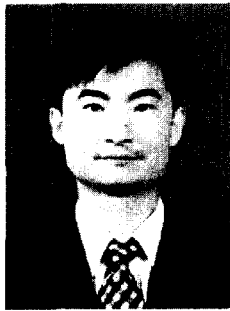


동물학 논문

Mechanism of GnRH pre-mRNA Splicing



성재영

1990년 서울대 동물학과 (이학사)
 1992년 서울대 분자생물학과 (이학 석사)
 1996년 서울대 분자생물학과 (이학 박사)
 1996~2000년 서울대 세포분화연구센터 (박사후 연수연구원)
 1997~1999년 독일 괴팅겐 의대 (홀볼트 펠로우)
 2000~현재 전남대 호르몬 연구센터 (전임강사)

1. 서론

고등동물에서 alternative splicing은 차등적 polyadenylation site의 사용, 차등적 전사시작 지점 사용, RNA editing 기전과 함께 단일 유전자로부터 다양한 종류의 mRNA를 합성하는 방법으로 고등동물의 복잡한 유전자 조절의 매우 중요한 특징이다. Alternative pre-mRNA splicing은 특히 조직 특이적, 발생단계 특이적인 유전자 조절에서 매우 중요한 전략으로 사용되고 있다 (Lopez, 1998). Alternative splicing은 단일 유전자로부터 기능과 구조가 다른 이형단백질을 만들 수 있다. 신경내분비 조절 관점에서 살펴보면 alternative splicing에 의해 형성된 단백질은 hormone 혹은 ligand에 대한 친화력의 차이, 세포내 위치 변동 및 신호 전달과 관련된 기능의 변화 등을 야기한다. 또한 alternative splicing은 RNA로부터 단백질을 만드는 효율의 조절에도 관련된다. Alternative splicing에 의해 다양한 5' 혹은 3' untranslated region (UTR)이 형성되고 이들은 RNA 안정성 혹은 번역효율 (translational efficiency)에 크게 영향을 주는 것으로

알려져 있다 (Wang et al., 1998). 현재까지 호르몬과 그 수용체, 신경전달물질 수용체의 유전자에서 수많은 alternative splicing pattern이 보고되었는데, 이는 5' 혹은 3' splice site의 차등적 선택, 차등적 엑손 선택 (exon selection) 혹은 인트론 보존 (intron retention)으로 나타난다. RNA splicing은 다양하고 복잡한 공정과정을 통해서 이루어진다. 인트론의 5' 혹은 3' splice site의 염기서열은 splice site 선택에서 일차적으로 중요하다. 5' splice site는 AG/GTRAGT (R=purine), 3' splice site는 피리미딘 (pyrimidine) tract과 그에 이어 CAG 염기서열, 즉 Y(n)CAG (Y=pyrimidine)이 보존되어 있다 (Shapiro and Senapathy, 1987). 또한 피리미딘 tract의 10에서 70 염기 앞쪽에 branch point site (BPS)가 존재한다 (Berglund et al., 1997). 5'과 3' splice site에는 거대 분자복합체, 즉 spliceosome이 형성되어 RNA splicing의 효소적 작용이 이루어진다. Spliceosome의 주요한 구성요소에는 U1, U2, U5, U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs), hnRNP, serine-arginin-rich (SR) 단백질 등이 있다 (Manley and Tacke, 1996). 효모의 경우 5' 혹은 3' splice site가 매우 잘 보존되어 alternative splicing이 거의 일어나지 않지만 그 이상의 고등 동물에서는 5' 혹은 3' splice site가 잘 보존되어 있지 않은 경우가 상당히 많이 존재하고, 이렇게 잘 보존되어 있는 곳과 잘 보존되지 않는 곳에 대한 spliceosome의 차등적인 형성이 이루어지고, 이에 따라 alternative splicing이 발생한다. 본고에서는 최근에 이루어진 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) 유전자의 pre-mRNA splicing을 중심으로 pre-mRNA splicing 기전을 살펴보고자 한다.

2. GnRH pre-mRNA Splicing

GnRH는 시상하부에서 분비되는 신경펩타이드로 포유류를 포함한 척추동물의 생식생리에서 중

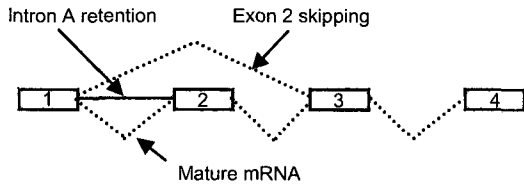


Fig. 1. Alternative GnRH pre-mRNA splicing. Alternative GnRH pre-mRNA splicing에 의해 인트론이 모두 제거된 성숙한 mRNA 형, 첫 번째 인트론이 보존된 형 (intron A retention), 엑손 2가 결핍된 형이 형성된다.

요한 역할을 한다. GnRH 유전자는 네 개의 짧은 엑손과 세 개의 긴 인트론으로 구성된다 (Bond et al., 1989). GnRH 유전자 발현은 시상하부뿐만 아니라 신체의 말단 조직, 즉 생식소, 뇌하수체, 면역조직, 태반 등에서 이루어지며, 뇌의 특정지역, 특히 후구 (olfactory bulb)와 후각 피질 (piriform cortex)에서도 발견되는 것으로 알려져 있다 (Azad et al, 1991; Choi et al., 1993; Pegasys et al., 1992; Radovick et al., 1990). 하지만 시상하부를 제외한 다른 조직에서는 그 발현 정도가 약할 뿐만 아니라, RNA 공정과정이 시상하부에서와는 다르게 나타난다. GnRH를 합성하는 시상하부나 GnRH 신경세포주 (GT1 cell line)에서는 인트론이 모두 제거된 성숙한 mRNA가 주로 발견되나 그 외의 조직 혹은 세포에서는 첫 번째 인트론 (intron A)를 포함한 전사체가 mRNA보다 훨씬 많이 발견된다 (Radovick et al., 1990; Dong et al. 1996). 또한 흔히 발견되지는 않지만 두 번째 엑손 (exon 2)이 결핍된 형이 발견되기도 한다 (Wilson et al., 1995, Zhen et al., 1997). 따라서 GnRH 유전자에서 발현

되는 RNA는 Fig. 1에서와 같이 모든 인트론이 제거된 성숙한 mRNA 형, 인트론 A가 보존되어 있는 형 (intron A retention), 그리고 엑손 2가 결핍되어있는 형 (exon 2 skipping)으로 나눌 수 있다. 인트론 A가 보존되거나 엑손 2가 결핍되는 형은 인트론 A의 3' splice site가 정상적인 3' splice site에 비해 그 염기서열이 잘 보존되지 않았기 때문으로 여겨진다. GnRH 인트론 A의 3' splice site를 다른 인트론의 3' splice site와 비교할 때 상이한 점이 발견된다. Fig. 2에서와 같이 mouse, rat, human의 GnRH 인트론 A의 3' splice site는 피리미딘 tract에 퓨린 염기가 많이 존재하고 또한 BPS로 추정되는 염기서열이 피리미딘 tract 앞부분에 존재하는 것이 아니라 피리미딘 tract안에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 피리미딘 tract에는 U2 auxiliary factor (U2AF)가 결합하게 되고, 이에 따라서 U2 snRNP가 3' splice site를 인지하게 되는데, 피리미딘 tract에 퓨린염기가 많이 존재할 경우 U2AF의 결합이 크게 약화되고, 또한 BPS에는 BBP (branch point bridging protein)이 결합하는데 (Berglund et al., 1997), BPS가 피리미딘 tract에 존재하는 경우 BBP와 U2AF의 경쟁이 형성되어 3' spliceosome 형성이 어려울 것으로 예상된다. 이러한 가설은 피리미딘 tract내에 존재하는 BPS로 추정되는 염기서열을 제거하고, 이를 피리미딘 tract 앞으로 치환했을 때 splicing이 효과적으로 나타나는 것으로 증명되었다 (Fig. 3) (Seong et al., 1999). 이와 같이 인트론 A의 3' splice site가 잘 보존되어있지 않은 경우 3' spliceosome이 인트론 A에 형성되지 못하여 인트론 A splicing 일어나지 못하게 된다. 한편으로 엑손 2가 삭제된 GnRH 전사체도 같은 맥락에서 설명될 수 있다. 이 경우에는 3' spliceo-

```

mouse intron A  GTTTCTGTGAAGCCAGTGGTCCAGGAGCTGGCCTCTTTGCTAAGCATTCTTCACTCTGTGTCTTGATGTCCCTTAG
rat intron A    GTTTCTGTGGAGTCAGTGGTCCGGGTGCTGGCTTCTTTCCAAAGTATTTCTTCCCTCTGTGTCTTGATGTCCCTTAG
human intron A  TTTTCACTAAAGAGGTCTTTTAGTTTATACTCAACCTTGCTCGATCTAATTGATTGTGCAATTCATGTCCCTTAG
mouse intron B  CACAGACAAGTCTTGGTCAAATGGAAACTGTTTGTGTTTACCTTCAIGTTTGAGGGTCTCATTCTTTATCTCCAG
mouse intron C  TTTTAGAAAACGTCAGAAAACAATGAAATCTTCAGCTAGTCCGTTCACAATTCATAAGCATGTTTTATATTTTCAG
    
```

Fig. 2. 인트론 A의 3' splice site. 생쥐, 흰쥐, 인간의 GnRH 인트론 A의 3' splice site와 생쥐의 인트론 B, 인트론 C의 염기서열을 나타낸다. 피리미딘 tract은 밑줄로 표시하고 추정되는 branch point site는 네모로 표시하였다. 피리미딘 tract안에 존재하는 퓨린은 진하게 표시하였다.

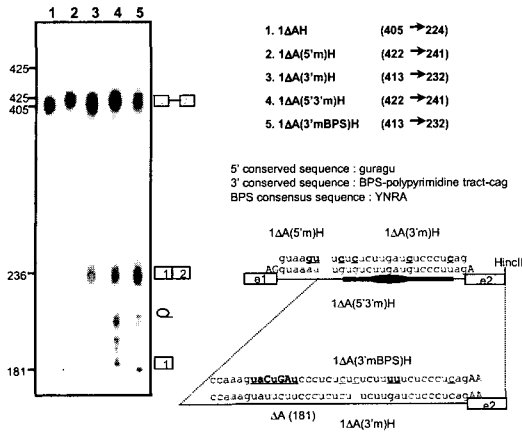


Fig. 3. 인트론 A splicing. 인트론 A의 5' 혹은 3' splice site를 consensus 염기서열로 치환한 후 in vitro에서 RNA splicing assay를 수행하였다. 3' splice site를 consensus 염기서열로 치환하거나, BPS를 피리미딘 tract 앞 쪽으로 치환했을 때 효과적인 intron A splicing이 관찰된다.

some이 인트론 A의 3' splice site에 형성되지 못하고 인트론 B의 3' splice site에 형성되고, 인트론 A의 5' splice site와 상호작용을 하여 결과적으로 엑손 2가 splicing 과정에서 제거되는 것으로 사료된다.

3. Exonic Splicing Enhancer (ESE)와 SR 단백질

고등생물의 RNA splicing 기전이 효모와 다른 것은 약한 5' 혹은 3' splice site에 대해서 splicing을 촉진시키거나 잘 보존된 splice site라 할지라도 그 사용을 억제하는 기전이 존재한다는 것이다. 이러한 기전에는 엑손 혹은 인트론에 존재하는 splicing enhancer 혹은 repressor 염기서열과 이에 결합하는 SR 단백질과 hnRNP가 관련되어 있다 (Manley and Tacke, 1996). SR 단백질과 hnRNP는 splicing enhancer 결합함으로써 약한 splice site에 spliceosome을 끌어들이어 splicing을 촉진하는 한편, 반대로 repressor와 결합하면 splice site에 spliceosome 형성을 억제함으로써 splicing을 차단한다. (Tian and Maniatis, 1994). GnRH 유전자의 경우

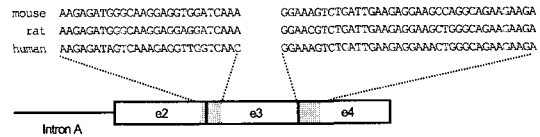


Fig. 4. GnRH 엑손 3과 4에 보이는 퓨린밀집 지역 (purine-rich region). 생쥐, 흰쥐, 인간의 GnRH 엑손에 존재하는 퓨린밀집 지역과 존재하는 위치와 그 염기서열을 표시하였다.

인트론 A의 3' splice site가 약함에도 불구하고 GnRH 신경세포에서 성숙한 GnRH mRNA가 형성되는 것은 인트론 A를 효과적으로 splicing시키는 특수한 기전이 존재함을 시사한다. 약한 3' splice site의 splicing 촉진시키는 기전에는 엑손 존재하는 염기서열, 특히 퓨린 염기가 밀집되어있는 지역 (purine-rich region)이 ESE (exonic splicing enhancer)로서 작용하는 것으로 알려져 있다 (Dirksen et al., 1994; Tanaka et al., 1994, Tian and Maniatis, 1994). GnRH 엑손에 존재하는 퓨린밀집 지역을 조사하면 mouse, rat, human에서 공통적으로 엑손 3과 엑손 4에 발견되다 (Fig. 4). 엑손 3과 4에 존재하는 퓨린밀집 염기서열은 구아노신 (G)과 아데노신 (A)이 서로 반복적으로 존재하여 GAR (R=purine) 혹은 AGR 서열이 여러번 반복된다. 이러한 염기서열은 ESE로 사용되는 퓨린밀집 염기서열의 전형으로 약한 3' splice site를 가진 인트론 A의 splicing에 촉진시킬 것으로 추정되었다. 엑손 3과 4에 존재하는 퓨린밀집 염기서열이 진정으로 ESE로서 작용하는 가를 검증하기 위하여 엑손 3과 4가 존재하는 상황에서 인트론 A의 splicing을 조사한 결과 GnRH 신경세포로부터 분리한 핵추출물 (nuclear extract)을 pre-mRNA와 반응시켰을 때 농도 의존적으로 splicing이 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 5). 또한 이러한 염기서열에서 퓨린을 피리미딘으로 치환시켰을 때 splicing이 일어나지 않는 것으로 보아 엑손 3과 4에 존재하는 퓨린밀집 염기서열이 ESE로 작용하는 것이 검증되었다 (Seong et al., 1999). GnRH pre-mRNA splicing에서 ESE의 촉진적인 효과는 생식소왜소증 생쥐 (hypogonadal mice)에서 보다 명확하게 증명된다. 생식소왜소증 생쥐는 GnRH 유전자 중에서 엑손 3과 4가 결핍되어 있다. 생식소왜소증 생쥐의 시

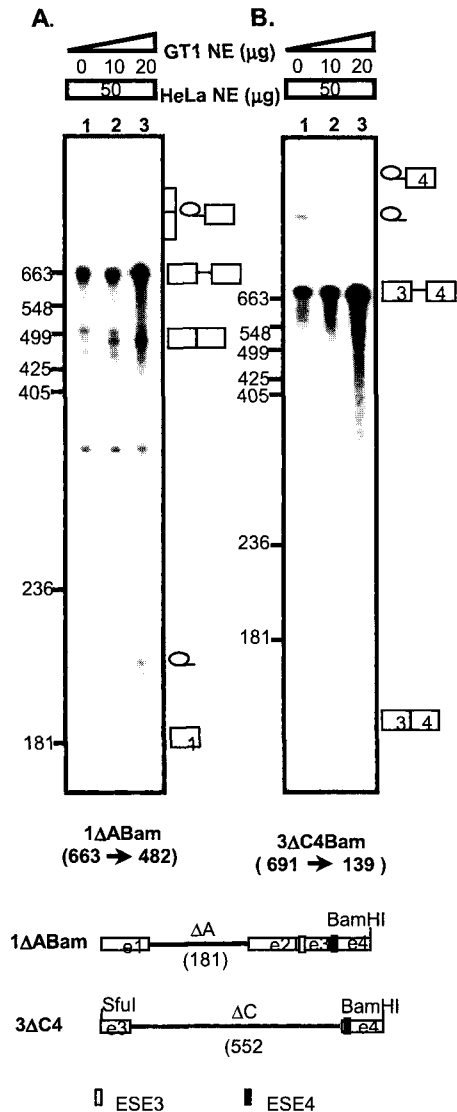


Fig. 5. GnRH pre-mRNA splicing에 미치는 ESE의 영향. 엑손 3과 4에 존재하는 ESE가 존재하는 조건에서 GnRH pre-mRNA를 in vitro에서 GT1 핵추출물과 반응시켰다. 인트론 A의 splicing은 GT1 핵추출물의 농도에 의존적으로 증가하였다. 반면, 인트론 C의 경우 커다란 영향을 주지 못하였다.

상하부에서 GnRH pre-mRNA splicing을 살펴보면, 인트론 A가 남아있는 전사체가 정상적인 생쥐에 비해서 훨씬 많이 존재하는데, 이는 엑손 3과 4에서 제공되는 ESE 염기서열이 결핍되어 촉진적

인 splicing이 일어나지 않았기 때문으로 사료된다 (Seong et al., 2000). 퓨린밀집 염기서열이 ESE로서 작용하기 위해서는 SR 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다 (Manley and Tacke, 1996). SR 단백질은 SRp20, ASF/SF, Sc35, SRp30, SRp40, SRp55, SRp75, 9G8, Tra, Tra2 α Tra2 β 등 현재까지 10여종이 알려져 있으며 분자량은 약 20~75 kDa 정도이다. 이들 SR 혹은 SR-like 단백질에는 하나 혹은 두 개의 RNA recognition motif (RRM)과 arginine과 serine이 반복되어 있는 SR domain이 존재한다. SR domain은 단백질-단백질 상호작용에 크게 관여하며, 단백질-RNA 상호작용에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 ESE에 결합한 SR 단백질은 spliceosome을 구성하는 단백질과 상호 작용하여 약한 3' splice site에 spliceosome이 형성되도록 도와준다 (Dirksen et al., 1994; Tanaka et al., 1994; Tian and Maniatis, 1994). 최근에 SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment) 방법에 의해 SR 단백질과 RNA 특정 염기서열간의 상호작용에 관한 연구가 진행되었다 (Liu et al., 1998; Schall and Maniatis, 1999). SELEX 방법은 SR 단백질이 퓨린 밀집 염기뿐만 아니라 피리미딘 염기서열에도 결합하는 것으로 알려져 SR 단백질과 ESE 작용은 보다 복잡할 것으로 사료된다. SR 단백질 중에서 특히 ASF/SF와 Tra2가 퓨린밀집 염기서열에 강하게 결합하는 것으로 보고되었다. GnRH 신경세포 주인 GT1 cell에서 핵추출물을 분리한 후 다시 SR 단백질만을 분리하고 이를 GnRH 엑손에 존재하는 퓨린밀집 염기서열과 UV-cross linking하면, 40 kDa의 단백질이 특이적으로 퓨린밀집 염기서열과 결합하는데, 이 40 kDa 단백질은 Tra2와 SRp40으로 추정되고 있다. 따라서 GnRH 신경세포 특이적인 GnRH pre-mRNA splicing은 Tra2 혹은 SRp40과 ESE의 상호작용에 의한 것으로 사료된다. GnRH 신경세포 특이적인 GnRH pre-mRNA splicing에서 특이할 점은 ESE가 엑손 3과 4에 존재한다는 것이다. 일반적으로 ESE는 3' splice site의 바로 뒤에 오는 엑손에 존재한다. 반면에 GnRH 엑손 2에는 퓨린밀집 염기서열이 존재하지 않는다. 퓨린밀집 염기서열이 ESE로서 작용하기 위해서는 3' splice site로부터의 거리가 매

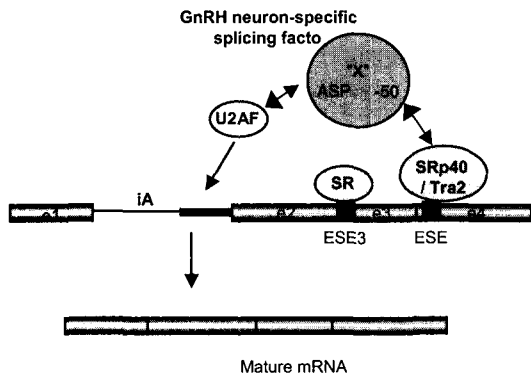


Fig. 6. GnRH 신경세포 특이적인 GnRH pre-mRNA splicing 모델. GnRH 엑손에 존재하는 ESE에 Tra2와 SRp40 단백질이 결합하고 이는 GnRH 신경세포 특이적인 X 단백질과 상호작용을 하여 인트론 A의 약한 3' splice site에 U2AF가 결합하도록 한다. 이에 따라, 인트론 A에 spliceosome이 형성되어 인트론 A가 RNA 공정과정을 통하여 제거된다.

우 중요한 요소로 작용한다. ESE가 3' splice site로부터 100 bp 미만의 거리에 있을 때 효과적인 반면 그 이상의 거리에 존재하면 ESE로서 작용하지 못한다. 그런데 엑손 3과 4에 존재하는 ESE는 3' splice site로부터 약 150 bp, 240 bp 정도 떨어져 있다. 따라서 SR 단백질이 멀리 떨어져 있는 ESE와 작용하여 3' spliceosome을 형성을 돕기 위해서는 이를 매개할 또 다른 단백질이 필요할 것으로 예상되고 있다. 최근의 연구결과에 의하면, GnRH 신경세포에서 분리한 핵추출물 중에서 ammonium sulfate 40~50% 포화농도에서 침전되는 (ASP40-50) 단백질이 특히 GnRH pre-mRNA splicing을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서 ESE에 결합하는 SR 단백질과 ASP40-50에 존재하는 단백질의 상호작용이 3' spliceosome을 형성을 촉진시켜 GnRH 신경세포 특이적인 splicing을 일으키는 것으로 사료된다 (Fig. 6). GnRH pre-mRNA splicing은 GnRH 신경세포 특이적인 뿐만 아니라, 발생단계 특이적인 현상을 보인다. 신생 생쥐에서 성인 생쥐로 발생하는 시기에 시상하부에서 GnRH pre-mRNA splicing을 살펴보면, 인트론 A의

제거가 발생이 진행될수록 증가하는 양상을 보여 준다 (Seong et al., 2000). 이와 같은 현상은 GnRH pre-mRNA splicing에 관련된 splicing machinery가 발생단계에 따라 성숙되고 있음을 지시한다. 하지만 아직까지 GnRH 신경세포 특이적인 splicing factor에 대한 연구는 진행중이며, 이 splicing factor의 발견은 alternative GnRH pre-mRNA splicing 기전을 밝히는데 중요한 역할을 할 것이다.

4. 신경내분비 조절과 pre-mRNA Splicing

신경내분비적 조절과 관련되어 수많은 유전자가 alternative splicing 현상을 보이고 이에 따라 다양한 단백질을 형성한다. Table 1은 신경내분비 조절과 관련된 유전자의 alternative splicing을 보여준다. 신경호르몬 유전자는 alternative RNA splicing보다는 대부분 alternative 단백질 공정과정에 의해 다양한 신경 펩타이드를 만들고 이를 통한 신경내분비적 조절에 관여한다. 하지만 GHRH (growth hormone-releasing hormone)의 경우 alternative splicing에 의해 새로운 C-terminal peptide를 만든다 (Perez-Riba et al., 1997). GH (growth hormone)는 4번째 인트론이 mRNA에 남아있음으로써 새로운 형의 GH를 합성한다 (Sun et al., 1993). GnRH나 NOS의 경우에는 alternative splicing에 의해 서로 다른 5' UTR이 형성되고 이는 번역과정의 효율을 조정한다 (Wang et al., 1998, Seong et al., 2000). PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide)에서는 alternative splicing에 의해 3가지 서로 다른 5' UTR이 형성되지만 아직 그 기능이 밝혀지지 않고 있다 (Yamamoto et al., 1998). 신경호르몬 혹은 신경전달물질에 대한 수용체는 보다 다양하고 광범위하게 alternative splicing이 일어난다 (Kilpatrick et al., 1999). Alternative splicing에 의해 N-말단 혹은 C-말단이 다른 경우, transmembrane (TM) domain이나 intracellular (IC) loop, extracellular (EC) loop에서의 엑손의 삽입 혹은 삭제 등에 의해 다양한 종류의 단백질이 만들어진다. 이들 단백질은 wild type과는 비교해서 ligand에 대한 친화력이 다른 경우도 있고, 다른 경로의 신호전달을 유도하거나 wild type에 대해

Table 1. Splice variants of neuroendocrine-related genes

Genes	Variants	Known relevance	Refs
GnRH	Intron A retention	Less translational efficiency	Seong et al., 1999
	Exon 2 deletion	No GnRH production	Zhen et al., 1997
GHRH	Exon addition	C-terminal peptide production	Perez-Riba et al., 1997
PACAP	Alternative exon 1 usage	Different 5-UTR	Yamamoto et al., 1998
GH	Intron D retention	Different C-terminal GH	Sun et al., 1993
NOS	Alternative exon 1 usage	Different 5-UTR, translational efficiency	Wang et al., 1998
GnRH Rc	Exon 2 deletion	No binding and coupling	Zhou and Sealfon, 1994
	Intron B retention	No binding and coupling	
	Exon 2 partial deletion	No binding and coupling (dominant negative to wild type)	Grosse et al., 1997
GHRH Rc	41 aa insertion in IC3	Different signaling	Zeitler et al., 1998
	Alternative C-terminus	Different signaling	Miller et al., 1999
TRH Rc	Alternative C-terminus	Different coupling	Lee et al., 1995
CRF ₁ Rc	CRF _{1β} 29 aa insertion in IC1	Reduced affinity, impaired coupling	Nabhan et al., 1995
CRF ₂ Rc	α , β , γ : alternative N-terminus	Different tissue distribution	Kostich et al., 1998
SSTR2	alternative C-terminus	Different signaling	Reisine et al., 1993
PACAP Rc	21 aa deletion in N terminus	Different ligand binding	Pantaloni et al., 1996
	HIP, HOP, HOP2, HIP-HOP1 in IC3	Different IP ₃ coupling	Spengler D et al., 1993
	PAC1R: 2 aa deletion in TM2 and TM4	No coupling to cAMP or IP ₃ but Ca signaling	Chatterjee et al., 1996
Leptin Rc	a, b, c, d, e: deferent C-terminus	Different tissue distribution	Chua et al., 1997
NPY Y1 Rc	α , β : different TM7 and C-terminus	β : only expressed in embryos, no coupling	Nakamura et al., 1995
Dopamine D2 Rc	29 aa insertion in IC3	Signal through G _{iα} protein	Monsma et al., 1989
GABA-B Rc	a, b: alternative N-terminus	Selective association of 1b variant with Kir channels	Kaupman et al., 1998
	c: 31 aa insertion in EC2/TM5		
	d: different C-terminus		

서 dominant negative 효과를 보이기도 한다 (Grosse et al., 1997). GH 수용체의 경우 alternative splicing에 의해 세포막에 결합하지 않고 분비되어 혈관계에서 GH와 결합하는 경우도 생긴다 (Edens and Talamantes, 1998). 이와 같은 alternative splicing은 모든 조직에서 항상 일정한 비율로 나타나기도 하지만 많은 경우에 조직 특이적, 발생단계 특이적으로 형성된다 (Kostich et al., 1998; Nakamura et al., 1995). 또한 호르몬이나 신경자극에 의해서도 특정 splice variant의 비율이 변화하는 것으로 나타나 있다 (Guivarc'h et al., 1998; Daoud et al., 1999). Alternative splicing 이 일어나는 기전은 여러 가지 가설에 의해 설명되고 있다. 하나의 가설은 spliceosome을 구성하는 단백질의 농도가 세포마다 혹은 발생학적 단계에 따라 다르게 분포하고 이에 따라 alternative splicing이 일어난다는 가설이다. SR 단백질의 농도는 세포마다 혹은 조

직마다 서로 다르게 분포함이 알려지고 있다 (Zahler et al., 1993). 또한 이러한 가설은 SR 단백질을 서로 다른 농도로 처리하였을 때 서로 다른 splice site 선택을 가져온다는 연구에 의해서 지지되고 있다 (Caceres et al., 1994). 또 다른 가설은 세포 혹은 발생학적 단계에 특이적인 splicing factor가 존재할 가능성이 있다. Hu RNA binding protein은 alternative splicing에 의해 다양한 RNA가 합성되고 다양한 단백질이 형성되는 데 이 단백질 자체가 splicing factor로서 작용할 것으로 예상되고 있다. 흥미로운 것은 이렇게 다양하게 Hu RNA가 뇌에서 조직 특이적이고 발생단계 특이적인 양상으로 발현된다 (Okano and Barnell, 1997). 초과리의 성결정에는 암컷 특이적인 transformer (Tra) 단백질의 발현이다. Tra 단백질의 발현은 alternative splicing을 결정하여 성의 결정에 중요한 역할을 한다 (Tian and Maniatis, 1994). 신경계

포 특이적인 PTB 단백질의 발현은 신경세포 특이적인 exon cassette의 발현을 조절하는 것으로 알려지고 있다 (Zhang et al., 1999).

Alternative splicing에 의해 복잡하고 정교한 신경내분비적 조절이 이루어지지만 현재까지 이들 유전자의 alternative splicing 기전에 대해서는 연구가 거의 진행되지 않고 있다. Alternative splicing에 관한 정확한 메커니즘에 대한 연구는 이들 유전자의 5'과 3' splice site에 대한 분석, 엑손 혹은인트론에 존재하는 cis-element에 대한 연구, 그리고 이러한 cis-element에 결합하는 단백질을 추적함으로써 이루어질 수 있다. 이러한 연구는 post-genome era에서 유전자 기능을 살피는데 결정적인 역할을 하고, 복잡하고 다양한 신경내분비 조절 메커니즘에 대한 이해를 크게 증진시킬 것이다.

참 고 문 헌

- Azad N, Emanuele NV, Halloran MM, Tentler J, Kelley M, 1991, Presence of luteinizing hormone-releasing (LHRH) mRNA in rat spleen lymphocytes. *Endocrinology* **128**: 1679-1681.
- Berglund JA, Chua K, Abovich N, Reed R, Rosbash M, 1997, The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branch-point sequence UACUAAC. *Cell* **89**: 781-787.
- Bond CT, Hayflick JS, Seeburg PH, Adelman JP, 1989, The rat gonadotropin-releasing hormone: SH locus: structure and hypothalamic expression. *Mol Endocrinol* **3**: 1257-1262.
- Caceres JF, Stamm S, Helfman DM, Krainer AR, 1994, Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**: 1706-1709.
- Chatterjee TK, Sharma RV, Fisher RA, 1996, Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem* **271**: 32226-3232.
- Choi WS, Kim MO, Lee BJ, Kim JH, Sun W, Seong JY, Kim K, 1994, Presence of gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat olfactory piriform cortex. *Brain Res* **648**: 148-151.
- Chua SC Jr, Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL, 1997, Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics* **45**: 264-270.
- Daoud R, Da Penha Berzaghi M, Siedler F, Hubener M, Stamm S, 1999, Activity-dependent regulation of alternative splicing patterns in the rat brain. *Eur J Neurosci* **11**: 788-802.
- Dirksen WP, Hampson RK, Sun Q, Rottman FM, 1994, A purine-rich exon sequence enhances alternative splicing of bovine growth hormone pre-mRNA. *J Biol Chem* **269**: 6431-6436.
- Dong K-W, Duval P, Zeng Z, Gordon K, Williams RF, Hodgen GD, Jones G, Kerdelhue B, Roberts JL, 1996, Multiple transcription start sites for the GnRH gene in rhesus and cynomolgus monkeys: a non-human primate model for studying GnRH gene regulation. *Mol Cell Endocrinol* **117**: 121-130.
- Edens A, Talamantes F, 1998, Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocrine Rev* **19**: 559-582.
- Grosse R, Schoneberg T, Schultz G, Gudermann T, 1997, Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor. *Mol Endocrinol* **11**: 1305-1318.
- Guivarc'h D, Vincent JD, Vernier P, 1998, Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptors in the MMQ prolactin cell line. *Endocrinology* **139**: 4213-4221.
- Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B, 1998, Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly

- rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14991-14996.
- Kilpatrick GJ, Dautzenberg FM, Martin GR, Eglen RM, 1999, 7TM receptors: the splicing on the cake. *Trends Pharmacol Sci* **20**:294-301.
- Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL, 1998, Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* **12**: 1077-1085.
- Lee TW, Anderson LA, Eidne KA, Milligan G, 1995, Comparison of the signalling properties of the long and short isoforms of the rat thyrotropin-releasing-hormone receptor following expression in rat 1 fibroblasts. *Biochem J* **310**: 291-298.
- Liu HX, Zhang M, Krainer AR, 1998, Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* **12**: 1998-2012.
- Lopez AJ, 1998, Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet* **32**: 279-305.
- Manley JL, Tacke R, 1996, SR proteins and splicing control. *Genes Dev* **10**: 1569-1579.
- Miller TL, Godfrey PA, Dealmeida VI, Mayo KE, 1999, The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* **140**: 4152-4165.
- Monsma FJ Jr, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR, 1989, Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* **342**: 926-929.
- Nabhan C, Xiong Y, Xie LY, Abou-Samra AB, 1995, The alternatively spliced type II corticotropin-releasing factor receptor, stably expressed in LLCPK-1 cells, is not well coupled to the G protein(s). *Biochem Biophys Res Commun* **212**: 1015-1021.
- Nakamura M, Sakanaka C, Aoki Y, Ogasawara H, Tsuji T, Kodama H, Matsumoto T, Shimizu T, Noma M, 1995, Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by alternative splicing. Isolation, genomic structure, and functional expression of the receptors. *J Biol Chem* **270**: 30102-30110.
- Okano HJ, Darnell RB, 1997, A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J Neurosci* **17**: 3024-3037.
- Pagesy P, Li JY, Berthet M, Peilon F, 1992, Evidence of gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat anterior pituitary. *Mol Endocrinol* **6**: 523-528.
- Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Houssami S, Spengler D, Bockaert J, Journot L, 1996, Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J Biol Chem* **271**: 22146-22151.
- Perez-Riba M, Gonzalez-Crespo S, Boronat A, 1997, Differential splicing of the growth hormone-releasing hormone gene in rat placenta generates a novel pre-proGHRH mRNA that encodes a different C-terminal flanking peptide. *FEBS Lett* **402**: 273-276.
- Radovick S, Wondisford FE, Nakayama Y, Yamada M, Cutler GB Jr, Weintraub BD, 1990, Isolation and Characterization of the human gonadotropin-releasing hormone gene in the hypothalamus and placenta. *Mol Endocrinol* **4**: 476-480.
- Reisine T, Kong H, Raynor K, Yano H, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, 1993, Splice variant of the somatostatin receptor 2 subtype, somatostatin receptor 2B, couples to adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **44**: 1016-1020.
- Schaal TD, Maniatis T, 1999, Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol Cell Biol* **19**: 1705-1719.
- Seong JY, Kim BW, Park S, Kim K, 2000,

- Pre-mRNA splicing of gonadotropin-releasing hormone during postnatal developing of normal mice and in adult hypogonadal mice. *Endocrinology* (submitted).
- Seong JY, Park S, Kim K, 1999, Enhanced splicing of the first intron from the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) primary transcript is a prerequisite for mature GnRH messenger RNA: presence of GnRH neuron-specific splicing factors. *Mol Endocrinol* **13**: 1882-1895.
- Shapiro MB, Senapathy P, 1987, RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* **15**: 7155-7174.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L, 1993, Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **365**: 170-175.
- Sun Q, Hampson RK, Rottman FM, 1993, In vitro analysis of bovine growth hormone pre-mRNA alternative splicing. Involvement of exon sequences and trans-acting factor(s). *J Biol Chem* **268**: 15659-15666.
- Tanaka K, Watakabe A, Shimura Y, 1994, Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. *Mol Cell Biol* **14**: 1347-1354.
- Tian M, Maniatis T, 1994, A splicing enhancer exhibits both constitutive and regulated activities. *Genes Dev* **8**: 1703-1712.
- Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA, 1999, RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12150-12155.
- Wilson TM, Yu-Lee L, Kelley MR, 1995, Coordinate gene expression of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and the LHRH receptor after prolactin stimulation in the rat Nb2 T-cell line: implications for a role in immunomodulation and cell cycle gene expression. *Mol Endocrinol* **9**: 44-53.
- Yamamoto K, Hashimoto H, Hagihara N, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Baba A, 1998, Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* **211**: 63-69.
- Zahler AM, Neugebauer KM, Lane WS, Roth MB, 1993, Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* **260**: 219-222.
- Zeitler P, Stevens P, Siriwardana G, 1998, Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (dw) rats. *J Mol Endocrinol* **1998** **21**: 363-371.
- Zhang L, Liu W, Grabowski PJ, 1999, Coordinate repression of a trio of neuron-specific splicing events by the splicing regulator PTB. *RNA* **5**: 117-130.
- Zhen S, Dunn IC, Wray S, Liu Y, Chappell PE, Levine JE, Radovick S, 1997, An alternative gonadotropin-releasing hormone (GnRH) RNA splicing product found in cultured GnRH neurons and mouse hypothalamus. *J Biol Chem* **272**: 12620-12625.
- Zhou W, Sealfon SC, 1994, Structure of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene: variant transcripts generated by alternative processing. *DNA Cell Biol* **13**: 605-614.