

최 종
연구보고서

소해면상뇌증의 진단표적물질의 발굴 및
국내에 발견된 CJD 환자의 유전역학연구

Discovery of Diagnostic Markers for Bovine
Spongiform Encephalopathy and CJD
Genetics in Koreans

연구기관

한림대학교
국립수의과학검역원

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “소해면상뇌증의 진단표적물질의 발굴 및 국내에 발견된 CJD 환자의 유전역학연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5월 21일

주관연구기관명 : 한림대학교

총괄연구책임자 : 이 채 영

연 구 원 : 김 용 선

연 구 원 : 김 윤 영

협동연구기관명 : 국립수의과학검역원

협동연구책임자 : 조 인 수

요 약 문

I. 제 목

소해면상뇌증의 진단표적물질의 발굴 및 국내에 발견된 CJD 환자의 유전역학 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

프리온 질환은 사람과 동물 모두에서 발병하고 전염성이 있기 때문에 소해면상뇌증으로부터 인간에게 전염되어 새로운 변종 크로이츠펠트 제이콥병이 발생할 수 있다는 점이 크게 부각되고 있다. 최근 선진국에서는 소해면상뇌증을 검사하기 위한 여러 가지 진단제제를 생산하여 검역이나 방역에 사용하고 있으나 우리나라는 진단제제를 수입에 의존하고 있는 실정이다. EU 등 전세계적으로 소해면상뇌증에 대한 신속진단법이 개발 중이며, 일부 진단법은 진단키트로 상품화되어 있다. 이에 따라 국내에서도 소해면상뇌증 진단제제의 개발과 이를 이용한 진단기술의 확립이 필요하다. 따라서 보다 구체적이고 근본적인 대책의 일환으로 이 질환의 시급한 병원체의 연구와 치료제 및 진단 기술 개발의 기초연구의 수행을 필요로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 한우의 단염기변이 분석을 통해 유전적인 특성을 구명하였다. 특성을 구명하는데 있어 전국적으로 한우의 유전자형을 분석하였으며 이들은 국내외의 소들의 결과와 비교하였다. 척추동물들간의 프리온단백유전자의 비교를 위해 인실리코 연구가 수행되었다. 또한, 크로이츠펠트 제이콥병 환자의 단염기변이에 대한 분석으로 유전적인 요인을 밝히고, 한국인의 유전적인 특성을 구명하였다. 더 나아가 프리온단백질이 결핍된 마우스에서 단클론 항체를 생산하고 토끼 및 닭에서 다클론항체를 생산하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 한우의 프리온단백유전자의 단염기변이가 소해면상뇌증에 걸릴 유전적인 가능성이 상대적으로 작은 것으로 밝혀졌다. 유사프리온단백유전자의 단염기변이연구는 크로이츠펠트 제이콥병에 걸릴 유전적인 요인을 밝혔으며 한국인이 병에 노출될 가능성이 상대적으로 더 큰 것으로 나타났다. 소해면상뇌증에 반응하는 항체를 개발하여 마우스 순화주를 이용하여 민감도를 조사한 결과 상용항체와 민감도가 비슷한 단클론항체와 다클론항체를 생산하였다. 개발된 2개의 단클론항체 및 1개의 다클론항체는 현재 보유한 양성조직에 대하여는 각각의 적용가능한 진단법에서 시판항체와 비슷한 민감도를 나타내었다. R63의 경우 사슴과 염소, 마우스에서는 반응하나 소 프리온 단백질에는 반응성이 없거나 미약한 것으로 확인되어 소와 사슴의 프리온질병 감별에 사용이 가능할 것으로 사료됨 또한 BL391항체의 경우 면역블로팅보다는 면역조직화학염색 진단시 활용이 가능할 것으로 기대된다. 현재까지 프리온 질환 진단방법에 어려움이 제기되는 가운데 감염성 프리온 단백질에 보다 특이적으로 반응하는 항체를 생산함으로써 감염성 프리온 단백을 정확하고 민감하게 검출할 수 있으며, 항체를 외국에서 수입해야 하는 경제적인 부담을 덜 수 있을 뿐만 아니라 독자적인 검출기준을 확립할 수 있을것으로 기대된다. 본 연구결과의 효율적인 활용을 위해서는 시작단계인 본 기초연구의 후속연구들의 수행이 시급한 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Discovery of diagnostic markers for bovine spongiform encephalopathy and CJD genetics in Koreans

II. Objectives and Importance

Prion diseases are infectious in human and animals. Currently, variant Creutzfeldt-Jakob disease is of a great concern as a possible disease transmitted from bovine spongiform encephalopathy. Therefore, we need to investigate on their pathogenic organs, treatments, and diagnosis.

III. Contents and Scope

This study concentrated on uncovering genetic characteristics of Korean cattle with single nucleotide polymorphisms. Also, other objectives of the current study were to examine genetic effects for variant Creutzfeldt-Jakob disease in human using single nucleotide polymorphisms and to show genetic susceptibility to the disease. Furthermore, monoclonal and polyclonal antibodies were derived from PrP^C knockout mice, rabbits, and chickens.

IV. Results and Applications

The current study showed that Korean cattle were genetically less susceptible to BSE than other breeds in terms of variation of prion protein gene. On the other hand, Korean people were more susceptible to variant Creutzfeldt-Jakob disease in terms of PRND polymorphisms. The antibodies produced in this study worked as well as the antibody currently utilized. In this study, two monoclonal antibodies (mAbs), designated BL391 and R63,

specific for PrP were produced using PrP knock-out mice immunized with synthetic peptides (a.a 150-169). Two mAbs (BL391 and R63) showed species-specific reactivity, BL391 bound to bovine PrP in immunohistochemistry and R63 bound to cervine PrP in immunoblotting and immunohistochemistry. Based on variable patterns of reactivity, four mAbs produced in this study were thought to be useful for development of diagnostic tool, an etiological and structural analysis of PrP. Especially, mAbs having species-specificity might be applicable for a diagnosis requiring the discrimination of BSE and CWD or the development of detection techniques for PrP^{Sc}. Further studies are in need to efficiently apply the results to the fields.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	10
1. Objectives of Study	10
2. Needs for Study	10
3. Range of Study	14
Chapter 2. Current Status of Study	16
1. Current Status of Study in Korea	16
2. Current Status of Study Abroad	18
3. Problems	20
Chapter 3. Contents and Results of Study	23
1. Contents of Study	23
2. Methods and Designs	24
3. Results	31
Chapter 4. Achievement of Objectives and Contribution to Disciplines	69
1. Achievement of Objectives	69

2. Contribution to Disciplines	73
Chapter 5. Application	76
1. Needs for Further Study	76
2. Application to Other Studies	78
3. Possibilities and Strategy of Industrialization	79
4. Publication	81
Chapter 6. Related information	83
1. Trends in Science for BSE	83
2. Association between BSE and Other Types of CJDs	85
3. Virus Theory for BSE	87
4. Function of Prion on Proliferation of Stem Cells	87
Chapter 7. References	89

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	10
제1절	연구개발의 목적	10
제2절	연구개발의 필요성	10
제3절	연구개발의 범위	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제1절	국내 기술개발 현황	16
제2절	국외 기술개발 현황	18
제3절	문제점	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	23
제1절	연구개발수행 내용	23
제2절	연구개발의 방법 및 설계	24
제3절	연구결과	31
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	69
제1절	연구개발목표의 달성도	69
제2절	관련분야에의 기여도	73

제 5 장	연구개발결과의 활용계획	76
제1절	추가연구의 필요성	76
제2절	타연구에의 응용	78
제3절	산업화 가능성 및 추진방안	79
제4절	논문발표	81
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	83
제1절	소해면상뇌증의 해외과학기술동향	83
제2절	소해면상뇌증과 다른 형태의 CJD사이의 연관성	85
제3절	소해면상뇌증의 병원체 바이러스	87
제4절	프리온의 줄기세포 분화기능	87
제 7 장	참고문헌	89

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

프리온 질환은 인수 공통으로 발병하고 전염성이 있기 때문에 소해면상뇌증의 오염국에서 수입된 소의 생산품과 부산물에 의해 한국인이 소해면상뇌증 병원체에 폭로될 가능성과 앞으로 소해면상뇌증으로부터 전염되는 크로이츠펠트제이콥병의 광범위한 지역에서의 발병가능성은 현 시점에서 시급한 대처를 필요로 한다. 소해면상뇌증으로부터 인간에게 전염되어 새로운 변종 크로이츠펠트 제이콥병이 발생할 수 있다는 점이 크게 부각되고 있는 실정이어서 보다 구체적이고 근본적인 대책의 일환으로 이 질환의 시급한 병원체의 연구와 치료제 및 진단 기술 개발의 기초연구가 필요하다고 판단되어 수행을 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 중요성

퇴행성 신경질환의 하나인 프리온 질환은 사람과 동물 모두에서 발병하며, 다른 뇌 퇴행성 질환과는 달리 전염성을 가진다는 점에서 그 중요성이 매우 크다. 광우병 파동에 따른 각 나라간에 소의 부산물 및 기업형 사료의 수출입 금지 및 소의 광우병으로부터 인간에게 전염되어 새로운 변종 크로이츠펠트제이콥병 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD, 일명 인간 광우병)이 발생할 수 있다는 점 (Hill et al., 1997)은 보다 구체적이고 근본적인 대책으로, 이 질환의 시급한 병원체의 연구와 치료제 및 진단 기술 개발의 기초연구가 필요하다. 크로이츠펠트제이콥병은 세계 도처에서 발생되고 있지만 계통적인 조사가 이루어져 있지 않아 많은 나라에서 발생률은 아직 밝혀져 있지 않고 있는 실정이다. 그러므로 소해면상뇌증 오염국에서 수입된 소나 그 생산품 또는 부산물에 의해 사람이 소해면상뇌증 병원체에 폭로될 가능성이 있다. 그렇기 때문에 앞으로 20년 사이에 크로이츠펠트제이콥병의 큰 발생이 광범위한 지역에서 일어날 가능성은 현 시점에서

부정할 수 없는 실정이다. 따라서 많은 나라에서 자국민의 발생 가능성을 예측하고 또한 다른 측면의 연구에 이용하기 위해 원인 물질인 프리온단백(prion protein)의 유전자 연구를 지속적으로 하고 있다 (Prusiner and Scott, 1997). 따라서 소해면상뇌증의 진단표적물질의 발굴 뿐만 아니라 우리국민을 대상으로 프리온단백 유전자 연구를 실시하여 크로이츠펠트제이콥병의 폭로 가능성에 대비하여 우리국민이 가지고 있는 유전자 특성을 밝히는 것이 현 시점에서 중요하고 시급하다.

2. 기술적 측면

프리온 감염체의 실체, 병원성의 기전 그리고 변종 인간 광우병의 원인에 대해서는 아직도 잘 모르는 상태이며, 단지 가설로만 알려졌고, 새로운 생화학적 기술의 접근이 요구된다 (Ludlam, 1997; Soto et al., 2002). 과거 프리온 병원체의 프리온 및 바이러스의 개별적인 접근시도에서 벗어나 프리온 감염과정과 바이러스 증식간의 관련성 규명을 통한 병원체 실체 발견을 위한 기술적 접근시도가 필요하였다. 병원체와 관련된 원인 물질의 조사 및 역학조사의 정보로 본 연구의 수행은 병인 및 병원성 기전 및 향후 진단기술 및 치료 후보물질 개발에 상당한 영향력을 줄 수 있다.

3. 경제·산업적 측면

프리온 질환은 전염 가능성 때문에 그 중요성이 부각되고 있고, 신경 조직 병리학적 병변으로는 신경세포 소실로 나타나는 공포현상(vacuolation)과 해면화(spongiosis)가 유발되고, 정상세포의 증대(astrocytosis) 및 비정상 형태의 프리온 (prion) 단백질 축적되고 침착되는 특징을 보인다. 사람에서 발병하는 프리온 질환에는 크로이츠펠트제이콥병, 저스만 스트라우슬러 쉥크병(Gerstmann-Strussler-Scheinker disease, GSS), 치명적 유전형 불면증(Fetal familial insomnia, FFI)과 쿠루(Kuru)가 있고, 동물에서는 소에서 발병하는 광우병(Bovine spongiform encephalopathy, BSE)과 양에서 발병하는 스크래피(scrapie) 등이 있다. 특히, 전세계를 공포로 몰아 넣었던 광우병은 1980년대 이후 영국에서 발생하여 1996년 유럽에서 수백 만 마리의 소를 집단 폐기하는 등 아일랜드에서 587건, 포르투갈에서 509건, 스위스에서 367건 등 전세계적으로 확산되어

왔다.

이와 더불어 다른 여러 나라에서는 수입 육류 및 이 질환의 원인일 것이라고 추정되는 육골분(meat and bone meal, MBM)이나 골분을 이용한 사료를 금지하는 추세에까지 이르렀다. 2001년에 들어와서 네덜란드와 우리와 가까운 일본에서 광우병의 발생이 보고됨에 따라 전세계는 다시금 공포에 휩싸이게 되었다. 2003년 미국의 광우병발생은 심각성을 더 부각시키고 있다. 매년 전세계적으로 백 만 명당 1명꼴로 발병하는 크로이츠펔트제이콥병은 주로 55세 이상에서 발병하는 것으로 알려졌으나 최근 연구동향에 따르면, 사람이 광우병에 감염된 소의 중추 신경계 조직이 포함된 제품을 섭취할 경우, 변종 크로이츠펔트제이콥병(variant Creutzfeldt-Jakob disease, vCJD)이 발생할 수 있는 점에서 기업형 축산계(경제, 산업적)를 비롯하여 사람에게 심각한 타격을 주고 있고 그 위험성의 인식이 커지고 있다.

2002년 11월 현재 이 변종 크로이츠펔트 야콥병에 걸린 환자 수는 영국에서 128명, 프랑스 6명, 아일랜드 1명, 이탈리아 1명, 미국 1명, 캐나다 1명으로 모두 138명이다. 이 질병의 많은 수가 젊은 층에서 발병하고, 신경 병리학적으로 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)가 해면상 변화가 있는 주위에 광범위하게 나타나는 특징과 이들의 100%가 코돈 129번에서 메티오닌(methionine) 동질접합체(homozygote)를 보인다. 현재 이 질병의 감염경로와 잠복기가 얼마인지, 얼마나 많은 사람이 노출되어 있는지는 확실치 않지만 새로운 변종 바이러스의 출현과 더불어 프리온 질환 및 10대에 주로 나타나는 이 변종 프리온 질환은 국가차원에서 대처해야 할 중요한 질환임에 틀림없다.

우리나라와 가까운 일본에서 소해면상뇌증과 관련한 사건들이 끊이지 않고 있어 소해면상뇌증에 대한 공포가 쉽게 사라지지 않을 전망이어서 소해면상뇌증의 진단표적물질의 발굴 및 국내에 발견된 CJD 환자의 유전역학연구가 더 절실한 시점이다. 예를 들면, 2005년 2월 4일에 일본에서 ‘인간 광우병’으로 불리는 변종 크로이츠펔트제이콥병(CJD) 환자가 발생해 숨진 것으로 처음 확인되었다. 일본 후생노동성은 이날 전문가 위원회를 열어 지난해 12월 숨진 50대 남성 환자가 광우병(BSE)의 인간 감염을 통해 발병하는 것으로 알려진 인간 광우병에 걸린 것으로 확인하였고, 일본에서 이런 환자가 발생한 것은 처음이었다. 2005년 2월 26일에 일본에서 15번째 광우병 감염 소를 확인하였다. 일본 농림수산성은 26일 홋카이도(北海道)의 한 목장에서 사육되던 102개월 된 홀스타인 젖소가 광

우병에 감염된 것으로 확인하였다.

위에 언급한 것처럼 소해면상뇌증은 유럽국가들 뿐만 아니라 세계적으로 발생하고 있는 실정으로 비발생국가에서도 발생의 우려가 점점 높아지고 있는 상황에서 최근 선진국에서는 소해면상뇌증을 검사하기 위한 여러 가지 진단제제를 생산하여 검역이나 방역에 사용하고 있으나 우리나라는 진단제제를 수입에 의존하고 있는 실정이다. 유럽연합(EU) 등 전세계적으로 소해면상뇌증에 대한 신속 진단법이 개발 중에 있으며, 일부 진단법은 진단키트로 상품화되어 있다(Dolores et al., 2005). 이에 따라 국내에서도 소해면상뇌증 진단제제의 개발과 이를 이용한 진단기술의 확립이 필요하였다.

4. 사회·문화적 측면

우리나라는 생명과학 및 의학의 급속한 발전과 인간 수명의 연장으로 이미 고령화 사회에 접어들었으며 초고령화 사회의 진입을 앞두고 있다. 따라서, 프리온 질환을 포함한 퇴행성 신경질환의 환자수의 급증은 적극적인 투자와 치료법이 개발되지 않을 경우, 기하급수적으로 늘어날 것으로 예상되고 있다. 이로 인해 국가적으로 막대한 경비의 소요 (경제적 문제) 뿐만 아니라, 이 질환들로 인해 가족 구성원의 사회활동을 제한시키고, 사회비용을 증가시키는 등 새로운 사회적, 문화적 문제로 제기될 것으로 보인다. 한림대학교 일송생명과학연구소(2001년 5월, 국립보건원으로부터 크로이츠펔트제이콥병 진단센터로 지정받음)의 보고에 따르면 국내에서 프리온 질환의 경우, 2002년까지 69명의 의심환자 중에서 35명이 크로이츠펔트제이콥병 추정환자로 판정되었고 매년 마다 증가하는 추세에 있다. 특히, 국내 정상인을 대상으로 프리온 유전자 코돈 129번을 조사한 결과 정상인의 95%에서 메티오닌 동질접합체를 가지고 있는 것을 확인하여 국내 정상인이 광우병에 노출되었을 때 변종 크로이츠펔트제이콥병에 걸릴 확률이 세계에서 제일 높다는 것을 암시할 뿐만 아니라, 우리 나라에 근접해 있는 일본에서 최근에 광우병이 발병했다는 점으로 미루어 보아 프리온 질환 분야는 국가차원에서 전폭적인 연구지원과 정확한 진단기술의 개발, 환자의 관리 및 예방대책의 마련이 시급한 실정이다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 한우와 홀스테인의 단염기변이 (SNP) 분석

- 가. 한우와 홀스테인의 SNP(single nucleotide polymorphism)분석을 통해 BSE가 많이 나타나고 있는 홀스테인과 전혀 연구가 안 되어있는 한우를 대상으로 유전적 특성을 구명하였다.
- 나. 소의 유전체에서 한국인 CJD 환자에 특이적으로 나타난 관련유전좌위와 호몰로그가 있는 위치의 비교연구를 하였다.
- 다. 호몰로그가 있는 위치에서의 한우의 위험도와 위험군 혹은 위험집단의 분류에 관한 연구를 수행하였다.

2. 크로이츠펠트제이콥병의 SNP에 대한 분석

- 가. 프리온질환 관련 유전자를 대상으로 정상 한국인에 대한 단염기변이(SNP)에 대한 분석을 수행하였다.
- 나. 한국사람 중 크로이츠펠트제이콥병 환자에 대한 SNP에 대한 분석을 수행하였다.
- 다. 유전자형을 실험한 한국인 정상인과 크로이츠펠트제이콥병 환자를 대상으로 SNP의 비교분석을 실시하였다.

3. 프리온 결손 신경 세포주 개발

- 가. 프리온 질환의 유발에 있어서 없어서는 안되는 프리온 단백질(prion protein)의 정상 기능을 밝히기 위해 순수하게 프리온 단백질만 결손된 신경 세포주를 개발하였다.
- 나. 프리온 질환의 병인과 신경 세포 소실기전을 밝히는데 중요한 기초를 제공하고 나아가 프리온 병원체의 기초연구와 진단 및 치료제를 개발하기 위한 연구의 기초자료를 마련하고자 수행하였다.

4. 단클론항체 및 다클론항체의 생산

- 가. 펩타이드(peptide)를 이용하여 단클론항체(monoclonal antibody) 및 다클론항체(polyclonal antibody)를 생산하였다.

나. 개발된 특이항체의 특성규명 및 소해면상뇌증을 일으키는 프리온 단백질과의 반응성을 분석하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

1. 국내 기술 현황의 개요

- 가. 현재 국내에서는 프리온질환에 관한 연구는 활발히 이루어지지 않은 편이며, 아직까지는 프리온 단백질 결손 신경세포주의 연구가 일부 수행한 것이 대부분이다.
- 나. 본 연구과제의 한우와 홀스테인의 단염기변이 분석, 크로이츠제이콥병의 단염기변이에 대한 분석, 단클론항체 및 다클론항체의 생산에 관한 연구는 거의 수행된 바가 없어 실질적으로 본 연구가 이들 프리온 질환의 연구에 있어서 국내에서는 시작단계라고 볼 수 있다.
- 다. 프리온에 대한 단클론항체를 개발하기 위해 본 연구과제의 협동연구팀인 수의과학검역원을 비롯한 몇몇 연구팀들에서 진단에 적용할 수 있는 프리온에 대한 단클론항체의 개발을 수행하여 왔다. 프리온 질환의 진단 기준의 확립을 위해 지금까지 개발된 프리온 단백질에 대한 항체에 비해 감염성 프리온 단백질에 대해 보다 특이적인 항체의 개발을 필요로 하였다.

2. 국내 기술개발 세부연구현황

- 가. 국내에서 수행된 프리온질환 연구들은 극히 제한적이지만 이들은 거의 본 연구과제의 연구진들에 의해 수행되어 왔다.
- 나. 최근 일본 연구진에 의해 개발된 프리온 단백질 결손 신경 세포주로부터 본 연구진에 의해 진행된 연구결과에 따르면 배지에서 혈청(serum)을 제거해 주었을 때 세포사를 일으키며, 같은 조건하에서 정상 프리온 단백질유전자를 재도입시키면 세포사가 억제되는 결과를 나타냄으로서 산화적 스트레스에 민감성을 나타냈다.
- 다. 역시 본 연구진에 의해 진행된 연구결과에 따르면 세포사 관련 단백질인 p53,

Bax, caspase-3, PARP 그리고 cytochrome c의 수준이 프리온 단백 결손 신경 세포주에서 높게 나타났다. 미토콘드리아의 칼슘(Ca^{2+})이 높아져 있었고, 반면에 미토콘드리아 막의 전위는 감소해 있었다. 이러한 결과는 정상 프리온 단백질이 세포사 및 억제제 또는 세포사멸 조절하는 역할을 할 것이라는 학설을 뒷받침하고 있다.

- 라. 위의 연구에서 사용되어진 프리온 단백 결손 신경 세포주는 후기에 운동실조를 나타내는 프리온 단백 결손 마우스로부터 유래한 것이기 때문에 도펠 유전자의 과발현의 영향에 대한 논란의 여지가 많이 남아 있다. 따라서 프리온 단백질의 기능을 연구하기 위해서는 도펠 유전자가 과발현 되지 않고 순수하게 프리온 단백질만 결손된 신경 세포주의 개발을 필요로 한다.
- 마. 본 연구진은 PC12 세포주에 프리온 단백을 코딩(coding)하는 유전자를 도입하여 정상 프리온 단백질 과발현되는 세포주를 제작하였고(Lee et al., 1999), 이 세포주에서 도파민 대사(metabolism)의 이상을 보고하는 등 프리온 단백질의 기능을 밝히기 위한 연구를 진행해 오고 있다. 이와 같은 연구들이 프리온 단백질 소실에 따른 도펠 단백질의 과발현이 없는 순수 프리온 단백질의 기능 소실 효과만을 나타낼 수 있는 신경세포주를 개발한다면 이들 세포주를 이용하여 프리온 단백질의 기능 뿐만 아니라 프리온 질환의 표적 유전자 발굴의 가능성을 높여 줄 뿐만 아니라 프리온 질환의 진단 및 치료기술 개발에 기초가 될 수 있는 연구결과를 도출할 수 있다.
- 바. 프랑스의 산양에서 BSE가 감염된 사례가 보고됨에 따라 종 특이적인 프리온 단백질에 대한 단클론항체는 동물과 사람에서 프리온 단백질 관련 신경병리학적 특성을 이해하는데 중요한 역할을 하는 것으로 인식되었다. 조직 표본에서 프리온 단백질을 검출하기 위한 단클론항체들이 개발되었고, 종 특이성과 항원결정부위에 관한 특성 규명하고 있다 (Furuoka et al., 2007). 예를 들어, 3F4 경우 사람 프리온단백질의 아미노산 109~112부위에 항원결정부위가 존재하고 사람 프리온질병에서 면역조직화학염색 과 면역블로팅 실험에서 폭넓게 사용되고 있다 이 항체는 사람과 햄스터에서는 프리온단백질을 검출할 수 있으나 마우스, 소, 면양, 원숭이에서는 검출되지 않는다. F89/160.1.5는 소 프리온단백질의 아미노산 146~159부위에서 만들어진 것으로 사람, 양, 소 조직에 반응한다(O'Rourke et al., 1998; Spraker et al., 2002). 따라서, 수의과학검역원에서는 프리온 단백질의 아미노산이 일정하기

는 하나 종별로 약간씩 차이가 인정되며 단 하나의 아미노산서열이 항원결정부위에 영향을 줄 수도 있는 것으로 판단하고 (Groshup and Pfaff, 1993) 항체개발을 추진 중에 있다.

제2절 국외 기술개발 현황

1. 프리온 병원체의 가설

가. 현재까지 프리온 병원체에 대한 가설로는 「바이러스」, 「바이리노」, 「프리온」 가설이 제시되었고, 병원체와 관련된 바이러스나 DNA가 검출되지 않은 점에서 변형된 프리온 단백질(PrP^{Sc})이 병원체일 것이라는 ‘프리온’ 가설이 현재까지는 유력시되고 있다.

나. ‘프리온’가설에서는 많은 양의 정상 프리온 단백질(PrP^{C})이 체내에 들어온 적은 양의 변형된, 병원성 프리온 단백질(PrP^{Sc})을 주형(template 또는 seeds)으로 하여 PrP^{Sc} 로 변환되고 이것이 중추신경계에 축적되면서 병원체의 증상이 일어난다고 보고 있다. 위에 언급한 프리온 질환의 진단 마커(marker)로 사용되고 있는 비정상 프리온 단백질(PrP^{Sc})은 정상 세포내에 존재하는 프리온 단백질이 단백질 분해효소에 부분적으로 저항성을 가지는 비정상 단백질로 변형된 형태를 말한다.

2. 프리온 병원체의 연구

가. 정상 프리온 단백질이 결손된 마우스는 프리온 병원체에 의해 감염되지 않고 이 때문에 정상 프리온 단백질이 결손된 마우스는 프리온 감염에 의해 나타나는 어떠한 병리적, 형태적 변화를 나타내지 않는다. 최근 유명 과학저널인 Science에는 크레/록스(Cre/Lox) 시스템을 이용하여 프리온 감염 이후에 정상 프리온 단백질을 제거 시켰을 때 프리온 감염에 의한 해면화(spongiosis)가 복구되고, 해마(hippocampus)의 신경세포가 소실되지 않으며 이 마우스의 수

명이 연장되었다는 연구결과가 보고되었다. 따라서 정상 프리온 단백질은 프리온 질환이 유발되는데 있어서 없어서는 안되는 필수조건이 되며, 정상 프리온 단백질이 변형된 형태의 프리온 단백질로 전환되는 것은 프리온 질환과 밀접한 관계가 있다.

나. 이와 같은 이유 때문에 프리온 질환과 관련되어 수행되어지고 있는 연구의 전 세계적인 경향과 추세를 보면 큰 맥락에서 다음과 같이 나누어 질 수 있다. 첫째는 정상 프리온 단백질의 기능 구명에 관한 연구이고, 둘째로는 단백질의 구조적인 변화 기작의 구명에 관한 연구이고, 셋째로는 변형된 형태의 프리온 단백질(PrP^{Sc})이 신경세포 사멸을 일으키는 기작에 관한 연구이고, 마지막으로는 궁극적인 목표가 될 수 있는 프리온 질환의 조기진단 및 치료제 개발에 관련된 연구들이다.

다. 정상 프리온 단백질의 기능과 프리온 질환에 대한 연구 동향을 보면, 1992년 정상 프리온 단백질의 기능을 연구하기 위해 Charles Weissmann 연구진에 의해 제작된 초기 프리온 단백질 결손 마우스는 어떠한 이상 증후도 나타내지 않았다. 이 후에 다른 연구진에 의해 제작된 두 종의 프리온 단백질 결손 마우스는 후기에 운동실조를 나타내지만, 이것은 비정상적인 splicing에 의해 프리온 단백질 유전자의 뒤쪽에 존재하는 도펠(doppel) 유전자가 과발현 됨으로써 나타나는 현상으로 보고되었다. 이상의 내용을 통해서 정상 프리온 단백질이 제거된 마우스가 정상적으로 발생하며, 정상 행동을 보이는 것은 아마도 프리온 단백을 대신하는 기작이 있을 것으로 예상되고 있다. 프리온 단백질의 기능에 대하여 항산화제(antioxidant), Cu/Zn SOD, 신호전달 그리고 최근에는 세포사(apoptosis)를 방지하는 역할 등을 할 것으로 보고되고 있지만, 프리온 단백질이 결손된 마우스에서 뚜렷한 변화를 보이지 않기 때문에 명확한 기능은 알려져 있지 않은 상태에 있다. 한편으로는 세포배양 실험을 통해 프리온 단백질의 기능을 밝히려는 연구들이 진행되고 있는 추세에 있다. 그러나 대부분의 프리온 단백질이 결손된 마우스의 해마로부터 순수 분리한 신경세포를 연구에 이용하고 있어서 프리온 단백질이 결손된 신경 세포주(cell line)의 필요성이 제기되고 있다 (Collinge et al., 1996).

라. 소해면상뇌증의 유전학연구는 제한적으로 수행되어오고 있고 (Palmer et al., 1991; Owen et al., 1992), 특히 단염기변이에 관한 연구는 최근에 들어와서 극히 제한적으로 연구를 수행하고 있는 실정이다. 예를 들면 독일과 일본의

경우 프리온단백유전자의 단염기변이의 대립유전자와 유전자형 빈도를 연구하여 이들이 소해면상뇌증에의 효과가 독일에서는 유의적인 것으로 나타난 바 있고 (Sander et al., 2004), 미국에서는 종모우를 대상으로 대립유전자와 유전자형 빈도를 연구하였다 (Seabury et al., 2004).

제3절 문제점

최근 여러 학자들은 프리온 단백질이 결손된 마우스로부터 신경세포를 순수 분리하여 프리온 단백질이 결손된 세포주를 개발하려는 연구를 진행하여 왔다. 그러나 현재까지 개발 보고된 세포주는 도펠(doppel) 유전자가 과잉발현되고 있기 때문에, 이러한 세포주를 가지고 프리온 단백질의 정상 기능을 연구하는데 문제점으로 제기되고 있는 실정이다. 그러나 대부분의 프리온 단백질이 결손된 마우스의 해마로부터 순수 분리한 신경세포를 연구에 이용하고 있어서 프리온 단백질이 결손된 신경 세포주(cell line)의 필요성이 제기되고 있다. 전 세계적으로 이러한 신경 세포주를 개발하려는 노력이 여러 실험실에서 기울여지고 있으나 현재까지는 과제로 남아 있는 상태에 있다.

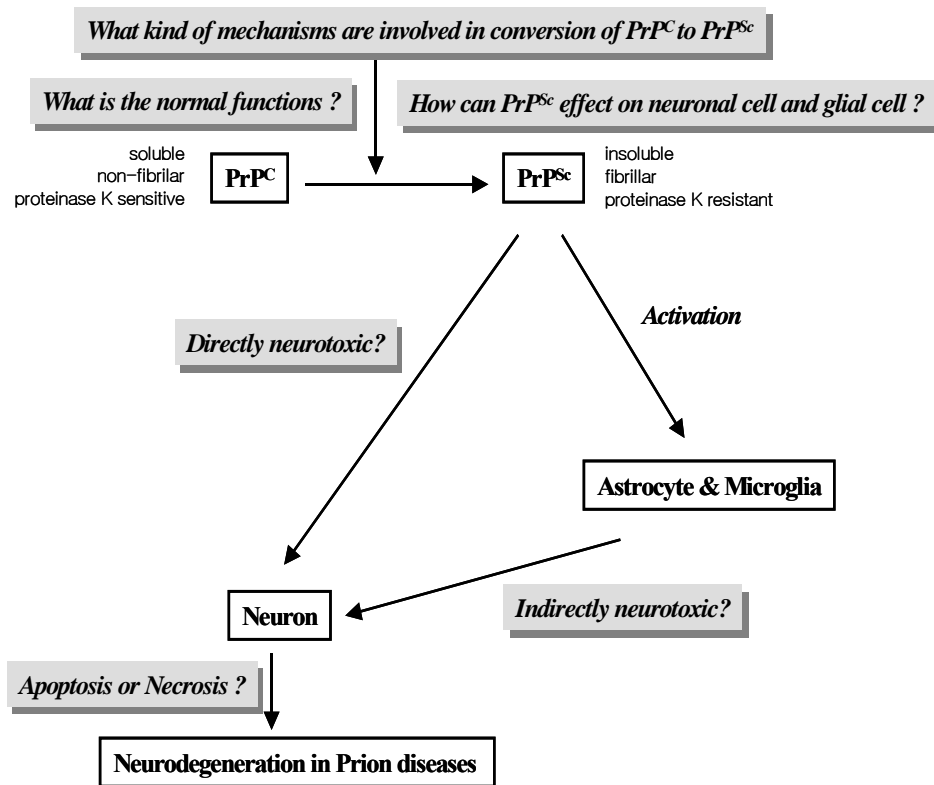


Figure 1. Trends in research on prion diseases.

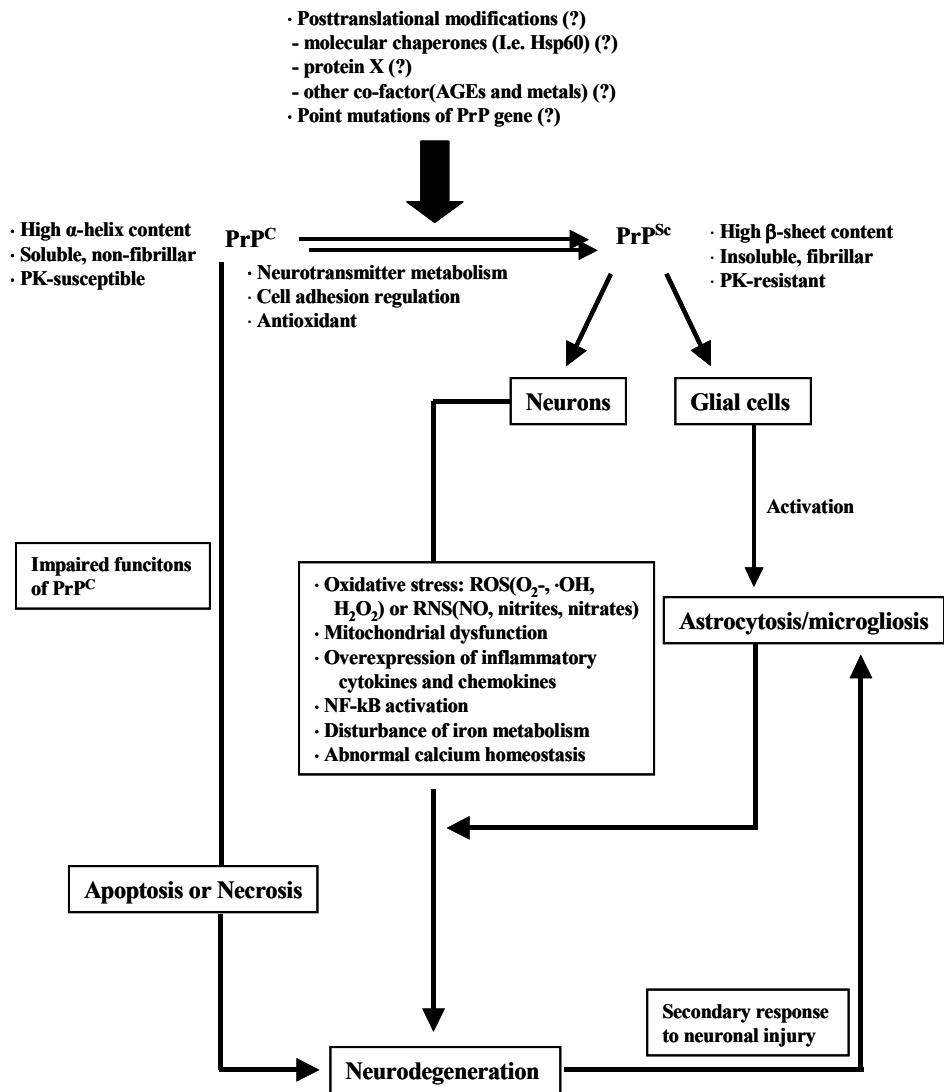


Figure 2. Diagram for research on mechanism of production of PrP^{Sc} and neurodegeneration in prion diseases

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발수행 내용

1. 한우와 홀스테인의 단염기변이 (SNP) 분석

- 가. 한우와 홀스테인의 SNP(single nucleotide polymorphism)분석을 통해 BSE가 많이 나타나고 있는 홀스테인과 전혀 연구가 안 되어있는 한우를 대상으로 유전적 특성을 구명하였다.
- 나. 소의 유전체에서 한국인 CJD 환자에 특이적으로 나타난 관련유전좌위와 호몰로그가 있는 위치의 비교연구를 하였다.
- 다. 호몰로그가 있는 위치에서의 한우의 위험도와 위험군 혹은 위험집단의 분류에 관한 연구를 수행하였다.

2. 크로이츠펠트제이콥병의 SNP에 대한 분석

- 가. 프리온질환 관련 유전자를 대상으로 정상 한국인에 대한 단염기변이(SNP)에 대한 분석을 수행하였다.
- 나. 한국사람 중 크로이츠펠트제이콥병 환자에 대한 SNP에 대한 분석을 수행하였다.
- 다. 유전자형을 실험한 한국인 정상인과 크로이츠펠트제이콥병 환자를 대상으로 SNP의 비교분석을 실시하였다.

3. 프리온 결손 신경 세포주 개발

- 가. 프리온 질환의 유발에 있어서 없어서는 안되는 프리온 단백질의 정상 기능을 밝히기 위해 순수하게 프리온 단백질만 결손된 신경 세포주를 개발하였다.
- 나. 프리온 질환의 병인과 신경 세포 소실기전을 밝히는데 중요한 기초를 제공하고 나아가 프리온 병원체의 기초연구와 진단 및 치료제를 개발하기 위한 연구의 기초자료를 마련하고자 수행하였다.

4. 단클론항체 및 다클론항체의 생산

- 가. 펩타이드 (peptide)를 이용하여 단클론항체 및 다클론항체를 생산하였다.
- 나. 개발된 특이항체의 특성규명 및 소해면상뇌증을 일으키는 프리온 단백질과의 반응성을 분석하였다.

제2절 연구개발의 방법 및 설계

1. 한우와 홀스테인의 단염기변이 (SNP) 분석

- 가. 한우에 있어서 direct sequencing을 이용하여 단염기변이를 발굴하고 이들을 홀스테인과 함께 screening하여 대립유전자의 빈도 및 유전자형의 빈도, 더 나아가 일배체형의 빈도를 비교분석하였다.
- 나. 프리온 질환과 관련이 있는 프리온단백(PRNP) 유전자에 대한 단염기변이를 분석하기 위하여 bovine PRNP 유전자에서 한우의 SNP를 발굴하고 홀스테인과 함께 screening하여 유전자형과 일배체형을 분석하였다.
- 다. 소의 유전체에서 한국인 CJD 환자에 특이적으로 나타난 관련유전좌위와 호몰로그를 추적하여 호몰로그가 있는 위치에서의 한우의 위험도와 위험집단을 분류하였다.
- 라. 한우의 단염기변이 연구에 있어서 한반도 전역에 걸쳐 대립유전자의 빈도 및 유전자형의 빈도, 일배체형의 빈도를 조사하였다.
- 마. 염색체 DNA 분리 및 PCR, Elution 및 DNA의 정량, Automatic DNA Sequencing은 다음의 크로이츠제이콥병의 SNP에 대한 분석에서 사용한 방법들을 따랐다.
- 바. 프리온 질환과 관련이 있는 프리온단백(PRNP) 유전자에 대한 역할을 알아보고자 가능한 척추동물들의 프리온단백 유전자에 대한 구조와 서열을 비교 분석하였다. 이 분석연구는 기존연구들로 밝혀진 결과들을 기초로 하여 현재 데이터베이스상에서 가능한 동물들의 프리온단백 유전자에 대한 구조와 서열을 비교분석하였다 (Baybutt and Manson, 1997; Li and Bolton, 1997; Lee et al., 1998; Collinge, 2001; Hills et al., 2001).

2. 크로이츠펜하이츨콧병의 SNP에 대한 분석

- 가. 염색체 DNA 분리 및 PCR: 건강한 한국인과 크로이츠펜하이츨콧병 환자의 혈액은 항응고제인 heparin이 처리된 상태로 냉동고에 보관하였다. 건강한 한국 사람과 크로이츠펜하이츨콧병 환자들의 혈액 (200 ul)에서 염색체 DNA의 분리는 QIAamp Blood Kit (QIAGEN, USA)를 이용하였다. DNA가 잘 분리되었는지 확인하기 위하여 1% agarose gel에 5 μ l용액을 전기영동을 실시하였다. 본 실험에 사용할 PCR primers 와 sequencing primers는 MilliGen/ Biosearch Cyclon Plus DNA synthesizer로 합성하였으며, PCR 반응에 사용될 효소 (Taq. polymerase) 는 Promega 제품을 사용하였다. 점돌연변이와 polymorphism을 조사하기 위해서, PCR은 각 primer를 제작하여 이용하며, PCR thermal cycler (Perkin Elmer, USA)는 template를 변성하기 위해서 94°C에서 10분, 그리고 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 30초, 72°C에서 2분 30초 동안 30회를 반응시켰다.
- 나. Elution 및 DNA의 정량: PCR 반응물을 1% low melting agarose gel에 loading한 다음 전기영동을 100V 40분간 실시하였다. DNA band를 EtBr로 염색한 다음 band만 오려내고 Gel elution Kit (Promega USA)를 이용하여 elution을 실시하였다. 먼저 elution된 DNA를 전기 영동을 수행하여 band가 있는지 확인한 다음 UV spectrophotometer로 정량을 실시하였다.
- 다. Automatic DNA Sequencing: Automatic DNA sequencing은 Taq dideoxy terminator cycle sequencing Kit ABI 377 automatic sequencer (ABI, USA) 를 가지고 수행하였으며, sequencing primers로서 T-1, T-2, S13, H3, K6를 이용하여 실시하였다.

3. 프리온 결손 신경 세포주 개발

- 가. 도펠 유전자가 과발현되지 않는 프리온 단백질 결손 마우스의 해마로부터 신경세포를 순수분리하여 세포주를 개발하였다 (Figure 3).
- 나. 먼저 프리온 단백질이 결손된 마우스의 해마(hippocampus)로부터 신경세포를 분리하였다.
- 다. 해마로부터 분리된 신경세포에 SV40 T 항원 (antigen)을 도입하여 신경세포

포를 불멸화하였다.

- 라. 선별(Selection) 및 프리온 단백질 결손된 신경 세포주(cell line)를 완성하였다.
- 마. 앞에 언급한 것처럼 프리온 단백질은 프리온 질환의 발병에 매우 중요하기 때문에 프리온 단백질 결손된 마우스와 세포주에서 microarray 분석을 실시함으로써 프리온 단백질의 기능과 프리온 질환의 병인에 연관되어 있을 표적 유전자를 탐색하였다 (Figure 4).
- 바. 프리온 단백질 결손된 마우스와 신경 세포주에서 RNA를 추출, microarray 분석을 수행하였다.
- 사. Microarray 결과를 분석하여 프리온 단백질 결손에 따른 발현변화 유전자를 탐색하였다.
- 아. 유전자 증폭(PCR) 분석과 분자 생화학적인 방법(western blot assay)을 통하여 발현변화를 확인하였다.
- 자. 더 나아가 면역 조직화화학적 분석 방법(immunohistochemistry)을 통하여 확인하였다.
- 차. 탐색된 표적유전자를 프리온에 감염된 마우스에 적용하고, 세포내 신호전달에 관련된 단백질들을 탐색하여 프리온 질환의 병인과 관련 있는지를 규명하였다.
- 카. 마우스에 프리온을 감염시킨 프리온 질환 마우스의 모델 구축 및 검증을 실시하였다.
- 타. 탐색된 표적유전자를 프리온에 감염된 마우스에 적용, 프리온 단백질의 감염 과정에 표적유전자의 관련성 여부를 조사하였다.
- 파. 세포 신호전달에 관련된 단백질을 프리온 감염된 마우스에 적용하여 프리온 단백질의 감염으로 인한 신경세포 소실에 관련이 있는지를 조사하였다.

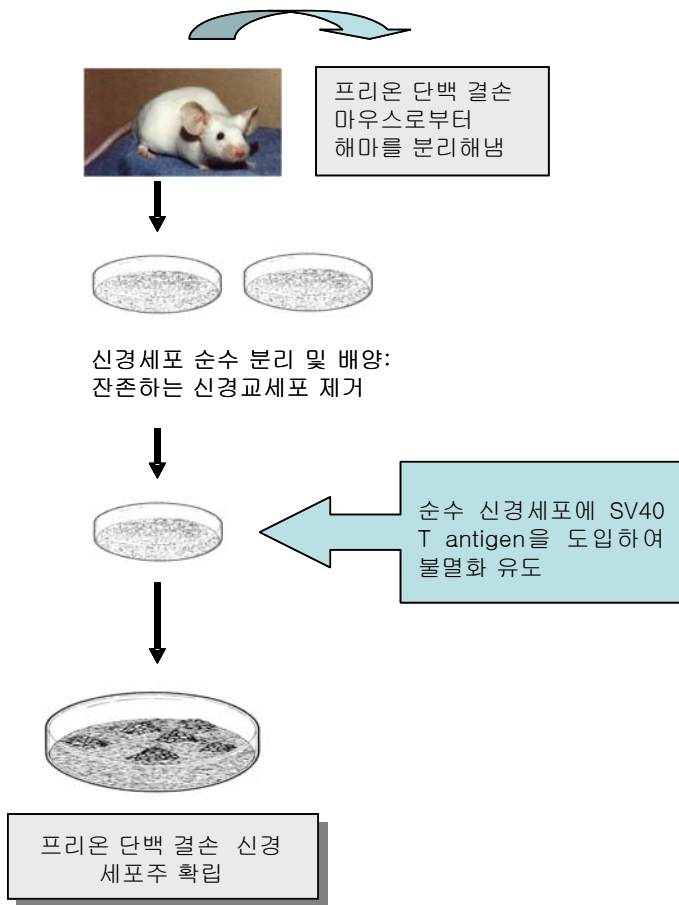
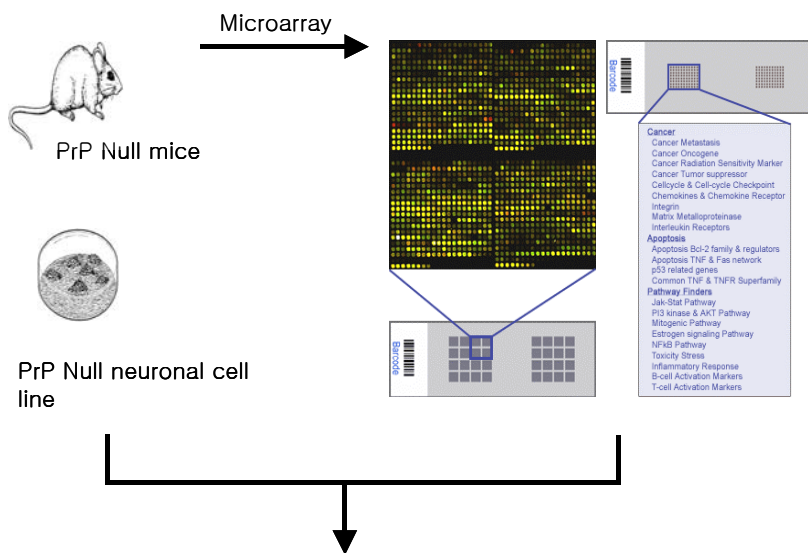


Figure 3. Production of cell lines with hippocampus in prion protein knockout mouse



프리온 질환 동물모델에 적용

Figure 4. Finding genetic markers for prion diseases using microarray with prion protein knockout mouse or cell line

4. 단클론항체 및 다클론항체의 생산

가. 펩타이드(peptide) 항체를 이용한 소해면상뇌증 프리온단백질 (PrP^{BSE}) 검출을 위해서 peptide 합성 및 특이성 조사 및 peptide 이용한 PrP knockout mouse, BALB/c mouse 및 토끼내에서 면역원성을 조사하였다. 면역용 펩타이드합성을 위한 동물프리온 단백질의 항원성 분석을 위해 기존의 아미노산 서열의 컴퓨터 분석프로그램인 항원성 예측프로그램(PROTEAM. peptron)에 의한 동물프리온 단백질의 항원성을 hydrophilicity, antigenic index, surface probability 등의 지표를 이용하여 분석후 면역용 단백질 합성하였다. 면역용 단백질 합성 및 면역 유도를 위해 S1부위는 hypervariable region으로 소를 기본으로 합성하였으며, PS73와 PS142부분은 축종별로 동일한 부분으로 합성하여 PrP knockout 마우스에 부위별로 100 μ g/ml씩 접종하여 융합 시 채혈하여 접종 전후로 비교하여 항체가 상승한 개체를 선발하여 융합 시 이

용하였고 항혈청 생산을 위하여 토끼 및 닭에 접종하였다.

나. 단클론항체 생산을 위해 특이 peptide 면역임과구 융합 및 항체분비 hybridoma를 작성하였다. 면역시킨 마우스로부터 splenic lymphocytes를 추출하여 마우스골수세포종인 SP2/0와의 PEG로 화학적 융합 처리하여 인위적인 hybridoma를 형성하게 하였다. 융합으로 형성된 hybridoma를 대상으로 10% fetal calf serum을 함유한 HAT배지에서 배양하고 각각의 배양 상층액을 ELISA를 이용하여 prion 항체를 분비하는 hybridoma를 선발하였다. 원하는 hybridoma 세포주가 선발되면 순수한 hybridoma clone을 작성하기 위하여 클로닝작업을 실시하였다. 클로닝방법은 한계희석법을 우선적으로 적용한다 클로닝이 완료된 hybridoma는 세포주명을 명명하였다 (Harlow and Lane, 1998).

다. 단클론항체의 복수생산 및 정제: 면역된 마우스의 splenic lymphocytes를 polyethylene glycol하에서 myeloma cells과 fusion하여 hybrid cells을 형성시킨 후 10% fetal calf serum을 함유한 HAT배지에서 배양하고 각각의 배양 상층액을 ELISA를 이용하여 선별하였다. 고농도의 단클론항체를 확보하기 위하여 클로닝이 완료된 hybridoma를 PrP knockout 마우스 또는 Balb/c 마우스의 복강에 10^6 - 10^7 /ml 주입하여 복수를 형성시킨 후 ammonium sulfate를 이용하여 cell-free 복수로부터 각각의 항체를 precipitation 하였다. 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)로 각각의 항체를 녹인 후 같은 buffer로 투석한 후 affinity protein A gel을 이용하여 순수 분리하였다.

라. 생산된 단클론 항체의 성상조사(isotyping 및 epitope 분석): 프리온 단백을 코딩하는 cDNA (1-254 aa)를 RT-PCR를 통해 뇌조직으로부터 cloning하였다. 프리온 단백질의 N-말단이 deletion된 4-5가지의 단백을 각각의 primer를 사용하여 PCR를 통해 97-254 aa, 125-254 aa, 158-254 aa, 219-254 aa를 만들었다. 각각의 PCR product를 발현벡터에 subcloning하여 293 cells에 transfection하였다. 각 cell lysate를 웨스턴블롯을 통해 각 항체의 대략적인 인지부위를 확인한 후 그 부위의 peptide를 합성하여 항체의 epitope을 확인하였다. 각 항체의 isotyping하기 위하여 anti-mouse isotyping kit를 이용하여 확인하였다. 각 epitope과 isotype이 확인한 후 본 연구실에서 가지고 있는 여러 종류의 프리온 strain에 대한 웨스턴 블롯 및 면역염색을 실시하여 특이성을 확인하였다.

- 마. 특이 peptide 이용하여 다클론항체를 생산하였다. 선발된 특이 peptide를 이용하여 토끼 및 닭에 3회 접종 후 항체형성의 여부를 확인하기 위하여 접종 전 및 각 boosting 후 7일에 토끼의 귀정맥과 닭의 경정맥을 통해 혈액을 일부 채취하였다.
- 바. 개발된 특이항체의 특성규명 및 BSE 프리온 단백질과의 반응성을 분석하였다. 다클론항체의 isotype은 hybridoma isotyping kit (Boeringer manheim, Germany)를 이용하여 키트 내의 설명서대로 조사하였고, spot assay를 통하여 생산된 다클론항체의 epitope를 분석하였다. 생산된 다클론항체와 다클론항체의 특이성을 확인하기 위하여 면역침강법을 이용하여 주요 반추가축 및 마우스 정상 프리온과의 반응성을 확인하였으며, 면역조직화학염색법 및 western blotting 법을 이용하여 BSE와의 반응성을 확인하였다. 진단민감도를 확인하기 위하여 마우스 순화 변형프리온에 시판되는 항체와 반응성을 비교하였다 (Harmryer et al., 1998).

5. 연구개발의 추진체계

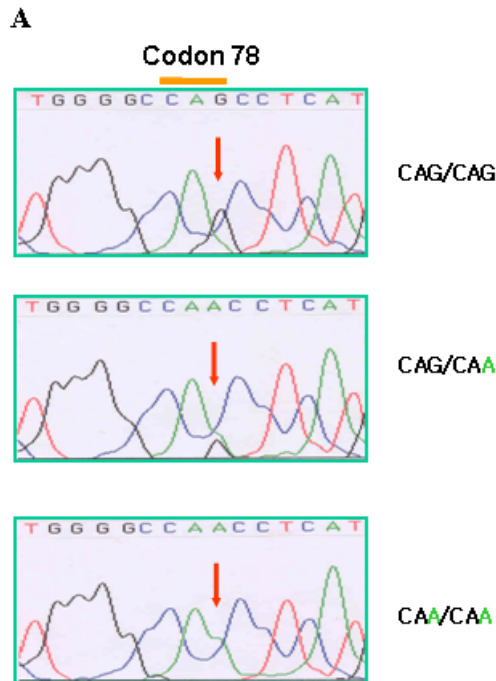
- 가. 본 연구과제를 추진하기 위하여 프리온 단백질이 결손된 마우스로부터 신경세포를 분리할 전문 인력 및 면역 조직학적, 생화학적 연구에 활용 할 수 있는 전문인력을 확보하여 수행하였고, PCR 및 자동 유전자 염기서열 분석기, Phospho-image analyzer, Confocal microscopy, 펩타이드 합성기 (Peptide synthesizer), cell culture clean bench, incubator 등의 첨단 장비들을 이용하여 수행하였으며 갖추었으며, 특히 프리온 감염과 위험을 막을 수 있는 첨단 바이오안전 실험실(Biosafety-Room, P3 Lab)과 별도의 감염 동물실에서 수행되었다.
- 나. 본 연구를 수행하는데 있어서 국내에서 확보가 불가능한 부분(예: 인간광우병 뇌조직)은 미국 뉴욕 Staten Island의 프리온 질환 연구센터(Dept of Virology, NYS Inst for Basic Research in Developmental Disabilities, NY)의 도움으로 연구를 수행하였다.
- 다. 본 연구의 중요한 목표중의 하나가 건강한 한국인과 국내에서 발생하는 크로이츠펠트제이콥병 환자들에서 점돌연변이의 polymorphism을 분석하여, 우

리 국민의 유전적 특성을 파악하고 관련 질환 및 다른 질환의 연구에 기초 자료로 활용하는데 있으므로, 짧은 기간동안 가능하면 많은 검체를 시험하여 분석하여야 하기 때문에 가능한 한 많은 샘플 확보에 주력하였다. 프리온질환의 원인 병원체의 특성상 취급하는데 고도의 위험이 따르는 관계로 국립 보건원에서의 크로이츠펠트제이콥병 환자의 혈액은 실험실 여건상 취급이 곤란하여 환자의 가검물은 전부 한림대학교 일송생명과학연구소에서 시험하고 분석하는 것으로 되어 있어서 가능하였고, 많은 종합병원의 크로이츠펠트제이콥병 환자가 한림대학교를 선호하는 경향이 있으므로 일송생명과학연구소에서의 검체 수집을 가능하게 만들어 연구기간동안에 분석하는 연구체계를 구축하였다.

제3절 연구결과

1. 한우와 홀스테인의 단염기변이 (SNP) 분석

- 가. 프리온 질환과 관련이 있는 프리온단백(PRNP) 유전자에 대한 단염기변이를 분석하기 위하여 120두의 한우로부터 혈액을 채취하여 -70°C 에서 보관하다가 단염기변이 분석시에 이들의 염기서열을 분석하였다.
- 나. 한우에서 prion protein gene (PRNP)의 open reading frame (ORF)에서 발견된 첫번째 polymorphism은 코돈 78번에 발견되었다. 모아진 120두의 한우를 가지고 이 코돈에서의 다형성에 대한 스크리닝을 수행하여 한우 유전자형의 빈도를 추정하였다 (Figure 5).
- 다. 유전자 자동염기서열분석기를 통해 두번째 single nucleotide polymorphism (SNP)은 코돈 192에서 발견되었다. 제한효소인 Hinc II를 통한 RFLP실험에서도 코돈 192의 SNP 다형성을 검증하였다. 역시 모아진 120두의 한우를 가지고 이 코돈에서의 다형성에 대한 스크리닝을 수행하여 한우 유전자형의 빈도를 추정하였다 (Figure 6).



B

Populations	Total no. of controls	Genotype frequency, n (%)			Allele frequency	
		G/G	G/A	A/A	G	A
Hanwoo	120	47 (39.2)	54 (45.0)	19 (15.8)	0.617	0.383

Figure 5. Polymorphism at codon 78 in samples of the Korean Holstein and Hanwoo. (A) Electropherograms showing the three genotypes at the polymorphic codon 78 of Holstein and Hanwoo. Upper portion: CAG/CAG, middle portion: CAG/CAA, lower portion: CAA/CAA (B) Genotype and allele frequencies of the polymorphism at codon 78 in the PRNP in samples of the Korean Holstein and Hanwoo.

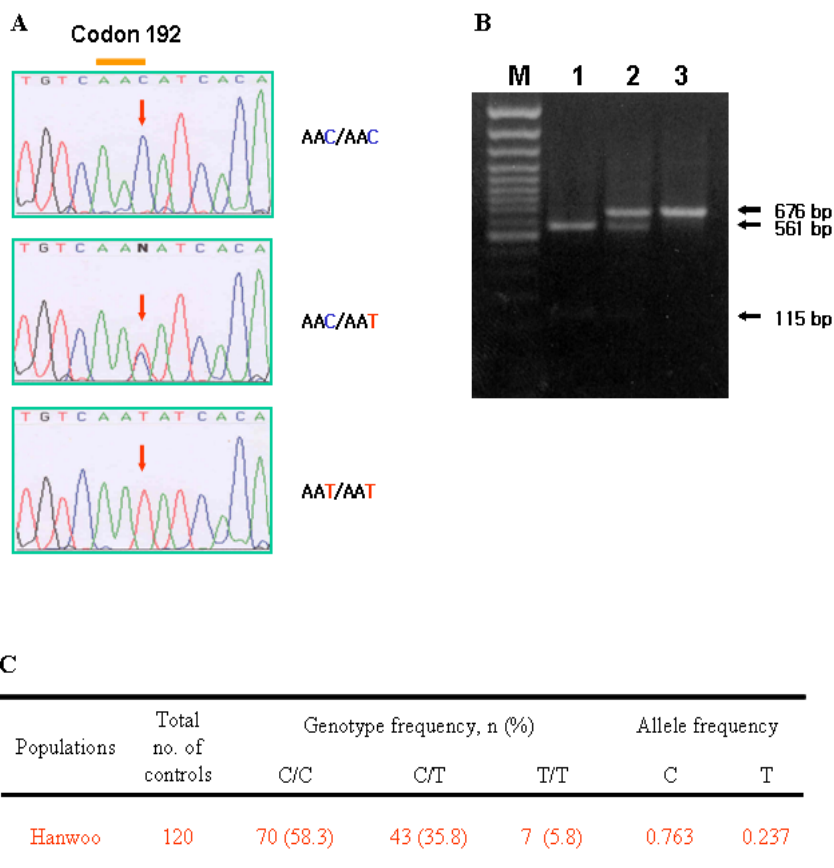


Figure 6. Polymorphism at codon 192 in samples of the Korean Holstein and Hanwoo. (A) Restriction analysis of PrP open reading frame (ORF) digested with *Hind*III. *Hind*III cuts codon 192 when it encodes AAC. M: 100 bp ladder DNA marker, lane 1: AAC/AAC, lane 2: AAC/AAT, lane 3: AAT/AAT. (B) Electropherograms showing the three genotypes at the polymorphic codon 192 of Hanwoo. Upper portion: AAC/AAC, middle portion: AAC/AAT, lower portion: AAT/AAT. (C) Genotype and allele frequencies of polymorphism at codon 192 in samples of the Korean Holstein and Hanwoo.

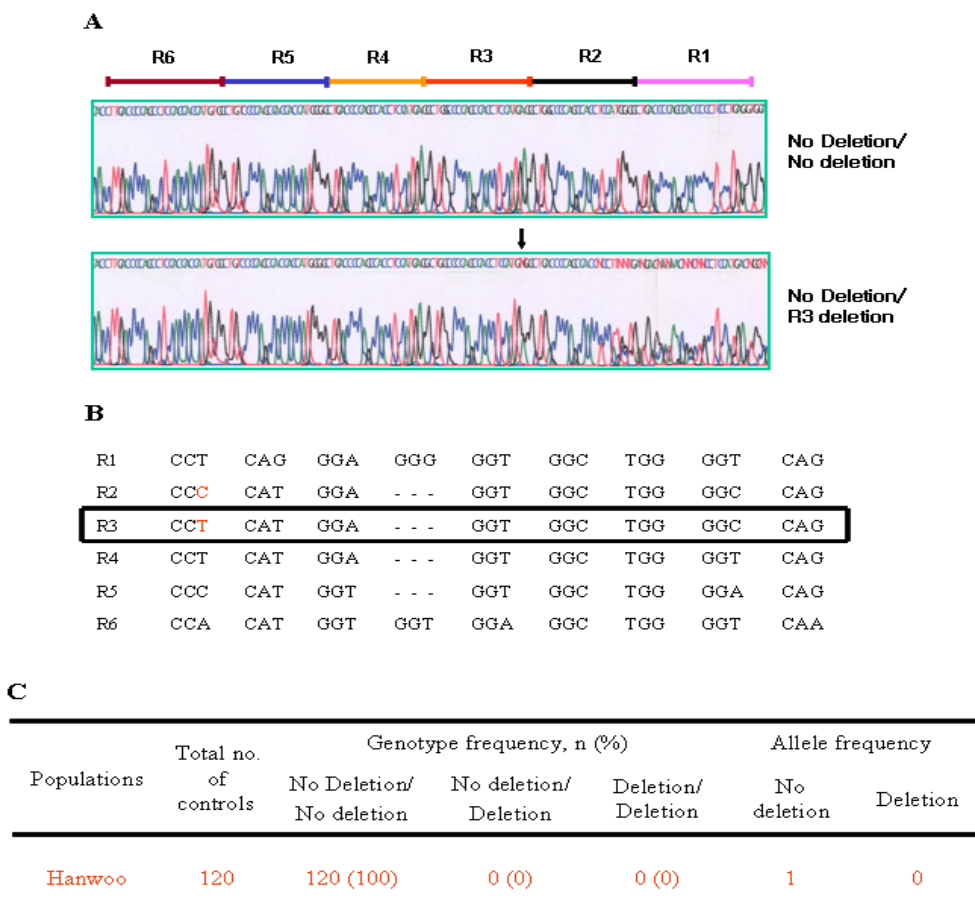


Figure 7. Polymorphism at octarepeat region in samples of the Holstein and Hanwoo. (A) Electropherograms showing the polymorphism at the octapeptide repeat region. The deletion of a single octapeptide repeat (24 bp) in Holstein. Upper portion: no deletion/no deletion, Lower portion: an octapeptide repeat deletion/no deletion. (B) The deletion R3 of the repeat region of the PRNP. The dark box represents the deletion found in all cases with R3 deletion. The abbreviated name for each repeat is shown on the left. (C) Genotype and allele frequencies in Hanwoo.

라. 또 한가지 중요한 결과는 젖소에서 주로 발견되는 octarepeat (24 bp)의 결실에 대한 연구인데, 이 결실은 R3 octarepeat region에서 일어나는데 다른 종들에서는 다형성이 존재하였지만 (Premzl et al., 2000; Walawski and Czarnik, 2003) 이 octarepeat의 결실에 대한 다형성이 120두의 한우의 유전자형에서는 전혀 발견되지 않음을 발견하였다. (Figure 7). 현재로서는 판단이 쉽지는 않지만 이 octarepeat의 결실에 대한 다형성이 소해면상뇌증에 영향을 줄 가능성을 고려해봐야 할 시점인 것으로 사료된다. 이 octarepeat 다형성은 인간의 크로이츠펠트제이콥병의 연관성과 관련하여 가장 많이 연구가 되어오고 있는 유전좌위로 관심을 주목받고 있다 (Goldfarb et al., 1991; Laplanche et al., 1995; Cochran et al., 1996; Rossi et al., 2000; Beck et al., 2001; Capellari et al., 2002). 또한 이 octarepeat 부위가 copper binding을 하는 유전좌위라는 것은 최근에 또 다른 많은 관심을 불러 일으키고 있다 (Hornshaw et al., 1995a; 1995b; Brown et al., 1997; Ruiz et al., 2000; Shaked et al., 2001; Garnett et al., 2003).

마. 위에서 분석된 3가지의 유전좌위의 다형성을 기초로 하여 (한우의 경우에 있어서는 octarepeat region에서의 다형성이 나타나지 않았으므로 실질적으로는 2개 유전좌위의 다형성임) 한우에서 8개의 유전자형이 발견되었고, 이들의 유전자형빈도는 Table 1에 보여주고 있다. 유전자형빈도가 $CAG^{78}CAA/AAC192^{AAC}/^+Octa^+$ 의 경우 27%로 가장 높았고, $CAG^{78}CAA/AAC192^{AAT}/^+Octa^+$ 와 $CAG^{78}CAG/AAC192^{AAT}/^+Octa^+$ 의 유전자형이 18%로 그 뒤를 따랐다.

Table 1. Genotype distribution for codon 78, 192 and octarepeat region of PRNP in Hanwoo.

Genotypes	Hanwoo, n=120 (%)
CAG ₇₈ ^{CAA} /AAC ₁₉₂ ^{AAC} /+Octa ⁺	32 (26.6)
CAG ₇₈ ^{CAA} /AAC ₁₉₂ ^{AAT} /+Octa ⁺	21 (17.5)
CAG ₇₈ ^{CAG} /AAC ₁₉₂ ^{AAC} /+Octa ⁺	21 (17.5)
CAG ₇₈ ^{CAG} /AAC ₁₉₂ ^{AAT} /+Octa ⁺	20 (16.7)
CAA ₇₈ ^{CAA} /AAC ₁₉₂ ^{AAC} /+Octa ⁺	17 (14.2)
CAG ₇₈ ^{CAG} /AAT ₁₉₂ ^{AAT} /+Octa ⁺	6 (5)
CAA ₇₈ ^{CAA} /AAC ₁₉₂ ^{AAT} /+Octa ⁺	2 (1.7)
CAG ₇₈ ^{CAA} /AAT ₁₉₂ ^{AAT} /+Octa ⁺	1 (0.8)

바. 본 소해면상뇌증의 표적 유전자의 발굴 연구에서는 무엇보다도 한우의 유전적 특성을 밝히는 스크리닝 연구에 중점을 두어 연구한 결과 소해면상뇌증과 관련이 있는 것으로 보고된 PRNP 유전자에 대한 한우의 23-bp indel, 12-bp indel과 24-bp indel 3개의 sequence variants의 유전자형을 genotyping한 결과를 Tables 2, 3, 4 에서 다른 육우와 홀스테인, 그리고 소해면상뇌증이 있는 소들의 결과와 함께 보여주고 있다. 한우는 위험성을 가지고 있는 대립유전자나 유전자형이 다른 종에 비해서 다소 빈도가 적은 것으로 보여지며, 이는 특히 강원도에 있는 한우들에서 더 적은 것으로 보여지고 있다. 이와 같은 결과는 23-bp indel과 12-bp indel에서 모두 나타나고 있다. octarepeat으로도 불려지는 24-bp indel polymorphism은 소해면상뇌증과 관련이 있는 것으로 보고된 바는 없지만 한우에서는 앞의 결과에서와 마찬가지로 단 한두도 deletion이 일어나지 않은 대립유전자나 유전자형빈도를 보여주고 있다.

Table 2. Preliminary results of allele and genotype frequencies of PRNP 23-bp indel polymorphism in Korean cattle

23-bp indel	n	Allele frequency		Genotype frequency			
		+	-	++	+-	--	
Korean	Korean cattle (Kangwon-do)	50	0.45	0.55	0.18	0.54	0.28
	Korean cattle (Jeju-do)	36	0.40	0.60	0.17	0.47	0.36
	Korean cattle (Total)	86	0.43	0.57	0.17	0.51	0.31
Japanese (J. Vet. Med. Sci, 2006)	Holstein	278	0.21	0.79	14(0.05)	90(0.32)	174(0.63)
	Japanese black cattle	186	0.41	0.59	19(0.10)	114(0.61)	53(0.28)
	BSE-affected Holstein	6	0.17	0.83	0	2(0.33)	4(0.67)
German (Neugenetics 2004)	German cattle	48	0.43	0.57	0.21	0.44	0.35
	BSE-affected German cattle	43	0.27	0.73	0.05	0.44	0.51
U.S.(Mammalian Genome 1994)	U.S. sires	132	0.30	0.70	0.14	0.32	0.54

Table 3. Preliminary results of allele and genotype frequencies of PRNP 12-bp indel polymorphism in Korean cattle

12-bp indel	n	Allele frequency		Genotype frequency			
		+	-	++	+ -	- -	
	Korean cattle (Kangwon-do)	50	0.46	0.54	0.20	0.52	0.28
Korean	Korean cattle (Jeju-do)	35	0.41	0.59	0.20	0.43	0.37
	Korean cattle (Total)	85	0.44	0.56	0.20	0.48	0.32
	Holstein	290	0.26	0.74	0.07	0.38	0.55
Japanese (J. Vet. Med. Sci, 2006)	Japanese black cattle	186	0.43	0.57	0.13	0.61	0.26
	BSE-affected Holstein	6	0.17	0.83	0	0.33	0.67
German (Neugenetics 2004)	German cattle	48	0.49	0.51	0.21	0.56	0.23
	BSE-affected German cattle	43	0.33	0.67	0.09	0.47	0.44
U.S. (Mammalian Genome 1994)	U.S. sires	132	0.49	0.51	0.32	0.35	0.33

Table 4. Preliminary results of allele and genotype frequencies of PRNP 24-bp indel polymorphism in Korean cattle

24-bp indel (octapeptide repeat)	n	Allele frequency		Genotype frequency			
		6	5	66	65	55	
	Korean cattle (Kangwon-do)	50	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00
Korean	Korean cattle (Jeju-do)	35	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00
	Korean cattle (Total)	85	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00
	Holstein	53	0.92	0.09	0.83	0.17	0.00
Japanese (J. Vet. Med. Sci, 2006)	Holstein	863	0.94	0.06	765(0.89)	94(0.11)	4(0.005)
	Japanese black cattle	186	0.97	0.03	173(0.93)	13(0.06)	0.00
	BSE-affected Holstein	6	1.00	0.00	6(1.00)	0.00	0.00
German (Neugenetics 2004)	German cattle	48	0.95	0.05	0.90	0.10	0.00
	BSE-affected German cattle	43	0.95	0.05	0.91	0.09	0.00

사. Table 5 에서는 이들의 odds ratio를 보여주고 있는데, 0.05의 유의성수준에서 23-bp indel의 경우는 영향이 있는 것으로 나타났고, 12-bp indel의 경우는 영향이 없는 것으로 나타났다. 특히, 23-bp indel의 경우 영향이 강원도한 우에 기인한 것으로 사료된다.

Table 5. Estimate of odds ratio for allele frequencies of PRNP polymorphisms in Korean cattle

23-bp ins/del	n	Allele frequency		OR(95%CI) Vs German BSE-affected	
		Ins	Del		
Kangwon-do	50	0.45	0.55	2.24 (1.21-4.16)	
Korean cattle	Jeju-do	36	0.40	0.60	1.85 (0.95-3.61)
	total	86	0.43	0.57	2.07 (1.18-3.64)

12-bp ins/del	n	Allele frequency		OR(95%CI) Vs German BSE-affected	
		Ins	Del		
Kangwon-do	50	0.46	0.54	1.77 (0.97- 3.21)	
Korean cattle	Jeju-do	35	0.41	0.59	1.47 (0.76- 2.82)
	total	85	0.44	0.56	1.64 (0.95- 2.82)

아. Table 6 에서는 이들의 콤비네이션 유전자형의 빈도를 강원도, 제주도, 그리고 종합한 결과를 보여주고 있다.

Table 6. Genotype combinations of two polymorphic loci within PRNP gene in Korean cattle (Hanwoo)

Location	Genotype combination		N	Freq.(%)
	23-bp indel	12-bp indel		
Gangwon-do	ID	ID	22	44.0
	DD	DD	14	28.0
	II	II	5	10.0
	ID	II	5	10.0
	II	ID	4	8.0
Jeju-do	ID	ID	15	42.9
	DD	DD	13	37.1
	II	II	6	17.1
	ID	II	1	2.9
Total	ID	ID	37	43.5
	DD	DD	27	31.8
	II	II	11	12.9
	ID	II	6	7.1
	II	ID	4	4.7

- 자. 위의 결과는 전국적인 분석을 요구하는 것을 암시하는 것으로 볼 수 있으며 이를 바탕으로 전국적인 한우의 분석을 실시한 결과 Table 5 에서는 이들의 odds ratio를 보여주고 있는데, 0.05의 유의성수준에서 23-bp indel과 12-bp indel이 모두 유의하게 영향이 있는 것으로 나타났고, 23-bp indel에서의 영향이 더 큰 것으로 나타났다.
- 차. 이들은 지역별로 변이를 보였는데 23-bp indel의 결과를 보면 제주도를 제외하고는 모두 유의성이 있는 것으로 나타났고, 충청도와 경상도에서만 유의성이 있는 것으로 나타났다. 이들 지역간의 특성은 앞으로 한우의 유전학연구에서 다른 유전자들의 연구에 있어서도 중요할 것으로 추측된다. 각 도별로 남북을 나누어서 나아가 더 협소한 지역에서의 분석이 의문이었지만 이들 연구는 시료수가 더 많아야 보다 정확한 판단을 내릴 수가 있다.
- 카. 현재의 결과로 PRNP유전자에서는 한우에서 소해면상뇌증의 가능성이 유전적으로 조금 낮은 수준으로 조심스럽게 예측해 볼 수 있다.

Table 7. Odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI) of alleles of *PRNP* polymorphisms using Korean cattle and BSE-affected German cattle.

	n	Allele		
		Frequency		OR (95% CI) ^a
		I	D	D
Promoter 23-bp indel				
Kyonggi	24	0.48	0.52	2.52(1.20-5.29)
Chungcheong	26	0.52	0.48	2.96(1.43-6.10)
Kangwon	60	0.43	0.57	2.10(1.15-3.81)
Kyongsang	152	0.45	0.55	2.25(1.33-3.81)
Jeolla	140	0.43	0.57	2.05(1.21-3.50)
Jeju	35	0.40	0.60	1.83(0.93-3.59)
Combined	437	0.44	0.56	2.18(1.33-3.57)
Intron 1 12-bp indel				
Kyonggi	24	0.40	0.60	1.36(0.65-2.83)
Chungcheong	26	0.50	0.50	2.07(1.02-4.20)
Kangwon	60	0.43	0.57	1.58(0.89-2.82)
Kyongsang	152	0.46	0.54	1.77(1.07-2.93)
Jeolla	140	0.44	0.56	1.60(0.96-2.66)
Jeju	35	0.41	0.59	1.47(0.76-2.82)
Combined	437	0.44	0.56	1.65(1.03-2.65)

I: Insertion; D: Deletion

^a OR and its 95% CI were estimated using the allele and genotype frequencies obtained from the BSE-affected German cattle in the study of Sander et al. (2004).

Bold face indicates the significance with $P < 0.05$.

타. 본 연구의 인실리코선행연구인 호몰로그연구가 PRNP유전자의 소해면상뇌증연구를 유도하였지만 본 연구결과로부터 PRNP유전자의 소해면상뇌증에 의

유전적인 효과의 가능성은 PRNP유전자의 좀 더 광범위한 다시말하면 소, 인간 외의 여러 동물들의 비교를 요구하였다. 따라서 스크래피 유전자연구들이 진행된 양 (Belt, et al, 1995; Billinis et al., 2002), PRNP유전자의 연구가 잘 되어진 마우스 (Westaway et al., 1994), 소 (Goldmann et al., 1991; Hunter et al., 1994; Schlapfer et al., 1999; Sander et al., 2004; 2005) 등을 포함하여 현재 데이터베이스가 갖추어진 모든 종에서 지놈서열과 아미노산서열을 비교하였다. 이 분석에는 총 12종의 지놈서열과 53종의 아미노산서열을 포함하고 있다.

과. 먼저 유전자의 구조는 12종의 척추동물에서 크기와 구조, 서열면에서 상당한 변이를 보이고 있다 (Figures 8, 9). 또한, 이들 동물들의 공동적인 transcription binding site연구는 이 유전자의 기능에 대한 힌트를 제시해 주고 있다 (Figure 10). 아마도 연구되어온 transcription binding site (Okamoto et al., 2002)와 함께 향후 프리온단백유전자의 기능에 기여를 할 것으로 사료된다. 호몰로지가 큰 부분들(Figure 11, Table 8)은 프리온단백유전자의 기능과 조절에 중요한 역할을 할 수 있는 부위로서 기존의 연구 (Mendez and Richter, 2001; Thackray et al., 2002; Si et al., 2003; Sunyach et al., 2003; Premzl et al., 2005)와 더불어 보다 집중적인 연구와 기능연구가 요구된다.

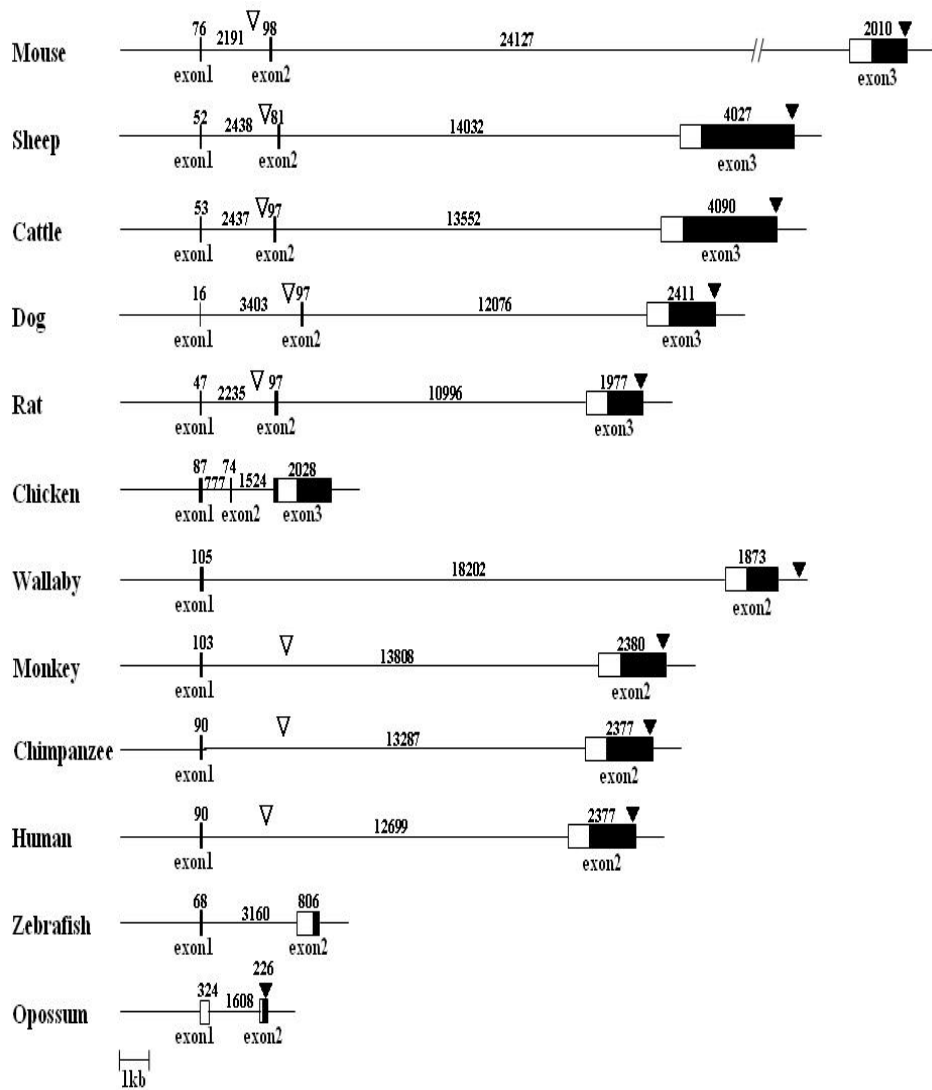


Figure 8. Structure of PRNP gene in 12 species. Coding regions are presented as opened boxes. The opened and closed triangles indicate the location of highly conserved regions in intron 1 and 3'-UTR, respectively.

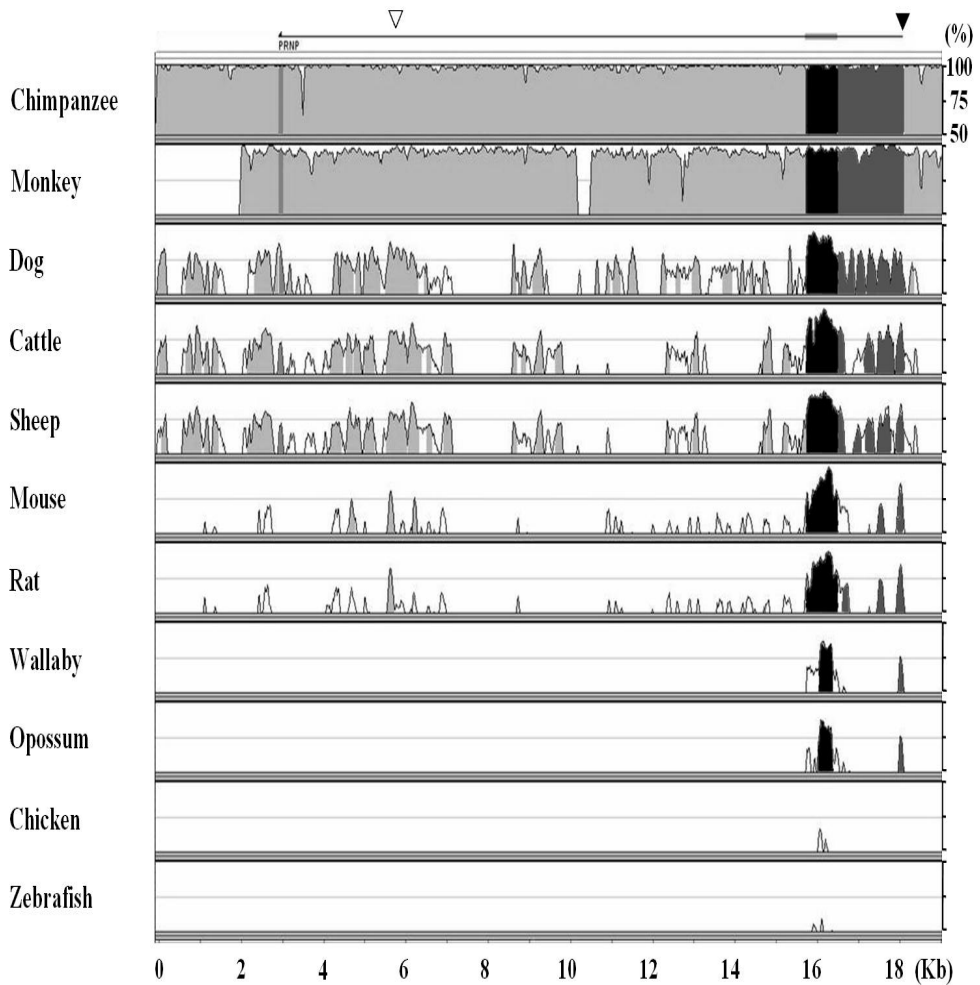


Figure 9. Nucleotide sequence identity of PRNP gene between human and other species. Peaks show their percent identities (50%~100%, vertical axis) at their relative positions to the reference human sequence (horizontal axis). Peaks in coding, UTR, and other sequences fitting the criterion for conservation (75% over 100 bp) are presented black, dark grey, and grey, respectively. The opened and closed triangles indicate the location of highly conserved regions in intron 1 and 3'-UTR.

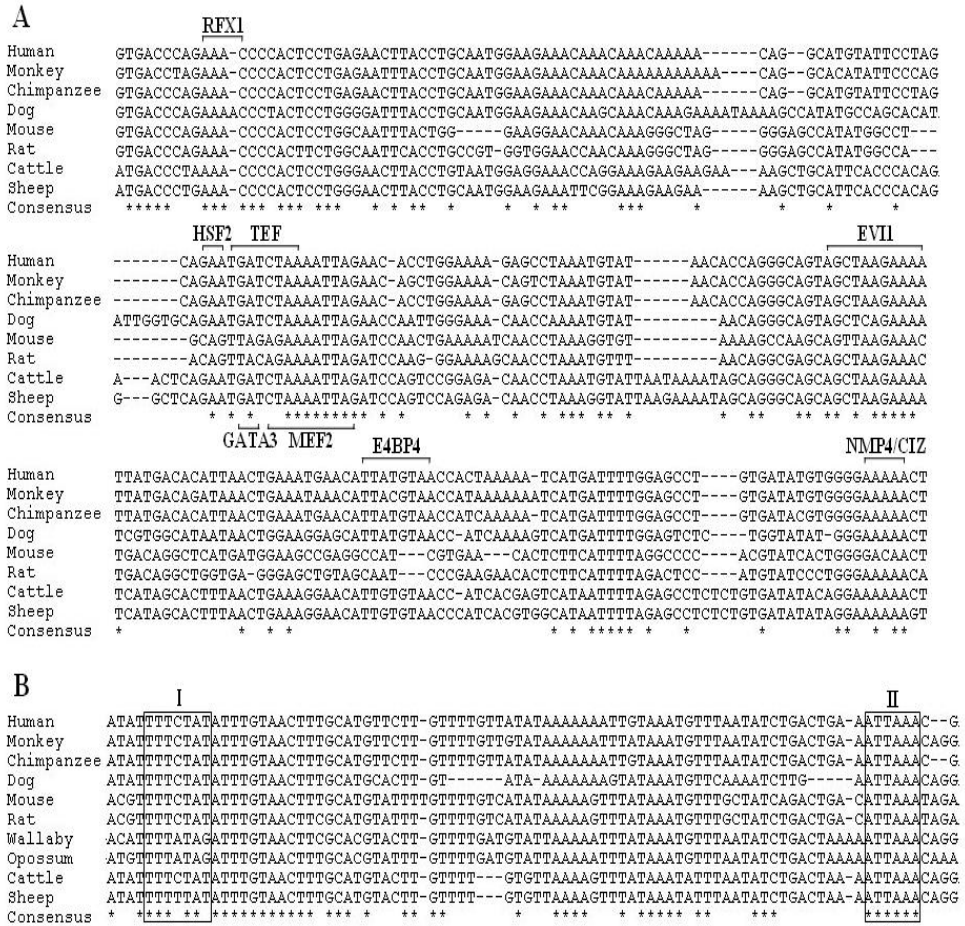


Figure 10. Conserved regions in intron 1 and 3'-UTR of PRNP gene. Asterisk indicates a conserved nucleotide in all species. **A.** Putative transcription factor binding sites in intron 1. The marked motifs has the similarity score larger than 0.7. RFX1, regulatory factor X1 HSF2, heat shock factor 2GATA3, GATA-binding factor 3 TEF, thyrotrophic embryonic factor; MEF2, myocyte enhancer factor 2, EVI1, ecotropic viral integration site 1 E4BP4, E4 promoter-binding protein 4 NMP4/CIZ, nuclear matrix protein 4/cas-interacting zinc finger protein. **B.** The functional sequences for maturation-specific (I) and nucleus-specific (II) polyadenylation in 3'-UTR.

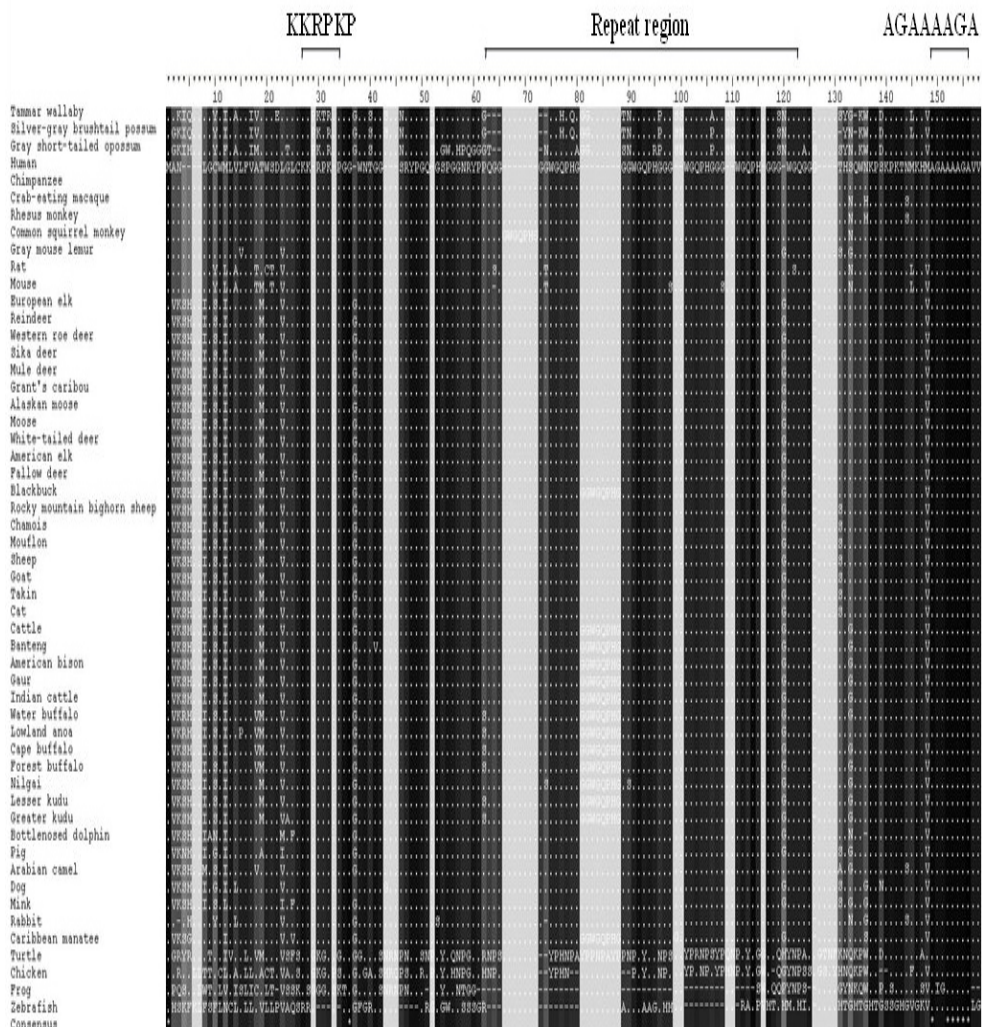


Figure 11. Amino acid sequences in 53 vertebrate prion proteins. The different amino acid from human sequence is appropriately replaced. Identical residue and deletion are indicated by point and dash, respectively. Sequence identity is presented by brightness of columns, and black indicates the complete identity. The marked sequences are the regions associate with prion diseases.

	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310
Tamar wallaby
Silver-gray brushtail possum
Gray short-tailed opossum
Human	GGGGMGGAMRRPPIHPSGIVEDRFRNHRHFNQVYVREDB	YKQNWPHQCVLTIKQHPVPTTNG
Chimpanzee
Crab-eating macaque
Rhesus monkey
Common squirrel monkey
Gray mouse lemur
Rat
Mouse
European elk
Reindeer
Western roe deer
Sika deer
Mule deer
Grant's caribou
Alaskan moose
Moose
White-tailed deer
American elk
Pallow deer
Blackbuck
Rocky mountain highorn sheep
Chamois
Mouflon
Sheep
Goat
Takin
Cat
Cattle
Banteng
American bison
Gaur
Indian cattle
Water buffalo
Lowland anoa
Cape buffalo
Forest buffalo
Nilgai
Lesser kudu
Greater kudu
Bottlenosed dolphin
Pig
Arabian camel
Dog
Mink
Rabbit
Caribbean manatee
Turtle
Chicken
Prog
Zebrafish
Consensus

Figure 11. --- Continued

Table 8. Comparison of octapeptide repeat sequences in 51 species*.

Composition	Species	Type	Sequence									
10 Hexa	I	Hexa	(P/N)	(Q/H/R/S/P)					N	P	(G/S/N/A)	Y
8 Hexa-1 Hepta	II	Hexa	(P/H)	(Q/H/R)					(N/Q)	P	(G/S)	Y
		Hepta	P		G	W			G	Q	G	Y
6 Octa	III	Octa	P	(Q/H)	G	G	G		Q	G	Q	
5 Octa	IV	Octa	P	(Q/H)	G	G	(T/G/S)		W	G	Q	
	V	Octa	P	(Q/H)	G	G	G		W	G	Q	
1 Nona-4 Octa	VI	Octa	P	H	G	G	G		W	G	Q	
		Nona	P	Q	G	G	G	G	W	G	Q	
	VII	Octa	P	H	G	G	G		W	(G/S)	Q	
		Nona	P	Q	S	G	G	T	W	G	Q	
1 Nona-3 Octa-1 Nona	VIII	Octa	P	H	G	G	G		W	G	Q	
		Nona	P	(Q/H)	G	G	G	G	W	G	Q	
1 Nona-4 Octa-1 Nona	IX	Octa	P	H	G	G	G		W	G	Q	
		Nona	(P/S)	(Q/H)	G	G	G	G	W	G	Q	
5 Deca	X	Deca	P	(Q/H/R)	(G/A/P)	G	G(T/S)	N	W	G	Q	
1 Undeca-4 Deca	XI	Deca	P	(Q/H)	(G/A/P)	G	G(T/S)	(N/S)	W	G	Q	
		Undeca	P	G	G	N	R	Y	P	G	W	G

I: Turtle II: Chicken III: Common squirrel monkey

IV: Mouse V: Rabbit

VI: Human, Chimpanzee, Crab-eating macaque, Rhesus monkey

VII: Rat

VIII: Dog, Mink, Bottlenose dolphin, Pig, Arabian camel, Sheep, Rocky mountain Bighorn sheep, Chamois, Mouflon, Goat, Takin, Cat, American elk, Fallow deer, White-tailed deer, Alaskan moose, Moose, Grant's caribou, Mule deer, Sika deer, Western roe deer, European elk, Reindeer, Gray mouse lemur

IX: 12 Bovine species (Cattle, Banteng, American bison, Gaur, Indian cattle, Water buffalo, Lowland anoa, Cape buffalo, Forest buffalo, Nilgai, Lesser kudu, Greater kudu), Blackbuck, Caribbean manatee

X: Gray short-tailed opossum

XI: Tammar wallaby, Silver-gray brushtail possum

*Frog and zebrafish were excluded because of lack of the repeat sequences.

2. 크로이츠펠트제이콥병의 SNP에 대한 분석

- 가. 정상인과 크로이츠펠트제이콥병 환자의 유전변이 연구를 위해 먼저 발현변화가 있는 유전자를 찾기위해 마이크로어레이 발현변화연구 결과 가장 가능성이 큰 prion like protein gene 인 *PRND* 유전자를 찾아내었다.
- 나. 이 *PRND* 유전자의 단염기변이 발굴을 수행하고 변이 3' UTR +28 의 염기서열에 대한 변이의 연구결과 대립유전자가 T와 C로 나타났다 (Figure 9).
- 다. 한국인에서 정상인과 크로이츠펠트제이콥병 환자들의 the prion like protein gene (*PRND*)의 유전자의SNP를 조사한 결과 3' UTR +28에서 다형성이 발견되었다. 이들 SNP가 이 질병과 연관이 있는지 알아보기 위해 SNP의 유전자형 빈도를 비교해 본 결과 이들 사이에 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다 ($p=0.0049$) (Table 9).
- 라. 따라서 명확한 연관을 알아보기위해 분명한 크로이츠펠트제이콥 환자들과 가능성이 있는 크로이츠펠트제이콥병 환자들을 구분하고 단염기변이 이외의 다른 고정효과들을 보정하여 분석한 결과 분명한 크로이츠펠트제이콥병 환자들과 가능성이 있는 크로이츠펠트제이콥병 환자들에서 모두 차이를 보여주었다 (Table 10). 또한 이들 크로이츠펠트제이콥병 환자들에서 나이와 성별에 따라 분석한 결과 나이와 성별에 영향을 받지 않는 것을 보여주고 있다. PRNP의 코돈 129, 219와 PRND의 3' UTR +28의 SNP의 Linkage Disequilibrium (LD)을 조사한 결과 이들과 PRND SNP사이에는 LD가 존재하지 않는 것을 Table 11에서 보여주고 있다. 이들 크로이츠펠트제이콥병 환자들의 유전분석 결과로써 *PRND* 유전자의 3' UTR +28 의 염기서열에 대한 변이가 크로이츠펠트제이콥병에 영향이 있는 것으로 사료된다.

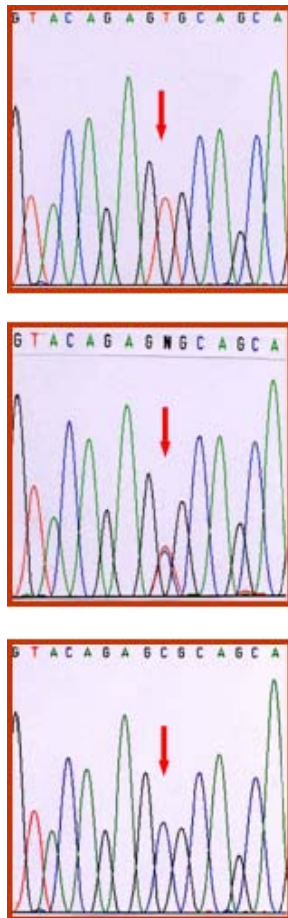


Figure 9. The *PRND* polymorphism at 3' UTR +28 found in the Korean population. Electropherograms showing the three genotypes at the 3' UTR +28 of *PRND* in healthy Koreans and sporadic CJD patients. Upper portion: T/T, middle portion: C/T, lower portion: C/C.

Table 9. Genotype and allele frequencies of the polymorphism at 3' UTR +28 of the *PRND* in samples of the normal Korean population and sporadic CJD patients.

Subject groups	Genotype frequency, n (%)				Allele frequency, n (%)		
	T/T	C/T	C/C	Total	T	C	Total
Control	24 (23.5)	58 (56.9)	20 (19.6)	102	106 (52.0)	98 (48.0)	204
Sporadic CJD	48 (43.6)	41 (37.3)	21 (19.1)	110	137 (62.3)	83 (37.7)	220
	$(\chi^2=10.6569, df=2, P=0.0049)$				$(\chi^2=4.6006, df=1, P=0.032)$		

Table 10. Genotypes at 3' UTR +28 of the *PRND*, age, and sex in Korean normal population and definite / probable cases with sporadic CJD.

	Total, n	Genotype frequency, n (%)			P-value ^a
		T/T	C/T	C/C	
Normal controls	102	24 (23.5)	58 (56.9)	20 (19.6)	-
Age (years)	57.7 ± 8.6 ^b	59.5 ± 9.5	57.1 ± 8.7	58.3 ± 8.2	
Gender (M/F) ^c	47/55	11/13	27/31	9/11	
Sporadic CJD patients	110	48 (43.6)	41 (37.3)	21 (19.1)	0.005
Definite CJD cases	17	9 (52.9)	5 (29.4)	3 (17.6)	0.036
Age (years)	57.2 ± 9.6	58.0 ± 10.2	54.8 ± 6.0	59.0 ± 1.7	
Gender (M/F)	10/7	4/3	3/2	3/1	
Probable CJD cases	93	39 (41.9)	36 (38.7)	18 (19.4)	0.015
Age (years)	63.8 ± 11.9	63.9 ± 9.6	64.5 ± 11.5	62.2 ± 16.8	
Gender (M/F)	43/50	18/21	15/21	10/8	

^aBased on comparison of genotype frequencies between controls and sporadic CJD patients.

^bData are expressed as mean ± SD.

^c(Male/Female).

Table 11. Pairwise linkage disequilibrium coefficients between three SNPs of *PRND* and *PRNP* in Korean control samples.

Polymorphisms	$ D' ^a$		
	<i>PRNP</i> codon 129	<i>PRNP</i> codon 219	<i>PRND</i> 3'UTR +28
<i>PRNP</i> codon 129	-	1	0.1
r^{2b} <i>PRNP</i> codon 219	0	-	0.46
<i>PRND</i> 3'UTR +28	0	0.01	-

^aThe Lewontin's standardized coefficient.

^bThe correlation coefficient

3. 프리온 결손 신경 세포주 개발

가. 프리온 단백질 결손된 마우스 (Zurich mouse) 및 이에 대한 정상 마우스를 확보하여 이들 마우스로부터 해마를 분리하고, 이로부터 신경세포를 분리하여 불멸화된 신경세포주를 구축하였다. 분리된 신경세포주 가운데 몇몇 결손 마우스의 신경세포주 (Hpl 3-4, Zpl 2-1, 2-4, 3-4) 및 정상마우스의 신경세포주 (HW 8-2, ZW 13-1, 13-2, 13-3)들간의 형태학적 특성을 Figure 10에서 보여주고 있다.

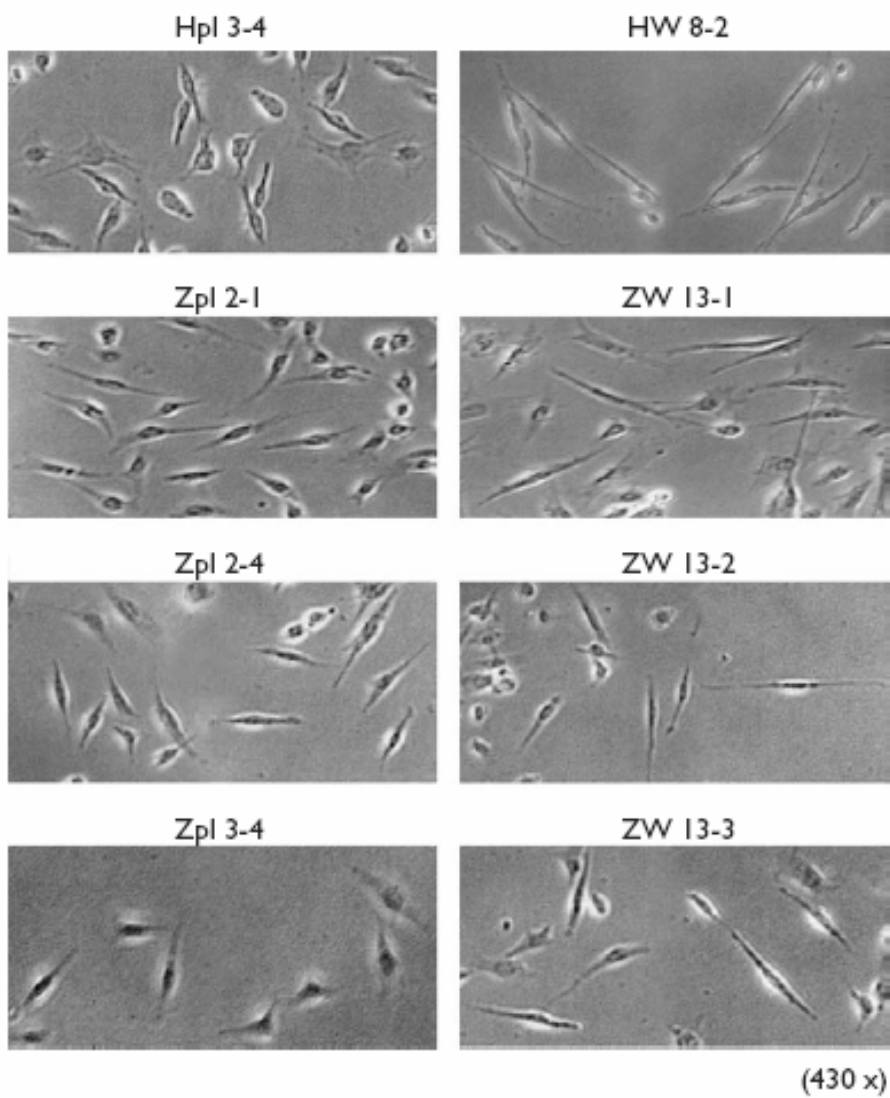


Figure 10. Characterization of morphology of established cell lines. Morphological appearance of PrP knockout (Hpl, Zpl) and PrP wild type (HW, ZW) cell lines were compared using an inverted microscope.

4. 단클론항체 및 다클론항체의 생산

가. 면역용 단백질 합성을 위한 동물 Prion단백질의 항원성 분석: 면역용 단백질 합성을 위하여 소의 아미노산 서열을 항원성 예측프로그램을 이용하여 항원성을 예측분석하여 본 결과 아미노산 73-88(PS73), 106-122(S1), 150-169(PS142)부분에서 hydrophilicity, antigenic index, surface probability분석기법 모두에서 항원성이 매우 높은 것으로 결과가 나왔다 (Figure 11).

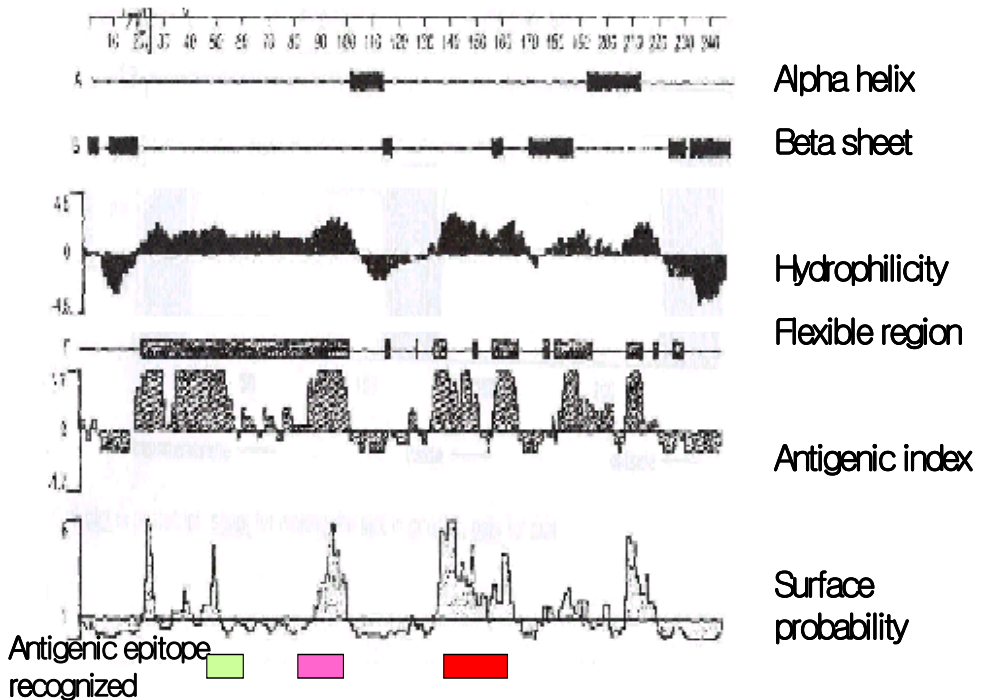


Figure 11. Antigen reaction analysis for animal prion protein using computer programs

나. 면역용 단백질 합성부위 및 항체작성: S1부위는 hypervariable region으로 소를 기본으로 합성하였으며, PS73와 PS142부분은 축종별로 동일한 부분으로 합성하여 PrP knockout 마우스에 부위별로 100 μ g/ml씩 접종하여 융합시 채혈하여 접종 전후로 비교하여 항체가 상승한 개체를 선발하여 융합시 이용하였다 (Table 12). PS73부위를 닭에 접종한 항혈청은 C73, S1부위를 닭에 접종한 항혈청은 CS1, 토끼 항혈청은 RS1이라 명하였고, 또한 PS142부위를 접종한 닭항혈청은 C142, 토끼 항혈청은 R142라 명하였다.

Table 12. Positions for peptide synthesis.

Species	Peptide ID	Amino acid sequence	Position	Conjugation	terminal modification
all	PS73	C-GGGWGQPHGGGWGQPH	73-88	KLH	C-terminal amidation
bovine	S1	C-THGQWNKPSKPKTNMKH	106-122	KLH	C-terminal amidation
all	PS142	C-IHFGNDYEDRYPENMHRYP	150-169	KLH	C-terminal amidation

다. 작성된 단클론항체의 특성 분석: 2종의 단클론항체는 R63, BL391로 상층액으로 생산되어 특이성을 조사하였다. 생산된 단클론항체는 isotyping 결과 모두 IgG계통의 kappa chain을 가지고 있었다. 작성된 두 항체는 재조합 PrP를 이용한 ELISA에서 모두 반응하였고, Peptide를 이용한 ELISA시 합성부위와 같은 아미노산 서열을 가지는 150-169에서 반응하였다. 그러나 R63항체 경우 225-245에서도 약하게 반응하여 150-169부위 이외에도 epitope이 있는 것으로 확인되었다 (Table 13). 생산된 단클론항체의 정

확한 항원결정기를 결정하기 위하여 sopt assay를 이용하여 반응시킨 결과 BL391은 IHFGND, R63은 NDYE로 확인되었다 (Figures 12, 13).

Table 13. Response of PrP antibodies to rec PrP ELISA and peptide ELISA

Monoclonal Antibody		R63	BL391
Isotype		IgG _{1,κ}	IgG _{1,κ}
Rec PrP ELISA	25-234	+	+
	25-217	++	++
	95-234	++	++
	25-181	++	++
Peptide ELISA	73-88	-	-
	106-122	-	-
	150-169	+	+
	225-245	±	-

* ±: 약양성, + : 양성 ++: 강양성, -:음성

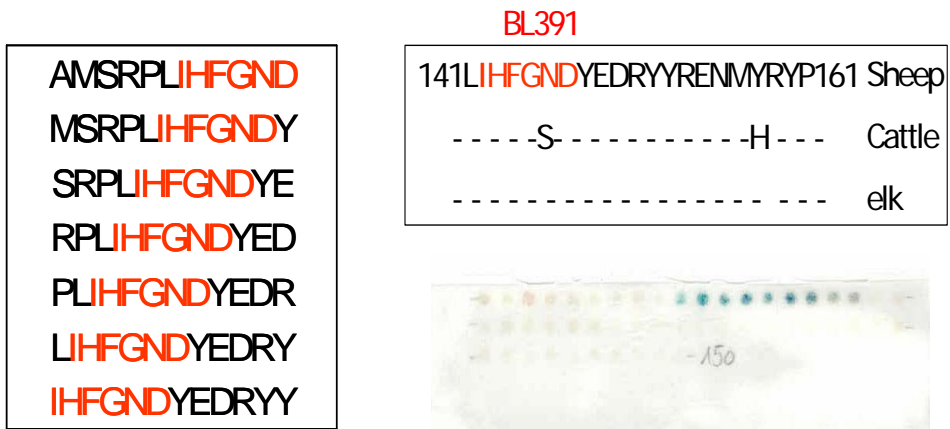


Figure 12. Epitope of BL391 using SPOT ASSAY

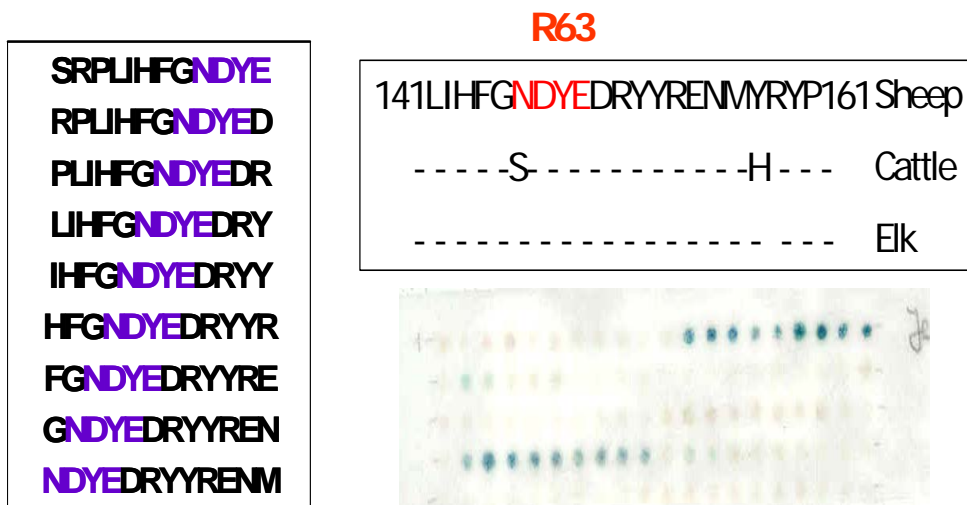


Figure 13. Epitope of R63 using SPOT ASSAY

monoclonal antibody (Mab)	Immunohistochemistry(IHC)					
	Cervine		Bovine		Hamster	
	PrP ^{CWD}	PrP ^C	PrP ^{BSE}	PrP ^C	PrP ^{263K}	PrP ^C
R63	+	-	+	-	+	-
BL391	+	-	+	-	-	-

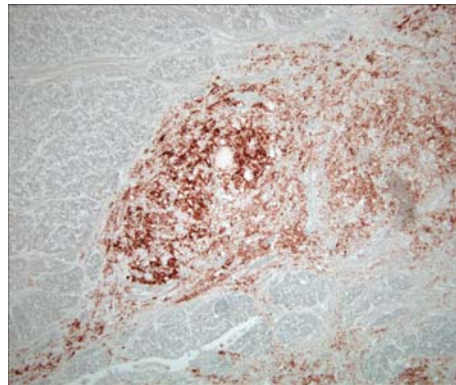
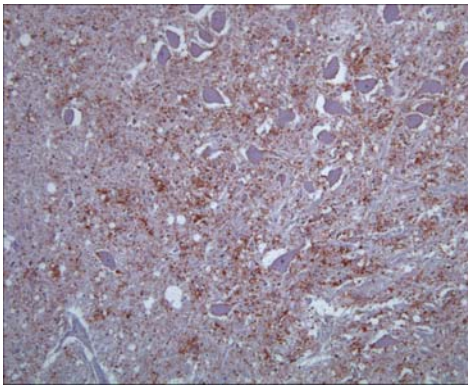


Figure 14. Immunohistochemical test for monoclonal antibody (BL391) with BSE-infected brain tissue.

monoclonal antibody (Mab)	Western blotting(WB)							
	Rec PrP		Cervine		Bovine		Hamster	
	bPrP	sPrP	PrP ^{CWD}	PrP ^C	PrP ^{BSE}	PrP ^C	PrP ^{263K}	PrP ^C
R63	+	+	+	-	+	-	+	-
BL391	+	+	+	-	+	-	-	-

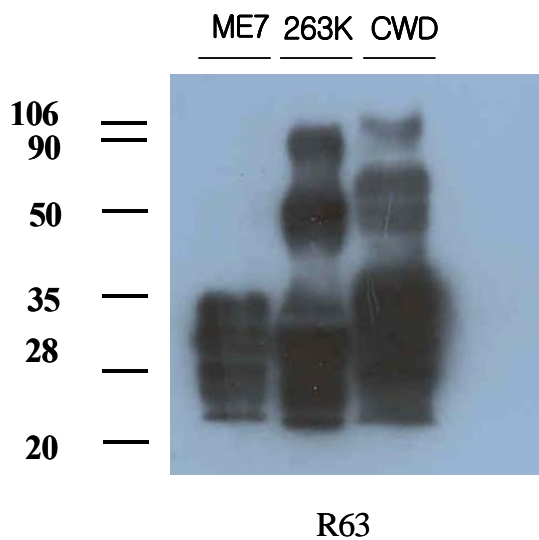


Figure 15. Western blotting for monoclonal antibody (R63) with BSE-infected brain tissue.

라. 프리온 단백질에 대한 단클론항체의 평가: R63의 반응성을 본 결과 CWD 및 BSE, hamster scrapie(263K) 감염 뇌조직의 신경세포 내 및 주변, 공포 주변에서 적색의 양성반응이 확인되었고 (Figure 14), Western blotting에서도 3개의 특이 밴드를 확인할 수 있었다 (Figure 15). 그러나 BL391의 경우 CWD 및 BSE감염 뇌조직에서만 반응성이 있고 hamster scrapie 감염 (263K) 뇌조직에서는 음성반응이 확인되어 scrapie 감염조직에는 반응성이 없는 항체로 확인되었다. 또 다른 정상프리온과의 반응성을 확인하기 위하여 면역침강법(IP)을 이용하여 선발된 2항체의 반응성을 확인하여 본 결과 BL391은 공시된 반추수 및 마우스에는 반응하였으나 R63은 소를 제외한 공시된 모든 시료에 반응하였다 (Figure 16). 변형 프리온과 선발된 2개의 단클론항체와의 반응성분석 결과 BL391의 경우 BSE 감염 뇌조직의 신경세포 내 및 주변, 공포주변에서 적색의 양성반응이 강하게 확인되었고, R63의 경우 CWD감염뇌조직을 이용한 Western blotting에서 3개의 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Figures 17, 18).

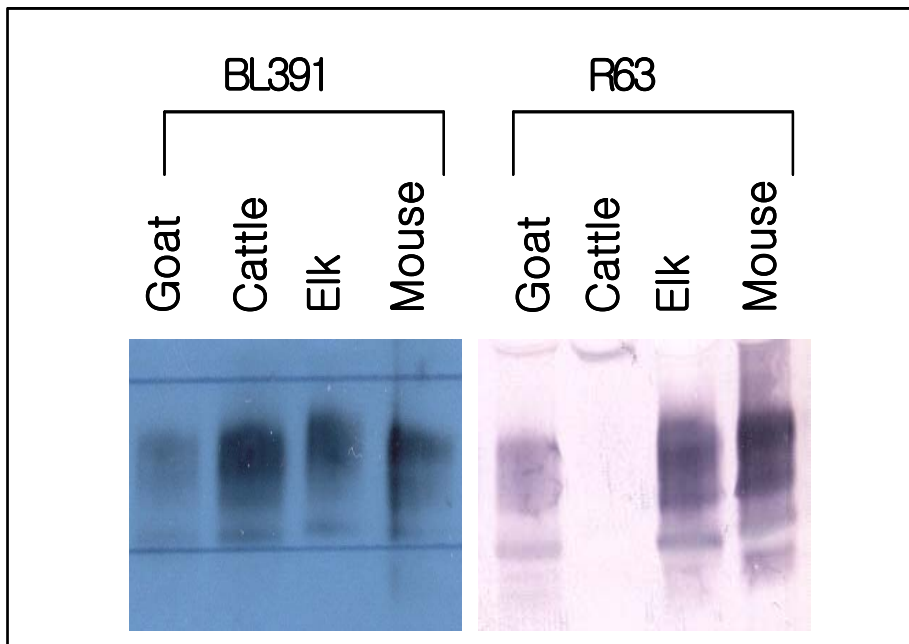


Figure 16. Response of antibodies to normal prion protein using IP

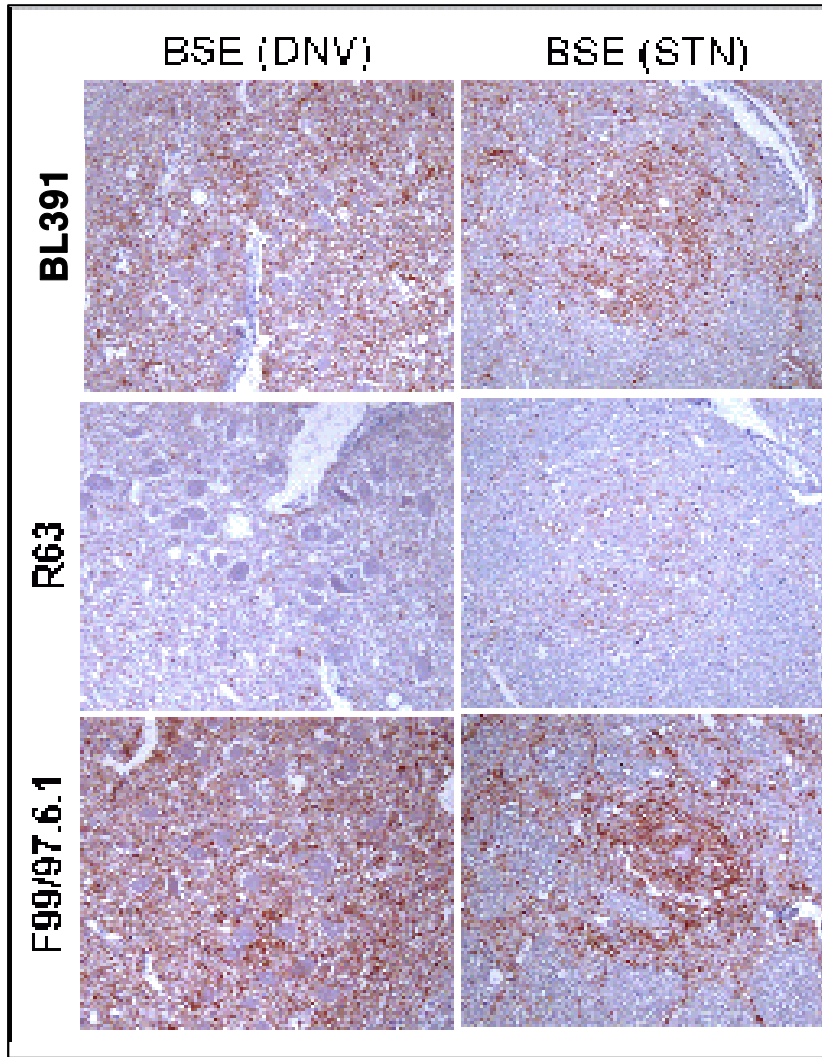


Figure 17. Response of antibodies by immunohistochemical methods.

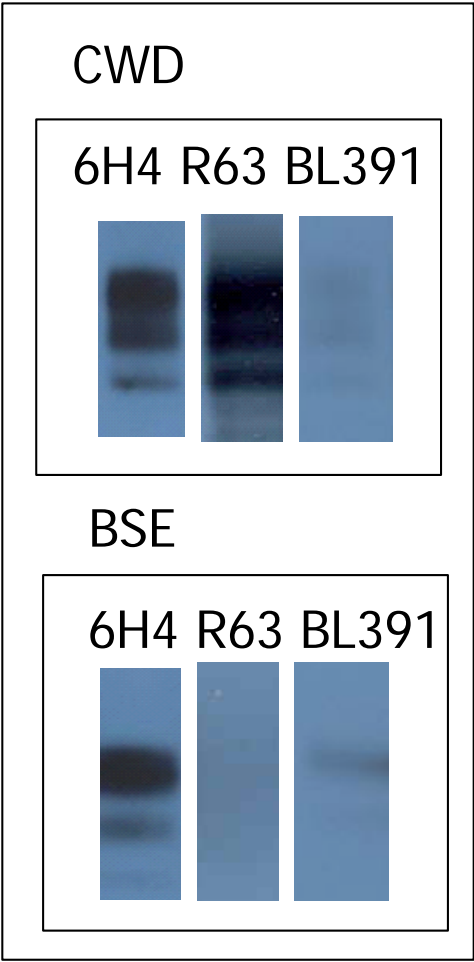


Figure 18. Response of antibodies by immunoblotting methods.

마. 프리온 단백질에 대한 특이 peptide 합성 및 면역유도: 면역을 위해 합성된 펩타이드는 다음의 Table 14와 같으며 토끼 및 닭에 접종하였다. PS73부위를 닭에 접종한 항혈청은 C73, S1부위를 닭에 접종한 항혈청은 CS1, 토끼 항혈청은 RS1이라 명하여고, 또한 PS142부위를 접종한 닭항혈청은 C142, 토끼 항혈청은 R142라 명하였다.

Table 14. Position for peptide synthesis.

peptide ID	amino acid sequence	position	conjugation
PS73	C-GGGWGQPHGGGWGQPH	73-88	KLH
S1	C-THGQWNKPSKPKTNMKH	106-122	KLH
PS142	C-IHFGNDYEDRYPENMHRYP	150-169	KLH

바. 토끼 및 닭의 항혈청내의 항체역가 조사: 토끼 및 닭에 접종후 항체형성여부를 확인하기 위하여 접종전 및 각 boosting 후 7일에 토끼의 귀정맥과 닭의 경정맥을 통해 혈액을 일부 채취하였다. 채취한 혈액은 재조합 소프리온 단백질을 항원으로하여 sandwich ELISA를 실시하였고 접종한 모든 개체에서 항체가 상승됨을 확인하였으며 또한 정상프리온 단백질에도 반응됨을 동시에 확인하였다 (Figure 19).

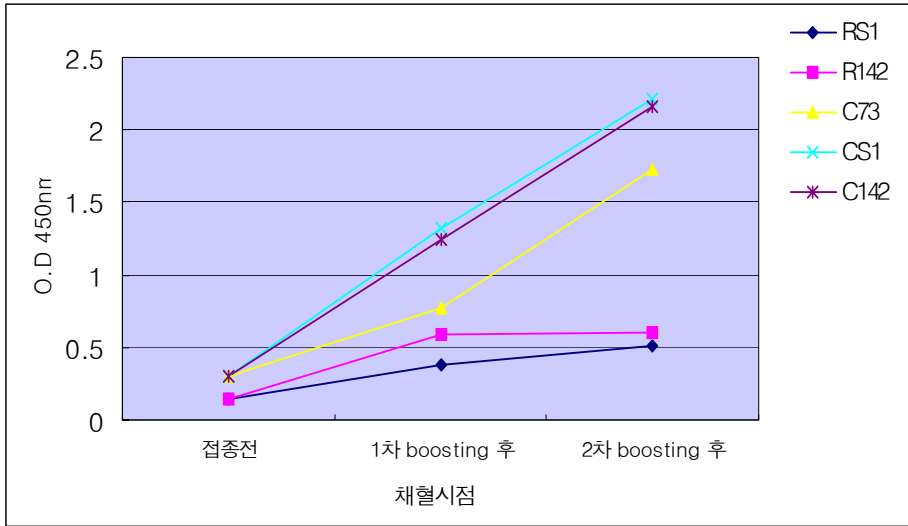
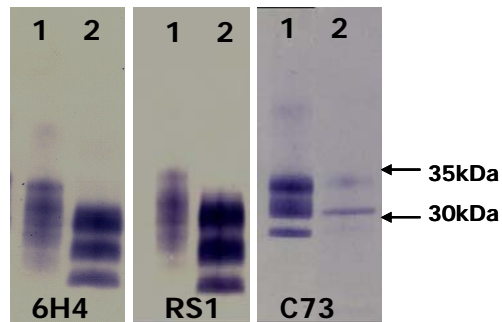


Figure 19. Antibody values for immune serum of rabbit and chicken.

사. 생산된 항혈청의 소해면상뇌증 프리온 단백질(PrP^{BSE})에 대한 반응성 조사: ELISA를 통해 정상프리온단백질에 반응함을 확인한 토끼 및 닭 항혈청이 변형프리온단백질인 소해면상뇌증 프리온단백질(PrP^{BSE})에 반응하는지 여부를 확인하기 위하여 웨스턴블로팅법을 통하여 BSE에 감염된 소의 뇌조직과 반응시켰다. 그 결과 닭항혈청인 C73, CS1, C142는 모두 변형프리온단백질에 대해 기존의 단클론항체 6H4(Prionics)와 같이 양성반응을 보임을 확인하였으며 그 중 C73은 절단된 변형프리온단백질($\text{PrP}^{27-30\text{KDa}}$)에는 반응하지 않았고, full-length의 변형프리온 단백질($\text{PrP}^{33-35\text{KDa}}$)에만 반응함을 확인하였다 (Figure 20). 또한 토끼에서 생산한 항혈청의 경우 RS1은 양성반응을 보였으나 R142는 소해면상뇌증프리온단백질(PrP^{BSE})과 반응하지 않았다.

<A>



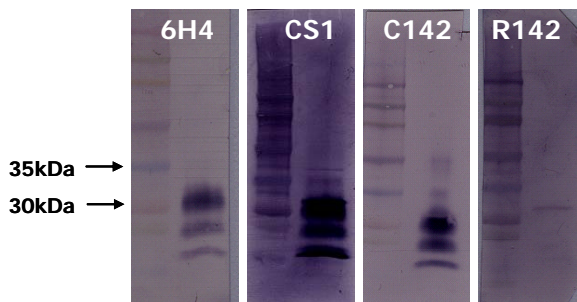


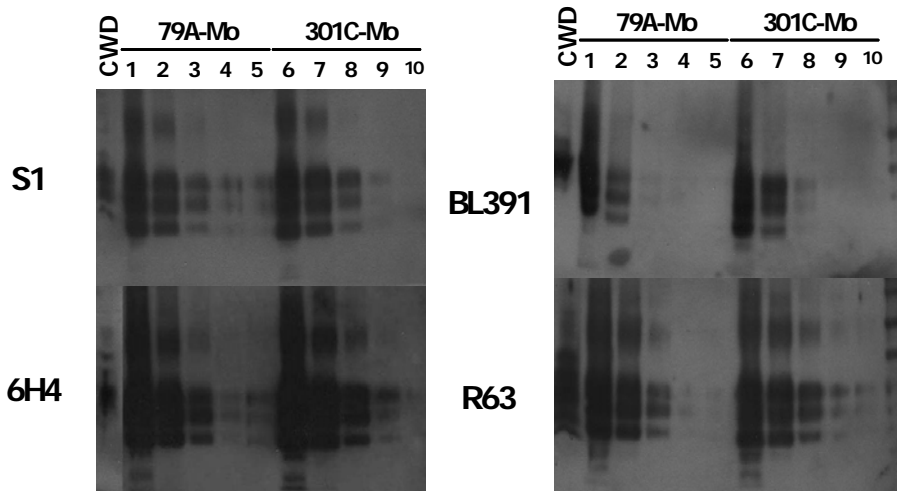
Figure 20. Response of immune serum to PrP^{BSE} using western blotting.

<A> Lane1: full-length 의 변형프리온 단백질(PrP33-35KDa)

Lane2 :절단된 변형프리온단백질(PrP27-30KDa)

 절단된 변형프리온단백질(PrP27-30KDa)

아. 마우스 순화 변형프리온을 이용하여 생산된 항체의 민감도를 분석한 결과 다클론항체로 생산된 S1은 6H4와 비슷한 민감도를 나타냄을 확인하였고 단 클론항체로 생산된 BL391은 민감도는 저하되나 R63은 비슷한 민감도를 나타내었다 (Figure 21).



1. CWD: PMCA sample(1mg/lane), 79A: Scrapie adapted mouse PrP^{Sc}, 301C: BSE adapted mouse PrP^{Sc}.
2. The mouse brain equivalent loads were 1mg(lane1 and 6), 200µg(lane2 and 7), 40µg(lane3 and 8) , 8µg(lane4 and 9), 200µg(lane5 and 10).
3. Final working concentration of each antibody was 0.2 µg/ml.

Figure 21. Sensitivity analysis for antibodies using PrP^{Sc}.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발목표의 달성도

1. 평가의 착안점 및 목표달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도(점수)	목표 달성도
1차년도 (2004)	○한우의 PRNP 유전자에서 SNP 발굴	30	100%
	○peptide 이용한 PrP knockout mouse, BALB/c mouse 및 토끼내에서 면역원성 조사 및 단클론항체 생산	30	100%
	○정상 한국인과 CJD 환자에 대한 SNP의 유전자형분석	40	100%
2차년도 (2005)	○한우와 홀스테인의 SNP유전분석	20	100%
	○세포수준에서 표적 유전자의 기능 및 발현변화 표적 유전자 확인	20	100%
	○특이 peptide이용 다클론항체 생산	30	100%
	○ 정상인과 CJD 환자에 대한 유전자형분석	30	100%
3차년도 (2006)	○프리온 결손 신경 세포주 개발 성공여부	20	100%
	○개발된 특이항체의 특성규명 및 BSE 프리온 단백질과의 반응성 분석	20	100%
	○ 정상인과 CJD 환자의 비교	30	100%
	○소의 유전체에서 한국인 CJD 환자에 특이적으로 나타난 관련유전좌위와 호몰로그 및 한우의 SNP분석	30	100%
최종평가	○소해면상뇌증의 진단표적물질의 발굴	20	100%
	○국내에 발견된 CJD 환자의 유전적 특성의 규명	20	100%
	○한우의 유전적 특성(SNP)의 규명	30	100%
	○연구결과에 의한 게재 학술지의 등급	30	100%

2. 1차년도 (2004-2005) 목표달성도

가. 세부연구목표: 한우와 홀스테인의 SNP분석

평가의 착안점: 한우의 PRNP유전자에 대한 SNP발굴 (100%)

본 연구과제는 한우의 PRNP유전자에 대한 SNP발굴 연구에 중점을 두어 연구한 결과 실험연구와 자료분석을 마무리함으로써 1차년도 연구의 가장 중요한 연구목표인 한우의 PRNP유전자에 대한 SNP발굴은 목표를 달성하였다.

나. 세부연구목표: CJD 환자에 대한 SNP에 대한 분석

평가의 착안점: CJD 환자에 대한 SNP와 STR 등의 유전좌위에 대한 분석 (100%)

CJD 환자에 대한 SNP와 STR 등의 유전좌위에 대한 분석의 경우는 예비결과까지 모두 완료함으로써 목표를 달성하였다.

다. 세부연구목표: 프리온 결손 신경 세포주 개발

평가의 착안점: 프리온단백이 결손된 실험동물 확보 (100%)

프리온 결손 신경 세포주를 개발하기 위하여 프리온단백이 결손된 마우스를 확보하여 연구목표를 달성하였다.

라. 세부연구목표: peptide 이용한 단클론항체 생산

평가의 착안점: peptide 이용한 단클론항체 생산 (100%)

항체제작을 위한 전염성해면상뇌증의 prion(PrP) epitope부위 선별 하여 면역용 펩타이드 합성하여 PrP knockout mouse에서 2종의 단클론항체 생산하였다.

3. 2차년도 (2005-2006) 목표달성도

가. 세부연구목표: 한우와 홀스테인의 SNP분석

평가의 착안점: 한우와 홀스테인의 SNP유전분석 (100%)

본 연구과제는 한우의 프리온단백유전자에 대한 스크리닝 연구에 중점을 두어 연구한 결과 한우와 홀스테인의 3개의 sequence variants의 유전자형에 대한 2차년도의 실험연구와 자료분석을 완료함으로써 가장 중요한 연구목표인 한우와 홀스테인의 SNP유전분석은 목표를 달성하였다.

나. 세부연구목표: 프리온 단백질이 결손된 신경 세포를 분리

평가의 착안점: 세포수준에서 표적 유전자의 기능 및 발현변화 표적 유전자 확인 (100%)

프리온질환에 영향을 미치는 유전자를 찾기 위해 병에 노출된 개체에 대한 유전자 발현변화연구를 진행하여 목표를 달성하였고, 이로부터 PRND유전자를 찾는데 성공하였다.

다. 세부연구목표: 다클론항체 생산

평가의 착안점: 특이 peptide이용 다클론항체 생산 (100%)

프리온 단백질에 대한 특이 peptide 합성 및 면역을 유도하고, 토끼 및 닭의 항혈청내의 항체역가를 조사하고, 생산된 항혈청의 소해면상뇌증 프리온 단백질 (PrP^{BSE})에 대한 반응성을 조사함으로써, PrP^{BSE} 를 검출가능한 4종의 다클론항체를 생산하였으므로 100%목표를 달성하였다.

라. 세부연구목표: 정상인과 CJD 환자에 대한 변이의 비교분석

평가의 착안점: 정상인과 CJD 환자에 대한 유전자형분석 (100%)

발현변화로부터 찾아낸 PRND유전자의 염기서열변이의 유전자형을 분석함으로써 목표를 100%달성하였고, 이들 염기서열변이에서 110명의 크로이츠펠트제이콥병 환자의 PRND 유전자의 유전자형을 정상인과 비교연구결과 PRND유전자의 염기서열변이가 크로이츠펠트제이콥병에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

4. 3차년도 (2006-2007) 목표달성도

가. 세부연구목표: 프리온 단백질 결손된 신경 세포주 개발

평가의 착안점: 프리온 결손 신경 세포주 개발 성공여부 (100%)

프리온 단백질 결손된 마우스의 해마를 분리하고, 이로부터 신경세포의 분리를 수행하여 프리온 결손 신경 세포주 개발에 성공함으로써 목표를 달성하였다.

나. 세부연구목표: BSE 프리온 단백질의 항체검증

평가의 착안점: 개발된 특이항체의 특성규명 및 BSE 프리온 단백질과의 반응성 분석 (100%)

개발된 특이항체의 특성을 규명하고 ELISA를 통해 정상프리온단백질에 반응함을 확인한 토끼 및 닭 항혈청이 변형프리온단백질인 소해면상뇌증 프리온단백질(PrP^{BSE})에 반응하는지를 확인하기 위하여 웨스턴블로팅법을 통하여 BSE에 감염된 소의 뇌조직과 반응성을 보았고, 마우스 순화 변형프리온을 이용하여 생산된 단클론항체와 다클론항체의 민감도를 분석함으로써 목표를 달성하였다.

다. 세부연구목표: CJD 환자에 대한 SNP에 대한 분석

평가의 착안점: 정상인과 CJD 환자의 비교 (100%)

PRND유전자의 염기서열변이에서 110명의 크로이츠펠트제이콥병 환자의 PRND 유전자의 유전자형을 정상인과 비교연구를 함으로써 목표를 달성하였고, 연구결과 PRND유전자의 염기서열변이가 크로이츠펠트제이콥병에 영향을 미치는 것으로 나타나는 것을 밝혔다.

라. 세부연구목표: 소의 유전체에서 한국인 CJD 환자에 특이적으로 나타난 관련 유전좌위와의 비교연구

평가의 착안점: 소의 유전체에서 한국인 CJD 환자에 특이적으로 나타난 관련유전좌위와 호몰로그 및 한우의 SNP분석 (100%)

한국인 CJD 환자에 특이적으로 나타난 관련유전좌위와 transcription factor binding좌위를 소를 포함한 50여종의 동물들의 유전체와 비교연구를 수행함으로써 목표를 달성하였다.

제2절 관련분야에의 기여도

1. 한우와 홀스테인의 단염기변이 (SNP) 분석

가. 한우의 소화면상뇌증에 대한 유전적인 요소의 예측을 가능하게 하여 프리온질환에 대처할 수 있는 기초를 마련하였다.

나. 한우의 프리온단백 유전자에서 발굴된 단염기변이는 한우에서만뿐만 아니라, 국내에서는 처음으로 인텐시브하게 얻은 프리온단백 유전자의 결과물이므로 의의가 크다.

다. 더 나아가 한우에서의 유전적 특성(genetic characteristics)연구가 전국적으로 분포된 한우들을 대상으로 연구함에 따라 본 연구결과는 한국에서 기르는 한우들의 대표성을 충분히 반영하여 유전적 특성연구의 연구결과의 신뢰도를 높인 것으로 사료된다.

라. 한우와 홀스테인의 단염기변이분석을 통해 소화면상뇌증가 많이 나타나고 있는 홀스테인과 전혀 연구가 안 되어있는 한우를 대상으로 각각의 유전적 특성과 이들을 비교함으로써 국내 육우와 유우의 프리온질환에 대처할 수 있

는 유전학 연구의 기초를 마련하였다.

마. 프리온단백 유전자의 구조 및 서열을 53종의 척추동물을 대상으로 비교하여 본 연구결과로부터 프리온단백 유전자의 소해면상뇌증에의 유전적인 효과의 가능성을 확인할 수 있는 가능성을 보여주었다.

2. 크로이츠펠트제이콥병의 SNP에 대한 분석

가. 본 연구과제로부터 PRND유전자의 크로이츠펠트제이콥병(CJD)의 유전적인 효과(genetic effects)를 밝힘에 따라 크로이츠펠트제이콥병의 유전역학(genetic epidemiology) 연구에 기여하였으며, 이들의 결과가 검증과정을 거쳐 적용될 것으로 기대한다.

나. 본 연구과제는 정상한국인과 한국인 크로이츠펠트제이콥병 환자에 대한 단염기변이의 분석을 수행하였으므로, 한국인의 유전자 특성에 따른 발생 가능성을 예측할 수 있다.

3. 프리온 결손 신경 세포주 개발

가. 본 연구과제에서는 소해면상뇌증을 포함한 프리온 질환(prion disease)의 유발에 있어서 없어서는 안되는 프리온 단백질(prion protein)의 정상 기능을 밝히기 위해 순수하게 프리온 단백질만 결손된 신경 세포주를 개발함으로써 앞으로 프리온 질환의 병인과 신경 세포 소실기전을 밝히는데 중요한 기초를 제공하였다.

나. 개발된 신경 세포주는 프리온 병원체의 기초연구뿐만 아니라 진단 및 치료제를 개발하기 위한 연구의 기초자료를 마련하는데 있어서 중요한 도구를 제공함으로써 프리온 질환의 연구분야에 기여하였다.

4. 단클론항체 및 다클론항체의 생산

가. 현재까지 한국에서 프리온 질환 진단방법에 어려움이 제기되는 가운데 감염성 프리온 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체(monoclonal antibody) 및 다클론항체(polyclonal antibody)를 펩타이드(peptide)를 이용하여 생산함으로써 감염성 프리온 단백을 정확하고 민감하게 검출할 수 있는 기틀을 마련했다.

나. 개발된 특이항체의 특성규명 및 소해면상뇌증을 일으키는 프리온 단백질과의 반응성으로 판단해 볼 때, 앞으로는 항체를 외국에서 수입해야 하는 경제적인 부담을 덜 수 있을 뿐만 아니라 독자적인 검출기준을 확립하는데 기여하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 추가연구의 필요성

1. 한우와 홀스테인의 단염기변이 (SNP) 분석

가. 본 연구과제는 소해면상뇌증에 대한 가장 중요할 가능성이 있는 유전자들을 선별하여 한우의 소해면상뇌증에의 노출가능성을 연구하였다. 그러나 소해면상뇌증은 퇴행성신경질환으로서 멘델리안 형식으로 유전되는 질병이라기보다는 복잡형질에 가까울 것으로 사료된다. 따라서, 앞으로 소해면상뇌증에 대한 다른 유전자들의 연구가 필요하다.

나. 또한 본 연구과제에서와 마찬가지로 중요할 가능성이 있는 유전자들을 선별하여 연구하는 것 뿐만 아니라 좀 더 광범위한 유전자의 연구가 요구된다. 더 나아가 최근에 유전자 칩을 이용한 범유전체의 연구가 요구된다.

다. 소해면상뇌증은 위에서 언급한 것처럼 복잡형질이므로 밝혀진 유전효과에 대한 기능연구와 이들 유전효과의 합리적인 추정에 대한 연구가 필요하다. 이들은 여러집단에 대해서 연구가 이루어져야하고 다른 영향을 통계유전분석 모형에서 얼마나 어떻게 합리적으로 연구하는가에 따라 유전효과의 합리적인 추정치를 얻을 수 있다.

2. 크로이츠펠트제이콥병의 SNP에 대한 분석

가. 본 연구과제는 크로이츠펠트제이콥병에 대한 가장 중요할 가능성이 있는 유전자들을 선별하여 이들 질병에의 영향을 알아보고 한국인의 이들 질병에의 노출가능성을 연구하였다. 그러나 이 질환 역시 멘델리안 형식으로 유전되는 질병이라기보다는 복잡형질에 가까울 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구로부터 크로이츠펠트제이콥병의 유전적인 효과가 밝혀진 PRND유전자 뿐만 아니라 앞으로 다른 유전자들에 대한 연구가 요구되고, 크로이츠펠트제이콥병에 대한 좀 더 광범위한 유전자의 연구는 현재 상용화되고 있는 유전자 칩을 이용한 범유전체의 연구까지도 요구된다.

나. 본 연구로부터 정상한국인과 한국인 크로이츠펠트제이콥병 환자에 대한 단염기변이의 분석을 수행하였으므로, 한국인의 유전자 특성에 따른 발생 가능성을 예측할 수 있다. 그러나 앞으로 크로이츠펠트제이콥병에 대한 다른 유전자들에 대한 연구, 더 나아가 범유전체의 연구를 하기 위해서는 상당한 수의 크로이츠펠트제이콥병 환자의 샘플을 수집하는 체계화된 연구프로젝트가 절실하다.

3. 프리온 결손 신경 세포주 개발

가. 본 연구로부터 순수하게 프리온 단백질만 결손된 신경 세포주를 개발함으로써 소해면상뇌증을 포함한 프리온 질환의 유발에 있어서 없어서는 안되는 프리온 단백질의 정상 기능을 밝히기 위한 프리온 질환의 병인과 신경 세포 소실기전을 밝히는 연구들의 수행이 필요하다.

나. 더 나아가서 이들 개발된 신경 세포주를 이용하여 진단 및 치료제를 개발하기 위한 연구가 절실하다.

4. 단클론항체 및 다클론항체의 생산

가. 감염성 프리온 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체 및 다클론항체를 펩타이드 (peptide)를 이용하여 생산함으로써 감염성 프리온 단백을 정확하고 민감하게 검출할 수 있는 기틀을 마련하였지만 감염성 프리온 단백을 보다 민감하게 검출할 수 있는 단클론항체 및 다클론항체를 개발하여 소량의 감염성 프리온 단백을 검출할 수 있는 기법을 고안하는 과제는 프리온 질환의 조기 진단 및 확진에 도움이 될 수 있다는 점에서 필요하다.

나. 또한 현재 상용화되거나 이미 알려진 진단 표지인자 (예; 14-3-3단백, S100 β , Heat Shock 60등) 에 대한 항체개발과 새로 개발된 진단 표지인자를 첨가하여 조기진단방법 개발이 이루어질 수 있는 연구가 필요하다.

다. 최근 비정형 소해면상뇌증(BSE)의 발생보고에 따라 비정형 소해면상뇌증시료에 대한 BL391의 반응성 확인이 필요하다.

라. BSE가 실험감염 된 엘크시료를 이용한 국내 개발 항체(R63)의 종 특이성 및 반응성 확인이 필요하다.

제2절 타연구에의 응용

1. 한우와 홀스테인의 단염기변이 (SNP) 분석

가. 본 연구는 한우의 연구에 초점을 맞추어 소해면상뇌증의 유전효과와 한우의 소해면상뇌증의에의 노출가능성을 연구하였다. 이들 연구결과는 한우의 다른 유전자들을 연구하여 이들과의 유전상호작용 및 총체적인 유전효과를 보는데 중요한 자료로 응용될 것으로 사료된다. 더 나아가, 프리온질환으로 알려진 병들에 노출되어 있는 다른 종들의 유전학연구에도 응용되어 영향을 미칠 것으로 사료된다.

나. 더 나아가, 프리온질환으로 알려진 병들에 노출되어 있는 다른 종들의 유전학연구에도 응용될 것으로 사료된다. 프리온질환에 노출되어 있지 않은 종들과의 비교연구에의 응용도 예상된다.

2. 크로이츠펠트제이콥병의 SNP에 대한 분석

가. 본 연구과제로부터 크로이츠펠트제이콥병에 대한 가장 중요할 가능성이 있는 유전자들을 선별하여 크로이츠펠트제이콥병에의 영향을 알아보고 한국인의 크로이츠펠트제이콥병에의 노출가능성을 연구하여 PRND유전자의 크로이츠펠트제이콥병의 유전적인 효과를 밝힘에 따라 크로이츠펠트제이콥병의 다른 유전자들을 연구하는데 응용될 것으로 사료된다. 특히, 다른 유전자들과의 유전상호작용 및 총체적인 유전효과를 보는데 중요한 자료로 응용될 것으로 사료된다.

나. 크로이츠펠트제이콥병의 유전연구결과 역시 프리온질환으로 알려진 병들에 노출되어 있는 다른 종들의 유전학연구와 프리온질환에 노출되어 있지 않은 종들과의 비교연구에 응용될 것이다.

3. 프리온 결손 신경 세포주 개발

가. 소해면상뇌증을 포함한 프리온 질환의 유발에 있어서 없어서는 안되는 프리온 단백질의 정상 기능을 밝히기 위해 본 연구과제에서는 순수하게 프리온 단백질만 결손된 신경 세포주를 개발함으로써 앞으로 수행되는 프리온 질환의 병

인과 신경 세포 소실기전을 밝히는 연구에 프리온 단백질만 걸손된 신경 세포 주의 응용이 많을 것으로 예상된다.

나. 또한 본 연구과제에서 개발된 신경 세포주는 프리온 병원체의 진단 및 치료제를 개발하기 위한 연구의 기초자료를 마련하는 연구에 응용될 것으로 사료된다.

4. 단클론항체 및 다클론항체의 생산

가. 프리온 질환 진단방법에서의 어려움은 감염성 프리온 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체 및 다클론항체의 생산을 요구하는데 감염성 프리온 단백을 보다 더 정확하고 민감하게 검출할 수 있는 기틀을 마련하기 위한 연구의 한 가지 방법으로써, 현재 상용화되거나 이미 알려진 진단 표지인자인 14-3-3단백, S100 β , Heat Shock 60 등에 대한 항체개발과 새로 개발된 진단 표지인자를 첨가하여 조기진단방법을 개발함에 있어 개발된 단클론항체 및 다클론항체의 응용이 예상된다.

나. 또한 개발된 특이항체의 특성규명 및 소해면상뇌증을 일으키는 프리온 단백질과의 반응성연구에의 응용도 예상된다.

다. 종 특이 항체의 개발이 확인되면 특이 epitope를 이용하여 민감도 높은 진단법에 적용이 가능하다.

라. 더 나아가 발병 전 진단 방법이 확립되면, 앞으로 치료방법이 개발될 경우 빠른 단계에서 치료가 가능하다.

마. 종 특이 항체를 이용한 감별진단 키트 개발의 연구에의 응용이 예상된다.

제3절 산업화 가능성 및 추진방안

1. 산업화 가능성

가. 본 소해면상뇌증 연구는 이 질환의 시급한 병원체의 연구와 치료제 및 진단 기술 개발의 기초연구로서 현재의 연구결과가 당장 산업화되어 있지는 않다. 한우의 소해면상뇌증에 대한 유전적 특성과 한국인의 크로이츠펠트제이콥병에 대한 유전적 특성이 보다 체계화되어 활용될 수 있고, 생산된 항체의 산

업화가 가능할 것으로 사료된다. 본 연구과제로부터 나온 연구결과로부터의 산업화가능성을 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

- 나. 한우의 소해면상뇌증에 대한 유전적인 요소의 예측을 가능하게 하여 프리온질환을 예측하는 것은 현재 본 연구결과만으로는 산업화의 가능성이 낮지만 앞으로 좀 더 광범위한 유전자의 연구나 더 나아가 범유전체의 연구로부터 결과들이 나온다면 앞으로 이들 결과를 기초로 만들어질 소해면상뇌증의 유전적 위험성을 예측할 유전자 칩의 산업화가 가능하다.
- 다. 현재 본 연구결과만으로는 크로이츠펠트제이콥병에 대한 PRND유전자로부터 예측하는 것은 산업화의 가능성이 낮지만 앞으로 좀 더 광범위한 유전자의 연구나 더 나아가 범유전체의 연구로부터 결과들이 나온다면 앞으로 이들 결과를 기초로 만들어질 크로이츠펠트제이콥병의 유전적 위험성을 예측할 유전자 칩의 산업화가 가능하다. 크로이츠펠트제이콥병은 소해면상뇌증 오염국에서 수입된 소나 그 생산품 또는 부산물에 의해 사람이 소해면상뇌증 병원체에 폭로될 가능성이 있기때문에 앞으로 크로이츠펠트제이콥병의 발생이 광범위한 지역에서 일어날 가능성을 고려할 때 크로이츠펠트제이콥병의 유전적 위험성을 예측할 수 있는 유전자 칩의 산업화의 가능성은 높다.
- 라. 통계분석을 통해 얻은 분석 자료는 산업화의 가능성은 낮지만, 역학적인 기초 자료로 활용이 가능하여, 사람에게 발생 가능한 크로이츠펠트제이콥병 관련 질환들의 질병 관리 대책에 유익한 자료로 활용가능성이 높다.
- 마. 본 연구과제는 프리온 질환의 진단과 치료제 개발의 기초단계의 연구이지만 본 연구를 기반으로 한 연구들이 궁극적으로 수행된다면 프리온 질환 및 여러 퇴행성 신경질환들에 대한 새로운 임상 치료제의 개발과 국제적인 특허를 통한 소유권의 창출 및 고감도 진단 기술을 확보할 수 있어 앞으로 국내외에서 사람 및 가축에서 발생할 수 있는 프리온 질환의 조기 진단에 크게 기여할 것으로 기대된다. 동시에 발병 전 진단 방법이 확립되면, 앞으로 치료방법이 개발될 경우 빠른 단계에서 치료를 위한 산업화가 가능하다. 또한 다른 퇴행성 신경질환의 발병기전 연구에의 활용, 선진 연구기술의 확보 및 생명과학 분야(BT)의 활성화, 치료 약물개발 및 그 약물의 전달체계에 활용이 기대되고 생물공학산업의 발전에의 기여가 예상된다. 궁극적으로 치료제의 개발 및 정확한 진단을 통하여 인류의 삶의 질 향상 및 건강 복지 증진에 크게 기여함과 동시에 질환 진단 및 치료에 소요되는 막대한 의료비용의 감소라는

경제적 파급효과를 가져올 수 있다.

2. 산업화 추진방안

- 가. 국제공동연구를 통하여 국내에 소유하고 있지 않은 감수성개체의 변형프리온 감염조직에 본 과제에서 생산된 항체를 적용하여 진단항체로서의 공식적인 가치평가가 추진될 계획이며, 이는 진단항체의 국산화추진 예산절감 효과에의 기여가 예상된다.
- 나. 개발된 특이항체의 특성규명 및 소해면상뇌증을 일으키는 프리온 단백질과의 반응성으로 판단해 볼 때, 보다 더 민감하게 반응하는 항체를 개발하여 극소량의 감염성 프리온 단백을 검출할 수 있는 기법을 고안함으로써 프리온 질환의 조기 진단 및 확진에 도움이 될 수 있는 방법으로 알려진 진단 표지인자에 대한 항체개발과 새로운 진단 표지인자를 첨가하여 조기진단방법의 산업화를 추진하는 것이 국제경쟁력을 위해서는 더 바람직한 추진방안이다.

제4절 논문발표

1. 연구논문의 발표

본 소해면상뇌증 연구로부터 이 질환의 중요한 연구결과들이 나왔고, 이들은 학술지에 3편이 출판된 상태이고 2편이 더 출판될 것으로 사료된다. 이들 연구논문들이 실리거나 실릴 예정인 학술지들은 모두 SCI의 목록에 포함된 국제학술지다.

2. 연구논문 목록

- 가. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) and Holstein cattle. (Genes Genet Syst. 2005 80:303-308, 게재)

- 나. Polymorphism at 3' UTR +28 of the prion-like protein gene is associated with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. (Eur J Hum Genet. 2005 13:1094-1097, 게재)
- 다. Genotype distribution of the prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms in Korean cattle. (Gene 2007 49 1539-1544, 게재)
- 라. In silico comparative analysis of DNA and amino acid sequences for prion protein gene (게재 예정)
- 마. A National Survey on the Frequency Distribution of *PRNP* Indel Polymorphisms in Korean Cattle and Their Potential Susceptibility to Bovine Spongiform Encephalopathy (게재 예정)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제1절 소해면상뇌증의 해외과학기술동향

인간에 대한 전염가능성으로 인간에게 공포심을 자아내고 있는 소해면상뇌증은 비정상적인 형태의 프리온단백에 의해 뇌, 특히 피질(cortex) 및 소뇌(cerebellum)부위가 스폰지와 같은 형태로 변형되는 만성신경성 질병으로써 특정한 증상이 나타나지 않는 2-5년의 긴 잠복기간을 거쳐 발병하여 보행장애, 진신마비 등의 임상적인 증상을 보이다가 결국은 사망에 이르는 치명적인 결과를 가져옴으로써 앞에서 언급한 것처럼 소해면상뇌증의 조기발견방법 및 치료방법개발이 현재 생명과학자과 의학자들에게 있어서 관심을 끌고 있다.

지금까지 소해면상뇌증은 양에서의 스크래피(scrapie), 사슴에서의 CWD(chronic wasting disease), 멧크에서의 TME(transmissible mink encephalopathy) 등과 마찬가지로 비정상적인 형태의 프리온단백에 의해 발생하는 프리온질환 중의 하나이다. 일반적으로 프리온질환은 동종 뿐만 아니라 다른 종 사이에서도 전염성이 있으며 그 증상으로 스폰지와 같은 형태의 뇌조직을 가지고 있기때문에 TSE(transmissible spongiform encephalopathies)로도 알려져 있으며 (Bruce et al., 1997) 특히 인간에게 발생하는 프리온질환에는 자연적으로 발병하는 크로이츠펠트제이콥병 및 유전성인 GSS (Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome), FFI(fetal familial insomnia)등과 감염(infection)등을 통해 후천적으로 발병하는 Kuru, vCJD(variant Creutzfeldt-Jacob disease) 등이 있다.

1984년 Prusiner박사에 의해 처음으로 프리온이 소의 소해면상뇌증, 양의 스크래피, 인간의 크로이츠펠트제이콥병 등의 질병원인단백질이 처음으로 프리온이라는 사실이 밝혀짐으로써 DNA나 RNA가 아닌 단백질자체가 감염성질환을 야기시키는 능력을 가질 수 있다는 사실을 입증하였다 (Prusiner, 1991). 일반적으로 정상적인 형태의 프리온 "PrP^c"는 GIP(glycoinositol phospholipid)가 anchor

된 막단백질로서 신경세포(neuron)표면에 존재하며 synaptic function에 관련되는 것으로 알려져 있고 또 "PrP^C"가 "PrP^{Sc}"로 구조적변형(conformational change)을 일으킨 프리온은 아직 규명되지 않은 기작에 의해 "PrP^{Sc}"가 지속적으로 "PrP^C"를 자신과 같은 병변(pathogenic)단백질로 전환 및 뇌에 축적된 결과로 뇌세포가 파열되어 뇌가 스폰지와 같은 형태를 갖게 된다는 것이다 (Prusiner, 1994; 1998).

약 백만명 중 한명꼴로 대부분 노년층에서 발병하는 것으로 알려진 크로이츠펔트제이콥병이 1996년에 영국에서 11명의 청소년들이 변형된 크로이츠펔트제이콥병인 "vCJD (variant Creutzfeldt-Jacob disease)" 에 의해 사망한 것이 보도된 이래 이에 따른 원인규명연구를 통하여 광우병의 인간으로 전염가능성을 밝힘으로써 소해면상뇌증에 대한 경각심과 함께 그와 관련연구가 진행되고 있다 (Hill et al., 1997; 1999; Collinge, 1999). 긴 잠복기간으로 인해 정확한 추정은 불가능하나 2004년 현재, 영국(약 150명)을 비롯하여 전세계적으로 약 200명의 "vCJD" 환자가 있는 것으로 밝혀져 있다. 인간광우병 "vCJD"에서는 원인병원체단백질 "PrP^{Sc}"가 뇌에서 뿐만 아니라 편도선(tonsil), 충수(appendix)와 같은 임파계(lymphoid system)에도 축적됨으로써 혈관을 통한 감염가능성이 있으며 현재 수혈을 통한 감염사례들이 보고된 바 있다.

현재 메사추세츠공대(MIT) Whitehead Institute의 Dr. Susan Lindquist, 캘리포니아대 샌프란시스코 (UCSF) 의대 신경생화학과 교수 Dr. Stanley Prusiner, 미국 국립 알러지전염병연구소(National Institute of Allergy and Infectious Diseases ; NIAID)의 Dr. Byron Caughey, 일본 큐슈대학의 Dr. Katsumi Dohura 등의 연구팀이 병원체 프리온단백의 증식 및 억제 기작규명연구 및 Thorazine(기존의 정신분열증치료약), Quinacrine(기존의 항말라리아치료약)등의 광우병 치료제로의 가능성여부를 확인하기 위한 임상실험단계에 있다.

또한, 정상적인 프리온단백과는 달리 "PrP^{Sc}"는 단백질분해효소(protease)로 분해되지 않고 박테리아, 바이러스, 곰팡이 등을 박멸시킬 수 있는 열, 방사선, 화학품 등에 의한 살균작용에도 저항력이 강함으로써 프리온질환에 걸린 가축육골의 섭취에 따른 감염예방이 힘들다 (Chiesa et al., 2000). 이에 가축뇌조직에 존재하는 병원체단백질을 조기 발견하여 인간이 섭취하지 않도록 예방하는 것이 급선무이며 이에 현재 과학자들은 이상적인 진단방법개발에 중점을 두고 있는 실정이다 (Foster et al., 2000a; 2000b). 현재 쓰이고 있는 광우병진단방법으로는 소의 뇌에서 조직을 분리하여 쥐에 주입한후 쥐의 발병여부를 확인하는 방법

(약 36개월이 걸림), 소의 뇌 조직절편을 가지고 병원체단백질을 인식하는 항체 (antibody)를 이용하여 병의 존재여부를 판단하는 방법 (약 일주일의 걸리며 다량검정(mass screening)시 비효율적임), 소의 뇌에서 분리된 조직을 단백질분해 효소(protease)를 이용하여 protease에 분해되지 않고 남은 병원체단백질을 그 특정 항체로 인식하는 방법 (약 8시간이 걸리며 현재 상업적으로 보편화되어 있으나 이 방법은 "PrP^{Sc}"이 대량으로 존재하는 경우에 한정된다는 단점이 있음), 화학물질(chemical)을 이용하여 서로 다른 두가지 형태의 프리온을 분리한후 형광물질이 입혀진 "PrP^{Sc}"항체를 이용하여 병의존재여부를 판단하는 방법 등이 있으며 현재 소량의 "PrP^{Sc}"도 인식하는 방법인 후자의 방법이 주목받고 있으며 (Saborio et al., 2001; Bellon et al., 2003) 이 방법을 이용하여 살아있는 가축으로부터의 조직을 통해 병의 존재여부를 밝히는 진단방법이 실험 중에 있다 (Prusiner, 2004).

현재 인간 광우병 치료제로 개발된 약물들은 주로 병의 치료보다는 병의 진전속도를 완화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 병원체단백질의 증식 및 억제 기작을 기초로 보다 효과적인 치료약개발이 급선무이며 동 치료약개발은 인간광우병으로 불리는 vCJD뿐만이 아닌 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease)등의 신경퇴행성질환치료에도 효과적일 것으로 생각되며 또한 혈액이나 소변을 통해 소해면상뇌증을 조기에 진단할 수 있는 인간 광우병 예방차원의 연구도 미래의 중요한 과제로 볼 수 있다.

제2절 소해면상뇌증과 다른 형태의 CJD사이의 연관성

2000년 이후부터 변종 변종크로이츠펠트제이콥병 (variant Creutzfeldt-Jakob disease)의 발병은 줄어들기 시작한다. 하지만 그 위협은 완전히 끝난 것이 아니라 곳곳에 많은 문제를 남기고 있다. 동물의 실험연구결과에 의하면 1그램 미만의 소해면상뇌증에 감염된 물질은 소를 감염시킬 수 있다. 인간에게 치명적인 양은 아직 알려지지 않고 있다. 다른 해결되지 않은 문제는 좀 더 많은 우려를 일으키고 있다.

소해면상뇌증에 오염된 고기를 먹은 사람은 변형된 크로이츠펠트제이콥병 (variant Creutzfeldt-Jakob disease)과 연관되는 것으로 생각되어 왔으나 다른 형

태의 인간광우병을 일으킬 가능성이 있는 것이 제기되었다. 의학연구위원회 (Medical Research Council)의 학자들은 소해면상뇌증으로부터 산발성 크로이츠펠트제이콥병 (sporadic CJD)로 나타날 수 있거나 인간에게서 나타나지 않은 다른 형태의 질환으로 나타날 가능성을 제시했다. “사이언스”지에 실린 이 연구는 이전에 생각되었던 것보다 좀 더 많은 사람들이 이 질병에 걸렸을 위험의 가능성을 증가시키고 있는 것이어서 주목된다.

변종크로이츠펠트제이콥병을 일으키는 “PrP^{Sc}”를 만들어내는 유전자의 유전자형이 메타이오닌 (Methionine)이라는 아미노산과 발린 (Valine)이라는 아미노산으로 만들어지는데 vCJD가 전체인구의 40%를 차지하는 유전자형인 MM 유전자형을 가지고 있는 사람에게만 일어나는 사실을 확인했다. 지금까지 한 가지 예외가 발견되었는데 이는 한 명의 MV 형 환자가 수혈로 인해 질병에 걸린 경우이다.

인간단백질을 유전적으로 변형시킨 실험쥐를 대상으로 실험하여 프리온 질환은 실험쥐의 유전자형에 따라 전염형태가 달라진다는 것을 발견했다. VV형의 실험쥐는 변종크로이츠펠트제이콥병과는 매우 다른 형태의 프리온질환으로 발전된다. 그리고 이것은 새로운 형태의 질환으로 Type 5라고 부르고 있다. 이것은 아직 인간에게서 나타나지는 않았으며 의학연구위원회의 과학자들은 이것이 어떤 형태의 질환을 일으키는지 알 수 없다고 말했다. MM형을 가지고 있는 실험쥐는 인간의 변종크로이츠펠트제이콥병과 유사하거나 간헐성 크로이츠펠트제이콥병과 유사하다. 연구자들은 변종크로이츠펠트제이콥병과 연관된 Type 4 프리온은 오로지 M형 단백질을 가지고 있는 사람들에게서만 증식된다. V형 단백질은 제4형의 분자형태에는 적합하지 않다. 그래서 이러한 유전자형을 가진 사람들은 변종크로이츠펠트제이콥병에 걸릴 가능성이 없는 반면에 모든 형태의 프리온 질환은 인간에게서 치명적이다. 최근에 증가하는 산발성 크로이츠펠트제이콥병의 숫자가 소해면상뇌증에 의한 전염에 기인할 수도 있다고 보고있다. 이번 연구가 만일 프리온이 사람과 사람으로 수혈과정을 통해 전이되면 이 질환의 형태는 그 전염자의 유전형질에 따라 달라질 수 있다. 일부 VV형을 가진 사람은 비록 전염자일지라도 변종크로이츠펠트제이콥병이 일어나지 않았을 수 있다. 이 결과는 프리온질환을 분류할 수 있는 좀 더 복잡한 시스템을 구축해야 하며 광우병과 산발성 크로이츠펠트제이콥병 사이의 상관성에 대해 간과해서는 안된다는 것을 보여주고 있다.

제3절 소해면상뇌증의 병원체 바이러스

소해면상뇌증과 인간광우병인 변종 크로이츠펠트제이콥병의 원인은 지금까지 변종프리온단백질로 알려져 왔다. 그러나 소해면상뇌증과 변종크로이츠펠트제이콥병의 원인이 프리온이 아니라 바이러스라는 주장이 계속해서 제기되고 있다. 특히 최근에 미국 예일대학교 의과대학 신경병리학자 로라 마누엘리디스 박사는 국립과학원회보(PNAS) 최신호에 발표한 연구논문에서 변종크로이츠펠트제이콥병에 감염된 신경세포에서 바이러스 크기만한 분자를 발견했으며 감염되지 않은 신경세포에는 이러한 분자가 없었다고 밝혔다. 또한 양에서 나타나는 스크래피에 감염된 세포에서도 똑같은 바이러스 분자가 발견되었다. 로라 마누엘리디스 박사의 연구는 프리온의 발견으로 1997년 노벨의학상을 수상한 스탈린 프루시너 박사의 프리온 원인설을 완전히 뒤엎는 연구이다.

매사추세츠공대(MIT) 셸던 펜먼 박사는 사람의 위와 장은 정상 단백질이나 비정상 단백질에 관계없이 모든 단백질을 신속히 분해하기 때문에 프리온을 먹어도 혈관이나 뇌로 들어갈 시간이 없기 때문에 인간이나 동물이 프리온에 감염된 고기를 먹으면 크로이츠펠트제이콥병에 걸린다는 주장에 의문을 표시한 바 있다. 세포와 조직을 구성하는 단백질은 원칙적으로 박테리아나 바이러스처럼 감염의 매개체가 될 수 없다는 것이 그의 주장이고 이는 로라 마누엘리디스 박사의 바이러스설에 힘을 실어주고 있다.

제4절 프리온의 줄기세포 분화기능

미국 화이트헤드 연구소의 하비 로디시 박사팀은 소해면상뇌증을 일으키는 프리온 단백질이 줄기세포 분화에 중요한 역할을 한다는 연구 결과를 얻었다. 이들에 따르면 프리온은 뇌 질환을 일으키지 않는 정상 상태에서 줄기세포의 복제를 도와 다른 세포로 분화하게 한다. 이 연구는 1월 30일 미국 국립과학원회보(PNAS)에 발표됐다.

프리온 단백질은 잘못 접힌 비정상 형태일 때 소해면상뇌증이나 크로이츠펔트제이콥병 등을 일으킨다. 연구팀은 새 혈구 세포로 분열하는 쥐의 줄기세포를 연구한 결과 많은 세포 표면에서 정상 프리온 단백질을 발견했다. 이 단백질은 줄기세포가 골수에서 새 혈구세포로 분화하는데 도움을 주는 것으로 밝혀졌다. 방사선으로 골수를 제거한 쥐에 골수 줄기세포를 이식해 새로 골수와 피를 만든 후 새 골수 세포를 채취해 다른 쥐에 이식하는 과정을 반복했다. 이 과정에서 프리온 단백질이 없는 줄기세포는 새 줄기세포를 만들지 못했다.

이 연구로부터 프리온이 줄기세포 복제를 돕는 정확한 과정은 알 수 없지만 아마 줄기세포가 골수 안에 달라붙는 것을 돕거나 세포 분열을 일으키는 호르몬 분비를 촉진할 것으로 보이며, 이 연구 결과가 검증되면 프리온이 일으키는 질병의 메커니즘을 이해할 수 있을 것으로 보인다.

제 7 장 참고문헌

Baybutt H, Manson J. 1997. Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. *Gene* 184:125-131.

Beck JA, Mead S, Campbell TA, Dickinson A, Wientjens DP, Croes EA, Van Duijn CM, Collinge J. 2001. Two-octapeptide repeat deletion of prion protein associated with rapidly progressive dementia. *Neurology*. 57:354-356.

Bellon A, Seyfert-Brandt W, Lang W, Baron H, Gröner A and Vey M. 2003. Improved conformation-dependent immunoassay: suitability for human prion detection with enhanced sensitivity. *J Gen Virol* 84:1921-1925.

Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, and Smits MA. 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 76:509-517.

Billinis C, Panagiotidis CH, Psychas V, Argyroudis S, Nicolaou A, Leontides S, Papadopoulos O, and Sklaviadis T. 2002. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J. Gen. Virol.* 83:713-721.

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 390:684-687.

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H and Bostock CJ. 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389:498-501.

Capellari S, Parchi P, Wolff BD, Campbell J, Atkinson R, Posey DM, Petersen RB, Gambetti P. 2002. Creutzfeldt-Jakob disease associated with a deletion of two repeats in the prion protein gene. *Neurology*. 59:1628-30.

Chiesa R, Drisaldi BE, Quaglio A, Migheli P, Piccardo P, Ghetti B, and Harris DA. 2000. Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc. Natl. Acad.Sci. U S A*. 97:5574-5579.

Cochran EJ, Bennett DA, Cervenakova L, Kenney K, Bernard B, Foster NL, Benson DF, Goldfarb LG, Brown P. 1996. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with a five-repeat octapeptide insert mutation. *Neurology*. 47:727-733.

Collinge J. 1999. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 354:317-323

Collinge J. 2001. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*. 24:519-550.

Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, and Hill AF. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383:685-690.

Dolores GW, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. 2005. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals : a review *J. Vet. Diagn Invest*. 17:509-527.

Foster PR, McLean C, Welch AG, Griffin BD, Hardy JC, Bartley A, MacDonald S and Bailey A. 2000. Removal of abnormal prion protein by plasma fractionation. *Transfus Sci* 22:53-56.

Foster PR, Welch AG, McLean C, Griffin BD, Hardy JC, Bartley A, MacDonald S and Bailey AC. 2000. Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human plasma products. *Vox Sang* 78:86-95.

Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, and Sata T. 2007. Species-specificity of a panel of prion protein antibodies for the immunohistochemical study of animal and human prion disease. *J. Comp. Path.* 136:9-17.

Garnett AP, Viles JH. 2003. Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J Biol Chem.* 278:6795-6802.

Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, Goldgaber D, Swergold GD, Wills PR, Cervenakova L, Baron H, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. 1991. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:10926-10930.

Goldmann, W., N. Hunter, T. Martin, M. Dawson, and J. Hope. 1991. Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. *J. Gen. Virol.* 72:201-204.

Groschup MH and Pfaff E. 1993. Studies on a species-specific epitope in murine, ovine and bovine prion protein. *J. Gen. Virol.* 74:1451-1456.

Harlow E and Lane D. 1998. *Antibodies.* Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 139-318.

Harmryer S, Pfaff E and Groschup MH. 1998. Synthetic peptide vaccines

yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J. Gen. Virol.* 79:937-994.

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ and Lantos P. 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389:448-450.

Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, King A, Al-Sarraj S, Ironside JW, Lantos PL and Collinge J. 1999. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353:183-189

Hills D, Comincini S, Schlaepfer J, Dolf G, Ferretti L, Williams JL. 2001. Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promoter region. *Anim Genet.* 32:231-232.

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM. 1995a. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 207:621-629.

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. 1995b. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 214:993-999.

Hunter N, Goldmann W, Smith G, and Hope J. 1994. Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. *Vet. Rec.* 135:400-403.

Laplanche JL, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Dussaucy M, Chatelain J,

Launay JM. 1995. Two novel insertions in the prion protein gene in patients with late-onset dementia. *Hum Mol Genet.* 4:1109-11.

Lee IY, Westaway D, Smit AFA, Wang K, Seto J, Chen L, Acharya C, Ankener M, Baskin D, Cooper C, Yao H, Prusiner SB, Hood LE. 1998. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res.* 8:1022-1037.

Lee HG, Park SJ, Choi EK, Carp RI, Kim YS. 1999. Increased expression of prion protein is associated with changes in dopamine metabolism and MAO activity in PC12 cells. *J Mol Neurosci.* 13:121-126.

Levin J, Bertsch U, Kretzschmar H, Giese A. 2005. Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates. *Biochem Biophys Res Commun.* 329:1200-1207.

Li G, Bolton DC. 1997. A novel hamster prion protein mRNA contains an extra exon: increased expression in scrapie. *Brain Res.* 751:265-274.

Ludlam CA. 1997. New-variant Creutzfeldt-Jakob disease and treatment of haemophilia. *Lancet* 350:1704

Mendez R, Richter JD. 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:521-529.

Okamoto K, Sherman G, Bai G, and Lipton SA. 2002. Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 107: 89 - 96.

O'Rourke KI, Baszler TV, Miller JM, Spraker TR, Sadler-Riggelman I and

Knowles DP. 1998. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1750–1755.

Owen F, Poulter M, Collinge J, Leach M, Lofthouse R, Crow TJ, and Harding AE. 1992. A dementing illness associated with a novel insertion in the prion protein gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 13:155–157.

Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, and Collinge J. 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *Nature* 352:340–342.

Premzl M, Bozic P, and Gamulin V. 2000. PRNP octarepeat allele genotype frequencies among the modern and rare cattle breeds in Croatia. *Anim. Genet.* 31:408–409.

Premzl M, Delbridge M, Gready JE, Wilson P, Johnson M, Davis J, Kuczek E, Marshall Graves JA. 2005. The prion protein gene: identifying regulatory signals using marsupial sequence. *Gene.* 349:121–134.

Prusiner SB. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515–1522.

Prusiner SB. 1994. Molecular biology and genetics of prion diseases. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 343:447–463.

Prusiner SB. 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95:13363–13383.

Prusiner SB. 2004. Detecting mad cow disease. *Sci Am.* 291:86–93.

Prusiner SB and Scott MR. 1997. Genetics of prions. *Annu Rev Genet* 31:139–175.

Raymond M and Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248 - 249.

Rossi G, Giaccone G, Giampaolo L, Iussich S, Puoti G, Frigo M, Cavaletti G, Frattola L, Bugiani O, Tagliavini F. 2000. Creutzfeldt-Jakob disease with a novel four extra-repeat insertional mutation in the PrP gene. *Neurology*. 55:405-410.

Ruiz FH, Silva E, Inestrosa NC. 2000. The N-terminal tandem repeat region of human prion protein reduces copper: role of tryptophan residues. *Biochem Biophys Res Commun*. 269:491-495.

Saborio GP, Permanne B, Soto C. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411:810-813.

Sander P, Hamann H, Drogemuller C, Kashkevich K, Schiebel K and Leeb T. 2005. Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem*. 280:37408-37414.

Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, Ziegler U, Distl O, and Leeb T. 2004. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics* 5:19-25.

Schlapfer I, Saitbekova N, Gaillard C, and Dolf G. 1999. A new allelic variant in the bovine prion protein gene (PRNP) coding region. *Anim. Genet*. 30:386-387.

Seabury CM, Womack JE, Piedrahita J, and Derr JN. 2004. Comparative PRNP genotyping of U.S. cattle sires for potential association with BSE. *Mamm. Genome* 15:828–833.

Shaked Y, Rosenmann H, Hijazi N, Halimi M, Gabizon R. 2001. Copper binding to the PrP isoforms: a putative marker of their conformation and function. *J Virol.* 75:7872–7874.

Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H, Kandel ER. 2003. A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia. *Cell.* 115:893–904.

Soto C, Saborio GP, Anderes L. 2002. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci* 25:390–394.

Spraker TR, O'Rourke KI, Balachandran A, Zink RR, Cumming BA, Miller MW and Powers BE. 2002. Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:3–7.

Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R. 2003. The mechanism of internalization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 22:3591–3601.

Thackray AM, Knight R, Haswell SJ, Bujdoso R, Brown DR. 2002. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. *Biochem J.* 362:253–258.

Walawski K, and Czarnik U. 2003. Prion octapeptide-repeat polymorphism

in Polish Black-and-White cattle. J. Appl. Genet. 44:191-195.

Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, and Prusiner SB. 1994. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91:6418-6422.

주 의

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