

## 쥐 뇌에서 발현되는 S-100 Beta 유전자의 Polymorphism에 대한 분자생물학적 증거

계명대학교 생물학과, 미생물학과\*

신승우 · 권오식\* · 유 민†

국문초록: 쥐 뇌에서 발현되는 S-100 beta 유전자의 다형현상을 조사하였다. Polymerase chain reaction을 위한 주형으로는 뇌에서 분리한 mRNA를 직접 역전사한 cDNA, 또는 rat brain cDNA library에서 분리한 phage DNA를 사용하였다. 증폭된 DNA 절편들은 크기가 기존에 보고되었던 것과 일치하였으나 DNA sequencing을 통한 세부적인 분석 결과 coding region 내에 염기변화 (CAT가 CAC로 변함)가 있음이 확인되었다. 그러나 이들은 모두 histidine을 결정하는 유전암호이기에 단백질의 1차구조에는 아무런 영향을 미치지 않는 다형현상으로 결론지어졌다. 본 연구는 S-100 beta 단백질에 그동안 알려지지 않았던 다형현상이 존재함을 시사하는 것으로서 S-100 beta 효소 유전자의 전체적인 구조를 이해하기 위한 학문적 자료가 될 것으로 기대된다.

### 서 론

S-100 효소 단백질은 calcium-binding protein으로 alpha와 beta의 2 종류가 있다<sup>3,11</sup>. 이들의 발현 비율은 조직에 따라 조금씩 다른 것으로 확인되었는데, 뇌와 정소에서는 beta가 18~40배 정도로 발현율이 높은 반면, 신장, 췌장, 심장 등에서는 오히려 alpha가 75배 까지 더 높게 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>16</sup>. 특별히 그동안 연구의 주된 관심이 된 것은 beta 단백질이다. 그 이유는 S-100 beta가 피질신경세포로부터 축색이 확장될 때 향신경성요소로 작용하기에 이의 적절한 발현은 곧 정상적인 신경발생에 필수 요소일 것으로 추정되었기 때문이다<sup>5</sup>. S-100 beta의 유전자는 이미 사람의 염색체 21번에 위치함이 확인되었고<sup>1</sup>, 신경질환인 알츠하이머병의 환자에서 과잉 발현된다는 사실도 보고되었다<sup>12</sup>. 뿐만 아니라 비슷한 신경 증상을 보이는 다운증후군과 S-100 beta와의 기능적 관계 역시 조심스럽게 제시되고 있는 실정이다<sup>1</sup>. 결국 이렇게 다양한 보고들은 S-100 beta의 결핍 내지는 과잉 발현이 중추신경

계의 비정상적인 발생을 유도하고, 심지어는 apoptosis에 관여할 것이라는 주장을 뒷받침해 주고 있다<sup>7</sup>. 아직 그 구체적인 기능 경로에 대해 정확한 보고는 없는 실정이지만 지금까지 가장 유력한 설은 S-100 beta가 신경세포와 신경교세포의 세포체내로 칼슘이온을 유입함으로써 apoptosis를 촉진한다는 것이다<sup>2</sup>. 한편 형질전환된 쥐를 조사한 결과에 의하면 해마부위에서 S-100 beta의 발현이 현저하게 증가하였고, 이때문에 단기 기억능력이 영향을 받은 것으로 보고되어 있다<sup>13,15</sup>. 사람에서도 이와 비슷하게 간질환자의 경우 S-100 beta가 한층 높게 발현된다는 보고가 있다<sup>6</sup>.

유전자의 구조를 신속히 분석하고자 할 때 널리 쓰이는 기술 중에는 RFLP (restriction fragment length polymorphisms)<sup>14</sup>, 또는 외줄의 DNA를 제한효소로 처리한 후 denaturing gel 상에서 전기영동하여 DNA band의 이동 변화를 확인하는 방법들이 있다<sup>4</sup>. 문제는 이런 방법들이 특정 제한효소 부위나 염기서열 변화에 근거를 두고 있기 때문에, 효소 기능과는 아무런 관계가 없는 변화, 즉 단순한 다형현상에 의해서도 결과의 해석이 달라질 가능성이 있다는 것이다.

우리는 S-100 beta 효소 유전자의 전체적인 구조와 정확한 기능을 이해하기 위한 클로닝 과정

\* 논문접수: 1998년 8월 1일

수정재접수: 1998년 11월 27일

† 별책요청 저자

에서 동물모델인 쥐의 S-100 beta 유전자가 나타내는 다형현상을 발견하였다. 즉 쥐 뇌에서 발견되는 S-100 beta의 cDNA 클론을 집중적으로 분석하였고 이 과정에서 다형현상으로 추정되는 염기 변화를 확인하였기에 보고하는 바이다. 본 연구의 결과는 S-100 효소 유전자의 구조와 기능을 이해하기 위한 기초 자료가 될 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

**재료.** Adult Sprague-Dawley는 동산의료원 (Taegu, Korea)에서 구입하였다. Polymerase chain reaction (PCR)에 사용한 primer들은 Bioneer (Taejon, Korea)에 주문 합성하였으며, 이들의 염기서열은 각각 P1이 GGATGTCTGAGCTGGAGAAGG (sense), P2가 TCACTCATGTTCAAAGAAGCTC (antisense)였다. 두 종류의 rat brain cDNA library는 서로 다른 개체로부터 분리한 RNA를 주형으로 하여 제조된 것들이었다. RNAzol B, RNase inhibitor, M-MuLV reverse transcriptase, Taq DNA polymerase, Wizard Plus Minipreps DNA Purification System, Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit 등은 미국의 Promega, Novagen, USB 등으로부터 구입하였고, 사용방법은 제조회사에서 추천한 절차에 따라 그대로 사용하였다. PCR 기기는 Hybaid Omnigene (USA)을 사용하였다.

**Rat brain RNA의 분리.** 쥐에게 sodium pentobarbital (25 mg/kg)을 복강주사하여 마취시켰다. 흉강을 열고 좌심실을 통하여 2 units/ml 농도로 heparin을 첨가한 PBS buffer (1:1 mixture of 130 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/130 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)를 충분히 관류시켰다. 두부를 절단하고 신속히 뇌를 적출한 다음 뇌조직 100 mg당 RNAzol B 2 ml을 첨가하여 반응시킴으로써 전체 RNA를 분리하였다.

**역전사반응 및 PCR 반응.** 분리한 전체 RNA에 oligo (dT), dNTP, RNase inhibitor, M-MuLV reverse transcriptase를 혼합한 다음 42℃에서 1시간 반응시켜 첫번째 cDNA를 합성하였다. 이어서 94℃에서 3분간 가열하여 reverse transcriptase의 활성을 제거한 다음 -20℃에 보관하면서 필요할 때 마다 일부를 분주하여 사용하였다. 역전사 반응물에는 sense primer와 antisense primer, dNTP, Taq DNA polymerase를 첨가한 뒤 PCR 반응을 수행하였다. PCR 프로그램은 매 cycle을 94℃에서

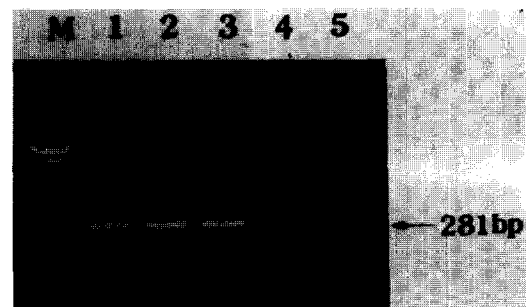
30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초로 하여 총 30회 반복하였다. 반응에 사용한 물질들의 농도는 Innis (1990) 등이<sup>9)</sup> 제시한 바에 의해 첨가하였다. Phage DNA는 Maniatis (1989) 등이<sup>10)</sup> 제시한 바에 따라 library로부터 분리하였다. 반응이 끝난 PCR 결과물은 1% agarose gel 상에 전기영동하여 확인하였다.

**Cloning.** PCR로 증폭된 cDNA 절편들은 pT7Blue T-vector에 ligation한 다음, NovaBlue 균주에 형질 전환시켰다. 형질전환체들은 X-gal, IPTG가 첨가된 배지 상에서 blue/white color selection을 통해 확인한 다음, glycerol stock을 만들어 -80℃에 보관하였다.

**DNA sequencing.** 반응을 위한 DNA는 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System을 사용하여 분리 정제하였다. 반응의 절차는 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit을 사용하여 제조회사에서 제시한 대로 수행하였다.

## 결 과

쥐의 중추신경계에서 발견되는 S-100 beta 유전자 변이를 조사하기 위하여 PCR 반응을 실시하였다. 사용한 sense primer와 antisense primer들은 Kuwano 등이<sup>9)</sup> 보고한 S-100 beta mRNA 염기서열에 기초하여 제작하였다. 특히 sense primer에는 개시코돈이, antisense primer에는 종말코돈이 포함되도록 고안함으로써 coding sequence 전



**Figure 1.** Results of PCRs and electrophoresis. Lanes 1, 2, 3 represent the amplified DNA products (281 bp) using reverse-transcribed cDNA of mRNA isolated from the rat brain as template (lane 1) or phage DNA templates isolated from rat brain cDNA libraries (lanes 2 and 3). Lanes 4 and 5 represent negative controls without primers or template DNA, respectively. Lane M represents the 100 bp ladder DNA size marker.

```

***
A: 1 GGATGCTGAGCTGGAGAAGGCCATGGTTGCCCTCATTGATGTCTTCCATCAGTATTTCAG 60
      |
B:  GGATGCTGAGCTGGAGAAGGCCATGGTTGCCCTCATTGATGTCTTCCATCAGTATTTCAG

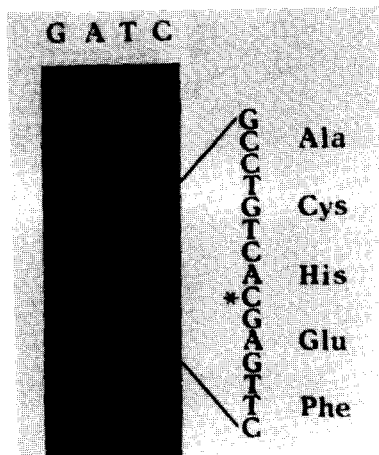
A: 61 GGAGAGAGGGTGACAAGCACAAGCTGAAGAAGTCAGAAGTGAAGGAGCTCATCAACAACG 120
      |
B:  GGAGAGAGGGTGACAAGCACAAGCTGAAGAAGTCAGAAGTGAAGGAGCTCATCAACAACG

A: 121 AGCTCTCTCACTTCTGGAGGAAATCAAAGAGCAGGAAGTGGTGGACAAAGTATGGAGA 180
      |
B:  AGCTCTCTCACTTCTGGAGGAAATCAAAGAGCAGGAAGTGGTGGACAAAGTATGGAGA

A: 181 CGCTGGACGAAGATGGGGATGGGGAGTGTGACTTCCAGGAGTTTATGGCCTTCGTCTCCA 240
      |
B:  CGCTGGACGAAGATGGGGATGGGGAGTGTGACTTCCAGGAGTTTATGGCCTTCGTCTCCA

A: 241 TGGTGACCACAGCCTGTCACGAGTTCTTTGAACATGAGTGA 281
      |
B:  TGGTGACCACAGCCTGTCATGAGTTCTTTGAACATGAGTGA
      |
      His
  
```

**Figure 2.** Comparison of nucleotide sequences between DNA fragment amplified using reverse-transcribed cDNA templates from rat brain (A) and the previously reported S-100 beta (B). The positions representing a polymorphism and corresponding amino acid (His) are shown in the box. Positions for PCR primers are underlined. The initiation codon (ATG) and stop codon (TGA) are included as (\*\*\*) in primer sequences.



**Figure 3.** The result of DNA sequencing. (\*) represents the nucleotide polymorphic difference. Orientation of the sequencing gel is reversed for the reading purpose (upside represents 5').

체의 증폭이 가능하도록 하였다. PCR 반응의 주형으로는 쥐 뇌에서 분리한 mRNA를 역전사반응하여 준비한 cDNA와 library에서 분리한 recombinant phage DNA가 사용되었다.

역전사 반응물을 PCR 수행한 결과 약 281 bp에 해당하는 DNA band가 전기영동으로 확인되었다 (lane 1, Figure 1). 이는 기존에 보고되었던<sup>9)</sup> S-100 beta mRNA의 염기서열을 참조할 때 예상했던 크기와 일치하는 것이었다. 이를 재확인하기 위하여 동일한 PCR 반응을 두종류의 rat brain cDNA library에서 분리한 phage DNA 주형에도 적용하였는데 역시 크기면에서 동일한 결과를 나타내었다 (lanes 2, 3). Primer 또는 주형으로 사용한 DNA 없이 PCR을 실시한 음성대조군에서는 (lanes 4, 5) 예상대로 아무런 DNA band가 관찰되지 않았기에 본 PCR 증폭은 S-100 beta에 특이적으로 이루어졌음이 재확인되었다.

이렇게 일차 증폭된 cDNA 절편들을 먼저

pT7Blue T-vector에 subcloning하였고, 보다 세부적인 분석을 위하여 DNA sequencing을 수행하였다. 그 결과 이전에 CAT로 보고된 염기가 CAC로 단일염기 치환된 것이 확인되었다. 이 결과는 역전사반응물을 PCR 반응의 주형으로 사용하였을 때나 phage DNA를 PCR 반응의 주형으로 사용하였을 때 모두 동일한 것으로 확인되었다. 따라서 Figure 2에는 역전사반응물을 PCR 수행했을 때 얻어진 염기서열 결과만을 기술하였다. 아미노산 서열은 기존에 보고되었던 S-100 beta와 100% 일치하였다.

## 고 찰

S-100 beta에 대한 그동안의 연구는 주로 임상학적 차원에서 이루어져 왔다. 때문에 상대적으로 분자유전학 차원에서의 연구가 늦어질 수밖에 없었는데, 가장 큰 이유는 신경조직에 대한 유전학적 기술 도입이 어려웠기 때문이다. 게다가 환자들의 증상이 워낙 다양하여 그 원인으로서는 S-100 효소를 알아내게 된 것도 비교적 최근의 일이기 때문이다. 특히 다운증후군, 알츠하이머병, apoptosis 등에 대한 직접 또는 간접적인 임상학적 영향은 이 효소에 대한 연구를 더욱 어렵게 만들고 있다.

유전자의 소규모 변이를 빠르고 정확하게 분석하고자 할 때 이용되는 보편적인 방법으로는 RFLP, 또는 hybrid DNA에 외줄특이적인 endonuclease를 처리하고 denaturing gel 상에서 DNA band의 이동이 어떻게 변화하는 지를 관찰하는 방법들이 있다. 그러나 이들 방법의 적용에서 문제가 되는 것이 바로 다형현상이다. 다형현상은 효소 기능에 전혀 영향을 미치지 않으면서도 유전자를 분석할 때 개체간 차이를 나타내는 요인이 되기에 유전자 분석을 목적으로 하는 여러 실험에서 혼란을 초래할 수 있기 때문이다.

본 실험에서는 동물모델인 쥐에서 S-100 beta 효소에 대한 다형현상을 확인하였다. 본 실험에서는 특히 library 제작 과정에서 유전자 염기서열이 재배열될 수 있다는 가능성을 피하고자 brain mRNA를 직접 역전사한 cDNA 주형도 PCR 반응에 사용하였다. 한편 형질전환체의 조사에서도 여러개의 콜로니들을 분석함으로써 PCR 반응에서 종종 초래될 수 있는 artifact의 가능성을 최대한 배제하였다. 단백질의 구조에는 전혀

영향을 주지 않은 다형현상이 쥐 S-100 beta에 존재함은 사람의 S-100 유전자에도 다형현상이 존재할 가능성이 있음을 시사하고 있다. 특히 본인들이 조사한 3종류의 주형 모두에서 단일염기치환이라는 다형현상 (CAT 대신 CAC)을 발견할 수 있었음은 흥미로운 사실이다 (Figure 3). 염기치환에도 불구하고 이들은 모두 histidine의 유전 암호였기에 단백질의 1차구조에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 본 연구는 S-100 beta 유전자의 전체적인 구조와 이 효소가 뇌에서 행하는 정확한 기능을 신속하게 분석하기 위한 학문적 기초를 마련할 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A and Dunn RJ (1988): Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science*, **239**: 1311-1313.
- 2) Barger SW and Van Eldik LJ (1992): S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem*, **267**: 9689-9694.
- 3) Baudier J, Glasser N, Haglid K and Gerard D (1984): Purification, characterization and ion binding properties of human brain S-100 beta protein. *Biochim Biophys Acta*, **790**: 164-173.
- 4) Caskey CT (1987): Disease Diagnosis by Recombinant DNA Methods. *Science*, **236**: 1223-1228.
- 5) Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL and Araoz C (1989): Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 7611-7615.
- 6) Griffin WS, Yeralan O, Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, Rovnaghi CR, Burnett BA, Feoktistova A and Van Eldik LJ (1995): Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem*, **65**: 228-233.
- 7) Hu J, Castets F, Guevara JL and Van Eldik LJ (1996): S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat

- cortical astrocytes. *J Biol Chem*, **271**: 2543-2547.
- 8) Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (1990): PCR protocols. pp 3-12, 1st Ed., Academic Press, Inc., San Diego.
  - 9) Kuwano R, Usui H, Maeda T, Araki K, Kurihara T, Yamakuni T, Ohtsuka E, Ikehara M and Takahashi Y (1986): Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and genomic DNA for alpha and beta subunits of S-100 protein. *Taniguchi Symp Brain Sci*, **9**: 243-255.
  - 10) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1989): *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  - 11) Marks A, Portier MM, Zeitoun Y, Legault-Demare L, Thibault J, Lamande N, Jeantet C and Gros F (1980): Identification of rat brain polysomes synthesizing the brain specific enolase (14.3.2 protein), S100 protein and alpha and beta tubulin subunits. *Biochimie*, **62**: 463-471.
  - 12) Marshak DR (1990): S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res*, **86**: 169-181.
  - 13) Roder JK, Roder JC and Gerlai R (1996): Memory and the effect of cold shock in the water maze in S100 beta transgenic mice. *Physiol Behav*, **60**: 611-615.
  - 14) Sauls CD and Caskey CT (1985): Applications of recombinant DNA to pathologic Diagnosis. *Clin Chem*, **31**: 804-811.
  - 15) Wagner AP, Reck G and Platt D (1993): Evidence that V+ fibronectin, GFAP and S100 beta mRNAs are increased in the hippocampus of aged rats. *Exp Gerontol*, **28**: 135-143.
  - 16) Zimmer DB and Van Eldik LJ (1987): Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. *Am J Physiol*, **252**: C285-C289.

**=Abstract=**

**Molecular Evidence for the Presence of Polymorphism in the Gene  
of S-100 Beta Protein Expressed in Rat Brain**

**Song-Woo Shin, Oh-Sik Kwon\* and Min Yoo<sup>†</sup>**

*Department of Biology, Department of Microbiology\*, Keimyung University,  
Taegu, 704-701, Korea*

We examined mRNAs, isolated from the rat brain, to ascertain if there is any polymorphism for S-100 beta protein gene. As templates for polymerase chain reaction (PCR) the reverse-transcribed cDNA from the rat brain or phage DNAs isolated from the rat brain cDNA libraries were used. Although PCR products turned out to be exactly same as the expected size based on the previously reported mRNA sequence a single base substitution (CAT to CAC) was identified at nucleotide level. This change was considered as polymorphism since it did not cause any change of the primary structure for S-100 beta protein. This result should facilitate the understanding of the overall structure of the gene for S-100 beta protein.

**Key Words:** S-100 beta, Brain, Polymorphism

**[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(2): 137-142, December, 1998]**

---

<sup>†</sup> Corresponding author