

Original Articles

ENU 돌연변이법에 의한 핏모증과 무치증을 보이는 유전성 마우스의 발견 및 기초 연구

김양언 · 조재우 · 조규혁 · 정한성¹ · 한상섭 · 송창우

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 독성유전체연구팀
¹연세대학교 치과대학, 구강생물학교실

Discovery of ENU-induced Hereditary Mouse Showing Hairless and Anodontia

Yang-Eon Kim, Jae-Woo Cho, Kyu-Hyuk Cho,
Han-Sung Jung¹, Sang-Seop Han and Chang-Woo Song

Laboratory of Toxicogenomics, Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Toxicology

¹Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University

(Received 13 September 2002, Accepted 25 November 2002)

Functional modeling of human genes and their biological mechanisms needs disease animal models. The mice provides cumulative advantages in defining basic genetic traits and complicated pathological disorders. By the use of strategies including genotype- and phenotype-driven approaches, novel genes and their pathways have been and will be identified through mouse genetics. ENU-mutagenesis, phenotype-driven approach, has been carried out systematically since 1999 in Korea Institute of Toxicology. 150 and 200 mg/kg ENU were injected intraperitoneally to 23 BALB/c male mice (G₀) respectively 10 weeks of age. Ten weeks later, ENU-treated male were mated to BALB/c female mice. Two male (ADM16 and AM09) and one female (ADF03) were selected among G₁ progeny produced by. To detect recessive mutants, two step mating experiments were performed. As the results, the mutant mice showing dwarfism, few vibrissae, kinky tail, hairless and anodontia were identified. The body weight of mutants was 63% lower than that of phenotypic normal at 3 weeks old. The total mutant incidence rates were 26, 20 and 20% in ADM16, ADF03 and AM09 line respectively. It was confirmed that this mutant had a recessive genetic trait. They were considered to be an important model animals associated with hair and teeth developmental biology.

Key words : ENU, mutagenesis, hairless, anodontia, BALB/c

서 론

인간 유전체 프로젝트의 성공적인 수행으로 유전자 지도가 작성되어 모든 염기 서열이 결정되었지만, 인간의 난치성 질병인 당뇨병, 비만, 골다공증, 심혈관 질환 등과 관련

한 유전자의 기능은 아직도 완전히 밝혀져 있지 않다^(1,2). Post-genome 시대에는 다양한 모델 동물을 이용하여 유전자의 생물학적 메커니즘을 이해하고 기능을 규명하고자 하는 기능 유전체학으로 연구 경향이 바뀌고 있다⁽³⁾. 따라서 유전자 기능을 효율적으로 규명하기 위하여 다수의 마우스에 돌연변이원을 이용하여 다양한 돌연변이를 일으키고, 그 원인 유전자를 찾음으로써 인간의 질병과 관련한 유전자 수준에서 기능을 해석할 수 있을 것이다⁽⁴⁾. 현재까지 특정 유전자와 표현형의 관계가 밝혀진 것은 마우스 전체 유전자의 소수에 불과하므로 유전자 정보를 더 확보하고 기능

Address reprints requests to **Chang-Woo Song**, Korea Institute of Toxicology, 100 Jang-dong, Yusong-gu, Daejeon 305-600, Republic of Korea

E-mail: cwsong@kitox.re.kr

Homepage: www.kitox.re.kr

을 밝히기 위해서는 체계적인 돌연변이 유발법을 이용한 돌연변이 마우스의 개발이 필요하다⁽⁵⁾.

돌연변이 마우스의 개발법으로, 유전자 덫(gene trap) 또는 유전자의 삽입에 의한 유도(transgenic insertional mutants) 방법 등을 이용한 유전자형 유래의 접근법(genotype-driven approach)과 방사선이나 화학물질을 이용한 표현형 유래의 접근법(phenotype-driven approach)이 있다. 표현형 유래의 접근법은 대규모적이며 무작위적인 돌연변이 유발법으로, 새로운 표현형을 가진 돌연변이 마우스를 개발하고 유전자를 탐색하여 그 기능을 밝히고자 하는데 중점을 두고 있다⁽⁶⁾.

본 실험실에서는 유전체 기능 분석을 위하여 전 유전자를 대상으로 한 표현형 유래 접근방식의 ENU-mutagenesis를 실시하고 있다. 선행 연구를 통하여 BALB/c 마우스에 있어서 가장 효율적으로 돌연변이를 유발시키는 적정 용량이 150 mg/kg 및 200 mg/kg ENU임을 확인하였으며, 투여된 마우스로부터 생산되는 표현형 이상체를 검색할 수 있는 스크리닝법을 확립하여 그 결과, 형태학적·행동학적으로 이상이 있는 돌연변이체를 확보하였다^(7,8).

본 연구에서는 확보한 돌연변이체 중에서 핏모증과 무치증을 보이는 마우스의 개발 과정, 일반적인 특징, 돌연변이 발생율, 체중변화, 번식성적 및 가계도에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시동물 및 사육 환경

돌연변이 유발에 사용된 실험동물은 8주령의 BALB/c 수컷 및 암컷을 공시하였다. ENU 투여 수컷은 ENU 최종 투여 후 7주에 ICR 마우스와 교배를 시켜 ENU 투여로 인한 일시적인 불임여부를 확인하였다. 사육 조건은 SPF로, 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 소음 60 phone 이하, 취기 20 ppm 이하, 조도 150~300 Lux, 명암주기는 12시간으로 하였다. 공시동물의 사육관리는 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"의 기준에 따라 유지하였으며, 사료와 음수는 자유 급이(ad libitum)하였다⁽⁹⁾.

ENU 조제 및 투여

ENU(N-ethyl-N-nitrosourea, SIGMA, Lot No. N3385)는 투여 당일 인산 완충액(pH 6.0)에 용해하여 한 시간 이내에 총 43마리의 마우스에 복강 투여 하였다^(7,10). 총 투여 용량 150 mg/kg ENU는 50 mg/kg과 100 mg/kg을 각각 1주일 간격으로, 200 mg/kg ENU는 100 mg/kg을 각각 1주일 간격으로 투여하였다.

교배 방법

ENU를 투여한 46마리의 BALB/c 수컷(G_0)은 정상 BALB/c 암컷 각 6마리씩, 총 270마리의 암컷과 교배하였

다. 이로부터 생산된 제 1세대(G_1) 중에서 수컷 55마리를 선발 및 이를 221마리의 정상 암컷과 교배하여 1780마리의 제 2세대(G_2)를 생산하였다. 이 가운데 472마리의 G_2 암컷과 39마리의 G_1 수컷을 교배시켜 3788마리의 제 3세대(G_3)를 생산하였다.

라인 형성 및 가계도 작성

150 mg/kg ENU를 투여한 23마리의 G_0 에서 생산된 G_1 수컷과 정상 암컷을 교배하여 G_2 를 생산하였으며, G_2 암컷과 G_1 수컷을 역교배시켜 G_3 에서 돌연변이체가 발견된 가계를 ADM16 라인이라 하였다. 200 mg/kg ENU를 투여한 23마리의 G_0 에서 생산된 G_1 암컷과 정상 수컷을 교배하여 생산된 G_2 를 형배교배하고 G_3 를 생산하여 돌연변이체가 발견된 가계를 ADF03 라인, 수컷과 정상 암컷을 교배하여 G_2 를 생산하고, 다시 G_2 암컷과 G_1 수컷을 역교배시켜 G_3 에서 돌연변이체가 확인된 가계를 AM09 라인이라 하였다. ADM16, ADF03 및 AM09 라인은 각각 형배교배로 가계를 유지하였으며, G_0 를 기준으로 하여 가계도를 작성하였다.

표현형 이상체 스크리닝 및 체중 측정

표현형 이상체 스크리닝은 ECPS(Esaki & Cho's Phenotype Screening) 프로토콜을 사용하였다⁽⁸⁾. 특히 형태, 행동, 반사에 관한 77개 항목과 주로 털, 피부, 머리, 얼굴, 체간, 몸통, 꼬리 등을 형태학적으로 스크리닝 하였다. 출생 1, 4, 7, 14 그리고 21일령에 관찰하였으며, 출생 21일령에는 성별을 확인하였고, 이유를 실시하였다.

체중 측정은 정상과 돌연변이 마우스를 각각 7, 14, 21일령에 체중 측정기(Satorious MCI, German)를 이용하여 측정하였다.

번식성적

번식 성적은 각 라인별로 총 분만 모체수, 총 분만 회수, 총 산자수, 평균 산자수(총 산자수/총 분만 회수), 총 이유수, 이유율(총 이유수/총 산자수×100)을 조사하였다.

결 과

돌연변이의 발견 및 전반적인 외형 관찰

ADM16, ADF03 및 AM09 라인의 모체에서 핏모증 및 무치증을 나타내는 돌연변이체가 생산되었으며, 외형적인 형태는 Fig. 1 및 2와 같다. 돌연변이 마우스는 출생시 굵은 꼬리, 뾰족한 역삼각형 얼굴, 왜소증을 육안으로 확인하였으며, 외형적 특징으로는 무모 및 무치아를 나타냈다.

교배 실험

ADM16, ADF03 및 AM09 라인에서 돌연변이 발생율은 Table 1과 같다. ADM16 라인은 총 403 마리 가운데 106마리의 돌연변이가 관찰되어 26%, ADF03 라인에서는 총

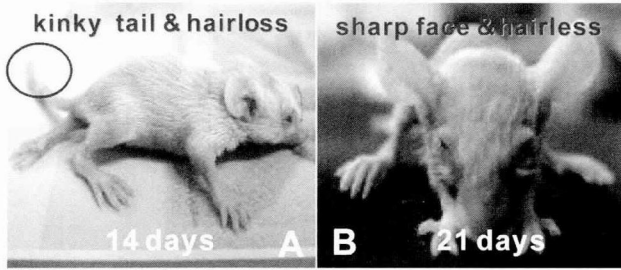


Fig. 1. The typical appearance of hairless and anodontia mouse in ADM16 line. Mutant mouse showed kinky tail and hairless (A). It also exhibited sharp face, few vibrissae and hairless (B).

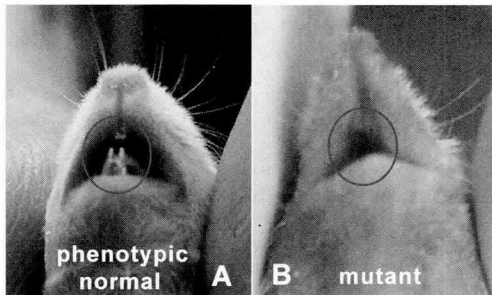


Fig. 2. The typical anodontia of mutant at 14 days of age in ADM16 line. Phenotypic normal mouse had incisive teeth (A). But there were no teeth in mutant (B).

183마리 가운데 36마리의 돌연변이가 관찰되어 20%, AM09 라인에서는 총 273마리를 관찰 한 결과 55마리의 돌연변이가 관찰되었으며, 20%의 발생율을 나타냈다.

체중 측정

정상과 돌연변이 마우스 ADM16 라인의 체중 변화는 Fig. 3과 같다. 정상 마우스의 체중은 7, 14, 21일령에서 각각 4.9 ± 0.7 g, 8.6 ± 1.0 g, 11.3 ± 1.3 g이었으며, 돌연변이 마우스는 동일한 주령에서 각각 2.6 ± 0.6 g, 4.0 ± 1.0 g, 4.2 ± 0.5 g으로 통계학적으로 매우 유의하였다($p < 0.0001$) (Fig. 3).

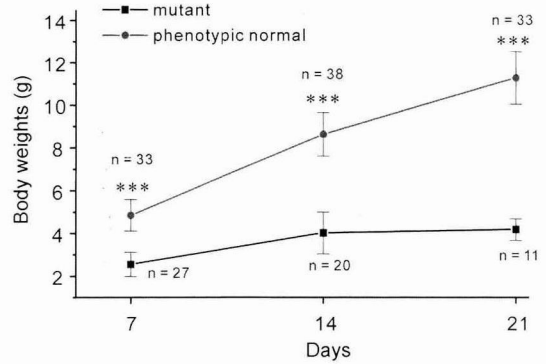


Fig. 3. Changes in body weights of mutants and phenotypic normal mice in the ADM16 line. Body weights of mutant mice were significantly lower than those of phenotypic normal littermates at the same age ($p < 0.0001$). (Values are mean \pm SE)

번식 성적

ADM16, ADF03 및 AM09 라인의 번식 성적은 Table 2와 같다. ADM16 라인에서는 24쌍이 83회 출산으로 578마리 생산, ADF03 라인 14쌍을 교배시켜 45회 출산으로 262마리, AM09 라인에서는 24쌍을 교배시켜 63회 출산하여 총 265마리의 마우스를 생산하였다. 이유율은 ADM16, ADF03 및 AM09 라인에서 각각 72.5, 77 및 67%였다.

가계도

ADM16, ADF03 및 AM09 라인의 가계도는 Fig. 4와 같다. 동형접합체는 치사하므로 동형접합체를 생산한 모체에서 출생된 이형접합체를 교배하여 각각의 라인을 유지하였다.

고찰

본 핏모증과 무치증 마우스는 수염이 거의 없었으며, 굽은 꼬리, 왜소증의 형태학적 이상을 나타내었다. 부검을 통한 육안적 소견으로 절치 뿐만 아니라 구치를 관찰 할 수 없었다. ADM16, ADF03 및 AM09 라인에서 핏모증과 무치증을 보이는 돌연변이체가 관찰된 것은 ENU가 BALB/c

Table 1. Segregation ratio in mating experiment between heterozygotes

Line	Total no. of observed	Total no. of affected	Incidence rate (%)	P value
ADM16 ($G_5 \sim G_6$)	403	106	26	$p > 0.05$
ADF03 ($G_3 \sim G_5$)	183	36	20	$p > 0.05$
AM09 ($G_3 \sim G_6$)	273	55	20	$p > 0.05$

Breeding data were analyzed using χ^2 -test and were considered significant at $p > 0.05$.

G_3 : the generation in which the recessive mutant mice were found

$G_4 \sim G_6$: the next generation of G_3

ADM16: G_1 male produced by 150mg/kg ENU treated mice

ADF03 and AM09: G_1 female and male produced by 200 mg/kg ENU treated mice

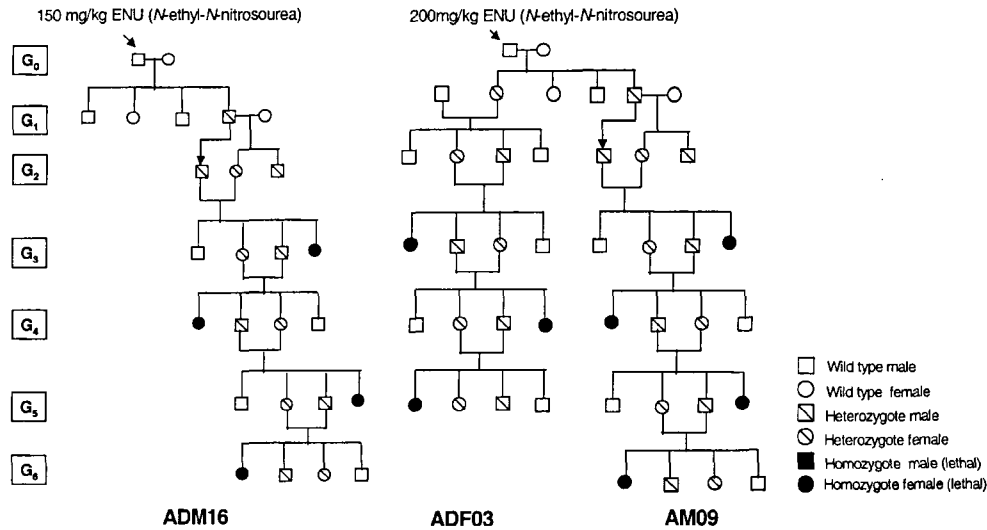


Fig. 4. Pedigrees of hairless and anodontia mice in the ADM16, ADF03 and AM09 line.

Table 2. Reproductive performance of hairless and anodontia mice

Line	Total no. of pairs	Total no. of delivery	Total no. of pups	Average litter size	Total no. of weaning	Weaning rate (%)
ADM16 (G ₃ ~G ₆)	24	83	578	7.0	403	71.9
ADF03 (G ₃ ~G ₃)	14	45	262	5.8	183	77.5
AM09 (G ₃ ~G ₆)	24	63	265	3.6	165	62.3

G₃: the generation in which the recessive mutant mice were found

G₄~G₆: the next generation of G₃

ADM16: G₁ male produced by 150 mg/kg ENU treated mice

ADF03 and AM09: G₁ female and male produced by 200 mg/kg ENU treated mice

에서 본 표현형과 관련된 유전자의 변이를 고빈도로 일으키며, BALB/c×BALB/c의 교배에서 생산된 G₃마우스는 본 유전자에 대하여 감수성을 가지고 있는 것으로 사료된다. 동형접합체는 출생 14일에 최초로 치사하였으며, 이 후 2~3일(출생 23~24일)에는 대부분이 치사하였다. 그러므로 동형접합체가 생산된 형매의 이형접합체간 교배(carrier×carrier)를 통하여 계대 유지하고 있으며, 현재 ADM16, ADF03 및 AM09 라인은 각각 G₆, G₅, G₆까지 유지되고 있다. 정상 개체의 체중은 7, 14, 21일령에서 각각 평균 4.9±0.7 g, 8.6±1.0 g, 11.3±1.3 g이었으며, 돌연변이체는 동일한 주령에서 각각 2.6±0.6 g, 4.0±1.0 g, 4.2±0.5 g으로 유의적인 차이를 보였다(p<0.0001). 이형접합체간 교배를 통하여 펙모증과 무치증 마우스의 유전 양식은 정상과 이형접합체간 3:1의 분리비를 보여 열성 유전 양식인 것으로 판단되었다. 피부, 치아 및 털 등은 외배엽성 기관이므로⁽¹¹⁾, 본 연구에서 개발된 펙모증과 무치증 마우스는 외배엽 이형성(ectodermal dysplasia)으로 사료된다. 외배엽 이형성 동물 모델로는 Tabby 마우스가 있으며, 감모증(hypotrichosis), 원형탈모증, 펙치증(oligodontia) 또는 무치증, 한선의 형성 및 발생 이상을 보이는 사람의 hypohidrotic ectodermal dysplasia(HED)과 유사한 증상을 나타낸다^(11,12).

또한 사람에서 외배엽 이형성의 Ellis-van Creveld(EvC) 증후군은 출생시 사산되거나, 유아기에 사망하는데 왜소증, 단지증, 다지증, 선천성 심장 질환, 무치증 또는 치아의 성장 지연, 신장 및 골 질환을 나타내므로⁽¹³⁾ 본 돌연변이체 마우스에 대하여 기관 형성기의 발생학적 연구, 유전자 연관 분석을 통한 원인 유전자 규명, 다양한 병리·조직화학을 검사할 통하여 치아 및 모발 형성과 관련된 유용한 모델 동물로 활용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 국가지정연구실사업(2000-N-NL-01-C-207) 지원에 의해 수행되었으며, 동물유지 관리 수고해 주신 Dr. Esaki, 이필수, 유제권, 차달선 연구원님들에게도 감사드립니다.

참고문헌

- Fields S (1997): The future is function. Nat. Genet. 17: 382-383
- Moore KJ (1999): Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes. Drug. Discov.

- Today. 4: 123-128
3. 송창우, 양승돈, Kozaburo Esaki, 한상섭 (2000): 돌연변이원 ENU를 이용한 체계적인 돌연변이체 개발과 유전체 기능분석. 유전. 3: 100-112
 4. Brown SDM and Nolan PM (1998): Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. Hum. Mol. Genet. 7: 1627-1633
 5. Brown SDM and Peters J (1996): Combining mutagenesis and genomics in the mouse-closing the phenotype-gap. Trends. Genet. 12: 433-435
 6. Brown SD and Balling R (2001): Systemic approaches to mouse mutagenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 11: 268-273
 7. Cho KH, Cho JW, Esaki K, Yang SD, Hong KC, Lim CW, Han SS and Song CW (2001): Effects of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) on BALB/cAnNCrj male mice (II). Korea J. Lab Anin. Sci. 17: 151-159
 8. Cho JW, Cho KH, Esaki K, Han SS, Hong KC and Song CW (2002): The screening protocol for selection of phenodeviants and results of large-scale ENU mutagenesis. Korea J. Lab Anin. Sci. 18: 130-136
 9. Han SS and Lee KJ (1998): Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Seoul.
 10. Cho KH, Cho JW, Esaki K, Yang SD, Hong KC, Han SS and Song CW (2001): Effects of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) on BALB/cAnNCrj male mice (I). Korea J. Lab Anin. Sci. 17: 143-149
 11. Prioloa M, Silengoab M, Leronea M and Ravazzoloac R (2000): Ectodermal dysplasias: not only skin deep. Clin. Genet. 58: 415-430
 12. Srivastava AK, Pispá J, Hartung AJ, Du Y, Ezer S, Jenks T, Shimada T, Pekkanen M, Mikkola ML, Ko MSH, Thesleff I, Kere J and Schlessinger D (1997): The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13069-13074
 13. Ruiz-Perez VL, Ide SE, Strom TM, Lorenz B, Wilson D, Woods K, King L, Francomano C, Freisinger P, Spranger S, Marino B, Dallapiccola B, Wright M, Meitinger T, Polymeropoulos MH and Goodship J (2000): Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodermal dysostosis. Nat. Genet. 24: 283-286