

Cre 발현유도 시스템을 이용한 유전자 기능 연구

경북대학교 의학전문대학원 분자의학교실

김정은

Functional Study of Gene using Inducible Cre System

Jung-Eun Kim

Department of Molecular Medicine, Kyungpook National University School of Medicine

ABSTRACT

Gene manipulation by disrupting important genes using homologous recombination in mammals has provided important insights into their function and development with regard to disease. However, many questions related to the genetic pathways that regulate cellular differentiation and function remain to be clarified. In particular, analysis of genetic pathways that control embryonic skeletal development is often hindered by the disruption of critical genes that function in early embryogenesis, thereby leading to embryonic or perinatal death and thus preventing study of the role of these genes in skeletal development and physiology postnatally. To overcome this problem gene-targeting methods, using site- and time-specific recombination based methods with the Cre/loxP system, have been used to delete particular genes in specific tissues and stages during development. Thus, the generation and characterization of transgenic mice expressing Cre recombinase, under the control of a tissue-specific and stage-specific promoter, has become prerequisite for study of the physiology and homeostasis of specific tissues during a specific time frame. In this report, we introduce the principles and methods of site-specific and time-specific recombination using the Cre/loxP and inducible Cre system, and discuss the potential applications for applying this system to the study of the development and physiology of the skeletal system. (J Kor Endocrinol Soc 21:364~369, 2006)

서 론

유전학적으로 조작된 동물을 이용해서 특별한 유전자 기능을 연구할 때, Cre나 Flp 같은 site-specific recombinase에 의한 조직 특이적 방법이 현재 많이 이용되고 있다[1,2]. 특히 척추동물에서 몸의 구조를 지지하는 골격 형성에 관여하는 유전자들을 조작하게 되면 태생기 혹은 출생 직후 사망을 일으키기도 하므로 출생 이후 성장기때 이런 유전자들의 역할을 연구하기에 상당한 어려움이 따르게 되므로 조직 특이적 방법에 의한 유전자 연구가 절실히 필요하다. 그러므로 이러한 조직 특이적 발현을 유도하는 형질전환 마우스는 특정 조직에서 특정 유전자의 기능을 분석하기 위한 유용한 수단으로 이용될 수 있다. 즉, 조직 특이적으로 발현되는 프로모터를 이용하여 하부에 Cre 재조합 효소와 인공합성 항에스트로겐인 tamoxifen이 선택적으로 결합할 수 있는 돌연

변이 에스트로겐 수용체 부분을 키메라 단백질 형태로 발현되게 하면 Cre 효소의 활성을 원하는 조직에서 원하는 시간에 유도할 수 있다. 본 연구에서는 원하는 공간뿐 아니라 원하는 시기에 특정 목표 유전자의 기능을 밝힐 수 있는 시간적 제어에 주안점을 두고 현재 진행되고 있는 방법들과 그 원리들을 설명하고, 뼈조작을 대상으로 한 Cre 발현 유도 마우스를 소개하고자 한다.

1. Cre 재조합 효소와 Cre 유도 시스템

초기 발생과정에 아주 중요한 유전자들은 일반적인 유전자 파괴(knockout)를 시행할 경우 발생과정 중에 사망하기 때문에 그 기능을 연구하기가 상당히 어렵다. 이러한 어려움을 해결하기 위해 단지 선택적인 조직부위에서 유전자를 비활성화시키는 방법이 고안되어왔고 그것이 바로 조건부 유전자 파괴(conditional knockout)이다[1,2]. 조건부 유전자

파괴 동물은 발생과정 중의 사망 위험성을 피할 수 있을 뿐 아니라 관심있는 조직이나 세포에서 선택적으로 유전자 파괴 효과를 볼 수 있는 장점이 있다. 조건부 유전자 파괴는 Cre/loxP 시스템을 기초로 하는데 bacteriophage P1 Cre 재조합 효소가 loxP 부위를 인식함으로써 loxP 서열로 둘러싸인(f flank) 목표 유전자(target gene) 조각이 제거되고 유전자 파괴 현상이 나타난다[3] (Fig. 1A). 이때 Cre 재조합 효소는 Cre 이식유전자의 앞쪽에 위치한 조직 및 세포 특이적 프로모터에 의해 활성화의 장소가 결정되고 그 결과 목표 유전자가 정해진 조직이나 세포에서 비활성화된다(Fig. 1B).

조건부 유전자 파괴를 이용한 목표 유전자 비활성화의 경우, Cre 시스템처럼 프로모터에 의해 특정조직과 특정세포 등에서 유전자 파괴가 일어날 수 있도록 주요 장소를 결정 짓는 것뿐만 아니라 목표 유전자의 비활성이 발생하는 시간을 연구자 스스로가 정할 수가 있다. 이것이 바로 Cre 발현 유도(inducible) 시스템에 의한 목표 유전자 파괴 방법이다

[4~6] (Fig. 2). Cre 발현 유도 이식유전자는 Cre 재조합 효소와 돌연변이가 있는 리간드 결합 도메인을 가진 에스트로젠 수용기(estrogen receptor, ER)가 결합된 CreER 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자이고, 이러한 CreER 유전자가 앞에 붙은 조직 특이적으로 발현 가능하게 하는 프로모터에 의해 조절을 받는 형태이다. 이때 에스트로젠 수용기의 리간드 결합 도메인에 에스트로젠 길항제가 붙음으로써 Cre 재조합 효소가 활성을 띠게 되고 활성을 가진 Cre 재조합 효소에 의해 목표 유전자의 유전자 파괴가 발생하게 된다. 에스트로젠 수용기의 리간드 결합 도메인은 G521R 단독 치환 돌연변이를 가진 에스트로젠 수용기와 G400V/M543A/L544A 세가지 돌연변이를 가진 에스트로젠 수용기 T2 (ERT2)의 두 가지가 있는데 후자의 경우 에스트로젠 길항제인 tamoxifen (TM) 이나 4-hydroxytamoxifen (4-OHT)에 더욱 민감하게 반응하므로[4,5], 적은량의 길항제 투여에도 쉽게 Cre 재조합 효소의 활성을 볼 수 있다. 이러한 길항제의 투여시간을

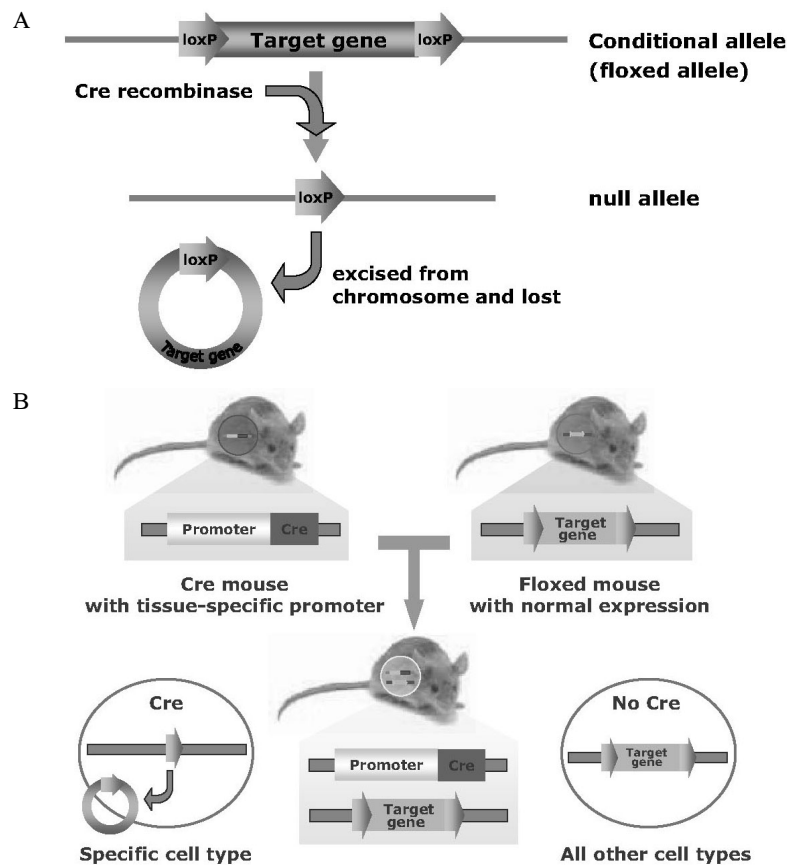


Fig. 1. A, Conditional gene inactivation by Cre/loxP system. Conditional mice harbor the floxed allele (conditional allele), in which target gene has flanked by two loxP sites. This target gene can be excised and inactivated by Cre recombinase recognizing two loxP sites. B, Transgenic mice expressing Cre recombinase in specific cell types under the control of cell-specific promoter have provided essential tools for studying the function of particular genes in specific tissues. Specific target gene is inactivated by Cre recombinase in specific tissues of the floxed mouse which has normal expression of target gene.

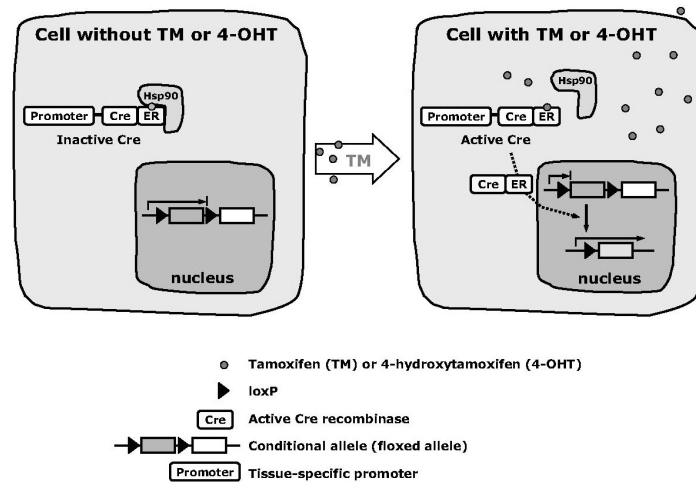


Fig. 2. Inducible Cre system. In the absence of appropriate ligand, the Cre recombinase fused estrogen receptor with mutated ligand binding domain is bound to the heat shock protein (Hsp90) and inhibited from the entering the nucleus. Upon administration and binding of estrogen antagonist, tamoxifen (TM) or 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) to the mutant estrogen receptor, Hsp90 dissociates from the CreER complex and allows translocation of activated CreER into the nucleus. In nucleus, CreER recognizes the loxP sites in conditional allele of target genes and mediates recombination.

연구자가 직접 조절해줌으로써 목표 유전자가 비활성화되는 시기를 충분히 조절해서 그 효과를 관찰할 수 있다.

2. Col1a1-CreERT2; Collagen 프로모터를 이용한 Cre 재조합 효소 발현 유도 형질전환 마우스

포유동물 조직의 주요 구성성분인 type I 콜라겐(Col1a1)은 조골세포(osteoblast)와 치아모세포(odontoblast)에서 주로 합성되고 여러 종류의 섬유아세포와 중간엽세포에서도 합성된다. 마우스 Col1a1 유전자에서 조골세포 특이적 enhancer 부위가 이미 밝혀졌고[7,8], 2.3kb Col1a1 프로모터를 이용한 형질전환 마우스의 경우 조골세포와 치아모세포에서 특이적으로 이식유전자의 높은 활성도를 보였다[9,10]. 조골세포와 치아모세포 특이적인 이식유전자를 이용해서 제작된 Col1a1-CreERT2 형질전환 마우스는 이름에서 보여지듯이 콜라겐 프로모터(Col1a1) 조절하에서 Cre 재조합 효소가 활성을 띄게 되는데 특히 에스트로겐 수용기(ERT2)에 에스트로겐 길항제가 붙음으로써 비로소 Cre 재조합 효소가 그 활성을 나타낼 수가 있게 된다[11]. Col1a1-CreERT2 형질전환 마우스의 조직 특이적 Cre 재조합 효소 활성은 ROSA26 리포터(R26R) 마우스를 이용해서 확인한다. 즉, 마우스의 복강 내 투여된 에스트로겐 길항제 TM (4-OHT)에 의해 활성화된 Cre 재조합 효소가 ROSA locus에 위치한 loxP로 둘러싸인 전사 정지(transcriptional stop) 카세트를 제거하고 LacZ 유전자를 발현시킨다[12] (Fig. 3A). 이때 β -galactosidase (β -gal) 활성도나 X-gal 염색부위

를 조사함으로써, Col1a1-CreERT2형질전환 마우스가 TM (4-OHT)에 의해 조골세포 및 치아모세포 특이적으로 유전자를 제거시킴을 알 수 있다.

뼈와 치아에서 특이적으로 재조합을 유도하는 Cre 재조합 효소 활성패턴을 분석하기 위해, 수컷 Col1a1-CreERT2 마우스와 암컷 R26R 마우스의 교배로 얻은 Col1a1-CreERT2;R26R 이중 형질전환 태생기 마우스와 마우스에 4-OHT를 투여한 후, 마우스의 각 조직에서 X-gal 염색을 관찰한 결과 조골세포와 치아모세포에서 강한 염색이 확인된다[11] (Fig. 3B). 강한 염색 결과를 바탕으로 뼈와 치아에서 리간드 유도 Cre 재조합 효소가 존재함을 알 수 있다. 이 결과는 리간드 의존적 방법으로 발생하는 Cre 재조합이 2.3kb 콜라겐 프로모터 조절하에서 모든 조골세포와 치아모세포에서 발생함을 의미한다. 그러므로 Cre 발현유도 마우스의 사용은 골격을 이루는 중요한 유전자와 출생 이후 뼈나 치아의 생리학적 측면 및 질환과의 연관성을 연구하는데 새로운 실험적 접근법을 제공한다.

3. Col1a1-CreERT2를 이용한 시기에 따른 골 관련 유전자 기능분석

뼈형성에 관련된 주요 전사인자인 Runx2나 Osterix는 유전자 파괴 연구를 통해 이들 유전자가 뼈형성과 골석회화 부진등의 표현형을 보이고 출생직후에 사망하게 된다[13~16]. 그러므로 Cre 발현유도되는 Col1a1-CreERT2 마우스는 출생 이후 뼈 형성이나 유지에 있어서 Runx2와 Osterix 같은 골형성인자의 필요성을 연구하기에 아주 유용하다. Fig. 4에

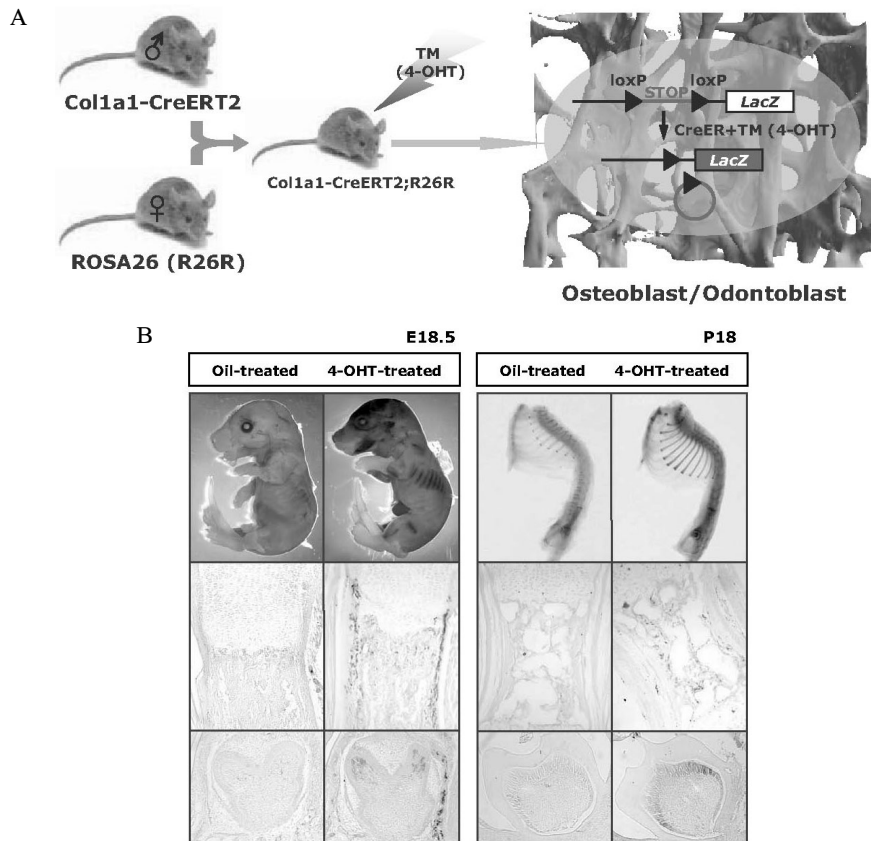


Fig. 3. A, Col1a1-CreERT2; Inducible Cre mouse using 2.3-kb collagen promoter. To determine the ability of Cre recombinase to induce recombination specifically in bone of inducible Cre mouse which has osteoblasts- and odontoblasts-specific collagen promoter, inducible Cre mouse was crossed with the ROSA26 mouse with lacZ reporter. Briefly, the LacZ gene, which is inserted in the ubiquitously expressed ROSA locus, is preceded by a transcriptional stop cassette flanked by loxP sites. Thus, in Col1a1-CreERT2;R26R double transgenic mice, LacZ gene should be expressed in bones when Cre recombinase is activated by 4-OHT administration. Cre recombination activated in a ligand-dependent manner occurred in osteoblasts and odontoblasts under the control of collagen promoter. B, Histological analysis of Col1a1-CreERT2;R26R double transgenic mice. Pups containing the Col1a1-CreERT2;R26R double transgene were injected intraperitoneally with TM or 4-OHT and stained with X-gal. They showed the LacZ expression in all bones and the strong X-gal staining in osteoblasts and odontoblast by histology. No X-gal staining was detected in oil-injected control pups.

서처럼 골형성관련 유전자의 hetero 마우스(+/-)와 flox 마우스(flox/+)를 이용해서 CreER 이식유전자를 가지면서 flox 마우스(flox/-;CreER)를 얻어서 유전자의 기능을 분석하고자 하는 시기에 맞춰 TM (4-OHT)를 투여한다. 그러면 Cre 재조합 효소가 발현하는 세포인 조골세포와 치아모세포에서 목표 유전자를 비활성화시킬 수 있고 골생리기능 및 뼈형성에 관련된 특별한 유전자의 출생 이후 기능을 연구할 수 있다.

고 찰

연골과 뼈로 구성된 척추동물의 골격은 몸의 구조를 지지 할 뿐 아니라 살아가는 동안 칼슘 항상성 유지에 도움을 준

다. 최근까지 발생단계 동안 뼈를 형성하는 전사인자나 세포 기질 구성성분의 역할을 이해하기 위해 많은 방법들이 개발 되어 왔다. 이러한 방법적 연구는 인간의 골 질환을 유발하는 유전자 연구에 큰 부분을 차지하고 있고, 뼈형성에 중요한 역할을 하는 유전자들의 적중 돌연변이를 가진 마우스를 제작함으로써 진행되어 왔다. 그러나 초기 태생기를 결정짓는 주요 유전자들의 기능을 없애면 출생 전 또는 직후에 사망하게 되므로 출생 이후나 성장한 동물의 생리학적 항상성 유지에 있어서 이러한 요소들의 역할을 이해하는 것은 아직도 어려운 숙제이다. 그래서 Cre/loxP 시스템을 이용한 유전자 적중 기술이 개발되었고 이는 발생단계에서 특별한 조직이나 특별한 시기에 유전자를 제거할 수 있는 장점이 있다

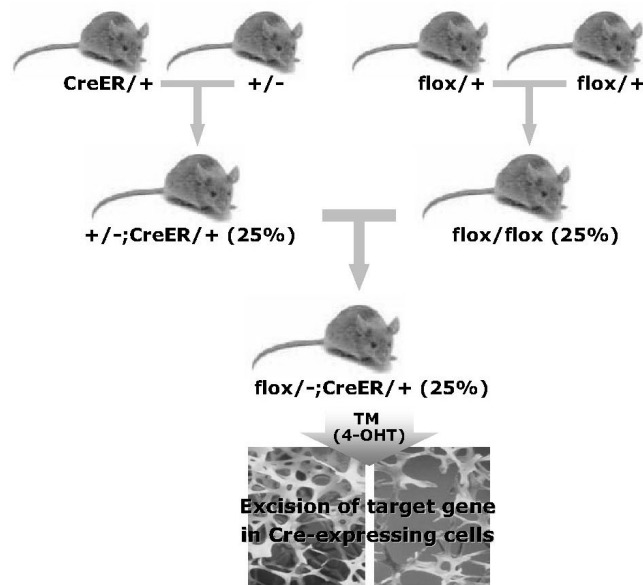


Fig. 4. Breeding strategy for the conditional gene inactivation using inducible Cre mice. Inducible Cre mice are very useful to study the function of genes in specific tissues or at specific stage of development and after birth. The $flox/-;CreER$ mice harboring the tissue-specific CreER transgene and heterozygous for the floxed and null alleles can be generated. Using $flox/-;CreER$ mice, target genes are inactivated in tissues or cells which Cre recombinase expresses after administration of TM or 4-OHT.

[1,2]. 뼈형성에 관련된 유전자 연구를 위해서도 특정 골세포 조직과 골세포 발달시기에 골 특이적 프로모터 조절하에서 Cre 재조합 효소를 발현하는 형질전환 생쥐의 제작과 분석이 절대적으로 필요하다.

마우스 콜라겐은 조골세포와 치아모세포 선택적으로 발현하는 유전자로써 콜라겐 프로모터는 발생단계에서 조골세포 분화가 시작되는 시기에 활성화되기 때문에 이를 이용한 Cre 형질전환 마우스는 조골세포 특이적으로 Cre 재조합 효소를 발현할 수 있다[9]. 같은 방법으로 출생 이후 조골세포 특이적으로 유전자 발현을 조절하기 위해서 발현유도 Cre 재조합 효소를 이용한 형질전환 마우스는 TM (4-OHT) 투여 후 조골세포에서 Cre 재조합 효소를 활성화시킬 수 있으므로 시기에 따른 유전자의 기능을 연구하는데 도움을 준다. $Col1a1-CreERT2$ 발현유도 형질전환 마우스는 출생 후 조골세포나 치아모세포 특이적 유전자를 제거하고 그 기능을 연구하는데 많은 기회를 제공할 수 있다. 예를 들어 조골세포 분화에 필수한 전사인자인 $Runx2$ [14~16]나 $Osterix$ [13]가 제거된 마우스는 출생 전 또는 직후에 사망하므로 이들 유전자에 대한 conditional alleles (floxed alleles)이 유용하다면 출생 이후의 각 유전자의 역할에 대해 더 많은 정보를 제공할 수 있다. 뿐만 아니라, 뼈형성에 영향을 준다고 알려진 여러 신호전달체계관련 유전자와 골세포기질을 구성하는 유전자의 연구도 가능하게 할 것이고 더 나아가 나이가

들어감에 따라 나타나는 만성 골 질환인 골다공증에 대한 연구와 이해에도 사용될 중요한 도구가 된다고 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 경북대학교 학술진흥연구비에 의하여 연구되었음. 또한 이 논문은 2006년도 두뇌한국 21사업에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

1. Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F: Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98:600-603, 1996
2. Le Y, Sauer B: Conditional gene knockout using Cre recombinase. *Methods Mol Biol* 136:477-485, 2000
3. Sternberg N, Hamilton D: Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between $loxP$ sites. *J Mol Biol* 150:467-486, 1981
4. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D: Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of

- the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324-4327, 1999
5. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P: Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237:752-757, 1997
6. Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, Grausenburger R, Berger P, Metzger D, Macklin WB, Chambon P, Suter U: Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* 22:430-440, 2003
7. Ducy P, Karsenty G: Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 15:1858-1869, 1995
8. Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B: Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro- α -1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol* 129:1421-1432, 1995
9. Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G: Mouse α -1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* 224:245-251, 2002
10. Braut A, Kalajzic I, Kalajzic Z, Rowe DW, Kollar EJ, Mina M: *Col1a1*-GFP transgene expression in developing incisors. *Connect Tissue Res* 43:216-219, 2002
11. Kim JE, Kazuhisa N, de Crombrughe B: Transgenic mice expressing a ligand-inducible cre recombinase in osteoblasts and odontoblasts: a new tool to examine physiology and disease of postnatal bone and tooth. *Am J Pathol* 165:1875-1882, 2004
12. Soriano P: Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21:70-71, 1999
13. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29, 2002
14. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Go YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T: Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764, 1997
15. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ: *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771, 1997
16. Choi JY, Pratap J, Javed A, Zaidi SK, Xing L, Balint E, Dalamangas S, Boyce B, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein JL, Jones SN, Stein GS: Subnuclear targeting of Runx/Cbfa/AML factors is essential for tissue-specific differentiation during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8650-8655, 2001