지레벨에서만 생성되는 운동신경이 유도되었다(Sockanathan과 Jessell 1998).

본 연구의 결과에 의하면 *Shh* 신호전달체계는 신경관에서 레티노산 신호전달체계를 조절할 수 없었다(Fig. 5). 신경관 전반에서 거의 균일하게 나타나는 레티노산의 활성화는 *Shh*^{-/-} 생쥐나 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 거의 유사하였다. 따라서 레티노산 단독으로는 운동신경세포를 유도할 수 없다는 결론을 얻을 수 있다. 그것은 *Shh*^{-/-} 생쥐에서 레티노산 활성화가 정상 생쥐와 유사함에도 불구하고 운동신경세포가 생성되지 못하였기 때문이다. 그러나 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포의 생성에 레티노산

이 기여할 가능성은 있다. 그것은 최근 신경관 배양 실험에서 레티노산은 섬유모세포성장인자와 함께 운동신경세포의 유도에 필수 전사인자인 *Olig2*를 유도하였기 때문이다(Novitch 등 2003). *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 레티노산이 운동신경세포의 생성에 기여하는지를 확인하기 위해서는 레티노산 억제제를 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 신경관에 투여한 후 운동신경세포의 생성을 관찰하여야할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포의 회복에 관여하는 보상 신호전달체계를 확인하고자 하였다. 뼈형태형성단백질 대항단백질 중 *follistatin*의 발현은 *Shh*^{-/-} 생쥐의 팔다리수준치에서 감소하였다. *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 팔수준치에서는 상당한 회복을 보였으나, 다리수준치에서는 감소하였다. *Flik*의 발현은 *Shh*^{-/-} 생쥐의 팔다리수준치에서 그 발현이 정상 생쥐와 유사하였다. *Flik*의 발현은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐의 팔수준치에서 정상 생쥐와 유사한 발현을 보였으나 다리수준치에서는 감소하였다. *Nog*의 발현은 *Shh*^{-/-} 신경관에서 정상 생쥐에 비해서 증가하였다. 레티노산 신호전달체계의 활성화는 *Shh*^{-/-} 생쥐나 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 정상 생쥐와 유사하게 유지되었다. 이러한 결과들은 *follistatin*이나 *flik*은 *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} 생쥐에서 운동신경세포의 생성에 기여하지 않을 것이나 레티노산은 기여할 가능성이 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Arkell R, Beddington RS : BMP-7 influences pattern and growth of the developing hindbrain of mouse embryos. *Development* 124 : 1-12, 1997.
- Aza-Blanc P, Lin HY, Ruiz i Altaba A, Kornberg TB : Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* 127 : 4293-4301, 2000.
- Bai CB, Joyner AL : Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2, *Development*. 128 : 5161-5172, 2001.
- Bai CB, Stephen D, Joyner AL : All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves

- an activator function of Gli3. *Dev Cell* 6 : 103–115, 2004.
- Basler K, Edlund T, Jessell TM, Yamada T : Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF beta family member. *Cell* 73 : 687–702, 1993.
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J : A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101: 435–445, 2000.
- Caspary T, Anderson KV : Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* 4 : 289–297, 2003.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA : Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383 : 407–413, 1996.
- Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S : Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* 274 : 8143–8152, 1999.
- Ding Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J, Hui CC : Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* 125 : 2533–2543, 1998.
- Durston AJ, van der Wees J, Pijnappel WW, Godsave SF : Retinoids and related signals in early development of the vertebrate central nervous system. *Curr Top Dev Biol* 40 : 111–175, 1998.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM : Two critical periods of Sonic hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87 : 661–673, 1996.
- Fainsod A, Steinbeisser H, De Robertis EM : On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *EMBO J* 13 : 5015–5025, 1994.
- Helms J, Thaller C, Eichele G : Relationship between retinoic acid and Sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud. *Development* 120 : 3267–3274, 1994.
- Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, Sugino H, Ueno N : Direct binding of *folliculin* to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 9337–9342, 1998.
- Ingham PW, McMahon AP : Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15 : 3059–3087, 2001.
- Jessell TM : Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1 : 20–29, 2000.
- Jones CM, Lyons KM, Hogan BL : Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* 111 : 531–542, 1991.
- Lee KJ, Jessell TM : The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22 : 261–294, 1999.
- Liem KF Jr, Jessell TM, Briscoe J : Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127 : 4855–4866, 2000.
- Liem KF Jr, Tremml G, Jessell TM : A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91 : 127–138, 1997.
- Litingtung Y, Chiang C : Specification of neuronal cell types in the ventral spinal cord is mediated by antagonistic interaction between *Shh* and *Gli3*. *Nature Neuroscience* 3 : 979–985, 2000.
- Matise MP, Epstein DJ, Park HL, Platt KA, Joyner AL : *Gli2* is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* 125 : 2759–2770, 1998.
- McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP : Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12 : 1438–1452, 1998.
- Muhr J, Graziano E, Wilson S, Jessell TM, Edlund T : Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron* 23 : 689–702, 1999.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H : Activin-binding protein from rat ovary is *folliculin*. *Science* 247 : 836–838, 1990.
- Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P, Dolle P : Restricted expression and retinoic acid-induced down-regulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62 : 67–78, 1997.

- Novitch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S : A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* 40 : 81-95, 2003.
- Park, HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL. : Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in : combination with a *Gli2* mutation. *Development* 127 : 1593-1605, 2000.
- Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C, Jessell TM : A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97 : 903-915, 1999.
- Renoncourt Y, Carroll P, Filippi P, Arce V, Alonso S : Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mech Dev* 79 : 185-197, 1998.
- Rossant J, Zirngibl R, Cado D, Shago M, Giguere V : Expression of a retinoic acid response element-hsp lac Z transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5 : 1333-1344, 1991.
- Shibanuma M, Mashimo J, Mita A, Kuroki T, Nose K : Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur J Biochem* 217 : 13-19, 1993.
- Sockanathan S, Jessell TM : Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell* 94 : 503-514, 1998.
- Streit A, Lee KJ, Woo I, Roberts C, Jessell TM, Stern CD : Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* 125 : 507-519, 1998.
- Streit A, Stern CD : Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech Dev* 82 : 51-66, 1999.
- Swindell EC, Thaller C, Sockanathan S, Petkovich M, Jessell TM, Eichele G : Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol* 216 : 282-296, 1999.
- von Mering C, Basler K : Distinct and regulated activities of human Gli proteins in *Drosophila*. *Curr Biol* 9 : 1319-1322, 1999.
- Wang B, Fallon JF, Beachy PA : Hedgehog-regulated processing of *Gli3* produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100 : 423-434, 2000.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM : Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110 : 385-397, 2002.
- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K : Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130 : 217-226, 1995.
- Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM : The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86 : 599-606, 1996.

Abstract

Expressions of BMP Antagonists in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} Mutant

Sae-Ock Oh, Yong-Suk Moon¹, Soo-Kyung Bae, Sik Yoon,
Sun-Yong Baek, Bong-Seon Kim, Jae-Bong Kim

Department of Anatomy, College of Medicine, Pusan National University, ¹Taegu Catholic University

Sonic hedgehog (Shh) has been known as an essential morphogen for the generation of motor neuron in developing spinal cord. However, motor neuron can be generated in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} or *Gli2*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutants although these mutants don't have *Shh* signaling. To find out the compensatory mechanism for the generation of motor neuron in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutant, we studied bone morphogenetic protein (BMP) antagonists including *follistatin*, *flik* and *noggin*, and retinoic acid signaling in this mutant.

To study expressions of BMP antagonists, we performed *in situ* hybridization. To examine an activity of retinoic acid, we measured β -galactosidase activity in retinoic acid response element (RARE) transgenic mouse.

The expression of *follistatin* was reduced at both levels of forelimb and hindlimb in *Shh*^{-/-} mutant compared to wild type embryo. It was restored at the level of forelimb but reduced at the level of hindlimb in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutant compared to wild type. The expression of *flik* was similar with wild type embryo at both levels of forelimb and hindlimb in *Shh*^{-/-} mutant. The expression of *flik* was similar with wild type embryo at the level of forelimb however reduced in hindlimb level in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutant. The expression of *noggin*, a BMP antagonist, was increased in *Shh*^{-/-} mutant. Activity of retinoic acid signaling was not affected in *Shh*^{-/-} or *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutants.

From these results, we conclude that retinoic acid but not *follistatin* and *flik*, may be involved in the generation of motor neuron in *Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} mutant.

Key words : BMP antagonists, Follistatin, Flik, Noggin, Sonic hedgehog, Retinoic acid