

S-2

Knockout 마우스 생산에 의한 *PEBP2 α C* 유전자의 생물학적 활성의 규명

배 석철¹, 이청림¹, 김웅국¹, Yoshiaki Ito²

1) 충북대학교 의과대학 생화학교실

2) Kyoto University, Institute for Virus Institute, Japan

Abstract

Polyoma Virus Enhancer core Binding Protein (PEBP2)는 유전자의 전사를 조절하는 hetero-dimeric transcription factor로서 α 와 β subunit으로 구성되어 있다. α subunit을 coding 하는 유전자중 하나인 *PEBP2 α B*는 급성백혈병과 관련되어있는 t(8;21) 또는 t(12;21)에 의하여 변형됨으로서 백혈병 발병의 원인이 되고 있다 (Miyoshi et al., 1993; Romana et al., 1995). β subunit을 coding 하는 *PEBP2 β* 도 inv(16)에 의하여 변형됨으로서 백혈병을 유도하는 주요 원인이 되고 있다 (Liu et al., 1993). 이 유전자들의 생물학적 활성을 밝히기 위한 연구가 gene targeting에 의한 knockout mouse 생산 방법으로 수행되었다. 그 결과 *PEBP2 α B*와 *PEBP2 β* 유전자가 definitive hematopoiesis에 있어서 결정적으로 중요한 역할을 하고 있음이 관찰되었다 (Okuda et al., 1996, Wang et al., 1996a, 1996b). 이는 이들 유전자가 hematopoietic master switch 유전자임을 밝힌 중요한 결과로서 이로부터 혈액학 연구 분야의 새로운 장이 열리게 되었다. 또한 이러한 연구 결과들은 PEBP2 family에 속하는 다른 유전자의 생물학적 활성의 연구를 촉진하는 계기가 되었다. 최근 *PEBP2 α A* 유전자가 결손된 마우스가 생산되었는데 이 유전자의 경우에는 모든 종류의 뼈의 생성이 완전히 결손됨이 관찰되었다 (Komori et al., 1997). 이는 *PEBP2 α A* 유전자가 뼈의 생성을 지배하는 master switch 유전자임을 보여주는 중요한 관찰로서 bone biologist 들의 큰 관심을 모으고 있다. 본 연구팀은 PEBP2 family 유전자 중 유일하게 아직 생물학적 활성이 규명되지 않은 *PEBP2 α C* 유전자의 활성을 knockout 마우스를 생산하는 방법에 의하여 분석하였으며 소화기관의 형성에 중요한 역할을 하고 있음을 확인 하였다.

Introduction

새로운 전사 조절 단백질을 coding 하는 PEBP2 gene family가 최근 발견되었다. 이들은 Polyomavirus enhancer core에 결합하여 virus의 전사와 복제를 조절하는 cellular protein을 coding하는 유전자로서 처음 발견되었는데, 이어진 연구에 의하여 이들의 hematopoiesis와 osteogenesis에 있어서의 중요한 역할이 밝혀지게 되었다. PEBP2는 특정 DNA sequence에 결합하는 α 와 β subunit으로 구성된 heterodimeric protein 이다 (Bae et al., 1994; Ito and Bae, 1997). α subunit은 세가지 유사한 유전자에 의하여 coding 되어 있으며 각각의 유전자에 의하여 coding 된 단백질은 PEBP2 α A (α A), PEBP2 α B (α B) 그리고 PEBP2 α C (α C)로 명명 되었다. 이들은 CBFA1, CBFA2, CBFA3 또는 AML3, AML1, AML2라는 다른 이름도 가지고 있다. β subunit 단백질은 포유류에서는 단 한가지만 알려져 있으며 PEBP2 β 또는 CBF β 로 명명되었다. PEBP2 α 유전자에 의하여 coding된 단백질들은 아미노산 배열에 있어서 초파리의 segmentation gene product runt와 높은 유사성을 보이고 있다 (Erickson et al., 1992). 특히 유사성이 높은 128 아미노산 부위는 DNA의 특정 염기배열에 결합하는 활성화 β subunit과 dimer를 형성하는 활성화의 두가지 중요한 기능을 가지고 있다. 이렇게 진화적으로 유지된 128 아미노산 부위는 이미 알려진 다른 domain과 전혀 유사성을 보이지 않으므로 Runt domain이라고 명명하였다. 최근 Runt domain을 가지는 새로운 초파리 유전자 *Lozenge*가 발견되었으며 초파리의 눈 (eye) 발생에 중요한 역할을 하고 있음이 확인되었다 (Daga et al.,

Table 1. Comparison of nomenclatures of PEBP2 proteins proposed by various investigators

α subunit			β subunit	
PEBP2 α A ¹	CBF α 1 ⁴	AML3 ⁵	PEBP2 β ⁷	CBF β ⁸
PEBP2 α B ²	CBF α 2 ⁴	AML1 ⁶		
PEBP2 α C ³	CBF α 3 ⁴	AML2 ⁵		

¹ Ogawa et al., 1993b; ² Bae et al., 1993; ³ Bae et al., 1995; ⁴ Speck and Stacy 1995; ⁵ Levanon et al., 1994; ⁶ Miyosh et al., 1991;

⁷ Ogawa et al., 1993a; ⁸ Wang et al., 1993.

1996) 포유류의 PEBP2 α protein이 heterodimer를 형성한다는 사실로부터 runt 또는 lozenge의 dimeric partner를 찾는 연구가 진행 되었는데 그 결과 PEBP2 β 의 초파리 homolog도 발견되었다 (Golling et al., 1996). 초파리에서는 2개의 β 유전자가 발견되었으며 *Big brother*와 *Brother*라고 각각 명명 되었다.

Hematopoiesis에 있어서 PEBP2 α B와 PEBP2 β 의 역할

PEBP2가 가지는 생물학적 중요성은 이 유전자들이 사람의 질병과 깊이 관련되어 있다는 사실로부터 밝혀지기 시작하였다. α B와 β 유전자는 사람의 급성백혈병의 중요한 발병 원인이 되고있다. α B는 chromosome translocation t(8;21)에 의하여 *ETO*와 접합되어 AML1/ α B-ETO 접합 단백질을 생성함으로써 acute myeloid leukemia를 유발하는 직접적인 원인이 된다 (Erickson et al., 1992; Miyoshi et al., 1993). 또한 α B 유전자는 t(12;21)에 의하여 *Tel* 유전자와 접합 됨으로서 Tel-AML1/ α B를 생성하여 acute lymphoblastic leukemia를 유도한다 (Romana et al 1995). 그리고 β 유전자도 역시 사람의 백혈병 발병 원인이 되고있는데, inv(16)에 의하여 *MYH11* 유전자와 접합되어 접합 단백질을 생성함으로써 (PEBP2 β -SMMHC) acute myeloid leukemia를 유도한다 (Liu et al., 1993). 이러한 연구 결과들은 PEBP2 유전자들이 혈액세포의 분화에 중요한 역할을 할 것을 예상케 하였으며 이는 gene targeting에 의한 knockout mouse의 생산 방법에 의한 연구 결과 확인 되었다. α B 또는 β 유전자가 결손된 마우스는 definitive hematopoiesis가 완전히 억제됨이 관찰되었는데 이로부터 이들 유전자가 hematopoietic master switch 임이 밝혀지게 되었다 (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996a, 1996b).

Osteogenesis에 있어서 PEBP2 α A의 역할

한편 α A 유전자의 생물학적 역할을 규명하는 연구도 동일한 방법에 의하여 수행 되었다. α A 유전자의 한 alleleer 만이 소실된 heterozygotic 마우스는 정상 마우스와 동일 하였으나 clavicle의 생성만은 억제되어 있었다 (Otto et al., 1997). 이러한 형질은 사람의 cleidocranial dysplasia (CCD)와 대단히 유사한것이다. 이어서 α A 유전자의 염색체상의 위치와 CCD 환자의 공통적 유전자 결손 위치가 동일하게 6p21 이라는 사실과 (Bae et al., 1994; Zhang et al., 1997; Mundlos et al., 1995), α A 유전자의 mutation이 CCD환자에서 빈번하게 관찰된

다는 사실로부터 αA 의 한 allele의 결손이 CCD의 직접적인 원인이 됨이 밝혀졌다 (Mundlos et al., 1997). 그런데 αA 유전자가 둘다 결손된 homozygotic 마우스에 있어서는 뼈의 생성 또한 완전히 억제되었으며 뼈조직에 특이적으로 발현되는 *Osteocalcin*, *Osteonectin*, *Osteopontin* 등의 발현 또한 거의 관찰되지 않았다 (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; Ducy et al., 1997). 이러한 결과로부터 αA 가 뼈조직 생성을 지배하는 osteogenic master switch 임이 확인되었다.

PEBP2 αC 의 생물학적 활성

αC 는 PEBP2 family에 속하는 알려진 유전자중 유일하게 그 생물학적 활성이 아직 규명되지 않았다. 본 연구팀은 gene targeting 방법에 의하여 αC knockout mouse를 생산하고 표현 형질을 분석하였다. αA 와 αB 는 각각 뼈 조직과 혈액세포에서 특이적으로 발현되어 각각의 조직의 생성에 기여하므로 αC 의 경우도 그 발현 양상을 정확하게 분석하는 것이 중요하다. 그러므로 αC 의 기능에 필수적으로 요구되는 exon 3부위를 제거하고 그 부위에 lacZ 유전자를 삽입함으로써 αC 의 N-terminus와 β -galactosidase가 접합된 접합단백질이 생성되도록 knockin 기법이 적용된 knockout gene targeting법을 이용하였다. 생산된 heterozygotic mice의 조직을 X-gal 염색법으로 분석한 결과 αC 는 소화기관의 상피세포에서 만 발현되었다. Heterozygotic mice 간의 교미에 의하여 생산된 homozygotic mice는 태어난 직후에는 정상 마우스와 구별 되지 않았으나 태어난 이후로 전혀 성장하지 못하고 대부분 태어난지 3일 이내에 사망하였다. Hematoxyline-eosin 염색법에 의하여 각 조직의 형태학적 변화를 분석한 결과 소화기관의 상피세포에서 현저한 차이가 관찰 되었다. 이러한 결과들은 αC 가 소화기 상피세포의 생성과 분화에 중요한 역할을 하고 있음을 제시하고 있다.

Reference

- Bae, S-C., Ogawa, E., Maruyama M., Oka H., Satake M., Shigesada K., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., and Ito Y. (1994). PEBP2 αB / mouse AML1 consists of multiple isoforms that possesses differential transactivation potentials Mol. Cell. Biol. 14, 3242-3252.
- Bae S-C., Takahasi E., Zhang Y.W., Ogawa E., Shigesada K., Namba Y., Satake M., Ito Y. (1995). Cloning, mapping and expression of PEBP2 αC , a third gene encoding the mammalian Runt domain. Gene 159, 245-248.
- Bae, S-C., Yamaguchi-Iwai, Y., Ogawa, E., Maruyama, M., Inuzuka, M.,

- Kagoshima, H., Satake, M., and Ito, Y. (1993). Isolation of PEBP2 α B cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene AML1. *Oncogene* 8, 809-814.
- Daga A., Karlovich C.A., Dumstrei K., Banerjee J. (1996). Patterning of cells in the Drosophila eye by Lozenge, which shares homologous domain with AML1. *Genes Dev.* 10, 1194-1205.
- Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., Karsenty G. (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754
- Erickson P., Gao J., Chang K.S., Look T., Whisenant E., Raimondi S., Lasher R., Trujillo J., Rowley I., Drabkin H. (1992). Identification of breakpoints in t(8:21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 80, 825-1831.
- Golling G., Li L.H., Pepling M., Stabbins M., Gergen J.P. (1996). Drosophila homologs of the proto-oncogene product PEBP2/CBFB regulate the DNA-binding properties of Runt. *Mol. Cell. Biol.* 16, 932-942.
- Golub T.R., Barker G.F., Bohlander S.K., Ward D.C., Bary-Ward P., Morgan E., Raimondi S.C., Rowley J.D., Gilliland D.G. (1995). Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4917-4921.
- Ito Y. and Bae S-C. (1997) *Oncogenes as Transcription Regulators: The Runt domain transcription factor, PEBP2/CBF, and its involvement in human leukemia*. Edited by Yaniv M and Ghysdael J. (Birkhauser Basel/Switzerland) Vol. 2, pp107-132.
- Kania M.A., Bonner A.S., Duffy J.B., Gergen J.P. (1990). The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev.* 4, 1701-1713.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y-H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiaki S., Kishimoto T. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
- Levanon D., Negreanu V., Bernstein Y., Bar-Am I., Avivi L., Groner Y. (1994). AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* 23, 425-432
- Liu P., Tarle S.A., Hajra A., Claxton D.F., Marlton P., Freedman M., Siciliano M.J., Collins F.S. (1993). Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 261, 1041-1044
- Miyoshi H., Ohira M., Shimizu K., Enomoto K., Maseki N., Kaneko Y., Kamada N., Ohki M. (1993). The t(8:21) translocation acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J* 12, 2715-2721
- Miyoshi H., Shimizu K., Kozu T., Maseki N., Kaneko Y., Ohki M. (1991). t(8:21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc. Natl*

Acad. Sci. USA 88, 10431-10434

- Mundlos S., Mulliken J.B., Abramson D.L., Warman M.L., Knoll J.H., Olsen B.R. (1995). Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family. *Hum. Mol. Genet.* 4, 71-75
- Mundlos S., Otto F., Mundlos C., Mulliken J.B., Aylsworth A.S., Albright S., Lindhout D., Coel W.G., Mertelsman R., Zabel B.U., and Olsen B.R., (1997). Mutation involving the transcription factor CBFA1 causes cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773-779
- Ogawa E., Inuzuka M., Maruyama M., Satake M., Naito-fujimoto M., Ito Y., Shigesada K. (1993a). Molecular cloning and characterization of PEBP2 β , the heterodimeric partner of a novel *Drosophila* runt-related DNA binding protein PEBP2 α . *Virology* 194, 314-331
- Ogawa E., Maruyama M., Kagoshima H., Inuzuka M., Satake M., Shigesada K., Ito Y. (1993b). PEBP2/PEBP2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila* runt gene and human AML1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6859-6863
- Okuda T., van Deursen J., Hiebert S.W., Grosveld G., Downing J.R. (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330
- Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Owen M.J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89,765-771.
- Romana S.P., Mauchauffe M., Le Coniat M., Chumakov I., Le Paslier D., Berger R., Bernard O.A. (1995). The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 85, 3662-3670
- Speck N.A. and Stacy T. (1995). A new transcription factor family associated with human leukemias. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* eds. 5, 337-364.
- Wang Q., Stacy T., Binder M., Matine-Padilla M., Sharpe A.H., Speck N.A. (1996a). disruption of the *cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92,3444-3449
- Wang Q., Stacy T., Miller D.J., Lewis A.F., Gu T-L., Huang X., Bushweller J.H., Boris J-C., Alt F.W., Ryan G., Liu P.P., Winshow-Boris A., Binder M., Marin-Padilla M., Sharp A.H., and Speck N.A. (1996b). The CBF β subunit is essential for CBF α 2(AML1) function in vivo. *Cell*, 87, 697-708
- Wang S., Wang Q., Crute B.E., Melnikova I.N., Keller S.R., Speck N.A. (1993). Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3324-3339
- Zhang W-W., Bae S-C., Takahashi E-I., and Ito Y. (1997). A cDNA cloning of the transcripts of human PEBP2 α A/CBFA1 mapped to 6p12.3-p21.1, the locus for cleidocranial dysplasia. *Oncogene*, 15, 367-371.