

최 종
연구보고서

형질전환 누에를 이용한 락토페린의 생산
및 기능성 연구

Production of the Lactoferrin Using Transgenic
Silkworm and Its Functional Studies

연구 기관

농업과학기술원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환 누에를 이용한 락토페린의 생산 및 기능성 연구(세부과제 “락토페린 유전자도입 누에 형질전환용 벡터 개발”, 협동과제 “락토페린 유전자 도입에 의한 형질전환 누에품종 육성”, 협동과제 “형질전환 누에 발현 락토페린의 생리활성 연구”, 협동과제 “형질전환 누에 발현 락토페린의 효능과 안전성 확립”)의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14일

주관연구기관명 : 농업과학기술원

총괄연구책임자 : 강 필 돈

세부연구기관명 : 농업과학기술원

세부연구책임자 : 강 필 돈

연 구 원 : 김 용 순

연 구 원 : 손 봉 희

연 구 원 : 정 이 연

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 명 곤

협동연구기관명 : 안양대학교

협동연구책임자 : 피 재 은

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 박 제 학

요 약 문

I. 제 목

형질전환 누에를 이용한 락토페린의 생산 및 기능성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구목적

단백질 함량이 높은 누에는 옛날부터 천연 건강 보조식품으로 널리 사용되어 왔다. 특히 누에에서 혈당강화 작용이 밝혀지면서 그 용도는 식품뿐만 아니라 의약품으로서의 가능성도 보여 주고 있다. 즉, 누에가루의 복용으로 위나 장 속에서 다당류 분해를 억제하는 α -glucosidase를 억제하여 혈당상승을 막을 수 있음이 밝혀져 있다. 현재 누에에서 밝혀진 혈당강화 물질은 10여종에 달한다. 이러한 천연 건강식품으로서의 누에에 관한 과학적 접근이 일부 있으나 아직은 의학서에 기초하여 그 효과를 증명하고 있는 실정이다.

본 연구는 위와 같은 점에 주목하여 첨단 생명공학 기법을 이용하여 누에의 기능성을 강화하는 연구를 수행하고자 한다. 즉, 누에로부터 사람의 초유에 많이 함유된 항세균 및 면역증진 물질인 락토페린을 생산하는 형질전환 누에를 개발함으로써 누에의 건강식품 및 의약품으로서의 기능성을 더욱 강화하고자 하는 것이다. 선진국, 특히 일본은 이미 누에에서 기능성 단백질의 생산이 산업화되어 있는 실정이다. 따라서 누에의 이용가치를 높이기 위해 우리나라도 새로운 기술적 투자가 필요하다. 이것은 곧 WTO 체제하에서의 농촌의 경쟁력 강화에 도움을 줄 것으로 생각된다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

사람 락토페린을 생산하는 유전자를 누에의 액틴 promoter 또는 피브로인 promoter에 의해 락토페린을 대량으로 발현하는 재조합 벡터를 만든 후 이를 누에의 염색체 속으로 형질전환(transgene)시킴으로써 락토페린을 생산하는 새로운 누에품종을 개발하고자 한다. 이렇게 작성된 재조합 형질전환 누에로부터 만들어진 락토페린은 여러 용도로 사용될 수 있으리라 생각되며, 본 연구에서는 누에가 가진 천연 식품으로서의 기능과 더불어 새로운 기능을 부여하고자 한다. 즉 락토페린이 가진 항 박테리아 작용을 이용하여 가축의 생산성을 저하시키는 각종 박테리아 유래 감염질환, 즉 설사나 기생충 감염의 치료에 사용할 수 있다. 이는 락토페린 생산 누에를 고기능성 사료로 이용할 수 있기 때문이다. 한편 락토페린의 항바이러스 작용, *Helicobacter pylori*에 대한 억제 작용, 면역 증강 작용이 있으므로 이러한 기능성이 부가된 누에가루는 획기적인 건강 상품이 될 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 누에로부터 생산되는 락토페린을 추출, 정제하여 이의 식품 및 의약품으로서의 가능성을 연구하고, 동시에 락토페린 생산 누에를 분말로 하여 건강식품 및 건강 보조식품 그리고 기능성 사료화에 대한 연구를 수행하고자 락토페린을 생산하는 형질전환 누에를 개발하고자 한다.

나. 경제·산업적 측면

누에는 주로 비단 생산을 목적으로 사육되어 왔다. 그러나 누에의 의학적 효과가 현재의 과학적 접근에 의해 밝혀지면서 건강 보조식품이나 의약품으로서의 가능성이 높아졌다. 특히 혈당 강하 작용에 의한 당뇨병에 탁월한 효과와 함께 누에의 오줌이 항암 효과가 있는 것이 밝혀졌다. 이와 같은 누에의 효과는 누에가 가진 상품으로서의 가능성이 매우 높음을 암시한다. 그러나 이와 같은 여러 기능과 작용이 있는 누에의 상품화는 국내에서 누에 가루의 제조에 그치고 있고, 세계적 건강 보조 식품으로서의 위치는 아직 확보하지 못하였다.

따라서 누에의 여러 특징을 이용하여 생명 공학 기법을 이용한 특수한 기능을 부

여하는 것이 필요하다. 전술한 바와 같이 이미 일본 등지에서는 누에로부터 유용한 사람 단백질, 즉 사람의 성장 호르몬, insulin-like growth factor(IGF), 인터페론 등을 생산함으로써 누에를 고부가가치 상품으로 개발하려는 시도가 진행 중이다. 그러므로 우리나라도 이와 같은 국제적 환경에 대응하여야 하고, 한편으로 WTO 체제하에서 농촌의 특성화를 위한 한 방편으로 이와 같은 시도가 바람직하다고 생각된다.

다. 사회·문화적 측면

우리나라 농촌은 노동력의 고령화로 재래식 방법으로 농사를 짓기 어려운 점이 있다. 그러므로 농가의 고소득 창출을 위한 신기술의 개발 및 이의 적용이 매우 시급하다. 이러한 시도는 WTO 체제하에서 우리 농촌의 경쟁력 강화와 우리 농산물이 세계적 상품으로 자리 잡을 수 있는 기초가 될 것이다. 본 연구에서는 이런 점에 착안하여 신기능을 도입한 형질전환 누에를 개발하고자 한다. 누에가 비단을 뽑는 곤충에서 당뇨병에 효능이 있는 제품으로서의 가능성이 밝혀졌으나, 현 상태로는 국제적 경쟁력이 있는 상품으로 개발하는 것은 매우 어렵다. 따라서 본 연구에서는 사람 락토페린을 대량 생산하는 형질 전환 누에를 개발 하고자 하는 것이다. 누에로부터 생산된 락토페린은 사람의 몸속에 소량 분비되는 락토페린과 여러 특징적인 면에서 똑같기 때문에 건강 보조 식품이나 의약품 개발 등의 고부가가치를 창출 할 수 있다. 또한 락토페린을 생산하는 형질전환 누에 자체를 대량생산하여 특수 기능성사료를 개발 할 경우 가축 등의 질병 치료 효과에 의한 생산성 향상을 이룰 수 있고, 이러한 첨단기법에 의해 제조된 누에를 농가에서 키울 경우 적은 노동력으로 고소득을 올릴 수 있을 것으로 생각된다.

한편, 형질전환 누에 개발에 의한 락토페린의 대량생산은, 그 동안 사람 락토페린을 얻을 수 없어 극소량만 사용되어 왔던 여러 분야에 사용 될 수 있음으로써 국민의 건강 증진에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제1협동과제에서는 락토페린 cDNA 클로닝을 위해 사람의 HL-1 세포주로부터

mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하고, PCR을 통하여 락토페린 cDNA를 클로닝 벡터를 이용하여 TA클로닝 한다. PCR 도중에 발생할 가능성이 있는 돌연변이의 가능성을 최소화하기 위하여 pfu enzyme을 PCR에 첨가하고, 클로닝 된 cDNA는 염기서열을 sp6와 T7 primers를 사용하여 2회 이상 결정한다.

한편, 락토페린을 과발현하는 형질전환 누에를 개발하기 위한 벡터 개발을 위해 벡터는 플라스미드와 트랜스포존을 토대로 한 것을 채택한다. 즉 플라스미드 벡터 뿐 아니라 트랜스포존 벡터를 개발하여 형질전환 누에를 개발한다. 트랜스포존 벡터 제작은 플라스미드 벡터 개발보다 많은 시간이 소요되나 그 발현성이 높으므로 시도하여 형질전환 누에 개발에 사용한다. *piggyBac*은 곤충에 사용되는 트랜스포존 벡터인데, 이들의 제작을 용이하게 할 목적으로 셔틀벡터를 우선 제작하고, 이를 토대로 트랜스포존 벡터 개발에 착수한다. 각각의 벡터를 개발한 후에는 단백질 발현 목적으로 자주 사용되는 곤충세포인 Sf9 cell을 이용하여 세포에서의 벡터의 용이성을 검증하고, 형질전환을 담당하는 세부과제 팀에 공급한다. 세부과제 팀과의 지속적인 feedback을 통하여 락토페린의 발현에 가장 효율적인 벡터를 개발한다.

제1세부과제인 락토페린 유전자 도입 형질전환 누에품종 육성 연구에서는 누에 유전자원으로 보존하고 있는 지리적 누에품종이 갖고 있는 특이적 유전형질을 검토하고, 또한 사육 및 생육특성 등을 비교하여 형질전환 시험에 이용할 수 있는 우수 누에 원종을 선발한다. 그리고 협동과제 1에서 제작한 형질전환을 위한 재조합 벡터의 host 특이성 및 전이활성을 검토하기 위해 곤충세포인 Sf9 또는 누에 유래의 BmN 세포에 대한 재조합 벡터 도입으로 형질전환 세포를 만든다. 그런 다음 배양된 각 세포에서 플라스미드를 추출하여 Southern blot 분석법으로 재조합 벡터의 도입 여부를 확인한다.

또한 DNA 미량주입장치를 이용하여 누에알에 재조합 벡터를 도입시키는 기술을 확립하기 위해 재조합 벡터를 누에알에 주사한 후, 누에알을 25℃에서 부화시켜 사육시킨 유충에서 플라스미드를 추출하고 Southern blot 분석법을 이용하여 외래유전자의 도입여부를 확인한다. 형질전환 누에에 도입된 외래유전자가 성충간의 교배에 의해 G1 이후의 세대에서도 안정적으로 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여, 각 세대에서 선발된 형질전환 누에 개체에서 게놈 DNA를 추출하여 PCR과 Southern

blot 분석법에 의해 계놈상의 목적유전자 존재를 확인한다.

제2협동과제인 형질전환 누에 발현 락토페린의 생리활성 연구에서는 형질전환 된 누에로부터 대량 생산되는 사람 락토페린 단백질의 생리활성, 특히 항암성에 대한 효과 연구를 목표로 하였다. 현재까지 보고된 락토페린의 항세균성, 항진균성, 항바이러스성, 항염증성, 항암성 등의 여러 유용성을 토대로 볼 때, 이 단백질의 사료 또는 식품으로의 사용 가치는 매우 높아 이러한 면에서 락토페린의 생리적 활성, 특히 항암 기능에 관한 연구는 필요하다. 따라서 이러한 락토페린의 항암적인 기능을 관찰하여 개발된 형질전환 누에에서 얻어지는 락토페린의 기능을 규명하고 누에에서 생산되는 락토페린을 이용한 산업화를 위한 중요한 자료를 제공한다. 이를 위해 형질전환 누에 개체에 따른 항암 능력 차이 비교와 형질전환 된 누에로부터 추출된 락토페린의 안전성 평가를 수행하였다.

제3협동과제인 형질전환 누에 발현 락토페린의 효능과 안전성 확립 연구에서는 형질전환 된 누에로부터 생산된 사람 락토페린의 효능과 안전성 확립을 목표로 하였다. 이를 위해 형질전환 된 누에로부터 추출된 락토페린의 항균 및 항암효과의 검색하고 형질전환 된 누에로부터 추출된 락토페린의 안전성 평가를 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 락토페린 유전자도입을 위한 누에 형질전환용 벡터 개발

본 연구에서 사람의 GI-101 cell line에서 추출한 mRNA를 이용하여, 사람 lactoferrin cDNA를 클로닝 하였고, 이를 곤충세포에서 발현될 수 있도록 곤충 발현용 플라스미드와 트랜스포존 벡터에 각각 subcloning하여, 누에 발현용 플라스미드벡터 (pIZT-lactoferrin)와 트랜스포존 벡터 (*piggyBac*-lactoferrin)를 개발하였다. 누에 형질전환에서 발현 벡터 구축은 도입유전자를 효율적이고 강력하게 발현하는 것이 무엇보다도 중요하다. 이런 측면에서 프로모터로써 이용한 누에 세포질 액틴 프로모터는 누에 형질전환용 벡터 구축에 적합한 것이라고 생각된다. 아울러 누에에 있어 부위 특이적 또는 시기 특이적인 프로모터가 개발된다면 보다 효율적인 외래유전자 발현

시스템이 구축되리라고 생각된다. 예를 들면 누에 건사선의 피브로인 프로모터나 세리신 프로모터를 클로닝 하여 누에 형질전환용 전이벡터로 이용한다면 목적 단백질을 발현시키고 회수하는데 적은 비용으로도 효율이 높은 물질생산이 가능할 것으로 생각된다. 따라서 금후에는 보다 폭넓은 프로모터의 연구 개발이 수행되어야 할 것이다. 또한 누에 게놈 내에 목적유전자를 삽입시키기 위해 움직이는 유전자라고 불리우는 트랜스포존을 이용하고 있는데, 최근의 연구 성과에서는 이 트랜스포존과 바이러스의 감염 시스템을 융합시킨 유전자 전이 방법이 개발되고 있고, 어느 정도의 성과를 보이고 있다. 따라서 누에 형질전환에 있어 목적유전자를 보다 효율적으로 또한 간단한 방법으로 삽입시킬 수 있는 분자생물학적 연구가 지속적으로 있어야 될 것으로 생각된다.

2. 락토페린 유전자도입에 의한 형질전환 누에품종 육성

본 연구에서는 누에 유전자원으로 보존하고 있는 지리적 누에품종(321종) 중에서, 인공사료 사육에 적합하고 침산(HCl) 처리에 의한 인공부화 조작이 필요하지 않은 다화성 계통의 열대 품종 HM이 microinjector를 이용한 형질전환 실험에 적합한 품종으로 선발하였다. 또한 lipofectin을 이용한 형질전환 BmN 세포주에서 전이벡터에 의한 누에 게놈 DNA상으로의 target gene 전이를 Southern blot hybridization으로 확인하였다. 따라서 BmN 세포주에서의 전이벡터에 의한 전이활성이 확인되었기 때문에 2차년도에 외래유전자 도입을 목적으로 하는 누에 형질전환 실험에 적용할 수 있을 것이다. Microinjector를 이용하여 누에알에 전이벡터를 주사한 후, 주사한 누에알은 25℃, 습도 25%로 유지되는 사육실에서 부화 및 사육하였다. 그 결과 누에 유충이 2-3령 시기에 형광 실체현미경을 사용하여 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 개체를 선발하였다.

본 실험을 통해 누에알에 DNA를 미량으로 주사하여 외래유전자를 도입시키는 microinjector 시스템으로 형질전환 개체가 얻어진 것은 국내의 누에 형질전환에 있어 물질생산을 위한 곤충 생체 공장화라는 기초 및 응용연구 분야에 이용될 가능성이 클 것으로 기대된다. 하지만 외래 유전자가 도입된 형질전환 개체는 외부 환경에 대해 비교적 감수성인 경향을 보이고 있어, 일반적인 사육 방법이나 환경이 무엇보다 중요

하다고 판단되었다. 또한 형질전환 개체를 선발하고 세대 간 교잡이나 계대사육을 위해서 많은 노동력과 시간이 필요하다. 때문에 형질전환 누에 품종으로써 그 형질을 고정시키고 품종을 유지하는데 장기적인 연구계획을 가지고 수행이 될 수 있었으면 한다.

3. 형질전환 누에 발현 락토페린의 생리활성 연구

본 세부 연구과제는 락토페린을 발현하는 누에 추출물의 항암적 효과를 연구하고자 사람의 종양세포에 형질전환 추출물을 적용하여 아포토시스 발생, 마이크로어레이 등을 이용한 유전자 발현 실험을 실시하였다. 판매되는 락토페린순물질과 비교해 본 바, 락토페린을 발현하는 누에 추출물의 부분적인 효과가 발견되었다.

4. 형질전환 누에 발현 락토페린의 효능과 안전성 확립 연구

1차, 2차년도 과제 수행 시, 천연락토페린의 식중독균(*Listeria monocytogenes*) 감염 및 Tumor bearing mice (lewis lung carcinoma cell)에 대한 항생 및 항암 효력을 관찰하였다. 3차 년도에는 락토페린을 발현하는 누에에서 체액을 추출하여 8주간 경구투여 후 1, 2차 년도에서 확립한 락토페린의 효력평가 방법에 의하여 그 효력을 평가하였다. 또한, 재조합 락토페린을 발현하는 형질전환 누에에서 추출한 체액에 대하여 안전성 평가를 수행하였으며, 암컷 BALB/c 마우스에 2000mg/kg 의 누에 체액을 2개월간 매일 경구 투여 후 알러지 유발성 평가, 장내세균총의 변화 평가 및 반복독성시험을 수행하였다.

상용화 되어있는 천연 락토페린이 효력을 나타내는 질병모델을 제작하고, 이를 양성 대조군으로 하여 항생, 항종양성을 평가하여 본 결과, 천연락토페린에서는 *L. monocytogenes* 과 LLC tumor 에 대하여 항생, 항암 효과를 관찰하였으나, 형질전환 누에의 체액에서는 같은 효력을 관찰 할 수 없었다. 또한, 안전성의 측면에서 형질전환 누에체액을 평가하였을 때, 최고 농도(2000 mg/kg) 로 경구 투여 시 Serum IgE, 장내 세균총의 숫자, 체중 및 사료섭취량을 변화시키지 않았으며 현미경 관찰 시 독성변화도 관찰되지 않았다.

SUMMARY

1. Development of the human lactoferrin expression vectors for transgenic silkworm, *Bombyx mori*.

Two human lactoferrin expression vectors were developed in this study. cDNA cloning of human lactoferrin and subcloning of the cDNA into vectors for the expression in insect cells were performed. Human lactoferrin cDNA was prepared using mRNA from GI-101 cell line. The insect expression vectors used include the plasmid vector pIZT and the transposon vector piggybac. Two human lactoferrin expression vectors developed in this study are pIZT-lactoferrin and *piggyBac*-lactoferrin.

2. Breeding of transgenic silkworm harboring the human lactoferrin gene

Lactoferrin, an iron-binding 80-kDa glycoprotein, has been suggested to have many biologic activities, such as facilitating iron absorption and having antimicrobial and antiinflammatory effects. Several of these activities are likely to only be facilitated by human lactoferrin because they depend on the binding of human lactoferrin to specific receptor. To produce recombinant human lactoferrin to animal foods using transgenic silkworm, *Bombyx mori*, we have cloned and sequenced the cDNA encoding for a human lactoferrin(HLf) from the mRNA in mammary tumor line(GI-101). As a result, the 2.5-kb fragment of HLf gene was cloned with pGEM-T vector and than this fragment was sequenced. In the nucleotide sequence analysis, single open reading frame of the 2,136-bp encoding for a polypeptide of 712 amino acid residues was detected.

On the other hand, we constructed a recombinant plasmid(pPT-HLf), containing human lactoferrin gene for germline transformation of the silkworm *B. mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. A nonautonomous helper plasmid

encodes the *piggyBac* transposase. Approximately 3.6% of individuals in the F0 silkworms expressed GFP. PCR analyses of GFP-positive F0 silkworms revealed that independent insertions occurred frequently. On the basis of these experiments, expression of Hlf in G1 generation of transgenic silkworm is now in process.

3. Studies of a physiological activity against transgenic silkworm-product, containing recombinant human lactoferrin(rLF)

This project focused on the anti-tumor effect of extract from transgenic silkworm developed to express human lactoferrin. For the purpose, apoptosis of human hepatoma cells, mRNA expression in human cells by insect extract using microarrays. Compared to pure lactoferrin commercially available, the extract of transgenic silkworms has only partial effect on human apoptosis.

4. Studies of effects on transgenic silkworm-product, containing recombinant human lactoferrin(rLF), and the establishment of safety

We investigated the effects of silkworm-product (hemolymph), containing recombinant human lactoferrin (rLF), using both the murine listeriosis model and the Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells bearing mice.

Against murine listeriosis: Hemolymph and human LF (hLF) was administered to BALB/c mice for 56 and 7 days, respectively, commencing 4 days before oral infection. The effect of these proteins was determined by bacterial enumeration and histopathological analysis of the liver and spleen, which are well-known as the major targets of oral listeria infection in mice. In bacterial enumeration, hLF decreased the number of *L. monocytogenes* cells in the liver. Histopathologically, the size and frequency of necrotic foci in the liver samples decreased with hLF administration. However, these changes were not observed in the mice fed hemolymph.

Against LLC tumor-bearing mice model: Twelve days after subcutaneous

inoculation of 10^6 Lewis lung cells into C57BL/6J mice, mice had primary tumors with an average volume of 370 mm^3 (ab^2) without either hemorrhagic or necrotic lesion in the center of tumors. However, compared to the control mice, the tumor size was significantly reduced (average volume: 212.5 mm^3) by subcutaneous injection of 25 mg/kg hLF per daily for 3 days ($p < 0.05$). In histopathological view, the tumors had centralized cell death and hemorrhage, and it was positive to TUNNEL reaction. However, there are no anti-tumor effects of hemolymph in the LLC tumor bearing mouse, even though the hemolymph was orally inoculated for 56 days.

In addition, the safety and toxicity of the hemolymph was also evaluated :

Six weeks old female BALB/c mice were daily fed with 2000 mg/kg hemolymph for 60 days. After administration, total IgE, hemolymph specific IgE, bacterial enumeration of small intestine and evaluation of toxicity were performed. The toxicity was evaluated by food intakes, weight gain, histopathological analysis and blood test. The result showed that all of those parameters were not changed by hemolymph-feeding.

CONTENTS

Summary	2
Contents	17
Chapter 1. Outline of the report on development of research	21
Section 1. Objectives and necessities of the development of research	21
1. Objectives of research	21
2. Necessities of the development of research	21
1) Technical scope	21
2) Economical scope	22
3) Social scope	22
Section 2. Scope of research	23
Chapter 2. Statues of research in Korea and other countries	25
Section 1. Recent research trend in Korea and other countries	25
Section 2. Position of the outcome of the research at the present status of progress	27
Chapter 3. Contents and products of the development of research	29
Section 1. Development of the human lactoferrin expression vectors for transgenic silkworm, <i>Bombyx mori</i>	29
1. Introduction	29
2. Materials and methods	29
1) Cloning of cDNA lactoferrin gene	29
2) Construction of the pIZ-lactoferrin vector	30
3) Construction of the pXINSECT-lactoferrin vector	30
4) Construction of the shuttle vector	30

5) Construction of the <i>piggyBac</i> -lactoferrin vector	31
6) Method of cDNA cloning and vectors	31
7) Design of PCR primers for lactoferrin cloning	32
3. Results and discussion	33
1) Cloning of cDNA lactoferrin gene	33
2) Construction of the pIZ-lactoferrin vector	36
3) Construction of the pXINSECT-lactoferrin vector	36
4) Construction of the <i>piggyBac</i> -lactoferrin vector	37
4. Conclusion	38
Section 2. Breeding of the transgenic silkworm, <i>Bombyx mori</i> , harboring the human lactoferrin gene	39
1. Introduction	39
2. Materials and methods	40
1) Selection of silkworm races	40
2) Research of host cell specificity	41
3) Induction of foreign gene	42
4) Expression test of foreign gene	43
5) Preparation of DNAs for transgene	43
6) Preparation of silkworm eggs	43
7) Hatching and rearing of silkworm larvae	43
8) Experiment of transgenic silkworm larvae	44
9) Selection of transgenic silkworm larvae	45
10) Breeding of transgenic silkworm larvae	45
3. Results and discussion	45
1) Selection of silkworm race	45
2) Research of host cell specificity	47
3) Expression test of foreign gene	48
4) DNA microinjection and selection of transgenic silkworm	49

5) Selection of transgenic silkworm larvae	49
6) Examination of the GFP gene by PCR reaction	50
7) Breeding of transgenic silkworm larvae	51
4. Conclusion	51
Section 3. Studies of a physiological activity against transgenic silkworm	
-product, containing recombinant human lactoferrin(rLF)	53
1. Introduction	53
2. Materials and methods	53
1) Preparation of lactoferrin	53
2) Preparation of total RNAs	53
3) DNA fragmentation	54
4) Cell membrane alterations	54
5) Enzymatic activity	55
6) Expression of apoptosis-related proteins	55
7) Analysis of cell cycle	55
8) Research of cell death by lactoferrin	57
9) Research of cell cycle by lactoferrin	57
10) Research of cell death by recombinant human lactoferrin	57
11) Research of cell cycle by recombinant human lactoferrin	57
12) cDNA microarray	58
3. Results and discussion	60
1) DNA fragmentation	60
2) Analysis of gene with cDNA microarray in HepG2 treated lactoferrin and silkworm extracts	60
3) Comparison of tumor cell propagation by lactoferrin and silkworm extracts	66
4) Comparison of anti-apoptosis gene expression, TNFAIP3, with lactoferrin and silkworm extracts in HepG2 cell line	68

4. Conclusion	70
Section 4. Studies of effects on transgenic silkworm-product, containing recombinant human lactoferrin(rLF), and the establishment of safety ·	71
1. Introduction	71
2. Materials and methods	71
1) Construction of model system using <i>Listeria monocytogenes</i>	71
2) Construction of model system using <i>Salmonella enteritidis</i>	72
3) Examination of antibiotic effects with a natural latoferrin on <i>Listeria monocytogenes</i>	73
4) Examination of antibiotic effects on <i>Listeria monocytogenes</i>	75
5) Test of anti-cancer effects on Lewis lung carcinoma (LLC)	77
6) Test of safety on transgenic silkworm extracts	79
7) Examination of IgE	80
8) Test of normal bacterial colony changes by resistant to antibiotic ·	81
3. Results and discussion	81
1) Construction of model system using <i>Listeria monocytogenes</i>	81
2) Construction of model system using <i>Salmonella enteritidis</i>	85
3) Examination of antibiotic effects with a natural latoferrin on <i>Listeria monocytogenes</i>	89
4) Examination of antibiotic effects on <i>Listeria monocytogenes</i>	95
5) Test of anti-cancer effects on Lewis lung carcinoma (LLC)	98
6) Test of safety on transgenic silkworm extracts	104
7) Examination of IgE	108
8) Test of normal bacterial colony changes by resistant to antibiotic	109
4. Conclusion	110
Chapter 4. Achievements and contribution of the studies to the related fields ·	111
Section 1. Objectives of the research	111

Section 2. Yearly objectives of the research	115
Section 3. Standpoints of evaluation and accomplishment of the research	118
Chapter 5. Plans for the application of the research	119
Section 1. Necessities for further research	119
Section 2. Applications to other studies	119
Section 3. Research results	120
Chapter 6. References	121

목 차

요 약 문	2
목 차	17
제 1 장 연구개발과제의 개요	21
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	21
1. 연구목적	21
2. 연구필요성	21
가. 기술적 측면	21
나. 경제·산업적 측면	22
다. 사회·문화적 측면	22
제 2 절 연구개발 범위	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황	25
제 1 절 국내외 연구동향	25
제 2 절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치	27
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	29
제 1 절 락토페린 유전자도입 누에 형질전환용 벡터 개발	29
1. 서론	29
2. 재료 및 방법	29
가. 락토페린 cDNA 클로닝	29
나. pIZ-lactoferrin 벡터개발	29
다. pXINSECT-lactoferrin 벡터개발	29
라. 셔틀벡터 개발	30
마. piggyBac 트랜스포존 벡터 구축	31
바. cDNA 클로닝 및 벡터 구축 방법	31

사. 락토페린 유전자 클로닝을 위한 primer 작성	32
3. 결과 및 고찰	33
가. 락토페린 cDNA 클로닝	33
나. pIZT-락토페린 벡터개발	34
다. pXINSECT-락토페린 벡터 개발	36
라. transposon 벡터 개발	37
4. 결과요약	38
제 2 절 락토페린 유전자도입 형질전환 누에 품종 육성	39
1. 서론	39
2. 재료 및 방법	40
가. 품종선발	40
나. Host 특이성 검토	41
다. 외래유전자 도입	42
라. 유전자 발현 검증	43
마. 형질전환용 DNA 조제	43
바. 누에알 준비 및 주사	43
사. 부화 및 누에 사육	44
아. 형질전환 누에 개체 작성	44
자. 형질전환 누에 개체 선발	45
차. 형질전환 누에 계대 사육	45
3. 결과 및 고찰	45
가. 누에 품종 선발	45
나. Host 특이성 검토	47
다. 유전자 발현 검증	48
라. 전이벡터 주사 및 형질전환 개체 선발	49
마. 형광현미경에 의한 형질전환 개체 선발	49
바. PCR에 의한 GFP유전자 도입 확인	50
사. 형질전환 누에 계대 사육	51

4. 결과요약	51
제 3 절 형질전환 누에 발현 락토페린의 생리활성 연구	53
1. 서론	53
2. 재료 및 방법	53
가. 락토페린 추출	53
나. 세포주에서의 total RNA 추출	53
다. DNA fragmentation	54
라. Cell membrane alterations	54
마. Enzymatic activity	55
바. Expression of apoptosis-related proteins	55
사. 세포주기 분석	55
아. 플라스미드 형질전환 누에에서 추출한 lactoferrin 세포사멸 연구	57
자. 플라스미드 형질전환 누에에서 추출한 lactoferrin 세포주기 연구	57
차. 트랜스포존 누에에서 추출한 lactoferrin에 의한 세포사멸 연구	57
카. 형질전환 누에에서 추출한 lactoferrin에 의한 세포주기 연구	57
타. cDNA microarray	58
3. 결과 및 고찰	60
가. DNA fragmentation	60
나. 락토페린 및 누에 추출물을 처리한 HepG2 세포주에서의 cDNA microarray를 통한 유전자 분석	60
다. 락토페린과 누에 추출물에 의한 사람 중앙세포 증식 비교	66
라. HepG2 세포주에서의 락토페린과 누에 추출물에서의 Anti-apoptosis gene인 TNFAIP3 발현 정도 비교	68
4. 결과요약	70
제 4 절 형질전환 누에 발현 락토페린의 효능과 안전성 확립	71
1. 서론	71
2. 재료 및 방법	71
가. <i>Listeria monocytogenes</i> d를 이용한 실험동물 모델 작제	71

나. <i>Salmonella enteritidis</i> 를 이용한 실험동물 모델 작제	72
다. <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 천연락토페린의 항생 효과 검증	73
라. <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 항생효과 평가 시험	75
마. Lewis lung carcinoma (LLC) cell 에 대한 항암효과 평가시험	77
바. 형질전환 누에 체액의 안전성 평가	79
사. 면역원성 평가(IgE 측정)	80
아. 항생제 내생에 의한 정상세균총의 변화 평가	81
3. 결과 및 고찰	81
가. <i>Listeria monocytogenes</i> 에 이용한 실험동물 모델 작제	81
나. <i>Salmonella enteritidis</i> 를 이용한 실험동물 모델 작제	85
다. <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 천연락토페린의 항생 효과 검증	89
라. <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 항생효과 평가 시험	95
마. Lewis lung carcinoma (LLC) cell 에 대한 항암효과 평가시험	98
바. 형질전환 누에 체액의 안전성 평가	104
사. 면역원성 평가(IgE 측정)	108
아. 항생제 내생에 의한 정상세균총의 변화 평가	109
4. 결과요약	110
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	111
제 1 절 연구개발 목표와 내용	111
제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용	115
제 3 절 연구평가의 착안점 및 달성도	118
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	119
제 1 절 추가연구의 필요성	119
제 2 절 활용계획	119
제 3 절 본 연구 과제를 통해 얻어진 연구실적	120
제 6 장 참고문헌	121

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구목적

단백질 함량이 높은 누에는 옛날부터 천연 건강 보조식품으로 널리 사용되어 왔다. 특히 누에에서 혈당강화 작용이 밝혀지면서 그 용도는 식품뿐만 아니라 의약품으로서의 가능성도 보여 주고 있다. 즉, 누에가루의 복용으로 위나 장 속에서 다당류 분해를 억제하는 α -glucosidase를 억제하여 혈당상승을 막을 수 있음이 밝혀져 있다. 현재 누에에서 밝혀진 혈당강화 물질은 10여종에 달한다. 이러한 천연 건강식품으로서의 누에에 관한 과학적 접근이 일부 있으나 아직은 의학서에 기초하여 그 효과를 증명하고 있는 실정이다.

본 연구는 위와 같은 점에 주목하여 첨단 생명공학 기법을 이용하여 누에의 기능성을 강화하는 연구를 수행하고자 한다. 즉, 누에로부터 사람의 초유에 많이 함유된 항세균 및 면역증진 물질인 락토페린을 생산하는 형질전환 누에를 개발함으로써 누에의 건강식품 및 의약품으로서의 기능성을 더욱 강화하고자 하는 것이다. 선진국, 특히 일본은 이미 누에에서 기능성 단백질의 생산이 산업화되어 있는 실정이다. 따라서 누에의 이용가치를 높이기 위해 우리나라도 새로운 기술적 투자가 필요하다. 이것은 곧 WTO 체제하에서의 농촌의 경쟁력 강화에 도움을 줄 것으로 생각된다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

사람 락토페린을 생산하는 유전자를 누에의 액틴 promoter 또는 피브로인 promoter에 의해 락토페린을 대량으로 발현하는 재조합 벡터를 만든 후 이를 누에의 염색체 속으로 형질전환(transgene)시킴으로써 락토페린을 생산하는 새로운 누에품종을 개발하고자 한다. 이렇게 작성된 재조합 형질전환 누에로부터 만들어진 락토페린

은 여러 용도로 사용될 수 있으리라 생각되며, 본 연구에서는 누에가 가진 천연 식품으로서의 기능과 더불어 새로운 기능을 부여하고자 한다. 즉 락토페린이 가진 항 박테리아 작용을 이용하여 가축의 생산성을 저하시키는 각종 박테리아 유래 감염질환, 즉 설사나 기생충 감염의 치료에 사용할 수 있다. 이는 락토페린 생산 누에를 고기능성 사료로 이용할 수 있기 때문이다. 한편 락토페린의 항바이러스 작용, *Helicobacter pylori*에 대한 억제 작용, 면역 증강 작용이 있으므로 이러한 기능성이 부가된 누에가 주는 획기적인 건강 상품이 될 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 누에로부터 생산되는 락토페린을 추출, 정제하여 이의 식품 및 의약품으로서의 가능성을 연구하고, 동시에 락토페린 생산 누에를 분말로 하여 건강식품 및 건강 보조식품, 그리고 기능성을 갖는 사료에 대한 연구를 수행하고자 락토페린을 생산하는 형질전환 누에를 개발하고자 한다.

나. 경제·산업적 측면

누에는 주로 비단 생산을 목적으로 사육되어 왔다. 그러나 누에의 의학적 효과가 현재의 과학적 접근에 의해 밝혀지면서 건강 보조식품이나 의약품으로서의 가능성이 높아졌다. 특히 혈당 강하 작용에 의한 당뇨병에 탁월한 효과와 함께 누에의 오줌이 항암 효과가 있는 것이 밝혀졌다. 이와 같은 누에의 효과는 누에가 가진 상품으로서의 가능성이 매우 높음을 암시한다. 그러나 이와 같은 여러 기능과 작용이 있는 누에의 상품화는 국내에서 누에 가루의 제조에 그치고 있고, 세계적 건강 보조 식품으로서의 위치는 아직 확보하지 못하였다.

따라서 누에의 여러 특징을 이용하여 생명 공학 기법을 이용한 특수한 기능을 부여하는 것이 필요하다. 전술한 바와 같이 이미 일본 등지에서는 누에로부터 유용한 사람 단백질, 즉 사람의 성장 호르몬, insulin-like growth factor(IGF), 인터페론 등을 생산함으로써 누에를 고부가가치 상품으로 개발하려는 시도가 진행 중이다. 그러므로 우리나라도 이와 같은 국제적 환경에 대응하여야 하고, 한편으로 WTO 체제하에서 농촌의 특성화를 위한 하나의 방편으로 이와 같은 시도가 바람직하다고 생각된다.

다. 사회·문화적 측면

우리나라 농촌은 노동력의 고령화로 재래식 방법으로 농사를 짓기 어려운 점이 있다. 그러므로 농가의 고소득 창출을 위한 신기술의 개발 및 이의 적용이 매우 시급하다. 이러한 시도는 WTO 체제하에서 우리 농촌의 경쟁력 강화와 우리 농산물이 세계적 상품으로 자리 잡을 수 있는 기초가 될 것이다. 본 연구에서는 이런 점에 착안하여 신기능을 도입한 형질전환 누에를 개발하고자 한다. 누에가 비단을 뽑는 곤충에서 당뇨병에 효능이 있는 제품으로서의 가능성이 밝혀졌으나, 현 상태로는 국제적 경쟁력이 있는 상품으로 개발하는 것은 매우 어렵다. 따라서 본 연구에서는 사람 락토페린을 대량 생산하는 형질 전환 누에를 개발 하고자 하는 것이다. 누에로부터 생산된 락토페린은 사람의 몸속에 소량 분비되는 락토페린과 여러 특징적인 면에서 똑같이 때문에 건강 보조 식품이나 의약품 개발 등의 고부가가치를 창출 할 수 있다. 또한 락토페린을 생산하는 형질전환 누에 자체를 대량생산하여 특수 기능성사료를 개발 할 경우 가축 등의 질병 치료 효과에 의한 생산성 향상을 이룰 수 있고, 이러한 첨단기법에 의해 제조된 누에를 농가에서 키울 경우 적은 노동력으로 고소득을 올릴 수 있을 것으로 생각된다.

한편, 형질전환 누에 개발에 의한 락토페린의 대량생산은, 그 동안 사람 락토페린을 얻을 수 없어 극소량만 사용되어 왔던 여러 분야에 사용 될 수 있음으로써 국민의 건강 증진에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

제 2 절 연구개발 범위

1. 협동과제 1 : 락토페린 유전자도입 누에 형질전환용 벡터개발

가. 연구개발 목표 : 사람 락토페린을 발현하는 누에 형질전환용 재조합 벡터 개발

나. 연구개발 내용

- 1) 사람 락토페린 cDNA 유전자 클로닝
- 2) 플라스미드 벡터와 트랜스포존을 이용한 재조합 전이벡터 개발

2. 세부과제 1 : 락토페린 유전자 도입 형질전환 누에품종 육성

가. 연구개발 목표 : 사람 락토페린 생산 형질전환 누에품종 육성

나. 연구개발 내용

- 1) Cell line을 이용한 외래유전자 도입기술 개발
- 2) DNA 미량주입에 의한 형질전환 누에 개체 작성

3. 협동과제 2 : 형질전환 누에 발현 락토페린의 생리활성 연구

가. 연구개발 목표 : 형질전환 누에 개체로부터 대량 생산되는 사람 락토페린 단백질의 생리활성, 특히 항암성에 대한 효과 연구

나. 연구개발 내용

- 1) 형질전환 누에 개체에 따른 항암 능력 차이 비교
- 2) 형질전환 누에 개체로부터 추출된 락토페린의 안전성 평가

4. 협동과제 3 : 형질전환 누에 발현 락토페린의 효능과 안전성 확립

가. 연구개발 목표 : 형질전환 누에 개체로부터 생산된 사람 락토페린의 효능과 안전성 확립

나. 연구개발 내용

- 1) 형질전환 누에 개체로부터 추출된 락토페린의 항균 및 항암효과의 검색
- 2) 형질전환 누에 개체로부터 추출된 락토페린의 안전성 평가

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 국내외 연구동향

1. 국내 연구 동향

누에가 건강 보조식품으로 알려진 후 국내에서는 누에의 효능이나, 효과 등에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 즉 천연 상태로서 누에의 혈당 강하 작용이나, 누에 오줌의 항암 작용 등이 보고되었다. 누에가 혈당 강하 작용에 효능이 있다는 것은 탄수화물을 포도당으로 분해하는 α -glucosidase의 억제 성분 때문인 것으로 밝혀졌으며, 기타, 혈당 강하에 작용하는 성분으로 deoxynojirimycin(DNJ)류 11종과 fagomine류 2종, arabinitol등 2종 등이 밝혀져 있다. 한편, 누에 오줌이 항암 효과가 있다는 사실이 밝혀져 있으나, 그 주성분은 아직 밝혀지지 않은 상태이다.

이와 같은 많은 연구에도 불구하고 신기능을 도입하려는 생명공학적인 시도가 국내에서는 아직 활발하지 않은 실정이다. 특히 사람 락토페린을 누에에서 생산하거나 락토페린을 생산하는 형질전환 누에를 개발하여 신품종을 만들려는 연구는 없는 것으로 알고 있다. 이는 몇 가지 관점에서 분석할 수 있는데, 첫째 한의학적 관점에서 누에의 효능을 밝히려는 연구가 주류를 이루고 있기 때문이고, 둘째 락토페린 자체에 대해 연구가 국내에서는 아직 많이 이루어지지 않았기 때문이다.

2. 국외 연구 동향

누에를 숙주로 하여 재조합 바큇로바이러스를 감염시킨 후 이로부터 유용한 단백질을 생산한 예는 주로 일본을 중심으로 많이 연구되었다. 특히 최근의 유전자 재조합 기법에 의한 연구로는 일본이 단연 앞서고 있다. 누에(*Bombyx mori*)에 재조합 바큇로바이러스를 감염시켜 사람의 성장호르몬(human growth hormone)을 발현시킨 결과가 보고되었다(Sumathy *et al.*, 1996). 이 성장호르몬은 누에 유충에서 대량 발현되었으며, 혈장으로 분비되었다. 이 단백질은 면역학적, 생화학적 특성이 천연의 사람의

성장호르몬과 정확히 같다는 것이 밝혀졌다.

Ho(1998)는 잉어(grass carp: *Ctenopharyngodon idellus*)의 성장 호르몬을 누에에서 발현시켰다. 이들은 이 누에를 분말로 하여 잉어의 사료에 첨가하여 투여한 결과 잉어의 성장 속도가 매우 빨라짐을 보고하였다. Marumoto등(1987)은 IGF II를 누에에서 발현하여 larvae당 3.6mg의 단백질을 생산 할 수 있었다. 이들은 이 IGF를 정제하여 생화학적, 생물학적 동정을 수행하였다. 그 외 luciferase (Palham *et al*, 1995), Antibody IgG2A (Reis *et al*, 1992), human granulocyte-macrophage colony-stimulating growth factor (Shi *et al*, 1996), 감염 표면 항원(HBS Ag)(Zhou *et al*, 1995), human β -interferon (Deng *et al*, 1995), protein kinase (Zemskov *et al*, 1992), GFP (Green Fluorescent Protein) (Sehgal and Gopinathan, 1998), Urokinase (Lawrie *et al*, 1995) 등이 보고되었다.

그러나 이와 같은 많은 단백질의 발현 성공에도 불구하고 누에의 염색체 속에 외래 유전자를 도입하여 형질전환 누에(transgenic silkworm)를 만든 보고는 많지 않다. Mori등(1995)은 luciferase를 바콜로바이러스에 cloning하여 재조합 벡터를 만든 후 누에에 감염시켜 발현시켰다. 이들은 이 유전자가 2세대까지 유전됨을 확인하였다. 그러나 누에의 chromosome속에 luciferase가 도입되었는지는 확인하지 못하였다. Yamao 등(1999)은 누에의 fibroin light-chain 유전자의 exon 7위치에 GFP 단백질을 coding 하는 유전자를 cloning하고, 이를 암컷 누에에 감염시킨 후 수컷 누에와 교배시키는 gene targeting 방법으로 형질전환 누에를 만드는데 성공하였다. 이 유전자는 견사선에서 발현되었으며, cocoon layer에서 단백질이 발견되었다. 이 유전자는 여러 세대에서 안정적으로 유전되었다는 연구보고 있다.

한편, 본 연구에 있어서 협동과제1은 형질전환 누에개발을 위한 여러 가지 벡터를 개발한다. 그런데, 현재 국내에서 형질전환 개체 개발을 위한 서플 벡터를 이용한 트랜스포존 벡터의 개발은 미진하고 또한 기술이 충분히 도입되어 있지 않은 상태이다. 그러므로 이 분야의 기술을 도입하기 위하여 미국 워싱턴 근교의 국립보건원 (NIH)과 미국 농무부 산하의 Beltsville Agricultural Research Center를 방문하고 기술 자문을 구하여 본 연구의 진행을 원활히 할 예정이다.

제 2 절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

현재 누에 형질전환을 위한 벡터 개발에 있어 국내의 연구 실정은 미진한 상태이다. 곤충의 발현 전이벡터에 도입되는 몇 가지 프로모터의 경우에도 외국에서 이미 개발된 것으로써 물질생산을 위한 산업화에 있어 문제가 될 수 있다. 따라서 본 연구를 수행함으로써 앞으로 누에에 이용할 수 있는 우리 고유의 고발현 프로모터나 전이인자에 관한 연구가 보다 활발하게 수행될 것으로 기대된다. DNA 미량주사장치 microinjector에 의한 국내의 누에 형질전환 기술은 시작단계라고 생각된다. 따라서 이러한 시스템이 확립된다면 곤충 형질전환 분야에 있어 외국과 대등한 위치에서 연구를 수행할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 곤충을 이용한 형질전환에 의한 락토페린 연구는 거의 전무한 상태이다. 따라서 곤충을 이용한 물질생산 시스템이 구축된다면 고부가가치의 락토페린을 용이하게 생산할 수 있어, 그 기대효과는 상당할 것으로 생각된다.

누에가 건강보조 식품이나 한방에 기초한 의약품으로서의 효능이 밝혀짐으로써 새로운 농가 소득원으로서의 가능성이 한층 커지고 있다. 그러나 누에가 가진 효능의 발견이나 확인에 중점을 두고 있어 첨단 유전공학 기법을 이용한 신기능을 도입하려는 연구는 아직 미미한 실정에 있다.

본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 누에로 하여금 사람 락토페린을 생산하게 하고, 더 나아가 락토페린 유전자를 누에의 염색체에 도입시킨 형질전환 누에를 작성함으로써 신품종을 개발하려는 것이다. 이는 기술적으로 여러 가지 효과를 얻을 수 있다. 첫째 이 과정에서 필수적으로 거쳐야 하는 과정으로 곤충세포 배양이 있는데, 이 곤충세포 배양에 의해 의약품으로서의 고부가가치가 있는 락토페린을 싸고 대량으로 만들 수 있고 둘째 재조합 유전자를 누에에 도입시켜 누에가 락토페린을 대량으로 생산하게 됨으로써 누에가루의 기능성 사료화 및 기능성 건강 보조식품 등의 용도로 이용이 확대될 수 있다. 셋째 형질전환 누에를 개발함으로써 락토페린이라는 사람 단백질을 만드는 누에 신품종을 개발할 수 있기 때문이다. 이와 같은 기술적 기법은 의약품 원료 등의 생산에 그대로 적용이 될 수 있다. 예를 들면 누에가 당뇨에 효능이 있기 때문에 insulin생산 누에를 만들 수 있다. 비록 인슐린의 체내 흡수율이 애로점으

로 작용하겠지만 인슐린 생산 누에 가루는 그 부가가치가 클 것으로 생각된다. 이와 같은 관점에서, 본 연구자들이 개발연구는 기술적으로 대단한 난이도가 있음에도 불구하고 그에 따른 파급효과는 대단히 클 것이다.

또한 WTO 체제하에서 우리나라의 농촌은 노령인구의 증가와 함께 피폐해져 가고 있다. 농산물은 경쟁력이 떨어지고 수입 농산물이 싼 가격으로 들어오기 때문에 신기술의 접목에 의한 획기적 기술 개발이 매우 절실하다.

본 연구자들은 이와 같은 점에 착안하여 유전자 재조합에 의해 락토페린을 생산하는 형질전환 누에로 고부가가치를 창출할 수 있다. 이러한 신기능을 가진 누에의 개발은 우리 농촌의 소득을 한층 증가시킬 수 있으며 특성화 된 기술력을 지닐 수 있을 것이다. 따라서 우리 농촌의 경쟁력 강화에도 도움이 될 것으로 생각된다. 또한 본 과제가 성공적으로 수행되면 그 동안 시료의 제한성으로 많은 용도로 개발하지 못했던 사람 락토페린을 대량 생산할 수 있게 됨으로써 국민의 건강증진에 많은 도움이 되리라 생각된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 락토페린 유전자도입 누에 형질 전환용 벡터개발

1. 서 론

이 세부연구에서의 목표는 락토페린 cDNA의 클로닝과 그를 이용한 누에발현용 락토페린 벡터의 제작이다. 본 연구에서 제작한 누에발현용 락토페린 벡터는 락토페린의 다양한 기능을 이용하여 다양한 분야에서 사용할 수 있다. 본 연구에서 목표로 하는 형질전환 누에의 개발이 활용화가 되면 사람들이 많은 관심을 가지고 있는 기능성 식품으로서의 실용화가 가능하다. 누에를 기능성 식품으로서의 개발은 누에의 기능뿐만 아니라 누에가 생산하는 락토페린의 기능이 포함이 되어 있기 때문에 국민 건강에 더욱 이바지할 수 있고, 누에가 생산하는 락토페린은 고부가가치의 의약품의 생산을 더욱 저렴하고 빠르게 다량생산이 가능하게 해준다. 그리고 누에를 생산을 하는 농촌에서는 특성화된 기술을 갖는 것은 물론이고 이를 통하여 경쟁력을 향상시킬 수 있다. 그리고 누에를 이용한 가축사료의 개발은 락토페린을 생산하는 누에의 기능을 이용하여 가축의 질병을 예방함은 물론이고 치료에도 도움을 줄 수 있다. 또한 근래에 가장 문제가 되고 있는 항생제의 오남용을 막을 수 있다. 이는 축산농가에 경제적인 도움을 주는 것은 물론이고, 국민건강에도 이바지할 수 있다.

2. 재료 및 방법

가. 락토페린 cDNA 클로닝 : 사람의 HL-1 세포주에서 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 PCR을 통하여 락토페린 cDNA를 pCR3.1 벡터(Invitogen 사용)를 이용하여 TA클로닝 한다. PCR 도중에 발생할 가능성이 있는 돌연변이의 가능성을 최소화하기 위하여 pfu enzyme을 PCR에 첨가하고, 클로닝 된 cDNA는 염기서열을 sp6와 T7 primers를 사용하여 2회 이상 결정한다.

나. 염기배열 결정 : HL-1 세포주에서 mRNA를 추출하여 얻어진 시료로부터 cDNA를 합성하고, PCR 증폭을 통해 얻어진 DNA 단편을 pCR3.1 벡터를 이용하여 클로닝 하였다. 클로닝 된 락토페린 DNA 단편은 Taq Dye Deoxy Terminator Cycle sequencing Kit을 이용하여 염기배열 결정을 수행하였다.

다. pIZ-lactoferrin 벡터개발 : 1)에서 개발된 lactoferrin의 cDNA를 이용하여 pIZ-lactoferrin을 개발한다. pIZ는 상업적으로 판매되고 있는 곤충세포용 벡터이다. 이들 벡터들은 주로 사람의 단백질을 다량 생산하기 위한 수단으로 사용되고 있다. pIZ와 벡터는 모두 플라스미드 벡터이므로 사용하고 편리하므로 본 세부과제에서 채택한다. 일반적인 클로닝 기법을 사용하여 락토페린 cDNA를 연결하여 competent cell에 transformation하여 대량 생산하고, 곤충세포인 Sf9 cell에서 이들 벡터에 의한 정상적인 락토페린의 발현을 유도하여 이 벡터의 형질전환 누에 개발을 위한 유용성을 먼저 확인한다. 완성된 벡터는 형질전환제작을 맡고 있는 세부팀에 공급하고, 형질전환 누에 개발 세부과제의 feedback을 바탕으로 벡터 구조의 조정을 시도한다.

라. pXINSECT-lactoferrin 벡터개발 : 2)에서와 같은 접근법으로 플라스미드 벡터인 pXINSECT를 이용하여 pXINSECT-lactoferrin을 개발한다. 완성된 벡터는 곤충세포인 sf9 cell에서 이들 벡터에 의한 정상적인 락토페린의 발현을 유도하여 이 벡터의 형질전환 누에 개발을 위한 유용성을 먼저 확인한다. 완성된 벡터는 형질전환제작을 맡고 있는 세부팀에 공급한다.

마. 셔틀벡터 pSLfa1180fa-lactoferrin 개발 : 구체적으로, pSL1180 (Pharmacia)를 구입하고, 이 벡터의 multiple cloning site의 HindIII 위치에 제한효소 FseI과 AscI에 절단되는 각각의 oligo를 (5'AGCTGGCCGCCTAGGCGCGTCCA)와 (5'AGCTTGCGCGCCTAGGCCGACC)를 연결하여 pSLfa1180 (FseI-AscI-HindIII)을 제작한다. 또 pSL1180fa를 제작하는데 pSL1180 벡터의 multiple cloning site상의 EcoRI 위치를 절단하고, FseI과 AscI 에 잘리는 oligo (5'AATTCGGCCGCCTAGGCGCGCC)와 (5'AATTGGCGCGCCTAGGCCGACCG)

를 연결하여 EcoRI-FseI-AscI의 제한 위치를 제작한다. 이렇게 제작된 pSL1180fa와 pSLfa1180를 토대로 5'에 FseI-AscI-HindIII 와 3'에 EcoRI-FseI-AscI를 가지는 벡터를 만든다. FseI과 AscI을 사용하는 목적은 두 효소모두 8 base를 탐지하여 절단하여, 원하지 않는 곳에서 DNA가 절단되는 경우가 적기 때문이다. pSLfa1180fa에 lactoferrin cDNA를 삽입하여 셔틀벡터 pSLfa1180fa-lactoferrin을 완성한다(그림 1).

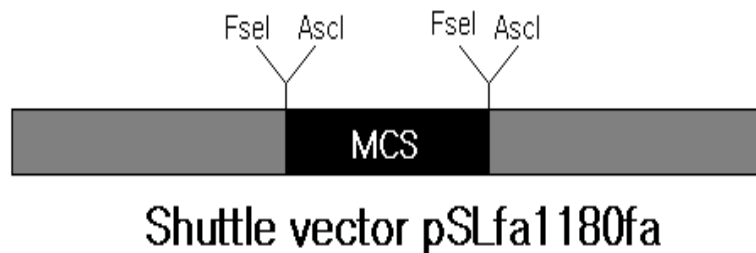


그림 1. 락토페린 유전자 도입 전이벡터 구축을 위한 셔틀벡터 구축

바. *piggyBac*-lactoferrin 트랜스포존 벡터개발 : pSL 벡터 제작을 바탕으로 트랜스포존 벡터인 *piggyBac*을 제작 착수한다. 셔틀벡터의 제작은 트랜스포존 벡터제작을 용이하게 할 목적으로 수행된다. *piggyBac* 벡터를 제작한 후, 여기에 락토페린을 연결하여 두 종의 트랜스포존 벡터 제작 완성한다. 완성된 벡터는 곤충세포인 Sf9 cell에서 이들 벡터에 의한 정상적인 락토페린의 발현을 유도하여 이 벡터의 형질전환 누에 개발을 위한 유용성을 먼저 확인한다. 형질전환제작 트랜스포존 벡터를 각각 세부 팀에 공급하고, 형질 전환 누에 개발 세부과제팀의 의견과 교환하여 최선의 벡터를 개발한다. *piggyBac* 벡터의 full length clone인 p3E1.2와 pCaSpeR-hs-pBac-orf helper는 Indiana University에서 비상업적인 목적으로 무료 제공하므로, 이들을 도입하여 사용한다. 이 벡터를 다양한 목적으로 사용하기 위하여 egfp, eyfp, ecfp 등의 형광을 발하는 단백질 marker를 벡터에 주입한다.

사. cDNA 클로닝 및 벡터 구축 방법 : cDNA 클로닝 및 벡터구축 방법은 기본적으로 Molecular cloning 방법에 준하여 수행하였다. cDNA 클로닝 및 재조합 전이벡터

구축 방법은 그림 2에 나타냈으며 효소, 시약 등은 미국의 따로 기재되지 않는 한 미국 Promega사와 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였다.

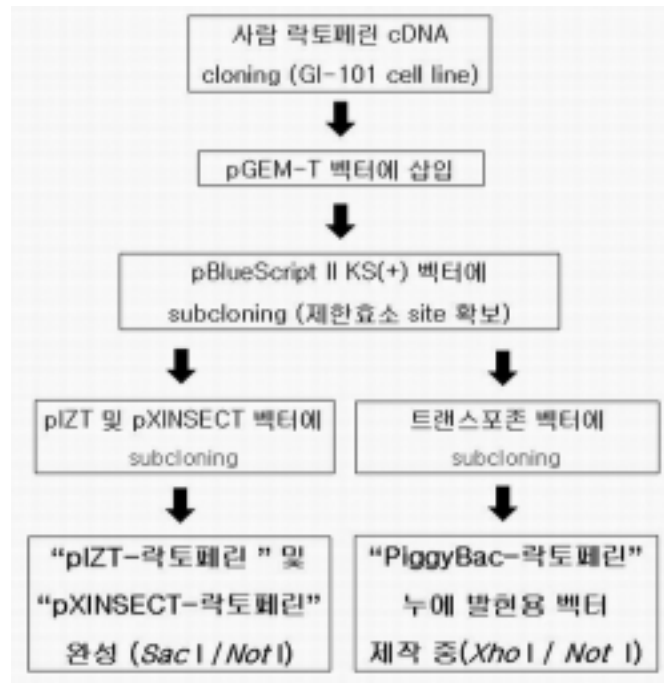


그림 2. cDNA 클로닝 및 재조합 전이벡터 구축 방법

아. 락토페린 유전자 클로닝을 위한 primer 작성 : 사람의 GI-101 cell line에서 추출한 mRNA를 이용하여 합성된 cDNA를 Clontech사에서 구입하여 이를 PCR로 락토페린의 cDNA를 증폭하였다. 사용된 Primer의 염기서열은 아래의 표 1에 나타내었다.

표 1. cDNA 클로닝을 위한 PCR primers 작성

Primers	Sequences
Hum-lacto A1	AGA ACC AGC CGA GTT TCT CA
Hum-lacto B1	GAA TGG CTG AGG CTT TCT TG
Hum-lacto B2	AAG ACG ACA GCA GGG AAT TG

3. 결과 및 고찰

가. 락토페린 cDNA 클로닝 : 사람의 세포 (GI-101)에서 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후, PCR을 통하여 락토페린 cDNA를 pGEM-T 벡터(promega)에 클로닝한다. PCR 도중에 발생할 가능성이 있는 돌연변이의 가능성을 최소화하기 위하여 Pfu enzyme을 PCR에 첨가하고, 클로닝 된 cDNA는 염기서열은 sp6와 T7 primer를 사용하여 2회 이상 결정하였다.

1st round는 Hum-lacto A1, Hum-lacto B2 이고, 2nd round에서는 Hum-lacto-A1과 Hum-lacto-B1을 이용하여 락토페린의 gene을 증폭하였다. 증폭된 product는 agarose gel electrophoresis를 이용하여 그 크기를 확인하여 다량확보와 제한효소에 반응하는 site를 확보하기 위하여 Promega사의 pGEM-T vector에 삽입하여 cloning을 하였다. pGEM-T vector에 삽입된 락토페린은 pIZT와 pXINSECT 벡터에 직접적으로 삽입이 되지 않기 때문에 다른 제한효소 site를 선정해야 했다. 이에 pBlueScriptII KS(+)와 공통적인 제한효소인 Sac II 와 Not I을 사용하여 pGEM-T에 삽입되어 있는 락토페린을 추출 이를 pBlueScript II KS(+)에 subcloning을 하였다.

pBlueScript II KS(+)은 pIZT와 pXINSECT 벡터와 공통적인 제한효소 site를 가지고 있다. 공통적인 제한효소인 NotI과 SacI을 사용하여 추출된 락토페린을 pIZT와 pXINSECT 벡터에 subcloning하였다. 이렇게 해서 제작된 벡터의 모식도를 보면 아래의 그림 3과 같다.

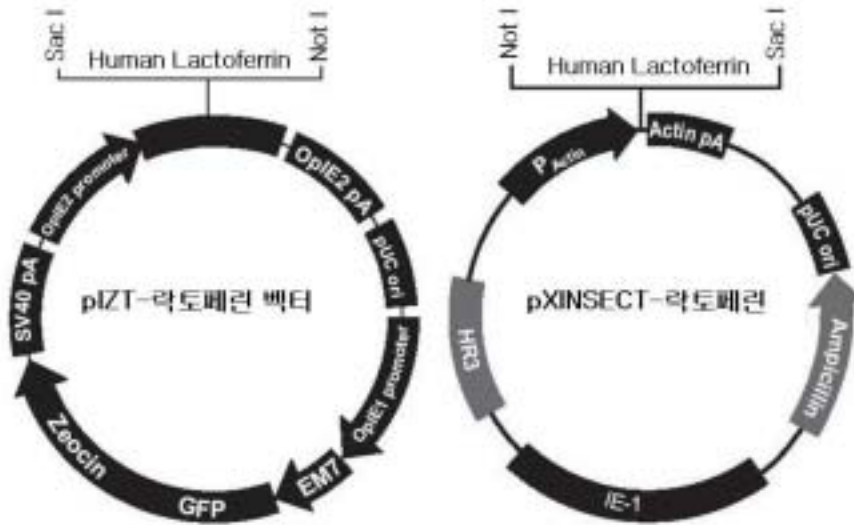


그림 3. 락토페린 유전자도입 발현 벡터 구축

나. 락토페린 cDNA 염기배열 결정 : Taq Dye Deoxy Terminator Cycle sequencing Kit을 이용하여 락토페린 유전자의 염기배열 결정을 수행한 결과, 개시코돈 ATG와 종결코돈 TAA를 포함하는 Open reading frame (2136 bp) 영역을 확인하였다. 락토페린 유전자 염기배열 결과는 Fig. 4와 같다.

	TCA GACCGCTAGCGCTAGCGCTACCGACTCA GATCTCGAGCTCAA GCTTCGAATTCTGCA GTCGACGGTA CCGA GCTCCACCGCGGGGAGTGGGAGGGGAA GGGGTGTCTATTGGGCAA CA GGGCGGGGCAAAA GCCTG AATAAAGGGGCGCA GGGCA GGC GCAA GTG GCA GA GCCTTCGTTTGCCAA GTCGCCTCCA GACCGCA GAC	
	*	
1	ATG AAACTTGTCTTCTCCTGCTGCTGTTCTCCTCGGGGCCCTCGGACTGTGTCTGGCTGGC	60
	M K L V F L V L L F L G A L G L C L A G	20
61	CGTAGGAGAAGGAGTGTTCAGTGGTGCACCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGC TTC	120
	R R R R S V Q W C T V S Q P E A T K C F	40
121	CAATGGCAAAGGAATATGAGAAGAGTGC GTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGAC	180
	Q W Q R N M R R V R G P P V S C I K R D	60
181	TCCCCATCCAGTGTATCCAGGCCATTGCGGAAAACAGGGCCGATGCTGTGACCCCTGAT	240
	S P I Q C I Q A I A E N R A D A V T L D	80
241	GGTGGTTTCATATACGAGGCAGGCCTGGCCCCCTACAACTGCGACCTGTAGCGGCGGAA	300
	G G F I Y E A G L A P Y K L R P V A A E	100
301	GTCTACGGGACCGAAAGACAGCCACGAACTACTATTATGCCGTGGCTGTGGTGAAGAAG	360
	V Y G T E R Q P R T H Y Y A V A V V K K	120
301	GGCGCAGCTTTCAGCTGAACGAACTGCAAGGTCTGAAGTCCTGCCACACAGGCCTTCGC	420
	G G S F Q L N E L Q G L K S C H T G L R	140
361	AGGACCGCTGGATGGAATGTCCCTATAGGGACACTTCGTCCATTCTTGAATTGGACGGGT	480
	R T A G W N V P I G T L R P F L N W T G	160
481	CCACCTGAGCCCATGAGGCAGCTGTGGCCAGGTTCTTCTCAGCCAGCTGTGTCCCGGT	540
	P P E P I E A A V A R F F S A S C V P G	180
541	GCAGATAAAGGACAGTTCCTCCCAACCTGTGTGCGCTGTGTGCGGGGACAGGGGAAAACAAA	600
	A D K G Q F P N L C R L C A G T G E N K	200
601	TGTGCCTTCTCCTCCAGGAACCGTACTTCAGCTACTCTGGTGCCTTCAAGTGTCTGAGA	660
	C A F S S Q E P Y F S Y S G A F K C L R	220
661	GACGGGGCTGGAGACGTGGCTTTTATCAGAGAGAGCACAGTGTTGAGGACCTGTCAGAC	720
	D G A G D V A F I R E S T V F E D L S D	240
721	GAGGCTGAAAGGGACGAGTATGAGTTACTCTGCCAGACAACACTCGGAAGCCAGTGGAC	780
	E A E R D E Y E L L C P D N T R K P V D	260
781	AAGTTCAAAGACTGCCATCTGGCCCGGTCCCTTCATGCCGTTGTGGCACGAAGTGTG	840
	K F K D C H L A R V P S H A V V A R S V	280
841	AAATGGCAAGGAGGATGCCATCTGGAATCTTCTCCGCCAGGCACAGGAAAAGTTTGAAAG	900
	N G K E D A I W N L L R Q A Q E K F G K	300
901	GACAAGTACCAGAAATCCAGCTCTTTGGCTCCCTAGTGGGCAGAAAGATCTGCTGTTC	960
	D K S P K F Q L F G S P S G Q K D L L F	320
961	AAGGACTCTGCCATTGGGTTTTTCGAGGGGTGCCCCCGAGGATAGATTCTGGGCTGTACCTT	1020
	K D S A I G F S R V P P R I D S G L Y L	340

Fig. 4. DNA sequence and deduced amino acid sequence of human lactoferrin gene. An asterisks show the position of the start and termination codon, respectively.

1021	GGCTCCGGCTACTTCACTGCCATCCAGAACTTGAGGAAAAAGTGAGGAGGAAGTGGCTGCC	1080
	G S G Y F T A I Q N L R K S E E E V A A	360
1081	CGGCGTGC GCGGGTCTGTGGTGTGCGGTGGGCGAGCAGGAGCTGCGCAAGTGTAAACCAG	1140
	R R A R V V W C A V G E Q E L R K C N Q	380
1141	TGGAGTGGCTTGAGCGAAGGCAGCGTGACCTGTCTCC TCGGCTCCACCACAGAGGACTGC	1200
	W S G L S E G S V T C S S A S T T E D C	400
1201	ATCGCCCTGGTGTGCTGAAAGGAGAAGCTGATGCCATGAGTTTGGATGGAGGATATGTGTAC	1260
	I A L V L K G E A D A M S L D G G Y V Y	420
1261	ACTGCAGGCAAAATGTGGTTTGGTGCCTGTCC TGGCAGAGAAC TACAAATCCCAACAAAGC	1320
	T A G K C G L V P V L A E N Y K S Q Q S	440
1321	AGTGACCTGATCC TAACTGTGTGGATAGACCTGTGGAAGGATATCTTGTGTGGCGGTG	1380
	S D P D P N C V D R P V E G Y L A V A V	460
1381	GTTAGGAGATCAGACACTAGCCTTACCTGGAAC TCTGTGAAAGGCAAGAAGTCTGCCAC	1440
	V R R S D T S L T W N S V K G K K S C H	480
1441	ACCGCCGTGGACAGGACTGCAGGC TGGAAATATCCCCATGGGCC TGTCTTCAACCAGACG	1500
	T A V D R T A G W N I P M G C L L F N Q T	500
1501	GGCTCC TCGAAAATTTGATGAATATTT CAGTCAAAGCTGTGCCCTGGGTCTGACCCGAGA	1560
	G S C K F D E Y F S Q S C A P G S D P R	520
1561	TCTAATCTCTGTGCTCTGTGTATTGCGCAGCAGG GTGAGAATAAGTGGCTGCCAAC	1620
	S N L C A L C I G D E Q G E N K C V P N	540
1620	AGCAATGAGAGATACTACGGCTACTGGGCTTTCCGGTGCCTGGCTGAGAATGCTGGA	1680
	S N E R Y Y G Y T G A F R C L A E N A G	560
1681	GACGTTGCATTTGTGAAAGATGTC ACTGCTTGCAGAACACTGATGGAATAACAATGAC	1740
	D V A F V K D V T V L Q N T D G N N N D	580
1741	GCATGGGCTAAGGATTTGAAGCTGGCAGACTTTGCGCTGCTGTGCC TCGATGGCAAACGG	1800
	A W A K D L K L A D F A L L C L D G K R	600
1801	AAGCC TGTGACTGAGGCTAGAAGCTGCCATCTTGCCATGGCCCCGAATCATGCCGTGGTG	1860
	K P V T E A R S C H L A M A P N H A V V	620
1861	TCTCGGATGGATAAAGGTGGAACGCCTGAAACAGGTGTTGCTCCACCAACAGGCTAAATTT	1920
	S R M D K V E R L K Q V L L H Q Q A K F	640
1921	GGGAGAAA TGGATCTGACTGCCCCGACAAGTTT TGTATTCCAGTCTGAAACCAAAAAAC	1980
	G R N G S D C P D K F C L F Q S E T K N	660
1981	CTTCGTTCAATGAC AACACTGAGTGTCTGGCCAGACTCCATGGCAAACAACATATGAA	2040
	L L F N D N T E C L A R L H G K T Y E	680
2041	AAATATTTGGGACCACAGTATGTCGCAGGCATTACTAATCTGAAAAAGTGTCAACCTCC	2100
	K Y L G P Q Y V A G I T N L K K C S T S	700
2101	CCCCTCTGGAAGCCTGTGAATTCCTCAGGAAGTAA	2136
	P L L E A C E F L R K *	712
	AA GCTGGGCGGCGCGACTCTA GATCATAATCA GCCATA CCACATTTGTAGAGGTTTACTTGTCT	

(Lactoferrin gene sequences continued)

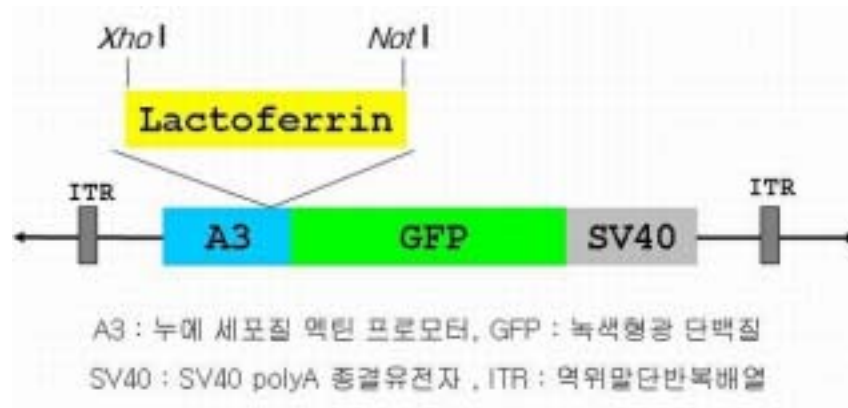
다. pIZT-락토페린 벡터개발 : 1)에서 개발된 락토페린의 cDNA를 이용하여 pIZT-락토페린을 개발하였다. pIZT/V5-His 는 상업적으로 판매되고 있는 곤충세포용 벡터이다. 이들 벡터들은 주로 사람의 단백질을 다량 생산하기 위한 수단으로 사용했다. pIZT벡터는 플라스미드 벡터이므로 사용하기 편리하여 본 과제에서 채택하였다.

라. pXINSECT-락토페린 벡터 개발 : 2)에서와 같은 접근법으로 플라스미드 벡터인 pXINSECT를 이용하여 pXINSECT-락토페린을 개발하였다. 완성된 벡터는 곤충세포인 Sf9 cell에서 이들 벡터에 의한 정상적인 락토페린의 발현을 유도하여 이 벡터의 형질전환 누에 개발을 위한 유용성을 먼저 확인하였다. 완성된 벡터는 형질전환제작을 맡고 있는 세부팀에 공급하였다.

마. Transposon 벡터 개발: *piggyBac* 벡터는 transposon 벡터로서 형질전환 효율이 높으므로 락토페린 누에 생산이 용이할 것으로 생각되어 채택되었다. 당초 목표한 바대로 사람의 락토페린 cDNA를 *piggyBac* 벡터에 삽입하여 클로닝 하는데 성공하였고, 이를 주관연구기관에 제출하여 형질전환 누에를 개발하는데 이용하도록 하였다.

제한효소 site를 조정을 위하여 다시 pBlueScript II KS(+) vector에 삽입된 락토페린의 양끝에 제한효소인 XhoI과 NotI에 반응하는 site를 부착시켰다. subcloning이 된 벡터와 트랜스포존의 A3의 끝부분에 제한효소인 Xho I 과 Not I을 처리하여 그 위치에 락토페린을 subcloning을 실행하였다.

Transposon 벡터개발을 이용하여 subcloning 과정 중 셔틀벡터를 사용하였다. 구체적으로, pSL1180 (Pharmacia)를 구입하여, 이 벡터의 multiple cloning site의 HindIII 위치에 제한효소 FseI과 AscI에 절단되는 각각의 oligo를 (5'AGC TGG CCG GCC TAG GCG CGT CCA)와 (5'AGC TTG GCG CGC CTA GGC CGG CC)를 연결하여 pSLfa1180 (FseI-AscI-HindIII)을 제작한다. 또 pSL1180fa를 제작하는데 pSL1180 벡터의 multiple cloning site상의 EcoRI 위치를 절단하고, FseI과 AscI에 잘리는 oligo (5'AAT TCG GCC GGC CTA GGC GCG CC)와 (5'AAT TGG CGC GCC TAG GCC GGC CG) 를 연결하여 EcoRI-FseI-AscI의 제한 위치를 제작하였다. 이렇게 제작된 pSL1180fa와 pSLfa1180를 토대로 5'에 FseI-AscI-HindIII 와 3'에 EcoRI-FseI-AscI를 가지는 벡터를 제작함. FseI과 AscI을 사용하는 목적은 두 효소 모두 8 base를 탐지하여 절단하여, 원하지 않는 곳에서 DNA가 절단되는 경우가 적기 때문이다. pSLfa1180fa에 lactoferrin cDNA를 삽입하여 셔틀벡터인 pSLfa1180fa-lactoferrin을 완성하였고, transposon 벡터로 subcloning을 완성하였다.



4. 결과요약

본 연구에서 사람의 GI-101 cell line에서 추출한 mRNA를 이용하여, 사람 lactoferrin cDNA를 클로닝 하였고, 이를 곤충세포에서 발현될 수 있도록 곤충 발현용 플라스미드와 트랜스포존 벡터에 각각 서브클로닝을 실시하여, 누에 발현용 플라스미드 벡터 (pIZT-lactoferrin)와 트랜스포존 벡터 (*piggyBac*-lactoferrin)를 개발하였다. 그리고 이 벡터는 형질전환 누에 개발을 위하여 성공적으로 이용되었다.

기술적인 측면에서 재조합유전자를 누에에 도입시켜 누에가 락토페린을 대량생산하게 만들어서 이를 기능성 식품과 가축의 사료로서의 이용을 볼 수 있다. 형질전환 누에를 개발함으로써 락토페린이라는 사람단백질을 만드는 누에 신품종을 개발할 수 있다. 이러한 기술적인 기법은 의약품 원료의 생산에서 적용이 가능하다.

유전자 재조합을 이용하여 형질전환 누에를 만드는 것은 경제적으로 고부가가치를 창출할 수 있다. 이러한 신기능을 가진 누에의 개발은 농촌에서의 소득을 증가시키는 물론이고 이러한 특성화된 기술력으로 경쟁력을 강화시킬 수 있다.

제 2 절 락토페린 유전자 도입 형질전환 누에품종 육성

1. 서론

Transgenic 생물은 형질전환 개체라도 하여 일반적인 생물에 폭넓게 이용되고 있다. 곤충에서는 최근까지 초파리 이외에는 형질전환 개체를 만드는 방법이 확립되어 있지 않았다. 하지만 최근에 이르러 트랜스포존을 이용함으로써 형질전환 누에를 만드는 방법이 확립되었다. 트랜스포존이라고 하는 것은 다른 이름으로 움직이는 유전자라도 말하며, DNA상을 전이하는 기능을 갖는 유전자를 뜻한다. 형질전환 누에는 GFP(녹색형광단백질) 유전자를 마커로써 삽입한 벡터와 전이를 촉진시키는 작용을 하는 helper라고 하는 DNA를 함께 누에알에 주사함으로써 비교적 손쉽게 만들 수 있다. 즉, 주사한 누에알에서 부화한 유충을 사육하여 다음 세대를 얻고, 형광을 나타내는 개체의 선발을 행함으로써 다수의 형광을 발광하는 개체를 얻을 수 있다. 이들 개체는 GFP유전자가 트랜스포존에 의해 염색체 중에 삽입되었기 때문에 얻을 수 있게 된다. 삽입된 유전자는 염색체를 떠돌지 않고 안정적으로 다음 세대로 전달되어, 한번 유전자를 도입하면 차세대 이후로도 형질전환 누에으로써 이용이 가능하다.

누에의 경우, 견사선이라고 하는 단백질을 대량으로 생산하는 기관이 있으며 아울러 인공사료에 의한 대량사육 기술이나 유전학적 연구가 다른 곤충보다 진전되어 있다. 또한 누에는 자연계에서는 생육이 불가능하기 때문에 격리가 용이하다. 이러한 특성을 이용함으로써 형질전환 누에는 유용물질의 생산이나 유전자의 발현기구 연구 등에 폭넓게 이용이 가능하다. 그러므로 현재 프로모터나 각종 유전자를 이용하는 방법이 개발 중에 있다. 또한 다른 분야의 농업곤충에도 외래유전자를 도입하는 것이 가능하므로 해충방제의 분야에서도 이후 이러한 기술의 이용이 가능할 것이다.

따라서 본 실험에서는 지리적 누에품종의 사육 및 관리 기술이 확립되어 있는 누에 유전자원의 특이적 유전형질을 검토와 사육 및 생육특성 등을 비교하여 형질전환 시험에 이용할 수 있는 누에 원종을 선발한다. 형질전환을 위한 재조합 벡터의 host 특이성 및 전이활성을 검토하기 위해 곤충세포인 Sf9 또는 누에 유래의 BmN 세포에

대한 재조합 벡터 도입으로 형질전환 세포를 만든다. 그런 다음 배양된 각 세포에서 플라스미드를 추출하여 Southern blot 분석법으로 재조합 벡터의 도입 여부를 확인한다. 또한 DNA 미량주입장치를 이용하여 누에알에 재조합 벡터를 도입시키는 기술을 확립한다. 즉, 재조합 벡터를 누에알에 주사한 후, 누에알을 25℃에서 **부화시켜** 사육시킨 유충에서 플라스미드를 추출하고 Southern blot 분석법을 이용하여 외래유전자의 도입여부를 확인한다. 주사한 누에알에서 부화한 차세대에서의 형질전환 누에는 형광실체현미경 하에서 마커유전자인 형광단백질에 의한 형광의 유무로 선발한다. 다음은 선발된 성충 간 또는 처리하지 않은 성충간의 교배에 의한 차세대(G1)를 획득한다. 이 G1에서 부화한 유충에서 선발된 형광발현 개체의 일부에서 게놈 DNA를 추출하여 PCR과 Southern blot 분석법에 의해 게놈상의 목적유전자 존재를 확인한다. 형질전환 누에에 도입된 외래유전자가 성충간의 교배에 의해 G1 이후의 세대에서도 안정적으로 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여, 각 세대에서 선발된 형질전환 누에 개체에서 게놈 DNA를 추출하여 PCR과 Southern blot 분석법에 의해 게놈상의 목적유전자 존재를 확인한다.

2. 재료 및 방법

가. 품종선발 : 누에 유전자원으로 보존하고 있는 지리적 누에품종의 사육 및 관리 기술이 확립되어 있는 이들 누에 유전자원이 갖고 있는 특이적 유전형질을 검토한다. 또한 이들 누에 유전자원의 사육 및 생육특성 등을 비교하여 형질전환 시험에 이용할 수 있는 누에 원종을 선발하였다. 인공사료 적합성 검정기준은 잠엽시험사업편람(농촌진흥청 잠엽시험장 발행)에 의해 판정하였다(표 1).

인공사료 사육 적합성 판정 기준

잠업시험사업편람

항 목	조 사 시 간	합 격	불 합 격	
			보 통	불 량
털 떨어율 (%) ¹	누에떨기 후 24시간째	94% 이상	90 - 93	89% 이하
2령 기잠율 (%) ²	" 5일째 오후	94% "	90 - 93	"
3령 " ³	" 9일째 "	95% "	92 - 94	91% 이하
4령 " ³	" 13일째 "	96% "	92 - 95	"

¹ : 2x2cm², ² : 4x4cm², ³ : 5x5cm²

표 1. 인공사료 사육 적합성 판정 기준표

한편, 털 떨어율(%)은 아래 그림 1과 같이 누에떨기 후, 24시간째에 가로 2cm와 세로 2cm 내의 누에 유충의 개체수를 의미한다.

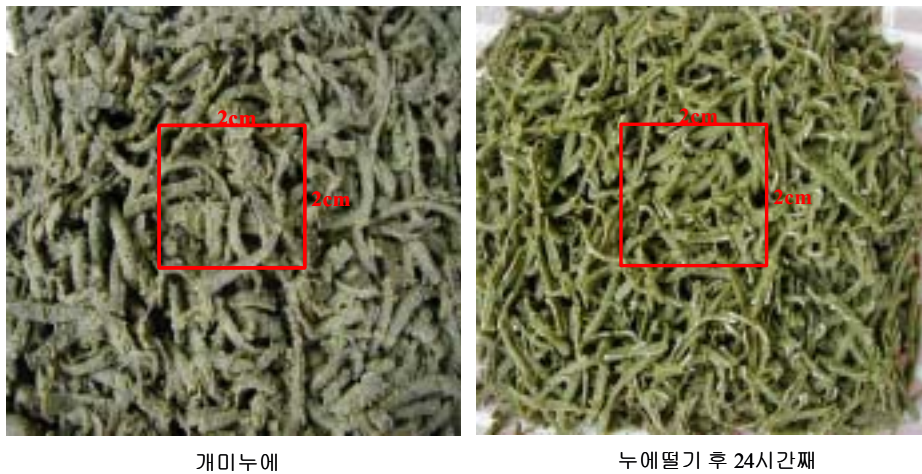
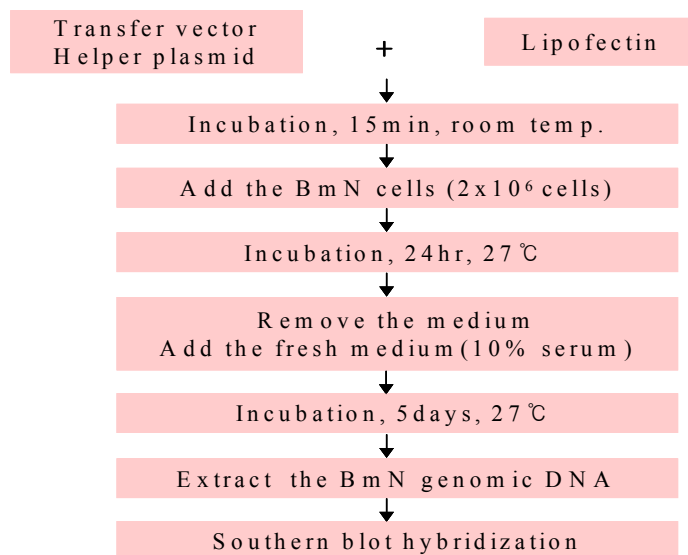


그림 1. 인공사료 사육 적합성 판정에 : 털떨이율

나. Host 특이성 검토: 협동과제 1에서 제작한 형질전환을 위한 재조합 벡터의 host 특이성 및 전이활성을 검토하기 위해 곤충세포인 Sf9 또는 누에 유래의 BmN 세포에 대한 재조합 벡터 도입으로 형질전환 세포를 만든다. 그런 다음 배양된 각 세포에서 플라스미드를 추출하여 Southern blot 분석법으로 재조합 벡터의 도입 여

부를 확인한다.

다. 외래유전자 도입 : 2~3일간 배양한 Sf9 또는 BmN 세포를 lipopectin method 를 이용하여 재조합 발현 벡터에 의한 형질전환 세포를 작성한다(그림 2). 즉, 벡터 DNA와 lipopectin 용액을 혈청과 항생제가 첨가되지 않은 배지에 분리하여 희석한 후, 1:5의 비율로 함께 혼합하여 형질전환 배지를 만든다. 이 형질전환 배지를 실온에서 15분간 반응시킨 후에 2시간 전에 미리 6-well plates에 고정시킨 세포에 분주한다. 24시간 동안 27°C에서 세포를 배양한 후, lipopectin이 함유된 형질전환 배지를 제거하고 10% 혈청이 첨가된 배지를 일정량 분주하여 세포를 4일간 배양한 후 발현 단백질 검증에 이용한다.



Lipofectin을 이용한 BmN 세포 형질전환

그림 2. BmN 형질전환 세포주 작성 방법

또한 DNA 미량주입장치를 이용하여 누에알에 재조합 벡터를 도입시키는 기술을 확립한다. 즉, buffer(5mM KCl/0.5mM 인산완충액 pH 7.0)로 희석한 재조합 벡터를 누에알 한 개당 3~4nl 도입시킨 후, 누에알을 25°C에서 부화시켜 사육시킨 유충에서

플라스미드를 추출하고 Southern blot 분석법을 이용하여 외래유전자의 도입여부를 확인한다. 한편, 형질전환 실험에 이용되는 micro-injector system은 그림 3과 같다.

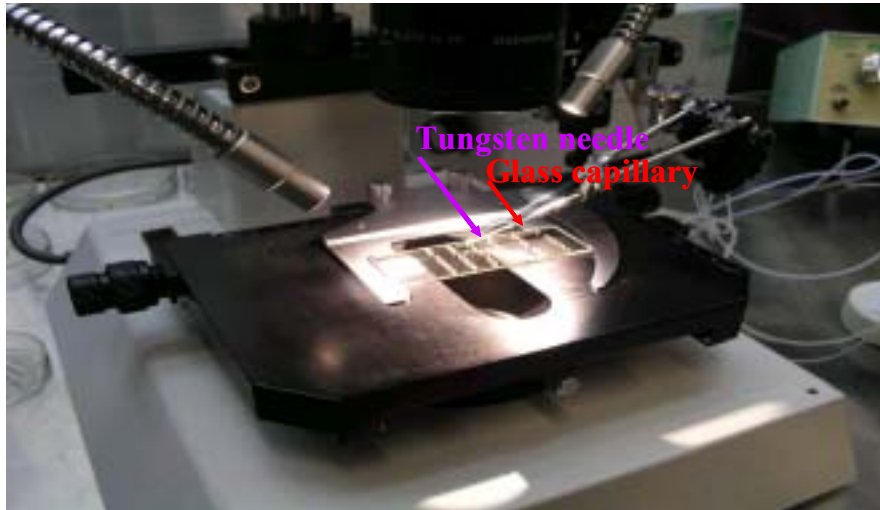


그림 3. DNA 미량주사를 위한 micro-injector 시스템

라. 유전자 발현 검증 : 위에서 배양한 세포를 원심분리 하여 얻은 배양액 내의 단백질을 회수한다. 그런 다음, SDS-PAGE나 Western blot 분석법을 이용하여 배양세포 내에서 정상적으로 재조합 벡터에 의해 외래단백질이 발현되는지 확인한다.

마. 형질전환용 DNA 조제 : 전이벡터와 헬퍼 플라스미드가 도입된 *E. coli*를 LB broth 50 ml에서 배양한 후, DNA Purification Kit(Promega)을 사용하여 각각의 플라스미드를 분리 정제하였다. 누에알 주사를 위한 전이벡터와 헬퍼 플라스미드 혼합 DNA는 5mM KCl/0.5mM 인산완충 용액(pH7.0)을 사용하여 300 μ g/ml가 되게 조제하였다.

바. 누에알 준비 및 주사 : 누에알은 산란 2시간 후 수정핵이 형성되고, 이후 1시간에 1회씩 핵분열 반복하여 약12시간 후에 포배가 형성된다. 배아 발육시기가 일정한 누에알 얻음으로써 부화 및 형질전환 효율을 높이기 위해서는 우화 당일의 성충을 4

시간 이상 교미시킨 다음 5℃ 냉장고에 보존시킨다. 다음날 25℃에서 옮겨 할애시키고 산란한 누에알을 포르말린 소독 및 70%에탄올로 세척한 후 건조하여 실험에 사용하였다.

건조한 누에알을 슬라이드글라스에 부착시킨 다음 DNA 미량 주사장치를 이용하여 누에알에 혼합 DNA 용액을 약4nl 정도 주사한 후 젤리타입의 화학합성 접착제를 사용하여 밀봉하였다.

사. 부화 및 누에사육 : 주사한 누에알은 온도 25℃, 습도 25%로 유지되는 항온실에서 부화 및 사육하였으며, 누에 유충은 인공사료로 사육하였다.

아. 형질전환 누에 개체 작성 : 협동과제 1에서 작성한 트랜스포존을 이용한 형질전환용 벡터(*piggyBac*)와 헬퍼 플라스미드(pCaSpeR-hs-pBac-orf)를 TE buffer에 희석한 후, 혼합 DNA용액 3~5nl를 DNA 미량주입기를 이용하여 산란 후 2~6시간 내의 누에알에 주사한다. 주사한 누에알에서 부화한 차세대에서의 형질전환 누에는 형광실체현미경 하에서 마커유전자인 형광단백질에 의한 형광의 유무로 선발한다. 다음은 선발된 성충 간 또는 처리하지 않은 성충간의 교배에 의한 차세대(G1)를 획득한다. 이 G1에서 부화한 유충에서 선발된 형광발현 개체의 일부에서 게놈 DNA를 추출하여 PCR과 Southern blot 분석법에 의해 게놈상의 목적유전자 존재를 확인한다. 형질전환 누에 작성법은 아래 그림 4와 같다.

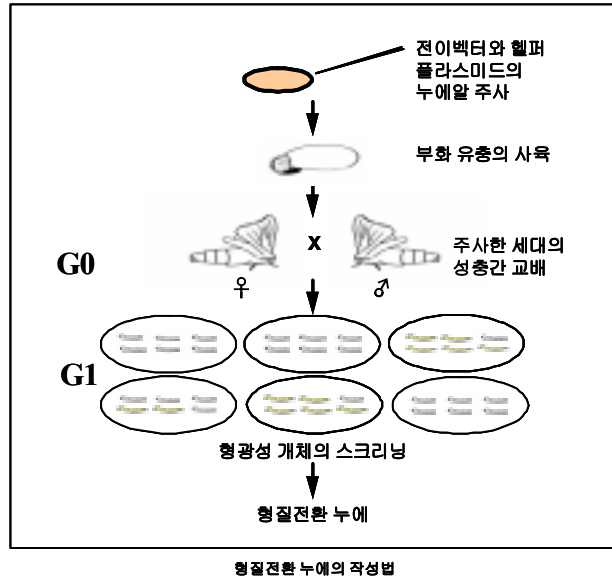


그림 4. Micro-injector를 이용한 누에 형질전환 방법

자. 형질전환 누에 개체 선발 : 누에 유충이 2-3령 시기에 형광 실체 현미경을 사용하여 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 개체를 선발하였다. 한편 형광발현 누에 개체로부터 추출한 게놈 DNA의 PCR 증폭으로 유전자 도입을 검정하였다.

차. 형질전환 누에 계대사육 : 형질전환 누에에 도입된 외래유전자가 성충간의 교배에 의해 G1 이후의 세대에서도 안정적으로 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여 각 세대에서 선발된 형질전환 누에 개체에서 게놈 DNA를 추출하여 PCR 실험과 Southern blot 분석법에 의해 게놈상의 목적유전자 존재를 확인한다.

3. 결과 및 고찰

가. 누에 품종 선발 : 누에 유전자원으로 보존하고 있는 지리적 누에품종(321종) 중에서, 일차적으로 인공사료 사육에 적합하고 침산(HCl) 처리에 의한 인공부화 조작이 필요하지 않은 다화성 계통의 열대 품종을 대상으로 품종선발을 수행하였다. 형질전환 누에를 작성하기 위해서는 수정 직후의 누에알에 DNA를 주사하는 기술 확립이

필요한데, 이때 이용되는 누에 품종 또한 실험 수행에 있어 중요하다. 즉, 뽕잎 사육 외에 누에의 연중 사육을 위해서는 인공사료 사육에 적합하고, 누에알에 DNA를 주사한 후에 침산(HCl) 처리가 필요하지 않는 누에품종의 선발이 필요하다. 농업과학기술원 농업생물부에서 보존하고 있는 지리적 누에품종 321종에서 먼저 침산 처리가 필요하지 다화성 계통 품종 8종(열대종: HM, 일본종: N74, 기타종: pnd^{re}, P50, Combodge, npnd-41, npnd-1, pre)을 선발하였다. 선발된 누에 8품종을 잠엽시험연구사업편람(농촌진흥청 농업과학기술원 발행)의 인공사료 적합성 검정기준에 의해 테스트한 결과, 적합 품종은 HM, 보통 품종은 N74와 P50, 부적합 품종은 Combodge < pre < npnd-1 < npnd-41 < pnd^{re} 순으로 판정되었다(그림 5).



HM 유충, 2령 2일째



HM 누에고치

그림 5. 인공사료 사육 적합성 우수판정 품종

한편, 누에알에 microinjector를 이용하여 DNA를 주입한 후, 침산 처리한 장려품종 백옥잠(누에알 300개 처리)과 침산 처리가 필요하지 않는 누에 품종 HM(누에알 350개 처리)의 누에알 사용하여 비교하였다. 그 결과, 침산 처리한 누에알은 염산의 영향으로 누에알 속의 내용물이 유출된 것이 많았고, 누에알에 생긴 hole 때문에 25℃ 배양기에서 건조되어 부화되는 개체는 없었다. 그러나 침산 처리가 필요하지 않은 HM 품종은 누에알 속의 내용물 유출이나 건조되는 알이 발생하지 않아 30개체(부화개체 30두/처리수 350)가 부화되었다. 현재 형질전환 여부는 확인되지 않았으나, HM 품종은 2차 년도에 계획하고 있는 형질전환 실험용 품종으로 적합하다고 사료된다(그림 5).

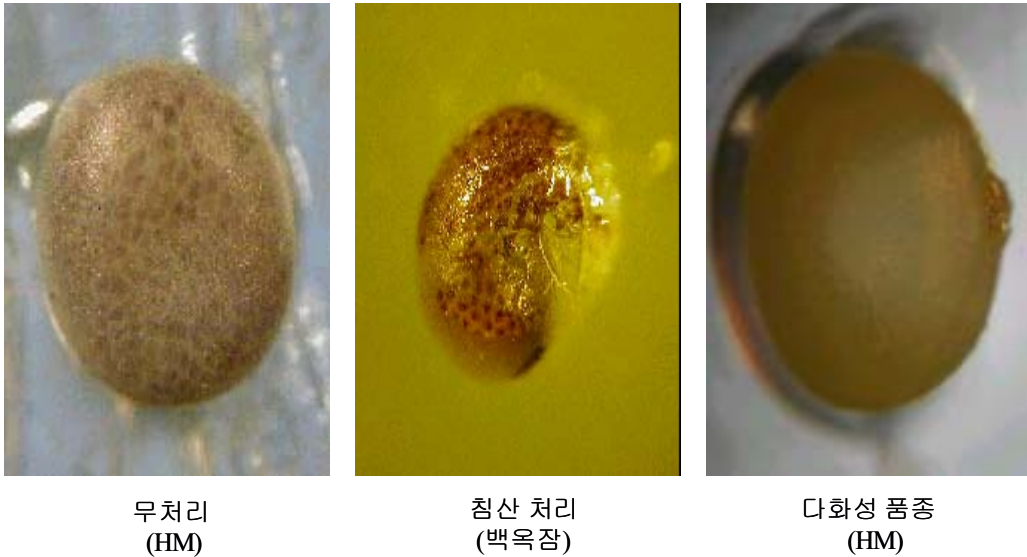


그림 6. 누에알 DNA 주사 후의 침산처리 비교

나. Host 특이성 검토 : 형질전환 누에 개체 작성을 위한 전이벡터의 *in vitro*에서의 host 특이성 및 전이활성을 검토하기 위해, 아래에 표시한 lipofectin을 이용하는 방법으로 전이벡터를 도입하여 형질전환 누에 BmN 세포를 작성하였다. 그런 다음 27℃에서 5일간 배양한 후, 형질전환 누에 BmN 세포로부터 genome DNA를 추출하였다. 조제된 genome DNA를 제한효소 *Pst*I으로 처리한 후, agarose gel 전기영동으로 분리한 다음, Southern blot 분석법으로 target gene의 누에 genome DNA내로의 전이 여부를 확인하였다.

그 결과 사진[B]의 lane 1에 나타난 negative control을 제외한 2, 3, 4, 5, 6에서 화살표로 표시한 2.6kb 단편이 검출되어 BmN 세포 내에서 목적유전자의 전이가 일어났음을 확인되었다(그림 6).

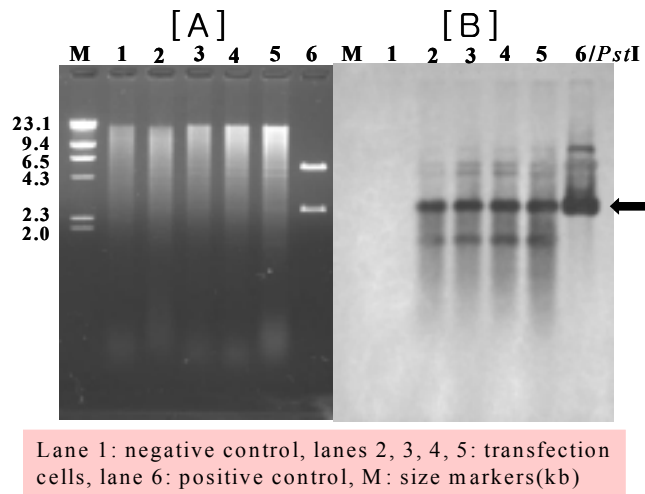
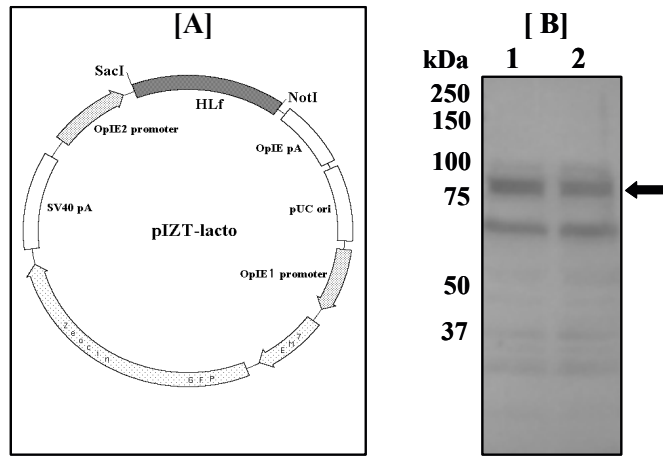


그림 6. BmN 세포를 이용한 *In vitro* 내 전이활성 검정

다. 유전자 발현 검증 : 위에서 배양한 세포를 원심분리 하여 얻은 시료를 파쇄 하여 얻은 조추출물을 단백질 시료로 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 그런 다음 lactoferrin 항체를 이용한 Western blot 분석으로 배양세포 내에서 정상적으로 재조합 벡터에 의해 외래단백질이 발현되는지 확인하였다. 그 결과, 아래 그림의 화살표로 표시한 것과 같이 락토페린으로 추정되는 약75-kDa의 발현 단백질을 확인하였다 (그림 7).



Construction of recombinant plasmid containing human latoferrin(HLf) gene(A) and Western blot analysis of stably transformed S9 cells expressing HLf protein (B). Lanes 1 and 2 are cellular fraction of stably transformed S9 cells. Numbers on the left indicate the molecular weight markers (kDa) and arrowhead indicates the HLf protein.

그림 7. Western bolt 분석에 의한 발현단백질 검정

라. 누에알에 대한 전이벡터 주사와 형질전환 개체 선발 : 질소 공기압을 이용한 DNA 미량 주사장치를 이용하여 누에알에 DNA혼합 용액을 주사한 총 누에알 수는 1,248개로, 그 중에서 형광단백질 발현 개체 20두를 선발하였다(표 2).

표 2. 누에알 전이벡터 주사에 따른 부화율 및 형광발현 개체 발현율

주사 누에알 수	부화 누에알 수	성충수	형광발현 개체수	발현율(%)
1,248	607	550	20	3.6

마. 형광 현미경에 의한 형질전환 개체 선발 : 누에알에서 부화된 F0 유충이 2령 혹은 3령에 접어드는 시기에 형광 실체현미경을 이용하여 누에 개체를 관찰하였다. 그 결과, 화살표로 표시한 것과 같이 누에 개체에서 부분적이긴 하지만 강한 녹색형광단백질 발현을 확인하였다(그림 8).

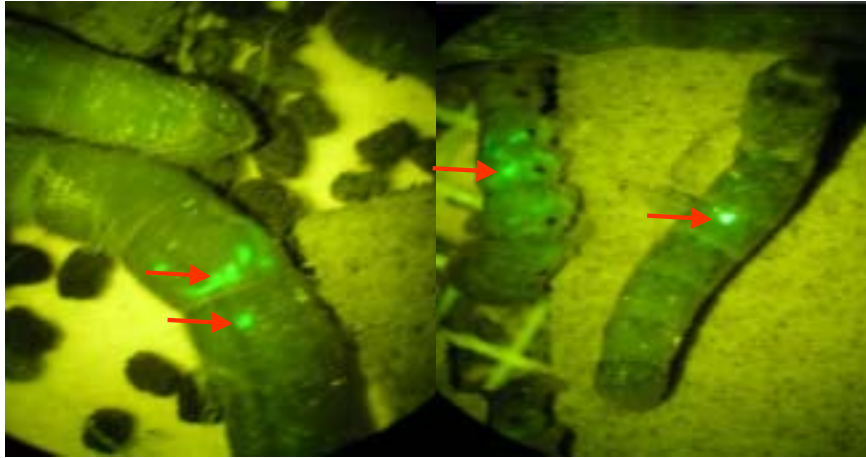


그림 8. 녹색형광단백질 발현 누에 개체

바. PCR에 의한 GFP유전자 도입 확인 : 형질전환 누에 개체로부터 녹색형광단백질 발현이 확인되었으므로, 첫째로 선택 마커로 도입한 녹색형광단백질(GFP) 유전자가 누에 계놈내로 전이 되었는지를 확인하였다. GFP유전자 도입 확인을 위해 합성한 프라이머(GFP-F: 3'-CCA TGG TGA GCA AGG GCG AG-5', GFP-R: 3'-GAG CTC TTA CTT GTA CAG CTC-5')를 사용하여 PCR 증폭을 수행한 결과, 형질전환 누에 개체에서 그림2에 나타낸 것과 같이 GFP유전자로 생각되는 0.75kb DNA단편이 확인되었다(그림 9).

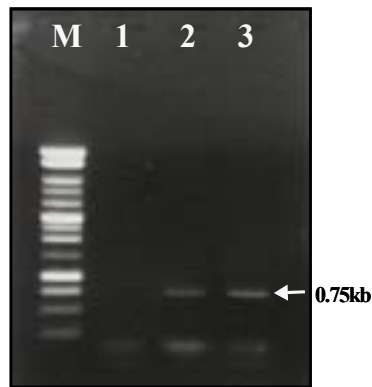
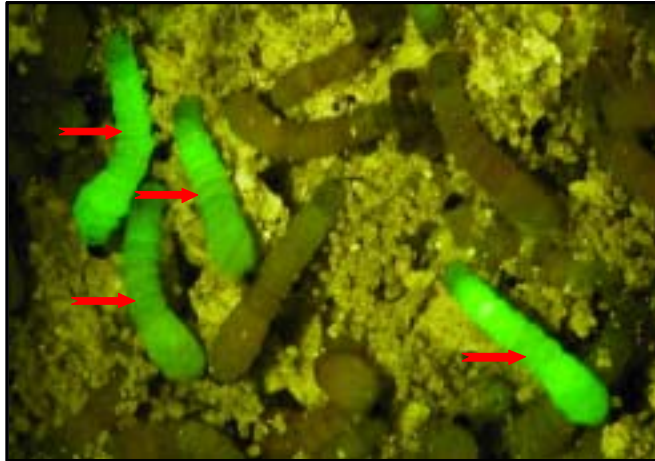


그림 9. PCR 증폭에 의한 GFP유전자 도입 확인
1: 대조구; 2, 3: 형질전환 누에 개체; M : 분자량마커

사. 형질전환 누에 계대 사육 : 형질전환 F0세대 누에 개체간의 교배 조합에 의 한 G1세대 누에 개체 중에서의 녹색형광단백질 발현을 실체현미경을 사용하여 확인 하였다. 그림에서와 같이 화살표로 표시한 누에 개체에서 녹색형광단백질 발현을 확 인할 수 있었다(그림 10).



GFP expression in G1 transgenic silkworms transformed by pPT-HLf vector. Transformed Larvae are fluorescent(arrows), as compared with nontransformed controls.

그림 10. 녹색형광물질 발현 형질전환 누에 개체(G1)

4. 결과요약

형질전환 누에를 작성하기 위해서는 수정직후의 누에알에 DNA를 주사하는 기술을 확립하는 것이 필요한데, 이때 이용되는 누에 품종 또한 실험 수행에 있어 중요하다. 즉, 뽕잎 사육 외에 누에의 연중 사육을 위해서는 인공사료 사육 적합하고, 누에알에 DNA를 주사한 후에 침산(HCl) 처리가 필요하지 않는 누에품종의 선발이 필요하다. 농업과학기술원 농업생물부에서 보존하고 있는 지리적 누에품종 321종에서 먼저 침산 처리가 필요하지 않은 다화성 계통 품종 8종(열대종: HM, 일본종: N74, 기타종: pnd^{re}, P50, Combodge, npnd-41, npnd-1, pre)을 선발하였다. 선발된 누에 8품종을 잠엽시험 연구사업편람(농촌진흥청 농업과학기술원 발행)의 인공사료 적합성 검정기준에 의해 테스트한 결과, 그 중에서 열대종인 HM이 가장 적합한 것으로 판정되었다.

한편, 누에알에 microinjector를 이용하여 DNA를 주입한 후, 침산 처리한 장려품종

백옥잠과 침산 처리가 필요하지 않는 누에 품종 HM의 누에알 사용하여 비교하였다. 그 결과, 침산 처리한 누에알은 염산의 영향으로 누에알 속의 내용물이 유출된 것이 많았고, 누에알에 생긴 hole 때문에 25℃ 배양기에서 건조되어 부화되는 개체는 없었다. 그러나 침산 처리가 필요하지 않은 HM 품종은 누에알 속의 내용물 유출이나 건조되는 알이 발생하지 않아 30개체가 부화되었다. 형질전환 누에 개체 작성을 위한 전이백터의 *in vitro*에서의 host 특이성 및 전이활성을 검토하기 위해, 아래에 표시한 lipofectin을 이용하는 방법으로 전이백터를 도입하여 형질전환 누에 BmN 세포를 작성하였다. 그런 다음 27℃에서 5일간 배양한 후, 형질전환 누에 BmN 세포로부터 genome DNA를 추출하였다. 조제된 genome DNA를 제한효소 *Pst* I으로 처리한 후, agarose gel 전기영동으로 분리한 다음, Southern blot 분석법으로 target gene의 누에 genome DNA내로의 전이 여부를 확인하였다. 그 결과, 사진[B]의 lane 1에 나타난 negative control을 제외한 2, 3, 4, 5, 6에서 화살표로 표시한 2.6kb 단편이 검출되어, BmN 세포 내에서 목적유전자의 전이가 일어났음을 확인되었다. 배양한 세포를 원심 분리 하여 얻은 시료를 파쇄 하여 얻은 조추출물을 단백질 시료로 사용하여 SDS-PAGE를 수행한 결과, 락토페린으로 추정되는 약75-kDa의 발현 단백질을 확인하였다. 질소 공기압을 이용한 DNA 미량 주사장치를 이용하여 누에알에 DNA혼합 용액을 주사한 실험에서 형광단백질 발현 개체 20두를 선발하였다. 누에알에서 부화된 F0 유충이 2령 혹은 3령에 접어드는 시기에 형광 실체현미경을 이용하여 누에 개체를 관찰하였다. 그 결과, 화살표로 표시한 것과 같이 누에 개체에서 부분적이긴 하지만 강한 녹색형광단백질 발현을 확인하였다. 형질전환 누에 개체로부터 녹색형광단백질 발현이 확인되었으므로, 첫째로 선택 마커로 도입한 녹색형광단백질(GFP) 유전자가 누에 게놈내로 전이 되었는지를 확인하였다. GFP유전자 도입 확인을 위해 합성한 primer를 사용하여 PCR 증폭을 수행한 결과, 형질전환 누에 개체에서 그림2에 나타난 것과 같이 GFP유전자로 생각되는 0.75kb DNA단편이 확인되었다. 형질전환 F0 세대 누에 개체간의 교배 조합에 의한 G1세대 누에 개체 중에서의 녹색형광단백질 발현을 실체현미경을 사용하여 확인하였다. 그림에서와 같이 화살표로 표시한 누에 개체에서 녹색형광단백질 발현을 확인할 수 있었다.

제 3 절 형질전환 누에 발현 락토페린의 생리활성 연구

1. 서론

현재까지 보고된 락토페린의 항세균성, 항진균성, 항바이러스성, 항염증성, 항암성 등의 여러 유용성을 토대로 볼 때, 이 단백질의 사료 또는 식품으로의 사용 가치는 매우 높다. 이러한 면에서 락토페린의 생리적 활성, 특히 항암 기능에 관한 연구는 필요하다. 본 연구는 이러한 락토페린의 항암적인 기능을 관찰하여 개발된 형질전환 누에에서 얻어지는 락토페린의 기능을 규명한다. 이 연구는 누에에서 생산되는 락토페린을 이용한 산업화를 위한 중요한 자료를 제공한다.

2. 재료 및 방법

가. 락토페린 추출 : 형질전환 된 누에 추출물을 얻기 위하여 Western blot으로 발현이 발견된 형질전환 누에 개체를 protease inhibitor (Roche) 존재하의 PBS에서 전기 homogenizer (IKA, 독일)로 분쇄한 하였다. 그런 다음 cell debris를 제거하기 위하여 10,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리 하였다. 그리고 원심분리 한 상층액을 락토페린 조추출물로 사용하였다.

나. 세포주에서의 total RNA추출 : 락토페린(Wako)과 누에 추출물이 처리된 세포주에서 total RNA를 Tri-Reagent(Sigma)를 사용하여 추출한다. 100mm의 배양면적당 1ml의 Tri-Reagent를 사용하여 직접 배양 dish에 넣고, 피펫으로 여러 번 통과시켜 배양세포로부터 직접 RNA를 얻는다. Chloroform을 넣고 15초간 잘 흔들어준 후, 실온에 2-3분간 더 반응시키고 원심분리를 실행한다. DNA가 섞이지 않도록 조심스럽게 위층을 잘 걷어내어 다른 튜브에 옮기고 isopropyl alcohol을 넣고 15,000rpm, 10분간 반응시켜 RNA를 침전시킨다. 상층액을 버리고 pellet를 75% DEPC-ethanol로 11,000rpm, 5분간 원심분리 하여 한차례 씻어준다. 실온에서 pellet을 5-10분간 말린

다. 이때 너무 마르지 않도록 조심하여 RNase/DNase-free water에 30-50ul로 pellet을 녹인다.

다. DNA fragmentation

1) Gel electrophoresis : apoptosis된 세포에서는 DNA가 apoptotic body로 fragmentation 된다. 세포에서 DNA를 추출하여 gel에 걸어서 DNA-ladder가 확인한다.

2) In situ assay : Apoptosis 동안에 DNA fragmentation되면서 형성되는 DNA strand breaks를 antibody를 이용하여 확인하는 방법이다. 직접 one cell 단위에서의 확인이 가능하다는 장점이 있는데, 원리는 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme)를 이용하여 DNA break의 3-OH DNA ends에 labeled-DNA를 결합시키는 것이다. Labeling은 fluorescent, enzymatic reaction등 다양하게 이용하고 있으나 Apoptosis의 진행 초기에서는 이용하기 어렵고 extracellular matrix component같은 것이 detection을 방해하기도 하는 단점이 있다.

3) Single reagents for TUNEL and supporting reagents : 보통 TUNEL이라고 부르는 방법인데 DNA strand breaks에 in situ labeling한 샘플에 무anti-fluorescein antibody to FITC-dUTP를 이용하여 detection하는 것이다. 이 antibody에는 alkaline phosphatase를 conjugation해서 Fast Red를 이용하여 발색한다.

4) ELISA : DNA fragmentation을 이용한 ELISA에서는 apoptosis 나 cytotoxicity-induced cell death를 구분 없이 detection하게 되는데, modified dUTP인 BrdU로 반응시켜서 세포 안의 DNA에 선행하여 labeling을 하고 이것을 monoclonal antibody를 이용하여 ELISA한다.

라. Cell Membrane alterations

1) Microscopy or FACS : apoptosis와 necrosis cell을 구분하기 위해 DNA stain과 함께 이용할 수 있는 방법인데, apoptosis cell membrane outer leaflet의 phosphatidylserine에 Annexin-V를 이용하여 detection한다. Annexin-v는 phosphatidylserine에 high affinity를 보이는 phospholipid-binding protein으로 여기서 probe로 이용된다. annexin V-biotin, annexin-v-alexa 568, annexin-v-fluos 등 conjugation 의 종류에 따라 FACS나 fluorescence microscope을 이용하여 측정한다.

마. Enzymatic activity

1) Western blot : poly-ADP-ribose polymerase(PARP)는 DNA binding protein으로 DNA strand break를 인식하는 protein인데, 이 protein이 apoptotic protease(apopain)의 substrate로 이용된다. 곧 apoptosis 초기 단계에서 PARP는 89kD와 24kD로 나뉘고 이것은 apoptosis detection에 이용 가능하다. PARP에 대한 polyclonal antibody를 이용하여 Western blot과 Immunoprecipitation이 이용하고 있다.

2) FIENA : caspase 3 activity를 fluorometric Immunosorbent Enzyme Assay(FIENA)를 이용하여 측정함으로써 apoptosis의 정도를 알 수 있다. Cell lysate에서 caspase 3에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 binding시켜놓고, 여기에 caspase에 의해 형광 발현하는 AFC substrate를 넣어서 형광정도를 측정하여 caspase 3가 어느 정도 activity를 보이는지를 측정하여 apoptosis를 확인한다.

3) In situ assay : apoptosis 동안에 cytokeratin 18에 변화가 생기는데, antibody M30 cytodeath를 이용하여 이 부분을 detection 할 수 있다. antibody를 결합시키고 이것을 immunofluorescence나 flow cytometry를 이용하여 visualization 한다.

바. Expression of apoptosis-related proteins

1) Apoptosis induction : apoptosis에서 유도되는 Fas protein에 대한 Anti-Fas를 이용하여 detection 한다.

2) in situ assay/Western blot : p53은 cell growth control에 중요한 역할을 하는데, 동시에 apoptosis를 조절하는 기능도 있다. apoptosis 시에 특별히 증가하는 p53을 detection 한다.

3) ELISA : p53 antibody를 detection 한다.

사. 세포주기 분석

1) Single color DNA staining with BrDU, PI, AO and HOECHST : 세포에 BrDU나 PI, AO, HOECHST를 처리한 후, 세포에서 nuclei를 추출하여 DNA content/cell cycle을 이용하여 cell cycle을 알아보는 방법이다. BrDU는 denatured

DNA 에 작용한다. PI(propidium iodide)는 undenatured DNA 에 작용하는데 double stranded DNA의 major groove에 삽입되어 488nm에서 600nm 사이에서 흡광도를 보이게 된다. AO(acridine orange)는 DNA/RNA 의 differential staining을 할 수 있고 DNA에서 green, RNA에서 red를 발현하는 형광의 차이를 보이고 이를 이용하여 cell cycle을 추정한다. Hoechst dye는 bis-benzimide derivative 로 적은 toxicity를 보이는데, 이 물질은 DNA의 AT-rich region 에 결합하여 465nm의 파장에서 밝은 형광을 보이게 된다. DAPI(diamidino-2-phenylindole 2HCl)도 AT binder 로 Hoechst dye와 같은 원리이다. 염색한 샘플은 FACS를 이용하여 cell cycle을 확인 중 임.

2) Two Color Analysis Of Cyclins : cell cycle에 따라 특징적으로 발현되는 cyclin을 이용하는 방법인데, cell cycle의 변화에 따른 marker로는 cyclins D, E, A , B1이 이용된다. 각각의 cyclin 에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 detection 한다. two color system에서는 cyclin/PCNA, and cyclin B1에 대한 antibody를 붙이고 red, green 으로 각각 발색하여 flow cytometer를 이용하여 측정한다. 일반적으로 cyclin D1의 발현은 early G1 을 뜻하고 cyclin E peak 는 G1/S transition 을 의미함. Cyclin A 는 G2/M phases 동안임을 뜻하고 cyclin B1 은 late G2/M 임을 의미함. 그렇지만 몇몇의 세포에서는 cyclin D1이 관찰되지 않는 일도 있으므로 모든 세포에 적용되는 방법은 아님.

3) Staining chromosomes (G-Banding) : Giemsa 또는 Leishman's stain을 이용하여 metaphase chromosome을 염색할 수 있다. GC-rich (giemsa light)부분과 GC-poor 부분(giemsa dark)을 구분하여 band 모양을 보이는데 이것을 G-banding 이라 한다.

4) H-Thymidine Uptake by Cultured Cells : 세포를 3H-thymidine을 30분 정도 단기간 처리 후 3H-thymidine의 양에 따라 cell cycle을 구분하는데, cell cycle analysis보다는 cell proliferation assay에 더 많이 이용된다.

5) TUNEL/Propidium Iodide, F-Actin/Propidium Iodide : 특정 cell cycle 단계에서의 apoptosis 를 동시에 측정하고자 할 때, TUNEL assay와 PI staining 을 동시에 적용할 수 있다.

아. 플라스미드 형질전환 누에에서 추출된 lactoferrin 세포사멸 연구 : pIZ, pXINSECT 벡터를 토대로 개발된 형질전환 누에 개체별 단백질 추출한다. 사람의 암 세포주 즉 대표적인 간암, 유방암, 대장암 각 1종의 세포에 추출된 누에 단백질을 용량별로 처리하여 각각의 세포의 아포토시스 유발 여부를 현미경적 소견과 세포내 DNA 손상 여부 등을 관찰하여 판단함. 또, 세포주기의 저지 상황을 세포 생물학적 기법을 이용하여 관찰한다.

자. 플라스미드 형질전환 누에에서 추출된 lactoferrin에 의한 세포주기 연구 : 락토페린은 포유류 세포주기의 G1에서 S로의 이행을 방해하는 것으로 알려져 있다. 이것을 G1 arrest 라고 하는데, 정상세포가 암으로의 이행에 있어 G1에서 S로의 이행에 관한 조절은 매우 중요하다. 즉 정상적인 조절 상태에서 암세포내의 유전적 손상 등의 상황에서 G1이 더 이상 S 단계로 이행되지 않아야 하는데, 제대로 제어되지 못하면 이 유전적 손상이 돌연변이로 세포 내에 고착되고 이로 인하여 정상세포의 유전적 손상이 축적된다. 본 세부과제에서는 서로 다른 벡터를 사용한 형질전환 누에의 개체별 락토페린에 노출된 간, 대장, 유방 암 세포주에서 이들 G1 arrest 와 관련이 있는 활성을 조사하여 락토페린의 세포주기 이행 저해 능력을 조사한다. 이러한 단백질의 활성은 주로 western blot (p21 WAF)과 RT-PCR (p16INK, p14ARF, C-fos, c-myc)을 사용하여 진행한다.

차. 트랜스포존 누에에서 추출된 lactoferrin 에 의한 세포사멸 연구 : pIZ, pXINSECT 벡터를 토대로 개발된 형질전환 누에 개체별 단백질 추출한다. 사람의 암 세포주 즉 대표적인 간암, 유방암, 대장암 각 1종의 세포에 추출된 누에 단백질을 용량별로 처리하여 각각의 세포의 아포토시스 유발 여부를 현미경적 소견과 세포내 DNA 손상 여부 등을 관찰하여 판단함. 또, 세포주기의 저지 상황을 세포 생물학적 기법을 이용하여 관찰한다.

카. 형질전환 누에에서 추출된 lactoferrin 에 의한 세포주기 연구 : 정상적인 조절 상태에서 암세포내의 유전적 손상 등의 상황에서 G1이 더 이상 S 단계로 이행되지

않아야 하는데, 제대로 제어되지 못하면 이 유전적 손상이 돌연변이로 세포 내에 고착되고 이로 인하여 정상세포의 유전적 손상이 축적된다. 본 세부과제에서는 형질전환 누에의 개체별 락토페린에 노출된 간, 대장, 유방 암 세포주에서 이들 G1 arrest와 관련이 있는 활성을 조사하여 락토페린의 세포주기 이행 저해 능력을 조사한다. 이러한 단백질의 활성은 주로 western blot (p21 WAF)과 RT-PCR (p16INK, p14ARF, C-fos, c-myc)을 사용하여 진행한다.

타. cDNA microarray

락토페린 및 누에 추출물이 처리된 세포에서 추출한 total RNA를 정량하여 총 50ug의 RNA에 형광 색소를 직접 표지하는 방법을 사용하였다. 직접 표지하는 방법은 Reverse Transcription 반응을 실시할 때 형광물질인 Cy5-dUTP(빨강)이나 Cy3-dUTP(초록)을 첨가하여 반응을 한다. 이렇게 반응을 한 뒤 정제된 형광물질이 표지된 cDNA를 hybridization 과정으로 합성한 두 개의 시료 cDNA를 같은 양으로 섞어서 제작해 놓은 하나의 microarray 칩에 넣은 후 slip cover를 사용하여 건조되는 것을 방지한 후 방수 chamber에 넣은 후 42℃의 항온수조에 넣어서 16시간 이상을 반응시켜서 결합시키고, 반응이 끝난 후 microarray 칩을 SSC 용액을 사용하여 결합이 안 된 cDNA들을 씻어낸다. 세척 후 microarray 칩을 원심분리기를 사용하여 확실하게 건조시켜서 분석과정에 오차를 적게 한다.

1) cDNA microarray data 분석

가) DNA microarray chip scanning : Hybridization을 마친 DNA microarray 칩(chip)은 microarray scanner를 이용하여 scanning을 진행하게 되는데, 각 spot에서 방사 (emission)되는 Cy3와 Cy5의 fluorescence intensity를 수치화 하게 된다. Scanning된 image를 분석하는 과정에서 비정상적인 spot이나 외부의 이물질로 인한 failed spot은 flagging을 통하여 분석과정에서 제거된다. Scanner의 분석용 software(GenePix 3.0) 프로그램을 이용해서 전환된 수치 값은 마이크로소프트 엑셀 프로그램 등을 사용하여 intensity-based normalization을 실시하게 되는데 각 spot에서 얻어진 수치 데이터는 DNA microarray 칩(chip) 표면에서 방사되는 background intensity에 의한 값이 포함되어 있으므로 정확한 intensity 값은 spot의 foreground

intensity에서 spot 주위의 background intensity 값을 제외한 값으로 계산한다.

나) Spot intensity scatter plot : Signal intensity의 최종 분석을 통하여 얻어진 intensity ratio(Cy5/Cy3)는 X, Y plot chart로 표시될 수 있으며 이와 같은 chart를 통하여 유의한 유전자를 확인한다. 이러한 X, Y plot chart를 일반적으로 scatter plot 이라 하며 대부분 45도 각도의 기울기를 나타낸다.

다) Spot intensity M vs A plot : Graph에 사용되는 intensity ratio는 raw signal intensity를 사용하지 않고 log-transformed intensity를 사용하게 된다. Log-transformed intensity를 사용하는 이유는 raw signal intensity의 값은 0~65535의 값에 따라서 넓은 범위에 걸쳐 분포하고 있으며 낮은 intensity(1000이하) 값이 많을 경우 상대적으로 한쪽 방향으로 치우쳐 있게 된다. 즉 log-transformed intensity를 사용함으로써 scatter plot에서 spot의 intensity를 전체적으로 고르게 분산시킬 수 있으며 이것은 데이터의 확인을 더 용이하게 할 수 있는 장점이 있다. M(Y axis) versus A(X axis)를 사용한 scatter plot은 X vs Y scatter plot을 45도 각도로 기울인 형태로서 두 가지 channel을 사용해서 실험을 실시한 microarray의 data를 가장 보편적으로 분석할 수 있는 그래프 방법이라고 할 수 있다. M vs A plot은 여러 가지 differential expression level을 쉽게 확인할 수 있게 하며, 또한 분석 과정에서 differential expression과 intensity간의 관계를 보여줄 수 있다는 장점이 있다.

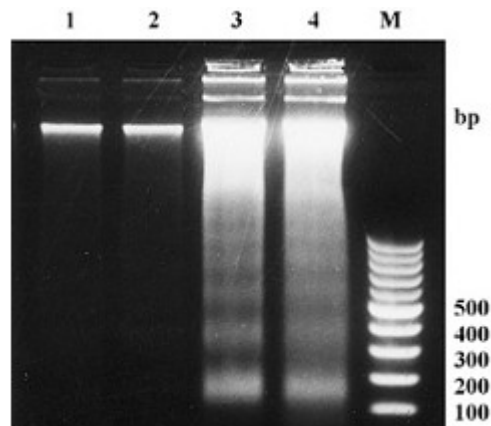
라) Box plot normalization : 실험에 사용될 칩(chip) 제작에 사용될 pin은 각각의 특성 및 상태에 따라서 차이가 날 수 있으며, 또한 hybridization 과정에서 생길 수 있는 local background로 인하여 정확한 intensity ratio를 얻을 수 없게 된다. 이와 같이 외부적인 원인으로 인하여 나타날 수 있는 차이를 줄이기 위하여 실험 결과의 분석 과정에서는 각 block에 따른 box plot normalization을 실시한다.

마) Microarray 실험결과 검증 : cDNA microarray를 통해 얻은 특이 유전자에 대한 확인은 실험에 사용된 세포주에서 얻은 total RNA를 1st strand cDNA synthesis kit(Roche)를 사용하여 cDNA를 합성한 후 real time PCR을 통해서 cDNA microarray에서 얻은 결과와 비교 확인한다.

3. 결과 및 고찰

가. DNA fragmentation : apoptosis된 세포에서는 DNA가 apoptotic body로 fragmentation 된다. 세포에서 DNA를 추출하여 gel에 걸어서 DNA-ladder가 확인되었다.

Apoptosis 동안에 DNA fragmentation되면서 형성되는 DNA strand breaks를 antibody를 이용하여 확인하는 방법임. 직접 one cell 단위에서의 확인이 가능하다는 장점이 있는데, 원리는 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme)를 이용하여 DNA break의 3-OH DNA ends에 labeled-DNA를 결합시키는 것이다. Labeling은 fluorescent, enzymatic reaction등 다양하게 이용하고 있다. Apoptosis의 진행 초기에서는 이용하기 어렵고 extracellular matrix component같은 것이 detection을 방해하기도 하는 단점도 있다.



세포사멸과정에서 발생하는 DNA fragmentation 현상을 보여주는 gel 사진(1. 2. control, 3. 4. 조각난 DNA를 보여줌. 5. DNA ladder)

나. 락토페린 및 누에 추출물을 처리한 HepG2 세포주에서의 cDNA microarray를 통한 유전자 분석 : HepG2세포에 락토페린(5uM)과 누에추출물(20 ug/ml of media)을 72시간 처리하여 total RNA를 추출하여 cDNA microarray를 실시하였다. 실시한 데이터를 근거로 apoptosis와 관련된 유전자를 선별하였다(표1).

표1 : 락토펜과 형질전환 누에추출물을 적용한 HepG2 간암종 세포의 apoptosis 관련 유전자 발현

유전자 발현 변화 (\log_2)		Gene Symbol	Gene name	Gene Bank accession	Biological Process
락토펜	누에추출물				
-1.51	-0.82	CD14	CD14 antigen	NM_002488	cell surface receptor linked signal transduction
-1.26	-0.53	CBX4	Chromobox homolog 4 (Pc class homolog, Drosophila)	NM_003655	chromatin assembly or disassembly
-1.19	-0.49	PHF17	PHD finger protein 17	NM_024900.2	apoptosis
-0.98	-0.27	TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290	apoptosis
-0.89	-0.24	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NM_020529	cytoplasmic sequestering of NF-kappaB
-0.83	-0.18	BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	NM_016561	protein ubiquitination
-0.73	-0.08	PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	AK095165	negative regulation of cell proliferation
-0.61	-0.07	ITGB3BP	Integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	NM_014288.3	cell adhesion
-0.59	-0.06	CD14	CD14 antigen	NM_002488.2	cell surface receptor linked signal transduction
-0.58	-0.06	BAG3	BCL2-associated athanogene 3	NM_004281	apoptosis
-0.57	-0.06	ELMOD2	ELMO domain containing 2	NM_153702	phagocytosis
-0.56	-0.06	CTNBL1	Catenin, beta like 1	NM_030877.3	
-0.55	-0.06	ELMO2	Engulfment and cell motility 2 (ced-12 homolog, C. elegans)	NM_133171	phagocytosis
-0.46	-0.05	FLJ13491	Hypothetical protein FLJ13491	NM_024623	protein metabolism

-0.43	-0.05	TNFRSF18	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	NM_004195	signal transduction
-0.41	-0.04	HDAC3	Histone deacetylase 3	NM_003883.2	chromatin modification
-0.40	-0.04	RAD21	RAD21 homolog (S. pombe)	NM_006265	cell cycle
-0.37	-0.03	PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	NM_002583	negative regulation of cell proliferation
-0.36	-0.03	FXR1	Fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	NM_005087	
-0.34	-0.03	PDCD2	Programmed cell death 2	NM_144781	apoptosis
-0.32	-0.03	AMID	Apoptosis-inducing factor (AIF) - like mitochondrion - associated inducer of death	NM_032797	chromosome condensation
-0.29	-0.02	NCKAP1	NCK-associated protein 1	NM_013436	central nervous system development
-0.24	-0.02	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	NM_021138.3	protein complex assembly
-0.24	-0.01	PDCD2	Programmed cell death 2	NM_002598.2	apoptosis
-0.23	-0.01	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	NM_001316	cell proliferation
-0.23	-0.01	AVEN	Apoptosis, caspase activation inhibitor	NM_020371.1	inhibition of caspase activation
-0.23	NA	MOAP1	Modulator of apoptosis 1	NM_022151	
-0.21	NA	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	NM_001165.3	cell surface receptor linked signal transduction
-0.21	NA	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	NM_004346	induction of apoptosis
-0.17	NA	VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor	NM_000551.2	cellular morphogenesis
-0.17	NA	BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	NM_004330	apoptosis
-0.13	NA	KIAA0971	KIAA0971	NM_014929.2	
-0.12	NA	TXNL1	Thioredoxin-like 1	NM_004786	electron transport

-0.12	NA	BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	NM_001166	cell surface receptor linked signal transduction
-0.11	NA	TIAL1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	NM_022333	defense response
-0.09	NA	APPBP1	Amyloid beta precursor protein binding protein 1, 59kDa	NM_003905	cell cycle
-0.07	NA	MRPS30	Mitochondrial ribosomal protein S30	BX538300	protein biosynthesis
-0.07	NA	BAG2	BCL2-associated athanogene 2	NM_004282.2	protein folding
-0.06	NA	DAP	Death-associated protein	NM_004394.1	induction of apoptosis by extracellular signals
-0.06	NA	DUSP22	Dual specificity phosphatase 22	NM_020185	cell proliferation
-0.06	NA	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	NM_001227.2	proteolysis and peptidolysis
-0.06	NA	TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	NM_003820	cell surface receptor linked signal transduction
-0.03	NA	BID	BH3 interacting domain death agonist	NM_001196	induction of apoptosis via death domain receptors
0.02	NA	BAD	BCL2-antagonist of cell death	NM_004322	induction of apoptosis
0.02	NA	AXIN1	Axin 1	NM_003502	development
0.03	NA	PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	NM_014330	cell cycle arrest
0.03	NA	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	NM_002342	immune response
0.04	NA	MGC5297	Hypothetical protein MGC5297	NM_024091.2	
0.08	NA	ACIN1	Apoptotic chromatin condensation inducer 1	NM_014977	apoptotic chromosome condensation

0.09	NA	TAX1BP1	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1	NM_006024	
0.11	0.01	DAP3	Death associated protein 3	NM_033657	induction of apoptosis by extracellular signals
0.13	0.01	SIRT1	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_012238	chromatin silencing
0.13	0.01	BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	NM_001167.2	apoptosis
0.14	0.01	PHLDA2	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	NM_003311	imprinting
0.15	0.02	DIABLO	Diablo homolog (<i>Drosophila</i>)	NM_138930	caspase activation via cytochrome c
0.15	0.02	TEGT	Testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	NM_003217.1	negative regulation of apoptosis
0.16	0.02	AATF	Apoptosis antagonizing transcription factor	NM_012138	
0.17	0.03	FLJ21901	Hypothetical protein FLJ21901	NM_024622	
0.17	0.03	RNF130	Ring finger protein 130	NM_018434	protein ubiquitination
0.18	0.03	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	NM_003879	induction of apoptosis by extracellular signals
0.20	0.03	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	NM_003789.2	induction of apoptosis
0.25	0.04	POGK	Pogo transposable element with KRAB domain	NM_017542	development
0.32	0.04	BCL2L12	BCL2-like 12 (proline rich)	NM_138639.1	
0.35	0.04	API5	Apoptosis inhibitor 5	NM_006595	anti-apoptosis
0.36	0.05	SH3GLB1	SH3-domain GRB2-like endophilin B1	NM_016009.2	
0.38	0.05	UBE1C	Ubiquitin-activating enzyme E1C (UBA3 homolog, yeast)	NM_003968	cell cycle
0.39	0.05	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence	NM_021960.3	anti-apoptosis

			1 (BCL2-related)		
0.42	0.05	DAD1	Defender against cell death 1	NM_001344	
0.42	0.06	PDCD6	Programmed cell death 6	NM_013232.2	induction of apoptosis by extracellular signals
0.45	0.06	SIAH2	Seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	NM_005067	cell cycle
0.51	0.06	BAG5	BCL2-associated athanogene 5	NM_004873	protein folding
0.54	0.07	BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	NM_005745	immune response
0.57	0.07	EBAG9	Estrogen receptor binding site associated, antigen, 9	NM_004215	regulation of cell growth
0.58	0.07	APP	Amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	NM_000484	cell adhesion
0.59	0.07	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	NM_002880.2	cell proliferation
0.61	0.07	BAG1	BCL2-associated athanogene	NM_004323	apoptosis
0.66	0.07	MAGI-3	Membrane-associated guanylate kinase-related (MAGI-3)	NM_020965.2	intracellular signaling cascade
0.75	0.07	DUSP22	Dual specificity phosphatase 22	BX648953	cell proliferation
0.76	0.08	YARS	Tyrosyl-tRNA synthetase	NM_003680.2	cell motility
0.79	0.08	BCL2L2	BCL2-like 2	NM_004050	regulation of apoptosis
0.80	0.08	BAX	BCL2-associated X protein	NM_138764.2	apoptotic mitochondrial changes
1.41	0.56	NGFR	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	NM_002507	neurogenesis

* 락토펜린(Wako) : 5 uM; 누에 추출물 : 20 ug/ml of media.

- 는 락토펜린에 의하여 감소된 유전자; + 는 증가된 유전자; NA는 signal이 매우

낮아서 filtering에서 제거됨

다. 락토페린과 누에추출물 의한 사람의 종양세포 증식 비교 : 락토페린은 종양세포에서의 성장을 억제하는 기능을 한다고 그동안 알려져 왔다. 그래서 누에 추출물의 효과를 확인하기 위하여 락토페린과 누에 추출물을 사람의 간암세포주인 HepG2와 T-cell 유래인 leukaemia 세포인 HL-60 세포에 처리하여 그들의 proliferation을 측정하였다. 동일한 수의 세포를 세포배양 dish에서 배양 24시간 후부터 락토페린과 누에추출물을 각각 처리하여 세포의 성장에 어떠한 영향을 끼치는지를 확인하였다. 각각의 세포의 배양조건은 37°C, CO₂는 5%, 습윤한 상태에서 배양하였다.

표2에서 확인하여 보면 락토페린과 누에 추출물을 처리한 후 24시간에서는 세포의 차이가 크지 않았다. 72시간이 지나면서 그 차이가 크게 나타나기 시작하였다. 락토페린은 어떠한 처리가 되지 않은 세포주에 비하여 세포의 proliferation이 억제 되는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 누에 추출물을 처리한 세포주 또한 proliferation이 억제 되는 것을 관찰할 수 있었으나 락토페린과 비교하였을 때 그 효과가 크지 않다.

표 2. 락토페린 (5uM)과 누에추출물(20ug/ml of media) 의한 HepG2 세포 증식

Cell growth (5회 평균, cells(X1000))				
	0H	24H	72H	120H
Control	200	400	740	1320
누에추출물	200	360	704	1246
락토페린	200	296	428	755

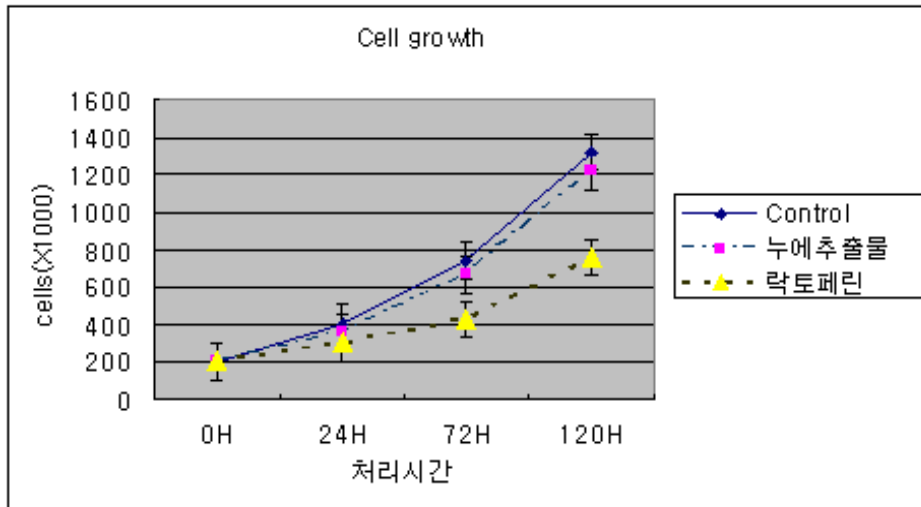
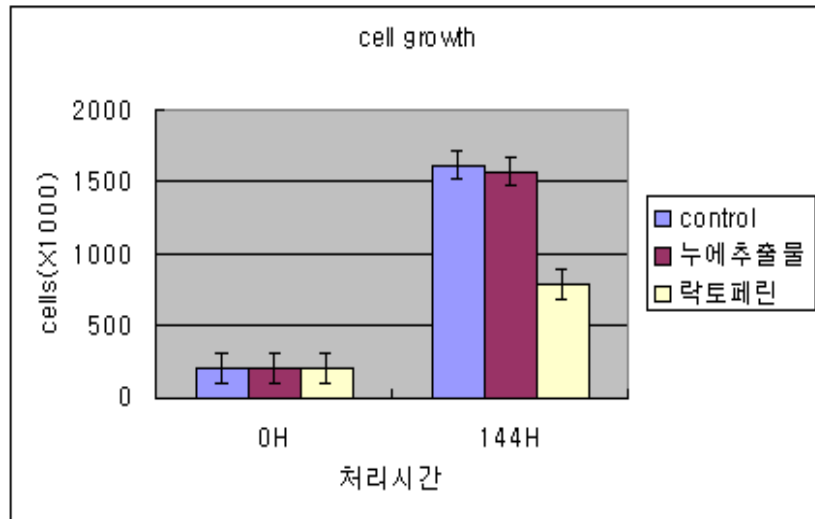


표3에서는 반복적으로 사람의 T세포 유래 leukemia 세포인 HL-60 cell에 HepG2 세포에서의 실험과 동일한 방법으로 락토페린과 누에추출물을 144시간 처리하였다. 락토페린을 처리한 세포에서의 성장이 아무런 처리가 되지 않은 세포보다 늦다는 것을 볼 수 있었다.

표 3. 락토페린 (5uM)과 누에추출물(20ug/ml of media) 의한 HL-60 세포 증식

Cell growth curve 2 (5회 평균, cells(X1000))		
	0H	144H
Control	200	1610
누에추출물	200	1570
락토페린	200	790



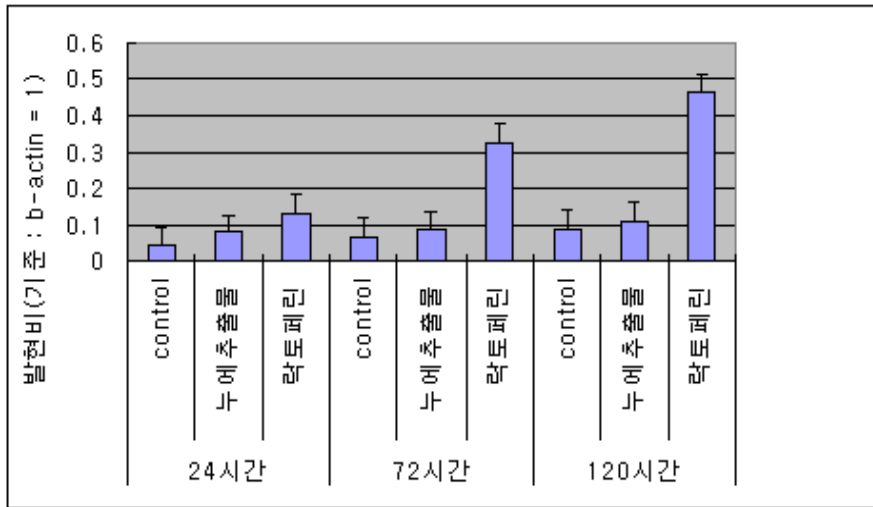
라. HepG2 세포에서의 락토페린과 누에추출물에서의 Anti-apoptosis gene인 TNFAIP3 발현 정도 비교 : 락토페린과 누에추출물을 사람의 간암 세포주인 HepG2에 처리하여 Anti-Apoptosis gene인 TNFAIP3(tumor necrosis factor, alpha-induced protein3)의 발현정도를 비교하였다. TNFAIP3 유전자는 TNF(tumor necrosis factor)에 의하여 발현이 된다고 알려져 있다. 그 TNFAIP3 유전자에 의하여 encoding 되는 단백질은 Zinc finger prtein으로 NF-kappa B의 활성을 억제한다. cDNA microarray를 통하여 선별된 유전자인 TNFAIP3의 발현의 차이를 통하여 락토페린 및 누에추출물의 효능을 확인하였다. 효능의 확인은 TNFAIP3 gene의 mRNA의 발현을 비교하기 위하여 real-Time PCR을 이용하였다. real time PCR에서 사용된 primer는 sense(5'-atg cac cga tac aca ctg ga-3')과 antisense(5'-gcg tgt gtc tgt ttc ctt ga-3')이다.

표4는 세포의 proliferation을 관찰한 세포주에서의 TNFAIP3의 mRNA의 발현을 비교한 것이다. 발현의 정도를 비교하기 위하여 House keeping gene인 beta-actin을 사용하였으며, 그 발현정도에 따른 비를 구하여 락토페린의 발현과 누에추출물의 효능을 비교하였다. 세포의 proliferation의 결과와 유사하게 세포를 culture dish에 분주한 후 24시간 후에 락토페린과 누에추출물을 처리한 후 24시간, 72시간, 120시간에

경과하였을 때 total RNA를 추출하였다. 이들 RNA를 cDNA로 합성 후에 TNFAIP3 gene에 대해서 real time PCR을 실시하였다. 24시간에서는 락토페린과 누에 추출물에서의 TNFAIP3 mRNA의 발현의 차이가 크게 나타나지 않았다. 그러나 시간이 지남에 따라 72시간, 120시간이 경과함에 따라 그 차이가 크게 나타나기 시작하였다. 락토페린에서는 TNFAIP3의 발현이 점차 증가하였다. 이는 락토페린이 종양세포의 apoptosis를 유도함에 따른 그 feedback 효과로 TNFAIP3의 발현이 나타는 것으로 판단된다. 마찬가지로 누에추출물 또한 락토페린과 마찬가지로 TNFAIP3의 발현이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 그러나 그 발현의 정도의 차이가 락토페린 만큼의 증가는 나타나지 않았다.

표 4. 락토페린과 누에추출물 처리 HepG2 세포의 TNFAIP3 mRNA 발현 비교

TNFAIP3 expression (5회 평균, beta-actin 기준 : 1)			
	24H	72H	120H
Control	0.042935	0.068067	0.092
누에추출물	0.078	0.088	0.109
락토페린	0.132127	0.326856	0.461764



락토페린과 누에추출물을 사람의 간암세포와 사람의 T-cell 유래의 HL-60 cell에 처리한 위의 실험을 통하여 누에추출물의 효능을 비교하였다. 종양세포의 proliferation의 억제와 TNFAIP3 유전자의 발현의 증가를 통하여 락토페린의 효능을 가지고 있으나 크지 않았음을 확인하였다.

4. 결과 요약

본 연구를 통하여 락토페린에 의한 사람 종양 세포인 HepG2 와 HL60 의 성장억제 및 apoptosis 발생을 확인하였고, 마이크로 어레이 실험을 통하여 주요 관련 유전자를 발견하였다. 주요 기전으로 TNFAIP3를 선별하여 락토페린에 의한 발현 감소를 경시적으로 확인하였다. 기존에 알려진 TNFAIP3의 NFkB에 대한 억제 조절 기능을 토대로 볼 때 이는 락토페린에 의한 apoptosis에서 중요한 기전으로 생각된다.

유전자 변형 누에 추출물을 사용한 실험결과 발현된 락토페린의 일부 효과를 발견할 수 있었고, 이를 토대로 유전자 변형 누에가 일정 부분 항암적인 효과가 있음을 보여주고 있다.

제 4 절 형질전환 누에발현 락토페린의 효능과 안전성 확립

1. 재료 및 방법

음성대조군은 (negative control: NC) 농업과학기술원으로부터 동일 령의 정상 누에에서 추출한 체액을 공여 받아 실험에 사용하였다. 양성대조군 (positive control: PC): Sigma에서 human lactoferrin을 구입하였다. 멸균증류수에 4 mg / ml 로 녹여서 0.2 μ m 로 filtering하여 -20℃에 보관하였다.

또한 재조합락토페린 처치군은 (Recombinant lactoferrin: rHF) 농업과학기술원으로부터 60 ug/ml 의 재조합 락토페린이 함유된 누에 체액을 공여 받아 실험에 사용하였다. 하루 2회 0.5ml 씩 투여한 군을 고농도 (rHF-HD)로 설정하고, 일일 1회 0.5 ml 씩 투여한 군을 저농도 (rHF-LD)로 하여 실험에 사용하였다. 천연락토페린 처치군은 hLF으로 표시하였다.

가. *Listeria monocytogenes*을 이용한 실험동물 모델 작제

1) Animals : 5주령 female BALB/c 마우스를 생명공학 연구소로부터 구입하였다. 사료와 음수는 자유 급이 하였으며, 1주일간 순화기간을 둔 후 실험에 사용하였다.

2) Bacterial culture and experimental design : *L. monocytogenes* strain ATCC 51774 (serotype 1/2a)을 tryptic soy agar에 37℃에서 overnight 배양하였고, 하나의 colony를 취하여 tryptic soy broth에 37℃에서 배양하였다. 600nm 파장에서 O·D값을 측정된 후, 투여할 용량으로 tryptic soy broth에 희석하였다. 각 군은 대조군(Con)과 *L. monocytogenes* 단독 투여군(L), 그리고 sodium bicarbonate 투여후 *L. monocytogenes* 투여군(Na)으로 하였고, 각 군은 5마리로 구성하였다. 감염군에는 존테를 이용하여 1×10^9 CFU/0.5ml/mouse의 농도로 경구 투여하였고, 대조군에는 동량의 tryptic soy broth를 투여하였다. Sodium bicarbonate 투여군에는 *L. monocytogenes* 감염에 대한 sodium bicarbonate의 효과를 확인하기 위해 10% sodium bicarbonate (Sigma, USA)를 100 μ l 경구 투여한 후, 30분 후에 균을 투여하였다. 실험 전에 O·D 값에 따른 CFU의 관계식을 얻기 위하여 평판 계수법을 이용하여 세균수를 측정하였다.

3) Body weight : 투여일과 부검 일에 체중을 측정하였다.

4) Food intake : 사료 섭취량을 매일 측정하였다.

5) Clinical signs & mortality : 임상증상과 동물의 사망 여부를 매일 관찰하였다. 분변의 색깔과 점도의 이상, 무기력, 식욕부진, 피모에 윤기가 없어지거나 세울 때 임상 증상을 나타내는 것으로 판정하였다.

6) Bacterial counting : 부검 시 비장과 간에서 *L. monocytogenes*의 수를 측정하였다. 비장과 간의 일부를 멸균 PBS (Phosphate buffered saline; pH 7.2)에 넣고 가위로 잘게 부순 후, 3ml 주사기로 up and down 하였다. 10^3 , 10^4 , 10^5 으로 각각 희석한 후, $100\mu\text{l}$ 를 취하여 50°C 의 palcam agar와 혼합하였고 실온에서 균힌 후, 다시 overlay 하였다. 이를 37°C 배양기에서 24-48 시간 배양한 후 증식한 균수를 측정하였다.

7) Histopathological examination : 실험 기간 내에 죽은 개체에 대해서는 곧바로 부검을 하였고, 감염 3일째에 모든 마우스를 부검하였다. 동물은 에테르로 마취한 후, 복대정맥을 통해 채혈하였다. 비장과 간장의 무게를 측정하였고, listeria 선택배지 (Palcam, Merck, German)를 이용하여 *L. monocytogenes* 균수를 측정하였다. 비장, 간장, 신장, 소장, 대장, 위, 폐장, 심장, 뇌를 10% 중성 포르말린에 24시간 고정한 후, alcohol-xylene에 processing 한 후, 파라핀 포매하였다. $2\mu\text{m}$ 의 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색을 하였고 광학현미경으로 관찰하였다.

8) Statistical analysis : 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System, Proprietary Software Release 8.1 version)를 이용하여 유의수준 $p<0.05$ 에서 수행하였다.

나. *Salmonella enteritidis*를 이용한 실험동물 모델 작제

1) Animals : 4주령 female BALB/c 마우스를 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 구입하였다. 사료와 음수는 자유 급이 하였으며, 1주일간 순화기간을 둔 후 실험에 사용하였다.

2) Bacterial culture : 실험에 사용할 균주는 *S. enterica* serovar *enteritidis*로 tryptic soy agar에 37°C 에서 overnight 배양하였고, 하나의 colony를 취하여 tryptic

soy broth에 37°C에서 배양한 후, 600nm 파장에서 O·D값을 측정하였고 6마리의 마우스에 존테를 이용하여 2×10^8 CFU/0.5ml/mouse의 농도로 경구 투여하였다. 대조군 5마리에는 동량의 tryptic soy broth를 경구 투여하였다. 실험 전에 O·D 값에 따른 CFU의 관계식을 얻기 위하여 평판 계수법을 이용하여 세균수를 측정하였다.

3) Body weight : 투여전과 투여 후 3일째 되는 날 체중을 측정하였다.

4) Food intake : 사료 섭취량을 매일 측정하였다.

5) Bacterial counting : 투여 후 2일과 4일 째, 분변을 채취하여 배출되는 *S. enteritidis*의 수를 측정하였다. 분변을 정량한 후 멸균 PBS에 serial 희석하였고, Salmonella 선택배지인 XLD agar (Difco, USA)에 overlay한 후, 37°C 세균 배양기에서 24시간 배양하여 균수를 측정하였다.

6) Clinical signs & mortality : 임상증상과 동물의 사망 여부를 매일 관찰하였다. 분변의 색깔과 점도의 이상, 무기력, 식욕부진, 피모에 윤기가 없어지거나 세울 때 임상 증상을 나타내는 것으로 판정하였다.

7) Histopathological examination : 실험 기간 내에 죽은 개체에 대해서 부검을 하였고, 감염균이 투여 6일째까지 모두 폐사하였으므로, 이때 대조군도 모두 부검하였다. 대조군 부검 시에는 에테르로 마취한 후, 복대정맥을 통해 채혈하였다. 비장, 간장, 신장, 소장, 대장, 위, 폐장, 심장, 뇌를 10% 중성 포르말린에 24시간 고정한 후, alcohol-xylene에 processing 한 후, 파라핀 포매하였다. 2 um의 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색을 하였고 광학현미경으로 관찰하였다.

8) Statical analysis : 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System, Proprietary Software Release 8.1 version)를 이용하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 수행하였다.

다. *Listeria monocytogenes*에 대한 천연 락토페린의 항생 효과 검증

1) Preperation of Natural Human lactoferrin : Sigma에서 천연락토페린을 구입하였다. 멸균증류수에 4 mg/ml로 녹여서 0.2 μ m로 filtering하여 -20°C에 보관하였다.

2) Determination of MICs(minimal inhibitory concentration) : 실험에 사용할 균주는 *S. enterica* serovar *enteritidis*, *L. monocytogenes* strain ATCC 19111, 19113,

19115, 51774 을 tryptic soy agar 에서 37°C에서 overnight 배양하였고, 하나의 colony를 취하여 pepton yeast glucose broth 에 37°C에서 배양하였다(ATCC19115는 tryptic soy broth에 배양). 1×10^6 CFU / ml을 96 well plate에 분주하고 여러 농도의 락토페린을 첨가하였다. 37°C에서 배양하여 시간대 별로 O·D 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Animals & diets : 4주령 female BALB/c 마우스를 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 구입하였다. 사료와 음수는 자유 급이 하였으며, 1 주일간 순화기간을 둔 후 실험에 사용하였다.

4) Experimental Design : 각 군은 대조군 (NC)과 *L. monocytogenes* 단독 투여군 (PC), 천연 락토페린 고농도(2mg / mouse) 투여군(HD), 천연 락토페린 저농도(0.2mg/ mouse) 투여군(LD)으로 설정하였으며 각 군은 6마리로 구성하였다. 락토페린은 실험개시일부터 부검일 까지 존대를 이용하여 7일간 경구투여 하였고, 대조군과 *L. monocytogenes* 단독 투여군에는 동량의 PBS(Phosphate buffered saline; pH 7.2)를 투여하였다. 락토페린 투여 기간 중 3일째에 PC, HD, LD군에 10% sodium bicarbonate (Sigma, USA) 100 μ l를 투여한 후, *L. monocytogenes*를 30분 후에 존대를 이용하여 1×10^8 CFU/0.5ml/mouse의 농도로 경구 투여하였고, 대조군에는 동량의 PBS를 투여하였다. 군 투여일에는 락토페린을 군 투여 후 6시간 후에 투여하였다.

Group	Animal No	Listeria treat (oral)	hLF treat (oral)
NC	6	PBS 0.5ml	PBS 0.5ml
PC	6	10^8 /0.5ml	PBS 0.5ml
HD	6	10^8 /0.5ml	2mg/0.5ml
LD	6	10^8 /0.5ml	0.2mg/0.5ml

5) Body weight : 실험 전일에 걸쳐 매일 체중을 측정하였다.

6) Food intake : 사료 섭취량을 매일 측정하였다.

7) Clinical signs & mortality : 임상증상과 동물의 사망 여부를 매일 관찰하였다. 분변의 색깔과 점도의 이상, 무기력, 식욕부진, 피모에 윤기가 없어지거나 세울 때

상 증상을 나타내는 것으로 판정하였다.

8) Bacterial counting : 균 투여 후 1일과 2일째에 분변에서 *L. monocytogenes*의 수를 측정하였다. 분변의 무게를 측정하고, 멸균 PBS에 넣고 homogenizer로 잘게 부순 후 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 으로 각각 희석한 후, 100 μ l를 취하여 50 $^{\circ}$ C의 palcam selective agar와 혼합하였고 실온에서 굳힌 후, 다시 overlay 하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24-48 시간 배양한 후 증식한 균수를 측정하였다. 부검 시 비장과 간에서 균수를 측정하였다. 비장, 간장 및 위장의 일부를 멸균 PBS 에 넣고 homogenizer로 잘게 부순 후, 3 ml 주사기로 up and down 하였다. 10^4 , 10^5 , 10^6 으로 각각 희석한 후, 100 μ l을 취하여 50 $^{\circ}$ C의 palcam selective agar와 혼합하였고 실온에서 굳힌 후, 다시 overlay 하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24-48 시간 배양한 후 증식한 균수를 측정하였다.

9) Histopathological examination : 감염 3일째에 모든 마우스를 부검하였다. 동물은 에테르로 마취한 후, 복대정맥을 통해 채혈하였다. 비장, 간장, 신장, 소장, 대장, 위, 폐장, 심장, 뇌를 10% 중성 포르말린에 24시간 고정한 후, alcohol-xylene에 processing 한 후, 파라핀 포매하였다. 2 um의 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색을 하였고 광학현미경으로 관찰하였다.

10) Statistical analysis : 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System, Proprietary Software Release 8.1 version)를 이용하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 수행하였다.

라. *Listeria monocytogenes*에 대한 항생효과 평가시험

1) Animals & diets : 4주령 female BALB/c 마우스를 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 구입하였다. 사료와 음수는 자유 급이 하였으며, 1 주일간 순화기간을 둔 후 실험에 사용하였다.

2) Experimental Design

표1. *L. monocytogenes* 에 대한 형질전환 누에 채액의 항생효과 평가 시 균 설정 및 실험계획

Group	Animal No	Listeria treat (oral)	hLF treat (oral)	Total lactoferrin
NC	5	PBS 0.5ml	정상누에 체액 0.5ml	0
PC	5	5*10 ⁸ /0.5ml	정상누에 체액 0.5ml	0
hLF	5	5*10 ⁸ /0.5ml	1 mg / 0.5 ml for 7일	7 mg / mouse
rLF-HD	5	5*10 ⁸ /0.5ml	형질전환누에 체액 0.06 mg/0.5ml for 56일	3.36 mg / mouse
rLF-LD	5	5*10 ⁸ /0.5ml	형질전환누에 체액 0.03 mg/0.5ml for 56일	1.68 mg / mouse

각 군은 음성대조군 (NC)과 양성대조군 (PC), 천연 락토페린 투여군(hLF, 7 mg/mouse), 형질전환 누에 체액 투여군(rLF-HD: 3.36 mg / mouse, rLF-LD: 1.68 mg/mouse)으로 설정하였으며 각 군은 5마리로 구성하였다. 락토페린은 실험개시 일 부터 부검일 까지 존대를 이용하여 매일 경구투여 하였고, 대조군은 동량의 정상누에 체액을 투여하였다. 락토페린 투여 기간 중 53일째에 PC, hLF, rLF-HD, rLF-LD 군에 10% sodium bicarbonate (Sigma, USA) 100ul를 투여한 후, *L. monocytogenes* ATCC 51774를 30분 후에 존대를 이용하여 5×10⁸ CFU/0.5ml/mouse의 농도로 경구 투여하였고, 대조군에는 동량의 PBS를 투여하였다. 군 투여일에는 락토페린을 군 투여 후 최소 4시간 후에 투여하였다.

3) Body weight : 실험 전일에 걸쳐 매일 체중을 측정하였다.

4) Food intake : 사료 섭취량을 매일 측정하였다.

5) Clinical signs & mortality : 임상증상과 동물의 사망 여부를 매일 관찰하였다. 분변의 색깔과 점도의 이상, 무기력, 식욕부진, 피모에 윤기가 없어지거나 세울 때 임상 증상을 나타내는 것으로 판정하였다.

6) Bacterial counting : 군 투여 후 1일과 2일째에 분변에서 *L. monocytogenes*의 수를 측정하였다. 분변의 무게를 측정하고, 멸균 PBS에 넣고 homogenizer로 잘게 부

순 후 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 으로 각각 희석한 후, 100 μ l를 취하여 50°C의 palcam selective agar와 혼합하였고 실온에서 굳힌 후, 다시 overlay 하였다. 이를 37°C 배양기에서 24-48 시간 배양한 후 증식한 균수를 측정하였다.

부검 시 비장과 간에서 균수를 측정하였다. 비장, 간장 및 위장의 일부를 멸균 PBS에 넣고 homogenizer로 잘게 부순 후, 3 ml 주사기로 up and down 하였다. 10^4 , 10^5 , 10^6 으로 각각 희석한 후, 100 μ l을 취하여 50°C의 palcam selective agar와 혼합하였고 실온에서 굳힌 후, 다시 overlay 하였다. 이를 37°C 배양기에서 24-48 시간 배양한 후 증식한 균수를 측정하였다.

7) Histopathological examination : 감염 3일째에 모든 마우스를 부검하였다. 동물은 에테르로 마취한 후, 복대정맥을 통해 채혈하였다. 비장, 간장, 신장, 소장, 대장, 위, 폐장, 심장, 뇌를 10% 중성 포르말린에 24시간 고정한 후, alcohol-xylene에 processing 한 후, 파라핀 포매하였다. 2 um의 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색을 하였고 광학현미경으로 관찰하였다.

8) Statistical analysis : 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System, Proprietary Software Release 8.1 version)를 이용하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 수행하였다.

마. Lewis lung carcinoma (LLC) cell 에 대한 항암효과 평가시험

1) 세포배양 (Preparation of cell line) : LLC 세포를 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland)에서 구입하여, Dulbecco's modified Eagle's 배지 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)에, 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 과 streptomycin을 첨가하여 배양하였다.

2) Animals & diets : 5주령 수컷 C57BL/6 mice를 서울대학교 실험동물 사육장에서 구입하였다. 마우스는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ 의 습도, 그리고 12시간 간격으로 light/darkness(오전 07시 점등, 오후 19시 소등)를 제공하였다. 공기는 일정하게 교환 유지하며, 사료와 음수는 자유 공급하였다.

3) Clinical signs & mortality : 임상증상과 동물의 사망 여부를 매일 관찰하였다. 분변의 색깔과 점도의 이상, 무기력, 식욕부진, 피모에 윤기가 없어지거나 세울 때 입

상 증상을 나타내는 것으로 판정하였다.

4) Experimental Design

표2. LLC 에 대한 형질전환 누에 체액의 항암효과 평가 시, 군 설정 및 실험계획

Group	n=	route	LLC	hLF treat (oral)	Total lactoferrin
NC	5	SC	0	PBS	0
PC	5	SC	1×10 ⁶ cell	PBS	0
hLF-HD	5	SC	1×10 ⁶ cell	0.5 mg / 0.1 ml hLF for 3일	1.5 mg / mouse
hLF-LD	5	SC	1×10 ⁶ cell	0.05 mg / 0.1 ml hLF for 3일	0.15 mg / mouse
rLF-HD	5	oral	1×10 ⁶ cell	형질전환누에 체액 (0.06 mg/0.5ml rLF) for 56일	3.36 mg / mouse
rLF-LD	5	oral	1×10 ⁶ cell	형질전환누에 체액 (0.03 mg/0.5ml rLF) for 56일	1.68 mg / mouse

각 군은 음성대조군 (NC)과 양성대조군 (PC), 천연 락토페린 투여군(hLF, 3.5 mg/mouse), 형질전환 누에 체액 투여군(rLF-HD: 3.36 mg / mouse, rLF-LD: 1.68 mg/mouse)으로 설정하였으며 각 군은 5마리로 구성하였다. 락토페린은 실험개시 일 부터 부검일 까지 존대를 이용하여 매일 경구투여 하였고, 대조군은 동량의 정상누에 체액을 투여하였다. 락토페린 투여 기간 중 44일째에 PC, hLF, rLF-HD, rLF-LD 군 에 1×10⁶ cell/0.2ml/mouse의 농도로 좌측 flank에 피하로 주입하였으며, 음성 대조군 에는 동량의 PBS를 투여하였다. 누에 체액은 재조합 락토페린을 정제한 것이 아님으 로 경구투여로 수행하였으며, 피하 고농도투여용량과 비슷하거나 높게 군을 설정하였 다.

5) 종양이식 평가 : 종양 세포이식 후 5일 정도부터 육안적으로 인지 가능함을 2차 년도 과제 수행 중에 관찰하였으며, 천연락토페린의 경우 SC로 종양이식 후 6일부터 8일까지 3일간 투여하였으며, 종양세포 이식 후 12일 쯤 부검하였다.

형질전환누에 체액은 종양 이식 44일 전부터 투여하였으며, 종양세포 이식 후 12일간

추가 투여한 후 부검하였다.

가) 종양크기 측정 : 종양세포는 육안적인 것인지 가능한 5~6일째부터 장축과 단축을 측정하였으며, 부피단위로의 nomalization 은 $a*b^2/2$ (a: 장축, b: 단축, 단위: mm³)로 표현하였다.

나) 조직병리학적 검사 : 10 % 중성 포르말린에 고정 후 파라핀 포매 후 H&E stain 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

다) Apoptosis 분석 : TUNEL assay kit (In Situ Cell Detection Kit, POD, Roche Applied Science, Penzberg, Germany)를 이용하여 파라핀 포매한 슬라이드에 대해 실시하였다. manufacturer's manual에 의해 수행하였다.

라) 통계처리 : SAS ver 8.2 system을 이용하여 수행하였다.

바. 형질전환 누에 체액의 안전성 평가

1) Animals & diets : 4주령 female BALB/c 마우스를 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 구입하였다. 사료와 음수는 자유 급이 하였으며, 1 주일간 순화기간을 둔 후 실험에 사용하였다.

2) 반복투여 경구독성실험 : 식품의약품안전청고시 제2003-37호 유전자재조합식품의 안전성평가심사등에 관한 규정 및 식품의약품안전청 고시 제2005-51호 위해평가방법 및 절차 등에 관한 지침 을 참고하여 수행하였으며 군 설정 및 투여 농도 및 기간은 표3과 같다.

표3. 형질전환 누에 체액의 안전성 평가 시 군 설정 및 실험계획

Group	동물수	route	hLF treat (oral)	평가항목
negative control	5	oral	정상누에 체액 2000 mg / kg	조직병리학적평가, IgE측정, 장내 정상세균총 수 측정
rLF-HD	5	oral	형질전환누에 체액 2000 mg / kg	조직병리학적평가, IgE측정, 장내 정상세균총 수 측정
rLF-LD	5	oral	형질전환누에 체액 200 mg / kg	조직병리학적평가, IgE측정, 장내 정상세균총 수 측정

3) 조직병리학적 검사 : 각 군은 대조군과 형질전환 누에 체액 투여군(rLF-HD: 2000 mg/kg, rLF-LD: 200 mg/kg)으로 설정하였으며 각 군은 5마리로 구성하였다. 형질전환 누에체액은 실험개시일부터 부검일 까지 존대를 이용하여 두 달간 매일 경구투여 하였고, 대조군은 정상누에 체액을 투여하였다 (표 3). 이 후, 부검하여 각 간, 뇌, 비장, 신장, 위, 장을 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 10 % 중성 포르말린에 고정 후 파라핀 포매한 후 H&E stain 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

사. 면역원성 평가 (IgE 측정)

표 3에서와 같이, 형질전환 누에 체액을 두 달 동안 반복적으로 매일 경구투여한 후 Ethyl ether(sigma)로 경도 마취한 후, 심장에서 채혈하였다. 혈액샘플을 3000g에서 30분간 원심 분리하여, serum을 수거하였으며, IgE ELISA를 수행하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

1) Total IgE의 측정 : Mouse IgE sandwich ELISA kit(Shibayagi co. Japan)를 이용하여 IgE를 정량하였으며, manufacturer's manual 에 의해 수행하였다.

2) Specific IgE 의 측정 : 형질전환 누에 체액에 대한 specific IgE를 측정하기 위하여, 96 well plate에 형질전환 누에 체액 10 ug / well을 coating한 후, 40배 희석한 마우스 serum를 1차 항체로 하여 ELISA를 수행하였다. 1차 항체는 4°C에서 overnight 반응하였으며, 0.05% t-PBS 로 3회 washing하였다. 2차 항체는 kit에 있는

biotin-conjugated monoclonal anti mouse IgE를 사용하여 Mouse IgE sandwich ELISA kit(Shibayagi co. Japan) manual 에 따라 수행하였다.

아. 항생제 내성에 의한 정상세균총의 변화 평가

표3에서와 같이, 형질전환 누에 체액을 두 달 동안 반복적으로 매일 경구투여한 후 부검하여, 소장을 분리하였다. 분리한 소장의 무게를 측정하고, 멸균 PBS에 넣고 homogenizer로 잘게 부순 후 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 으로 각각 희석한 후, 100 μ l를 취하여 혈액배지에 접종하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24-48 시간 배양한 후 증식한 균수를 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. *Listeria monocytogenes*을 이용한 실험동물 모델 작제

1) CFU 측정 : 평판 계수법에 의한 균수를 측정한 결과, $y = (35.955x - 2.5063) \times 10^8$ CFU/ml (x = optic density at wavelength of 600nm) 의 식을 얻을 수 있었다.

2) Body weight(g) : *L. monocytogenes* 감염 3일 후 체중 변화를 관찰한 결과, 감염군과 대조군 사이에 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다. 그러나 대조군이 평균 1.0g 정도 체중이 증가한 반면, *L. monocytogenes* 단독 투여군과 sodium bicarbonate 처치 후 감염군은 각각 평균 0.3g과 0.4g의 체중 증가를 보였다 (사망한 개체는 제외하였음, Fig. 1).

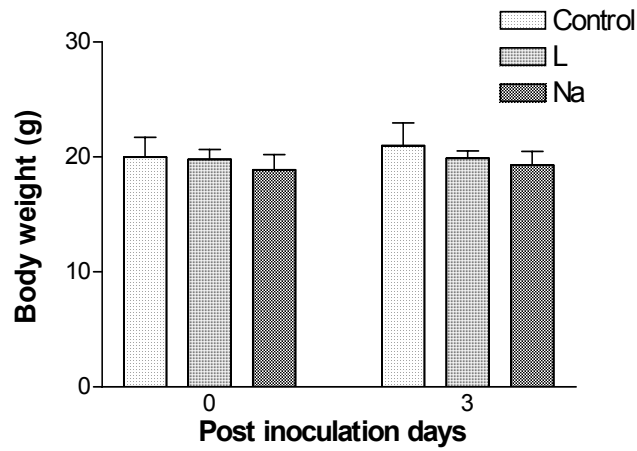


Fig. 1. Measurement of body weight.

3) Food intake(g) : 대조군은 실험 기간 동안 사료 섭취량이 비교적 일정하였으나, *L. monocytogenes* 단독 투여군은 감염 2일까지는 사료 섭취량이 현저히 적었으나 감염 3일째는 대조군에 가깝게 회복된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 sodium bicarbonate 처치 후 감염 군에서는 감염 후 3일간 모두 대조군에 비해 사료 섭취량이 다소 감소한 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

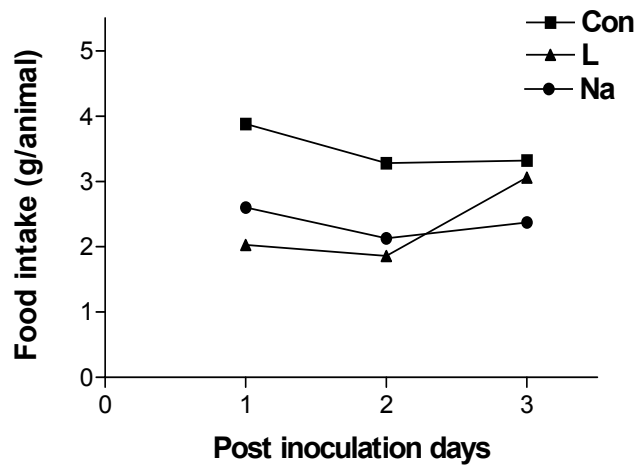


Fig. 2. Measurement of daily food intake per mouse.

4) Clinical signs : *L. monocytogenes* 단독 투여군과 대조군에서는 어떠한 개체에서도 특징적인 임상증상이 관찰되지 않았다. Sodium bicarbonate 처치 후 *L. monocytogenes* 감염군에서는 일부 마우스에서 피모에 윤기가 없으면서 거칠게 관찰되었으나, 무기력하거나 운동성을 소실한 개체는 관찰되지 않았다.

5) Mortality : Sodium bicarbonate 처치 후 *L. monocytogenes* 감염군에서는 감염 후 1일째 1마리가 사망하였고, *L. monocytogenes* 단독 투여군에서는 감염 후 2일째 1마리가 사망하였다. *Listeria* 선택배지 (Palcam, Merck, German)를 이용하여 사망한 개체의 비장과 간에서 세균 분리를 한 결과, 모두 10^5 CFU/ml 이상의 세균이 분리되었다.

	Post inoculation days				
	0	1	2	3	Total
Con	0	0	0	0	0/6
L	0	0	1	0	1/5
Na	0	1	0	0	1/5

6) Bacterial counting in spleen and liver : *L. monocytogenes* 단독 투여군은 4마리 중 (실험 기간 내에 죽은 1마리 제외) 1마리의 비장에서만 균이 분리되었다. 그러나 sodium bicarbonate 처치 후 *L. monocytogenes* 감염군에서는 4마리 중 3마리의 간과 비장에서 균이 분리되었다. 그러나 분리된 균의 수에서는 개체 간에 다소 차이를 나타내었다. 한편, 대조군의 어떤 마우스의 비장과 간에서도 *Listeria*는 검출되지 않았다(Table 1).

Table 1. Bacterial counting in spleen and liver(CFU/ml)

	Spleen			Liver		
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
Con-1	0	0	0	0	0	0
Con-2	0	0	0	0	0	0
Con-3	0	0	0	0	0	0
Con-4	0	0	0	0	0	0
Con-5	0	0	0	0	0	0
L-1	0	0	0	0	0	0
L-2	dead during experimental periods					
L-3	0	0	0	0	0	0
L-4	*	39	7	0	0	0
L-5	0	0	0	0	0	0
Na-1	18	3	0	4	0	0
Na-2	0	0	0	0	0	0
Na-3	*	18	2	1	0	0
Na-4	5	3	0	16	3	0
Na-5	dead during experimental periods					

*: could be counted because of too many proliferation of colonies

7) Histopathological examination : 비장, 간, 신장, 소장, 폐, 심장, 뇌 등을 조직 병리학적으로 관찰한 바, 대조군과 L. monocytogenes 단독 투여군 (1×10⁹ CFU/0.5ml/mouse)에서는 어떠한 병변도 관찰할 수 없었다. 그러나 sodium bicarbonate 처치 후 L. monocytogenes를 투여한 군에서는 간에서 소수의 호중구 침윤과 함께 국소의 피사소가 관찰되었다. 이러한 병변은 간에서 세균 분리가 되었던 Na-1, 3, 4에서는 두드러지게 나타났으나, Na-2에서는 매우 경미한 정도로만 관찰되었다. 비장에서는 경도의 충혈과 함께 백비수의 위축이 관찰되었다. 비장과 간 이외의 장기에서는 특징적인 병변이 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 2. Histopathological examination for several major organs of mice.

	<i>Histopathological examinations</i>						
	Spleen	Liver	Kidney	Small intestine	Lung	Heart	Brain
Con-1	-	-	-	-	-	-	-
Con-2	-	-	-	-	-	-	-
Con-3	-	-	-	-	-	-	-
Con-4	-	-	-	-	-	-	-
Con-5	-	-	-	-	-	-	-
L-1	-	-	-	-	-	-	-
L-2	Dead						
L-3	-	-	-	-	-	-	-
L-4	-	-	-	-	-	-	-
L-5	-	-	-	-	-	-	-
Na-1	+	+	-	-	-	-	-
Na-2	+	+	-	-	-	-	-
Na-3	+	+	-	-	-	-	-
Na-4	+	+	-	-	-	-	-
Na-5	Dead						

- : No specific lesion, +: liver; multifocal necrosis or microabscess, spleen; mild congestion and atrophy of white pulp.

나. *Salmonella enteritidis*를 이용한 실험동물 모델 작제

1) CFU 측정 : 평판 계수법에 의해 세균 수를 측정한 결과, $y = (929.6x - 80.013) \times 10^6$ CFU/ml (x = optic density at wavelength of 600nm)의 식을 얻을 수 있었다.

2) Body weight(g) : 대조군은 투여 전에 비해 3일 후 평균 2.6g의 체중이 증가하였으나 *S. enteritidis* 투여군은 감염 3일 후에 투여전보다 체중이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$, Fig. 1).

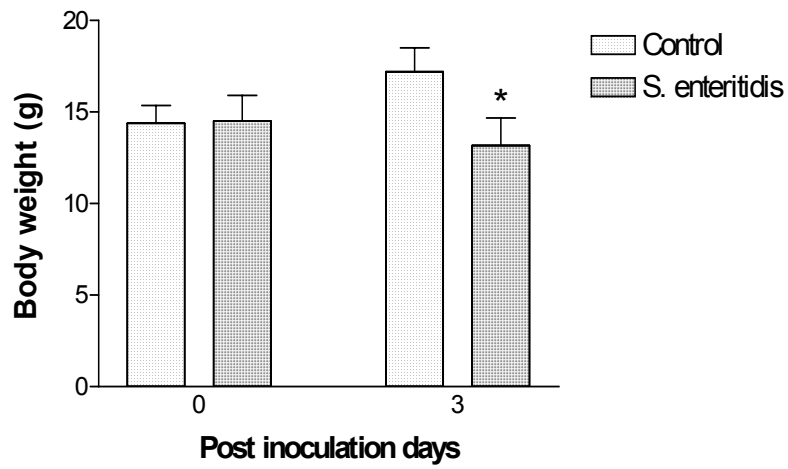


Fig. 1. Measurement of body weight at 0 and 3 postinoculation days.

3) Food intake(g) : 대조군은 실험 전 기간에 걸쳐 사료 섭취량이 비교적 일정 하였으나, *S. enteritidis* 감염군은 감염 3일째부터 급격히 사료 섭취량이 감소하였다 (Fig. 2).

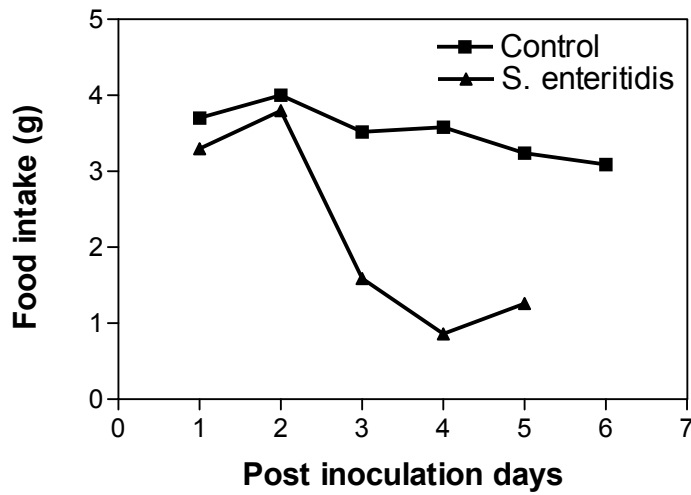


Fig. 2. Measurement of food intake during experimental periods.

4) Bacterial counts in feces : 감염 2일과 4일째 분변에서 Salmonella 선택배지를 이용하여 *S. enteritidis* 균 분리를 한 결과, 감염군 6마리에서 모두 균이 재분리 되었고, 감염 2일째에 비해 4일째에 균수가 다소 증가하였다(Fig. 3).

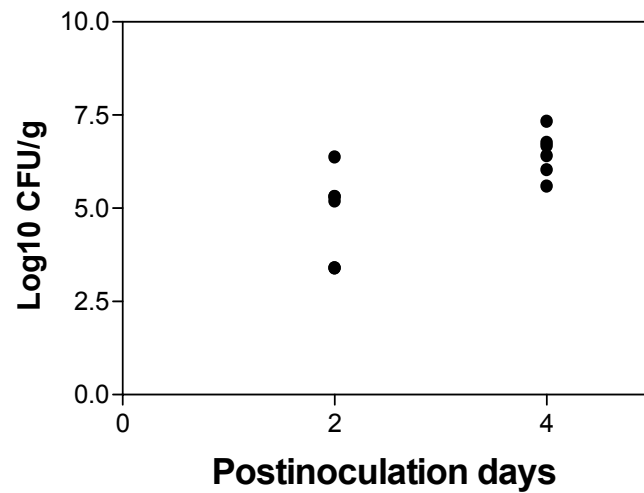


Fig. 3. Bacterial counts in feces at 2 and 4 postinoculation days.

5) Clinical signs : *S. enteritidis* 감염군에서는 감염 2일째부터 임상 증상을 보이기 시작했다. 감염 2일째 감염군 두 마리의 피모가 대조군에 비해 거칠어졌고 털을 세우는 증상이 관찰되었고, 케이지 내의 다른 개체들과 대조군의 마우스가 비교적 활발히 움직이는 반면 활동성을 소실하여 케이지 모서리에 서로 웅크리고 있는 모습이 관찰되었다. 이러한 증상은 감염 3일째 감염군 6마리 전 개체에서 관찰되기 시작하였으며, 폐사할 때까지 계속되었다(Fig 4). 그러나 대조군의 어떤 마우스에서도 이러한 증상은 관찰되지 않았다.

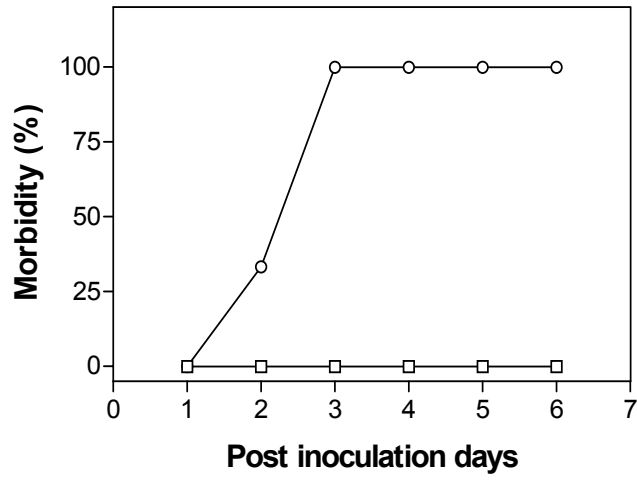


Fig. 4. Evaluation of morbidity during experimental periods.

6) Mortality : *S. enteritidis* 감염군은 감염 5일째 1마리가 사망하였고, 6일째 3마리, 그리고 7일째 남은 두 마리가 모두 사망하였다. 대조군에서는 어떤 마우스도 사망하지 않았다 (Fig. 5).

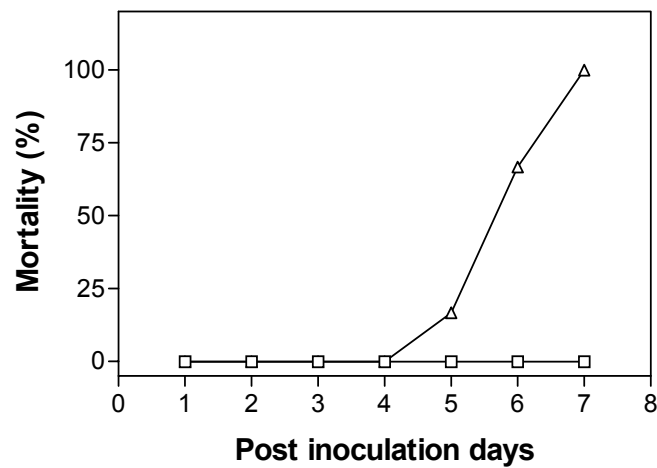


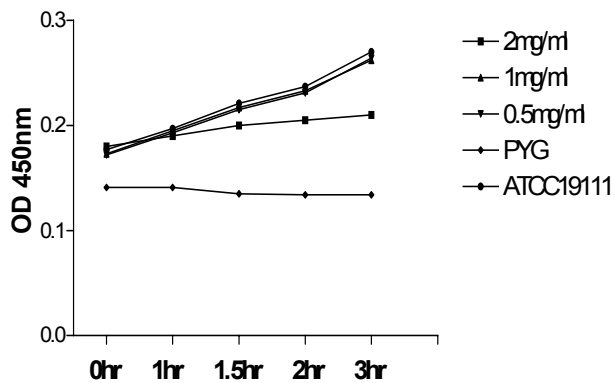
Fig. 5. Evaluation of mortality during experimental periods.

7) Histopathological examination : 사망한 마우스를 부검하여 주요 장기에 대한 조직 병리학적 관찰을 하였다. 비장에서는 백비수가 심하게 위축되었고, 비장 전체에 걸쳐 마크로파지의 침윤과 함께 비장 세포의 괴사가 관찰되었다. 일부에서는 부종 소견이 관찰되기도 하였다. 간에서는 간세포의 괴사가 간 전체에 걸쳐 대량으로 일어나 있었고, 일부 간세포는 공포 변성이 일어났으며, 중도의 출혈 소견도 관찰되었다. 괴사소 주위에서는 주로 단핵구계의 염증세포가 침윤하였으며, 괴사소 내부에서는 대량의 세균 집락이 관찰되었다. 신장에서는 심한 출혈 소견과 함께 세뇨관 내부에 부종이 관찰되었으며 세뇨관 상피 세포의 괴사 및 공포 변성이 관찰되었다. 그러나 이러한 병변부에서 염증 반응은 관찰되지 않았다. 감염 후 7일째 사망한 한 마리의 마우스에서는 뇌막염이 관찰되기도 하였다. 소장에서는 고유 점막층 뿐만 아니라 점막하층까지 대량의 단핵구 침윤이 관찰되었다. 점막층 하부는 이러한 염증 세포 침윤과 함께 장 상피세포의 대량 괴사가 관찰되었고, 용모 상부의 상피세포 층은 괴사되어 대부분이 탈락하였다. 일부에서는 점막층 전체가 탈락되어 관찰되기도 하였다. 폐에서는 심한 폐출혈 소견이 관찰되었고, 폐포벽은 단핵구계의 염증세포의 침윤으로 매우 비후되어 폐포강이 거의 소실되었다.

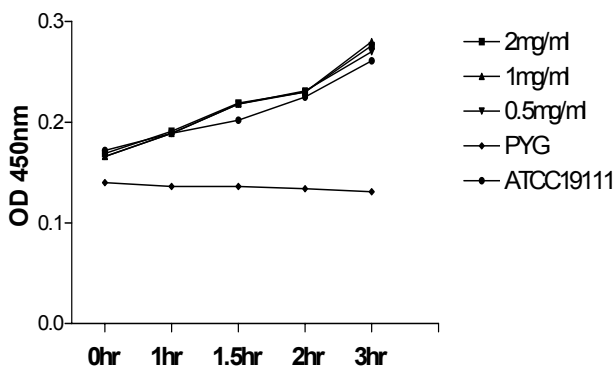
다. *Listeria monocytogenes*에 대한 천연 락토페린의 항생 효과 검증

1) MICs for bacteria : PYG배지에서 시간대별로 천연락토페린의 *L. monocytogenes*에 대한 MICs를 측정된 결과, ATCC19113을 제외한 모든 균주에서 천연 락토페린 농도 2mg/ml 이상에서 로그값이 0.5 이상 차이나는 것을 관찰하였다. ATCC51774의 경우 1mg/ml의 락토페린에서도 증식이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

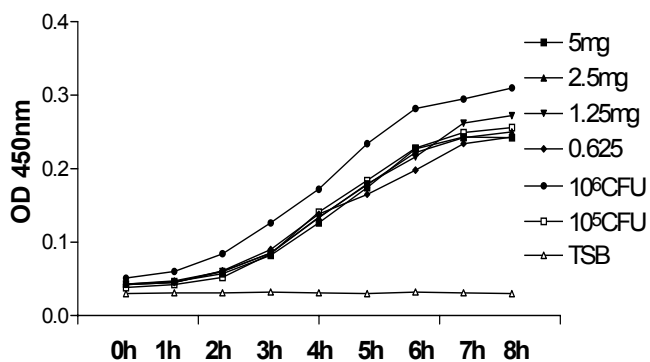
ATCC19111



ATCC19113



ATCC19115



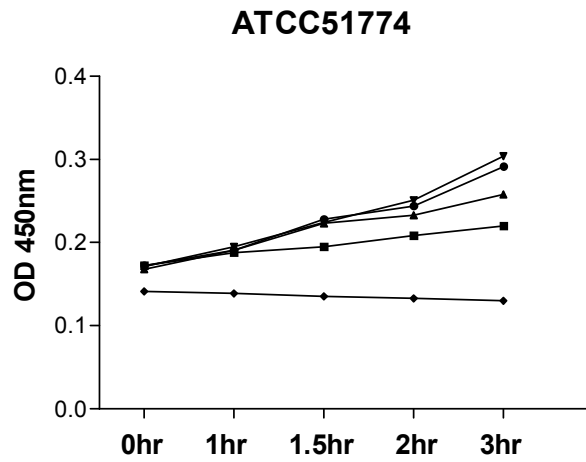


Fig. 1. MICs of *Listeria monocytogenes*

2) Body weight(g) : *L. monocytogenes* 감염 3일 후 체중 변화를 관찰한 결과, 투여군과 대조군 사이에 7일째에 유의적인 차이를 관찰할 수 있었다. 대조군이 평균 2.6g 정도 체중이 증가한 반면, *L. monocytogenes* 단독 투여군에서는 균 투여 후 체중이 감소하여 평균 ± 0 의 체중 증감을 보였으며, 천연 락토페린 처치 군은 균 투여 후 체중이 감소하였으나, 고농도 및 저농도 투여군에서 실험 시작 일에 비해, 각각 평균 1.0g과 0.5g의 체중증가를 보였다. 실험 종료일까지 사망한 개체는 없었다(Fig. 2).

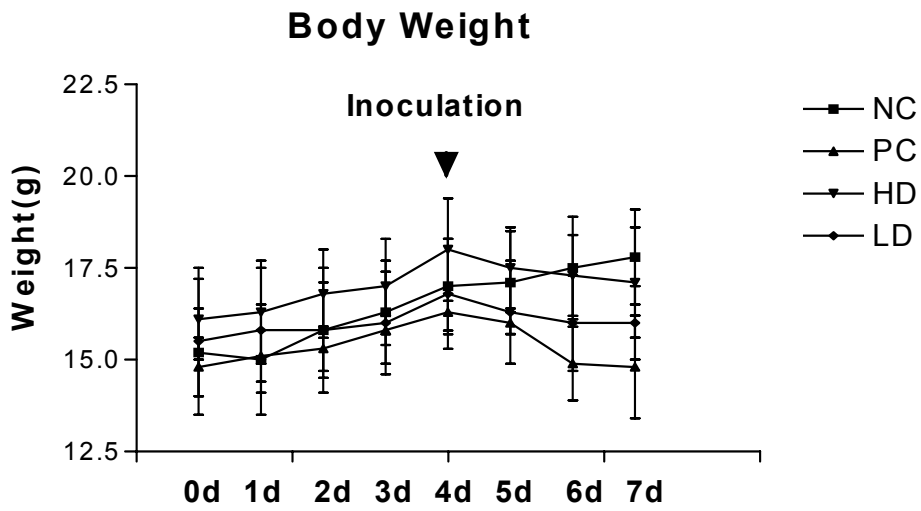


Fig. 2. Measurement of body weight.

3) Food intake(g) : 대조군은 실험 기간 동안 사료 섭취량이 비교적 일정하였으나, *L. monocytogenes* 단독 투여군과 락토페린 처치군은 감염 후 사료섭취량이 급격히 감소하였다(Fig. 3).

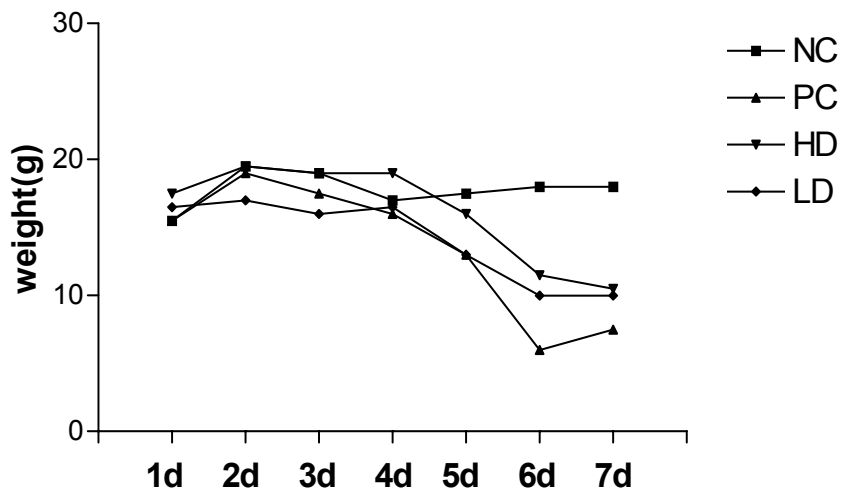


Fig. 3. Measurement of daily food intake per mouse.

4) Clinical signs : 실험 전군에서 특징적인 임상증상이 관찰되지 않았다. *L. monocytogenes* 감염군에서는 일부 마우스에서 피모에 윤기가 없으면서 거칠게 관찰되었으나, 무기력하거나 운동성을 소실한 개체는 관찰되지 않았다.

5) Bacterial counting in feces : *L. monocytogenes* 감염 1일과 2일에 분변에서 균수를 측정하였으나, 감염 2일째 락토페린 고농도 투여군에서 10^4 배로 희석하였을 때 균이 배양되지 않은 개체가 있어서, 유의적인 결과는 관찰할 수 없었다. 그러나 락토페린 고농도 처치군에서 균수가 감소하는 경향을 보이며, 감염 2일째에 *L. monocytogenes* 단독감염 군에서 균수가 급증하는 경향을 보였다(Fig. 4).

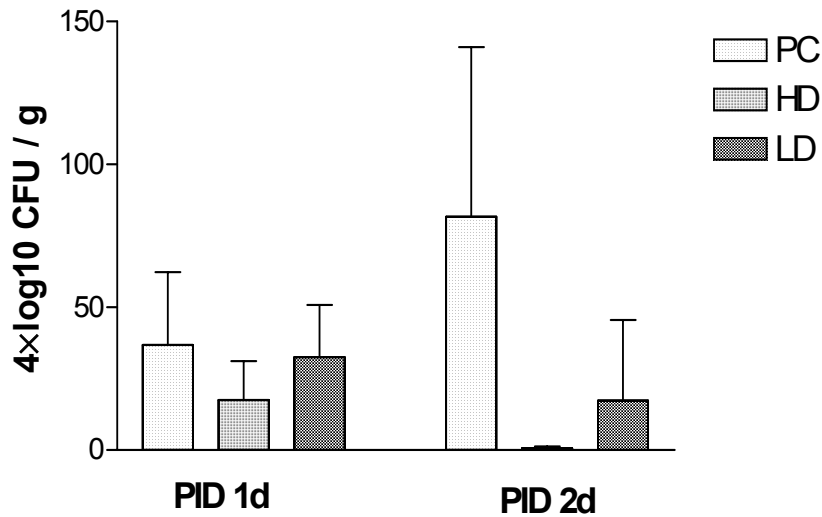


Fig. 4. Bacterial counting in feces(CFU/g)

6) Bacterial counting in spleen and liver : 부검 시 간장, 비장, 위장에서 균수를 측정하였으나 간장을 제외한 나머지 장기에서 유의적인 결과를 관찰할 수 없었다. 위장에서는 *L. monocytogenes* 단독감염 군에 비해 락토페린 투여군에서 균수가 감소하는 경향을 보이나, 10^4 배 희석하였을 때 배양되지 않은 개체가 있었다(Fig. 5).

Bacteria count in organs

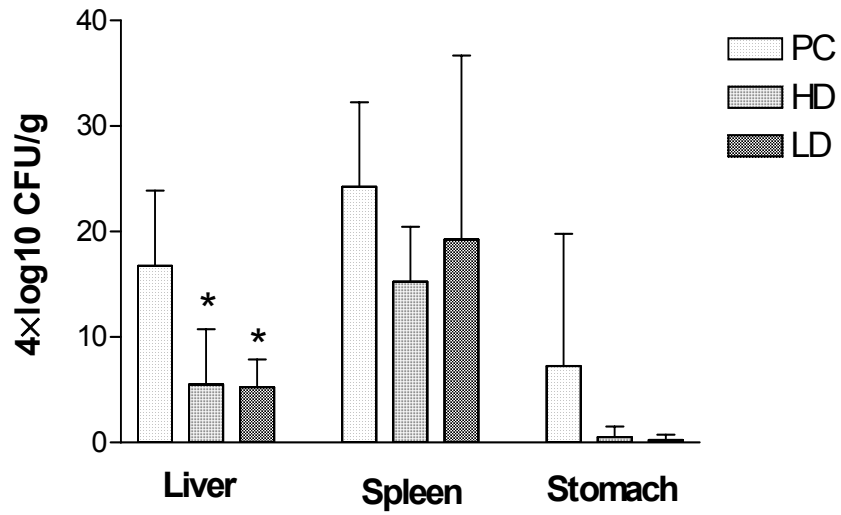
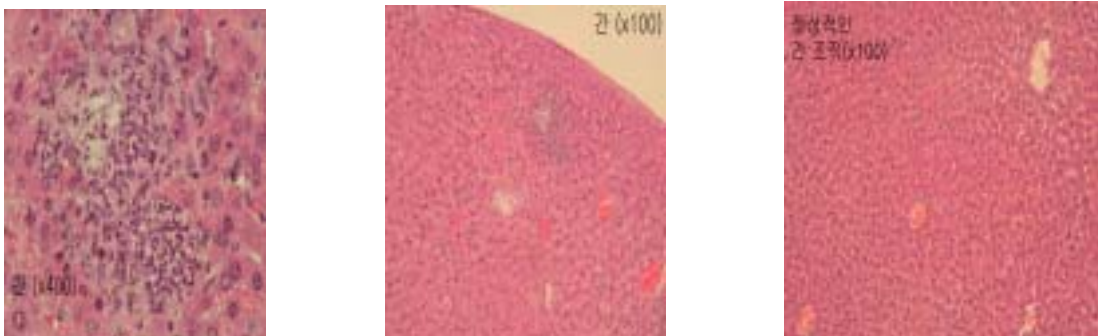


Fig. 5. Bacterial counting in spleen and liver(CFU/ml)
 (*표는 대조군에 비해 유의성 있음을 의미 P<0.05)

7) Histopathological examination : 현미경 상에서 *L. monocytogenes* 단독감염군과 락토페린 투여군에서의 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 6).



(a)focal infiltration of neutrophils (b)focal necrosis (c)nomal liver

Fig. 6. Histopathological view of liver

락토페린은 약80kda의 protein으로서, 양성전하를 띤 단백질이다(Lonnerdal, 1995). 또한 한 개의 polypeptide chain을 가지며 두 개의 대칭성의 구형의 N-, C-lobes를 가지고 있다(Baveye, 1999) 이 두 개의 lobe은 각각 Fe, Cu, Zn 등의 금속에 강하게 결합하는 성질을 가지고 있다(BWA van der Strate, 2001). 이러한 성질에 의해 락토페린이 Fe등에 결합하여서, 세균과 virus등의 생존에 필요한 이온에 대한 항상성을 무너뜨려서 항균효과나 항바이러스 효과가 있다고 알려져 있다(Nibbering, 2001). 또한 Gram(-)균과 Gram(+)균 모두에서 bacteriostatic & bacteriocidal 효과가 있음이 보고되어 있다.(Levy, 1996)

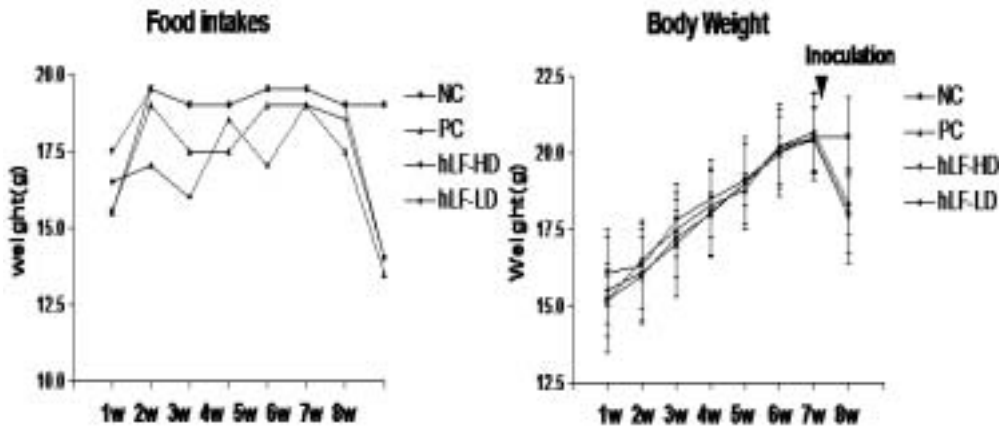
*Listeria monocytogenes*는 숙주의 세포에 침입하기 위해 *inlAB*라는 virulence gene의 활성을 필요로 한다(Conte MP, 1996). 그런데, 이러한 *inlAB* gene은 철 이온이 부족한 상황에서는 감소하게 되어서, *Listeria monocytogenes*이 세포내로 침입하는 것을 저해하게 된다(Maria PC, 2000). 이러한 기전에 의해 락토페린이 본 실험에서 위장에서 직접적인 invasion을 막으며, MALT를 통해 간장에 translocation하는 것을 저해한 것으로 사료된다. 그러나 조직학적 검사에서 가시적인 증상의 완화를 관찰 할 수는 없었다. 추후에 더 많은 양의 락토페린을 장기간 투여하여 항생효과를 검증하는 실험이 시행되어야 할 것이다.

이번 실험에서는 천연 락토페린이 *L. monocytogenes* ATCC19111, ATCC19115, ATCC51774에 대하여 배지 내에서 성장을 억제함을 관찰하였으며, ATCC51774를 이용한 in vivo 경구투여 실험에서 간장에서 *L. monocytogenes*의 translocation을 유의적으로 막아줌을 입증하였다.

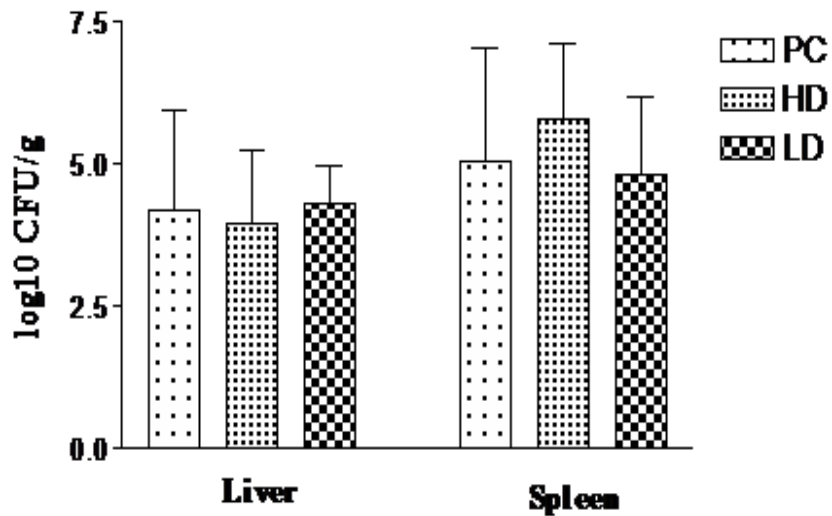
라. *Listeria monocytogenes*에 대한 항생효과 평가 시험

1) 체중 사료섭취량 변화 : *L. monocytogenes*에 감염 된 마지막 주를 제외하고는 체중 및 사료섭취량의 변화가 인지되지 않았다.

부검 전날 체중과 사료섭취량을 측정하였을 때, *L. monocytogenes* 감염군에서 섭취량과 체중의 저하가 관찰되었으나, 형질전환 누에 체액을 투여한 군과 정상 누에 체액을 투여한 군의 차이가 관찰되지 않았다.



2) 균수측정 : 간, 비장에서 PALCAM 배지를 이용하여 균수를 측정한 결과 정상 누에 체액 투여군과 형질전환 누에 체액투여군에서 균수의 변화가 인지되지 않았으며, 용량에 의한 반응도 관찰되지 않았다. NC (음성대조군)에서는 균이 검출되지 않았다.



3) 조직병리학적 소견 : 그림 1에서처럼 천연락토페린을 투여한 군(C)은 락토페린을 투여하지 않은 군에 비해 multifocal necrosis가 간에서 적게 일어나며, 크기도 감소하는 효과를 보였다. 그러나 그림2에서처럼 형질전환 누에 체액을 투여한 개체(그

림 2A, 2B) 정상 누에 체액을 투여한 개체와(그림 2C, 2D) 비교하여 조직병리학적 차이를 관찰할 수 없었으며, 비장의 경우에서도 차이를 나타내지 않았다.

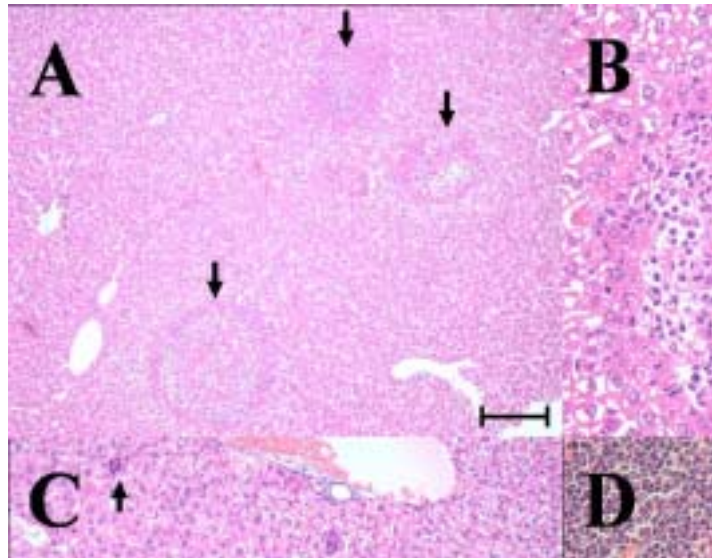


그림 1. 리스테리아 감염 마우스 간에서 친연락토페린의 효과
(Journal of Medical Microbiology, 2005, 54, 1-6) (A: 감염 대조군, 간, 100배;
B: 감염대조군, 간, 400배; C: 친연락토페린 투여군, 간, 100배; D: 비장, 200배)

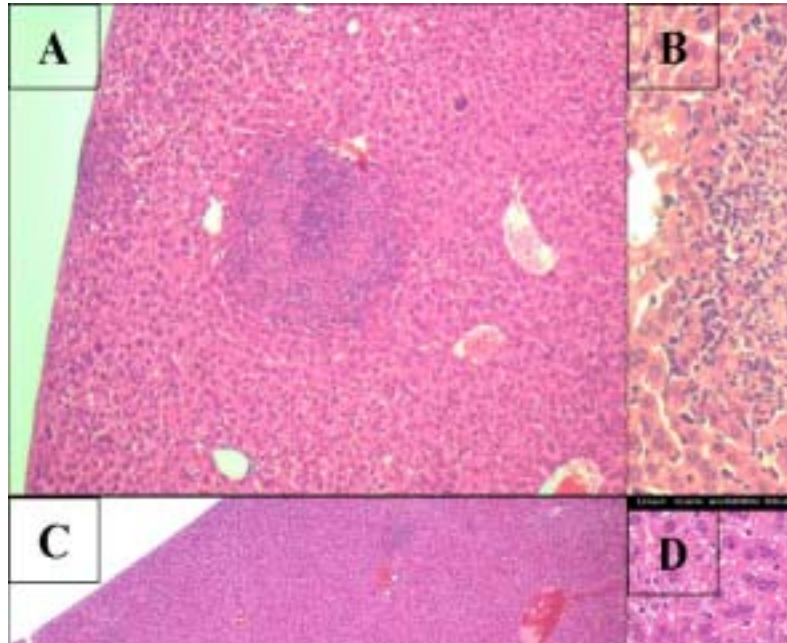


그림2. 형질전환 누에 채액 투여군과 정상누에 채액 투여군의 조직병리학적 비교
 (A and B liver, hLF-HD, 100배, 400배; C and D: liver, PC, 40배, 400배)

마. Lewis lung carcinoma cell (LLC)을 이용한 종양동물 모델의 확립

1) 육안 소견 : 피하로 LLC 세포를 이식한 후 5일째부터 육안 상으로 종양을 확인할 수 있었으며, 7일째부터는 투여한 전 개체에서 종양이 확인되었다.

종양은 7일 째에는 지름이 약 5~7 mm 정도였으며 (Fig 1A), 21일째에는 3cm 가량으로 성장하였다 (Fig 1B). 16일이 지나면서는 종양부위의 출혈을 일부 개체에서 외관상으로 확인할 수 있었다.



Fig 1. LLC이식 후 종양의 육안 소견

2) 조직병리학적 소견

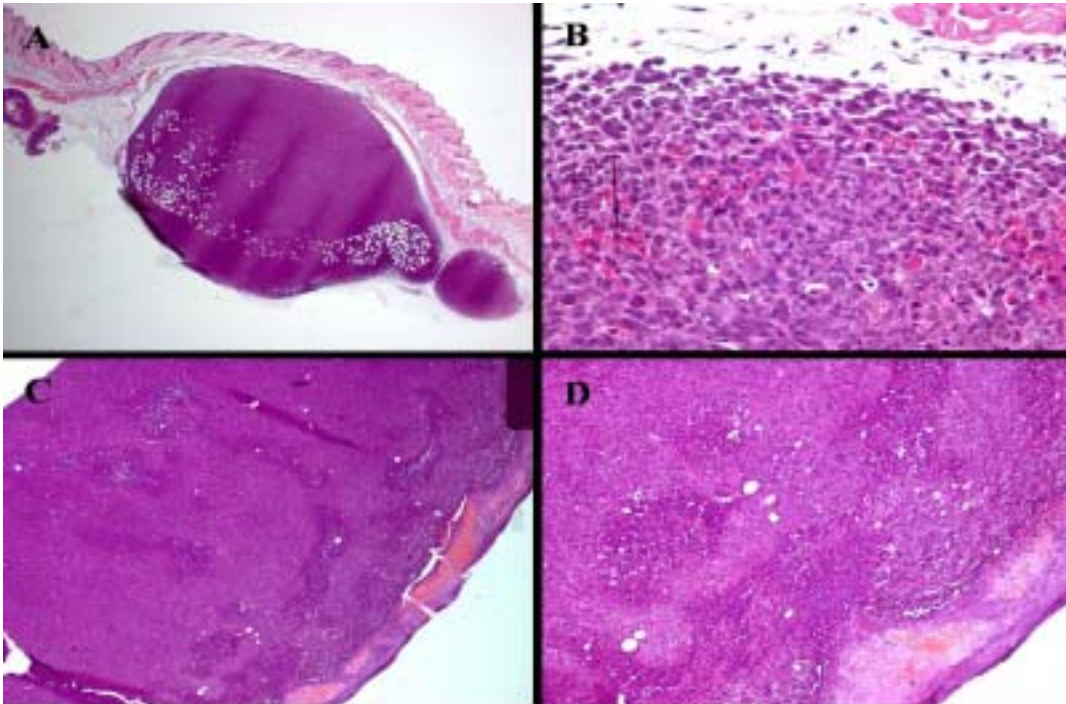
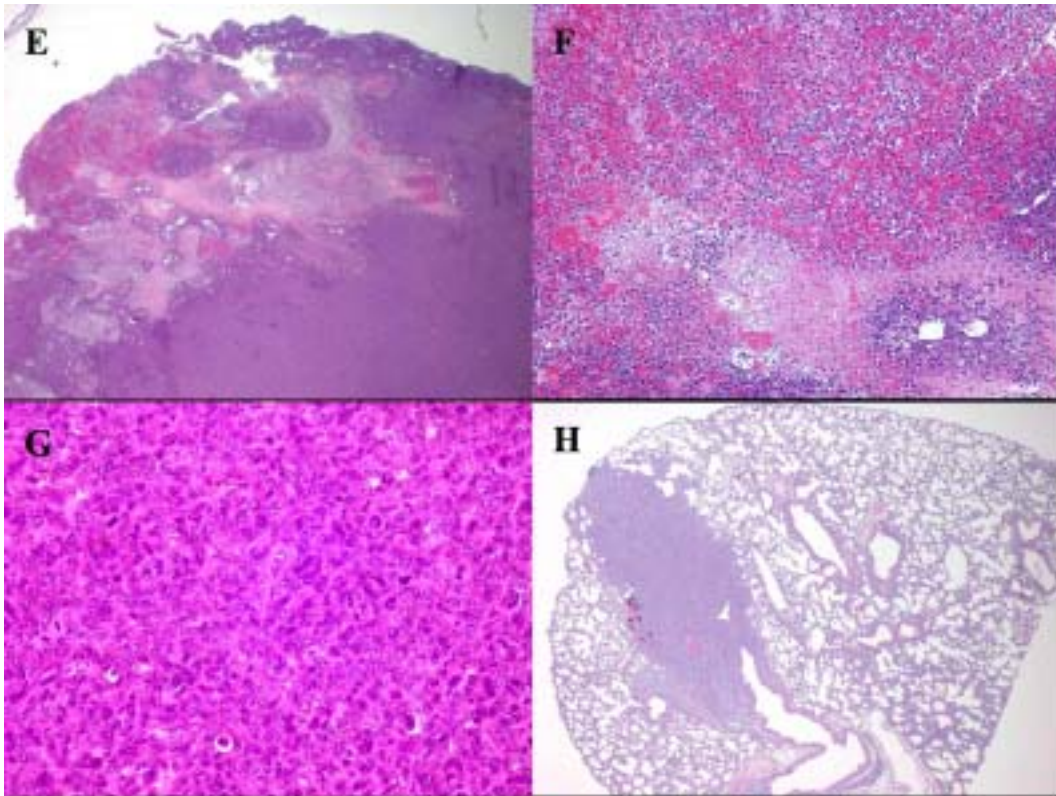


Fig 2. LLC 이식 후 시간대별 종양의 조직학적 변화

LLC 세포 투여 후 7일째에 약 5~6 mm 정도의 종양이 관찰되었다 (Fig 2A, ×20). 종양내부에는 약간의 지방침착이 관찰되었으며, 종양은 경계가 확실하고 침윤상이 없는 LLC 세포로만 이루어져 있었다. 종양 내 괴사소는 관찰되지 않았으며, mitotic figure가 다수 관찰되었다 (Fig 2B, ×200). 투여 후 9일째와 12일째에는 종양의 크기만 커지고, 7일째와 동일한 소견을 보였다. 한편, LLC 세포 투여 후 14일째에는 종양이 팽창하여 피하층의 결합조직들이 거의 관찰되지 않았으며, alopecia, hemorrhagic necrosis 가 피부에서 관찰되었다 (Fig 2C, ×20). 또한, 중심부의 종양세포의 초기괴사소견이 인지되었다 (Fig 2D, ×100).



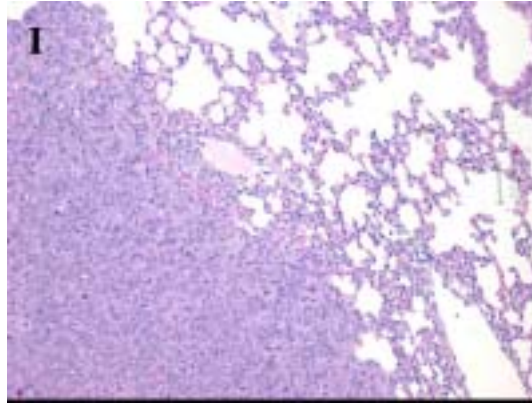


Fig 2. LLC 이식 후 시간대별 종양의 조직학적 변화

LLC 세포 투여 후 16일 쯤에는 종양을 둘러싸고 있는 피부층이 거의 소실되었으며, 종양 중심부의 괴사가 관찰되었다 (Fig 2E, $\times 20$). 종양 중심부에는 출혈소와 호산성 물질을 동반한 괴사가 진행되고 있음을 관찰하였다 (Fig 2F, $\times 100$). LLC 세포 투여 후 16일 쯤에도 괴사가 진행되지 않은 부위의 종양세포는 활발한 분열상을 보이고 있다 (Fig 2G, $\times 400$). 또한, LLC 세포를 피하에 이식하였을 때, 폐로의 전이가 관찰되었으며, 종양세포 이식 후 12일 쯤부터 관찰되는 개체가 있었으며, 16일 이후에는 다수 관찰되었다 (Fig 2H, $\times 40$; Fig 2I, $\times 200$). Lewis lung carcinoma 세포의 이식 실험에서 종양 면역과 관련하여 C57BL/6 마우스에 실시하는 동계이식임에도 불구하고 종양의 이식에 있어서 수용률 (acceptance rate)의 차이가 관찰되었으며, 선행 연구사례에 있어서 면역거부에 관련하여 여러 가지 문제점을 가지고 있었다. Sumimoto 등 (1997)은 Lewis lung carcinoma (LLC) 세포를 C57BL/6 마우스에서 1×10^6 cell을 이식한 동계 모델에서 100%의 수용을 보고하였으나, 조직 이식 거부반응이 병리조직학적으로 나타난다는 보고도 있었다(Saunders et al, Fig. 3).

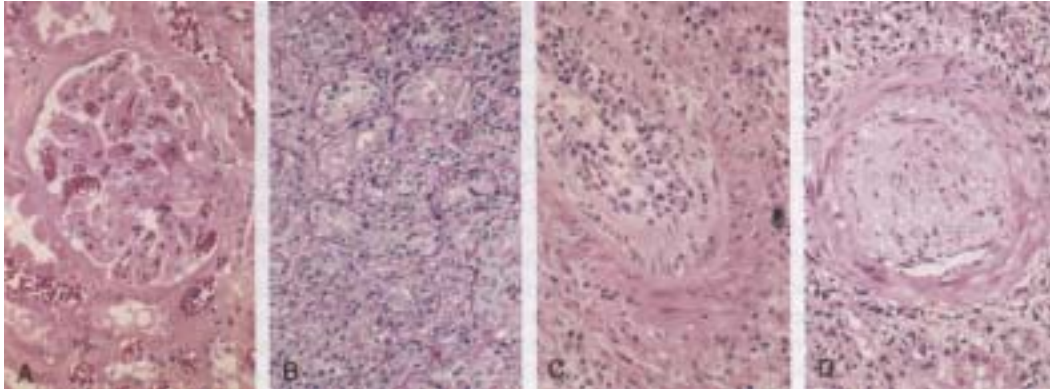


Fig. 3. Histopathology of different forms of graft rejection.

A. Hyperacute rejection of a kidney allograft with endothelial damage, platelet and thrombin thrombi, and early neutrophil infiltration in a glomerulus. B. Acute rejection of a kidney with inflammatory cells in the interstitium and between epithelial cells of the tubules. C. Acute rejection of a kidney with destructive inflammatory reaction destroying the endothelial layer of an artery. D. Chronic rejection of a kidney allograft with graft arteriosclerosis. (Cellular and Molecular Immunology, Saunders)

그러나 본 실험실에서 LLC 세포의 이식 시 이식된 mice의 kidney에서 병리조직학적인 이식거부 이상이 나타나지 않았다 (Fig. 4).

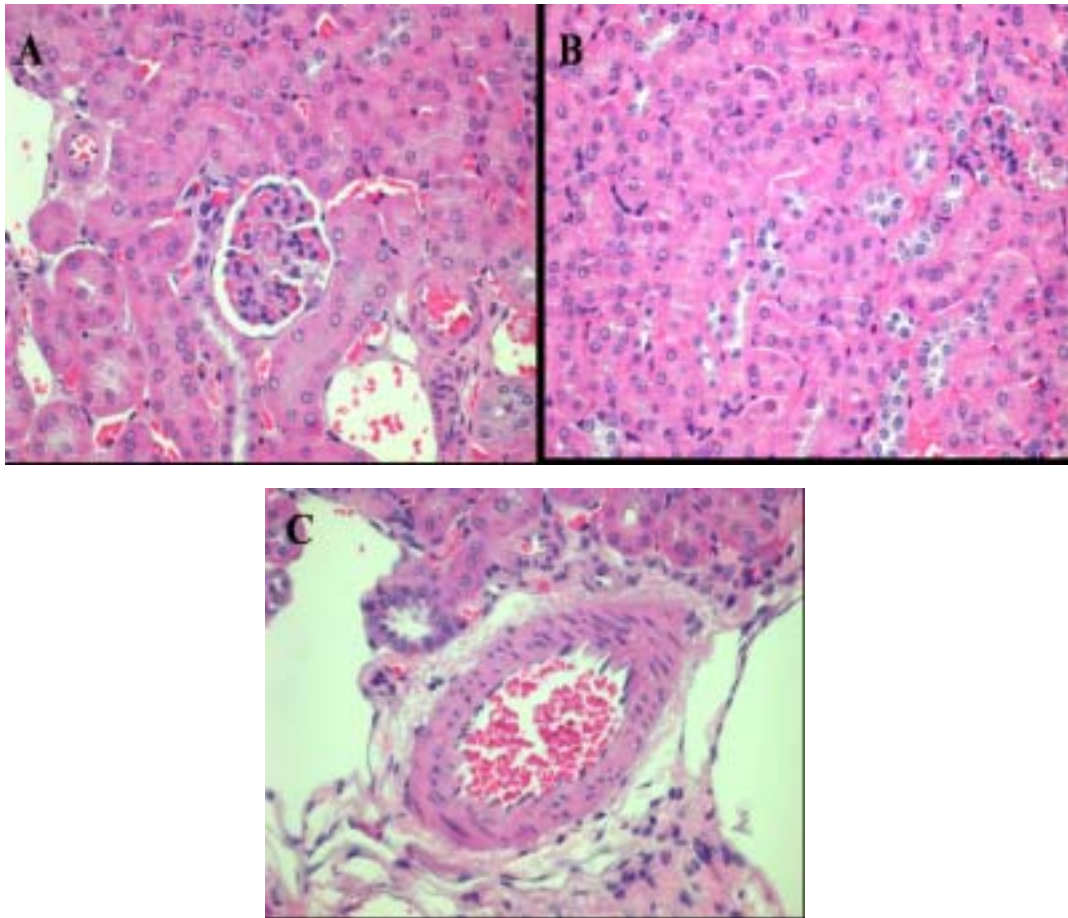


Fig 4. The kidney of syngeneic C57BL/6 mice after 14 days later from LLC 1×10^6 cells injection by s.c. A. glomerulus B. tubules C. artery.

본 실험에서는 LLC 세포를 이용하여 100%의 수용률을 보이는 종양 모델 동물을 작제하였고, 재조합 락토페린을 투여하기 위하여, 정상적으로 종양세포의 괴사가 일어나기 시작하는 시기를 확인하였다. LLC세포를 이식하였을 때, 14일 후부터 자연적인 괴사가 일어나기 시작하며, 이에 따라 추후 재조합 락토페린을 투여하여 항암능력을 평가할 때, LLC 세포 이식 후 5일째부터 12일 째까지 재조합 락토페린을 투여하고, 실험 종료 시점을 LLC 세포이식 후 12일로 정하여 재조합 락토페린의 항암능력을 평가하고자 한다.

바. 형질전환 누에 체액의 안전성 평가

1) 반복투여 경구독성시험 : 형질전환 누에 체액을 두 달 동안 BALB/c 마우스에 경구투여 하였을 때, 정상 누에 체액 투여 군 및 형질전환 누에 체액 투여 군 모두에서 최고용량 (2000 mg/kg) 군에서 사망 또는 임상증상을 보이지 않았으며 체중 및 사료섭취량에서도 유의적인 변화가 없었다(표 5, 표 6). 부검 시 육안 상으로 특이소견을 관찰할 수 없었으며, 슬라이드 절편을 제작하여 광학현미경상에서 관찰하였을 때도 정상 범위에서 벗어나는 소견을 관찰할 수 없었다(표 7).

표5. 반복투여 경구독성시험 체중변화 (g)

Group	animal No.	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week	6 week	7 week	8 week
nc	1	19.2	19.9	21.9	22.5	20.3	23.0	24.2	24.2
nc	2	19.1	20.8	21.8	22.8	21.2	23.5	25.0	25.5
nc	3	16.3	19.1	21.3	22.8	20.0	23.6	24.8	25.1
nc	4	19.0	19.2	20.9	21.0	20.1	21.9	23.7	24.3
nc	5	19.3	20.9	21.5	22.1	21.7	23.5	24.0	24.5
rLF-HD	1	19.5	21.9	23.5	23.1	22.5	22.8	23.5	23.8
rLF-HD	2	19.5	20.8	21.9	22.9	22.8	22.6	23.2	23.8
rLF-HD	3	19.8	21.6	24.1	25.0	22.8	23.1	24.1	24.5
rLF-HD	4	19.0	19.8	21.4	23.0	21.0	22.1	22.4	23.1
rLF-HD	5	19.2	20.4	21.2	22.9	24.0	22.1	22.6	23.4
rLF-LD	1	20.0	21.8	23.3	24.5	22.5	23.9	24.1	24.5
rLF-LD	2	20.0	21.5	22.5	24.1	22.8	23.6	23.8	24.0
rLF-LD	3	18.0	18.7	19.0	20.8	22.8	20.2	21.6	22.3
rLF-LD	4	19.5	20.2	21.8	23.0	21.0	22.4	22.8	23.4
rLF-LD	5	19.5	20.3	20.3	21.0	24.0	20.5	21.2	22.5

표 6. 반복투여 경구 독성 시험 시 사료 섭취량의 변화 (g)

Group	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week	6 week	7 week	8 week
NC	14.2	16.6	17.7	17.5	19.5	19.3	19.3	19.6
rLF-HD	14.8	17.0	17.2	15.0	19.0	19.3	19.5	20.0
rLF-LD	14.8	17.2	16.5	17.8	19.5	19.8	19.5	20.5

표 7. 병리 조직학적 검사 장기 및 이상 유무 판정

Group	nc					rLF-HD					rLF-LD				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
동물 No.															
간장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
신장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
부신	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
비장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
췌장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
흉선	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
횡경막	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
기관, 폐	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
심장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
타액선	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
림프절	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
위장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
소장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
대장	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
자궁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
난소	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
방광	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
대뇌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
소뇌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
안구	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2) 혈액검사 소견 : 적혈구수, 백혈구수, 혈소판수, 혈색소량을 2개월간 형질전환 누에 체액을 투여한 후 측정하였으며, 결과는 표8과 같았다.

표 8. 혈액검사 소견

group	animal No.	RBC(n/ul)	WBC(n/ul)	Platelet(n/ul)	MPV(fL)
NC	5	9.22±0.272	4.3±1.11	1.13±0.18	4.55±0.23
rLF-HD	5	9.54±0.288	4.8±1.38	1.70±0.22	4.54±0.62
rLF-LD	5	10.08±1.422	4.6±1.26	1.58±0.13	4.32±0.88

3) 형질전환 누에 체액의 항종양 평가 : 표 2에서와 같이, 천연락토페린은 종양이식 후 6일째부터 8일째까지 3일간 피하투여하고, 형질전환 누에 체액은 LLC cell 이식 전 44일 동안 매일 경구투여 하여, 총 56일간 투여하였다.

형질전환 누에 체액이 정제가 되어있지 않은 상태였기 때문에 경구투여를 수행하였고, 기간을 최대한 하여 8주간 투여하였다.

그림 3, 4에서와 같이, 천연락토페린 피하 투여군에서는 육안적으로 종양의 크기가 감소하는 것이 관찰되었으나, 누에 체액 투여군 (rLF-HD) 은 육안적인 변화가 인지되지 않았다.

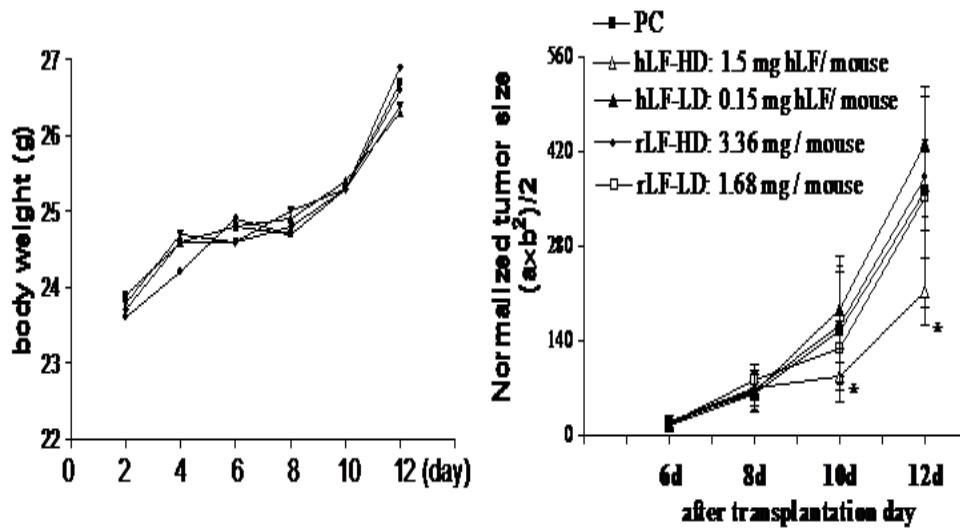


그림 3. LLC 이식 후 시간대별 체중 및 종양 부피의 변화.

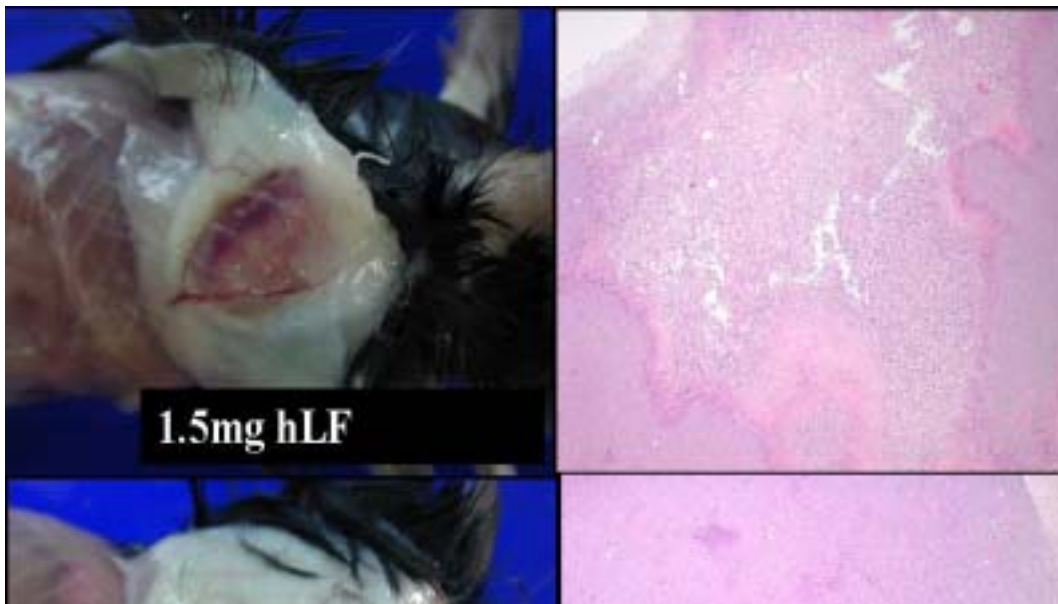


그림4. 천연락토페린과 형질전환 누에 체액의 항종양성 비교

또한, 2년차 과제보고서에 기술하였듯이 LLC cell 착상 후 12일까지는 자연적인 괴사가 발생하지 않는다. 따라서 그림 4에서처럼 control군에서는 H&E stain 시 괴사 소가 관찰되지 않으며, TUNEL assay를 수행하였을 때도 양성 반응이 거의 관찰되지 않는다. 이는 고농도의 형질전환 누에 체액을 투여하였을 때도 control과 거의 같은 결과를 나타내었으며, 천연락토페린을 피하로 투여한 것에 비해서 다량의 재조합락토페린이 투여되었을 것으로 예상됨에도 불구하고 항종양성을 보이지 않았다. 천연락토페린의 경우 종양조직 중심부 및 주변부에 다량의 괴사소를 형성시켰으며 (그림4), 괴사소 주변 부에 대해서 TUNEL assay를 수행하였을 때, 대조군에 비해 양성 세포가 다수 관찰되었다 (그림5). 그러나 이는 투여방법의 차이에 의한 것일 수도 있으며, 추후 정제된 재조합 락토페린이 준비된다면, 세포실험과 피하 투여 등의 방법을 적용하여 비교하여야 할 것이다.

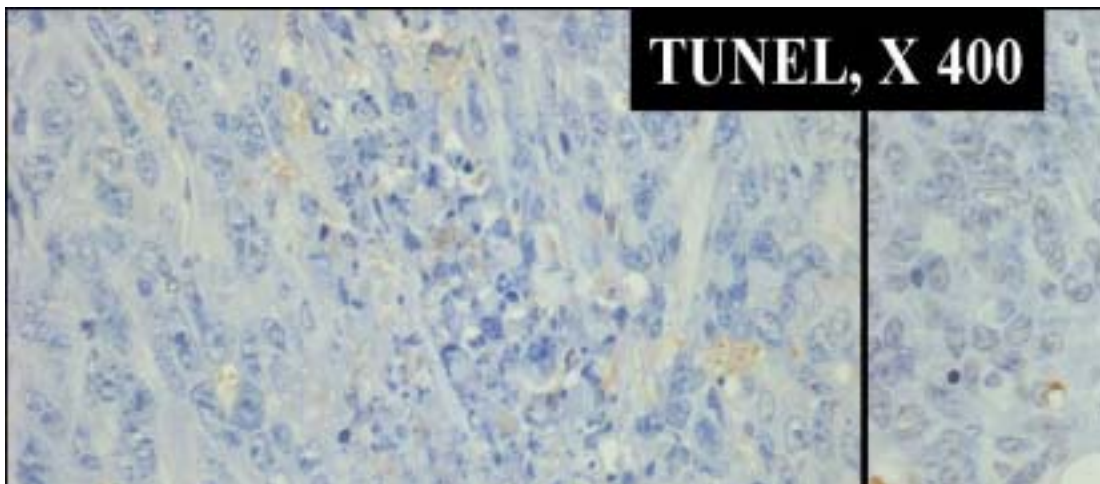


그림5. 천연락토페린 투여 후 종양조직에서의 TUNEL assay

사. 면역원성 평가 (IgE 측정)

1) Total IgE의 측정 : 표 4에서와 같이, 형질전환 누에 체액을 두 달 동안 반복적으로 매일 경구투여한 후 혈청을 sampling 하여, Mouse IgE sandwich ELISA kit(Shibayagi co. Japan)를 이용하여 IgE를 측정하였을 때, 표4와 같은 결과를 얻었

다.

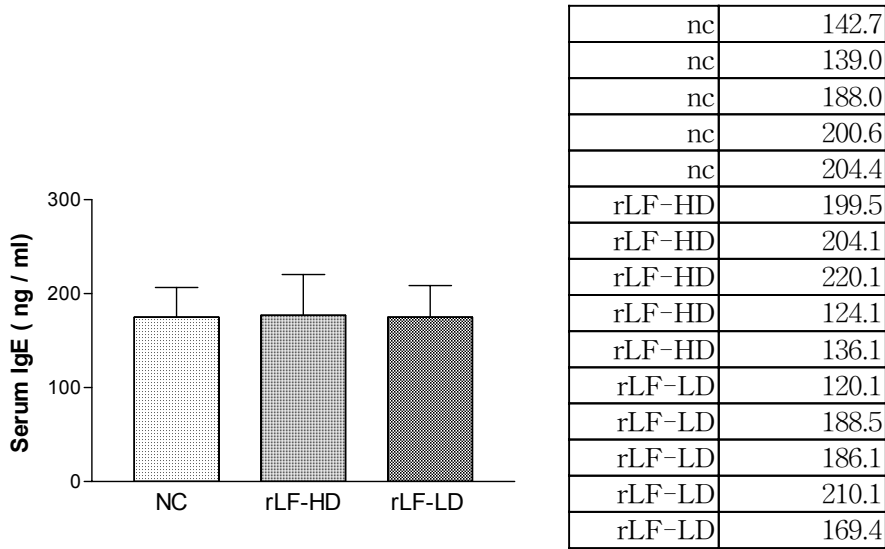


표4. Serum Total IgE 수치 (ng/ml)

표 4에서처럼 형질전환 누에 채액을 두 달 동안 경구 투여하였을 때 정상 마우스에 비해 혈중 IgE의 수치는 유의적으로 변화하지 않았으며, 기존 보고와 비교하여 정상범주에 포함됨을 확인하였다 (100~200ng/ml). 또한, 형질전환 누에 채액을 항원으로 하여, Specific IgE를 측정하였을 때, O.D. 450nm 값이 0.1 이하로 측정되었다. 이는 형질전환 누에 채액을 2개월간 마우스에 경구 투여하였을 때 누에채액에 특이적인 IgE 값은 상승하지 않는 것으로 사료된다.

아. 항생제 내성에 의한 정상세균총의 변화 평가

형질전환 누에 채액을 두 달 동안 반복적으로 매일 경구투여한 후 부검하여, 소장을 분리하여 혈액배지에서 배양되는 colony 수를 측정하였을 때 다음과 같은 결과를 관찰하였다.

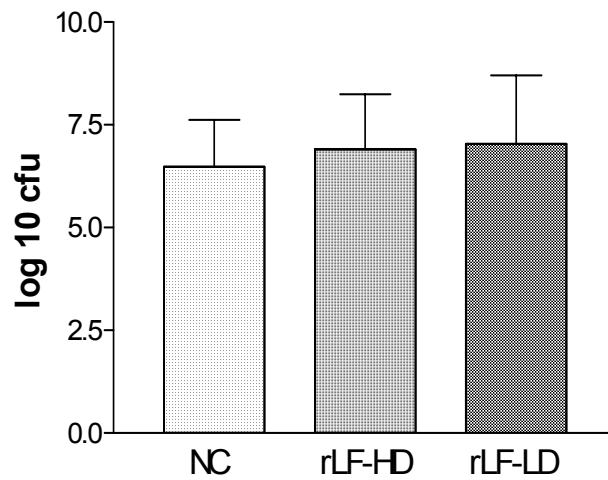


그림 6. 혈액배지에서 배양된 소장 내 세균 수 (log 10 cfu/g)

그림 6에서처럼 소장 1g당 $10^6 \sim 10^7$ cfu의 균 colony가 혈액 배지에서 확인되었으며, 형질전환 누에체액에 의한 정상세균총의 변화는 인지되지 않았다.

4. 결과 요약

재조합 락토페린을 생산하는 형질 전환 누에의 체액에 대해, 항생, 항종양성, 안전성에 대한 평가를 수행하였다. 상용화 되어있는 천연 락토페린이 효력을 나타내는 질병모델을 제작하고, 이를 양성 대조군으로 하여 항생, 항종양성을 평가하여 본 결과, 형질전환 누에의 체액에서 천연락토페린과 같은 효력을 관찰 할 수 없었다.

그러나 본 연구과제에서 사용된 형질전환 누에의 체액은 재조합 락토페린이 정제된 형태가 아니며, 이로 인해 투여 경로 선정 등에 있어서 제약이 따랐다. 따라서 보다 정확한 효능의 검증을 위해서는 형질전환 누에체액으로부터 재조합 락토페린의 추출, 정제 및 농축이 필요하며, 이를 이용하여 효능을 검증한다면 보다 나은 효과를 관찰 할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 안전성의 측면에서 형질전환 누에체액을 평가하였을 때, 최고 농도(2000 mg/kg) 로 경구 투여 시 Serum IgE, 장내 세균총의 숫자, 체중 및 사료섭취량을 변화시키지 않았으며 현미경 관찰 시 독성변화도 관찰되지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표와 내용

제1세부과제: 락토페린 유전자 도입 형질전환 누에품종 육성

누에 형질전환 실험을 수행하기 위해서는 인위적인 휴면타파가 필요하지 않은 적합 품종 선발뿐만 아니라, 실험실 내에서 연중 사육이 가능해야 하기 때문에 인공사료에 적합한 품종 선발이 중요하다. 또한 누에 형질전환을 위해 DNA를 누에알에 미량 주사하는 microinjector를 이용하는 기술의 확립이 중요하다. 따라서 본 실험에서는 형질전환용 누에 품종 선발과 DNA 미량주사장치 기술 이용을 위한 형질전환 기술확립을 위해 다음과 같은 실험을 수행한다.

1. 누에 품종 선발

- 가. 인공사료 사육 적합성 판정
- 나. DNA 누에알 주사 후 침산처리 영향 평가

2. 누에 BmN 세포 내 전이활성 검정

- 가. Lipopectin을 이용한 누에 BmN 세포 형질전환
- 나. 전이백터 도입 여부 확인
- 다. 전이백터 도입 목적유전자 발현 산물 검정

3. 형질전환 누에품종 선발

- 가. Microinjector에 의한 DNA 누에알 주사
- 나. 형질전환 누에 개체 선발
- 다. 형질전환 누에 개체 분자생물학적 검정
- 라. 형질전환 누에 교배조합 실험

제1협동과제: 락토페린 유전자도입 누에 형질 전환용 벡터개발

본 과제에서는 락토페린을 과발현하는 형질전환 누에를 개발하기 위한 벡터 개발을 한다. 벡터는 플라스미드와 트랜스포존을 토대로 한 것을 채택한다. 각각의 벡터를 개발한 후에는 단백질 발현 목적으로 자주 사용되는 곤충세포인 Sf9 cell을 이용하여 세포에서의 벡터의 유용성을 검증하고, 형질전환을 담당하는 세부과제 팀에 공급한다. 세부과제 팀과의 지속적인 feedback을 통하여 락토페린의 발현에 가장 효율적인 벡터를 개발한다.

1. 락토페린 cDNA 클로닝

- 가. mRNA 추출 및 cDNA 합성
- 나. PCR 반응에 의한 cDNA 클로닝
- 다. 락토페린 유전자 염기배열 검정

2. pIZ-lactoferrin 벡터개발

- 가. 곤충세포 발현 벡터 pIZ-lactoferrin 벡터 구축
- 나. pXINSECT-lactoferrin 벡터 구축

3. 셔틀벡터 pSLfa1180fa-lactoferrin개발

- 가. 전이벡터 구축을 위한 enzyme site 도입
- 나. PCR 반응에 의한 유전자단편 subcloning

4. piggyBac-lactoferrin 벡터 개발

- 가. 트랜스포존 유전자 영역 도입
- 나. lactoferrin 유전자 도입

제2협동과제: 형질전환 누에 발현 락토페린의 생리활성 연구

현재까지 보고된 락토페린의 항세균성, 항진균성, 항바이러스성, 항염증성, 항암성 등의 여러 유용성을 토대로 볼 때, 이 단백질의 사료 또는 식품으로의 사용 가치는

매우 높다. 이러한 면에서 락토페린의 생리적 활성, 특히 항암 기능에 관한 연구는 필요하다. 본 연구는 이러한 락토페린의 항암적인 기능을 관찰하여 개발된 형질전환 누에에서 얻어지는 락토페린의 기능을 규명한다. 이 연구는 누에에서 생산되는 락토페린을 이용한 산업화를 위한 중요한 자료를 제공한다.

가. 락토페린 추출

- 가. 누에 발현 산물 추출 및 회수
- 나. Western blot 분석

2. 세포주에서 total RNA 추출

- 가. Total RNA 추출
- 나.

3. 세포주기 분석

- 가. lactoferrin 에 의한 세포사멸 연구
- 나. lactoferrin 에 의한 세포주기 연구

제3협동과제: 형질전환 누에 발현 락토페린의 효능과 안전성 확립

천연락토페린과 형질전환 누에체액의 항생, 항종양능력을 *Listeria monocytogenes* 감염모델과 lewis lung carcinoma cell bearing mice에 대하여 평가하였다. 2개월 반복 경구 투여 후 생체 내 독성 및 알러지 유발성에 대한 평가를 수행하였다.

1. *Listeria monocytogenes*에 이용한 실험동물 모델 작제

- 가. Bacterial counting
- 나. Histopathological examination
- 다. Statistical analysis

2. *Salmonella enteritidis*를 이용한 실험동물 모델 작제

- 가. Bacterial counting

나. Histopathological examination

다. Statistical analysis

3. *Listeria monocytogenes*에 대한 천연락토페린의 항생 효과 검증

가. Food intake 측정

나. Bacterial counting

다. Clinical signs & mortality

라. Histopathological examination

4. *Listeria monocytogenes*에 대한 항생효과 평가 시험

가. Food intake 측정

나. Bacterial counting

다. Clinical signs & mortality

라. Histopathological examination

5. Lewis lung carcinoma (LLC) cell 에 대한 항암효과 평가시험

가. Clinical signs & mortality

나. 종양이식 평가

6. 형질전환 누에 체액의 안전성 평가

가. 반복투여 경구독성실험

나. 면역원성 평가 (IgE 측정)

다. 항생제 내성에 의한 정상세균총의 변화 평가

제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용

제1차년도

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2002 - 2003)	(1) 락토페린 cDNA 클로닝 pIZ-락토페린 벡터제작	<ul style="list-style-type: none"> - 락토페린 cDNA클로닝 - pIZT-락토페린 벡터제작 - pXINSECT-락토페린 제작
	(2) 형질전환용 누에 품종 선발 및 재조합 벡터의 Host 특이성 검토	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환용 누에품종 선발 - 재조합벡터 host 특이성 검토
	(3) 실험동물에서 lactoferrin의 항균효과	<ul style="list-style-type: none"> - 동물모델 확립 - 천연 락토페린의 효능 검증

제2차년도

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2003 - 2004)	(1) pSL 셔틀벡터제작 <i>piggyBac</i> -락토페린 벡터제작 완성	<ul style="list-style-type: none"> - pSL 셔틀벡터 제작 - 트랜스포존 도입 <i>piggy-Bac</i> 벡터 구축
	(2) Cell lines을 이용한 외래유전자 도입 및 발현 검정	<ul style="list-style-type: none"> - BmN 또는 Sf9 형질전환 세포주 작성 - 발현 단백질 확인
	(3) pIZ와 pXINSECT 벡터 누에의 개체별 락토페린 활성연구	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 누에 발현 단백질 추출 - 아폽토시스 유발여부 관찰 - 세포내 DNA 손상 여부 관찰
	(4) 실험동물에서 재조합 lactoferrin의 항암효과	<ul style="list-style-type: none"> - Nude mice에 Leukemic cell line 이식 후 항암효과 검사 - Sarcoma cell 마우스 복강 내 투입 후 생존 여부 관찰

제3차년도

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2004 - 2005)	(1) DNA 미량주입에 의한 형질전환 누에 개체 작성	<ul style="list-style-type: none"> - Micro-injector 이용 DNA 누에알 주사 - G0와 G1 형질전환 누에 선발 - G1 누에 세대 유전학적 분석
	(2) <i>piggyBac</i> 벡터에의 개체별 락토페린 활성 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 누에 개체별 단백질 추출 - 아폽토시스 유발 및 세포주기 저지 실험 발현 단백질의 발현 여부 면역학적 연구
	(3) 재조합 사람 lactoferrin 의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 알러지 유발성 평가 - 항생물질 내성 유전자의 안전성 평가 반복투여 독성 시험

제 3 절 연구평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도(점수)
1차년도 (2003년)	<ul style="list-style-type: none"> - 락토페린 cDNA 클로닝 - 형질전환용 우수 누에 품종 선발 - 곤충세포 이용한 재조합 벡터 Host 특이성 검토 - 락토페린 항균효과 검증을 위한 실험동물 확립 - 천연 락토페린의 효능검정 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
2차년도 (2004년)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>piggyBac</i>-락토페린 벡터제작 완성 - pXINSECT 락토페린 세포주기 조절 연구 - Cell line 이용한 형질전환 방법 개발 - 세포 또는 누에가 생산하는 락토페린의 항균 효능 및 항암효과 검증 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
3차년도 (2005년)	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 누에 개체 선발 및 교배실험 - pXINSECT 락토페린 세포사멸 활성화연구 - 누에가 생산하는 락토페린의 항암효과 검정 - 알러지 독성시험 및 내성균주 확인 - 반복투여 독성시험 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> - 락토페린 발현 형질전환 누에 품종 확립 - 실험동물에서 재조합 락토페린의 항암효과 - 재조합 사람 락토페린의 안전성 평가 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

외국 여러 나라에서는 곤충의 생체 공장화를 목표로 하여 곤충 형질전환 분야에 많은 연구를 집중하고 있다. 최근까지 초파리 이외에는 형질전환 개체를 만드는 방법이 확립되어 있지 않았지만 최근에는 트랜스포존을 이용함으로써 형질전환 누에를 만드는 방법이 확립되었다. 형질전환 누에는 GFP 마커 유전자를 마커로써 삽입한 벡터와 전이를 촉진시키는 작용을 하는 helper라고 하는 DNA를 함께 누에알에 주사함으로써 비교적 손쉽게 만들 수 있다. 형질전환 개체는 GFP유전자가 트랜스포존에 의해 염색체 중에 삽입되었기 때문에 이 유전자는 염색체를 떠돌지 않고 안정적으로 다음 세대로 전달되어, 한번 유전자를 도입하면 차세대 이후로도 형질전환 누에로써 이용이 가능하다. 만약 다른 유용유전자를 삽입시킨다면 시간과 비용을 절약하면서 고부가가치의 물질을 영구적으로 생산할 수 있는 시스템이 구축되는 것이다. 따라서 지속적인 누에 형질전환 연구와 더불어 고발현 프로모터와 유용유전자 개발이 필수적으로 병행되어야 할 것이다.

제 2 절 활용계획

- 가. 누에 형질전환 기반 기술 확립으로 유용유전자 도입 연구에 응용
- 나. 곤충 형질전환용 벡터 개발을 위한 유전자발현 검정에 활용
- 다. 락토페린이 함유된 기능성 식품개발 가능성 연구에 활용
- 라. 기능성을 갖는 가축 사료 첨가제로서 개발
- 리. 고부가가치 의약품 대량 생산 가능성 연구에 응용 가능
- 마. 제반 기술의 특허 출원 및 품종 등록 소유권 확보

제 3 절 본 연구 과제를 통해 얻어진 연구실적

- 1) Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee BH, Kang PD, Kim YS, Park JH.. 2003. Potential antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with *Listeria monocytogenes* in mice. J Med Microbiol. 2005 Nov; 54(Pt 11): 1049-54.
- 2) Kim YS, Sohn BH, Lee JM, Lee SU, Kim MG, Park JH, Kang PD. Cloning of the Human Lactoferrin Gene and Germline Transformation of the Silkworm *Bombyx mori* L. with a *piggyBac* Vector. International Conference of Sericulture and Entomological Sciences. 2004 Oct; p56
- 3) Hui-Young Lee, Jong-Hwan Park, Seung-Hyeok Seok, Min-Won Baek, Dong-Jae Kim, Pil-Don Kang, Yong-Soon Kim, Jae-Hak Park. 2004. Antimicrobial effect of humane lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. The 47th Conference of the Korean Society of Sericultural Sciences. 2004 Apr; p68

제 6 장 참고문헌

Tamura T. et al. Transient expression of chimeric CAT genes injected into early embryo of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet*, 65 : 401 - 410. 1990

Mori, H. et al. Transovarian transmission of foreign gene in the silkworm, *Bombyx mori*, by *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Bio/technology* 13 : 1005-1007. 1995

Yoo, YC. et al. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovin milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem. Biophys Res Commun.* 237 : 624-628. 1997

Tomita, S. et al. Cloning and characterization of a mariner like element in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genes Genet. Sys.* 72 : 219-228. 1997

Damien, C. et al. Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *J. Cell Biochem.* 74 : 486-498. 1999

Yamao, M et al. Gene targeting in the silkworm by use of baculovirus. *Genes* 13 : 511-516. 1999

Tamura T et al. Germline transformation of the silkworm, *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature Biotechnol.* 18 : 81, 2000

Horn, C and Wimmer, E.A. A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.* 210 : 630. 2000

Carter PB, and Collins FM. (1974) The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med*, 139:1189-1203.

Collins FM. (1972) Salmonellosis in orally infected specific pathogen free C57BL mice. *Infect Immun*, 5:191-198.

Conlan JW. (1996) Neutrophils prevent extracellular colonization of the liver microvasculature by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 64:1043-1047.

Conlan JW. (1997) Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

typhimurium, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*, 65:630-635.

Hormaeche CE. (1979) Natural resistance to *Salmonella typhimurium* in different inbred mouse strains. *Immunology*, 37:311-318.

Mastroeni P, Harrison A, and Hormaeche CE. (1994) Natural resistance and acquired immunity to *Salmonella*. *Fund Clin Immunol*, 2:83-88.

Plant J, and Glynn AA. (1976) Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Infect Dis*, 133:72-78.

Robson HG, and Vas SI. (1972) Resistance of inbred mice to *Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis*, 126:378-389.

Cassiday, P. K., and R. E. Brackett. 1989. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.* 52:207-214.

Czuprynski, C. J., N. G. Faith, and H. Steinberg. 2002. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6):2893-2900.

Czuprynski, C. J., N. G. Faith. 2002. Sodium bicarbonate enhances the severity of infection in neutropenic mice orally inoculated with *Listeria monocytogenes* EGD. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9(2):477-481.

Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511.

Macdonald, T. T., and P. B. Carter. 1980. Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect. Immun.* 28:516-523.

Marco, A. J., N. Prats, J. A. Ramos, V. Briones, M. Blanco, L. Dominguez, and M. Domingo. 1992. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Comp. Pathol.* 107:1-9.

Notermans, S., J. Djfrenne, P. Teunis, ad T. Chackraborty. 1998. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.* 61:244-248.

Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. V. Broome. 1991. Epidemiology of human

listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:169-183.

Van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pauwels EK, Pieper F, Nuijens JH, Nibbering PH. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. Nat Biotechnol. 2002 May;20(5):484-7.

Conte MP, Longhi C, Petrone G, Buonfiglio V, Di Santo S, Seganti L, Velenti P. The anti-invasive effect of bovine lactoferrin requires an interaction with surface proteins of *Listeria Monocytogenes*. Int J Immunopathol Pharmacol. 1999 Sep-Dec;12(3):149-155.

Murdock CA, Matthews KR. Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA. J Appl Microbiol. 2002;93(5):850-6.

Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, van Berkel LA, van Berkel PH, Pauwels EK, Nuijens JH. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria.

Lee *et al.*, Potential antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with *Listeria monocytogenes* in mice, Journal of Medical Microbiology, 2005, 54, 1-6

식품의약품안전청고시 제2003-37호 유전자재조합식품의안전성평가심사등에관한규정
식품의약품안전청 고시 제2005-51호 위해평가방법 및 절차 등에 관한 지침

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.