

최 종
연구 보고서

세포성 면역조절 유전자를 이용한 형질전환 복제돼지의
개발 및 생산효율 향상

Production of transgenic cloned pigs with cellular
immune response regulation genes and improvement of
pig cloning efficiency

연구기관
(주)엠젠

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “세포성 면역조절 유전자를 이용한 형질전환 복제돼지의 개발 및 생산효율 향상에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 12월 31일

주관연구기관명 : (주)엠젠

총괄연구책임자 : 박 광 욱

세부연구책임자 : 박 광 욱

연 구 원 : 설 재 구

연 구 원 : 최 기 명

연 구 원 : 홍 승 표

연 구 원 : 한 귀 승

연 구 원 : 유 지 연

연 구 원 : 최 현 민

연 구 원 : 김 은 정

연 구 원 : 김 수 현

연 구 원 : 박 영 철

제1협동연구기관명 : 건국대학교

제1협동연구책임자 : 조 쌍 구

연 구 원 : 김 봉 우

연 구 원 : 김 정 현

연 구 원 : 최 혜 연

제2협동연구기관명 : 가톨릭대학교

제2협동연구책임자 : 임 향 숙

연 구 원 : 김 구 영

연 구 원 : 남 민 경

연 구 원 : 김 호 영

요 약 문

I. 제 목

세포성 면역조절 유전자를 이용한 형질전환 복제돼지의 개발 및 생산효율 향상

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

돼지의 장기를 사람에게 이식했을 경우에 일어나는 면역거부반응을 억제하기 위해 인간 면역조절관련 유전자 HLA-G/DAF 유전자가 주입된 형질전환 복제돼지를 생산하여 이종이식 시 발생하는 면역거부반응을 억제하는 기술을 개발하고 또한 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 세포 사멸 및 세포성장 조절 관련 유전자 확보 및 Knock-down 실험을 위한 siRNA를 개발 한다. 그리고 복제 수정란 초기 발생과정에서 중요한 세포 사멸 및 세포 성장 유전자의 기능 연구와 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 발현 양상, 단백질의 변성 및 분해 조절 기작 및 세포 내 기능 구명을 통해 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 기능 조절을 통한 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 제고, 형질전환 동물(돼지) 생산을 증진 시키고 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 분자생물학적 기능을 단기간에 확인할 수 있는 zebrafish 시스템을 확립 및 기능 연구와 Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포사멸 메커니즘을 규명한다.

2. 연구개발의 필요성

이종장기의 실용화를 위해서는 돼지에서 면역거부에 관련유전자를 조절하는 것이 필수적인 기술이다. 돼지의 장기를 사람에게 이식할 때 첫 번째로 일어나는 거부반응을 초급성 거부반응이라고 하며, 그 외에도 세포매개성 거부반응은 이종장기개발에 필수적인 요인임. 그러나 세포매개성 거부반응에 대한 연구는 초기단계이다. 초급성 및 세포매개성 거부반응은 사람의 HLA-G/DAF 유전자를 삽입시킨 형질전환 돼지를 개발함으로써 극복될 것으로 예상되고 HLA-G/DAF 복합형질전환 돼지는 돼지 세포, 간세포 등 세포 이식에 유용하게 이용될 것으로 예상된다. 복제동물 생산 성공확률은 매우 낮은 수준으로 조기 폐사, 유산, 기형 출산 등으로 인해 복제 수정란의 2-5%만이 산자로 태어나고 있는 실정이고 인간에게 적용하기 위해 형질전환 복제동물을 만들 때에는 형질전환이 개체의 발생에 미치는 영향과 조작 유전자의 생리적 기능에 대한 연구가 반드시 이루어져야 한다. 또한 65세 이

상의 노인층 연령 인구가 증가하는 추세에서 장기이식환자의 증가와 장기기증자의 격감 등으로 인한 장기이식 수급 불균형이 심화될 것이고 이에 따라 이종장기 시장은 2010년경 약 2,000억불의 세계시장과 약 20조원 규모의 국내시장 형성 추정된다. 따라서 바이오이종장기의 개발은 시장지배력을 강화하는데 결정적 역할을 할 것이며, 미래 장기이식 분야의 신의료 시장을 선점함으로써 국가수익을 창출할 수 있다. 성인병의 증가, 고령화 사회, 핵가족의 영향 등 다양한 원인에 의해 이식장기의 수요가 급증하여 수요공급의 불균형 현상이 심각하고 합법적으로 장기를 이식 받기까지 평균 10년 이상 걸리는 현실적 문제 때문에 장기 매매 또는 해외원정이식이 성행하고 있어 심각한 사회문제로 부각되고 있다. 음성적 장기 매매시장은 전 세계적으로 이미 상당한 시장을 형성하고 있지만 그동안 겪는 환자의 고통을 생각해봤을 때 무조건적으로 비난할 수 없는 상황이므로 형질전환 복제돼지를 이용한 장기이식 및 세포치료의 개발이 시급한 실정이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제의 목표는 인간 HLA-G 및 DAF 유전자가 주입된 형질전환 복제돼지를 생산하여 이종이식 시 발생하는 초급성 및 세포매개성 거부반응을 억제하는 기술의 개발과 분자생물학적 기법을 사용하여 복제동물의 생산을 증진과 기능을 단기간에 확인할 수 있는 시스템을 확립하는데 있다. 제1세부과제는 돼지를 이식하는데 있어서 가장 큰 문제점 중 하나인 면역거부반응을 체세포 복제기술과 형질전환 기술의 발달로 이러한 난관들을 해결할 수 있게 되었는데 본 연구팀은 초급성 및 세포성 면역조절을 위한 HLA-G/DAF 형질전환 복제돼지를 개발하여 이종장기의 산업화를 급속히 앞당길 수 있도록 연구개발하고 제1협동과제는 체세포 핵치환을 통한 복제기술은 효율적인 측면에서 볼 때 아직 완전하다고 할 수 없으므로 본 팀은 복제 효율성 증진과 형질전환의 안전성 확보의 필요성을 중요하게 생각하여 체외성숙, 수정과 염색체의 리모델링, 재프로그래밍 등의 과정에 대한 폭넓은 연구를 진행하고 따라서 난자의 성숙, 수정, 착상 등 배 발생 관련 유전자를 발굴하여 그들의 기능을 분자수준에서 규명하고 이 연구 결과를 바탕으로 유전자를 조작하여 동물복제 효율을 높이는 연구를 수행할 것이다. 제2협동과제는 제브라피시 시스템에서 유전자의 기능을 확인하기 위해 사용하는 방법은 매우 다양하다. RNA, DNA, modified oligonucleotide인 morpholino system을 microinjection으로 제브라피시 배아에 전달하여, 타겟 유전자의 과발현 또는 mRNA가 translation되는 것을 방해함으로써 유전자의 발현을 억제하는 조작이 가능하다. 그로 인한 변화는 발생 시작 12시간 정도부터 확인 가능하며 48시간 이내 발생과정에 미치는 영향을 모니터링할 수 있다. 따라서, 형질전환이 개체의 발생에 미치는 영향과 조작 유전자를 제브라피시의 microinjection 시스템으로 조절하면 면역반응 관련 기능뿐만 아니라 발생과정에 어떤 영향을 미치는지를 빠른 시간 내에 확인할 수 있을 것이다. 또한 체외 수정과 핵치환을 거친 발생란의 발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 세포사멸 조절 관련 유전자를 발굴하여 그 기능을 규명하는 동시에 morpholino 시스템 혹은 제브라피시의 배아에 microinjection하여 생기는 발생과정에서의 변화를 확인하여 이들 유전자를 제거하거나 발현을 증가시켰을 때 나타날 수 있는 여러 문제점들을 미리 예측, 해결할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 제브라피시 시스템을 이용하여 제브라피시 특정 유전자의 발현조절을 가능케 하

는 시스템을 확립하여 체외 수정과 핵 치환을 거친 발생란을 이용하여 발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 유전자의 기능연구 및 동물 개량 및 생산을 증가를 위한 가축 생명공학 분야의 응용 연구에 활용하고자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- HLA-G, DAF 유전자 확보 및 체세포주 확립 및 면역조절 유전자 벡터개발, 발생초기 돼지에서의 세포주 확립 및 동결 태아 세포내 벡터의 주입 및 형질전환 체세포 완성 후 세포학적 특성분석 및 기능분석. 복제란의 체외 생산 및 체계 극대화과 HLA-G, HLA-G/DAF 면역조절 복제돼지의 생산 및 HLA-G 돼지에서의 체도세포 분리
- 복제 수정란 초기 발생과 착상 조절에 관련된 세포 사멸 및 세포성장 조절 관련 유전자의 발현 양상, 단백질의 변성 및 분해 조절 기작과 세포 내 기능 구명을 통한 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 증진
- 체외 수정과 핵 치환을 거친 발생란의 발생 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 세포사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자를 발굴하여 이 유전자의 기능을 규명하고 동시에 이들 유전자를 제거하거나 발현을 증가시켰을 때 발생할 수 있는 여러 문제점들을 미리 예측, 해결할 수 있는 효율적이고 빠른 실험방법을 구축

SUMMARY

Hyperacute and cellular rejection in xenotransplantation is caused by activation of complement, human natural killer cells (NK cells) on endothelium. The combination of non-classical major histocompatibility complex class I molecules-G1 (HLA-G1) and decay accelerating factor (DAF/CD55) would be an effective strategy to overcome host complement and NK cells-induced rejection in xenotransplantation. In this study, we produced the minipig clonal cell lines by transfection of the HLA-G1 and HLA-G1/DAF gene into minipig fetus cell lines, as well as produced the HLA-G1 and HLA-G1/DAF-transgenic minipigs using the nuclear transfer. Expression of the HLA-G1 and HLA-G1/DAF gene in the minipigs would be to prevent hyperacute and cellular rejection in xenotransplantation.

And we tried to increase the developmental efficiency of the porcine oocytes. We investigated the molecular function of several proteins involved in protein cleavage, degradation, or modification. We suggest that the finely-regulated expression and function of specific proteins such as AAA protease, BI-1, or SUMO are important for high developmental efficiency of porcine oocytes. Moreover, We found that treatment of specific flavonoids can modulate the cell viability. Also we investigated the sequence of the zebrafish genome revealed a high degree of genetic conservation between humans and other vertebrates. The function and morphology of zebrafish organs are very similar to those of human. Zebrafish offers several advantages over rodent models; 1. zebrafish produces 200 eggs per spawning, 2. investigating the effects on overexpression, mis-expression, knock-down of specific gene is easy during development, 3. zebrafish development is completed within 48 hpf (hour post fertilization), 4. its embryos and larvae are transparent, which allows for the development of the internal organs to be easily observed. Because of these advantages, the zebrafish is a remarkable vertebrate for characterizing the in vivo function of the specific gene for a number of reasons. We have established efficient screening system using zebrafish. This system contribute to more effective solutions to study of in vivo functions of specific gene that associated with in vitro fertilization, maturation and immune system.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research -----	8
Section 1. Objects and Necessity of the Project -----	8
Section 2. Objects of the Project -----	9
Chapter 2. Current status of the technology -----	13
Section 1. Contents of the Project to Domestic and International --	13
Section 2. Filed of the Bio-organ to Domestic and International ---	23
Chapter 3. Research contents and results -----	27
Section 1. Introduction, Materials and Methods -----	27
Section 2. Years of Research contents -----	39
Section 3. Results -----	42
Chapter 4. Research achievements and contribution -----	98
Chapter 5. Applications of results -----	104
Chapter 6. Foreign information collected during this research -----	105
Chapter 7. References -----	107

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	8
제 1 절 연구개발의 필요성 및 목표 -----	8
제 2 절 연구개발의 목표 -----	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	13
제 1 절 국내, 외 연구개발내용 -----	13
제 2 절 국내, 외 바이오장기 분야 -----	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	27
제 1 절 이론적, 실험적 접근방법 -----	27
제 2 절 년차별 연구내용 -----	39
제 3 절 연구결과 -----	42
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	98
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	104
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	105
제 7 장 참고문헌 -----	107

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발과제의 필요성 및 목적

1. 필요성

가. 기술적 측면

- 1) 이종장기의 실용화를 위해서는 돼지에서 면역거부에 관련유전자를 조절하는 것이 필수적인 기술.
- 2) 돼지의 장기를 사람에게 이식할 때 첫 번째로 일어나는 거부반응을 초급성거부반응이라고 하며, 그 외에도 세포매개성 거부반응은 이종장기개발에 필수적인 요인임. 그러나 세포매개성 거부반응에 대한 연구는 초기단계.
- 3) 세포매개성 거부반응은 사람의 HLA-G 유전자를 삽입시킨 형질전환 돼지를 개발함으로써 극복될 것으로 예상됨.
- 4) HLA-G 형질전환 돼지는 췌도 세포, 간세포 등 세포 이식에 유용하게 이용될 것으로 예상됨.
- 5) 복제동물 생산 성공확률은 매우 낮은 수준으로 조기 폐사, 유산, 기형 출산 등으로 인해 복제 수정란의 2-5%만이 산자로 태어나고 있는 실정.
- 6) 인간에게 적용하기 위해 형질전환 복제동물을 만들 때에는 형질전환이 개체의 발생에 미치는 영향과 조작 유전자의 생리적 기능에 대한 연구가 반드시 이루어져야 함.

나. 경제·산업적 측면

- 1) 65세 이상의 노인층 연령 인구가 증가하는 추세에서 장기이식환자의 증가와 장기기증자의 격감 등으로 인한 장기이식 수급 불균형이 심화될 것임.
- 2) 이종장기 시장은 2010년경 약 2,000억불의 세계시장과 약 20조원 규모의 국내시장 형성 추정됨.
- 3) 따라서 바이오이종장기의 개발은 시장지배력을 강화하는데 결정적 역할을 할 것이며, 미래 장기이식 분야의 신의료 시장을 선점함으로써 국가수익을 창출할 수 있음.
- 4) 성인병의 증가, 고령화 사회, 핵가족의 영향 등 다양한 원인에 의해 이식장기의 수요가 급증하여 수요공급의 불균형 현상이 심각함.
- 5) 합법적으로 장기를 이식 받기까지 평균 10년 이상 걸리는 현실적 문제 때문에 장기매매 또는 해외원정이식이 성행하고 있어 심각한 사회문제로 부각됨.
- 6) 음성적 장기매매시장은 전 세계적으로 이미 상당한 시장을 형성하고 있지만 그동안 겪는 환자의 고통을 생각해봤을 때 무조건적으로 비난할 수 없는 상황.

2. 목적

가. 주요목적

- 1) 인간 HLA-G/DAF 유전자가 주입된 형질전환 복제돼지를 생산하여 이종이식 시 발생하는 세포매개성 거부반응 억제하는 기술의 개발임.
- 2) 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 세포 사멸 및 세포성장 조절 관련 유전자 확보 및 Knock-down 실험을 위한 siRNA를 개발
- 3) 제 3 세부과제와의 공동연구를 통한 복제 수정란 초기 발생과정에서 중요한 세포 사멸 및 세포 성장 유전자의 기능 연구
- 4) 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 발현 양상, 단백질의 변성 (modification) 및 분해 (degradation) 조절 기작 및 세포 내 기능 구명
- 5) 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 기능 조절을 통한 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 제고: 형질전환 동물(돼지) 생산을 증진 : 3 → 10%
- 6) 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 분자생물학적 기능을 단기간에 확인할 수 있는 zebrafish 시스템을 확립 및 기능 연구
- 7) Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포사멸 메커니즘을 규명
- 8) 공동연구에 의해 선별된 면역거부반응 유발 유전자(제 1 세부과제)와 세포 사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자(제 2 세부과제)를 zebrafish 시스템에서 과 발현 또는 knock-down시켜 배아 발생에 미치는 영향을 모니터링

제2절 연구개발과제의 내용 및 범위

본 연구과제의 목표는 인간 HLA-G 및 DAF 유전자가 주입된 형질전환 복제돼지를 생산하여 이종이식 시 발생하는 초급성 및 세포매개성 거부반응을 억제하는 기술의 개발과 분자생물학적 기법을 사용하여 복제동물의 생산을 증진과 기능을 단기간에 확인할 수 있는 시스템을 확립하는데 있다. 제1세부과제는 돼지를 이식하는데 있어서 가장 큰 문제점 중 하나인 면역거부반응을 체세포 복제기술과 형질전환 기술의 발달로 이러한 난관들을 해결할 수 있게 되었는데 본 연구팀은 초급성 및 세포성 면역조절을 위한 HLA-G/DAF 형질전환 복제돼지를 개발하여 이종장기의 산업화를 급속히 앞당길 수 있도록 연구개발하고 제1협동과제는 체세포 핵치환을 통한 복제기술은 효율적인 측면에서 볼 때 아직 완전하다고 할 수 없으므로 본 팀은 복제 효율성 증진과 형질전환의 안전성 확보의 필요성을 중요히 생각하여 체외성숙, 수정과 염색체의 리모델링, 재프로그래밍 등의 과정에 대한 폭넓은 연구를 진행하고

따라서 난자의 성숙, 수정, 착상 등 배 발생 관련 유전자를 발굴하여 그들의 기능을 분자수준에서 규명하고 이 연구 결과를 바탕으로 유전자를 조작하여 동물복제 효율을 높이는 연구를 수행할 것이다. 제2협동과제는 제브라피시 시스템에서 유전자의 기능을 확인하기 위해 사용하는 방법은 매우 다양하다. RNA, DNA, modified oligonucleotide인 morpholino system을 microinjection으로 제브라피시 배아에 전달하여, 타겟 유전자의 과발현 또는 mRNA가 translation되는 것을 방해함으로써 유전자의 발현을 억제하는 조작이 가능하다. 그로 인한 변화는 발생 시작 12시간 정도부터 확인 가능하며 48시간 이내 발생과정에 미치는 영향을 모니터링할 수 있다. 따라서, 형질전환이 개체의 발생에 미치는 영향과 조작 유전자를 제브라피시의 microinjection 시스템으로 조절하면 면역반응 관련 기능뿐만 아니라 발생과정에 어떤 영향을 미치는지를 빠른 시간 내에 확인할 수 있을 것이다. 또한 체외 수정과 핵 치환을 거친 발생란의 발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 세포사멸 조절 관련 유전자를 발굴하여 그 기능을 규명하는 동시에 morpholino 시스템 혹은 제브라피시의 배아에 microinjection하여 생기는 발생과정에서의 변화를 확인하여 이들 유전자를 제거하거나 발현을 증가시켰을 때 나타날 수 있는 여러 문제점들을 미리 예측, 해결할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 제브라피시 시스템을 이용하여 제브라피시 특정 유전자의 발현조절을 가능케 하는 시스템을 확립하여 체외 수정과 핵 치환을 거친 발생란을 이용하여 발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 유전자의 기능연구 및 동물 개량 및 생산을 증가를 위한 가축 생명공학 분야의 응용 연구에 활용하고자 한다. 각 세부 과제별 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

<p>제 1 세부과제</p> <p>세포성 면역조절을 위한 HLA-G 형질전환 복제 돼지의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> □ HLA-G 유전자 확보 및 체세포주 확립 : HLA-G 유전자 검색, 분리 및 확보하고, 이를 이용하여 유전자 벡터 개발 및 체세포주 확립 <ul style="list-style-type: none"> - HLA-G 유전자 검색, 분리 및 확보 - HLA-G 세포매개성 면역조절 유전자 벡터개발 - 발생초기 돼지에서의 세포주 확립 및 동결 - 태아 세포내 벡터의 주입 및 형질전환 체세포 완성 - 돼지 체세포의 세포학적 특성분석 및 기능분석 □ HLA-G 형질전환 복제돼지 생산 : 복제란 제작, 대리모에 이식 및 복제돼지 생산. 형질전환 복제돼지 생산 효율 증진. <ul style="list-style-type: none"> - 세포의 염색체분석 및 복제란의 체외 생산 - 복제란의 체외생산 체계 극대화 - 복제란의 이식 및 임신유지의 최적화 - 세포매개성 면역조절 형질전환 복제돼지 생산 - 형질전환 복제돼지 생산 효율 증진 - 형질전환 복제돼지의 세포학적 특성분석 및 기능분석 □ HLA-G/DAF 형질전환 복제돼지의 유용성 검토 : 형질전환 복제 돼지의 생물학적 특징검사. 복제효율 증진 유전자가 주입된 돼지 형질전환 세포주의 개발. <ul style="list-style-type: none"> - HLA-G/DAF 형질전환돼지의 장기이식용 가능성 검증 - HLA-G/DAF 형질전환돼지의 관리 기술 확립 - 면역조절능 향상을 위한 복합 형질전환 복제돼지의 개발
--	---

<p style="text-align: center;"><u>제 1 협동과제</u></p> <p style="text-align: center;">복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 제고를 위한 유전자발굴과 기능구명</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 관련 유전자를 유전체/단백체학적 방법으로 확보 이들 유전자들의 기능 연구를 위한 siRNA를 개발 <input type="checkbox"/> 복제 수정란 발생과정에서 중요한 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자 : 발현 양상을 realtime PCR 등의 방법으로 연구 <input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 기능연구 <ul style="list-style-type: none"> - 세포주 및 zebrafish (제 3세부과제)에의 기능연구 - siRNA를 수정란 (zygote)에 microinjection하여 RNAi의 효과 확인 - 상실배 및 배란포에 transfection을 통한 RNAi로 배 발달에서의 유전자 기능 파악 - 발굴한 자궁 내 특정유전자의 기능을 체외배양한 자궁세포에서 규명 <input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, glycosylation 등의 변성을 immunoblotting, immunohistochemistry, 형광법 등을 이용하여 연구 (제 3 세부과제와 공동연구) <input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 UPS (ubiquitination-proteasome system) 또는 AAA protease에 의한 분해 (degradation) 조절 기작을 연구하고, siRNA interference, immunostaining, western blotting 등의 방법을 통해 세포 내 기능을 구명 (제 3 세부과제와 공동연구) <input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 기능 조절을 통한 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 증진 방안 연구
<p style="text-align: center;"><u>제 2 협동과제</u></p> <p style="text-align: center;">형질전환 복제동물 생산기술의 효율성 향상과 안전성 확보를 위한 제브라피시 스크리닝 시스템의 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> RNA, DNA microinjection technology, morpolino system을 이용하여 zebrafish 특정 유전자의 발현과 제거 시스템 확립 <input type="checkbox"/> <i>In situ</i> hybridization과 immunostaining, western blotting으로 zebrafish에 도입한 유전자의 발현과 기능을 확인 <input type="checkbox"/> 세포사멸관련 유전자가 제거된 쥐의 배아를 분리하여 western blotting, immunostaining, <i>in situ</i> hybridization으로 정상 쥐의 배아 발생의 차이를 확인

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국·내외 연구개발 내용

1. 체세포 복제 및 형질전환 기술

가. 영국 Roslin연구소가 1997년 유선조직 상피세포를 이용하여 최초로 체세포 복제동물인 “돌리”를 보고 함으로써 생명공학분야에 큰 관심을 모으게 되었음.



<그림 1> 세계 최초의 복제동물 돌리

나. “돌리”의 탄생이후 여러 종에 대한 복제연구가 진행되어 소, 염소, 생쥐, 고양이 등의 복제가 성공하였으며, 복제기술은 단순한 동물의 복제는 물론 체세포에 특별한 유전자를 삽입 또는 제거 (knockout, knockin)한 후 복제를 하게 되면 형질전환 동물의 생산이 가능하게 되었음.

다. 형질전환 복제동물로 human clotting factor IX gene (혈액응고에 관여)이 젖에서 발현하는 양 (1997년, PPL사), -galactosidase가 발현 되는 소 (메사추세츠대학, 1998년), recombinant human antithrombin III 를 젖에서 분비하는 염소 (Genzyme Transgenic 사, 1999년), PrP gene (prion이라는spongiform encephalopathy (해면체성 뇌질환)을 일으키는 물질형성)이 제거된 양(2001년, Roslin) 등이 보고 되었음.

라. PPL사가 2000년 최초의 복제돼지의 생산에 성공.

마. 미주리 대학에서 2001년 해파리의 형광유전자를 돼지의 체세포에 주입시킨 후 복제에 성공하여 최초의 형질전환 복제돼지 (일명 노란돼지)를 생산하였음. 복제 및 형질전환 기술을 이용하여, 이종장기를 개발하기 위한 기반 기술 공급.

2. 바이오 이종장기의 개발

<표 1 > 형질전환 복제돼지 개발팀

년도	국가	개발 생산된 돼지	보고자
1995	영국	hDAF 형질전환 돼지	Rosengard et al.
1999	미국	H-transferase 형질전환 돼지	Alexion
2002	영국	hMCP 형질전환 돼지	Zhou 등
2002	미국	GT 적중돼지(-/+)	Unl. Missouri, PPL
2002	이태리	hDAF 형질전환 돼지	Lavitrano 등
2003	미국/영국	GT 적중돼지(-/-)	PPL, Immerge

가. 돼지의 장기를 인간에게 이식한 연구는 100여년 이상의 역사를 가지고 있음. 1980년대 형질전환 생쥐의 생산에 성공하여 이 기술은 돼지의 형질전환에도 응용이 시작됨. 이종 장기를 위한 돼지의 형질전환은 주로 초급성거부반응의 조절에 초점을 두고 있으며, 사람의 면역관련 유전자를 돼지에 발현시켜 이종이식 시 발생하는 자연항체의 반응을 억제하려고 함.

나. 인간의 DAF (decay accelerating factor) 유전자가 주입된 형질전환 돼지 생산에 성공. DAF 유전자가 돼지세포의 표면에서 발현하면 사람에서 보체의 활성을 억제함으로써 이종이식시 발생하는 초급성 거부반응을 일부 완화 시킬 수 있음. 그러나 초급성 거부반응을 완전히 억제할 수는 없음. 이 연구가 보고 된 이후 여러 연구자가 인간 DAF 유전자가 주입된 형질전환돼지의 생산에 성공 (Rosengard 등, Transplantation 1995).

다. 인간의 H-transferase 형질전환돼지의 생산에 성공. 이종이식시 일어나는 자연항체의 활성을 막기위하여 human α ,2-fucosyltransferase (H-transferase)가 돼지의 세포표면에 발현시키는데 성공. 돼지의 α -gal에 대하여 자연항체가 공격하게 함으로써 초급성거부반응을 완화 시킬 수 있었음. 그러나 초급성 거부반응을 완전히 억제할 수는 없음 (Costa 등, FASEB 1999; Alexion 사).

라. 미국 미주리대학에서 2002년 돼지장기이식의 가장 큰 문제점인 초급성 거부반응의 원인 유전자 (α -Gal)를 제거한 복제돼지의 생산에 성공. 이 연구는 최초로 유전자 적중기술을 통해 특정 유전자를 제거에 성공 (Lai 등, Science 2002).

- 마. 미주리대학과 PPL사가 2003년 초급성 거부반응의 원인 유전자 (α-Gal)를 완전히 제거하는데 성공 (Phelps 등, Science 2003; Kolber-Simonds 등, PNAS 2004).
- 바. HLA-G는 polymorphic이 적은 분자로 임신기간 중 태반과 양막에서 특이적으로 발현. 발현된 HLA-G는 태아를 NK 세포로부터 보호하고 T 세포의 면역반응을 억제함. 돼지의 세포에서 사람의 HLA-G를 발현시키면 인간 NK 세포에 의한 세포독성이 현저히 저하됨이 보고 되었음 (Wang 등, Transplantation Proceeding 2004).

3. 형질전환 복제동물 생산기술의 현황

- 가. 형질전환동물 생산기술은 분자생물학, 수의축산학, 동물발생공학의 접목으로 탄생한 신기술로 동물 개량과 생산성을 높일 수 있는 획기적인 방법으로 각광받고 있음. 특히 최근 체세포핵이식을 이용한 복제기술이 눈부시게 발전함에 따라 유전자 조작 동물을 대량으로 복제하는 것이 가능.
- 나. 이러한 첨단기술은 농축산분야, 산업분야, 의료분야 등에 광범위하게 적용이 가능하며, 이로 인해 인체 유용 단백질이나 치료용 단백질의 대량생산, 병인 연구를 위한 질환 모델동물 개발, 난치병이나 불치병 치료를 위한 줄기세포 생산, 이종이식용 장기 생산 연구가 활발히 진행되고 있음. 이런 기술로 도출되는 연구결과는 인간이 더욱 건강하고 풍요로운 삶을 영위하는데 크게 도움이 될 것임.
- 다. 최근에는 장기이식용 동물로서 돼지가 특히 주목을 받고 있음. 돼지 유전자의 구조는 인간과 매우 유사하고 그 장기는 생리 해부학적으로 인간의 장기와 비슷하며, 인간에게 전염되는 질병이 거의 없다는 큰 장점이 있음. 다산성도 지녔기 때문에 장기의 대량공급이 가능하고 특정 질병이 배제된 specific pathogen free (SPF) 사육이 가능하기 때문에 장기 이식 시 발생할 수 있는 감염의 위험성을 최소화 할 수 있다는 장점.
- 라. 국내의 돼지 생명공학은 1990년대 말 이후 농진청을 비롯한 10여개의 연구기관을 중심으로 활발히 이루어지고 있음. 그러나 돼지를 이용하여 인간에게 필요한 치료물질과 장기를 생산하고 의료용으로 적용하기 위해서는 아직 극복해야 할 장애물이 많이 남아있음.

4. 복제돼지의 의학적 응용 - 이종장기의 개발

- 가. 장기이식의 방법은 장기가 회복 불가능할 경우 가장 확실한 치료수단으로 여겨지고 있으나, 대부분의 장기는 뇌사자나 제한된 장기 기증자로부터 얻을 수 있으므로, 장기 공급의 부족으로 많은 환자들이 치료를 받지 못하고 고통 받고 있음. 따라서 장기를 공급하기 위한 대체동물이 필요하게 되었으며, 그중 돼지의 장기가 생리적으로 인간과 매우

흡사하여 의학연구를 위한 모델 가축으로 많은 연구가 진행되어 왔으며, 인간 장기의 대체 동물로 기대되고 있음.

나. 장기의 제공원으로 가장 가능성이 높은 것은 원숭이이지만, 현실적으로 사용이 불가능함. 현재 장기의 공급원으로 생각되어지는 동물은 돼지로서 영장류에 비하여 돼지는 1년이 채 되지 않는 세대간격, 다산성, 윤리적인 문제가 적다는 점, 그리고 인간의 장기와 생리적으로 흡사하다는 점에서 많은 장점을 가지고 있음.

다. 그러나, 돼지의 장기를 사람에게 이식하면 면역거부반응이 일어남. 이러한 면역거부반응은 돼지에서 면역관련 유전자를 제거하거나 변형시킴으로써 거부반응을 제거하거나 억제할 수 있음.

5. 초급성 면역거부반응 (Hyperacute Rejection)

가. 돼지장기를 이식하는 데 있어서 가장 큰 문제점 중 하나는 면역거부반응으로 특히 초급성 거부반응 (hyperacute rejection)이 가장 큰 문제점으로 여겨지고 있음. 초급성 거부반응은 돼지의 장기를 인간에게 이식하면 돼지세포 표면에 존재하는 galactose α -1,3-galactose (α -Gal) 잔기가 항원으로 인식되어 거부반응이 일어나 환자가 수 분 또는 수 시간 안에 죽게 되는 현상을 말함.

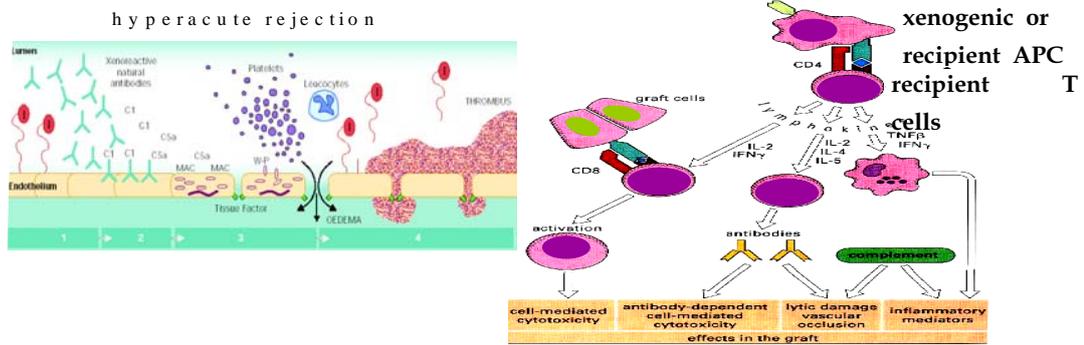
나. 최근에 체세포 복제기술과 형질전환 기술의 발달로 이러한 난관들을 해결할 수 있는 길이 열려, 돼지를 이용한 바이오장기의 개발이 세계적으로 진행되고 있음. 즉, Galactosyl (α -1,3) Galactosyl Transferase (GGTA1)에 대한 유전자 적중 기술을 통한 초급성 거부반응을 제어하는데 성공하였고, 그 이외의 급성 및 만성 거부반응을 조절하기 위하여 혈청보체 조절인자 조절, 혈관내피 세포의 안정화하기 위한 여러 기술적 방법들이 발달하여 면역거부반응이 제거된 돼지의 생산으로 일부 해결할 수 있음.

6. 세포매개성 면역거부반응 (Cellular Rejection)

가. 초급성 거부반응이후에는 세포매개성 거부반응이 일어남. 이 거부반응은 활성화된 T 세포가 이종 장기의 세포를 공격하거나 사이토카인 등을 분비하여 세포사멸을 일으키는 현상. 세포매개성 거부반응의 제어에 관한 연구는 국제적으로 초기 개발단계에 있음. 이 기술은 이종장기의 실용화에서 있어서 절대적으로 필요함.

나. 이종장기 중 심장, 신장과 같은 고형장기를 이식할 때는 초급성거부반응이 가장 큰 문제이지만 세포 단계(예: 췌도 세포, 간 세포)의 이식에서는 초급성거부반응 보다도 오히려 세포매개성 거부반응이 더 중요한 거부반응으로 알려지고 있음. 따라서 돼지세포를 사람에게 이식하기 위해서는 세포매개성 거부반응의 조절이 필수적임.

T cell-mediated xenograft rejection



<그림 2> 이종장기 이식시 면역거부반응의 종류와 기전

다. 사람의 체내에 돼지의 장기를 이식 했을 경우 α-gal epitope에 의해 발생하는 초급성 거부 반응 이외에 Natural Killer(NK) 세포에 의한 거부반응도 발생하게 됨. 돼지의 장기가 사람의 몸에 들어올 때 NK세포는 돼지의 endothelial cell(EC)을 비자기로 인식하여 세포용해를 일으킴. 하지만 NK 세포의 활성을 억제시키는 유전자로 형질전환 돼지를 만든다면 NK 세포의 cytotoxicity를 막을 수 있을 것이며, 여기에 가장 적합한 유전자 중 하나가 HLA-G임. 지금까지의 연구결과에 의하면, 돼지의 세포에서 사람의 HLA-G를 발현시키면 인간 NK 세포에 의한 세포독성이 현저히 저하됨이 보고 되었음.

라. NK 세포는 내재면역에서 중요한 역할을 함. 특히 가장 우선적인 역할은 선택적으로 종양세포, 몸속에 침입한 박테리아, 바이러스 등의 감염에 의해 MHC class I 기능이 감소된 체내의 세포를 공격하는 것임. 또한 NK 세포는 골수를 이식할 때 거부반응을 일으키기도 함. NK 세포의 활성화와 비활성은 특정억제/활성 수용체(specific inhibitory / activating receptor)가 표적세포의 ligand와 결합함으로써 이루어짐. 즉, NK 세포의 cytotoxicity는 MIC, ULBP 등의 활성화자극과 HLA-class I 및 non HLA-class I 억제 자극에 의해서 조절됨. NK 세포를 불활성화시키는 특정거부수용체(specific inhibitory receptor)에는 KIR(the killer cell Ig-like receptor)과 LIR1/ILT2, CD94/NKG2A가 있다. 이 수용체는 non HLA-class 및 MHC class I molecules과 결합하여 NK 세포를 불활성화시킴.

마. NK 세포는 이종장기이식 거부반응에도 중요한 역할을 함. 사람과 돼지간의 이종이식시에 NK 세포는 돼지의 세포에 빠르게 이종 세포독성을 일으킴. 이는 HLA class I의 결핍과 swine leukocyte Ag(SLA) class I이 NK 세포 억제수용체에 positive 자극으로 전달되기 때문. 그 결과 NK 세포는 표적세포를 공격하고 pre-inflammatory cytokine을 분비하며 표적세포의 기능을 상실시킴. 그러므로 NK 세포의 활성화와 이종 세포독성을 억제시키는 것은 이종이식 시에 발생하는 거부반응을 줄일 수 있는 이상적인 접근방법임.

바. HLA-G는 non-classical MHC class I molecule로서 인간의 6번 염색체에 위치한 HLA-A의 telomeric에 위치하고, HLA-A2의 염기서열과 상당히 일치함. 또한 HLA-G는 HLA-B, C 와도 유사하며 8개의 exon을 포함하고 있음. exon 1은 peptide signal을 encoding하며, α 1-domain(exon2), α 2-domain(exon3), α 3-domain(exon4), transmembrane(exon5), cytoplasmic tail(exon6-7), untranslated region(exon8)등으로 이루어져 있음. HLA-G는 mRNA splicing에 의해서 G1, G2, G3, G4의 isoform과 2개의 soluble form인 G5, G6 가 있으며, 여기서 가장 큰 HLA-G1은 exon1-8번에 모두 위치해 있음. HLA-G의 여러 isoform중에서 HLA-G1이 NK cell의 inhibitory receptor인 KIR, CD94/NKG2A, LIR1/ILT2와 결합하여 NK 세포를 불활성화시키는 것으로 알려짐.

사. 한편, HLA-G 이외에 HLA-C를 이용하여 NK 세포를 불활성화시킬 수 있으나, HLA-C는 polymorphic allele이고 이종이식시 HLA-C의 발현으로 T 세포에 의한 cytotoxicity가 보고됨. 반대로 HLA-G는 polymorphic이 적은 분자로 임신기간 중 태반과 양막에서 특이적으로 발현하는 것이 특징. 발현된 HLA-G는 태아를 NK 세포로부터 보호하고 T 세포의 면역반응을 억제함. 따라서 HLA-G는 이종이식 시 발생하는 NK 세포에 의한 면역거부 반응을 억제하는데 좋은 유전자 중 하나이로 전 세계적으로 연구되고 있음.

아. 그러나, HLA-G 유전자가 삽입된 돼지는 전세계적으로 생산된 예가 없음. 사람의 HLA-G 유전자가 들어간 형질전환 돼지가 생산되면 이종장기의 산업화를 급속히 앞당길 것으로 예상됨. 특히 췌도세포와 같은 세포이식에는 필수적일 것으로 예상.

7. 복제 효율성 증진과 형질전환의 안전성 확보의 필요성

가. 체세포 핵치환을 통한 복제기술은 효율적인 측면에서 볼 때 아직 완전하다고 할 수 없음. 복제 동물 1마리를 만들기 위해서는 수백 개의 난자가 필요하며 수정 이후에도 세포 분열을 거쳐 배아 단계로 들어가는 것은 수십 개에 불과하고 착상 이후에도 유산이나 사산되는 경우가 대부분이기 때문임. 현재의 기술로는 체외성숙과 체외수정을 거친 난자의 인공 임신 성공확률은 최대 3%를 넘지 못하는 실정임.

나. 이는 체외성숙, 수정과 염색체의 리모델링, 재프로그래밍 등의 과정에 대한 폭넓은 연구와 분자생물학적 이해가 반드시 필요하다는 것을 의미. 따라서 난자의 성숙, 수정, 착상 등 배 발생 관련 유전자를 발굴하여 그들의 기능을 분자수준에서 규명하고, 이 연구 결과를 바탕으로 유전자를 조작하여 동물 복제 효율을 높이는 연구의 수행이 반드시 필요.

다. 복제 동물을 이용하여 생산한 장기를 치료 목적으로 사용하기 위해서는 동물과 인간사이의 면역거부반응, 특히 가장 큰 문제점인 초급성 면역거부반응(hyperacute rejection, HAR)을 없애는 것이 무엇보다 중요.

라. 2002년 인체 면역거부 유전자 GGTA1을 제거한 돼지가 탄생했고 향후 돼지 게놈 프로젝트에 의해 또 다른 면역거부 유전자의 정체가 모두 밝혀지면 나머지 유전자들을 제어하는 작업도 가능.

마. 생물 면역체계는 생물 개체의 생존 시스템 그 자체라고 할 수 있으므로 면역체계의 변형이 오히려 개체의 생존율을 떨어뜨릴 위험이 있고, 복제 효율을 높이기 위해 제거하거나 조작한 유전자들이 배 발생 과정에서 원치 않는 영향을 미칠 가능성도 배제할 수 없음. 따라서 이러한 현상을 관찰하고 확인할 수 있는 안정성 검증 시스템 구축 연구는 복제 생산 시스템 구축을 위해 반드시 수행해야 하는 과제임.

8. 세포사멸 유전자 조작 쥐를 이용한 난자의 세포사멸 메커니즘의 연구

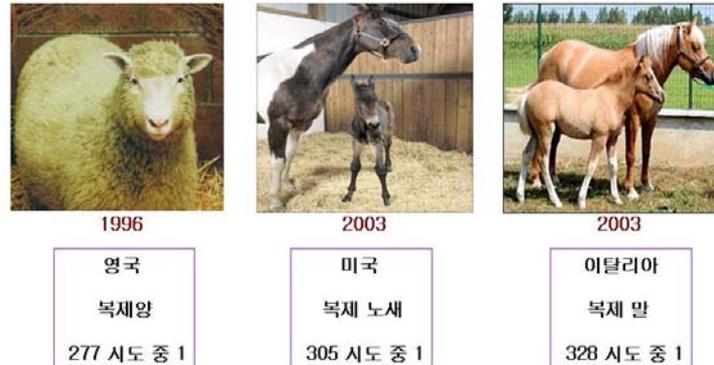
가. 핵치환 기술은 몇 가지 기술적인 문제만 해결된다면 산업화의 가능성이 매우 높은 기술. 따라서 체외 배양기술을 개선하고 핵 치환된 수정란의 체외 발달 효율을 높이기 위해 배양배지의 성분에 변화를 주고(human serum albumin 사용) 세포에 손상이 적은 탈핵기술(squeezing법)을 개발하는 등 각고의 노력이 이루어지고 있음. 또한 난자의 성숙과 수정, 분열에 중요한 세포주기 관련 유전자들의 분자생물학적 조절 메커니즘을 규명하여 리모델링과 재프로그래밍을 효율을 높이고자 하는 시도도 이루어지고 있음.

나. 최근에 ubiquitin-proteasome system (UPS)과 apoptosis 관련 단백질의 조절이 쥐 배아의 성숙과 수정과정에 매우 중요한 영향을 미친다는 사실이 보고되었으나, 그에 대한 체계적인 지식과 연구는 매우 부족한 실정. 그러므로 체외성숙과 체외수정 과정에서 일어나는 여러 가지 유전자 발현 변화와 그에 따른 apoptosis, UPS의 조절 메커니즘을 규명하는 연구가 반드시 이루어져야 할 것임. 또한 mitochondria dependent-apoptosis 관련 주요 유전자의 기능이 배제된 쥐의 배아를 이용하여 정상 쥐의 배아 사멸 메커니즘과의 차이를 규명하는 것은 형질전환 및 복제동물의 생산효율을 향상시키기 위해 반드시 수행해야 하는 연구 분야임.

9. 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 제고를 위한 유전자발굴과 기능구명 연구

가. 현재 핵치환을 통한 복제동물 생산 성공확률은 매우 낮은 수준으로 조기 폐사, 유산,

Very Low Efficiency of Animal Cloning



<그림 3> 복제동물의 복제율 효율성 비교

기형 출산 등으로 인해 복제 수정란의 2-5%만이 산자로 태어나고 있는 실정이기 때문에, 체외 수정 및 핵치환을 통한 형질전환 및 복제동물 생산기법의 성공확률을 높이는 것이 급선무인데, 이를 위해서는 복제동물 생산을 제고를 위한 수태관련 유전자 기능의 구명이 필요.

- 나. 또한 핵치환 복제를 통해 태어난 산자의 상당비율이 과체중, 거대태반, 고폐압 및 호흡기장애 등을 보이고 있어서, 이 기술의 산업화에 걸림돌이 되고 있어, 해결 방안이 시급히 필요한 실정. 특히, 최근 한우 체외 수정란 생산과 수정란 이식을 통해 축산 농가의 생산성을 향상 시키고 있는데 조기 유산 및 거대 산자 생산이 많이 보고되고 있어 해결 방안이 필요.
- 다. 포유동물 수정란의 초기 발생과정에 약 10,000개의 유전자가 관여한다고 추측되고 있으나, 체외 수정 및 핵치환 및 착상 시의 발현 변화에 대한 정보가 매우 미흡한 실정.
- 라. 체외 수정 및 핵치환 및 착상 시 변화되는 유전자의 기능을 구명하고, 이들의 발현을 조절하는 기술을 개발한다면, 수정란의 체외배양 시스템 및 착상 기술을 획기적으로 향상시켜 체외 수정란 및 복제 수정란의 이용 효율을 증진 시킬 수 있음.
- 마. 동물에 있어서 체외 수정 및 핵치환 란의 경우, 발생 과정에서 세포 사멸, 착상 및 산자 수 조절 관련 유전자의 발현 조절이 중요한 것으로 조사되고 있음. 또한, 이들 유전자의 전사 (transcription) 조절뿐만 아니라 생산된 단백질의 변성 (modification) 및 분해

(degradation) 기작도 매우 중요한 것으로 보고되고 있는데, 이들에 대한 체계적인 연구 및 정확한 조절 경로에 대한 연구가 매우 부족한 실정.

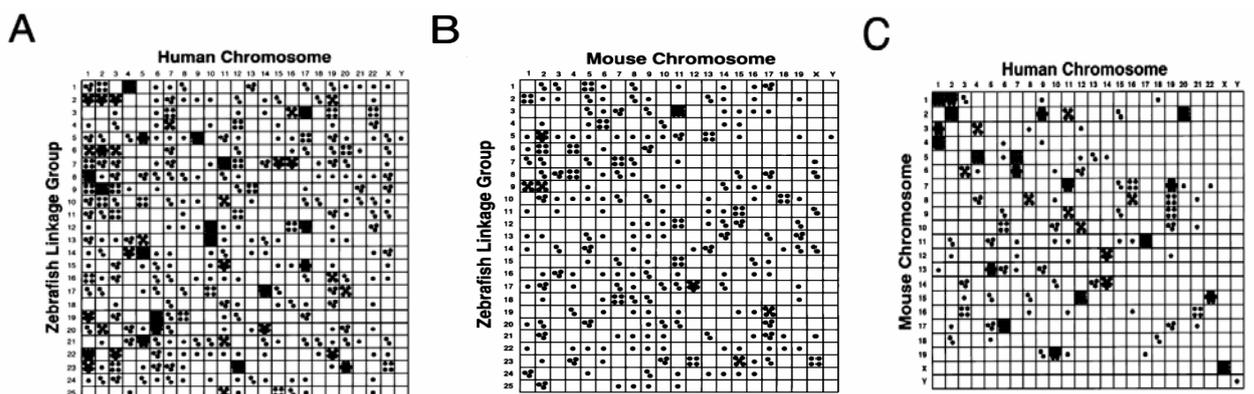
바. 가축에 있어서 착상 전후 배아 사망률이 20-30%에 이르고 있지만 관련 유전자의 기능 해석에 의한 원인 구명이 거의 이루어져 있지 않음.

사. 발생 및 착상관련 유전자의 기능 구명과 발현시기를 알 수 있다면 형질전환복제 동물의 수태율 증진과 함께 수정란의 체외배양시스템을 획기적으로 향상시켜 체외 수정란 및 복제 수정란의 이용 효율을 증진 시킬 수 있음.

10. 조작 유전자의 기능 규명과 안전성 시험을 위한 zebrafish 스크리닝 시스템의 확립

가. 인간에게 적용하기 위해 형질전환 복제동물을 만들 때에는, 형질전환이 개체의 발생에 미치는 영향과 조작 유전자의 생리적 기능에 대한 연구가 반드시 이루어져야 함. 그러나 쥐나 돼지를 이용한 스크리닝은 난자의 수가 적고 발생기간이 길어 현실적으로 어려운 점이 많음.

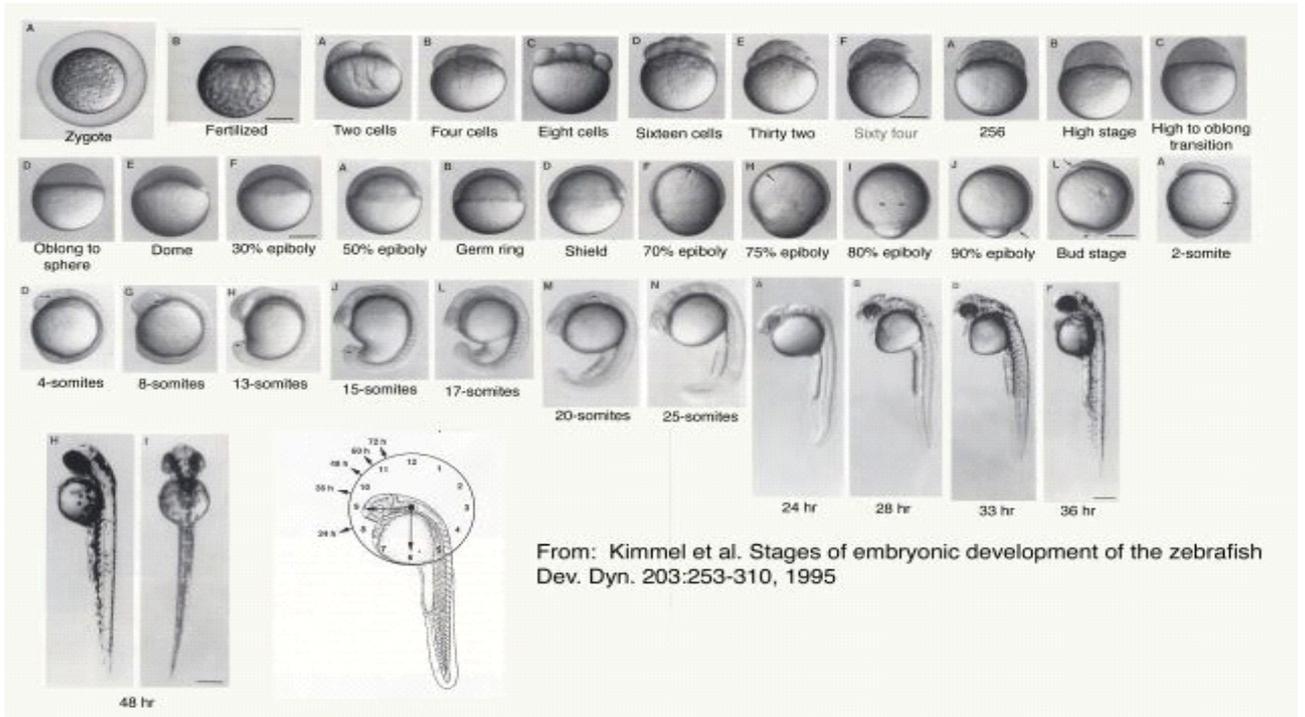
나. Zebrafish는 인간의 유전자와 매우 유사한 유전자들을 가지고 있는 척추동물임. 허파를 제외한 비장, 흉선 등 면역계를 포함한 대부분의 zebrafish의 장기는 기능과 형태학적인 측면에서 인간의 장기와 매우 유사하다. 따라서 zebrafish는 35,000개의 인간 유전자들의 발현양상과 생체 내 역할을 규명하기 위해 사용할 수 있는 whole-organism으로서 그 가치가 매우 높게 평가되고 있음.



<그림 4> Human chromosome과 zebrafish chromosome의 유사도 비교

다. 한 쌍의 zebrafish로부터 한 번에 약 200개 정도의 많은 수의 배아를 체외수정으로 얻을 수 있을 뿐만 아니라, DNA, RNA를 배아에 직접 주입하는 조작이 쉬워 RNA와 단백질 수준에서 유전자 발현을 조절하는 연구가 용이하다는 장점. 배아가 투명하며 48시간 내

에 발생이 완료되므로 주입한 유전자가 발생과정 동안 개체의 사망과 발생 변이에 관여하는 지를 외부에서 직접 관찰할 수 있으며, 실험 기간도 다른 척추동물보다 10배 이상 단축할 수 있음.

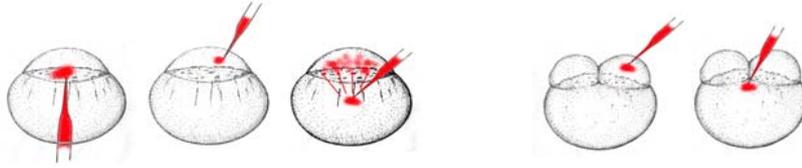


<그림 5> Zebrafish의 발생과정 : 48시간 내에 발생과정이 완료된다.

라. Zebrafish 시스템에서 유전자의 기능을 확인하기 위해 사용하는 방법은 매우 다양하다. Modified oligonucleotide인 morpolino system을 사용하여 타겟 유전자 mRNA가 translation되는 것을 방해함으로써 유전자의 발현을 억제하는 조작이 가능하며 그로 인한 변화는 발생 시작 12시간 정도부터 확인 가능 또한 인간이나 돼지 유전자의 mRNA를 직접 수정란에 주입하여 48시간 이내 발현을 확인하고 발생과정에 미치는 영향을 모니터링할 수 있다. DNA 주입을 통해 형질전환 zebrafish 제작은 물론, mammalian cell에서만 사용해 온 siRNA 기술을 이용하여 zebrafish에서 특정 유전자를 knock-down할 수 있음.

마. 따라서 돼지에서 제거할 면역 반응 관련 유전자(제 1세부 과제)를 zebrafish의 morpolino 시스템 혹은 RNAi 방법으로 knock down 하여 면역반응 관련 기능뿐만 아니라 발생 과정에 어떤 영향을 미치는지를 빠른 시간 내에 확인할 수 있음. 또한 체외 수정과 핵 치환을 거친 발생란의 발생 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 세포 사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자를 발굴하여(제 2세부 과제) 이 유전자의 기능을 규명하는 동시에 mopolino 시스템 혹은 zebrafish의 배아에 microinjection하여 생기는 발생

과정에서의 변화를 확인하여 이들 유전자를 제거하거나 발현을 증가시켰을 때 발생할 수 있는 여러 문제점들을 미리 예측, 해결할 수 있음.



<그림 6> Microinjection을 이용하여 zebrafish egg에 유전자를 도입

바. 이와같이 zebrafish를 이용한 효율적인 스크리닝 시스템을 확립하여 체외성숙과 수정에 관련된 유전자의 기능을 확인하고 면역반응관련 유전자들을 제거했을 때 발생에 미치는 영향을 연구함으로써 생체 내에서 유전자 발현과 기능과의 상호관계 및 단백질간의 조절 기전 등의 총체적인 단백질 네트워크를 이해할 수 있을 것임.

제2절 국내·외 바이오장기 분야

1. 국내 바이오장기 분야

- 가. 이종장기 생산용 복제동물 및 형질전환동물 관련 기술들은 국내에서도 확립되어 있어 국제 경쟁력이 있는 것으로 평가된다. 최근 서울대와 경상대에서 각각 독자적으로 체세포를 이용한 복제돼지 생산에 성공한 바 있고(2001), 이어서 서울대 연구팀은 형광 유전자를 지닌 형질전환 복제돼지 생산을 보고하였다(2003).
- 나. 이외에도 한국생명공학연구원, 축산연구소, 경상대, 건국대, 엠젠, 충남대, 충북대 등 여러 연구팀에서 이종장기 개발관련 기초 연구 및 복제돼지 개발에 관한 연구가 진행되고 있는 것으로 파악되고 있다.
- 다. 최근 서울대 및 축산연구소에서는 무균돼지 사육을 위한 기반시설을 갖추어 미래 이종장기 대량생산에 대비하고 있다. 이와 관련하여 국가에서는 향후 이종장기 분야의 중요성을 인식하여 범부처적으로 바이오장기를 차세대 성장동력사업으로 선정하여 연구개발에 착수하였다.
- 라. 고품장기 이식에 관한 제반 기술들은 그 동안 여러 종합병원에서 확립되었고 동물실험을 통한 이식기술의 증진을 도모하고 있는 것으로 파악되고 있다.
- 마. 줄기세포 연구를 위하여 과학기술부 21세기 프론티어 세포응용연구사업이 배아줄기세포, 성체줄기세포, 동물줄기세포 활용 등의 내용으로 진행되고 있다. 보건복지부에서는 초급성 이식거부반응을 극복하기 위하여 바이오이종장기 연구개발 센터사업을 착

수하였다(2003). 2004년부터 차세대성장동력사업의 일환으로 바이오장기 분야의 연구를 과학기술부, 농림부, 보건복지부에서 범부처적으로 수행하고 있다.

바. 보건복지부, 과학기술부, 농림부가 주축이 되어 바이오이종장기개발 사업단, 장기복제 이식기술 개발 사업단, 무균돼지 생산 사업단을 형성하였으며, 현재 활발히 바이오장기의 기반 기술연구, 임상연구, 산업화 연구를 시행하고 있다.

사. 무균돼지 생산 사업단은 인간에게 이식 가능한 형질전환 무균 복제 돼지의 생산체계를 구축하고, 바이오장기 생산동물의 관리기술 개발 및 형질전환복제동물의 생산효율 증진에 필요한 기술을 확립하여 면역적으로 인간에게 거부반응이 없는 돼지를 생산하는데 필요한 기반을 체계적으로 구축함으로써 바이오장기 생산 무균돼지의 산업화를 최종목표로 하고 있다.

아. 국내에서 이종장기 생산에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나 종합적이고 체계적인 연구개발 투자는 없으며 산업적으로는 최근 이종장기 이식을 위한 전문 바이오벤처 회사가 설립되어 집중적인 투자가 이루어지고 있다. 바이오장기 기술은 특성상 국내에서 해결되어야 하며 산·학·연 공동연구와 장기적이고 체계적인 지원이 이루어진다면 충분히 경쟁력을 확보할 수 있는 분야이다.

차. ㈜엠젠은 HLA-G 형질전환 돼지 및 HLA-G/DAF 이중형질전환 복제돼지를 2005년과 2007년에 개발했다.

2. 국외 바이오장기 분야

가. 현대의학이 발달하기 시작한 20세기 초부터 이종간 장기이식이 시도되었지만, 당시 면역학 기초이론이 미미하고 장기이식기술 또한 제대로 정립되지 않은 상화 하에서 시도되어 대부분 실패하였다. 그러나 많은 이종간 장기이식의 시도를 통하여 이종간 장기이식의 문제점이 종간 면역의 장벽에 의한 면역거부반응에서 기인한다는 것을 알게 되었으며, 이를 극복하기 위한 연구가 추진되기 시작하였다.

나. 지금까지 인간 이식용 바이오장기를 동물에서 생산하기 위한 연구는 먼저 이식 시 일어나는 면역거부반응을 극복하려는데 연구의 초점을 맞추고 실시해 왔다. 면역거부반응을 극복하기 위해서 크게 두 가지 측면에서 접근하고 있는데 첫째는 바이오장기를 이식하였을 때 인간의 면역 체계에 의한 면역거부반응을 억제하기 위한 면역억제제의 개발이며, 둘째는 면역거부반응이 일어나지 않도록 면역거부반응에 관련된 유전자를 조작한 바이오장기를 개발하는 것이다.

* 표. 2. 최근 형질전환 돼지의 장기이식 보고 현황

장기	형질전환 내용	이식동물	생존일	년도
심장	hDAF발현	원숭이	0-4일	2002
	hDAF 발현	개코원숭이	2-99일	2002
	hCD59/hDAF 발현	개코원숭이	6.7일	2000
	CD154, CD28/B7	개코원숭이	15일	2005
	hDAF 발현	개코원숭이	14.6일	2005
	GalT-KO	개코원숭이	6개월	2005
간	CD55, CD59 H-transferase 발현	개코원숭이	13-24시간	2005
신장	hDAF 발현	개코원숭이	20.7일	2004
피부	GnT-III, DAF 발현	원숭이	9일	2004
폐	hMCP 발현	개코원숭이	12시간	2002

* 출처 : Biosafety, 한국생명공학연구원 · 바이오안전성정보센터, 2007

다. 이종장기 생산을 위한 형질전환돼지 개발에 관한 연구는 선진국에서 약 15년여 전에 시작되었는데 영국의 Imutran사, 미국의 Nextrans사 및 Alexion사, 일본의 일청제분 및 일본햄 등 주로 산업체를 중심으로 수행되어 왔다. 영국에서는 사람 DAF(decay accelerating factor)와 MHC 유전자를 발현하는 형질전환돼지를 개발하였다.

라. 지난 10년 동안은 동물의 장기에 보체반응을 억제하는 억제인자를 과발현시켜 이식 후에 초급성 거부반응을 억제하려는 연구가 진행되어 왔다.

마. 영국 Imutran사에서는 사람 DAF 유전자를 발현하는 형질전환돼지의 심장을 이식받은 바분(baboon) 원숭이가 초급성 이식 거부반응을 나타내지 않고 21일까지 생존하였다고 보고하였으며, 신장이식의 경우는 35일까지 생존하였다고 보고하였다. 이것은 형질전환기술에 의해 초급성거부반응은 어느 정도 극복가능하다는 것을 시사 하였다.

바. 영국 Immutran사에서는 살아있는 돼지 조직을 이식받은 160명의 환자의 혈청을 추적 조사하였을때 내인성 돼지 레트로바이러스의 발현이 전혀 검출되지 않았다고 보고하였다.

사. 미국 Missouri-Columbia대와 Immerge Bio Therapeutic사는 초급성 이식거부반응의 주원인으로 알려진 $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase 유전자를 적중시킨 형질전환 복제돼지 개발에 최초로 성공하였고, 이 후 유사한 성공사례가 계속해서 보고되고 있다. 미주리대에서 개발한 초급성 이식거부반응 관련 유전자가 적중된 돼지의 심장을 영장류에 이식하였을 때 영장류가 이식거부반응 없이 81일까지 생존하였다는 결과도 보고되고 있다.

아. 미국 NIH 산하기관에서만 이종이식 연구에 1999~2003년 사이 약 30억 달러의 연구비가 지원되고 있다. 일본도 바이오장기 관련 연구에 문부성, 후생성, 과기청, 통산성 등 범부처적인 연구지원을 하고 있다. 한 예로서, 일본은 2000년 “밀레니엄 프로젝트”의

일환으로서 재생의학 분야의 연구를 적극적으로 추진하기 위하여 이화학연구소 (RIKEN) 소속의 발생학센터(Center for Developmental Biology)를 설립하였고 2003년까지 약 239억엔(약 2,400억원)의 예산을 투자하고 있다.

차. 선진국의 민간기업에서는 바이오장기의 중요성을 인식하고 바이오장기기술 선점을 위한 경쟁이 치열한 편이다. 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서는 연구의 수익성과 잠재력을 예견하고 정부보다 민간기업에서 더 적극적으로 연구개발을 위한 투자를 하고 있다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 이론적, 실험적 접근방법

1. 제 1 세부연구과제

본 연구에서는 미니돼지의 체세포에 인간 면역억제 유전자를 주입하고 이를 체세포 복제 기법을 통해 형질전환 복제 미니돼지를 생산하여 이종장기 이식 시 일어나는 급성 면역 거부반응 및 세포성 면역거부반응을 억제할 수 있도록 하는 것이며 다음과 같은 방법이 이용되었다.

가. 돼지의 제작

- 임신된 돼지 태아를 면도날로 잘게 자른 후 세포를 trypsin-EDTA가 첨가된 배지에서 5분간 배양한다. 상층액을 원심분리한 후 10% FBS가 포함된 배지에서 배양하고 세포가 90% confluency에 이르면 trypsinization시켜 계대배양하여 일부는 핵이식에 이용하고 나머지는 동결 보존 한다.

나. HLA-G 및 DAF gene 분리 확보

- JEG-3 cell line(HLA-G)을 37°C, 5% CO₂에서 배양한 후 TRIZOL Reagent (Invitrogen, Inc)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 AMV Reverse Transcriptase(Invitrogen, Inc)를 이용하여 cDNA를 만들고 Bam HI/Hind III enzyme site를 첨가한 primer(forward 5'-ATG/GAT/CCG/GAT/GGT/GGT/CAT/GGC/GCC C-3' Reverse 5'-ACT/AAG/CTT/AGC/CTG/AGA/GTA/GCT/CCC/TCC/TT-3')를 사용하여 PCR(95°C-4min, 95°C-1min, 58°C-1min, 72°C-1min(30cycle), 72°C-10min, 4°C-forever)을 통해 HLA-G gene을 얻었다. 그 후 gel elution을 통해 다량의 HLA-G DNA를 얻어 sequencing 의뢰를 통해 100% HLA-G gene이 일치함을 확인하였다. 한편 human liver cDNA library를 이용하여 EcoR I site가 포함된 DAF primer(Forward 5'-TAG/AAT/TCG/TTC/TAA/CCC/GGC/GCG/CCA/TG-3', Reverse 5'-TAG/AAT/TCA/AGA/AAC/TAG/GAA/CAG/TCT/GT-3')를 사용하여 PCR을 실시한 결과(95°C-4min, 95°C-1min, 56°C-1min, 72°C-1min(30cycle), 72°C-10min, 4°C-forever) hDAF gene을 확보하고 마찬가지로 gel elution을 통해 다량의 hDAF DNA를 얻어 sequencing 의뢰를 통해 100% gene이 일치하는 것을 확인하였다.

다. HLA-G 및 DAF 발현 벡터 제작

- HLA-G 발현 벡터는 pcDNA 3.1, hDAF 발현 벡터는 pCX-BSD 벡터를 사용하였다. pcDNA 3.1의 MCS(mutl-cloning site)을 Bam HI과 Hind III 제한효소로 절단한 후 이 위치에 T4 DNA ligase(Roche, Inc)를 이용하여 HLA-G gene을 ligation을 시켰고 또한 pCX-BSD 부분의 EcoRI 부분에 T4 DNA ligase를 사용하여 hDAF gene을 ligation시켰다. 완성된 vector에 Bam HI과 Hind III, EcoRI 제한효소로 절단한 후 HLA-G gene의 삽입과 hDAF gene을 확인하였고 또한 세포내 주입을 위해 DNA를 제한효소로 절단하여 단일가닥으로 만든 후 phenol extraction법으로 DNA를 분리하였다.

라. HLA-G, hDAF 발현백터의 세포내 주입 및 확인

- 미니돼지의 체세포에 완성된 HLA-G 백터를 그리고 HLA-G 유전자가 발현하는 미니 돼지의 귀세포에 hDAF 발현 백터를 lipofectamin 2000을 이용하여 transfection을 시킨 후 HLA-G는 G418, hDAF는 BSD로 2주간 selection을 실시하여 colony를 확보하고 배양하였다. 배양된 colony를 48well에 옮기고 일주일간 배양한 후 이를 다시 6well plate에 옮긴다. 일부 cell을 이용하여 1.5ml tube에 cell을 모은 후 이를 lysis buffer를 이용하여 cell을 lysis를 시킨다. 그 후 일부를 사용하여 colony PCR 분석을 실시하였다. PCR 결과 HLA-G(1024bp), hDAF(1200bp)를 확인하였고 정상적으로 미니 돼지의 체세포 안에 HLA-G와 hDAF가 주입되었음을 확인하였다.

마. 유세포 분석

- Colony PCR을 통하여 양성으로 확인된 체세포는 6well 2개로 나누어 일주일 정도 배양 후 primary antibody로 HLA-G는 MEM-G9 monoclonal antibody, hDAF는 anti-CD55 monoclonal antibody를 사용하고 secondary antibody는 anti-mouse-FITC를 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. 대조군으로 normal 미니돼지 체세포를 사용하였고 대조군에 비해 샘플에서 HLA-G와 hDAF가 현격히 증가하는 샘플들을 얻을 수 있었다.

바. 면역조직 화학염색 분석

- 유세포 분석에서 발현이 증가한 세포주를 선별하여 Chamber slide를 사용하여 세포를 배양한 후 media를 제거 후 cold PBS로 수차례 washing 하고 95% EtOH을 사용하여 세포를 고정을 시킨 후 HLA-G 4H84 monoclonal antibody, anti-CD55 monoclonal antibody를 사용하여 면역 조직 화학 분석을 실시하였다.

사. HLA-G 태아세포, 자돈 PCR 분석

- 대리모에 HLA-G 수정란을 이식 후 1달 후에 임신 유무를 확인하고 임신에 성공한 대리모의 태아를 35일령이 된 후에 자궁에서 꺼내어 4마리의 태아를 확인하고 태아세포주를 만들었다. 제작된 태아세포주의 HLA-G 유전자 발현 유무를 확인하기 위해 HLA-G gene primer를 사용하여 PCR을 실시하였다.

또한 두 마리의 대리모 임신 돈에서 총 9마리의 돼지 산자를 생산하였는데 갓 태어난 9마리의 산자들의 태반을 이용하여 genomic DNA를 추출하였고 PCR 분석을 실시하였다. 확인결과 9마리 모두 형질전환을 확인하였다. 생후 20일령 후에 돼지 산자의 귀 조직을 떼어내어 곧바로 동결 시킨 후 H&E staining 및 면역 조직 화학 염색을 실시하였다.

아. NK 세포독성 분석

- 핵이식에 사용된 HLA-G 양성 체세포주와 태아세포주, HLA-G 자돈 귀세포, HLA-G/DAF 양성 체세포주의 세포성 면역 활성 억제 실험을 위해 NK 세포 세포독성실험을 실시하였다. 세포독성 실험은 MTT assay method를 사용하였고 effector 세포로는 NK92MI를 사용하였다. 96well plate에 3×10^4 의 세포를 39°C incubator에 실험 전날배양하고 실험 당일에 NK92MI 세포를 10배로 늘려 샘플이 있는 plate에 넣고 8시간 이하로 배양을 실시한다. 그

후 MTT 용액을 20ul씩 넣고 4시간 배양을 하고 crystal이 관찰된 후 media를 모두 제거한 후에 DMSO 200ul를 넣어 crystal을 녹인 후 540nm에서 값을 읽는다.

차. LDH 분석

- HLA-G/DAF 세포의 유세포 분석에서 양성으로 확인된 샘플들을 이용하여 초급성 면역활성 억제 실험을 위해 LDH assay 실시하였다. 실시 결과 음성대조군과 샘플을 비교하였을 때 샘플들이 비교적 독성을 억제하는 것을 확인하였다. expose를 실시한다. 96well plate에 FACS 및 western positive sample(target cell)을 24시간 전에 2×10^4 의 cell을 깔고 배양한다. 다음날 cell이 잘 자랐는지 확인 후 건강한 사람의 혈액을 15ml 뽑아 vacutainer에서 30분간 상온에 둔 후 혈액이 응고되면 2000rpm, 10분간 원심분리한다. 원심분리 후 노란색 액체부분(혈청)을 따서 tube에 옮겨놓는다. 그 후 media와 섞은 후 experimental well(실험군 sample) 및 effector cell spontaneous release값에 사용한다. 또한 target cell spontaneous release, target cell maximum release, volume 및 medium back ground control을 준비한 후 5% CO₂, 39°C에서 6시간 정도 배양 후 10ul의 lysis buffer를 첨가 후 45분간 5% CO₂, 39°C에서 배양한다. 그 후 250g, 4분간 원심분리, 새로운 96well plate에 50ul씩 옮긴 후 assay buffer를 넣은 후 상온에서 30분간 배양, 50ul stop solution 첨가 후 ELISA reader로 492nm에서 측정한다.

차. 핵이식

- 난포란의 채취를 위한 난소를 도축장에서 38°C 생리식염수가 들어있는 보온병을 이용하여 실험실로 운반하였다. 18 gauge 주사기를 이용하여 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 난구세포가 2~3층이상 치밀하게 붙고 세포질이 균일한 난포란을 선별하여 0.5 $\mu\text{g/ml}$ LH, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ FSH, 10ng/ml EGF가 첨가된 TCM-199 성숙액에서 42~44시간 성숙하였다. 세포질이 균일하고 제1극체가 방출된 MII기 난자를 실험에 이용하였다. 핵이식은 제1극체와 그 주변의 핵을 제거하는 탈핵을 하고, 제거한 부위에 공여세포를 주입하여 실시하였다. 용합은 110V, 30 μs , 2회 통전을 실시하였다. 체외배양은 BSA가 첨가된 NCSU-23에서 배양을 실시하였다. 제작된 복제수정란을 대리모에 이식하였고 한달 후에 임신 유무를 확인하였다.

타. 미니돼지 췌장세포 분리

- 동물 수술실에서 돼지를 마취시킨 후 수술을 통하여 비장, 십이지장 과 연결된 췌장을 분리 하여 냉장보관된 HBSS 에 보관한 후 실험실로 췌장을 이송한다. 췌장의 무게를 측정 후 pancreatic duct에 20gauge catheter 를 통해 0.15% Liberase PI (dissolved in HBSS)을 주입하여 췌장을 팽창시켜서 췌도를 따라서 효소가 췌장내에 들어가서 내분비 및 외분비 세포를 분리할 수 있게 효소반응을 유도한다. 팽창된 췌장을 여러 조각으로 분할하여 유리조각 및 철그물(pore-size: 500um)이 들어있는 스테인레스 챔버에 투입한 후 37 OC 의 500ml HBSS 용액을 챔버내로 순환시켜서 Liberase PI 을 활성화시켜 내분비 및 외분비세포를 췌장에서 분리하여 반응 후 4분부터 매분마다 10ml 주사기로 500ul 뽑아서 dithiazone 염색을 통해 인슐린을 포함하는 내분비 세포의 양을 현미경하에서 측정하며 반응시간 결정 (chamber는 가볍게 흔들어 가면서 반응시키며 최종 반응시간이 결정되면 강하게 흔들어서 췌장 조각을 잘게 분해함). 효소

반응된 세포액을 20ml의 효소불활성 용액 (HBSS supplemented with 10% FBS and DNase) 이 들어있는 50ml conical tube에 30ml 씩 분주한 후 원심분리하여 세포를 침전시킨다. HBSS (10 % FBS)용액으로 3회 세척한다 (2000 rpm, 1min). 침전된 세포를 commercial UW 용액 100ml (2% FBS)로 부유시킨 후 얼음에서 30분간 방치. 수확된 세포의 일부를 취해 DTZ 염색을 통해 내분비 세포의 숫자를 알아냄. COBE 2000 (Cobe BCT Inc, USA) 원심분리기에 Continuous Ficoll Gradient (1.077 -> 1.110)를 형성한 후 100ml UW 용액으로 부유시킨 췌장세포용액을 첨가하여 원심분리 후 50ml conical tube에 분주하여 각 conical tube에서 일부를 취하여 DTZ 염색법을 이용하여 내분비 세포의 순수 분리 (>80%)를 결정한다. 내분비 세포의 숫자가 80% 이상되는 tube 의 ficoll 을 원심분리를 이용하여 제거한 후 HBSS (10% FBS) 용액으로 2회 세척한다 (2000 rpm, 2min). 침전된 내분비 세포를 M199 또는 CMRL1066 배양액으로 부유시킨 후 DTZ 염색을 통하여 내분비세포의 숫자를 결정한 후 150mm 배양접시에 50,000 개씩 분주하여 CO2 incubator에 배양함.

카. 면역결핍 생쥐를 이용한 췌도세포 이식

- 면역거부 반응과 관련된 T cell 및 B cell 에 이상을 보이는 Rag-/- 마우스의 꼬리정맥에 Streptozotocin (240mg/g)을 투여하여 당뇨병을 유도한다. 혈당수치가 350mg/ml 이상인 상태로 3일이상 유지되면 당뇨병에 걸린 것으로 판단한다. 이들 당뇨병 유발 생쥐의 kidney capsule 에 돼지로부터 유래된 췌장세포를 3000 또는 5000 Insulin Equivalent (IEQ)를 주입한 후 혈액내의 당농도를 측정하여 이식된 췌장세포의 기능을 검증 함. Immunohistochemistry를 통하여 이식된 돼지 췌장 세포의 생존여부를 검증한다. 돼지의 췌장으로부터 분리한 islet cell을 마우스의 kidney capsule에 이식하여 당뇨병이 유발된 마우스에 정상적인 췌장기능을 수행할 수 있는 이식 췌장세포의 숫자 및 생체내의 이식세포의 생존가능성을 검증하였으며 약 5000 IEQ 정도의 세포를 이식하여 기능 회복 및 세포생존성이 우수함을 확인하였다.

2. 제 1 협동연구과제

- 가. 각 발생단계별로 분리된 porcine 난자들로부터 발현량에 차이를 나타내는 유전자 15개를 찾아내고, 이들의 염기서열과 기능을 분석하였다. 이 중, NADH1은 NADH6와 함께 energy metabolism에 관여하는 유전자로 알려져 있다. KCRF (potassium channel regulatory protein factor)는 potassium ion의 channel을 통한 이동을 조절하는 factor로 알려졌다. AY713975인 pig의 Bax Inhibitor 1 (BI-1)라는 유전자와 homology를 가지고 있었다. NM015447의 human과 84% homology를 갖는 CAMSAP1 (calmodulin regulated spectrin-associated protein1)으로 밝혀졌다. HERC3 (hect domain and RLD 3)는 ubiquitin protein ligase activity를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 일부 유전자의 siRNA를 제작하여 유전자의 기능을 zebra fish 및 생쥐에서 일차적으로 분석하고 있다.

- 나. 돼지 난자에 있어서 maturation 단계에서 몇몇 유전자 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 기존의 bovine에서 maturation단계에서 여러 유전자들의 mRNA 발현이 증가한다는 연구 결과와 동일함을 알 수 있었다. 그리고, apoptosis

에 관여하여 조절하는 유전자인 Bcl-2 family가 난자 발달이나 embryo형성에도 관여한다고 보고된 바 있어서, pro-apoptotic 역할을 하는 BAX와 anti-apoptotic 역할을 하는 Bcl-2, bcl-XL의 발현을 분석하였고, AAA (ATPases associated with diverse cellular activities)-protease family 유전자들도 분석하였다.

- 다. 난자 발생에서의 유전자 발현량 차이가 정상적인 발생에 매우 중요함을 transcription 억제제인 α -amanitin처리를 통해 분석하였는데, α -amanitin을 처리한 난자에서는 난자 주위에 cumulus cell들이 확장되어 있지 않고, 여전히 Gap junction되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. Control 난자의 성숙 효율은 74% 이상인 반면, α -amanitin 처리 난자는 8%에 불과하였고, translation 억제제인 cycloheximide를 처리한 난자는 48% 정도 되는 것으로 나타났다.
- 라. 성공적으로 복제 돼지를 얻기 위해서 난자의 올바른 성숙이 초기 착상과 최종적으로 산자를 얻는데 중요하게 작용하게 된다. 특히 *in vitro* 배양한 난자의 quality는 복제 돼지를 만드는데 매우 중요하다. 본 GeneFishing 실험결과에서 여러 유전자들이 성숙난에서 높은 발현을 보였던 것처럼, 아폽토시스 관련 유전자들 및 AAA protease 등의 단백질 분해 관련 유전자들이 정상적으로 완전히 성숙된 양질의 난자를 만드는데 관여할 것으로 생각된다.
- 마. 수정란 발생에서 발현량의 차이를 나타내었던 아폽토시스 조절 단백질 BI-1의 정상 PWG 미니돼지와 복제 PWG 미니돼지간의 각 조직별 발현차이를 RT-PCR을 통하여 살펴본 결과, 정상 PWG 미니돼지는 Testis에서 발현이 가장 높았으며, Heart를 제외한 kidney, lung, liver, spleen에서 발현이 됨을 확인하였다. 복제 PWG 미니돼지는 testis를 비롯하여 각 조직에서 발현이 되었으며, 소뇌와 대뇌에서는 상대적으로 발현이 낮음을 확인하였다.
- 바. 배 발달에 중요한 세포사멸 조절인자 중 하나인 Bcl-2가 SAPK (stress activated protein kinase) 신호전달계에 미치는 영향을 조사해 보았다. SAPK는 Bcl-2에 의해 활성이 저해되었고, 이는 Bcl-2의 dose에 의존하여 저해됨을 알 수 있었다. 그리고 Bcl-2는 SEK1과 MEKK1 모두의 활성을 저해하였다. 즉 Bcl-2는 SAPK경로의 활성을 MEKK1 상위에서 저해함을 알 수 있었다.
- 사. 아폽토시스에 매우 중요한 단백질인 ASK1 및 CAD 단백질과 상호결합하여 아폽토시스를 억제하는 기능을 가지고 있는 CIAA 유전자가 초기 배 발달 및 착상 시기에 유전자 발현의 차이를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 CIAA 단백질은 배 발달에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고된 Formin 류의 단백질들과 서로 상호 결합하는 것을 발견할 수 있었다.
- 아. Formin family 단백질 중 하나인 Formin2 (Fmn2)는 불임(Infertility)과 관련된 난소 유전자(ovary gene)로 최근 밝혀졌는데, 이 Formin2가 CIAA와 상호작용하여, 발생에 중요한 역할을 담당할 것으로 예측할 수 있었다.

차. Fmn2는 Formin family 단백질 중의 하나인데, 이 family에는 Fmn, Fhos, Dia, Bni 등 여러 단백질이 포함된다. 최근에, 세포 골격 (cytoskeleton)의 핵심 구성 요소인 액틴(actin)의 생성을 조절하는 단백질이 동정됐는데, 이 동정된 단백질은 Bni1p라 불리는 것으로 포르민(formin)이란 단백질 군에 속하였다. 앞으로 아포토시스 관련 단백질인 CIIA와 배 발달에 필수적인 기능을 수행하며 불임과 관련된 Formin family 단백질 간의 상호 작용 기작을 분석하고 세포 골격 조절 능력을 분석함으로써 정상 배 발달 관련 마크로 활용하고, 배 발달률 증진에 활용하고자 한다.

타. 착상 관련 유전자를 분석하는 연구를 진행하였다. 앞으로 Leukaemia inhibitory factor (LIF), BI-1, MMP-1, MMP-9, CIIA, Formin, Dia, integrin, TGF-1, JNK, ERK, ErbB1 등에 대한 기초적인 유전자 발현 연구를 체계적으로 진행할 계획이다.

1) Porcine sample로부터 total RNA 추출 및 cDNA 합성

Porcine oocyte의 발달 과정 배아를 단계별로 각 100개 sample을 얻어서 TRIzol (Invitrogen)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 이 RNA sample의 일부를 spectrophotometer를 사용하여 정량하고 그 다음 과정의 cDNA 합성에 사용하였다.

2) Differential mRNA level을 보인 genes의 elution

PCR product 15ul를 1.2% ethidium bromide-stained agarose gel에 loading하여 electrophoresis를 실시한 후 UV illuminator에서 long-wave의 UV를 이용하여 확인 후, target band를 잘라내었다. 잘라낸 agarose gel에서 PCR product는 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)을 이용하여 정제하였다.

3) Subcloning 확인을 위한 제한 효소 처리

miniprep.하여 얻은 각 cloned DNA내에 insert size를 확인하기 위해 제한효소로 37°C에서 반응시킨 후, ethidium bromide-stained 1.2% agarose gel에 100bp ladder(MBI)와 함께 loading한 후 electrophoresis (Mupid)를 통하여 size를 확인하였다.

4) NCBI GeneBank의 BLAST search program을 통한 sequencing 분석

homology search 분석 프로그램 사이트인 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 sequencing한 각 clones의 sequence를 입력하여, 기존의 알려진 유전자나 EST와 비교 분석을 실시하였다.

5) RT(reverse-transcription) PCR

Taq buffer (TaKaRa), dNTP (TaKaRa), cDNA template에 각각의 forward와 reverse primer (20mM)를 첨가하였으며, PCR조건은 94°C 3분으로 one cycle로 denaturation, 94°C 30초, 62°C 30초, 72°C 30초로 35 cycle로 PCR 증폭하였고, 72°C 7분으로 final extension하여 PCR 반응을 완료하였다.

6) Real-Time RT-PCR Quantification

mRNA를 추출하여 reverse transcription하여 real-time quantitative RT-PCR에 사용하였다. PCR반응에는 sequence specific primers는 Primer3 Software v0.2c program을 이용하여 design하였다. DNA Engine OPTICON3 (MJ Research, San Francisco, CA) 기기를 이용하여 실시하였으며, 2X SYBR Green qPCR premix (FINNZYMES) 10ul에 1ul의 sequence specific forward 와 reverse primers (20 pmole/ul)을 각각 넣고, 1ul의 cDNA(2ug)을 넣은 후 멸균 3차증류수로 총 20ul로 맞추었다. 세 번의 PCR실험을 수행하였고, house keeping gene인 porcine GAPDH의 mRNA발현으로서 normalize하였다. 또한, 상대적인 값은 calibrator인 IM(immature oocyte)에 대한 값이며, 상대적인 발현 차이를 calibrator인 IM(immature oocyte)에 대한 n-fold로 나타내었다.

7) 돼지 미성숙 난자의 체외 성숙

도살된 돼지의 난소로부터 회수한 돼지 미성숙난자는 TCM-199 배양액에 10% porcine follicular fluid (pFF), 0.5 μ g/ml Folltropin-V, 100 IU/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin이 첨가된 500 μ l의 배양액 내에 50개씩 침지시킨 후 39°C, 5% CO₂의 배양기내에서 체외성숙을 유도했다. α -amanitin은 25ug/ml농도로 처리하였으며, cycloheximide는 10uM를 6, 24, 44시간 동안 처리하여 성숙시켰다.

8) mouse에서 *in vivo*와 *in vitro* 난자 채취 및 배양

mouse 난자의 sampling은 C57BL/6(6 weeks, female) mouse를 사용했다. 다음의 과정은 모두 mineral oil안의 CZB-HEPES drop에서 진행하였다. 미성숙난자 채취는 PMSG(pregnant mare serum gonadotropin, 5IU)를 복강 주사한, mouse의 난소를 48시간 이후에 적출하여, chopping한 후, follicle cell을 300ug/ml 농도의 Hyaluronidase가 첨가된 media에서 제거한 후, GV(germinal vesicle) 단계의 Oocyte를 구분해서 sampling 하였다. 그리고, 성숙된 난자의 채취는 위의 방법으로 얻은 난자를 18-20시간 동안(37°C, 5% CO₂ incubator) IVC(*in vitro* culture)하여, first polarbody의 확인을 통해 구분, 채취하였다. 동시에 α -amanitin을 25ug/ml, cycloheximid 10uM를 각각 처리하여, 마찬가지로 18-20시간동안 IVM(*in vitro* maturation)을 실시하면서, 성숙된 난자를 구분, 채취하였으며, 성숙 과정 중에 일어나는 유전자의 발현 변화양상을 보는 실험에 사용하였다. 각 샘플을 얻기 위하여 총 5회씩 404개의 난자를 실험에 사용하였다.

9) RT(reverse-transcription) PCR

각 발생 단계의 난자 및 배아 샘플로부터 mRNA를 추출하여 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성 후, RT-PCR에 사용하였다. PCR반응에는 sequence specific primers는 Primer3 Software v0.2c 프로그램을 이용하여 디자인하였다 (Table 1). PCR 조건으로 95°C에서 30초, 58-60°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 총 30회 반복하고, 72°C 10분 동안 final extension하여 반응을 종료하였다. 세 번의 독립적인 PCR 실험을 수행하였고, house keeping gene인 돼지 GAPDH의 mRNA발현으로서 일정한 양으로 보정하였다.

10) 난자 및 배아의 채취

난자의 sampling은 C57BL/6(6 weeks, female) mouse를 사용했다. 다음의 과정은 모두 mineral oil안의 CZB-HEPES drop에서 진행하였다. 미성숙난자 채취는 PMSG(pregnant mare serum gonadotropin, 5IU)를 복강 주사한, mouse의 난소를 48시간 이후에 적출하여, chopping한 후, follicle cell을 300ug/ml 농도의 Hyaluronidase가 첨가된 media에서 제거한 후, GV(germinal vesicle) 단계의 Oocyte를 구분해서 sampling 하였다. 그리고, 성숙된 난자의 채취는 위의 방법으로 얻은 난자를 18-20시간 동안(37°C, 5% CO₂ incubator) IVC(*in vitro* culture)하여, first polarbody의 확인을 통해 구분, 채취하였다. 이후, 2세포기와 4세포기, Morula, 배반포기의 배아 샘플들을 채취하였다.

11) Cell culture, Transfection, Etoposide와 H₂O₂ 처리

293T 세포주는 10% fetal bovine serum과 항생제 (50 µg/ml streptomycin 및 50 U/ml penicillin)가 첨가된 DMEM으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 100 mm 배양조에 배양하였고 2일에서 3일에 한번 씩 분주함과 동시에 배양액을 갈아주었다. DNA transfection을 위하여, LipofectAMINE(Life Technologies, Inc.), electroporation 등을 이용하여 각각의 플라스미드를 세포주 내로 도입하였다. Etoposide를 30uM의 농도, H₂O₂ 300uM의 농도로 각각의 세포 샘플에 처리하였다.

12) DAPI 염색

293T 세포를 PBS로 세 번 수세한 후, cell을 acetone/methanol (50:50, vol/vol)로 5분간 고정시킨 후 PBS로 3번 정도 수세 후 형광을 띠며 DNA에 결합하는 염색액인 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 2 µg/ml)용액으로 5분간 염색하였다. 그리고 PBS로 2-3번 정도 수세 후 염색된 핵의 모양은 형광현미경 (Zeiss) 하에서 ultraviolet excitation filter (300-500 nm)를 통해 관찰하였다.

13) 형광 현미경을 이용한 ROS의 측정

세포 내 활성산소종의 농도는 oxidant-sensitive fluorescent probe인 DCFHDA를 이용해서 역상 현미경으로 측정되었다. 세포는 (1 x 10⁶ cells/ml) 35 mm 배양조에서 배양액과 함께 12시간 배양하였다. 세포는 serum free 배지로 2번 수세 후 16시간 starvation을 시켰다. 그 후 세포는 2 µM doxorubicin을 12시간 처리 후 5 mM DCFHDA를 30°C에서 30분간 처리하였다. 그 후 PBS로 4번 수세하고 cover glass를 덮은 다음 역상 형광 현미경 (excitation, 488 nm; emission, 520nm)을 이용하여 확인했다.

14) 형광세기를 이용한 ROS의 측정

세포 내 ROS의 생성 정도는 oxidant sensitive probe인 DCFHDA를 사용하여 excitation 파장은 504 nm, emission 파장은 524 nm에서 peroxide에 의해 DCFHDA가 산화되어 생성되는 DCF의 형광을 측정하였다. 측정하기 30분 전에 DCFHDA를 300 mM 되도록 처리하고 30°C에서 배양한 후 세포를 모은 후 sonication buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM *p*-nitrophenol phosphate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 초음파 파쇄기로 4 초씩 7회 파쇄한 후 12,000 x g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액의 단백질을 BSA를 표준 물질로 하여 BCA 단백질 정량 kit을 이용해 562 nm에서 흡광도를 측정하여 정

량 한 후 동일한 양의 단백질을 가지고 형광세기를 측정하였다.

15) RT(reverse-transcription) PCR을 이용한 발현 확인

세포에 TRIZOL을 1ml 넣어서 풀어준다. 여기에 Chloroform을 200ul 넣어서 vortexing 후, 원심분리해서 상층액을 새 tube에 옮겨준다. 동량의 isopropanool을 넣고 -70°C에서 12시간 보관한 다음, 원심분리 하여서 나온 pellet을 물에 녹인다. RNA 정량 후, MMLV reverse transcriptase (promega)를 사용해서 제조사의 사용 방법대로 cDNA를 합성하였다. PCR은 Afg3L2 primer로 PCR을 하여 수행하고, house keeping gene인 GAPDH의 mRNA 발현으로서 일정한 양으로 보정하였다.

16) MTT assay

96 well plate에 세포를 각각 5×10^3 개/well로 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한 뒤에 농도별로 H₂O₂을 처리하였다. 24시간 뒤에 배지를 제거한 후 MTT solution(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 0.05mg/ml)을 50 µl씩 처리하여 4시간 동안 배양한다. MTT solution을 제거하고 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 150 µl씩 넣어 주었다. ELISA reader를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

17) Flow cytometry를 이용한 ROS의 측정

12 well plate에 세포를 각각 1×10^5 개/well로 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후에 H₂O₂와 NAC를 처리하였다. 세포 내 ROS의 생성 정도는 oxidant sensitive probe인 DCFHDA를 사용하여 flow cytometry를 이용하여 peroxide에 의해 DCFHDA가 산화되어 생성되는 DCF의 형광을 측정하였다. DCFHDA를 300 mM 되도록 처리하고 37°C에서 30분간 배양한 후 PBS에 3번 씻어낸 후 측정하였다.

18) Flow cytometry를 이용한 미토콘드리아 막전위의 측정

12 well plate에 세포를 각각 1×10^5 개/well로 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후에 H₂O₂와 NAC를 처리하였다. 미토콘드리아 막전위를 측정하는 DiOC₆를 세포에 40 nM로 처리 후 37°C에서 30분간 배양한 후 PBS에 3번 씻어낸 후 측정하였다.

19) 3차 배양

세포배양시에 plate에 기존 배양액과 chollagen I (20:1)을 섞은 배지를 미리 coating한다. 그리고 37°C, 5% CO₂에서 1시간 incubation 후에 배양에 이용하였다.

20) Mouse embryo in vitro culture

C57BL/6 마우스에 PMSG주사. 48시간 후에 hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다. mating 후에 난자를 1cell 단계에서 채취하여, M16배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양 하였다.

21) Mouse 유래 ES cell 배양

마우스 배아 유래 줄기세포인 D3(CRL-1934, ATCC)세포를 이용하였다. 0.1% gelatin 코팅된 dish에서 knockout Dulbecco's modified Eagle's medium(KO-DMEM; Life

Technologies; Paisley, UK) 을 이용하여 배양하였으며, 20% fetal bovine serum을 첨가하여 배양하였다. 2 mM L-glutamine (Sigma), a nucleoside mixture of 3 mM Guanosine, 3 mM Cytidine, 3 mM Adenosine, 3 mM Uridine and 1 mM Thymidine, 0.1 mM 2- mercaptoethanol (Sigma) 와 leukemia inhibitory factor (1000 units/ml of ESGRO; Chemicon International; Middlesex, UK)가 첨가되었으며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

22) Western blotting

Sample은 정량을 한 후에 20 ug씩 loading하였다. SDS-PAGE gel에 electrophoresis (5X buffer : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)를 120 V로 1시간 30분간 한 후에 transfer buffer (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 20% methanol)에서 65분간 95 V, 4°C 조건으로 membrane (Schleicher and Schuell, Protran10401396)에 transfer를 실시하였다. 이후 1시간 동안 5% Skim milk에 blocking을 실시한 후 washing (TBST: 25 mM Tris-Cl (PH7.4) 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 30분, 1차 항체를 5% skim milk에 희석하여 binding (2시간)시켰으며, 2차 항체 (Amersham Bio. Anti rabbit IgG HRP, NA934V/Cell Signalling, Anti mouse IgG HRP, #7076)는 1시간 동안 binding 시켰다. 매 단계마다 30분간 washing을 실시하였다. 그 후에 ECL용액 (Amersham Boi. RPN2106)을 membrane에 뿌려주고 암실에서 detection을 하였다.

23) 돼지 난자의 배양 및 시약처리

돼지의 난포란의 채취를 위한 난소를 도축장에서 38°C 생리식염수가 들어있는 보온병을 이용하여 실험실로 운반하였다. 18 gauge 주사기를 이용하여 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질이 균일한 난포란을 선별하여 0.5 µg/ml LH, 0.5 µg/ml FSH, 10 ng/ml EGF가 첨가된 TCM-199 성숙액에서 42~44시간 성숙하였다. 성숙된 난자는 난구세포를 제거하고, 세포질이 균일하며 제1극체가 방출된 MII기 난자를 실험에 이용하였다. 단위 발생은 전기적 자극으로 110 V, 30 µs, 2회 통전을 실시하여 0.4% BSA가 첨가된 NCSU-23에 Flavonoid를 농도에 따라 39°C 5% CO₂ INCUBATOR에서 7일간 체외배양을 실시하였고, 단위 발생수정란은 형광염색을 통하여 분할율, 배반포기 발달을 및 핵 수를 관찰하였다.

3. 제 2 협동연구과제

가. 형질전환과 복제과정에서 여러 유전자들이 생체에 미치는 영향을 분석하기 위한 스크리닝 방법으로 zebrafish 시스템을 구축하였다. Zebrafish 생육의 최적 조건을 조성, zebrafish 배양 시스템을 구축하고 이와 더불어 실험에 이용할 embryo의 수확을 원활하게 하기위한 시스템도 구축하였다. 확보한 embryo에 apoptosis 및 UPS 관련 유전자를 DNA 혹은 RNA 형태로 microinjection하는 방법을 확립하기 위해 각 유전자마다 발현 정도와 특성을 고려, DNA나 RNA의 양을 조절하는 등 zebrafish embryo에서의 최적 발현 조건을 결정하였다.

- 나. 유전자의 *in vivo* 기능을 연구하기 위하여 pCS2+ zebrafish용 vector에 cloning 시스템 구축하였다. Apoptosis 및 UPS 관련된 human HtrA2와 zebrafish HtrA 유전자를 확보하여 pCS2+ vector에 cloning하고 DNA를 embryo에 microinjection하여 HtrA2의 발현을 형광현미경으로 확인하였다. Injection한 embryo 중 75~85%의 embryo에서 HtrA2 발현이 확인되며, HtrA2의 발현에 따라 embryo의 꼬리 생성이 억제되거나 머리 모양이 기형을 나타내며 등이 굽는 등의 형태 변화가 관찰되었다. 이러한 형태 변화가 일어난 embryo는 정상적인 발생을 이루지 못하였다.
- 다. Zebrafish의 형질전환 여부를 확인하기 위해서 genotyping, immunostaining, RT (reverse transcription)-PCR 실험 방법을 확립하였다. 현재 본 실험실에서 보유하고 있는 HuC- α -synuclein 형질전환 zebrafish는 조직 특이적인 HuC promoter에 의해 신경계에서만 α -synuclein 단백질이 발현되는 형질전환체이다. 이를 이용하여 꼬리지느러미에서 genomic DNA를 추출, α -synuclein 유전자에 특이적인 primer로 PCR을 수행하여 형질전환 개체를 분리해 낼 수 있었다. 분리해낸 개체의 배아를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 α -synuclein 유전자의 transcript가 제대로 형성되는지의 여부도 확인하였다. 또한 이들 배아를 α -synuclein 항체를 이용하여 immunostaining을 실시한 결과, 신경계에서 α -synuclein 단백질이 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 위의 방법으로 apoptosis, UPS 관련 유전자와 면역거부반응 관련 유전자의 형질전환체를 만드는 경우 genomic DNA typing을 통해 원하는 개체만 쉽게 분리할 수 있고, RT-PCR, immunostaining을 통해 특정 유전자의 발현, 발현의 위치와 발생에서의 변화를 쉽게 확인할 수 있다.
- 라. 특정 유전자의 과발현 또는 배아초기발생에 중요한 유전자를 억제하여 나타나는 다른 여러 단백질의 발현 변화 양상을 보다 뚜렷하게 확인할 수 있는 *in situ* hybridization을 확립하였다. 뇌의 흑질에 특이적으로 세포사멸을 일으키는 MPTP 신경독소를 처리했을 때 초기 발생에서부터 zebrafish의 운동성 저하와 비정상적인 몸의 구부러짐이 관찰되었고, 흑질이 점차 소실되는 것을 관찰할 수 있었다. 흑질세포 특이적인 dopamine transporter의 DIG labelled-RNA probe를 이용하여 MPTP을 처리한 배아를 *in situ* hybridization한 결과 dopamine transporter의 발현양이 감소하였으며 이것으로 흑질세포가 특이적으로 감소했다는 것을 알 수 있었다.
- 마. Microinjection을 통한 유전자의 발현으로 일어나는 apoptosis를 zebrafish에서 확인하기 위한 여러 가지 실험 방법을 구축하였다. HtrA2 DNA나 RNA를 injection 한 뒤 acridine orange staining을 이용하여 형광현미경 하에서 apoptosis 유무를 확인하였다. 그 결과 발생 중 굽어진 꼬리, 정상보다 짧게 발생된 꼬리나, 정상보다 작은 머리 등 심한 형태 변화를 보이는 곳에 apoptosis가 많이 일어난 것을 알 수 있었으며 이것으로 HtrA2가 발생 과정에 특정 부위에서 발현되면 매우 뚜렷한 apoptosis 현상을 보이며 따라서 정상적인 발생이 이루어지지 않는다는 것을 확인하였다. Apoptosis를 좀 더 체계적으로 연구하기 위하여 TUNEL assay를 진행 중이며 apoptosis에 관련된 여러 가지 유전자를 microinjection하고 zebrafish에서 유전자의 발현과 조절을 확인할 수 있는 또 다른 방법을 구축하여, apoptosis 유전자 및 UPS 관련 유전자가 배발생에 미치는 연구를 좀 더 체계적으로 진행할 예정이다.

바. 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 도입과 면역거부반응 관련 유전자의 제거 효과를 단기간에 확인할 수 있는 제브라피시 시스템을 확립

- RNA, DNA microinjection technology을 이용하여 zebrafish 특정 유전자의 발현 시스템 확립
- *In situ* hybridization과 immunostaining으로 zebrafish에 도입한 유전자의 기능을 확인

사. Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포사멸 메커니즘을 규명

- 세포사멸관련 유전자가 제거된 쥐의 배아를 분리하여 체외에서 세포배양

아. Apoptosis 관련 유전자인 caspase-3 유전자를 확보하여 우선적으로 cell에서의 발현과 세포사멸정도를 확인 하였고, 1차년도에서 구축된 microinjection시스템을 통하여 caspase-3 과발현을 통한 유전자의 기능과 embryo의 발생과의 상관관계를 연구하였다. 발생과정에서 꼬리의 비정상적인 발생과 머리가 작아지는 형태적 변화를 확인하였다. 이를 바탕으로 TUNEL, AO staining을 통해 apoptosis가 일어난 부위가 caspase-3에 의한 것임을 확인하는 추가 실험을 예정중이다.

차. 1차년도에서 microinjection을 통하여 연구하였던 apoptosis 관련 유전자인 HtrA2의 연구를 계속 진행하기 위해 in silico screening을 통하여 상동성이 높은 zebrafish HtrA1 (zHtrA1) 유전자를 확인 하였고, zebrafish larvae cDNA를 이용하여 유전자를 확보하였다. 이를 주형으로 하여 DIG-labeled RNA probe를 제작하여 embryo 발생 단계에서 zHtrA1의 발현 양상을 확인하였다. zHtrA1은 발생 초기에서부터 ubiquitously하게 발현되고 있으며, 모든 장기의 발생이 끝나는 발생 후 48시간에도 eye와 head, body, tail까지 전체적으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 zHtrA1이 발생은 물론이고, 성체에서도 생체 내 항상성 유지를 위한 중요한 유전자임을 추측할 수 있다.

타. Apoptosis 관련 유전자인 HtrA2의 생체 내 조절 기능을 확인하기 위하여 pGEX vector 시스템을 이용하여 HtrA2의 substrate를 탐색하였다. 세포사멸과 생체 내 항산화 작용을 통한 항상성 유지에 중요한 단백질로 알려져 있는 SOD1과 함께 in vitro cleavage test를 실시하였고 SOD1이 HtrA2에 의해 절단되어 지는 것을 확인하였다. 이는 SOD1과 HtrA2가 세포사멸기전에서 밀접한 상관관계가 있음을 나타낸다.

카. 또 다른 방법으로, 활성이 제거된 *mnd2* mice를 이용하여 HtrA2의 substrate screening을 실시하였다. liver와 brain을 적출하여 fractionation 방법을 통해 mitochondrial lysates 얻었고, 이를 정제된 HtrA2와 반응시켰다. HtrA2의 substrate로 알려진 HAX-1의 항체를 이용하여 western blotting analysis를 통해 변화를 확인하였고, hetero, homozygous *mnd2* mice에서 정상적인 mice와 다르게 나타났다. 이러한 HtrA2등의 세포사멸 유전자의 연구를 위하여 다양한 방법으로 계속적인 실험을 진행할 예정이다.

제2절 년차별 연구내용

1. 제1세부과제

연구 내용	추진 일정		
	1 단계	1 단계	1 단계
	1년차	2년차	3년차
제 1 세부과제 : 세포성 면역조절을 위한 HLA-G 형질전환 복제돼지의 개발			
<input type="checkbox"/> HLA-G 유전자 확보 및 체세포주 확립			
- HLA-G 유전자 검색, 확보 및 유전자 벡터개발과 발생초기 돼지에 서의 세포주 확립 및 동결			
- 태아 세포내 벡터의 주입 및 형질전환 체세포 완성 및 특성분석			
<input type="checkbox"/> HLA-G 형질전환 복제돼지 생산			
- 복제란의 체외 생산 및 대리모 이식과 복제란의 체외 생산 체계 극대화 및 임신유지 최적화			
- 형질전환 복제돼지 생산 효율 증진 및 세포학적 특성 분석			
<input type="checkbox"/> HLA-G/DAF 형질전환 복제돼지의 유용성 검토			
- 형질전환 복제돼지의 표현형 검사			
- 복제효율 증진 유전자가 주입된 돼지 형질전환 세포주의 개발			

2. 제1협동과제

연구 내용	추진 일정		
	1 단계	1 단계	1 단계
	1년차	2년차	3년차
제 1 협동과제 : 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 제고를 위한 유전자발굴과 기능구명 연구			
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 세포 사멸 및 세포성장 조절 관련 유전자 확보 및 siRNA 개발			
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 유전자의 기능 연구			
- 세포주 및 실험동물을 통한 기능 연구 (제 3 세부과제와 공동연구)			
<input type="checkbox"/> 착상 전후 발현 이상 유전자 확보 및 기능 연구			
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 발생과정에서 중요한 발생 초기 발달 및 착상 조절 관련 유전자의 발현 양상 연구			
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 변성 및 분해 조절 관련 연구			
- 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 변성 (인산화, ubiquitination 등)에 관한 연구			
- 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 UPS 또는 AAA protease에 의한 분해 조절 관련 연구			
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 기능 조절을 통한 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 증진 연구			
- 세포주 및 실험동물을 통한 기능 연구 결과의 활용 (제 2 및 3 세부과제 결과를 실험동물에서 활용)			
- 제 2 및 3 세부과제 결과를 제 1 세부과제에서 형질전환복제 돼지에 활용			

3. 제2협동과제

연구 내용	추진 일정		
	1 단계	1 단계	1 단계
	1년차	2년차	3년차
제 2 협동과제 : 형질전환·복제동물 생산기술의 효율성 향상과 안전성 확보를 위한 제브라피시 스크리닝 시스템의 확립			
<input type="checkbox"/> 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 도입과 면역거부반응 관련 유전자의 제거 효과를 단기간에 확인할 수 있는 zebrafish 시스템을 확립			
- RNA, DNA microinjection technology, morpolino system을 이용하여 zebrafish 특정 유전자의 발현과 제거 시스템 확립			
- <i>In situ</i> hybridization과 immunostaining, western blotting 으로 zebrafish에 도입한 유전자의 기능을 확인			
- 확보한 transgenic zebrafish를 다른 유전자의 transgenic zebrafish와 교배하여 개체의 발생과 구조 등에 미치는 영향을 확인			
<input type="checkbox"/> Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포 사멸 메커니즘을 규명			
- 세포사멸관련 유전자가 제거된 쥐의 배아를 분리하여 체외 배양			
- western blotting, immunostaining, in situ hybridization으로 정상 쥐 배아와 세포사멸관련 유전자가 제거된 쥐 배아의 수정, 성숙, 발생의 차이를 확인			

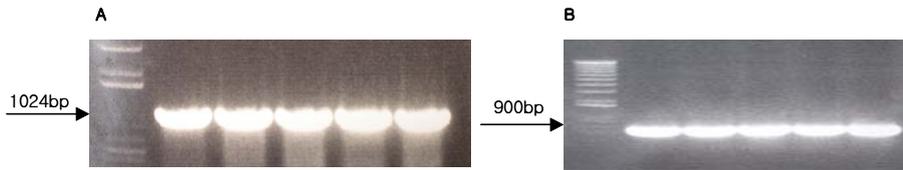
제3절 연구결과

1. 1년차 연구결과

가. 제1세부과제

1) HLA-G 유전자 검색, 분리 및 확보

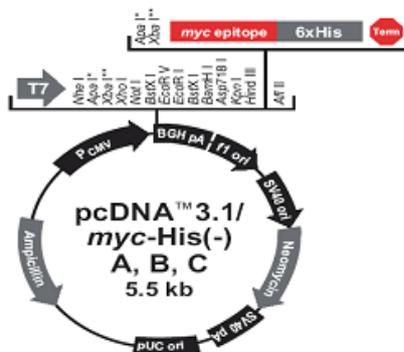
- JEG-3 cell line을 37°C, 5% CO2에서 배양한 후 TRIZOL Reagent (Invitrogen, Inc)를 사용하여 RNA를 분리하였다. AMV Reverse Transcriptase(Invitrogen, Inc)를 이용하여 cDNA를 만들고 Bam HI/Hind III enzyme site를 첨가한 primer를 사용한 PCR을 통해 HLA-G gene을 얻었다. 그 후 gel elution을 통해 다량의 HLA-G DNA를 얻어 sequencing 의뢰를 통해 100% HLA-G gene이 일치함을 확인하였다.(그림 1.)



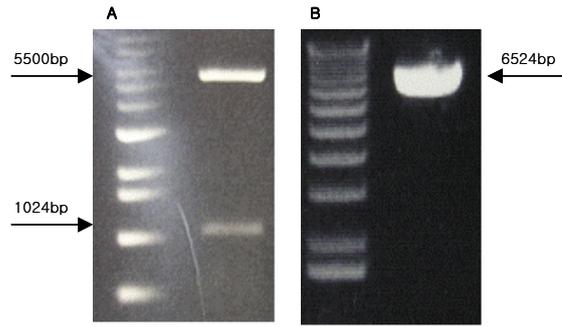
<그림 7> JEG-3 세포의 HLA-G cDNA PCR 결과(A) 및 GAPDH 결과(B)

2) HLA-G 세포매개성 면역조절 유전자 벡터 개발

- HLA-G를 발현 벡터는 pcDNA 3.1 (Invitrogen, Inc; 그림 2.)을 사용하였다. pcDNA 3.1의 MCS(mutl-cloning site)을 제한효소로 절단한 후 이 위치에 T4 DNA ligase(Roche, Inc)를 이용하여 HLA-G gene을 ligation을 시켰다. 완성된 vector를 제한효소로 절단한 후 HLA-G gene의 삽입을 확인하였고(그림 3A.) 또한 제한효소를 절단하여 단일가닥으로 만든 후(그림 3B.) phenol extraction법으로 DNA를 분리하였다.



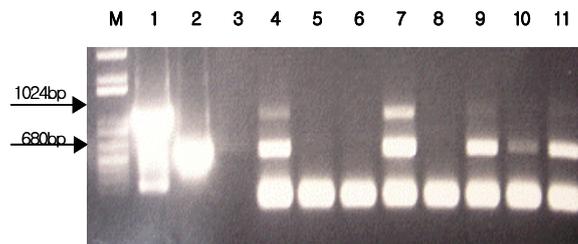
<그림 8> HLA-G 유전자를 클로닝 한 pcDNA 3.1 벡터



<그림 9> 제한효소 처리를 통한 HLA-G 유전자 확인

3) 미니 돼지 체세포에서의 HLA-G gene 확인

- 돼지의 체세포에 완성된 HLA-G 발현 벡터를 주입하고 lipofectamin 2000을 이용하여 transfection을 시킨 후 G418로 selection을 실시하여 colony를 확보하고 배양하였다. 배양된 colony의 일부를 double colony PCR 분석을 통하여 HLA-G(1024kb), neo gene(680bp)를 확인하였고 정상적으로 미니 돼지의 체세포 안에 HLA-G가 주입되었음을 확인하였다.(그림 4.)



Lane M : Maker

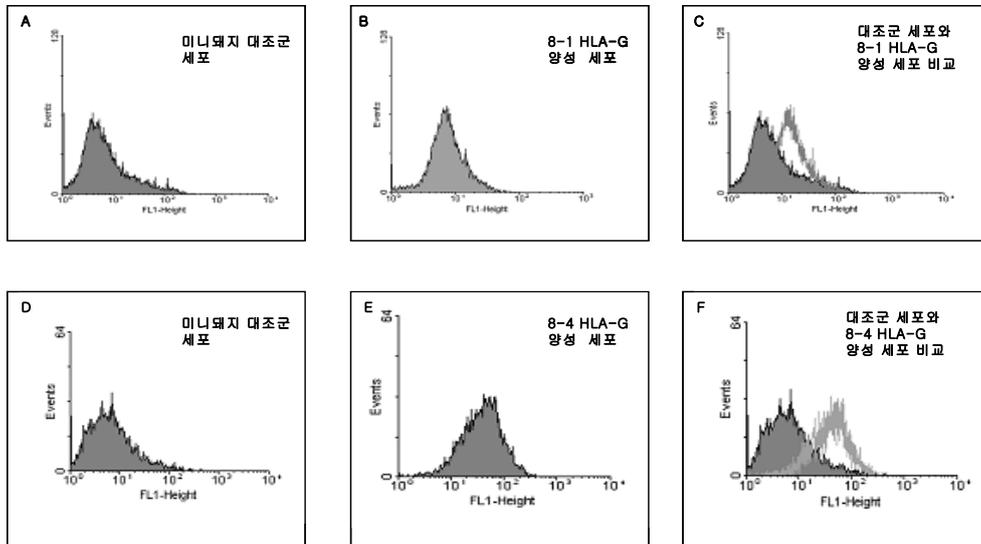
- 1 : HLA-G 유전자 양성 대조군 밴드(1024bp)
- 2 : pcDNA 벡터 네오마이신 내성 유전자(neo) 양성 대조군 밴드(680bp)
- 3 : 음성대조군(미니돼지 체세포)
- 4 : 8-1 HLA-G 유전자 양성 샘플
- 7 : 8-4 HLA-G 유전자 양성 샘플
- 9 : 8-6 HLA-G 유전자 양성 샘플
- 11 : 8-8 HLA-G 유전자 양성 샘플

<그림 10> 미니돼지 세포를 이용한 double PCR 분석

4) HLA-G 양성 체세포의 유세포 분석

- Double PCR을 통하여 양성으로 확인된 체세포는 60mm dish 2개로 나누어 일주일 정도 배양 후 MEM-G9 monoclonal antibody를 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. 분석 결과 양성 체세포 샘플의 HLA-G 발현이 대조군 샘플에 비해 현저히 증가 하

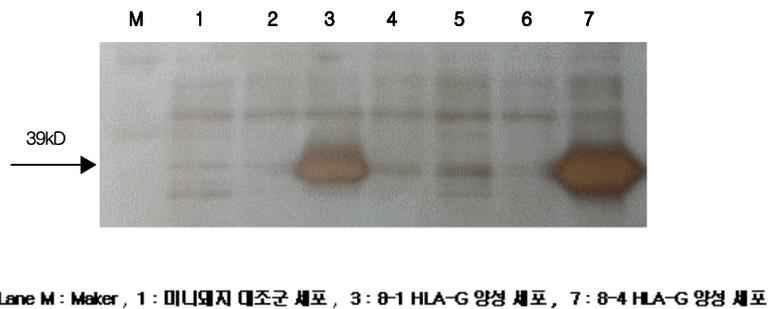
는 것을 볼 수 있었다 (그림 11).



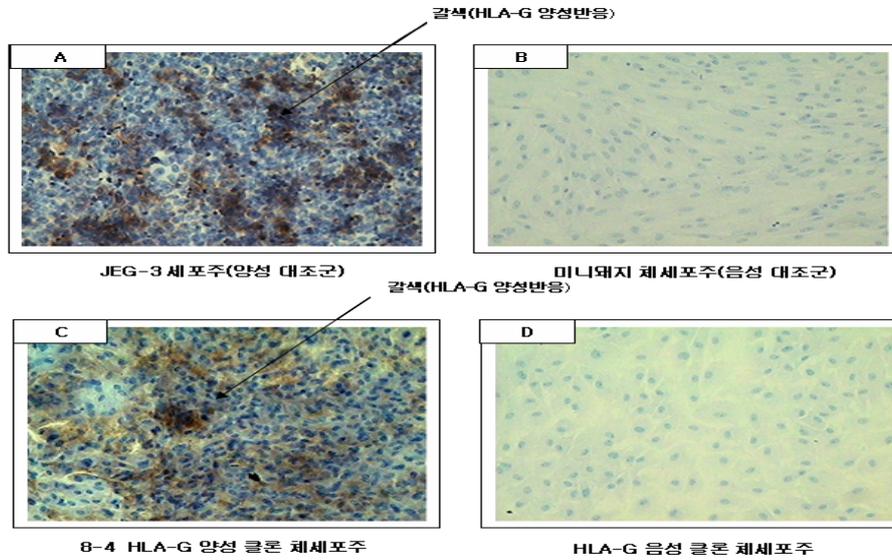
<그림 11> 미니뎀지 대조군 세포와 HLA-G 양성 세포의 유세포 분석

5) HLA-G 양성 체세포의 western blot 과 면역 조직 화학 염색 분석

- 유세포 분석에서 발현이 증가한 세포주를 대상으로 protein level에서의 발현 확인을 위해 4H84 monoclonal antibody를 사용하여 western blot과 면역 조직 화학 분석을 실시 하였다. 그 결과 유세포 분석에서와 마찬가지로 western blot에서도 HLA-G의 expect size인 39kD의 band가 확인 되었으며(그림 12) 면역 조직 화학 염색에서도 HLA-G 발현을 확인하였다 (그림 13).



<그림 12> HLA-G 양성세포의 western blotting



<그림 13> 면역 조직 화학 염색

6) HLA-G 태아 세포의 형질전환 확인 분석

- 대리모에 HLA-G 수정란을 이식 후 1달 후에 임신 유무를 확인하고 임신에 성공한 대리모의 태아를 35일령이 된 후에 자궁에서 꺼내어 4마리의 태아를 확인하고 태아세포주를 만들었다. 제작된 태아세포주의 HLA-G 유전자 발현 유무를 확인하기 위해 HLA-G gene primer와 nen gene primer를 동시에 첨가하여 double PCR을 실시하였다. 확인 결과 4개의 태아세포주에서 HLA-G gene이 확인되었다 (그림 14).



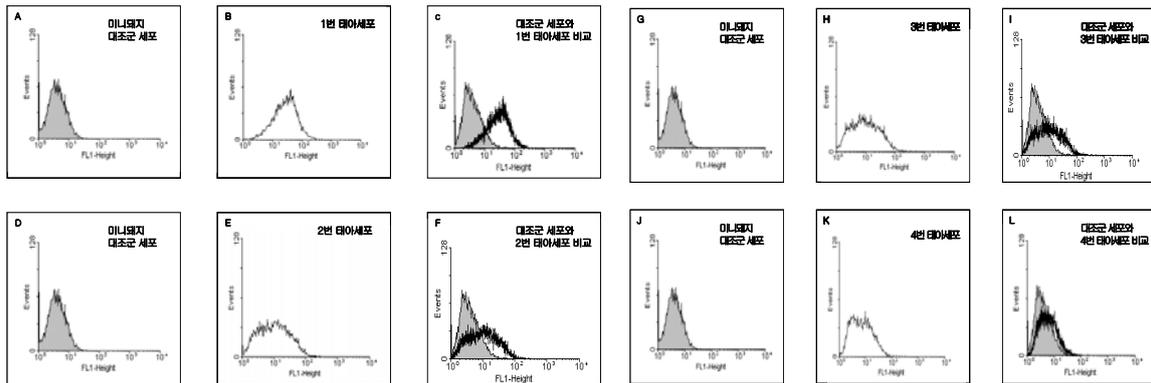
<그림 14> 태아세포를 이용한 double PCR 분석

Lane M : Maker

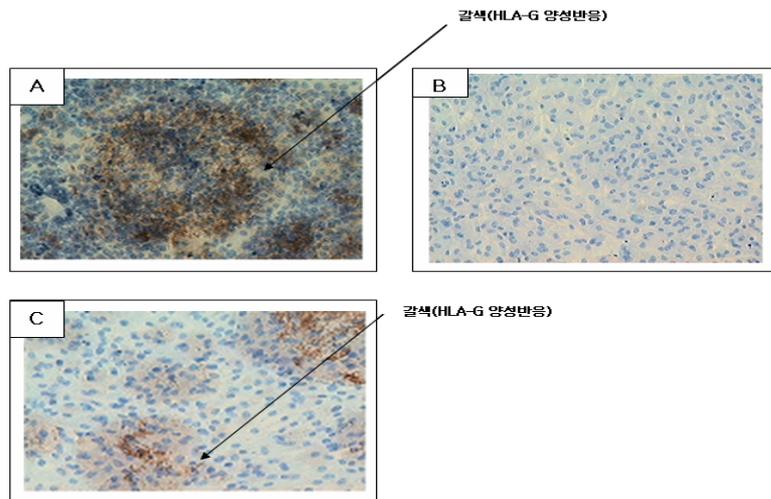
- 1 : HLA-G 유전자 양성 대조군 밴드(1024bp) 및 pcDNA 벡터 네오마이신 내성 유전자(neo) 양성대조군 밴드(680bp)
- 2 : 음성 대조군 (D.W)
- 3 : 음성 대조군 (HLA-G, neo primer)
- 4 : 음성 대조군 (대리모 체세포)
- 5 : 1번 태아세포
- 6 : 2번 태아세포
- 7 : 3번 태아세포
- 8 : 4번 태아세포

7) 태아세포의 유세포 분석 및 면역 조직 화학 염색 분석

- PCR 결과로 확인된 태아세포를 유세포 분석(그림 15) 및 면역 조직 화학 염색 분석(그림 16)을 양성 체세포주의 동일한 분석 방법을 통하여 HLA-G의 발현 유무를 확인하였다. 유세포 분석에서 태아세포주는 대조군 세포에 비해 그래프가 이동한 것을 볼 수 있다. 특히 4개의 태아세포주에서 1번 태아세포가 대조군 세포에 비해 현저하게 이동하는 것을 볼 수 있다. 또한 면역 조직 화학 염색에서도 HLA-G가 발현됨을 확인하였다.



<그림 15> 미니패지 대조군 세포와 태아세포의 유세포 분석

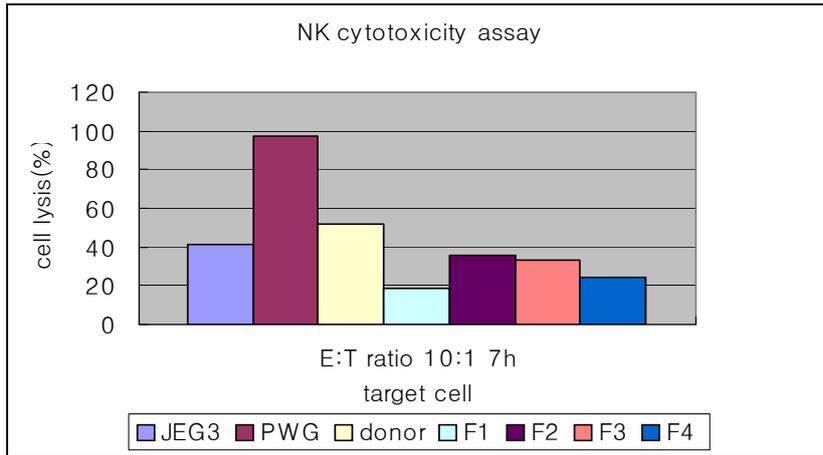


A: HLA-G 양성 대조군 세포 염색 B: HLA-G 음성 대조군 세포 염색
C: 1번 태아 세포 염색

<그림 16> 태아세포의 면역 조직 화학 염색

8) HLA-G 양성 체세포주 및 태아세포주의 human NK cell cytotoxicity assay

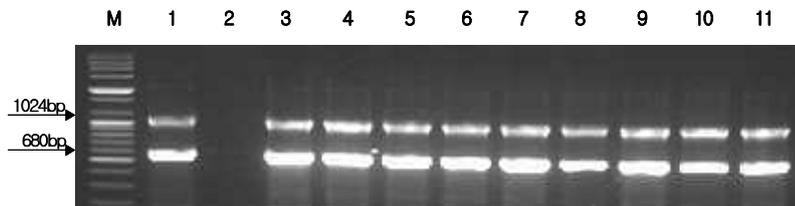
- 핵이식에 사용된 HLA-G 양성 체세포주와 태아세포주의 세포성 면역 활성 억제 실험을 위해 NK 세포 세포독성실험을 실시하였다. 실시 결과 양성 대조군세포(JEG-3, 하늘색)는 42%, 음성대조군 세포(PWG, 자주색)는 98%, 양성대조군 세포(HLA-G 양성 체세포, 노란색)는 55%, 1번 태아세포주(F1, 옥색) 19%의 결과를 확인하였다. 즉, 유세포 분석에서 다른 태아세포주 보다 많은 이동을 보인 1번 태아세포주가 NK 세포 세포독성 실험에서도 좋은 결과를 보였다.



<그림 17> HLA-G 양성세포 및 태아세포의 NK cytotoxicity assay

9) HLA-G 복제돼지 산자의 형질전환 확인 및 면역 조직 화학 염색 분석

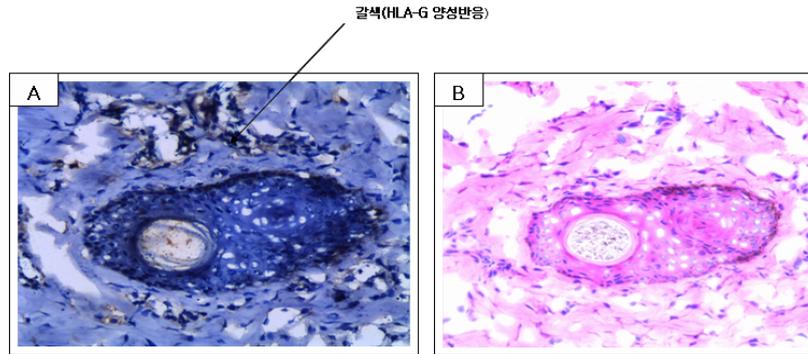
- 두 마리의 대리모 임신 돈에서 총 9마리의 돼지 산자를 생산하였다 (그림 20). 갓 태어난 9 마리의 산자들의 태반을 이용하여 genomic DNA를 추출하였고 double PCR 분석을 실시하였다. 확인결과 9마리 모두 형질전환을 확인하였다(그림 18). 생후 20일령 후에 돼지 산자의 귀 조직을 떼어내어 곧바로 동결 시킨 후 H&E staining 및 면역 조직 화학 염색을 실시하였다. 실시 결과 조직에서 HLA-G가 발견되는 것을 확인하였다.(그림 19)



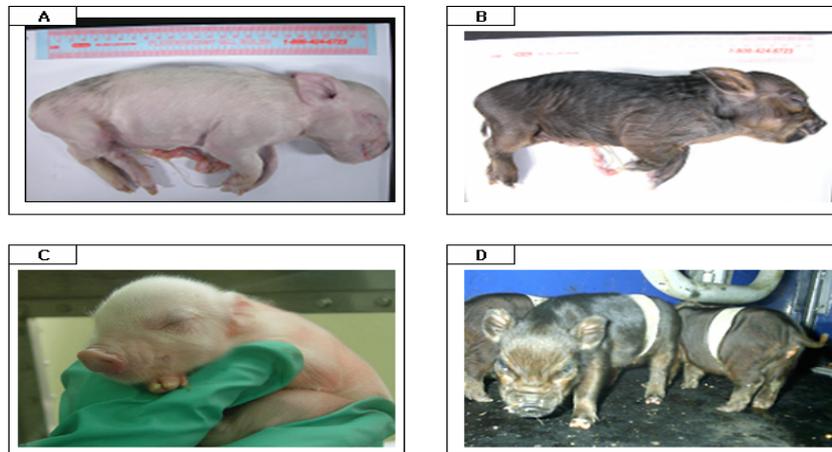
<그림 18> 복제돼지 산자 체세포를 이용한 double PCR분석

Lane M : Maker

- 1 : HLA-G 유전자 양성 대조군 밴드(1024bp) 및 pcDNA 벡터 네오마이신 내성 유전자(neo) 양성대조군 밴드(680bp)
- 2 : 음성 대조군(대리모 체세포)
- 3-11 : 복제돼지 산자 샘플



<그림 19> 복제돼지 산자 귀 조직 면역 조직 화학 염색(A) 및 H&E 염색(B)



<그림 20> HLA-G를 발현하는 복제돼지 산자

나. 제1협동과제

1) 각 발생단계별로 분리된 porcine 난자들로부터 방법에 명시한 대로 total RNA를 추출하였으며, spectrophotometer를 사용하여 그 농도를 측정하였다. 각 발생단계에서 발현 차이를 보이는 유전자들을 동정하는 실험을 진행하였다. 1 (미성숙단계), 2 (성숙 단계), 3 (IVF후 cleaved 2-4cell 단계)의 1ul cDNA를 2 ul의 10X reaction buffer (TaKaRa), 2 ul의 25 mM MgCl₂ (TaKaRa), 2 ul의 2.5mM dNTP (TaKaRa), GeneFishing PCR에서 동일하게 첨가하는 1 ul의 reverse primer dT-ACP2 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXX(T)15-3')와 서로 다른 20개의 forward primer인 arbitrary ACP(Annealing control primer)를 각 1 ul 씩을 각각 넣고, Taq polymerase (TaKaRa) 1ul를 넣어 총 20 ul로 맞추어 GeneFishing PCR을 실시하였다. 그로부터 얻은 PCR product를 각 5 ul씩 1.2%의 ethidium bromide-stained agarose gel에 loading 후 electrophoresis를 통하여 얻은 사진이다. 그 중 총 56개의 differential mRNA level을 보인 clones를 선별하여 표시하였다. Control은 GeneFishing kit에서 제공하는 E4.5일 제와 E12일제의 mouse의 conceptus tissues에서 추출

한 total RNAs을 사용하여 합성한 cDNA(10ng/ul) 1ul를 주형으로 forward primer로서 ACP13 과 reverse primer인 dT-ACP2 을 이용하여 Gene Fishing PCR을 실시한 결과이다. ACP-based GeneFishing PCR을 통하여 differential display한 clone들을 각 발생 단계에서 발현율의 차이를 기준으로 분류하였을 때, 특히 maturation단계에서 난자 내 유전자들의 발현율이 높아지는 것으로 나타났다. 즉, maturation단계에서 상대적으로 높은 발현율을 보이는 clone은 총 44개로서 56개의 clone들 중 79%에 해당하는 비율이다. GeneFishing PCR로부터 얻은 총 56개의 clone의 product를 pCR TOPO vector에 cloning하였다. clone 1~25번은 pCR2.1 TOPO vector에 cloning하였으며, clone 26~56번은 pCR4 TOPO vector에 cloning하였다. ligation은 위에서 서술한 방법에 따라 반응시켰다. 다음 과정으로 ligation한 plasmid DNA를 transformation하여 얻은 각 colony를 ampicillin(50ug/ml)을 첨가한 LB 액체 배지 3ml에 배양한 후, 원심분리기에서 12,000 X g ,2분동안 원심분리하여 *E.coli* cell을 모아서, plasmid Mini-prep kit(QIAGEN)를 사용하여 plasmid DNA를 획득하였다

15개의 clone에 대해서 NCBI GenBank의 BLAST search program을 통한 분석 결과는 표 1과 같다.

각 유전자들은 기능별로 분류하였으며, identity와 GenBank accession number, 각 발생단계별 양상과 clones의 sequencing size와 종별 homology율을 표에 나타내었다. C1은 성숙난과 IVF 후 cleaved 2-4cell단계에서 높게 발현되었으며, BLAST search결과 accession number는 AF034253이며 pig의 NADH1 유전자와 100% homology를 갖는 것으로 분석되었다. NADH1은 NADH6와 함께 energy metabolism에 관여하는 유전자로 알려져있다. C7은 성숙난에서 발현이 높은 것으로서, BLAST search결과 accession number는 NM138523 의 Rat과 90% homology의 KCRF (potassium channel regulatory protein factor)로 밝혀졌다. KCRF는 potassium ion의 channel을 통한 이동을 조절하는 factor로 알려졌다. C4는 미성숙단계에서 발현이 높았으며, BLAST search결과 accession number가 AY713975 인 pig의 Bax Inhibitor 1 (BI-1)라는 유전자와 homology를 가지고 있었다.

표 3. Transcriptlevel에 차이를 나타내는 유전자들

Clone	Function	Identity	Developmental stage			GenBank accession number	Size(bp) of clones	Species/ Homology
			Immature	Mature	IVF 2-4 C			
C1	Energy metabolism	NADH1	↑	↑↑	↑↑	AF034283	211	Pig 100% Mus 91% Rat 91% Human 91%
C41		NADH6	↑	↑↑	↑	AF304203	412	Pig 91% Mus 91% Rat 91% Human 91%
C7	Regulation of potassium ion	KCRF(Potassium channel regulatory factor)	↑	↑↑	↑	NM138523	179	Mus 90% Human 90% Pig 90% Rat 90%
C4	Inhibition of apoptosis	TEGT	↑↑	↑	↑	AY713975	243	Pig 100% Mus 100% Rat 100% Human 91%
C18	Signaling pathway	CAMSAP1	↑	↑↑	↑	NM015447	147	Mus 84% Human 84% Pig 84% Rat 84%
C27	Integral membrane protein	SMP1	↑	↑↑	↑	NM014313	639	Pig 85% Mus 85% Rat 85% Human 89%
C28	Unknown	FLJ20647	↑	↑↑	↑	AY254046	161	Pig 88% Mus 88% Rat 88% Human 88%
C29		LOC132321	↑	↑↑	↑	BC032582	179	Pig 85% Mus 85% Rat 85% Human 85%
C39	Ubiquitin-protein ligase activity	HERC3(HECT domain and RLD3)	↑	↑↑	↑	D25215	320	Pig 94% Mus 93% Rat 92% Human 94%
	pro-apoptotic activity	BAX	↑	↑↑	↑	AJ650642	225	Pig 100% Mus 95% Rat 100% Human 100%
	Anti-apoptotic activity	Bcl-XL	↑	↑↑	↑	NM_214285	250	Pig 100% Mus 92% Rat 92% Human 94%
		Bcl-2	↑	↑↑	↑	BP165310	93	Pig 100% Mus 92% Rat 91% Human 94%
	AAA-protease activity	Yme1L1	↑↑	↑↑	↑	CJ009431	238	Pig 91% Mus 91% Rat 91% Human 93%
		Afg3L2	↑↑	↑↑	↑	CK467201	208	Pig 100% Mus 96% Rat 96% Human 96%
		Paraplegin	↑	↑↑	↑	BG834019	211	Pig 100% Mus 85% Rat 85% Human 88%

C10은 성숙난에서 높은 발현을 보였으며, BLAST search결과 accession number는 NM015447의 human과 84% homology를 갖는 CAMSAP1 (calmodulin regulated spectrin-associated protein1)으로 밝혀졌다. 이 유전자의 기능을 보면 Ca ion binding protein인 calmodulin을 조절하며, signalling pathway에 관련되어 있다. C27은 성숙난에서 높은 발현을 보였으며, BLAST search결과, accession number가 NM014313인 small membrane protein1 유전자이다. human과 89%, Rat과 88%, mouse와 85%의 homology를 나타내었다. C28은 성숙난에서 높은 발현을 보였으며, BLAST search결과, accession number가 AY254046이며 human과 88%의 homology를 갖으며, 기능은 아직 밝혀 지지 않은 hypothetical protein FLJ20647이다. C29는 성숙난에서 높은 발현을 보였으며, BLAST search결과, accession number가 BC032582이며, 아직 기능이 밝혀지지 않은 LOC132321로 명명된 유전자이다. human과 85%의 homology를 갖았다. C39는 성숙난에서 높은 발현을 보였으며, BLAST search결과, accession number가 D25215인 HERC3(hect domain and RLD 3)와 각각 human과 94%, mouse와 93%, Rat과 92%의 homology를 갖는 것으로 나타났다. 이 유전자는 ubiquitin protein ligase activity를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. C41은 성숙난에서 높은 발현을 보였으며, BLAST search결과, accession number가 AF304203인 pig의 NADH6와 91%의 homology를 갖는다. 이는 NADH family로서 energy metabolism에 관여하는 유전자로 알려져 있다.

표 4. bovine과 porcine에서 시험관내 또는 생체내 성숙 단계 동안 또는 성숙 후에 발견되는 유전자들

Function	Genes	References
rRNA transcription	RNA pol1	Baran et al. 2004; Humblot et al. 2004
mRNA processing, addition of poly(A) tail	PolyA	Wrenzycki et al. 1999
Growth factors and hormones	GDF-9, GH, GDF-9, TGF β 1, VEGF	Emspanier et al. 2002; Bieser et al. 1998 Wrenzycki et al. 1999; Lequarre et al. 1997; Navarette Santos et al. 2000; Augustin et al. 2001, 2003
Glucose transporter proteins	Glt-1, -3, -8, SGLT	
Energy metabolism	NADH1, 6	Shoffner and Wallace, 1995
ubiquitin-protein ligase activity	HERC3	Cruz et al. 1999
Control of cellular oxidative states	GPX	Loneragan et al. 2003
Transcription factors initiation transcription	UBF, SOX, CREB, YAP65, HMGN1, ATF-1, HMGB1, NFAR, Oct-4, HDAC3, 7, HAT1, GCN5, U2 snRNA, H2A, YY1, HMGA1, MSY2, TBP, HMGN2, p300, RY-1, TEAD2, ZFX, Lamin B, 18s, GPI, LDH, β actin	Loneragan et al. 2003b; Vigneault et al. 2004
Signaling intermediates	LR- β , HK, PA11, nPA, GCS	Wrenzycki et al. 1999; Bieser et al. 1998
Principal scavengers of superoxide	Mn-SOD, Cu/Zn-SOD	Harvey et al. 1995; Lequarre et al. 2001 Gutierrez-Adan et al. 2004; Wrenzycki et al. 1999; Loneragan et al. 2003; Miller et al. 2003; Wrenzycki et al. 2001a Watson et al. 1992; Winger et al. 1997; Prelle et al. 2001; Yaseen et al. 2001; Bertoloni et al. 2002
Cell adhesion proteins	Cx43, occludin, JAM, ZO-1, -2, Plako	
Embryonic growth factors with pleiotropic mitogenic activity	Igf1r, Igf2, Igf2R	
Prostanoid receptors-modulate renal hemodynamics and salt and water excretion in kidney	EP2, -3-4	Calder et al. 2001
Modulation of carbohydrate and lipid metabolism	Pit-1	Kolle et al. 2001; Joudrey et al. 2003
Cell cycle	cyclin B1, cyclinA	Watson et al. 2000; Weksburg et al.
Producing NADPH	G6PD	Wrenzycki et al. 2002; Loneragan et al. 2003b
Integral membrane protein	SMPI (Small membrane protein1)	Wagner and Flegel 2000; Reboul et al., 1999
Differentiation and implantation	gp130	Rizos et al. 2002
Signaling pathway	CAMSAPI	
Catalyzes the conversion of hypoxanthine and guanine	Hprt	Gutierrez-Adan et al. 2000
Breakdown of the extracellular matrix	MMP1	Bieser et al. 1998
Potent mitogen, oocyte maturation	bFGF, FGF-R	Bieser et al. 1998; Lazzari et al. 2002
Ovarian follicle development, cumulus expansion	flk, flt, VEGF	Emspanier et al. 2002
Mitogenesis and apoptosis	COX-2	Calder et al. 2001
Synthesis and degradation	TIMP1	Bieser et al. 1998
Chaperones in protein folding, stabilising damaged proteins	HSP	Humblot et al. 2004
Proteolytic degradation	Ubiquitin	Robert et al. 2002
Cytoskeleton component	Tubulin	Robert et al. 2002
Regulation of potassium ion	potassium channel regulatory factor	Raifman et al. 2000

이 결과를 통해 돼지 난자에 있어서 maturation 단계에서 몇몇 유전자 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 기존의 bovine에서 maturation 단계에서 여러 유전자들의 mRNA 발현이 증가한다는 연구 결과와 동일하다. 그러한 논문 중에서 Wrenzycki의 논문에서는 여러 유전자들이 bovine 난자의 in vitro와 in vivo maturation 중에 발견된다고 보고하였다. 우리가 얻은 clones 외에 cell 내에 apoptosis에

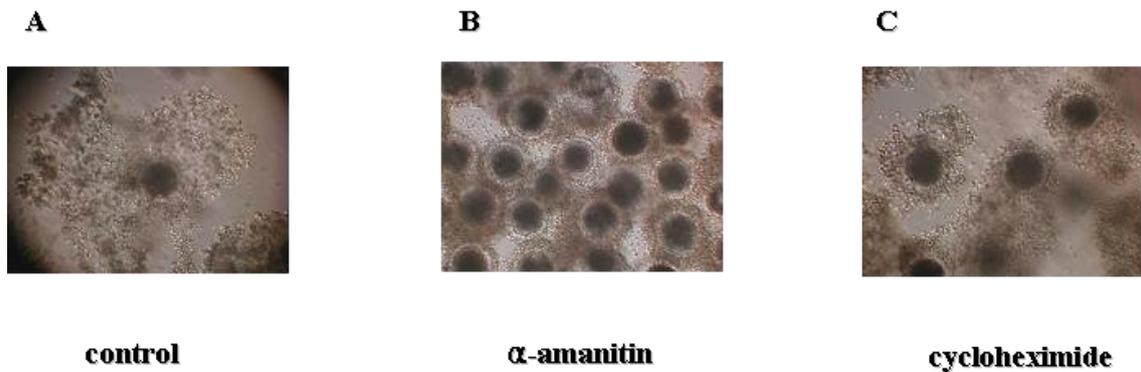
관여하여 조절하는 유전자인 Bcl-2 family가 난자 발달이나 embryo 형성에도 관여한다고 보고된 바 있어서, pro-apoptotic 역할을 하는 BAX와 anti-apoptotic 역할을 하는 Bcl-2, bcl-XL을 선정하여 porcine EST sequence로부터 homologue를 찾아내었다. 동시에 AAA (ATPases associated with diverse cellular activities)-protease family 유전자들을 선정하여 역시 porcine EST sequence로부터 homologue를 찾아내어 표에 함께 나타내었다. 이 단백질은 cell 내 미토콘드리아막에 존재하는 막 단백질로서, 다른 단백질의 분해 또는 분해의 기능을 하는 것으로 알려져 있다. AAA protease (ATPase Associated with a variety of cellular Activities protease)는 또 다른 막 단백질로서 여러 가지 단백질 분해에 중요한 작용을 한다. 단백질의 분해와 질적 향상성 유지는 그것이 이루어지는 부분에 따라서 작용하는 기작이 조금씩 차이가 나게 된다. 세포막과 소포체의 막에서는 ubiquitination에 의해서

이루어지지만, 미토콘드리아와 엽록체, 박테리아의 막에서는 AAA protease가 작용을 한다고 밝혀져 있다. 이러한 AAA protease의 한 종류인 FtsH는 박테리아에서 세포 생존, 세포 분열, 막단백질의 고정, mRNA의 안정에 영향을 주며, 효모의 호흡작용에 영향을 준다. 또한 사람에게서도 존재하는 FtsH의 유사단백질인 Paraplegin (SPG7)이 존재 하는데, 이것은 AAA protease 중 mitochondrial metallopeptidase이다. 이것이 변형되어 잘못된 작용을 하게 되면, 유전성 연속성 하지 마비 (hereditary spastic paraplegia, HSP)를 일으킨다고 알려져 있다. 그 외에 Yme1L1과 Afg3L2라는 단백질이 더 존재한다. 위와 같은 사실을 바탕으로 두 family 유전자들을 선정하였으며, 표에서 보듯이, human, mouse, rat, porcine 간에 각 유전자들은 높은 homology를 가지고 있다.

돼지 난자 혹은 수정란이 각 발생단계를 거치면서 발현되는 유전자들은 서로 다르다. 형질전환복제돼지의 성공은 이러한 유전자들을 찾아내어 그 기능을 연구하여 발현 조절을 함으로써 가능할 것이다. 그래서 가장 최근에 cell signaling과 apoptosis에 관련된 유전자로서 anti-apoptotic한 역할을 가진 것으로 알려진 BI-1도 이러한 돼지 난자 발생에 관여하는 중요한 유전자일 것으로 사료되며, 또한 CAMSAP1은 Calcium binding protein인 calmodulin과 관련되어 cell signaling pathway에 관여하는 것으로 사료되어 선별하였으며, RT-PCR과 real-time PCR을 실시하여 각 발생 단계에서 발현 양상을 조사하였다.

우선, GeneFishing PCR을 통한 결과를 확인하고, 각각의 발생단계에서 발현의 차이를 보기 위하여 RT(reverse transcription) PCR을 시행하였다. 서로 다른 세 개의 발생단계의 난자에서 얻은 각각의 total RNA를 reverse transcription으로 합성한 cDNA를 template로 하여, 위에서 나타낸 primer를 사용하여 PCR 증폭하였다. 그 결과 BI-1은 미성숙 단계에서 높은 발현을 보였으며 성숙 단계와 IVF 후 cleaved 2-4 cell 단계에서는 발현이 상대적으로 낮은 경향을 보이는 것을 확인하였다. clone10 (CAMSAP1)은 앞서 실행한 GeneFishing PCR실험의 결과와 동일하게 성숙 단계에서 높은 발현을 한다는 것을 확인하였다. GAPDH는 동량의 cDNA로부터 PCR을 시행하였음을 보여주는 결과이다. 위 유전자들을 quantitative Real-time RT-PCR을 이용하여, 실제로 IM (immature oocyte), M (mature oocyte), IVF2-4 (IVF후 cleaved 2-4cell embryo)에서의 상대적인 양을 연구하였다. 위 세 단계의 mRNA를 추출하여 reverse transcription하여 real-time quantitative RT-PCR에 사용하였다. PCR반응에는 sequence specific primers를 사용하였다. 세 번의 PCR실험을 수행하였으며, house keeping gene인 porcine GAPDH의 mRNA발현으로서 normalize하였다. 또한, 상대적인 값은 calibrator인 IM (immature oocyte)에 대한 값이며, 상대적인 발현 차이를 calibrator인 IM(immature oocyte)에 대한 n-fold로 나타내었다. BI-1은 앞서 실시한 GeneFishing PCR과 RT-PCR에서 확인한 바, 정량적으로 mRNA level을 측정하였을 때, 그래프에서 보는바와 같이, 미성숙 단계에서 높은 발현율을 보였으며, C10 (CAMSAP1)은 ACP-based PCR differential display 와 RT-PCR을 통해 확인한 결과와 동일하게 Maturation단계에서 높게 발현되는 것으로 증명되었다 (그림 21).

그림에서 보듯이, A(Control)는 외부 다른 요인(시약)은 배제하고 일반적인 성숙 배지내에서 체외 정상 성숙 시킨 난자로서, 그 형태는 성숙된 난자 주위에 cumulus cell들이 확장되어 있는 것으로 확인할 수 있다. 반면 α -amanitin을 처리한 난자(B)에서는 난자 주위에 cumulus cell들이 확장되어 있지 않고, 여전히 Gap junction되어 있는 것을 확인할 수 있었다. cycloheximide(c)를 처리한 난자는 control에서 보다는 아니지만 α -amanitin 처리 난자 보다는 확장이 일어나 있음을 확인할 수 있었다.



<그림 21> 정상 성숙 시킨 난자 (A, control)와 α-amanitin (25 ug/ml) (B), cycloheximide (10uM) (C)을 배지에 함유하여 control과 44시간동안 성숙 시킨 난자의 형태학적 관찰 결과.

이러한 형태학적인 관찰 외에 표로 나타내었을 때, control난자의 성숙 효율은 74% 이상인 반면, α-amanitin 처리 난자는 8%에 불과하였고, cycloheximide (c)를 처리한 난자는 48% 정도 되는 것으로 나타났다 (표5).

표 5. α-amanitin (25 ug/ml), cycloheximide (10 uM) 처리한 난자에서 미성숙 난자의 각 성숙 발달 효율.

Treatment agent	No. of immature oocytes	Metaphase II rates(n)
Control	404	74.3±6.0 ^a (300)
α-amanitin	404	8.0±1.9 ^c (32)
cycloheximide	404	47.9±6.6 ^b (191)

a and b : P < 0.05

표 6. Bcl-2family의 각종 별 sequence-specific primers

Gene	Primer sequence		Product size	Gene	Primer sequence		Product size
	Forward primer	Reverse primer			Forward primer	Reverse primer	
BI-1	5'-ttctggatgtcttctt		194	BI-1	5'-tctggggaaccttttcttg		216
	5'-gctcatggctgacatcaaga				5'-ttctcattgaagccaggat		
BAX	5'-ttgctacagggttcatcca		225	BAX	5'-gctgatggcaacttcaactg		239
	5'-aaacatgtcagctgccacac				5'-actccagccacaagatgggt		
Bcl-XL	5'-gaaaccctagtcctcaaa		250	Bcl-XL	5'-ttcgggatggagtaaaactgg		207
	5'-cgttcaatacctgctcaaaagc				5'-ctgcattgttccgtagaga		
Bcl-2	5'-ttccggatgggtgaactg		93	Bcl-2	5'-gaggattgtggccttctttg		218
	5'-ctcctgtctacgctctccac				5'-tcagagacagccaggagaaa		
GAPDH	5'-gggatgaaccatgagaagt		230	GAPDH	5'-agaacatcctcctgcctcc		250
	5'-aagcaggatgatgttctgg				5'-ttgaagtccaggagacaac		

Porcine primers

Mouse primers

성공적으로 복제 돼지를 얻기 위해서 난자의 올바른 성숙이 초기 착상과 최종적으로 산자를 얻는데 중요하게 작용하게 된다. 특히 *in vitro* 배양한 난자의 quality는 복제 돼지를 만드는데 매우 중요하다. 본 GeneFishing 실험결과에서 여러 유전자들이 성숙난에서 높은 발현을 보였던 것처럼, 이러한 유전자들이 정상적으로 완전히 성숙된 양질의 난자를 만드는데 관여할 것으로 사료된다.

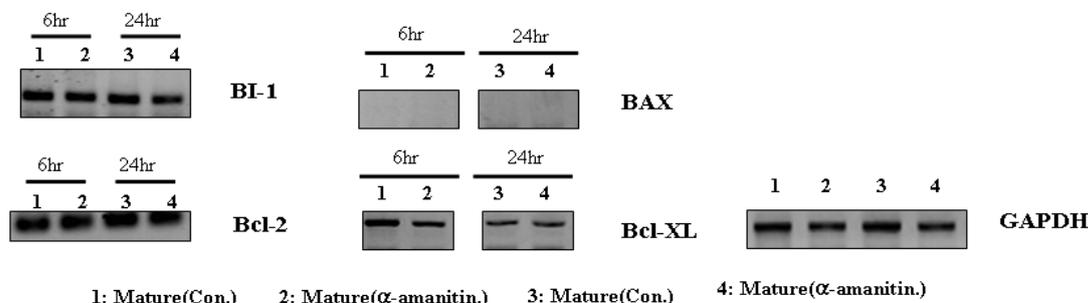
표 7. AAA-proteasefamily 유전자의 각종별 sequence-specific primers

Gene	Primer sequence		Product size	Gene	Primer sequence		Product size
	Forward primer	Reverse primer			Forward primer	Reverse primer	
YmELL1	5'-ccaaggccagatgtaaagg	5'-ttcggtcaggtcccattagg	238	YmELL1	5'-tgagatgitttgaggcgtag	5'-atgcctctgggaaattgtg	236
Afg3L2	5'-gcataagcccagattgtca	5'-cctttccacgtcagctttc	208	Afg3L2	5'-aggacgagcctcaatctca	5'-tcaatcgcttctgaagtg	207
Paraplegin	5'-caaaaagagccaggtcctct	5'-tacacatccgctcaacagc	211	Paraplegin	5'-gocctcagagtttgctatt	5'-atctggtcttccgctcttt	236
GAPDH	5'-gggcatgaaccatgagaagt	5'-aagcaggatgatgtcttg	230	GAPDH	5'-agaacatcatcctgcaccc	5'-ttgaagtgcagagagacaac	250

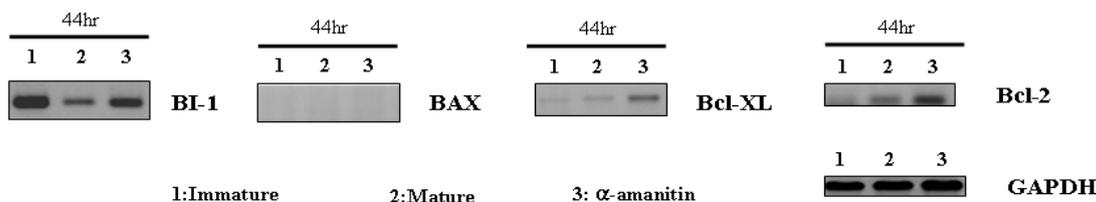
Porcine primers

Mouse primers

porcine matured oocyte – No treat , α -amanitin, cycloheximide for 6 & 24hrs, respectively



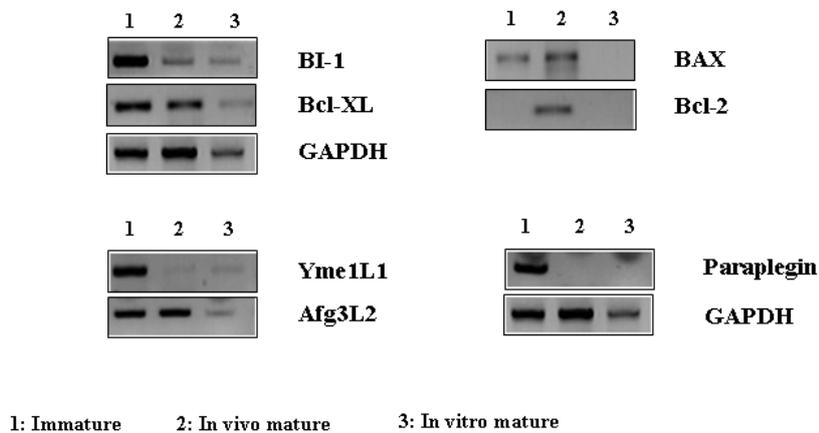
Porcine Immature & mature oocyte – No treat , α -amanitin, cycloheximide for 44hrs



<그림 22> 미성숙난과 정상난 ,18-20시간 동안 α -amanitin, cycloheximide 처리한 난자의 Bcl-2 family와 AAA-protease family 유전자의 RT-PCR

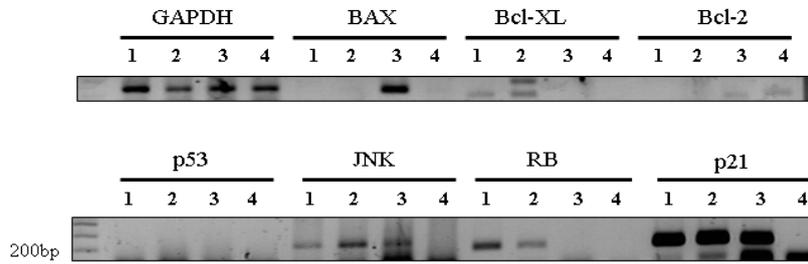
Mouse의 *in vitro* 성숙난에서 apoptosis pathway에서 관련되어 있는 Bcl-2 apoptotic family중 대표적인 유전자인 Bax, Bcl-2, Bcl-xL와 우리가 GeneFishing을 통해 porcine의 난자 발달단계에서 발현의 차이가 있음을 확인한 BI-1와 AAA-protease family로 대표적인 유전자인 Yme1L1, Afg3L2, paraplegin의 발현율을 RT-PCR을 실시하여 확인하였다. 위 유전자들의 발현이 mammalian에서 중요하게 난자 성숙에 관여할 것으로 판단되며 mouse에서 난자 성숙과정중에 차이가 있을 뿐만 아니라, 체외배양과 체내 배양 난자사이에서도 각각 차이가 있을 것으로 예상하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. mouse의 각 유전자 sequence를 찾아서 유전자의 발현을 확인할 수 있도록 specific primer를 design하여, RT-PCR을 실시하였다 (표 6, 7).

1번 lane은 미성숙 단계의 난자이며, 2,3번은 체외 성숙시킨 난자로서 2번 lane이 control인 성숙난이며, 3번이 transcription inhibitor로 잘 알려진 α -amanitin을 처리하여 성숙시킨 난이며, 성숙 시간은 18-20시간 체외 배양하였다. RT-PCR결과 BI-1, Bax, Bcl-XL은 미성숙단계에서 발현을 보였으며, 성숙난과 α -amanitin을 처리한 성숙난에서는 발현이 낮았다. Bcl-2의 경우는 전 lane에서 specific band를 확인할 수 없었다. 즉. 미성숙난자에서 발현이 높았으며, 성숙난과 α -amanitin을 처리한 성숙난에서는 발현이 낮았다. Yme1L1,Afg3L2와 paraplegin의 결과 또한 Bcl-2 family 유전자에서 보였던 양상과 비슷하였다. 즉. 미성숙난자에서 발현이 높았으며, 성숙난과 α -amanitin을 처리한 성숙난에서는 발현이 낮았다.



<그림 23> 미성숙난과 *in vivo*와 *in vitro* 성숙난에서 Bcl-2 family와 AAA-protease family 유전자의 RT-PCR

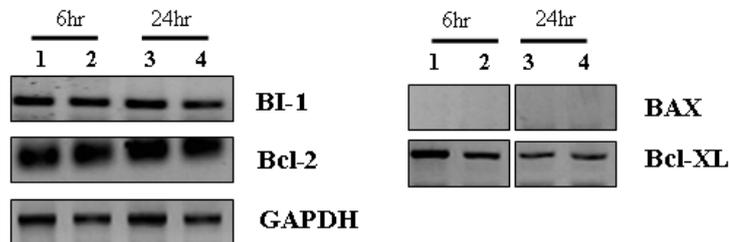
다음은 체외 배양한 난자와 체내 난자의 발현 차이를 확인해 보았다. 1번 lane은 미성숙 난자이며, 2번은 *in vivo* 난자, 3번은 *in vitro* 배양한 난자이다. BAX와 Bcl-XL은 *in vivo*에서 *in vitro*보다 상대적으로 높은 발현을 보였으며, Bcl-2는 *in vivo* 난자에서만 발현이 되었다. BI-1은 발현차이가 없는 것으로 나타났다. Yme1L1과 paraplegin은 미성숙난에서 발현을 보이지만, *in vitro* 배양한 난자와 *in vivo* 난자의 발현 차이는 없었다. 그러나 Afg3L2는 BAX와 Bcl-XL의 결과와 비슷한 양상으로 *in vivo*에서 *in vitro*보다 상대적으로 높은 발현을 보였다.



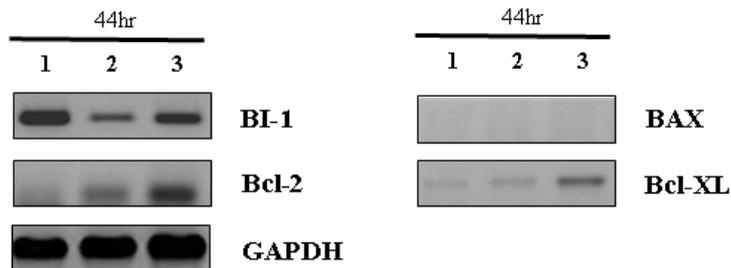
1: oocyte 2: embryo 2cell 3: Morula 4: Blastocyst

<그림 24> 발생단계별 각 유전자들의 발현.

체내 발생 단계별로 Bcl-2 family 유전자인 BAX, Bcl-XL, Bcl-2와 cell cycle 관련 유전자인 p53, RB, p21 그리고 MAPK (mitogen activate protein kinase) 중 하나인 JNK 의 발현을 확인하였다. 그 결과 BAX는 Morula 단계에서 특이적으로 발현이 되는 것을 볼 수 있었고, Bcl-XL은 oocyte와 embryo 2 세포기에서 발현을 보였다. Bcl-2는 배반포기에서 희미하게 발현이 되었다. p53은 전 단계에서 발현을 확인할 수 없었고, JNK는 oocyte와 embryo 2 세포기, Morula 단계에 걸쳐 발현이 됨을 확인하였다. RB는 oocyte에서 발현이 특이적으로 높았으며 embryo 2 세포기에도 발현이 되었다. p21은 oocyte에서 Morula 단계 까지 높은 발현율을 보였으며, 배반포기에서는 발현을 보이지 않았다.



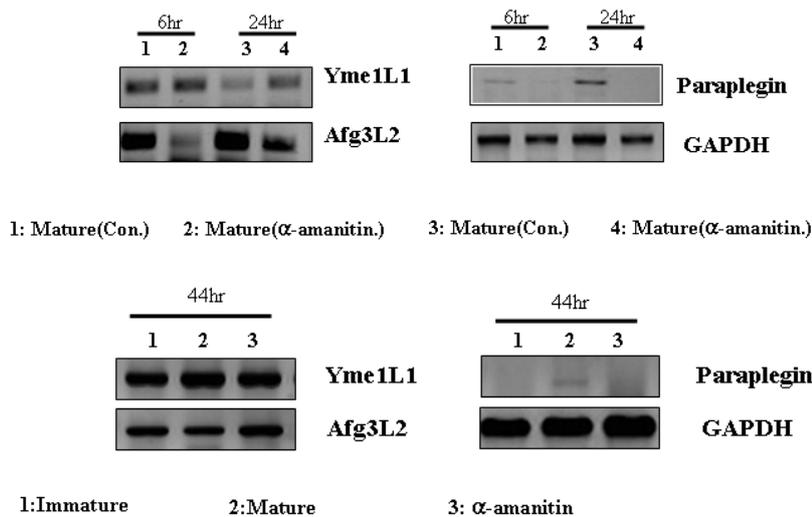
1: Mature(Con.) 2: Mature(α -amanitin.) 3: Mature(Con.) 4: Mature(α -amanitin.)



1: Immature 2: Mature 3: α -amanitin

<그림 25> Porcine의 미성숙난과 정상난과 6, 24, 44시간동안 α -amanitin, cycloheximide 처리한 난자의 Bcl-2 family 유전자의 RT-PCR

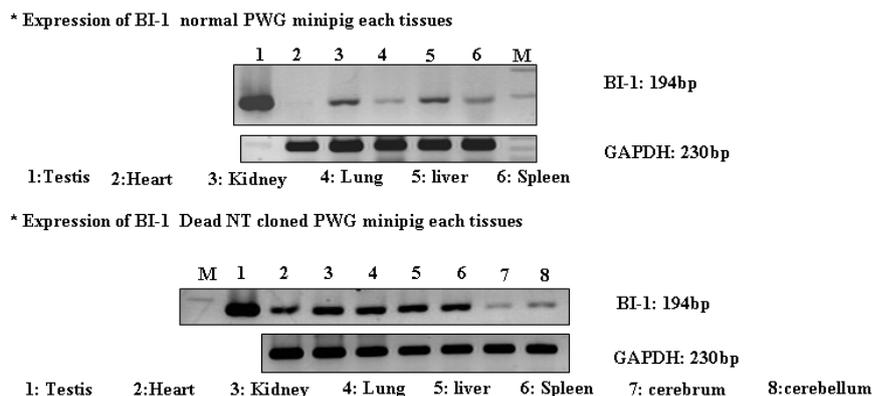
Mouse에서 확인한 결과를 바탕으로 porcine 난자를 샘플로서 위와 동일한 family 돼지 유전자들의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. porcine sequence-specific primer를 표와 같이 각 유전자의 porcine homologue sequence로부터 design하였다. Mouse sample과 마찬가지로 α -amanitin은 25ug/ml농도로 처리하여 6, 24, 44시간 동안 배양, 성숙시켰다. 그림 6의 위 사진은 각각 6,24시간 정상 성숙 시킨 control 난자 (1, 3번 lane)과 α -amanitin을 처리한 난자 (2, 4번 lane)로부터 mRNA를 추출하여 RT-PCR하였다. 아래사진은 미성숙난 (1번 lane)과 정상 성숙난 (2번 lane), 44시간 동안 α -amanitin을 처리한 난자로부터 mRNA를 추출하여 RT-PCR하였다. 그 결과, BI-1은 미성숙난에서 발현이 높았고, control 난자에서 발현이 낮아졌다. 6, 24시간 동안 α -amanitin 처리한 난자에서 정상 난자와 비교하여 발현 차이가 없었으며, 44시간 동안 처리한 난자에서는 정상 성숙 난자(control)보다 발현이 높았다. BAX는 전 샘플군에서 발현을 볼 수 없었으며, Bcl-XL은 BI-1과 마찬가지로 6, 24시간에서 α -amanitin을 처리한 난자나 정상 난자나 발현 차이가 크지 않았으며, 44시간 α -amanitin을 처리한 난자에서 발현이 높았다. Bcl-2도 Bcl-XL과 비슷한 결과를 나타내었다.



<그림 27> porcine의 미성숙난과 정상난과 6, 24, 44시간 동안 α -amanitin, cycloheximide 처리한 난자의 AAA-protease family 유전자의 RT-PCR

AAA-protease family 유전자의 발현을 나타낸 그림 7의 위 사진은 각각 6,24시간 정상 성숙 시킨 control 난자(1, 3번 lane)과 α -amanitin을 처리한 난자(2, 4번 lane)로부터 mRNA를 추출하여 RT-PCR하였다. 아래사진은 미성숙난 (1번 lane)과 정상 성숙난 (2번 lane), 44시간 동안 α -amanitin을 처리한 난자로부터 mRNA를 추출하여 RT-PCR하였다. 그 결과, Yme1L1은 6시간 성숙난에서는 차이가 없었으며, 24시간 성숙난에서는 α -amanitin을 처리한 난자에서 보다 발현이 높았고, 44시간 난자에서는 차이가 없었다. Afg3L2는 6,24시간 난자에서는 α -amanitin을 처리한 난자에서 발현이 낮아지고, 44시간에서는 역시 차이가 없었다. Paraplegin은 6, 24시간에서는 Afg3L2와 비슷한 경향을 보였으며, 44시간에서는 발현이 모두 낮았다.

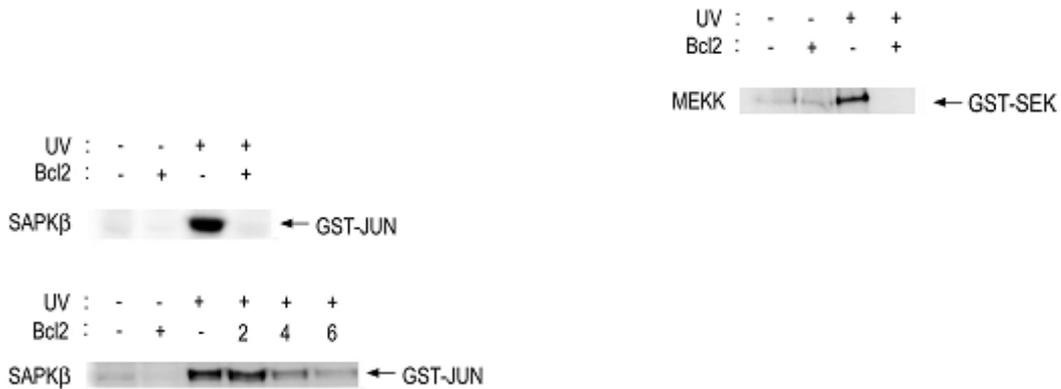
BI-1의 정상 PWG 미니돼지와 복제 PWG 미니돼지간의 각 조직별 발현차이를 RT-PCR 을 통하여 살펴본 결과, 정상 PWG 미니돼지는 Testis에서 발현이 가장 높았으며, Heart를 제외한 kidney, lung, liver, spleen에서 발현이 됨을 확인하였다. 복제 PWG 미니돼지는 testitis를 비롯하여 각 조직에서 발현이 되었으며, 소년과 대년에서는 상대적으로 발현이 낮음을 확인하였다.



<그림 28> 정상 PWG 미니돼지와 복제 PWG 미니돼지의 각 조직별 BI-1 발현

앞으로 BI-1의 발현을 억제하였을 경우에는 어떤 현상이 나타나는지 알아볼 계획인데, BI-1에 대한 siRNA를 제작하여, stable cell에 넣고 30uM의 etoposide를 48시간 동안 처리하였다. apoptosis에 어떤 변화가 있는지 알아보기 위해서 DAPI staining과 western blotting으로 PARP 잘림을 확인하였다. 각각의 결과 siRNA를 넣은 cell이 그렇지 않은 세포 보다 PARP의 잘림이 더 많이 생기는 것으로 나타났으며, DAPI staining을 통해서 본 apoptotic cell의 비율도 더 많아지는 것으로 나타났다.

또한, 배 발달에 중요한 세포사멸 조절인자 중 하나인 Bcl-2가 SAPK (stress activated protein kinase) 신호전달계에 미치는 영향을 조사해 보았다. Bcl-2는 미토콘드리아의 외막에 주로 위치하며, 세포가 살아가는데 중요한 조절인자로 아포토시스로부터 세포 사멸을 막는 중요한 기능을 수행한다. Bcl2 family내에서는 크게 아포토시스를 막는 인자와 아포토시스를 촉진하는 인자로 구분되는데 아포토시스를 막는 인자로 Bcl-2, Bcl-XL, 촉진시키는 인자로는 Bax, Bak, Bad 등이 알려져 있다. 그중 Bcl2는 C. elegans의 ced-9 유전자의 포유동물의 상대유전자인 것으로 알려져 있고, 또한 ced-4의 상대유전자인 Apaf1 (Apoptosis activating factor 1)의 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다. 한편 stress Activated Protein Kinase (SAPK)는 UV, etoposide 등의 여러 stress로부터 유도되는 유전자로 아포토시스와 관련되는 것으로 알려져 있다. 여러 stress로부터 활성화된 SAPK는 Bcl2에 의해 저해되는 것으로 보고 되어있다. 그래서 SAPK 신호전달계에 미치는 Bcl-2의 기능과 작용 기작을 알고자 본 실험을 수행하였다.



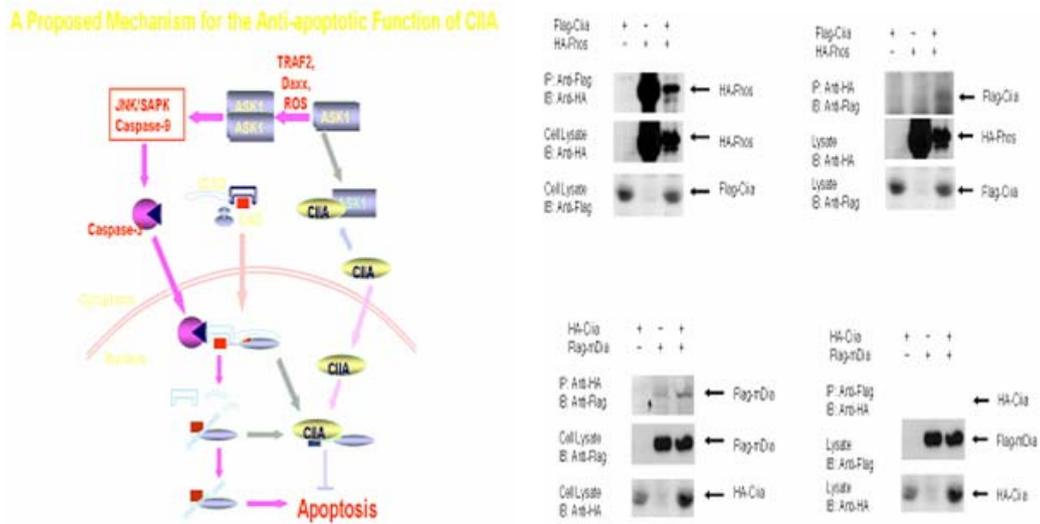
<그림 29> SAPK 신호전달계에 미치는 Bcl-2의 효과

Stress Activated Protein Kinase (SAPK)는 여러 세포에 유해한 물질이나, UV등의 stress성 요인에 의해 발현 유도되는 유전자로 아포토시스와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. UV나 Staurosporin, Etoposide 등에 의해 SAPK가 활성화되고, Bcl2가 이를 막을 수 있다는 것은 보고가 되어있다. 그래서 우리는 Bcl-2가 SAPK 경로의 어느 위치에서 이를 막는 것인지 알고자 실험을 실시하였다. 먼저, UV에 의해 유도된 SAPK의 활성이 Bcl-2에 의해 막을 수 있는지를 보았다. 그 결과 Bcl-2에 의해 활성이 저해되었고, 이는 Bcl-2의 dose에 의존하여 저해됨을 알 수 있었다. 그래서 SAPK의 상위 Kinase인 SEK1과 MEKK1의 활성화에는 어떤 영향을 끼치는지 알기 위해 SEK1 과 MEKK1 assay를 실시하였다. 그 결과 Bcl-2는 SEK1과 MEKK1 모두의 활성을 저해하였다. 즉 Bcl-2는 SAPK경로의 활성을 MEKK1 상위에서 저해함을 알 수 있었다.

다음으로 아포토시스에 매우 중요한 단백질인 ASK1 및 CAD 단백질과 상호결합하여 아포토시스를 억제하는 기능을 가지고 있는 CIAA 유전자가 초기 배 발달 및 착상 시기에 유전자 발현의 차이를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 CIAA 단백질은 배 발달에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고된 Formin 류의 단백질들과 서로 상호 결합하는 것을 발견할 수 있었다. Formin family 단백질에는 Fmn 1 Fmn 2, Dia, Fhos, Bni 1 등이 있는데, 본 연구에서는 Formin 류 단백질들인 Dia 및 Fhos 단백질과 상호결합하는 것을 Co-IP를 통해서 분석할 수 있었다.

Formin family 단백질 중 하나인 Formin2 (Fmn2)는 불임(sterility)과 관련된 난소 유전자(ovary gene)로 최근 밝혀졌는데, 쥐의 난세포(egg cells)를 대상으로 한 실험 결과 Fmn2라는 이 유전자가 결핍될 경우 심각한 임신 합병증(pregnancy complication)이 발생하는 것으로 확인됐다. Fmn2 유전자는 포르민-2(formin-2)라는 단백질을 발현시키는데, 불임이나 배아 손실(embryo loss), 기형(birth defects) 등에 대한 이해의 폭을 크게 넓힐 수 있을 것으로 기대된다. 정상적인 난자나 정자가 생기려면 일련의 세포 분열 과정을 통해 부계 또는 모계의 염색체가 제대로 전달되어야만 한다. 감수 분열(meiosis)이라 불리는 이 과정에서 문제가 생길 경우 다운증후군(Down's syndrome) 같은 여러 가지 염색체 이상 질환이 발병할 수 있다. Fmn2 유전자는 염색체가 난자로 적절히 배분되는 과정에 필요한 기능을 하는 것으로 알려졌다. 사람의 경우, 일반적으로 두 세 번 이상 임신 손실(pregnancy)을 경험할 경우 이를 재발성 임신 손실 (recurrent pregnancy loss)이라 부른다. 보통 여성 가운데 약

1% 정도가 이 같은 재발성임신 손실을 경험한다. 이번 연구 결과에 따르면, Fmn2 유전자에 돌연변이 (mutation)가 동반되는지 여부를 확인함으로써 실제 임신 손실이나 불임 여부를 가늠할 수 있을 것으로 생각된다. Fmn2 유전자가 결핍된 난세포는 제 1 감수분열 (meiosis I) 단계를 정상적으로 완료하지 못하는 것으로 보고되었다. 이 유전자 결핍으로 인해 난세포의 중기 방추사(metaphase spindle)가 제 위치를 찾지 못하면서 세포 분열



<그림 30> 발생 중 발현의 차이를 나타내는 아포토시스 조절 유전자 CIAA 및 Formin family 단백질간의 상호작용

과정이 아예 중단되는 현상이 나타난다. 그 결과 제 1 감수분열 완료를 의미하는 핵심 세포인 제 1 극체(polar body)가 전혀 형성되지 못하고 난자로 성숙해야 할 딸세포들이 형성되지 않는다. Fmn2 유전자가 결핍된 암컷 쥐로부터 발생한 배아의 경우 세 쌍에서 다섯 쌍의 염색체를 갖고 있으며 결국에는 정상적으로 발달하지 못하고 사멸한다는 것이다. 이에 반해 Fmn2 유전자를 갖고 있는 정상적인 쥐에서는 두 쌍의 염색체를 갖는 배아가 발달했다. Fmn2 유전자가 결핍된 암컷 쥐에게 건강한 난소를 이식할 경우 임신 손실을 막을 수 있다는 사실도 확인되었다. 이에 반해서 Fmn2 유전자가 결핍된 쥐의 난소를 건강한 암컷 쥐에게 이식했을 경우에는 생식 능력이 상실되는 결과를 빚었다. 또한 Fmn2 유전자가 존재하는 정상적인 쥐와 달리 Fmn2 유전자가 결핍된 암컷의 배아 세포 수가 급격히 감소하는 경향도 확인할 수 있었다.

Fmn2는 Formin family 단백질 중의 하나인데, 이 family에는 Fmn, Fhos, Dia, Bni 등 여러 단백질이 포함된다.

그리고 최근에, 세포 골격 (cytoskeleton)의 핵심 구성 요소인 액틴(actin)의 생성을 조절하는 단백질이 동정됐는데, 이 동정된 단백질은 Bni1p라 불리는 것으로 포르민(formin)이란 단백질 군에 속하였다. Bni1p 단백질로부터 생성 과정이 조절되는 액틴은 효모 (yeast)로부터 동물, 사람에 이르기까지 모든 세포에서 발견된다. 액틴 분자는 액틴 미세섬유 (actin filaments)를 구성하고 이들이 세포의 골격 구조를 형성하게 된다. 또한 액틴은 세포 분열과

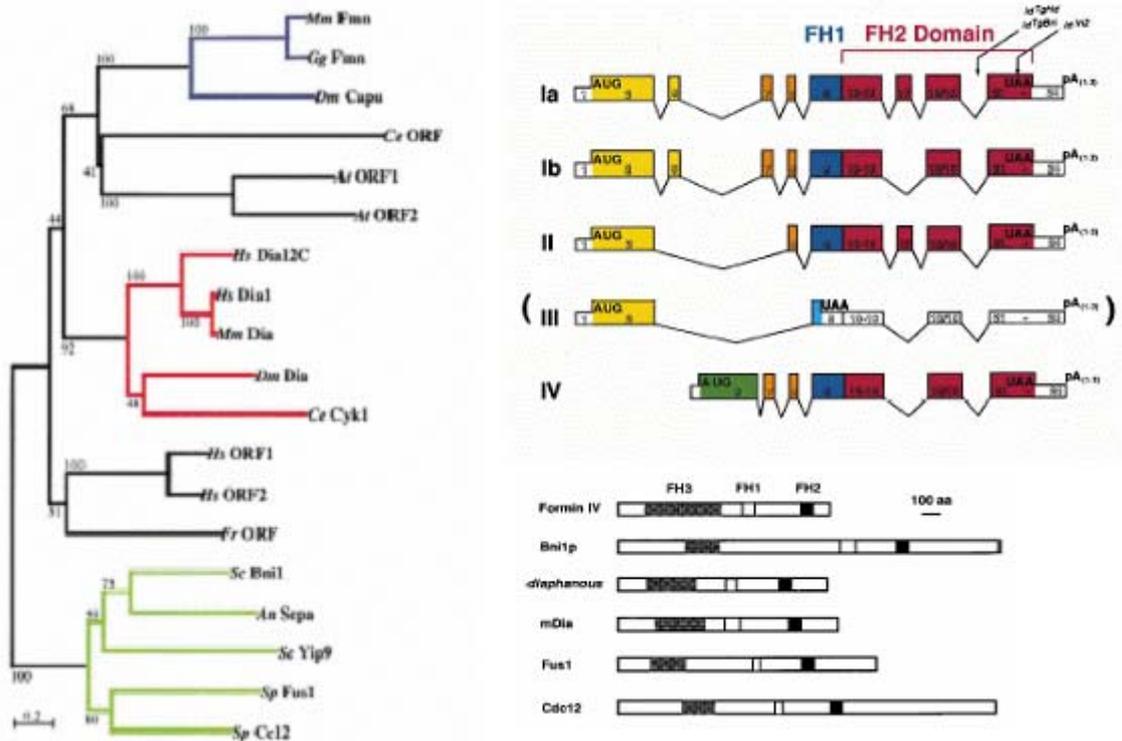
표 8. Members of the Formin Family Proteins

TABLE 1

Members of the Formin Family Proteins

Protein	Organism	Mutant phenotype
Formins	Vertebrates	Limb deformities (1)
DFNA1 (hDia)	Human	Nonsyndromic deafness (25)
mDia	Mouse	ND ^a
Diaphanous	<i>D. melanogaster</i>	Defect in cytokinesis (2)
Cappuccino	<i>D. melanogaster</i>	Defects in cytokinesis and oocyte polarity (6)
Bni1p	<i>S. cerevisiae</i>	Defects in bipolar bud site selection (26) and cytokinesis (8)
Bnr1p	<i>S. cerevisiae</i>	Defect in axial bud site selection (17)
Cdc12	<i>S. pombe</i>	Defect in cytokinesis (19)
Fus1	<i>S. pombe</i>	Defect in conjugation (12)
FigA/SepA	<i>A. nidulans</i>	Defects in cytokinesis and cell polarity (27)

^a Not determined.



<그림 31> 발생 중 발현의 차이를 나타내는 Formin family 단백질들

세포내의 여러 물질을 대사시키는 과정에도 필요하다. 액틴으로 인해 세포의 모양이 결정되고 이들의 도움으로 세포가 이동할 수 있는 셈이다. 액틴은 모든 생물체에 존재하며 대사 과정에 없어서는 안되는 매우 중요한 물질이기 때문에 이를 조절하는 과정은 세심하게 진행되어야만 한다. 만약 액틴 조절이 정상 궤도를 벗어나게 되면 여러 가지 심각한 문제들이

발생할 수 있다. 예를 들어, 사람의 경우 액틴의 조절 과정이 실패할 경우 청력 상실과 면역력 약화, 심지어는 암까지 발생할 수 있다. 이처럼 중요한 기능을 담당하는 액틴은 가지상 (branched form)과 평행상 (parallel)의 두 가지 유형으로 존재한다. 약 4년 전에 Arp2/3이란 단백질 복합체가 가지상 액틴 미세 섬유의 형성을 조절한다는 연구 결과가 발표된 바 있었다. 이번 연구 결과의 요지는 효모의 Bni1p란 단백질이 평행상 액틴 미세 섬유의 형성 과정을 조절한다는 것이다.

앞으로 아픔토시스 관련 단백질인 CIIA와 배 발달에 필수적인 기능을 수행하며 불임과 관련된 Formin family 단백질 간의 상호 작용 기작을 분석하고 세포 골격 조절 능력을 분석함으로써 정상 배 발달 관련 마크로 활용하고, 배 발달률 증진에 활용하고자 한다.

마지막으로 착상 관련 유전자를 분석하는 연구를 진행하였다. 포유류 배아는 포배형성과 부화과정을 거쳐서 준비된 자궁내막상피에 부착, 침투과정으로 착상이 진행된다. 이러한 착상과정에는 침투능력을 갖는 배아와 이를 수용할 수 있는 자궁내막간의 상호작용이 이루어 지는데, 이때 스테로이드 호르몬과 다양한 성장인자들, cytokines 등이 중요한 조절요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 즉, 착상과정 중 자궁내막의 leukaemia inhibitory factor (LIF)가 결여되었을 때 착상이 되지 않으며, 또한 착상시기에 integrin이 영양배엽 세포와 ECM 단백질 또는 자궁내막 상피세포와의 상호작용으로 착상에 직접 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 자궁에서 integrin $\alpha\beta3$ 의 영향을 억제했을 때 착상률이 감소한다는 보고가 있다. 본 연구에서 착상에 필요조건인 LIF가 착상시기의 배아 발생에 중요한 영향을 주는데, 특히 이 시기의 integrin 유전자들의 발현 조절을 분석하고 있다.

포배기로의 배아 발생과 더불어 자궁내막의 synchronization은 착상에 필수적이다. 자궁내막에서 여러 성장인자들과 수용체들의 발현이 스테로이드 호르몬의 작용을 중재하는 것으로 밝혀졌으나 아직도 여러 성장인자들과 수용체들의 발현과 조절 그리고 조직 생리화학적 변화에 관하여서는 잘 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 발정주기와 착상시기의 자궁에서 EGF 수용체중 ErbB1의 존재부위의 확인과 발현 양상을 분석하고자 하였다. 발정주기 중 proestrus 및 estrus 시기엔 stroma 전체에서 발현하고 metestrus 시기엔 myometrium에 가까운 stroma에서 발현하며 diestrus 시기에는 특정 발현부위가 검출되지 않았다. 한편 착상 시기 중 임신 1일째는 stroma 전체에서 보였고, 2일에는 lumen stroma에서 보다 감소한 발현양상을 보였으며, 3일에는 myometrium에 가까운 stroma에서 다 강하게 발현되었다. 4일째에는 다시 stroma 전체에서 발현하며 5일에는 배아 주변의 stroma가 decidum을 형성하는 primary decidual zone에서 발현하였다. 생쥐에서 착상시기중 TGF-1이 자궁내막 상피세포의 세포예정사에 미치는 영향도 조사 중인데, 생쥐의 경우, 배아는 수정된 후 4일째가 되면 포배로 발생하여 자궁으로 이동하여 자궁내막 벽면에 착상을 하게 된다. 배아의 영양외배엽 세포는 자궁내막 상피세포를 뚫고 지나가고, 기저막이 붕괴되며, 배아는 자궁내막안으로 들

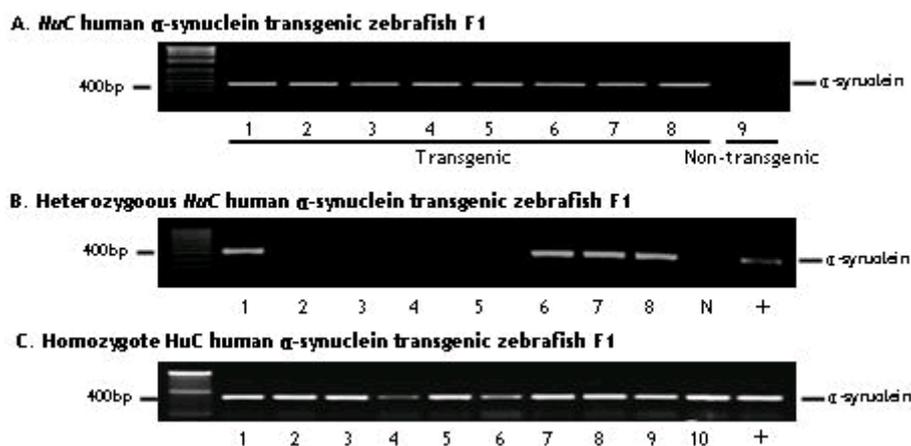
어가게 된다. 착상이 일어나는 지점의 자궁내막 상피세포들에 배아가 부착하게 되고, 이 부분의 상피세포들은 세포예정사를 일으킨다고 보고 되어있다. 생쥐의 경우, 포배가 착상하는 과정에서 일어나는 자궁내막 상피세포의 세포예정사는 autocrinal 또는 paracrinal 하게 조절 되어진다. 세포예정사를 조절하는 성장인자 중에 TGF- β 1이 착상시기에 일어나는 세포예정사에서 중요한 역할을 한다고 생각되어지고 있다. TGF- β 1이 포배 착상 시기에 자궁내막 상피세포의 apoptosis에서 어떤 역할을 할 것인지에 대해 연구하고자 하였다. TGF-1 neutralizing assay를 통하여 포배에서 분비되는 물질에 의해 자궁내막 상피세포의 apoptosis 가 촉진됨을 확인하였으며, 특히 apoptosis를 일으키는 물질이 TGF-1임을 TGF-1 neutralizing antibody로 확인하였다. 착상시기 중 자궁내막 상피세포에서 일어나는 apoptosis는 in vivo에서 보면, 착상시기중 포배와 자궁내막 상피세포가 만나는 부위의 자궁내막 상피세포에서 발생하였다.

2차년도 에서부터, 착상 관련한 기작에 중요한 역할을 수행하는 것으로 분석되는 BI-1, MMP-1, MMP-9, CIAA, Formin, Dia, integrin, TGF-1, JNK, ERK, ErbB1 등에 대한 유전자 발현 연구를 진행할 계획이다.

다. 제2협동과제

1) Transgenic zebrafish line 구축과 genotyping 방법 확립

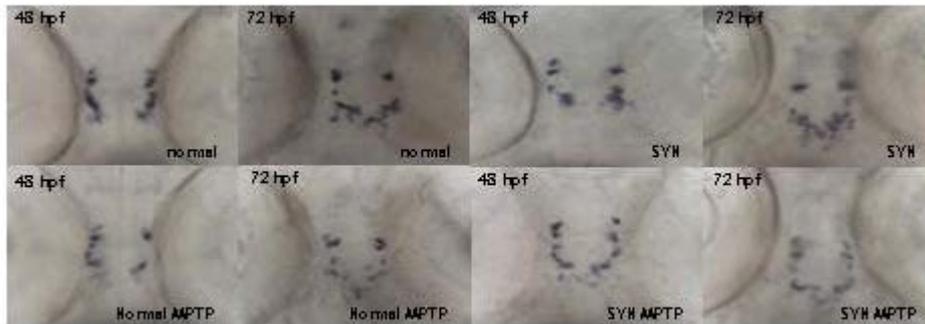
Alpha-synuclein transgenic zebrafish의 genotyping을 PCR 방법으로 확인하고 homozygous transgenic zebrafish line의 구축을 위한 system을 정립함.



<그림 32> α -Synuclein transgenic zebrafish의 PCR genotyping

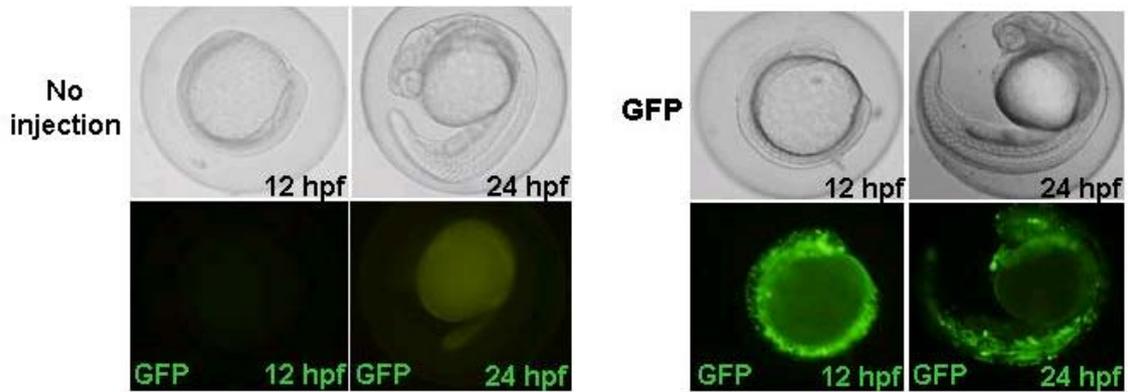
- F1 zebrafish 성체(생후 약 3개월)의 꼬리지느러미에서 genomic DNA를 추출함. Alpha-synuclein primer set로 PCR을 수행한 후 2% agrose gel 상에서 band의 유무를 확인함 (그림 32).
- F1 zebrafish 사이의 교배와 PCR genotyping으로 homozygous F2 transgenic zebrafish line 구축함

- 2) 특정 유전자의 발현 여부를 확인하기 위한 *in situ* hybridization의 확립
- Zebrafish에서 특정 유전자의 발현을 확인하기 위해 digoxigenin-labelled antisense riboprobe를 합성하여 *in situ* hybridization으로 embryo에서 발현되는 mRNA를 확인하는 방법을 구축함 (AP가 결합 되어 있는 anti-digoxigenin antibody로 반응 후, AP의 기질인 NBT/BCIP (tetrazolium salt/5-bromo-4-chloro-3 idolylphosphate)를 처리하여 유전자 발현과 위치를 확인함).



<그림 33> Dopaminetransporter의 발현을 *insitu* hybridization으로 관찰

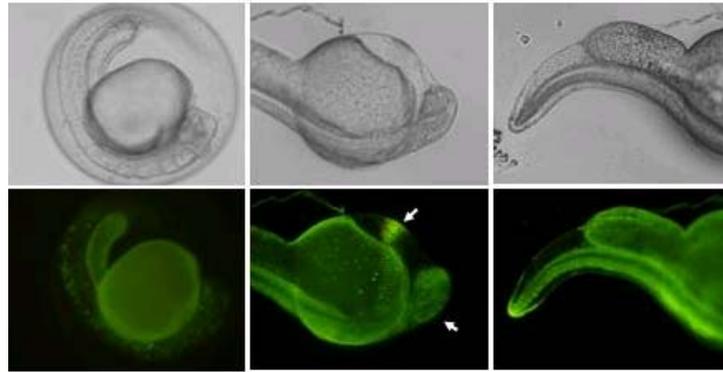
- 3) Zebrafish에서 특정 유전자의 microinjection과 발현 시스템 확립



<그림 34> Zebrafish에서 유전자의 발현 및 확인

- Zebrafish expression vector에 cloning 되어 있는 GFP plasmid를 zebrafish embryo에 microinjection, GFP의 발현양상을 형광현미경으로 관찰하는 시스템 확립함.

4) Apoptosis 관련 유전자 (HtrA2)의 발현과 apoptotic cell death 관찰 시스템



<그림 35> Acridine orange (AO)를 이용하여 zebrafish embryonic cell death 관찰

- AO로 staining한 후 형광현미경에서 apoptotic cell death 유도 여부를 관찰함.
- Apoptosis로 야기되는 발생의 defect를 zebrafish embryo로 관찰하는 방법을 구축 중임.

5) Apoptosis 관련 유전자(HtrA2)가 제거된 쥐와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포사멸 메커니즘을 규명:

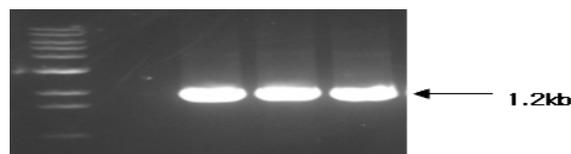
- *mnd2* mouse의 확보 및 교배, PCR로 genotyping 확립.
- *mnd2* mouse의 phenotype 관찰.
- Mouse embryonic fibroblast의 배양 시스템 구축

2. 2년차 연구결과

가. 제1세부과제

1) DAF 유전자 검색, 분리 및 확보

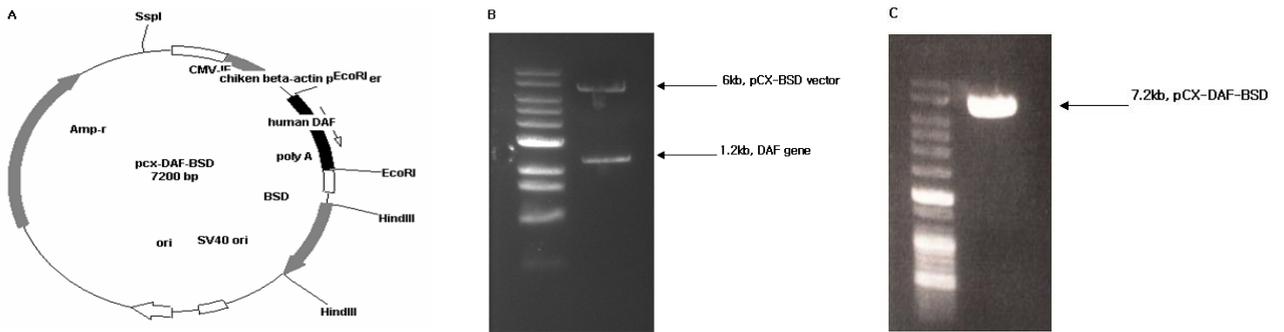
- Gene bank를 통해 DAF 유전자의 sequence를 확인하고 cloning을 위한 enzyme site(EcoRI)가 포함된 primer를 제작하였다. 제작된 primer를 이용하여 Hela cell cDNA library에 사용하여 1.2kb의 DAF 유전자를 확보하고 gel elution을 통해 다량의 DAF DNA를 얻어 sequencing 의뢰를 통해 100% DAF gene임을 확인하였다. (그림 36)



<그림 36> Hela cell cDNA library를 이용한 DAF gene PCR 결과

2) DAF 초급성 면역조절 유전자 벡터 개발

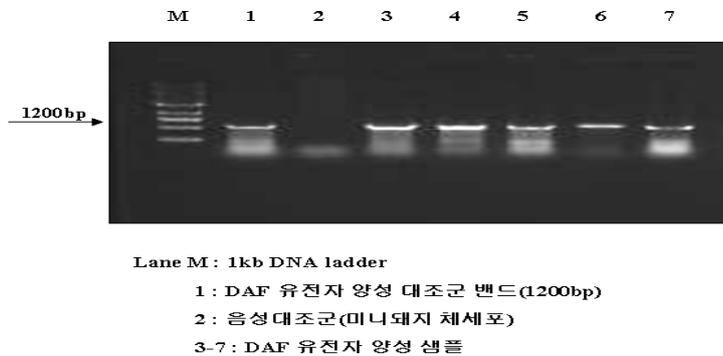
- DAF 유전자를 발현하는 vector는 pCX-BSD vector(6kb)를 사용하였고 여기에 EcoRI enzyme을 사용하여 절단한 후 T4 DNA ligase(NEB, Inc)를 이용하여 DAF 유전자를 ligation 시켰다. 완성된 pCX-DAF-BSD vector를 EcoRI enzyme을 처리하여 ligation 유무를 확인하였고 또한 transfection을 위해 SspI enzyme으로 단일가닥으로 만든 후 phenol extraction법으로 DNA를 분리하였다.(그림 37)



<그림 37> DAF 유전자를 클로닝한 pCX-DAF-BSD vector(A), EcoRI으로 처리한 pCX-DAF-BSD(B), SspI으로 처리한 pCX-DAF-BSD 결과

3) HLA-G 발현 미니폐지 체세포에서의 DAF 유전자 확인

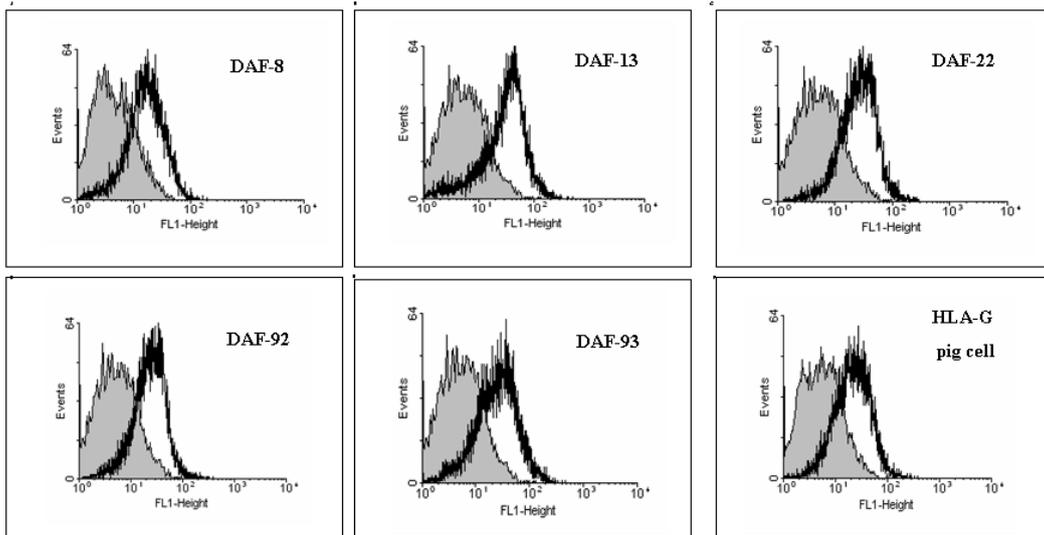
- HLA-G 발현 미니폐지의 체세포에 완성된 DAF 유전자 발현 vector를 주입하고 lipofectamin 2000을 이용하여 transfection을 시킨 후 G418로 selection을 실시하여 colony를 확보하고 배양하였다. 배양된 colony의 일부를 PCR 분석을 통하여 DAF 유전자를 확인하였고 정상적으로 미니폐지의 체세포 안에 DAF 유전자가 주입되었음을 확인하였다(그림 38).



<그림 38> 미니폐지 세포를 이용한 DAF PCR 분석결과

4) DAF 양성 체세포의 유세포 분석

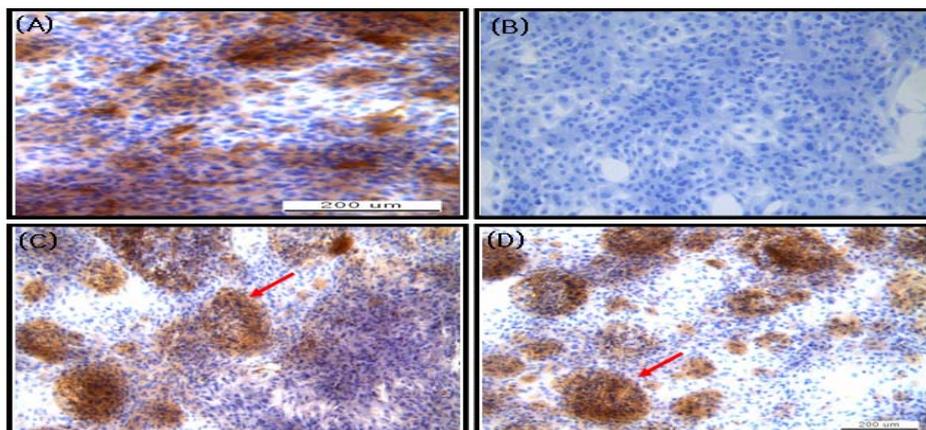
- PCR을 통하여 양성으로 확인된 체세포는 60mm dish 2개로 나누어 일주일 정도 배양 후 human DAF monoclonal antibody를 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. 분석 결과 양성 체세포 샘플의 DAF 발현(검은 실선)이 대조군 샘플(회색실선)에 비해 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 또한 HLA-G 발현 미니돼지 귀세포에서 HLA-G 유전자 역시 발현하는 것을 확인하였다.(그림 39)



<그림 39> 미니돼지 세포를 이용한 DAF 유세포 분석 결과

5) DAF 양성 체세포의 면역조직 화학 염색 분석

- 유세포 분석에서 발현이 증가한 세포주를 대상으로 protein level에서의 발현을 확인하기 위하여 human DAF monoclonal antibody를 이용하여 면역조직 화학염색 분석 (Immunohistochemistry)을 실시하였다. 실시 결과 negative control과 비교를 하였을 때 sample에서 현저히 DAF 유전자가 발현하는 것을 확인하였다.(그림 40)

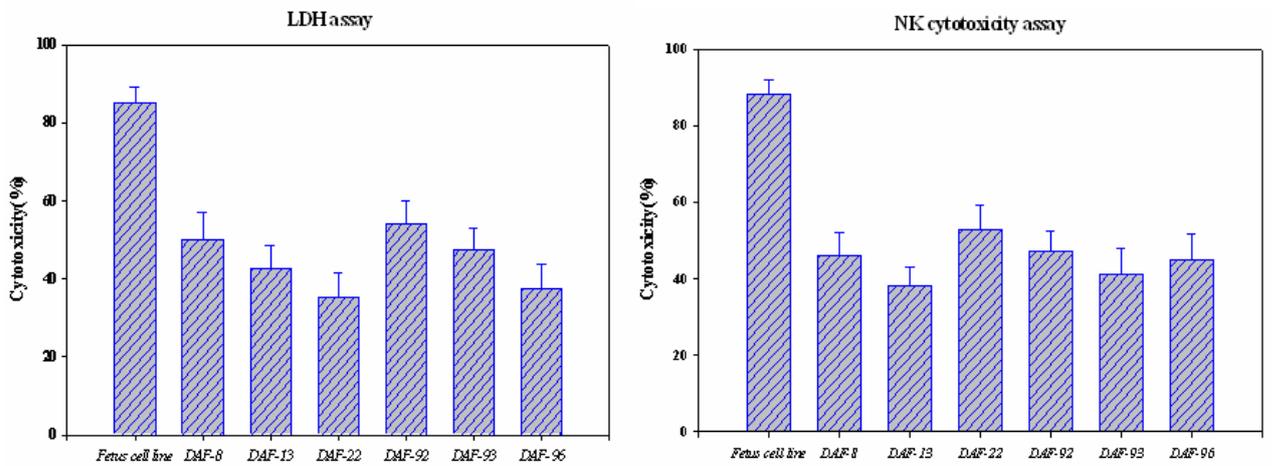
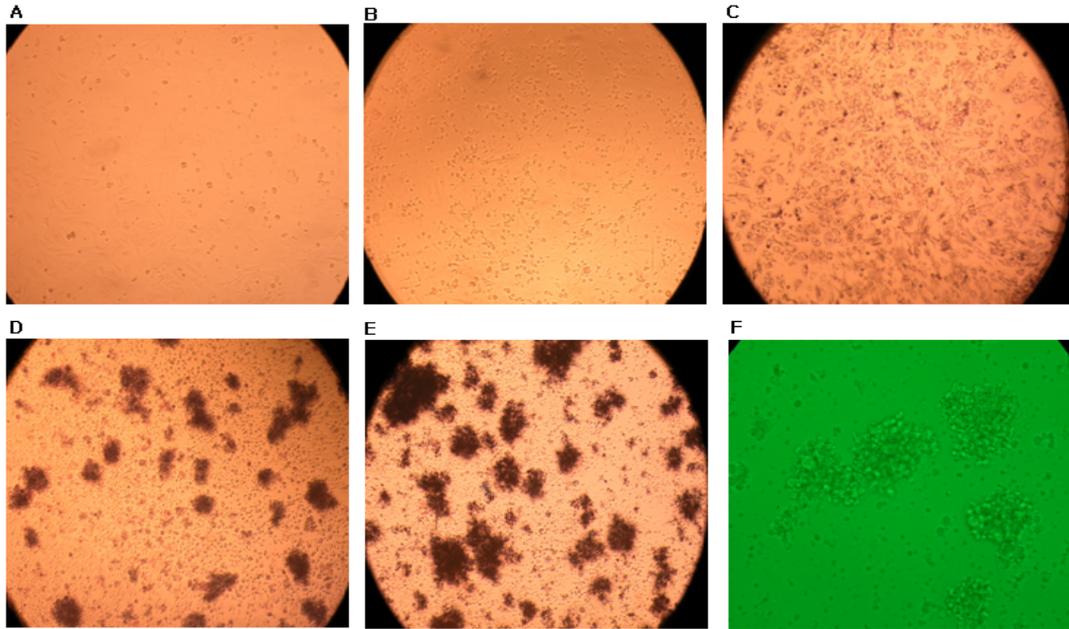


<그림 40> 유세포 분석 양성 sample 면역조직 화학염색 분석 결과

A: 양성대조군 DAF 체세포, B: 음성대조군 미니돼지 체세포, C,D : 양성 DAF 체세포 샘플

6) DAF 양성 체세포주 LDH assay 및 NK cytotoxicity assay

- 유세포 분석에서 양성으로 확인된 샘플들을 이용하여 초급성 및 세포성 면역활성 억제 실험을 위해 LDH assay 및 NK cytotoxicity assay를 실시하였다. 실시 결과 음성대조군과 샘플을 비교하였을 때 샘플들이 비교적 독성을 억제하는 것을 확인하였다.(그림 41)



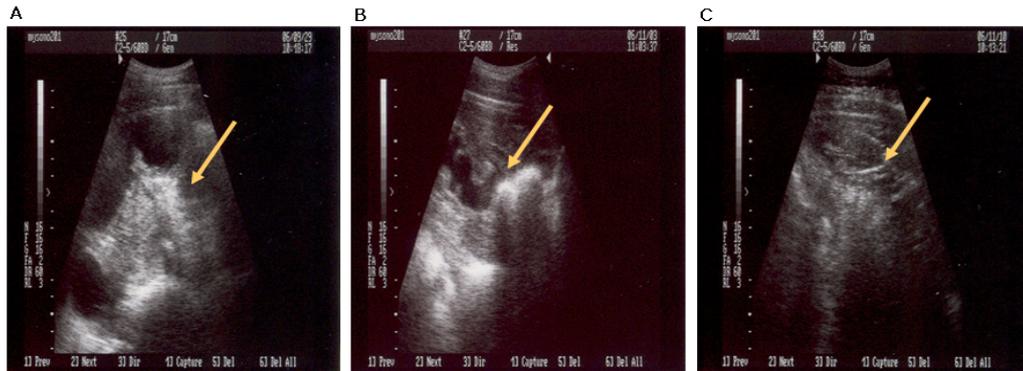
<그림 41> NK assay 시간별 경과 과정 및 LDH, NK cytotoxicity assay 결과

A: 양성 sample cell line, B: 양성 sample cell line과 NK92MI cell line 반응, C : 반응 후 MTT 처리 1시간 경과, D : 반응 후 MTT 처리 2시간 경과, E : 반응 후 MTT처리 4시간 경과, F : NK 92MT cell line

7) HLA-G/DAF 발현 미니돼지의 이식 및 임신

- 완성된 양성 체세포 샘플들을 이용하여 복제 수정란을 제작하고 이것을 이용하여 대리모에 이식하였다. 십 수차례 태아가 착상 후 50일 전후로 하여 퇴화되는 것을 확인하였는데 원인

을 분석하고 수정한 결과 대리모에서 태아가 퇴화되지 않고 계속 자라는 것을 초음파를 통하여 확인하였다. 현재 그림 7의 태아는 12월 25일에 태어날 예정이다.

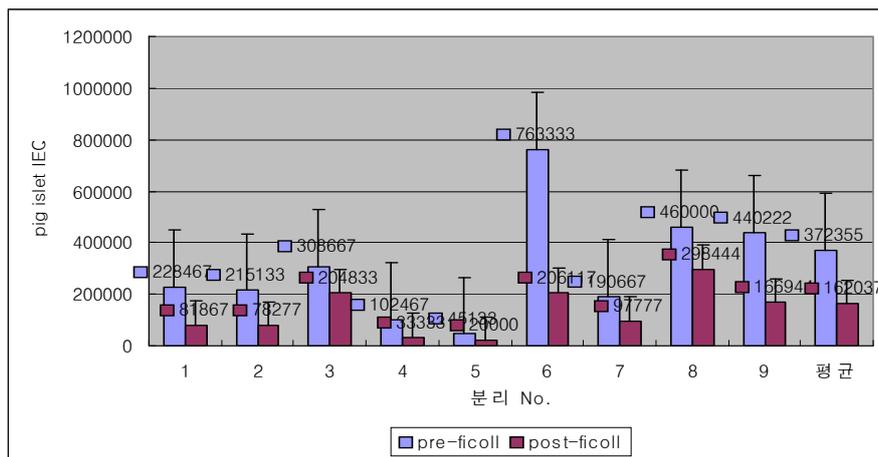


<그림 42> HLA-G/DAF 대리모 임신 초음파 결과

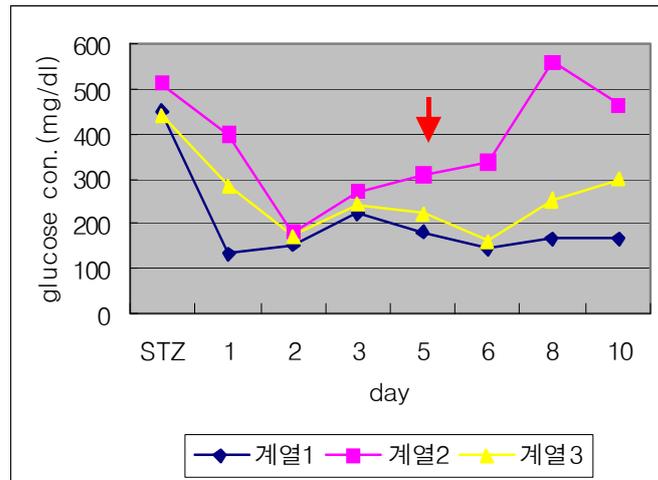
A: 임신 28일 경과, B: 임신 60일 경과, C: 임신 67일 경과

8) 돼지 Islet분리 및 배양

- 9회에 걸쳐 PWG mini-pig의 췌장으로부터 islet cell을 분리하여 다양한 조건에서 체외배양을 시도하여 cell survival에 적합한 조건을 탐색하였다. 그림 8.처럼 ficoll gradient 전후로 평균 각각 372355 IEQ 및 162037 IEQ의 수율을 보였다. 4, 5회의 경우 돼지의 perfusion을 생략하였을 때 췌장 내에서의 liberase 효소의 활성도에 영향을 받아 췌장내의 endocrine cell의 분리가 적게 되어 수율이 낮은 것으로 판단 됨. 또한 세포배양액에 glucagon-like protein을 첨가하면 췌장으로부터 분리된 beta-cell의 사멸을 막거나 지연시킴으로써 세포의 생존에 유리한 환경을 조성하는 것으로 판단 됨. (그림 43)



<그림 43> 돼지 췌장세포분리 및 ficoll 전후의 DTZ 양성 세포 수.

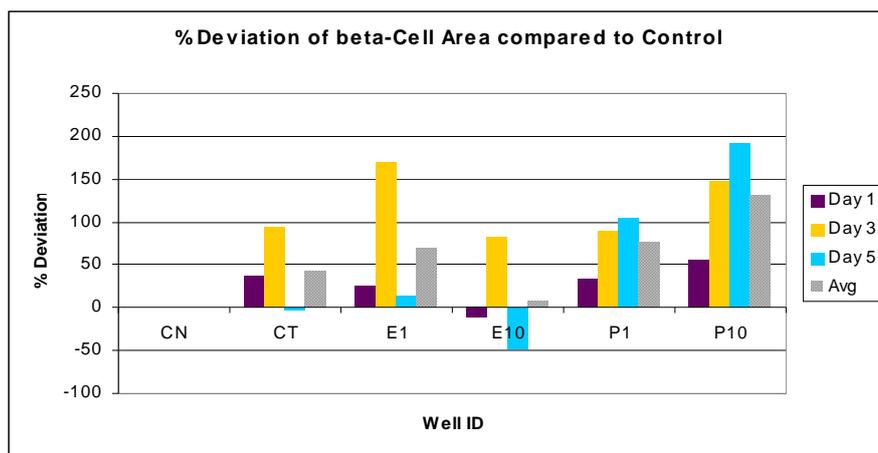


<그림 44> glucagon-like protein 매개 세포 생존능력 증가

dithiozine 염색 후 beta cell 면적. 대조군의 면적을 normaliz한 후 Glp-1 analogue처리를 한 실험군의 면적을 측정하였음. CN: control, E1: 1nM of Exendin-4, E10: 10nM of Exendin-4, P1: 1nM of Exendin-4 analogue, P10: 10nM of Exendin-4 analogue

9. 이종이식

- 돼지의 췌장으로부터 분리한 islet cell을 마우스의 kidney capsule에 이식하여 당뇨병이 유발된 마우스에 정상적인 췌장기능을 수행할 수 있는 이식 췌장세포의 숫자 및 생체내의 이식세포의 생존가능성을 검증하였으며 약 5000 IEQ 정도의 세포를 이식하여 기능 회복 및 세포생존성이 우수함을 확인 함. (그림 45)



<그림 45> 이종이식 후 당뇨병 유발 생쥐의 glucose tolerance.

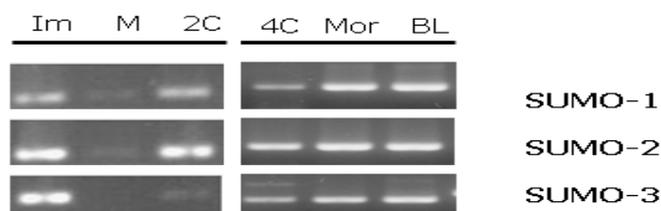
나. 제1협동과제

1) 연구결과

표 9. Sequence-specific primers of ubiquitin-related genes.

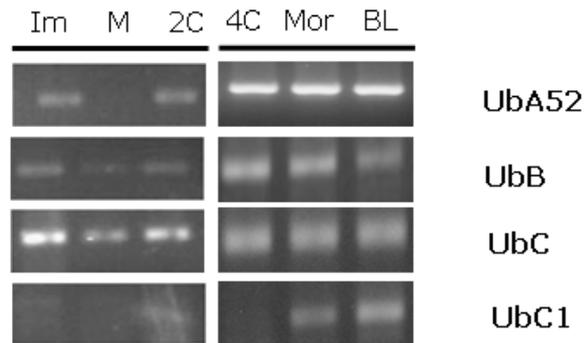
Gene	Sequence 5'→3'	Product size	GenBank accession number
SUMO1	F: ggaggcaaaccttcaactg	166	NM_009460
	R: cattggaactccctgtctttg		
SUMO2	F: acgagaaaccaaggaagga	150	NM_133354
	R: aacctgaccttcacaatag		
SUMO3	F: ccaactgagcaagctgatgaa	162	NM_019929
	R: tctgtctgctgctggaata		
Uba52	F: tcaaggccaagatccaagac	192	NM_026872
	R: tgtacttctgggcaagctga		
UbB	F: accagcagaggctgatcttt	193	NM_011664
	R: ttcacgttctcgatggtgtc		
UbC	F: ggcatgcagatctttgtgaa	156	BC094012
	R: tcacaccaagaacaagcac		
UbC1	F: gcaaagatccaggacaagga	160	NM_019639
	R: caaagatctgcatcccaact		
Uba2	F: gcagactttgcagcttctct	170	NM_026872
	R: ctgaacattcagccctgtga		
Ube213	F: aggctgatgaaggagcttga	188	NM_009456
	R: atcttgggtggtttgaatgg		
cul1	F: atgcttgccaagagactggt	186	NM_012042
	R: cggttctgaattcgtcaggt		
HERC3	F: taaaggtgtgtggtggcaaa	246	NM_028705
	R: ccatgccatagatgggaatc		

단백질 분해와 관련된 ubiquitination의 작용과 관련된 유전자들을 NCBI 웹사이트에서 기존에 보고된 저널들을 바탕으로 검색하여, 위 표와 같은 유전자들을 수집하였다. PCR 반응 후 생성되는 PCR산물의 예상되는 사이즈 및 NCBI GenBank에 등록된 번호들을 표와 함께 나타내었다. 이러한 유전자들의 coding sequence부위에서 primer를 디자인하여 PCR 실험에 사용하였다.



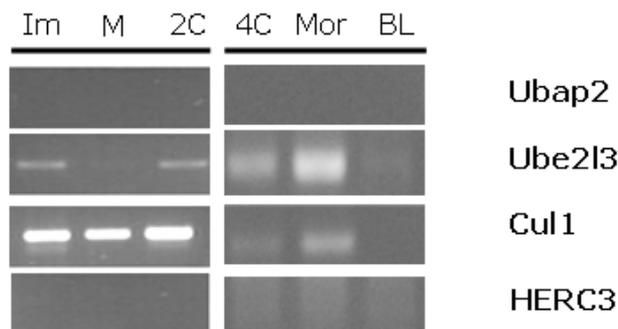
<그림 46> Evaluation of expression patterns of the genes encoding SUMO family proteins in mouse pre-implantation developmental stages by using RT-PCR (Im, 미성숙난; M, 성숙난; 2C, 수정 후 2세포기; 4C, 수정 후 4세포기; Mor, Morula; BL, 배반포기).

SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) 가족은 세포 내 단백질 분해에 관련된 역할을 하는 유비퀴티네이션 작용과 유사하다고 기존 연구 결과에 알려져 있어서, SUMO1,2,3의 마우스 초기 착상 전 발생 단계의 유전자 발현 정도를 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과, 미성숙 (Im)단계에서 발현이 높았다가 성숙과정 중에 그 발현이 감소하였고, 수정 후 2세포기 난할 수정란에서 다시 ZGA(zygotic gene activation)에 의해 각 유전자들의 발현이 증가하였다. 초기 착상 전 단계(4세포기~배반포)에서는 4세포기에서는 그 발현율이 약간 감소하다가 Morula와 배반포기에서 일정한 발현율을 보였다 (그림 46).



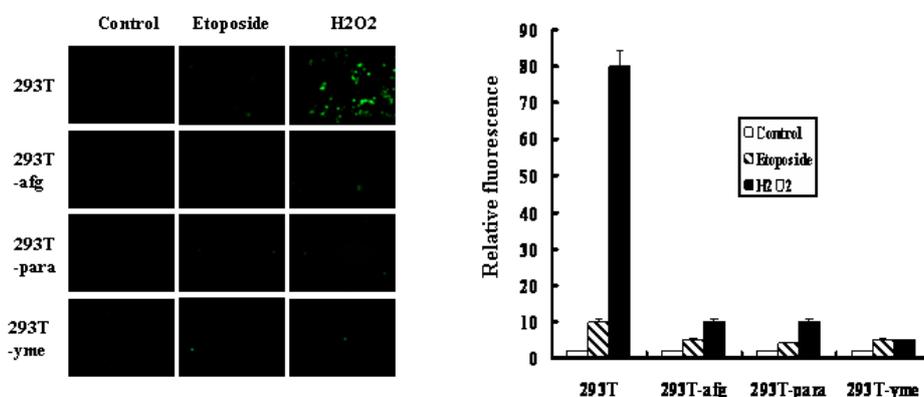
<그림 47> Evaluation of expression patterns of the genes encoding ubiquitination- proteins in mouse pre-implantation developmental stages by using RT-PCR (Im, 미성숙난; M, 성숙난; 2C, 수정 후 2세포기; 4C, 수정 후 4세포기; Mor, Morula; BL, 배반포기).

유비퀴티네이션 관련 유전자 중 Ubiquitin family가 있는데 ubiquitin-associated protein 2 (UbA52), ubiquitin B (UbB), ubiquitin B (UbC), UbC transcript variant 1 (UbC1)의 초기 착상 전 단계에서 유전자 발현 양상을 확인하였다. UbA52는 미성숙 단계에서 발현이 되었고 성숙 단계에서 발현이 현저히 감소하였다. 2세포기에서 다시 발현이 시작되어 4세포기에서 배반포 단계까지 높게 발현이 유지되었다. UbB와 UbC도 각 발생 단계에서 비슷한 발현 양상을 나타내었다. 하지만 UbC1의 경우 초기 단계에서 거의 발현되지 않았으며, Morula단계와 배반포 단계에서 발현되었다 (그림 47).

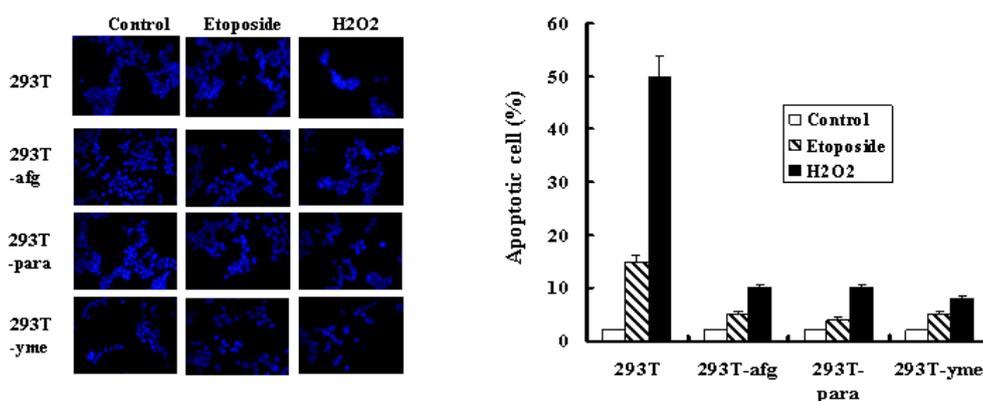


<그림 48> Evaluation of expression patterns of the genes encoding ubiquitination-related proteins in mouse pre-implantation developmental stages by using RT-PCR (Im, 미성숙난; M, 성숙난; 2C, 수정 후 2세포기; 4C, 수정 후 4세포기; Mor, Morula; BL,배란포기).

ubiquitin 그룹과 함께 유비퀴티네이션과 관련된 단백질 분해 작용을 한다고 알려진 ubiquitin-associated protein 2 (Uba2), ubiquitin-conjugating enzyme E2L3 (Ube2L3), cullin 1 (cul1), Hect domain and RLD 3 (HERC3) 의 발현양상을 확인해 본 결과, Uba2 와 HERC3의 경우에는 발현되지 않았으며, Ube2L3는 미성숙단계에서 발현되다가 성숙단계에서 감소하고 2세포기에서 다시 발현이 증가하면서 Morula단계까지 발현이 되다가 배란포기에서 발현이 현저히 감소하였다. cul1은 미성숙, 성숙 및 2세포기까지 이러한 초기 발생단계에서 높게 발현이 유지되다가 그 후 단계에서 차츰 발현이 감소하였다 (그림 48).



<그림 49> Effects of etoposide and H₂O₂ on ROS production of 293T cells , and yme1L1, paraplegin (SPG7), afg312-overexpressed cells.



<그림 50> Effects of etoposide and H₂O₂ on viability and apoptosis of 293T cells ,and yme1L1, paraplegin (SPG7), afg312-overexpressed cells.

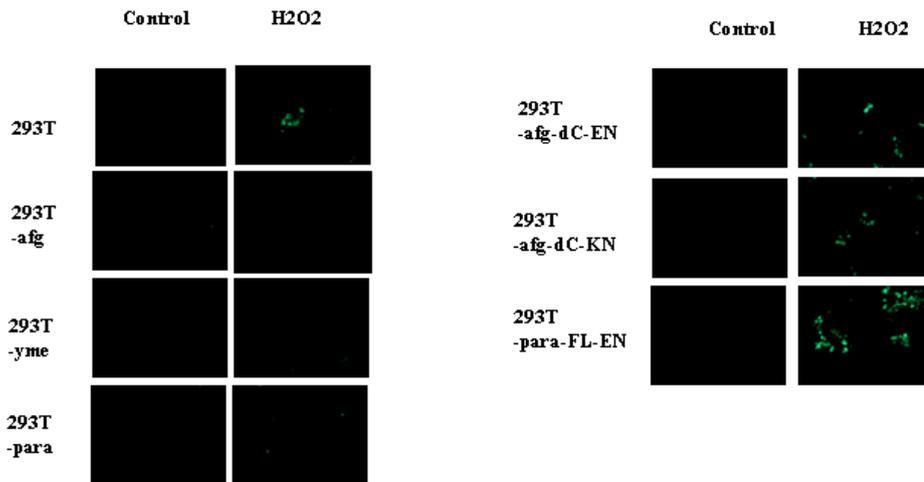
미토콘드리아 막단백질로서 단백질 분해, 세포 사멸과 신경퇴행에 관여하며 조절한다고 알려져 있는, AAA-protease family에 대한 연구를 진행하였다. 3차년도 연구에서는 이러한

ubiquitination과 비슷하게 단백질 분해를 비롯한 세포 내 다양한 기능을 담당하고 있는 AAA-protease family를 이용한 지금까지의 연구결과를 바탕으로 복제돼지에 적용하여 발전된 연구를 진행한다면 복제 수정란의 발생율을 증가시키는데 기여할 것으로 예상된다.

AAA-protease (ATPase associated with a number of cellular activities)는 에너지 의존적인 protease로서 세포 조절과 항상성에 중요한 역할을 한다. 여러 기관에 존재 하지만 그 중에서 미토콘드리아 내막에 위치하는 AAA-protease로서 yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2 등이 있으며, 이들이 세포 내 특히, 미토콘드리아에서의 역할과 ROS (Reactive oxygen species)와의 관계에 대해 다음 연구를 수행하였다. 293T 세포주에 yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2의 암호화 부위의 sequence를 발현 벡터에 클로닝을 하여, 각각 transfection을 통해 세포 내로 도입한 뒤 각각의 유전자가 과발현되는 세포주를 만들었다. 각 세포주에 세포사멸을 유도하는 물질인 etoposide를 30 uM의 농도로 12시간 동안 처리하였고, ROS의 한 종류인 과산화수소수 (H_2O_2)를 300 uM의 농도로 12시간 동안 처리하여, ROS의 생성 정도를 형광현미경을 이용하여 측정하였다. DCFHDA라는 H_2O_2 를 특이적으로 염색하는 시약을 이용하여 ROS를 측정한 결과, 대조군으로 사용된 293T 세포주에서는 ROS 생성이 증가되었지만, yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2가 과발현되는 세포주에서는 ROS 생성이 저해됨을 확인하였다. 상대적인 DCFHDA의 형광 발현 정도를 나타낸 그래프 결과에서도 마찬가지로 293T 세포주보다 yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2가 과발현되는 세포주에서는 비슷한 경향으로 현저하게 ROS 생성이 낮아짐을 알 수 있었다 (그림 49).

yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2가 미토콘드리아에서 생성되는 ROS의 생성을 억제한다는 결과를 바탕으로, 이러한 ROS가 세포사멸을 유도하는지와 AAA-protease가 ROS 생성 억제 뿐만 아니라 세포 사멸도 저해하는지 연구하였다. 그림 4에서 사용하였던 세포주와 같은 세트로 세포사멸을 유도하는 물질인 etoposide 30 uM의 농도와 ROS의 한 종류인 과산화수소수(H_2O_2) 300 uM의 농도로 12시간 동안 처리한 후, 세포 사멸을 형상학적으로 관찰할 수 있는 DAPI 염색법을 이용하여 세포 사멸에 의해 나타나는 핵의 모양을 형광 현미경을 통하여 관찰하였다. 그 결과, 293T 세포주에서는 H_2O_2 에 의해 핵의 단편화가 일어나는 모습이 관찰되어 apoptosis가 유도된다는 것을 알 수 있었지만, yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2는 서로 간 정도의 차이는 있지만, 어느 정도 비슷한 경향으로 apoptosis를 저해한다는 것을 알 수 있었다. 또한, etoposide에 의한 DAPI 염색결과에서는 핵 모습 변화의 차이가 없음이 관찰되었다.

전체 세포에서 DAPI염색 후 핵의 단편화가 관찰된 apoptosis 세포들에 대한 비율을 그래프 결과로 도출하여 분석하였을 때에도 293T 세포주에서 H_2O_2 에 의한 apoptosis 세포수의 증가가 yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2에 의해서 감소된다는 것을 알 수 있었다 (그림 50).



Afg dTM
Afg dTM KN → ATP hydrolysis domain
Afg dTM EA → Metal binding domain
Para FL EA → Metal binding domain

<그림 51> Effects of H₂O₂ on ROS production of wild type yme1L1, paraplegin (SPG7), afg3l2-overexpressed cells and mutant paraplegin (SPG7), afg3l2 cells.

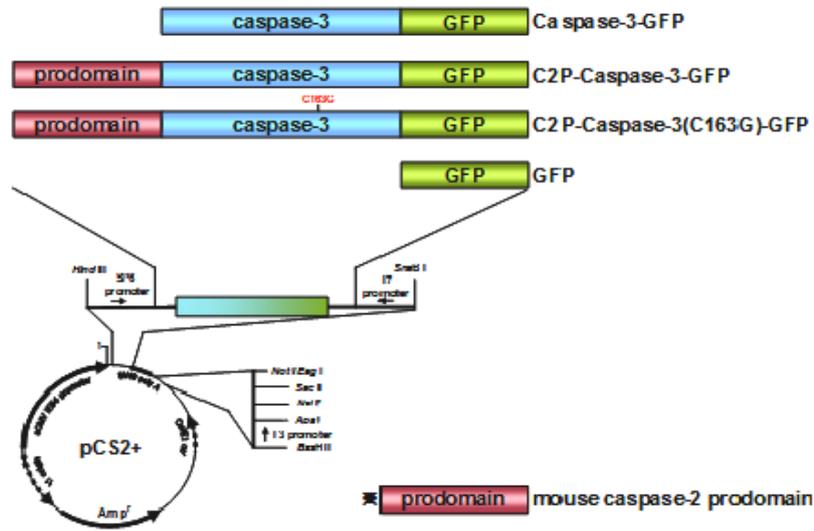
afg3l2의 도메인 중 ATP hydrolysis 도메인, Metal binding 도메인을 변형시킨 mutant afg3l2 세포주를 만들고, paraplegin의 Metal binding 도메인 부위를 변형시킨 mutant paraplegin 세포주를 만들어 각 도메인이 이들 유전자들에 중요한 역할을 하는지 실험하였다.

afg3l2의 ATP hydrolysis 도메인과 Metal binding 도메인을 변형시킨 mutant 세포주에서는 wild type afg3l2의 ROS 생성 저해 효과와 반대로, ROS가 생성이 되는 것을 확인하였다. 또한 wild type의 paraplegin의 Metal binding 도메인 부위가 변형된 mutant 세포주에서도 마찬가지로 H₂O₂에 의한 ROS 생성이 증가되었다 (그림 51).

다. 제2협동과제

1) 1. Apoptosis 관련 유전자인 caspase-3의 유전자 확보.

- Apoptosis 관련 유전자인 caspase-3의 apoptosis와 embryo발생에 대한 유전자의 기능을 연구하기 위하여 이전에 구축 했던 pCS2+ zebrafish용 vector에 유전자를 cloning하였다.
- Human caspase-3는 caspase cascade를 통하여 initiator caspase가 effector caspase를 activation한다. Initiator caspase가 활성화 되지 않은 조건에서도 caspase-3의 active form으로의 활성을 유도하기 위해서 caspase-2 prodomain (C2P)을 fusion시킨 caspase-3를 pCS2+ vector에 cloning하였다.

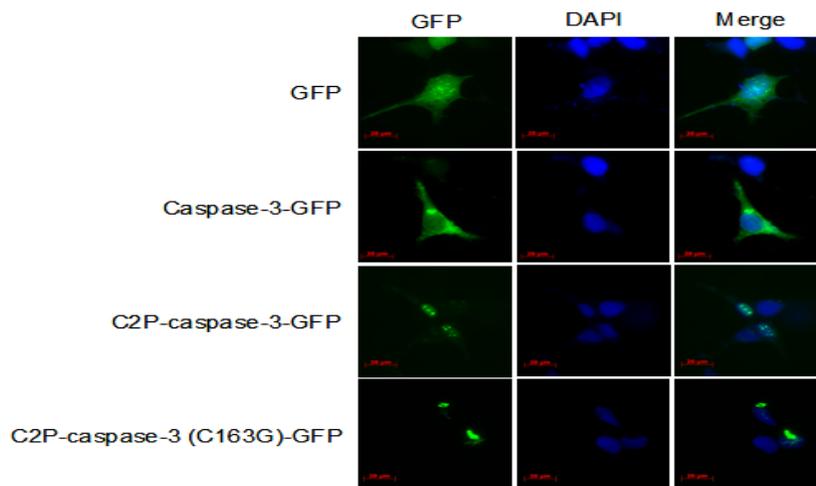


<그림 52> 제작된 caspase-3 GFP fusion constructs의 구조

- Zebrafish 모델 시스템의 형태 변화가 활성화되지 않은 caspase-3의 과발현에 의한 것인지, C2P에 의한 caspase-3의 활성화에 의한 것인지 확인하기 위해, C2P domain이 존재하지 않는 pro-caspase-3 유전자와 활성화부위를 mutation 시킨 C2P-caspase-3 (C163G) 유전자를 zebrafish 용 expression vector에 cloning하였다. 모든 유전자는 발현 확인이 용이하도록 유전자의 C-말단에 GFP 단백질을 fusion하였다.

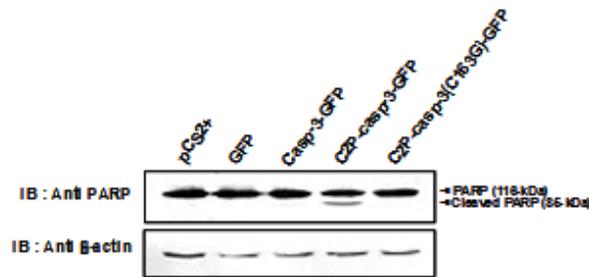
2. Caspase-3 construct의 발현 확인과 세포사멸 확인

- Caspase-3-GFP를 zebrafish에서 과발현시키기 전에, HEK293 cells에 transfection하여 형광현미경으로 active caspase-3의 발현 양상을 확인하였다.



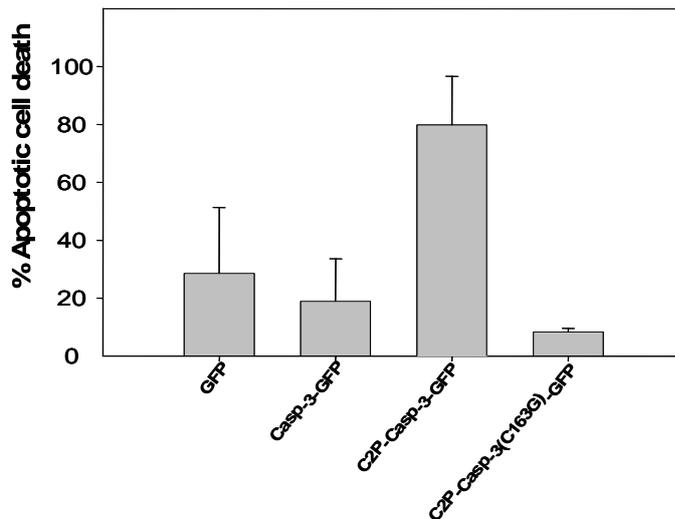
<그림 53> HEK293 cells에서 C2P-caspase-3-GFP의 발현양상

- Procaspase-3-GFP를 HEK293 cell에 transfection하였을 때는 세포질에 넓게 발현되는 것을 확인하였다. 하지만 C2P-caspase-3-GFP의 경우 핵에서 발현하고 있는 것을 확인하였으며, 대조군인 GFP에 비하여 GFP 발현 정도가 약한 것을 확인하였다. C2P-caspase-3 (C163G)-GFP는 핵과 세포질에 같이 발현되고, fiber 또는 dot-like 형태로 발현되는 것을 확인하였다.
- 또한, C2P-caspase-3의 발현을 통한 활성화의 여부를 western blotting을 통해서 확인하였다.



<그림 54> C2P-caspase-3-GFP의 활성화에 의한 PARP의 절단 확인

- PARP 항체를 이용하여 분석한 결과, C2P-caspase-3-GFP를 transfection한 경우에서만 cleaved PARP fragment (86 kDa)가 형성된 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 caspase-2 prodomain에 의해 procaspase-3가 active caspase-3로 processing 됨으로써 catalytic activity가 증가되는 것을 확인하였다.
- C2P-caspase-3의 발현에 따른 세포사멸은 DAPI staining assay를 통하여 확인하였다.

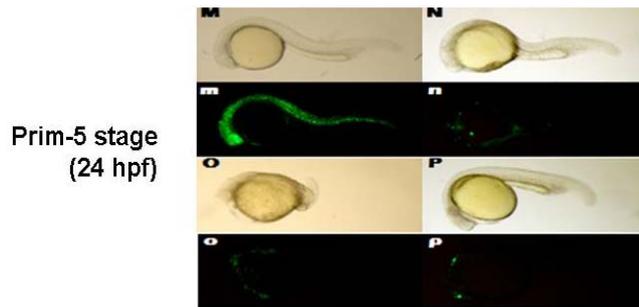


<그림 55> C2P-caspase-3의 활성화에 의한 세포사멸의 확인

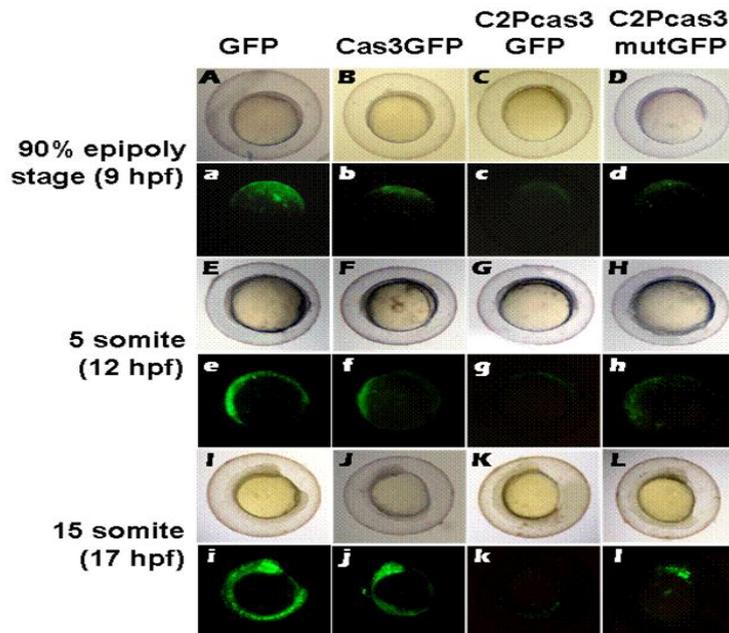
- GFP나 procaspase-3-GFP, C2P-caspase-3(C163G)-GFP 비하여 C2P-caspase-3-GFP를 transfection한 경우에는 caspase-3 활성화에 의한 apoptotic cell death 비율이 80%로 증가된 것을 확인할 수 있었다.

3. C2P-caspase-3의 과발현을 통한 embryo 발생에서의 유전자의 기능 확인

- C2P-caspase-3의 DNA를 microinjection하여 유전자의 발현을 발생단계별로 GFP로 모니터링하고, 발현에 따른 embryo 발생에서의 형태변화를 확인하였다.



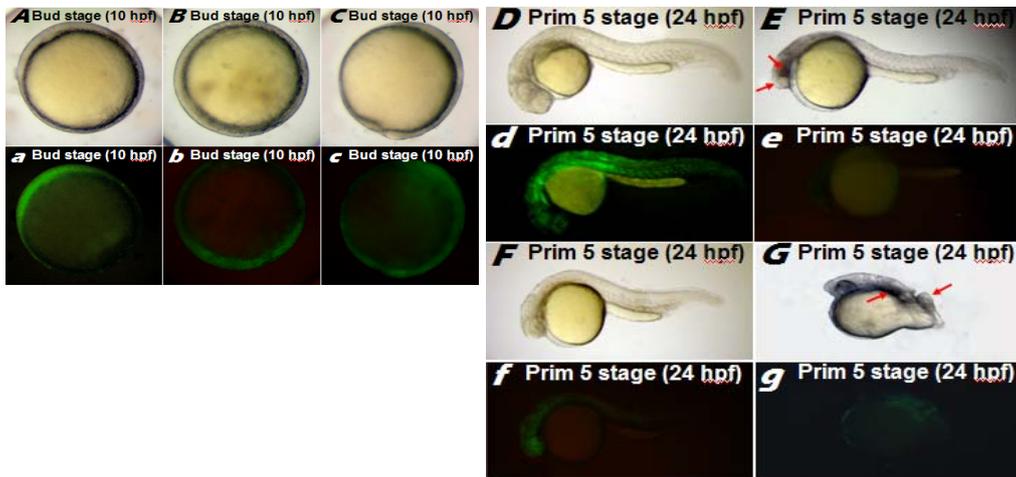
M, m = GFP
 N, n = Caspase-3-GFP
 * O, o = C2P-caspase-3-GFP
 P, p = C2P-caspase-3 (C163G)-GFP



<그림 56> DNA microinjection을 통한 C2Pcaspase-3의 발현 확인과 형태 변화 관찰

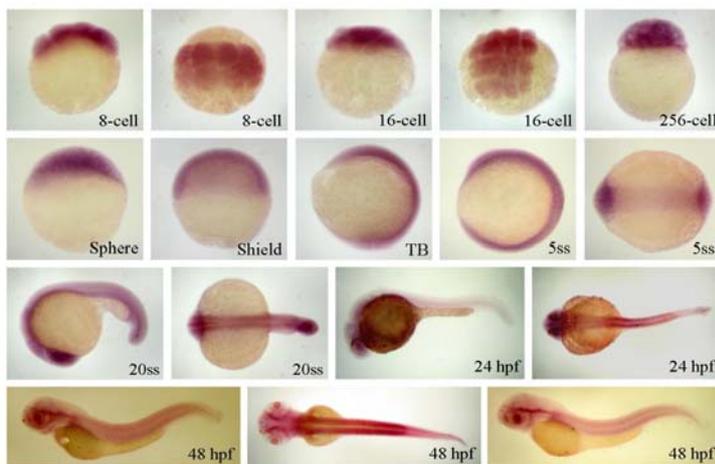
- 발생초기 때부터 모든 GFP의 발현을 통해서 caspase-3의 발현을 확인할 수 있었고, cell에서와 마찬가지로 대조군과 비교해서 GFP의 발현정도가 낮은 것으로 확인되었다. 수정 후 24시간에 대조군인 GFP injection의 경우는 정상적인 발생이 이루어졌으나, C2P-caspase-3-GFP를 injection한 embryos에서는 꼬리가 휘어지거나 머리가 작아지는 현상을 확인할 수 있었다. Caspase-3-GFP나 C2P-caspase-3(C163G)-GFP를 injection한 경우에서도 드물게 꼬리가 휘어지는 형태적 변화를 관찰 할 수 있었지만, C2P-caspase-3-GFP를 injection한 군에서 형태적 변화가 월등히 많은 것이 확인되었다.
- In vitro에서 제작한 capped mRNA를 embryo에 microinjection한 경우도 DNA injection결과와 마찬가지로 C2P-caspase-3가 과발현된 embryos에서 꼬리의 비정상적인 발생과 머리가 작아지는 형태적 변화가 확인되었다.

A, a, D, d = GFP; B, b, E, e, G, g = C2P-caspase-3-GFP; C, c, F, f = C2P-caspase-3(C163G)-GFP



<그림 57> RNA microinjection을 통한 C2P-caspase-3의 발현 확인과 형태 변화 관찰

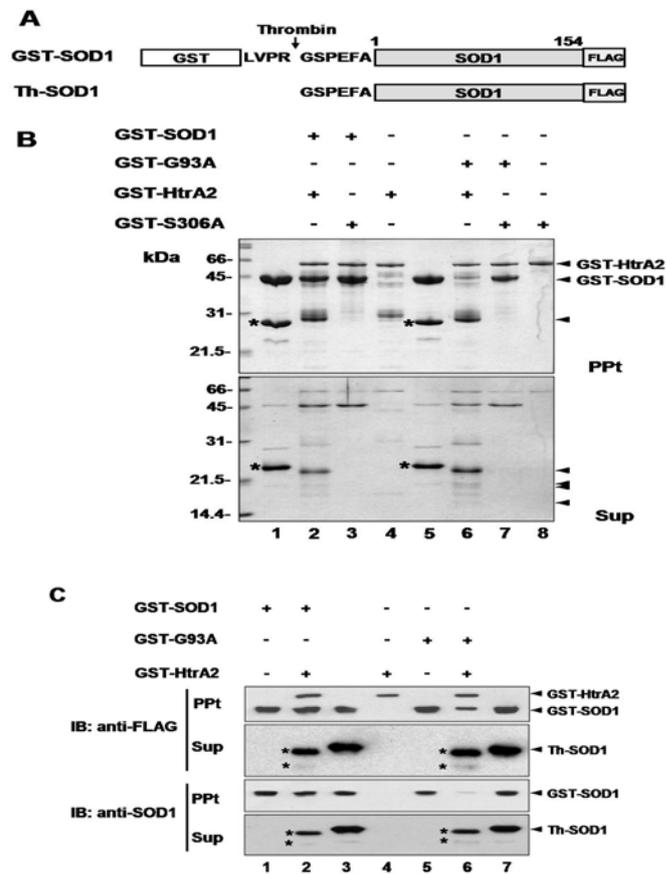
4. HtrA2와 상동성이 높은 zebrafish HtrA1의 발현 양상 확인



<그림 58> zebrafish HtrA1의 발현 양상 확인

- 1년차에서 연구하였던 apoptosis 관련 유전자인 HtrA2의 연구를 계속 진행하기 위해 in silico screening을 통하여 상동성이 높은 zebrafish HtrA1 (zHtrA1) 유전자를 확인하였고, zebrafish larvae cDNA를 이용하여 유전자를 확보하여 pBS vector에 cloning 하였다.
- zHtrA1의 기능을 연구하기 위하여 우선적으로 in situ hybridization을 통하여 embryo 발생 단계에서 발현 양상을 확인하였다. zHtrA1은 발생 초기에서부터 ubiquitously하게 발현되고 있으며, 모든 장기의 발생이 끝나는 발생 후 48시간에도 eye와 head, body, tail까지 전체적으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 zHtrA1이 발생은 물론이고, 성체에서도 생체 내 항상성 유지를 위한 중요한 유전자임을 추측할 수 있다.

5. pGEX vector 시스템을 이용한 HtrA2의 확인



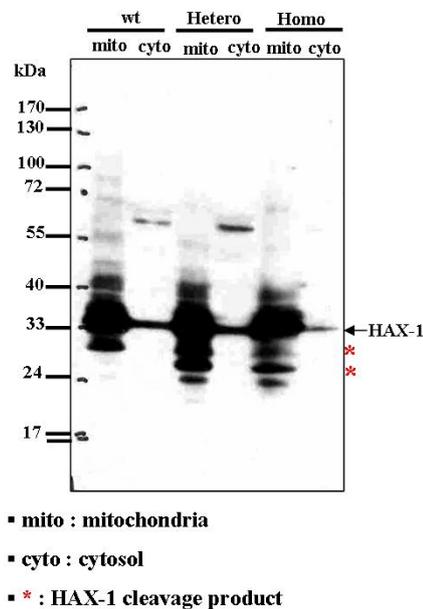
<그림 59> HtrA2에 의한 GST-SOD1과 GST-G93A 단백질의 절단양상

- (A) GST-SOD1 융합단백질 사이의 thrombin 절단 부위
- (B) HtrA2에 의한 GST-SOD1과 GST-G93A 단백질의 절단
- (C) Immunoblot assays를 통한 SOD1 fragments의 확인(*Journal of Life Science*, 2006. 16)

- Apoptosis 관련 유전자인 HtrA2의 생체 내 조절 기능을 확인하기 위하여 HtrA2의 substrate를 탐색하였다. 대장균을 이용하여 HtrA2를 발현시킬 수 있는 pGEX vector 시스템을 이용하여 human HtrA2 단백질을 얻을 수 있었다. 또한 세포사멸과 생체 내 항산화 작용을 통한 항상성 유지에 중요한 단백질로 알려져 있는 SOD1을 같은 시스템으로 대량으로 회수하였다. SOD1과 HtrA2와의 관계를 in vitro cleavage test를 실시하였다.
- 그 결과 SOD1이 HtrA2에 의해 절단되어 지는 것이 뚜렷하게 확인하였다. 이는 SOD1과 HtrA2가 세포사멸기전에서 밀접한 상관관계가 있음을 나타낸다.

6. Apoptosis 유전자인 HtrA2가 제거된 mice를 이용한 HtrA2의 substrate 확인

- 활성이 제거된 *mnd2* mice를 이용하여 HtrA2의 substrate screening을 실시하였다.



<그림60> *mnd2* mitochondrial lysates를 이용한 HAX-1의 변화 확인

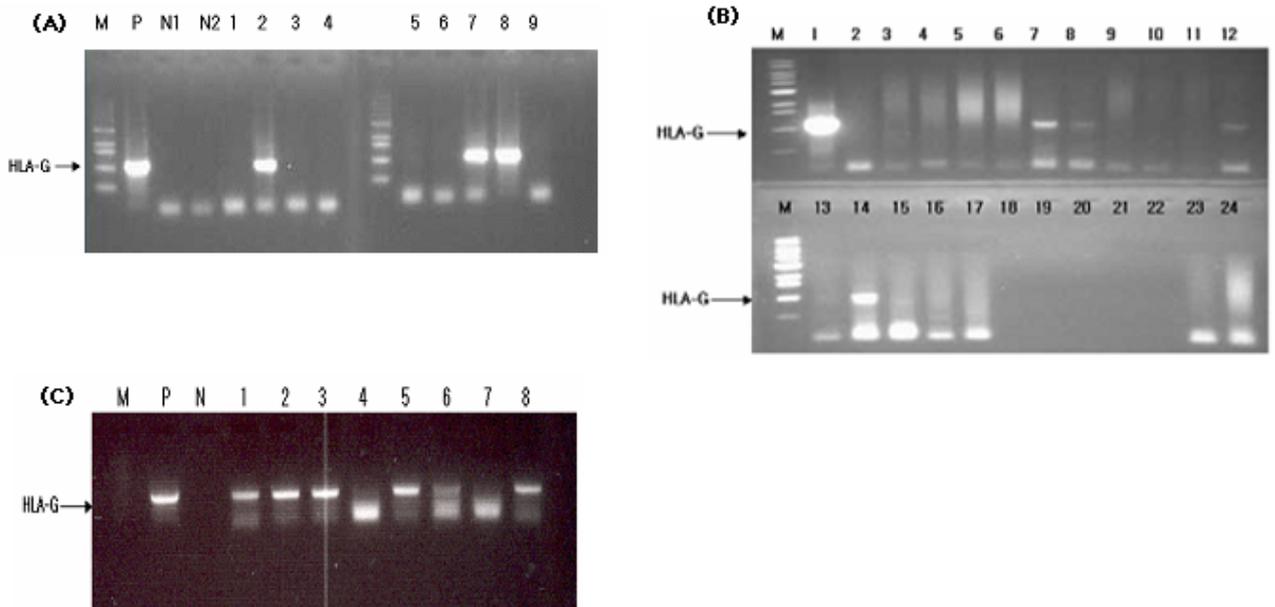
- *mnd2* mice와 정상적인 mice에서 liver와 brain을 적출하여 fractionation 방법을 통해 얻었고, mitochondrial lysates를 대장균을 이용하여 정제한 HtrA2와 반응시켜 HtrA2의 substrate로 알려진 HAX-1의 항체를 이용하여 western blotting analysis를 통해 변화를 확인하였다. HAX-1의 발현 양상은 hetero, homozygous *mnd2* mice에서 정상적인 mice와 다르게 나타났다. 이러한 HtrA2등의 세포 사멸 유전자의 연구를 위하여 다양한 방법으로 지속적인 실험을 진행할 예정이다.

3. 3년차 연구결과

가. 제1세부과제

1. HLA-G 형질전환 복제 미니돼지 축군 형성

- 형질전환된 복제 미니돼지와 wild-type의 미니돼지의 자연교배를 통해 축군을 형성하였다. 먼저 HLA-G 모돈 미니돼지와 wild-type 미니돼지와 교배를 시킨 후 F1 4마리를 생산하였다. 형질전환 유무 확인은 PCR을 통해 확인하였다. 또한 F1 암컷과 수컷을 교배하여 HLA-G 형질전환 미니돼지 F2 6마리를 생산하고 형질전환 유무를 PCR을 통해 확인하였다.

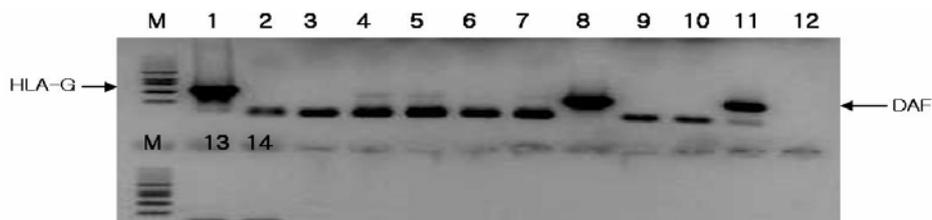


<그림 61> HLA-G F1, F2 자돈 PCR screening

(A), (B) HLA-G 자돈 F1, (C) HLA-G 자돈 F2

2. HLA-G/DAF 클론 세포주의 RT-PCR

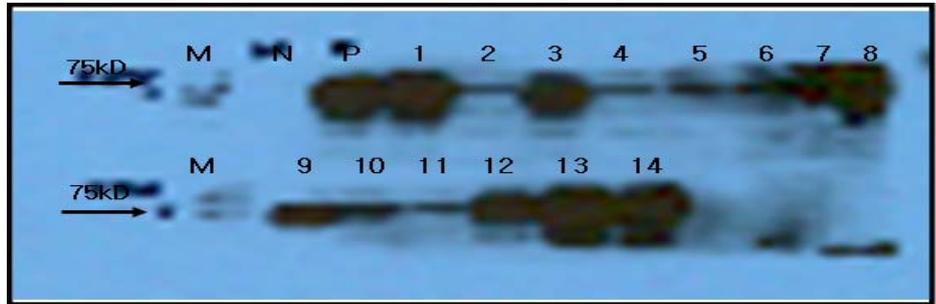
- HLA-G/DAF 클론 세포주를 선별한 후 total RNA를 Trizol을 사용하여 분리한 다음 cloned AMV kit를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후 HLA-G 및 DAF primer를 사용하여 RT-PCR을 통해 RNA level에서의 발현 양상을 확인하였다.



<그림 62> HLA-G/DAF 클론세포주의 RT-PCR

3. HLA-G/DAF 클론 체세포주의 웨스턴 블릿

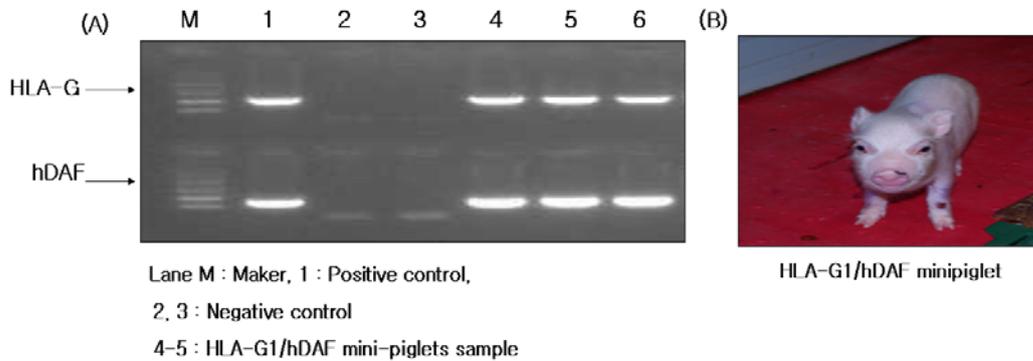
- HLA-G/DAF 클론 체세포주에서의 단백질발현 확인을 위해 anti-DAF mouse monoclonal antibody를 사용하여 웨스턴 블릿을 실시하였다. 그 결과 DAF의 expect size 인 75kD의 band가 확인 되었다.



<그림 63> HLA-G/DAF 클론 세포주 DAF 웨스턴 블릿

3. HLA-G/DAF 복제 미니돼지 생산

- 13마리의 대리모 임신 돈에서 총 3마리의 돼지 산자를 생산하였다. 하지만 2마리의 산자가 폐사하고 1마리의 돼지산자가 생존하였다. 갓 태어난 3마리의 산자들의 귀조직을 이용하여 genomic DNA를 추출하였고 PCR 분석을 실시하였다. 확인결과 3마리 모두 형질전환을 확인하였다.



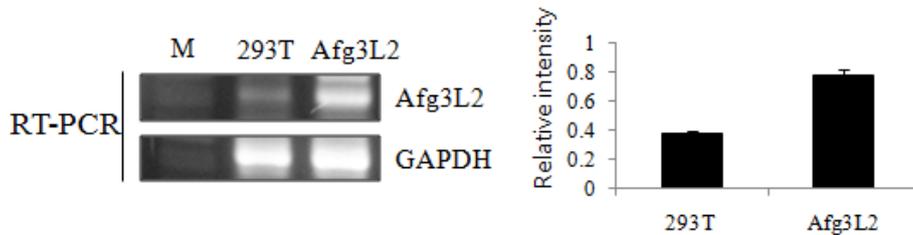
<그림 64> HLA-G/DAF 자돈 PCR screening

나. 제1협동과제

1) 미토콘드리아 막단백질로서 단백질 분해, 세포 사멸과 신경퇴행에 관여하며 조절한다고 알려져 있는 AAA-protease family에 대한 연구를 진행하였다. AAA-protease (ATPase associated with a number of cellular activities)는 에너지 의존적인 protease로서 세포 조절과 항상성에 중요한 역할을 한다. 여러 기관에 존재 하지만 그 중에서 미토콘드리아 내막에 위치하는 AAA-protease로서 Afg3l2가 있으며, 2차년도 연구에서는 transient 하게 발현하는 세포 내에서 연구가 진행되었다. 이번에는 세포 내에서 Afg3L2가 stable하게 발현될 때, 미토콘드리아에서의 역할과 ROS (Reactive oxygen species)와의 관계에 대해 다음 연구를 수

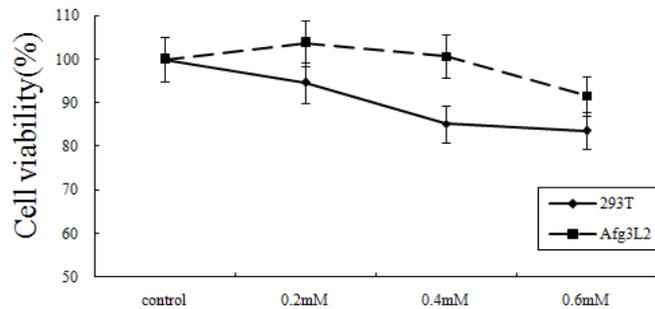
행하였다.

293T 세포주에 Afg3L2의 발현 벡터를 transfection방법을 사용하여 세포 내로 도입한 뒤, G418로 selection 하여 stable cell line을 제작하였다. 발현은 제작한 primer를 사용한 RT-PCR로 확인하였다 (그림 65).



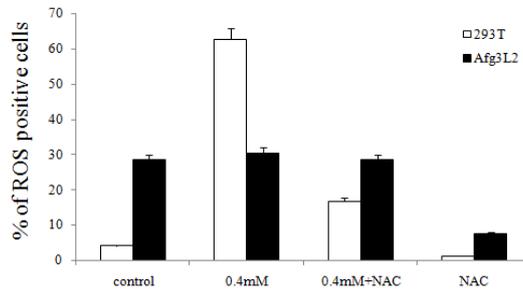
<그림 65> HEK 293/Afg3L2 세포주의 발현 확인.

이전 연구에서 ROS로 인한 cell death를 Afg3L2 transient cell이 억제한다는 결과를 확인하기 위하여, Afg3L2 stable cell line에 다양한 농도의 H₂O₂ (0.2, 0.4, 0.6 mM)를 24시간 처리한 후, cell viability 차이를 MTT assay로 확인하였다. 그 결과, Afg3L2 stable cell line에서는 H₂O₂에 의한 cell death가 감소하는 것을 알 수 있었다 (그림 66).



<그림 66> H₂O₂에 대한 HEK 293, HEK 293/Afg3L2 cell line의 cell death 확인.

Afg3L2 유전자가 발현되는 세포의 미토콘드리아에서 ROS의 생성이 억제된다는 결과를 바탕으로, 이러한 ROS 생성 억제가 stable cell line에서도 동일하게 나타나는지 연구 하였다. control과 Afg3L2 stable cell line에 0.4 mM H₂O₂를 24시간 동안 처리하였고, DCFH-DA라는 시약을 사용하여 세포내 ROS를 특이적으로 염색하여 flow cytometry로 측정하였다. 그 결과, H₂O₂를 처리하지 않은 세트에서는 Afg3L2 stable cell line의 ROS 생성이 더 높았다. 하지만, H₂O₂를 처리한 세트에서는 control에 비해 ROS 생성 증가량이 적은 것을 알 수 있었다. 이로써 Afg3L2는 세포내 ROS를 적정수준으로 유지시켜 주는 것으로 확인되었다. 또한, 세포내 생성된 ROS를 제거시켜주는 N-acetyl cysteine을 H₂O₂ 처리하기 30분 전에 1 mM로 전처리를 하여 본 연구팀의 실험결과를 확인하였다 (그림 67).



<그림 67> H₂O₂에 대한 HEK 293, HEK 293/Afg3L2 cell line의 ROS 생성 확인.

이처럼 AAA protease는 세포내에서 ROS 생성 및 유지에 중요한 작용을 하는 것으로 확인 되었다. 이러한 AAA protease (ATPase Associated with a variety of cellular Activities protease)는 다양한 종에서 존재를 하는 막 단백질로서 여러 가지 단백질 분해에 중요한 작용을 하는 것으로 밝혀졌다. E. coli의 경우에는 FtsH라는 AAA protease가 존재한다는 것이 확인 되었으며 다양한 substrate가 존재한다고 밝혀졌다. 그 중 본 연구팀은 YccA라는 protein을 찾게 되었고 그것이 human Bax inhibitor-1의 homolog인 것을 확인할 수 있었다.

Protease	Organism (organelle)	Proteolytic substrates	Regulation
FtsH	<i>E. coli</i>	SecY, F ₀ subunit a, YccA ^b	σ ³² , λCIP ^a , λCIII ^a , λXis ^a , LpxC ^a
	<i>B. subtilis</i>	?	SpoVM ^a
m-AAA-protease (Yta10p/Yta12p)	<i>S. cerevisiae</i> (mitochondria)	F ₀ subunits 6, 8, 9, Cox1, Cox3, Cob	?
i-AAA-protease (Yme1p)	<i>S. cerevisiae</i> (mitochondria)	Cox2	?
FtsH	<i>A. thaliana</i> (chloroplasts)	Rieske Fe/S	?

^aSoluble and peripheral membrane proteins.
^bThe classification of YccA is tentative as its function remains to be determined.

TIBS, 25:247-251(2000)



<그림 68> FtsH가 YccA를 degradation하는 모식도

우리가 연구하고자하는 단백질인 Bax Inhibitor-1은 anti-apoptotic한 Bcl-2와 상호작용하며, pro-apoptotic 한 Bcl-2 family인 Bax에 의한 세포사멸을 저해한다고 그 기능이 처음 밝혀졌다. 주로 ER 또는 mitochondria에 존재한다고 알려져 있으며 다양한 경로를 통한 세포사멸을 막아준다고 보고되고 있다. 또한 oxidative stress로부터 세포를 보호하며, calcium을 조절하여 ER stress에 의한 세포사멸도 저해한다고 밝혀졌다.

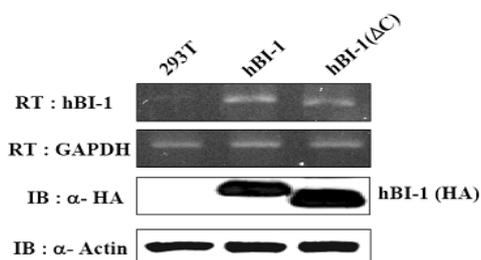
BI-1은 심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 골격근, 신장, 췌장 등 거의 대부분의 신체 기관에서 발현되며, 특히 정소에서 높게 발현되는 유전자인 TEGT (Testis enhanced gene transcript)라고도 하므로, 동물 발생에도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

따라서 AAA protease의 다양한 기능연구와 ROS 조절 작용은 BI-1과 상당히 밀접한 연관이 있을 것으로 보이지만, BI-1과 AAA protease 간의 연관성 및 기능에 대해서는 밝혀지지

않아서 BI-1의 세포내 작용에 대한 연구를 수행하였다.

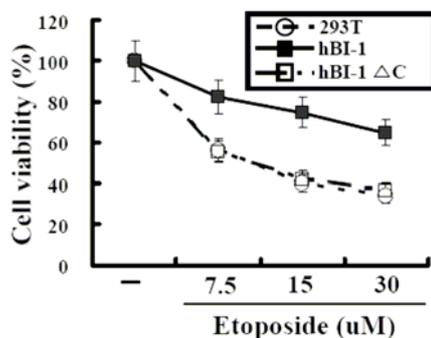
Bax inhibitor-1에 대한 연구를 시작하기 위해 여러 cDNA에서 BI-1 유전자의 cloning을 시작하였다. NCBI에 있는 hBI-1의 nucleotide sequence를 기준으로 primer를 제작하였으며, PCR method를 사용하여 증폭 하였다. HFB (human fetal brain), 293T, HaCaT의 cDNA를 template를 사용하여 PCR한 DNA를 pcDNA vector에 cloning 하였다. 또한 기존의 논문을 참조하여 BI-1의 c-terminal 9개 amino acid를 제거한 ΔC mutant form을 제작 하였다.

BI-1 wild type, ΔC mutant form 들의 세포 내 기능을 조사하기 위해서, 각각의 발현 vector를 HEK 293 cell에 transfection 하였고, transfection 된 세포를 G418로 selection 하여 stable하게 BI-1, BI-1 ΔC 를 발현하는 cell line인 HEK 293/hBI-1, HEK 293/hBI-1 ΔC 를 제작하였다. 발현은 western blotting과 RT-PCR로 하였다 (그림 69).



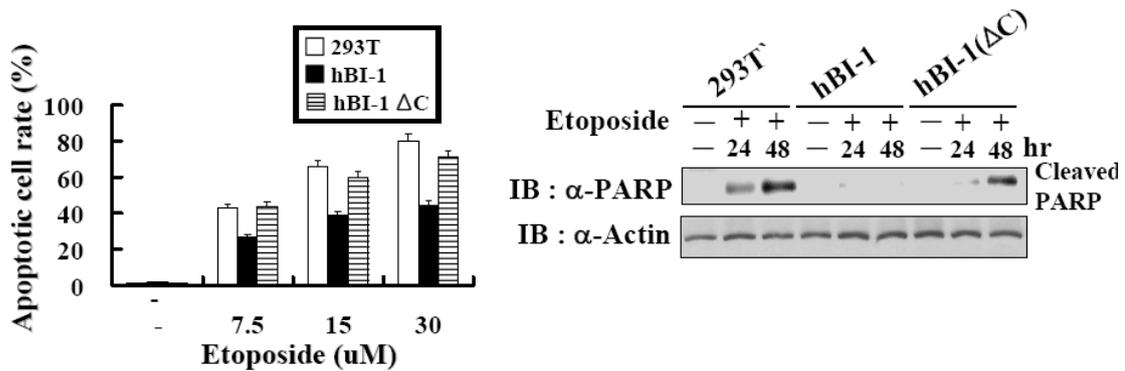
<그림 69> HEK 293/hBI-1, HEK 293/hBI-1 ΔC cell line의 발현 확인. hBI-1, hBI-1 ΔC expression vector를 HEK 293 cell에 도입 후, G418로 selection하여 stable expression cell을 만들었다. 각 cell line에서의 발현을 HA antibody와 RT-PCR로 확인 하였다.

각각의 stable cell에서 BI-1의 기능을 확인하기 위해 mitochondria 경우 stress reagent인 etoposide 처리 후 cell death 차이를 MTT assay로 확인하여 보았다. 그 결과, stoposide에 의한 cell death를 BI-1이 억제하였지만, ΔC mutant는 저해하지 못하는 것으로 나타났다 (그림 70).



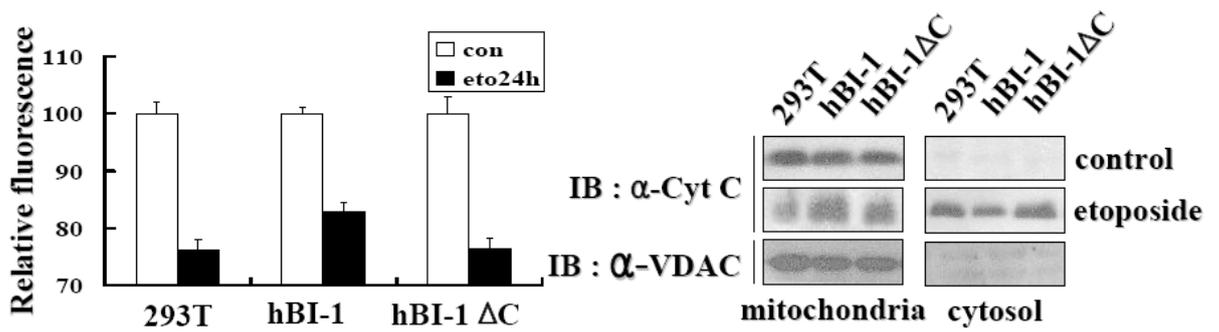
<그림 70> etoposide에 대한 HEK 293/hBI-1, ΔC cell line의 cell death 확인. HEK 293, HEK 293/hBI-1, HEK 293/hBI-1 ΔC cell line에 etoposide 48시간 동안 처리 한 후 MTT assay로 cell death를 확인 하였다.

BI-1이 저해시킨 etoposide에 의한 cell death 가 과연 apoptosis에 의한 차이인지 알아보기 위해 DAPI staining을 이용하여 nucleus fragmentation의 변화를 확인하였고, western blotting으로 핵막 단백질인 PARP cleavage 변화 양상을 관찰하였다. HEK 293 cell에 처리한 etoposide의 농도가 증가할수록 nucleus fragmentation이 증가하는 양상을 확인 하였고, HEK 293/hBI-1 cell에서는 이러한 현상이 저해되었다. BI-1의 negative control인 hBI-1 ΔC 은 억제하지 못하는 것으로 조사되었다. 또한, 이와 유사하게 etoposide 농도 증가에 따른 PARP의 cleavage 증가가 hBI-1의 과 발현에 의해서 저해됨을 확인하였다 (그림 71).

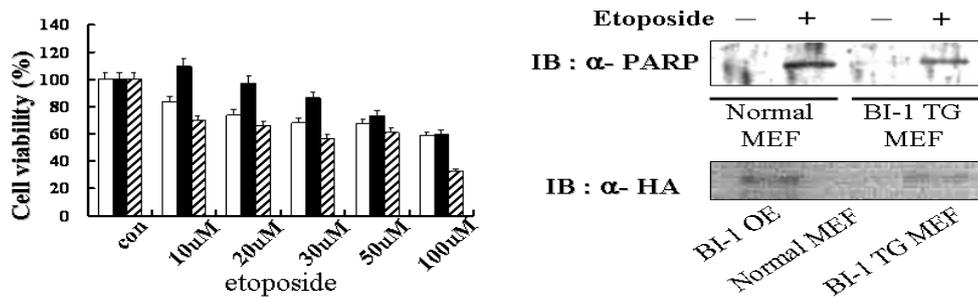


<그림 71> etoposide에 대한 HEK 293/hBI-1, HEK 293/hBI-1 ΔC cell line의 apoptosis 확인. A. HEK 293, HEK 293/hBI-1, HEK 293/hBI-1 ΔC cell line에 etoposide (30 μM)을 48시간 동안 처리 한 후 DAPI staining으로 DNA fragmentation을 확인 하였다. B. HEK 293, HEK 293/hBI-1, HEK 293/hBI-1 ΔC cell line에 etoposide (30 μM)을 24, 48시간 동안 처리 한 후 western blotting으로 PARP cleavage를 확인 하였다.

apoptosis가 일어나면 여러 활성 단백질로부터 mitochondria가 손상을 입게 되어, mitochondria의 막 전위 가 떨어지게 된다. 또한, mitochondria 안에 있던 다양한 단백질들이 밖으로 나오면서 apoptosis를 유도하기도 한다. 이러한 이유로 BI-1이 mitochondria의 막 전위 및 mitochondria 내 단백질인 cytochrome C의 변화에도 영향을 주는지 살펴보았다. 그 결과, etoposide에 의한 mitochondria의 막 전위 저하와 그로 인한 cytochrome C의 세포질 내 유출을 BI-1이 저해하는 것으로 나타났고, mutant는 억제하지 못함을 알 수 있었다 (그림 72). 따라서 BI-1은 etoposide에 의한 mitochondria경유 apoptosis를 저해하는 것을 알 수 있었다.

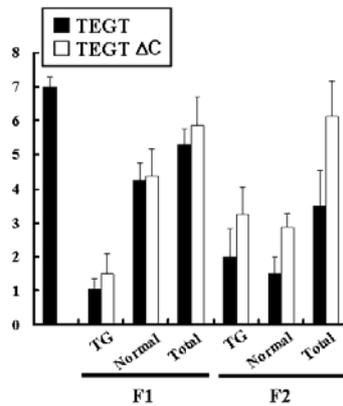


<그림 72> etoposide stress에 대한 HEK 293/hBI-1, HEK 293/hBI-1 ΔC cell line의 mitochondria potential 및 cytochrome C release 확인. A. Etoposide 30uM을 24시간 처리 후, mitochondria potential을 DiOC6와 FACS analysis로 확인하였다. B. 동일한 상황에서 세포를 mitochondria와 cytosol로 분리 한 후 cytochrome C의 변화를 western blotting으로 확인하였다.



<그림 73> BI-1형질전환 마우스의 MEF cell에서 etoposide에 대한 apoptosis 저해 효과 확인. A. Etoposide를 다양한 농도로 48시간 처리 후, cell viability를 MTT assay 방법으로 수행하였다. B. 30uM etoposide 처리 후 western blotting을 통하여 PARP cleavage양상 비교.

BI-1에 대한 연구를 위하여 BI-1과 mutant의 과발현 형질전환 마우스를 제작하였다. BI-1 과발현 형질전환 마우스로부터 만든 Mouse embryonic fibroblast (MEF) cell을 사용하여 실험한 결과, 293T cell의 실험결과와 유사하게 etoposide에 의한 세포사멸을 억제하였다 (그림 73).



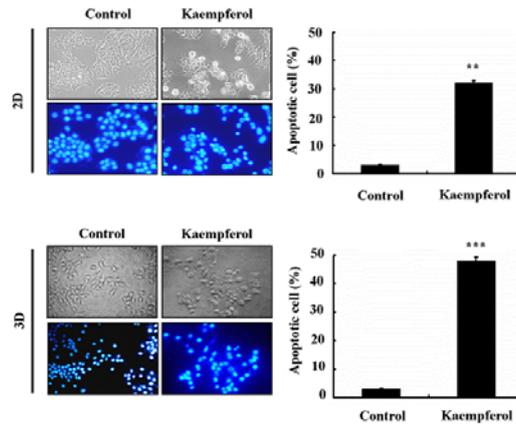
<그림 74> BI-1형질전환 마우스의 산자수 비교. BI-1이 과발현되는 mouse와 normal 또는 BI-1 delta C mutant TG mouse의 산자수를 통계적 방법으로 분석하여 비교하였다.

BI-1의 과발현이 만들어진 TG mouse에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해서 관찰한 결과 BI-1이 과발현 되는 TG mouse의 산자 수가 정상 mouse 또는 mutant mouse에 비해서 산자수가 낮은 것으로 확인되었다 (그림 74). 이러한 결과들로 부터, Afg 등의 AAA protease 관련 유전자들과, BI-1 유전자가 세포 내의 ROS와 밀접한 연관성을 가지고 있다는 것을 알 수 있었으며, 이러한 유전자들의 조절을 통해서, 난 발달의 효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

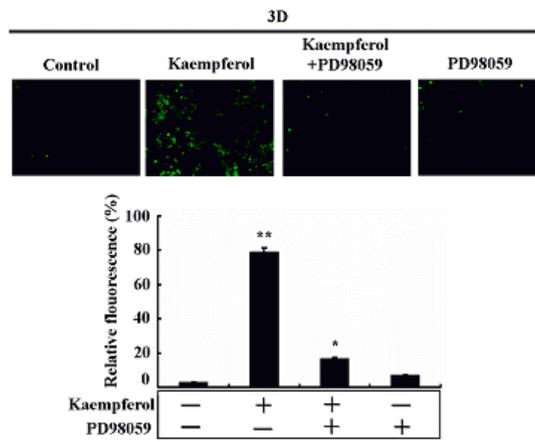
또한 ROS의 조절을 통해서 난 발달의 효율을 높일 수 있을 것으로 생각되는 플라보노이드들에 대한 연구도 함께 진행하였다. 플라보노이드는 식물에서 추출한 천연 색소물질로서, 자연계에 3000여 가지 이상이 존재한다고 알려져 있으며, 항산화작용을 비롯해 항균작용, 항암작용 등 생체 내에서 여러 가지 역할을 한다고 알려져 있다. 이러한 플라보노이드의 생물학적인 기작을 살펴보기 위해서 다음과 같은 실험들을 진행하였다.

여러 플라보노이드들 중에서 캠프페롤이라고 하는 플라보노이드는 인간유래 유방암 세포인 MCF-7세포에서 암세포를 죽이는 탁월한 효과를 보였다. 캠프페롤을 처리하자 유방암 세포에서 아포토시스가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 보다 생체 환경에 가깝게 하기 위하여, 세포배양 조건을 일반 2차 배양 방식과, 3차 배양 방식을 사용하였다. 3차 배양 방식은 기존의 2차 배양 방식보다 보다 생체환경에 가깝다고 알려져 있으며, 본 실험에서는 3차 배양 시에 보다 더 확실한 플라보노이드의 효과를 확인할 수 있었다. 그에 따라 캠프페롤을 처리한 후 일어나는 아포토시스를 DAPI 염색을 통해 관찰할 수 있었으며, 이는 3차배양시에 더 확실하게 나타나는 것을 확인하였다 (그림 75).

나아가, MCF-7 유방암 세포에서 캠프페롤에 의해 일어나는 아포토시스가 ROS와 연관되어 있다는 것을 확인하기 위하여, 3차 배양 조건 하에서 ROS를 측정하였다. 그리고 캠프페롤에 의한 아포토시스 신호가 ERK와 관련된다는 기존의 연구가 있어서, ERK의 저해제인 PD98059를 함께 처리하여 ROS의 변화양상을 살펴보았다. 그 결과 캠프페롤에 의해서 유발된 ROS가 PD98059에 의해서 줄어든다는 현상을 확인하였다(그림 76).

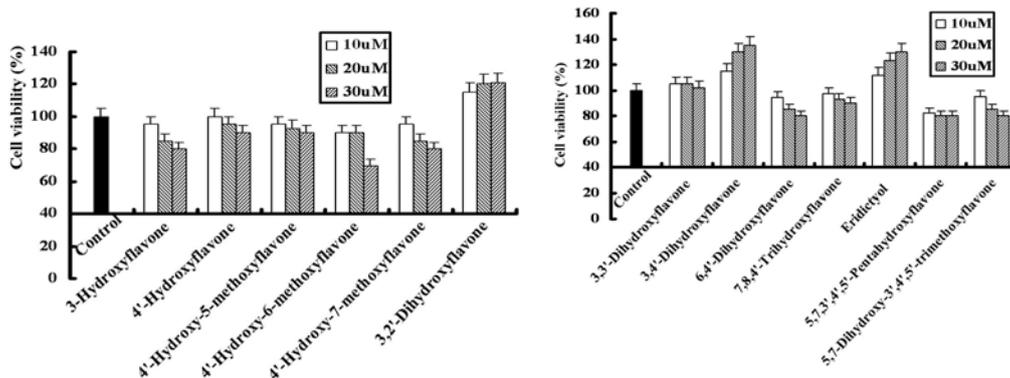


<그림 75> MCF-7 세포에 Kaempferol처리 후 아포토시스의 관찰.



<그림 76> Kaempferol 및 PD98059 처리 후 ROS의 측정.

그리고, 여러 플라보노이드들을 인간유래 피부세포인 HaCaT세포에 처리한 후 세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, 플라보노이드들에 따라 세포를 더 증식하게 하는 효과를 가진 플라보노이드들과, 세포의 증식을 억제하는 플라보노이드들이 다양하게 존재한다는 것을 알 수가 있었다(그림 77).



<그림 77> 여러 flavonoid가 HaCaT keratinocyte의 cell viability에 미치는 영향

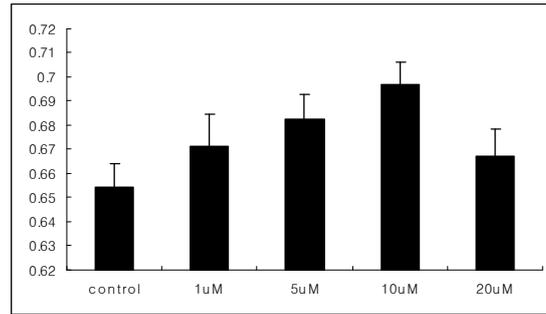
플라보노이드는 광범위 하게 퍼져있는 식물 색소의 한 부류이고 대부분은 phenylalanine에서 합성되어있다. 최근 과학적이고 치료적인 관심이 이 flavonoid의 구조와 기능에 초점이 맞춰지고 있다. 이것은 녹색식물의 세포 어디에나 산재되어 있고, 자연에서 식물의 색깔에 많이 관련되어 있다. 대부분은 UV light에 의해서 자극되어 밝은 형광을 뿜는다. Flavonoid는 phenolic compound이며 diphenylpropane(C6C3C6) skeleton에 의해 특성화된 구조를 가진다. 이 구조는 monomeric flavanol, flavone, flavanol, flavanon에 나타나고 이러한 모든 화합물은 cancer prevention을 포함한 human health의 잠재적인 역할을 알아내기 위한 중요한 연구를 하는데 필요하다. 인체의 첫 방어선은 주로 외피와 내피로 구성된 피부이다. keratinocyte는 epidermis로 구성된 principle cell type이고 총 epidermis cell의 90%를 차지한다. 인간 keratinocyte cell line은 발생 때 우연히 생겨난 불멸의 인간 epithelial cell line이며, 특정 p53의 mutation을 일으킨다. 하지만, HaCaT cell은 쥐에게 접종시켜도 암화 되지는 않는다. 인간 HaCaT cells에 미치는 다양한 flavonoid의 영향을 평가하기 위해서 우리는 이들 세포에 각각 다른 양의 flavonoid를 처리하고, MTT assay를 통해 cell viability를 확인하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아의 물질대사 능력에 의존하며, 세포내 산화 환원반응을 보여준다. 몇몇 flavonoid는 HaCaT cells의 cell viability를 감소시키는 것을 보여주었고, 3,2'-dihydroxyflavone, 3,4'-dihydroxyflavone eriodictyol은 cell viability를 증가 시키는 효과를 보여주었다. 이러한 결과는 여러 flavonoid에 의해 특이적으로 조절되고, 이것은 그들의 diphenylpropane(C6C3C6) skeleton 에 의해 좌우된다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과들로 미루어 보아 플라보노이드의 종류에 따라 다양한 생체 기능이 있을 것으로 사료된다. 그에 따라 난 발달에 영향을 미치는 플라보노이드들도 분명 존재할 것이라고 판단할 수 있으며, 특히나 난 발달에 중요한 영향을 미치는 ROS를 조절하는 플라보노이드를 복제 난 배양에 적절히 첨가하여 이용하면 난 발달 효율에 보다 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

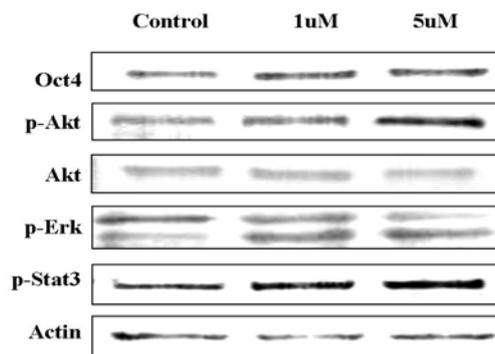
이러한 플라보노이드들의 영향이 동물의 발생과정상에서 어떠한 영향을 미칠지, 그리고 실제로 돼지의 복제 수정란 발달 효율을 높이는데 역할을 할 수 있을지 판단을 하기 위하여, 여러 가지 방향으로 플라보노이드를 이용한 실험들을 진행하였다.

우선, 마우스 배아줄기세포에서 플라보노이드의 첨가효과를 알아보기 위하여 D3 마우스 배아줄기세포에 특정 플라보노이드 (3',4'-Dehydroxyflavone)를 농도별로 처리를 하여 MTT

세포 독성 검사를 실시한 결과 세포에 대한 독성이 나타나지 않았으며, 그림 78 에서 보는 바와 같이 플라보노이드를 농도별로 첨가하였을 때 1에서 10 uM 농도에서 농도별로 세포의 증식이 향상 되는 결과를 얻었다. 이러한 결과들을 바탕으로 세포 증식에 관여되는 여러 가지 유전자의 발현차이를 western blot 을 실시하여 관찰하였다. 그 결과 마우스 세포 증식에 관련된 P-Akt, P-Erk 등이 활성화 되는 결과를 나타냈으며, 또한 세포주기에 관련된 Cdk2 등이 활성화되어 플라보노이드가 세포증식에 영향을 주는 결과를 나타내었다(그림 79).

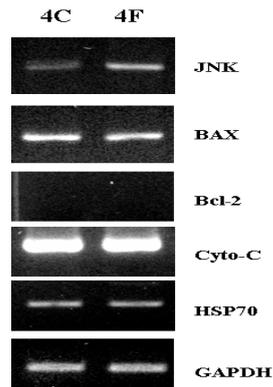


<그림 78> 마우스 유래 배아 줄기세포(D3 cell)의 증식에 특정 플라보노이드 (3',4'-Dehydroxyflavone)가 미치는 영향. 플라보노이드를 처리 후 MTT assay를 통해서 cell viability를 측정



<그림 79> 마우스 유래 배아 줄기세포(D3cell)에 플라보노이드 처리 후 유전자 발현차이. 특정 플라보노이드(3',4'-Dehydroxyflavone)을 24h 처리한 후 세포를 회수하여 western blotting 실시.

이러한 결과들을 바탕으로 실제로 동물의 난 발생과정에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 마우스의 수정란에 특정 플라보노이드 (3',4'-Dehydroxyflavone, 10 uM)를 처리 후 in vitro 상태에서 배양을 했을 때 몇몇의 유전자의 발현이 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (그림 80).



<그림 80> Mouse embryo에 flavonoid를 처리후 배양시 유전자의 발현 양상.
(4C: 4cell stage control group/ 4F: 4cell stage flavonoid treat group)

마우스는 C57BL/6, 4-6주령 마우스를 이용하였으며, 과배란 유도 후 mating을 시켰으며, 1세포 단계에서 난자를 회수 하였다. 회수한 난자는 control과 플라보노이드 처리 그룹으로 나누었으며, 배양 시 단계별로 채취하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 플라보노이드의 처리로 인해서 몇몇 유전자의 발현이 차이나는 것을 확인하였다. 4세포 단계에서 특히나 JNK의 발현이 플라보노이드 처리그룹에서 저해되는 것을 확인하였다. 또한 현재 돼지의 복제 수정난의 발달 효율을 높이기 위한 실험을 진행 중이다.

현재 항산화 효과가 탁월하다고 알려진 특정 플라보노이드(3',4'-Dehydroxyflavone)를 비롯한 여러 플라보노이드들의 핵이식 복제돼지의 수정난의 체외배양에 적용하는 실험을 계획 및 진행 중이며, 돼지의 복제 수정난에서의 발달율에 긍정적인 영향을 미치기에 적절한 농도를 측정 중이다 (그림 81). 0 nM에서부터 50 mM까지의 다양한 농도로 처리를 해 보고 있으며, 지금까지의 결과로 보아, 특정 플라보노이드인 3',4'-Dehydroxyflavone에 있어서는 앞으로 돼지의 복제 수정난의 체외 배양에 적절할 것으로 예상되는 농도는 10 uM 이내일 것으로 예상되며, 좋은 결과가 예상되는 플라보노이드들도 추가로 실험을 할 계획에 있다.

Concentration	Oocyte	Cleaved Oocyte	Blastocyst
0 nM	83	58	6
10 nM	82	51	8
20 nM	82	56	6

Concentration	Oocyte	Cleaved Oocyte	Blastocyst
0 uM	82	53	6
0.1 uM	81	58	8
1 uM	81	53	6

Concentration	Oocyte	Cleaved Oocyte	Blastocyst
0 uM	85	49	6
10 uM	85	49	4
50 uM	85	45	-

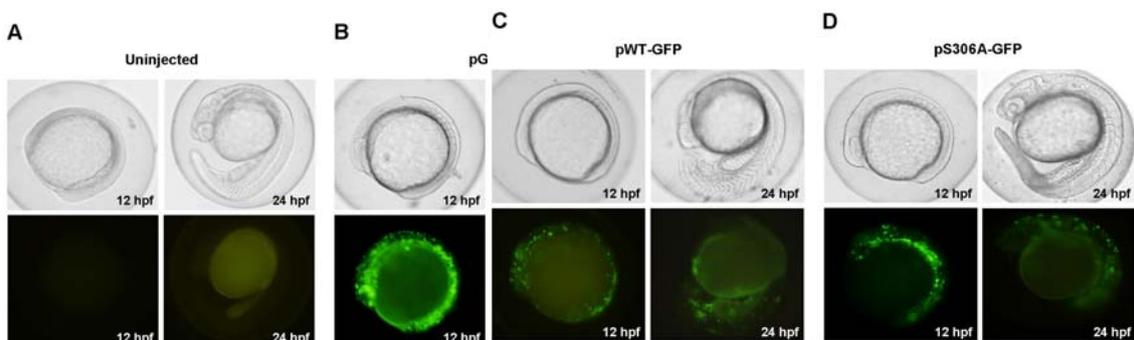
<그림 81> 핵이식 복제돼지의 수정란의 체외 배양시에 첨가한 플라보노이드(3',4'-Dehydroxyflavone)의 영향.

다. 제2협동과제

1) Apoptosis 관련 유전자 (HtrA2)의 발생에서의 기능 확인

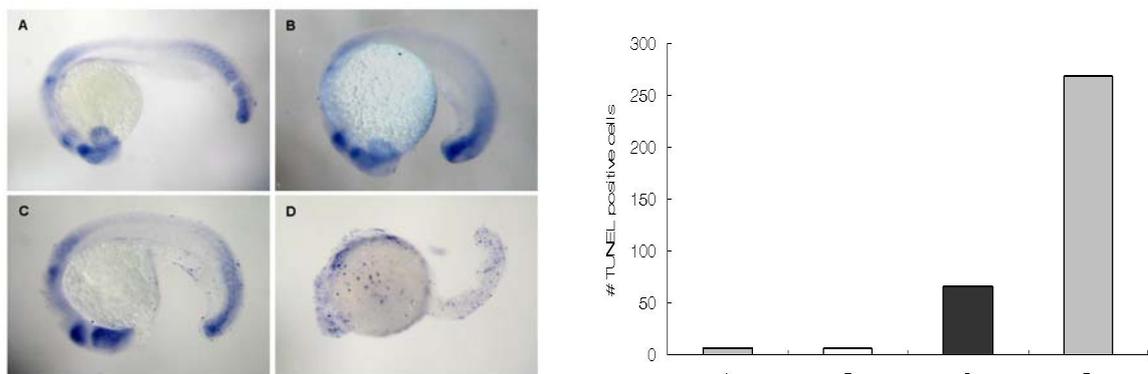
- HtrA2 DNA를 제브라피시 배아의 1 세포기에서 microinjection하여, 12 h post fertilization (hpf) (5~6 somite stage, 5~6개의 somite가 발생하는 단계이며 최초로 눈이 구별되는 단계)와 24 hpf에서 관찰하였으며, 발생하는 배아의 측면을 관찰하였다.

- pWT-GFP, pS306A-GFP, pGFP plasmid 모두 동일한 양의 DNA를 배아에 microinjection하여 각 단백질들의 발현양상을 관찰하였다(그림. 82 B, C, D). GFP가 제브라피시 배아에서 발현될 경우 zebrafish의 발생에 전혀 영향을 미치지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 제브라피시에서 WT-GFP가 S306A-GFP보다 다소 적은 양이 발현되기는 하나, 각각의 HtrA2 단백질의 발현을 쉽게 확인할 수 있고 GFP 자체도 제브라피시에 영향을 끼치지 않으므로 생체 내에서 HtrA2의 생리적 기능을 연구하는데 이 발현 시스템을 이용할 수 있었다.

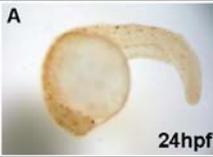
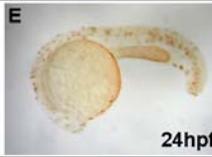
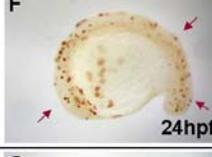
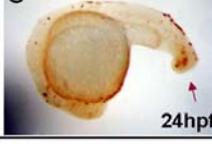


<그림 82> 제브라피시 배아에서 세포사멸 관련 유전자 HtrA2의 발현양상

- 제브라피시 배아의 발생에 있어서 HtrA2의 단백질이 발현되었을 때 어떤 phenotype이 나타나는지를 관찰하였다. HtrA2를 microinjection한 embryo는 크게 3가지 형태변화로 구분지어 관찰할 수 있었다. 3가지 형태변화는 머리의 형태변화(편평한 머리, 정상에 비해 작은 머리 등), 꼬리의 형태변화(굽은 꼬리, 정상보다 짧은 꼬리 등), 전체적인 형태변화(작거나 편평한 머리와 짧고 굽은 꼬리, 척추가 굽은 것 등이 동시에 발생)이다. pWT-GFP를 microinjection한 총 90개의 제브라피시 embryo 중 6.7%는 머리 변화, 31.1%는 꼬리 변화, 24.4%는 전체적인 형태변화를 보였다(그림. 83).
- 이와 비교하여 pS306A-GFP를 제브라피시 배아에 microinjection하고 pWT-GFP를 확인한 방법과 동일하게 확인한 결과, 총 85개의 배아 중 머리변화는 없었으며, 꼬리변화 11.8%, 전체 형태변화 4.7%를 확인할 수 있었다. pWT-GFP와는 다르게 pS306A-GFP에 의한 발생 중 형태변화개체는 총 16.5%로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 WT-GFP는 embryo에서 발현되면 정상적인 발생을 저해시킴을 알 수 있다.
- 상기의 결과로 WT-GFP는 배아의 정상적인 발생을 저해함을 알 수 있는데, 이러한 원인이 여러 연구에서 보고된 바와 같이 WT-GFP가 apoptosis를 유도하는 기능에 의한 것인지 알아보기 위해 TUNEL assay를 하였다. 이를 위하여 1 세포기의 배아에 pWT-GFP, pS306A-GFP, pGFP를 microinjection한 후 24 hpf 때 고정하고, 이후 TUNEL 염색을 실시하여 비교 분석하였다. pWT-GFP는 pS306A-GFP, pGFP, un-injected와 달리 dot 형태의 반점들이 염색된 것을 볼 수 있다(그림 84).
- 이는 TUNEL positive 결과로 apoptosis가 일어났다는 것을 의미하며, pS306A-GFP, pGFP, no injected embryo에서 dot형태의 반점이 아닌 넓은 면적으로 염색된 부분은 background이다. pS306A-GFP, pGFP, no injected에서도 일부 TUNEL positive를 볼 수 있으나 이것은 pWT-GFP에 비하여 매우 적은 비율이다. 이 결과는 pWT-GFP가 제브라피시에서 발현될 때 apoptosis를 유발하는 것을 알 수 있었다.



<그림 83> 제브라피시 배아에서 세포사멸 관련 유전자 HtrA2의 발현에 의한 형태학적 변화

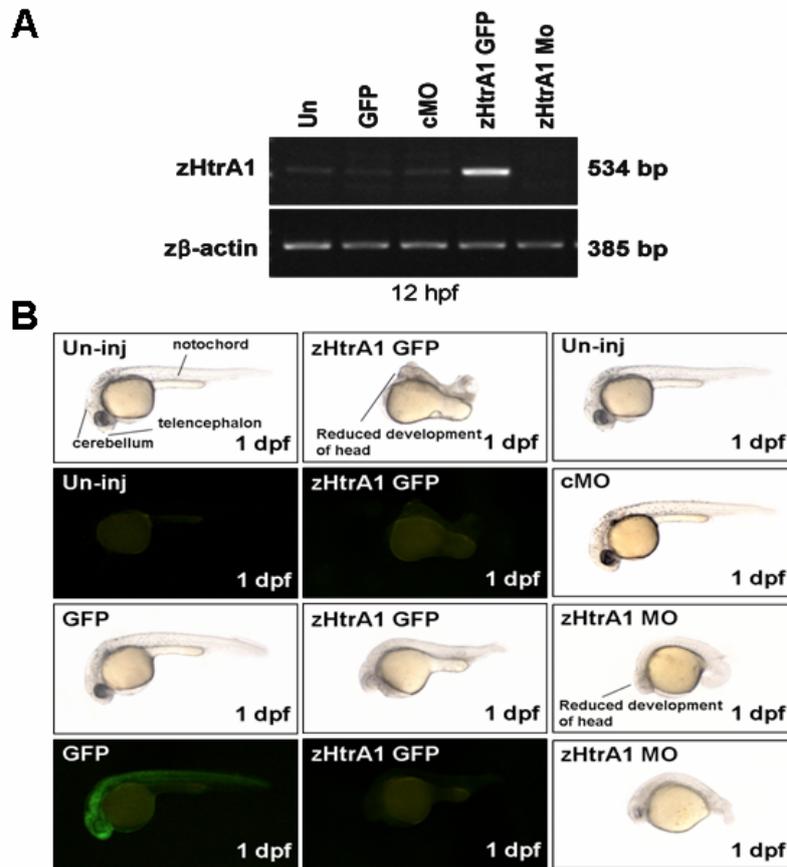
Negative control	Phenotype	WT-GFP		S306A-GFP	
		phenotype	n=90	phenotype	n=85
	Normal		37.8%		83.5%
	Small head Short tail Short and bent-up axis		24.4%		4.7%
	Bent-up Tail		31.1%		11.8%
	Small and flat Head		6.7%		0%

<그림 84> TUNEL assay를 통한 제브라피시에서 hHtrA2가 유발하는 apoptosis 확인

13. 제브라피시 HtrA1의 발현억제와 morpholino (MO) system의 구축

- Apoptosis 관련 유전자인 HtrA2의 연구를 계속 진행하기 위해 *in silico* screening을 통하여 확인된 상동성이 높은 제브라피시 HtrA1 (zHtrA1) 유전자를 확보하였고, 이를 주형으로 하여 *in vitro* transcription을 수행 mRNA를 제작하였다. 또한 HtrA1 유전자의 발현을 억제하기 위해 RNA splicing을 교란하는 MO를 제작, 주문하였다.
- zHtrA1의 mRNA와 MO가 배아에 효과적으로 전달되었는지 확인하기 위해 RT-PCR을 실시하여 transcript를 확인하였다. mRNA를 injection한 경우 transcript가 배아 내에 과량으로 존재하는 것을 확인하였고, MO를 injection한 경우 endogenous zHtrA1이 제거됨을 확인할 수 있었다.
- MO와 mRNA의 microinjection을 통하여 zHtrA1의 발현을 조절한 결과, 제브라피시 배아에서 zHtrA1의 단백질이 과발현되었을 때는 조금 더 심각한 phenotype이 나타났지만, 흥미롭게도 두 경우 다 발생이 저해됨을 확인할 수 있었다. 특히 머리가 작아지고, 눈의 발생이 저해되며, 꼬리의 길이가 짧아지고 굽어지는 3가지 형태변화가 뚜렷하게 확인되었다. 이는 zHtrA1의 항상성 유지가 제브라피시 발생단계에서 매우 중요하다는 사실을 시사한다.
- 이러한 MO system의 확립은 돼지에서 제거할 면역 반응 관련 유전자를 제브라피시의 morpholino 시스템으로 knock down하여, 관련 유전자가 면역반응 관련 기능뿐만 아니라 발생 과정에 어떤 영향을 미치는지를 빠른 시간 내에 확인할 수 있을 것이다. 또한 체외 수정과 핵 치환을 거친 발생란의 발생 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 세포사

멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자를 발굴하여 이 유전자의 기능을 규명하는 동시에 morpholino 시스템 혹은 제브라피시의 배아에 microinjection하여 생기는 발생 과정에서의 변화를 확인하여 이들 유전자를 제거하거나 발현을 증가시켰을 때 발생할 수 있는 여러 문제점들을 미리 예측, 해결할 수 있을 것이다.



<그림 85> 제브라피시 배아에서 zHtrA1 유전자의 발현조절에 따른 변화 확인

A. RT-PCR을 통한 발현 확인 (Un : Uninjected, GFP : GFP injected, zHtrA1 GFP : zHtrA1 injected, cMO : control MO injected, zHtrA1 MO : zHtrA1 MO injected) B. Microinjection 후 phenotype의 변화 확인

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연차별 연구개발 목표 및 기여도

1. 제1세부과제 : 세포성 면역조절을 위한 HLA-G 형질전환 복제돼지의 개발

- 제1세부과제에서는 인간 면역억제유전자 HLA-G 형질전환 미니복제돼지의 생산을 통해 미니복제돼지의 췌도세포를 사용해 당뇨병을 치료할 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한 미니돼지의 체세포에 인간 DAF 유전자를 발현하는 형질전환 체세포주를 확립하여 DAF 형질전환 복제돼지 생산 개발을 앞당겼으며 생산된 HLA-G 형질전환 복제돼지의 췌도세포를 분리하는 기술 습득 및 활용을 할 수 있도록 연구개발을 하였다. 본 연구팀은 HLA-G 형질전환 복제돼지 외에 인간 DAF 유전자를 포함하는 HLA-G/DAF 복합 형질전환 미니돼지를 최초로 생산하여 이종장기 이식시 발생하는 초급성 및 세포성 면역 거부반응을 억제할 수 있는 가능성 제시하였다.

가. 2005년도 1년차

- 1) 연구목표 : HLA-G 유전자 확보 및 체세포주 확립을 통하여 HLA-G 형질전환 복제돼지를 생산하고 생산된 복제돼지의 유용성 검토

나. 2006년도 2년차

- 1) 연구목표 : 인간 DAF 유전자를 발현하는 형질전환 체세포주 확립과 형질전환 복제돼지 생산, 확립된 DAF 체세포를 이용한 복제란의 체외 생산 및 체계의 극대화를 목표로 하고 또한 HLA-G 형질전환 복제돼지 췌도세포 분리 기술 개발

다. 2007년도 3년차

- 1) 연구목표 : 생산된 형질전환 복제돼지 HLA-G, HLA-G/DAF 복제돼지와 wild type의 미니돼지의 자연교배를 통한 축근 형성, 자연교배를 통해 생산된 미니돼지의 표현형 검사 및 세포학적 분석, 복제효율 증진 유전자가 주입된 미니돼지 체세포주의 개발과 wild type 미니돼지와 복합 형질전환 복제돼지의 췌장으로부터 Islet 분리 및 Islet 체외 배양 기술 확립, 이종 및 동종 이식을 통한 외과기법 확립기술 개발과 humanized 마우스 이식을 통한 효율성 검증

2. 제1협동과제 : 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 제고를 위한 유전자발굴과 기능구명연구

- 복제 수정란의 초기 발생 및 착상에 중요한 세포 사멸, 세포성장, 및 단백질의 변성과 분해 조절 관련 유전자 확보 및 발현 양상과 기초적 기능 연구를 수행 하였다. 이를 통해 중요하다고 예상되는 유전자와 단백질을 대상으로 발현 양상과 역할을 규명하는 연구를 통하여, 복제동물 생산과 형질 전환 동물 생산의 생산 효율 증진에 활용하는 방안에 주안점을 두고 연구를 진행하였다. 이러한 연구를 바탕으로, 중요 유전자의 조절함으로서, 실질적으로 복제

및 형질전환 동물의 난 발생 효율 증진에 기여할 수 있을 것으로 기대하며, 실질적인 복제 돼지 생산에 적용하고자 함.

가. 2005년도 1년차

- 1) 연구목표 : 복제 수정란 초기 발생 및 착상 과정에 중요한 세포사멸, 세포성장, 및 단백질의 변성과 분해 조절 관련 유전자 확보 및 발현 양상과 기초적 기능 연구의 수행

나. 2006년도 2년차

- 1) 연구목표 : 복제 수정란 초기 발생 및 착상 과정에 중요한 세포사멸, 세포성장, 및 단백질의 변성과 분해 조절 관련 유전자 확보 및 발현 양상과 기능 연구의 수행 및 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 생산 효율 증진을 위한 기반 연구 수행

다. 2007년도 3년차

- 1) 연구목표 : 복제 수정란 초기 발생 및 착상 과정에 중요한 세포사멸, 세포성장, 및 단백질의 변성과 분해 조절 관련 유전자 확보 및 발현 양상과 기능 연구의 수행 및 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 생산 효율 증진을 위한 기반 연구 수행 및 실질적인 복제돼지 생산에 적용

3. 제2협동과제 : 형질전환·복제동물 생산기술의 효율성 향상과 안전성 확보를 위한 제브라피시 스크리닝 시스템의 확립

- 면역거부반응 관련 유전자의 조절 효과를 단기간에 확인할 수 있는 새로운 시스템을 확립 및 발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 apoptosis 관련 유전자의 연구를 통한 배아 내 기능연구와 면역거부반응 관련 유전자의 조절 효과를 단기간에 확인할 수 있는 새로운 시스템을 확립, 발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 apoptosis 관련 유전자의 연구를 통한 배아 내 기능연구 및 Apoptosis 관련 유전자의 발현 조절을 통한 배아 발생에서의 유전자의 기능을 확인 하였다. 또한 형질전환·복제동물 생산기술의 효율성 향상과 안전성 확보를 위한 새로운 시스템을 확립, 발생과정에서 매우 중요한 역할을 하는 apoptosis 관련 유전자의 메커니즘을 연구 및 Apoptosis 관련 유전자의 발현 조절을 통한 배아 발생에서의 유전자의 기능을 확인하였다.

가. 2005년도 1년차

- 1) 연구목표 : 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 도입 과 면역거부반응 관련 유전자의 제거 효과를 단기간에 확인할 수 있는 제브라피시 시스템을 확립 및 Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포 사멸 메커니즘을 규명

나. 2006년도 2년차

- 1) 연구목표 : 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 분자생물학적 기능을 단기간에 확인할 수 있는 zebrafish 시스템을 확립 및 기능 연구 및 Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포사멸 메커니즘을 규명, 공동연구에 의해 선별된 면역거부반응 유발 유전자(제 1 세부과제)와 세

포 사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자(제 2 세부과제)를 zebrafish 시스템에서 과발현 또는 knock-down시켜 배아 발생에 미치는 영향을 모니터링

다. 2007년도 3년차

- 1) 연구목표 : Apoptosis 관련 유전자와 상동적인 zebrafish apoptosis 유전자의 과발현과 knock-down을 통한 apoptosis 관련 유전자의 기능과 embryo의 발생과의 상관관계 연구와 Apoptosis 관련 유전자의 substrate 탐색을 통한 새로운 세포사멸 메커니즘에 대한 연구. 공동연구에 의해 선별된 면역거부반응 유발 유전자(제 1 세부과제)와 세포사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자(제 2 세부과제)를 zebrafish 시스템에서 과발현 또는 knock-down시켜 세포사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자의 발생시기에서의 기능 연구

제2절 연도별 연구개발 목표의 달성도

1. 제1세부과제

연구 내용	추진 일정		
	1 단계	2 단계	3 단계
	1년차	2년차	3년차
<input type="checkbox"/> HLA-G 유전자 확보 및 체세포주 확립	100%		
<input type="checkbox"/> HLA-G 유전자 검색, 확보 및 유전자 벡터개발과 발생 초기 돼지에 서의 세포주 확립 및 동결	100%		
<input type="checkbox"/> 태아 세포내 벡터의 주입 및 형질전환 체세포 완성 및 특성분석	100%		
<input type="checkbox"/> HLA-G 형질전환 복제돼지 생산	100%		
<input type="checkbox"/> 복제란의 체외 생산 및 대리모 이식과 복제란의 체외 생산 체계 극대화 및 임신유지 최적화	100%		
<input type="checkbox"/> 형질전환 복제돼지 생산 효율 증진 및 세포학적 특성 분석	100%		
<input type="checkbox"/> DAF 형질전환 복제돼지 생산		95%	
<input type="checkbox"/> 복제란의 체외 생산 및 대리모 이식과 복제란의 체외 생산 체계 극대화 및 임신유지 최적화		100%	
<input type="checkbox"/> 형질전환 복제돼지 생산 효율 증진 및 세포학적 특성 분석		90%	
<input type="checkbox"/> HLA-G 형질전환 복제돼지 체외 세포 분리 기술 확립		80%	
<input type="checkbox"/> HLA-G/DAF 복합 형질전환 복제돼지 개발 및 유용성 검토			100%
<input type="checkbox"/> HLA-G/DAF 형질전환 복제돼지의 표현형 검사			100%

2. 제1협동과제

연구 내용	추진 일정		
	1 단계	2 단계	3 단계
	1년차	2년차	3년차
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 세포 사멸 및 세포성장 조절 관련 유전자 확보 및 siRNA 개발	100%		
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 유전자의 기능 연구	80%		
<input type="checkbox"/> 세포주 및 실험동물을 통한 기능 연구 (제 3 세부과제와 공동연구)	90%		
<input type="checkbox"/> 착상 전후 발현 이상 유전자 확보 및 기능 연구	90%		
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 발생과정에서 중요한 발생 초기 발달 및 착상 조절 관련 유전자의 발현 양상 연구	90%		
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 변성 및 분해 조절 관련 연구	100%		
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 세포 사멸 및 세포 성장 조절관련 유전자 확보 및 siRNA 개발		100%	
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 초기 발생과정에 중요한 유전자의 기능 연구		100%	
<input type="checkbox"/> 착상 전후 발현 이상 유전자 확보 및 기능 연구		100%	
<input type="checkbox"/> 복제 수정란 발생과정에서 중요한 발생 초기 발달 및 착상 조절 관련 유전자의 발현 양상 연구		100%	
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 변성 및 분해 조절 관련 연구		90%	
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 기능 조절을 통한 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 증진 연구		90%	
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 변성 및 분해 조절 관련 연구			100%
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 변성 (인산화, ubiquitination 등)에 관한 연구			100%
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 단백질의 UPS 또는 AAA protease에 의한 분해 조절 관련 연구			100%
<input type="checkbox"/> 초기 발생 및 착상 조절 관련 유전자의 기능 조절을 통한 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 증진 연구			90%
<input type="checkbox"/> 세포주 및 실험동물을 통한 기능 연구 결과의 활용 (제 2 및 3 세부과제 결과를 실험동물에서 활용)			100%
<input type="checkbox"/> 제 2 및 3 세부과제 결과를 제 1 세부과제에서 형질전환 복제 돼지에 활용			100%

3. 제2협동과제

연구 내용	추진 일정		
	1 단계	2 단계	3 단계
	1년차	2년차	3년차
<input type="checkbox"/> 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 도입과 면역거부반응 관련 유전자의 제거 효과를 단기간에 확인할 수 있는 제브라피시 시스템을 확립	100%		
<input type="checkbox"/> Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포 사멸 메커니즘을 규명	100%		
<input type="checkbox"/> 난자의 체외성숙, 체외수정, 발생에 관여하는 apoptosis, UPS 관련 유전자의 분자생물학적 기능을 단기간에 확인할 수 있는 zebrafish 시스템을 확립 및 기능 연구		100%	
<input type="checkbox"/> Apoptosis 관련 유전자가 제거된 쥐의 배아와 정상 쥐의 배아를 통해 배아의 세포사멸 메커니즘을 규명		100%	
<input type="checkbox"/> 공동연구에 의해 선별된 면역거부반응 유발 유전자(제 1 세부과제)와 세포 사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자(제 2 세부과제)를 zebrafish 시스템에서 과 발현 또는 knock-down시켜 배아 발생에 미치는 영향을 모니터링		100%	
<input type="checkbox"/> Apoptosis 관련 유전자와 상동적인 zebrafish apoptosis 유전자의 과발현 또는 knock-down을 통한 apoptosis 관련 유전자의 기능과 embryo의 발생과의 상관관계 연구			100%
<input type="checkbox"/> Apoptosis 관련 유전자의 substrate 탐색을 통한 세포사멸 메커니즘 연구			100%
<input type="checkbox"/> 공동연구에 의해 선별된 면역거부반응 유발 유전자(제 1 세부과제)와 세포사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자(제 2 세부과제)를 zebrafish 시스템에서 과발현 또는 knock-down시켜 발생시기에서의 유전자의 기능 연구			100%

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 연구과제별 개발결과의 활용계획

1. 제1세부과제

- 가. 본 연구개발을 통하여 복제돼지의 생산에 있어서 생산 효율을 증대시킴으로서 장차 장기이식용 형질전환 복제돼지의 생산효율 향상에 크게 기여할 수 있어 산업화에 크게 기여할 것임
- 나. 핵이식/형질전환 기술을 이용한 질환모델 돼지의 생산에 활용
- 다. 복제란을 이용한 줄기세포 생산 연구의 기초 자료로 활용

2. 제1협동과제

- 가. 형질전환 복제동물 생산 과정의 체외배양, 체외수정, 핵치환 및 착상 과정 중 유전자 발현을 조사하여 세포사멸, 착상 및 산자수 조절 관련 유전자의 발현 양상을 제시하고 이들의 변성, 분해 및 세포 내 기능을 구명함으로써 복제수정란 발생 및 형질전환 동물의 착상효율 증진 방안을 제시하는데 활용
- 나. 체외배양, 체외수정 및 핵치환 과정 중의 조절 경로를 체계적으로 파악함으로써 관련 학문에 귀중한 기초 자료를 제공할 수 있을 것이며 유전자 발현 조절에 의한 초기 발생 유전자기능 구명은 발생 및 분화연구에 귀중한 기초 자료를 제공할 수 있을 것임
- 다. 형질전환 및 복제동물 생산 효율을 증대시킴으로써 차세대 농축산업 분야의 하나로 부상할 부가가치가 높은 질환 모델동물 생산 산업을 앞당기고 이를 통해 의약학 분야와 유기적인 관계를 가지고 산업화로 적극적으로 나아갈 수 있을 것임.
- 라. 복제 수정란의 이용 효율의 획기적인 개선

3. 제2협동과제

- 가. *In vivo*로서의 장점과 무한한 가능성을 지닌 Zebrafish system을 이용하여 형질전환과 복제과정에서 조작된 유전자들이 생체에 미치는 영향을 다양하게 분석하는 스크리닝 방법을 정립함
- 나. 체외성숙, 수정, 발생에 관여하는 단백질 네트워크를 분자수준에서 규명함으로써 생명현상에 대한 기초연구를 확립할 뿐만 아니라 동물 개량 및 생산율 증가를 위한 가축 생명공학 분야에 활용할 수 있음
- 다. 본 연구는 국제 경쟁력을 갖춘 연구로 우수 국제 저널에 게재할 수 있음
- 라. 본 연구를 통해 정립될 학문적, 기술적 정보를 타 연구자와 공유함으로써 타 연구 분야 발전에 기여

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절. 국외 바이오장기 분야

1. 현대의학이 발달하기 시작한 20세기 초부터 이종간 장기이식이 시도되었지만, 당시 면역학 기초이론이 미미하고 장기이식기술 또한 제대로 정립되지 않은 상화 하에서 시도되어 대부분 실패하였다. 그러나 많은 이종간 장기이식의 시도를 통하여 이종간 장기이식의 문제점이 중간 면역의 장벽에 의한 면역거부반응에서 기인한다는 것을 알게 되었으며, 이를 극복하기 위한 연구가 추진되기 시작하였다.
2. 지금까지 인간 이식용 바이오장기를 동물에서 생산하기 위한 연구는 먼저 이식 시 일어나는 면역거부반응을 극복하려는데 연구의 초점을 맞추고 실시해 왔다. 면역거부반응을 극복하기 위해서 크게 두 가지 측면에서 접근하고 있는데 첫째는 바이오장기를 이식하였을 때 인간의 면역 체계에 의한 면역거부반응을 억제하기 위한 면역억제제의 개발이며, 둘째는 면역거부반응이 일어나지 않도록 면역거부반응에 관련된 유전자를 조작한 바이오장기를 개발하는 것이다.

* 표. 10. 최근 형질전환 돼지의 장기이식 보고 현황

장기	형질전환 내용	이식동물	생존일	년도
심장	hDAF발현	원숭이	0-4일	2002
	hDAF 발현	개코원숭이	2-99일	2002
	hCD59/hDAF 발현	개코원숭이	6.7일	2000
	CD154, CD28/B7	개코원숭이	15일	2005
	hDAF 발현	개코원숭이	14.6일	2005
	GalT-KO	개코원숭이	6개월	2005
간	CD55, CD59 H-transferase 발현	개코원숭이	13-24시간	2005
신장	hDAF 발현	개코원숭이	20.7일	2004
피부	GnT-III, DAF 발현	원숭이	9일	2004
폐	hMCP 발현	개코원숭이	12시간	2002

* 출처 : Biosafety, 한국생명공학연구원 · 바이오안전성정보센터, 2007

3. 이종장기 생산을 위한 형질전환돼지 개발에 관한 연구는 선진국에서 약 15년여 전에 시작되었는데 영국의 Imutran사, 미국의 Nextrans사 및 Alexion사, 일본의 일청제분 및 일본햄 등 주로 산업체를 중심으로 수행되어 왔다. 영국에서는 사람 DAF(decay accelerating factor)와 MHC 유전자를 발현하는 형질전환돼지를 개발하였다.
4. 지난 10년 동안은 동물의 장기에 보체반응을 억제하는 억제인자를 과발현시켜 이식 후에 초급성 거부반응을 억제하려는 연구가 진행되어 왔다.
5. 영국 Imutran사에서는 사람 DAF 유전자를 발현하는 형질전환돼지의 심장을 이식받은

바분(baboon) 원숭이가 초급성 이식 거부반응을 나타내지 않고 21일까지 생존하였다고 보고하였으며, 신장이식의 경우는 35일까지 생존하였다고 보고하였다. 이것은 형질 전환기술에 의해 초급성거부반응은 어느 정도 극복가능하다는 것을 시사 하였다.

6. 영국 Immutran사에서는 살아있는 돼지 조직을 이식받은 160명의 환자의 혈청을 추적 조사하였을때 내인성 돼지 레트로바이러스의 발현이 전혀 검출되지 않았다고 보고하였다.
7. 미국 Missouri-Columbia대와 Immerge Bio Therapeutic사는 초급성 이식거부반응의 주 원인으로 알려진 $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase 유전자를 적중시킨 형질전환 복제돼지 개발에 최초로 성공하였고, 이 후 유사한 성공사례가 계속해서 보고되고 있다. 미주리대에서 개발한 초급성 이식거부반응 관련 유전자가 적중된 돼지의 심장을 영장류에 이식하였을 때 영장류가 이식거부반응 없이 81일까지 생존하였다는 결과도 보고되고 있다.
8. 미국 NIH 산하기관에서만 이종이식 연구에 1999~2003년 사이 약 30억 달러의 연구비가 지원되고 있다. 일본도 바이오장기 관련 연구에 문부성, 후생성, 과기청, 통산성 등 범부처적인 연구지원을 하고 있다. 한 예로서, 일본은 2000년 “밀레니엄 프로젝트”의 일환으로서 재생의학 분야의 연구를 적극적으로 추진하기 위하여 이화학연구소(RIKEN) 소속의 발생학센터(Center for Developmental Biology)를 설립하였고 2003년까지 약 239억엔(약 2,400억원)의 예산을 투자하고 있다.
9. 선진국의 민간기업에서는 바이오장기의 중요성을 인식하고 바이오장기기술 선점을 위한 경쟁이 치열한 편이다. 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서는 연구의 수익성과 잠재력을 예견하고 정부보다 민간기업에서 더 적극적으로 연구개발을 위한 투자를 하고 있다.

제7장 참고문헌

Lambrigts D, Sachs DH, Cooper DKC. Discordant organ xenotransplantation in primates: World Experience and Current Status. *Transplantation* 1998; 66: 547.

Cascalho M, Platt JL. The Immunological barrier to xenotransplantation. *Cell* 2001; 14: 437.

Hiroshi M, Hiroshi N, Yoichi T et al. Transgenic pigs expressing human decay-accelerating factor regulated by porcine MCP gene promoter. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 302.

Lai L, Kolber-simonds D, Park KW et al. Production of α -1,3-Galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089.

Phelps CJ, Koike C, Vaught TD et al. Production of α -1,3-Galactosyltransferase deficient pigs. *Science* 2003; 299: 411.

Carosella ED, Dausset J, Kirzenbaum M. HLA-G revisited. *Immunol today* 1996; 17: 407.

Ober C, Aldrich CL. HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function?. *J Reprod Immunol* 1997 ; 36: 1.

Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M et al. The α 1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: Is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 5249.

Perez-Villar JJ, Melero I, Navarro F et al. The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1. *J. Immunol* 1997; 158: 5736.

Rouas-Freiss N, Goncalves RMB, Menier C et al. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 11520.

Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I et al. HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int Immunol* 2001; 13: 193.

Sasaki H, Xu XC, Mohanakumar T et al. HLA-E and HLA-G expression on porcine endothelial cells inhibit xenoreactive human NK cells through CD94/NKG2-dependent and

- independent pathways. *J. Immunol* 1999; 163: 6301.

Sasaki H, Xu XC, Smith DM et al. HLA-G expression protects porcine endothelial cells against natural killer cell-mediated xenogeneic cytotoxicity. *Transplantation* 1999; 67: 31.

Dorling A, Monk N, Lechler R. HLA-G inhibits the transendothelial cell migration of human NK cells: a strategy for inhibiting xenograft rejection. *Transplant Proc* 2000; 32: 938.

van den Berg CW, Morgan BP: Understanding the immune protection afforded by endogenous complement regulatory molecules. *Graft* 4:63, 2001

Benet W, Bjorkland A, Sundberg B, et al. Expression of complement regulatory proteins on islets of Langerhans: a comparison between human islets and islets isolated from normal and hDAF transgenic pigs. *Transplantation* 2001; 72(2): 312

Dalmasso AP, Vercellotti GM, Platt JL, et al. Inhibition of complement mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor: potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation*. 1991; 52(3): 530

Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification - Hwang *et al.* *Biotechniques* 35(6);1-5 (2003)

Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. - Kim *et al.* *Biotechniques* 36(3);1-5 (2004)

Identification of differentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system - Hwang *et al.* *Molecular reproduction and development* 69:43-51 (2004)

Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro - Gutierrez *et al.* *Molecular reproduction and development* 68:441-448 (2004)

Expression of caspase and Bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. - Exley *et al.* *Biology of reproduction* 61:231-239 (1999)

Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast.- Xu *et al.* *Mol cell* 1;337-346

Bcl-X and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during

embryogenesis - Edmund *et al.* *molecular Endocrinology* 14(7) 1038-1052 (2000)

The pro-apoptotic gene Bax is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. - Stallock *et al.* *Development* 130(26); 6589-6597 (2003)

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival - Adams, J.M. and Cory, S. . *Science* 281, 1322-1326 (1998)

BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. - Gross, A. *et al.* *Genes Dev.*13, 1899-1911(1999)

Mouse models of cell death. - Ranger, A.M. *et al.* *Nat. Genet.* 28, 113-118 (2001)

Programmed cell death: alive and well in the new millennium - Scott H. Kaufmann
TRENDS in Cell Biology Vol.11 No.12 (2001)

AAA proteins - Andrei N Lupas *et al.* *currentopinion in structural biology* 12:746-753(2002)

AAA protease : cellular machines for degrading membrane proteins - T.langer *TIBS* 25 (2000)

Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. *Science* 294:1708-1712. (2001)

Modulation of apoptosis in HaCaT keratinocytes via differential regulation of ERK signaling pathway by flavonoids. Lee ER, Kang YJ, Kim JH, Lee HT, Cho SG. *J Biol Chem* 280:31498-31507. (2005)

How death shapes life during development.Baehrecke EH. . *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 779-87.(2002)

Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. *Science.* 291, 1279-84. (2001).

Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, Casari G. *J Cell Biol.* Nov 24;163(4):777-87. (2003)

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003;22:8543-67.

Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1387:17-31.

MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 2004;5:674-8.

Arimura T, Kojima-Yuasa A, Suzuki M, Kennedy DO, Matsui-Yuasa I. Caspase-independent apoptosis induced by evening primrose extract in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Lett* 2003;201:9-16.

Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004;23:2785-96.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-42.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:1067-74.

Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003;17:2481-95.

Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003;11:529-41.

Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-70.

Okun I, Malarchuk S, Dubrovskaya E, Khvat A, Tkachenko S, Kysil V, Ilyin A,

Kravchenko D, Prossnitz ER, Sklar L, Ivachtchenko A. Screening for caspase-3 inhibitors: a new class of potent small-molecule inhibitors of caspase-3. *J Biomol Screen* 2006;11:277-85.

Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998;12:1551-70.

Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:897-907.

Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2006 ;7:207-19.

Evans TG, Yamamoto Y, Jeffery WR, Krone PH. Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones.* 2005 ;10:66-78.

Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem.* 2000 ;275:2581-8.

Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A, Savopoulos J, Hassan NJ, et al. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem.* 2000 ;267:5699-710.

Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet.* 2002 ;3:717-24.

Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?. *Genes Brain Behav.* 2004 ;3:63-74.

Seong YM, Choi JY, Park HJ, Kim KJ, Ahn SG, Seong GH, Kim IK, Kang S, Rhim H.

Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *J Biol Chem.* 2004 ;279:37588-96.

Shin JT, Fishman MC. From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:311-40.

Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell.* 1999 ;97:339-47.

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.

