주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕계열)

↑
6cm
↓

세포복제 기술을 이용한 퇴행성 신경질환 모델개의 생산

농림축산식품부

↑
3cm
↓

발간등록번호
11-1543000-000163-01

세포복제 기술을 이용한 퇴행성 신경질환 모델개의 생산

Generation of neurodegenerative disease model dogs using somatic cell cloning technique

충남대학교

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “세포복제 기술을 이용한 퇴행성 신경질환 모델개의 생산에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 7 월 31 일

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단
주관연구책임자 : 김 민 규
세부연구책임자 : 김 민 규
협동연구기관명 : 한국과학기술원
협동연구책임자 : 박 찬 규
협동연구기관명 : 경북대학교
협동연구책임자 : 이 동 석
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원
협동연구책임자 : 장 규 태

요 약 문

Ⅰ. 제 목

세포복제 기술을 이용한 퇴행성 신경질환 모델개의 생산

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

개발된 개의 체세포 복제기술 이용하여 유전자 적중 및 형질전환 기술을 개발하고 이들 기술을 복합적으로 활용하여 형질전환 복제 개를 생산하고자 한다. 특히, 뇌질환 관련 모델은 생쥐에서 인체 질환과 유사성을 보이지 않는 점에 착안하여, 퇴행성뇌질환 관련 유전자 적중, 형질전환 개를 체세포 복제 기술을 통하여 생산하고 인간과 유사한 퇴행성 뇌질환 및 관련 행동을 분석하여 인체뇌질환 모델로서의 활용 가능성을 모색하며, 유전정보 기반을 구축하여 맞춤형 신약개발을 위한 질환 모델동물로서 활용하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1) 개의 난자 채취 및 배아생산을 위한 최적화 시스템 구축
2) 개의 유전자지도 분석 및 Targeting vector 제작
3) 파킨슨병 관련 유전자적중 체세포주 확립
4) human 알츠하이머병 관련유전자 cDNA 확보 및 family alzhimer's disease mutant APP 제작
5) 형광 및 알츠하이머병병 관련 유전자가 동시에 발현되는 lentiviral vector 구축
6) Lentiviral vector를 이용한 알츠하이머병 질환 관련 유전자 발현 체세포주 구축
7) 형광 발현 렌티바이러스 vector 구축
8) human 알츠하이머 관련유전자 cDNA 확보 (APP, b-secretase)
9) 파킨슨 및 알츠하이머 형질전환 복제견 생산
10) 형질전환 복제견의 검증
11) 개 유전자 동정 및 전사체 profiling
12) 개 유전정보 및 분석을 위한 기반 구축

Ⅳ. 연구개발결과

1) 1차년도

- 체세포 복제 효율의 안정화 구축
- 파킨슨병 및 알츠하이머병의 유전자 탐색 : 안정된 세포주 확립
- 개의 조직별 유전자 동정 및 개 reference gene 동정을 실시 : 7개 조직에서 약 3억 5천만 read의 raw data를 확보

2) 2차년도

- 파킨슨 형질전환 복제개 생산 : DJ-1 gene 형질전환 복제개 확증
- V5 tag 유전자를 클로닝한 Lentivial vector system 완성 : swedish type APP gene의 안정적 발현과 분자/면역학적 재검증
- 파킨슨병 및 알츠하이머병의 중요 candidate 유전자의 full-length cDNA 동정

3) 3차년도

- 파킨슨병 모델개의 분자생물학적 검증과 행동학적 검증 실시 : DJ-1의 삽입위치 확인
- 사람의 파킨슨병과 유사한 표현형을 나타내는 이상행동 관찰
- 파킨슨병 모델개의 후대생산 : 2마리의 자견에서 모두 DJ-1 정상적 발현
- 질환모델 개 연구에 필수적인 개 유전정보 분석을 위한 기반을 구축 : 유전자 데이터베이스 완성
- 알츠하이머병 형질전환 복제개 임신 : 1마리의 대리모에서 3마리의 태아 확인

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

1) 세계 의약품 개발 시장추세에 발맞춰 인간과 유사한 치료반응을 관찰 할 수 있는 뇌질환 질환모델견 생산
2) 글로벌 신약 개발회사에서 요구하는 질환모델견의 생산 시스템 구축
3) 분자병리학적·분자유전학적 뇌질환 기작연구 및 질환모델 유전자 연구지원 정보 인프라 구축을 통해 타깃신약 발굴 기반확립으로 뇌의학 관련 산업의 고부가가치 창출
4) 뇌질환 발병 메커니즘 규명
5) 개 전체 유전자 동정 및 전사체 profiling을 통해 개 이용 연구의 활성화 및 관련 산업의 선점
6) 축산과 첨단생명공학기법을 결합한 연구의 최적화로 개 사육농가 및 관련 산업 소득증대

SUMMARY
(영 문 요 약 서)

To generate neurodegenerative disease model dogs, we have established a stability of somatic cell cloning efficiency in the first year. A stable somatic cell line has also been established by genetic screening of Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Moreover, genetic screening has been tried not only various cell tissues but also neurodegenerative disease-related reference genes in dogs. We have obtained three hundred fifty million raw data from seven tissues with the consequence that.

In the second year, neurodegenerative disease model dog has been successfully generated using Parkinson's disease transgenic cell line generated based on results produced from the first year. The cloned dog has been confirmed through molecular biological test and DJ-1 gene transgenic dog was beyond doubt. DJ-1, also known as PARK7, is a protein which in humans is encoded by the PARK7 gene. DJ-1 has been identified as a gene linked to early-onset familial Parkinson's disease. It has been reported for the first time in the world from us that it may also function as a glyoxalase. In addition, APP gene, which is swedish type, has been introduced to generate Alzheimer's disease model dogs. This gene was produced by V5 tag gene-cloned Lentiviral vector system during second co-project. The produced full-length cDNA from major candidate genes of Parkinson's disease and Alzheimer's disease has been done by genetic screening during third co-project.

In the third year, the position of DJ-1 insertion in the Parkinson's disease model dog generated from the second year has been confirmed through molecular biological/ethological test. Parkinson's disease and Parkinson's disease-related behavior, which is similar phenotype to human disease, has been observed. Interestingly, normal expression of DJ-1 gene has been confirmed in two pups which were born as a next generation. Based on the results of DEG analysis obtained from two pups, 45 up-regulation genes and 29 down-regulation genes has been found in DJ-1 gene transgenic dogs. Furthermore, Alzheimer's disease model dogs have been successfully pregnant by Alzheimer's disease transgenic cell line. Three pups will be born from 1 surrogate mother in the near future. Taken together, we expect that those results, which were conducted for the first time in the world, can be submitted to the most prestigious journals such as Nature, Science, Cell etc in the near future.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Ⅰ. Purpose of the study····· 1

Ⅱ. Current level of domestic and foreign technical development····· 4

Ⅲ. Contents and Results ····· 11

Ⅳ. Achievement of the goal and Contribution to the related research field····· 71

Ⅴ. Outcome and Future Plan····· 75

Ⅵ. Scientific and technical information gathered from oversea during the progress of research and development··· 77

Ⅶ. Current level of Research facility · Equipment····· 79

Ⅷ. Reference ····· 80

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 1

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 4

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 11

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여····· 71

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획····· 75

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보····· 77

제 7 장 연구시설·장비 현황····· 79

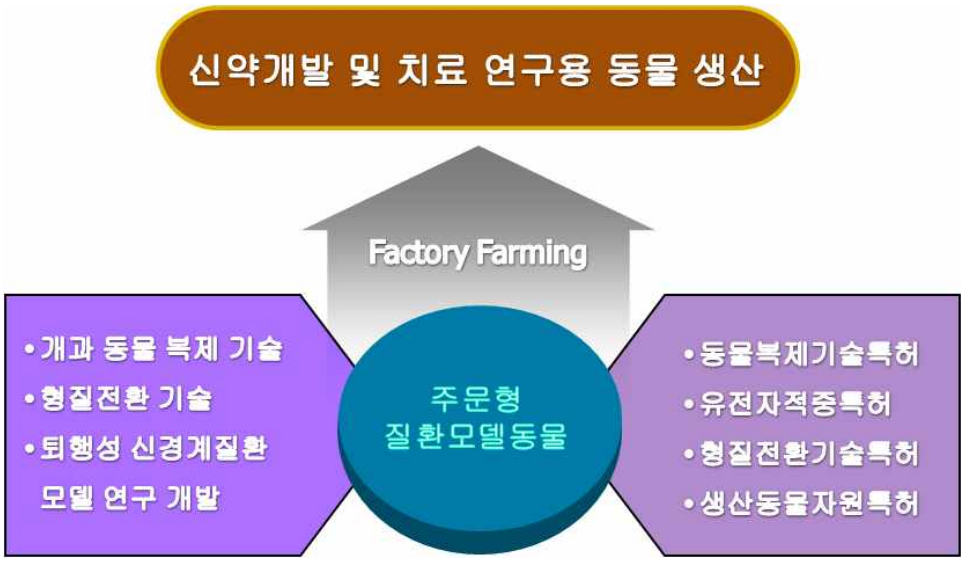
제 8 장 참고문헌····· 80

본 문

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

개발된 개의 체세포 복제기술 이용하여 유전자 적중 및 형질전환 기술을 개발하고 이들 기술을 복합적으로 활용하여 형질전환 복제 개를 생산하고자 한다. 특히, 뇌질환 관련 모델은 생쥐에서 인체 질환과 유사성을 보이지 않는 점에 착안하여, **퇴행성뇌질환 관련 유전자 적중, 형질전환 개를 체세포 복제 기술을 통하여 생산**하고 인간과 유사한 퇴행성 뇌질환 및 관련 행동을 분석하여 인체뇌질환 모델로서의 활용 가능성을 모색하며, **유전정보 기반을 구축하여 맞춤형 신약개발을 위한 질환 모델동물로서 활용**하고자 한다.



2. 연구개발의 필요성

가. 근본적 신경질환 치료방법 연구의 필요성

- 고도로 발달된 현대사회는 **파킨슨병** (Parkinson's disease, PD), **알츠하이머병** (Alzheimer's disease, AD) 같은 **신경 퇴행성 질환** (neuronal degenerative disease)들이 만연하다. 이는 환자 뿐 만 아니라 가족 및 사회에 대하여 많은 문제를 낳고 있으며, **치료수단을 개발하는 것이 시급한 국가적 과제로 부각**되고 있다.
- 특히 국내 **알츠하이머병**에 의해 기인되는 노인성 치매의 경우 2005년 6만5천명, 2008년 13만 7천명으로 **연평균 25%의 증가율**을 보이고 있으며, 특히 80대 이상 연령층의 실진료 환자수는 **연평균 34%씩 증가**하고 있는 실정이다. 치매로 인한 건강보험 진료비도 해마다 증가하여, 2005년 872억 원에서 2008년에는 3천817억 원으로 집계되어, 치매 진료환자 1인당 연간 건강보험 진료비가 최근 7년 동안 2.4배나 증가하였다.
- 이렇듯 치매 등 노인성 질환으로 인한 건강보험 급여비가 30%에 육박하는 등 노인의료비와 함께 커다란 경제 사회적 문제로 야기되고 있다. 특히 대표적 퇴행성 뇌신경질환인 알츠하이머와 파킨슨병은 원인미상의 뇌신경세포의 선택적인 사멸로 발생하는 질환으로 아직까지

질병의 발생이나 진행을 억제하거나 근치적인 **치료 방법이 없는 상태고 이에 대한 연구가 필요**하다.

- **파킨슨병**은 알츠하이며병에 이어 두 번째로 흔한 신경퇴행성질환이다. 국내 유병율은 의료이용 기록으로 60세 이상자에서 **인구 10만명당 1,473명이 발병**하고 있다. 2006년 자료에 의하면 **환자수는 만성신부전증 다음으로 가장 많은 수를 차지**한다. 의료비는 환자 1인당 1,036천원으로 지난 5년간 70% 증가하는 추세를 보이고 있다.
- 하지만 현재 50대 미만의 환자에서 유전적소인에 의해 발병한다는 보고만 있고, 정확한 병인론을 밝히지 못하고 있다. 따라서 현재 밝혀진 질병관련 **유전자의 조절을 통한 병인론의 연구가 절실**하다.
- **전임상자료가 부족하여 질병의 원인과 치료제가 개발이 상당히 지연**되고 있어 이를 충족시킬 질환모델 동물의 개발이 시급하다.

나. 신경계질환모델 연구에 대한 문제점

- 현재 **다양한 생쥐모델을 통한 질환 모델을 구축하여 인간의 질환을 연구**하고 있으나, 뇌질환의 경우 단순히 유전적 defect를 가져 신경발생 문제와 같은 실험만 가능하다. 그러나 인식, 특히 노화에 따른 퇴행성 신경질환 연구는 거의 불가능하다는 한계성을 인식하여 최근 원숭이를 이용한 연구가 시작되었으나, 아직 초기단계이며 그 성공여부가 불투명하다. 현재 사용되고 있는 퇴행성신경질환 모델의 작성은 주로 설치류에서 뇌혈관을 수술 적으로 결찰하거나 특정 receptor를 knockout한 후 제작하고 있으나, **행동학적 관찰이 어렵고 수명이 짧은 마우스에서 질병의 발현을 기대하기에는 어려운 점이 많은 것이 사실**이다.
- **마우스에서의 파킨슨 모델동물 연구의 한계점** ; 생쥐에서의 파킨슨 질환 모델 연구만으로는 현재 한계점에 도달하였다. 퇴행성 질환인 파킨슨병은 가계도를 이용한 **유전학적 연구로 밝혀진 early-onset 유전자들 Parkin, Pink1, DJ-1등에 의해 유발됨**이 알려져 있다. 현재까지는 이어한 유전자들의 기능이나 질병 관련 메커니즘의 연구에 생쥐 파킨슨 질환 모델이 이용되어 왔다. 그러나 **생쥐의 파킨슨 질환 모델에서는 사람들에게서 나타나는 발병 증상들이 뚜렷이 나타나지 않았으며 knockout을 시키지 않은 생쥐와 행동 비교실험을 하였을 때도 뚜렷한 차이점을 찾을 수 없었다.** 이러한 문제점들은 생쥐에서 파킨슨 질환 연구는 인간의 파킨슨 발병 메커니즘의 규명이나 치료법 개발에 한계를 나타냈다.
- 지난 20년간 유전성 AD 원인 유전자 (Amyloid precursor protein (APP), b-secretase, 등)들의 변화에 의해서 생기는 현상을 in vivo level에서 해석하고, AD관련 인자의 발굴 및 관련 단백질의 in vivo에서의 기능 연구는 AD연구의 큰 흐름으로 되어 있다. 하지만 아직까지 **최적의 설치류 동물 질환모델이 확립되지 않아 AD관련 신약개발에서 in vivo 평가방법의 확립 및 신속 정확한 약효 관찰이 불가능하고 식품, 진단시약 개발 등 산업적 효율성이 낮게 평가**되고 있다.

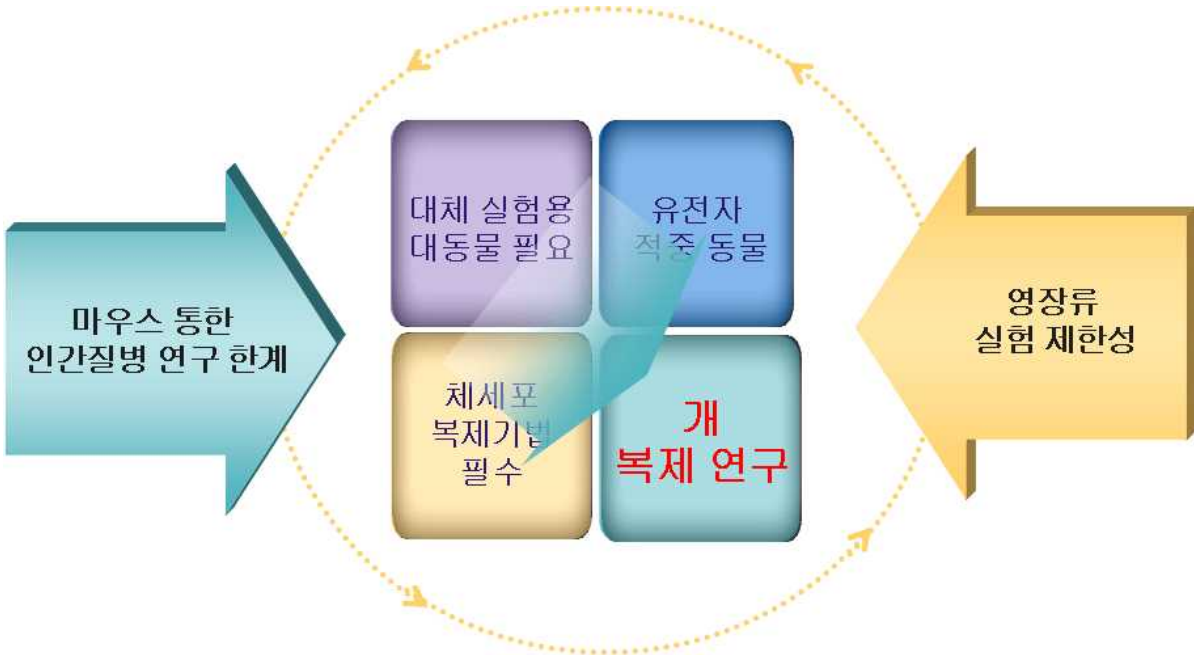
다. 혁신적 질병모델 동물의 필요성

- 퇴행성질환의 약물치료나 기전연구를 위한 질병모델로는 대부분 설치류를 이용해 왔으나, 동물 질환모델의 병리양상과 증상이 사람에서 관찰되는 것과 많은 차이를 보이고 있어 동물 질환모델에서 나온 결과를 토대로 임상시험을 시행할 경우 많은 문제점을 안고 있다.
- 알츠하이머병 관련인자의 *in vivo* 기능 연구를 수행함에 있어서 **환자를 대신할 수 있는 알**

츠하이머병의 최적 실험(모델)동물개발은 필수적으로 기억과 학습뿐만 아니라 인지 및 자기표현이 가능한 개를 이용한 질환모델은 알츠하이머병 연구를 통해 단순히 질병의 원인 및 예방과 치료제의 개발에 큰이바지를 할 수 있을 뿐만 아니라 **한국의 알츠하이머병연구 수준을 세계적 수준으로 끌어올릴 것이라 기대** 할 수 있다.

- 적절한 질병 동물 모델을 개발하는 것이 발병 기전의 연구 및 치료제의 개발에 가장 먼저 선행되어야 할 중요한 과제이나 국내외적으로 이러한 환자와 유사한 적절한 질병 동물 모델의 개발은 미진한 상태에 있다.

- Pfizer 등 **글로벌제약사들이 경쟁적으로 신경계질환 치료제를 개발하고 있으나 마땅한 전임상실험동물의 부족으로 임상진입에 많은 어려움**을 겪고 있기에 개에서 퇴행성 신경계질환 모델동물이 생산된다면 이들의 치료제개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 관련 연구분야의 국내외 연구동향

미국에서는 급증하는 뇌질환 연구를 통해 미래를 대비하기 위하여 정부차원에서 『뇌연구 10년 법안(Decade of the Brain)』을 제정하였으며 또한 미국NIH에서는 2004년에 신경과학연구의 청사진(Blueprint for NeuroscienceResearch)프로그램, 미국정신건강 연구소의 선도적 뇌질환 연구 프로그램(NIMH Treatment Development Initiative)을 착수하여 **뇌질환 관련 유전자분석, 뇌 영상기법개발, 실험동물모델개발, 뇌질환 치료기술 개발을 집중 지원**하고 있다.

일본에서도 『뇌의 세기(Century of the Brain)』 선포로 **뇌질환 병인, 조기진단지표 및 치료제 개발에 국가적 역량을 집중**하고 있다.

가. 인간의 알츠하이머/파킨슨병 메카니즘 및 병인 유전자 동정

대표적인 난치성 퇴행성 뇌질환인 AD/PD는 많은 방법으로 연구되고 있다. 하지만 아직까지 질병의 발생기전이 불명확하여 그 메카니즘 및 병변 유전자를 동정하는 연구가 계속적으로 진행 중에 있으며, 그 연구 현황은 다음과 같다.

(1) 알츠하이머 메카니즘 및 병인 유전자 동정

- 사람과 마우스에서 presenilin1(PS1), presenilin2(PS2)이 AD병인 유발 유전자임을 보고 하였다. (1996, Lee 등, J Neurosci.)
- AD 환자의 경우 amyloid precursor protein(APP)이 β-secretase에 의해 분해가 되고 PS1과 PS2를 subunit으로 지니고 있는 γ-secretase에 의해 분해되어, 분해산물이 세포외에 축적되어 발병된다고 보고하였다(2002, Hardy, Science. ; 2002, Wilson등, Nat Neurosci.).
- APP, PS1, PS2를 암호화하고 있는 유전자 내에서의 돌연변이에 의해서 알츠하이머가 유발된다고 보고되었다(2004, Selkoe, Nat Cell Biol.).

(2) 파킨슨병 메카니즘 및 병인 유전자 동정

- PD 환자의 가계도 및 유전자 분석을 이용하여 Parkin gene에의 돌연변이가 유년시기에 발병하는 PD와 관련 있음을 밝혔다(1998, Kitada 등, Nature.).
- PD는 도파민성 신경의 퇴행과 Lewy body라고 알려진 단백질 축적물이 형성되는데, ubiquitin proteasome system(UPS)과 chaperone이 PD와 관련이 있음을 제시하였다(2002, Auluck 등, Science).
- PD 환자의 염색체상에서 PARK6라고 알려진 chromosome 1p36의 좌위를 분석한 결과 PINK1(PTEN-induced kinase 1)에서의 돌연변이가 PARK6와 관련이 있다고 확인하였으며, 이것은 missense mutation과 nonsense mutation으로 나타난다고 보고하였다. 또한 PINK1은 미토콘드리아에 위치하고 있으며 이 유전자에 돌연변이가 생기면 cellular stress에 대한 민감도가 증가함을 밝혀 미토콘드리아와 PD의 관련성에 대해 보고하였다. (2004, Valente등, Science)

나. 설치류에서 알츠하이머/파킨슨병 모델동물생산

AD/PD 관련 연구는 세포수준인 신경세포 위주의 연구에서부터 AD/PD 모델마우스를 통한 질환적용 실험 및 임상에 적용하는 연구들까지 다양한 범주에서 이루어지고 있다. 인간의 치

료에 실제적으로 적용하기위해서는 세포수준을 넘어 질병모델동물을 이용한 질병의 발병기전 연구, 신약의 효능 및 안전성 연구가 필수적으로 이루어져야한다. AD/PD 모델 쥐는 약물주입법과 전핵내미세주입법으로 생산되고 있으나, 낮은 생산효율과 생산된 질병모델간의 형질차이로 인해 임상실험 시 동등한 결과를 도출하는데 어려움이 있다. 지금까지 보고된 국내외 타 연구 기관의 각 연구개발 현황을 아래에 작성하였다.

(1) 약물 주입을 이용한 알츠하이머/파킨슨병 모델 생산

- lipopolysaccharide를 뇌와 뇌실에 주입하여 질병모델 쥐를 생산했으나, 이 모델은 전체적으로 표준화 작업이 어렵고, 유발 방법과 관련한 모든 것이 구체화되어 있지 않아 모델 동물의 병변의 양상이 완전히 통일되어있지 않다는 단점이 있다(1998, Hauss-Wegrzyniak 등, Brain Res.).
- Tau의 병태생리를 연구하기 위해 APP형질전환 쥐의 뇌에서 추출한 Aβ 침전물을 B6/P301L tau 형질전환 개체의 뇌로 주사하였다. 주입한 베타 아밀로이드와 침전된 신경섬유성의 베타아밀로이드가 모두 tau 신경섬유성 병인을 유발함을 보고하였다(2007, Balmont 등, Am J Pathol.).
- 6-hydroxydopamine(6-OHDA) / MPTP (1 - Methyl - 4 - phenyl - 1,2,3,6 - tertahydropyridine)의 주입으로 PD 모델을 생산하였다. MPTP를 주입한 모델과 달리 6-OHDA를 주입한 모델동물의 lesion은 비가역적인 신경 손상을 유발하였고 일측성 또는 양측성으로 유발된 것을 확인할 수 있었다(2010, Conceicao 등, J Vis Exp.).

(2) Microinjection 이용한 알츠하이머/파킨슨병 모델 생산

- pronuclear injection을 통해 사람의 mutant APP gene이 발현하는 형질전환 쥐를 생산하였다. 그러나 NFT, Paired helical filaments(PHF)가 형성되지 않았으며, 이러한 이유는 아직 알려져 있지 않다(2003, Jankowsky 등, J Neuropathol Exp Neurol.).
- Parkin gene의 엑손 3 부위를 targeting하여 Parkin Knockout mice를 생산하였다. 도파민 조절과 nigrostriatum의 기능에 parkin의 역할을 밝힌 첫 결과이며 parkin이 쥐에서 nigral neuron의 생존에 필수적인 역할을 하는 것은 아니라는 사실을 보고하였다(2003, Goldberg등, J Biol Chem.).
- PINK 1 -/- 인 mice를 생산하였고 쥐에서 PINK1 유전자와 미토콘드리아의 기능과의 관련성을 확인하였다. 이를 통해, 포유류의 PINK1 gene이 미토콘드리아의 기능에 중요하며 스트레스에 반응하여 보호 작용을 한다는 것을 보고하였다(2008, Gautier 등, PNAS).
- Human PSM146V, human APPSWE, human tauP301L의 형태를 지닌 triple transgenic mice를 생산하였다. 아밀로이드 플라크 외에도 다른 형질전환 개체에서 발생하지 않았던 Neurofibrillary tangle-like pathology가 형성되었으며, 인간의 AD 질병의 신경학적 이상 위치와 동일 위치에서 나타남을 밝혀, 가장 전임상학적으로 유용한 동물 모델이라 보고된다(2008, Mastrangelo 등, BMC Neurosci.).
- PDAPP mouse model은 돌연변이된 사람의 APP minigene을 지니는 개체이며, 뇌의 뇌량 부분이 심각하게 위축되어 있고 해마 부위의 부피가 상당히 감소되어 있었다. 그러나 이것은 Aβ가 축적되기 전인 3개월가량부터 관찰되기 때문에, 발생학적 결함으로 인한 것으로 간주되며 AD와 관련된 연구를 진행하기에는 다소 무리가 있다(2008. Wahrle 등, J Clin Invest.).
- APP/PS1/Tau의 돌연변이형을 지닌 Triple transgenic mice를 생산하였다. NTF가 형성되므로 AD모델에 더 가깝지만 개체 간의 병의 발현 양상에 있어 진행 속도가 다른 문제점이

보고되었다(2008, Bertoni-Freddari 등, Rejuvenation Res.).
- Parkin deficiency가 유도된 mice의 생산하여, 증가하는 도파민 방출의 조절에 parkin이 연관되어 있으며 nigrostriatal의 신경 pathway에 있어서 시냅스의 유연성 또한 관련이 있음을 밝혔다(2009, Kitada 등, J Neurochem.).
- PD에서 열성으로 유전되는 병인유전자인, parkin, DJ-1, PINK1의 3가지를 모두 불활성화시킨 mice모델을 생산하였다. 비록 신경 말단 부분에서 방출된 도파민 양의 감소와 시냅스 연결성부위의 tsh상이 나타났으나, substantia nigra 신경세포의 퇴행은 나타나지 않았다(2009, Kitada 등, J Neurochem).
- 최근에는 Parkin과 PINK 유전자 기능의 상관관계에 관한 연구가 활발하다. Parkin knockout mice model에서와 같이 PD와 관련된 toxin에 노출시킨 rat model에서 용해성, 비용해성 PINK의 생성 증가와 함께 parkin aggregate가 나타나, PINK1과 parkin이 Lewy body 형성에 중요한 역할을 함을 밝혔다(2010, Um 등, Biochem Biophys Res Commun.).

다. 비설치류에서 AD/PD 모델 동물 생산

설치류에서 AD/PD 모델을 생산하여 질환연구를 진행하고 있으나, 인간의 질환과 유사한 병적 증상과 병리병변을 보여주지 못하고 있다. 따라서 이러한 한계를 극복하기 위하여 비설치류에서도 AD/PD 모델 동물을 생산하고 있으며, 초파리에서 그 연구가 활발히 진행되고 있다. 관련한 국내외의 연구 현황은 아래의 목록과 같다.
- 인간의 APP 유전자를 과발현시켜 초파리를 이용한 AD 모델을 생산하였다. 결과 초파리의 날개에서 비정상적인 변화와 뇌의 Kenyon cell에서 퇴행성 변화, 그리고 아밀로이드 plaque와 유사한 산재된 축적물이 형성되었다(2004, Iijima-Ando 등, PLos One.).
- 독성이 있는 beta-amyloid peptide를 발현시켜 AD 모델 초파리를 생산하였고, 형질전환 초파리의 신경이 퇴행성 변화를 보였으며, 생후 몇 일이 지나지 않아 운동 기능이 저하되고, 후각 기억력이 손상되었으며 수명이 짧아지는 등의 AD의 분명한 표현형을 보였다(2004, Crowther 등, Curr Opin Pharmacol.).
- 초파리를 이용하여 PD 질환 모델 동물을 정상적인 사람의 a-synuclein과 두 개의 돌연변이형으로(A30P, A53T)을 생산하였다. 뇌 조직에서 육안적인 형태학적 변화를 유발하지는 않았으나 성체 시기가 되었을 때 tyrosine hydroxylase의 손상이 일어났으며, 사람과 유사하게 lewy body와 같은 축적이 일어났고, 운동 기능 손상도 유발되었다(2000, Feany 등, Nature).
- 초파리에서 Parkin gene의 기능 손상을 유발하여 PD 질병모델을 생산하였다. 결과 초파리의 산화적 손상에 대한 민감도의 증가와 날개의 표현형이 달라졌다. 시간의 경과에 따라 운동기능에서도 퇴행성 변화가 나타났고, 그 구조적인 변화에는 미토콘드리아의 기능 결핍 및 조직학적 비정상이 관찰되었다(2003, Greene 등, PNAS; 2004, Pesah 등, Development).
- 초파리를 이용하여 Pink1 유전자가 Parkin과 유전적으로 상호작용하여 mitochondira의 function과 관련있다는 것을 밝혀냈다. 초파리의 PINK1의 유사체를 제거한 결과, 수컷의 불임, 근육조직의 괴사성 퇴화, 미토콘드리아 형태의 이상을 유발하고 산화적 스트레스를 포함한 여러 스트레스에 대해 민감도가 증가하였다. 미토콘드리아의 기능을 조절하는데 있어서 pink1-parkin의 역할은 PD의 병인의 중추적인 메카니즘이라고 보고하였다(2006, Clark 등, Nature).
- 자연발생학적 동물 모델로 알츠하이머와 유사한 증상을 나타내는 노령의 침팬지를 이용한

연구도 진행되고 있다. 신경학적 plaque의 형성과 NFT 및 Filament의 형성이 알츠하이머 질병 양상과 동일하였으나 실험동물 모델로 사용하기 위해서는 대량 생산이 필요하며 자연발생학적인 무작위적으로 발생하기 때문에 실험동물 모델로는 적합하지 않다(2008, Rosen 등, J Comp Neurol.).

- 콜레스테롤이 풍부한 식이를 공급받은 토끼를 동물 모델로 사용하여 베타아밀로이드의 침전이 완만하게 나타나는 것을 확인하였다. 그러나 콜레스테롤 식이 방법이 표준화되지 않았고 베타아밀로이드의 침전 양상은 개체에 따라 조금씩 변이가 있어 실험동물로 적절히 활용되기에는 무리가 있다(2008, Sparks 등, J Alzheimers Dis.).

2. 질환모델 동물 시장의 현황

가. 국가경제에서의 중요성

- 바이오산업은 IT분야와 함께 미래 국가경제를 견인할 신성장동력으로 건강(Red), 환경(White), 식량(Green), 삶의 질 향상(QOL) 등 인류 난제 해결에 필요한 기술 및 제품 개발을 통해 고부가가치를 창출하는 미래 신산업으로 국가적인 관심과 지원이 이루어 지고 있는 분야임. 특히 바이오제약(자원)·의료 응용영역이 전통적 의약산업중심에서, IT·BT·NT 등의 기술을 융합하는 패러다임 변화에 따라 미래 세계시장 선도가능 제품군의 중심으로 급성장 하고 있다.
- 이러한 바이오산업의 특징을 바탕으로 유용 유전자의 확보는 바이오산업에서 가치창출을 위한 필수 요소임. 현재 기능이 밝혀졌거나 질병과 연관성이 있는 유전자를 타겟으로 개발된 바이오의약품이 속속 등장하고 인간 유전자들의 기능이 가속적으로 밝혀져 의약품 개발의 대상 유전자들이 급속히 늘어날 것으로 전망된다.
- 따라서 질병 치료에 활용될 수 있는 유용 유전자의 발굴을 위한 유전자 분석기술 및 DNA chip 기술과 함께 모델동물 제작기술 등 유전자 기능분석을 위한 각종 생명공학기술의 확보는 고부가가치 바이오 신약개발에 있어 필수적이며, 이들 기술을 활용하여 독점적으로 확보한 유전자 자원은 새로운 경제적 가치를 창출할 수 있을 것으로 전망되며 이에 따른 국가경제에 미치는 영향 또한 상당할 것으로 예상된다.

나. 시장의 규모 및 가치 창조

- 유전자이식 및 적중 실험동물의 개발은 유전자에 대한 특허확보와 함께 개발된 질환모델 동물 자체를 상업화 할 수 있다는 점에서 큰 특징이며, 신약개발에 소요되는 개발투여 비용 및 개발기간의 증가에 따라 이를 감소시킬 수 있는 방법에 대한 제약사 요구가 증가하고 있으며, KO/KI/TG 동물 제작기술의 발달에 따른 同 상황에 대한 대응 가능성 증가로 새로운 동물 모델에 대한 수요가 확대될 것으로 예상된다(Bioin, 2010).
- 노인성 뇌질환인 뇌졸중, 치매, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환의 연간 시장규모는 미국이 200조원, 한국이 약 10조원에 달하며, 2026년경에는 우리나라도 초고령 국가에 진입하게 되어 시장규모는 최소 2~3배이상 증가하리라 예상 되고 있다(한국과학기술정보연구원, 2005). 또한 뇌신경계 질환 관련 치료제 시장은 전체 제약 산업의 약 15%를 점유하고 있고, 세계 시장은 2005년 923억 달러에서 2015년에는 2,000억 달러를 넘어설 전망이다. 항우울증 및 안정제 시장을 비롯한 정신질환 약물과 알츠하이머치매 관련 의약품 시장이 빠른 증가 추세를 보이고

있다(전 세계 치료분야별의약품 도매 시장 현황 -'04. 10, IMS).
- 본 과제에서 도출된 질환모델 동물의 시장규모를 최소한으로 산출하였을 경우 뇌신경질환 관련 질환모델개(3년생 정도)를 제약회사에 제공한다면 마리당 최소 500만원 산정하고 미국 FDA통과를 목표로 하였을 때 100마리가 기준이며, 전임상대상 신약을 Test 하는 것이 **국내에서 일 년에 10가지라고 하면, 50억 정도가 우리나라 연간 시장**이 된다.
- 이후 외국의 Big-Pharm(Glenmark, pfizer) 등에서 요구한다면, 10배의 수요가 예측되며, 이 경우 **500억원 정도의 독점시장이 가능**하다.

3. 국내외 관련분야 환경변화

- 2009년 건강보험공단 조사에서 지난 7년간 치매로 등록된 환자는 4.5배(102만7천명) 이상 늘어났으며 총 진료비는 2조4387억원으로 보고되어, 퇴행성뇌질환에 대한 사회적 관심도가 매우 커지고 있으며 이와 관련된 의료분야의 역할이 날로 중요해지고 있다.
- 지난 50년간 인간의 수명이 연장되면서 노화 관련 뇌질환 및 신경질환이 늘고 있으며 전 세계 인구 5명 중 1명 이상이 스트레스와 우울증으로 고통 받고 있다. 2005년 7개 주요 제약시장에서 전체 20%에 달하는 인구가 뇌질환 및 신경질환을 겪고 있으며, 알츠하이머병을 비롯한 치매 환자 수는 전 세계적으로 약 3천만 명 정도이며 의료비용은 300조원으로 추정된다.
- 뇌신경 질환 관련 의약품 세계시장은 2005년 923억 달러 규모를 형성하고 있고, 이 중 연평균 시장 증가율이 높은 질병으로는 알츠하이머 (34.5%)와 파킨슨병 (12.9%)이 있다. 하지만 베이비붐 세대가 60~70세에 접근함에 따라 시장 규모는 증가할 것으로 예상된다.
- 따라서 체계적인 지원을 받아 양질의 성숙난자를 대량으로 확보하기 위한 연구를 시도하고, 사람과 유사한 개의 유전질병에 관한 연구를 가속화하여 비설치류에서의 질병연구 및 신약개발에 필요한 실험동물을 생산한다면, 현재까지의 취약성을 극복하고 이 분야에서 우리나라는 세계적으로 선도적인 위치를 차지 할 수 있을 것이다..
- 또한 본 연구진은 세계적인 의약품 시장 추세에 발맞춰 인간과 유사한 치료반응을 관찰할 수 있는 인체 뇌질환 모델견을 구축하고, 이를 활용한 분리 병리기작 연구 및 타깃 신약 발굴 기반을 학립함으로써 뇌질환 관력 산업에서 부가가치를 창출할 수 있을 것이다.
- 최근 국내에서도 학계, 연구소 및 산업체 등에서 viral vector를 이용한 질환 형질전환 모델 동물개발이 활발히 진행 중이며, 국내 연구팀들은 미세주입법, 체세포핵이식, 배아줄기세포를 이용한 형질전환 동물 생산 연구가 진행되고 있으나, 그 중 체세포핵이식을 이용한 형질전환 방법이 활발히 진행 중이다. 그러나 정부주도의 체계적인 대규모 지원이 부족한 실정이다.
- Lentiviral vector system을 이용하여 줄기세포에 형질전환 시킴으로써 이전의 유전자 전달을 위하여 이용한 Lipofectamine의 독성에 대한 문제점을 낮추었고, 이를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

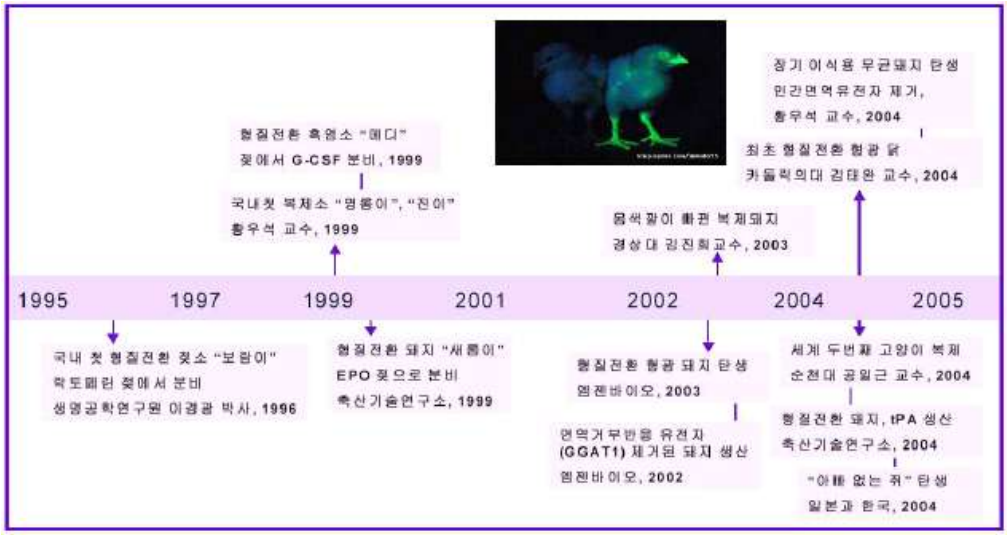


Fig. 1. 형질전환 동물 분야 관련 수행 국내동향
(농촌진흥청 2008년 형질전환동물 및 이종장기 국내동향보고서)

- 세포로의 유전자 운반체는 크게 바이러스성 벡터와 비 바이러스성 벡터(물리화학적 벡터)로 구분된다. 아데노바이러스 수송체가 비 바이러스성 운반체보다 유전자 전달 효율이 높으나 염증반응과 면역반응을 일으키는 단점이 있다. 비 바이러스성 벡터인 Liposome을 이용하여 아데노바이러스 벡터가 가지는 문제점을 없애고, 유전자 전환효율성을 높이고 정자세포의 damage를 최소화시키기 위한 연구를 몇 그룹이하고 있다.
- 렌티바이러스는 유전자 전이의 높은 효율성과 핵 내로의 삽입을 통해 다음 세대로의 유전자 전달에 높은 것으로 밝혀져, 몇 개의 그룹이 렌티바이러스를 이용한 연구가 진행되고 있다. 아래 Fig. 은 형질 전환 동물 분야 관련 수행 세계동향이다.

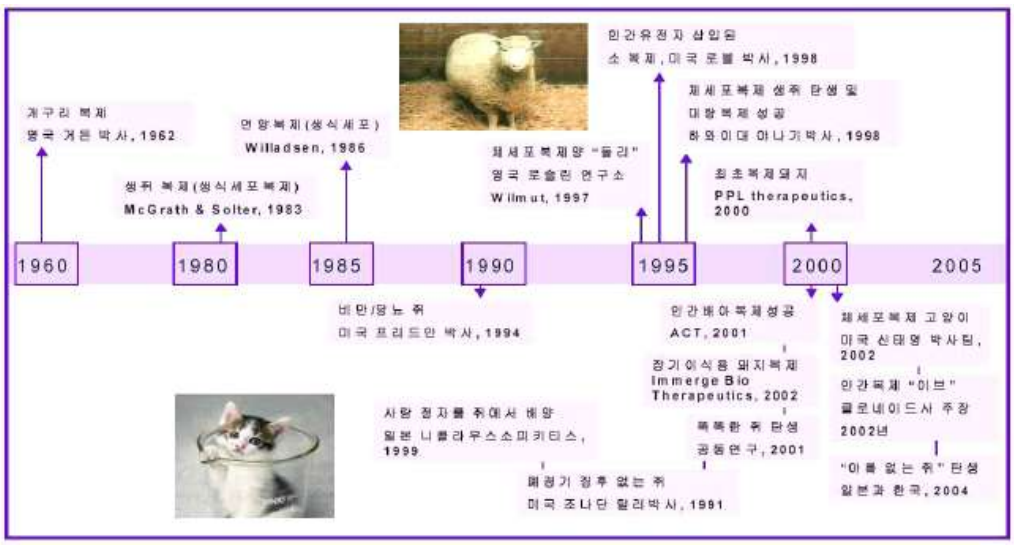


Fig. 2. 형질전환 동물 분야 관련 수행 세계동향
(농촌진흥청 2008년 형질전환동물 및 이종장기 국내동향보고서)

- 2000년에 종료된 인간 게놈 프로젝트는 Sanger 방법의 염기 해독 기술을 사용하여 인류에게 인간의 레퍼런스 유전체를 제공하였다. 그 뒤 NIH에서는 이러한 인간의 레퍼런스를 게놈을 기

반으로 한 경제적이고 효율이 좋은 차세대 유전체 해독기를 개발하기 위해 “10만달러 유전체 해독기 개발 사업”을 몇 년에 걸쳐 수행하였다.
- 그 결과 2005년 Roche사에서 처음 GS 454-FLX 시스템을 개발하여 제품화 하였으며. 2007년에는 일루미나사의 솔렉사 Genome Analyzer 해독기를 내놓았다. 바로 뒤를 이어 Life Technology사에서 SOLiD 시스템을 내놓으면서 현재까지 차세대 유전체 시장은 이 세 제품이 주도하고 있다.
- 그 중 일루미나사의 솔렉사 해독기의 경우는 상대적으로 다른 경쟁사의 해독기에 비해 발전 속도가 빨라, 2009년 한해만 보더라도 3개월 마다 한 번씩 해독기와 소프트웨어를 업그레이드를 함으로써 매분기마다 게놈 해독 량을 계속하여 2배씩 증가시켜왔다.
- 이러한 빠른 속도의 발전에 힘입어 2010년에 새로운 해독기 HiSeq 2000을 개발하여 상용화에 성공함으로써 현재 휴먼 게놈을 약 30배수 이상 해독하는 비용을 만 달러 까지 가능하게 만든 최초의 회사가 되었다.

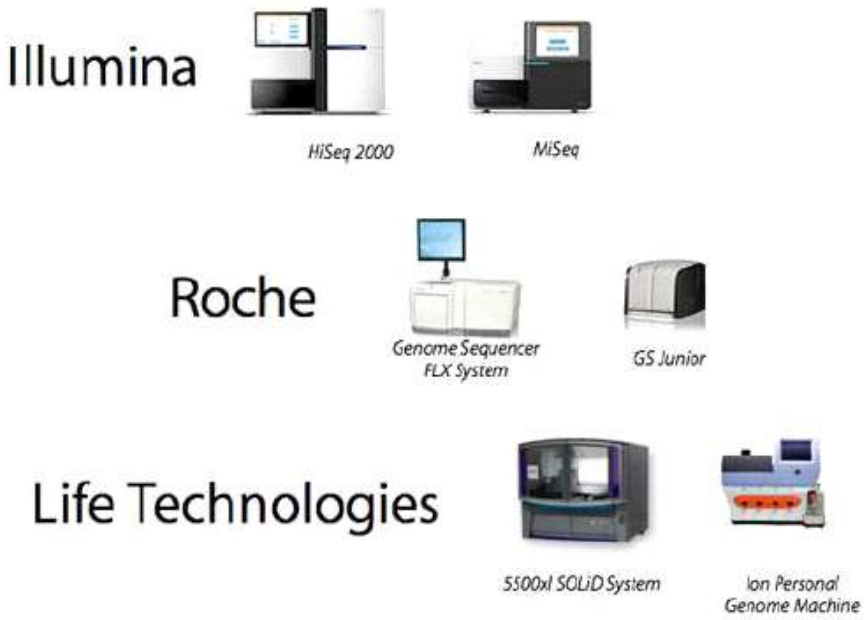


Fig. 3. 대표적인 NGS 시컨싱 장비

- 그리고 이러한 차세대 시컨싱 회사의 치열한 경쟁 뒤에는 또 다른 차세대 시컨서들이 대기하고 있다. 지금까지의 차세대 시컨서들은 빛을 나노기술을 통해 검출하는 방식으로 시컨싱을 진행하였음. 하지만 이러한 방식이 아닌 전혀 새로운 방식으로 염기서열을 초병렬적으로 결정하는 방식을 사용하는 시컨서들을 개발 중이다.
- 일루미나는 염기를 읽을 때 형광색소를 사용하지 않고 염기가 막을 통과할 때의 전위변화를 읽어내는 방식의 시컨서를 개발 중인 옥스퍼드 나노포어 테크놀로지 (Oxford Nanopore)에 투자 중이다.
- 2010년 7월 1일의 발표에 따르면 IBM은 로슈와 손을 잡고 DNA Transistor라는 새로운 시컨서를 개발 중이다. nanopore가 있는 실리콘 칩을 제작해서 DNA가 nanopore를 통과할 때의 전압의 변화를 검출해서 염기서열을 결정하는 원리라고 한다.
- 결국 **더 저렴한 비용으로 더욱 빨리 시컨싱을 수행할 수 있는 더욱 소형화된 장비가 나올 것으로 기대된다.**

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 제 1세부 : 복제 효율 안정화 및 퇴행성신경질환 복제 개 생산

▷ 과제 책임자 : 충남대학교 동물자원생명과학과 김민규

가. 복제 효율 안정화 구축

(1) 최적의 성숙난자 채취 시스템구축

- 혈장 성 호르몬 수준 측정을 통해 실험대상견의 발정주기 및 배란일을 결정하였다. 결정 방법은 무각화 상피 세포가 80%이상이고 혈중 프로게스테론 농도가 약 4.0~7.0 ng/mL일 때 배란이 이루어졌다고 보았으며, 배란 후 72시간째 성숙난자의 회수를 수행하였다.

생체 내 성숙 난자를 회수하는 방법으로 외과적으로 대상 동물을 마취한 후 개복시켜서 생식열구(bursal slit)을 통하여 난관의 말단에 접근하고 카테터 (Fig. 4)를 난관채에 장착한 다음 난관-자궁 접합부위에 주사침을 삽관하였다. 이후 배아 수집 배지를 난관 내부에 관류시켜 관류액을 수득하고 상기 관류 액으로부터 난자를 회수하였다.

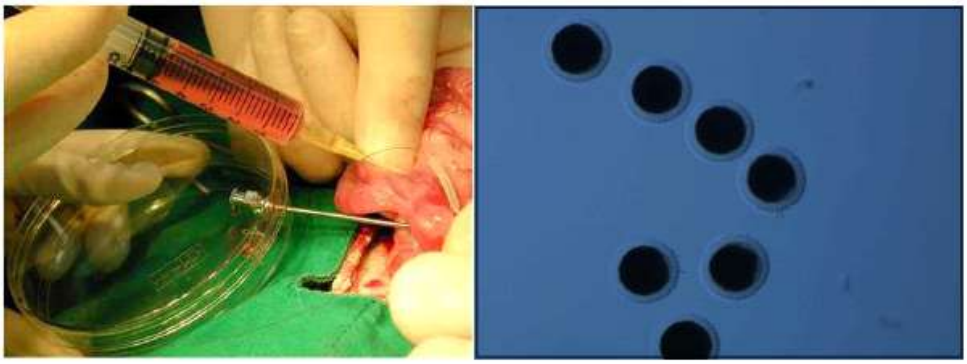


Fig. 4. 수술적 방법으로 난관을 관류하여 난자회수하는 방법과 회수된 성숙난자

- 회수된 난자중 75.21%가 성숙난자였으며, 미성숙난자 15.52%, 노화난자 9.27%로 성숙난자 회수율이 매우 높아 성숙난자 채취시스템을 안정적으로 구축하였다.

Table 1. 회수한 난자의 성숙정도와 회수율

No. of oocyte	No. of matured oocyte	No. of immatured oocyte	No. of aged oocyte
2049	1541 (75.21%)	318 (15.52%)	190 (9.27%)

(2) 과배란 처리에 의한 체내 성숙난자의 회수율 증가 연구

- 개 복제는 다른 동물처럼 도축장에서 난소를 회수하여 체외배양된 난자를 이용하는 것과 달리 발정견의 체내난자를 사용하여야 하는 제한이 있다. 따라서 복제효율을 향상시키기 위하여 다량의 난자가 필요하다. 하지만 자연적으로 발정이 온 모견에서는 제한된(6-12개/두) 난자의 회수로 인해 복제효율이 크게 제한된다. 본 연구는 개 복제효율의 저하요인을 개선하기 위하여 발정초기에 PMSG와 hCG를 이용하여 개의 난자를 과배란시켜서 다량의 난자를 확보할 수 있는 가능성을 알아보기 위하여 실시하였다.
- 개의 발정주기에서 발정초기(proestrus)단계인 삽살개를 이용하였으며, 채혈분석을 통해 혈중

P4 level “0.1~0.96㎍/ml”의 범주에 속하는 삽살개 11두를 이용하여 두 그룹으로 나누어 A그룹 5마리, B그룹 삽살개 6마리를 이용하여 실험을 진행하였다.

Gruop A : PMSG 200IU(1ml)을 매일 투여하고 P4 level이 1~2 ㎍/ml에 도달하였을 때, hCG 1000IU(1ml)을 투여하여 배란을 유도.

Group B : PMSG 500IU(2.5ml)을 이틀간격으로 투여하고, P4 level이 1~2 ㎍/ml에 도달하였을 때, hCG 1000IU(1ml)을 투여하여 배란을 유도.

배란을 유도한 뒤, 혈중 P4 level 측정과 질도말을 통해서 배란적기를 찾은 뒤 uterine tube flushing을 통해서 배란된 난자를 회수하여 결과를 확인하였다. 실험결과 A그룹에서는 총 83개의 난자(마리당 16.6개)를, B그룹에서는 50개의 난자(마리당 8.5개)를 회수하였고, 그리고 CL형성 또한 A그룹이 94개, B그룹이 53개로 호르몬 비처리군 49마리에서 평균 회수한 난자 수의 6.4개에 비해 월등히 많은 난자를 회수하였다.

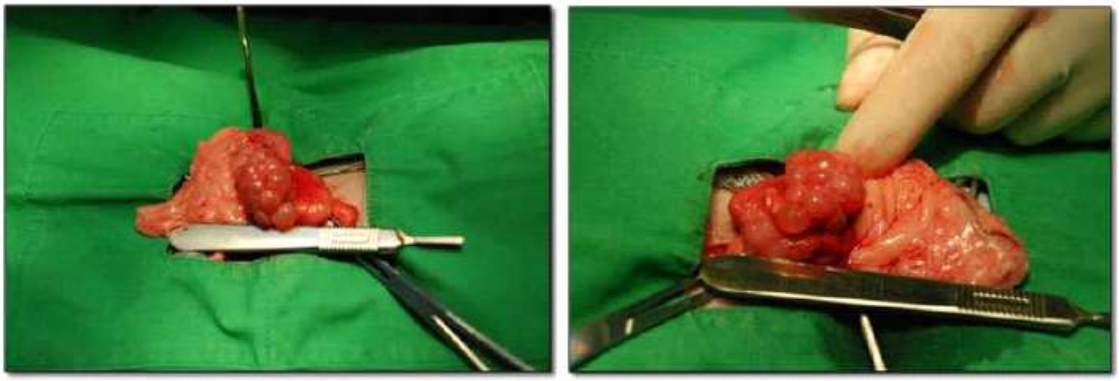


Fig. 5. Ovulated follicle in Superovulation dog.

-특히 A그룹의 두 개체에서는 미성숙 난자였지만, 각각 42개와 29개의 난자를 배란/회수하는 결과를 보였다.

Table 2. Effect of superovulation in proestrus bitch.

Donor dog ID	P4 level of ovulation time	No. of collected oocytes	Quality
KS 9	**5.34**	**42**	**immature**
KS 15	10.71	2	bad
KS 19	4.86	4	immatured
KS 24	4.71	7	matured
KS 40	6.99	9	immatured
KS 41	4.52	4	immatured
KS 42	4.43	12	immatured
KS 43	4.93	12	immatured
KS 44	6.01	5	immatured
KS 45	5.51	8	immatured
KS 56	**3.63**	**29**	**immatured**
KS 88	8.63	1	aging

(3) 세포별 복제 배아 생산효율 비교

- Confluency 그룹, serum starvation 그룹 (0.5% FBS 첨가), 9개의 acteoside 그룹 (10, 30, 50μM acteoside를 24h, 48h, 72h 처리)으로 나누어 세포 주기 동기화릐 결과를 비교하였다. Serum starvation 그룹 (79.2%)에서 contact inhibition 그룹 (74.6%)보다 더 많은 세포가 G0/G1 단계에 정지하였다. 9개의 acteoside 그룹 간에는 유의적인 차이는 없었지만, 30μM acteoside를 48시간 처리하였을 때 (78.3%)가 가장 좋았으며 serum starvation 그룹과 유사한 결과를 보였다 (Fig. 6 , Table 3)

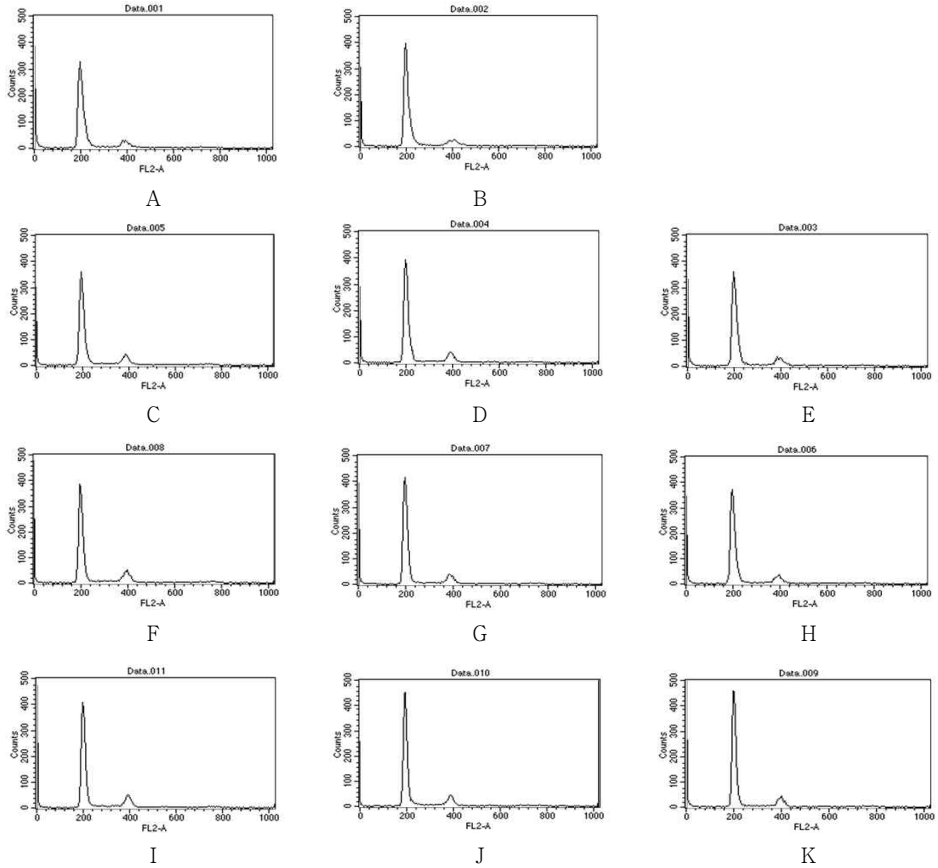


Fig. 6. Histograms of canine fetal fibroblasts analyzed by flow cytometry for cell-cycle stage. A : contact inhibition, B : serum starvation, C : 10 μM acteoside treatment for 24 h, D : 10 μM acteoside treatment for 48 h, E : 10 μM acteoside treatment for 72 h, F : 30 μM acteoside treatment for 24 h, G : 30 μM acteoside treatment for 48 h, H : 30 μM acteoside treatment for 72 h, I : 50 μM acteoside treatment for 24 h, J : 50 μM acteoside treatment for 48 h, K : 50 μM acteoside treatment for 72 h.

Table 3. Cell-cycle synchronization effect of Contact inhibition, serum starvation and acteoside treatment on canine fetal fibroblasts.

			Cell cycle Phase, % (mean ± SD)[NS]		
			G0/G1 stage	S stage	G2/M stage
Contact inhibition			74.6 ± 3.2	2.4 ± 0.4	8.9 ± 0.2
Serum starvation			79.2 ± 1.2	2.1 ± 0.3	9.0 ± 0.2
Acteoside	10 μM	24 h	76.5 ± 2.4	4.0 ± 0.5	11.8 ± 0.4
		48 h	77.6 ± 1.0	3.1 ± 0.3	11.4 ± 0.3
		72 h	77.6 ± 0	2.6 ± 0.4	10.9 ± 1.2
	30 μM	24 h	78.1 ± 1.6	3.8 ± 0.4	12.1 ± 0.1
		48 h	78.3 ± 0.4	2.9 ± 0.3	10.7 ± 2.0
		72 h	77.8 ± 0.5	2.9 ± 0.4	10.6 ± 1.2
	50 μM	24 h	76.4 ± 5.4	3.9 ± 0.2	12.4 ± 1.1
		48 h	76.3 ± 1.6	3.3 ± 1.1	10.9 ± 0.3
		72 h	75.6 ± 1.4	2.4 ± 0.1	9.2 ± 0.3

- Confluency 그룹, serum starvation 그룹, acteoside 그룹에 대한 ROS (Reactive Oxygen Species) 의 감소 효과를 알아보았다. Fig. 7는 피크가 오른쪽으로 이동할수록 더 많은 ROS 가 발생하였다는 것을 보여준다. Acteoside 그룹이 contact inhibition 그룹보다는 약간, serum starvation 그룹보다는 많이 왼쪽에 위치하는 것을 볼 수 있었다. 이는 acteoside 처리가 contact inhibition과 serum starvation 그룹보다 ROS 형성을 감소시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

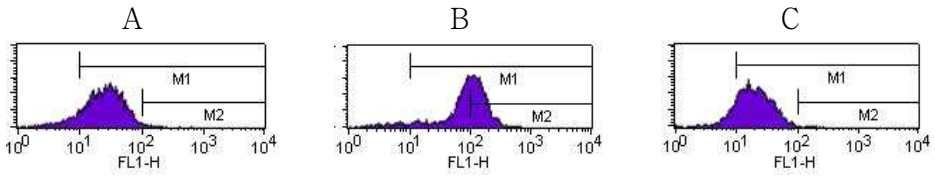


Fig. 7. Histograms showing level of ROS detected in canine fetal fibroblasts. A : contact inhibition, B : serum starvation, C : acteoside treatment. Canine fetal fibroblasts were treated with 30 μM acteoside for 48 hours.

- 또한 위의 세 그룹에 대한 apoptosis 생성 효과도 알아보았다. 이 실험을 통해 apoptosis 생성은 contact inhibition 그룹 (2.6%)과 acteoside 그룹 (2.9%) 간에 유의적인 차이는 없는 것으로 보였다 (Fig. 8과 table 4). 그러나 serum starvation 그룹의 apoptosis 생성율은 21.8%로 다른 두 그룹보다 매우 높은 결과를 보였다. 또한 살아있는 세포의 비율도 contact inhibition 그룹 (90%)과 유사한 90.2%이었다.

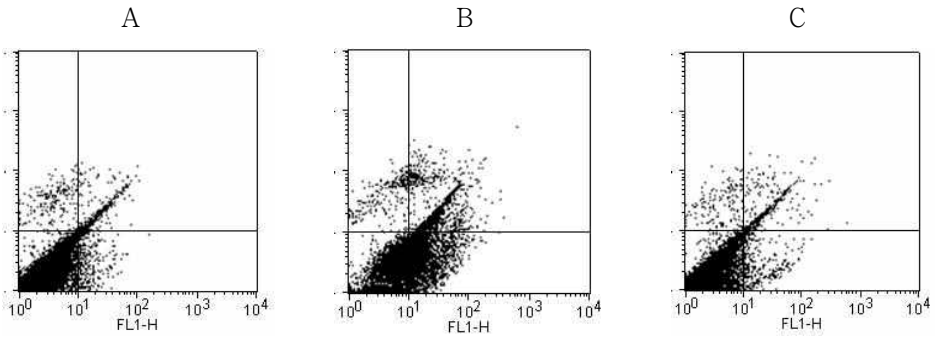


Fig. 8. Distributions of Apoptosis and viability of canine fetal fibroblasts. A : contact inhibition, B : serum starvation, C : acteoside treatment. Canine fetal fibroblasts were treated with 30 μM acteoside for 48 hours.

Table 4. Rate of survivability, apoptosis and necrosis in each treatment group.

	Cell, % (mean ± SD)		
	Live	Necrosis	Apoptosis
Contact inhibition	90.0 ± 1.4[a]	5.6 ± 2.3[a]	2.6 ± 0.5[a]
Serum starvation	60.5 ± 8.5[b]	15.9 ± 5.1[b]	21.8 ± 12.3[b]
Acteoside	90.2 ± 1.1[a]	5.3 ± 1.8[a]	2.9 ± 0.6[a]

- Contact inhibition 그룹과 acteoside 그룹의 세포를 이용하여 개 체세포 복제를 실시하였다. 개의 수정란은 체외에서 배양이 어렵기 때문에, 우리는 복제란의 체외 배양시 10 세포기까지만 확인할 수 있었다 (Fig. 9와 Table 5). Acteoside를 처리한 세포를 사용 체세포 복제란의 분할율은 36.1%로, contact inhibition 그룹을 사용한 복제란 (20.6%)보다 유의적으로 높았다. 4 세포기와 8 세포기 복제란의 비율은 acteoside 그룹에서는 각각 29.5%와 14.8% 관찰된 반면, contact inhibition 그룹에서는 각각 11.1%와 3.2%로 유의적으로 낮았다.

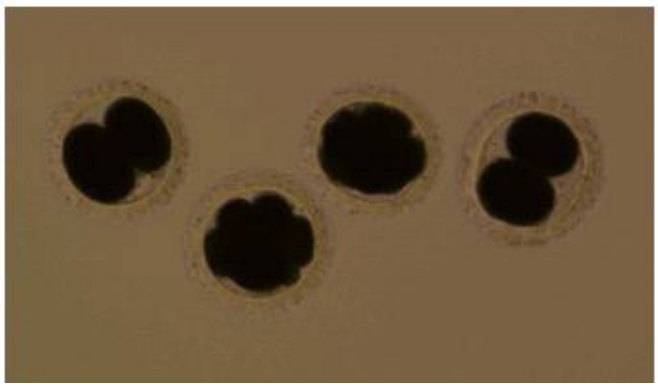


Fig. 9. *In vitro* development of cloned canine embryos derived from fetal fibroblasts treated with 30 μM acteoside for 48 h. Magnification 200 x.

Table 5. Effect of acteoside on developmental ability of canine nuclear transfer embryos.

	No. of embryos	Cleaved (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	>10-cell (%)
Contact inhibition	63	13 (20.6%)	7 (11.1%)	2 (3.2%)	
Acteoside	61	22 (36.1%)	18 (29.5%)	9 (14.8%)	1 (1.6%)

- 체세포의 성질 및 기원에 따라 복제효율의 차이가 있어, 이를 사전에 검증하여 형질전환세포주로 이용하고자 세포주별 복제효율을 조사하였다.
- 임신 30일령의 비글견 태아를 제왕절개 방법으로 회수하여 실험실내 5% CO2, 39℃로 온도가 유지되는 배양기에서 기본 세포 배양용 배지 하에서 배양되었다. 이후 핵이식에 사용하기 위해 3~8번 계대 배양한 체세포를 3~4일 동안 밀집 배양하여 탈핵된 난자에 세포 조작기를 이용, 주입함으로써 핵 이식란을 만들었다.
- 또한 지방유래, 양수유래의 중간엽줄기세포를 확립하여 세포주로 공시하였다.
- 세포주별로 핵이식 후 배발달율을 조사한 결과 태아유래의 세포주가 54%의 분할율을 나타내었으며, 16세포기까지 분화되었다 (Fig. 10).
- 하지만 지방유래 및 양수유래의 중간엽줄기세포주는 세포-난자 융합율이 각각 23%와 29%로 낮은 분할율을 나타내었다.

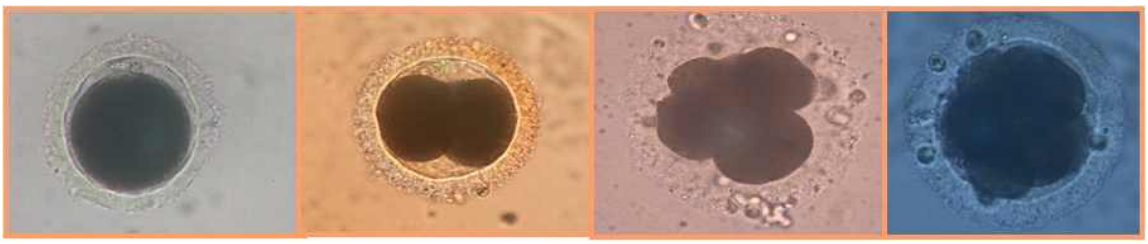


Fig. 10. 세포복제 후 16세포기까지 분할된 복제배아

- 위의 결과에 따라 태아세포주를 이용하여 canine DJ-1 형질전환 세포주를 작성하여 탈핵난자에 주입하여 배발달율을 조사한 결과 52%의 분할율을 나타내어 형질전환 세포주를 이용하여도 일반세포주와 배발달율에는 큰 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 11).

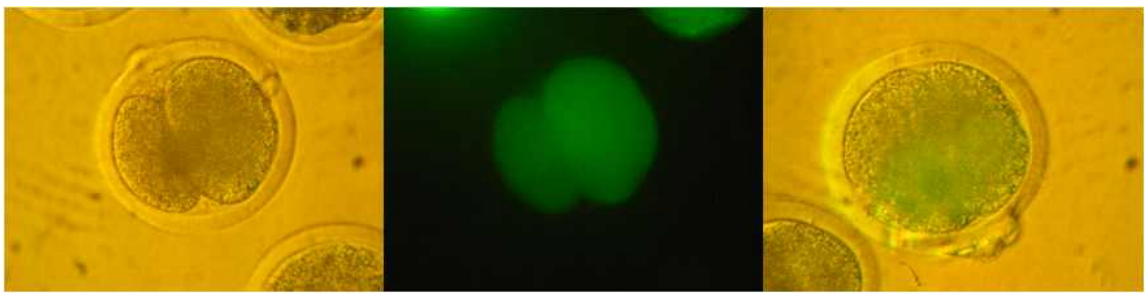


Fig. 11. cDJ-1 GFP 형질전환 세포주를 이용하여 세포복제 후 분할된 배아

(4) 최적의 체세포 복제 핵이식란 작성

- 수술적 방법으로 회수한 체내 성숙난자는 난구세포 제거 후 10% (v/v) FBS 및 5 ug/mL 비즈벤지미드 (bisbenzimide) (Hoechst 33342)와 5 ug/mL 사이토칼라신 B가 보충된 Hepes-buffered TCM-199 배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)로 탈핵하였다. 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫 (내경 150 um)으로 고정하고, 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline) 공간으로 개의 태아로부터 유래한 단일의 섬유아세포를 주입한 후 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM Hepes 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 전극을 사용하여 융합시켰다.

단일 세포-난자 결합체를 미세조작기 (Shutter, USA)에 부착되어 있는 2개의 마주보는 전극 사이에 난자 세포질체 및 핵 공여 세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (I.Works inc., Osaka, Japan)로 전기 자극을 주었다. 70-75V, 15 usec 지속시간으로 2 펄스를 가하며, 전기 자극 30 분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실체현미경 하에서 관찰한다. 융합된 수정란만을 선별하여 기술한 바와 같은 변형 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199 배지 내에서 2시간 동안 배양하며, 재구성된 개 수정란의 화학적 활성은 39℃의 10 uM 칼슘 아이노포어 (calcium ionophore)를 포함하는 난관액 합성배지 (cSOF; 삼투압 및 pH는 각각 270 내지 280 mOsm 및 7.2 내지 7.3.임)에서 배양함으로써 복제수정란의 활성화를 유도하였다. 그 후, 복재된 수정란을 세척한 후 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린 (dimethylaminopurine)이 보충된 cSOF 내에서 4시간 동안 추가로 배양하였다.

- 위의 방법으로 회수한 난자는 결과 총 34두의 난자 제공견으로부터 353개의 난자를 회수하였으며, 이 중 탈핵과 세포주입에 이용할 수 있는 양질의 난자는 292개였다. 세포주입후 전기적 융합을 통해 재구성된 난자는 189개로서 융합율은 64.7%를 나타내었다 (Table 6).

Table 6. Ooctyes collection rate and reconstructed embryos following SCNT

Donor dog	P4 level of ovulation	No. of collected oocytes	Quality	No. of NT oocytes	No. of fused oocytes
1	4.23	12	good	7	7
2	9.05	11	good	10	10
3	5.36	5	good	5	4
4	4.16	12	bad	12	12
5	5.5	16	good	15	12
6	4.2	4	normal	2	2
7	5	9	aging	6	3
8	4.69	10	good	10	8
9	7.35	12	aging	7	3
10	4.55	8	good	8	?
11	5.14	8	good	8	8
12	5.68	12	good	10	8
13	6.31	6	bad	6	3
14	4.13	13	bad	16	9
15	5.23	8	good		
16	7.17	14	good	14	5
17	4.46	9	normal	5	4
18	7.91	13	good	13	9
19	7.45	13	good	21	13
20	9.26	11	aging		
21	8.23	14	aging	13	10
22	5.15	15	immature	13	7
23	8.51	8	bad	8	7
24	9.67	15	aging & good	9	7
25	7.83	11	bad	9	2
26	7.98	2	bad	2	0
27	5.5	7	normal	5	3
28	6.06	18	good	22	11
29	8.07	12	aging		
30	4.47	10	bad	10	7
31	5.08	9	good	11	7
32	7.3	4	aging		
33	5	11	aging	6	3
34	4.83	11	good	9	5
Total		353		292	189(64.7%)

(5) 우수한 복제 배아 생산시스템 구축

- 도축장에서 가져온 소 난소의 난포에서 난포액을 18G 바늘이 달린 10ml 주사기를 뽑은 후 모아진 난자를 수차례 세척한 후, 난구세포가 3층 이상 둘러싸여 있고 세포질이 균일한 난자만을 선발하여 체외성숙시킨다. 이때 페니실린/스트렙토마이신, 10% FBS, FSH, EGF, sodium pyruvate와 cysteine이 첨가된 media-199에서 22-24시간 체외성숙 시킨다. 성숙된 난자는 난구세포 제거 후 10% (v/v) FBS 및 5 ug/mL 비즈벤지미드 (bisbenzimide) (Hoechst 33342)와 5 ug/mL 사이토칼라신 B가 보충된 Hepes-buffered TCM-199 배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)로 탈핵하였다. 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫 (내경 150 um)으로 고정하고, 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline) 공간으로 APP TG 세포를 주입한 후 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM Hepes 및 0.05% (w/v)

BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 전극을 사용하여 융합시켰다. 단일 세포-난자 결합체를 미세조작기 (Shutter, USA)에 부착되어 있는 2개의 마주보는 전극 사이에 난자 세포질체 및 핵 공여 세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (I.Works inc., Osaka, Japan)로 전기 자극을 주었다. 35-37V, 15 usec 지속시간으로 2 펄스를 가하고, 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199 배지 내에서 2시간 동안 배양한다. 재구성된 소-개 복제란의 화학적 활성은 39℃의 10 uM 칼슘 아이노포어 (calcium ionophore)를 포함하는 난관액 합성배지 (mSOF; 삼투압 및 pH는 각각 270 내지 280 mOsm 및 7.2 내지 7.3.임)에서 배양함으로써 복제수정란의 활성화를 유도하였다. 그 후, 복제된 수정란을 세척한 후 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린 (dimethylaminopurine)이 보충된 mSOF 내에서 4시간 동안 추가로 배양하였다.

- Canine APP TG 세포주를 이용하여 탈핵된 소의 난자에 주입하여 재구성한 복제란의 배발달은 Table 2에서와 같이 17.8%의 배반포 형성율을 나타내어 비형질전환세포의 배반포형성율(9.5%)와 비슷한 수준을 나타내어 형질전환 세포가 배발달에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

Table 7. Development of interspecies SCNT embryos reconstructed with bovine oocytes and canine APP TG cell

Cell Type	No. of NT embryos	No. of fused embryos (%)	2-cell (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	16-cell (%)	morula (%)	blastocyst (%)
APP TG	45	32 (71.1)	26 (57.7)	15 (33.3)	11 (24.4)	10 (22.2)	6 (13.3)	4 (8.9)
Non-TG	42	34 (80.9)	24 (57.1)	15 (35.7)	13 (31.0)	11 (26.2)	6 (14.3)	4 (9.5)

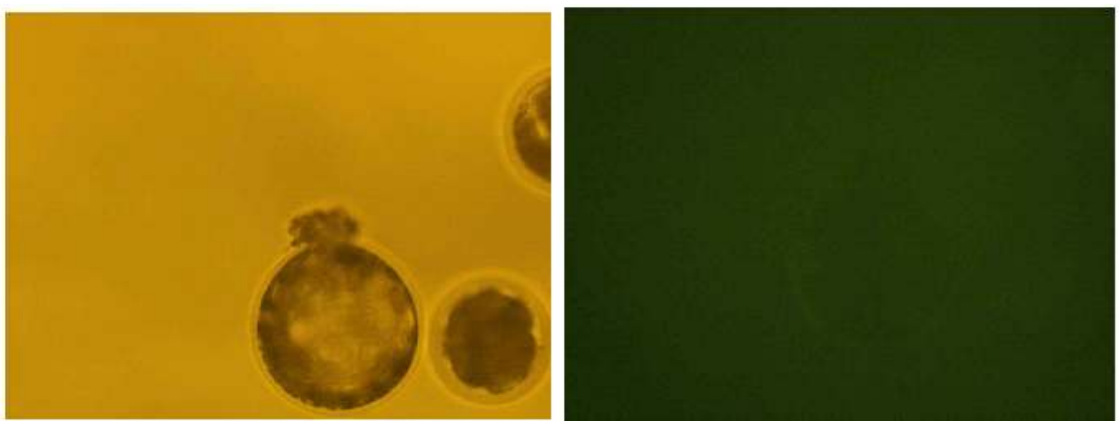


Fig. 12. Blastocyst of interspecies cloned embryo using bovine oocyte and canine APP TG cells

- APP TG 세포주는 소 난자 안에서 정상적인 reprogramming이 가능하며, 이 결과 배반포까지 발달하였다. 그러나 배반포 안에서 GFP 발현은 확인할 수 없었다.
- 발정견으로부터 수술적 방법을 통해 체내 성숙난자를 회수하였다. 위의 방법과 동일한 방법

으로 체세포 복제를 실시하였다. 이때 APP와 hDJ-1 TG 세포를 사용하였으며, 일반 태아섬유아세포를 사용하여 체세포 복제하였을 때와 배발달율을 비교하였다.

Table 8. Embryo development rate with different canine TG cell line

Cell Line	No. of embryos	Cleaved (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	>10-cell (%)
Non-TG cell	61	22 (36.1)	18 (29.5)	9 (14.8)	1 (1.6)
APP TG cell	23	10 (43.5)	3 (13)	1 (4.3)	
hDJ-1 TG cell	57	21 (36.8)	14 (24.6)	11 (19.3)	7 (12.3)

- APP와 hDJ-1 TG 세포주를 이용한 복제배아의 배발달율은 태아섬유아세포를 이용했을 때의 결과와 유사한 것으로 볼 수 있었다. 이는 태아섬유아세포와 같이 두 세포주 모두 정상적인 reprogramming이 가능하다는 것을 증명하였다. 그러나 특이하게 APP TG 세포주보다 hDJ-1 TG 세포주를 사용했을 때 배발달율이 유의적으로 높은 결과를 확인 할 수 있었다.

나. 파킨슨 형질전환 개 생산

(1) DJ-1 형질전환 복제개 생산

- hDJ-1 TG 세포주를 이용하여 체세포 복제한 후, 총 5두의 대리모에 65개의 복제란을 이식하였다. 이식 후 26일째에 초음파 진단을 통하여 임신여부를 확인한 결과 1마리의 대리모에서 임신을 확인하였다.

Table 9. 복제란 이식과 임신율

No. of NT oocytes	No. of Fused oocytes (%)	No. of transferred embryos	No. of recipients	Day-30 Pregnancy (%)	Full term (%)
65	25 (38.5%)	65	5	1 (20%)	1 (20%)

- 7일 간격으로 초음파 진단을 하여 태아의 성장 상태를 관찰하였다. 33일째는 태아의 크기가 35.1mm이고, 40일째는 40.8mm로 성장하였으며 47일째는 척추골격 및 심장 박동을 확인하였다 (Fig. 13). 임신이 끝까지 유지되어 복제견 1마리가 체중 412g으로 태어났다.

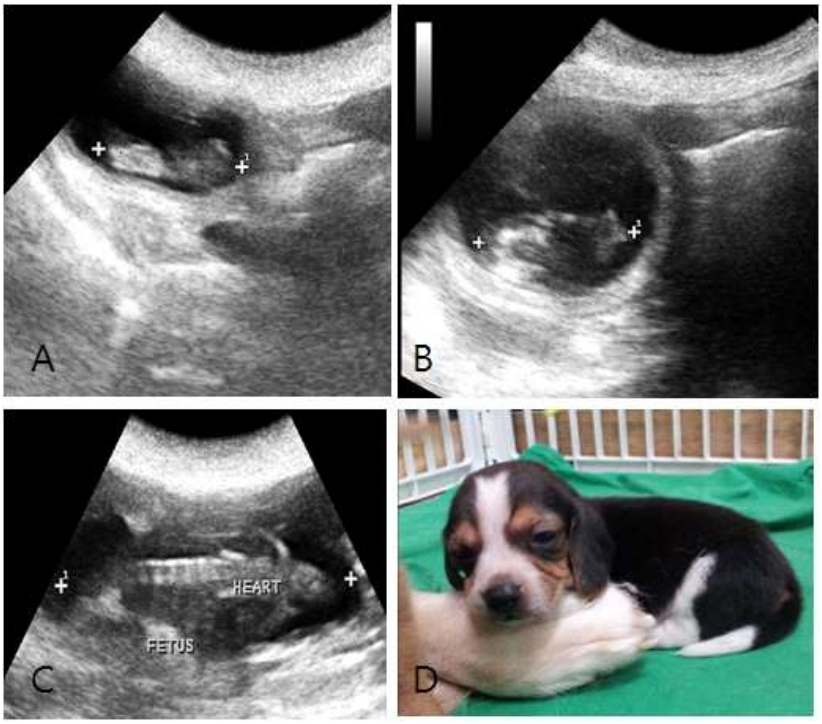


Fig. 13. 태아의 초음파 사진 & 태어난 복제견의 모습

A : 이식 33일째의 초음파 사진, 임신낭 안에 태아 관찰. B : 이식 40일째의 초음파 사진. C : 이식 47일째의 초음파 사진, 태아의 척추와 심장 관찰. D : 태어난 지 3주된 복제견의 모습

- 복제견은 같은 날 태어난 비글견 두 마리와 같이 생활하면서 관찰하였다. 7개월령까지 매일 체중을 측정하여 성장을 모니터링하여 3마리 간의 성장 양상을 비교 평가하였다. 2개월령까지는 일반견 2마리와 복제견의 체중이 비슷하였으나, 그 후로 점차 체중 차이가 벌어지다가 7개월령부터는 약 1kg까지 차이가 나는 양상을 확인하였다.

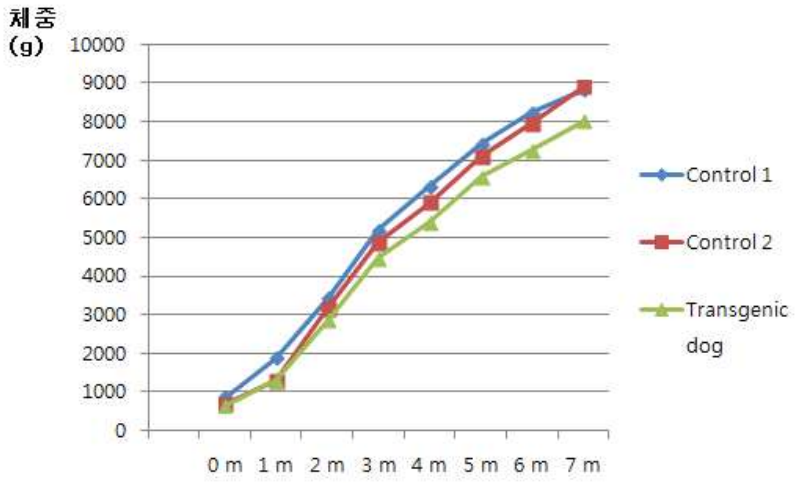


Fig. 14. 형질전환 복제견과 일반견의 성장곡선

(2) DJ-1 형질전환 복제개의 행동학적 분석

- Wendy Volhard' Puppy Aptitude Test를 통한 행동학적 분석 결과, social attraction, following, restraint, social dominance, elevation dominance과 같은 성격을 보여주는 지표에서

는 DJ-1 형질전환 복제견과 일반견의 차이는 나타나지 않았으나 (Fig. 15A), 물체 및 감각에 대한 반응을 보여주는 retrieving, touch sensitivity, sound sensitivity, sight sensitivity, stability 항목에서는 형질전화 복제견과 일반견에 대한 차이를 확인 할 수 있었으며, 특히 DJ-1 형질전환 복제 개에게서 touch, sound, sight sensitivity test 에서 반응에 대한 흥분 및 예민성을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 15B).일반적인 보행 테스트를 통해 실험 한 결과 몸을 지탱하는 힘과 지구력이 일반견에 비해 부족한 것을 알 수 있었다.

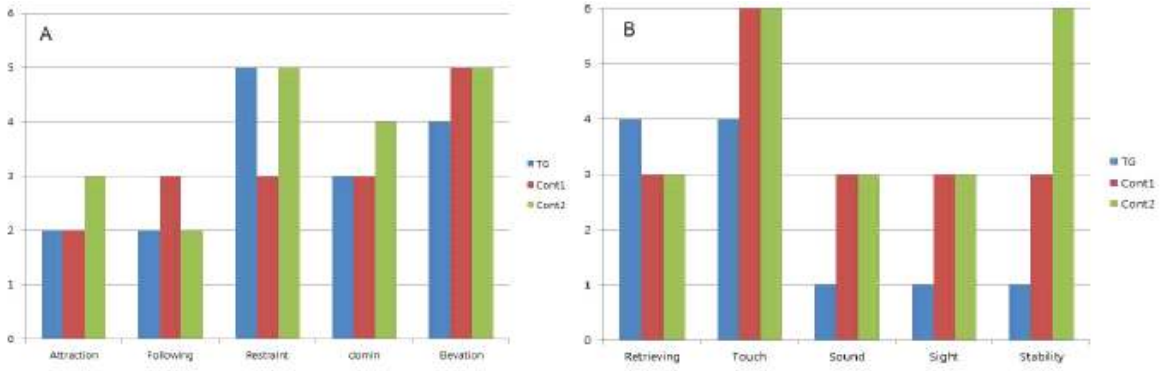


Fig. 15. Scoring of Wendy Volhard' Puppy Aptitude Test.

- 태어난지 7개월째부터 depression(우울)증상이 나타났다. 매우 침울하며 행동이 느리며 뛰거나 점프를 하지 못했으며 밥도 잘 먹지 않고 뒷다리 근육이 떨리는 것이 관찰되었다. 또한 서 있을 때 항상 뒷다리를 구부정하게 딛고 있으며 목 가누는 것을 힘들어 하며 너클링시 원상태로 발을 펴지 못하는 것도 확인하였다.(Fig. 16).

Fig. 16. 구부정한 뒷다리의 모습(좌)과 너클링시 발을 원래대로 펴지 못하는 모습(우)

- 10m 거리에서 먹이를 두고 유인했을 때 일반견은 3초만 달려오는 것을 볼 수 있었으나, 파킨슨 질병개는 17초 걸렸으며 길의 중앙에서 실험을 실시하였음에도 불구하고 벽 쪽으로 이동하여 벽에서 약 10cm정도 떨어져서 벽을 따라 걸어오는 것이 관찰되었다 (Fig. 17).

Fig. 17. 벽을 따라 천천히 걸어오는 DJ-1 형질전환 복제개의 모습

- 이러한 depression 증상이 7일 정도 유지되다가 다시 보통 일반견과 같은 stable한 상태로 돌아왔으며 stable 상태가 15일정도 유지되었다. 그리고 다시 depression 상태가 10일 유지되다가 stable 상태가 11일정도 유지되기를 반복하고 있다. 1년이 지난 지금도 불규칙적으로 depression과 stable 상태가 유지되고 있다.

(3) 태어난 DJ-1 형질전환 복제개의 후대생산

- DJ-1 형질전환 복제개가 성성숙이 완료된 후 정액을 채취하여 암컷 비글견에 수술적으로 인공수정을 실시하였다. 60일 이후 자연분만을 통해 2마리가 태어났다. 이후로 5마리 더 인공수정을 실시하여 초음파 검사로 임신을 확인하였다.

Fig. 18. DJ-1 형질전환 복제개의 2세들

다. 알츠하이머 형질전환 개 생산

- APP TG 세포주를 이용하여 체세포 복제한 후, 총 3두의 대리모에 개의 복제란을 이식한 결과 1마리가 임신에 성공하였다. 이식 35일 째 총 3개의 태아가 보이며 임신낭의 크기는 50mm이며, 이식 47일째는 척추과 두개골을 볼 수 있었으며, 심장박동도 확인할 수 있었다. 이 대리모의 분만예정일은 8월 11일이다.

Table 10. 복제란 이식과 임신율

No. of NT oocytes	No. of Fused oocytes (%)	No. of transferred embryos	No. of recipients	Day-30 Pregnancy (%)
47	18 (38.3%)	47	3	1 (33.3%)

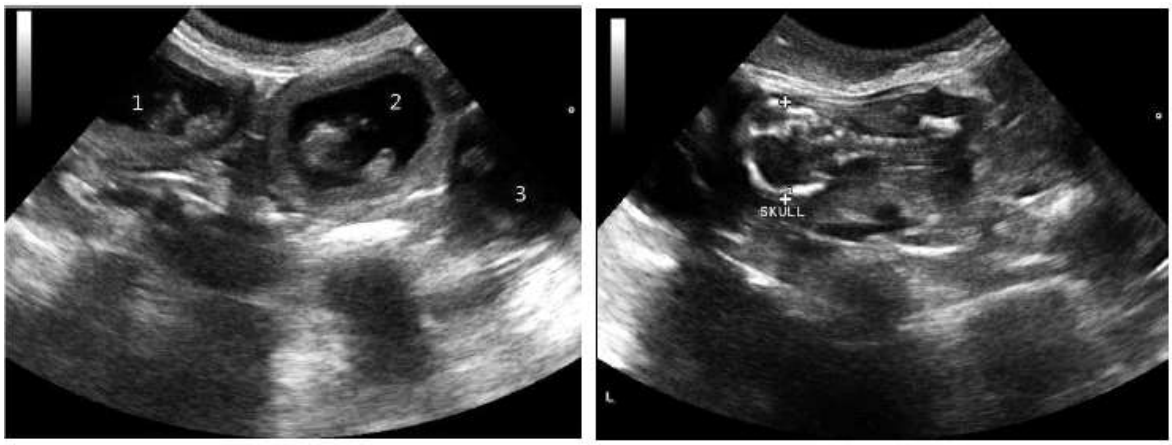


Fig. 19. APP 형질전환 복제개의 초음파 사진.
좌:임신 35일령, 우:임신 47일령

2. 제 1협동 : 질환모델 유용유전자 탐색 및 유전자 적중기술 개발

▷ 과제 책임자 : 한국과학기술원 생명과학과 박찬규

사람의 DJ-1 유사체인 선충의 DJR-1.2는 새로운 glyoxalase라는 것을 본 연구진이 최근 밝혔으며, 실제로 glyoxals (glyoxal과 methylglyoxal)의 독성으로부터 선충을 보호한다는 것을 보고하였다. 또한 우리는 선충의 다우어 (Dauer) 상태일 때와 더불어 starvation일 때 DJR-1.2의 단백질 발현 증가를 관찰할 수 있었다. 이 현상 역시 선충의 다우어 (Dauer) 상태에서 glyoxals에 관한 glyoxalase 활성을 높여주었으며, glyoxal로 인한 독성으로부터 선충을 보호해주었다. 이러한 DJR-1.2의 단백질 발현 증가는 DAF-16이라는 transcriptional regulator에 의해 조절된다는 것을 확인하였다. 또한 SCNT (Somatic cell nuclear transfer)를 이용하여 만든 사람 DJ-1 과발현 형질전환 개가 복제되었다는 사실을 genotyping과 mitochondria sequencing을 통해 밝혔으며 형질전환 개에서 사람의 DJ-1 단백질이 정상적으로 발현되고 있음을 관찰할 수 있었다.

(1) 개의 유전자 지도 분석과 뇌질환 관련 유전자 genomic DNA 확보

- 파킨슨병은 가장 빈번하게 나타나는 신경 퇴행성의 비정상적인 움직임을 나타내는 질환으로 연령에 의존적(age-dependent)이다. 특징적인 행동은 휴식시에 떨림(resting tremor), 근육의 강직성, 행동이 느려지는 서동증(bradykinesia)과 운동 불능증(akinesia)이 나타난다. 파킨슨병

환자의 병리학적인 특징은 도파민 신경의 점차적으로 손실을 보이는 것이다. 현재까지 early-onset 파킨슨병을 유발하는 유전자로는 적어도 여섯 개정도의 유전자가 이 질병과 관련되며 그 중에서 상염색체 우성 돌연변이와 관련된 유전자는 alpha-synuclein, uchL1, LRRK2이고 상염색체 열성 변이와 관련된 유전자는 Parkin, PINK1, DJ-1로 알려져 있다. Parkin은 파킨슨병 환자의 50%정도에서 돌연변이가 발견될 정도로 중요한 유전자이고, DJ-1은 초기에 발병하는 파킨슨병의 1%에서 돌연변이가 발견되고 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 상쇄시키는 중요한 기능을 한다. 또한 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) 유전자는 잠정적인 세린/쓰레오닌 kinase로 파킨슨환자의 8-15%정도에서 변이가 발견된다. PINK1유전자가 DJ-1과 상호작용하며 미토콘드리아의 기능장애와 관련 된다는 보고가 있다. 파킨슨병의 발병 원인과 메카니즘 네트웍을 밝히기 위해서, 본 연구진은 관련 유전자들을 탐색하였다 (Table 11).

Table 11. 파킨슨병 관련 유용유전자 탐색

Locus	Protein	Human	Dog
Park 1/4	A-synuclein	4q21	*
Park 2	Parkin	6q25	Chr 1
Park 5	Ubiquitin C terminal hydrolase L1 (uchl1)	4p14	*
Park 6	PINK1	1p35-37	Chr 2
Park 7	DJ1	1p38	Chr 5
Park 8	LRRK2	12 cent	*

- Database를 활용하여 탐색해 본 결과 개에서는 상염색체 열성 변이와 관련된 유전자들에 관하여 확인할 수 있었다. Pakin은 chromosome 1번 (52,931,268~54,245,604), Pink1은 chromosome 2번 (81,170,891~81,187,985), DJ-1은 chromosome 5번 (64,576,104~64,590,535) 에 위치하고 있었으며 개의 염색체 지도를 분석한 것을 바탕으로 하여 Bacterial artificial chromosome (BAC)로부터 해당 유전자 중 DJ-1 염기 배열을 확보할 수 있었다.

(2) 개와 사람간의 DJ-1 단백질 배열 비교

- DJ-1 family 단백질들은 사람, 대장균, 효모등 이종 간의 구조적 유사성이 매우 높은 것으로 알려져 있다 (Ying Wei 2007). 사람의 경우 8개의 alpha-helix와 11개의 beta-sheet로 이루어져 있고 이합체(dimer)로 존재한다 (Tao X, Tong L. 2003). 현재까지 DJ-1은 oncogene (Nagakubo, D 1997), antioxidant 기능 (Taira, T 2004), chaperone (Shendelman, S 2004), neuronal protection (Menzies, F 2005), protease (Chen, J 2010) 등 여러 가지 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있으나 정확한 기능은 아직 불분명하다. 본 연구진은 실험진행에 앞서 개와 사람의 DJ-1 단백질 배열 비교를 통해 이들이 얼마나 유사한지 알아보았다.

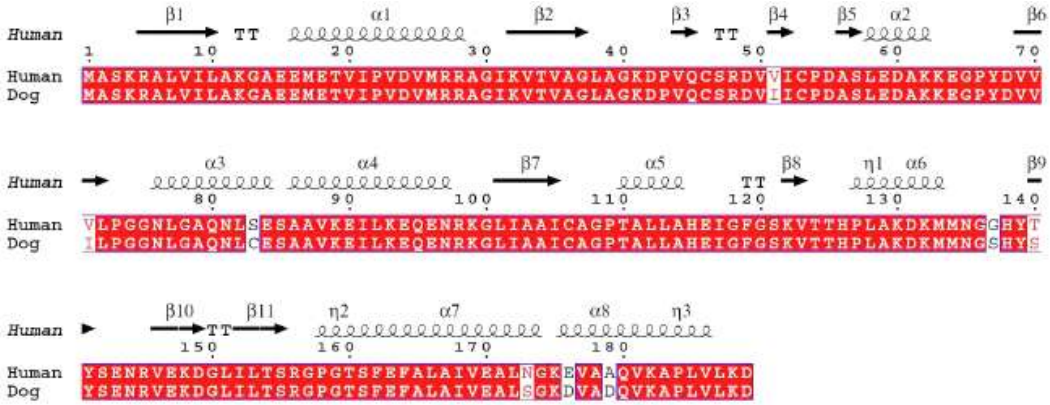


Fig. 20. 개와 사람의 DJ-1 단백질 배열 비교

- Database에서 개와 사람의 DJ-1 단백질 배열을 얻은 후 ClustalW와 ESPript 2.2 프로그램을 이용하여 단백질 배열 유사성을 분석하였다. 그 결과 95%이상이 아미노산 배열에 있어서 동일하다는 결과를 얻었으며, 3차 구조 예측에 따르면 효소활성 부위가 보존되어 기능적으로도 유사할 것으로 추측된다 (Fig. 20).

(3) 형질전환 개 생산을 위한 벡터 시스템 구축

- 레트로바이러스 감염을 통한 Red fluorescent protein(RFP)이 발현되는 형질전환 개가 보고된 바 있다. 이는 개의 배아섬유아세포에 체세포 핵 치환 기술과 전기충격을 이용하여 만들어진 것이다 (Hong, S.G. 2009). 그 결과 뇌, 척수, 고환, 심장, 폐, 신장, 간, 위 등 많은 기관에서 RFP가 발현되는 것이 확인되었다.

Fig. 21. 개와 사람 DJ-1이 클로닝된 레트로바이러스 벡터의 구축

- 결과에 바탕하여 형질전환 개를 만들기 위해 DJ-1 유전자를 가진 레트로바이러스를 구축하였다. pMSCV(murine stem cell virus)-puro 벡터를 이용하였는데 이 벡터는 mscv 프로모터에 의해 조절되며, long terminal repeat (LTR), virus packaging signal (Ψ^+), puromycin 저항 유전자를 포함하고 있다. 이 벡터와 PCR을 이용하여 개와 사람의 DJ-1 유전자를 PCR로 증폭시킨 후 제한효소인 XhoI과 EcoRI으로 잘라 클로닝하였다 (Fig. 21).

(4) 개 DJ-1 유전자 적중 벡터 제작

- 유전자 적중 방법은 생체 내에서 유전자의 기능을 이해하는데 응용되고 있다. 유전자 결손 생쥐는 1989년 개발된 이래 수 많은 유전자의 기능을 밝히는데 기여를 하였다. 유전자 적중 방법을 이용한 유전자 결손 생쥐는 사람과 관련된 유전 질병 연구에서 없어서는 안 될 중요한 실험 방법으로 이용되고 있다.

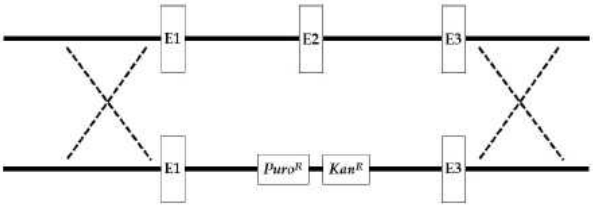


Fig. 22. 개의 DJ-1 유전자 적중을 위한 접근 방법

- 본 연구에서는 유전자 결손 생쥐를 생산할 때 쓰이는 homologous recombination을 이용하여 DJ-1 단백질의 시작코돈이 있는 Exon 2를 제거하려 한다 (Fig). 적중 벡터에는 전기 충격 방법으로 도입될 세포주와 대장균에서의 positive selection을 위해 kamamycin과 puromycin 내성 유전자를 클로닝하였다. 아울러 Exon 2을 기준으로 하여 왼쪽과 오른쪽 DNA 염기 배열을 각각 5 kb 정도 삽입하였다 (Fig. 23).

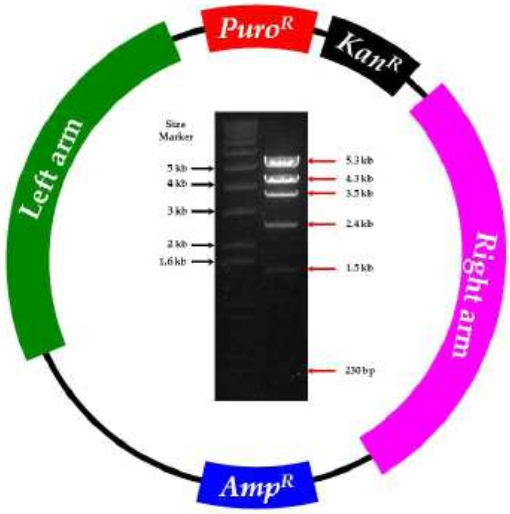


Fig. 23. DJ-1 유전자 적중 벡터 구축

- 목적하는 클론이 제대로 만들어졌음을 확인하기 위하여 DNA 염기 배열 결정과 제한효소(EcoRI, NotI, SalI)를 이용한 맵핑을 시도하였다. 정확한 DNA 염기 배열이 삽입되어있다는 것과 잘려진 DNA 단편 크기도 역시 예상과 일치하는 것으로 나타남으로 보아 클론이 제대로 만들어졌음을 확인하였다.

(5) 개의 배아섬유아세포(canine fetal fibroblast)에 레트로바이러스 감염 확인

- 형질전환 개 생산을 위해 만들어진 레트로바이러스 벡터에 개와 사람의 DJ-1을 클로닝하여, 이를 적정 세포주에 트랜스펙션(transfection)시킨 후 레트로바이러스를 생산하였다. 레트로바이러스를 개의 배아섬유아세포에 감염시켰으며, 감염 정도를 알아보기 위해 GFP가 클로닝된 레트로바이러스를 대조군으로 이용하였다(Fig. 24A, B). 이로 부터 감염 효율성을 알아보기 위해 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 실험을 수행하였다 (Fig. 24C). 그 결과 97% 이상이 바이러스를 가지고 있음을 알 수 있었다. 아울러 개와 사람의 DJ-1이 개의 배아 섬유아세포에서 단백질을 발현시키는지를 알아보기 위해 웨스턴 블랏(Western blot)을 수행한 결

과, 개 (cDJ-1)의 경우는 endogenous하게 발현된 cDJ-1의 양에 육박하는 발현양을 보였고 사람의 hDJ-1은 개의 것보다 크기가 증가되었음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 24D).

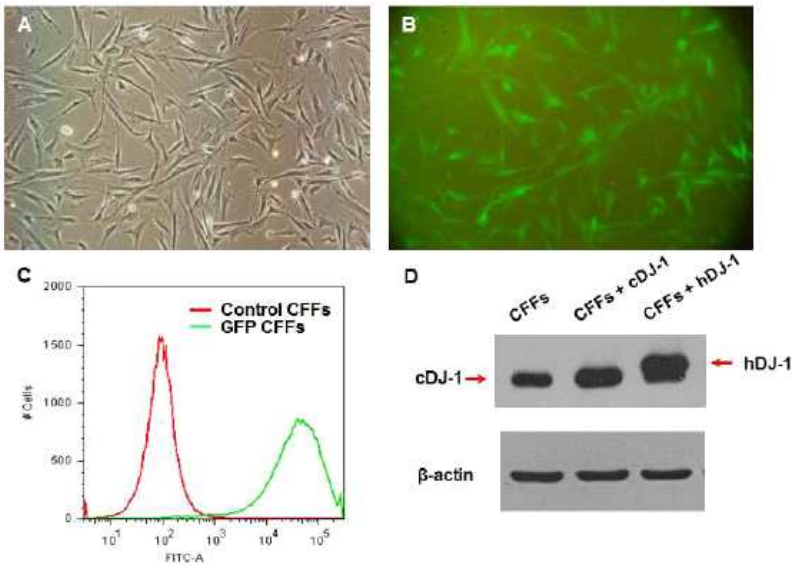


Fig. 24. 개의 배아섬유아세포에 대한 레트로바이러스의 감염 효율성과 DJ-1 단백질의 발현정도 확인

(6) 사람의 DJ-1과 유사체들(homologs)은 새로운 glyoxalase이다.

- 대장균의 glyoxalase Ⅲ는 비록 효소 촉매 활성 부위에 여분의 도매인을 가지고 있지만 DJ-1 수퍼패밀리 단백질들과의 유사성을 가지고 있다. 그리고 사람, 생쥐, 선충의 DJ-1은 대장균의 그것과 다소 진화적으로 멀지만 촉매 활성에 필요한 잔기(residue)인 histidine, cysteine, glutamate가 활성 부위에서 발견된다(Fig. AB). 비록 대장균의 DJ-1과 사람, 생쥐, 선충 DJ-1은 예측된 세 개의 촉매 잔기를 가지고 있지만 이들은 단백질 서열상엔 보존되어 있지 않다. 오히려, 히스티딘에서 나타나는 위치상의 차이는 각각의 계통에 따라 독립적으로 진화한 것으로 보인다. 대장균의 DJ-1 효소 활성 실험을 바탕으로 하여 본 연구진은 사람(hDJ-1), 생쥐(mDJ-1), 선충(cDJR-1.1, 1.2)에서도 같은 glyoxalase Ⅲ 활성이 나타나는지를 알아보았다. 정제된 DJ-1 단백질은 DNPH assay를 통해 효소 활성과 촉매 반응을 위한 조건을 측정하는데 사용되었다. 실험결과 모든 효소는 전형적인 Michaelis-Menten kinetics을 보여주었다(Table 12, Fig. 25BD). DJ-1 유사체들은 glyoxal에 비해 methylglyoxal에 대해 조금 더 높은 친화도를 보였고, 반면 활성도(specific activity)는 methylglyoxal보다는 glyoxal에 대해 더 높았다.

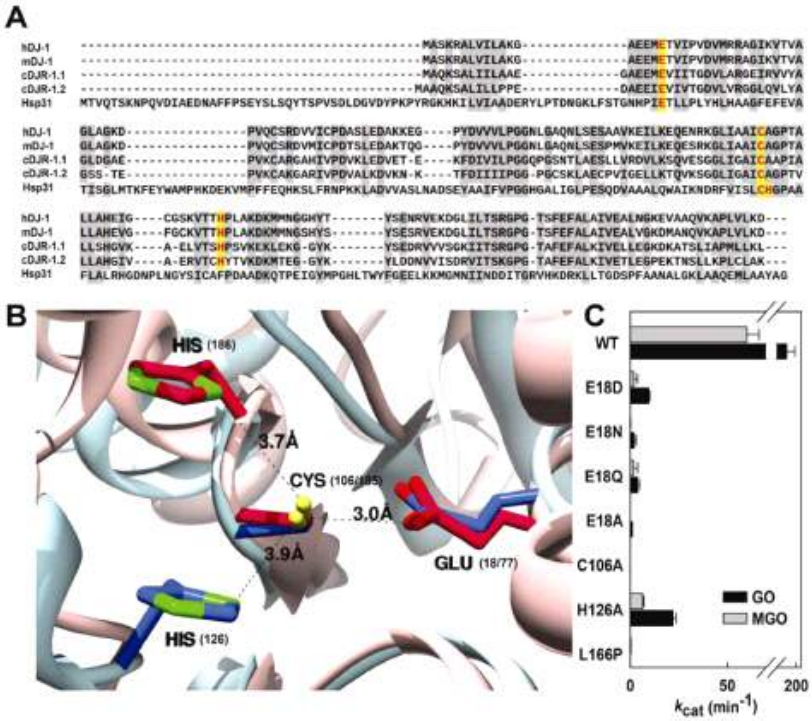


Fig. 25. 사람의 DJ-1과 그 유사체들의 단백질 서열과 구조 비교 및 효소 활성

Table 12. 정제된 DJ-1의 효소 활성

Type	Methylglyoxal			Glyoxal		
	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($min^{-1}M^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($min^{-1}M^{-1}$)
hDJ-1	0.60	72.38	$1.21x10^5$	1.39	199.3	$1.43x10^5$
mDJ-1	0.84	53.8	$0.64x10^5$	1.48	184.0	$1.24x10^5$
cDJR-1.1	0.30	13.8	$0.46x10^4$	3.61	356.4	$0.99x10^5$
cDJR-1.2	0.39	60.0	$1.53x10^5$	0.78	146.4	$1.88x10^5$

- Methylglyoxal 및 glyoxal에 대한 glyoxalase 효소활성을 통해 각각 생성되는 lactic acid 및 glycolic acid의 반응 산물들은 1H-NMR 및 HPLC를 통해 확인되었다(Fig. 26AC). Acetaldehyde, acrolein, glyceraldehyde, 2, 3-butanedione, 및 2-carboxybenzaldehyde와 같은 다양한 종류의 알데히드를 기질로서 테스트하였으나, 정제한 단백질들은 이들을 기질로 사용하지 않았다.

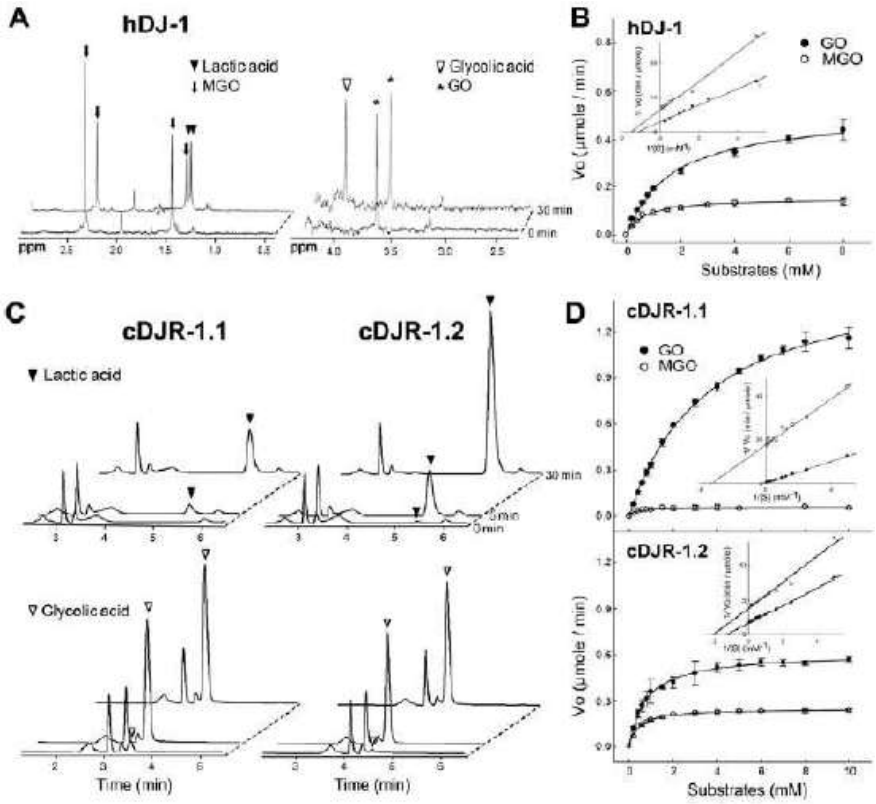


Fig. 26. Glyoxalase로서 DJ-1 유사체들의 반응 산물과 Michaelis-Menten kinetics

- 사람, 생쥐, 선충의 효소 촉매 부위는 대장균의 것과 유사한 구조를 가지고 있어 그 잔기들에 변이를 도입하여 같은 역할을 하는지 알아보았다. 사람의 DJ-1 단백질을 가지고 E18A, E18D, E18N, E18Q, C106A, H126A mutants를 만들었고 각각의 mutant 단백질들을 정제하고 효소 활성 실험을 수행하였다 (Fig. 25C). 그 결과, 대장균의 효소 활성 실험처럼 cysteine과 glutamate의 mutants는 효소 활성을 완전히 잃은 반면 histidine의 mutant는 대략 10%정도 남아있었다. Familial Parkinsonism에서 발견되는 L166P mutant는 앞서 확인한 cysteine과 glutamate mutants와 마찬가지로 glyoxalase 활성이 없었다.
- 실험에서 이 결과를 토대로 하여 새로운 glyoxalase가 co-factor와 무관하게 나타나는지 알아보기 위해 선충의 DJ-1이 각각 결손된 mutants와 둘 다 결손된 mutant를, 생쥐에서는 wild-type과 DJ-1이 결손된 것을 사용하였다. wild-type N2 선충으로부터 djr-1.1 및/또는 djr-1.2 유전자를 제거한 경우 glyoxalase 활성이 소멸되었으며 (cDJR-1.1 결손에 의해 GO에 대한 효소활성의 약 70%가 감소되었으며, cDJR-1.2의 결손에 의해 약 30%의 활성이 감소됨), djr-1.1 또는 djr-1.2 형질전환 선충에서는 glyoxalase 활성이 다시 복구되었다. cDJR1.1의 C106S mutant 역시 효소적 활성을 전혀 보이지 않았다(Table 13). 정상 및 mDJ-1 결손 생쥐에 대해서도 동일한 결과를 얻었다. Table 에서 보이는 바와 같이, DJ-1 결손 생쥐의 활성은 glyoxal을 glycolic acid로 전환하는 활성을 보이지 않았다.

Table 13. 생쥐와 선충에서의 glyoxalase 활성

Genotype	Activity [a] (unit/μg protein)
M. musculus C57B/6	
WT brain	8.82 ± 0.99
mDJ-1 $^{-/-}$ brain	n.d
C. elegans N2	
WT	7.23 ± 0.26
djr-1.1	2.23 ± 0.34*
djr-1.2	5.28 ± 0.35
djr-1.1;1.2	n.d
djr-1.1;1.2 + $P_{djr\text{-}1.1}$::*djr-1.1*::*gfp*	4.92 ± 0.29
djr-1.1;1.2+ $P_{djr\text{-}1.1}$::*djr-1.1(C106S)*::*gfp*	n.d
djr-1.1;1.2 + $P_{djr\text{-}1.2}$::*gfp*::*djr-1.2*	3.10 ± 0.92

(7) 선충의 cDJR1.1와 cDJR1.2의 조직내 분포

- 포유동물은 단일의 DJ-1 유사체를 갖지만, 선충의 경우 2가지의 isoform을 갖는다. 종전의 연구결과에 의하면 DJ-1 단백질은 모든 종류의 조직 어디에나 분포하는 것으로 알려져 있다. 선충에서 DJ-1 유사체의 기능을 확인하기 위해, djr-1.1 또는 djr-1.2의 프로모터 부위에 연결된 GFP 융합 컨스트럭트(Pdjr-1.1::djr-1.1::gfp 및 Pdjr-1.2::gfp::djr-1.2)를 갖는 형질전환 선충에서 발현의 국제화(localization)를 알아보았다.

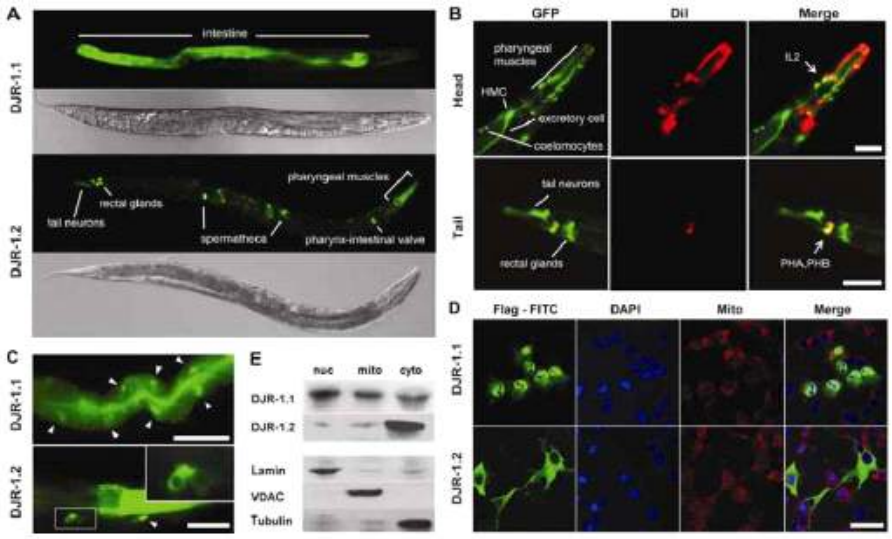


Fig. 27. 선충의 cDJR1.1와 cDJR1.2의 조직에서의 단백질 발현 패턴

- cDJR-1.1::GFP의 발현은 오직 장(intestine)에서만 검출된 반면, GFP::cDJR-1.2은 인두근(pharyngeal muscles), 인두-장 밸브(pharynx-intestinal valve), 복신경색(ventral nerve cord),

정낭(spermatheca), 직장샘(rectal gland), 두부 뉴런의 내부순(inner labial, IL) 세포, 꼬리부 뉴런의 PHA/PHB 화학센서 뉴런 및 선충의 전체 단계를 통해 지지 쉬스/소켓 세포을 포함하는 다양한 세포에서 발현되었다 (Fig. 27A). 5일령의 성체기에서는 HMC(head-mesodermal cells), 배설관(excretory canals) 및 체강소체(coelomocytes)에서 cDJR-1.2이 추가적으로 발현되었다 (Fig. 27B). cDJR-1.1 및 cDJR-1.2의 주요 발현 부위는 서로 중복되지 않았으며, 이러한 현상은 유충기 전체 및 선충의 성체기를 통해 매우 일정하게 유지되었다. cDJR의 세포내 위치를 조사하였을 때, cDJR-1.1는 장 세포(intestinal cells)의 핵과 세포질 모두에서 발견되었으나, cDJR-1.2는 두부 뉴런의 세포질에서만 검출되었다(Fig. 27C). 이러한 cDJRs의 발현 국재화 패턴은 Flag-태깅된 cDJRs으로 형질전환된 COS-7 세포들의 것과 일치하였으며, FITC와 컨쥬게이트된 항-Flag 항혈청으로 수행한 면역염색과 세포 분획에 의해서도 확인되었다 (Fig. 27DE). cDJR-1.1은 전체 세포를 통해 모든 부분에서 발현되고 특히 핵에서 발현이 높게 나타난 반면, cDJR-1.2은 세포질에서만 발현되었는데, 이러한 사실은 EGFP-cDJR에 의해 추가적으로 확인되었다(Fig. 28).

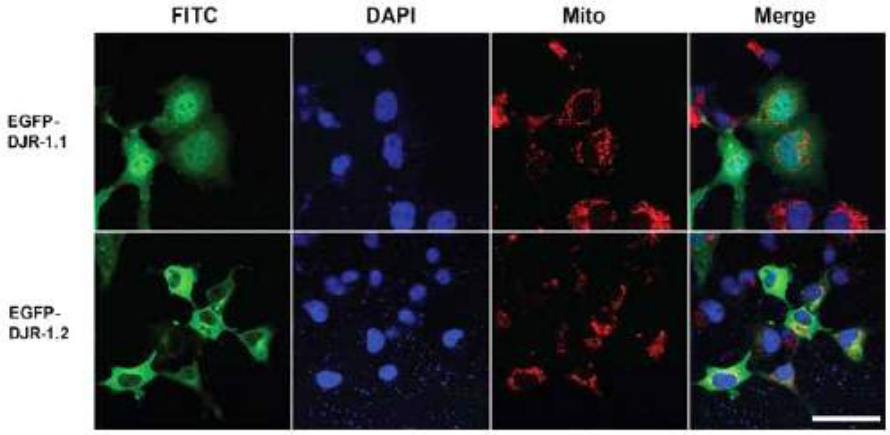


Fig. 28. EGFP-cDJRs의 세포내 국재화(localization)

(8) Glyoxal에 의한 치사로부터 세포와 선충을 보호해주는 DJ-1의 역할 규명

- DJ-1 결손 생쥐로부터 생쥐배아섬유아세포(MEFs, mouse embryonic fibroblast cells)을 제조하고, MEF에서의 mDJ-1의 발현이 매우 낮기 때문에 바이러스 프로모터에 의해 사람의 hDJ-1을 안정적으로 발현시키는 MEF 유도세포주를 제조하였다. hDJ-1의 wild type과 촉매부위 변이형을 갖는 hDJ-1 결손 MEF에 대해 glyoxal을 처리한 경우, wild-type hDJ-1을 가진 세포는 결손 및 촉매 부위 변이형의 세포와 비교하여, glyoxal로부터 보호되어 세포 생존능이 크게 향상 (63%)되는 것을 관찰하였다 (Fig. 29A).

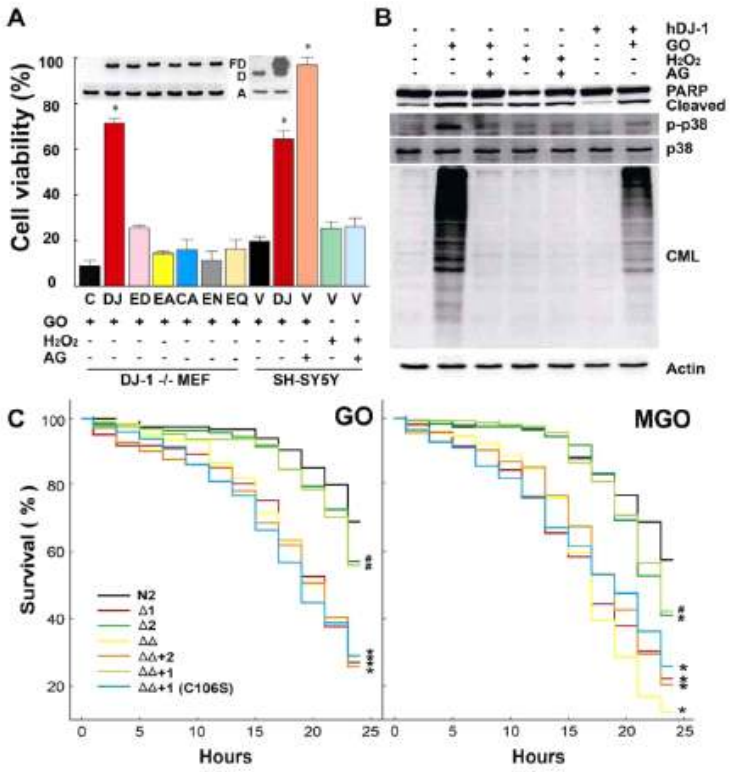


Fig. 29. Glyoxal에 의해 유도된 세포치사에 대한 DJ-1의 역할

- 이와 같은 glyoxal에 대한 세포보호 작용은 인간 도파민성 뉴런 세포(SH-SY5Y)에서, 벡터 대조군에 비해 안정적으로 발현되는 hDJ-1에서도 관찰되었다. SH-SY5Y 세포에서 추가적인 hDJ-1이 존재하는 경우 glyoxal에 대한 보호작용이 증가하였으며, 세포 생존율이 45% 이상으로 증가하였다. α-oxoaldehyde는 뉴런세포에서 세포사(apoptosis)를 유도하는 것으로 알려져 있으므로, DJ-1이 glyoxal에 의해 유도되는 세포사(apoptosis)로부터 세포를 보호하는지에 대해 조사하였다. Fig. B에서 보인 바와 같이, DJ-1이 많은 세포와 비교하여, DJ-1이 적은 세포에서, PARP-1의 절단이 증가하고, p38의 인산화가 증가되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과들은 glyoxal로부터의 DJ-1에 의한 세포보호 작용은 아마도 glyoxal의 세포내 수준을 낮추어 세포사 유도 신호를 감소시킨 것에 의한 것으로 생각된다. 또한 glyoxal에 의한 세포사는 당화된 (glycated) 단백질인 카르복실메틸라이신 (CML) 의 축적으로 이어지는데, 이는 glyoxal과 반응하는 화합물인 아미노구아니딘(AG)의 첨가로 사라진다. 반면에, 과산화수소 (hydrogen peroxide)에 의한 인간 도파민성 뉴런 세포(SH-SY5Y)의 세포사는 아미노구아니딘(AG)에 의해 보호되지 않았으며, 카르복실메틸라이신(CML)의 축적과도 연관되지 않았는데, 이는 glyoxal에 의한 죽음이 활성산소종(ROS)는 무관하다는 것을 의미한다. 실제로 세포내에서의 ROS 양을 측정하는데 사용되는 CM-H2DCFDA를 이용하여 glyoxal과 과산화수소에 의해 생성되는 ROS를 측정해보았다 (Fig. 30).

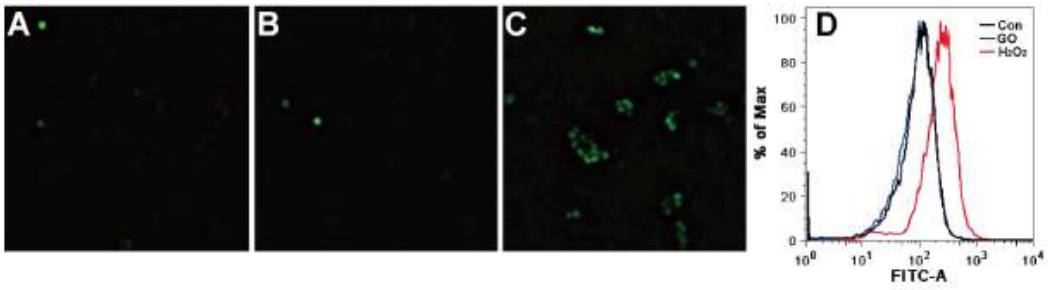


Fig. 31. 형광현미경과 FACS를 이용한 ROS 측정

- 과산화수소에 의해서만 ROS가 증가할 뿐, glyoxal에 의해서는 변화가 없었다. DJ-1이 glyoxal로부터 세포를 보호하는 작용에 대해서는 선충에서 glyoxal 또는 methylglyoxal을 선충에 처리한 후 생존능을 분석하여 평가하였다 (Fig. 30CD). cDJR-1.1 mutant는 wild-type의 것에 비해 생존능이 크게 감소된 반면, cDJR-1.2 muatant에서는 glyoxal의 영향이 약간 감소되었는데, 이러한 결과는 cDJR-1.1이 알데히드 화합물로부터 선충을 보호하는데 있어서 주요한 작용자임을 암시하는 것이다. cDJR-1.1의 중요성은 cDJR-1.1, 1.2 중복 mutant에서 cDJR-1.1 만이 효소활성을 복구하며 wild type 수준과 근접한 수준으로 글리옥살(GO)에 대한 보호작용을 할 수 있다는 사실에 의해서도 확인되었다. cDJR-1.1의 촉매활성 부위 mutant(C106S)는 글리옥살(GO)에 의해 유도되는 사멸의 관점에서 중복 mutant의 표현형을 복구(rescue)시키지 못하였는데, 이는 선충에서 glyoxalase 자체 활성이 또한 중요하다는 것을 암시하는 것이다. 반면에, GFP::cDJR-1.2의 형질전환 발현은 세포 보호 작용을 크게 증가시키지 못하였는데, 이는 cDJR-1.2와 비교하여 cDJR-1.1의 존재 위치와 양으로 볼때 cDJR-1.1이 glyoxal detoxification에 주요한 역할을 한다는 것을 암시한다. Wild type으로부터 djr-1.1 또는 djr-1.2 유전자를 제거한 경우, 이들의 수명에 영향이 없었는데(17 내지 18 일), glyoxalase I을 제거하면 수명이 감소한다고 보고되었기 때문에, 이와 같은 사실은 cDJRs이 제1의 glyoxal의 제거자로서 작용하지 않을 수도 있다는 것을 암시한다. 오히려, cDJRs은 glyoxal의 세포내 변화에 반응하는 다른 조절자 역할을 할 수 있을 가능성이 있다.

(9) 선충의 DJ-1s는 glyoxal에 의해 유도되는 뉴런 퇴화를 완화시킨다.

- DJ-1은 파킨슨병을 일으키는 화합물로부터 뉴런을 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 선충에서 4개의 두부 뉴런(cephalic neurons, CEPs), 2개의 앞쪽 목돌기 뉴런(anterior deirid neurons, ADEs) 및 2개의 뒤쪽 목돌기 뉴런(posterior deirid neurons, PDEs)을 포함하여 8개의 도파민성 뉴런이 존재한다. 도파민성 뉴런에 작용하는 신경독소물질 6-OHDA(6-hydroxydopamine)은 CEP 뉴런에 대해 높은 민감도를 가지면서 이들 뉴런의 퇴화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 뉴런은 수포화(blebbing), 세포체 원형화(cell body rounding) 및 종국적으로 세포체 소실(cell body loss)과 같은 형태적 변화를 보인다. 선충을 glyoxal 또는 methylglyoxal로 처리하였을 때, CEP 뉴런이 농도 의존적 방식으로 퇴화되는 것을 관찰하였다 (Fig. 32).

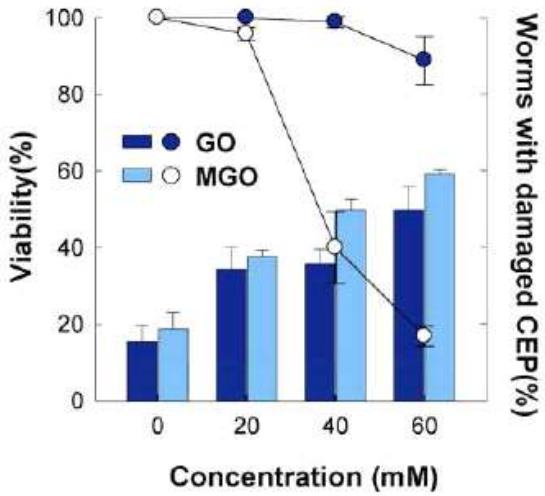


Fig. 32. 선충과 도파민 뉴런에 대한 glyoxals의 독성

- 도파민성 뉴런의 특징적 소실은 수포화(blebbing) 및 세포체 소실(cell body loss)의 점진적인 변화를 보여주는 Pdat-1::mCherry 형질전환 선충에서 모니터링하였다 (Fig. 33A). 50 mM glyoxal 또는 20 mM methylglyoxal로 wild type 및 mutant로부터 유충 단계의 선충을 얻어 처리한 경우, wild type과 비교하여 djr-1.2 및 *djr-1.1;djr-1.2* 변이주에서 CEP가 현저하게 소실(20% 이상)되었다 (Fig. 33B). GFP::cDJR-1.2 형질전환 선충은 뉴런의 생존을 wild type 수준으로 복구시켰다. CEP 도파민성 뉴런을 보호하는 작용에 있어서 cDJR-1.1의 역할이 무시할만한 수준이었기 때문에, *djr-1.1;djr-1.2* mutant 선충에서의 *djr-1.1* 복구 컨스트럭트에 대한 glyoxal 효과는 테스트하지 않았다. glyoxal이 없는 동일한 조건에서, cDJR-1.1/1.2이 결실된 mutant는 wild type과 비교하여 CEP 생존능에서 어떠한 차이도 보여주지 않았다. 아치사량 농도의 glyoxal에 대해서 관찰되는 CEP 뉴런의 소실은 이 화합물에 대해 뉴런이 민감하다는 것을 암시하는데, 이는 무독화 활성을 보이는 cDJR-1.2에 의해 보호될 수 있다. Djr-1.2이 다른 뉴런을 보호하는지 여부를 테스트하기 위해, 먼저, 인두의 앞부분에서 위치하는 12개의 화학센서 뉴런중 2개 뉴런인 ASH 및 ADL 뉴런을 시각화하는데 사용되는 Psrb-6::mCherry를 가진 형질전환 균주를 제조하였다. 이러한 뉴런에 글리옥살을 처리하면 수지상체 수포화(dendrite blebbing) 및 세포체 소실(cell body loss)의 점진적 변화가 생기는데 (Fig. 33C), 이는 glyoxal의 신경독성이 도파민성 뉴런에만 특이적이지 않다는 것을 암시한다. 그러나, cDJR-1.2는 glyoxal 처리에 대해 이들 뉴런을 보호하지 못하였는데 (Fig. 33D), 이는 cDJR-1.2의 뉴런 보호 활성이 모든 타입의 뉴런에 대해 효과를 나타내는 것이 아니고, 오히려 도파민성 뉴런에 특이적이라는 것을 암시한다.

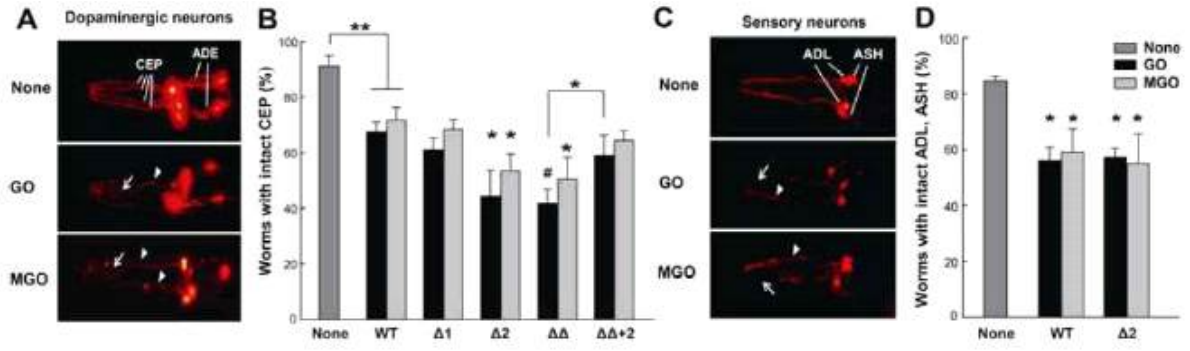


Fig. 33. Glyoxal에 의해 유도되는 뉴런 퇴화를 완화시키는 선충의 DJ-1들

(10) 생쥐을 이용한 파킨슨병 유도물질의 탐색

- 본 연구팀에서는 DJ-1과 구조적으로 유사한 단백질들의 구조와 기능을 연구해 왔다. 그 일환으로 DJ-1의 삼차 구조를 결정한 바 있고, 이에 근거하여 그 기능을 유추하고 있다. 우리는 아직 그 역할과 기능이 명확히 알려져 있지 않은 대장균의 유사 유전자 산물이 산화 스트레스와 관련된 대사산물에 활성을 보인다는 사실을 확인하였고 이 단백질의 기능을 규명하였으며, 아울러 이 단백질과 구조적으로 유사한 단백질들에 대해 사전 연구 결과를 얻었다. 위의 사전 연구결과를 바탕으로 본 연구팀은 DJ-1결손 생쥐에서 산화 스트레스와 생체 내에 스트레스를 줄 수 있는 대사물질의 변화를 예측하고 있다. 생쥐의 조직샘플로부터 대사물질의 양을 HPLC를 통해 측정함으로써 DJ-1의 결손으로 야기되는 대사물질의 변화를 관찰하고, 이 결과에 근거하여 파킨슨병을 유도하는 물질적 근거를 찾고자 하였다. 파킨슨병의 병리학적인 특징은 흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta)의 도파민 신경세포가 손실되는 것이다. 생쥐 뇌 조직 절편에서 면역조직화학법을 통한 TH (tyrosine hydroxylase) 양성뉴런의 변화를 측정함으로 도파민 신경세포의 퇴행여부를 검증하였다.

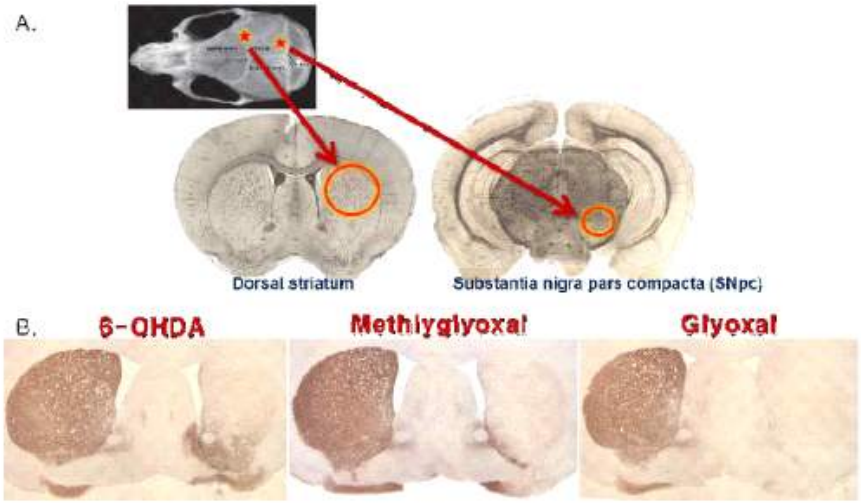


Fig. 34. 생쥐를 이용한 substantia nigra pars compacta 부위의 면역조직화학법

- Glyoxal 화합물을 뇌정위 수술을 통하여 투여함으로써 파킨슨병에서 특징적으로 죽어가는 nigro-striatal 도파민 신경세포의 손상을 일으켜 파킨슨 병 모델을 만들었다. 생쥐의 우측 striatum 또는 우측 SNpc에 기존에 파킨슨병 유도물질로 알려진 6-hydroxydopamine (6-OHDA)와 함께 methylglyoxal과 glyoxal을 주입함으로써 우측 nigro-striatal 도파민 신경세

포의 degeneration이 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 34AB). 도파민 뉴런의 마커로 사용되는 tyrosine hydroxylase antibody를 사용하여 immunohistochemistry를 수행함으로써 도파민 뉴런이 손실된 것을 확인하였다. 기존의 뇌정위 수술 법을 통해 주사하여 unilateral 파킨슨 병의 모델(뇌의 좌 우반구중 한쪽만 손상 시킨 모델, 몸 양쪽의 운동성 차이를 보는 행동실험을 할 수 있다는 장점이 있다)을 만드는 것으로 잘 알려진 물질인 6-Hydroxydopamine(6-OHDA)에서와 마찬가지로 methylglyoxal과 glyoxal에서도 좌측 striatum과 비교해 볼 때 injection을 한 우측striatum의 도파민 뉴런의 퇴화를 입증하였다.

(11) 파킨슨병 유도 모델 생쥐에서의 운동성 이상 유무 확인

- 파킨슨병의 특징적인 증상은 휴식시에 떨림(resting tremor), 근육의 강직성, 행동이 느려지는 서동증(bradykinesia)과 운동불능증(akinesia)과 같은 운동 이상이다. 따라서 파킨슨병 모델 동물에서도 행동실험을 통해 운동 이상이 나타나는 것을 확인할 필요가 있다. 본 연구진은 당대사 유전자인 fucose mutarotase가 결핍된 생쥐 변이체의 제조 및 행동 분석연구를 수행 한 바 있어 행동실험을 볼 수 있는 방법을 갖추고 있다. 따라서 파킨슨병 유도 모델 생쥐에서 도파민 신경세포의 손상이 생쥐의 운동성까지 영향을 미치는지 확인하기 위해 행동실험을 수행하였다. 걸음걸이 분석을 위해 CatWalk method(automated gait analysis system)를 사용하였다 (Fig. 35). 생쥐가 좁은 통로를 지나가도록 한 뒤, 유리판에 찍힌 발자국의 넓이와 intensity, 찍히는 시간 간격 등이 측정, 분석하였다. Control에 비해 파킨슨 모델에서 발이 찍힌 넓이와 발걸음을 옮기는 속도가 줄어든 것을 확인 하였고, 특히 우측 nigrostriatal pathway의 손상으로 인해 쥐의 좌측 발의 운동성이 더욱 떨어진 것을 확인하였다.

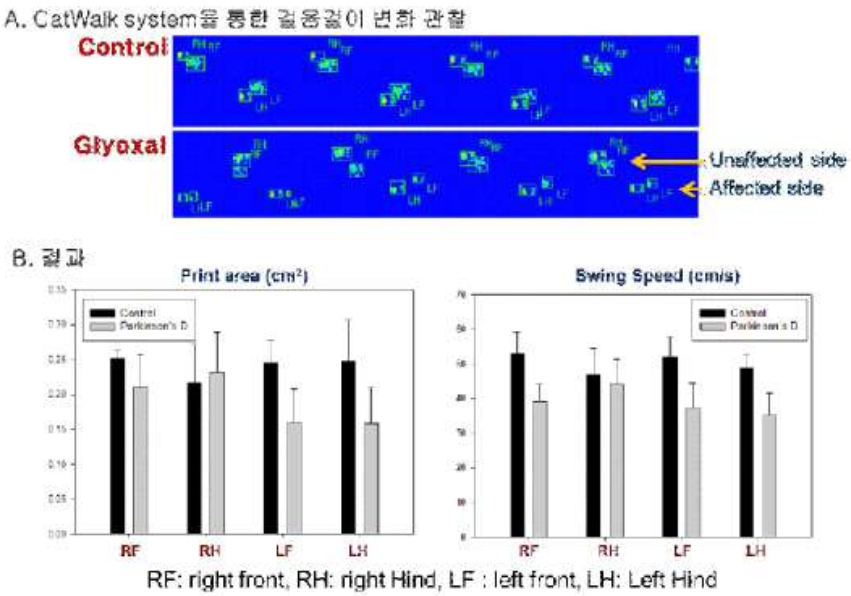


Fig. 35. 파킨슨병 모델 생쥐에서 관찰된 운동성변화

(12) 선충을 이용한 파킨슨병 치료 물질 탐색

- 본 연구진은 앞서 생쥐에서 확인된 파킨슨병 유도 물질인 methylglyoxal과 glyoxal 의 효과를 줄이는 물질들을 탐색하기 위해 선충을 이용하였다.

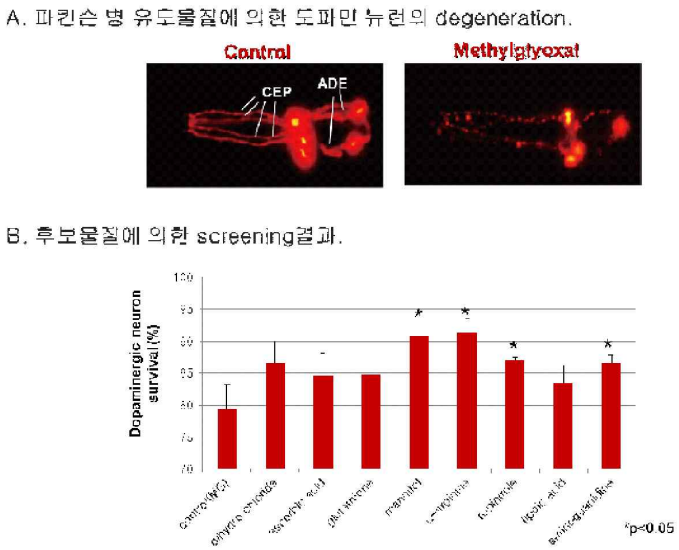


Fig. 36. 선충을 이용한 파킨슨병 모델 구축과 치료물질 탐색

- 여기에 사용된 선충는 도파민 뉴런이 형광현미경 하에 보일 수 있도록 red fluorescence protein을 도파민 뉴런에 발현시킨 것이다. 이 선충에 glyoxal을 처리하게 되면 도파민 뉴런인 CEP 뉴런과 ADE 뉴런이 퇴화되는 것이 보인다 (Fig. 36A). 이 시스템을 바탕으로, 파킨슨병의 치료제나 항산화제의 성분으로 알려진 신약 후보물질들을 선충에 처리한 후, 후보 물질들을 선충에게 처리하여 후보물질들 중 선충의 도파민 뉴런 퇴화를 방지해 줄 수 있는 것들을 탐색하였다. 그 결과 항산화 기능을 하는 것으로 알려진 mannitol, L-arginine, aminoguanidine과 파킨슨 치료제 성분으로 알려진 ropinirole이 가장 효과적으로 선충의 뉴런을 보호하는 것으로 확인되었다 (Fig. 36B).

(13) One step inactivation 방법을 이용한 유전자 적중 벡터 개발

- One step inactivation 방법은 Barry L. Wanner와 Kirill A. Datsenko에 의해 개발되었다. 이 방법은 PCR primers에 타겟 유전자와 일치하는 염기서열을 넣어 제작하고 필요한 항생제 유전자의 염기서열을 PCR한다. 이렇게 얻어진 PCR product는 대장균안으로 형질 변환된다. 이후 타겟 유전자와 염기서열이 같은 부분을 가진 PCR product는 대장균의 타겟 유전자와 유전자 재조합을 이루게 되며, 결국 타겟 유전자는 기능을 잃게 된다. 이러한 방법을 이용하여 본 연구진은 보다 쉽게 높은 효율로 개의 DJ-1 유전자 적중 벡터를 제작하려고 한다.
- 이 방법은 기존에 시도되던 유전자 적중 벡터 제작 방법에 있어서, homologous recombination을 이용한다는 점에서는 같다. 하지만 homologous recombination이 일어나기 위하여 가능한 한 긴 타겟 유전자의 염기서열을 클로닝할 필요가 없기 때문에 손쉽게 유전자 적중벡터의 개발이 가능하게 된다. 방법은 아래의 모식도에 설명하였다 (Fig. 37).

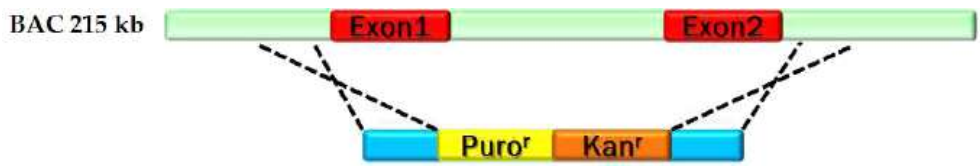


Fig. 37. One step inactivation 방법을 이용한 개의 DJ-1 유전자 적중 벡터 제작

- 위의 모식도와 같이 개의 Bacterial artificial chromosome (BAC)을 유전자 적중 벡터로 사용한다. PCR products를 대장균 내에 형질 변환하여 homologous recombination이 일어나게 된다. 항생제를 기준으로 하여 양쪽으로 각각 100 kb 이상의 염기 서열이 클로닝된 효과를 얻을 수 있기 때문에 고효율의 homologous recombination 빈도를 가지게 될 것이며, 개의 배아 섬유아세포(canine fetal fibroblast)를 이용하여 보다 손쉽게 만들 수 있을 것이다.

(14) Zinc Finger Nuclease 기술을 이용한 개의 DJ-1 유전자 결손 세포주의 확립

- Zinc Finger Nuclease 기술은 2005년 Fyodor D. Urnov와 Michael C. Holmes 등에 의해 개발되었다. 이 기술은 *Fok*I (Fig.)이라는 제한효소가 특정 DNA의 염기 서열을 인지하고 절단하는 염기 서열이 다른 Type IIs 제한효소의 그룹에 포함된다는 점에 착안하여 만들어지게 되었다. 따라서 *Fok*I의 DNA binding domain을 유전공학적으로 변형시킨 것을 Zinc Finger nuclease (ZFN)라 한다. 따라서 우리가 원하는 개의 DJ-1 염기서열에 맞게 ZFN을 만들어줌으로써 유전자 결손 세포주의 확립이 가능하게 된다 (Fig. 38).

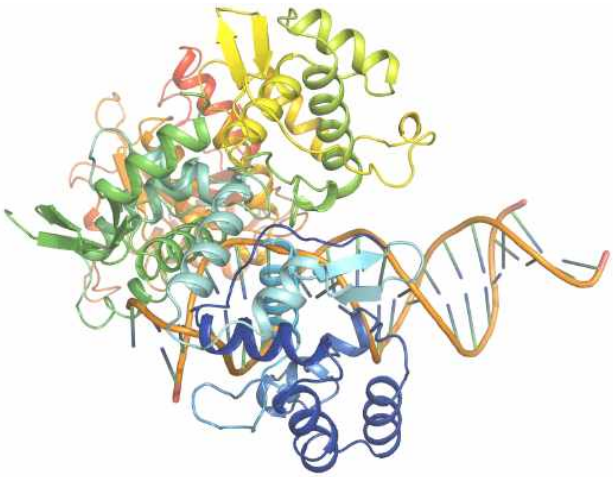


Fig. 38. *FokI*의 구조 (PDB : 1FOK)

Fig. 39. Zinc Finger Nuclease를 이용한 유전자 결손 방법

- ZFN을 이용한 기술은 이미 널리 이용되고 있다. Rats, Rabbits, Zebrafish 등 많은 실험동물에서 이미 수행되고 있으며, 만들어진 동물모델도 있다. 이 방법은 유전자 적중 벡터의 필요성을 배제한, ZFN의 제작만으로 유전자 결손 실험동물들을 만들 수 있기에 획기적이다.

(15) 다우어 (Dauer) 상태에서 선충의 DJR-1.2 단백질 발현 증가

- 선충의 파킨슨병 관련유전자인 *djr-1.1*과 *djr-1.2*에 GFP를 붙인 후 각각의 프로모터를 이용

하여 단백질을 발현시켰다. DJR-1.2 단백질 발현 패턴을 보면 평소 인두근 (pharyngeal muscle), 인두-장 밸브(pharynx-intestinal valve), 정낭(spermatheca), 직장샘(rectal gland), 두부 뉴런의 내부순(inner labial, IL) 세포, 꼬리부 뉴런의 PHA/PHB 화학센서 뉴런 등 다양한 세포에서 발현되고 있음을 확인하였다.

- 하지만 선충이 다우어 (Dauer) 상태로 들어갈 때는 DJR-1.2 단백질 발현이 선충의 몸 전체에서 상당량이 발현되고 있음을 확인할 수 있었지만 DJR-1.1 단백질을 과발현시켰을 때에는 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 40AB). 그리고 특이한 점은 DJR-1.2가 다우어 (Dauer) 상태일 때 먹이를 주게 되면 정상적인 상태로 다시 돌아오는 것을 확인할 수 있었다.

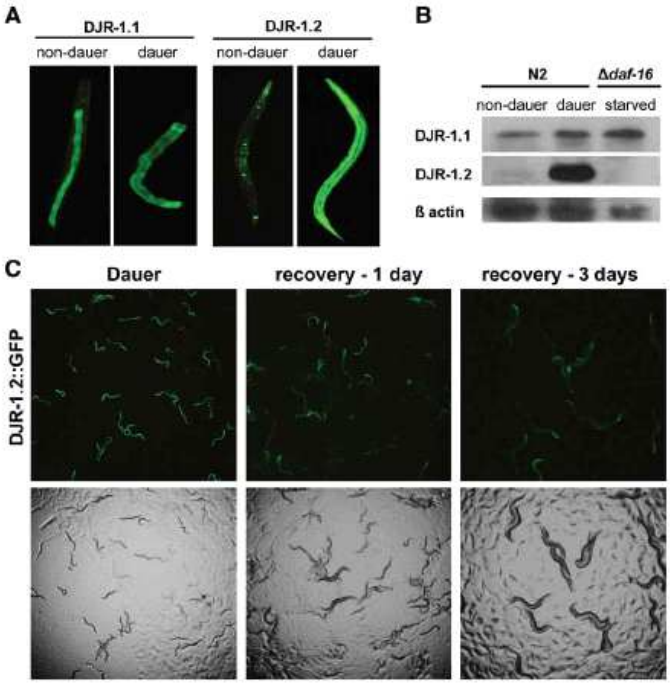


Fig. 40. 선충의 다우어 (Dauer) 상태일 때의 DJR-1.2 단백질 발현 증가

(16) 선충의 다우어 (Dauer) 상태에서 glyoxalase의 활성 및 치사율 비교

- 선충의 다우어 (Dauer) 상태에서 DJR-1.2 단백질이 과발현됨을 확인함에 따라 본 연구진은 그 증가된 단백질이 glyoxalase 활성을 전체적으로 높여주는지 조사하기 위해 glyoxals (glyoxal과 methylglyoxal)에 대한 효소활성 실험을 수행하였다.

- 일반적인 상태에서의 N2 (wild type)와 *djr-1.1* 결손 선충에서의 다우어 (Dauer) 샘플은 다른 샘플들보다는 glyoxal (GO)과 methylglyoxal (MGO)에 대해 효소적 활성이 높다는 것을 확인할 수 있었지만 *djr-1.2* 결손 선충과 *djr-1.1*과 *djr-1.2*가 동시에 결손된 선충의 다우어 (Dauer) 샘플들에서는 이러한 증가를 확인할 수 없었다 (Fig. 41A). 이러한 glyoxalase의 효소적 활성 증가는 DJR-1.2 단백질의 발현 증가 때문 임을 나타낸다.

- 그렇다면 실제로 다우어 (Dauer) 상태에서 DJR-1.2 단백질의 발현 증가가 GO의 독성으로부터 선충을 보호해주는지를 알아보기 위해 선충의 치사율을 비교해보았다 (Fig. 41B). *djr-1.1*과 *djr-1.2*가 각각 결손된 선충은 Wild type보다 그 치사율은 낮았지만, *djr-1.2*만 결손된 선충이 *djr-1.1*이 결손된 선충보다 그 치사율이 낮음을 관찰할 수 있었으며, *djr-1.1*과 *djr-1.2*가 동시에 결손된 선충에 *djr-1.2*를 보충한 선충에서 그 치사율 역시 줄어듬을 확인할 수 있었다.

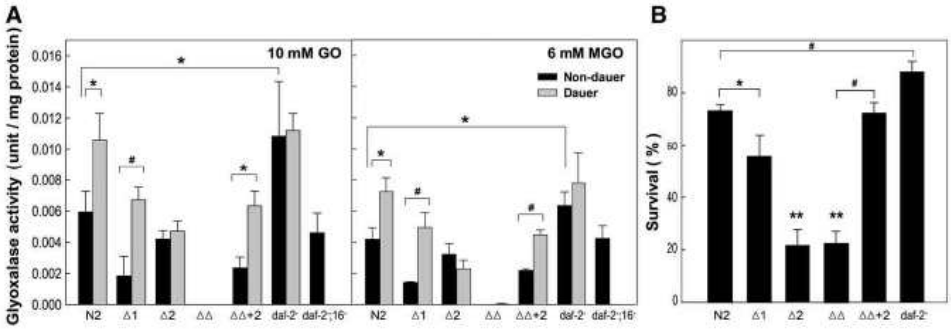


Fig. 41. 다우어 (Dauer)에서의 glyoxalase 활성 및 치사율 비교

(17) Starvation으로 인한 DJR-1.2의 발현 증가는 DAF-16에 의해 조절된다.

- DJR-1.2 단백질의 발현 증가가 다우어 (Dauer) 형성 유전자들과 관련있는지 알아보기 위해 wild type과 *daf-16*이 결손된 선충을 이용하였다. 이 선충들에 *djr-1.2*의 프로모터 (promoter) 하에 GFP가 조절을 받는 벡터를 넣어 형질전환 선충을 만들었고, GFP의 발현 패턴을 관찰하였다. *daf-16*이 결손된 선충은 다우어 (Dauer)를 형성하지 않기 때문에 본 연구진은 다우어 유도 조건인 starvation 상태에서 확인하였다.
- 예상대로 starvation 후에는 wild type에서 GFP의 발현 증가를 관찰할 수 있었지만 *daf-16*이 결손된 선충에서는 아무런 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 42A). 마찬가지로 real-time PCR을 통해 *djr-1.2* mRNA를 측정해보았지만 *daf-16*이 결손된 선충에서는 그 증가를 관찰할 수 없었다 (Fig, 42B). 따라서 이 결과들을 통해 DJR-1.2는 starvation과 다우어일 때 DAF-16에 의해 단백질의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

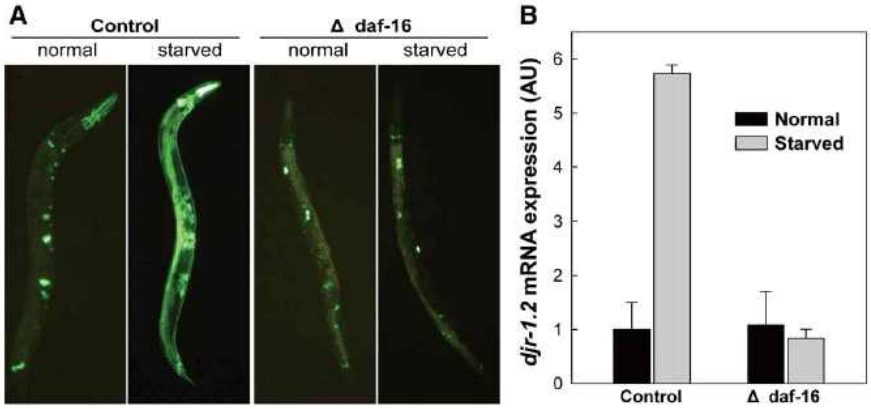


Fig. 42. DAF-16에 의해 조절되는 DJR-1.2 단백질의 발현

(18) 형질전환 복제 개의 확인

- 생산된 형질전환 모델 개가 핵공여개와 유전적으로 일치하는지를 확인하기 위해 형질전환 개의 탯줄, 난자제공견의 피, 대리모의 피, 핵공여개의 체세포에서 genomic DNA를 추출하여 총 8개 (FH2054, FH2010, FH2079, PEZ12, PEZ01, PEZ03, PEZ06, PEZ08)의 canine specific microsatellite markers에 의한 genotyping과 cytochrome c oxidase subunit II (CO II), cytochrome b, 16S rRNA, D-loop region의 primers를 제작하여 마이토콘드리아 DNA의 sequencing을 수행하였다.
- 먼저 Table 14.에서 볼 수 있듯이 형질전환 모델 개와 핵공여개는 microsatellite 패턴이 모

든 locus들에서 일치한다는 것을 알 수 있었다. 이와는 다르게 난자제공견과 대리모와는 서로 다른 microsatellite 패턴을 보였다.

- 형질전환 모델 개가 복제된 것이라면, 마이토콘드리아 DNA는 난자제공견의 마이토콘드리아 DNA와 일치하여야 한다. 이러한 목적으로 개 마이토콘드리아의 cytochrome c oxidase subunit II (CO II), cytochrome b, 16S rRNA, D-loop region을 sequencing하여 비교분석하였다 (Table 15).

- 분석결과 파킨슨병 형질전환 모델 개와 난자제공견의 마이토콘드리아 DNA는 일치하였으며, 핵공여견과 대리모와는 다르다는 결론을 얻을 수 있었고, 파킨슨병 형질전환 모델 개는 SCNT를 통해 복제된 개라는 결론을 내릴 수 있었다.

Table 14. Canine-specific microsatellites 패턴의 분석

Canine markers	Transgenic Dog		Nuclear donor		Surrogate		Oocyte donor	
	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2
FH2054	151	155	151	155	151		151	176
FH2010	231		231		235		227	231
PEZ12	273		273		269	293	289	301
PEZ01	115	123	115	123	115	119	115	123
PEZ03	120		120		120		120	
PEZ06	180	184	180	184	184	192	172	192
PEZ08	232	240	232	240	228	236	236	240
FH2079	280	288	280	288	272	276	276	

Table 15. 마이토콘드리아 DNA의 염기 서열 비교

	Nucleotide positions[a]						
	CO II	Cytochrome B		D-loop region			
	7145	14329	14383	15652	15665	15814	16025
Transgenic Dog	G	A	C	A	C	T	T
Nuclear donor	A	G	T	G	T	T	T
Oocyte donor	G	A	C	A	C	T	T
Surrogate	G	G	T	G	T	C	T

[a] GeneBank accession number : U96639

(19) 형질전환 모델 개에서 hDJ-1 단백질의 발현 확인

- 본 연구진은 파킨슨병 형질전환 모델 개가 복제된 것이라는 것을 증명하였고, 이에 따라 사람 DJ-1이 과발현되고 있는지를 판단하기 위해 immunoblotting을 수행하였다. Immunoblotting을 위해 개 양막세포에서 hDJ-1 형질전환 모델 개와 대조군의 단백질을 각각 추출하였고 이들 샘플은 RIPA buffer (20 mM Tris - HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM Na3VO4, 50mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail)를 이용하여 lysis를 시켰다. 얻어진 cell lysates는 SDS-PAGE를 이용하여 분리시켰고, nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 5% skim milk로 blocking을 하였고 Flag, Actin, DJ-1 antibody는 4℃에서 overnight incubation하였다. 세 번 세척한 후, horseradish peroxidase conjugated secondary antibody를 이용하여 incubation하였고 LAS-4000(FUJIFILM)으로 하였다. 개 양막세포에서 hDJ-1 형질전환 모델 개와 대조군의 단백

질을 각각 추출하였고, 이를 Flag antibody와 DJ-1 antibody를 사용하여 조사하였다.
- 대조군에는 발현되지 않는 hDJ-1이 형질질환 모델 개에서는 정상적으로 발현됨을 확인하였다 (Fig. 43).

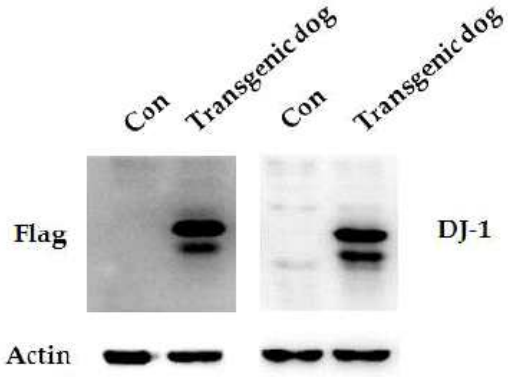


Fig. 43. 양막세포에서 hDJ-1 단백질의 발현 확인

(20) Inverse PCR을 이용한 hDJ-1의 mapping

- hDJ-1이 개의 chromosome 상에 integration된 곳을 결정하기 위해 inverse PCR을 수행하였다. IN_hDJ-1_F (ctgagaatcgtgtggaaaaagacggcc)와 IN_hDJ-1_R (gatgaccagagctcttttggaagccat) primer를 가지고 PCR을 수행하였다. Genomic DNA를 BamHI으로 자른 후 이를 T4 ligase를 이용하여 self ligation 하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 95℃ 5 min (1 cycle), 95℃ 30 sec, 61.4℃ 40 sec, 72℃ 6 min (35 cycles), 72℃ 10 min (1 cycle). lane 1, 2는 control로 사용한 샘플이며 lane 3은 형질전환 개다. Control에서는 PCR products가 나오지 않았지만 형질전환 개에서는 3 ~ 4 kb에서의 PCR products를 관찰할 수 있었다 (Fig. 44A). 이 PCR products를 가지고 다시 IN_hDJ-1_F (ctgagaatcgtgtggaaaaagacggcc), IN_LTR_R IN_LTR_R (gcccatattctgctgtctctctgttcc) primer를 이용해 second PCR을 수행하였고 1 ~ 2 kb에서 PCR products를 얻을 수 있었다 (Fig. 44B).
- 이를 sequencing 해본 결과, 최종적으로 flag tagged hDJ-1은 chromosome 9번에 integration 되어음을 알았다 (Fig. 44C).

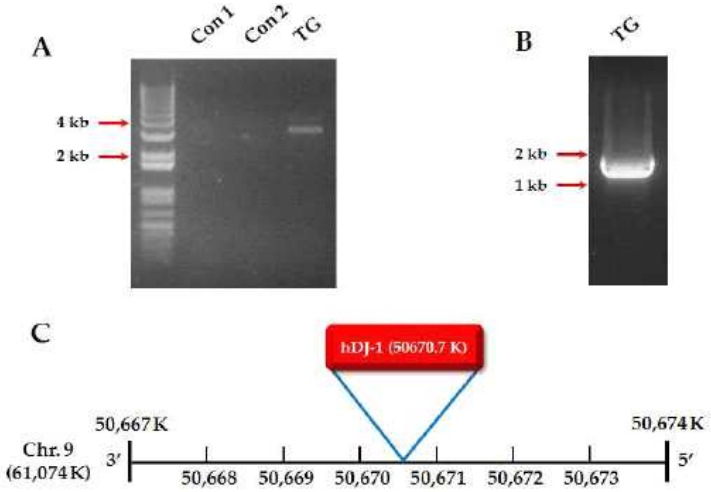


Fig. 44. Mapping for integrated *hDJ-1* gene

(21) 형질전환 복제 개의 생식선전달 확인

- 형질전환 복제 개의 정자를 채취하여 인공수정을 통해 태어난 강아지들에게서 사람의 *DJ-1* 유전자가 생식선전달이 되었는지 확인하기 위해 각 샘플들의 genomic DNA을 추출한 후 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 95℃ 5 min (1 cycle), 95℃ 30 sec, 58℃ 40 sec, 72℃ 6 min (35 cycles), 72℃ 10 min (1 cycle). 사용한 프라이머로는 positive control로써 dj1ddetect_F (aaatgatactcactctgggtc)과 R_NotI_right arm (ccatatggGCGGCCGCAAAGTGAATCTTGAGAAGCAAC)이다. 이는 개의 genomic DNA라면 증폭된 PCR 산물을 얻을 수 있으며, Fig. 45의 1번이 그 결과이다. 2번은 사람의 *DJ-1* 유전자 클로닝된 벡터 내의 프라이머인 pMSCV_5' (CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC)와 pMSCV3' (CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC), 3번은 벡터 내의 프라이머인 pMSCV_5'와 사람의 *DJ-1* 유전자의 hDJ-1_EcoRI_R (gggaattcc tagtctttaagaacaagtg) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

- 그 결과, Control에서는 1번을 제외한 나머지 PCR set에서 증폭된 결과를 얻을 수 없었으며, 형질전환 복제 개와 그 자식들을 모두 사람의 DJ-1 유전자를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

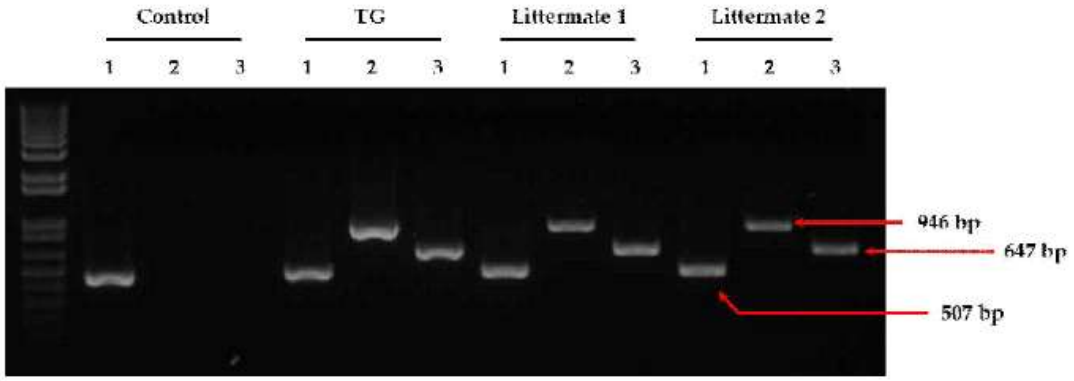


Fig. 45. 형질전환 복제 개의 생식선전달 확인

3. 제 2협동 : 알츠하이머병 형질전환 체세포주 확립 기술 및 분자병리학적 검증

▷ 과제 책임자 : 경북대학교 생명공학부 이동석

알츠하이머병 질환 모델개의 생산을 위한 알츠하이머병 관련유전자(swedish type mutant APP) 유전자를 유전체에 삽입되어 안정적으로 발현하는 lentiviral vector를 이용하여 체세포를 한 후 핵 치환을 통해서 알츠하이머병 모델 개를 생산하고, 알츠하이머병 모델 개 생산 후 뇌에서 알츠하이머병 관련 유전자 발현을 확인할 뿐만 아니라 분자/병리학적 접근을 통한 인간 뇌질환 모델동물 가능성을 검증하는 것을 목표로 한다.

(1) Human 알츠하이머병 관련유전자 cDNA 확보 및 알츠하이머병 mutant APP 제작

- Human cDNA library에서 Forward primer
5′-ATGCTGCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCT-3′과 Reverse prime
5′-GTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTT-3′을 이용하여 pCR8/TOPO vector에 cloning하였

으며, sequencing을 통하여 APP 유전자 서열을 재검증하였다.

- 붉은색 부분이 알츠하이머병의 원인이 되는 유전자 서열이고 푸른색은 V5 tag의 서열이다.
- APP 유존저 서열에 종결코돈을 생략하고 V5 epitope의 tag를 통하여 분자면역학적 검증이 유용하게 벡터를 디자인 하였다 (Fig. 46).

wide-type APP cDNA sequence

```
       ATGCTGCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCGCCTGGACGGCTCGGGCGCTGGAGGTACCCACTGATGGTAATGCTGG
    80 CCTGCTGGCTGAACCCCAGATTGCCATGTTCTGTGGCAGACTGAACATGCACATGAATGTCCAGAATGGGAAGTGGGATT
       CAGATCCATCAGGGACCAAAACCTGCATTGATACCAAGGAAGGCATCCTGCAGTATTGCCAAGAAGTCTACCCTGAACTG
       CAGATCACCAATGTGGTAGAAGCCAACCAACCAGTGACCATCCAGAACTGGTGCAAGCGGGGCCGCAAGCAGTGCAAGAC
       CCATCCCCACTTTGTGATTCCCTACCGCTGCTTAGTTGGTGAGTTTGTAAGTGATGCCCTTCTCGTTCCTGACAAGTGCA
       AATTCTTACACCAGGAGAGGATGGATGTTTGCGAAACTCATCTTCACTGGCACACCGTCGCCAAAGAGACATGCAGTGAG
       AAGAGTACCAACTTGCATGACTACGGCATGTTGCTGCCCTGCGGAATTGACAAGTTCCGAGGGGTAGAGTTTGTGTGTTG
       CCCACTGGCTGAAGAAAGTGACAATGTGGATTCTGCTGATGCGGAGGAGGATGACTCGGATGTCTGGTGGGGCGGAGCAG
       ACACAGACTATGCAGATGGGAGTGAAGACAAAGTAGTAGAAGTAGCAGAGGAGGAAGAAGTGGCTGAGGTGGAAGAAGAA
       GAAGCCGATGATGACGAGGACGATGAGGATGGTGATGAGGTAGAGGAAGAGGCTGAGGAACCCTACGAAGAAGCCACAGA
    800 GAGAACCACCAGCATTGCCACCACCACCACCACCACCACAGAGTCTGTGGAAGAGGTGGTTCGAGTTCCTACAACAGCAG
       CCAGTACCCCTGATGCCGTTGACAAGTATCTCGAGACACCTGGGGATGAGAATGAACATGCCCATTTCCAGAAAGCCAAA
       GAGAGGCTTGAGGCCAAGCACCGAGAGAGAATGTCCCAGGTCATGAGAGAATGGGAAGAGGCAGAACGTCAAGCAAAGAA
       CTTGCCTAAAGCTGATAAGAAGGCAGTTATCCAGCATTTCCAGGAGAAAGTGGAATCTTTGGAACAGGAAGCAGCCAACG
       AGAGACAGCAGCTGGTGGAGACACACATGGCCAGAGTGGAAGCCATGCTCAATGACCGCCGCCGCCTGGCCCTGGAGAAC
       TACATCACCGCTCTGCAGGCTGTTCCTCCTCGGCCTCGTCACGTGTTCAATATGCTAAAGAAGTATGTCCGCGCAGAACA
       GAAGGACAGACAGCACACCCTAAAGCATTTCGAGCATGTGCGCATGGTGGATCCCAAGAAAGCCGCTCAGATCCGGTCCC
       AGGTTATGACACACCTCCGTGTGATTTATGAGCGCATGAATCAGTCTCTCTCCCTGCTCTACAACGTGCCTGCAGTGGCC
       GAGGAGATTCAGGATGAAGTTGATGAGCTGCTTCAGAAAGAGCAAAACTATTCAGATGACGTCTTGGCCAACATGATTAG
       TGAACCAAGGATCAGTTACGGAAACGATGCTCTCATGCCATCTTTGACCGAAACGAAAACCACCGTGGAGCTCCTTCCCG
    1600 TGAATGGAGAGTTCAGCCTGGACGATCTCCAGCCGTGGCATTCTTTTGGGGCTGACTCTGTGCCAGCCAACACAGAAAAC
       GAAGTTGAGCCTGTTGATGCCCGCCCTGCTGCCGACCGAGGACTGACCACTCGACCAGGTTCTGGGTTGACAAATATCAA
       GACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGG
       TGTTCTTTGCAGAAGATGTGGGTTCAAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGACAGTG
       ATCGTCATCACCTTGGTGATGCTGAAGAAGAAACAGTACACATCCATTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGT
       CACCCCAGAGGAGCGCCACCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTTCTTTGAGCAGATGC
    2080 AGAACGATATCGAATTCCTGCAGGACTACAAAGACGATGA
```

Fig. 46. Cloning of APP wild-type gene from human cDNA library.

(2) Human 알츠하이머병 관련유전자 cDNA 확보 및 family Alzheimer's disease mutant APP (swedish type) 제작

- Site specific point mutagenesis 방법으로 wild-type APP 유전자에서 sense primer인 5′-CGGAGGAGATCTCTGAAGTGAATCTGGATGCAGAATTCCGA-3′와 anti-sense primer인 5′-TCGGAATTCTGCATCCAGATTCACTTCAGAGATCTCCTCCG-3′를 이용하여 알츠하이머병을 유도하는 것으로 알려진 swedish-type APP로 제작하였으며, sequencing 방법을 이용하여 재검증을 실시하였다.
- 푸른색으로 표시되어 있는 염기서열이 site-specific point mutation 된 부분이다 (Fig. 47).

swedish APP cDNA sequence

```
1600 GAAGITGAGCCTGTTGATGCCCGCCCTGCTGCCGACCGAGGACTGACCACTCGACCAGGTTCTGGGTTGACAAATATCAA
     GACGCAGGAGATCTCTGAAGTGAATCTGGATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGG
     TGTTCTTTGCAGAAGATGTGGGTTCAAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGACAGTG
     ATCGTCATCACCTTGGTGATGCTGAAGAAGAAACAGTACACATCCATTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGT
     CACCCCAGAGGAGCGCCACCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTTCTTTGAGCAGATGC
2080 AGAACGATATCGAATTCCTGCAGGACTACAAAGACGATGA
```

Fig. 47. Cloning of APP swedish-type gene in lentiviral vector sequence.

(3) 형광 및 항생제와 알츠하이머병 관련 유전자가 개별적으로 각각 동시에 발현되는 lentiviral vector 제작

- Lentiviral vector에 swedish-type APP유전자를 cloning하기 위해서 gateway system을 이용하였다. 먼저, entry vector에 Forward primer 5′-ATGCTGCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCT-3′과 Reverse primer 5′-GTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTT-3′을 이용하여 cloning하였으며, LR clonase를 이용하여 pLenti6.3 및 pLenti7.3 의 destination vector에 cloning하였다. 마찬가지로, sequencing으로 최종확인 하였다 (Fig. 48, 49).

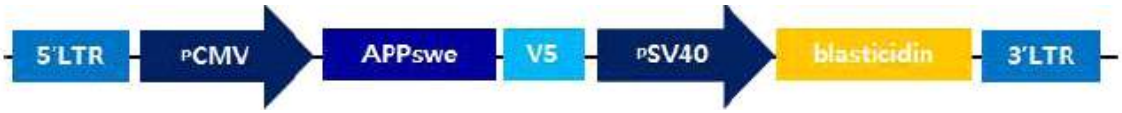


Fig. 48. Cloning of APP swedish-type gene of lentiviral vector (pLenti6.3).

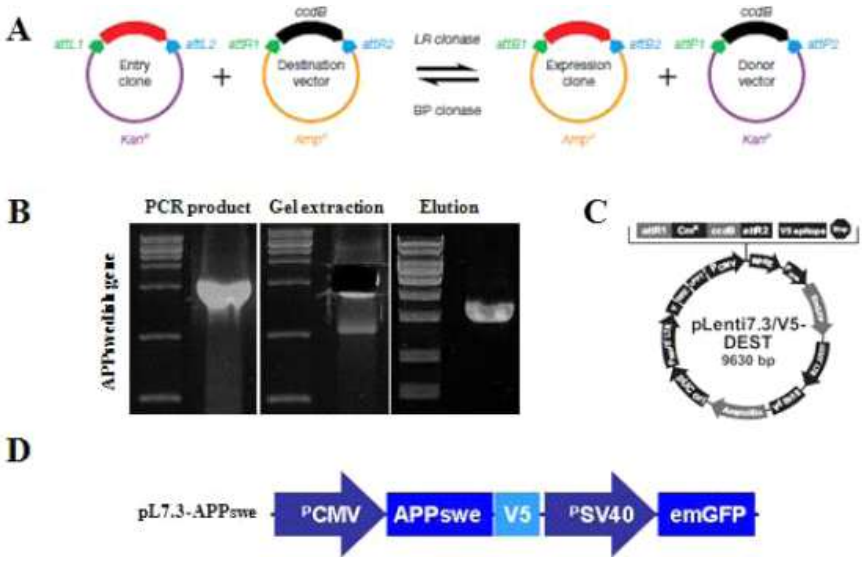


Fig. 49. Cloning of APP swedish-type gene of lentiviral vector (pLenti7.3).

(A) Schematic illustration of lentiviral vector cloning. (B) PCR product purification for APPswedish gene (2.1 kb). (C) Map and features of pLenti7.3/V5-DEST gateway vector. (D) Schematic illustration of lentiviral vector construct. pCMV, human CMV promoter; APPswe, amyloid precusor protein swedish type; pSV40, SV40 early promoter and origin; emGFP, Emerald Green Fluorescent Protein.

(4) Lentiviral vector를 이용한 amyloid-β 생성 및 응집체 형성 개의 체세포주 확립

- GFP 형광단백질과 swedish-type APP 유전자가 동시에 발현되는 Lentiviral vector (pLenti6.3) (Fig. 50A)를 이용하여 제1협동 책임자가 구축한 개의 체세포주에 infection하여 swedish-type APP와 V5-tag 유전자를 통한 분자/면역학적 방법으로 발현을 확인 (Fig. 50B) 하였으며, Confocal을 이용하여 세포주의 발현을 재검증하였다 (Fig. 50C). 또한, 유세포분석기 (FACS)를 이용하여 형광이 발현하는 개 체세포의 sorting이 가능하였으며 sorting 후 배양시 더욱 향상된 효율의 형광발현 개 체세포주를 얻을 수 있었다 (Fig. 51). 이러한 시스템을 이용하면 보다 편리하게 형광현미경 아래에서 형질전환 세포주를 이용한 핵치환 및 분석이 가능하게 하며, 검증에도 매우 유용하다.

- Blasticidin 저항 유전자와 swedish-type APP 유전자가 동시에 발현되는 Lentiviral vector (pLenti6.3)를 이용하여 제1협동 책임자가 구축한 개의 체세포주에 infection한 후 8μg/mL의 Blasticidin 항생제를 이용하여 90%이상의 세포를 선별하였다. 90%이상 선별된 세포를 이용하여 보다 편리하게 핵 치환이 가능하다.

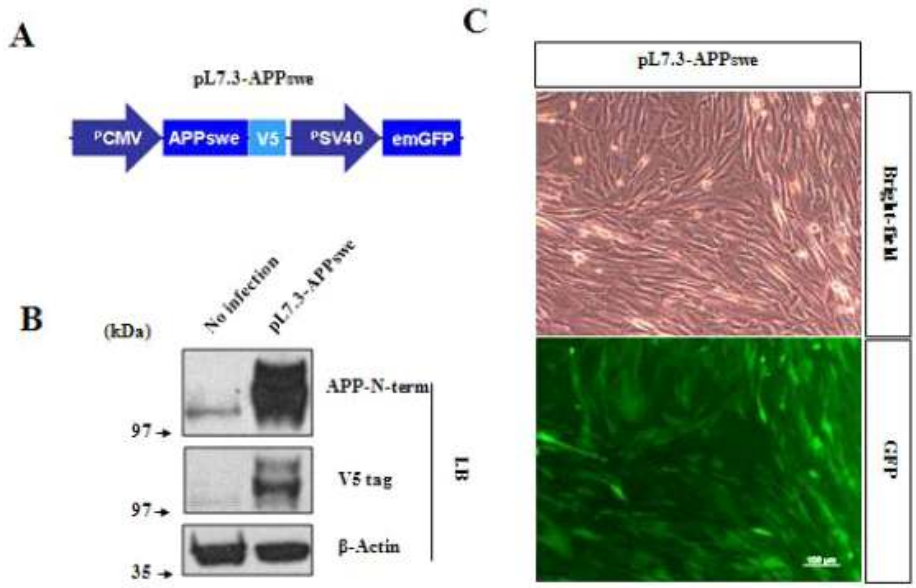


Fig. 50. Expression of APP swedish-type protein of lentiviral vector in Canine Fibroblast cells.

(A) Schematic illustration of lentiviral vector construct. pCMV, human CMV promoter; APPswe, amyloid precusor protein swedish type; pSV40, SV40 early promoter and origin; emGFP, Emerald Green Fluorescent Protein. (B) Western blot detects APPswedish and V5 tag proteins expression in canine fibroblast cells transduced with pL7.3-APPswe lentivrial vector. (C) emGFP-positive canine fibroblast cells 48 hours after infected with pL7.3-APPswe. Scale bar = 100 μm.

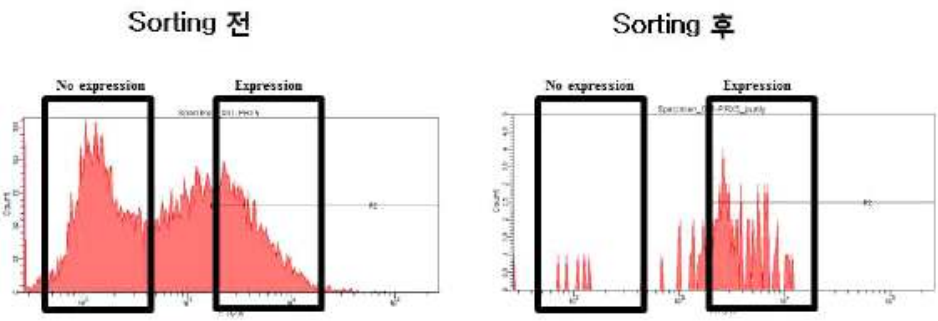


Fig. 51. 알츠하이머병 관련 유전자와 GFP 형광이 동시에 발현되는 형질전환 개 체세포주의 sorting전과 sorting후 발현효율 확인

(5) 알츠하이머병 관련 유전자의 발현 세포주의 평가 및 도입 조건 확립

- 알츠하이머병 관련유전자의 형질전환 세포주의 평가 및 도입 기준을 구축하기 위해 고 농축된 viral vector의 titer 기준을 마련하기 위하여 기존의 viral vector titeration 방법이 아닌 빠르고 편리한 Kit형식의 viral vector titeration을 수행하였다 (Fig. 52, 53).
- 아래 kit를 사용하면 최대 20분 안에 titeration이 가능하며, 비용적인 측면에서도 p24를 이용

한 면역효소활성측정법(ELISA)를 사용한 방법보다 저렴하다.

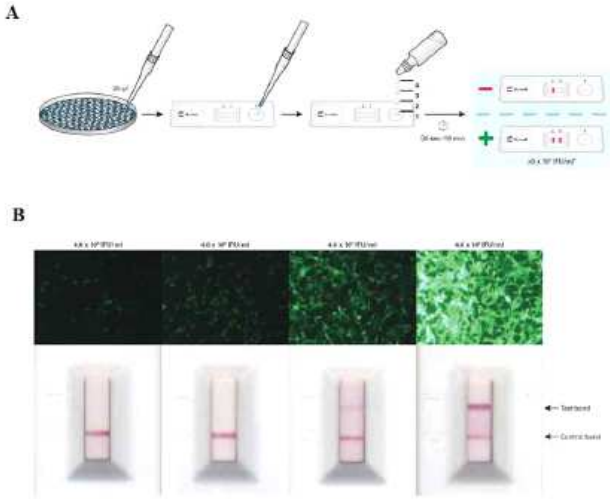


Fig. 52. Lentiviral vector titeration kit 사용방법 및 적용방법

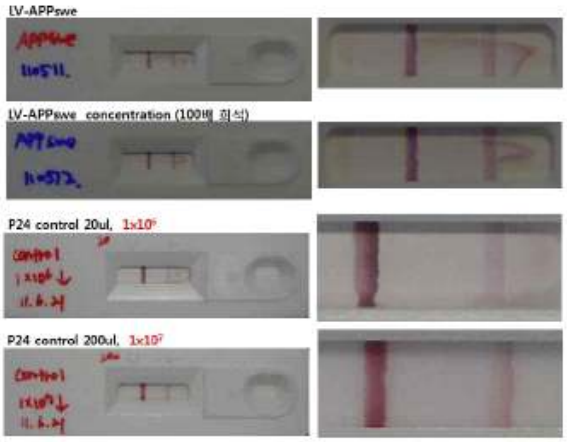


Fig. 53. Lentiviral vector titeration kit를 이용한 APPswe lentiviral vector의 titeration 결과

- 또한, GFP 형광단백질이 발현하는 Lentiviral vector를 사용하여 유세포분석 (Flow cytometry)를 이용하여 발현효율 측정이 가능하다.
- 높은 titer의 Lentiviral vector를 이용하여 개의 체세포에 virla vector를 농도별 infection 한 후, GFP 형광 단백질의 발현을 확인하여 viral vector의 안정적인 발현 시스템을 구축하여 알츠하이머병 유전자를 발현하는 개의 체세포주를 안정적으로 구축 가능하게 되었다.
- GFP 형광단백질이 발현되는 동일한 titer의 Lentiviral vector를 개 체세포주에 infection하여 발현효율을 측정하여 적정농도의 Lentiviral vector titer를 확립하였다 (Fig. 54).

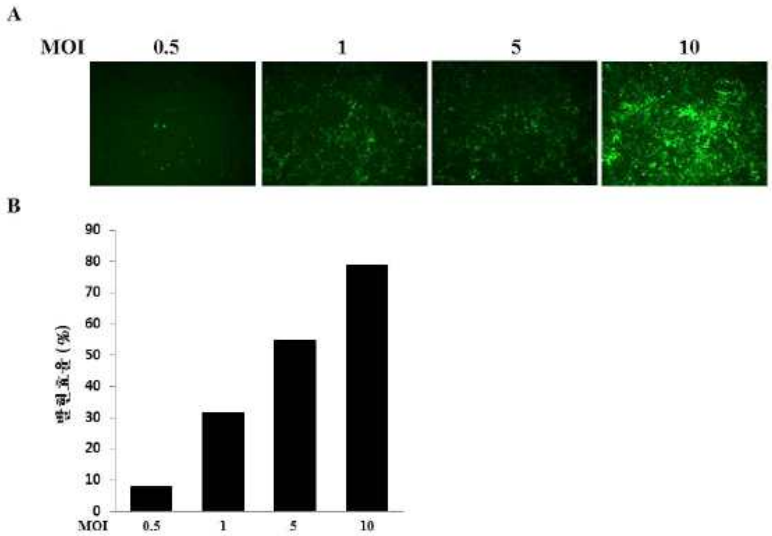


Fig. 54. 개의 체세포주에 농도별로 viral vector를 infection하여 GFP 형광단백질의 발현 확인을 통하여 Lentiviral vector의 효율을 확인.

(6) 형질전환 질환 개 모델을 작성하기 위한 최적의 세포주 확립 및 발현 평가 확립)

- 높은 titer의 Lentiviral vector를 이용하여 알츠하이머병 관련 유전자의 발현 개 체세포주를 안정적으로 확립가능한 시스템을 구축하였으며, V5 tag 및 β-amyloid 항체를 이용한 분자/면역학적 검증 및 GFP 형광단백질 발현을 통하여 세포주의 평가가 가능하게 함.
- 알츠하이머병 유전자인 swedish-type APP를 Lentiviral vector를 이용하여 발현시킨 개 체세포주의 형질전환 정도를 β-amyloid 항체를 이용하여 확인 하였으며, 이전 결과에서 V5 tag으로도 확인이 가능함을 증명하였다 (Fig. 55).

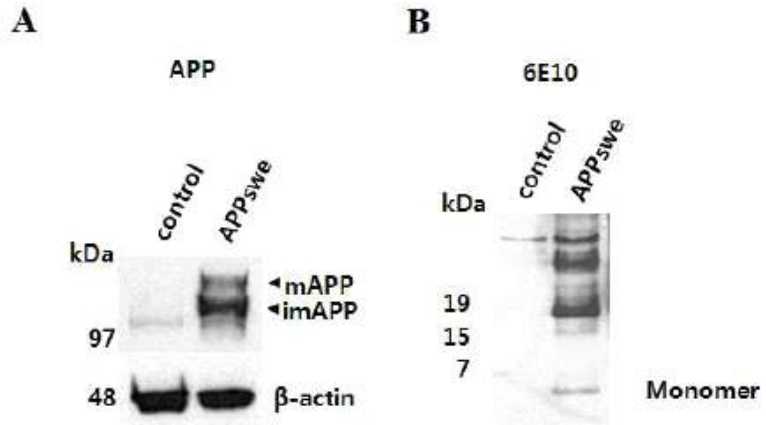


Fig. 55. 알츠하이머병 유전자가 발현하는 Lentiviral vector를 이용하여 형질전환시킨 개 체세포주의 형질전환 평가

- 형질전환 질환 개 모델을 작성하기 위한 최적의 조건 및 최적의 세포주를 확립하기 위해서 다양한 대동물의 세포주에서 Lentiviral vector의 발현 패턴 변화를 확인하였다.
- 개의 체세포주와는 별도로 다른 세포주의 Lentiviral vector의 발현 패턴 변화를 확인하기 위해서 사람의 embryonic tooth budderived cells에도 infection 하여 발현을 확인 하였다 (Fig. 56).
- 그래서 대동물인 개뿐만 아니라 사람의 줄기세포에서도 발현이 되는 조건을 확립 및 검증하

였다.

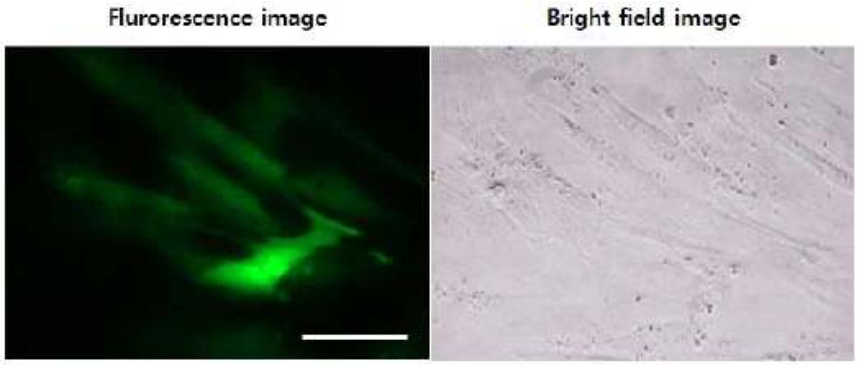


Fig. 56. Fluorescence image of lentiviral-vector infected embryonic tooth budderived cells.

(7) 대동물에서 형질전환 질환 모델의 효율을 높이기 위한 생식세포에서의 발현 검증을 통하여 최적의 형질 전환 모델 시스템을 구축

- 형질전환 질환 개 모델의 생산 효율을 높이기 위한 생식세포에서의 발현 검증을 통하여 최적의 형질 전환 모델 시스템을 구축하기 위하여 다른 대동물인 돼지를 통해서 Lentiviral vector의 생식세포에서의 발현을 검증하였다 (Fig. 57).
- 돼지의 정소에서 GFP 형광단백질이 발현하는 Lentiviral vector의 도입을 통해 돼지의 정소에서 안정적으로 발현되는 것을 검증하여 개의 질환 모델 효율을 높이기 위한 생식세포에서의 발현 검증이 가능하다는 것을 확인 하였다.

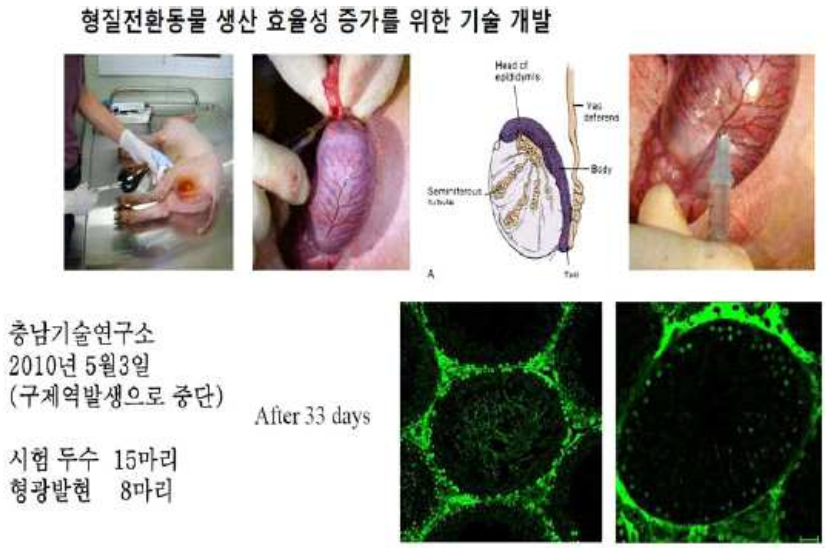


Fig. 57. 돼지의 생식세포에서 Lentiviral vector의 도입에 의한 발현

(8) 미토콘드리아의 모양변화를 실시간으로 관찰 가능한 형광발현 시스템 구축

- 미토콘드리아는 세포의 에너지 생산 및 세포사멸 등 세포의 생존에 매우 중요한 역할을 하는 세포소기관으로써, 최근에 매우 유동적으로 분절 (fission)과 융합 (fusion)을 반복하면서 그 기능을 유지하는 것으로 알려져 있다.
- 최근 연구결과에 따르면 알츠하이머병 환자의 뇌세포에서 비정상적으로 미토콘드리아의 분절이 증가되어 있으며, 이러한 현상이 신경세포의 사멸에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다.

- 또한, 알츠하이머병 환자 뇌의 미세교아세포 (microglia)가 비정상적으로 활성화되어 신경세포 사멸에 영향을 주는 것이 보고되었다.
- 그래서 면역반응을 일으키지 않은 lentiviral vector를 이용하여 미토콘드리아 특이적으로 DsRed2 형광단백질이 안정적으로 발현하는 미세교아세포주를 구축하였으며, 특허 출원을 완료하였다.
- 비정상적으로 활성화된 미세교아세포에서 미토콘드리아의 분절이 증가되는 것을 확인하였으며, 미토콘드리아 분절 억제에 의해서 미세교아세포의 비정상적인 활성이 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 58). (accepted at J Neurochem. 2013 Jul 2)

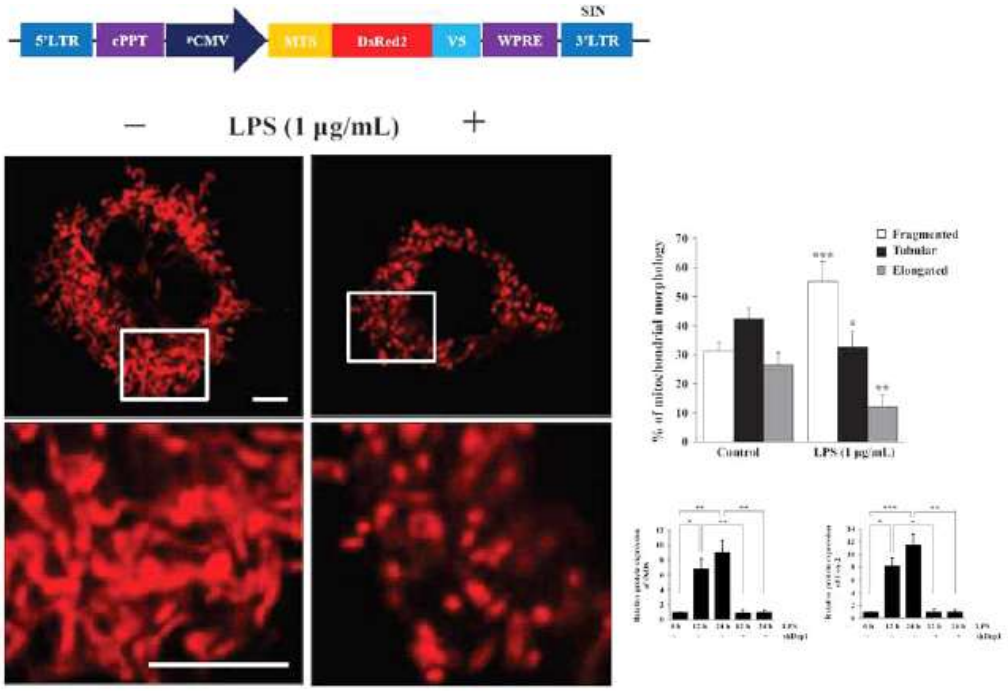


Fig. 58. 미세교아세포의 비정상적인 활성에 따른 미토콘드리아의 분절 증가 및 미토콘드리아 분절 억제에 의한 미세교아세포의 활성 감소 확인

- 이 결과를 이용하여 알츠하이머병 모델견의 신경세포에서 미토콘드리아의 모양을 관찰하고 차이점을 비교 분석하여 알츠하이머병 모델견의 기능성 여부 평가를 실시할 계획이다.

4. 제 3협동 : 퇴행성 신경질환 개 연구를 위한 유전정보 기반구축 사업

▷ 과제 책임자 : 한국생명공학연구원 국가영장류센터 장규태
퇴행성 신경질환 연구에 활용되는 대표적인 동물 자원인 개의 유전자 동정 및 조직별 전사체 profiling을 통한 개 유전정보 기반구축을 목표로 함

가. 개의 전사체 profiling

(1) RNA sequencing and Unigene Construction

- 총 10개의 신선한 조직을 (대뇌, 폐, 심장, 신장, 비장, 췌장, 정소, 난소, 소뇌, 간) 채취하여 total RNA의 분리
- Oligo(T)가 달려있는 비드(beads)를 이용하여, 전체 RNA에서 폴리A가 달려 있는 mRNA를

분리

- 추출된 mRNA들은 약 200~700bp로 조각낸 뒤, 랜덤헥사머 프라이머를 이용하여 cDNA형태로 합성

- 특정 크기의 조각들을 선별한 뒤, PCR을 이용하여 증폭

- 증폭된 샘플들은 일루미나의 GAIIx 및 HiSeq2000을 이용하여 서열을 해독

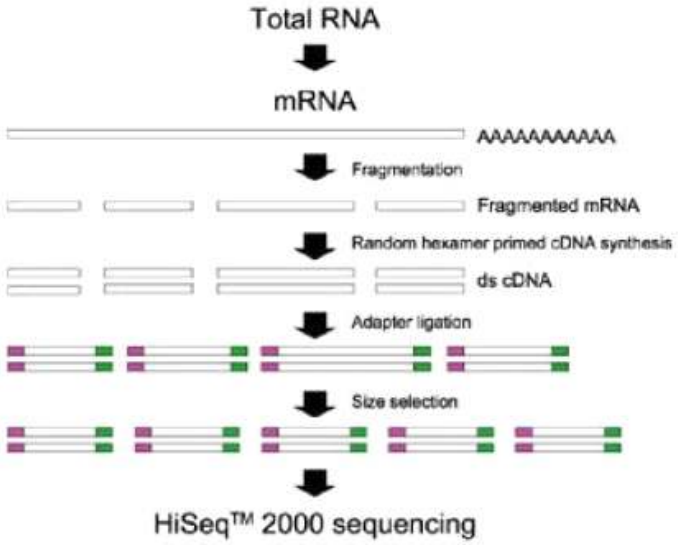


Fig. 59. RNA-Seq의 실험 방법 및 순서

- 7개 조직인 대뇌, 폐, 신장, 비장, 췌장, 정소, 난소에서 약 5천백만 read, 평균 4.6G 의 raw data를 확보함

Table 16. RNAseq 결과 summary

Samples	Total Reads	Total Nucleotides (nt)	Q20 percentage	N percentage	GC percentage
대뇌	51,688,888	4,651,999,920	92.12%	0.00%	52.02%
폐	51,688,888	4,651,999,920	94.30%	0.00%	49.57%
심장	52,266,668	4,704,000,120	94.48%	0.00%	48.68%
신장	51,511,114	4,636,000,260	93.85%	0.00%	48.79%
비장	51,688,888	4,651,999,920	94.12%	0.00%	50.05%
췌장	51,688,888	4,651,999,920	92.79%	0.00%	54.26%
정소	51,688,888	4,651,999,920	93.93%	0.00%	48.65%
난소	51,688,888	4,651,999,920	93.97%	0.00%	50.14%
소뇌	54,488,890	4,904,000,100	92.94%	0.00%	49.70%
간	55,066,664	4,955,999,760	94.27%	0.00%	50.38%

- 약 5억 2천만개의 raw read를 바탕으로 개에서 발현되는 유전자의 mapping을 진행하여 assembly를 진행함.

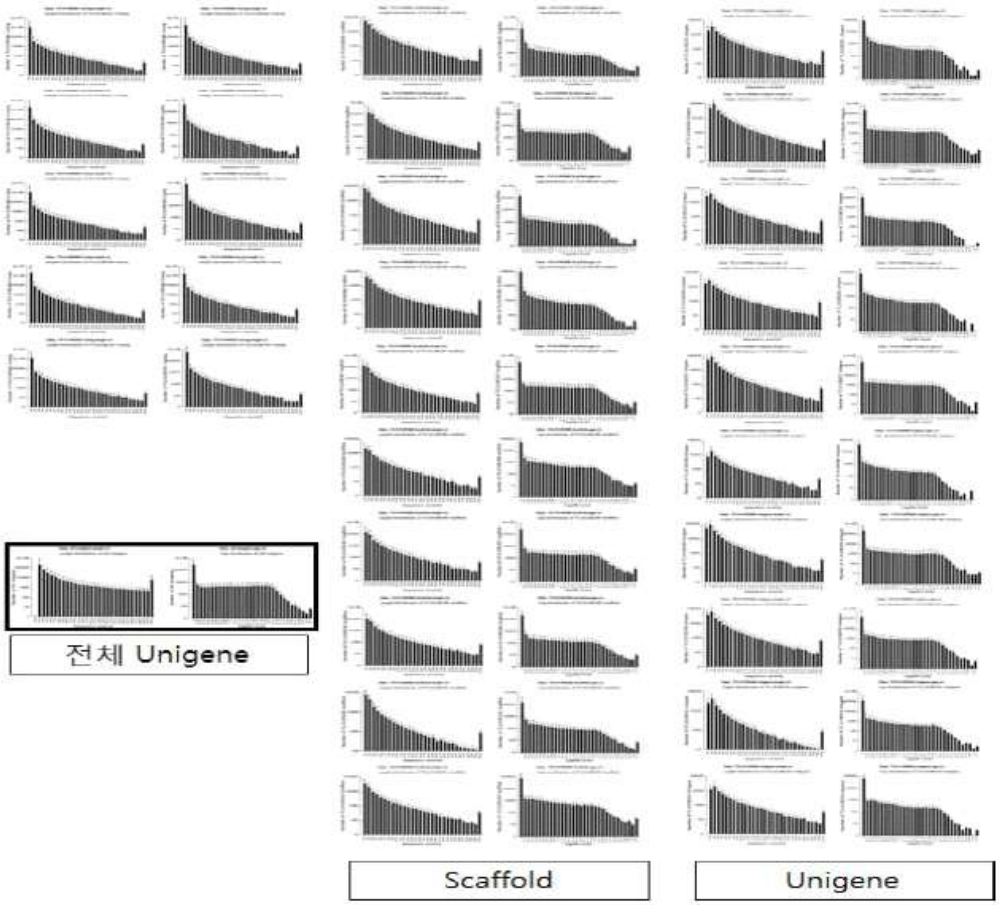


Fig. 60. Assembly 결과 summary

- 전체 Unigene의 COG functional classification을 수행한 결과, translation, ribosomal structure and biogenesis기능이 우점적으로 나왔으며, 기능적인 분류가 잘되지 않는 unigene들도 많이 나온 것으로 미루어보아 개 유전자의 기능적 분석 연구가 많이 진행되지 않은 것을 반영하고 있음

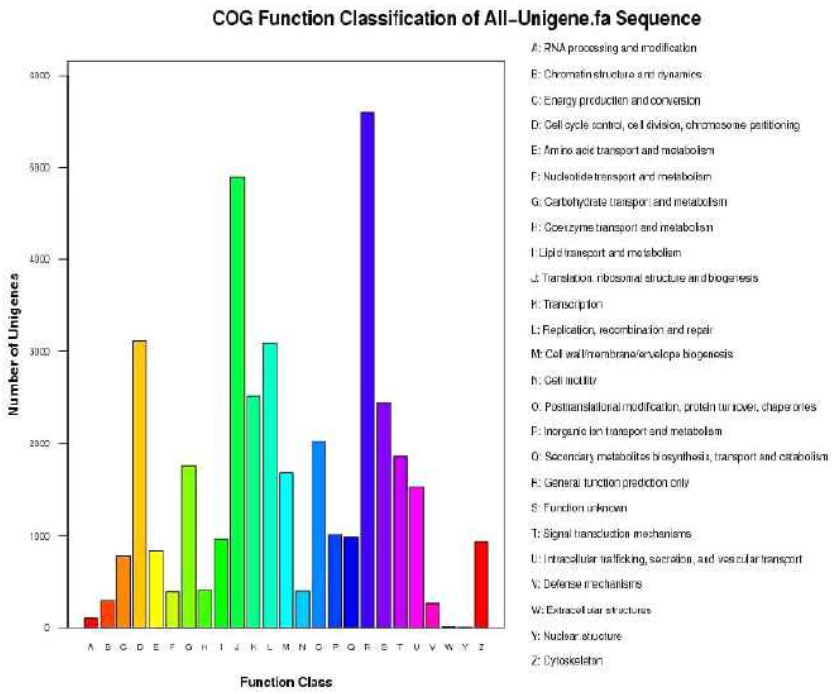


Fig. 61. COG Function classification of Unigene

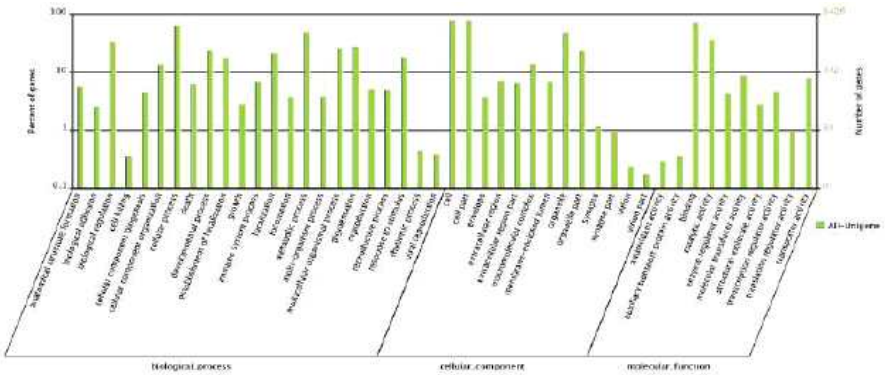


Fig. 62. GO classification of Unigene

(2) 개 reference gene selection

- 대량의 개 전사체 expression profiling이 시작되면 수많은 유전자들의 발현 pattern을 systemic하게 알 수 있게 됨

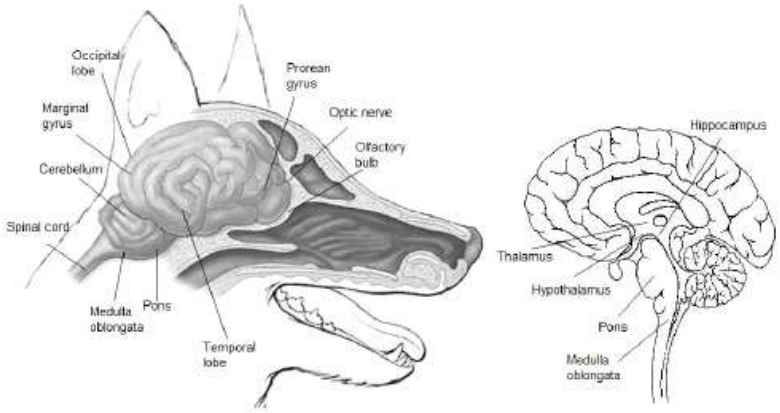


Fig. 63. 개 brain 부위별 다양한 조직 sample

Table 17. 각그룹별 조직정보

Whole brain	Peripheral tissues	Forebrain	Cerebrum	Diencephalon	Hindbrain	Metencephalon
Thalamus	Cerebrum	Thalamus	Occipital lobes	Thalamus	Pons	Pons
Pons	Cerebellum	Hypothalamus	Prorean gyrus	Hypothalamus	Cerebellum	Cerebellum
Hypothalamus	Kidney	Occipital lobes	Temporal lobe		Medulla oblongata	
Occipital lobes	Liver	Prorean gyrus	Hippocampus			
Spinal cord	Lung	Temporal lobe	Marginal gyrus			
Prorean gyrus	Spleen	Hippocampus				
Optic nerve	Pancreas	Marginal gyrus				
Temporal lobe	Testis					
Medulla oblongata	Ovary					
Cerebellum	Heart					
Hippocampus						
Marginal gyrus						
Olfactory bulb						

- 하지만 이러한 생물정보학적 데이터의 경우 실험적 검증이 반드시 필요함으로 기존의 개 조직을 이용한 qRT-PCR용 internal reference gene의 selection이 반드시 필요함.

- Melting curve analysis를 통해 qRT-PCR 실험을 위해 제작된 프라이머의 specificity를 validation함

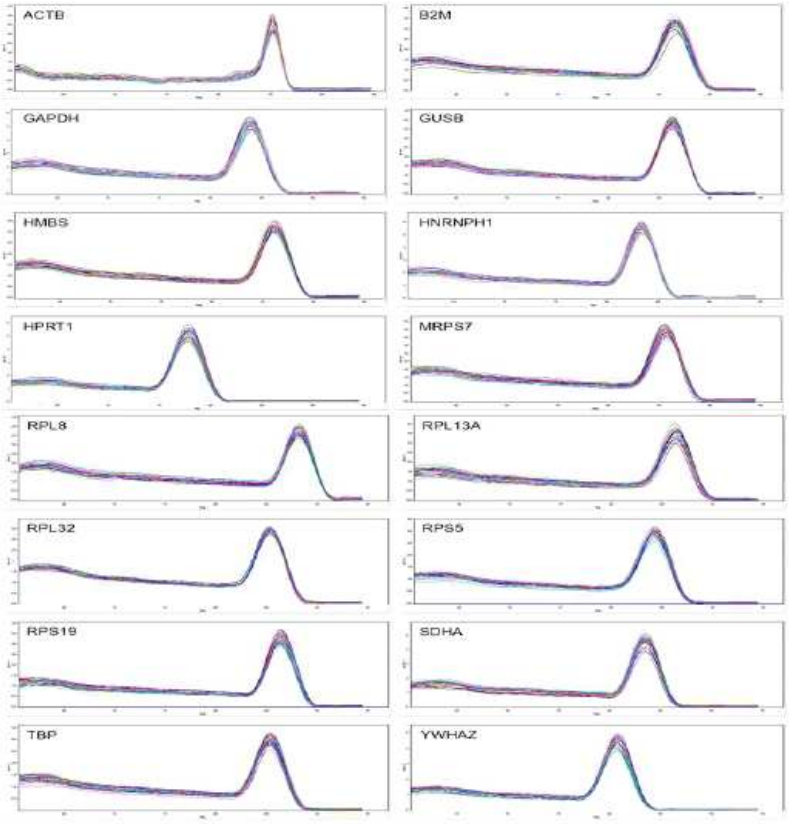


Fig. 64. 뇌조직 이용한 melting curve analysis 결과

- geNorm data분석은 pairwise comparison방법을 통해 가장 안정적인 유전자를 선정함. 이러한 방법을 이용하면 몇 개의 유전자를 노멀라이제이션에 쓰면 좋은지를 결정하는데 도움을 줌. 0.15이하의 값이면 더 이상의 reference gene 추가가 필요 없음.

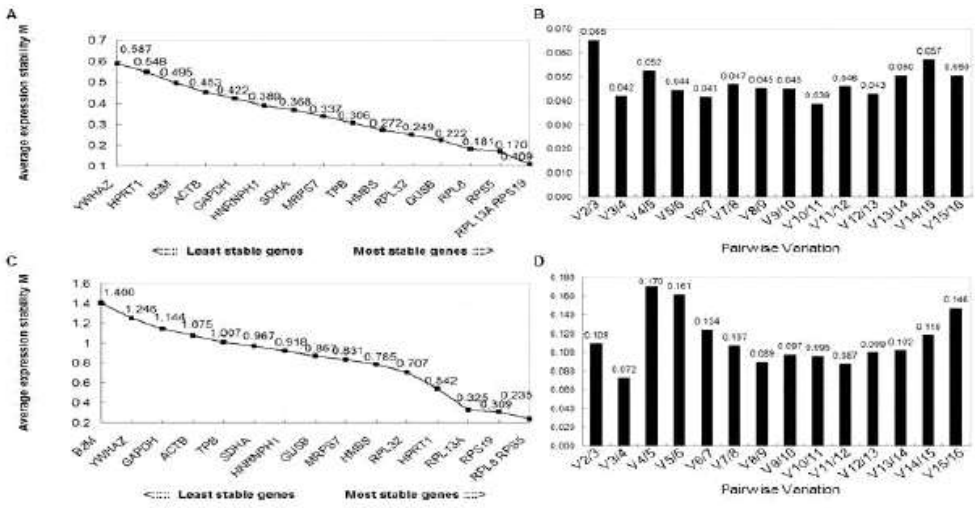


Fig. 65. geNorm 분석

- NormFinder의 경우 stability값을 계산하여 가장 안정적으로 발현되는 유전자를 선발 가능함

Calculation of gene stability value by NormFinder.

Whole brain tissues		Whole body tissues	
Gene name	Stability value	Gene name	Stability value
RPL8	0.112	HMBS	0.339
RPS5	0.116	RPL32	0.358
TPB	0.140	GUSB	0.383
MRPS7	0.148	MRPS7	0.431
SDHA	0.199	HPRT1	0.437
RPS19	0.206	RPL13A	0.511
HMBS	0.209	HNRNPH1	0.528
RPL13A	0.237	RPL8	0.545
RPL32	0.240	RPS5	0.614
HNRNPH1	0.271	TPB	0.645
GUSB	0.293	SDHA	0.665
GAPDH	0.330	RPS19	0.692
ACTB	0.373	ACTB	0.820
B2M	0.544	GAPDH	0.950
HPRT1	0.552	YWHAZ	1.247
YWHAZ	0.552	B2M	1.613

The genes with low stability value mean low variation and a stable expression and high stability value mean high variation and a unstable expression.

Fig. 66. NormFinder 분석

- BestKeeper 분석법은 SD 값과 CV값으로 각각 가장 안정적인 레퍼런스 유전자의 순위를 매기는 프로그램으로써, 가장 낮은 값일수록 안정적인 유전자가 됨

Detailed expression stability analysis of reference genes by BestKeeper.

	ACTB	B2M	GAPDH	GUSB	HMBS	HNRNPH1	HPRT1	MRPS7	RPL8	RPL13A	RPL32	RPS5	RPS19	SDHA	TPB	YWHAZ
Whole brain																
n	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
geo Mean [CP]	21.48	17.33	16.55	19.66	20.85	18.15	19.1	20.11	16.09	16.21	25.17	17.57	17.84	18.11	22.9	17.5
ar Mean [CP]	21.49	17.34	16.56	19.67	20.85	18.15	19.12	20.11	16.09	16.22	25.18	17.57	17.84	18.12	22.9	17.51
min [CP]	20.41	15.9	15.9	18.73	20.17	17.22	18.29	19.39	15.62	15.34	24.24	17.08	17.08	17.31	22.26	16.14
max [CP]	22.51	18.32	18.19	20.45	21.58	18.66	21.4	20.76	16.64	16.72	25.86	18.08	18.39	19.21	23.48	19.24
stddev [± CP]	0.47	0.64	0.31	0.44	0.36	0.29	0.54	0.23	0.26	0.28	0.31	0.2	0.29	0.26	0.27	0.57
CV [% CP]	2.2	3.67	1.85	2.23	1.75	1.59	2.83	1.14	1.64	1.7	1.23	1.16	1.64	1.46	1.17	3.27
Whole body tissues																
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
geo Mean [CP]	27.72	24.69	17.26	18.55	20.73	18.85	17.55	19.97	15.18	14.95	23.88	16.94	15.93	18.27	23	19.4
ar Mean [CP]	27.76	24.8	17.33	18.57	20.75	18.89	17.55	19.99	15.19	14.96	23.91	16.96	15.95	18.3	23.05	19.53
min [CP]	24.77	21.03	14.41	16.85	19.26	16.39	16.71	18.57	14.46	14.03	22.34	16.02	14.78	16.77	20.83	16.34
max [CP]	29.43	27.23	19.91	20.18	22.34	20.64	17.99	21.07	16.5	16.35	25.81	18.53	17.33	19.92	25.84	23.44
stddev [± CP]	1.15	1.99	1.28	0.78	0.93	1.12	0.3	0.84	0.48	0.6	0.94	0.55	0.75	0.93	1.28	1.82
CV [% CP]	4.16	8.02	7.38	4.2	4.5	5.92	1.74	4.2	3.13	3.98	3.93	3.26	4.68	5.09	5.57	9.33

Abbreviations: n: number of samples; GM [CP]: the geometric mean of CP; AM [CP]: the arithmetic mean of CP; Min [CP] and Max [CP]: the extreme values of CP; SD [± CP]: the standard deviation of the CP; CV [%CP]: the coefficient of variance expressed as a percentage on the CP level; Min [x-fold] and Max [x-fold]: the extreme values of expression levels expressed as an absolute x-fold over- or under-regulation coefficient; SD [± x-fold]: standard deviation of the absolute regulation coefficients.

Fig. 67. BestKeeper 분석

- 최종적으로 3가지의 분석 프로그램을 종합하여 candidate reference gene의 순위를 매김. 결론적으로 개의 다양한 뇌 조직과 tissue조직에서의 정량적 발현분석에서는 RPS계열의 유전자들이 가장 우수한 normalization 유전자로 밝혀졌으며, 이러한 유전자를 이용할 경우 실험적인 validation이 매우 용이함을 알 수 있음

Ranking of 10 candidate reference genes according to geNorm, NormFinder, and BestKeeper.

Gene	Whole brain				Forebrain				Cerebrum				Diencephalon				Hindbrain				Metencephalon				Whole body tissues			
	G	N	B(SD)	B(CV)	G	N	B(SD)	B(CV)	G	N	B(SD)	B(CV)	G	N	B(SD)	B(CV)	G	N	B(SD)	B(CV)	G	N	B(SD)	B(CV)	G	N	B(SD)	B(CV)
ACTB	13	13	13	12	16	15	16	16	12	12	7	4	9	1	11	11	13	14	14	14	15	15	16	15	13	13	12	6
B2M	14	14	16	16	13	13	12	12	8	10	11	13	15	15	7	9	16	16	16	16	14	14	15	16	15	16	16	15
GAPDH	12	12	9	11	10	11	6	8	13	13	8	11	12	8	13	13	1	1	3	4	5	1	6	6	14	14	13	14
GUSB	5	11	12	13	12	10	13	13	6	8	11	10	6	3	8	7	3	3	4	2	3	5	1	1	9	3	6	7
HMBS	7	7	11	10	14	14	15	14	16	16	16	16	7	5	9	8	11	11	6	5	9	10	11	11	7	1	9	9
HNRNPH1	11	10	7	6	6	9	1	1	7	2	9	8	4	7	5	6	14	15	15	15	16	16	14	14	10	7	11	13
HPRT1	15	15	14	14	11	12	9	9	15	15	15	15	10	6	12	12	8	8	9	10	10	11	12	13	5	5	1	1
MRPS7	9	4	2	1	8	8	4	5	9	3	1	1	13	12	14	14	9	9	11	11	1	1	3	2	8	4	7	7
RPL8	4	1	3	7	5	3	11	11	4	6	10	12	6	9	2	4	5	4	5	6	6	6	7	7	1	6	2	2
RPL13A	1	8	6	9	3	7	2	4	3	1	5	9	11	13	1	1	4	5	1	1	1	1	2	3	4	8	4	5
RPL32	6	9	9	4	4	6	8	7	5	11	14	8	1	11	2	2	13	13	13	12	13	13	13	10	6	2	10	4
RPS5	3	2	1	2	1	1	5	6	1	3	3	5	5	5	6	6	7	7	7	8	8	8	10	12	1	3	3	3
RPS19	1	6	7	7	1	2	4	7	1	5	2	2	1	10	3	3	1	1	2	3	4	1	5	5	3	12	5	10
SDHA	10	5	8	5	9	4	10	10	10	4	5	7	14	14	15	15	6	6	8	7	7	7	8	9	11	11	8	11
TPB	8	8	5	9	7	4	6	8	11	7	8	6	8	1	10	10	12	12	12	9	12	12	8	8	12	10	13	12
YWHAZ	16	15	15	15	15	16	14	15	14	14	11	14	16	16	16	16	10	10	10	13	11	9	4	4	16	15	15	16

Abbreviations: G: geNorm; N: NormFinder; B(SD): standard deviation of BestKeeper index; B(CV): coefficient of variation of BestKeeper index.

Fig. 68. Candidate reference gene의 순위

나. 개 조직 특이 유전자의 동정

(1) 알츠하이머병의 중요 candidate 유전자 full-length cDNA동정

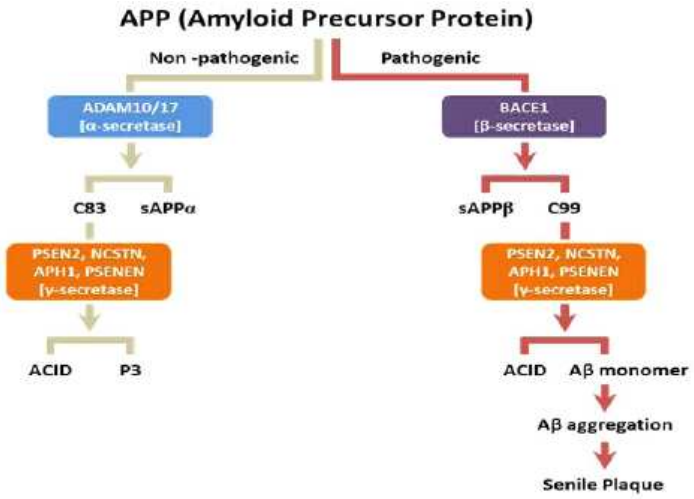


Fig. 69. APP processing pathway

- APP pathway에 관련된 유전자 8개중 RefSeq의 status가 prediction 상태로 Genbank에 등록되어 있는 7개의 유전자를 선별하여 full-length를 동정함

Gene Symbol		Official Full Name	RefSeq status*
	APP	amyloid beta (A4) precursor protein	PROVISIONAL
α-secretase	ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	MODEL
	ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17	MODEL
β-secretase	BACE1	beta-site APP-cleaving enzyme 1	MODEL
γ-secretase	PSEN2	presenilin 2	MODEL
	NCSTN	nicastrin	MODEL
	APH1	anterior pharynx defective 1 homolog A	MODEL
	PSENEN	presenilin enhancer 2 homolog	MODEL

* PROVISIONAL RefSeq: This record has not yet been subject to final NCBI review.
MODEL RefSeq: This record is predicted by automated computational analysis.

Fig. 70. APP pathway 관련 유전자들의 RefSeq 상태

- 먼저 생물정보학적인 기법을 통해 유전자를 동정하고 RACE 및 sequencing기법을 통해 전장 유전자를 동정하고 비교 분석함

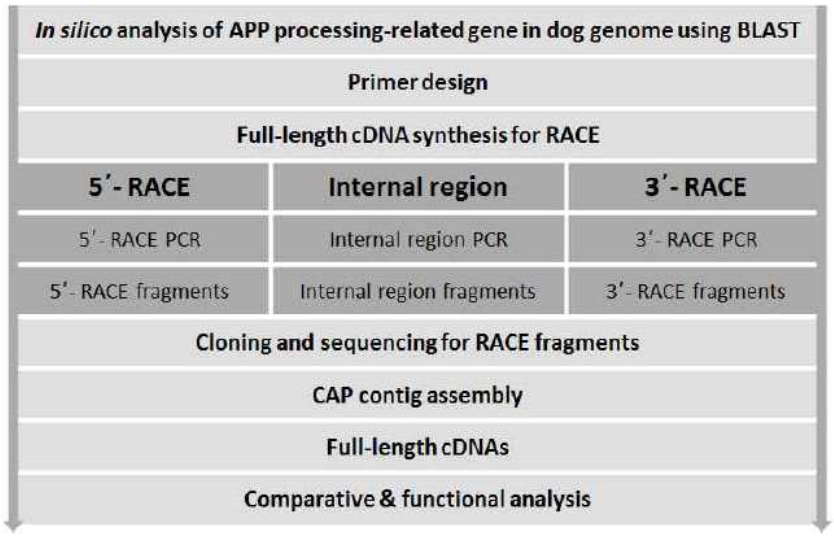


Fig. 71. APP 관련 유전자의 동정 절차

- 대부분의 목표 유전자가 5UTR, CDS, 3'UTR, 그리고 poly(A)까지의 동정이 완료 되었으나, BACE1 유전자의 경우 CDS만 동정이 되었다. 발현양이 매우 낮거나, 특정 단계에서만 발현 조절되는 유전자의 경우 이렇게 유전자 동정이 힘들 경우가 있는데, 아무래도 그러한 경우라고 생각됨

Gene Symbol		5′-UTR	CDS	3′-UTR	Poly(A)	Note
α-secretase	ADAM10	●	●	●	●	
	ADAM17	●	●	●	●	
β-secretase	BACE1	-	●	-	-	BACE1 full-length sequence is fully not identified, but CDS is identified.
γ-secretase	PSEN2	●	●	●	●	
	NCSTN	●	●	●	●	
	APH1	●	●	●	●	
	PSENEN	●	●	●	●	

●: Target region is completely identified, -: Target region is not identified

Fig. 72. RACE 실험 결과

- RACE실험결과 APP관련 유전자들의 대부분은 인간의 RefSeq와 비교 했을 때 더욱 많은 전사체를 가지는 것으로 조사되었다. (APH1 gene의 경우 인간이 개의 경우보다 2개더 많은 alternative transcripts를 가지는 것으로 밝혀짐)

Gene Symbol		The number of identified transcripts	The number of deduced isoforms	Human RefSeq*
α-secretase	ADAM10	4 ea	4 ea	1 ea
	ADAM17	4 ea	4 ea	1 ea
β-secretase	BACE1	6 ea	6 ea	6 ea
γ-secretase	PSEN2	4 ea	4 ea	2 ea
	NCSTN	4 ea	4 ea	1 ea
	APH1	2 ea	2 ea	4 ea
	PSENEN	1 ea	1 ea	1 ea

* NCBI Reference Sequences

Fig. 73. RACE 실험을 통해 밝혀진 전장 전사체와 alternative transcripts

- 동정된 개 유전자를 분석한 결과 인간의 RefSeq에 등록된 개수보다 훨씬 더 많은 alternative transcript를 보유하고 있음이 밝혀졌으며, 개 유전자와 인간 유전자와의 아미노산 호몰로지를 분석해 본 결과 인간과 마우스와의 비교보다 훨씬 더 가까움을 알 수 있음

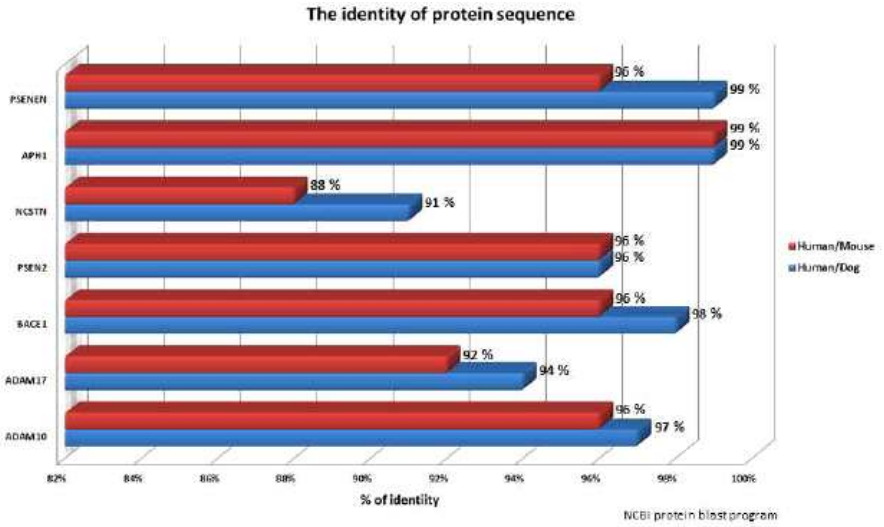


Fig. 74. 단백질서열의 identity 분석

- APP관련 전장 유전자 동정 및 분석 결과, ADAM10, PSEN2, NCSTN에서 현재의 reference gene에 matching 되지 않는 exon영역이 동정 되었다. 이러한 영역의 발생은 현재의 개 reference genome이 약 7.5X 지놈으로 불완전한 상태여서 발생할 수 있는 문제이며, reference genome의 boxer 품종과 우리가 분석한 beagle 품종간의 variation으로 생길 수 있는 문제임.

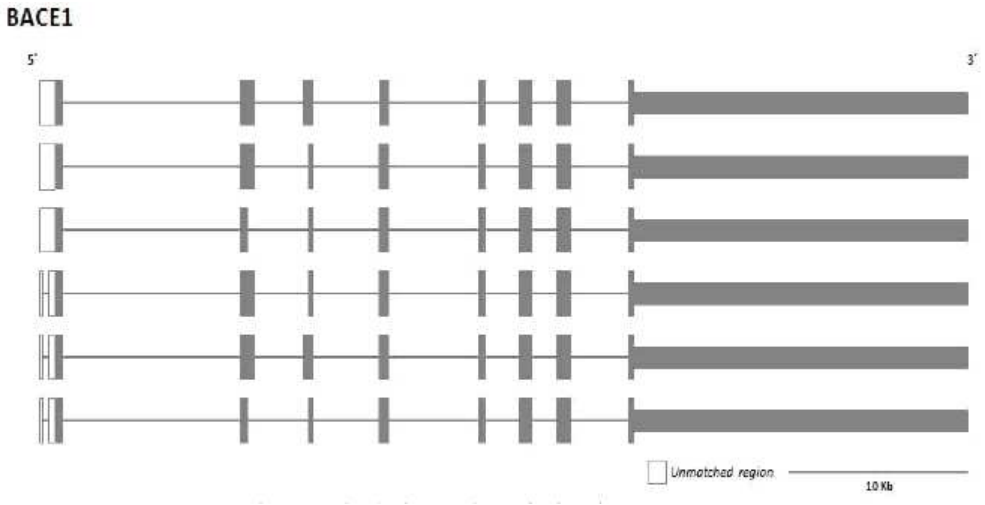


Fig. 75. 유전자 동정결과의 예

Gene Symbol	Primer	Sequence (5'-3')
ADAM10	5_TSP_ADMA10	CACGAGTCTGGATGAATCCTT
	ADAM10_1_S	GGATTCATTACACCAAAAACACC
	ADAM10_1_AS	TTGGAGTATGAACACTGCATATCTT
	ADAM10_2_S	GGCTACTGTGATGTTTTCATGC
	ADAM10_2_AS	CATTGTGCTGTTTCACCTTCA
	3_TSP_ADMA10	TTTAAACTTTCTAATTCAATTCCAGTT
ADAM17	5_TSP_ADMA17_1	CGATGATCTGCTACCACCAA
	5_TSP_ADMA17_2	AGAAGTCCTGCCATTTGACG
	ADAM17_1_S	TGAAGATATCAAGAATGTTTCACG
	ADAM17_1_AS	CAAGGAGAAAACCAGGACAGA
	ADAM17_2_S	TGAGGAAAGGAAAGCCCTGT
	ADAM17_2_AS	GGAAGGGGTCCTTCTCAAA
	ADAM17_3_S	GAAGGACCCCTTCCCCAA
	ADAM17_3_AS	GTCAGCGGATCATTACAGTG
	3_TSP_ADMA17	ACCTGTGGTGCAAAAGCA
BACE1	5_TSP_BACE1	ATCTCAGCATAGGCCAGACC
	BACE1_1_S	GCAGCAGTAACTTTGCAGTG
	BACE1_1_AS	TGGTCAGGCTACAACCACAG
	BACE1_2_S	GGGAGACCGACGAAGAGC
	BACE1_2_AS	GCTGCTCCCCCAGCCAGAAC
	BACE1_4_S	TGCTTCCAGGTATGGGACCT
	BACE1_4_AS	AGGTGACCCACTTTCTTTGG
	BACE1_5_S	TTGCTTTCTGACTGATCCTGAA
	BACE1_5_AS	GTTTGGTGACCTTGGGTGAG
	BACE1_6_S	ATGGCCCAAGCCCTGCCCT
	BACE1_6_AS	GGACAGCTGCCTCTGGTAGT

Gene Symbol	Primer	Sequence (5'-3')
PSEN2	5_TSP_PSEN2	TCATGATGAGGGTGTTGAGC
	PSEN2_1_S	CCAGTGGAGAAGCCAGGA
	PSEN2_1_AS	AGCTGATGGGAGGCCAAG
	3_TSP_PSEN2	AGTGTGCTGGTGGGCAAG
NCSTN	5_TSP_NCSTN	GGTTGATGCTGAAGGTGCTC
	NCSTN_1_S	AAAGGGAGAACCAGCCGAAT
	NCSTN_1_AS	GGGGGCAATGAAAAGGAC
	3_TSP_NCSTN	CAGTGCCAGGATCCAAGTAAA
APH1	5_TSP_APH1	GGTGATCTTCCCTCCTCACT
	APH1_1_S	CGCTTTTCTTGATCACTGTGG
	APH1_1_AS	ACCCTCCACTTCACCTTGG
	3_TSP_APH1	CTATCCACCTTTCCGCTTTG
PSENEN	5_TSP_PSENEN	GGCCGGTAGATCTGGAAGA
	3_TSP_PSENEN	TTGCTTTCCTGCCTTTTCTC
5'-RACE Primer		GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT
3'-RACE Primer		CTGTGAATGCTGCGACTACGAT

Fig. 76. Primer list

(2) Comparative gene analysis

- 최근 연구결과에 따르면 vacuolar protein sorting (Vps) 유전자로 구성된 retromer complex가 퇴행성 뇌질환과 깊은 관련이 있는 것으로 보고됨

- 대표적인 퇴행성 뇌질환 중의 하나인 Alzheimer's disease의 환자에서 확인해 본 결과 retromer complex를 구성하는 vps 유전자의 발현이 감소되어 있었으며 그 결과 Aßeta가 상승되어 있다는 것을 확인하였음 (PNAS, 2008).

- 개, 인간, 영장류, 마우스, 랫 Vps29 gene의 full-length 서열 및 transcript variant서열을 locus specific PCR 및 RACE실험을 통해 결정하여 비교분석함

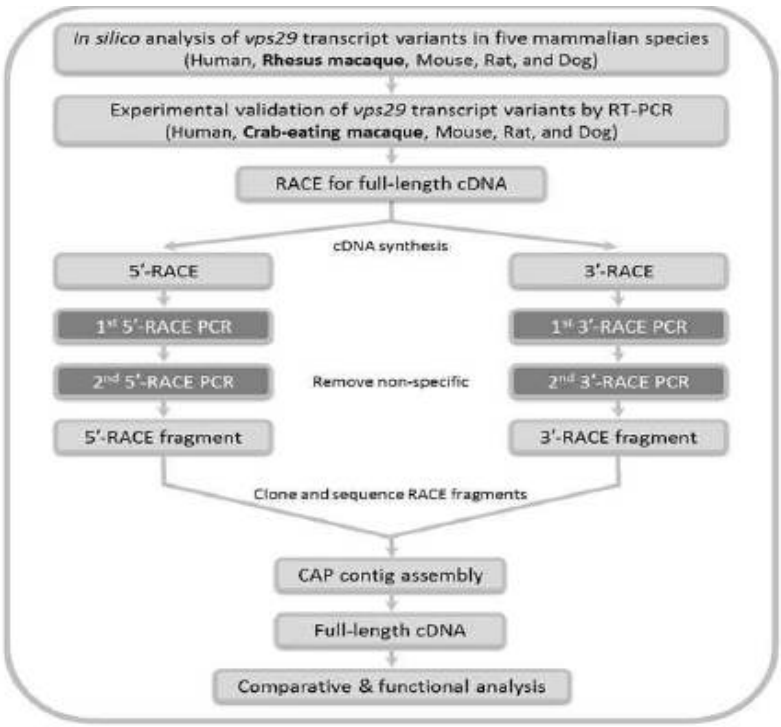


Fig. 77. Comparative analysis flow chart

- *In silico* 분석 결과 개는 4가지 타입의 전사체가 존재하는 것으로 알려짐, 하지만 4번째 타입의 경우 RT-PCR을 통한 validation실험에서 확인할 수 없었음

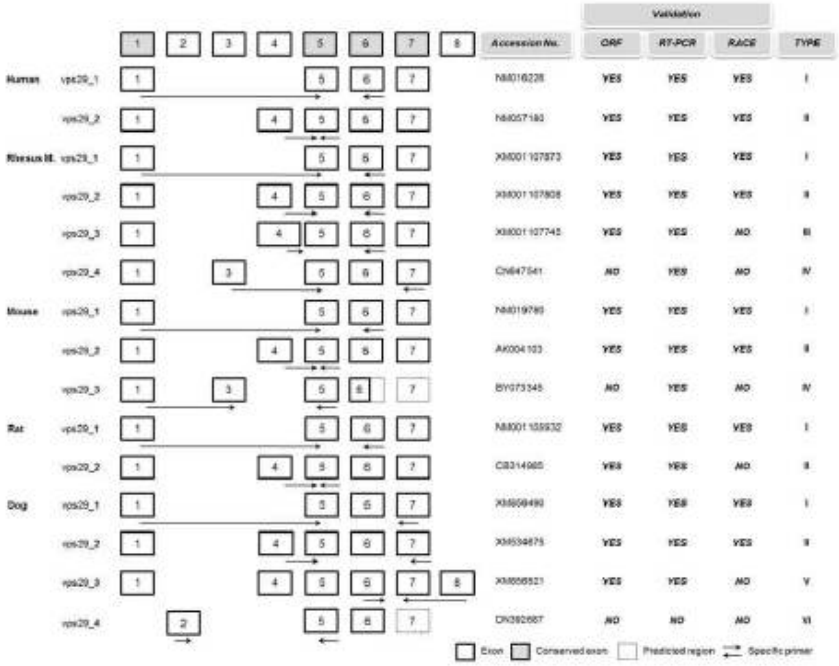


Fig. 78. Comparative gene structure analysis

- 5′RACE 및 3′RACE 실험을 통해 Full-length VPS29 유전자를 분석해본결과 종 별로 다양한 UTR영역을 가짐을 알 수 있음. 특히 전사의 효율에 큰 영향을 미칠 수 있는 5′UTR영역이 3′UTR영역에 비해 훨씬 더 많은 sequence diversity를 가짐을 알 수 있음

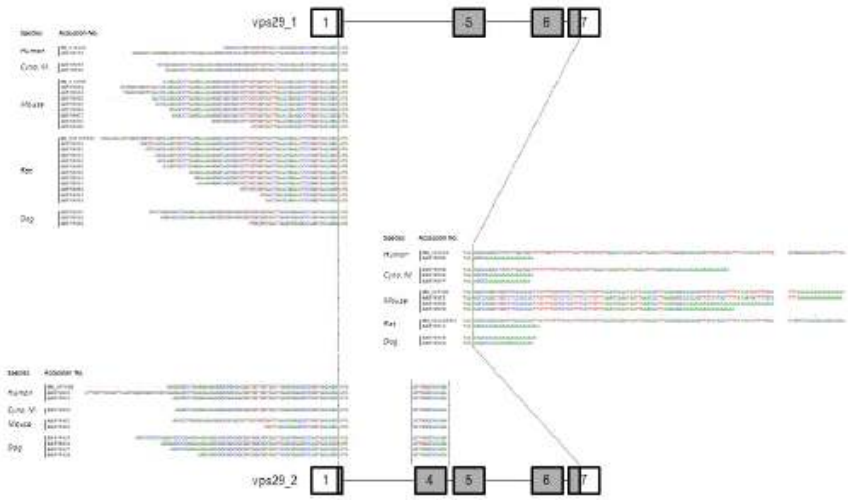


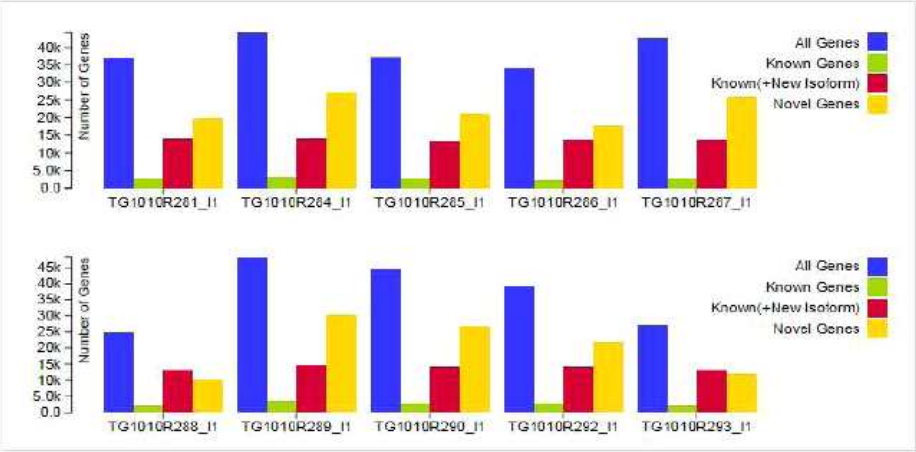
Fig. 79. 다양한 UTR영역의 VPS29 유전자

(3) 개 Unigene 완성

- 전체적으로 61597개의 개 unigene을 완성하였으며, 이들 중 절반가량은 기존에 Genbank에 보고되지 않았던 novel한 유전자이다. 또한 기존의 알려진 유전자의 경우도 새로운 alternative

splicing된 전사체가 발견된 것이 14,835개로 실제 개 유전자 연구가 아주 미비한 단계임을 반증하고 있다. 본 연구가 개 지놈의 전장을 완성하지는 못했지만 대량의 RNAseq 데이터를 바탕으로 Unigene을 완성함으로써 개와 관련된 다양한 연구 분야의 발전에 많은 기여를 할 것으로 생각됨.

Genes			
Sum	Known	Known(+new transcripts)	Novel
61,597	4,466	14,835	37,948



ID	Name	Gene				
		SUM	KNOWN	Novel	MOD	UNEXP
S0001	TG1010R281_I1	36,850	2,761	19,951	14,138	24,747
S0002	TG1010R284_I1	44,121	2,923	27,111	14,087	17,476
S0003	TG1010R285_I1	37,364	2,577	21,145	13,642	24,233
S0004	TG1010R286_I1	34,002	2,432	17,833	13,737	27,595
S0005	TG1010R287_I1	42,703	2,810	26,028	13,865	18,894
S0006	TG1010R288_I1	25,051	1,888	10,165	12,998	36,546
S0007	TG1010R289_I1	48,276	3,419	30,323	14,534	13,321
S0008	TG1010R290_I1	44,233	2,956	26,979	14,298	17,364
S0009	TG1010R292_I1	38,908	2,831	21,935	14,142	22,689
S0010	TG1010R293_I1	27,232	2,206	11,826	13,200	34,365

Fig. 80. Unigene summary

(4) 개 expression profiling분석을 통한 DEG 분석

- 총 10가지의 장기 조직 중 대뇌와 소뇌의 경우 두 조직 간의 비교 분석을 통해 differentially expressed genes을 분석하였다. 그 결과 발현양에 차이를 보이는 150개의 유전자를 동정하였다. DEG분석은 CUFDIFF를 이용하여 부석을 하였으며, 소뇌에서 up regulation 되는 유전자가 44개이며, 대뇌에서 up regulation되는 유전자가 106개이다.

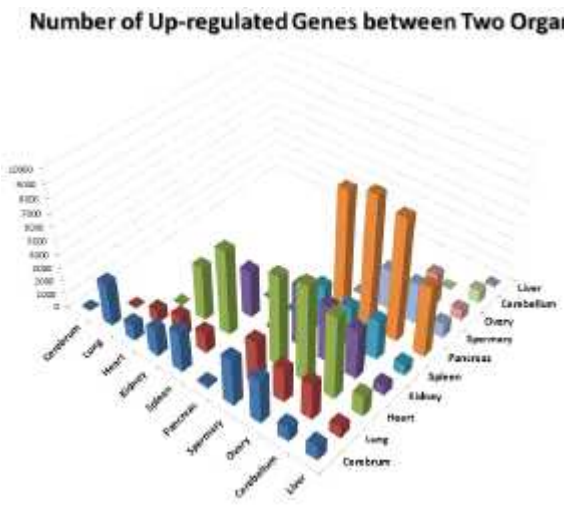


Fig. 81. Up-regulated genes

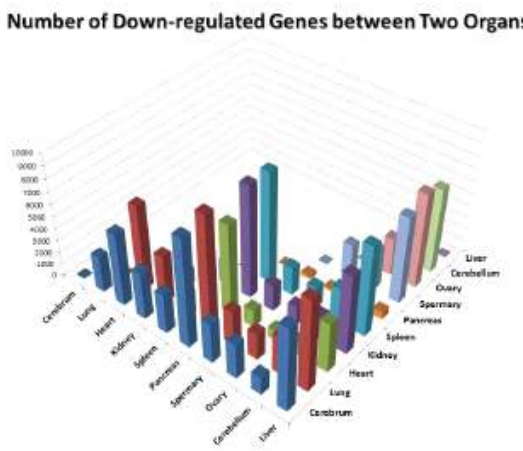


Fig. 82. Down-regulated genes

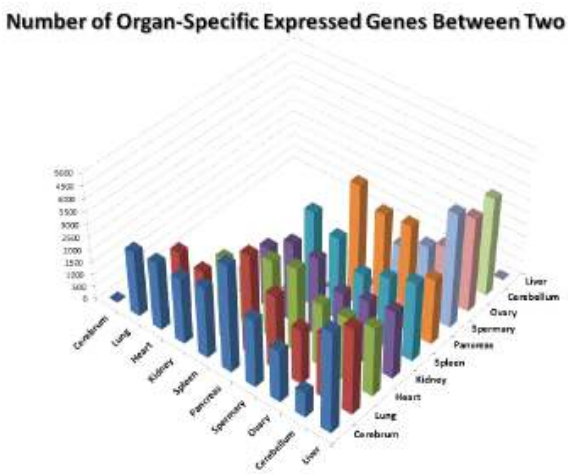


Fig. 83. Organ-specific expressed genes

No	Name	Genes	
		Up	Down
1	TG1010R281_l1 vs. TG1010R292_l1	44	106

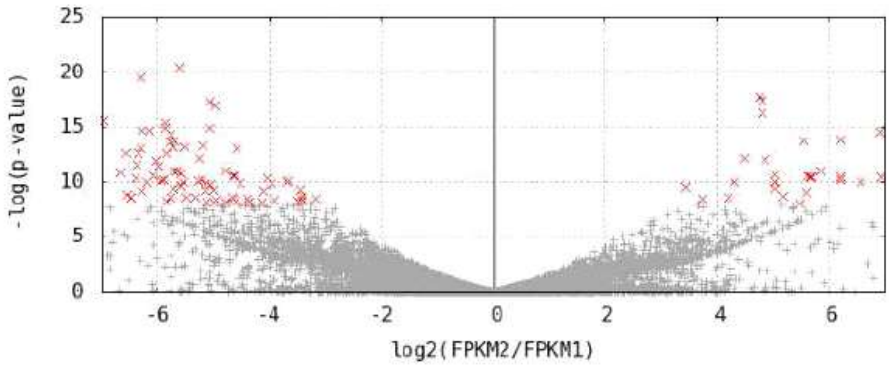


Fig. 84. DEG 분석

다. 개 조직 특이 유전자의 동정

- 기존에 밝혀진 Boxer의 지놈을 (Nature, 2005) reference로 사용하여 UCSC Genome Browser를 포맷으로 하여 유전자 분석 데이터베이스를 구축하였음. 지놈브라우저의 reference genome은 가장 최근에 업데이트된 2011년 버전을 사용하였음. 또한 사용자의 편의를 위해 UCSC 브라우즈의 사용법과 동일한 방법으로 유전자 분석이 가능하도록 Blat search 기능을 추가하였, 개 유전자 연구를 위한 데이터베이스를 완성하였음.

(접속 주소: http://dog.myomics.net/cgi-bin/hgGateway)

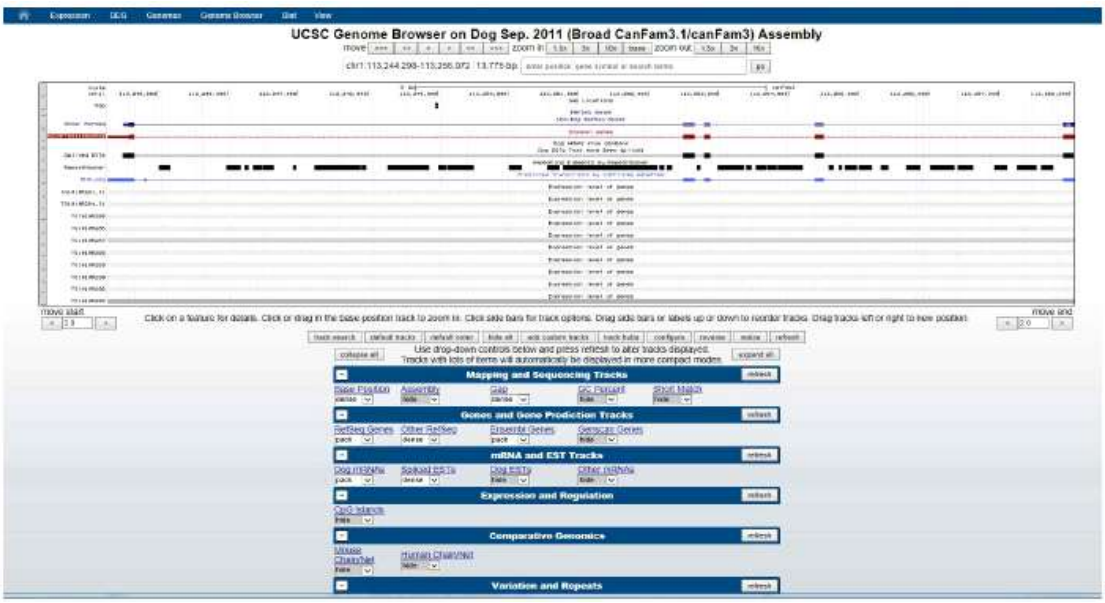


Fig. 85. 개발된 Genome Browser

- 완성된 지놈브라우즈는 유저가 원하는 유전자를 분석할 때 본 연구를 통해 만들어진 unigene의 구조 및 다른 지놈 과의 구조적 비교분석 데이터까지 제공하고 있으며, 조직별 발현양의 차이까지도 음영의 차이를 활용하여 실시간으로 인지할 수 있도록 인터페이스를 만들었

다. 그리고 특정 유전자의 이름을 알지 못하고 DNA 또는 RNA 일부분의 서열만을 알게되었을 경우도 Blat search 를 이용하여 동일한 방식으로 활용할 수 있다.

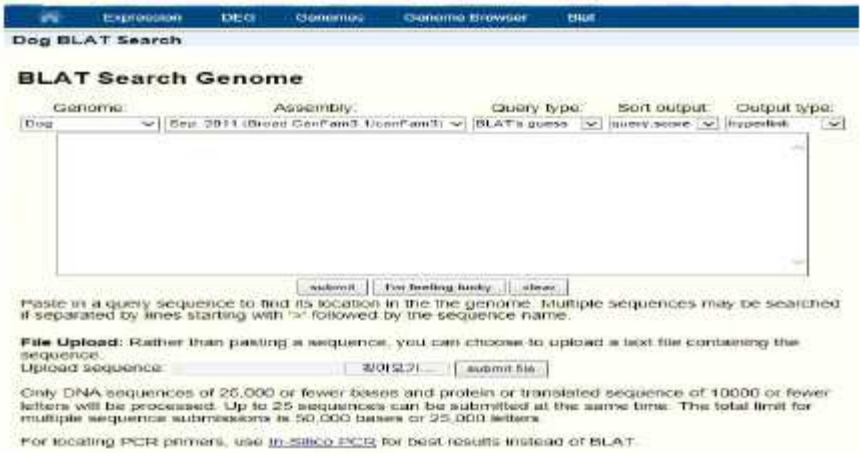


Fig. 86. 개발된 Blat search tool

라. DJ-1 transgenic 개와 정상 개의 전사체 비교 분석

- DJ-1 TG 개와 정상개와의 전사체 비교 분석을 위해 두 개체로부터 혈액을 추출하여 전사체 비교 분석을 수행하였음. RNA-seq 실험 수행시 가장 중요한 것은 샘플 RNA의 quality 이므로 엄격한 기준을 적용하여 여러 샘플 RNA를 test하여 전체 RNA중 90%이상이 complete한 상태로 존재하는 것만 최종 선정하여 실험에 착수함.

NO.	Delivery ID	Theragen ID	BA _Conc. (ng/ul)	RIN value	28s/18s ratio	Sample Vol.(ul)	BA 기준 _총량(ug)	260/280	결론
1	B1	T1209R509	173	9.3	1.9	35	6.06	2.06	A
2	T1	T1209R510	231	9.4	1.8	35	8.08	2.05	

Fig. 87. 정상개와 TG개의 샘플 정보 및 QC

< Bioanalyzer 결과 사진 >

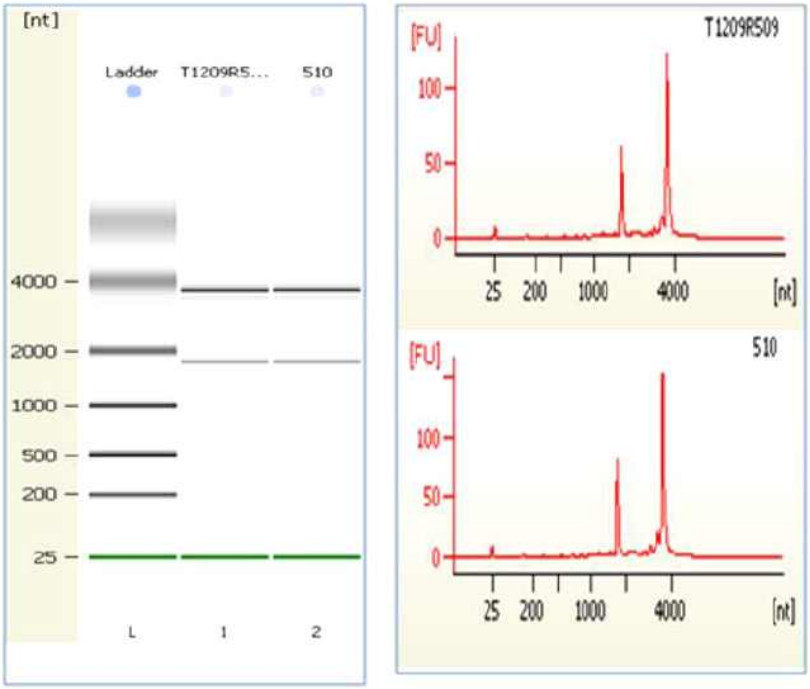


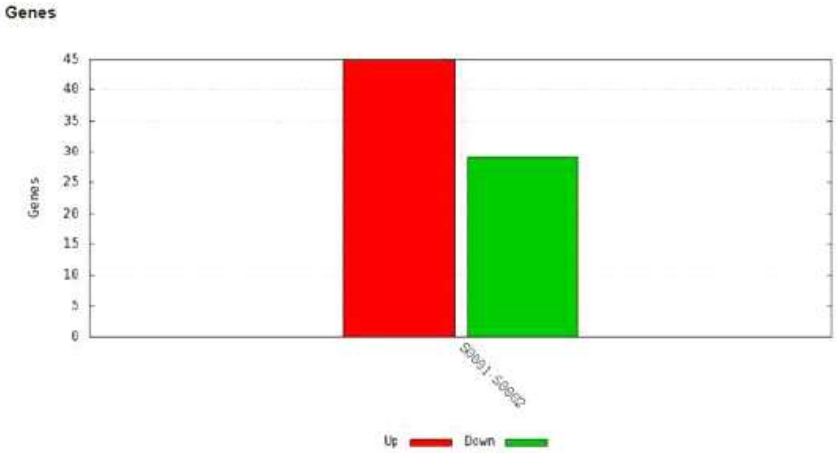
Fig. 88. 샘플 quality 분석을 위한 Bioanalyzer결과 사진

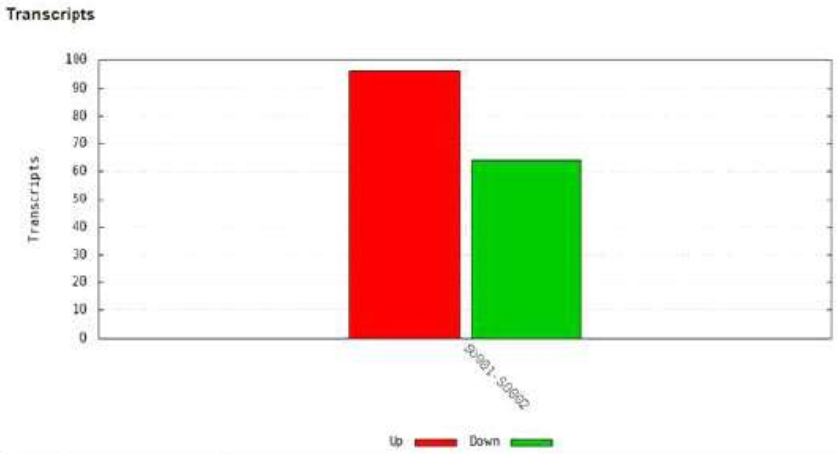
- DJ-1 TG 개와 정상개의 RNA-seq 분석을 통해 나온 결과물을 활용하여 두 전사체사이에서 DEG를 찾기 위해 얼라이먼트를 실시

No	ID	Name	Total	Mapped	PROPER	READ 1 / READ 2	Strand(+) / Strand(-)	Splice
1	S0001	T1209R0509	68,649,021	63,152,047 (92.0%)	46,417,352 (67.6%)	29,026,405 28,740,828	28,871,275 28,895,958	17,527,837 (25.5%)
2	S0002	T1209R0510	66,138,932	61,141,645 (92.4%)	42,034,854 (63.6%)	26,300,519 26,058,214	26,172,819 26,185,914	16,489,261 (24.9%)

Fig. 89. 얼라이먼트 summary

- DEG분석을 실시하여 분석한 결과 DJ-1 TG개에서는 45개의 유전자가 up regulation이 되었으며, 29개의 유전자가 down regulation이됨.





No	Name	Genes		Transcripts	
		Up	Down	Up	Down
1	S0001-S0002	45	29	96	64

Fig. 90. DEG분석

- DEG분석된 유전자를 이용하여 Gene Ontology분석을 실시한 결과, molecular function의 경우 DJ-1 TG개에서 binding 및 catalytic activity 카테고리에 속하는 유전자들이 많이 관련된 결과를 보여주었으며, biological process의 경우 biological regulation, cellular process, metabolic process, regulation of biological process 카테고리에 많은 유전자들이 속하는 결과를 보여주었다.

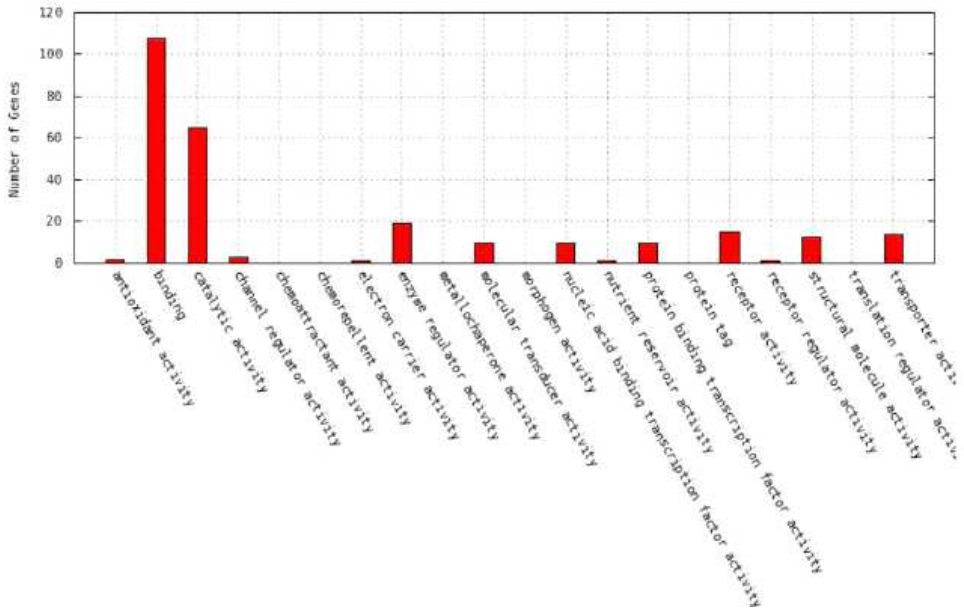


Fig. 91. Molecular function 분석 결과

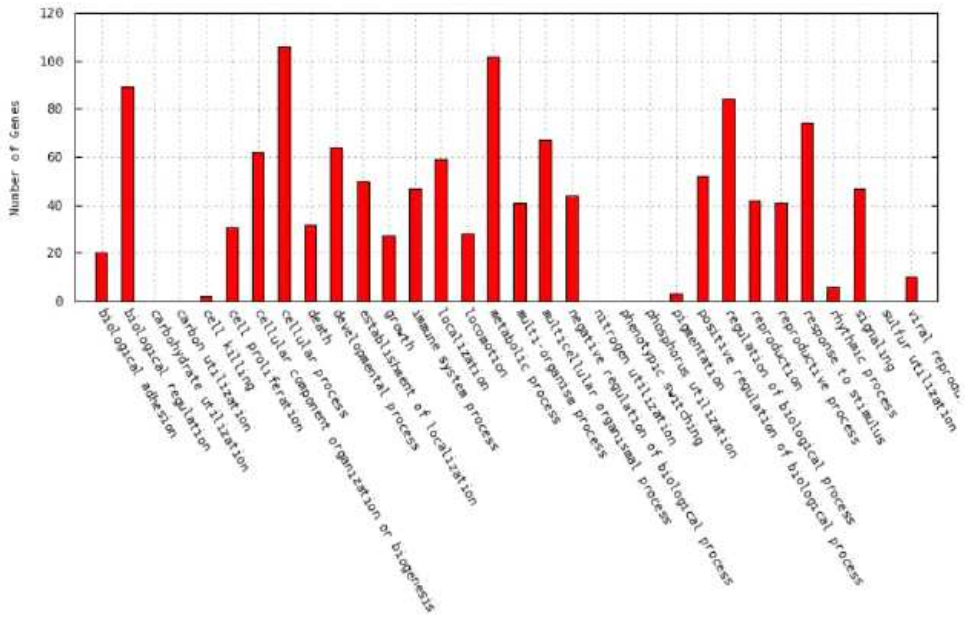


Fig. 92. biological process 분석 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2010	**효율적인 복제 개 배아 생산**	최적의 성숙난자 채취 시스템구축
			과배란 및 발정동기화 기술 개발
			세포별 복제 배아 생산 효율 비교
		유전자적중 벡터 생산	뇌질환 관련 유전자 genomic DNA 확보
			유전자지도 분석 및 targeting vector 제작
			완성된 벡터의 세포 수준에서 확인
		형질전환 세포주 개발	human 알츠하이머병 관련유전자 cDNA 확보 및 family alzhimer's disease mutant APP 제작
			형광과 알츠하이머병 관련 유전자가 개별적으로 각각 동시에 발현되는 lentiviral vector 제작
			인간 질병 모델에 이용할 수 있는 207개 중 알츠하이머병 관련 유용 유전자의 분석
			Lentiviral vector를 이용한 amyloid-β 생성 및 응집체 형성 개의 체세포주 확립
		개 유전자 동정	개 조직별 유전자 동정
			개 reference gene 동정
			comparative gene analysis
2차년도	2011	**복제 배아 대리모 이식 및 파킨슨 형질전환 개 생산**	우수한 복제 배아 생산시스템 구축
			형질전환 세포주이용 파킨슨 질환모델 개 생산
		질환모델 유용유전자 탐색	DJ-1의 glyoxalase 기능 입증
			cDJR1.1, 1.2의 조직 국재화(localization)
			세포와 선충에서의 DJ-1 역할
			선충에서의 cDJRs의 도파민 뉴런 보호 기능
			파킨슨병 유도물질 탐색
			파킨슨병 모델 생쥐에서의 운동성 측정
			파킨슨병 치료 물질 탐색
		형질전환 기술 개선 및 평가	알츠하이머병 관련유전자의 발현 세포주의 평가 및 도입 조건 확립
			다양한 발현 세포주에 따른 형질전환효율 평가
			배아수준에서의 형질전환효율 검증
		개 전사체 profiling	개의 전사체 profiling
			개 조직 특이 유전자 동정
			개 transcriptome 및 유전자 데이터베이스 구축
3차년도	2012	**형질전환 질환모델 개 생산**	파킨슨병 유전자 적중 복제 개 생산
			알츠하이머병 형질전환 복제 개 생산
		복제견의 신경질환 발현 평가	복제 개의 유전자 도입 및 발현 검증
			유전자 적중 개 형질 변화 조사
			알츠하이머 신경계질환 형질전환개의 행동학적 검증
		복제견의 퇴행성뇌질환	미토콘드리아의 모양변화를 실시간으로 관찰 가능한 형광발현 시스템 구축

		분자병리학적 평가	Blasticidin 저항 유전자와 swedish-type APP 유전자가 동시에 발현되는 세포주 확립
		개 질환모델 분석 시스템 구축	개 유전정보 지원 infra 시스템 및 유전자 분석 시스템 구축
			퇴행성 신경 질환 모델연구 지원용 DB 구축

2. 계획대비 달성도

구분	연구개발의 목표	달성내용	달성도(%)
1차년도 (2010)	**효율적인 복제 개 배아 생산**	- 혈중 progesterone(P4) 농도를 측정하여 배란적기를 판정: 75.21%의 성숙난자 회수	100
		- PMSG와 hCG를 이용하여 배란 유도: 개체당 평균 36.3개의 난자 회수(보통 개체당 10.3개)	
		- 임신30일령의 태아세포, 지방유래의 중간엽줄기세포, 양수유래의 중간엽줄기세포 및 cDJ-1 TG 세포주를 체세포복제에 사용: 태아유래의 세포주가 융합율이 높음 - 세포주에 Ateoside 처리: 높은 세포주기 동기화, 세포의 사멸과 ROS의 감소 효과	
	유전자적중 벡터 생산	- 개의 유전자 지도 분석을 통한 뇌질환관련 유전자 DNA 확보	100
		- 사람의 DJ-1 유전자를 레트로바이러스 벡터에 클로닝: FACS를 이용한 레트로바이러스 정도 측정, Western blot을 이용한 사람의 DJ-1 발현 관찰	
		- 개의 DNA를 template로 한 적중 벡터 구축 - DNA 염기 배열 결정과 제한효소 맵핑를 이용한 벡터 조성 확인	
	형질전환 세포주 개발	- Human cDNA library에서 wild type APP를 Gem-T easy벡터를 이용하여 클로닝: sequencing을 통하여 재검증 실시	100
		- Site specific point mutagenesis방법을 통하여 wild type APP 유전자를 알츠하이머병을 유도할 수 있는 swedish type APP로 제작: sequencing을 통하여 재검증을 실시	
		- lentiviral vector를 사용하여 형광과 알츠하이머병 관련 유전자를 각각 다른 promoter를 사용하여 (CMV promoter와 EM7 promoter) 유전자의 발현을 분자/면역학적 방법으로 확인: 형광유전자의 발현은 confocal 장비를 이용하여 발현을 재검증 - 기존에 문제가 되어왔던 하위유전자의 발현이 약화되는 현상은 이러한 dural promoter 시스템에서는 발생되지 않음.	
		- 형광과 swedish type APP 유전자가 동시에 발현되는 Lentiviral vector를 이용하여 염색체 삽입에 의한 유전자의 안정적인 발현을 유도: 분자/면역학적 방법을 통하여 재검증 - swedish type APP유전자에 V5 tag 유전자를 클로닝하여 세포주 생산 시스템 구축: 보다 편리하게 형광현미경 아래에서 형질전환 세포주를 이용한 핵치환 및 분석이 가능	

	개 유전자 동정	- 7개 조직 약 3억 5천만 read의 raw data 확보	100
		- 유전자 발현의 정량적 분석을 위해 reference gene 동정 및 비교 분석을 수행	
		- 레트로머 유전자의 비교 분석 (인간, 영장류, 마우스, 개, 랫)	
2차년도 (2011)	**복제 배아 대리모 이식 및 파킨슨 형질전환 개 생산**	- TG cell line의 복제효율 향상을 통해 우수한 복제란을 다량생산할 수 있는 기술 개발 - 이식할 대리모의 상태 및 호르몬 변화에 맞춰 이식효율 증대 도모 - 대리모에 최소한 스트레스와 임신효율 향상을 위한 이식 시스템 개발	100
		- hDJ-1 형질전환 세포주를 이용한 배아생산과 효율적 이식시스템을 통해 파킨슨 질환모델 복제개 생산	
	질환모델 유용유전자 탐색	- DJ-1의 glyoxalase 활성과 효소 반응생성물의 측정 - 조직과 세포내의 cDJR1.1, 1.2 의 localization 관찰 - 세포와 선충에서의 DJ-1 역할 규명: DJ-1의 유무에 따른 생존능과 세포사 시그널 확인과 ROS level 측정 - 선충에서의 cDJRs의 도파민 뉴런 보호 기능: 도파민 뉴런 퇴화 관찰 - 파킨슨병 유도물질 탐색: 흑질 치밀부에서의 도파민 뉴런 퇴화 관찰 - 파킨슨병 모델 생쥐에서의 운동성 측정: 도파민 뉴런의 손상이 생쥐의 운동성에 미치는 영향을 확인 - 파킨슨병 치료 물질 탐색: 도파민 뉴런의 손상을 보호하는 치료물질 탐색	100
	형질전환 기술 개선 및 평가	- 알츠하이머병 관련유전자의 형질전환 세포주의 평가 및 도입 기준을 구축 - Lentiviral vector의 고농축을 통하여 높은 titer로 생산 가능 조건 확립 - 높은 titer의 Lentiviral vector를 이용하여 알츠하이머병 관련 유전자의 발현 개 체세포주를 안정적으로 확립 가능한 시스템을 구축하고, V5 tag을 통한 분자/면역학적 검증 및 GFP 형광단백질 발현을 통하여 세포주의 평가가 가능	100
		- 형질전환 질환 개 모델을 작성하기 위한 최적의 세포주 확립 및 발현 평가 확립 - 대동물의 개의 줄기세포 뿐만 아니라 사람의 줄기세포에서도 발현이 되는 조건을 확립 및 검증	
		- 형질전환 질환 개 모델의 효율을 높이기 위한 생식세포에서의 발현 검증을 통하여 최적의 형질 전환 모델 시스템을 구축 - 알츠하이머병 질환 개의 모델을 평가하기 위한 분자/면역학적 방법을 체계화하고, 실시간으로 형광	

		발현을 통한 형질전환이 확인 가능한 시스템을 확립 - 알츠하이머병 질환을 유도하는 원인 물질을 분석하는 시스템 구축 및 최적화 확립	
	개 전사체 profiling	- 개 전사체 profiling의 validation실험에 필수적인 개 reference gene의 동정 및 selection - 10개 조직 (대뇌, 폐, 심장, 신장, 비장, 췌장, 정소, 난소, 소뇌, 간)에서 발현 되는 전사체들을 동정하고 발현 양상을 비교 분석하기 위해 추가 1억 7천만 read의 data 확보 (전체적으로 5억 2천만 read)	100
		- 알츠하이머병, 파킨슨질병의 중요 candidate유전자의 full-length cDNA를 동정 및 분석중 (알츠하이머병 관련 12개 유전자 동정 완료) - 10개 조직에서 발현되는 유전자들의 전사체를 상호 비교하여 조직 특이적인 발현양상이 다른 특이 유전자 동정 작업을 수행	
		- 개 transcriptome 및 유전자 데이터 베이스 구축을 위해 현재 대량의 전사체 데이터 분석	
3차년도 (2012)	**파킨슨 형질전환 복제개의 후대 생산과 알츠하이머병 형질전환 복제개의 생산**	- 파킨슨 형질전환 복제개의 정액을 이용하여 암컷 비글견에 인공수정 실시: 2마리의 산자 생산	100
		- 알츠하이머병 형질전환 복제개 생산: 1마리의 대리모에 3마리의 태아 확인(8월 12일 분만예정)	
	복제견의 신경질환 발현 평가	- 다우어(Dauer) 상태에서 선충의 DJR-1.2 단백질 발현 증가, glyoxalase의 활정 및 치사율 비교 - 다우어 유도 조건인 starvation 상태에서 DJR-1.2 발현 증가 확인: DAF-16에 의해 조절	100
		- 파킨슨 형질전환 복제개의 검증: microsatellite 분석과 mitochondria DNA 분석을 통해 복제개 임을 확인 - 복제개에서 hDJ-1 단백질의 발현 확인 - 복제개의 chromosome 상에 integration site 확인: inverse PCR을 통해 flag tagged hDJ-1이 chromosome 9번에 삽입됨을 확인	
		- 형질전환 복제개의 생식선전이 확인: 2마리 산자로부터 DNA를 추출하여 PCR 수행결과 2마리 모두 hDJ-1 gene을 갖고 있음을 확인	
	복제견의 퇴행성뇌질환 분자병리학적 평가	- 미토콘드리아의 모양변화를 실시간으로 관찰 가능한 형광발현 시스템 구축	100
		- Blasticidin 저항 유전자와 swedish-type APP 유전자가 동시에 발현되는 Lentiviral vector (pLenti6.3)를 이용하여 세포주 확립	
	개 질환모델 분석 시스템 구축	- 개 unigene 완성: 전체적으로 61597개의 개 unigene 완성(절반가량은 기존에 Genebank에 보고되지 않았던 novel한 유전자) - 개 조직 특이 유전자의 동정: 개 유전자 연구를 위한 데이터베이스를 완성	100
		- DJ-1 transgenic 개와 정상 개의 전사체 비교 분석: DEG 분석을 실시하여 파킨슨 형질전환 복제개에서 45개의 유전자가 up-regulation, 29개의 유전자가 down-regulation 됨을 확인.	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 활용방안

가. 과학 기술적 활용 방안

현재까지 인체질환의 모델구축은 배아줄기세포 유전자 적중이 용이한 생쥐를 중심으로 진행되어왔다. 그러나 인체 뇌질환의 경우 인간과 생쥐는 진화·발생적으로 상당한 거리가 존재하여 생쥐는 그 모델로의 한계를 보유하고 있으며 학습과 행동 분석에 현실적 어려움이 존재한다는 것은 잘 알려진 사실이다. 그리하여 원숭이 다음으로 행동 및 학습의 관찰이 용이한 개를 이용하여 뇌질환 관련 유전자 적중을 시도하고 유전자 적중 개를 제작한다면, 그 학문적·의학적 임팩트는 매우 크다고 할 수 있다. 또한 **복제 동물 생산 효율 향상을 위한 메커니즘 및 복제동물의 유전적 결함여부 등을 규명**함으로서 학문적 발전을 기할 수도 있다. 결론적으로 보았을 때 본 과제가 추구하는 **"개의 체세포에서 유전자 적중 기술 확립"**과 **"핵치환을 통한 유전자 조작 개의 제작"**, "유전정보 분석 기반구축"은 인체뇌질환 모델 확립 기술뿐만 아니라 개 질환 연구 분야의 전반적인 학문적 발전을 위해서도 매우 중요하다고 할 수 있다.

나. 경제 산업적 활용방안

지난 50년간 인간의 수명이 연장되면서 노화 관련 뇌질환 및 신경질환이 늘고 있으며 전 세계 인구 5명 중 1명 이상이 스트레스와 우울증으로 고통 받고 있다. 2005년 7개 주요 제약시장에서 전체 20%에 달하는 인구가 뇌질환 및 신경질환을 겪고 있으며, 알츠하이머병을 비롯한 치매 환자 수는 전 세계적으로 약 3천만 명 정도이며 의료비용은 300조원으로 추정된다. 뇌신경 질환 관련 의약품 세계 시장은 2005년 923억 달러 규모를 형성하고 있고, 이 중 연평균 시장 증가율이 높은 질병으로는 알츠하이머 (34.5%)와 파킨슨병 (12.9%)이 있다. 하지만 베이비붐 세대가 60~70세에 접근함에 따라 시장 규모는 증가할 것으로 예상된다. 실제로 우리나라도 2007년 건강보험공단 조사에서 지난 4년간 파킨슨병으로 등록된 환자는 50% 이상 늘어났다고 보고되어, 퇴행성뇌질환에 대한 사회적 관심도가 매우 커지고 있으며 이와 관련된 의료분야의 역할이 날로 중요해지고 있다. 따라서 본 연구진은 이런 세계적인 의약품 시장 추세에 발맞춰 인간과 유사한 치료반응을 관찰할 수 있는 인체 뇌질환 모델견을 구축하고, 이를 활용한 **분자병리기작 연구 및 타깃 신약 발굴 기반을 확립함으로써 뇌질환 관련 산업에서 부가가치를 창출**할 수 있을 것이다.

2. 기대성과

- 현재 신경계질환 모델동물의 주종을 차지하고 있는 마우스 시장은 연간 한국 10억 원, 세계 6,000억 원에 이르고 있음
- 마우스 시장을 대체할 유일한 복제 개 생산은 이 보다 5~10배 수준에 이를 것으로 예상되며, 뇌질환 관련 산업에서의 부가가치는 최고 연간 6조원 정도의 시장을 창출할 수 있는 블루오션으로 지목되고 있음
- 신약개발을 위한 질환 모델동물 생산의 새로운 패러다임을 창출하여 전 임상 기간의 단축 및 우수한 신약개발에 기여

- 국제적 기술선점을 통한 지적재산권 확보 및 고부가가치 산업으로 뇌질환 신약개발의 선두국가 도약
- 개 유전자 정보 분석 tool 개발을 통해 질환 모델 개 연구 분야의 유전자 선점효과 및 개 연구 분야 선도국가 도약

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

개의 경우 번식 생리의 특성상 난자의 체외배양연구는 아직도 미개척 분야로 남아있기 때문에, 세계적으로 왕성한 연구가 진행되고 있다. 2006년 이탈리아의 Luvoni GC 등이 개과 동물 난자의 체외성숙을 위한 배양 방법을 연구하는 한편, 개와 고양이 난자의 발달 연구에서 최근 진보된 점에 대해 정리하였다. 미국의 Bolamba는 Epidermal growth factor(EGF) 등은 2006년 다양한 호르몬의 첨가가 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대해 연구하여 보고하였다. 최근 2007년 Rodriques 등이 신선하고 냉각된 동일종의 정액으로 수정된 개 난자의 시험관 내 난할에 미치는 성숙 배지의 영향에 대해 연구하였고, 캐나다 그룹에서는 Songsasen 등이 pyruvate와 glutamine가 개 난자의 체외 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

최근 복제동물에서의 미토콘드리아 DNA 연구는 2005년 St John JC 등이 중복 핵이식란으로부터 mtDNA가 어떻게 자손에게 전달되는지를 밝히는 연구를 수행하였고, Jiang Y등도 2006년에 핵이식 이후 공여세포의 mtDNA의 존재여부를 확인한 결과를 보고하였다. Takeda K등은 2006년에 복제돼지에서, 같은 해 Li Y등은 이종간의 핵이식에서 mtDNA에 관한 연구를 수행하였다.

파킨슨병 관련 연구는 미국의 코넬대학에서 설치류를 대상으로 파킨슨질환모델을 생산한 보고가 있다. 이는 사람의 leucidin-rich-repeat-kinase2(LRRK2) 단백질을 변형시켜 정자매개의 형질전환을 실시하여 N551, I723, R1398, R1441, R1514, P1542, R1628, M1646, S1647, M1869, G2019, G2385, and T2397의 아미노산 그룹을 선택적으로 작동을 불능시키도록하는 기능을 개발하였다. 하지만 마우스에서는 표현형이 관찰되지 않는 단점을 보였다. Aarhus University에서는 돼지에서 유전적으로 우성으로 나타나는 퇴행성신경질환모델을 개발하였으나 이는 자연적으로 발생되는 신경질환을 발견한 것에 불과하였다. 또한 Kampavata AB(WO 2006/004552)는 도파민 뉴런의 기능을 상실하게하여 호흡기능의 퇴화를 유도하였다는 보고가 있었으나 처음 파킨슨모델을 대상으로 한 실험이 호흡변화에 관여한다는 내용이었다.
알츠하이머병관련 연구는 2011년 Gonalez-Martinez A가 개에서 자연적으로 발생한 노화 동물모델에서 마밀로이드베타의 종류 및 양에 따른 인지기능 차이를 확인하였다. 이는 알츠하이머 관련 유전자를 인위적으로 발현시킨 것이 아닌 노화된 개에서 실험한 것으로 형질전환 모델이 아닌 것이 차이점이다. 또한 마우스에서 2007년 일본특허에 β-amyloid precusor protein (β APP) gene이 포함된 알츠하이머 관련 유전자를 삽입한 형질전환 마우스를 생산하는 방법 및 뇌에서 amyloid가 생성되어 뇌질환을 관찰하는 방법에 대한 출원이 있었다. 이는 본 연구와 목적 유전자가 같으나 퇴행성 뇌질환의 표현형은 관찰되지 않았다는 차이점이 있다.

그밖에 형질전환 동물에 관한 연구는 그 용이성 때문에 마우스에서 가장 활발하게 이루어지고 있으나, 마우스는 사람과 유전적, 생리적으로 차이가 크다는 단점이 있다. 따라서, 임상목적의 질병 기전연구나 치료연구에 응용하기 위해, 비설치 동물의 형질전환 연구가 필요한 상황이다. 특히, 개와 고양이는 인간의 질병과 유사성이 높은 동물일 뿐 아니라, 유전적으로도 가깝고, 지능이 높고 사람과 친숙하여 실험동물로 다루기 수월한점 등 여러 가지 장점이 있다. 그러나 해외에서는 아직 해당 동물의 복제 기술이 국내를 따라오지 못하는 상황이기 때문에, 개나 고양이를 이용한 복제 형질전환 연구는 거의 보고 되지 않고 있다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

- Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Velascoand I, Camacho-Arroyo I. Progesterone Increases Dopamine Neurone Number in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. J Neuroendocrinol. 2009. 21(8):730-736
- Flames N, Hobert O. Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. nature. 2009. 458:885-889
- German DC, Yazdani U, Speciale SG, Pasbakhsh P, Games D, Liang CL. Cholinergic neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. J Comp Neurol. 2003 Aug 4;462(4):371-81.
- Hedlund E, Perlmann T. Neuronal cell replacement in Parkinson''s disease. J Intern Med. 2009. 266(4):358-371
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci. 2004. 117:4411-4422
- Kalinowska A, Losy J. PECAM-1, a key player in neuroinflammation. Eur J Neurol. 2006 Dec;13(12):1284-90.
- Loring JF, Paszty C, Rose A, McIntosh TK, Murai H, Pierce JE, Schramm SR, Wymore K, Lee VM, Trojanowski JQ, Peterson KR. Rational design of an animal model for Alzheimer's disease: introduction of multiple human genomic transgenes to reproduce AD pathology in a rodent. Neurobiol Aging. 1996 Mar-Apr;17(2):173-82.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of genesilencing in mammalian embryonic stem cellsand preimplantation embryos. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Feb 19;99(4):2140-5.
- Sarasa L, Gallego C, Monleón I, Olvera A, Canudas J, Montañés M, Pesini P, Sarasa M. Cloning, sequencing and expression in the dog of the main amyloid precursor protein isoforms and some of the enzymes related with their processing. Neuroscience. 2010 Dec 29;171(4):1091-101. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.042. Epub 2010 Sep 27.
- Sarasa M, Pesini P. Natural non-trasgenic animal models for research in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2009 Apr;6(2):171-8.
- Schulz TC, Noggle SA, Palmarini GM, Weiler DA, Lyons IG, Pensa KA, Meedeniya AC, Davidson BP, Lambert NA, Condie BG. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Dopaminergic Neurons in Serum-Free Suspension Culture. Stem Cells. 2004. 22(7):1218-1238
- Shinohara H, Wang F. Real-Time Detection of Dopamine Released from a Nerve Model Cell by an Enzyme-Catalyzed Luminescence Method and Its Application to Drug Assessment. Anal Sci. 2007. 23(1):81-84

- Van Dam D, De Deyn PP. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. Nat Rev Drug Discov. 2006 Nov;5(11):956-70.
- Winner B, Desplats P, Hagl C, Klucken J, Aigner R, Ploetz S, Laemke J, Karl A, Aigner L, Masliah E, Buerger E, Winkler J. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. Experimental Neurology. 2009. 219:543-552
- Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharmacol Ther. 2000 Nov;88(2):93-113.
- Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, Du Z, Werbel B, Valliere C, Pearce RA, Thomson JA, Zhang SC. Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells. 2005. 23(6):781-790

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.