

동 · 물 · 학 · 논 · 단

The nematode *C. elegans*, an elegant model organism for molecular genetics



이 준 호

1980~1986 서울대학교 미생물학과
 1987~1989 서울대학교 미생물학과 대학원 (이학석사)
 1989~1994 California Institute of Technology (이학박사)
 1994~1995 University of California at Berkeley
 (박사후연구원)
 1995~현재 연세대학교 생물학과 조교수

1. 서 론

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*)는 어디서나 흙속에서 쉽게 찾을 수 있는 약 1 mm 정도 크기의 선충으로서, 세균(실험실에서는 대장균)을 먹이로 사는 동물이다. 이들은 적당한 조건에서 약 3일만에 세대를 교체할 수 있는 자웅동체(hermaphrodite)로 존재한다. 이 선충에 대한 분자 유전학적 연구는 1974년 S. Brenner의 논문에서 처음 찾아볼 수 있듯이, 비교적 최근에 그 연구가 활발히 진행되어 온 실험동물이다. 현재 국내에는 5개 정도의 연구실에서 이 동물을 이용한 실험을 수행하고 있으나, 아직은 많이 보편화되어 있지 않으며, 따라서 *C. elegans*의 연구 동향이나 실험상의 장단점, 다른 시스템을 가진 연구자의 보조 실험재료로서의 이점 등이 잘 알려져 있지 않다. 본 논단에서는 먼저 *C. elegans*의 생물학적 특징을 소개하고, 다음으로 *C. elegans*에서 행할 수 있는 연구 방

법을 소개한 후, 본 연구자의 연구내용을 예로 소개하고자 한다.

2. *C. elegans*: An elegant model organism for molecular genetics

1) *C. elegans*의 biology

*C. elegans*는 자웅동체와 수컷으로 자연상에 존재하는데, 대부분은 자웅동체이다. 성은 X 염색체와 상염색체(autosome)의 비에 따라 정해지는데, X/A가 1.0이면 자웅동체, 0.5이면 수컷이 된다. 자웅동체와 수컷은 그 형태상으로 쉽게 구별이 된다. *C. elegans*가 자웅동체의 자가수정으로 주로 번식하므로 실험실에서 교배의 과정이 없이도 쉽게 배양할 수 있으며, 웅체가 따로 존재하므로 유전학적 연구를 위한 교배를 쉽게 시킬 수 있다. 또한 -70도에서 동결 보관할 수 있으므로 배양을 위한 소모를 최소화할 수 있다.

*C. elegans*는 pseudocoelomate에 속하는데, 그 몸체의 구조는 두 개의 concentric한 원통이 pseudocoelom이라는 공간에 의해 나누어져 있는 양상으로 되어 있다(그림 2). 안쪽의 원통은 내장을 이루며, 바깥쪽의 원통에는 cuticle, hypodermis, 근육계, 신경계 등이 분포한다. 성체의 경우에 생식소가 pseudocoelom에 위치하게 된다.

*C. elegans*의 수정란에서 성체가 되는데 약 64시간이 걸리며, 그 중 첫 14시간 정도는 egg shell 속에서 일어나며, 이 기간동안 초기 발생을 진행하여 자웅동체의 경우 558 세포로 되며, 이때 알에서 깨어나 나머지 기간동안 더 발생을 진행하게 된다. 이 후기의 발생 과정(larval stage라 부름)은 4번의 허물(molt)을 벗는 과정을 포함하게 된다. molt와 molt 사이의 기간을

각각 L1, L2, L3, 그리고 L4 단계라 부른다 (그림 3). Vulva를 포함하여 생식에 필요한 기관은 L4 단계의 후반부에 완성이 되며, 마지막 허물을 벗은 후에 비로소 성체로 된다. *C. elegans*의 자세한 소개는 단행본으로 출간되어 있다 (1,2).

2) Genetics와 Genome project

*C. elegans*는 5쌍의 autosome과 한 쌍의 성염색체를 가지므로 6개의 linkage group으로 되어 있다. 또한 전 염색체에 걸쳐 쉽게 구별 가능한 marker mutation, deficiency와 duplication, translocation 등이 존재한다. 따라서 mutagenesis를 통해 찾아내는 돌연변이들은 비교적 짧은 시간에 mapping할 수 있다. Epistasis 실험, null phenotype의 분석 등으로 동일한 표현 형질을 나타내는 여러 개의 유전자들의 작용 순서, 정상 상태에서의 생물학적 기능 등을 찾아낼 수 있다. *C. elegans*의 genome은 약 80~100 Mb이며, 현재 약 절반의 genome의 염기배열이 이미 밝혀졌으며, 수년 내에 완료될 것이다. 그 동안에 축적되어온 genetic map과 genome project의 결과 산물인 physical map을 비교함으로써 새로운 돌연변이의 cloning, 기능을 알지 못하는 gene의 돌연변이의 동정 등이 용이하게 이루어질 수 있다.

3) Reverse genetics

기능을 알지 못하는 gene의 돌연변이의 동정을 위해 기존에 동정된 돌연변이가 그 유전자의 map 위치에 존재한다면 complementation 실험으로 확인해 볼 수 있겠지만, 아직은 모든 염색체가 모든 가능한 돌연변이로 saturation될 정도로 자세한 genetic map이 존재하지 않으므로, 다른 방법으로 특정 유전자의 변이를 찾아야 할 경우가 있다. 이때 사용될 수 있는 방법이 transposon insertion으로 인한 특정 변이를 찾는 것이다 (3,4). MT3126이라는 *C. elegans* strain은 transposon의 수가 많을 뿐 아니라 이들의 이동도 쉽게 되는 성질을 가진 strain이다. 이 strain에서 그 자손들을 대량으로 준비하여 POOL을 만든 후 절반은 동절 보관하고 절반은 PCR의

template로 준비한 후, transposon에 특이한 primer와 원하는 유전자에 특이한 primer 하나를 사용하여 PCR하면, transposon이 원하는 유전자에 insertion된 경우에만 PCR product가 만들어지게 되는 것이다. 이렇게 transposon insertion을 찾으면, pool의 크기를 단계적으로 줄여 결국에는 transposon insertion을 가진 단일 개체를 찾아낼 수 있게 된다. 이러한 방법을 사용해야 하는 이면에는 *C. elegans*에서 아직도 homologous recombination에 의한 gene targeting이 가능하지 않다는 현실이 있다.

4) Transgenic studies

*C. elegans*에서 transgenic study는 microinjection을 통해 원하는 construct를 도입함으로써 가능해진다 (5, 그림 1).

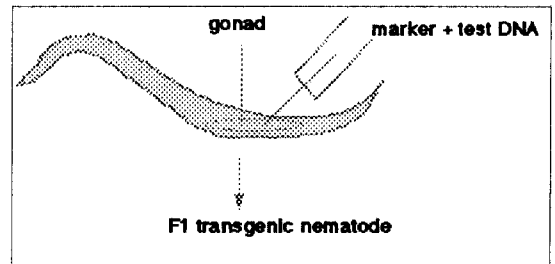


그림 1. Microinjection into the gonad of the nematode.

Microinjection으로 DNA 혹은 RNA를 도입할 수 있으며 일반적으로 자웅동체의 성체의 syncytial gonad에 injection한다. Microinjection으로 수행할 수 있는 실험으로는 rescue 실험, expression study, antisense approach 등을 들 수 있다. 특정 유전자의 cloning을 위해 rescue 실험을 할 때에는, 후보가 되는 genomic DNA clone을 mutant 유전형질의 개체에 도입한 후 transgenic animal에서 그 돌연변이의 표현 형질이 상쇄되었는가(즉 rescue 되었는가)를 점검하는 것이다. Expression study를 위해서는 clone되어 있는 유전자의 조절 부위에 reporter를 fusion시켜 이를 wild type 개체에 도입한 후 reporter의 활성을 조사함으로써 그 유전자의 발

현 양상을 연구하면 된다. reporter로는 주로 lacZ나 gfp (green fluorescent protein)을 이용한다(6). 후자의 경우에는 살아 있는 개체에서 주어진 유전자의 발현 양상을 역동적으로 관찰할 수 있다는 이점을 가지지만, 특정한 발생 단계에서는 형광을 내지 못하여 나름의 한계를 가지고 있다. 또한, microinjection된 DNA가 extra-chromosomal array 상태로 존재하기 때문에 mosaic 상태로 발현되는 경우가 많아 발현 양상의 해석에 주의를 요한다. 따라서, 가장 정확한 expression study를 위해서는 위의 reporter gene의 microinjection과 함께 항체를 이용한 histo-immunochemistry를 수행하는 것이 바람직하다. *C. elegans*가 가지는 연구상의 가장 큰 무기는 genetics를 활용할 수 있다는 점이다. 예를 들어, 선충에서 고등동물의 주요 유전자와 유사한 유전자를 cloning하게 되면, 가장 핵심적인 정보는 그 유전자의 돌연변이를 분석함으로써 얻어지게 되는 것이다. cloning 된 DNA의 돌연변이를 동정하기 전에 우선 시도해 볼 수 있는 실험으로 antisense RNA를 들 수 있다. 즉, 주어진 유전자의 promoter에 antisense의 DNA를 접합하여 microinjection한 후 그 표현 형질의 변화를 관찰하거나, heat shock promoter를 이용하여 특정 시기에 antisense RNA의 발현을 유도하여 그 영향을 살필 수 있다. Maternal 유전자라고 생각될 때에는 antisense RNA를 직접 injection하여 그 영향을 찾을 수 있다. Zygotic 유전자의 경우에는 antisense RNA의 injection으로 그 영향을 찾을 확률은 낮다.

5) Cell ablation experiment

고등동물의 발생 과정에서 흔히 볼 수 있는 것이 cell-cell interaction에 의한 유도(induction) 현상이다. *C. elegans*는 비교적 cell-cell interaction의 경우가 단순하나 존재하고 있는 interaction의 경우에는 그 구성과 순서가 고등동물과 흡사하므로, *C. elegans*에서 이러한 연구가 많이 진행되어 왔다. 이러한 연구를 각 세포의 수준에서 할 때 이용할 수 있는 실험 방법이 cell ablation 실험이다. laser 광선을 이용하여 현미경하에서 특정 세포를 각각 죽일 수 있으므

로, cell-cell interaction이 일어나고 있다면, 한 세포의 제거가 특정한 표현 형질로 나타나게 될 것이다. 대표적인 예는 자웅동체의 vulva의 발생과정에서 찾을 수 있다. 이 과정에서는 Anchor cell이라는 somatic cell에서의 inductive signal이 vulval precursor cell을 induction시키는 데, 이것은 laser 광선으로 이 AC를 발생 초기에 제거하게 되면 vulva의 발생이 일어나지 않는다는 실험 결과에 의해 확립된 것이다. Cell ablation을 이용할 수 있는 또 하나의 응용은, expression pattern이 조사된 유전자의 경우 그 돌연변이 형질을 유추하는 데에서 찾을 수 있다. 즉, 특정 유전자가 특정한 발생 단계에서 특정 세포에서 발현이 된다면, 그 세포들을 laser로 제거함으로써 포괄적인 의미로 phenocopy할 수 있는 것이다.

3. 국내 연구의 현황

*C. elegans*를 재료로 연구를 수행하고 있는 국내의 연구실은 5~6개에 불과한 실정이나 앞으로 늘어날 것으로 예상된다. 국내 연구진들의 연구 분야는 다양하여 근육의 발생에 관여하는 유전자의 연구, heatshock response에 관여하는 유전자의 연구, topoisomerase의 연구, acetylcholine receptor의 연구 등이 활발히 진행되고 있다. 활발한 상호 의견 교환과 정보의 공유, 토론을 위해 모든 *C. elegans* 연구진들이 매년 2차례 모이는 연구회를 운영하고 있다. 본 난에서는 앞에서 열거한 분자유전학적 기법들을 이용하여 연구하는 실제적인 예를 본 연구실에서 진행되고 있는 과제들을 들어 보려고 한다.

1) Clathrin associated protein complex의 생물학적 기능의 분석

Genetic screen을 통해 *C. elegans*의 vulval induction pathway에서 negative regulator로 작용하는 유전자를 동정하여 클로닝한 결과 그 중 하나가 clathrin associated protein complex의 medium chain임이 밝혀진 후(7), 본 연구실에서는 clathrin associated protein complex가 signaling pathway의 선택적 조절 과정에서 관

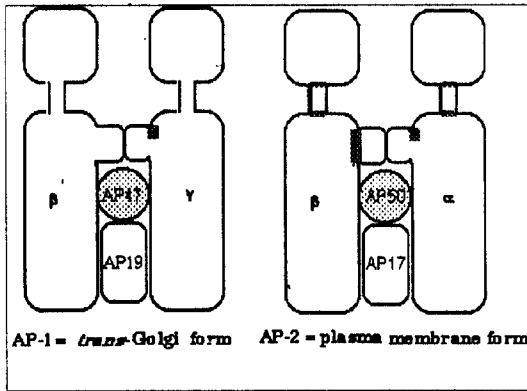
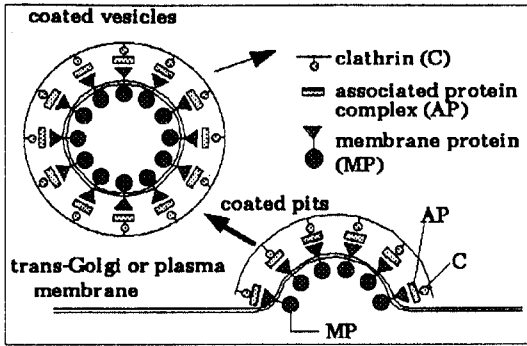


그림 2. (A) Structure of clathrin coated vesicle. (B) Clathrin associated protein complex.

여할 수 있다는 판단을 하였고 이에 다양한 종류의 clathrin associated protein complex medium chain의 생물학적 기능을 연구하기로 하였다. clathrin coated vesicle의 구조는 그림 2에 도식화하였다.

현재는 네 종류의 medium chain 유전자를 확보하였는데 이들은 각각 *unc-101*, *apm-1*, *apm-2*, *apm-3*로 명명되어 있다. *unc-101*이 위에서 언급한 negative regulator로서, 포유류의 medium chain AP47과 약 74% 동일성을 보인다. *apm-2*는 포유류의 medium chain AP50과 약 70%의 동일성을 보이는 유전자이다. AP47과 AP50은 각각 trans-Golgi와 plasma membrane상에 특이하게 존재하는 medium chain으로 알려져 있다. *apm-1*은 *C. elegans*에서 특이하게 발견된 medium chain으로 *unc-101*이나 포유류의 AP47에 공히 약 70% 정도의 동일성을

보이는 새로운 medium chain으로, 발현 양상이나 생물학적 기능이 아직 조사되지 않은 유전자이다. *apm-3*은 설치류에서 neuron-specific하게 발현되는 non-clathrin associated vesicle의 medium chain과 유사한 단백질로서 그 기능에 대한 연구는 진행되지 않은 단백질이다. 본 연구실에서는 이들 단백질의 유전자들의 발현 양상을 항체의 제조 및 histoimmunochemistry, lacZ 및 gfp fusion construct의 microinjection 등의 접근 방법으로 조사하고 있다. 예비적인 결과에 의하면, *unc-101*은 sperm과 coelomocyte에서 그 발현이 관찰되는데, 이 세포들은 intracellular vesicle들이 유난히 많은 세포들로서 clathrin associated protein의 발현을 쉽게 관찰할 수가 있었다. vulval induction pathway에서의 기능을 유추하기 위해 vulva 부분의 발현을 관찰한 결과, 아직은 그 identity를 알 수 없는 세포들에서 발현됨을 알 수 있었다. 그 이외의 세포들에서도 발현이 될 수 있기 때문에, 보다 정확한 실험 조건을 찾는 데 주력하고 있으며, subcellular localization은 confocal microscopy를 통해 보이고자 한다. *apm-2*의 경우는 *unc-101*이 발현되는 세포들 이외에도 특이적으로 신경세포와 spermatheca의 표면에서도 발현되는 것이 관찰되었다. 이들 유전자의 기능을 규명하기 위해서는 mutation 연구가 필수적인데, 이를 위해서는 antisense approach와 transposon insertion mutation의 동정을 통한 방법으로 접근하고 있다.

2) Neuromuscular junction의 연구

Reverse genetic approach로 본 연구실에서 수행하고 있는 내용은 neuromuscular junction에서 기능하는 단백질 유전자의 기능의 규명에 관한 것이다(그림 3).

우선 presynaptic terminal에서 vesicle fusion에 필요한 단백질의 하나인 SNAP-25의 기능을 밝히는 연구를 수행하고 있다. SNAP-25는 synaptosomal protein of 25 KD의 줄인 말로서, 이 단백질의 연구를 시작하게 된 이유는, 첫째, 현재까지는 그 연구를 위한 genetic system이 확보되어 있지 않고(*Drosophila*에서 cloning되었

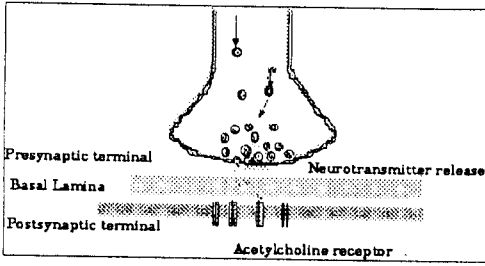


그림 3. Neuromuscular junction.

지만 repetitive sequence들의 존재로 mutation을 만들기가 거의 불가능함), 둘째, vesicle fusion은 neuron에서만 일어나는 것이 아니라 일반 세포에서도 일어나는 현상인데도 neuron-specific SNAP-25 이외의 nonneuronal SNAP-25 homolog가 밝혀져 있지 않으며, 셋째, SNAP-25가 neurotransmitter release 뿐 아니라 신경세포의 발생 과정에서 axon outgrowth에도 관여할 수 있다는 간접적인 연구 결과가 있어 이를 organism 수준에서 검증할 수 있으리라 기대된다는 점들을 들 수 있다(8, 9, 10, 11, 12). 본 연구실에서는 다른 종에서 cloning된 SNAP-25 유전자의 아미노산 서열에서 진화적으로 보존된 부위를 선택하여 degenerate primer를 만든 후 RT-PCR을 통해 한 종류의 SNAP-25 homolog를 cloning할 수 있었다. 이어서 genetic map과 physical map을 비교한 결과 candidate mutation을 찾을 수 있었고, cloning 된 genomic DNA를 microinjection하여 그 표현형질을 상쇄할 수 있음을 확인함으로써 SNAP-25가 그 mutation의 wild type 유전자를 encode함을 알아낼 수 있었다. SNAP-25의 antibody를 제조하여 이 homolog가 *C. elegans*에서도 neuron plasma membrane-specific함을 확인하였다. 또한 genome project의 과실의 하나로, SNAP-25와 유사한 또다른 homolog를 두개 더 찾았고 그 중 하나는 non-neuronal cell에서 특이하게 발현됨을 알 수 있었다. 현재는 이 또다른 유전자의 mutation을 동정하여 그 표현형질을 찾아가는 연구를 수행하고 있다. 이러한 연구가 순조롭게 진행된다면, SNAP-25가 단 하나의 단백질이 아니라, gene family로 존재함을 보일 수도 있으리라 기대한다.

Neuromuscular junction의 발생과정에서 muscle쪽에서 일어나는 중요한 과정 중의 하나는 acetylcholine receptor의 집중 현상이다. 이 과정에서 기능하는 단백질의 하나로서 rapsyn을 들 수 있다(13). rapsyn의 경우 이미 transgenic mouse가 만들어져 그 기능이 많이 밝혀져 있음에도 *C. elegans*라는 하등한 동물에서 연구하는 이유는 rapsyn이 muscle에서 presynaptic terminal쪽으로 보내는 retrograde signaling에도 관여할 수 있다는 점 때문이다. 이러한 retrograde signaling에 관여하는 새로운 유전자는 genetic manipulation이 용이한 system에서 수행하는 것이 장점을 가지는 것이다. 본 연구실에서는 그 시작점으로 우선 선충의 rapsyn homolog를 동정하고, 그 발현 양상, antisense approach와 mutation analysis를 통해 rapsyn의 생물학적 기능을 확인한 후, receptor clustering에 관여하는 새로운 유전자를 동정하는 방향으로 연구의 초점을 맞추고자 한다. 또한, rapsyn이 실제로 presynaptic terminal에 영향을 끼치는지, 그렇다면 이때 어떤 유전자들과 interaction하여 작용하는지를 밝히는 것도 중요한 내용이 될 것이다.

4. 전 망

*C. elegans*라는 실험 동물은 국내에서도 얼마든지 국제 경쟁력을 가지고 연구할 수 있는 유력한 시스템이다. Genome project의 완성은 이 실험 동물 연구의 종착역이 아니라, 그 생물학적 연구의 시발점이 될 것이며, 따라서 앞으로도 당분간은 창의적인 연구의 대상이 되리라 기대한다. *C. elegans*의 genetics를 이해하고 위의 여러가지 분자유전학적 기법을 적절히 활용한다면 다세포동물에서의 유전자 기능의 연구들이 선충을 이용하여 새롭게 펼칠 수 있으리라 생각된다. 보다 많은 연구자들이 서로 정보를 자유롭게 공유하고, 객관적인 비판의식을 가지고 상호 보완해 가는 학문적 토양 위에서라면 선충을 이용한 연구의 미래는 한층 더 밝으리라 기대해 본다.

참 고 문 헌

1. Wood, W.B. 1988. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor, New York.
2. Epstein, H.F., Shakes, D.C. 1995. Methods in cell biology vol.48 : *Caenorhabditis elegans*: modern biological analysis of an organism. Academic Press.
3. Plasterk, R.H.A. 1992. Reverse genetics of *Caenorhabditis elegans*. Bioessays 14: 629-633.
4. Plasterk, R.H.A., Groenen, J.T.M. 1992. Targeted alterations of *Caenorhabditis elegans* genome by transgene instructed DNA double strand break repair following Tc1 excision. EMBO J. 11:287-290.
5. Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., Ambros, V. 1991. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. EMBO J. 10:3959-3970.
6. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802-805.
7. Lee, J., Jongeward, G., Sternberg, P.W. 1994. unc-101, a gene required for many aspects of *C. elegans* development and behavior, encodes a clathrin-associated protein. Genes Dev. 8:60-73.
8. Loewy, A., Liu, W-S., Baitinger, C., Willard, M.B. 1991. The major 35S-methionine-labeled rapidly transported protein (superprotein) is identical to SNAP-25, a protein of synaptic terminals. J. Neurosci. 11: 3412 -3421.
9. Bark, I.C., Wilson, M.C. 1994. Regulated vesicular fusion in neurons: snapping together the details. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4621-4624.
10. Bark, I.C. 1993. Structure of the chicken gene for SNAP-25 reveals duplicated exons encoding distinct isoforms of the protein. J. Mol. Biol. 233:67-76.
11. Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Johns, K.A., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., Catsicas, S. 1993. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. Nature 364:445-448.
12. Risinger, C., Blomqvist, A.G., Lundell, I., Lambertsson, A., Nassel, D., Pieribone, V.A., Brondin, L., Larhammer, D. 1993. Evolutionary conservation of synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) shown by Drosophila and Torpedo. J. Biol. Chem. 268:24408-24414.
13. Apel, E.D., Roberds, S.L., Campbell, K.P., Merlie, J.P. 1995. Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. Neuron 15: 115-126.