1999년도 산학협동 연구비 Korean Circulation J 2001;31(7):711-721

# 마우스 FK-506 Binding Protein 12.6 유전자의 클로닝과 생물학적 기능 및 여러 심질환에서의 발현양상

충북대학교 의과대학 내과학교실, 충북대학교 의학연구소
조명찬 · 박해남 · 연태진 · 김동운

# Molecular Cloning of Mouse FK-506 Binding Protein 12.6 Gene and Its Biological Function and Expression Patterns in the Various Models of Heart Disease

**Myeong-Chan Cho, MD, Hainan Piao, MD, Tae-Jin Youn, MD and Dong-Woon Kim, MD**
*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Medical Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, Korea*

**ABSTRACT**

**Background and Objectives**: The FK-506 binding protein 12 (FKBP12) regulates intracellular $Ca^{2+}$ release by stabilizing the $Ca^{2+}$-induced $Ca^{2+}$-release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle. It has been reently shown that a different FKBP, FKBP12.6, is specifically associated with cardiac ryanodine receptor. Since the role of FKBP12.6 in excitation-contraction coupling in the cardiac muscle has not been precisely determined, its biological function was assessed and expression patterns of FKBP12.6 were evaluated in the various models of heart disease. **Materials and Method**: The mouse (m) FKBP12.6 gene was cloned and characterized after screening a mouse genomic DNA library using a mFKBP12.6 cDNA obtained through reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Expression levels of mFKBP12.6 was evaluated during cardiac development and in the models of cardiac hypertrophy and failure. **Results**: Both mFKBP12.6 and mFKBP12 contain an open reading frame of 327 nucleotides encoding 108 amino acids. Comparison of mFKBP12.6 cDNA to rat FKBP12.6, human FKBP12.6 and mFKBP12 cDNA revealed 95%, 94% and 74% identity in nucleotide sequence and 98%, 97% and 80% identity in amino acid sequence, respectively. Purified recombinant mFKBP 12.6 migrated slower than either mFKBP12 or human FKBP12 on an SDS-polyacrylamide gel, despite having the same number of amino acids and a slightly lower calculated molecular mass. Northern blot analysis showed that the expression of FKBP12 and FKBP12.6 to be highest in brain. While the expression of FKBP12 was much stronger in adult than in embryonic hearts, it was further increased following pressure overload hypertrophy. FKBP12.6 mRNA expression analyzed by RNase protection assay was upregulated after induction of cardiac hypertrophy like FKBP12, whereas it was decreased in the failing heart. The mFKBP12.6 gene contains 5 exons and the proteincoding region of the gene was divided into 4 exon modules. **Conclusion**: We report the molecular cloning and characterization of the mouse FKBP12.6 gene. According to these results, FKBP12 and FKBP12.6 may play a role in the development of cardiac hypertrophy and transition to heart failure. To precisely determine the role of FKBP12 and FKBP12.6 in the heart, a strategy using homologous recombination in embryonic stem cells to conditionally ablate exon 2 of mFKBP12.6 gene has been developed and initial characterization is now underway. **(Korean Circulation J 2001;31(7):711-721)**

**KEY WORDS**: FKBP12 · FKBP12.6 · Cloning · Gene · Transgenic.

교신저자 : 조명찬, 361 - 711 청주시 흥덕구 개신동 62 충북대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (043) 269 - 6356 · 전송 : (043) 273 - 3252 E - mail : mccho@med.chungbuk.ac.kr

## 서 론

FK-506 binding protein(FKBP)은 무핵세포부터 척추동물까지 널리 존재하고 있으며 그 유전자 염기서열의 많은 부분이 보존되어 있어 생명의 유지에 중요한 유전자로 생각되어진다.[1] FKBP는 SDS-polyacrylamide gel에서 얻은 단백질의 크기(KDa)로 명명되고 있으며, 지금까지 사람에게는 FKBP9, FKBP12, FKBP13, FKBP25 및 FKBP52가 알려져 있었으나 최근 FKBP12.6이 보고되었다.[2-4] FKBP12는 장기이식후 거부반응을 억제하기 위하여 투여되는 면역억제제인 FK-506의 세포내수용체(intracellular receptor)로 작용하는 immunophillin으로 FK-506이 FKBP12와 결합하여 FK506-FKBP12 complex를 형성하면 serine/threonine phosphatase인 calcineurin을 억제하고 T 임파구 증식에 필수적인 interleukin-2의 활동을 막아 면역억제 효과를 나타낸다.[5] FKBP12는 petidyl-prolyl isomerase로 단백질의 folding과 assembly에 관여하며, 이미 생성된 세포막 단백질의 적절한 physiological conformation을 안정시키며, 면역억제제인 FK-506과 rapamycin에 의하여 불활성화된다. 또한 FKBP12는 skeletal muscle type의 ryanodine receptor(RyR-1),[6-8] inositol triphosphate receptor,[9][10] transforming growth factor-β Type I receptor[11][12] 등 여러 세포막 수용체와 연관되어 있다. Skeletal muscle에서 FKBP12는 RyR-1과 같이 분리되고 sarcoplasmic reticulum(SR)의 terminal cistern에 같이 존재하며(colocalize), FK-506이나 rapamycin 투여시 calcium-induced calcium-release(CICR) channel인 RyR-1의 open probability가 증가시키고 mean open time을 길게하여 subconductance 상태가 되는 것으로 미루어 FKBP12는 RyR-1을 안정화 시키는 것으로 생각된다.[6][7]

FKBP12.6도 FKBP12 처럼 거의 모든 세포의 세포질에 분포하나 심장에서는 세포질에는 거의 존재하지 않고 SR에 국한되어 있다.[3] FKBP12.6의 면역학적 역할은 FKBP12와 유사하나 ryanodine receptor에 결합하고 기능을 나타내는 것은 다르다.[2] 즉, FKBP12가 skeletal type의 RyR-1과 특이적으로 결합하는 것 같이 FKBP12.6은 심장에서 cardiac type의 ryanodine receptor(RyR-2)와 특이적으로 결합하여 심장의 CICR channel인 RyR-2의 안정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 일부 보고는 RyR-2에 영향을 미치지 않는다고 하여 아직 논란의 여지가 있다.[2-4]

FKBP12의 coding DNA 염기서열은 마우스, 백서(rat), 토끼, 사람 등에서 밝혀져 있고 염기서열의 유사정도는 종간에 95~100%로 매우 비슷하며 보존되어 있다. FKBP12 유전자의 구조는 5개의 exon을 가지며 그 중 exon 3과 exon 4가 FK506과 rapamycin의 결합, cistrans isomerase activity, TGF-β type I receptor binding 등에 관여하는 functional domain을 갖는 것으로 알려져 있다.[13][14] 그러나 지금까지 FKBP12.6의 cDNA 염기서열은 사람과 백서에서만 알려져 있으나 마우스의 cDNA 염기서열은 보고된 바가 없으며 또한 어느 종에서도 FKBP12.6의 유전자구조는 아직 알려진 바가 없다. 사람과 백서의 FKBP12와 FKBP12.6의 아미노산의 수가 108개로 같으며 cDNA 염기서열도 74~85%의 유사성을 보여 유전자의 구조가 비슷하리라 생각되나 같은 유전자 산물인 아형(isoform) 인지 아닌지에 대해서는 아직 분명하지 않다.

본 연구를 통하여 심혈관계 기능에 미치리라 생각되는 FKBP12와 FKBP12.6의 역할을 규명하기 위해서 마우스 FKBP12와 12.6 유전자의 molecular cloning과 두 종류 FKBP의 생물학적 기능 및 여러 심질환에서의 발현양상을 분석하고자 한다. 이런 시도를 통하여 최근에 각광받고 있는 유전적으로 형질을 변환시킨 마우스(genetically engineered mouse)의 생성하고 이들 유전자의 기능과 역할을 더 잘 규명할 수 있는 배경을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 마우스 FKBP12.6(mFKBP12.6) 유전자의 molecular cloning

FKBP12.6도 FKBP12 처럼 염기서열이 대부분 보존되어 있으므로 mFKBP12.6 coding DNA sequence(cds)를 얻기 위해 사람의 FKBP12.6의 cds에 근거하여 forward primer(5′-ATGGGCGTGGAGATCG-AGAC-3′)와 reverse primer(5′-TCACTCTAA-GT TGAGCAGCTC-3′)를 제작하였다. 성인 마우스 심장을 polytron homogenizer를 이용하여 중간 속도에서 30초씩 여러번 분쇄한 후 RNA isolation kit(RNA-

zol, GibcoBRL)를 이용하여 심장의 RNA를 분리하고 spectrophotometer로 RNA 농도를 측정하였다. Random hexamer로 first-strand DNA synthesis(RT-PCR kit, GibcoBRL)를 시행하고, 상기 두 primer로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. PCR product 중 10 μl를 취하여 1% agarose gel에 running하여 band를 확인한 후 gel을 잘라내어 gene clean kit(QIEX II, GibcoBRL)를 이용하여 purify 시켰다. Gene clean된 DNA band를 TA cloning kit(Stratagene, USA)를 이용하여 pCR2.1 vector에 cloning한 후 염기서열을 알기 위해 automatic sequencing을 시행하였다.

### Genomic DNA library screening과 mapping 및 subcloning

Lambda FIX II vector에 삽입된 129 SVJ mouse genomic DNA library(Stratagene, USA)를 이용하여 mFKBP12.6 유전자를 검색하였다. 사용한 genomic DNA library는 insert size가 9~23 kb 이고 숙주세포는 XL-1 blue MRA(P2, Stratagene)이다. Genomic DNA library의 titration과 증폭 후에 15cm LB 배지에 plating하고 RT-PCR로 얻은 mFKBP12.6 coding DNA fragment를 probe로 하여 hybridization을 실시하였다. 1, 2, 3차 screening으로 양성 클론이 검출하여 phage DNA miniprep 혹은 maxiprep(Qiagen, USA)을 통하여 mFKBP12.6의 유전자 일부가 삽입된 phage DNA를 얻었다. 검출된 여러 phage DNA들을 여러 가지 제한효소의 조합으로 절단 혹은 PCR을 통해 비교하여 mapping에 이용하였으며 sequencing을 통해 exon과 intron의 구분을 하였다. mFKBP12.6 유전자 구조를 밝히는데 mFKBP12 유전자 구조를 참조하여 각 exon 부위의 forward 및 reverse oligonucleotide primer를 제작하였으며 PCR과 Southern blot analysis를 시행하여 mFKBP12.6 유전자의 orientation과 구조를 밝혔다. mFKBP12.6 유전자를 pBluescript plasmid에 subclone하고 향후 유전적으로 형질을 전환시킨 마우스를 생성하기 위한 targeting construct를 만드는데 이용하였다.

### mFKBP12.6 coding DNA sequences의 homology search

Genomic DNA library screening, mapping 및 subcloning을 통해 sequence가 확인된 mFKBP12.6 cds를 기존에 보고된 사람과 백서의 FKBP12.6 sequence와 비교하여 종간의 DNA sequence homology와 amino acid sequence homology를 알아보았다. 또한 mFKBP12를 포함한 여러 종의 FKBP12와의 유사성은 Macaw software(version 2.0.5)와 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에서 제공하는 BLAST sequence similarity program(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)을 이용하여 분석하였다.

### mFKBP12와 mFKBP12.6의 단백질의 합성과 항체의 제작

RT-PCR 후에 pCR2.1 vector에 subclone된 mFKBP12와 mFKBP12.6 DNA를 frame shift가 없게 제한효소로 잘라 pGEX4T-1 vector(Amersham, USA)에 subclone한 후 column method로 glutathione-S-transferase(GST)-mFKBP12 fusion protein과 GST-mFKBP12.6 fusion protein을 만들었다. GST-mFKBP12 fusion protein과 GST-mFKBP12.6 fusion protein의 일부분을 취하여 thrombin으로 GST 부분을 잘라내어 purified mFKBP12와 mFKBP12.6를 만들었다. 만들어진 각 단백질(GST-FKBP12.6 fusion protein, pure FKBP12.6, GST-FKBP12 fusion protein, pure FKBP12)의 특성을 규명하기 위해 15% SDS-PAGE gel에 두 종류의 purified FKBP와 사람의 FKBP12(Sigma, USA)를 동시에 running하여 electrical mobility를 비교하였으며, 또한 protein analysis를 통해 mFKBP12와 mFKBP12.6의 physical property와 단백질 특성을 비교하였다.

Polyclonal antibody의 생성에 있어 GST-fusion protein이 항원성에 영향을 미치지 않기 때문에 통상적인 방법으로 GST-mFKBP12 fusion protein을 토끼에 여러번 면역시켜 polyclonal 항체를 제작하였다. 제작된 anti-mFKBP12 antibody의 감수성과 특이성을 검정하기 위해 두 종류의 purified FKBP와 사람의 FKBP12의 Western blot analysis를 시행하였다.

### 여러 조직 및 심장의 발생과정에서 FKBP12와 FKBP12.6 mRNA의 발현양상

성인 마우스의 뇌, 심장, 폐, 비장, 신장, 근육, 간, 췌장

등을 적출하여 liquid nitrogen에 급속냉동시킨 후 각 장기를 homogenize 시켜 RNA를 분리하고 spectrophotometer로 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 각 장기의 total RNA는 10 μg씩 1% agarose gel에 running하고 Northern blot 분석을 위하여 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 심장의 발생과정에서 FKBP12와 FKBP12.6의 mRNA 발현정도의 관찰하기 위해 gestational age가 다른 fetal heart 즉 embryonic day 15(E15.0)와 17(E17.0), 태생직후(neonate) 및 성인 마우스의 심장을 적출하여 Northern blot 분석를 실시하였다. 클론된 FKBP12 및 FKBP12.6 coding DNA fragment를 $^{32}$P로 random labeling한 후 hybridization을 실시하였고 표준화를 위해 membrane을 stripping 시킨 후 GAPDH의 발현정도를 분석하였다.

### 심비후와 심부전모델에서 mFKBP12와 mFKBP12.6 mRNA의 발현정도

심비후모델은 마우스를 전신마취후 인공호흡을 시키고 현미경 하에서 횡행대동맥을 일부 협착(transverse aortic constriction, TAC)시킴으로서 압력과부하에 의한 좌심실비후를 유발하였다.[15] TAC 1주일 후에 심장을 적출하여 무게를 측정하고 tibial length로 표준화시켰다. 심부전모델은 Duke University의 Dr. Howard A. Rockman으로부터 받은 근육세포 분화(myogenic differentiation)의 조절단백질인 muscle LIM protein (MLP) 유전자를 완전결핍마우스(complete knockout mouse, MLP$^{-/-}$)를 사용하였다.[16] 정상 대조군 심장, TAC에 의한 좌심실 비후 심장, MLP$^{-/-}$에 의한 심부전 심장에서 total RNA를 각각 분리한 후 Northen blot analysis와 direct-protect RNase protection assay (RPA kit, Ambion)로 FKBP12와 FKBP12.6의 mRNA expression 정도를 비교관찰하여 심장의 비후나 수축력과 FKBP들과의 관계를 분석하였다.

### 형질전환마우스의 생성을 위한 Targeting construct의 제작과 microinjection

FKBP12와 FKBP12.6 유전자를 과발현시킨 마우스를 생성하기 위해 각각의 cDNA를 α-myosin heavy chain(αMHC) promoter와 SV40 polyadenylation signal을 가지고 있는 pIBI vector에 subcloning 하여 targeting construct를 만들었으며, FKBP12.6 유전자를 조직선택적으로 결핍(conditional knockout)시킨 마우스를 생성시키기 위해 3개의 loxP를 갖고 있는 pflox vector에 FKBP12.6 유전자를 재배열시켰다.

## 결 과

### mFKBP12.6 유전자의 molecular cloning과 물리적 특성

마우스 심장에서 추출한 RNA를 random hexamer로 first-strand DNA synthesis를 한 후 hFKBP12.6 cDNA에 근거한 두 종의 primer로 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR, 94℃에서 denaturation, 60℃에서 annealing, 72℃에서 chain extension을 35회)을 실시하였다. PCR product 중 10 μl를 취하여 1% agarose gel에 running(80 volts, 60분)하여 327 bp의 single band를 확인한 후(Fig. 1), pCR2.1에 subcloning하고 자동 염기서열 분석(automatic sequencing)으로 총 327 bp의 mFKBP12.6 cDNA 염기서열을 처음으로 밝혔다. mFKBP12.6 cDNA의 염기서열을 기존에 보고된 사람(hFKBP12.6)과 백서(rFKBP12.6)의 cDNA 염기서열과 비교하여 보면 DNA nucleotide의 수가 327 bp로 같으며 DNA sequence homology는hFKBP12.6과는 94%(309/327 bp), rFKBP12.6과는 95%(313/327 bp)의 일치율을 보였다. 마우스, 사람, 백서, 토끼 등의 FKBP12와도 70~80%의 일치율을 나타내었다(Fig. 2).

mFKBP12.6는 108개의 아미노산으로 구성되어 있

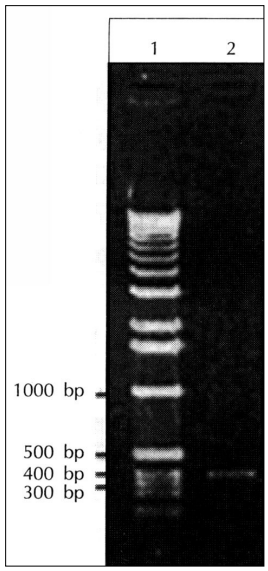


**Fig. 1.** Agarose gel (1%) running of the RT-PCR product showed a band at the molecular weight of 327 bp. Lane 1 : molecular weight marker, Lane 2 : 10 μl of RT-PCR product.

고 BCM Search Launcher를 이용한 단백질 이차구조 분석으로 13번과 33번 사이에 transmembrane - helix length가 있으며 평균 hydrophobicity가 - 0.357로 mFKBP12.6은 수용성 단백질임을 확인하였다. 아미노산 서열은 rFKBP12.6과 98%(106/108 AA 's), 사람 또는 bovine FKBP12.6과는 97%(105/108 AA 's)의 homology를 보였으며 여러 종의 FKBP12와도 유사성이 높아 hFKBP12와는 82%(89/108 AA 's), mFKBP 12와는 80%(87/108 AA 's)의 homology를 보였다.

mFKBP12와 mFKBP12.6 두 종류의 GST - fusion protein을 제작한 다음 thrombin으로 소화시켜 얻은 각각의 purified FKBP를 얻어 electrical mobility를 비교한 결과 mFKBP12는 약 14 KDa의 위치에서 검출되었고 mFKBP12.6은 mFKBP12보다 electrical mobility가 느려 약 17 KDa의 위치에서 염색되어(Fig. 3) 두 종류의 FKBP가 똑같이 108개의 아미노산을 갖지만 단백질의 이차구조가 다름을 알 수 있었으며 이런 electrical mobility의 차이는 TEMED - excess 15%

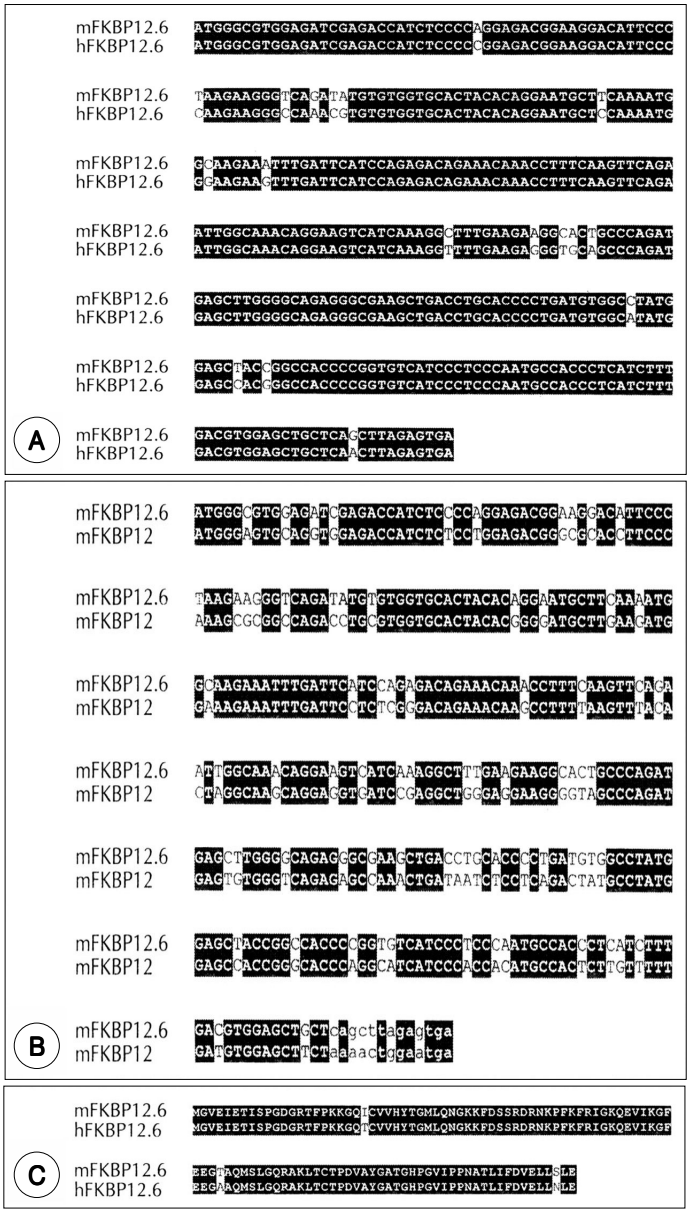


**Fig. 2.** Nucleotide and amino acid sequences of mouse FKBP12.6. DNA sequence homology was 94.5% (309/327 bp) between mFKBP12.6 and hFKBP12.6 (A) and was 74.9% (245/327 bp) between mFKBP12.6 and mFKBP12 (B). mFKBP12.6 was consisted of 108 amino acids and amino acid sequence homology was 97.2% (105/108 AA'S) between mFKBP12.6 and hFKBP12.6 (C).

SDS - PAGE gel(0.25% TEMED와 0.25% ammonium sulfate)에서 더욱 현저하였다. 그러나 계산한 FKBP 12.6의 분자량(11.6 KDa)은 FKBP12의 분자량(11.8 KDa)보다 작았다. GST - mFKBP12 fusion protein을 토끼에 여러 차례 면역시켜 제작한 polyclonal 항체인 anti - mFKBP12 antibody는 mFKBP12와 mFKBP 12.6을 모두 검출할 수 있음을 Western blot analysis에서 확인하였다.

RT - PCR로 얻은 mFKBP12.6 cds를 probe로 하여 129 SVJ mouse genomic DNA library screening을 시행하여 1차 screening에서 30개의 putative clone을, 2차 screening에서 47개의 positive clone을 얻었다. 3차 screening에서 양성 클론으로 판정된 즉 FKBP 12.6의 유전자 일부(14 Kb)가 삽입된 bacteriophage lambda DNA를 miniprep으로 얻어 restriction enzyme으로 잘라 gene mapping을 하였으며 sequencing 을 통해 exon과 intron을 구분을 하였다. 14 Kb에 달하는 mFKBP12.6 유전자의 fragment는 4개의 exon(E1 - E4)을 가지고 있었으며 이는 모든 protein coding DNA sequence를 포함하고 있었으며, mFKBP 12.6 유전자의 구조는 hFKBP12 및 mFKBP12 유전자 구조와 매우 유사하였다(Fig. 4).

### 여러 조직 및 심장의 발생과정에서 FKBP12와 FKBP12.6 mRNA의 발현양상

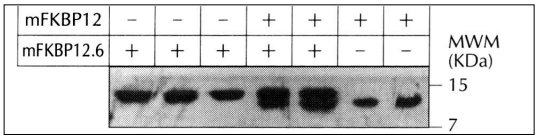


**Fig. 3.** Electrical mobility of mFKBP12 and mFKBP12.6. Despite a calculated molecular weight of mFKBP12.6 slightly less than that of mFKBP12, it migrates more slowly on TEMED-excess denaturing 15% SDS-PAGE gel than mFKBP12 (0.25% TEMED, 0.25% ammonium sulfate).

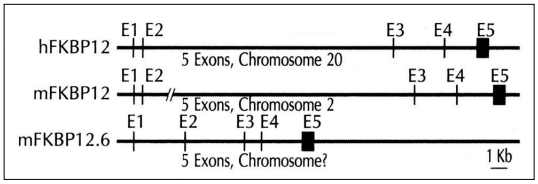


**Fig. 4.** Exon organization and structure of hFKBP12, mFKBp 12 and mFKBP12.6 gene. E : exon.

FKBP12 mRNA는 마우스의 뇌에서 가장 높게 발현되었고 검색한 모든 장기에서 발현되었으며 근육, 신장, 심장 등의 순이었다(Fig. 5). 그러나 Northern blot analysis를 통한 FKBP12.6 mRNA의 발현은 뇌를 제외하고는 매우 낮아 심장에서의 발현을 다른 장기와 비교할 수 없었다. FKBP12 mRNA의 발현은 embryonic day 15(E15.0)부터 발현되었으며 성인에서 발현이 더 컸으나 FKBP12.6 mRNA의 발현은 Northern blot analysis로는 알 수가 없었다(Fig. 6).

### 심비후와 심부전에서 FKBP12와 FKBP12.6 mRNA의 발현정도

정상대조군(n=5) 심장의 FKBP12 mRNA 발현에 비해 압력과부하에 의해 심비후가 유발된 TAC군(n=5)

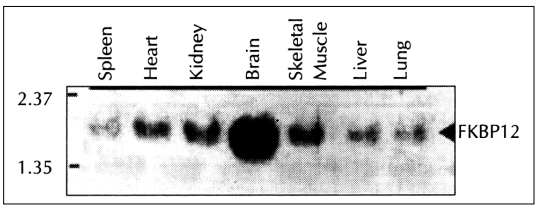


**Fig. 5.** Steady-state FKBP12 mRNA levels in various mouse tissues.

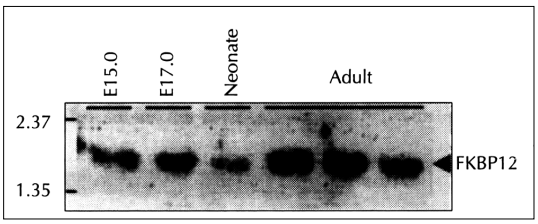


**Fig. 6.** Expression of FKBP12 mRNA during cardiac development. FKBP12 mRNA was detected from the embryonic day 15 (E15.0) and was greater in the adult hearts than fetal hearts.

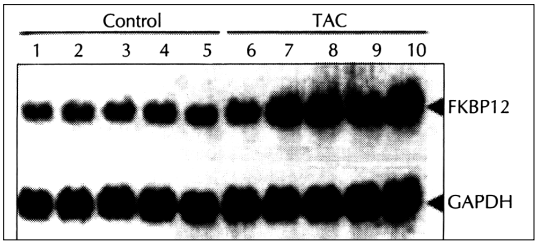


**Fig. 7.** FKBP12 mRNA expression of the hypertrophied hearts induced by transverse aortic constriction (TAC) was greater than that of control hearts.

의 심장 FKBP12 mRNA의 발현이 증가되어 있었으나 (Fig. 7) 심부전모델인 MLP$^{-/-}$ 심장에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(data not shown). Northern analysis의 internal control로 GAPDH를 이용하였으며 세 군간의 차이는 없었다.

FKBP12.6 mRNA의 발현은 심장에서 매우 낮아 Northern anlysis로 분석하기가 어려워 direct-protect RNase protection assay를 이용하였다. 대조군(n=2)에 비해 심비후를 가진 TAC군(n=4)의 FKBP12.6 mRNA 발현은 증가되어 있었으나 심부전모델인 MLP$^{-/-}$ 심장에서는 오히려 FKBP12.6 mRNA의 발현은 감소하였다. RNase protection assay의 internal control은 EF1α를 이용하였으며 세군간에 차이는 없었다(Fig. 8).

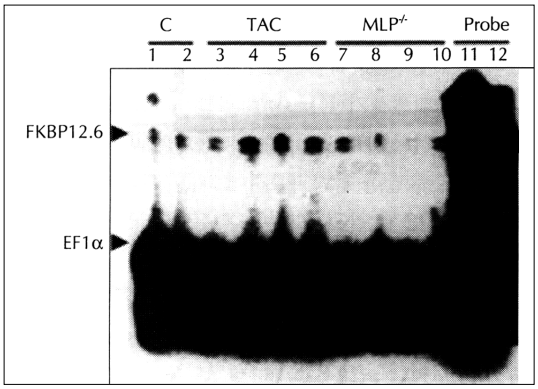


**Fig. 8.** RNase protection assay demonstrated FKBP12.6 mRNA expression of the TAC hearts was upregulated compared with that of control hearts and the expression level of FKBP12.6 in the heart failure models, MLP -/- mice, was less than controls. Lanes 11 and 12 were free probes of EF1α that is an internal control.

### 형질전환마우스의 생성을 위한 Targeting construct의 제작

FKBP12와 FKBP12.6 유전자를 심장에 과발현시킨 마우스를 생성하기 위해 각각의 cDNA를 αMHC promoter를 가지고 있는 pIBI vector에 subcloning하여 targeting construct를 만들었다(Fig. 9A).

FKBP12.6 유전자를 완전 결핍 혹은 심장선택적으로 결핍시킨 마우스를 생성시키기 위해 2번째 exon(E2)과 그 앞뒤의 intron 1과 2의 일부를 pflox vector 중 2개의 loxP 사이에 위치하도록 FKBP12.6 유전자를 재배열시킨 targeting construct를 제작하였다(Fig. 9B).

## 고 찰

최근에 사람과 소에서 FKBP12의 아형인 FKBP12.6이 분리되고 규명되었다.[2-4)17)] FKBP12와 같은 108개의 아미노산를 가지며 그 중 서열이 다른 18개의 아미노산도 주로 phenylalanine이 tryptophan으로 치환된 conservative substitution이었다. 면역학적 측면에

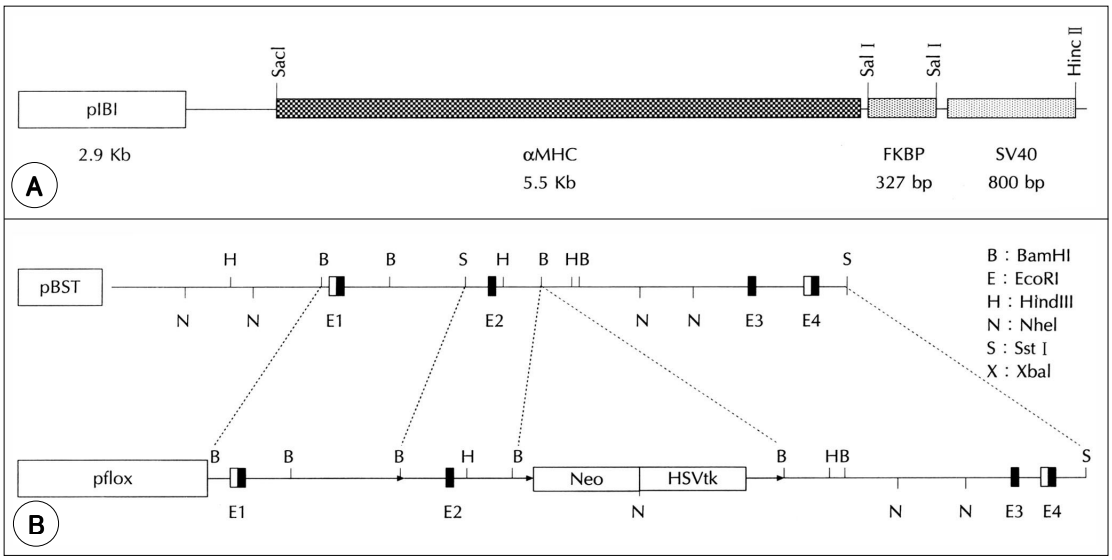


**Fig. 9.** Schematic illustration of targeting constructs for the generation of FKBP12 and FKBP12.6 overexpression mice (A) and conditional knockout mice (B). ▶loxP site

서도 FKBP12.6은 FK-506과의 결합력이나 calcineurin 억제력이 FKBP12와 비슷하였다. Lam 등의 보고[3]와 본 연구 결과에 따르면 FKBP12.6 mRNA은 거의 모든 조직에서 발현되었으며 뇌에서 가장 높았다. FKBP12 mRNA 역시 뇌에서 가장 높게 발현되므로 FK-506의 투여시 발생하는 중추신경계 독성을 설명할 수 있는 배경을 제시하였으며 계산한 FKBP12.6의 분자량(11.6 KDa)은 FKBP12의 분자량(11.8 KDa)보다 작지만 denatuing gel에서 느린 전기영동의 소견을 보였다고 하였다.[3] 본 연구에서도 mFKBP12는 약 14 KDa에 위치하였고 mFKBP12.6은 mFKBP12보다 electrical mobility가 느려 약 17 KDa의 위치에서 염색되어 같은 소견을 보였다. FKBP12.6의 DNA 염기서열은 사람(h)과 백서(r)에서만 알려져 있었다. 본 연구를 통하여 mFKBP12.6 DNA nucleotide의 수는 327 bp로 mFKBP12와 같으며 DNA sequence homology는 hFKBP12.6과는 94%(309/327 bp), rFKBP12.6과는 95%(313/327 bp)의 일치율을 보였다. 마우스, 사람, 백서, 토끼 등의 FKBP12와는 70내지 80%의 일치율을 나타내었다. hFKBP12 유전자는 24 kb 정도로 20번 염색체(20p13)에 있으며 5개의 exon이 있고 그중 처음 4개의 exon이 protein coding region을 갖는다.[18] 본 연구결과에 의하면 14 Kb에 달하는 mFKBP12.6 유전자의 fragment는 protein coding을 담당하는 4개의 exon(E1-E4)을 모두 가지고 있었으며 exon의 크기는 hFKBP12나 mFKBP12 유전자와 같았고 intron의 길이가 다소 달랐다. 즉 mFKBP12.6 유전자의 경우 5′-untranslated region과 Gly-13 sequence까지의 첫번째 exon과 Gly-13부터 Gly-29 sequence까지의 두번째 exon은 약 3 Kb의 intron에 의해 분리되어 있었으나 hFKBP12의 첫 번째 intron의 크기는 79 bp 정도이다. 그러나 두 번째와 세 번째 intron의 길이는 hFKBP12보다 짧아 각각 3.4 Kb, 1 Kb 정도였으며 세 번째 exon은 Gly-29부터 Glu-66 residue 까지를 coding하며 네 번째 exon은 Met-67 이후를 담당하였다. 마우스의 FKBP12.6의 유전자 구조를 밝힘으로서 향후 gene targeting을 하는 데 중요한 정보를 제공한다.

FK-506과 rapamycin의 투여로 근육세포의 RyR-1에 결합되어 있는 FKBP12를 해리(stripping)하면 낮은 농도의 calcium과 caffeine에 의해 활성화되며 RyR-1의 open probability가 증가하고 mean open time이 길어지는 subconductance 상태가 되며, 불활성화를 위해 높은 농도의 magnesium이 필요로 한다.[5-9)19)] 이런 현상은 FKBP12를 재투여하면 원상태로 복귀되어, FKBP12는 RyR-1의 closed conformation을 안정화시키는 것으로 생각되고 있다. 최근 FKBP12 결핍 마우스($FKBP12^{-/-}$)를 생성하여 심혈관 표현형을 분석하여 보고하였는데 대부분의 $FKBP12^{-/-}$는 E14.5와 출생사이에 심한 확장성 심근증과 심실중격결손 등의 심장의 구조적 이상(cardiac defect)으로 사망하나 근육세포는 병리조직학적으로 정상소견을 보인다고 하였다.[13] FKBP12는 심장 및 근육의 ryanodine receptor의 칼슘 유리능을 조절하여 심장의 세포내 칼슘의 변화가 일어나고 이로 인해 심근의 수축기 및 이완기 기능에 영향을 미친다고 하였으며 FKBP12는 심장의 발달 특히 심근의 밀집화(compaction)에 중요한 역할을 한다고 보고하였다.[13)20)] 본 연구에서는 FKBP12 mRNA는 마우스 심장의 초기발생기(E15.0)부터 발현되었고 출생 후 성체 마우스의 심장에서 발현이 더욱 높았다. 마우스에서 TAC으로 유발한 압력과부하에 의한 좌심실 비후 심장의 FKBP12 mRNA 발현은 정상대조군에 비해 유의하게 높았다. 본 연구에서 TAC 시행 1주 후의 심장을 대상으로 Northern blot analysis를 시행하였는데 이때에는 심초음파상 좌심기능의 이상은 없으나 이완기능의 이상은 있으며 β-agonist의 자극에 의한 심근의 수축반응은 감소되어 있는 즉 β-adrenergic receptor의 탈감작(desensitization)은 있는 것으로 알려져 있다.[21)] 심비후시 β-adrenergic receptor 탈감작의 기전으로 β-adrenergic receptor kinase 1의 증가가 제시되고 있기는 하나 FKBP12의 역할도 규명해야 하겠다.

FKBP12.6은 FKBP12 처럼 거의 모든 세포의 세포질에 분포하고 생화학적 및 면역학적 역할은 FKBP12와 유사하다. FKBP12.6은 심장의 RyR-2와 특이적으로 결합하여 안정화 시킨다. 사람의 경우 FKBP12.6의 Gln-31, Asn-32, Phe-59 등 세 곳의 아미노산 residue가 RyR-2와 특이적으로 결합하는 것을 결정한다고 알려져 있다.[22)] FKBP12와 FKBP12.6을 RyR-1과 RyR-2에서 해리시키고 교환 혹은 재결합시키는 실험을 통해 외부에서 투여한 FKBP12와 FKBP12.6이 FKBP12-stripped RyR-1과 결합하고 교환되나 RyR-2에서는 FKBP12.6 만이 교환되고 재결합됨을

밝혀 심장세포의 세포질에 FKBP12 만 존재하나 심장세포의 흥분-수축기전에는 SR에 있는 FKBP12.6이 중요한 역할을 한다고 하였다.[2] 그러나 FKBP가 RyR에 결합하고 영향을 미치는 현상에 대해 다른 결과를 보고한 연구들도 있다. 즉 FKBP12가 RyR-1의 closed conformation을 안정시킨다는 것은 일치하고 있으나 FKBP12.6이 RyR-2의 channel 안정화에 대해서는 아직 확실히 정립되지 않았으며, FKBP12.6이 RyR-1에 결합하고 교환되는 현상은 발표되었으나 RyR-1에 미치는 영향은 아직 불확실하다. 마찬가지로 FKBP12가 RyR-2를 modulation한다는 보고와 FKBP12.6이 작용하는 곳과 다른 부위에 작용하여 RyR-2에 영향을 미칠 것이라는 가정들이 있다. FKBP12.6은 심장에서는 세포질에는 존재하지 않고 SR에 국한되어 있으며 매우 낮은 농도로 존재하여 보통의 Northern blot analysis로는 발현이 매우 높은 뇌를 제외하고는 검색하기가 어려워 본 연구에서 FKBP12.6 mRNA의 발현을 알기위해 direct-protect RNase protection assay를 이용하였다. 본 연구에 따르면 심비후시에 FKBP12와 FKBP12.6 mRNA의 발현은 증가되어 있고 심부전시에는 FKBP12 mRNA는 변화가 없고 FKBP12.6 mRNA의 발현은 downregulation되어 있었다. 최근에 토끼의 심근세포에 adenovirus를 이용하여 FKBP12.6 유전자 전달을 통해 과발현시켰을때 SR에서 칼슘의 소실(leak)를 막아 결과적으로 SR의 칼슘 분비를 증가시켜 심근수축을 항진시킨다고 보고하여[23] 본 연구와 연결지어 보면 심부전의 경우 FKBP12.6이 downregulation되고 이로 인해 RyR-2의 closed conformation에 이상이 생겨 leaky channel이 되어 수축기능이 떨어지게 된 것이 설명가능해진다. 이를 뒷받침하는 연구들로 심부전시에 [$^3$H]dihydro-FK506-binding assay를 해보면 FKBP12.6의 수(Bmax)가 83%나 감소하고 RyR-2와의 상호작용(interaction)에 이상이 생겨 칼슘분비 이상이 발생한다는 연구[24]와 심부전의 SR에서 RyR-FKBP12.6 complex의 일부소실에 의해 칼슘 leak가 생기고 FKBP12.6 단백질량이 감소한다는 보고가 있다.[25]

결론적으로 FKBP12와 FKBP12.6은 심실의 밀집화, 중격의 생성 등 심장의 발생에 있어 중요한 역할을 하며 심장의 calcium-induced calcium-release channel인 RyR-2를 안정화시켜 심기능에 영향을 미친다. Junctional SR protein인 junctin, triadin, calsequestrin들이 심장의 흥분-수축기전에 관여함이 유전적으로 형질을 전환시킨 마우스를 이용하여 밝혀졌듯이 FKBP12나 FKBP12.6 유전자를 각각 과발현시킨 마우스 및 심장선택적으로 결핍시킨 마우스의 생성이 구체적인 분자생물학적 기전을 설명할 수 있으리라 생각된다. 또한 SR에 위치해 있으며 칼슘조절에 영향을 미치는 단백질이나 이온채널 혹은 수용체들의 상호작용에 관한 연구도 transgenic technology와 double 혹은 triple transgenic mice를 생성함으로서 가능해질 것이다.

## 요 약

**연구배경과 목적** :

FK-506 binding protein(FKBP)은 무핵세포부터 척추동물까지 널리 존재하고 있으며 그 유전자 염기서열의 많은 부분이 보존되어 있어 생명의 유지에 중요한 유전자로 생각되며, 지금까지 사람에게는 FKBP9, FKBP12, FKBP13, FKBP25 및 FKBP52가 알려져 있었으나 최근 FKBP12.6이 보고되었다. FKBP12는 근육세포의 ryanodine receptor type 1을 안정화시켜 세포내 칼슘분비를 조절하며, FKBP12.6은 심장의 ryanodine receptor type 2와 선택적으로 결합하는 것으로 알려져 있다. 그러나 심근에서 두 종류의 FKBP의 역할과 작용기전이 아직까지 완전히 밝혀져 있지는 않다. 본 연구는 mFKBP12와 mFKBP12.6 유전자의 클로닝과 여러 심질환에서의 발현양상을 분석하여 FKBP12와 FKBP12.6의 생리적 역할을 규명해보고 최근에 각광받고 있는 유전적으로 형질을 변환시킨 마우스의 생성하기 위한 배경을 제시하고자 한다.

**재료 및 방법** :

성인 마우스 심장의 RNA를 이용하여 RT-PCR을 실시하여 mFKBP12.6 cDNA를 얻었다. 마우스 genomic DNA library를 3회 검색하여 mFKBP12.6 유전자의 molecular cloning을 시행하고 PCR과 Southern blot analysis를 통해 mFKBP12.6 유전자의 orientation과 구조를 밝혔다. mFKBP12.6의 coding DNA sequence 및 아미노산 서열을 확인하여, 종간의 차이를 비교하였다. mFKBP12와 mFKBP12.6의 단백질의 합성과 항체의 제작하였으며 여러 조직 및 심장의 발생과정, 심비후와 심부전모델에서 FKBP12와 FKBP12.6 mRNA의 발현양상을 Northern blot analysis와 direct-pro-

tect RNase protection assay로 분석하였다. 형질전환 마우스의 생성을 위한 targeting construct를 제작하여 microinjection을 실시하였다.

**결 과** :

1) mFKBP12.6의 DNA nucleotide의 수는 사람(h)과 백서(r)의 FKBP12.6 뿐만 아니라 mFKBP12와도 같은 327 bp이었으며, 종간의 염기서열의 일치율(sequence homology)은 hFKBP12.6과 94%(309/327 bp), rFKBP12.6과는 95%(313/327 bp)이었고 mFKBP12와는 74%이었다.

2) mFKBP12.6은 mFKBP12와 같은 108개의 아마노산를 가지며 hFKBP12.6과 97%, rFKBP12.6과 98%, hFKBP12와 82%, mFKBP12와는 80%의 일치율을 보였다. 계산한 mFKBP12.6의 분자량(11.8KDa)은 FKBP12의 분자량(11.9KDa)보다 작지만 FKBP12.6은 TEMED-excess SDS-PAGE gel에서 mFKBP12보다 느린 전기영동의 소견을 보였다. GST-mFKBP12 fusion protein을 토끼에 여러 차례 면역시켜 제작한 polyclonal 항체인 anti-mFKBP12 antibody는 mFKBP12와 mFKBP12.6을 모두 검출할 수 있음을 Western blot analysis에서 확인하였다.

3) mFKBP12.6 유전자는 4개의 exon(E1-E4)이 protein coding을 담당하며 exon의 크기는 hFKBP12나 mFKBP12 유전자와 같았고 intron의 길이가 다소 달랐으나 hFKBP12 및 mFKBP12 유전자 구조와 매우 유사하였다.

4) FKBP12와 FKBP12.6 mRNA는 모든 장기에서 발현되었으며 뇌에서 가장 높았으며 FKBP12 mRNA의 발현은 E15.0부터 발현되었으며 성인에서 발현이 더 컸었다.

5) 압력과부하로 심비후를 유발하였을 때 FKBP12와 FKBP12.6 mRNA의 발현은 증가되었고 심부전의 심장에서는 FKBP12 mRNA는 변화가 없었으나 FKBP 12.6 mRNA의 발현은 감소(downregulation)되어 있었다.

6) FKBP12와 FKBP12.6 유전자를 심장에 과발현 혹은 결핍시킨 마우스를 생성시키기 위해 각각 αMHC promoter를 가지고 있는 pIBI vector와 3개의 loxP를 갖고있는 pflox vector에 클론하여 targeting construct를 제작하였다.

**결 론** :

본 연구를 통해 mFKBP12.6 유전자를 클로닝하고 물리적 특성을 분석하였다. FKBP12와 FKBP12.6은 심장의 흥분-수축기전과 ryanodine receptor를 통한 칼슘의 조절에 영향을 주어 심기능에 영향을 미칠 것으로 생각되며 향후 FKBP12나 FKBP12.6 유전자를 각각 과발현시킨 마우스 및 심장선택적으로 결핍시킨 마우스의 생성이 구체적인 분자생물학적 기전을 설명할 수 있으리라 생각된다.

**중심 단어** : FKBP12 · FKBP12.6 · 클로닝 · 유전자 · 유전자조작.

본 연구는 1999년도 대한순환기학회 산학협동연구비의 보조에 의하여 이루어졌음.

## REFERENCES

1) Marks AR. *Cellular functions of immunophilins. Physiol Rev 1996;76:631-49.*
2) Timerman AP, Onoue H, Xin HB, Barg S, Copello J, Wiederrecht G, *et al. Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. J Biol Chem 1996;271:20385-91.*
3) Lam E, Martin MM, Timerman AP, Sabers C, Fleischer S, Lukas T, *et al. A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. J Biol Chem 199;270:26511-22.*
4) Sewell TJ, Lam E, Martin MM, Leszyk J, Weidner J, Calaycay J, *et al. Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. J Biol Chem 1994;269:21094-102.*
5) Cardenas ME, Zhu D, Heitman J. *Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin. Curr Opin Nephrol Hypertens 1995;4:472-7.*
6) Jayaraman T, Brillantes A-M, Timerman AP, Fleischer S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. *FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). J Biol Chem 1992;267:9474-7.*
7) Ahern GP, Junankar PR, Dulhunty AF. *Subconductance states in single-channel activity of skeletal muscle ryanodine receptors after removal of FKBP12. Biophys J 1997;72:146-62.*
8) Brillantes A-MB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, *et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell 1994;77:513-23.*
9) Bultynck G, De Smet P, Weidema AF, Ver Heyen M, Maes K, Callewaert G, *et al. Effects of the immunosuppressant FK506 on intracellular $Ca^{2+}$ release and $Ca^{2+}$ accumulation mechanisms. J Physiol 2000;525:681-93.*
10) Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH. *Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates $Ca^{2+}$ flux. Cell 1995;83:463-72.*
11) Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, *et al. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I*

*rece-ptors. Cell 1996;86:435-44.*

12) Aghdasi B, Ye K, Resnick A, Huang A, Ha HC, Guo X, *et al. FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:2425-30.*
13) Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng MJ, *et al. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. Nature 1998; 391:489-92.*
14) Van Duyne GD, Standaert RF, Karplus PA, Schreiber SL, Clardy J. *Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. J Mol Biol 1993;229:105-24.*
15) Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhelper ME, Field LJ, *et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:8277-81.*
16) Arber S, Hunter JJ, Ross J, Hongo M, Sansig G, Borg J, *et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. Cell 1997;88:393-403.*
17) Barg S, Copello JA, Fleischer S. *Different interactions of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors with FK-506 binding protein isoforms. Am J Physiol 1997;272: C1726-33.*
18) DiLella AG, Craig RJ. *Exon organization of the human FKBP-12 gene: correlation with structural and functional protein domains. Biochemistry 1991;30:8512-7.*
19) Bandyopadhyay A, Shin DW, Ahn JO, Kim DH. *Calcineurin regulates ryanodine receptor/Ca (2+)-release channels in rat heart. Biochem J 2000;352:61-70.*
20) Koide M, Obata K, Iio A, Iida M, Harayama H, Yokota M, *et al. Function of FK506 binding protein (FKBP) in chick embryonic cardiac development. Heart Vessels 1997; Suppl 12:7-9.*
21) Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA. *Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. J Biol Chem 1997;272:17223-9.*
22) Xin HB, Rogers K, Qi Y, Kanematsu T, Fleischer S. *Three amino acid residues determine selective binding of FK506-binding protein 12.6 to the cardiac ryanodine receptor. J Biol Chem 1999;274:15315-9.*
23) Prestle J, Janssen PM, Janssen AP, Zeitz O, Lehnart SE, Bruce L, *et al. Overexpression of FK506-binding protein FKBP12.6 in cardiomyocytes reduces ryanodine receptor-mediated $Ca^{2+}$ leak from the sarcoplasmic reticulum and increases contractility. Circ Res 2001;88:188-94.*
24) Ono K, Yano M, Ohkusa T, Kohno M, Hisaoka T, Tanigawa T, *et al. Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal $Ca^{2+}$ release in heart failure. Cardiovasc Res 2000;48:323-31.*
25) Yano M, Ono K, Ohkusa T, Suetsugu M, Kohno M, Hisaoka T, *et al. Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal $Ca^{2+}$ leak through ryanodine receptor in heart failure. Circulation 2000;102:2131-6.*