

GOVP1200506929

M10106000055-03B4500-00910

분자 및 세포 기능 디스커버리

Discovery of molecular and cellular function

동물모델을 이용한 선천성 간질의 원인

유전자 발굴 및 발병 기전 연구

Identification of an epileptic gene in sims mutant mouse
and genetic study for the diseases

질병관리본부

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 세부과제 “동물모델을 이용한 선천성 간질의 원인 유전자 발굴 및 발병 기전 연구”의 보고서로 제출합니다.

2004. 7. 30.

주관연구기관명 : 질병관리본부

주관연구책임자 : 오 범 석

연 구 원 : 구 수 경

연 구 원 : 진 수 정

연 구 원 : 기 은 경

보고서 초록

과제관리번호	M10106000055-03 B4500-00910	해당단계 연구기간	2001.8.1-2004.5.31	단계 구분	3단계 / 총 3단계
연구사업명	중 사업명	특정 연구 개발 사업			
	세부사업명	분자 및 세포 기능 디스커버리 사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	동물모델을 이용한 선천성 간질의 원인유전자 발굴 및 발병기전연구			
연구책임자	오 범 석	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부 : 5 명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계: 50,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	질병관리본부 유전체연구부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	31
<p>sims는 자발적으로 새롭게 생긴 돌연변이 마우스로, 성적 미성숙, 대뇌 그리고 간질의 대표적인 표현형을 보인다. sims 돌연변이에서 나타나는 발작은 동형접합체와 이형접합체에서 정도가 다르게 나타난다. 이들 표현형 이외에도 sims 돌연변이는 이 유시기에 일반 마우스보다 작은 사이즈를 가지며 약간의 경련 증상을 보인다. 암컷과 수컷 모두에서 이차적 생식 기관의 발생적 지연이 나타나고, 다른 조직적인 차이 없이 뇌가 30 % 정도 더 크다. 이러한 sims 돌연변이의 표현형은 sims 돌연변이 마우스에서 사춘기의 생리학적 과정을 통제하는 중요한 유전자에 문제가 생겼을 것이라는 것을 제안해준다. 유전연구를 통해서 sims는 멘델리안 유전 법칙을 따르는 상 염색체 열성 유전이라는 것을 알아내고, 연관 분석을 통해서 sims의 원인 유전자가 마우스 염색체의 18번에 위치하는 두개의 마커 D18Mit12와 C-7사이에 있다는 것을 알아냈다. Positional cloning을 통해 원인 유전자를 확인하기 위해 <i>in silico</i> BAC contig를 만들었고, 그 지역에서 19개의 후보 유전자를 찾아내었다. 이 19개의 후보 유전자들 중에서 원인 유전자를 찾기 위해서 RT-PCR, Southern, Northern, Western blotting, sequencing을 하였고, 형질전환 마우스를 이용한 표현형의 rescue실험을 하였다. 이 실험의 결과, sims의 원인 유전자를 19개의 후보 유전자 중 5개의 후보 유전자로 압축시켰다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	간질, 마우스모델, 연관조사, 염기서열 분석, 형질전환 마우스.			
	영 어	epilepsy, mouse model, linkage analysis, cDNA sequencing, transgenic mice.			

요 약 문

I. 제 목

- 동물모델을 이용한 선천성 간질의 원인 유전자 발굴 및 발병 기전 연구

II. 연구개발의 목적

- 마우스모델을 이용하여 간질의 원인 유전자를 발굴함
- 얻어진 유전정보를 이용하여 간질의 발병기전을 이해함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 유전지도 완성을 위하여 마우스 1,000마리의 연관조사 (2,000 meiosis)
- D18Mit12 마커와 HDac 유전자 사이의 약 800kb의 염기서열 및 유전자 정보 완성
- BAC clone transgenic 마우스를 이용하여 형질의 rescue 확인

IV. 연구개발결과

- 간질마우스모델 sims를 이용하여 염색체 18번 원인유전자 800kb지역의 유전적·물리적 지도 작성
- 후보 유전자 19개의 유전자 발현 및 변이 분석
- sims 지역 3개의 BAC clone transgenic 마우스 구축
- 형질 rescue 분석을 통하여 후보 유전자의 수를 5개로 줄임

V. 연구개발결과의 활용계획

- sims 마우스를 이용한 간질유전자의 발굴을 계속 수행해서 원인유전자를 찾은 후 앞서 기술한 방법을 통하여 간질의 유전진단에 사용할 수 있는 지를 확인하고 또한 sims 모델마우스를 이용하여 발작이 일어나는 발병기전을 분석함
- 그 결과는 간질의 pathway 규명을 통하여 더욱 많은 간질 및 발작에 관여하는 유전자를 발굴하는 단초가 될 것임

S U M M A R Y

Series of genetic study for epilepsy found that approximately 20 % of epileptic diseases are caused by genetic factors and at the moment more than 100 cases were reported for the patients showing the monogenic traits. Since genetic study for the epilepsy is difficult with human subject, mouse models have been used widely in epilepsy study. We characterized a new spontaneous mutant mouse line *sims* (sexual immaturity, megaencephaly and seizure). *sims* mutant mouse has a smaller size than normal mice at the weaning age and exhibits mild tremor. Severe developmental retardation of the secondary sexual organs in both sexes was observed and the brain had 30 % heavier with no histological difference. Another phenotype associated with *sims* is seizure that occurs in both homozygotes and heterozygotes with varying severity. These results suggest that a critical gene controlling the physiological processes of puberty, likely in CNS, is disrupted in these mutant mice. Linkage analysis revealed that *sims* is located between D18Mit12 and C-7 in mouse chromosomes 18. To identify the responsible gene by positional cloning, we have constructed *in silico* BAC contig and analyzed 19 candidate genes with several approaches such as RT-PCR, full-length RT-PCR, Southern hybridization, Northern hybridization, Western blotting, nucleotide sequencing and phenotypic rescue experiment using mouse BAC clone transgenic mice. As a result, we concluded a mutated gene of *sims* mutant mice is one of 5 candidate genes out of 19 candidate genes. Further study is needed to identify the causative gene of *sims* mutant mice.

C O N T E N T S

Chapter 1. Summary of research project

Chapter 2. Present status of internal and external technical development

Chapter 3. Contents and results of research project

Chapter 4. Achievement for the goal and contribution for the related field

Chapter 5. Application plan of the results

Chapter 6. Abroad science technical information obtained from the process of research

Chapter 7. References

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장. 참고문헌

제 1 장. 연구개발과제의 개요

- 인구의 약 10 % 정도가 평생에 한번쯤은 발작을 일으키며, 많은 경우 암, 뇌손상, metabolic imbalance와 같은 병들의 합병증으로 나타나는 경우가 많음.
- 간질은 반복되는 발작질환으로 신경세포의 비정상적인 과흥분성에 의해 유발됨.
- 발작증상은 개인차가 심하므로 현대 의학의 뛰어난 진단방법에도 불구하고 간질의 50 % 정도는 확진을 내리기가 어려움.
- 일련의 유전연구에 의하면 간질은 약 20 % 가 유전적 소인에 의해 결정되고 지금까지 100건 이상의 single mendelian disorder에 의해 유전되는 간질이 보고되었음. 따라서 간질의 원인 유전자를 규명하는 일은 간질의 진단과 치료를 위하여 중요함.
- 하지만 사람을 대상으로 한 간질관련 유전자 탐색연구는 현실적으로 어려우므로 유전학 연구에 적합한 마우스모델들이 전 세계적으로 많이 사용되고 있음 (표1).
- 마우스모델을 통하여 원인유전자를 탐색하는 방법은 positional cloning방법이 널리 사용되고 있으며 국내에서 미약한 positional cloning의 기술 확립과 간질의 진단 및 치료법 개발을 위하여 모델마우스에서 간질 원인 유전자를 발굴하는 연구는 매우 중요함.

표 1. 유전자가 밝혀진 간질모델마우스 (돌연변이종)

마우스	유전자	변이종류	염색체위치
tg (tottering)	hi-volt. Ca ⁺⁺ channel, α1a subunit	aa subs.	8
lh (lethargic)	hi-volt. Ca ⁺⁺ channel, β4 subunit	splicing (null)	2
swe (slow-wave epilepsy)	ubiquitous Na ⁺ /H ⁺ transporter	prem. stop	4
Myo5a (dilute)	myosin (non-muscle type)	aa subs.	9
opt (opisthotonus)	inositol 1, 4, 5 triphosphate receptor	deletion	6
Kcnj6 (weaver)	K ⁺ channel (G-protein-coupled)	aa subs.	16
qk (quaking)	novel multifunctional protein	deletion	17

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국외 연구개발 실적

1. 유전성 간질증후군으로는 생후 발작을 보이다가 3-4개월만에 없어지는 benign neonatal epilepsy (EBN), 진행성 근간대성 간질인 progressive myoclonic epilepsy (EPM), 수면시에 나타나는 nocturnal frontal lobe epilepsy (ENFL), 고열에 의한 유발되는 발작인 generalized epilepsy with febrile seizure (GEFS), 사춘기 때 나타나는 근간대성 간질인 juvenile myoclonic epilepsy (JME), 소아에서 주로 나타나는 일시적인 의식상실인 childhood absence epilepsy (CAE) 등이 있음.
2. 지금까지 사람에게서 발견된 간질관련 유전자는 20개 정도며 최근 transgenic technique의 발달로 많은 유전자가 Tg 나 knock-out 마우스에서 발작 증상을 나타내 현재 동물에서 약 50종의 발작관련 유전자가 보고되었으며 그들을 기능적으로 분류하면 ion channels, signal transduction proteins, neurotropic factors와 receptor 등임.

제 2 절. 국내 연구개발 실적

1. 국내의 간질에 관한 연구는 주로 병원에서 간질환자의 case 보고나 간질환자 (대개의 경우 측두엽 간질)의 항경련제 투여에 따른 효과를 보고하였을 뿐 간질에 대한 분자생물학적인 연구는 전무한 상태임.

제 3 장. 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 간질모델마우스 sims (sexual immaturity, megaencephaly, seizure)

1. 본 연구에서 사용되는 유전성 간질모델마우스, sims는 연구책임자가 직접 발굴한 autosomal recessive (seizure의 경우 heterozygote에서도 약하게 나타나는 semidominant임) 돌연변이 마우스로서 전신성 강직간대 발작 (generalized tonic-clonic seizure)을 일으킴.
2. sims 마우스의 발작을 수치적으로 분석하기 위하여 신경자극제의 하나인 pentylene tetrazole (PZT)을 주입시켜 그 반응을 조사한 결과 정상마우스에 비해 3배의 과민한 발작 반응을 나타냈음 (표 2).
3. 또한 sims 마우스는 발작뿐 만 아니라 떨림 (tremor), 사춘기의 홀몬분비 이상에 의한 성기관의 미성숙, 뇌의 비대현상 (megaencephaly) 등을 나타냄 (그림 1).
4. 조직검사 결과 난소 (ovary)에서 난의 배란된 흔적인 황체 (corpus luteum)을 발견할 수 없었으며, 정소 (testis)의 testosterone을 분비하는 Leydig cell, seminal vesicle, coagulating gland의 분비세포, 전립선 (prostate) 세포 등이 위축 (hypotrophy)되어 있는 것을 관찰하였음 (그림 2).
5. 돌연변이 마우스의 testosterone의 수준을 정량 분석한 결과 sims 돌연변이 생쥐의 이형접합체 (heterozygote)에서는 정상인 반면 동형접합체 (homozygote)에서는 testosterone이 전혀 검출되지 않았다 (표 3).

반응	Non-carrier	heterozygote
없음	6	2
발작	2	6

표 2. sims 돌연변이 마우스의 PTZ에 대한 발작반응 조사

number	heterozygote	homozygote
1	3.73/3.97	0.133/0.133
2	17.21/20.0	0.133/0.133
3		0.133/0.133

표 3. sims 돌연변이 마우스의 testosterone 정량분석 (Duplicate, pg/tube)

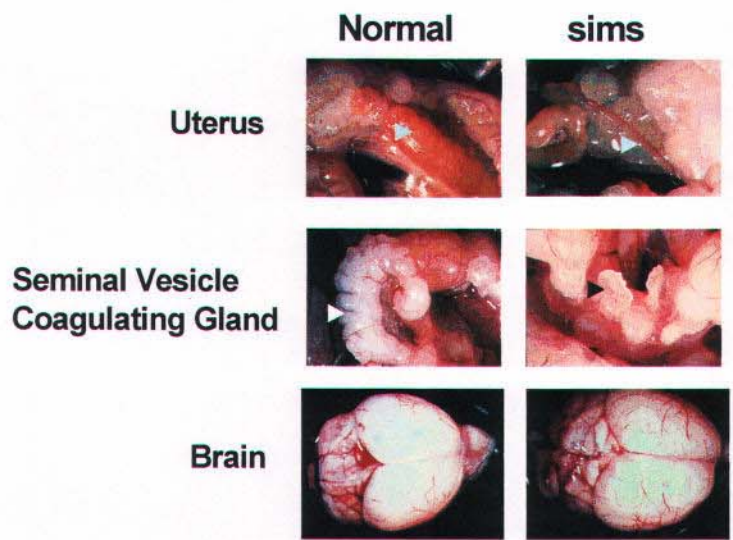


그림 1. sims 마우스의 해부학적 비교. 화살표는 자궁(uterus)과 seminal vesicle을 표시함.

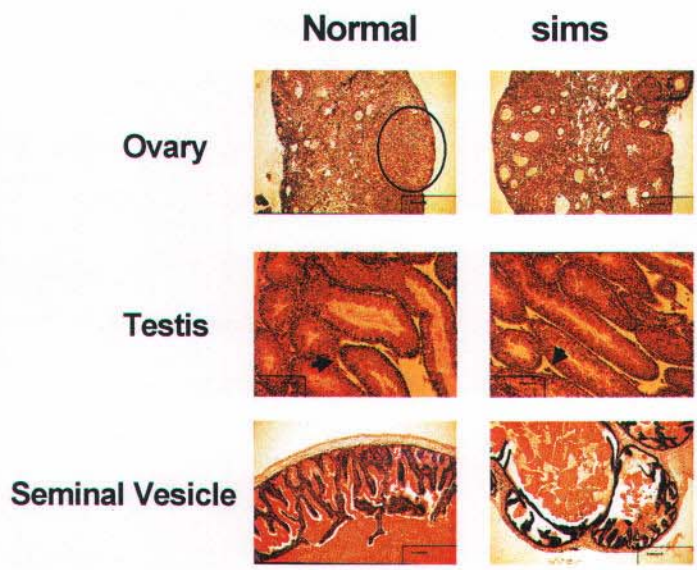


그림 2. 들연변이 생쥐의 조직학적 비교. Ovary의 open circle은 corpus luteum을 표시하며 testis의 화살은 Leydig cell을 나타냄.

제 2 절. 원인유전자의 염색체상의 위치 확인을 위한 유전지도 (genetic map) 작성

1. sims 유전자의 염색체 위치를 결정하기 위한 연관조사 실시 : 129 strain origin인 sims 마우스를 wild 마우스인 CAST와 교배시켜 (wild 마우스의 경우 genetic variation이 커서 genotyping으로 보다 많은 정보를 얻을 수 있음) F1 마우스를 얻음. F1 마우스는 CAST 염색체와 129 염색체를 갖는 homogeneous함. 하지만 F1 마우스를 서로 교배시키면 감수분열시 염색체의 cross-over가 일어나서 염색체가 섞이게 되고 따라서 sims 유전자 지역도 CAST와 129 유전체가 섞이게 됨 (그림 3, 4). F2 마우스의 phenotype과 genotype을 조사하여 sims phenotype과 co-segregation하는 지역을 추적해 나감으로서 sims 위치를 결정할 수 있음.
2. 초기 sims 유전자의 염색체 위치를 대략 확인하기 위하여 F2 마우스 중에서 sims phenotype을 갖는 affected 20마리의 genomic DNA를 pooling하여 genetic marker 로 분석한 결과 염색체 18번의 genetic marker D18mit87과 D18mit58사이에 위치하는 것으로 추정됨 (그림 5 a,b).
- 3, sims 마우스의 원인 유전자를 얻기 위하여 총 2,500마리 (5,000 meiosis)의 연관조사를 하여 sims 유전자 주변의 미세염색체 지도 (genetic fine map)를 작성하였으며 sims 유전자는 염색체 18번의 telomere 쪽으로 18 cM 부근 0.3 cM 이내로 좁힘 (그림 6). D18Mit12 마커는 centromere 쪽으로 RG-MBAC-368P10 BAC clone (NRG2 유전자)에 C-7 마커는 telomere 쪽으로는 RP23-6P18 BAC clone (Pcdha의 variable region)으로 구간은 약 500kb 임.

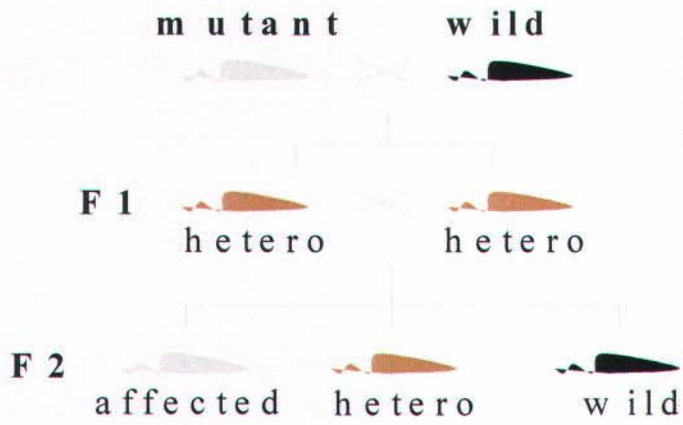


그림 3. 연관조사를 위한 마우스 교배 diagram

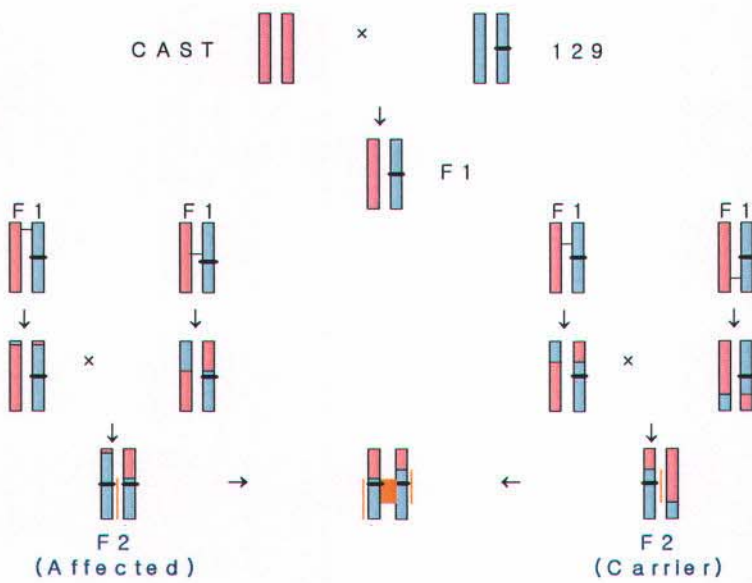


그림 4. 연관조사시 발생하는 염색체의 cross-over 및 genetic mapping scheme.

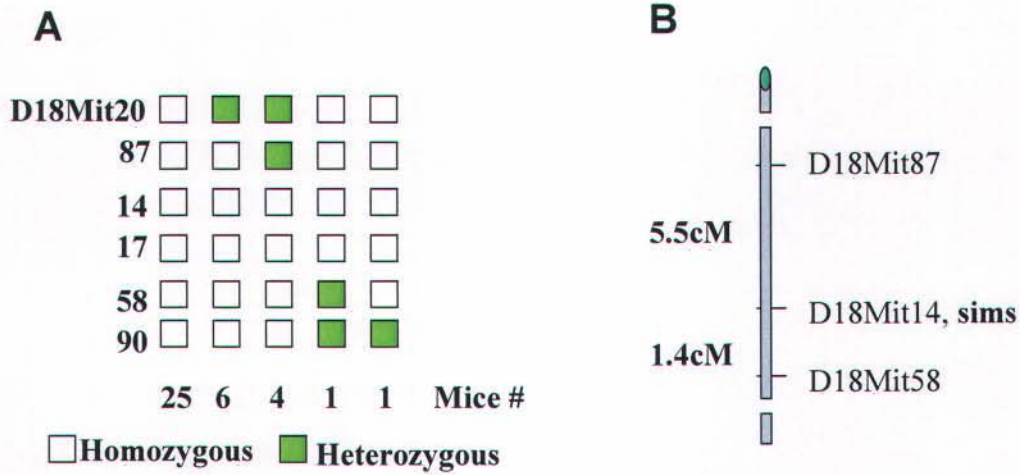


그림 5. *sims*의 염색체 지도. A, 질환마우스 37마리를 각 genetic marker로 연관조사한 결과 D18Mit14와 17에서 전부 homozygote로 나타남. B, *sims*의 염색체 위치.

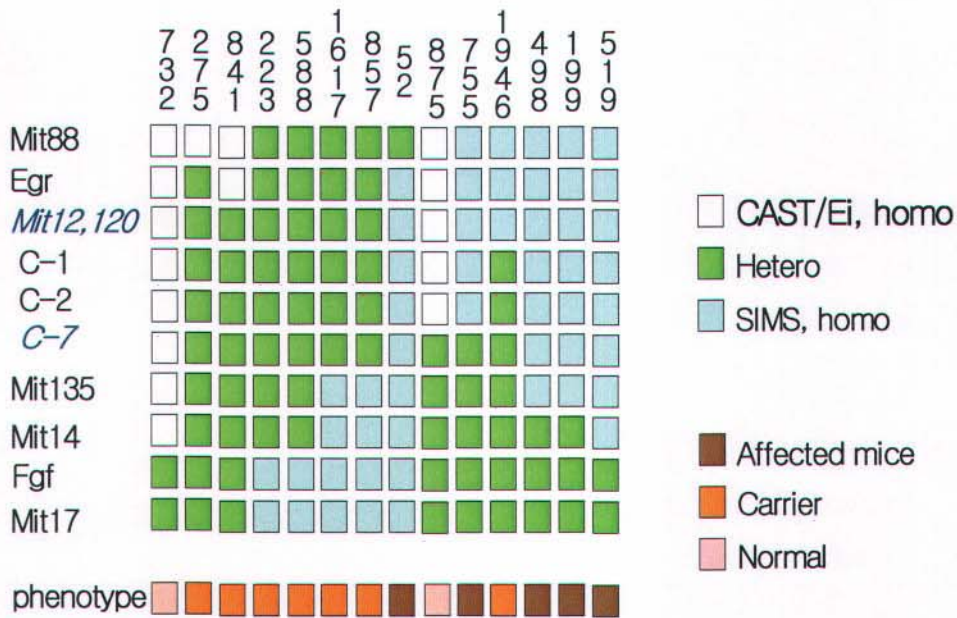


그림 6. 연관조사 결과

제 3 절. 원인유전자 부근의 염기서열 및 유전자 확인을 위한 물리지도 (physical map) 작성

1. 이 구간의 물리지도 (physical map)를 얻기 위하여 인간염색체지도와 마우스 sequence 간의 computer search(*in silico* study) 결과 핵심구간의 contig을 구축하였음 (그림 7).
 2. 이 구간 내에 존재하는 BAC clone 들의 염기서열을 이용하여 21개의 새로운 genetic marker를 개발하였음 (표 5).
 3. 마우스 BAC clone을 통한 contig이 완성되어 RG-MBAC-368P10--CT7-368A6--RP23-181H5--RP23-326L17--RPC1-23-193023--RP23-6P18--RPC1-23-72C114 의 순서로 결정되었으며 약 500kb의 염기서열에 대한 정보를 sequence alignment로 결정하였음.
- 물리지도에 의해 밝혀진 염기서열을 이용하여 구간 내에 존재하는 유전자를 확인한 결과 표 5와 같이 19개의 유전자를 확인하였음.

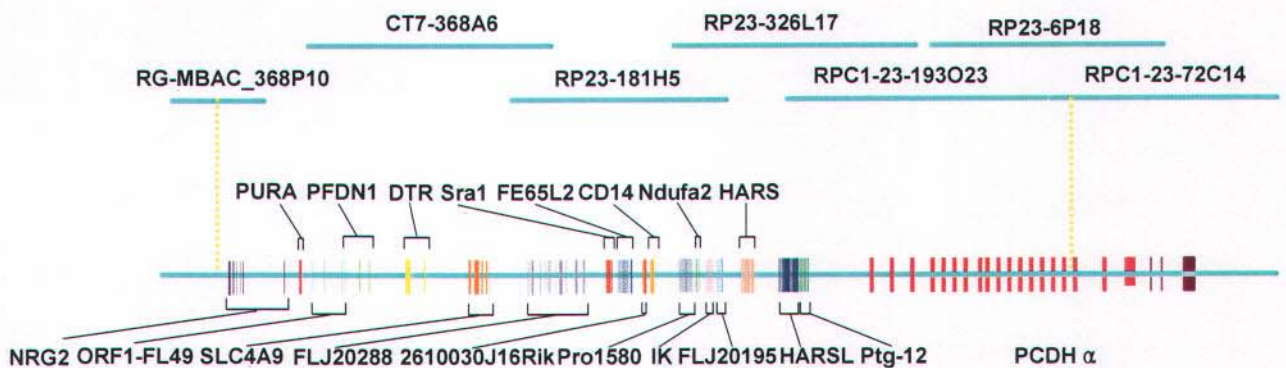


그림 7. sims 유전자의 physical map 및 후보유전자의 위치

표 4. 마우스 염색체 18번 20 cM 근처에 위치하는 본 연구에서 개발된 새로운 marker들

Primer 이름	primer F	primer R
m22-pA/B	gtgactactgtaattgacctc	atcacttcaaaatataacagtc
EGR1-F	caccttagccttaaggggt	tatcccatgggcaatagagc
P-2	ggaggttaagcaattcccata	tcgtatgaagggaacagtaagca
C-1	ggccattatgtgaaagagatca	tgcagcaatgcattaggtct
C-7	tcaaaaagctaggcctgtgaa	acagacacaccttgggaagc
C-12	aaatccagccctacagaaggt	tgggtggtgttagtgtgtgtgc
D-2	ccaaggtctgctcaatccat	tgaacattttctgccatttt
N-3	aaattcaagacatacagtgggaga	tggccatcaggttactgtctt
N-7	atctgatggggaagggaag	tttcagctctaccaagaagga
N-11	tcagctccaggaagactgaaa	ccctgaggacagaattgagg
N-15	ccactgctaaaataaaatacactgga	tctcccaacttgcttctg
RP23BAC-2	ttggtatagctctgagggtgt	caagggcacaaagggttatc
RP23BAC-5	cccacctcctctgagacaa	ccccaatagcaggcaaaacta
RP23BAC-7	ccaagtctgggattaag	ggcaagaaaatcaggcattc
RP23BAC-10	agttccagcaaaagcatga	tgcaaatggtgcagctatc
RP23BAC-8	tggaatatgcaaaccatgaa	ggccttaaattgccatcct
HDAC-M3	tagtaagcaaggccgtgagg	agtgtgctagtcaccctgtc
diap3-1	acatctctgctagcctcgga	gaaaagcacaatgcagcaa
diap-1	cttccaggactgcttctg	aaactgaggactcggggt
FGF-4	aaggagcccaagaaccaat	caaacctgacagcagaccag
NPY6R	ctgcagtctattggtgaagagtg	ttcatgcatgtaggcaagca

표 5. 후보유전자의 기능 및 GenBank number

유전자명	GenBank	기능
Neuregulin2 (NRG2)	AW476166	EGF like ligand for ErbB3 and ErbB4 receptor
ORF1-FL49	AK002512	putative nuclear protein ORF1-FL49
prefoldin1(PFDN1)	NM026027	subunit 1 of prefoldin, transfers proteins to a cytosolic chaperonin
diphtheria toxin receptor(DTR)	NM010415	Heparin-binding EGF-like growth factor, binds to EGF receptors and functions as a smooth muscle cell mitogen
SLC4A9	AW018362	Solute carrier family4, sodium bicarbonate cotransporter-like, member9
FLJ20288	AW106560	May mediate protein-protein interactions; contains fifteen ankyrin (Ank) repeats
Sra1	NM025291	steroid receptor RNA activator 1
Fe65L2	BG247381	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3(Apbb3), Member of the Fe65 protein family; has WW and PID/PTB elements
2610030J16Rik	NM026404	function unknown
CD14	NM009841	CD14 antigen
Pro1580	NM018502	hypothetical protein PRO1580, function unknown
Ndufa2	NM010885	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 2
IK cytokine(IK)	AJ006130	Cytokine; down-regulates the expression of HLA class II antigens
FLJ20195	AK017695	hypothetical protein FLJ20195
HARS	NM008214	histidyl-tRNA synthetase
HARSL	NM080636	histidyl-tRNA synthetase-like
Ptg-12	NM025594	function unknown
PCDH-alpha	NM054072	protocadherin alpha,cadherin domain

제 4 절. 원인유전자 발굴을 위한 분석

1. 지금까지 발표된 유전질환의 변이를 종합하여보면 coding region의 point mutation에 의한 아미노산의 변화가 가장 많으며 그 외에도 deletion, insertion, regulatory region의 변이 및 splicing region의 변이 등 다양한 변이가 보고 됨.
2. 연구결과 sims 유전자는 마우스 염색체 18번 centromere에서 18 cM 떨어져 있는 NRG2 유전자와 Pcdh α 유전자의 사이에 있는 것으로 확인되었음. 따라서 이 사이에 존재하는 19개 유전자의 유전자 발현, 유전자 변이를 RT-PCR, Northern blot, genomic Southern blot 등으로 변이마우스에서 정상과 비교하여 차이를 보이는 유전자를 찾고자 하였음.
3. 유전자 발현의 차이를 확인하기 위하여 19개 유전자의 RT-PCR을 수행한 결과 SLC4A9을 제외하고는 성공적으로 수행되었음. 하지만 결과는 유의성 있는 차이를 확인하지 못하였음 (그림 8).
4. exon-intron boundary splicing지역 염기서열에 변이가 생기면 alternative splicing이 생기고 이로 인하여 다른 크기의 mRNA variant가 발현되어 표현형질이 달라질 수도 있으므로 full-length RT-PCR을 시도하였음 (그림 9). 그 결과 DTR, HARSL, NRG2, SLC4A9을 제외한 15개의 유전자를 성공적으로 수행하였으나 유전자간 유의성있는 차이를 확인하지 못하였음.
5. large deletion의 유전자변이를 확인하기 위하여 10개 유전자에서 genomic Southern blot을 수행하였으나 유의성 있는 차이를 정상과 sims마우스에서 확인할 수 없었음 (그림 10).
6. 따라서 위의 실험 결과를 종합해보면 sims 마우스의 유전자 변이는 point mutation과 같이 미세한 변이의 차이일 가능성이 높음. 따라서 각 유전자의 mRNA를 염기서열을 분석하여 변이를 확인하기로 하였음.
7. 표 6은 Pcdh α 를 포함하여 19개 모든 유전자의 염기서열을 확인한 결과임. 이중 FLJ20195 유전자에서는 893번 염기서열에서 C가 T로 변이되어 (893 C>T) 298번 아미노산이 proline에서 leucine으로 바뀌는 것이 (Pro298Leu) 확인되었으나 FVB strain의 정상마우스에서 T 염기서열로 확인되어 단순한 polymorphism으로 사료되었음.

8. 또한 FLJ20288 유전자의 경우 6370 염기서열이 C에서 T로 변이되어 (6370 C>T) 2124번 아미노산이 proline에서 serine으로 변하는 것이 (Pro2124Ser) 확인되었으나 129 strain 정상마우스에서 T염기서열로 확인되어 역시 단순한 polymorphism인 것으로 생각되어짐.
9. FE65L2 유전자의 경우에도 239번 염기서열이 G에서 C로 변이되어 (239 G>C) 80번 아미노산이 arginine에서 proline으로 변하는 것이 (Arg80Pro) 확인되었으나 역시 129 strain 정상마우스에서 C로 확인되어 polymorphism으로 보임.
10. Pcdh α 의 경우 1번 isoform (CNR-1)에서 1780번 염기서열이 G에서 A로 변이되어 (1780 G>A) arginine에서 tyrosine으로 변하는 것이 (Arg594Tyr) 확인되었으나 FVB strain 정상마우스에서 A로 확인되어 역시 polymorphism으로 사료됨.
11. 그 외에도 Ptg12, Sra1, FE65L2, IK, Pcdh α V9, 13에서 염기서열의 변이가 확인되었으나 아미노산의 변화는 없었음 (synonymous change).
12. 원인유전자를 발굴하는 또 다른 방법으로 cDNA microarray 분석을 통하여 유전자의 발현을 총체적으로 확인함으로써 발병기전에 관련된 pathway를 확인하고 pathway에 관련된 유전자를 중심으로 변이를 확인하는 즉 functional candidate gene approach와 비슷한 접근방법을 사용할 수 있음. 마우스 cDNA chip은 14k chip (Digital Genomics)을 사용하였으며 현재로서는 1번 수행하였으며 sample이 준비되는 데로 2번 더 수행할 예정임.
13. sample로는 정상마우스와 sims 마우스의 3주령 brain 조직으로부터 추출된 total RNA를 사용하였음.
14. M value, $\log_2(\text{Cy5}/\text{Cy3})$ (Cy3: control, Cy5 affected)가 2이상 (4배 이상 발현)인 유전자가 6개, $1 < M < 2$ 인 유전자가 98개, $-2 < M < -1$ 인 유전자가 384개, $M < -2$ 인 유전자가 15개 확인되었으며 이중 후보유전자인 Pcdh α V7이 M value -1.906 (약 4배 감소)을 보여 RT-PCR로 재확인하였으나 확인되지 않았음 (data not shown).

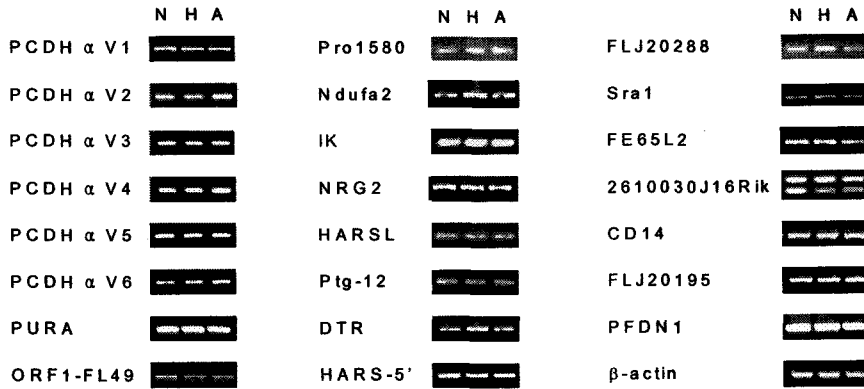


그림 8. sims 후보유전자의 RT-PCR을 이용한 유전자 발현 비교

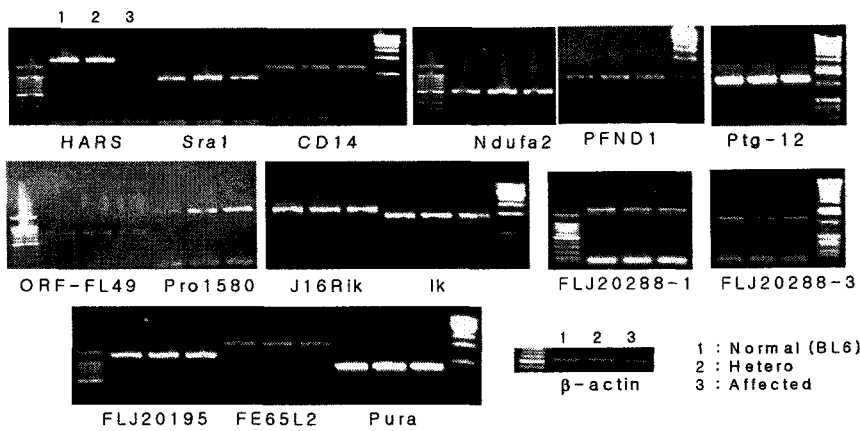


그림 9. sims 후보유전자의 발현양상 비교를 위한 full-length RT-PCR

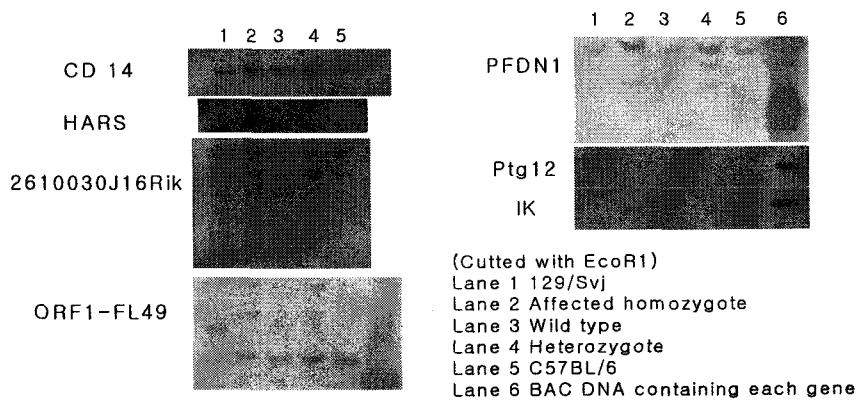


그림 10. sims 후보유전자의 DNA 변이를 확인하기 위한 genomic Southern blot

표 6. sims 후보유전자의 mRNA 염기서열 분석

유전자명	염기서열 변이	아미노산 변이	비고
FLJ20195	893 C>T	Pro298Leu	893 C in 129 and normal N6F1/ 893 T in FVB
Ptg12	120 C>A	Pro40Pro	
	339 C>A	Arg113Arg	
Sra1	90 G>T	Gly30Gly	
	222 C>T	Pro74Pro	
ORF1-FL49	no change		
2610030J16Rik	no change		
Ndufa2	no change		
FLJ20288	6370 C>T	Pro2124Ser	6370 T in 129
Hars	no change		
Pura-partial	no change		
Slc4A9	not amplified		
CD14	no change		
DTR	no change		
HARSL	no change		
NRG2-partial	no change		
FE65L2	239 G>C	Arg80Pro	239 C in 129
	699 T>C	Asp233Asp	
IK	492 A>G	Lys164Lys	
	1217 T>C	Leu406Ser	1217 T in other affected N6F1
Pro1580	no change		
PFDN1	no change		
PcdhV1	1780 G>A	A594T	1780 A in FVB
PcdhV2	no change		
PcdhV3	no change		
PcdhV4	no change		
PcdhV5	no change		
PcdhV6	no change		
PcdhV7	no change		
PcdhV8	no change		
PcdhV9	2190 C>T	G730G	
PcdhV10	no change		
PcdhV11	no change		
PcdhV12	no change		
PcdhV13	918 G>A	G306G	

제 5 절. Transgenic 마우스 제작을 통한 원인유전자 발굴

1. 위의 다양한 원인유전자 발굴법에도 불구하고 확실한 원인유전자 발굴이 어려웠기 때문에 원인유전자 지역에 mapping된 BAC clone 3개를 이용하여 transgenic 마우스를 제작하여 표현형질의 rescue 실험을 수행하였음.
2. 마우스 BAC clone을 통한 contig은 RG-MBAC-368P10--CT7-368A6--RP23-181H5--RP23-326L17--RPC1-23-193023--RP23-6P18--RPC1-23-72C114 의 순서로 약 500kb를 차지함.
3. 이들 BAC clone 중 CT7-368A6, RP23-181H5, RP23-326L17 3개를 선택하여 FVB strain 마우스를 이용하여 transgenic 마우스를 제작하였음 (Macrogen 위탁 제작)
4. CT7-368A6 transgenic 마우스와 sims heterozygote와 교배시켜 F1을 얻은 후 sims/tg 마우스를 교배시켜 transgene을 갖는 sims homozygote (sims/sims) 마우스와 transgene을 갖지 않는 sims homozygote (sims/sims) 마우스의 표현형질을 비교하였음 (그림 11).
5. 82 마리의 F2 마우스를 분석한 결과 이 중 sims/sims, tg^+ 가 11마리, sims/sims, tg^- 가 11마리 확인되었으며 두 경우다 sims의 표현형질을 모두 갖고 있으며 차이가 없었음.
6. RP23-181H5 transgenic 마우스와 sims heterozygote와 교배시켜 F1을 얻은 후 sims/tg 마우스를 교배시켜 transgene을 갖는 sims homozygote (sims/sims) 마우스와 transgene을 갖지 않는 sims homozygote (sims/sims) 마우스의 표현형질을 비교하였음 (그림 12).
7. 총 250 마리의 F2 마우스를 분석한 결과 이 중 sims/sims, tg^+ 가 23마리, sims/sims, tg^- 가 10마리 확인되었으며 sims/sims, tg^+ 가 23마리 중 9마리의 life-span이 연장되는 것을 볼 수 있었음 (대부분의 sims homozygote 마우스는 4주 이내에 약 80%가 죽음). 하지만 tremor 및 tail suspension에 의한 clutch 등의 표현형질은 tg^- 와 큰 차이를 보이지 않음. 현재 다른 형질 확인을 위하여 조직 검사 및 임신여부 실험을 수행하고 있는 중임 (sims homozygote 마우스의 경우 임신되지 않음). 이 시점에서 추측하건데 형질이 부분적으로 rescue가 일어난 것으로 사료됨 (표 7).
8. RP23-326L17 transgenic 마우스와 sims heterozygote와 교배시켜 F1을 얻은 후 sims/tg 마우스를 교배시켜 transgene을 갖는 sims homozygote (sims/sims) 마우스와 transgene을 갖지 않는 sims homozygote (sims/sims) 마우스의 표현형질을

비교하였음 (그림 13).

9. 32 마리의 F2 마우스를 분석한 결과 이 중 $sims/sims, tg^+$ 가 4마리, $sims/sims, tg^-$ 가 1마리 확인되었으며 $sims$ 의 표현형질을 모두 갖고 있으며 그 차이를 볼 수 없었음.
10. 결론적으로 transgenic 마우스 rescue 실험을 통하여 RP23-181H5 BAC clone 150kb 내에 $sims$ 원인유전자가 있을 확률이 높음. 이 지역에는 9개 유전자가 있으며 현재 다시 RT-PCR, 염기서열분석 등을 수행하고 있음.

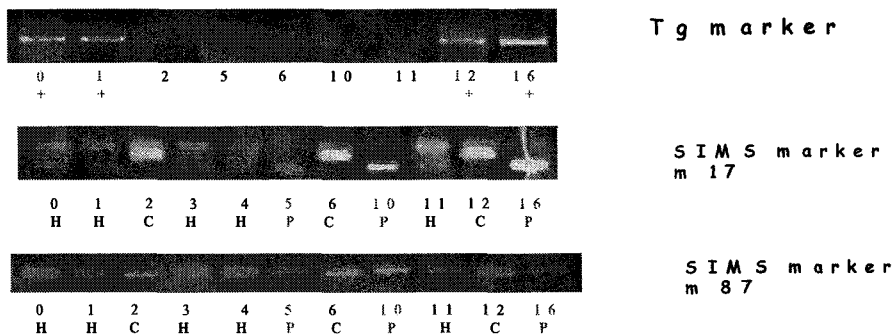


그림 11. CT7-368A6 transgenic 마우스의 sims 마우스와 교배 후 F2 마우스 genotyping 결과. gel 사진 아래의 번호는 F2 마우스 번호이며 5번의 경우 tg-이며 sims homozygote임. 16번의 경우 tg+이며, sims homozygote임. genetic marker m17 번과 m87번은 sims locus의 좌측과 우측의 마커임.

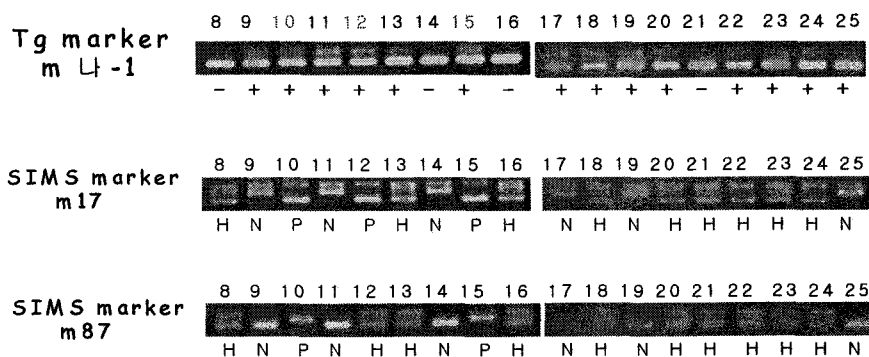


그림 12. RP23-181H5 transgenic 마우스의 sims 마우스와 교배 후 F2 마우스 genotyping 결과. gel 사진 위의 번호는 F2 마우스 번호이며 8번의 경우 tg-이며 sims locus heterozygote임. 10번의 경우 tg+이며, sims locus sims homozygote임.

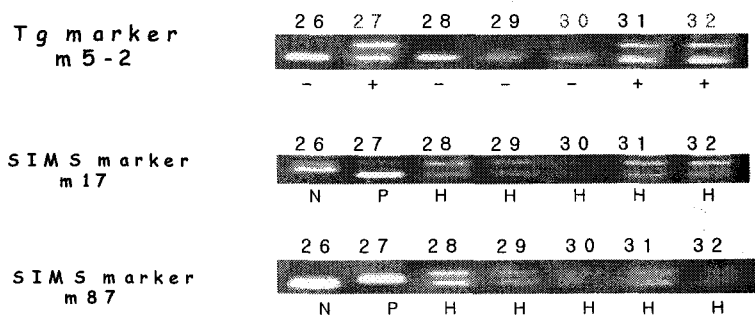


그림 13. RP23-326L17 transgenic 마우스의 sims 마우스와 교배 후 F2 마우스 genotyping. gel 사진 위의 번호는 F2 마우스 번호이며 26번의 경우 tg-이며 sims locus wild homozygote임. 27번의 경우 tg+이며, sims locus sims homozygote임.

표 7. RP23-181H5 transgenic 마우스와 sims heterozygote와 교배시켜 얻은 F2 마우스의 수명 분석

Parents	마우스 번호	genotyp e	transgen e 유무	life span
11 X 10	0	P	-	3주 안에 죽음
	5	P	+	6주 후 sacrificed
	7	P	+	6주 후 sacrificed
11 X 19	28	P/H	+	3주 안에 죽음
	30	P	+	3주 안에 죽음
	32	P	+	28, 30보다 조금 오래 살았음
	61	P	+	확인 안됨
	66	P	-	3주 안에 죽음
11 X 50	174	P	-	3주 안에 죽음
	175	P	+	174, 176보다 조금 오래 살았음
	176	P	-	3주 안에 죽음
	187	P	-	세달 넘게 살았음
	190	P	+	한달 정도 살다 죽음
	191	P	-	3주 안에 죽음
	193	P	+	세달 넘게 살고 있음
	195	P	+	한달 안에 죽음
	233	P	+	3주 안에 죽음
	12 X 10	10	P	+
12		P/H	+	3주 안에 죽음
15		P	+	7주 정도 살다 죽음
28		P	+	3주 안에 죽음
40		P	+	3주 안에 죽음
46		P	+	3주 안에 죽음
117		P	-	3주 안에 죽음
		P	+	3주 안에 죽음
166		H/P	+	3주 안에 죽음
168		P	+	3주 안에 죽음
180		P	+	3주 안에 죽음
209		P	+	한달 정도 살다 죽음
210		P	+	7주 넘게 살고 있음
59 x 47	221	P	-	3주 안에 죽음
61, 63 X 47	247	P	+	5주 넘게 살고 있음 Wild type과 눈으로 구별 어려움
	249	P	-	5주 넘게 살고 있음 Wild type과 눈으로 구별됨
	250	P	-	5주 넘게 살고 있음 Wild type과 눈으로 구별됨

제 6 절. 마우스 genome project 1차 draft 완료에 따른 새로운 유전자 분석

1. 2002년 12월 마우스 genome project가 1차 완료되어 90 % 이상의 genome 염기서열이 보고 되었음. 2003년 draft 염기서열을 분석하여 새로운 유전자의 annotation이 진행되었으며 이 과정에서 sims 유전자 지역에 새로운 유전자의 annotation이 보고 되었음. 따라서 이 지역에 보고된 새로운 유전자를 정리하여 보면 그림과 같음 (그림 14).
2. 이들 새로운 유전자들은 기능이 알려있지 않은 LOC381150 유전자, Kinesin motor, catalytic domain을 갖는 E230025N22 유전자, zebrafish의 primordial germ cell migration에 관련된 dead end homolog 1 (Dnd1)임.
3. 또한 2610030J16Rik 유전자는 UDP-galactose transporter인 solute carrier family 35, member A4 (Slc35a4)로, FE65L2 유전자는 amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3 (Apbb3)으로 밝혀졌음.
4. 이외에도 FLJ20288 유전자는 1110004012Rik 또는 9130019P20Rik (signal transduction에 관련된 RTK signalling protein MASK/UNC-44와 homology를 보임) 유전자와 alias로 표시되어 있으며, Pro1580 유전자는 2410015B03Rik (ARM repeat fold domain을 갖음)와 alias이며, Ptg-12 유전자는 261051D14Rik (U1-like zinc-finger domain을 갖는 transcription factor) 와 alias임.
5. 새로운 유전자 LOC381150, E230025N22, Dnd1은 RT-PCR 등 앞서 기술된 원인유전자 발굴을 위한 분석이 진행 중에 있음.

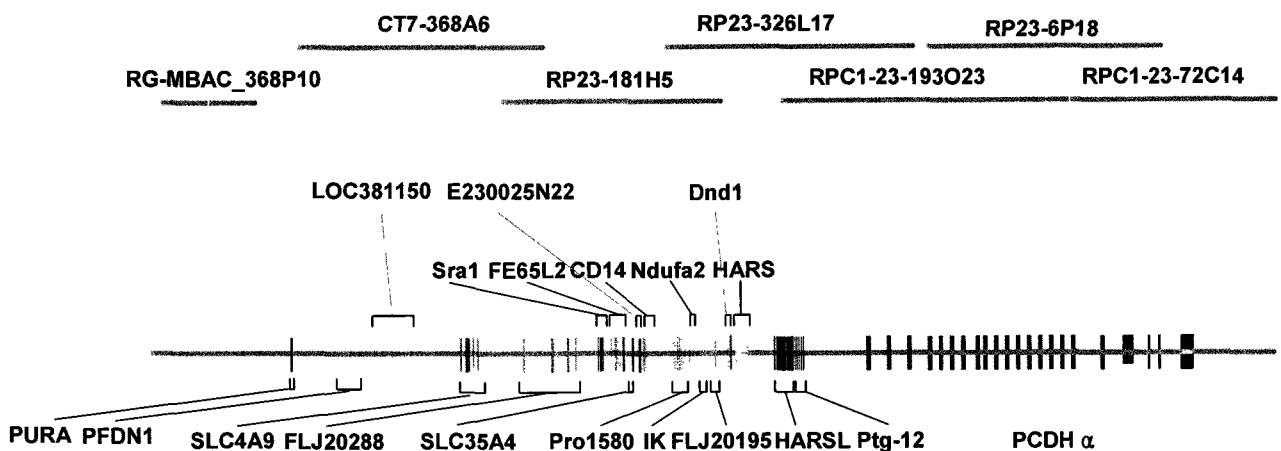


그림 14. 마우스 genome browser에 annotation된 sims locus 유전자

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발의 최종목표

1. 마우스모델을 이용하여 간질의 원인 유전자를 발굴함.
2. 얻어진 유전정보를 이용하여 간질의 발병기전을 이해함.

제 2 절. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	마우스 염색체 18번의 sims 유전자가 위치한 D18Mit12 마커와 유전자 HDac 사이의 유전·물리지도 완성	1. 유전지도 완성을 위하여 마우스 1,000마리의 연관조사 (2,000 meiosis) 2. D18Mit12 마커와 HDac 유전자 사이의 약 800kb의 염기서열 및 유전자정보 완성
2차년도 (2002)	D18Mit12 마커와 유전자 HDac 사이에 존재하는 후보유전자 중에서 sims 원인유전자 발굴	1. D18Mit12 마커와 유전자 HDac 사이에 존재하는 후보유전자 (candidate gene)의 RT-PCR, Northern blot, Genomic Southern blot 수행 2. 유전자발현 및 유전자변이가 확인된 후보유전자의 sequencing (대략 20kb)
3차년도 (2003)	원인 유전자의 발현양상 연구와 간질발병기전의 genetic pathway 결정을 위한 관련유전자 발굴	1. 각종 장기 (10여종 이상)의 Northern blot 수행 2. 각종 장기 (5종 이상)의 in situ hybridization 수행 3. 관련 유전자 발굴을 위한 마우스 cDNA chip (4X10k) 3회 이상 실시 4. 발굴된 관련유전자의 RT-PCR 또는 Northern blot을 통한 확인 분석 5. 관련단백질 발굴을 위한 단백질 chip과 2-D gel 3회 이상 수행

제 3 절. 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도 (%)
1	유전지도 작성	마우스 1,000마리의 연관조사	100
2	물리지도 작성	NRG2 유전자(centromere 쪽)와 Pcdha의 variable region(telomere 쪽) 사이의 약 500kb 염기서열 결정	100
3	후보유전자 발굴	구간내에 존재하는 19개의 유전자를 확인	100
4	후보유전자의 유전자 발현 조사	후보유전자의 유전자 발현차이를 RT-PCR 등으로 확인하였음	100
5	유전자변이 조사	12개 후보유전자의 genomic Southern blot을 완수하였으며, 18개의 후보유전자 염기서열을 확인하였음	100
6	형질의 rescue 조사	3개의 BAC clone transgenic 마우스를 제작하였음	100
7	원인유전자의 발현양상 및 발병기전 연구	microarray를 이용한 cDNA chip 분석	80

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

- 인구의 약 10 % 정도가 평생에 한번쯤은 발작을 일으키며, 많은 경우 암, 뇌손상, metabolic imbalance와 같은 병들의 합병증상으로 나타나는 경우가 많음.
- 일련의 유전연구에 의하면 간질은 약 20 % 가 유전적 소인에 의해 결정되고 지금까지 100건 이상의 single mendelian disorder에 의해 유전되는 간질이 보고 되었음.
- 현재 국내의 간질환자는 약 30만으로 추정되며 항경련제와 같은 약물치료가 어려운 환자가 약 20-30 %로 이들을 위한 새로운 항경련제의 개발이 시급함.
- sims 마우스를 통하여 원인유전자가 확인이 되면 간질의 병인을 이해하기 위하여 유전자의 발현양상과 유전자의 기능을 탐색함.
- 간질의 원인 유전자를 규명하는 일은 간질의 진단과 치료를 위하여 중요하며 환자의 부분적이기는 하지만 유전진단이 가능할 것이고, 발병기전의 연구와 간질관련유전자의 발굴을 통하여 새로운 항경련제의 개발이 가능할 것임.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 2002년도 11월에 마우스 지놈 염기서열이 밝혀짐에 따라 사람의 유전체와 마우스의 유전체가 비교될 수 있게 되어 마우스 연구가 더 한층 활발해질 수 있는 전기가 마련되었음. 더욱이 일본의 마우스 full-length cDNA 염기서열 DB (Fantom Project)가 공개됨에 따라 형질전환 동물로서 뿐만 아니라 기능유전체 연구의 동물모델로서 마우스의 위치가 확고하여졌음.
- 최근까지 hereditary idiopathic epilepsy와 관련되어 확인된 유전자의 대부분이 ion channel 유전자로서 epilepsy를 channelopathy라고 까지 불렀음. 하지만 최근 일련의 실험에 의하면 꼭 그렇지도 않은 것으로 추측됨. audiogenic epilepsy 마우스 모델인 Frings 마우스에서 positional cloning 방법으로 발굴된 유전자인 MASS1 (monogenic audiogenic seizure-susceptible)는 일본의 epilepsy 환자에서 유의성있는 변이가 확인되었음 (Skradski et al., Neuron 2001. 31:537-8, Nakayama et al. Ann Neurol. 2002. 52:654-7).
- leucine-rich glioma-inactivated 1 gene (LGI1) (epitempin 유전자로도 알려져 있음)는 autosomal-dominant lateral temporal lobe epilepsy의 원인유전자로 보고 되었음 (Kalachikov et al. Nat Genet. 2002. 30:335-341).
- 특히나 MASS1과 LGI1은 44개의 아미노산이 7번 반복되어 있는 EAR domain (for epilepsy-associated repeat)을 공유하고 있어 이 domain의 기능 연구가 활발히 진행 중임.
- X chromosome-linked Aristaless-related homeobox gene (ARX) 유전자는 mental retardation과 infantile spasm, myoclonic seizure, dystonia의 증상을 갖는 유전질환자 9 가족에서 유전자변이가 확인되어 대부분의 infantile spasm을 갖는 X-linked 가계에서 원인유전자인 것으로 추정됨 (Stromme et al., Nat Genet. 2002. 30:441-5).
- serine-threonine kinase 9 유전자 (STK9)는 ARX에 이어 X-linked infantile spasm과 관련된 두 번째 유전자로 확인되었음 (Kalscheuer et al., Am J Hum Genet. 2003. 72:1401-11).
- 또한 chloride channel 유전자인 CLCN2의 변이가 idiopathic generalized epilepsy의 가장 일반적인 증상과 관련되어 있다고 보고 되었으며 ATP1A2 sodium potassium ATPase pump 유전자의 변이가 familial hemiplegic migraine과 benign familial infantile convulsion이 있는 가족의 연관조사에서 co-segregate된다는 보고도 있었음 (Vanmolkot et al., Ann Neurol. 2003. 54:360-6).
- Lafora의 progressive myoclonus epilepsy의 두 번째 유전자인 NHLRC1이 putative E3 ubiquitin ligase를 coding하는 것으로 보고 되었음 (Chan et al., Nat Genet. 2003. 35:125-7).
- 대부분의 idiopathic generalized epilepsy와 관련된 유전자들은 ion channel family 유전자로 확인되었으며 non-ion channel 유전자들의 변이가 autosomal-dominant lateral temporal

lobe epilepsy, cortical development의 비정상, X-linked mental retardation과 epilepsy의 증상과 관련되어 있는 것으로 알려짐. 대부분의 epilepsy는 복잡한 inheritance를 보이며, 이제 까지 알려진 epilepsy와 관련된 유전자는 epilepsy 가족력을 갖는 질환 및 sporadic한 경우의 일부분을 설명할 뿐이어서 더욱 많은 유전자의 발굴 및 발병기전을 이해하는 연구가 더욱 필요한 실정임.

제 7 장. 참고 문헌

Chan E. M., Young E. J., Ianzano L., Munteanu I., Zhao X., Christopoulos C. C., Avanzini G., Elia M., Ackerley C. A., Jovic N. J., Bohlega S., Andermann E., Rouleau G. A., Delgado-Escueta A. V., Minassian B. A., and Scherer S. W. (2003) Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 35, 125-127.

Kalachikov S., Evgrafov O., Ross B., Winawer M., Barker-Cummings C., Martinelli Boneschi F., Choi C., Morozov P., Das K., Teplitskaya E., Yu A., Cayanis E., Penchaszadeh G., Kottmann A. H., Pedley T. A., Hauser W. A., Ottman R., and Gilliam T. C. (2002) Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30, 335-341.

Kalscheuer V. M., Tao J., Donnelly A., Hollway G., Schwinger E., Kubart S., Menzel C., Hoeltzenbein M., Tommerup N., Eyre H., Harbord M., Haan E., and Sutherland G. R., Ropers HH, Gecz J. (2003) Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 72, 1401-1411.

Nakayama J., Fu Y. H., Clark A. M., Nakahara S., Hamano K., Iwasaki N., Matsui A., and Arinami T., and Ptacek L. J. (2002) A nonsense mutation of the MASS1 gene in a family with febrile and afebrile seizures. *Ann Neurol* 52, 654-657.

Skradski S. L., Clark A. M., Jiang H., White H. S., Fu Y. H., and Ptacek L. J. (2001) A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* 31, 537-544.

Stromme P., Mangelsdorf M. E., Shaw M. A., Lower K. M., Lewis S. M., Bruyere H., Lutcherath V., Gedeon A. K., Wallace R. H., Scheffer I. E., Turner G., Partington M., Frints S. G., Fryns J. P., Sutherland G. R., Mulley J. C., and Gecz J. (2002) Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet* 30, 441-445.

Vanmolkot K. R., Kors E. E., Hottenga J. J., Terwindt G. M., Haan J., Hoefnagels W. A., Black D. F., Sandkuijl L. A., Frants R. R., Ferrari M. D., and van den Maagdenberg A. M. (2003) Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol* 54, 360-366.