creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

이학석사학위논문

G protein-coupled receptor(GPCR)와 인슐린 신호가 종의 분산 행동에 미치는 영향 연구

The role of G protein-coupled receptors and insulin-like peptides in the regulation of a dispersal behavior

2015년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

김 나 리

G protein-coupled receptor(GPCR)와 인슐린 신호가 종의 분산 행동에 미치는 영향 연구

The role of G protein-coupled receptors and insulin-like peptides in the regulation of a dispersal behavior

지도교수 이 준 호

이 논문을 이학석사학위논문으로 제출함

2014년 12월

서울대학교 대학원
생명과학부
김 나 리

김나리의 이학석사 학위논문을 인준함

2014년 12월

위 원장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문 요약

G protein-coupled receptor(GPCR)와 인슐린 신호가 종의 분산 행동에 미치는 영향 연구

김나리

진화는 과거로부터 현재에 걸친 환경에 대한 적응의 산물로, 생존에 유리한 방향으로 행동의 변화를 야기해왔다. 그러한 행동의 변화는 유전체 정보에 담기게 되었다. 따라서 환경과 행동의 연결고리를 분자적 수준에서 밝히는 작업은 진화가 어떤 식으로 이루어져 왔는지에 대한 기초적인 정보를 제공할 것이다. 이 연결고리를 밝히고자 예쁜꼬마선충 *Caenorhabditis elegans*(*C. elegans*)의 dauer 시기에만 나타나는 nictation이라는 분산 행동에 대해 연구하고자 하였다.

*C. elegans*는 어려운 환경(high temperature, low nutrient availability, high population density)에 처하면 대안적 발생 단계인 dauer 시기로 들어간다. Dauer는 다양한 스트레스 상황에 저항력을 가진 휴먼 유충 시기로, 다른 발달 단계에서는 나타나지 않는 nictation이란 행동(꼬리를 지지 삼아 허공에 머리를 이리저리 흔듦)을 보인다. 이

러한 행동을 통해 주변을 지나가는 곤충과 같은 다른 동물들의 몸에 쉽게 올라탈 수 있다. 따라서 *C. elegans*의 nictation은 생존과 번식에 적합한 새로운 서식처로 이동하기 위한 생존 본능적인 분산 행동으로 이해되고 있다.

특히 본 연구에서는 G protein-coupled receptor(GPCR) 및 인슐린 신호에 초점을 맞추어 살펴보았다. 이들 신호가 어떻게 신경계의 발생 변화를 통해 행동을 조절하는지 밝히고자 하였다.

Nictation은 여러 가지 물리적·화학적 자극에 의해 유도되는 행동이다. 다양한 신호를 인지할 수 있으며 *C. elegans*의 전체 유전자 중 많은 수를 차지하는 수용체는 G protein-coupled receptor(GPCR)이다. GPCR은 세포막에 존재하는 단백질로 세포 바깥에서 오는 신호를 세포 안으로 전달시켜주는 역할을 한다. Nictation에 관여하며 환경적 자극을 인지할 것으로 예측되는 GPCR로 STR-2, ODR-10과 SRA-6 수용체를 각각 찾았다.

Insulin-like signaling pathway가 nictation을 조절한다는 사실을 통해 본 연구에서는 어떠한 인슐린 리간드가 nictation에 관여 하는지 살펴보았다. 그 결과 *ins-27, ins-28, ins-34, daf-28* 유전자가 관여함을 알았다.

이들 신호가 dauer 시기에 nictation을 직접적으로 조절할 수 있을지, 아니면 dauer 이전 시기에 nictation을 잘 할 수 있도록 신경계 발생 변화를 유도할지 밝히는 것이 필요하다. 만약 후자의 경우라면 본 연구

를 통해 신경계 발생의 유연성을 밝힐 수 있을 것이다. 해당 연구는 신경 재생 기전 연구의 기반이 되는 기초연구로서 중요한 의미를 가질 것으로 생각된다.

주요어 : *C. elegans*, dauer, nictation, GPCR, insulin-like peptides, neural development, evolution

학번 : 2012-20294

차 례

국문 요약 i
차례 iv
그림 차례 v
I. 서론 1
II. 실험 재료 및 방법 4
III. 실험 결과 13
1. Nictation과 GPCR의 연관성 13
2. GPCR의 downstream인 G protein과 nictation의 연관성 15
3. Nictation과 Insulin-like peptides의 연관성 15
IV. 고찰 19

참고 문헌 38
Appendix 43
1. 온도에 따른 nictation 43
2. 습도에 따른 nictation 43
3. Micro-dirt chip의 말린 시간에 따른 nictation의 변화 44
4. 한 시간 동안 *C. elegans*의 nictation 관찰 44
Abstract 49
Acknowledgement 53

그림 차례

Figure 1. Two methods of nictation measurement.....26

Figure 2. GPCR nictation screening test.....27

Figure 3. *Pdor-10::gfp* expression pattern.....28

Figure 4. Rescue of *str-2* mutants with *str-2* gDNA.....29

Figure 5. *Pstr-2::gfp* expression pattern 30

Figure 6. PA14 could increase nictation independently of *str-2* 31

Figure 7. G protein nictation screening test 32

Figure 8. Insulin ligands nictation screening test.....33

Figure 9. Rescue of *ins-28* mutants with *ins-28* gDNA.....34

Figure 10. PA14 can increase nictation behavior.....35

Figure 11. PA14 can increase nictation through *ins-7*.....36

Figure 12. The picture of N2 dauer and *ins-15* dauer.....37

Figure S1 . Nictation in temperature and humidity.....46

Figure S2. Nictation in accordance with the dried chip on

time.....47

Figure S3. Observation of nictation for an hour.....48

I. 서론

*Caenorhabditis elegans*는 신경의 발생과 행동 연구에 있어 좋은 모델 생명체이다. 모든 세포의 계보(cell lineage)가 알려져 있고 연속 절단한 전자 현미경 사진들을 통한 해부학적 신경지도의 제작으로 인해 신경세포들 사이의 연결망이 모두 밝혀져 있기 때문이다. 뿐만 아니라 동물 최초로 지놈 프로젝트의 완성을 통해 특정 행동에 관여하는 유전자의 기능도 알 수 있게 되었다. 또한 *C. elegans*의 자웅동체 신경계는 체세포의 3분의 1정도인 302개의 신경세포들과 56개의 보조세포(glial cell)로 이루어져 있다. (수컷의 경우는 381개의 뉴런과 92개의 보조세포로 이루어져있다.) *C. elegans*는 사람이나 쥐에 비하면 매우 간단한 신경계를 가지고 있음에도 불구하고, 회피 반응을 포함한 다양한 학습 행동과 여러가지 복잡한 행동을 할 수 있기에 *C. elegans*는 행동 조절의 메커니즘을 규명하는데 활발히 연구되고 있다(Meisel and Kim, 2014).

*C. elegans*의 nictation 행동은 첫 보고가 된 후(Croll and Matthews, 1977) 3차원적 공간에서 관찰할 수 있는 시스템 개발의 결여로 인해 연구가 진행되지 못하였다. 그러나 본 연구실에서는 micro-dirt chip assay system을 도입하여 세계 최초로 nictation 행동을 개체 수준에서 정량적으로 분석하고 이 행동에 관여하는 유전자와 신경계의 작용에 대해 규명하였다(Lee et al., 2012).

*C. elegans*의 휴면 유충 시기인 dauer 상태에서는 먹이를 먹지 않고 거의 움직이지도 않는데 반해, 신기하게도 nictation이라는 행동을 보인다. 앞선 논문을 통해 *C. elegans*가 nictation을 하는 까닭에 대해 주변을 지나가는 곤충과 같은 다른 개체에 보다 쉽게 올라타 생존과 번식에 적합한 새로운 서식지로 이동하기 위한 것임을 알았다. 그리고 이러한 행동은 진화적으로 잘 보존된 분산 행동임을 이해할 수 있었다. 또한 nictation은 IL2 신경세포에 의해 유발되며 IL2에서 분비되는 아세틸콜린이 nictation 행동에 필요함을 알았다.

본 연구에서는 이 프로젝트의 후속 연구를 진행하였고, 어떠한 신호전달인자들이 nictation을 조절하고 있는지 알아보고자 하였다. 특히 G protein-coupled receptor(GPCR)과 인슐린 신호에 집중하여 nictation과의 관련성을 살펴보았다.

*C. elegans*는 진화적으로 잘 보존된 GPCR을 이용해 먹이와 페로몬 등 다양한 화학물질을 인지하는 것으로 알려져 있다(Bargmann and Mori, 1997). 따라서 환경을 인지할 것으로 생각되는 GPCR을 찾아, nictation과의 관련성을 살펴보는 것은 의미가 있을 것이라 생각하고 가설을 세웠다.

에너지 항상성을 조절하는 역할로 잘 알려진 insulin-like signaling pathway는 최근에는 신경세포의 가소성 측면에서 학습과 기억에 관해 많은 연구가 이뤄지고 있다(Chen et al., 2013). 선행 연구를 통해 insulin-like signaling pathway가 nictation을 조절한다는

사실을 알았다(Lee et al., 2012). 본 실험자는 인슐린 신호의 가장 upstream을 연구하였고, 어떠한 인슐린 리간드가 nictation에 관여하는지 살펴보고자 하였다. 뿐만 아니라 어떠한 환경에 의해 해당 인슐린 리간드가 분비되는지 알아보고자 하였다.

과거에는 해부학적인 신경 커넥톰(connectome)을 밝히기 위한 연구가 주로 이루어져 왔다면, 최근엔 좀 더 기능적인 커넥톰에 관해 많은 연구가 행해지고 있다. 과거 해부학적인 신경 커넥톰으로는 설명 되지 않았던 현상(wireless 신호전달체계에 의한 행동 및 기능 조절)들이 기능적인 커넥톰에 의해 설명되기 시작하면서 이것이 좀 더 중요한 패러다임으로 받아들여지고 있는 실정이다. 본 연구를 통해 신경 내분비시스템에 의한 wireless 신호전달체계가 어떤 식으로 행동에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 배지

*C. elegans*를 키우는 배지로는 nematode growth medium (NGM)을 사용하였으며 조성은 다음과 같다. NGM 배지는 1L를 만들 때 bacto-trypton(Difgo) 4g, potassium dihydrogen phosphate(Shinyo) 3g, sodium chloride(Fisher) 2g, dipotassium hydrogen phosphate(Showa chemical) 0.5g, cholesterol(Sigma) 0.008g을 넣고 한천을 2% 첨가하여 사용하였다.

일반적으로 *Escherichia coli*를 키우는 배지로는 Luria Bertani(LB) 배지를 사용하였다. 플레이트에 고체배지를 만들 때는 한천 가루 (agar powder)를 2%로 첨가하였고, 우리가 원하는 균주를 선택하기 위해서는 각 플라스미드가 가진 마커에 따라 ampicillin, kanamycin, streptomycin 등의 항생제를 사용하였다.

2) *C. elegans* strains

야생형으로서 Bristol N2를 사용하였다(Brenner, 1974). Mutant

strain들은 Caenorhabditis Genetics Center(CGC)와 National BioResource Project(NBRP)에 요청하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 mutant들은 다음과 같다.

① G protein-coupled receptor(GPCR) mutant screening test에 사용된 strain

srd-1(eh1), str-2(ok3148), str-2(ok3089), str-2(tm445), str-3(tm2483), srab-12(tm5583), srab-20(tm5830), sra-6(tm2275), sro-1(tm3088), tyra-3(ok325), odr-10(ky225), odr-10(ky32), gpa-2(pk16), gpa-3(pk35), gap-2(pk16);gpa-3(pk35), rhy-1(ok1402)

② G protein mutant screening test에 사용된 strain

gsa-1(ce81), gsa-1(ce94), egl-30(ad805), goa-1(n363), gpa-1(pk15), gpa-2(pk16), gpa-3(pk35), gpa-4(pk381), gpa-5(pk376), gpa-7(pk610), gpa-9(pk438), gpa-10(pk362), gpa-14(pk342), gpb-2(pk751), gpc-1(pk298), gpc-1(pe372), oac-39(gk145)

③ Insulin-like signaling pathway mutant screening test에 사용된 strain

ins-1(tm1888), ins-2(tm4467), ins-3(tm3608), ins-4(ok3534), ins-4(tm3620), ins-5(tm2560), ins-

6(tm2416), ins-7(tm2001), ins-8(tm4144), ins-9(tm3618), ins-10(tm3498), ins-11(tm1053), ins-12(tm2918), ins-13(tm4856), ins-14(tm4886), ins-15(ok3444), ins-16(ok2919), ins-17(tm790), ins-18(tm339), ins-19(tm5155), ins-20(tm1947), ins-20(tm5634), ins-21(tm5180), ins-22(tm4990), ins-22(tm4639), ins-22(ok3616), ins-23(tm1875), ins-25(ok2773), ins-26(tm1983), ins-27(ok2474), ins-28(ok2722), ins-29(tm1922), ins-30(ok2343), ins-31(ok3543), ins-32(tm6109), ins-33(tm2988), ins-34(tm3095), ins-35(ok3297), ins-36(tm6125), ins-37(tm6268), ins-38(tm2632), daf-28(tm2308), daf-28(sa191)

결과에 넣지 않았지만 test한 strain들로는 *ins-3(ok2478), ins-3(ok2488), ins-7(tm1907), ins-7(ok1573), ins-13(tm5129), ins-18(ok1672)*이 있다.

Agar 로 만든 고체 배지에 OP50-1 *E. coli* 균주를 배양하여 lawn 을 만들었다. 그 위에 실험에 사용한 *C. elegans* 들을 올려주었다. 3~4 일 간격으로 새 배지에 옮겨주며 배양하였다.

3) *E. coli* 균주

C. elegans 의 먹이로는 대장균 OP50-1(streptomycin 내성균주)을 사용하였고, 일반적인 플라스미드의 증폭을 위해서는 DH5α를 사용하였다.

4) 시약

Micro-dirt chip 을 만들기 위해 OCI Company 의 Agar Powder 를 사용하였다. DNA 전기 영동에는 Promega Corporation 의 agarose 를 사용하였다.

5) 효소

제한 효소와 기타 다른 효소들은 주로 MBI fermentus 사와 Promega, Boehringer Mannheim, Takara, New England Biolab 사의 제품을 사용하였다.

6) Dauer pheromone

Dauer 를 만들기 위해 합성 페로몬을 사용하였다. 합성 페로몬은 [ascaroside C7 (ascaroside 1, daumone 1(JEONG *et al.* 2005)), ascaroside C6 (ascaroside 2, daumone 2), ascaroside C9 (ascaroside 3, daumone 3(Butcher et al., 2007; Jeong et al., 2005))] 백융기 교수님 실험실로부터 제공 받았다. 페로몬 배지를

만들기 위해 각각 10μM 의 daumone 1, 2, 3 을 섞었다. 이 페로몬 배지의 조성 하에서 야생형 *C. elegans* 의 경우에는 대략 80% 정도가 dauer 시기로 발생하게 된다. Young adult 시기인 일곱 마리의 *C. elegans* 를 페로몬 배지에 올리고 25℃에서 배양한다. Dauer 는 페로몬 배지에 올린 시점을 기준으로 4~5 일 뒤에 관찰된다. (Dauer 는 몸이 가늘고 길며 움직임이 거의 없다.)

7) Micro-dirt chip

Micro-dirt chip의 주형이 되는 틀은 soft-lithography를 이용하여, post의 직경이 50㎛, 높이가 25㎛가 되도록 제작하였다(Park et al., 2008). 이 주형을 petri-dish에 두고 70℃의 4% agar를 붓고, 거품을 없애기 위해 slide glass의 표면을 이용해 틀을 긁어 주었다. 20분 정도 agar를 굳힌 다음 주형은 떼어내고 37℃에서 1시간 30분 정도 말린 다음 사용하였다.

8) 기타

미세주입(microinjection)을 위한 플라스미드 추출에는 Qiagen plasmid kit를 사용하였고, PCR 산물의 정제에는 Bohringer Mannheim의 PCR purification kit, DNA agarose gel에서 DNA 추출에는 Qiagen의 Qiaex II와 MBI fermuetus 사의 DNA gel extraction kit를 사용하였다.

2. 실험 방법

1) Dauer synchronization

본 연구의 모든 실험은 dauer stage로 synchronization 시킨 벌레를 사용하였다. 페로몬이 포함된 배지에 일곱 마리의 young adult *C. elegans*를 옮겨 25℃에서 4~5일 동안 배양하여 dauer를 얻었다.

2) Micro-dirt chip에서의 nictation 측정

페로몬 배지에서 만들어진 synchronization된 dauer를 M9 buffer를 이용해 micro-dirt chip 위에 옮겨 놓고 nictation을 관찰 하였다. Micro-dirt chip에는 일정한 간격으로 post가 존재한다. Dauer는 이 post 사이를 움직이다가 꼬리를 지지 삼아 몸을 허공에 들어 올려 머리를 흔드는 nictation 행동을 보인다. *C. elegans*는 dauer가 아닌 발생 단계에서도 머리를 살짝 들어 올리는 행동을 하는데 이를 foraging이라고 한다. Nictation은 foraging을 할 때 보다 머리를 더 많이 들어 올리며, dauer는 3차원 공간으로 머리를 이리저리 흔드는 특이적인 행동을 보인다. Nictation 측정을 위해 크게 두 가지 방법을 사용하였다.

① Individual nictation test

머리를 들어 올리는 시점을 nictation 행동의 시작이라 정하고 counting을 하였다. 총 1분 관찰하는 동안 한 마리의 dauer가 머리

를 들어 올린 시점으로부터 다시 머리가 바닥에 떨어뜨리는 시간까지를 측정하였다(Figure 1A). 1분 동안 이러한 행동이 관찰된 시간을 모두 더하여 전체 관찰한 시간 당 비율을 계산하여 nication ratio를 구하였다. 테스트 방법은 30~40마리의 dauer를 micro-dirt chip에 올린 후, 20분이 지난 뒤부터 측정을 하기 시작한다. 1회 측정 시 15마리를 측정하여 average nictation ratio를 산출하였다. N2의 경우엔 대략 30% 정도의 nictation ratio를 보인다.

② Population nictation test

전체 dauer 중에서 몇 마리가 nictation을 하고 있는 지에 대한 비율을 계산하였다. 40마리의 dauer를 micro-dirt chip에 올린 뒤 20분이 지난 뒤부터 관찰하기 시작했다. Nictation을 하고 있는 벌레는 1’, 기어다니고 있는 벌레는 ‘0’으로 표기하여 nictation ratio를 구했다(Figure 1B). 1회 측정 시 이 과정을 세 번 반복하여 average nictation ratio를 산출하였다. 이 방법은 주로 GPCR mutant screening 및 insulin-like peptides mutant screening test에 주로 사용하였다. N2의 경우 35~45%로의 nictation ratio를 나타내었다.

3) Mutant outcross

Nictation에 영향을 미치는 mutant를 선별한 뒤, 해당 유전자의 돌연변이만 남기고 나머지 유전자들은 정상적으로 만드는 작업(Outcross)

을 해야만 한다. 그리하여 해당 유전자의 phenotype을 재차 확인하고자 한다. Outcross를 하기 위해 자웅동체인 해당 유전자의 결실 돌연변이체와 N2 수컷을 교배시켰다. 여러 번의 교배를 통해 해당 유전자의 돌연변이만을 남겨 놓았다.

4) Mutant rescue

str-2(ok3148) 돌연변이체에 *str-2* gDNA 부분이 들어간 fosmid(C50C10.7)로 rescue하였다. 이 clone을 pTG96_2 plasmid안에 *psur-5::gfp*가 cloning된 vector를 marker로 사용해 함께 미세 주입 해주었다.

*ins-28(ok2722)*은 N2 gDNA를 template로 하여 *ins-28* primer를 이용해 *ins-28*의 upstream 2kb 이상(promoter 지역)부터 3' stop codon 바로 앞까지 PCR을 하였다. 이를 통해 얻은 insert와 Green Fluorescent Protein(GFP) 발현 벡터인 pPD114.108을 각각 PstI과 NotI 제한효소를 이용하여 자른 후, 연결시켜 주었다. 이렇게 cloning된 plasmid를 미세 주입 방법을 이용하여 *C. elegans*에 주입하였다. 형광 현미경을 이용하여 그 발현 양상 및 rescue 실험을 하였다.

5) 미세 주입 (Microinjection)

Transgenic animals을 만들기 위해 미세 주입 방법을 사용했다. 미세 주입을 하기 위해 DNA는 Qiagen plasmid kit를 사용하여 준비하였

고, 전체농도가 100ng/㎕가 되도록 맞추었다. 일반적으로 pRF4(*rol-6*)를 마커로 사용하는데, nictation 행동을 rescue 하기 위한 실험에서는 온 몸에서 강하게 발현하는 *sur-5* promoter를 pTG96_2 plasmid에 cloning한 vector를 사용하였다. 본 연구의 미세 주입 과정에는 Differential interference contrast(DIC) 현미경을 이용하였다. 벌레의 young adult 한 마리를 3% agar에 둔 상태로 관찰하면서 생식선 쪽이 주사 바늘 쪽에 향하도록 배치한 후, DNA가 담긴 주사 바늘을 생식선 속으로 살짝 찔러 넣고 압력기의 공기압으로 DNA 용액이 생식선 속으로 들어가도록 하였다. 미세 주입이 완료된 개체는 신속히 M9 용액으로 덮어 마르지 않게 한 후 새 배지로 옮겼다.

6) 형광 현미경 (Fluorescence Microscopy)

Transgene의 발현 양상을 관찰하기 위해 형질 전환 동물을 2.5mM levamisole로 마비시킨 후, mouth pipette을 이용해 3% agar pad 위에 올려놓는다. 사용한 형광현미경은 Axioplan 2 microscope나 Confocal LSM700 microscope (Zeiss)를 이용했다.

III. 실험 결과

1. Nictation과 G protein-coupled receptor(GPCR)의 연관성

Nictataion에 관여하며 환경적 자극을 인지하는 GPCR을 찾아 이 수용체의 신호가 어떻게 nictation을 조절하는지 알아보고자 했다. 각 뉴런에서 발현하는 GPCR을 중심으로 이들 유전자들의 결실 돌연변이체 nictation screening test를 수행하여 해당 유전자를 찾고자 하였다(Figure 2). 그 결과로 individual nictation test를 통해 STR-2 수용체를 찾았다(Figure 2A). Population nictation test를 통해서는 ODR-10 수용체와(Figure 2B) SRA-6 수용체를 찾았다(Figure 2C). *str-2*와 *sra-6* 유전자 결실 돌연변이체들은 nictation을 잘 하지 못하는 반면, *odr-10* 유전자 결실 돌연변이체는 nictation을 더 잘 하는 phenotype을 보였다.

ODR-10 수용체는 후각을 담당하는 AWA 신경세포의 cilia에서 발현되는 수용체로서 diacetyl을 인지한다. 약하게는 CEP 신경세포에서 발현한다고 알려져 있다(Sengupta et al., 1996). *odr-10* 유전자의 AWA 뉴런에서의 발현은 non-dauer시기보다 dauer시기에 증가되어 있다(Figure 3).

str-2 유전자 결실 돌연변이체를 outcross한 뒤에도 해당 nictation

phenotype이 관찰됨을 확인하였다. 또한 이 돌연변이체에 *str-2* 유전자를 주입함으로써 해당 phenotype이 rescue되었다. 이로써 STR-2 수용체가 nictation에 관여함을 확증할 수 있었다(Figure 4). STR-2 수용체는 dauer 시기에는 ASI 뉴런에서 발현하고 그 외 시기에는 AWC 뉴런에서 발현한다고 알려져 있다(Peckol et al., 2001). 본 실험자 역시 발현 양상을 확인한 바 있다(Figure 5).

GPCR의 신호가 nictation을 어떻게 조절하는지 총체적으로 이해하기 위해서 *str-2* 유전자가 어떤 신호에 반응하는지 알아보는 것은 중요하겠다. STR-2 유전자는 *Drosophila*의 methuselah(MTH) receptor와 paralogs가 있다고 밝혀져 있다(Nagarathnam et al., 2012). 이 논문에서 MTH는 영양분을 인지할 것이라고 보고되었다. 이를 토대로 STR-2가 어떤 영양분을 인지하는지 알아보았다. 아마도 부족한 영양분이거나 혹은 해로운 영양분을 STR-2 수용체가 인지해 nictation을 조절할 것으로 생각되어진다. *C. elegans*는 흙 속의 유기 물질과 미생물들을 먹고 산다. 박테리아의 여러 종류 중 녹농균(*pseudomonas aeruginosa*)은 동물에 질병을 일으키는 세균으로 예쁜꼬마선충을 죽이는 균주로 잘 알려져 있다(Tan et al., 1999). 녹농균의 일종인 PA14(*pseudomonas aeruginosa* strain)을 먹고 자란 dauer의 경우 *E. coli*를 먹고 자란 dauer에 비해 nictation이 증가됨을 선행연구를 통해 알았다(unpublished data). 이에 해로운 영양분을 인지할 것으로 예상되는 STR-2 수용체가 혹시 PA14을 인지하는지 살펴보고자 *str-2*

유전자의 결실돌연변이체를 PA14 배지에서 키워 dauer 시기에서의 nictation ratio를 측정하였다. 실험 결과를 통해 STR-2 수용체가 없어도 PA14을 인지할 수 있었다(Figure 6).

2. GPCR의 downstream인 G protein과 nictation의 연관성

STR-2 수용체는 GPCR이므로 이 신호를 전달하는 G단백질(G-protein, Gα, Gβ, Gγ)을 찾고자 감각뉴런에서 발현하는 G protein 유전자들의 결실 돌연변이체 nictation screening test를 진행하였다. G protein은 많은 신경세포에서 발현되고 있는 중요한 단백질이기에, 일부 유전자들의 결실 돌연변이체는 움직임에 심각한 결함이 나타난다. Nictation을 측정할 수 있는 결실 돌연변이체들 중에 스크리닝을 통해 찾아진 G protein은 없었다(Figure 7).

3. Nictation과 Insulin-like peptides의 연관성

인슐린 신호 전달계에 의한 wireless 신호전달체계가 nictation 행동을 어떻게 조절하고 있는지 알아보기 위해 해당 인슐린 리간드를 찾는 일부터 하였다. *C. elegans*의 마흔 개 인슐린 유전자 결실 돌연변이체를 이용해 nictation screening test를 진행하였다. 그 결과 *ins-27, ins-28, ins-34, daf-28* 유전자를 찾았다. 이들 유전자 돌연변이체의 경우 N2 대조군에 비해 nictation ratio가 감소되어 있음을 알 수 있었다(Figure 8). *ins-28, ins-34*의 경우 N2에 비해 상당히 nictation

defect phenotype을 보인다. *ins-27*과 *daf-28* 유전자 돌연변이체들의 경우, nictation test를 할 때마다 nictation ratio 값이 일관되지 않았다. 그래서 다른 유전자 돌연변이체 nictation test에 비해 여러 번의 반복 실험을 하였다. 이 두 유전자들은 N2에 대비했을때 유의미한 실험 결과가 나타났다. 하지만 이는 다른 유전자들에 비해 실험 횟수가 많았기 때문에 차이가 나타난 것으로 해석된다.

ins-28 유전자 결실 돌연변이체의 경우에는 N2 대조군에 비해 nictation을 잘 하지 못하는데, outcross를 한 뒤에도 해당 nictation phenotype을 보임을 확인하였다. 또한 해당 돌연변이체에 *ins-28* 유전자를 넣어줌으로써 기능 회복이 됨을 확인하였다. 이로 인해 *ins-28* 유전자의 nictation 관련성을 확실히 확인한 바 있다(Figure 9).

Outcross된 *ins-18*과 *ins-34* 유전자 돌연변이체들의 경우 해외 연구팀에서(Fernandes de Abreu et al., 2014) 받을 수 있었다. 이들 돌연변이체의 nictation test 실험 결과 해당 mutant phenotype이 재현됨을 확인할 수 있었다.

Nictation에 관련한 다음의 유전자(*ins-27, 28, 34, daf-28*)들이 어떤 환경에 의해 분비되는지 알아보고자 하였다. 인슐린 리간드를 분비하는 감각뉴런은 특정 환경을 인지하여 특정 시기에 특정 뉴런으로 인슐린 리간드를 분비한다. 환경에 따라 인슐린 리간드의 발현이 달라지며 이에 따라 *C. elegans*의 발생을 조절한다는 연구를 포함하여(Hung et al., 2014) 이에 대한 연구는 점차 활발해지고 있는 상황이다. *C.*

*elegans*의 다양한 환경적 요인으로 우리가 쉽게 생각할 수 있는 것 중의 하나는 바로 먹이일 것이다. 앞서 설명했듯이 PA14은 *C. elegans*의 해로운 먹이이다. 선행 연구에서 *daf-2* dauer를 가지고 PA14 실험을 하였다. 이 실험 결과 인슐린 신호가 PA14에 의해 매개되는 nictation 반응에 관여함을 알 수 있었다(unpublished data).

E. coli 페로몬 배지에서 유도한 dauer에 비해 PA14 페로몬 배지에서 유도한 dauer는 nictation ratio가 증가된다. 해당 실험을 *ins-28* mutant를 가지고 실험해 보았다. 그 결과 *ins-28* 유전자의 경우 PA14에 관여하지 않음을 알 수 있었다(Figure 10). *ins-34* 역시 PA14에 관여하지 않는다(unpublished data).

Nictation phenotype에는 영향이 없지만 PA14 반응을 매개하는 인슐린 리간드로 *ins-7* 유전자를 찾았다(Figure 11). 이 유전자의 경우 PA14 관련하여 aversive olfactory learning에 관여한다고 보고된바 있다. ASI 뉴런에서 발현된 INS-6가 URX 뉴런에서 분비되는 *ins-7* 유전자의 전사를 억제함으로써 RIA 뉴런에서 발현하고 있는 인슐린 수용체를 활성화 시켜 학습을 유도한다는 내용이다(Chen et al., 2013).

*ins-15(ok3444)*의 경우 dauer로의 발생은 되었으나 죽는 phenotype을 보였다. 현재까지 *ins-15* 유전자의 기능 및 phenotype에 관해서는 연구된 적이 없다. 본 연구자가 처음으로 dead dauer phenotype을 관찰하였다(Figure 12). Dead dauer의 경우 N2 dauer처럼 입 주위와 몸이 cuticle로 덮여있다. 하지만 N2 dauer와는 달리 많

은 조직에서 괴사가 진행되었다. Dauer로 발생이 되지 않는 *ins-15* mutant의 경우엔 살아있는 것으로 보아, *ins-15* 유전자의 역할은 dauer시기에 생명 유지를 위해 필수적인 기능을 하는 것으로 생각된다.

ins-24, *ins-39*는 해당 돌연변이체가 없어 test하지 못하였다.

IV. 고찰

본 연구팀의 nictation 행동 연구는 종의 확산 과정에 대한 행동을 신경세포 수준에서 분자적으로 분석한 독창적이고 차별적인 연구이다. Micro-dirt chip assay를 사용하여 세계 최초로 nictation 행동 정량화 분석을 할 수 있게 되었다. 이 분석법을 이용해 GPCR의 nictation 행동 조절의 기전 제시를 통해 환경과 행동의 연결고리를 분자적 수준에서 밝히고자 하였다. 또한 인슐린 신호전달계의 nictation 조절 기전 규명을 통해 wireless 신호전달체계가 행동에 어떻게 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

1. Nictation과 G protein-coupled receptor(GPCR)의 연관성

STR-2 수용체는 nictation에 중요한 역할을 하고 있으며 dauer 시기에는 ASI 뉴런, 그 외 시기에는 AWC 뉴런에서 발현하는 것을 확인한 바 있다. 하지만 dauer로 들어가는 시기는 어떤 뉴런에서 발현하는지 모르고 있어 이를 알아보는 것이 필요하겠다. STR-2 수용체가 어느 신경세포에서의 발현이 nictation에 중요한지 cell-specific rescue 실험을 진행 중에 있다. 이후엔 해당 신경세포에서의 발현이 어느 시기에 중요한지 stage-specific rescue를 알아볼 계획에 있다. 시기에 대

한 정보는 STR-2 수용체가 nictation에 어떠한 역할을 수행하고 있는지에 대한 핵심정보를 제공해 줄 것이다. 예를 들어 dauer로 들어가는 시기 혹은 그 이전 시기에서 STR-2 수용체가 발현된다면, 이 수용체는 dauer 시기가 되었을 때 nictation을 잘 할 수 있도록 신경세포의 발생 변화를 야기하는 역할을 수행한다고 생각할 수 있다. 만약 dauer 시기 때의 STR-2 수용체의 발현이 중요하다면, dauer 시기에 nictation을 잘 하도록 유도하는 환경적 상황을 인지하여 직접적으로 nictation을 조절하는 역할을 한다고 생각할 수 있을 것이다.

STR-2 수용체의 리간드를 찾기 위해 먼저 녹농균(*pseudomonas aeruginosa*)을 가지고 실험을 해보았다. 이 실험을 통해 STR-2 수용체는 PA14을 인지하지 않음을 알 수 있었다. 녹농균 외에 다른 균주를 시험해봄으로써 STR-2 수용체의 리간드를 찾는 것이 중요하겠다. Cell-stage specific rescue가 성공하면, rescue가 된 신경세포에서의 기존에 알려진 역할을 통해 STR-2 수용체의 리간드 찾기를 조사해볼 수 있을 것이다. STR-2가 발현되는 ASI 신경세포는 dauer pheromone, Na^+, Cl^-, cAMP, biotin, lysine을 인지하는 감각뉴런으로 알려져 있다. 또한 AWC 신경세포는 benzaldehyde, butanone, isoamylalcohol, 2,3-pentanedione, 2,4,5-trimethylthiazole을 인지하는 것으로 밝혀져있다(Lans, 2005).

*C. elegans*의 AWC 뉴런은 후각 신경세포로서 STR-2 단백질의 발현 유무에 따라 세포의 운명이 달라진다. STR-2 수용체를 발현하는

세포는 AWC(ON) 세포로 발생이 진행되고 STR-2 수용체를 발현하지 못하는 세포는 AWC(OFF)가 되며 두 세포는 각기 다른 화학물질을 감지하게 된다. 좌우 중 한 쪽만 AWC(ON)이 되며 좌우 중 어느 쪽이 AWC(ON)으로 발생이 진행 될지는 무작위로 결정된다(Sagasti et al., 2001). STR-2의 발현은 칼슘 신호를 통해 활성화된 p38 mitogen-activated protein kinases(p38 MAPKs) 단백질에 의해 조절을 받는다. p38 MAPKs는 열과 삼투와 같은 다양한 스트레스에 반응하여 세포의 분화와 사멸 및 자가 포식에 관여한다고 알려진 단백질로서 모든 진핵생물에 잘 보전된 단백질이다. 하지만 신경세포에서의 p38 MAPKs의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 상황이다. 또한 *C. elegans*에서 p38 MAPKs 조절함으로써 STR-2 발현 차이로 나타나는 현상이 포유류에서는 어떤 신경세포의 운명을 결정지어 역할의 차이를 유도하게 되는지 모르고 있는 상태다. 이 신경세포는 발생과정에서 *C. elegans*의 생존본능 행동과 같이 중요한 행동을 조절할 가능성이 클 것으로 생각된다.

이에 대한 연구는 신경세포의 발생 및 기능적인 측면을 밝힐 수 있는 연구로서 중요한 가치를 가질 것이다.

2. GPCR의 downstream인 G protein

G protein screening test를 통해 찾아진 G protein은 없었다. ASI 및 AWC 신경세포에서 발현하고 있는 Gα subunits은 밝혀져 있다

(Jansen et al., 1999). Cell-specific rescue 실험 결과를 바탕으로 해당 신경세포의 Gα subunits을 조사함으로써 나머지 Gβ, Gγ subunits도 찾을 수 있을 것이다.

G protein downstream에서 이 신호를 받는 target을 찾아야 할 것이다. GPCR의 신호를 받는 신경세포로서 nictation에 중요한 IL2 신경세포가 있지는 않는지 살펴볼 필요가 있다. 또한 위의 신호를 통해 인슐린 리간드 분비가 조절될 가능성이 있으므로 이 또한 조사해 볼 필요가 있다고 생각한다.

3. Nictation과 Insulin-like peptides의 연관성

ins-27, *daf-28* 유전자의 경우, outcross된 line으로 nictation test를 다시 수행할 필요가 있다. 본 연구자가 테스트한 해당 유전자의 결실 돌연변이체는 해당 유전자 외에 일부 다른 유전자들 또한 망가진 돌연변이체이기 때문이다. 따라서 해당 유전자의 결실 부분만 남기고 그 외 다른 유전자는 정상인 돌연변이체를 통해 *ins-27, daf-28* 유전자를 확인해야만 한다.

ins-28 rescue 실험 외에도 *ins-27, ins-34, daf-28* 유전자 돌연변이체에 정상 유전자를 넣어줌으로써 원래의 표현 형질로 돌아오는지를 살펴봐야하겠다.

ins-27, 28, 34, daf-28 유전자와 *daf-2* 유전자의 이중 돌연변이체의 nictation test를 하고 있다. 감각 뉴런에서 분비된 인슐린 리간드는

주변 세포로 확산되어 작용한다. 해당 인슐린 유전자는 nictation을 조절하기 위해서는 인슐린 수용체를 통해서만 작용해야 할 것이다. 이중 돌연변이체를 통해 해당 인슐린 유전자가 정말 인슐린 수용체를 통해 nictation을 조절하는지 확인하고 있다. *ins-28;daf-2*와 *ins-34;daf-2* mutants의 경우 *daf-2*만큼 nictation ratio가 올라가지는 않는 결과가 나타났다(unpublished data). 추가 반복 실험을 더 해야만 하는 상황이다.

해당 인슐린 유전자의 작용 지점을 알아보고자 어떤 신경세포에서 발현한 인슐린 수용체를 통해 인슐린 유전자가 nictation에 관여하는지 살펴보아야 한다. 선행 연구에서 인슐린 신호전달은 ASI 혹은 ASJ 신경세포에서 작용함을 알아본 바 있다. 앞으로 ASI와 ASJ에서 해당 인슐린 유전자가 중요한지 알아보고자 한다. 그러기 위해 *daf-2* 유전자를 넣어줌으로써 어느 신경세포에서의 nictation조절이 필수적인지를 알아볼 예정이다. *C. elegans*에서 지금껏 보고된 인슐린 수용체 상동유전자는 *daf-2* 유전자가 유일하다. 이중 돌연변이체 nictation 실험 결과를 통해 인슐린 리간드가 DAF-2 수용체를 통해 nictation을 하지 않는다면 *C. elegans*에 새로운 인슐린 수용체 상동유전자가 있을 수 있다는 가능성이 재기된다. 새로운 인슐린 수용체 상동유전자가 존재하고 이를 찾을 수 있다면 인슐린 신호전달 연구에 중요한 성과가 될 것이다.

또한 어느 시기에서의 리간드 발현이 nictation에 필수적인지를 연구해보아만 한다. 어떤 시기에서 해당 리간드가 작동하는가에 대한 문제

는 신경세포의 가소성 측면에서 중요한 의미를 가지게 된다. Dauer로 발생되는 시기에 해당 인슐린 리간드의 발현이 중요하다면 dauer 시기 때 nictation을 보다 잘 할 수 있도록 신경네트워크의 변화를 수반할 수 있다는 의미가 될 수 있기 때문이다.

Nictation과의 관련성으로 찾아진 네 개의 유전자(*ins-27, 28, 34, daf-28*)들이 어떠한 환경에 의해 분비되는지 알아보아야 할 것이다. 우선적으로 해볼 수 있는 실험으로 PA14 페로몬 배지에서 dauer를 만들어 nictation test를 해보았다. 현재까지 *ins-28*과 *ins-34* 유전자는 PA14에 의해 매개되는 nictation 행동 반응에 관여하지 않는 것으로 해석된다. 이 밖의 유전자들(*ins-27, daf-28*)에 대해서도 PA14실험을 하고 있는 중이다. 또한 nictation에는 관여하지 않으나 PA14에 의해 매개되는 nictation에는 관여하는 인슐린 리간드를 찾는 과정도 해보면 좋을 것 같다. PA14 외에도 해당 인슐린 리간드가 어떠한 환경을 인지하여 분비되는지 아는 것은 필요하겠다.

*C. elegans*의 마흔 개 인슐린 유전자 중 몇몇만이 연구가 되었을 뿐 대다수의 유전자에 대해서는 자세히 알려진 바가 없다. 또한 nictation과 관련하여 찾아진 인슐린 유전자(*ins-27, 28, 34, daf-28*)중 *ins-27, ins-28*과 *ins-34* 유전자에 대해서는 전혀 연구된 바가 없다. 최근 인슐린 유전자를 총체적으로 이해하려는 연구가 시도되고 있다(Ritter et al., 2013). 점차 많은 연구들이 개별 인슐린 리간드의 역할보다는 리간드 간의 상호작용을 살펴보고 있다(Fernandes de Abreu

et al., 2014). 그렇기에 nictation과 관련된 *ins-27, 28, 34, daf-28* 유전자들 간의 작용 네트워크를 규명하는 것 만으로도 큰 의미를 가질 것이다. 나아가 이 분자적 메커니즘이 포유류에서는 어떠한 행동을 조절하는데 사용되는지 알아보는 것 역시 중요하겠다.

또한 인슐린을 분비하는 감각뉴런은 환경을 인지하여 다양한 인슐린 리간드를 분비함으로써 사이신경(interneuron)세포의 특성(neural property)을 조절한다는 연구가 점차 진행되고 있다(Chen et al., 2013). 이러한 점에 미루어 볼 때, 본 연구의 인슐린 리간드가 nictation에 관련하는 신경세포들의 활성을 변화시킬 것으로 생각된다. 인슐린 신호전달계의 nictation 조절 메커니즘을 규명하는 것은 뉴런 가소성을 설명하는 좋은 예로서 기대 된다. 이 연구를 통해 신경계 발생의 유연성을 밝힌다면, 신경 재생 기전 연구의 기반이 되는 기초 연구로서 중요한 의미를 가질 것이다.

이렇듯 nictation은 *C. elegans*의 dauer 시기에만 보이는 행동이지만, 유전자의 기능과 신경계 다발의 역할 측면에서 이를 생물학적 결과인 행동의 변화를 알아보기 위한 방법으로서 중요한 가치를 가진다.

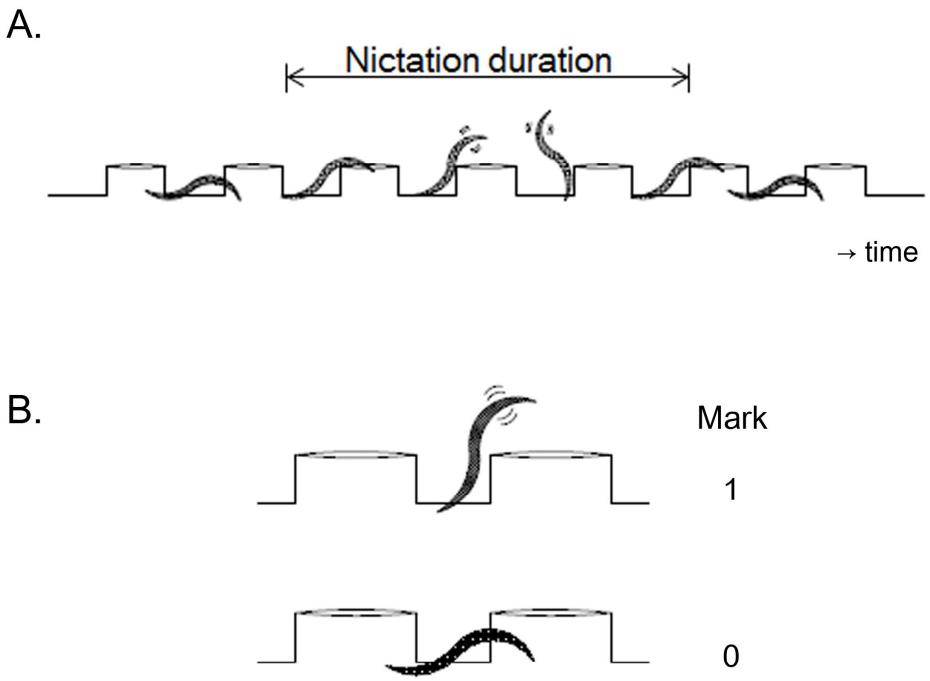


Figure 1. Two methods of nictation measurement. 머리를 들기 시작하는 시점부터 다시 머리를 내리는 시점까지의 시간 측정 방법 (A). 전체 dauer 중에서 몇 마리의 dauer가 nictation을 하고 있는지에 대한 비율 계산 방법 (B).

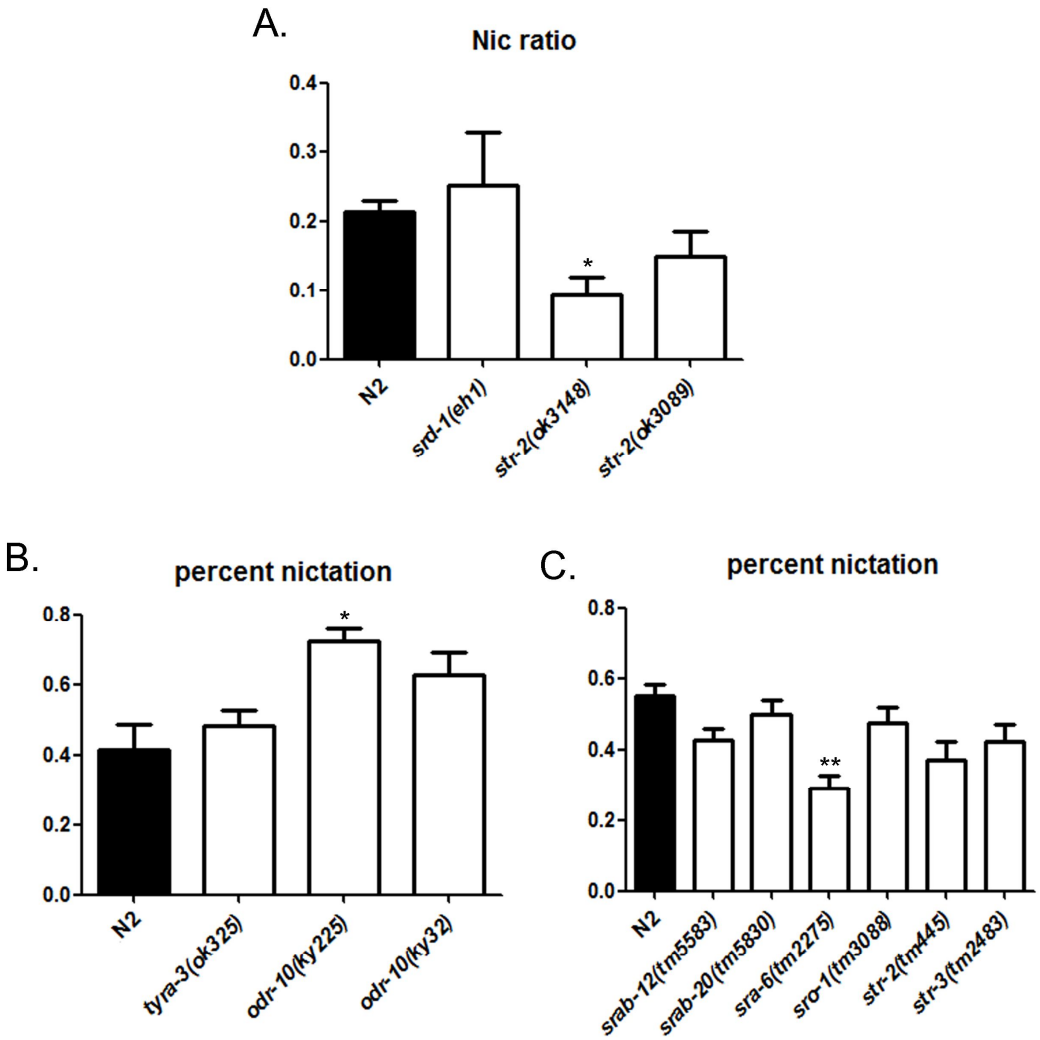
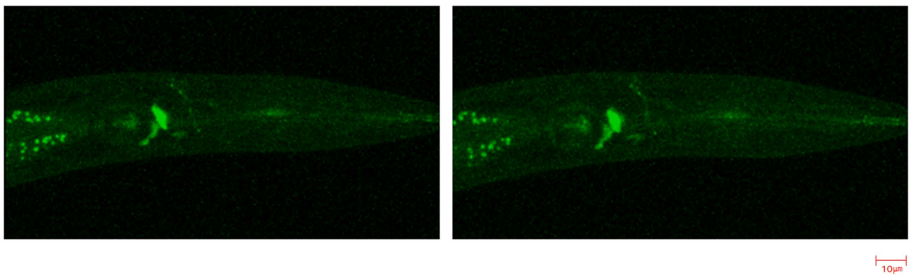


Figure 2. GPCR nictation screening test. 감각뉴런에서 발현하는 GPCR을 중심으로 nictation test를 통해, nictation에 관여하는 GPCR을 찾았다. Individual nictation test를 통해 STR-2 수용체 (A), population nictation test를 통해 ODR-10 수용체와 (B) SRA-6 수용체를 찾았다(C).

A.



B.

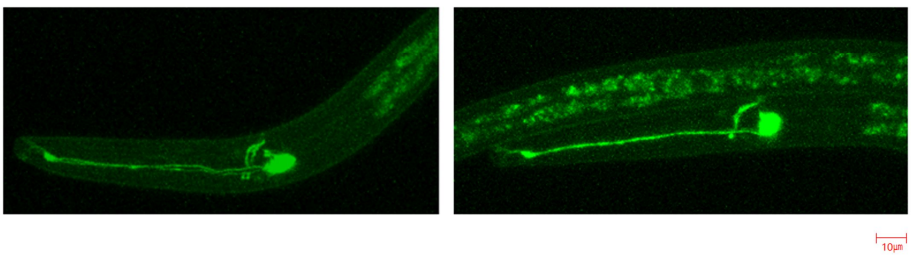


Figure 3. *Podr-10::gfp* expression pattern. *odr-10*의 발현은 non-dauer 시기에 AWA 뉴런에서 발현된다(A). Dauer시기에는 non-dauer 시기보다 더 강하게 AWA 뉴런에서 발현된다(B).

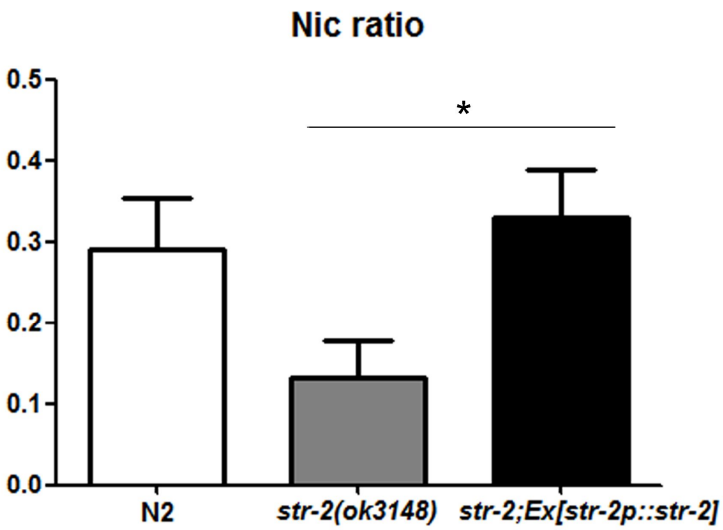


Figure 4. Rescue of *str-2* mutants with *str-2* gDNA. *str-2* mutants(outcrossed line)는 nictation을 잘하지 못한다. *str-2* mutants에 *str-2* gDNA를 미세주입 해준 결과 rescue되었다.

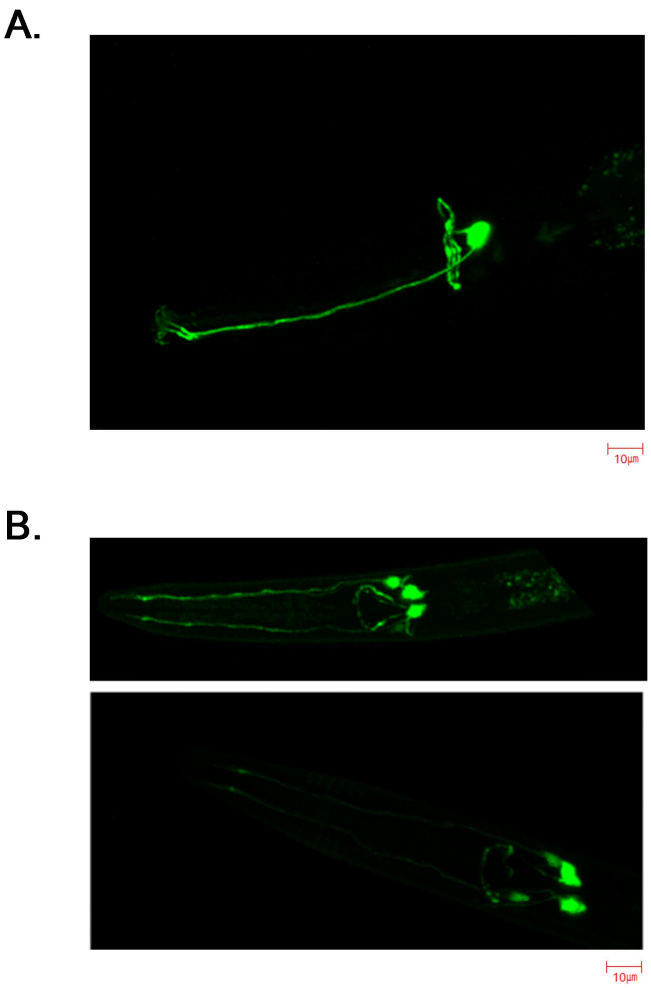


Figure 5. *Pstr-2::gfp* expression pattern. STR-2 수용체는 non-dauer 시기에는 AWC 뉴런에서 강하게 발현한다(A). 이 수용체는 dauer 시기에는 ASI 뉴런에서 주로 발현한다(B).

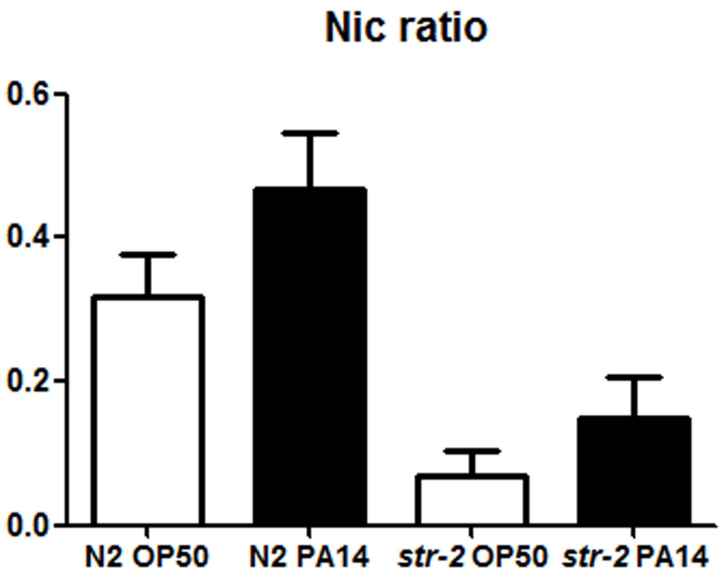


Figure 6. PA14 could increase nictation independently of *str-2*.
str-2 mutants는 여전히 PA14을 인지한다.

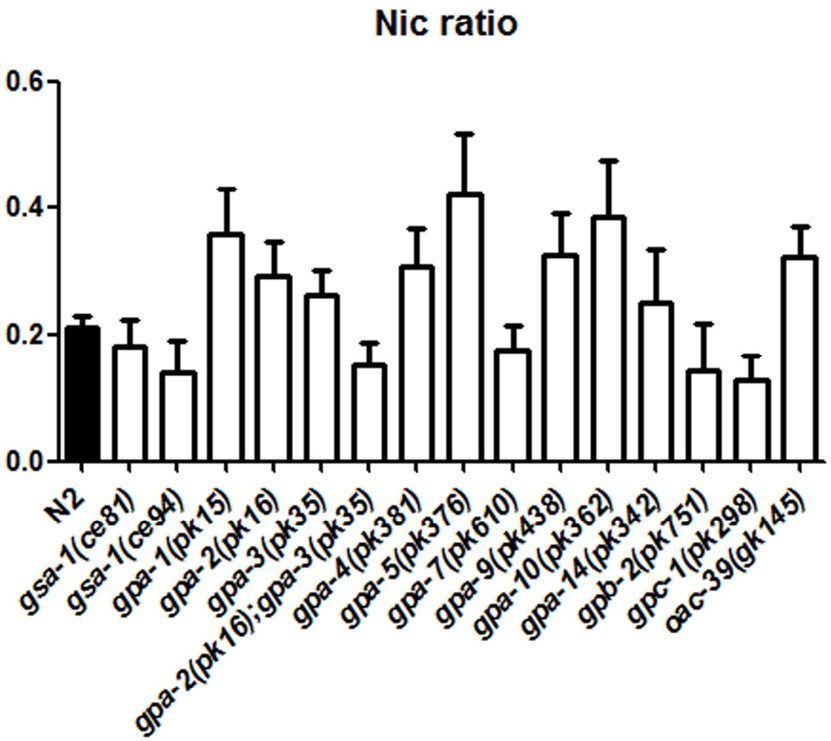


Figure 7. G protein nictation screening test. 감각뉴런에서 발현하는 G protein을 중심으로 nictation test를 하였다. 유의미한 결과가 나타나는 유전자는 없었다.

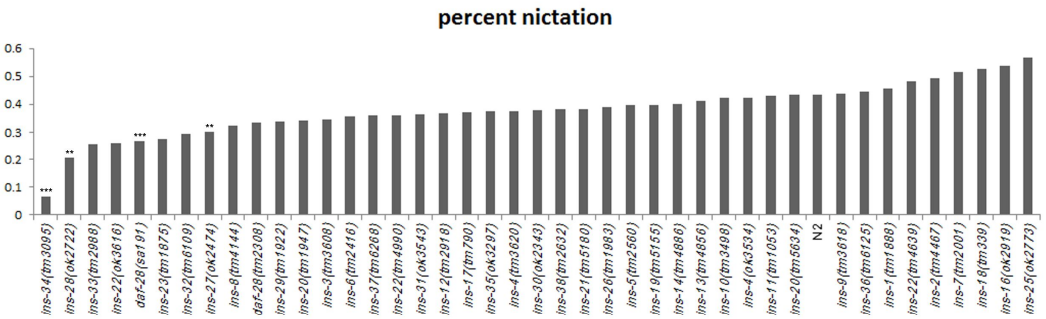


Figure 8. Insulin ligands nictation screening test. *C. elegans*의 마흔 개 인슐린 유전자들 중, nictation에 관련하는 유전자들은 *ins-27, ins-28, ins-34, daf-28*이다.

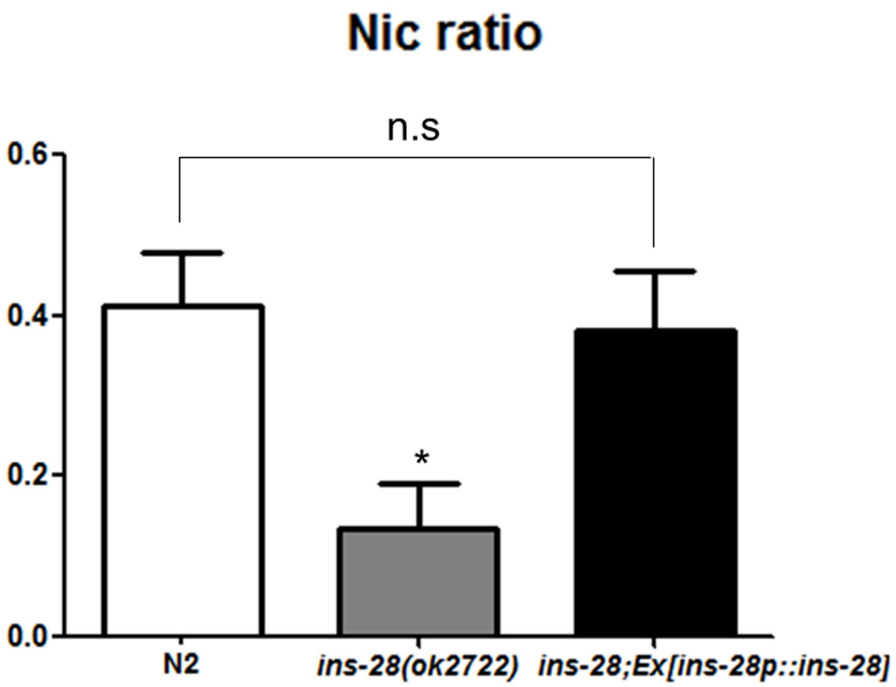


Figure 9. Rescue of *ins-28* mutants with *ins-28* gDNA. *ins-28* mutants(outcrossed line)는 nictation을 잘하지 못한다. *ins-28* mutants에 *ins-28* gDNA를 미세주입 해준 결과 rescue 되었다.

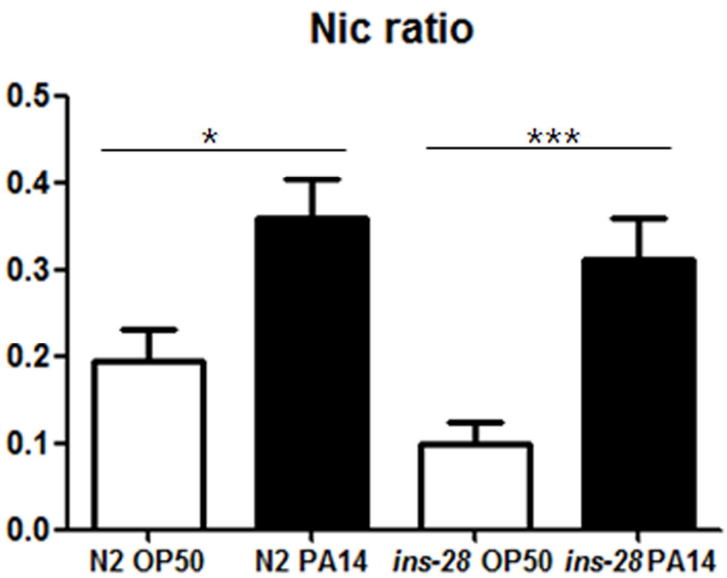


Figure 10. PA14 can increase nictation behavior. PA14 페로몬 배지에서 발생한 N2 dauer는 nictation을 잘한다. PA14에서 키운 *ins-28* mutants 역시 nictation을 잘한다.

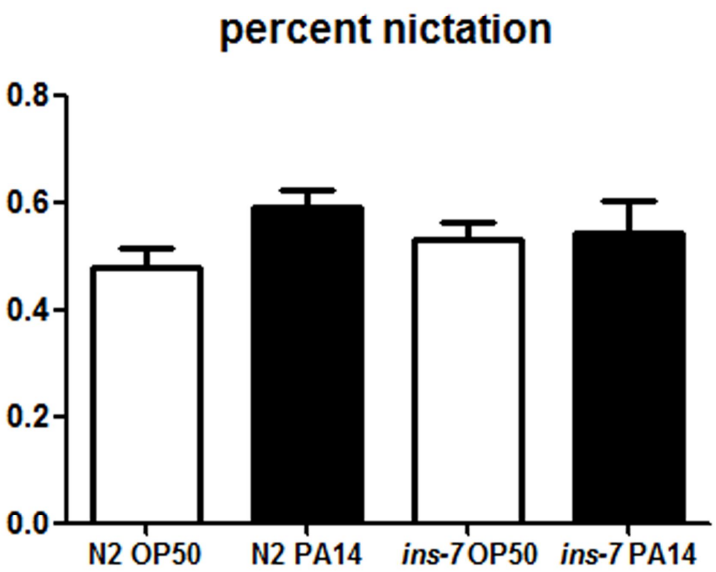
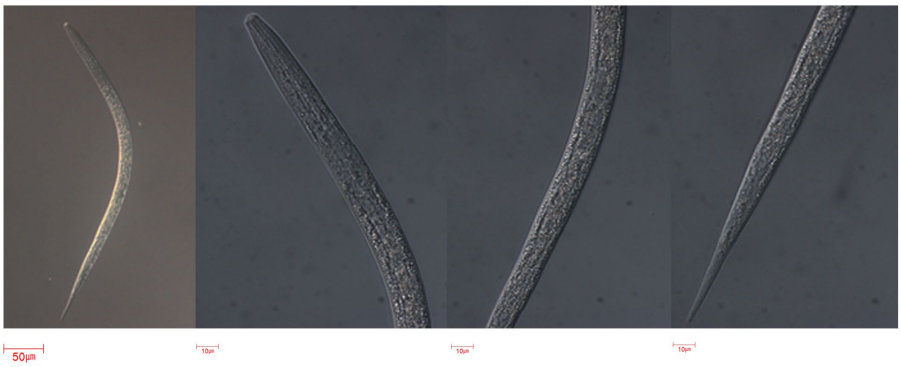


Figure 11. PA14 can increase nictation through *ins-7*. *ins-7(tm2001)*은 nictation phenotype이 없다. 하지만 PA14에 의해 매개되는 nictation반응에는 관련한다.

A.



B.

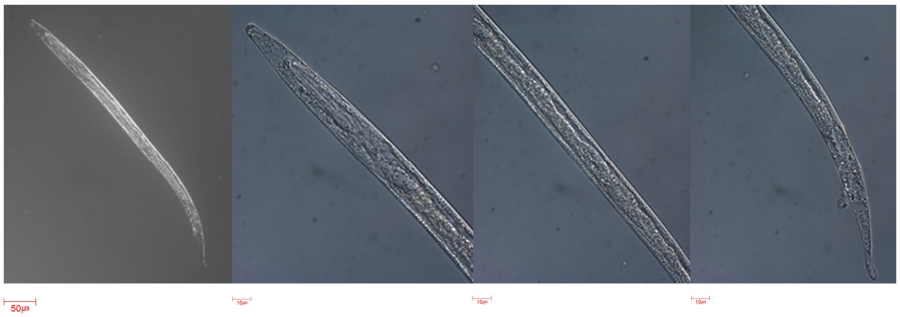


Figure 12. The picture of N2 dauer and *ins-15(ok3444)* dauer. N2 dauer와 같이 *ins-15* mutants 역시 cuticle로 몸이 감싸였다. 하지만 *ins-15* mutants는 dead-dauer로 많은 조직에서 괴사가 진행되고 있다.

참고 문헌

Bargmann, C.I., and Mori, I. (1997). Chemotaxis and Thermotaxis. In C elegans II, D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, and J.R. Priess, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Brenner, S. (1974). The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics *77*, 71-94.

Butcher, R.A., Fujita, M., Schroeder, F.C., and Clardy, J. (2007). Small-molecule pheromones that control dauer development in *Caenorhabditis elegans*. Nat Chem Biol *3*, 420-422.

Chen, Z., Hendricks, M., Cornils, A., Maier, W., Alcedo, J., and Zhang, Y. (2013). Two insulin-like peptides antagonistically regulate aversive olfactory learning in C. elegans. Neuron *77*, 572-585.

Croll, N.A., and Matthews, B.E. (1977). Biology of nematodes (Blackie & Son Limited.).

Fernandes de Abreu, D.A., Caballero, A., Fardel, P., Stroustrup, N., Chen, Z., Lee, K., Keyes, W.D., Nash, Z.M., Lopez-Moyado, I.F., Vaggi, F., *et al.* (2014). An insulin-to-insulin regulatory network orchestrates phenotypic specificity in development and physiology. PLoS genetics *10*, e1004225.

Hung, W.L., Wang, Y., Chitturi, J., and Zhen, M. (2014). A Caenorhabditis elegans developmental decision requires insulin signaling-mediated neuron-intestine communication. Development (Cambridge, England) *141*, 1767-1779.

Jansen, G., Thijssen, K.L., Werner, P., van der Horst, M., Hazendonk, E., and Plasterk, R.H. (1999). The complete family of genes encoding G proteins of Caenorhabditis elegans. Nature genetics *21*, 414-419.

Jeong, P.Y., Jung, M., Yim, Y.H., Kim, H., Park, M., Hong, E., Lee, W., Kim, Y.H., Kim, K., and Paik, Y.K. (2005). Chemical structure

and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. Nature *433*, 541-545.

Lans, W.J. (2005). Making Sense of G Proteins: Genetic analysis of sensory G protein signaling in the nematode C. elegans (Erasmus MC: University Medical Center Rotterdam).

Lee, H., Choi, M.K., Lee, D., Kim, H.S., Hwang, H., Kim, H., Park, S., Paik, Y.K., and Lee, J. (2012). Nictation, a dispersal behavior of the nematode Caenorhabditis elegans, is regulated by IL2 neurons. Nature neuroscience *15*, 107-112.

Meisel, J.D., and Kim, D.H. (2014). Behavioral avoidance of pathogenic bacteria by Caenorhabditis elegans. Trends in immunology *35*, 465-470.

Nagarathnam, B., Kalaimathy, S., Balakrishnan, V., and Sowdhamini, R. (2012). Cross-Genome Clustering of Human and C. elegans G-Protein Coupled Receptors. Evolutionary bioinformatics online *8*, 229-259.

Park, S., Hwang, H., Nam, S.W., Martinez, F., Austin, R.H., and Ryu, W.S. (2008). Enhanced Caenorhabditis elegans locomotion in a structured microfluidic environment. PloS one *3*, e2550.

Peckol, E.L., Troemel, E.R., and Bargmann, C.I. (2001). Sensory experience and sensory activity regulate chemosensory receptor gene expression in Caenorhabditis elegans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 11032-11038.

Ritter, A.D., Shen, Y., Bass, J.F., Jeyaraj, S., Deplancke, B., Mukhopadhyay, A., Xu, J., Driscoll, M., Tissenbaum, H.A., and Walhout, A.J. (2013). Complex expression dynamics and robustness in C. elegans insulin networks. Genome research *23*, 954-965.

Sagasti, A., Hisamoto, N., Hyodo, J., Tanaka-Hino, M., Matsumoto, K., and Bargmann, C.I. (2001). The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates. Cell *105*, 221-232.

Sengupta, P., Chou, J.H., and Bargmann, C.I. (1996). odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. Cell *84*, 899-909.

Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999). Killing of Caenorhabditis elegans by Pseudomonas aeruginosa used to model mammalian bacterial pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 715-720.

Appendix

1. 온도에 따른 nictation

Nictation은 환경에 대한 반응으로써 일어나는 행동이다. 온도가 nictation에 미치는 영향을 알아보기 위해 nictation을 측정하는 날마다 당시의 온도를 기록해보았다. 주목해서 볼 점은 27℃이다. 27℃에서는 nictation ratio가 낮아져 있다. 이 온도에서의 nictation 결함은 움직임과 관련한 문제일 수도 있다. Nictation 자체의 문제인지 알아보기 위해 motility를 분석해 보는 것이 필요하겠다. 만약 nictation 특이적인 문제라면 온도를 감지하면서 nictation을 조절하는 특정 뉴런이 있을 가능성이 있고, 그런 뉴런들의 후보들을 찾아 nictation test를 해보면 좋을 것 같다. 또한 24℃ 이하의 온도를 포함한 다양한 온도 조건에서 실험을 해보는 것이 필요하겠다(Figure S1A).

2. 습도에 따른 nictation

측정할 당시의 온도뿐만 아니라 습도도 기록해 nictation test를 해보았다. 측정할 당시의 습기의 variation이 크지 않아 40~50% 구간에 몰려있다. 그리고 이 때의 nictation 측정값에서는 어떠한 경향성이 보이지 않았다. 40~50% 구간에서의 습기 변화는 nictation에 큰 영향을 미치지 않는 다고 잠정적인 결론을 내릴 수 있었다(Figure S1B).

3. Micro-dirt chip의 말린 시간에 따른 nictation의 변화

Micro-dirt chip을 만들기 위해서는 agar를 굳히고, 주형이 되는 틀을 떼어낸 다음 37℃에서 1시간 30분 정도 말린다. 말리는 시간에 따라 nictation의 변화가 나타나는지 알아보기 위해 30분 간격으로 chip을 말려보았다. Chip을 30분 말릴 때 보다 1시간, 1시간 30분 말릴 때 nictation ratio가 줄어들었다. 하지만 2시간 말렸을 때 다시 nictation ratio가 증가하는 것을 미루어 보아 말린 시간은 아무런 차이를 나타내지 못한 다는 것을 알 수 있었다. 또한 chip을 말리다 보면 2시간과 2시간 반에서는 chip의 기둥 사이의 간격이 좁아지는 문제가 발생했다. 2시간 반을 말린 chip에서 nictation ratio가 감소하는 것은 chip 내의 습기 문제가 아닌, *C. elegans*가 chip의 기둥 사이가 아닌 기둥 위를 기어다녀 머리를 부딪히지 못하기 때문에 nictation이 감소한 것으로 해석 된다(Figure S2).

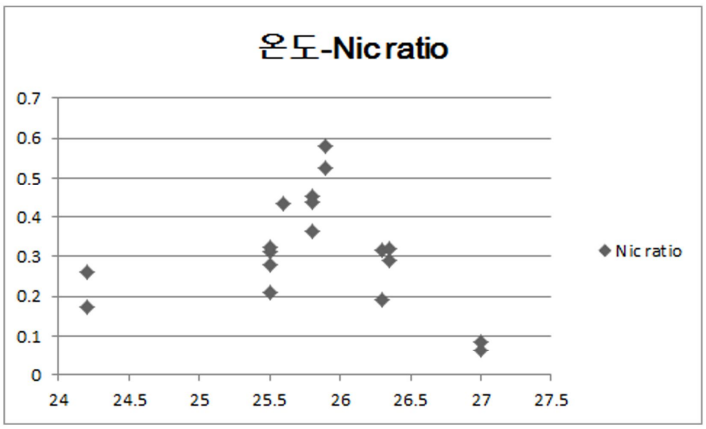
4. 한 시간 동안 *C. elegans*의 nictation 관찰

Nictation ratio의 차이가 *C. elegans*의 individual 내에 있는지 individual 간에 있는지 알아보기 위해 한 마리의 dauer를 chip에 올려놓고 chip을 탈출하기 직전까지를 observation time(t>40분)으로 잡고 1시간 동안 관찰하였다. Nictation을 관찰한 11마리의 individual 내 nictation ratio의 standard deviation을 계산해 본 결과 약 28%의 값이 나왔고, 이러한 값은 벌레들마다 유사했다. Individual 간의

nictation ratio의 standard deviation은 13% 정도이다(n=11). 이 결과로 individual 간의 nictation ratio의 차이보다는 individual 내의 nictation ratio의 차이가 더 크다는 것을 알 수 있었다. (individual 간의 nictation ratio의 값은 standing, quiescence의 시간도 포함되어 있는 값이라 standard deviation이 클 것이다. 그럼에도 불구하고 individual 내의 nictation ratio의 standard deviation 값보다 작다는 것은 이 결과가 더욱 확실하다는 것을 뒷받침하는 것 같다.) 따라서 nictation을 잘 하고 못하는 벌레가 있는 것이 아니라 개인 내에서 nictation ratio의 차이가 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

Nictation의 주기가 존재하는지 알아보고자 11마리의 dauer가 매 분마다 어느 정도의 nictation을 하는지 조사해보았다(Figure S3A). 이 그래프를 해석하기는 굉장히 어려웠다. 그래서 각각의 dauer마다 nictation을 시작하는 시점 사이의 간격을 계산해 보았다. Dauer가 1분 이상 움직이지 않는다면 이 시간은 제외하고 nictation 시작에서 다음 nictation의 시작까지의 시간을 조사해보았다(Figure S3B). 이 결과 약 20초 정도면 대부분의 dauer가 다시 nictation을 한다는 것을 알 수 있었다.

A.



B.

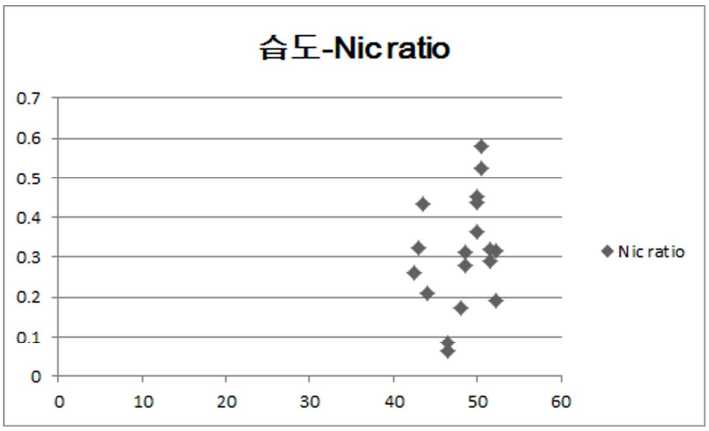


Figure S1. Nictation in temperature and humidity. 온도에 따른 nictation ratio의 변화 (A). 습도에 따른 nictation (B).

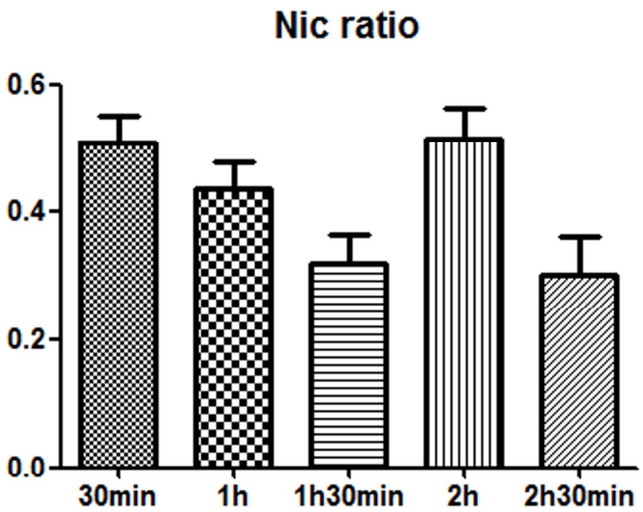
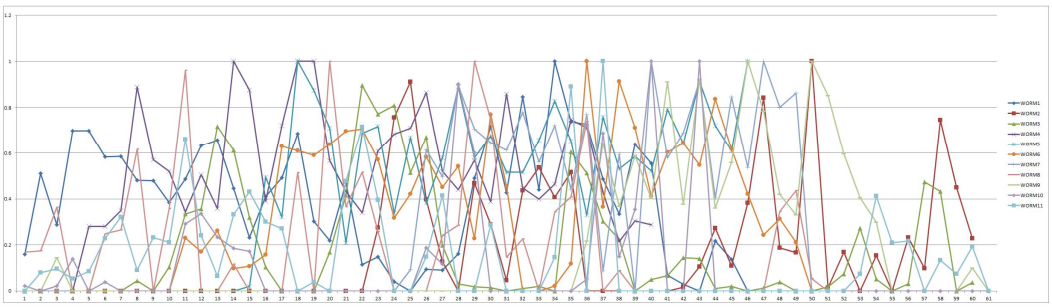


Figure S2. Nictation in accordance with the dried chip on time. Chip을 말린 시간에 따른 nictation의 유의미한 경향성의 변화는 관찰되지 않았다.

A.



B.

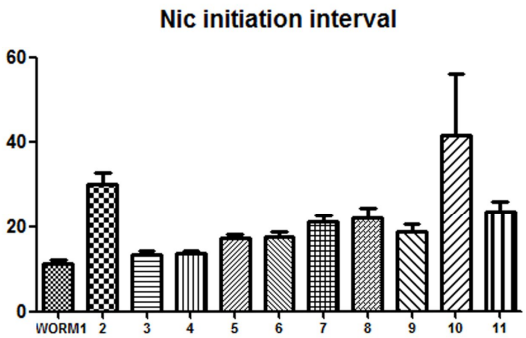


Figure S3. Observation of nictation for an hour. 1시간 동안 관찰한 dauer의 nictation ratio의 변화 (A). Dauer의 nictation시작 사이의 간격에 따른 nictation의 주기 관찰 결과 (B).

Abstract

The role of G protein-coupled receptors and insulin-like peptides in the regulation of a dispersal behavior

Biological Science

The Graduate School

Seoul National University

Caenorhabditis elegans is an excellent model organism in the study of neural development and behavior. *C. elegans* can have a variety of learning behavior and a number of complex actions, including withdrawal response, even though the nervous system has a very simple compared to the human or rat. *C. elegans* has been actively studied to identify the mechanism of action control.

When the food is limited or the population is too crowded, *C.*

elegans enters an alternative stage called the dauer. The dauer larvae usually do not move but show an unexpected behavior, nictation(Croll and Matthews, 1977). The dauer larvae climb up onto any projections and wave their head in three-dimensional space. This behavior is shown by worms at only dauer stage. The reason for nictation is easier to get on other objects such as insects. *C. elegans* can move into a new habitat for the survival and reproduction. This behavior could be understood that the evolutionarily well conserved dispersal behavior.

The study of nictation behavior did not progress due to lack of system development, which can be observed in the three-dimensional space. We established the behavior assay of nictation. So we quantitatively analyzed the nictation and had identified for the action of the nervous system and the gene involved in this action(Lee et al., 2012).

In this study, we investigated what signaling factors regulate the behavior of nictation. Especially this research will be focused on how GPCR and insulin ligands regulate this behavior.

We found *str-2, odr-10* and *sra-6* genes as the GPCR that plays a role in nictation behavior of *C. elegans*. The research that determines a neuronal network mechanism of *str-2* gene that

participates in *C. elegans* instinctive survivor behavior will help us understand the nerve system of animals with more complicated structure. p38 MAPKs that regulates the expression of *str-2* gene, is a signal that is also conserved in mammal and we could examine if the signal could regulate the expression of other genes in different animals such as mammals. Along with *str-2* gene, these genes have a potential to act in neuronal development, and play a role in regulating important behavior of *C. elegans* such as instinct survival behavior.

Currently, insulin is studied in the aspect of neural plasticity that regulates learning and memory. Among 40 insulin genes in *C. elegans*, our lab discovered *ins-27, 28, 34, daf-28* genes through the deletion mutants screening test. Insulin genes that are involved in nictation will suggest fundamental understanding of how neuronal network leads to behavior.

Evolution, which is a form of adaptation to environments from past to present, has caused the changes of behavior pattern in favorable ways to survive. Those changes are encoded in the genetic information. Therefore, the research that clarifies the linkage between environments and the behavior in molecular level will provide the fundamental information how evolution has

processed. We will study a dispersal behavior called nictation which is showed in dauer – an alternative developmental stage of *C. elegans* – in order to identify this linkage.

Key words : *C. elegans*, dauer, nictation, GPCR, insulin-like peptides, neural development, evolution

Student number : 2012-20294