

예쁜 꼬마선충에서의 칼시케스트린에 관한 연구

안주홍 교수
광주과학기술원 생명과학과

요약

칼시케스트린은 골격근과 심장근의 근소포체 내에서 칼슘을 격리시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 우리는 예쁜 꼬마선충에서 토끼 골격근의 칼시케스트린과 아미노산 서열상 50% 이상의 유사성을 보이는 유전자를 찾아내어 그 기능을 연구하였다. 포유류가 골격근 타입의 칼시케스트린 유전자와 심장근 타입의 칼시케스트린 유전자를 가진 것과 달리 예쁜 꼬마선충은 하나의 칼시케스트린 유전자를 갖는다.

우리는 골격근, 인두근과 음부근에서 중배기 초기부터 발생 전 시기동안 강하게 발현됨을 보였고, 골격근에서 칼시케스트린이 라이아노딘 수용체(UNC-68)가 존재한다고 알려진 근소포체막 부근에 위치함을 확인하였으며, 라이아노딘 수용체가 칼시케스트린의 위치에 영향을 준다는 사실을 알게되었다.

칼시케스트린이 근소포체에서 과량으로 발현되거나 칼시케스트린 유전자가 결핍된 돌연변이에서 정상적으로 근육이 형성되는 것으로 보아 근육형성과 수축에 중요하지 않을 거라 추정되었고, 더 나아가 RNAi 실험을 통해 골격근의 칼시케스트린을 완전히 제거했을 때 역시 근육형성과 움직임에 아무런 문제를 유발하지 않음을 확인하였다.

이러한 결과로부터 칼시케스트린은 예쁜 꼬마선충의 골격근에 존재하는 주된 칼슘 결합단백질이지만 골격근의 형성이나 근 수축에는 필수적이지 않다는 결론을 내리게 되었다.

배경

칼시케스트린은 1971년 척추동물의 근소포체에서 처음 발견된 칼슘결합단백질로서¹⁾ 생화학적 연구를 통해 그리 강하지 않은 보통의 결합력과 많은 칼슘 결합능력을 가진 것으로 알려졌다²⁾, 이러한 중간정도의 결합력으로 많은 양의 칼슘과 결합하는 특성 때문에 근소포체 내에서 칼슘저장 역할을 할 것으로 추정되었다³⁾. 그러나 아직까지 생물학적 기능은 자세히 밝혀져 있지 않다.

척추동물에서 칼시케스트린은 고속-연축-골격근 타입과 심장근 타입의 두가지 유전자가 발견되었다. 그러나 아직 무척추동물의 칼시케스트린에 대한 보고가 없다. 우리는 무척추 동물인 예쁜 꼬마선충의 근육에 칼시케스트린이 존재하는지, 만약 존재한다면 그 기능은 무엇인지 연구해 보기로 하였다. 예쁜 꼬마선충은 짧은 생활환을 가진 토양 선충으로 짧은 세대기와 단순한 구조를 가진 이유로 유전학과 세포생물학적 연구에 유용한 모델동물로 이용되고 있다. 예쁜 꼬마선충은 움직임에 중요한 몸체근육과 음식섭취와 저작에 중요한 인두근을 가지고 있고, 많은 유전학적, 생화학적 연구결과 몸체근육은 척추동물의 골격근과, 인두근은 심장근과 그 유래를 같이 하는 것으로 추정된다⁴⁾. 또한 예쁜 꼬마선충은 게놈지도의 완성과 정방향, 역방향 유전학적 실험 기술 등을 통해 척추동물의 유사 유전자의 기능연구를 위한 좋은 모델 동물이 되고 있다.

결과

예쁜 꼬마선충에서 단일 칼시케스트린 유전자의 동정
예쁜 꼬마선충의 칼시케스트린 유전자를 찾기 위해 우리는 예쁜 꼬마선충의 게놈 데이터 베이스를 이용하였고, 417개 아미노산을 암호하는 하나의 유전자(*csq-1*)를 찾았다. 칼시케스트린 유전자는 X 염색체의 오른 팔에 위치하며 유전지도 상에서는 *his-24*와 *unc-3* 사이에 위치한다(그림 1). 그리고 *mnDf4*,

mnDf10^{5, 6, 7)}이라는 두 개의 염색체 결핍 돌연변이가 존재하는데 이는 칼시케스트린 유전자를 포함한 부위가 결핍된 돌연변이로 배 발생단계에서 성장이 멈추나 몸체와 인두부분에서 근육발생이 관찰되었다.

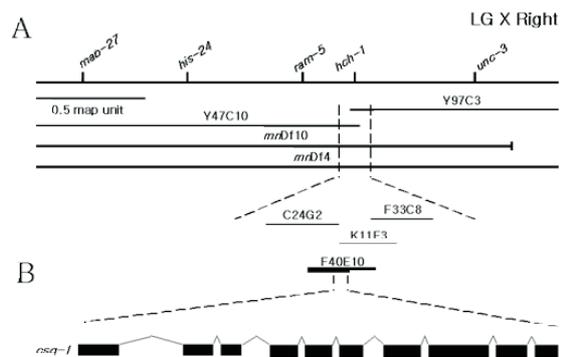


그림 1 칼시케스트린의 유전지도와 물리지도
(A) 칼시케스트린은 유전지도상에서 *ram-5*와 *unc-3* 사이에 위치하며, 이들 부위를 상설한 결핍돌연변이 *mnDf10*과 *mnDf4*가 있다.
(B) 예쁜꼬마선충의 칼시케스트린은 *cosmid F40E10.4*의 *F40E10.3* 유전자에 의해 암호되는 exon 10개로 구성된 단백질이다.

칼시케스트린 유전자(*csq-1*)는 칼슘결합 단백질을 만드는 유전자

척추동물의 칼시케스트린은 칼슘결합 능력을 가진 것으로 알려져 있고⁸⁾, 따라서 우리는 이와 높은 유사성을 보이는 예쁜 꼬마선충의 칼시케스트린이 칼슘결합 능력을 갖는지 확인해 보기로 했다. 네 가지 단편의 칼시케스트린 펩타이드를 GST와 결합시켜 대장균에서 과다발현 하였고, 동위원소 ⁴⁵Ca²⁺를 이용한 칼슘결합측정실험을 통해 칼시케스트린이 전체영역을 통해 칼슘과 결합함을 확인하였다(그림 2).

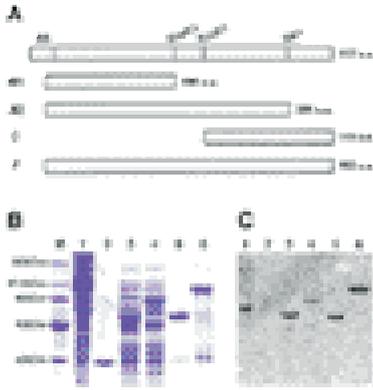


그림 2 칼슘결합측정실험
칼시케스트린의 네 가지 단편을 만들어(A), 이들을 GST와 결합시켜 대장균에서 과다 발현시켰고(B), 이들의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 과의 결합능력을 확인하였다(C). M, size marker; 1, 쥐의 심장 소포체; 2, GST; 3, N1; 4, N2; 5, C; 6, F.

발생과정중 칼시케스트린의 발현

칼시케스트린의 시간적, 공간적 발현을 알아내기 위해 우리는 northern blot analysis와 whole-mount *in situ* hybridization 실험을 수행하였다. northern blot analysis를 통해 약 1.5 kb의 전사체가 양의 차이는 있으나 발생단계 전 과정에서 발현됨을 보았고, *in situ* hybridization 실험을 통해 배 발생 단계에서부터 성체단계까지 골격근의 전구세포와 골격근에서 칼시케스트린의 전사체가 존재함을 알았다(그림 3).

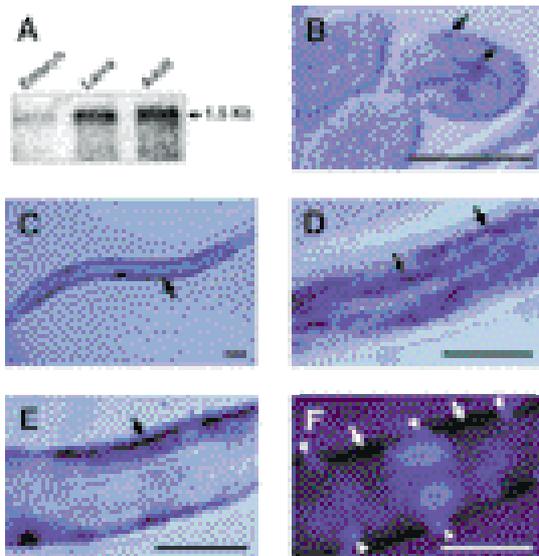


그림 3 Northern blot analysis와 whole-mount *in situ* hybridization.
(A) ^{32}P 로 표식한 칼시케스트린의 cDNA를 probe로 이용한 발생단계별 전사체의 발현정도
(B-E) *in situ* hybridization을 통한 칼시케스트린의 발생단계별 발현부위(화살표) 막대의 크기는 50 μm .

라이아노딘 수용체(RyR)의 결핍과 칼시케스트린 위치와의 관계

항 칼시케스트린 항체는 예쁜 꼬마선충 추출 western blot에서 64 kDa 정도의 한 밴드를 인지하였다. 그러나 예상되는 예쁜 꼬마선충의 칼시케스트린 크기는 49 kDa이다(그림 4).

이러한 현상은 칼슘결합 단백질에서 자주 보이는 현상으로 다

른 척추동물의 칼시케스트린 경우에서도 관찰되었다⁹⁾. 또한 항 칼시케스트린 항체로 염색을 했을 때 그물모양의 염색 패턴을 보였다(그림 5A). 이는 근 수축과 이완에 관련되어 있는 것으로 알려진 라이아노딘 수용체의 항체로 염색한 결과(그림 5B)¹⁰⁾와 유사한 패턴으로, 근소포체에 존재하면서 근소포체로부터 칼슘을 방출하여 근 수축을 유발시키는 라이아노딘 수용체^{11, 12)}와 칼시케스트린이 상호작용한다는 생체 외 실험결과¹³⁾와 일치한다. 우리는 라이아노딘 수용체가 발현되지 않는 돌연변이체(*unc-68*)를 항 칼시케스트린 항체로 염색하였고, 그 결과 정상형(wild-type)에서의 그물형태와는 확연히 구별되는 불규칙적 패턴을 볼 수 있었다(그림 5C). 이러한 결과로부터 칼시케스트린의 생체 내 위치가 라이아노딘 수용체의 존재와 관련이 있다는 추정을 할 수 있었다.

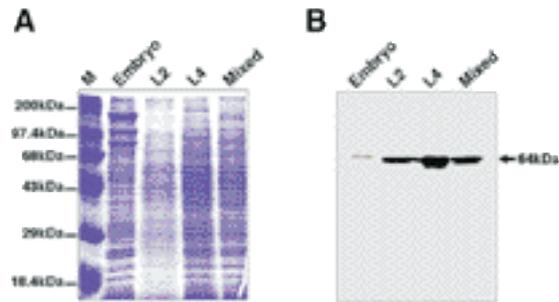


그림 4 칼시케스트린의 발생단계별 western blot analysis.
(A) SDS-PAGE gel을 coomassie 염색한 결과
(B) 항 칼시케스트린항체를 이용하여 blot으로부터 64 kDa 크기의 신호를 인지.

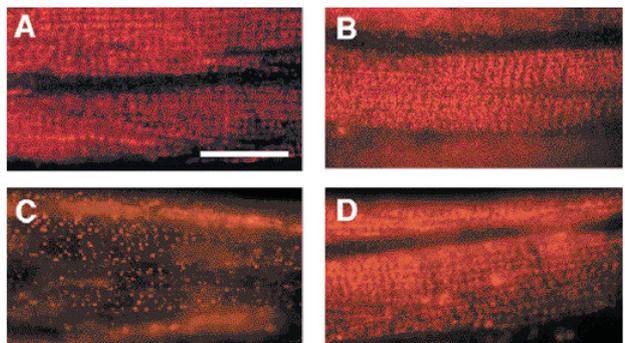


그림 5 정상형과 라이아노딘 수용체 돌연변이체(*unc-68*)의 항체염색 결과
(A)는 항 라이아노딘 수용체의 항체로 염색한 했을 때 (B)와 같은 격자무늬를 보이며, 항 칼시케스트린항체로 라이아노딘 수용체 돌연변이체(*UNC-68*)를 염색하면 이들과 다른 불규칙적 염색양상을 보인다(C). (D)는 비교 군으로 아세틸콜린 수용체의 돌연변이체인 *unc-29*를 항 칼시케스트린항체로 염색한 결과. 막대의 크기는 20 μm .

우리는 또한 칼시케스트린의 정확한 존재 위치를 확인하기 위해 항 칼시케스트린 항체를 이용하여 EM(immuno gold electron microscopy)을 수행하였고, 칼시케스트린이 골격근의 위쪽 근소포체 막 부위에 존재함을 알게 되었다(그림 6A와 6B).

재미있게도 이 부위는 라이아노딘 수용체가 존재하는 부위로 알려져 있다¹⁰⁾. 라이아노딘 수용체의 돌연변이체인 *unc-68*에서는 근소포체 막 부근에서 칼시케스트린의 존재가 인지되지 않았고, 이 결과는 위의 항체 염색결과와 일치한다(그림 6C와 6D). 즉, 생체 외 실험의 결과와 같이 생체 내에서도 칼시케스트린과 라이아노딘 수용체가 상호작용을 할거라는 결론에 도달하였다.

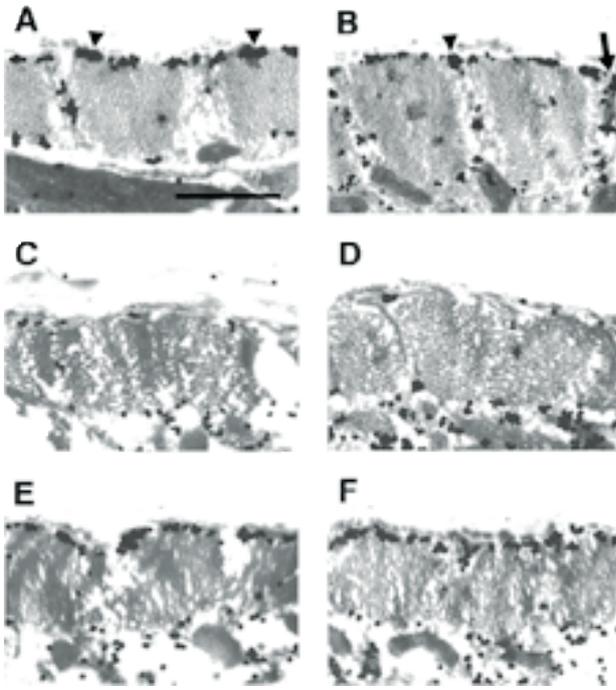


그림 6 EM(immuno gold electron microscopy)을 통한 칼시케스트린의 존재 위치 확인

(A, B) 정상형 경우, 칼시케스트린의 존재가 위쪽 근소포체(삼각형)와 dense body(화살표)에서 확인되었으나, 라이아노딘 수용체 돌연변이체(*unc-68*)의 경우 근소포체에서 칼시케스트린의 신호가 보이지 않는다(C, D).

(E, F)는 대조군인 *unc-29*.

막대의 크기는 1 μm.

칼시케스트린은 몸체근, 인두근과 음부근에서 발현

우리는 칼시케스트린의 발현 양상을 보기 위해 형광단백질(GFP; green fluorescent protein)을 리포터로 이용한 promoter 삽입 벡터(*csq-1::gfp*)를 만들어 예쁜 꼬마선충의 자궁에 주입하고 다음세대에서 벡터가 들어간 형질 전환체를 선별하여 형광 현미경 하에서 관찰한 결과, 칼시케스트린이 배 발생 단계에서부터 성체시기까지 전 시기를 통해 인두근과 음부근 그리고 몸체근에서 발현됨을 보았다(그림 7A-C).

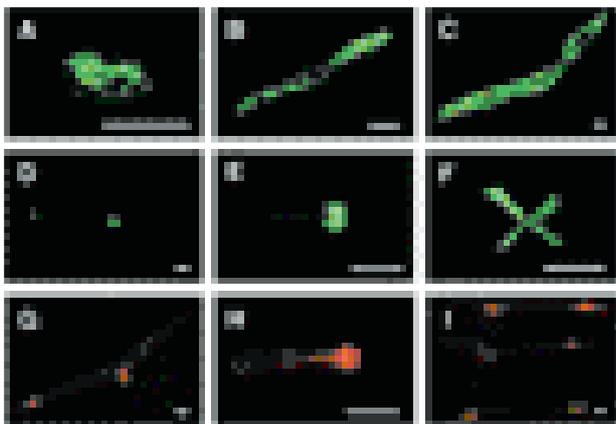


그림 7 형광단백질(GFP; green fluorescent protein)과 항체를 이용한 칼시케스트린의 발현양상 확인

칼시케스트린의 promoter 부위를 형광단백질과 결합한 plasmid를 획득한 형질 전환체에서 초기 배 발생 단계에서부터 성체시기까지 형광단백질의 발현 관찰(A, B, and C).

이 형질 전환체에 GFP에 대한 RNAi를 수행한 결과 몸체 근을 제외한 인두근과 음부근에서의 발현이 관찰됨(D, E, F).

칼시케스트린에 대한 RNAi를 수행한 후 항 칼시케스트린 항체로 염색했을 때 위와 같이 인두근과 음부근에서는 RNAi가 작동하지 않음을 관찰(G, H, I)

칼시케스트린 발현의 조직 특이적 저해

우리는 칼시케스트린의 기능을 알아보기 위해 RNAi(double strand RNA mediated interference) 실험¹⁴⁾을 수행하였다. RNAi는 특정 유전자의 cDNA 일부분을 이중가닥 RNA로 만든 후 예쁜 꼬마선충에 주입하여 특정 유전자의 발현을 거의 완벽하게 저해하는 실험방법으로 control로 GFP에 대한 RNAi를 형질 전환체(*csq-1::gfp*에 의해 형질 전환된)에 주입한 결과 몸체근에서는 GFP 발현이 완전히 저해되었으나, 인두근과 음부근에서는 저해가 되지 않음을 발견하였다(그림 7D-F). 이 부위는 예쁜 꼬마선충의 RNAi 실험에서 RNAi가 작동하지 않는 부위로 알려진 일부 조직에 속한다. 또한 칼시케스트린에 대한 RNAi 실험 결과 그림에서 보는 바와 같이(그림 7G-I) 항 칼시케스트린 항체로 염색했을 때 GFP RNAi 실험에서와 같은 결과(그림 7D-F), 즉, 골격근에서의 칼시케스트린 발현은 저해했으나 인두근과 음부근에서는 칼시케스트린의 존재가 확인되었다.

골격근에서의 칼시케스트린 결핍

GFP 발현 양상을 통해 우리는 몸체근육에서 과량으로 발현되는 칼시케스트린이 근수축과 이완에 중요한 역할을 할 것으로 추측했고, 다른 한편으로는 칼시케스트린 유전자를 포함한 결핍 돌연변이체의 표현형질로부터 근형성과 수축에 필수적이지 않을 거라는 추측 또한 가능하였다^{5, 7)}. 우리는 칼시케스트린의 기능을 밝히기 위해 RNAi를 수행하게 되었고, 그 결과 정상형(wild-type)과의 차이점을 발견할 수 없었다. 그러나 라이아노딘 수용체에 대한 RNAi를 수행한 결과, 라이아노딘 수용체 돌연변이체(*UNC-68*)와 유사한 느린 움직임, 라이아노딘 수용체 agonist인 levamisole¹⁵⁾에 대한 저항성 등의 특징을 보였다.

이는 다른 근소포체 단백질에 대한 RNAi가 정상적으로 작동했다는 의미이다. 또한 칼시케스트린에 대한 RNAi를 라이아노딘 수용체 결핍배경(*UNC-68* 돌연변이체, *UNC-68* RNAi)에서 수행해 보았으나 어떠한 시너지 효과도 볼 수 없었다. 이러한 결과들로부터 우리는 몸체근에서 대량으로 발현되는 칼시케스트린은 적어도 움직임에는 필수적이지 않다는 결론을 내릴 수 있었다.

결론

우리는 데이터 베이스와 Southern blot analysis를 통해 예쁜 꼬마선충에서 토끼의 골격근 타입의 칼시케스트린과 50% 이상의 유사성을 가진 칼시케스트린을 찾았고, 칼슘 오버레이 실험을 통해 칼슘 결합 능력을 확인하였다. 근육의 수축과 이완은 칼슘에 의한 탈 분극에 의해 일어나는데¹⁶⁾ 원형질막에 존재하는 전압개폐통로인 VGCCs와 근소포체에 존재하는 라이아노딘 수용체(RyR)가 근육의 수축과 이완에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 칼시케스트린은 생체 외 실험에서 라이아노딘 수용체와 칼시케스트린이 상호 작용한다는 연구 결과¹⁸⁾와 근소포체 내 과량의 칼슘 농도가 라이아노딘 수용체에 의한 칼슘 방출에 중요하다는 보고⁹⁾ 때문에 위 경로의 하부에 존재하는 것으로 추정된다.

항 칼시케스트린 항체로 정상형(wild-type)을 염색한 결과, 항 라이아노딘 수용체의 항체로 염색했을 때와 유사한 그물모양의 패턴을 보였으나, 항 칼시케스트린 항체로 라이아노딘 수용체가 결핍된 돌연변이체(*unc-68*)를 염색한 결과 전혀 다른 불규칙적인 양상을 보였다. 그리고 항 칼시케스트린 항체를 이용한 EM 결과 정상형(wild type)에서 몸체근육 세포 내의 위쪽 근소포체 막 부위에서 칼시케스트린의 존재가 확인되었으나 라이아노딘 수용체의 돌연변이체인 *UNC-68*에서는 세포기질 내의 다른 부

분에 불규칙적으로 위치함을 보였다.

이러한 실험결과로부터 우리는 칼시케스트린의 존재부위가 라이아노딘 수용체와 관련이 있다는 추정을 할 수 있었다. 또한 우리는 GFP를 이용하여 예쁜 꼬마선충에서 칼시케스트린이 몸체근육, 인두근육 그리고 음부근육에서 강하게 발현됨을 볼 수 있었고, 칼시케스트린의 기능을 알아보기 위해 RNAi 실험을 수행하였다. RNAi는 인두 근육과 음부 근육을 제외한 몸체근육에서만 작용하는데 예상과 달리 근육형성이나 움직임 등에 아무런 변화를 주지 않았다. 즉, 예쁜 꼬마선충에서 몸체 근육의 형성, 그리고 수축과 이완에 칼시케스트린이 필수적이지 않다는 것이다. 우리는 이에 대한 몇 가지 가능성을 생각할 수 있는데, 첫째, 우리가 모르는 어떤 단백질이 칼시케스트린의 기능을 보완한다는 가능성, 둘째, 라이아노딘 수용체와 칼시케스트린을 이용한 경로와 독립적인 경로의 존재 가능성, 셋째, 칼슘의 저장고 역할을 하는 칼시케스트린이 없다고 하더라도 저장고로 칼슘을 공급하는 펌프(SERCA)의 능력이 수요량을 감당할 수 있다면 칼시케스트린(저장고)이 존재하지 않더라도 특별한 문제점을 유발하지 않을 것이라는 가정이다. 또한 우리는 RNAi에 의해 저해되지 못한 심장 근육 타입인 인두 근육에서의 칼시케스트린의 역할에 주목하고 있다.

참고문헌

- 1) MacLennan, D.H. and Wong, P.T.S.(1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1231-1235.
- 2) MacLennan, D.H., Campbell, K.P. and Reithmeier, R.A.F. (1983). *Calcium and Cell Function* **4**, 151-173.
- 3) Heilmann, C. and Spacmer, C.(1996). pp. 222-224. New York: Oxford University Press Inc.
- 4) Waterson, R. H. (1988) pp.281-335. Cold Spring harbor laboratory Press, New York.
- 5) Meneely P.M. and Herman, R.K.(1979). *Genetics* **92**, 99-115.
- 6) Ahnn, J. and Fire, A. (1994). *Genetics* **137**, 438-498.
- 7) Lee, D.,Shin, J. and Ahnn, J. (1997). *Korean J. Biol. Sci.* **1**, 355-361.
- 8) Mitchell, R. D., Simmerman, H.K.B. and Jones, L.R. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 1376-1381.
- 9) Fligel, I., Ohnishi, M., Carpenter, M.R., Khanna, V.K., Reithmeier, R.A.F. and MacLennan, D.H.(1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1167-1171.
- 10) Maryon, E.B., Saari, B. and Anderson, P. (1998). pp. 451-482. San Diego: Academic Press.
- 11) Coronado, R., Morrisette, J., Sukhareva, M. and Vaughan, D.M. (1994). *Am J Physiol.* **266**, 1485-1504.
- 12) Maryon, E.B., Coronado, R. and Anerson. P. (1996). *J. Cell Biol.* **134**, 885-893.
- 13) Guo, W. and Campbell, K.P. (1995). *J. Biol. Chem.* **271**, 9027-9030
- 14) Fire, a., Xu, S. Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.(1998). *Nature* **391**, 806-811.
- 15) Lewis, J.A., Wu, C. H. and Levine, J.H. (1980). *Genetics* **95**, 905-928.
- 16) Bagshow, C.R. (1993). pp.26-27. Chapman & Hall Inc, London.
- 17) Catterall, W.A. (1991). *Cell* **64**, 871-874.
- 18) Mitchell, R.D., simmerman, H.K.B. and Jones, L.R. (1998). *J. Biol. Chem.* **263**, 1376-1381.

연자 약력 및 소개



안주홍
joohong@eunhasu.kjist.ac.kr

1984 서울대학교 생물학과 학사
1986 State University of New York at Stony Brook M.S.
1991 UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School, Ph.D.
1991-1995 Carnegie Institution of Washington, Post Doc.
1996- 광주과학기술원 생명과학과 조교수
현재 광주과학기술원 생명과학과 부교수