

최 중  
연구보고서

젖소 초유 중의 유용 유전자원(IGF)의  
탐색 및 누에를 이용한 생명공학적인  
생산 활용 기술의 개발

Investigation of available genetic resources(IGF) in bovine  
colostrum and development of biotechnological production  
and application technique by utilization of silkworm

연구기관  
성균관대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “젓소 초유 중의 유용 유전자원(IGF)의 탐색 및 누에를 이용한 생명공학적 생산 활용 기술의 개발“ 과제 의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8 월 7 일

주관연구기관명 : 성균관대학교

총괄연구책임자 : 이 수 원

1세부연구책임자 : 이 수 원

연 구 원 : 양 희 진, 황 경 아, 김 현 주

2세부연구책임자 : 서 동 상

연 구 원 : 전 형 욱, 김 현 진, 박 하 영

협동연구기관명 : (주)한국메디칼푸드 생명공학연구소

협동연구책임자 : 강 병 선

연 구 원 : 공 성 희, 이 수 연, 차 승 실

# 요 약 문

## I. 제 목

젖소 초유 중의 유용 유전자원(IGF)의 탐색 및 누에를 이용한 생명공학적인 생산 활용 기술의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 수유실태는 도시의 경우 63.6%가 조제분유에 의존하고 있다. 또한 출산 직후부터 조제분유에만 의존하여야 하는 경우가 급격히 증가하고 있어, 신생아의 정상적인 발육을 위한 초유의 중요성이 더욱 크게 대두되고 있는 실정이다. 그러나, 일반적으로 시판되고 있는 상업용 조제분유에는 생리활성인자, 특히 IGF가 발견되지 않고 있다. 이는 가공과정 중에 IGF가 파괴되거나 열변성 되었음을 의미하는 것으로, 신생아의 정상적 성장을 위해서는 천연상태의 IGF의 첨가가 매우 중요하다고 할 수 있을 것이다. 이러한 시대적 요구에 부응하기 위하여, 본 연구진은 유용 유전자원이 다량으로 함유되어 있지만 대부분 폐기 처분되고 있는 초유의 이용가치를 높이는 동시에 유전자공학적 기법에 의한 IGF 생산시스템을 확립하고자 한다.

최근 유전공학의 발전으로 사람의 인슐린을 비롯한 유용물질이 대장균에서 대량 생산되고 있다. 대장균에서의 유용물질 생산은 생산원가가 저렴하다는 장점이 있으나, 고등생물 post-translational modification 기능을 갖고 있지 않아, 고등생물의 대부분의 효소와 같은 산물들은 대장균에서 만들어지면 생체 내 활성을 갖지 않는다는 단점이 있다. 그러나 누에는 고등생물로써 대장균이 갖고 있지 않는 splicing이나 post-translational modification 기능을 갖고 있어 생리활성물질이나 고등생물의 효소와 같은 유용물질의 대량생산에 적합하다. 그리고 누에는 개체가 크고 잠업이라는 대량생산 체제를 이미 갖추고 있어 유용물질의 대량 생산이 바로 가능하다.

일반적으로 식용으로 이용하고 있는 누에를 이용함으로써, 발견된 IGF-I을 정제 하

여 사용하는 것은 물론이고, 정제하지 않은 상태의 누에분말을 이용할 수도 있어, 그 효용가치는 매우 크다고 할 수 있을 것이다.

또한 국내의 잠업은 오랜 역사와 전통을 가지고 있으나, 국내 인건비 상승과 같은 국내 여건의 변화와 후개발 도상국의 값싼 인건비로 생산되는 값싼 고치의 수입에 의해 국내 잠업은 매우 어려운 실정이다. 그러므로 앞으로 국제 시장에서 국내 잠업이 우위를 차지하기 위해서는 중국과 같은 개발도상국이 생산할 수 없는 고부가가치의 누에를 생산하는 전략이 시급하다. 국내의 우수한 잠사기술이나 최근에 연구되어지고 있는 누에의 분자유전학적 기술을 바탕으로 고부가가치 누에를 생산할 수 있는 형질 전환 누에를 창출하는 기술을 확립하고, 그 품종을 확보하는 것은 매우 중요하다.

이와 같이 우유의 생리활성물질과 누에의 접목으로, 국내 우유 및 식품산업은 물론이고 잠업농가의 고부가가치 산업으로 정착시킬 수 있는, 일석이조의 효과를 기대할 수 있는 본 연구는 그 의미가 매우 크다고 할 수 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 세부과제 : IGF-I의 생리화학적 특성 검증

초유 중의 생리활성 인자의 검색

- 초유의 분획 및 IGF-I의 농축
- SDS-PAGE 및 immunoblotting 등에 의한 IGF-I의 검색

초유중의 IGF-I의 분리

- 각종 column chromatography에 의한 IGF-I의 분리
- IGF-I의 생화학적 특성 분석

IGF-I의 면역세포 증식효과 검증

- T cell line을 이용한 증식 효과

IGF-I의 항암효과 검증

- 각종 암세포의 배양기술확립 및 항암효과 검증방법확립
- 초유 IGF-I 및 형질전환 IGF-I의 항암 효과 검증

IGF-I의 cytokines분비효과 검증

- cytokines의 분석 시스템 확립
- RT-PCR에 의한 cytokines의 분비능력 검증

초유 IGF-I과 형질전환 IGF-I의 구조적 유의성 검증

- Peptide mapping 및 N-말단 아미노산 배열
  - Isoelectric point 및 아미노산 조성
- 형질전환 IGF-I과 초유 IGF-I의 생리적 기능 비교 검토
- 세포증식효과 비교 검토
  - 항암효과 검토

제 2 세부과제 : IGF-I의 형질전환 누에의 작성

IGF-I gene의 screening

- IGF-I cDNA cloning
- 누에 건사선 단백질 유전자와의 형질전환 방안 모색

IGF-I 발현벡터 개발

- IGF-I 형질전환 누에 발현벡터 모델링
- 형질전환 누에의 작성

IGF-I 형질전환 누에 선발

- 형질전환 누에 사육 기술 개발
- Sub-matching에 의한 품종육성

IGF-I 형질전환 누에 생산 및 발현분석 체계 확립

- Fibroin promoter분석

형질전환 누에에서 발현된 IGF-I의 분리, 정제방법 확립

- IGF-I 대량 분리 정제 체계 확립

IGF-I 형질전환 누에 대량 생산

- IGF-I 분비 효율 제고
- 형질전환 누에 대량 생산 체계 확립

제 3 세부과제 : *in vivo*계에서의 IGF-I 분획의 생리 활성 검증

IGF-I의 Primary cell의 증식효과 검증

- splenocytes의 증식효과 검증

IGF-I의 장관기능 증진에 미치는 효과 검증

- 항암제 투여에 의한 장관궤양의 유도
- Mucosal weight, protein 및 DNA변화 측정

투여 방법에 따른 IGF-I의 활성변화 검토

- 투여방법의 모델 설정
  - 투여 방법에 따른 장관내 국소적 활성 검증
  - 최적 투여방법 설정
- 인슐린 의존성/비의존성 당뇨병에 미치는 효과 검증
- 당뇨병 유발 Rat의 생산
  - 체중 및 혈액 glucose의 분석
- 형질전환 IGF-I의 실용화기술 개발
- 조제분유, 건강 보조식품에의 활용 방안 검토
  - 인슐린 의존성 환자에 대한 활용화 방안 검토
- 국내·외 특허출원
- 특허관련 자료 수집
  - 특허출원 및 홍보

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발 결과

1) 젖소 초유 내에 존재하는 성장호르몬인 IGF-I을 분리·정제한 후 cell line 및 마우스의 생체내에서 미치는 면역활성에 미치는 영향을 실험하였다. 젖소 초유로부터 IGF-I의 분리 및 정제는 ion exchange chromatography와 gel filtration chromatography, affinity chromatography 및 ultrafiltration 거쳐 IGF-I을 분리·정제하였으며, 이를 SDS-PAGE와 western blotting을 실시하여 확인하였다. 초유 IGF-I의 함량은 약 540 $\mu$ g/L 으로 측정되었고, 이를 분리 정제 한 결과 약 12 $\mu$ g의 IGF-I을 회수하였다. IGF-I이 cell line 면역활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, IGF-I의 세포증식에 미치는 영향은 EL4 cell에서 약 55%로서 높은 성장율을 나타냈으며, 암세포 성장 저해율은 A427 cell에서 약 35%로 가장 높게 나타났다. IGF-I이 RAW 264.7 cell을 자극하여 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 생성을 증가시켰다. IGF-I이 murine macrophage의 면역활성에 미치는 영향을 실험한 결과, IL-6, NO, TNF- $\alpha$  분비를 유도과 탐식작용을 증가시키는 것으로 확인하였다. IGF-I이 murine splenocyte의 면역활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 B cell, T cell 증식효과를 보였고, NK cell의 활성을 증가시켰다. N-terminal 서열과 아미노산 조성 분석의 결과로 초유와 형질전환 누에에서 분리된

IGF-I이 표준 IGF-I과 동일한 물질임을 알 수 있었다. 형질 전환 누에와 초유에서 분리한 IGF-I의 세포증식에 미치는 영향을 비교하였을 때, 정상세포증식에는 상대적으로 초유 중의 IGF-I의 증식률이 높았다. 하지만 항암효과에 있어서는 HeLa와 SNU-C1 에서는 형질전환 누에에서 분리된 IGF-I의 효과가 훨씬 더 높았다.

2) 여러 가지 유용물질의 대량생산을 위하여 그동안 대장균에서 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 대장균에서의 유용물질 생산은 고등생물에서 필요로 하는 특징을 대체하지 못하는 단점이 있어 이를 보완할 수 있는 생물을 찾게 되었다. 누에는 이러한 단점을 보완할 수 있는 고등생물로서의 특징을 가지고 있어 post-translational modification을 하고, 특히 누에의 견 단백질인 피브로인은 5령기 유충의 후부 견사 선에서 아주 강력한 발현을 하여 전체 체중의 약 20% 이상이나 되는 피브로인 단백질을 생산한다. 그러므로, 누에에서의 유용물질을 생산하는 것이 그 기대효과가 크다고 할 수 있다. 본 연구에서는, 앞서 연구된 미세주사법을 이용한 형질전환 누에를 바탕으로 P 벡터계를 이용하여 피브로인 유전자를 프로모터로 한 IGF- I 유전자를 삽입한 발현벡터를 만들었다(p[FPIGF- I]). 발현벡터는 전이효소와 함께 전낭배기 난에 미세주사하여 형질전환 누에를 만들었다. 미세주사한 4,605개의 난중에 70개가 1령 단계로 되었고, PCR로 형질전환체를 선별하였고, 전이율은 13%였다. F2는 PCR 산물을 염기서열 결정하여 외부유전자(IGF- I)가 존재함을 확인하였다. PCR로 선별된 형질전환체의 무게와 크기가 정상적인 번데기에 비하여 약 20%정도 더 큰 것으로 확인하였다. 또한 F1, F2에서도 같은 양상을 보임을 확인하였다. 이러한 결과로 발현벡터가 생식세포에 의해 유전되고 있음을 알 수 있었다. 그리고 형질전환된 누에의 고치로부터 1,300ng/g의 IGF-I이 포함되어 있는 것을 확인하였다.

3) *In vivo* 상에서 IGF-I의 생리활성 검증 및 실용화 기술개발에 관한 연구를 진행하였다. IGF-I 분획물의 마우스 비장세포의 증식효과는 whole whey에 비해서 2배 이상의 세포증식효과를 나타내었으며 투여량의 높을수록 면역증강효과가 높은 것으로 나타났다. IGF-I 분획물은 methotrexate투여쥐의 장관 및 점막 부작용을 감소시켰다. IGF-I 분획물의 투여방법중 근육내 주사보다 복강내 주사가 methotrexate투여쥐의 장관기능을 더 증진시켰다. IGF-I 분획물은 STZ 유발 당뇨쥐의 내당능과 지질대사를 다소 개선시키는 경향을 보였다. 형질전환 IGF-I 누에는 STZ 유발 당뇨쥐의 공복혈당을 감소시켰으며 혈중 인슐린 농도를 다소 증가시켰다.

## 2. 연구개발 활용에 대한 건의

- 1) 초유 IGF-I과 유사한 활성을 가진 누에 형질전환 IGF-I의 생산이 가능해짐.
- 2) IGF-I의 대량생산을 통한 제품화는 국내 시장 개발 및 해외 수출.
- 3) 축산과 잠업을 연계시킨 새로운 형태의 고부가가치 산업이 확립되고, 첨단 생명공학의 기술적 우수성을 국내·외에 홍보(산업적 상승효과 극대화).
- 4) *In vitro* 및 *in vivo*계에 의한 IGF-I의 세포증식효과, 장관 면역 증강 효과 등의 생리활성을 검증하여, 새로운 형태의 조제분유 개발.
- 5) 신생아용 기능성 식품으로서의 개발은 물론이고, 성인병 치료용(당뇨) 특수 건강식품으로서의 개발.
- 6) 미량의 생리활성물질을 대량으로 생산할 수 있는 시스템을 확립함으로써 초유 중의 다른 유용자원에 대한 형질전환 기법 응용(국내외 특허 획득 가능).



## SUMMARY

Title: Investigation of available genetic resources(IGF) in bovine colostrum and development of biotechnological production and application technique by utilization of silkworm.

I. The purpose of this study is to observe immune activity on cell lines and mice by purified IGF-I in bovine colostrum. The results are as follows; The purification of IGF-I from bovine colostrum was performed by ion exchange, gel filtration, affinity chromatography and ultrafiltration. The results were confirmed through SDS-PAGE and western blotting. The yield of IGF-I was about 12 $\mu$ g/L from bovine colostrum was measured about 540 $\mu$ g/L. IGF-I was able to increase the proliferation rate of the cell line, EL4 by 55%. On the other hand the inhibition rate of proliferation was indicated cell line, A427 by 32%. IGF-I were able to induce the secretion of IL-6, NO and TNF- $\alpha$  from murine macrophage which indicated the increased phagocytosis. In the influence of immune activity of murine splenocyte, the result indicated that IGF-I was able to increase the proliferation of B cell and T cell, and activity of NK-cell. Results from N-terminal sequence and amino acid composition analysis of colostrum IGF-I and transgenic silkworm IGF-I to be identical to that the standard IGF-I. Comparison with transgenic silkworm IGF-I and colostrum IGF-I on cell proliferation, colostrum IGF-I was able to increase the proliferation rate of the cell line relatively to transgenic silkworm IGF-I. But, anti-cancer effects of transgenic silkworm IGF-I were higher than colostrum IGF-I on HeLa and SNU-C1 cancer cells.

II. Many attempts have been done on various essential protein by using transformed *E. coli* system. However, prokaryote system doesn't equipped the protein maturation mechanisms which are necessary for eukaryotic proteins. In this sense, among the eukaryotes, silkworms have two major merits in overcoming the difficulties. First, the protein maturation mechanisms are available in silkworm. Second, the silkworms have fibroin promoter known as the most powerful and

effective promoter which controls the expression of fibroin, one member of silk protein. In this study, the production of recombinant human IGF-I in silkworm system was designed. The method makes use of the microinjection technique and P-derived vector to transfer the foreign genes into the chromosomes. We constructed the expression vector using fibroin gene promoter and P transposon vector promoter and P transposon vector containing IGF-I and reporter genes (pFpIGF-I). We microinjected into eggs laid at the preblastoderm stage. 70 of 4605 microinjected eggs were survived. Through the PCR screening, transgenic silkworms were selected and proved to be positive (13%) for IGF-I gene. Also, we assayed F1 and F2 transgenic silkworms and got the positive PCR results and did PCR-sequencing. As the result, PCR products had the sequence of IGF-I gene. The studies on the gene expression using fibroin gene promoter may help to understand mechanism in fibroin genes, transcriptional regulation, or many advantages to produce useful biological materials. And, the contents of IGF-I was about 1,300ng/g from transgenic silkworm cocoon.

III. *In vivo* study on biological activity of IGF-I and development its practical use. The results are as follows; IGF-I enriched whey fraction enhances splenocyte proliferation in comparison with whole IGF-I. Immune enhancing properties of IGF-I enriched whey fraction is dose dependant manner. IGF-I enriched whey fraction reduces gastrointestinal and mucosal adverse effects in methotrexate treated rat. Intraperitoneal injection of IGF-I enriched whey fraction reduces gastrointestinal and mucosal adverse effects in methotrexate treated rat in contrast with intramuscular injection. IGF-I enriched whey fraction makes impaired glucose tolerance and lipid metabolism better in STZ induced diabetic rat. Transgenic IGF-I enriched silkworm decrease fasting blood glucose concentration and increase insulin concentration a little bit in STZ induced diabetic rat. But In normal rat, insulin concentration pick up considerably.

# CONTENTS

I. Outlines of the project .....	16
1. Objectives and necessities of the project .....	16
1) Technical aspects .....	16
2) Economic and industrial aspects .....	17
3) Social aspects .....	18
2. Contents and scopes of the project .....	19
II. R&D status in domestic and overseas .....	22
III. Contents of project and Its results.....	24
1. Verification of Physiochemical properties for IGF-I(Part 1) .....	24
1) Research contents.....	24
(1) Search for the physiological active factors in colostrum and isolation of IGF-I .....	24
(2) Verification of Immune cell proliferation effect and cytokine production capacity .....	25
(3) Verification of anti-cancer effects by colostrum IGF-I .....	26
(4) Effects of immune activity on murine macrophage and murine splenocyte by colostrum IGF-I .....	28
(5) Verification of structural homology for colostrum IGF-I and transgenic IGF-I .....	30
(6) Comparison of colostrum IGF-I and transgenic IGF-I for physiological function .....	31
2) Research results.....	32
(1) Isolation and purification of colostrum IGF-I.....	32
(2) Determination of Immune cell proliferation effect and cytokine production capacity.....	39

(3) Determination of anti-cancer effect of colostrals IGF-I.....	47
(4) Effects of immune activity on murine macrophage and murine splenocyte by colostrals IGF-I .....	51
(5) Verification of structural homology for colostrals IGF-I and transgenic IGF-I .....	63
(6) Comparison of colostrals IGF-I and transgenic IGF-I for physiological function .....	65
2. Development of transgenic silkworm for IGF-I(Part 2).....	73
1) Introduction .....	73
(1) Life cycle of silkworm and fibroin gene .....	73
(2) Transgenic animal .....	75
(3) Transposon-mediated gene transfer .....	76
2) Research contents .....	77
(1) Construction of expression vector .....	77
(2) Development of transgenic silkworm .....	78
(3) Screening of transgenic silkworm in <i>Bombyx mori</i> .....	79
(4) Establishment of method for isolation and purification of IGF-I from transgenic silkworm .....	80
3) Research results .....	81
(1) Construction of expression vector (pFP[IGF- I ]) .....	81
(2) Development of transgenic silkworm .....	83
(3) Screening of transgenic silkworm in <i>Bombyx mori</i> .....	83
(4) Fibroin gene promoter analysis .....	88
(5) Establishment of method for isolation and purification of IGF-I from transgenic silkworm .....	92
(6) Mass production of transgenic silkworm .....	94
3. Biological activity of IGF-I and development its practical use(Part 3) .....	95

1) Research contents .....	95
(1) Proliferation effect of IGF-I enriched whey fraction on primary splenocyte cell .....	95
(2) Effect of IGF-I enriched whey fraction on gastro-intestinal function .....	95
(3) Effect of IGF-I enriched whey fraction according to the different methods of administration .....	97
(4) Effect of IGF-I enriched whey fraction on type I DM .....	99
(5) Study on actual application of transgenic IGF-I enriched silkworm .....	100
2) Research results .....	102
(1) Proliferation effect of IGF-I enriched whey fraction on primary splenocyte cell .....	102
(2) Effect of IGF-I enriched whey fraction on gastro-intestinal function .....	104
(3) Effect of IGF-I enriched whey fraction according to the different methods of administration .....	106
(4) Effect of IGF-I enriched whey fraction on type I DM .....	113
(5) Study on actual application of transgenic IGF-I enriched silkworm .....	116
IV. Achievement and contribution to related fields .....	123
1. Achievement .....	123
2. Contribution to related research fields .....	124
V. Application Plan of the Results .....	125
1. Application Plan .....	125
2. The necessity of the additional research .....	125
3. Application to other research fields .....	125
VI. Overseas Information on Science and Technology during the Project .....	126
VII. References .....	127

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발 과제</b> 의 개요.....	16
제 1절	연구 개발의 목적 및 필요성.....	16
1.	기술적 측면 .....	16
2.	경제 산업적 측면 .....	17
3.	사회 문화적 측면 .....	18
제 2절	연구개발의 내용 및 범위.....	19
<b>제 2 장</b>	<b>국내의 기술개발 현황</b> .....	22
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	24
제 1절	IGF-I의 생리화학적 특성 검증(제1세부과제).....	24
1.	연구개발 내용.....	24
가.	초유 중의 생리활성 인자의 검색 및 IGF-I의 분리.....	24
나.	IGF-I의 면역세포 증식효과 및 cytokines분비능력 검증.....	25
다.	IGF-I의 항암효과 검증.....	26
라.	IGF-I이 murine macrophage와 murine splenocyte의 면역활성에 미치는 영향 .....	28
마.	초유 IGF-I와 형질전환 IGF-I의 구조적 유의성 검증.....	30
바.	형질전환 IGF-I와 초유중의 IGF-I의 생리적 기능 비교 검토.....	31
2.	연구개발 수행 결과.....	32
가.	IGF-I의 분리 및 정제.....	32
나.	IGF-I의 면역세포 증식효과 및 cytokines분비능력 측정.....	39
다.	IGF-I의 항암효과 측정.....	47
라.	IGF-I이 murine macrophage와 murine splenocyte의 면역활성에 미치는 영향 .....	51
마.	초유 IGF-I과 형질전환 IGF-I의 구조적 유의성 검증.....	63
바.	형질전환 IGF-I과 초유 IGF-I의 생리적 기능 비교.....	65

제 2절 IGF-I의 형질전환 누에의 작성(제 2세부과제).....	73
1. 서론.....	73
가. 누에의 생태와 피브로인.....	73
나. 형질전환 동물.....	75
다. 전이인자를 이용한 형질전환 벡터.....	76
2. 연구개발 내용.....	77
가. IGF-I gene 발현벡터 개발.....	77
나. IGF-I 형질전환 누에 작성.....	78
다. IGF-I 유전자가 형질전환 된 개체 선별.....	79
라. 형질전환 누에에서 발현된 IGF-I의 분리 정제 방법 확립.....	80
3. 연구개발 수행 결과.....	81
가. IGF-I gene screening 및 발현벡터 개발.....	81
나. IGF-I 형질전환 누에 작성.....	83
다. IGF-I 유전자가 형질전환 된 개체 선별.....	83
라. Fibroin promoter 분석.....	88
마. 형질전환 누에에서 발현된 IGF-I의 분리 정제 방법 확립.....	92
바. IGF-I 형질전환 누에 대량생산.....	94
제 3절 <i>In vivo</i> 에서의 IGF-I의 생리활성 검증 및 실용화 기술개발(제 3세부과제).....	95
1. 연구개발 내용.....	95
가. IGF-I enriched whey fraction의 primary cell 증식효과 검증.....	95
나. IGF-I enriched whey fraction의 장관기능 증진에 미치는 효과 검증.....	95
다. 투여방법에 따른 IGF-I의 활성변화.....	97
라. 인슐린 의존성 당뇨병에 미치는 효과 검증.....	99
마. 형질전환 IGF-I의 실용화 기술 개발.....	100
2. 연구개발 수행 결과.....	102
가. IGF-I enriched whey fraction의 primary cell 증식효과 검증.....	102

나. IGF-I enriched whey fraction의 장관기능 증진에 미치는 효과 검증.....	104
다. 투여방법에 따른 IGF-I의 활성변화.....	106
라. 인슐린 의존성 당뇨병에 미치는 효과 검증.....	113
마. 형질전환 IGF-I의 실용화 기술 개발.....	116
<b>제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....</b>	<b>123</b>
제 1절 목표 달성도.....	123
제 2절 관련분야에의 기여도.....	124
<b>제 5 장    연구개발결과의 활용계획.....</b>	<b>125</b>
제 1절 활용계획.....	125
제 2절 추가 연구의 필요성.....	125
제 3절 타 연구의 응용성.....	125
<b>제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....</b>	<b>126</b>
<b>제 7 장    참고문헌.....</b>	<b>127</b>



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성

#### 1. 기술적 측면

우리나라 수유실태를 살펴보면, 도시의 경우 63.6%가 조제분유에 의존하고 있다. 또한 출산 직후부터 조제분유에만 의존하여야 하는 경우가 급격히 증가하고 있어, 신생아의 정상적인 발육을 위한 초유의 중요성이 더욱 크게 대두되고 있는 실정이다. 그러나, 일반적으로 시판되고 있는 상업용 조제분유에는 생리활성인자, 특히 IGF가 발견되지 않고 있다(Nagashima 등, 1990). 이는 가공과정 중에 IGF가 파괴되거나 열변성 되었음을 의미하는 것으로, 신생아의 정상적 성장을 위해서는 천연상태의 IGF의 첨가가 매우 중요하다고 할 수 있을 것이다. 이러한 시대적 요구에 부응하기 위하여, 본 연구진은 유전자공학적 기법에 의한 IGF 생산시스템을 확립하고자 한다.

현재 세계적으로 볼 때 유전자 재조합 기술에 의해 생산되고 있는 각종 농산물의 종류는 약 60여종(1996년 기준)이며, 또한 각종 생리활성을 갖는 단백질을 비롯하여 각종 항생제 등의 생산에도 응용되고 있다. 유전자 재조합에 의해 생산된 각종 형질 전환 물질에 대한 위해성 논란이 일어나고 있으나, 위해성의 문제 이전에 인류의 건강유지를 위한 방안으로 적용되고 있는 점이 많으며, 각종 암을 포함한 성인병 등의 치유를 위한 불가피한 학문의 흐름이라 할 수 있다. 즉, 생명공학이 인류를 위해 공헌할 수 있는 유일한 방안이자 혜택이라 할 수 있을 것이다.

최근 유전공학의 발전으로 사람의 인슐린을 비롯한 유용물질이 대장균에서 대량 생산되고 있다. 대장균에서의 유용물질 생산은 생산원가가 저렴하다는 장점이 있으나, 고등생물 post-translational modification 기능을 갖고 있지 않아, 고등생물의 대부분의 효소와 같은 산물들은 대장균에서 만들어지면 생체내 활성을 갖지 않는다는 단점이 있다. 그러나 누에는 고등생물로써 대장균이 갖고 있지 않는 splicing이나 post-translational modification 기능을 갖고 있어 생리활성물질이나 고등생물의 효소와 같은 유용물질의 대량생산에 적합하다. 그리고 누에는 개체가 크고 잠업이라는 대량생산 체제를 이미 갖추고 있어 유용물질의 대량 생산이 바로 가능하다.

누에의 견사선에 존재하는 견단백질은, 70%이상을 점하는 fibroin과 그 주위를 싸고 있는 sericin의 두 종류의 단백질로 구성되며, 이들에 관해서는 많은 연구가 축적

되어져 있다. 특히 fibroin은 5열기 유충의 후부 견사선에서 아주 강력한 발현을 하여 전체 체중의 약20% 이상이나 되는 fibroin 단백질을 생산하므로, 누에의 견사선은 이러한 유전자 발현을 연구하는데 유용한 시스템을 제공한다. 이러한 fibroin의 강력하고 조직 특이적인 발현 조절 기작에 관여하는 것은 유전자 발현조절 연구에 중요한 실마리를 제공할 수 있으리라 기대되며, 진핵생물을 유용물질의 대량생산에 이용할 수 있다. 대장균이나 효모, 그리고 일부 고등동물 (특히 계란 단백질 등)을 벡터로 사용할 경우, 세포조직을 파괴하여 정제하여야 함으로 그 단계가 매우 복잡하고, 불순물의 혼입, 또는 정제과정에서의 활성 저하가 예상되며, 생산량에 한계가 있다. 그러나, 누에의 경우, 견사선 단백질 조직은 육안으로도 식별이 가능하여 편셋 등으로도 몸체에서 쉽게 분리할 수 있어 형질전환 IGF-I의 정제가 매우 용이하며, 젖소 초유 중의 IGF-I과 활성이 거의 같은 천연상태의 IGF-I을 대량 생산할 수 있는 것이 가장 큰 장점이다.

일반적으로 식용으로 이용하고 있는 누에를 이용함으로써, 발현된 IGF-I을 정제하여 사용하는 것은 물론이고, 정제하지 않은 상태의 누에분말을 이용할 수도 있어, 그 효용가치는 매우 크다고 할 수 있을 것이다. 낙농분야와 잠업분야를 동시에 만족시킬 수 있는 사업이라고 생각한다.

## 2. 경제 산업적 측면

초유 중에는 수많은 생체조절인자가 함유되어 있으나, 대부분의 초유는 그 이용가치가 적어 폐기 처분되고 있다. 유용 유전자원이 다량으로 함유되어 있는 초유의 이용가치를 높이는 것은 우유로서의 가치를 높이는 것뿐만 아니라, 기능성 식품의 개발 및 세계적인 특허의 획득과 고부가가치 상품으로 개발될 수 있음을 의미하는 것이다. 최근 소비자의 인식변화에 의해 건강식품에 대한 관심이 높아지고, 그 소비량이 급증하고 있는 것도 식품선택의 기준이 생리 활성적 기능을 생각하는 쪽으로 옮겨가고 있음을 의미한다고 할 수 있을 것이다. 이러한 관점에서 볼 때 초유의 효용가치를 높이고, 그 중에 함유되어 있는 유용 유전자원을 활용한다는 것은 낙농산업에 활기를 불어넣는 일이 될 수 있을 것이며, 이 물질을 형질전환 기법으로 대량 생산할 수 있는 시스템이 확립된다면 경제적인 이익의 획득은 물론이고, 식품 산업 전 분야에 큰 활력소로 작용할 수 있을 것이다.

국내의 잠업은 오랜 역사와 전통을 가지고 있으나, 국내 인건비 상승과 같은 국제 여건의 변화와 후개발 도상국의 값싼 인건비로 생산되는 값싼 고치의 수입에 의해 국

내 잠엽은 매우 어려운 실정이다. 그러므로 앞으로 국제 시장에서 국내 잠엽이 우위를 차지하기 위해서는 중국과 같은 개발도상국이 생산할 수 없는 고부가가치의 누에를 생산하는 전략이 시급하다. 국내의 우수한 잠사기술이나 최근에 연구되어지고 있는 누에의 분자유전학적 기술을 바탕으로 고부가가치 누에를 생산할 수 있는 형질전환 누에를 창출하는 기술을 확립하고, 그 품종을 확보하는 것은 매우 중요하다.

이와 같이 우유의 생리활성물질과 누에의 접목으로, 국내 우유 및 식품산업은 물론이고 잠엽농가의 고부가가치 산업으로 정착시킬 수 있는, 일석이조의 효과를 기대할 수 있는 본 연구는 그 의미가 매우 크다고 할 수 있을 것이다.

### 3. 사회 문화적 측면

식품은 단순히 영양소 공급물질로서의 기능(영양적 기능)만 하는 것이 아니라 여러 가지 생체조절 기능에 관여하고 있다. 인간의 건강은 호르몬계, 신경계, 면역계 등을 주체로 하는 조절계에 의해 유지되고, 이러한 항상성에 혼란이 오면 건강하지 못한 상태에 빠지지만 그것의 예방, 회복에 일상적으로 섭취하는 식품 성분이 크게 영향을 미친다. 식생활과 성인병 등은 예로부터 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 왔으며, 최근에는 새로운 생리조절기능을 갖는 식품소재 또는 식품성분에 관한 연구가 활발히 진행되어, 식품에 의해 건강의 유지·증진·회복을 달성하고, 만성·퇴행성 질환의 예방과 치료를 통해 국민의 삶의 질을 높일 수 있도록 하기 위한 노력이 다각도로 진행되고 있다.

식품에 의한 생체방어는 감염방어, 대사이상, 알레르기, 노화, 나아가서는 호르몬계, 신경계의 제어와 깊은 관련을 갖고 있는 것으로, 생체방어식품 원료의 확보, 제조가공, 실용화의 문제 등에 관한 폭 넓은 연구가 진행되고 있다. 이러한 관점에서 볼 때, IGF-I의 안정적 공급은 사회 문화적으로 큰 영향을 미칠 수 있을 것이다. 또한 대장균 등의 미생물이 아닌 누에에 발현시킨 IGF-I을 식품 또는 의약품으로 활용할 수 있다는 것은 국민 건강 증진에 크게 기여할 수 있으리라 생각한다.

## 제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	생리 활성 인자의 분획 및 면역세포 증식 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 초유 중의 생리활성 인자의 검색               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 초유의 분획 및 IGF-I의 농축</li> <li>- SDS-PAGE 및 immunoblotting 등에 의한 IGF-I 의 검색</li> </ul> </li> <li>▶ 초유중의 IGF-I의 분리               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각종 column chromatography에 의한 IGF-I의 분리</li> <li>- IGF-I의 생화학적 특성 분석</li> </ul> </li> <li>▶ IGF-I의 면역세포 증식효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- T cell line을 이용한 증식 효과</li> </ul> </li> </ul>
	IGF-I gene screening 및 발현 벡터 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ IGF-I gene의 screening               <ul style="list-style-type: none"> <li>- IGF-I cDNA cloning</li> <li>- 누에 견사선 단백질 유전자와의 형질전환 방안 모색</li> </ul> </li> <li>▶ IGF-I 발현벡터 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- IGF-I 형질전환 누에 발현벡터 모델링</li> <li>- 형질전환 누에의 작성</li> </ul> </li> </ul>
	<i>in vivo</i> 계에서의 IGF-I 분획의 생리 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ IGF-I의 Primary cell의 증식효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- splenocytes의 증식효과 검증</li> </ul> </li> <li>▶ IGF-I의 장관기능 증진에 미치는 효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항암제 투여에 의한 장관궤양의 유도</li> <li>- Mucosal weight, protein 및 DNA변화 측정</li> </ul> </li> </ul>

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2002)	IGF-I의 항암효과 및 cytokines분비 능력 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ IGF-I의 항암효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각종 암세포의 배양기술확립 및 항암효과 검증방법확립</li> <li>- 초유 IGF-I 및 형질전환 IGF-I의 항암 효과 검증</li> </ul> </li> <li>▶ IGF-I의 cytokines분비효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- cytokines의 분석 시스템 확립</li> <li>- RT-PCR에 의한 cytokines의 분비능력 검증</li> </ul> </li> </ul>
	IGF-I의 형질전환 누에 선발 및 발현분석체계의 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ IGF-I 형질전환 누에 선발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환 누에 사육 기술 개발</li> <li>- Sub-matching에 의한 품종육성</li> </ul> </li> <li>▶ IGF-I 형질전환 누에 생산 및 발현분석 체계 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibroin promoter분석</li> <li>- IGF-I 정량 정성 분석</li> </ul> </li> </ul>
	체내 IGF-I의 활성변화 및 형질전환IGF-I의 당뇨병에 대한 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 투여 방법에 따른 IGF-I의 활성변화 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 투여방법의 모델 설정</li> <li>- 투여 방법에 따른 장관내 국소적 활성 검증</li> <li>- 최적 투여방법 설정</li> </ul> </li> <li>▶ 인슐린 의존성/비의존성 당뇨병에 미치는 효과 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 당뇨병 유발 Rat의 생산</li> <li>- 체중 및 혈액 glucose의 분석</li> </ul> </li> </ul>

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2003)	초유 IGF-I과 형질 전환 IGF-I의 특성 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 초유 IGF-I과 형질전환 IGF-I의 구조적 유의성 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Peptide mapping 및 N-말단 아미노산 배열</li> <li>- Isoelectric point 및 아미노산 조성</li> </ul> </li> <li>▶ 형질전환 IGF-I과 초유 IGF-I의 생리적 기능 비교 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포증식효과 비교 검토</li> <li>- 항암효과 검토</li> </ul> </li> </ul>
	형질전환 IGF-I의 정제 및 형질전환 누에의대량생산 시스템확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 형질전환 누에에서 발현된 IGF-I의 분리, 정제방법 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- IGF-I 대량 분리 정제 체계 확립</li> </ul> </li> <li>▶ IGF-I 형질전환 누에 대량 생산               <ul style="list-style-type: none"> <li>- IGF-I 분비 효율 제고</li> <li>- 형질전환 누에 대량 생산 체계 확립</li> </ul> </li> </ul>
	형질전환 IGF-I의 실용화 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 형질전환 IGF-I의 실용화기술 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조제분유, 건강 보조식품에의 활용 방안 검토</li> <li>- 인슐린 의존성 환자에 대한 활용화 방안 검토</li> </ul> </li> <li>▶ 국내·외 특허출원               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 특허관련 자료 수집</li> <li>- 특허출원 및 홍보</li> </ul> </li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술 개발현황

IGF는 신체의 주요 기관인 태반, 심장, 폐, 신장, 간, 췌장, 비장, 소장, 정소, 난소, 대장, 뇌 골격 등에서 분비된다. IGF는 30세까지는 1일 10mg을 생산한다. IGF는 insulin과 비슷한 구조를 가지고 있고 세포의 성장에 영향을 주며, 당뇨병을 비롯한 만성질환에 영향을 준다(Rosen, 1999). 그리고 IGF의 세포성장에 대한 효과는 PDGF와 함께 세포가 DNA 합성을 완성하는 능력을 증진하는 것으로 알려지고 있으며 단일 growth factor 보다는 여러 가지 growth factor가 혼합된 것이 세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 그리고 우유에서 유래하는 growth factor는 소화장관에서 생체소화효소에 의해 잘 분해되지 않아, 소의 초유에서 유래하는 IGF를 위주로 하는 growth factor 혼합물이 더욱 더 효율적으로 epithelial cell과 enterocytes, 장관 면역 세포 등의 성장을 촉진할 것으로 기대된다.

초유를 이용하는 많은 제품이 국내외에서 판매되고 있으며, 초유에는 이러한 성분들이 함유되어 있어 다양한 기능성이 있을 것으로 판단하고 있다. 그러나, 소의 초유에서 유래하는 growth factor를 분리하여 식품 또는 임상적으로 이용할 수 있는 고부가가치의 기능성 제품으로 이용하기 위한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다

이러한 기술이 개발된다면 현재 임상용으로 거의 수입에 의존하는 growth factor를 대체할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 소의 초유에서 growth factor를 효과적으로 분리하여 그 효능을 입증한다면, 유아기 초기에 장관의 발달을 유도할 수 있는 조제분유 소재로 이용하여 유아들의 건강을 크게 향상시킬 수 있을 것이다.

본 연구에서 누에의 형질을 전환하여 IGF의 생산을 시도하려는 것은, 누에는 이미 국내에서 당뇨병 환자를 위한 식이요법제로 널리 이용되고 있기 때문이다. 또한 Recombinant IGF의 경우, 제 1형과 제2형 당뇨병에 효능이 있으며, 특히 난치성 당뇨병인 insulin 저항성 당뇨병환자의 혈당 상승을 억제하는 효과가 있다. 그리고 recombinant IGF-I은 면역기능 증진효과, 항암효과, 상처치료 효과, 그리고 IGF-I은 노화의 지표로 이용할 수 있으며 IGF-I을 투여할 경우 노화억제효과가 있을 것으로 기대하고 있다.

그러나, 현재 생산되고 있는 형질전환 IGF-I은 대장균이나 효모에서 생산되고 있으나, 그 생산량이 약 2-8mg/l에 불과하다. 최근에는 그 수율이 8-55mg/L 정도로 높일

수 있지만 미생물을 이용할 경우 정제과정이 아주 복잡하다는 단점이 있다. 그리고 IGF-I이 완전한 polypeptide로 정제되는 비율이 10-20% 정도로 아주 낮은 것으로 알려져 있다. 이는 미생물이 갖고 있는 각종 전이효소의 한계성, 또는 splicing이나 post-translational modification 기능을 갖고 있지 않기 때문이라 생각한다. 이러한 기술적 한계성을 극복하기 위해서는 post-translational modification 기능을 갖고 있는 고등 동물을 사용하여야 하며, 형질전환 IGF-I의 활용가치가 높은 host를 사용하여야 할 것이다. 이러한 관점에서 볼 때, 누에의 경우 recombinant IGF를 견사선이라는 단백질 생산 공장을 이용하기 때문에 손쉽게 완전한 분자의 recombinant IGF-I을 생산할 수 있는 장점이 있다.

한편, 본 연구진은 형질전환 누에를 이용한 유용물질 생산에 관한 연구를 다년간 수행하여 왔으며, 형질전환 누에의 생산에 성공하였다. 전이인자를 이용하여 매우 높은 삽입률로 형질전환 누에를 작출하는데 성공하였으며, 미세주사법으로 누에의 알에 주사한 벡터가 누에의 계놈내에 성공적으로 전이되었음을 PCR방법을 이용하여 확인하였다. 견사선이라는 특수한 구조를 이용하므로써 그 정제과정이 매우 단순하여 초유 중에 함유된 IGF-I과 거의 같은 활성을 지닌 형질전환 IGF-I을 생산할 수 있으며, 건강 식품으로 누에분말을 직접 섭취하는 식생활 습관, 특히 당뇨병환자에게 큰 인기를 누리고 있는 잇점을 최대한 살릴 수 있어, 그 효용가치는 매우 높으리라 생각한다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 IGF-I의 생리화학적 특성 검증(제1세부과제)

#### 1. 연구개발 내용

##### 가. 초유 중의 생리활성 인자의 검색 및 IGF-I의 분리

#### 1) 공시유

본 연구에 사용된 젖소 초유는 수원 인근 축산농가에서 사육중인 Holstein 종의 젖소로부터 분만 후 12~24시간 이내에 분비된 것을 착유하였다. Skim milk 상태로 -20℃에 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 2) IGF-I 분리 및 정제

초유 skim milk는 pH를 4.3으로 조정 후 5,000rpm에서 30분간 원심분리 시켜, casein을 제거하고 상등액인 whey를 얻었다. IGF-I binding protein과 IGF-I을 분리하기 위해 Francis 등(1986)의 방법으로 1M acetic acid로 pH를 2.8로 조정한 후 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였다.

이후 Belford 등(1997)의 방법을 일부 변형하여 SP Sephadex C-25 resin으로 ion exchange chromatography를 실시하였다.

SP Sephadex C-25 chromatography에 의해 얻어진 분획을 SDS-PAGE와 ELISA를 통해 IGF-I의 존재를 확인한 후 IGF-I을 함유하고 있는 분획을 회수하여 1kDa membrane을 사용하여 ultrafiltration system(Amicon, USA)으로 농축하였다. 농축한 분획은 1M acetic acid로 산성화 시킨 후 SP sephadex G-75(Sigma, USA)에 의한 gel filtration chromatography를 실시하여 IGF-I을 함유하는 분획을 분리하였다.

분리된 각 분획은 SDS-PAGE로써 분획 내 물질의 분자량을 확인하였고, IGF-I 함유 예상 분획은 western blot analysis로 IGF-I의 존재를 확인하였다. 그리고 IGF-I을 함유하는 peak 부분의 분획을 모아서 IGF-I 이외의 분자 즉, 거대분자의 효과적인 제거를 위해 10kDa centriplus(Amicon, USA)를 이용하여 IGF-I을 회수하였고 IGF-I의 분리 여부를 SDS-PAGE와 western blot으로 확인하였다.

### 3) 단계별 정제도 확인

#### 가) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

각 단계별 정제과정에서 용출된 각 분획의 IGF-I 정제도와 분자량을 확인하기 위하여 Laemmli 등(1970)의 방법에 준하여 electrophoresis kit(Hofer miniVE, Amersham Biosciences, Sweden)를 사용하여 15% gel을 만들어 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동을 끝낸 gel은 염색과 탈색의 과정을 통해 분자량을 확인하였다.

#### 나) Western blot analysis

각 단계별 정제과정에서 용출된 분획 내의 IGF-I 존재 유무를 확인하기 위해서 western blot을 실시하였다. Primary antibody는 mouse 유래 biotin-labeled monoclonal anti-human IGF-I (R&D systems, USA)를 사용하였고 streptavidin HRP (R&D systems, USA)로 반응시킨 후 발색을 시키기 위하여 4-chloro-1-naphthol을 기질로 사용하였다.

### 4) Enzyme-linked immunosorbent assay

각 단계별 정제과정에 의해 용출된 각 분획의 IGF-I 정제도와 그 함량은 Battelli 등(1999)의 방법을 이용하여 sandwich ELISA로 측정하였다. capture antibody로는 monoclonal anti-human IGF-I antibody(R&D systems, USA)를 사용하였고 detection antibody는 biotinylated anti-human IGF-I antibody(R&D systems, USA)를 사용하였다. streptavidin-HRP를 200배 희석하여 well당 100 $\mu$ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분 반응시킨 후 세척하였다. 마지막 발색반응단계에서 1% TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 기질로 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 recombinant human IGF-I (R&D systems, USA)을 사용하여 IGF-I의 함량을 산출하였다.

#### 나. IGF-I의 면역세포 증식효과 및 cytokines분비능력 검증

##### 1) IGF-I의 면역세포 증식효과 측정

실험에 사용한 세포주는 murine T lymphoma cell인 EL-4(KCLB 40039)로 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다. EL-4 cell의 medium은 10%(v/v)의 horse serum, 1% 항생제(penicillin-100units/ml, streptomycin-100 $\mu$ g/ml)를 포함한

DMEM(Gibco/BRL, USA)를 사용하여 T-75 flask (TPP, Swiss)에서 배양하였다. 세포가 충분히 배양된 상태일 때 새로운 T-75 flask에 20 : 1의 비율로 계대 배양하며 사용하였다.

EL4 cell은  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주한 후 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 동안 배양한 후 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 처리하여 나타난 발색도로 증식율을 측정하였다.

## 2) IGF-I의 cytokines 분비능력 검증

### 가) Bioassay에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성량 측정

RAW264.7 세포를 96-well plate에 배양하여, 이에 일정농도의 IGF-I을 6시간 처리한다. 배양액을 회수하여 TNF- $\alpha$ 에 민감한 L929 세포에 actinomycin과 함께 24시간 처리한다. 그런 후 MTT를 배양된 L929세포의 배지에 가한 다음 37°C에서 4시간 더 배양하고, 각 well의 배지를 제거하고 PBS로 갈아준다. 여기에 SDS 용액을 첨가하고 37°C에서 18시간 배양하여 발색도를 microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정한다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan으로 분해된 양을 나타내며 각 well의 생존 세포수에 비례한다. 따라서 TNF- $\alpha$  생성량과 L929의 세포생존률은 반비례하며, 이를 TNF- $\alpha$  생성량의 지표로 사용하였다.

### 나) ELISA에 의한 cytokine 분비량의 측정

Murine macrophage인 RAW264.7 cell을 IGF-I (R&D system, USA)과 IGF-I rf 및 whey로 자극시킨 배양상등액을 sandwich ELISA로 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-6의 함량을 정량하였다. 이때 각 시료로 RAW264.7 cell을 자극시킨 배양상등액은 각각 8시간 10시간 12시간에 상등액을 회수하여 시간에 따른 각각의 cytokine 분비량을 비교하였다.

## 다. IGF-I의 항암효과 검증

### 1) 세포배양

암세포주는 A-427, SK-HEP-1, A-498, HeLa, WiDr, SNU-C1을 사용하였고, 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다(Table 1).

Table 1. Culture conditions for human-derived cancer cell lines

Cell Name (KCLB number)	Tissue	Histopathology	Culture medium	Split ratio	Optimum concentration (cells/well)
A-427 (30053)	lung	carcinoma	DMEM +10% FBS	1 : 6	$2 \times 10^4$
SK-HEP-1 (30052)	liver	adenocarcinoma ; ascites	DMEM +10% FBS	1 : 3	$5 \times 10^3$
A-498 (30044)	kidney	carcinoma	DMEM +10% FBS	1 : 4	$3 \times 10^3$
HeLa (10002)	cervix, uterine	adenocarcinoma	RPMI1640 +10% FBS	1 : 5	$2 \times 10^3$
WiDr (102118)	colon	adenocarcinoma	DMEM +10% FBS	1 : 4	$3 \times 10^3$
SNU-C1 (00001)	stomach	adenocarcinoma	RPMI1640 +10% FBS	1 : 4	$7 \times 10^3$

2) Cytotoxicity 측정

IGF-I rf의 암세포주에 대한 cell mediated cytotoxicity를 측정하기 위하여 배양된 각 암세포주는 최적 농도로 조절하여 실험하였다. 적정농도로 조절된 96 well microplate에 분주하여 4시간 동안 전배양한 후 배양에 사용된 medium을 제거하고 새로운 culture medium을  $180\mu\text{l}$ 와 각 시료를 농도별로  $20\mu\text{l}$ 를 넣어 well 부피를  $200\mu\text{l}$ 가 되도록 조절하였다.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 48시간 동안 배양한 후 MTT 용액을  $10\mu\text{l}$ 씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 상등액을 조심스럽게 제거하고 formazan 결정을 부유시키기 위해 PBS buffer  $100\mu\text{l}$  와 20% SDS 용액을  $50\mu\text{l}$ 씩 분주하여 18시간 동안 발색시킨 후, ELISA microplate reader로 흡광도(540nm)를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{Sample O.D.} - \text{Negative Control O.D.}}{\text{Negative Control O.D.}} \times 100$$

라. IGF-I이 murine macrophage와 murine splenocyte의 면역활성에 미치는 영향

1) 실험설계

IGF-I이 mouse 면역에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *in vivo*와 *in vitro* test로 실험하였다. *In vivo* test는 2주 동안 마우스의 복강에 시료를 직접 투여함으로써 생체내의 면역반응을 실험하였다(Table 2). *In vitro* test에서는 5주령 마우스에서 비장 세포와 대식세포를 분리하여 *in vivo*의 시료와 동일한 농도로 세포에 처리함으로써 IGF-I이 마우스의 *in vitro*에서 미치는 면역 활성 효과를 측정하였다.

본 연구에 사용한 실험동물은 4주령의 CD-1 (ICR)계 웅성 mouse를 사용하였고, 항온항습 (22±1°C, 55±5%) 및 light dark cycle을 12시간 단위로 자동 조절되도록 하였으며, 물과 사료를 충분히 공급하면서 1주 동안 실험 환경에 적응시켜 예비사육한 후 실험에 사용하였다.

Table 2. Design on *in-vivo* animal experiment

Group number	Sample	Dose (µg/mouse)	Mouse (n)
1	PBS	-	6
2	IGF-I rf	1	6
3		0.1	6
4		0.01	6
5		0.001	6
6		1	6
7	IGF-I	0.1	6
8		0.01	6
9		0.001	6
10	Whey	1	6
11		0.1	6
12		0.01	6
13		0.001	6

1) IGF-I rf means IGF-I rich fraction: IGF-I rf was contained IGF-I 10ng in 1mg of protein. 2) IGF-I : standard IGF-I(R&D system, USA) 3) Mice were intraperitoneal (I.P.) injected everyday for 2weeks with IGF-I, IGF-I rf and whey at the concentration of 0.001, 0.01, 0.1 and 1µg/200µl(Concentration of administration into mouse were at 0.05, 0.5, 5 and 50µg/kg/day ).

## 2) 복강 macrophage의 활성화 측정

### 가) 복강 Macrophage 분리

생후 5주령 mouse의 복강 내 대식세포를 증가시키기 위해 1% thioglycollate (Sigma, USA) 1ml을 복강에 투여하고 3일후에 ether로 안락사 시킨 후 복강대식세포를 분리하였다.

### 나) IL-6의 생성도 측정

마우스의 대식세포에서 분비되는 Interleukin-6 (IL-6)의 생성에 IGF-I이 미치는 영향을 알아보기 위해 sandwich ELISA를 이용하여 생성된 IL-6를 정량하였다.

분리한 대식세포를 96 well microplate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하고 각 IGF-I, IGF-I rf와 whey를 각 농도별로 처리하여 18시간배양한 후 상등액을 회수하여 배양상등액 중의 IL-6를 sandwich ELISA정량하였다.

### 다) NO의 생성도 측정

복강 대식세포가 항암효과를 나타내는 기전의 하나인 NO 생성에 대해 IGF-I이 미치는 영향은 분리한 대식세포에 각 샘플을 농도별로 처리하여 배양한 상등액 중의 nitric oxide 생성 농도를 Griess 방법으로 측정하였다. 즉, 대식세포의 배양상등액 100 $\mu$ l를 microplate에 옮긴 후 Griess reagent I 액(0.2% naphthylethylene)과 II 액(10% phosphoric acid containing 2% sulfanilamide)을 각각 50 $\mu$ l씩 첨가하였다. 상온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였고 NO의 농도는 sodium nitrite의 표준곡선을 작성하여 이에 준하여 계산하였다.

### 라) TNF- $\alpha$ 생성도 측정

분리한 mouse의 대식세포를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하고, *in vitro* test 경우는 IGF-I, IGF-I rf 및 whey를 각 농도별로 첨가하여 활성화시킨 후 배양상등액 100  $\mu$ l를 취하였다. 이를 L929 cell에 첨가하여 L929세포의 증식 저해율로 상등액 중의 생성된 TNF- $\alpha$  양을 측정하였다.

### 마) 탐식작용 측정

Macrophage의 탐식능은 zymosan particle 방법 (Okimura 등, 1986)과 NBT

(4-nitroblue tetrazolium chloride) reduction 방법(Stossel 등, 1973)을 이용하여 측정하였다.

### 3) Splenocyte의 활성화 측정

#### 가) Natural Killer cell의 항암효과 측정

NK cell의 활성측정은 NK cell에 예민한 YAC-1 cell에 대한 cytotoxicity를 측정하였다. 비장세포를 96 well microplate에  $5 \times 10^5$  cell/well의 농도로 넣은 후 YAC-1 cell을 target cell로 하여 50 : 1의 비율로 넣었으며, 그리고 *in vitro* test는 IGF-I, IGF-I rf 및 whey를 농도별로 처리하여 20시간동안 배양하였다. 세포증식은 MTT(1mg/ml) 25 $\mu$ l/well를 가하였고 4시간동안 배양한 후 생성된 formazan은 SDS/PBS 100 $\mu$ l를 넣어서 용해시킨 후 540nm에서 측정하였다.

#### 나) Splenocyte의 증식효과 측정

비장세포를 96 well microplate에  $5 \times 10^5$  cell/well의 농도로 분주하였다. 단, *in vitro*는 각 시료를 농도별로 가하였다. 세포증식을 위한 mitogen으로 LPS (10 $\mu$ g/ml)와 Con A (2.5 $\mu$ g/ml)를 첨가하여 각각 B cell과 T cell의 증식능력을 측정하였다.

#### 마. 초유 IGF-I와 형질전환 IGF-I의 구조적 유의성 검증

##### 1) N-terminal amino acid sequence 확인

초유와 누에고치로부터 분리·정제한 IGF-I의 N-terminal amino acid sequence는 Applied Biosystem Model 491 protein sequencer(한국기초과학지원 연구원)를 이용하여 분석하였다.

##### 2) 등전점 측정(isoelectric focusing)

정제한 IGF-I 등전점을 측정하기 위하여 Robertson 등(1987)의 방법으로 등전점 전기영동을 실시하였다. 5%의 acrylamide gel (3.3%, pH 3.5~10.0)을 제조하여 Mini-Protein II(Bio-rad, USA)을 사용하여 IEF-PAGE를 하였다. cathode buffer는 20mM NaOH를 anode buffer는 10mM phosphoric acid를 사용하였으며 current voltage로 200V에서 30분, 200V에서 1시간 30분을 전개시킨 후 10%의 trichloroacetic acid에서 20분간 고정시켰다. 그런 후 1% trichloroacetic acid에서 2시간 동안 정치시

킨 후 SDS-PAGE에서 사용한 것과 같이 염색과 탈색을 하였다.

### 3) 아미노산 조성 분석

아미노산 분석은 HPLC로 취한 각각의 IGF-I 시료를 건조하여 이를 HCl로 110°C에서 24시간 가수분해한 후 가수분해된 아미노산을 PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체화 시켰다. 이를 HPLC(1100 Series, Hewlett Packard, 한국기초과학지원 연구원)로 분석하였다. 분석된 측정치를 각 아미노산의 분자량을 참고로 하여 각각의 아미노산 잔기수를 산출하였다.

### 바. 형질전환 IGF-I와 초유중의 IGF-I의 생리적 기능 비교 검토

#### 1) 형질전환 IGF-I와 초유 중의 IGF-I의 세포증식효과 비교 측정

누에로부터 형질 전환시켜 얻은 IGF-I rf과 초유로부터 얻어진 IGF-I rf를 사용하여 cell line에서의 세포증식효과를 측정하였다. 실험에 사용한 세포주는 Detroit 551, L6, IEC-6로 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다(Table 3). 증식효과 측정은 앞서 수행한 세포증식효과 측정에서와 동일한 방법을 사용하였다.

Table 3. Culture conditions for cell lines

Cell Name (KCLB No.)	Tissue	Histopathology	Culture medium	Split ratio	Optimum concentration (cells/0.1ml/well)
Detroit 551 (10110)	skin	normal	DMEM+ 10% FBS	1 : 4	$5 \times 10^4$
L6 (21458)	muscle	normal	DMEM+ 10% FBS	1 : 5	$1 \times 10^4$
IEC-6 (21592)	epithelial	normal	DMEM+ 10% FBS	1 : 5	$1 \times 10^5$

#### 2) 형질전환 IGF-I와 초유 중의 IGF-I의 항암효과 비교 측정

앞서 수행한 세포주를 이용한 항암효과 측정 방법으로 누에로부터 형질 전환시켜 얻은 IGF-I rf과 초유로부터 얻어진 IGF-I rf를 사용하여 cancer cell line에서의 항암효과를 측정하였다.



## 2. 연구개발 수행 결과

### 가. IGF-I의 분리 및 정제

#### 1) Ion exchange chromatography

젯소 초유에서의 IGF-I 분리 정제는 Francis 등(1986)과 Yandell 등(1998)의 방법에 준하여 SP-Sephadex C-25 ion-exchange chromatography 방법을 사용하여 IGF-I을 함유하고 있는 분획을 분리하였다. IGF-I 분획의 방법으로는 Honegger 등(1986)의 gel filtration chromatography와 Hossner과 Yemm(2000)이 분자량을 cut off 시키는 diafiltration 등의 다양한 방법을 사용하였지만 이러한 방법들은 시료의 손실이 많아 회수량이 극히 미량이므로 본 연구에서는 이들 방법의 단점을 고려하여, 먼저 ion exchange chromatography를 실시하여 IGF-I을 함유하는 분획의 회수율을 높이는 방법을 실시하였다.

SP Sephadex C-25 ion exchange chromatography에서 50mM ammonium acetate buffer (pH 5.5)를 4ml/min의 유속으로, absorbance 280nm에서 0.05이하까지 흘려줌으로써 anion을 가지는 분자들을 일차적으로 제거하였다. 그리고 난 후 50mM ammonium acetate (pH 5.5)와 1M-NaCl을 함유하는 0.25M-NH<sub>3</sub> 용액으로 linear gradient를 걸어주면서 fraction collector (Bio-Rad, USA)를 사용하여 fraction을 회수하였다. 그 결과 ion의 강도와 특성에 따라 4개의 peak가 분리되었음을 확인하였다 (Fig. 1).

Ion exchange chromatography에 의해서 분리된 4개 peak의 분자량과 이들 분획 중 IGF-I을 포함하는 분획을 검색하기 위한 방법으로서 SDS-PAGE(Fig. 2)와 ELISA(Fig. 1)를 실시하였다. 먼저 분리된 분획의 분자량을 측정하기 위하여 Fraction No. 28, 32, 57, 173, 216, 229, 239를 차례로 SDS-PAGE를 실시한 결과 Fraction No. 28, 32, 57, 173에서 보이는 밴드의 분자량은 marker와 비교해보면 20kDa 이하의 분자가 주를 이루었고, Fraction No. 216, 229, 239는 30kDa 이상의 분자들이 분획되었음을 알 수 있었다. 그러나 밴드에 나타난 결과로는 각 fraction의 분자량은 알 수 있지만, IGF-I의 분자가 실제로 포함되어 있는 fraction의 위치는 파악할 수는 없었기 때문에 ELISA를 실시하여 IGF-I이 존재하는 fraction을 알아보았다. 그 결과 Fig. 1에서 막대그래프로 나타낸 바와 같이 Fraction No. 20~90에서 IGF-I의 용출 농도가 가장 높았으며, buffer의 NaCl 농도는 0.1~0.2M 부근이었다.

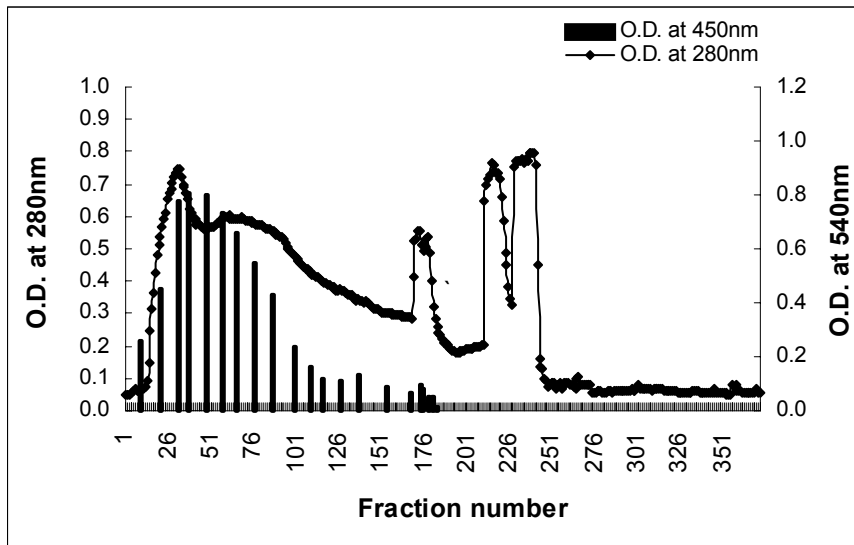


Fig. 1. Spectrometric and ELISA test on the fractions of IGF-I separated by SP Sephadex C-25 chromatography.

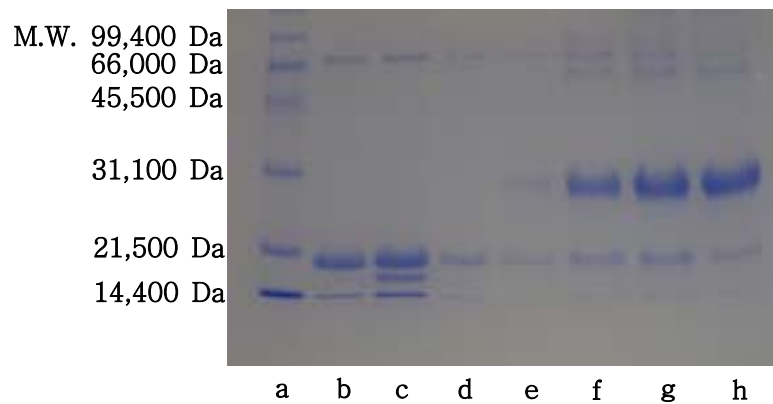


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of the fractions separated by SP Sephadex C-25 chromatography. Lane a : Low molecular weight marker(Bio-Rad, USA), lane b : fraction No. 28, lane c : fraction No. 32, lane d : fraction No. 57, lane e : fraction No. 173, lane f : fraction No. 216, lane g-fraction No. 229, lane h : fraction No. 239

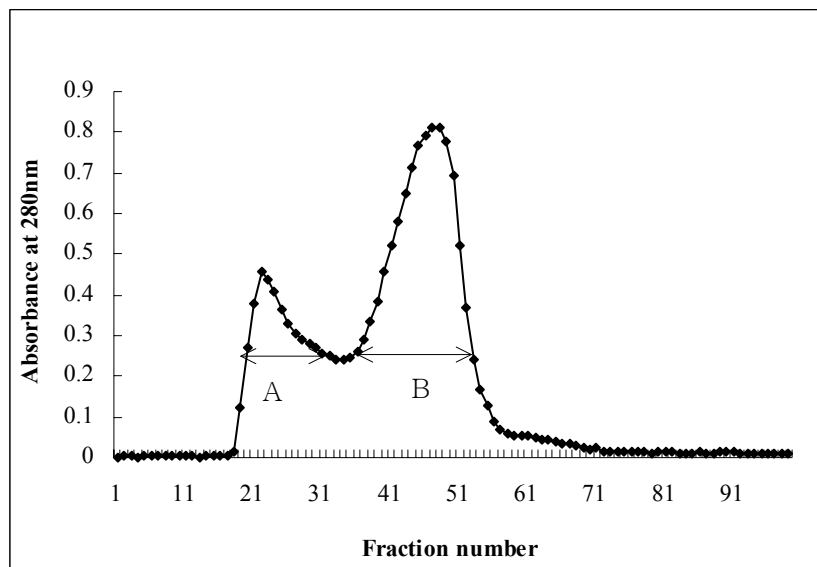
이러한 결과는 단백질 농도가 높게 나타난 다른 3개의 peak 부분에서는 IGF-I이 극히 미량 존재하거나, 검출되지 않음으로써 IGF-I에 대하여 항체의 특이적인 반응이 이루어졌음을 확인할 수 있는 결과였고, buffer의 NaCl 농도가 0.3~0.5M까지 미량 이긴 하지만 IGF-I이 용출되어졌음을 확인하였다.

## 2) Gel filtration chromatography

Ion exchange chromatography에 의해 용출된 분획을 전기영동과 sandwich ELISA를 실시하여 IGF-I을 포함하고 있는 분획을 검색하였고 이 분획들을 회수하였다.

Ion exchange chromatography에서 회수한 분획은 gel filtration chromatography를 실시하기 위하여 1kDa membrane을 사용하여 ultrafiltration(Amicon, USA)으로 농축시킨 후 SP-Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 실시하였다.

Ion exchange chromatography에서 회수한 fraction을 농축한 분획은 gel filtration chromatography에 의해 A와 B 두개의 peak로 분리 되었다(Fig. 3)



**Fig. 3. Purification of IGF-I using sephadex G-75.**

A : Fractions from 19 to 33 contained protein bigger than M.W. 20kDa

B : IGF-I is purified from the fractions between 41 and 51

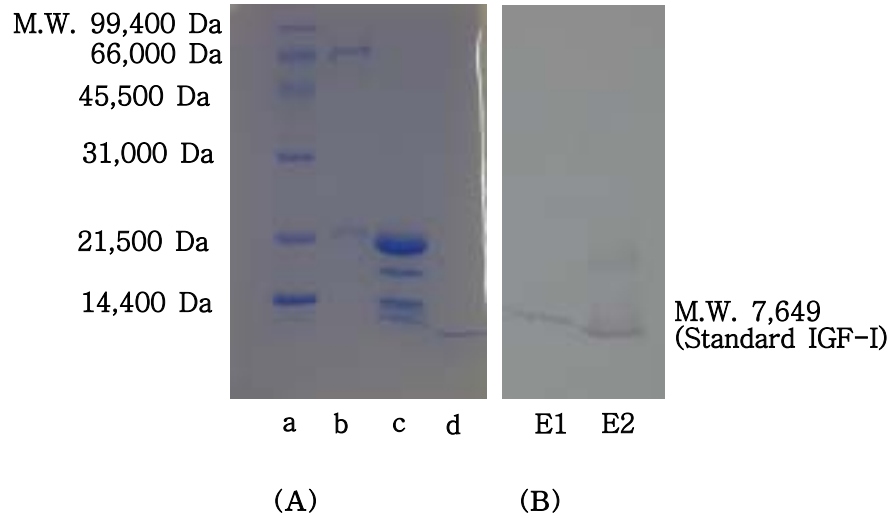


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and western blotting (B) analysis patterns of fractions separated from Sephadex G-75 chromatography. Lane a : low molecular weight marker(Bio-Rad, USA), lane b : fraction No. 20~31(Peak A), lane c : fraction No. 41~51(Peak B), lane d : standard IGF-I (R&D system, USA), lane E1 : electrophoresis lane c, lane E2 : electrophoresis lane d

두개의 peak에 상당하는 분획을 회수하여 SDS-PAGE를 한 결과 peak A에서는 66,000Da과 21,500Da의 두개의 분리대가 나타났으며 peak B에서는 21,500Da과 14,400Da 사이의 4개의 분리대와 약 10,000Da 이하의 위치에서 1개의 분리대가 나타났다. 그리고 10,000Da 이하의 분리대는 standard IGF-I (R&D systems, USA)의 분자량 7,649Da의 분리대와 거의 유사한 이동도의 분자량을 가진 peptide로 확인되었다. 따라서 이로써 peak B에서 약10,000Da 이하에서 분리된 peptide가 IGF-I과 동일한 물질인지를 확인하기 위해 western blotting한 결과 Fig. 4와 같다. 그 결과 Fig. 4의 lane c에서 분리된 단백질 중에서 standard IGF-I(R&D system, USA)과 비슷한 이동도를 보이는 약 10,000Da이하의 단백질만 anti-human IGF-I과 반응하는 것으로 확인됨으로써 소의 초유 유청의 IGF-I은 SP-Sephadex G-75 chromatography에서 분획된 peak B에 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

3) Ultrafiltration에 의한 IGF-I 농축

SDS-PAGE 분석결과 ion-exchange chromatography와 gel filtration chromatography에 의해 분리한 분획 중에서 IGF-I을 포함하고 있는 분획은 IGF-I 뿐만 아니라 10kDa 이상의 단백질도 동시에 존재하고 있다. 그러므로 10kDa 이상의 단백질을 효과적으로 제거하고 순도가 높은 IGF-I을 회수하기 위해서 막 분리(membrane separation)을 이용하였다. 본 실험에서 막 분리에 이용한 membrane은 Centriplus (Amicon/USA)를 사용하여 10kDa 이하의 peptide 분획을 회수하여 IGF-I을 분리하였다. 분리한 IGF-I 분획물의 SDS-PAGE와 Western blot의 분석 결과는 Fig.5과 같으며 Centriplus 처리에 의해서 10kDa 이상의 분자가 제거되었다(Lane b). 그리고 10kDa 이하의 분획물은 SDS-PAGE 결과 IGF-I을 함유하고 있으며(Lane c), Western blotting 분석결과 standard IGF-I과 동일한 peptide의 분리대가 존재한다는 것이 확인되었다(Lane F1).

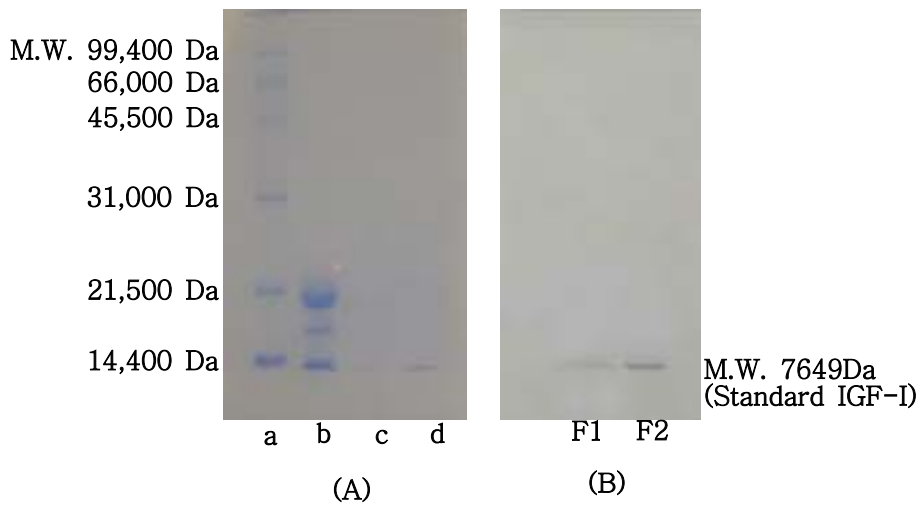


Fig. 5. SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis patterns of fraction separated from membrane filtration. Lane a : Low molecular weight marker (Bio-Rad, USA), lane b : 10kDa < Fraction, lane c : 10kDa > Fraction, lane d : Standard IGF-I(R&D system, USA), lane F1 : standard IGF-I(R&D system, USA), lane F2: 10kDa > Fraction (Lane c)

#### 4) 정제 단계별 IGF-I 회수율

초유 whey 중의 IGF-I의 정제단계별 농도와 회수율을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

본 실험에서 젖소 초유 중의 IGF-I 농도를 ELISA로 측정한 결과 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 분만 후 1일째에  $540\mu\text{g/L}$ 의 농도로 가장 높았고, 분만 4일 이후부터는 IGF-I의 농도가 약  $156\mu\text{g/L}$ 의 농도로 급격히 낮아졌으며 7일째는 약  $36\mu\text{g/L}$ 의 농도로 존재하는 것을 확인하였다. Pakkanen 등(1997)의 bovine milk growth factor에 대한 보고에 의하면 비유기에 따라 초유와 상유를 비교하였을 때 초유 중의 IGF-I은  $50\sim 2000\mu\text{g/L}$ 의 큰 차이의 농도로 존재하며, 상유 중에 IGF-I은  $10\mu\text{g/L}$ 이하의 농도로 존재한다고 보고되어 있다. 또한 Sharron 등(1991)은 bovine colostrum whey 중에 존재하는 IGF-I의 농도가 초유 중에는  $100\sim 600\mu\text{g/L}$ , 상유에서는  $4\sim 14\mu\text{g}$ 의 농도로 존재하고 사람의 초유 중에는  $7\sim 27\mu\text{g/L}$ , 돼지는  $65\sim 357\mu\text{g/L}$  그리고 쥐에서는  $28\sim 30\mu\text{g/L}$ 로서 젖소 초유에서의 IGF-I 함량이 월등히 높음을 보고하였고, 또한 상유에 비해 초유 내에 다량의 IGF-I이 함유되어 있긴 하지만 그 농도는 개체간의 큰 차이를 보이는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 초유중의 IGF-I이 비슷한 함량으로 존재하며 비유기간에 따라서 초유중의 IGF-I 함량이 급격히 변화하는 경향을 나타내었다.

Whey 중의 IGF-I 함량을 측정한 후 정제 단계에 따른 IGF-I의 농도와 회수량을 Table 8에 나타내었다. IGF-I 정제의 최종단계에서 얻어진 IGF-I의 회수율은 초유 중에 존재하는 IGF-I 중 약 2%를 회수하였다. Francis 등(1986)이 IGF-I의 정제를 ion exchange chromatography와 Sep-pak 및 4단계의 HPLC에 의해 정제한 IGF-I의 회수율이 약 0.6%였다고 보고하였다. 본 실험에서의 IGF-I의 회수율도 2%로써 극히 적은 양이었지만 보고된 실험결과와 비교해보면 약 3배가량의 회수율 증가를 보였으며, 또한 정제단계를 줄임으로써 IGF-I의 회수율을 증가시킨 것에 대한 의의가 있다고 생각된다.

Table 4. Recovery ratio of IGF-I from bovine colostrum whey after each purification step

Purification Step	Volume (ml)	IGF-I content ( $\mu\text{g}$ )	Recovery rate (%)
Whey*	1000	540	100
SP Sephadex C-25	253.5	54	10
SP Sephadex G-75	10	12	2.2
Centriplus	5	12	2

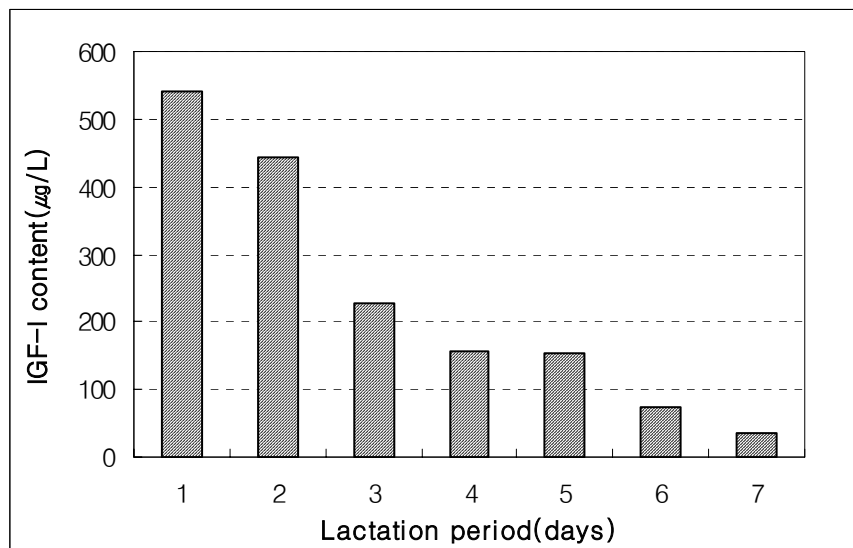


Fig. 6. Changes of IGF-I content in colostrum whey during 7 days after parturition.

## 나. IGF-I의 면역세포 증식효과 및 cytokines분비능력 측정

### 1) 시료 제조

초유 유청 중 IGF-I의 cell line 면역활성 능력을 시험하기 위한 시료는 IGF-I의 분자량이 7.6kDa임을 고려하여 젖소 초유 유청 내의 free IGF-I을 30kDa과 1kDa의 ultrafiltration cartridge를 사용한 ultrafiltration으로 분획하였고, 분리한 분획을 SDS-PAGE로 확인한 다음 사용하였다. 즉, Ultrafiltration cartridge를 이용하여 얻은 분획의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 7과 같다. Lane C의 IGF-I rich fraction에서는 20kDa 이하의 3개 밴드가 존재하였다. 이것은 UF를 사용하여 얻은 IGF-I rich fraction 중에서 거대분자가 효과적으로 제거된 반면에 20,000Da 이하의 분자들은 선택적으로 분리 되었다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Hossne 과 Yemm(2000)이 초유를 30kD의 membrane으로 diafiltration 처리하여 30kDa 이상 혹은 이하의 분획으로 나누어 각각의 분획을 SDS-PAGE로써 확인한 결과 30kDa 이상의 분획에서 저분자 단백질은 제거되었음을 보여준 실험결과와 동일한 결과를 보였다. IGF-I rich fraction이 IGF-I 분자를 함유하고 있는지 확인하기 위해 실시한 Western blot 분석 결과는 Fig. 8과 같았다. 즉, IGF-I rich fraction(A)이 standard IGF-I(B) 보다는 발색의 정도에는 다소 차이를 보였지만 IGF-I rich fraction 내에 IGF-I peptide가 존재하는 것을 확인하였다. 또한 IGF-I rich fraction 중에 IGF-I 함량은 ELISA로 측정된 결과 IGF-I rich fraction 1mg 중 10ng의 IGF-I이 함유되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 9).



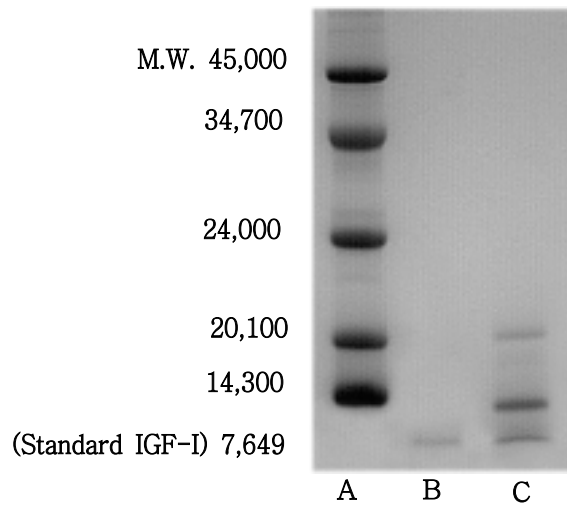


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration. Lane A : Low molecular weight marker(Sigma. USA), lane B : Standard IGF-I (R&D systems. USA), lane C : IGF-I rf(IGF-I rich fraction)

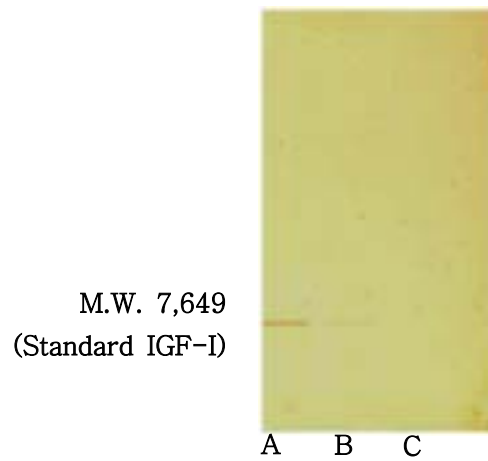
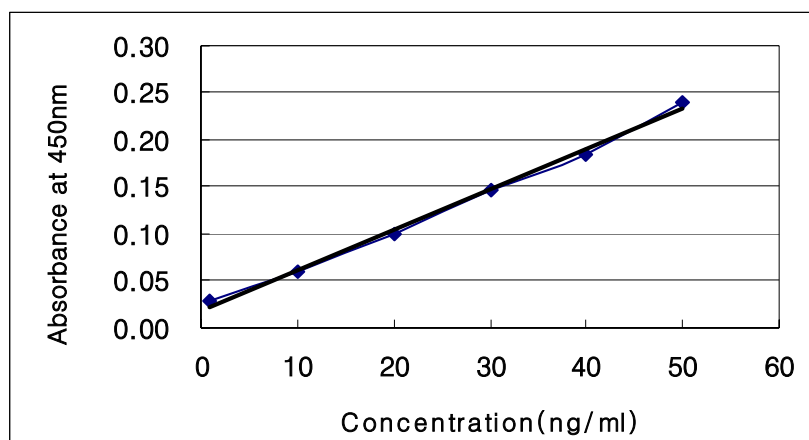
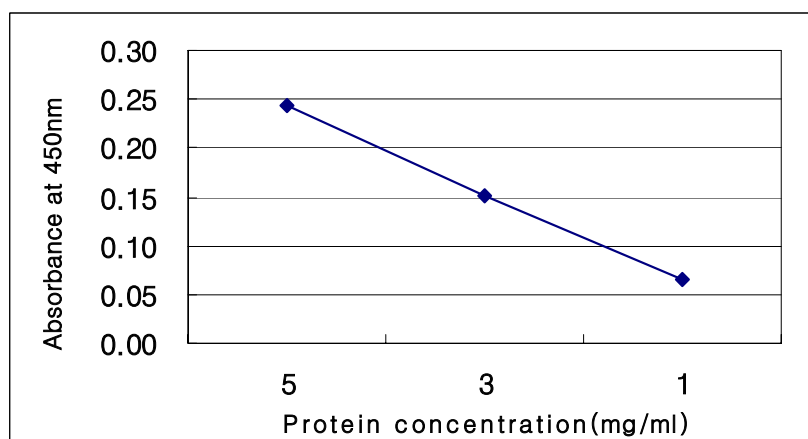


Fig. 8. Western blotting analysis of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration. Lane A : Standard IGF-I(R&D systems, USA), lane B : IGF-I rich fraction, lane C : Bovine Serum Albumin



(a) IGF-I standard curve



(b) IGF-I quantity in IGF rf

Fig. 9. Standard curve (a) and quantitative analysis of IGF-I in IGF-I rich fraction quantitative analysis of IGF-I (b) with sandwich ELISA.

- Standard IGF-I (R&D system, USA). IGF-I rf means IGF-I rich fraction.

## 2) IGF-I의 면역세포 증식효과 측정

초유 유청 IGF-I rich fraction이 *in vitro* 세포 증식에 미치는 영향을 실험하기 위하여 EL-4(Th cell) cell line을 이용하였다.

세포증식 실험에 사용한 IGF-I rich fraction의 IGF-I 함량은 단백질 1mg당 10ng이었으며 투여한 단백질의 양을 기준으로 처리하였다.

EL-4 cell은 1mg/ml에서 대조구에 비해 54.57%, 0.1mg/ml에서는 약 27.57%의 세포 성장률 증가를 나타내었다(Fig. 10). Qureshi 등(1997)은 human esophageal epithelial cell에 IGF-I을 처리했을 때 세포수가 농도 의존적인 증가율을 나타내었음을 보고하였고 또한 세포배양 3일 후에는 대조구에 비해 IGF-I 처리구는 두 배의 세포수가 증가한다고 하였다. 본 실험에서도 그들의 결과와 동일한 경향을 나타내는 것으로 보아 IGF-I이 세포 성장을 촉진한다는 사실이 확인되었다.

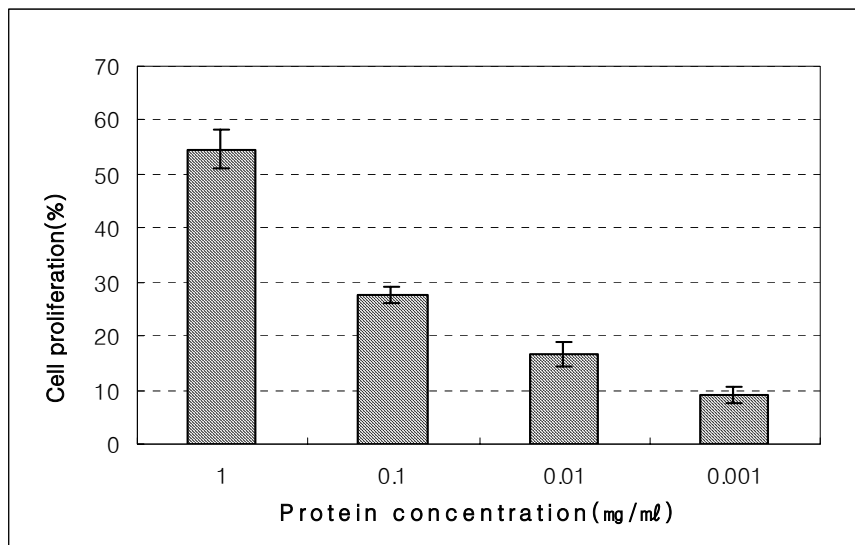


Fig. 10. The Effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on the proliferation of EL-4 cells. Supplementation cells of IGF-I rich fraction, which is contained 10ng IGF-I in 1mg protein were ranged 1 to 0.001 mg/ml. Percentage of cell proliferation was expressed by MTT assay.

### 3) IGF-I의 cytokines분비능력 측정

#### 가) IGF-I의 세포독성 측정

IGF-I rich fraction이 TNF- $\alpha$ 의 생성에 미치는 영향을 측정하였다. TNF- $\alpha$ 의 생성은 murine macrophage인 RAW264.7 cell을 사용하여 분비를 유도시켰고, 분비된 TNF- $\alpha$  함유액은 TNF- $\alpha$ 에 민감한 L929 cell을 이용하여 bioassay를 실시하였다. IGF-I rich fraction의 세포 독성을 시험하기 위해서 TNF- $\alpha$  bioassay에 이용하는 RAW264.7 cell로서 IGF-I rich fraction 자체에 대한 독성을 가지는지 실험하였고 그 결과는 Fig. 11과 같다. IGF-I rich fraction을 단백질 함량 기준으로 1, 10, 100 $\mu$ g/ml 및 1mg/ml의 수준으로 18시간 동안 자극하였을 때 대조구 대비 95% 이상의 생존율을 나타내었기 때문에 IGF-I rich fraction은 RAW264.7 cell에 대해 세포독성을 나타내지 않는다는 사실을 확인하였다.

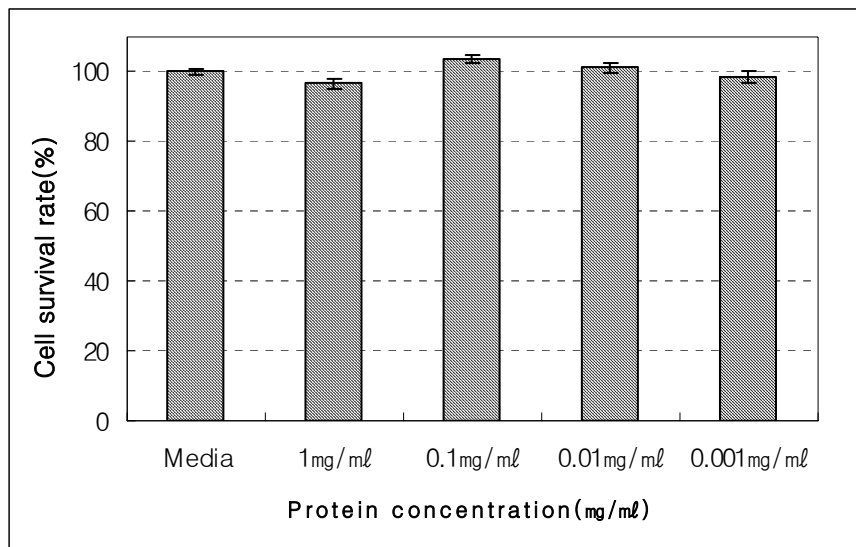


Fig. 11. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on the cytotoxicity to RAW264.7 cells. Supplementation cells of IGF-I rich fraction, which is contained 10ng IGF-I in 1mg protein were ranged 1 to 0.001mg/ml. Percentage of cell survival rate was expressed by MTT assay.

나) Bioassay에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성량 측정

IGF-I rich fraction 투여에 의해 RAW264.7 cell이 TNF- $\alpha$  생산에 대한 효과와 생리활성을 시험하기 위해서 IGF-I rich fraction 10, 1, 0.1, 0.01mg/ml 및 0.001mg/ml의 농도로 투여하였고 얻어진 결과는 Fig. 12와 같다.

IGF-I rich fraction 0.001mg/ml 과 0.01mg/ml의 농도에서 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 각각 55.5%와 54%의 L929 cell의 생존율을 나타냄으로써 거의 유사한 TNF- $\alpha$  생산 능력이 있음을 보여주었고, 0.1mg/ml의 농도에서는 약 45%의 생존율과, 1mg/ml의 농도로 자극시켰을 시는 약 35%의 생존율을 나타내었다. 그리고 양성대조구인 LPS 1 $\mu$ g/ml 농도에 의해 자극된 결과 약 56%의 L929 생존율 나타내었다. 이러한 결과는 IGF-I가 TNF- $\alpha$  분비를 유도하는 것으로 나타났고 TNF- $\alpha$ 의 생성량은 농도 의존적이었다. 또한 양성대조구 LPS가 1 $\mu$ g/ml과 IGF-I rich fraction 농도와 거의 유사한 수준으로 TNF- $\alpha$  분비를 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 세포내에서 free radical 생산 억제에 의해 노화방지에 영향을 미칠 수 있으며 더 나아가서 IGF-I rich fraction은 macrophage에서 TNF- $\alpha$ 의 생산을 자극하여 종양세포의 괴사 유도에 관여할 것으로 판단된다.

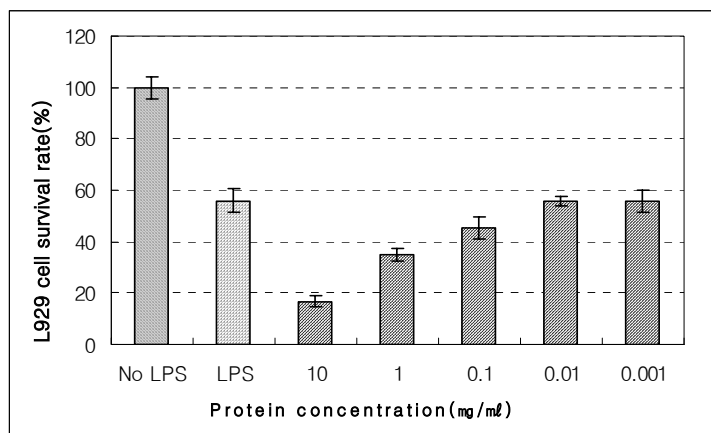


Fig. 12. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on TNF- $\alpha$  production assayed by the survival rate of L929 cells. TNF- $\alpha$  production was expressed by growth inhibition of L929 cells, and survival rate was measured by MTT assay in which the supernatant of RAW264.7 cells cultured for 18 hrs was applied to L929 cells. No LPS means negative control and LPS means positive control(1 $\mu$ g/ml).

다) IGF-I rich fraction이 IL-6 생성에 미치는 영향

IGF-I rich fraction이 IL-6의 생산에 미치는 영향에 대해서 시험하기 위하여 RAW264.7 cell에 IGF-I rich fraction을 1, 10 그리고 100ng/ml 투여하였고, IL-6를 생산한 결과는 Fig. 13과 같다.

Lymphocyte인 EL4 cell로부터 IL-2와 IL-6의 분비량을 측정된 결과 자극시간과 IGF-I rich fraction의 농도에 상관없이 거의 분비되지 않는 것으로 관찰되어 IGF-I이 EL4 cell의 cytokine IL-2와 IL-6의 분비에 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다(data not shown).

Macrophage인 RAW264.7 cell로부터 IGF-I에 의한 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 분비량을 측정하였고 lymphocyte인 EL4 cell로부터 IL-2와 IL-6의 분비량을 측정하였다. 실험결과 IL-1 $\beta$ 는 RAW264.7 cell에서 자극 시간에 상관없이 IGF-I에 의해 거의 분비되지 않아 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다(data not shown).

그러나 IGF-I rich fraction 1, 10, 100ng/ml로 10시간동안 배양했을 때 0.38, 1.1, 6.17ng의 IL-6를 분비하였으며, IGF-I 1, 10, 100ng/ml 농도로 10시간 배양했을 때 1.89, 2.17, 2.37ng을 각각 분비하였고 whey는 배양시간과 농도에 거의 영향을 받지 않았고 IL-6의 생산량도 10ng이하의 극미량으로 나타났다. IGF-I과 IGF-I rich fraction은 배양시간과 처리농도에 의존적으로 IL-6를 생산하는 것으로 나타났으며 10ng/ml 이하의 처리농도에서 IGF-I 이 IGF-I rich fraction보다 IL-6 생산량이 약 3 배 높게 나타났으나 100ng/ml 의 처리농도에서는 IGF-I rich fraction이 IGF-I보다 약 3배 많은 IL-6 생산량을 나타내었다. IGF-I의 경우 일정한 농도와 시간동안 배양했을 때 IGF-I rich fraction과 유청에 비해 IL-6 생산능력이 아주 높았다. IGF-I rich fraction의 경우에는 12시간 이상 배양했을 때 가장 많이 IL-6를 생산하였으며 이러한 결과는 IGF-I rich fraction중에 포함된 다른 생리활성물질과의 상승작용에서 기인한 것으로 생각된다.

본 연구에서 IGF-I rich fraction이 유청보다 IL-6를 더 많이 생산하는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 IGF-I rich fraction이 macrophage의 활성화에 기여할 것으로 여겨진다.

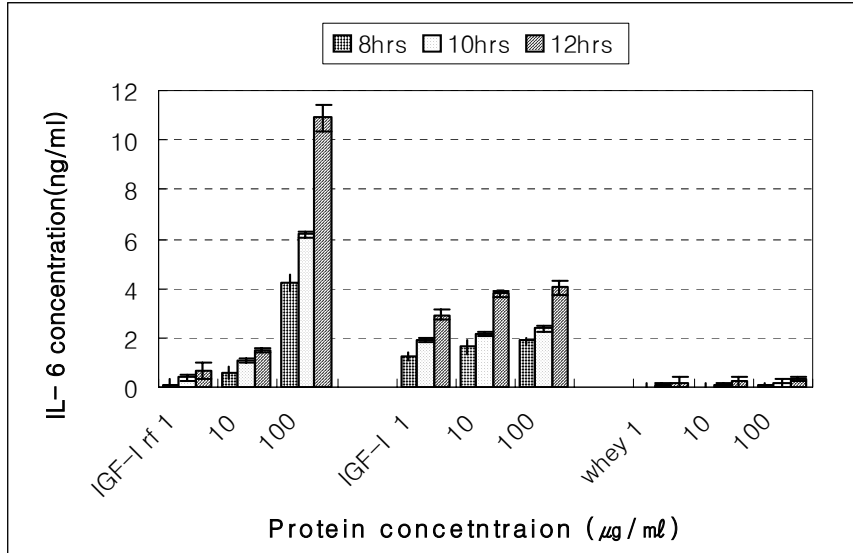


Fig. 13. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on IL-6 production from RAW264.7 cells. IL-6 in the supernatant of RAW264.7 cells cultured for 18 hrs was determined by sandwich ELISA. IGF-I rf means IGF-I rich fraction in which is contained 10ng per 1mg protein.

다. IGF-I의 항암효과 측정

1) Cytotoxicity 측정

초유 유청 유래 IGF-I rich fraction이 암세포에 미치는 영향에 대해서 연구하기 위해서 A427, SK-HEP-1, A498, HeLa, WiDr 및 SNU-C1 의 cell line을 이용하였고 MTT assay로 세포독성을 측정하였다. 암세포에 대한 세포 독성 시험에 사용한 IGF-I rich fraction의 IGF-I 함량은 단백질 1mg당 10ng이었으며 단백질의 양을 기준으로 세포독성을 측정하였다.

Lung cancer cell인 A427에 대한 연구에서 IGF-I rf에 의해 1mg/ml IGF-I rich fraction에서 32.35%, 0.1mg/ml의 농도에서는 22.56%, 0.01mg/ml에서 20%와 0.001mg/ml에서는 13%의 세포 성장억제 효과를 나타내었다(Fig. 14).

IGF-I rich fraction이 간암 세포인 SK-HEP-1 세포 성장에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 15와 같다. 1mg/ml의 농도에서 IGF-I rich fraction은 대조구에 비하여 2.1%, 0.1mg/ml의 농도에서는 8.4%, 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 17.33%와 13.07%의 암세포 성장 억제율을 보였다.

신장암 세포인 A498 cell에 대한 실험에서 1mg/ml의 농도일 때 23%의 암세포 성장 저해 효과를 보였으며 0.1mg/ml의 농도에서는 9.2%의 성장저해율과 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 1.4%와 0.9%의 성장 저해율을 나타내었으며 0.01mg/ml이하의 농도에서는 암세포 성장저해 효과는 거의 없었으며 mitogen으로서의 활성은 나타나지 않았다(Fig. 16).

IGF-I rich fraction이 자궁암 세포인 HeLa cell의 성장저해에 대한 시험에서 1mg/ml의 농도에서 4.9%의 세포 증식 저해율을 나타내었으며 0.1, 0.01과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 3.2%, 3.5% 및 2.3%의 세포 성장 저해율을 보였고 신장암 세포주와 유사한 경향을 보였다(Fig. 17).

IGF-I rich fraction이 직장암 세포인 WiDr cell에 미치는 영향은 Fig. 18과 같이 1mg/ml 농도에서 28.45%의 세포성장 저해율을 나타내었고, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 13%, 11.26%와 2.3%의 세포 성장 저해율을 나타내었다.

IGF-I rich fraction이 위암 세포주 SNU-C1에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 19과 같이 1mg/ml과 0.1mg/ml의 농도에서 각각 17.12%와 9.75%의 세포 증식을 보였고 0.01, 0.001 $\mu$ g/ml의 농도에서는 각각 4.75% 와 5.49%의 세포 증식률을 나타내었다. 다른 암세포와는 달리 위암 세포주는 IGF-I rich fraction의 첨가에 의해서 세포의 증식을 증진하는 것으로 나타났다.



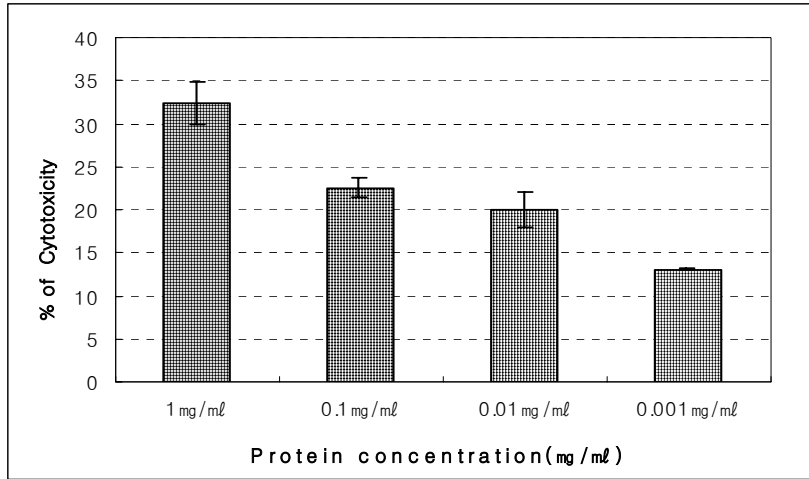


Fig. 14. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostral whey by ultrafiltration on the cytotoxicity to A427 cells.

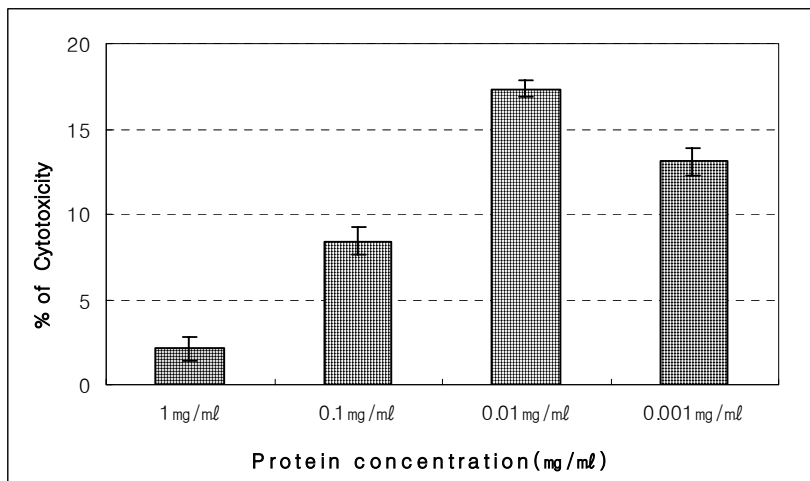


Fig. 15. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostral whey by ultrafiltration on the cytotoxicity to SK-HEP-1 cells.

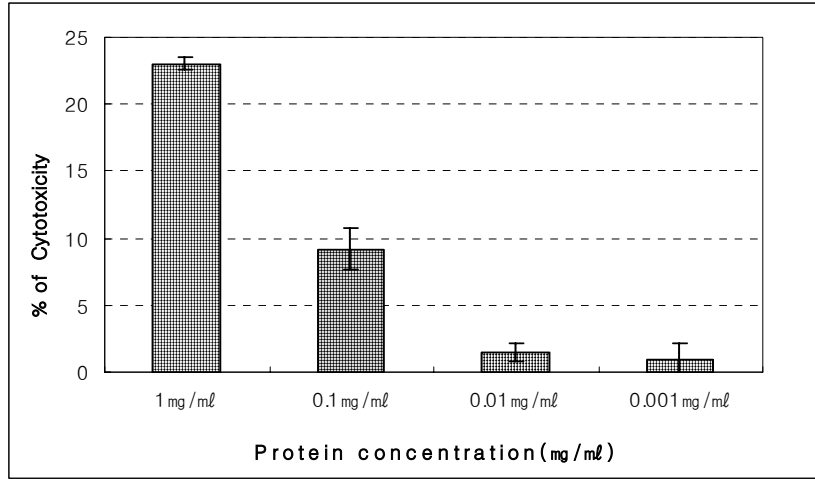


Fig. 16. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on the cytotoxicity to A498 cells.

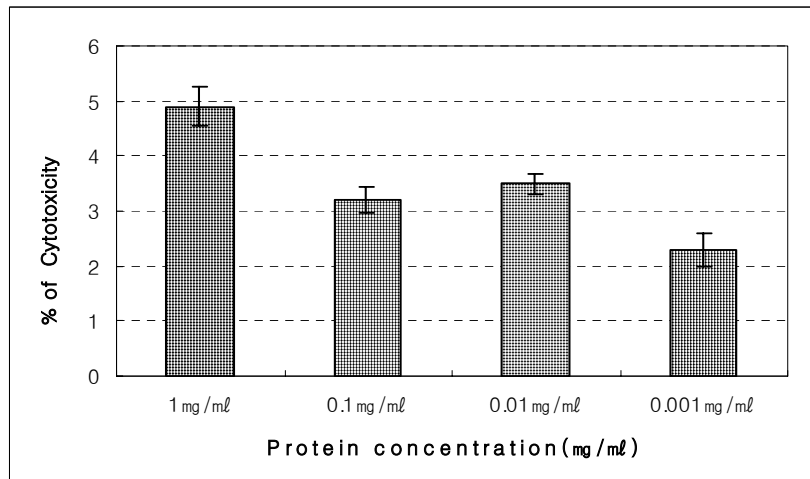


Fig. 17. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on the cytotoxicity to HeLa cells.

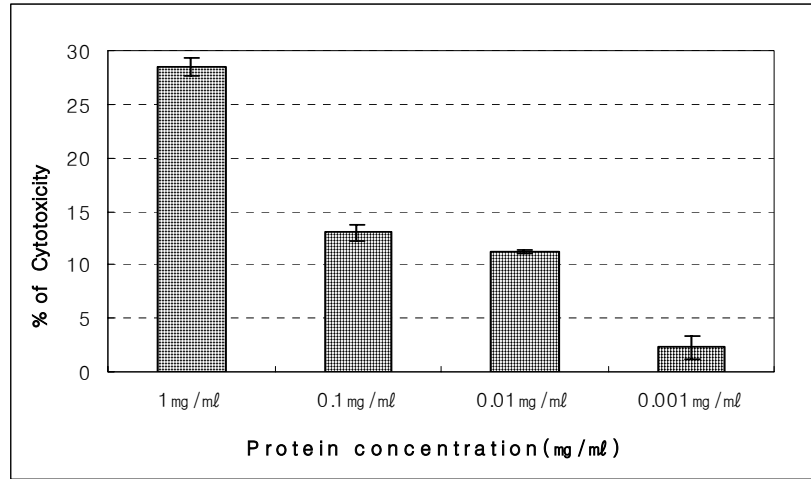


Fig. 18. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on the cytotoxicity to WiDr cells.

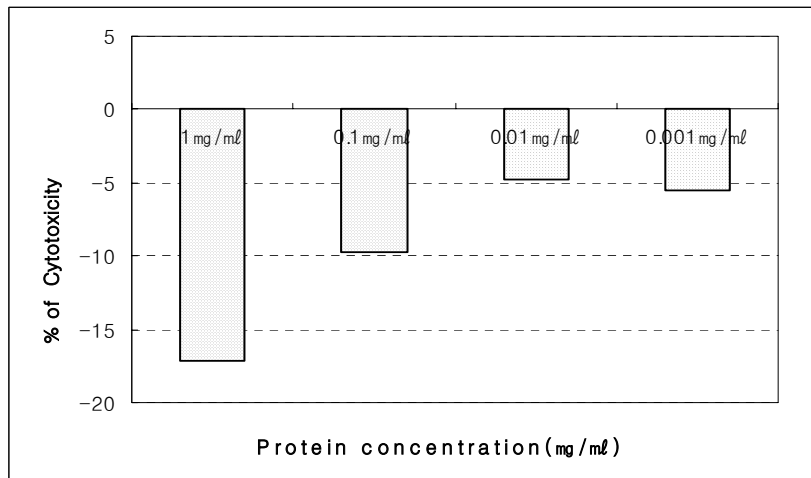


Fig. 19. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on the cytotoxicity to SNU-C1 cells. 0.001mg/ml.

라. IGF-I이 murine macrophage와 murine splenocyte의 면역활성에 미치는 영향

1) Macrophage의 활성화에 미치는 영향

가) Interleukin-6의 생산

본 실험에서 IGF-I rich fraction이 대식세포에서 활성화되어 분비되는 IL-6의 생산에 미치는 효과를 시험하기 위해서 sandwich ELISA를 이용하여 배양액 중의 IL-6를 정량하였으며 결과는 Fig. 20과 같다.

*In vitro*에서 마우스 macrophage의 IL-6 생산량은 LPS(100ng/ml) 자극에 의해서 9.0ng/ml의 IL-6를 생산하였고 LPS를 자극하지 않은 경우 7.2ng/ml을 생산하였다. IGF-I rich fraction 1 $\mu$ g/ml 자극에 의해서 9.8ng/ml을 분비하였고 0.1, 0.01, 0.001 $\mu$ g/ml의 농도로 자극시에는 각각 8.7, 8.9, 7.0ng/ml을 분비하였다. IGF-I 1 $\mu$ g/ml 농도로 자극에 의해서 12ng/ml을 분비하였고 0.1, 0.01, 0.001 $\mu$ g/ml으로 자극하였을 때 10.9, 8.8, 7.1ng/ml을 분비하였다. 유청의 경우 1, 0.1 $\mu$ g/ml 자극 시 8.9ng/ml, 9.0ng/ml을 0.01과 0.001 $\mu$ g/ml 자극에 의해서는 각각 8.6과 6.7ng/ml을 분비하였다(Fig. 20).

*In vivo*에서 대조구 처리한 마우스의 복강 macrophage는 4.9ng의 IL-6를 분비하였고, IGF-I rich fraction 1 $\mu$ g 투여군은 7.3ng/ml을 분비하였고 0.1, 0.01, 0.001 $\mu$ g/ml 투여군은 각각 6.5, 6.1, 5.6ng/ml을 분비하였다. IGF-I 1 $\mu$ g 투여군은 8.5ng/ml을 0.1, 0.01 $\mu$ g과 0.001 $\mu$ g 투여군은 각각 7.9, 7.2 $\mu$ g/ml 및 6.6 $\mu$ g/ml을 분비하였다. 유청의 경우 1 $\mu$ g/ml 투여군은 6.5ng, 0.1과 0.01 $\mu$ g/ml 투여군은 각각 약 5.6, 5.3ng/ml 그리고 0.001 $\mu$ g/ml 투여군은 5.1ng/ml의 IL-6를 생산하였다(Fig. 21).

실험 결과 *in vitro*와 *in vivo*에서의 IGF-I이 IL-6의 분비유도에 미치는 영향은 최고 농도 1 $\mu$ g으로 처리했을 때 각각 12ng, 8.5ng을 생성하였으며, IGF-I rich fraction과 유청도 *in vivo*에서 보다 *in vitro*에서 IL-6의 분비 유도 능력이 높았고 IL-6의 생성량은 농도 의존적이었다. 그러나 본 실험에서 분획한 IGF-I rich fraction은 IGF-I과 유사한 수준의 분비 유도 능력이 있음을 확인하였으며, 유청에서는 그 분비 유도 능력이 가장 낮게 나타났다.

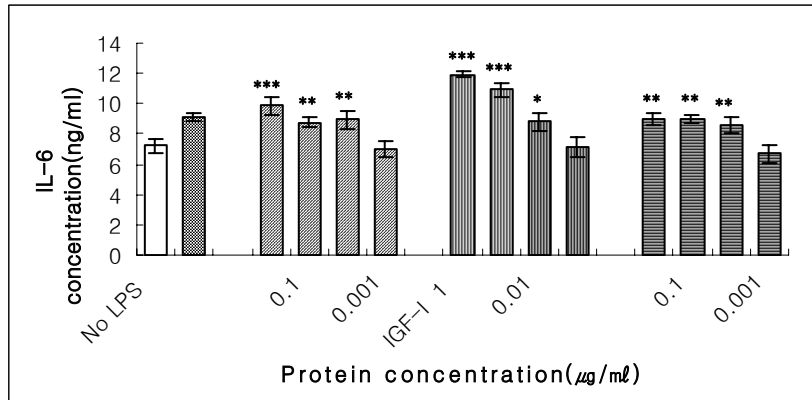


Fig. 20. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostral whey by ultrafiltration on *in-vitro* IL-6 production from murine peritoneal macrophages. IL-6 concentration in the culture of peritoneal macrophage supplemented with IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction was determined by sandwich ELISA. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

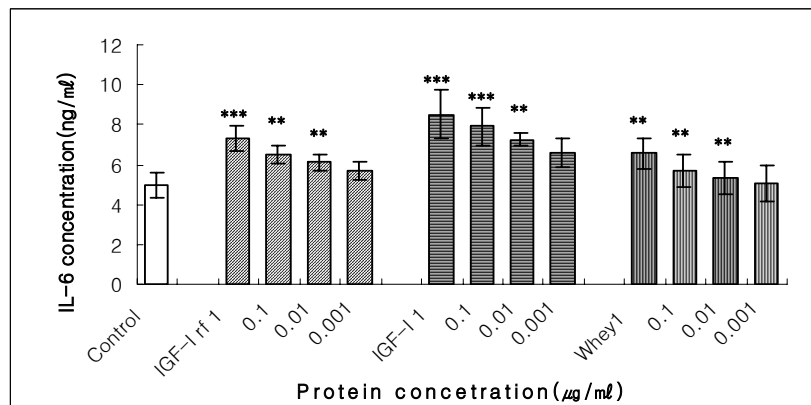


Fig. 21. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostral whey by ultrafiltration on *in-vivo* IL-6 production from murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were collected at 2 weeks after administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction. Administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction was conducted at the interval of 24 hrs for two weeks. The dosage level was 1, 0.1, 0.01, and 0.01 μg on the basis of protein contents. IL-6 in the supernatant of murine peritoneal macrophage cultured 18 hrs was determined by sandwich ELISA. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$

나) Nitric oxide(NO)의 생산

IGF-I rich fraction이 *in vitro*와 *in vivo*에서 NO 생산에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 22, Fig. 23과 같다. *In vitro*에서 마우스 peritoneal macrophage를 1 $\mu$ g/ml의 농도로 자극하였을 때 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 각각 18.8 $\mu$ M, 17.0 $\mu$ M의 NO를 생산하였고 유청은 11.6 $\mu$ M의 NO를 생산하였다.

또한 1 $\mu$ g의 농도로 마우스에게 복강 투여하였을 때 peritoneal macrophage에서 분비되는 NO의 양은 IGF-I rich fraction은 10.7 $\mu$ M, IGF-I은 13 $\mu$ M 및 whey는 6.38 $\mu$ M이었다. IGF-I rich fraction, IGF-I 그리고 유청을 같은 농도로 자극했을 때 macrophage의 NO 분비 능력은 *in vitro*나 *in vivo*에서 모두 IGF-I 이 가장 높았으나 IGF-I rich fraction도 IGF-I과 비슷한 분비 능력을 나타내었다. 그러나 유청은 NO 분비 능력이 가장 낮게 나타났다. *In vitro*나 *in vivo*에서 NO는 활성화된 macrophage에서 생산되는 대사산물이기 때문에 IGF-I rich fraction은 유청에 비해 NO 생산량이 더 높게 나타났으며 이러한 결과는 IGF-I rich fraction에는 유청보다 IGF-I이 더 많이 함유되어 있어서 기인된 것으로 생각된다.

다) TNF- $\alpha$ 의 생산

IGF-I rich fraction이 mouse의 peritoneal macrophage에 의한 TNF- $\alpha$  생산에 미치는 영향은 *in vitro*와 *in vivo*에서 실시하였으며 TNF- $\alpha$ 의 생산량은 L929 cell lysis 정도로 표시하는 bioassay로서 측정하였으며 얻어진 결과는 Fig. 24, 25와 같다.

*In vitro*에서는 1 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조구와 대비하여 IGF-I rich fraction은 34.5%의 높은 L929 cell lysis를 보였고, IGF-I은 40.5% 그리고 유청 26.5%의 L929 cell lysis를 나타내었다.

*In vivo*에서도 IGF-I rich fraction 1 $\mu$ g 복강 투여군은 대조구와 대비하여 30%, IGF-I 은 약 34% 그리고 whey는 20%의 L929 cell lysis를 나타내었다. 마우스 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ 의 분비 능력도 NO의 생산량과 비슷한 경향을 나타내었으며, whey에 비해 IGF-I rich fraction이나 IGF-I이 macrophage를 더욱더 잘 활성화시켜 TNF- $\alpha$ 의 분비 능력이 높게 나타났다. 결과를 요약하면 *in vitro*와 *in vivo*에서 각 시료를 농도별로 처리하여 NO의 분비 유도능력을 측정한 결과 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 IGF-I 1 $\mu$ g 처리군이 TNF- $\alpha$ 의 분비 유도능력은 가장 높게 나타났으며, 유청에 비해서 IGF-I이 대식세포를 더욱 활성화시킴으로써 TNF- $\alpha$ 의 분비 유도 능력이 IGF-I과 IGF-I rf에서 높게 나타났음을 확인하였다.

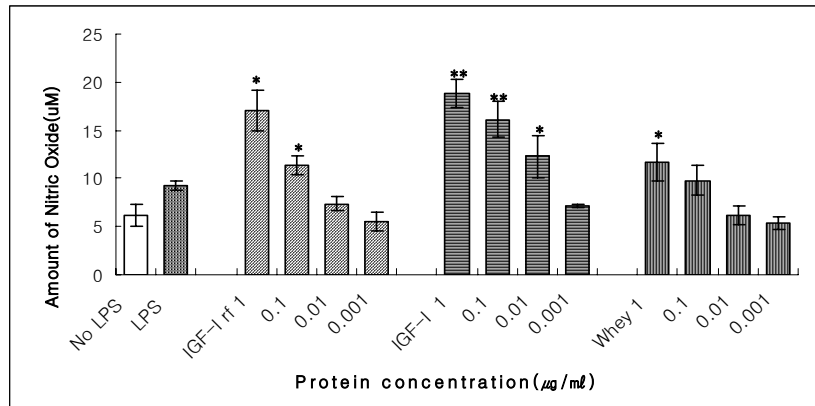


Fig. 22. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vitro* NO production from murine peritoneal macrophages. NO in the culture of peritoneal macrophage was determined by Griess reagent. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

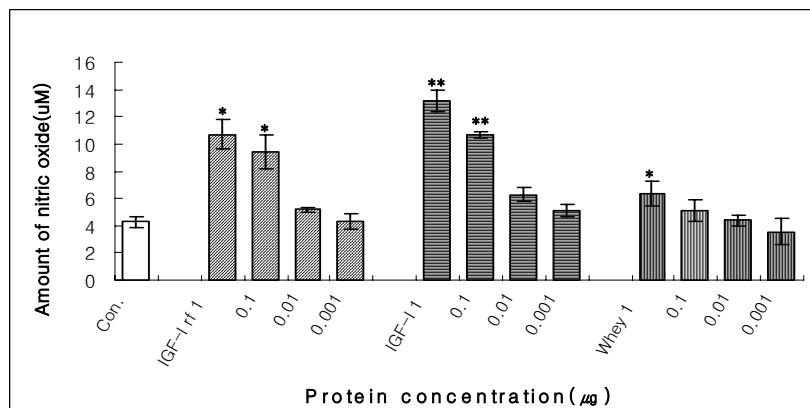


Fig. 23. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vivo* NO production from murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were collected at 2 weeks after administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction. Administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction was conducted at the interval of 24 hrs for two weeks. The dosage level was 1, 0.1, 0.01, and 0.01 µg on the basis of protein contents. No concentration in the culture of peritoneal macrophage was determined by Griess reagent. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

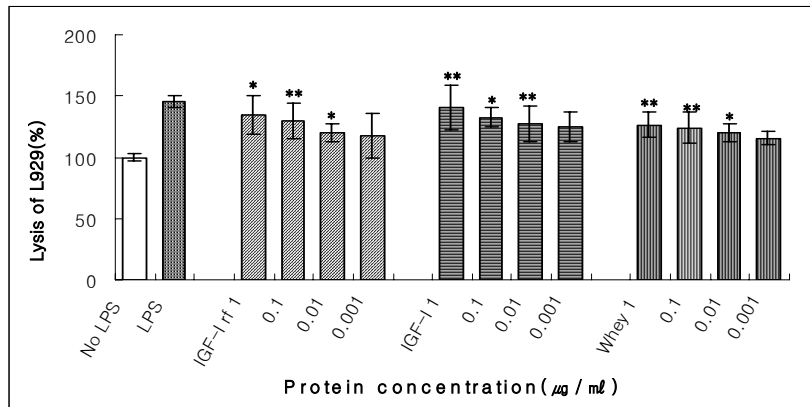


Fig. 24. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vitro* TNF- $\alpha$  production from murine peritoneal macrophages. IGF-I rf means IGF-I rich fraction in which contained IGF-I 10ng in 1mg of protein. \*\* : p<0.01, \* : p<0.05

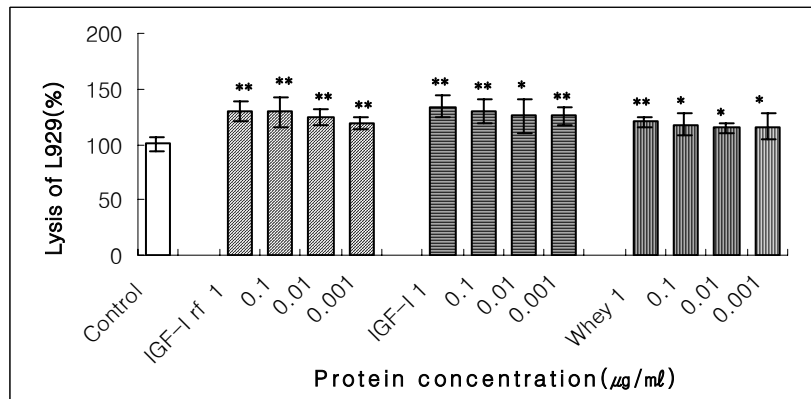


Fig. 25. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vivo* TNF- $\alpha$  production from murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were collected at 2 weeks after administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction. Administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction was conducted at the interval of 24 hrs for two weeks. The dosage level was 1, 0.1, 0.01, and 0.01µg on the basis of protein contents. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\* : p<0.01, \* : p<0.05



라) Peritoneal macrophage의 phagocytosis에 미치는 영향

*In vitro*와 *in vivo*에서 마우스 peritoneal macrophage의 phagocytosis에 대한 IGF-I rich fraction의 효과는 Fig. 26 과 Fig. 27과 같이 *in vitro*에서 IGF-I rich fraction, IGF-I 그리고 유청을 각각  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  투여했을 때 대조구에 비해서 각각 78%, 103%와 63% 증가하였으며 투여량에 의존적으로 phagocytosis가 증가하였다. 그리고 LPS를 처리한 양성대조구의 경우 대조구에 비해서 phagocytosis가 72% 정도 증가하는 것으로 나타났으며 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 양성대조구보다 phagocytosis 증진능력이 높은 것으로 나타났다(Fig.26).

*In vivo*에서 phagocytosis는 IGF-I rich fraction, IGF-I 그리고 유청을  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 복강투여 한 결과 대조구에 비해서 IGF-I rich fraction이 65%, IGF-I이 51%, 그리고 유청은 34%로 phagocytosis를 증진 하였다(Fig. 27). *In vivo*에서의 결과는 *in vitro*와 약간 다른 경향을 보였으며 IGF-I rich fraction이 IGF-I 보다 15% 더 높은 phagocytosis를 나타내었다. 0.1, 0.01 및  $0.001\mu\text{g}$ 의 농도로 IGF-I rich fraction 복강 투여군은 대조구에 비해서 IGF-I은 각각 21%, 6% 및 3%의 phagocytosis 증가를 보였고 IGF-I rich fraction은  $0.1\mu\text{g}$  복강 투여시에 약 18%의 phagocytosis 증가를 나타내었지만 0.01과  $0.001\mu\text{g}/\text{ml}$  복강 투여시에는 phagocytosis의 증가가 나타나지 않았으며 유청의 경우도 IGF-I rich fraction과 비슷하게  $0.01\mu\text{g}$  이하의 복강 투여에서 투여량에 따른 phagocytosis는 나타나지 않았다. 위의 결과를 볼 때 IGF-I rich fraction을 경구 투여하는 경우  $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$  이하에서는 phagocytosis 증진효과가 없으며 적어도 복강 투여시에는  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $50\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 이상의 수준에서 phagocytosis의 증진효과가 있는 것으로 판단된다.

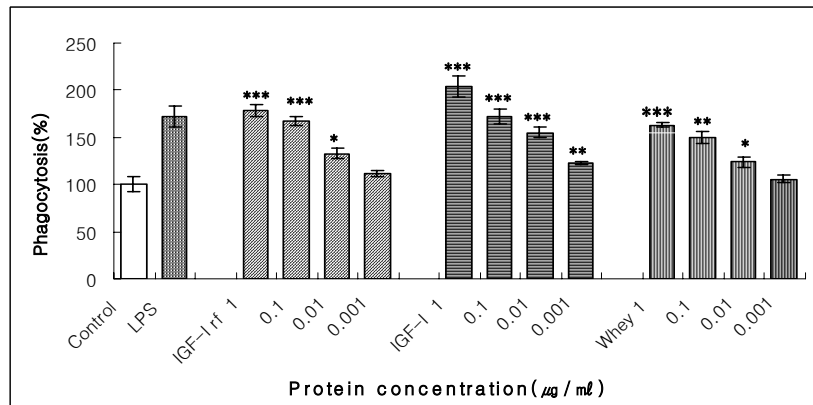


Fig. 26. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vitro* phagocytosis of murine peritoneal macrophage. Phagocytosis was determined in activated murine peritoneal macrophages for 20 hrs by at supplementation of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction by formazan production. IGF-I rf means IGF-I rich fraction in which contained IGF-I 10ng in 1mg of protein. \*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* : p<0.05

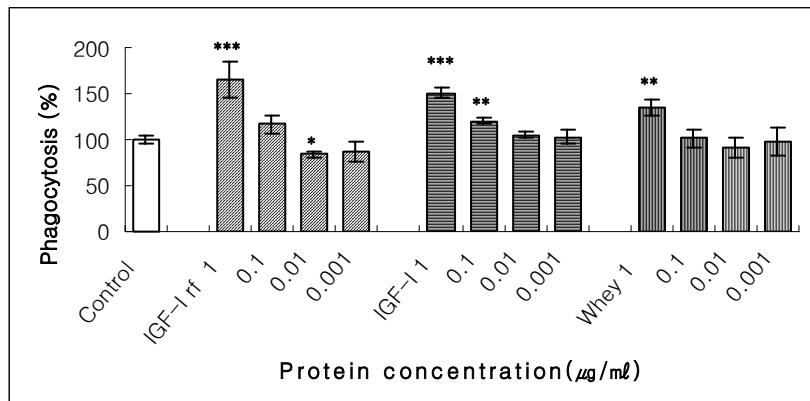


Fig. 27. The effect of IGF-I rich fraction separated from colostrum whey by ultrafiltration on *in-vivo* phagocytosis of murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were collected at 2 weeks after administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction. Administration of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction was conducted at the interval of 24 hrs for two weeks. The dosage level was 1, 0.1, 0.01, and 0.01µg on the basis of protein contents. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* : p<0.05

## 2) Splenocyte의 활성화 측정

### 가) Natural killer cell의 항암효과

IGF-I rich fraction이 NK cell의 활성화에 미치는 영향을 *in vivo*와 *in vitro*에서 실험하였고 얻어진 결과는 Fig. 28와 Fig.29와 같다.

*In vitro*에서의 실험 결과는  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 IGF-I rich fraction은 22.2%, IGF-I은 YAC-1 cell에 대해 27.7%의 세포 독성을 나타내었고 whey는 15.21%의 세포 독성을 나타내었다. Whey의 경우는  $1\mu\text{g}$ 의 농도에서는 약15%의 YAC-1 cell lysis의 결과로써 대조구의 약 12%와 유사한 정도를 나타내었고,  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하에서는 YAC-1 cell lysis의 능력을 나타내지 않음을 확인하였다.

*In vivo*에서는  $1\mu\text{g}$ 의 농도로 복강 투여한 군에서 IGF-I rf은 약 42.3%의 세포독성을 보였고, IGF-I은 55.43%의 세포 독성을 나타내었으며, whey는 30.44%의 세포독성을 보였다. 또한 *in vitro*와 *in vivo*에서 IGF-I rich fraction과 IGF-I은 YAC-1 cell lysis에 대해 농도 의존적인 경향을 보였다.

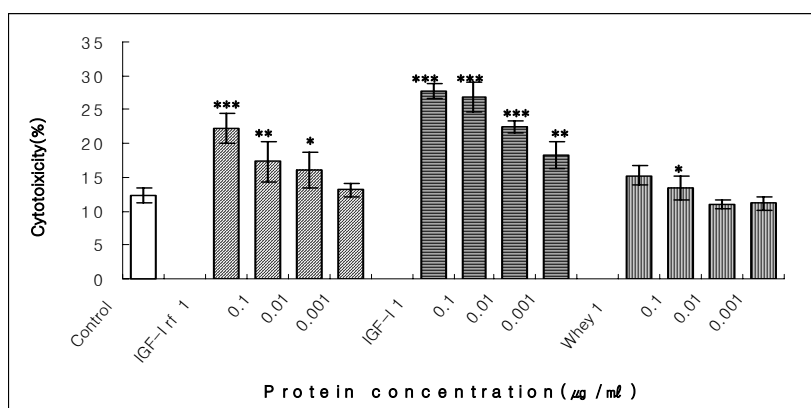


Fig. 28. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on the *in-vitro* NK-cell activity of mouse splenocyte. Splenocytes were cocultured with YAC-1 cell in the presence IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction for 20 hrs. NK cell activity was assessed by MTT assay. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

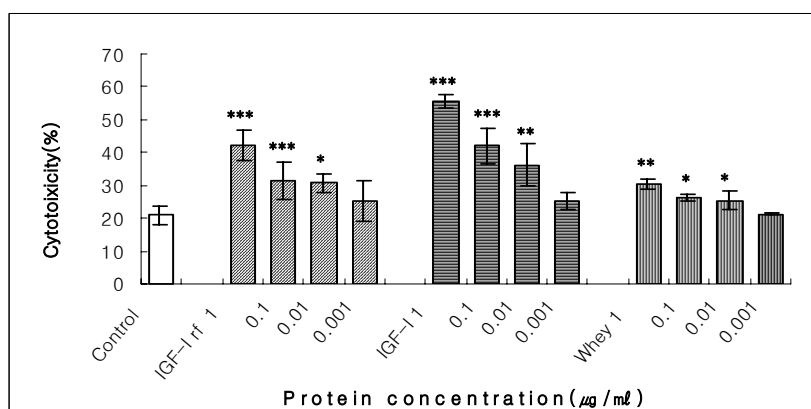


Fig. 29. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on the *in-vivo* NK cell activity from mouse splenocyte. Splenocytes were cocultured with YAC-1 cell in the presence IGF-I rich fraction, IGF-I and whey fraction for 20 hrs. NK cell activity was assessed by MTT assay. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

#### 나) Splenocyte 증식효과 측정

IGF-I rich fraction의 면역세포 증식효과를 측정하기 위해 마우스의 비장 세포를 분리하여 B cell과 T cell의 증식효과를 측정하였다. B cell 증식효과 측정을 위한 mitogen으로 LPS를 사용하였고 T cell mitogen으로는 Con A를 사용하였다.

Fig. 30은 *in vitro*에서의 T cell 증식능력을 나타낸 것으로서 1, 0.1, 0.01 및 0.001  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조구에 대비해 IGF-I rf 처리구는 116%, 65%, 32% 및 18%의 T cell 증식능력을 보였고, IGF-I 처리구는 128%, 87%, 55% 및 36%의 세포 증식율을 나타내었고, 유청 처리구에서는 약 64%, 32%, 15%와 약 6%의 세포 증식율을 나타내었다. *In vivo*에서 IGF-I, IGF-I rf 와 유청 처리구의 T cell 증식능력은 Fig. 31에 나타내었으며 IGF-I rf 처리구는 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리구에서 약 33%, 12%, 7%의 증식능력을 보였고 0.001  $\mu\text{g}$ 의 농도에서는 세포증식 효과를 나타내지 못했다. IGF-I 처리구는 1, 0.1, 0.01 및 0.001  $\mu\text{g}$ 의 농도로 복강 투여 시 대조구에 비해 100%, 50%, 24% 및 10%의 세포 증식율을 나타내었고, 유청 처리구에서는 1, 0.1, 0.01 및 0.001  $\mu\text{g}$ 의 농도로 투여한 군이 각각 20%, 5%, 8%와 약 3%의 세포 증식율을 나타내었다.

*In vitro*에서의 B cell 증식효과는 1, 0.1, 0.01 및 0.001  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조구에 비해 IGF-I rich fraction은 각각 103%, 105%의 세포증식 효과를 보였으며 0.01, 0.001  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 각각 55%와 46%의 증식율을 나타내었으며 IGF-I은 약 135%, 112%, 99% 및 58%의 세포 증식율을 나타내었고, 유청의 B cell 증식능력은 1, 0.1, 0.01 및 0.001  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조구에 비해서 52%, 33%, 23% 및 8%의 B cell 증식 효과를 보였다(Fig. 32).

*In vivo*에서의 B cell 증식능력을 측정한 결과는 IGF-I, IGF-I rf 및 유청 처리구 모두 *in vitro*에서보다 약간 낮은 세포 증식율을 보였으나, 모든 처리구의 세포 증식율은 *in vitro*와 유사한 경향이었으며, 또한 *in vitro*에서와 마찬가지로 시료 처리의 농도에 의존적인 증식효과를 나타내었다(Fig. 33).

본 실험에서 처리한 시료 중 whey가 가장 낮은 세포증식을 보였지만, *in vitro*와 *in vivo*의 실험에서 1  $\mu\text{g}$ 으로 자극하였을 때 LPS와 유사한 수준의 세포 증식능을 나타내었다.

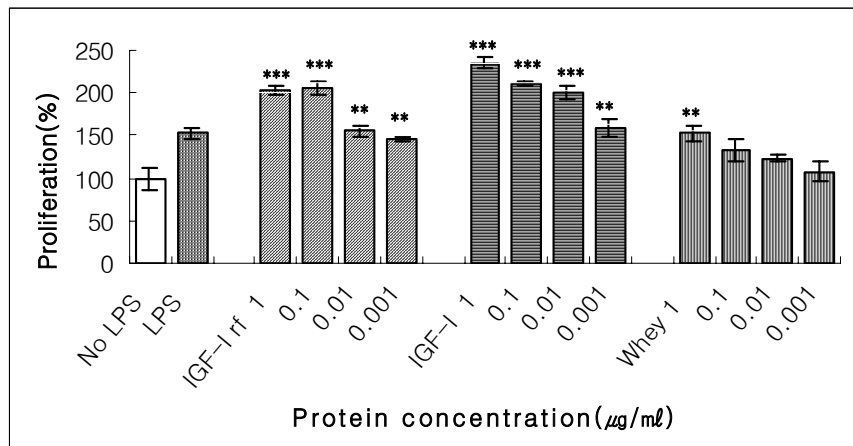


Fig. 30. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vitro* proliferation of splenocytes stimulated with Concanavalin A. Splenocytes were stimulated with Concanavalin A ( $2.5\mu\text{g/ml}$ ). Splenocytes proliferation was measured by MTT assay. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$

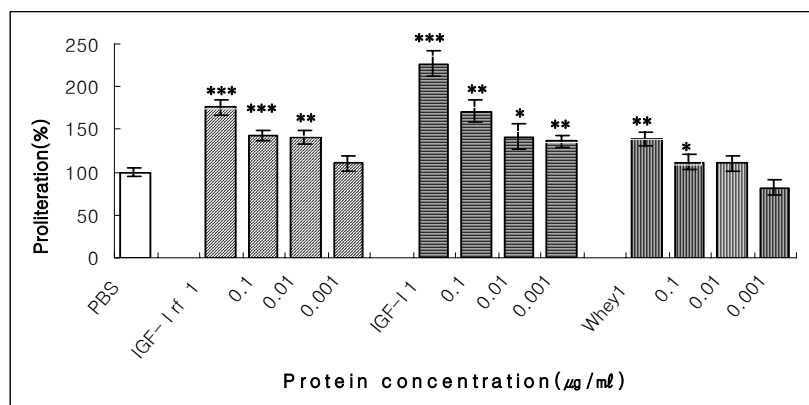


Fig. 31. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vivo* proliferation of splenocytes stimulated with Concanavalin A. Splenocytes were stimulated with Concanavalin A (Con A:  $2.5\mu\text{g/ml}$ ). Splenocytes proliferation was measured by MTT assay. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. Mice were intraperitoneal (I.P.) injected everyday for 2 weeks with IGF-I rich fraction, IGF-I and whey at the concentration of 0.001, 0.01, 0.1 and  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Concentration of administration into mouse were at 0.05, 0.5, 5 and  $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ). \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

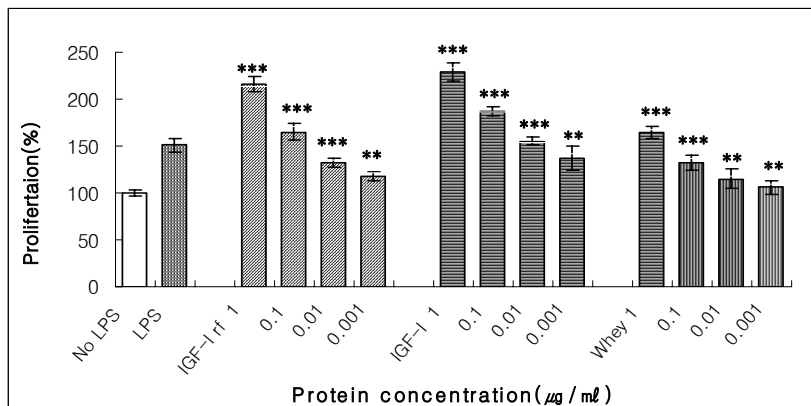


Fig. 32. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vitro* proliferation of splenocytes stimulated with LPS. Splenocytes were stimulated with LPS(2.5 $\mu\text{g/ml}$ ). Splenocytes proliferation was measured by MTT assay. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$

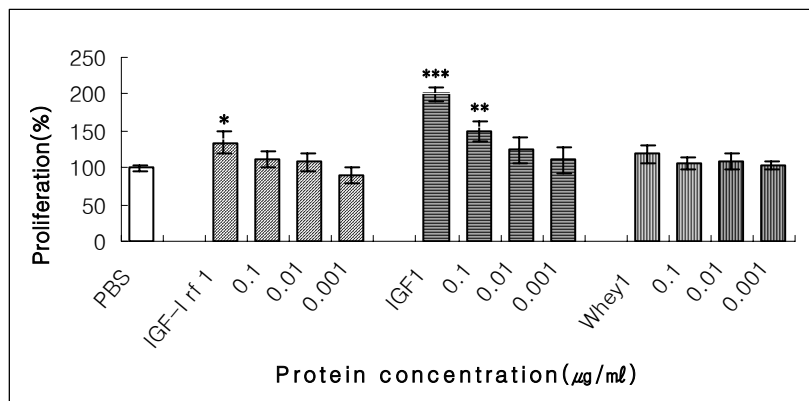


Fig. 33. The effect of IGF-I rich fraction, IGF-I and whey on *in-vivo* proliferation of splenocytes stimulated with LPS. Splenocytes were stimulated with LPS(2.5 $\mu\text{g/ml}$ ) for 48 hrs. Splenocytes proliferation was measured by MTT assay. IGF-I rf means IGF-I rich fraction. Mice were intraperitoneal (I.P.) injected everyday for 2 weeks with IGF-I rich fraction, IGF-I and whey at the concentration of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Concentration of administration into mouse were at 0.05, 0.5, 5 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ). \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

마. 초유 IGF-I과 형질전환 IGF-I의 구조적 유의성 검증

1) N-terminal amino acid sequence 확인

초유와 누에에서 분리·정제한 IGF-I이 구조적으로 동일한지 확인하기 위해서 N-terminal amino acid sequence을 확인하였다. N-말단의 7개의 amino acid의 배열이 Gly-Pro-Glu-Thr-Leu-Cys-Gly의 순으로 측정되었다.

이 결과는 현재 알려져 있는 IGF-I의 N-terminal amino acid sequence와 동일한 것으로 나타났으며 또한 사람 유래의 IGF-I과 소에서 분비되는 IGF-I의 amino acid sequence는 동일한 것으로 알려져 사실을 이번 연구 결과로 재차 확인할 수 있었다.

2) 등전점측정

초유와 누에에서 분리·정제한 IGF-I이 등전점을 측정하였다. IGF-I의 pI는 대략 8.5 부근으로 보고되어있다. 본 연구 결과에서 대략 8.5 부근에서 band가 형성되어 있는 것을 측정 할 수 있었다.

3) 아미노산 조성 분석

초유에서 분리한 IGF-I과 형질전환 누에에서 추출한 IGF-I을 구성하고 있는 아미노산에 차이가 있는지 알아보았다. Table 5에서 보는 것처럼 분석 결과치의 glutamine과 glutamic acid, asparagine과 aspartic acid의 양이 합쳐져서 산출된 상태이지만 각각의 함이 동일하므로 아미노산의 조성이 동일한 것으로 판단하였다.



**Table 5. Amino acids composition of IGF-I obtained from colostrum and transgenic silkworm**

Amino acids	IGF-I	Colostrual IGF-I	Silkworm IGF-I
Alanine	6	6	6
Arginine	6	6	6
Asparagine	1	5*	5*
Aspartic acid	4		
Cysteine	6	6	6
Glutamine	2	6**	6**
Glutamic acid	4		
Glycine	7	7	7
Histidine			
Isoleucine	1	1	1
Leucine	6	6	6
Lysine	3	3	3
Methionine	1	1	1
Phenylalanine	4	4	4
Proline	5	5	5
Serine	5	5	5
Threonine	3	3	3
Tryptophan			
Tyrosine	3	3	3
Valine	3	3	3
Total A.A. residues	70	70	70

\* mean the sum of asparagine & aspartic acid

\*\* mean the sum of glutamine & glutamic acid

바. 형질전환 IGF-I과 초유 IGF-I의 생리적 기능 비교

1) 형질전환 IGF-I과 초유 IGF-I의 세포증식효과 비교 측정

제 2세부과제로부터 형질 전환되어 IGF-I이 발현되어진 누에와 누에 고치를 받아 PBS용액에 용출 시켜 sandwich ELISA를 이용하여 IGF-I의 함량을 계산해서 시료로 사용하였다

초유 IGF-I rich fraction과 누에로부터 형질 전환하여 얻은 IGF-I rich fraction을 이용하여 *in vitro* 세포 증식에 미치는 영향을 실험하기 위해 앞서 항암효과를 측정했던 IEC-6(epithelial cell), Detroit 551(skin cell), EL-4(Th cell) 및 L6(skeletal muscle cell) cell line을 이용하였다.

세포증식 실험에 사용한 IGF-I rich fraction의 IGF-I 함량은 단백질 1mg당 10ng이었으며 투여한 단백질의 양을 기준으로 처리하였다.

IEC-6 cell은 초유로부터 분리된 IGF-I에서는 IGF-I 함유농도가 10ng인 단백질 농도 1mg/ml에서 대조구에 비해 60.68% 세포성장률 증가를 보였으며 0.1mg/ml과 0.01mg/ml에서는 각각 53.54%, 29.92%와 0.001mg/ml의 농도에서는 약 18.21%의 세포성장률 증가를 나타내었다. 하지만 형질전환 된 누에의 IGF-I 분획은 증식 능력을 약간 보이는 하지만 초유 유래의 IGF-I 분획의 효과에 비해서는 30% 정도 밖에 작용하지 못하는 것으로 측정되었다(Fig. 34). Skin cell인 Detroit 551 cell은 1mg/ml에서 대조구에 비해 56.25%의 세포 성장률 증가를 나타내었고 0.1mg/ml과 0.01mg/ml에서는 각각 26.65%, 15.45%의 성장률을 보였으며 0.001mg/ml의 농도에서는 3.23%의 세포성장률을 나타내었다(Fig. 35).

EL-4 cell은 1mg/ml에서 대조구에 비해 54.57%, 0.1mg/ml에서는 약 27.57%의 세포 성장률 증가를 나타내었다(Fig. 36).

Skeletal muscle cell인 L6 cell은 IGF-I rich fraction 1mg/ml의 농도로 투여한 처리구가 대조구에 비해 46.38%의 세포성장률 증가를 보였고 0.1mg/ml과 0.01mg/ml의 농도에서는 각각 26.10%, 15.10%의 세포성장률 증가를 나타내었다(Fig. 37).

본 연구에 사용된 모든 세포에서 누에에서 추출된 IGF-I rf의 세포증식 능력은 초유로부터 분리된 IGF-I rf 보다 낮은 것으로 관찰 되었다. 이는 순수하게 정제되지 않은 분획상태에서 초유 속에서 이행되어 온 다른 물질들이 세포증식에 영향을 끼치는 정도가 더 크게 작용함에 의한 것으로 생각되어 진다.

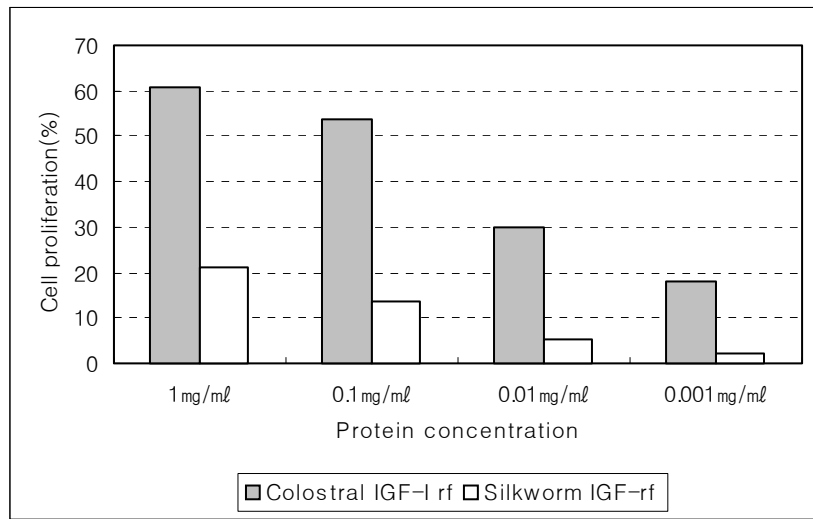


Fig. 34. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration on the proliferation of IEC-6 cells.

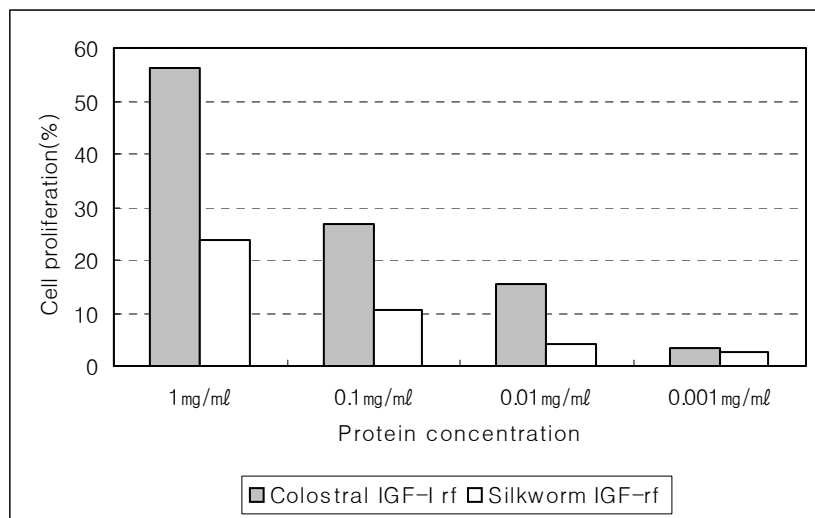


Fig. 35. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration on the proliferation of Detroit 551 cells.

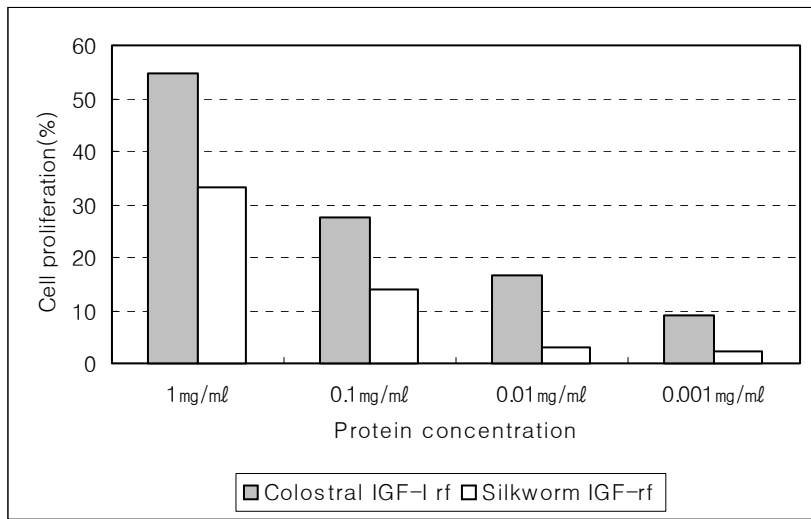


Fig. 36. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration on the proliferation of EL4 cells.

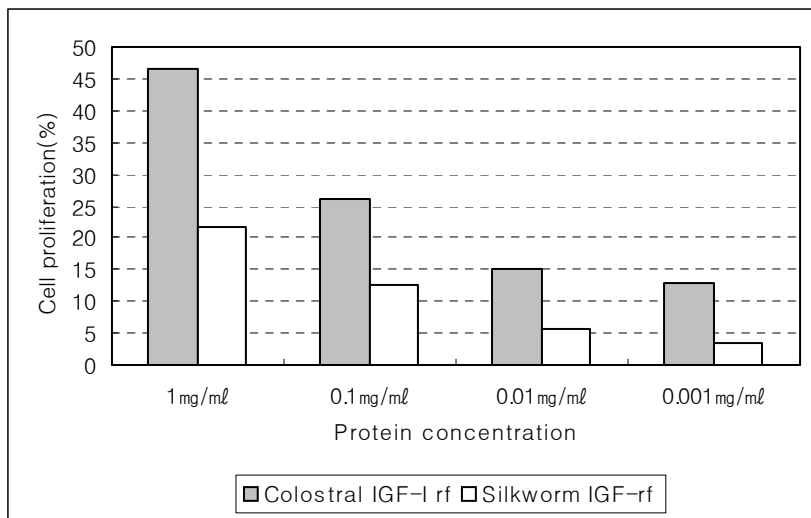


Fig. 37. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration on the proliferation of L6 cells.

2) 형질전환 IGF-I과 초유 IGF-I의 항암효과 비교 측정

Lung cancer cell인 A427에 대한 연구에서 IGF-I rf에 의해 1mg/ml IGF-I rich fraction에서 32.35%, 0.1mg/ml의 농도에서는 22.56%, 0.01mg/ml에서 20%와 0.001mg/ml에서는 13%의 세포 성장억제 효과를 나타내었다. 누에 IGF-I rf은 1mg/ml의 농도에서 25% 0.1mg/ml의 농도에서는 16.44%, 0.01mg/ml에서 11.22%와 0.001mg/ml에서는 4.98%의 세포 성장억제 효과를 나타내어 이것 역시 초유 IGF-I보다는 암세포 성장저지력이 낮게 측정되었다(Fig. 38).

IGF-I rich fraction이 간암 세포인 SK-HEP-1 세포성장에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 39와 같다. 1mg/ml의 농도에서 IGF-I rich fraction은 대조구에 비하여 2.1%, 0.1mg/ml의 농도에서는 8.4%, 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 17.33%와 13.07%의 암세포 성장 억제율을 보였다. 누에 IGF-I rf은 이와는 달리 1mg/ml의 농도에서 13.32% 성장 저지율을 나타내며 농도에 의존적인 경향을 보여주어 초유 IGF-I rf과는 다른 양상을 나타냈다.

신장암 세포인 A498 cell에 대한 실험에서 1mg/ml의 농도일 때 23%의 암세포 성장저해 효과를 보였으며 0.1mg/ml의 농도에서는 9.2%의 성장저해율과 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 1.4%와 0.9%의 성장 저해율을 나타내었으며 0.01mg/ml이하의 농도에서는 암세포 성장저해 효과는 거의 없었으며 mitogen으로서의 활성은 나타나지 않았다. 누에 IGF-I rf은 1mg/ml의 농도일 때 17.6%의 암세포 성장저해 효과를 보였으며 0.1mg/ml의 농도에서는 8.65%의 성장저해율은 나타내었고 이것도 마찬가지로 더 낮은 농도에서는 활성을 나타내지 않았다(Fig. 40).

초유 IGF-I rich fraction이 자궁암 세포인 HeLa cell의 성장저해에 대한 시험에서 1mg/ml의 농도에서 4.9%의 세포 증식 저해율을 나타내었으며 0.1, 0.01과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 3.2%, 3.5% 및 2.3%의 세포 성장 저해율을 보였고 신장암 세포주와 유사한 경향을 보였다. 누에 IGF-I은 HeLa에서는 0.1mg/ml의 농도에서도 30%에 가까운 저지율을 보여주었다(Fig. 41).

IGF-I rich fraction이 직장암 세포인 WiDr cell에 미치는 영향은 Fig. 42와 같이 1mg/ml 농도에서 28.45%의 세포성장 저해율을 나타내었고, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml과 0.001mg/ml의 농도에서는 각각 13%, 11.26%와 2.3%의 세포 성장 저해율을 나타내었고 누에 IGF-I rf에서도 비슷한 저지율을 나타내었다.

IGF-I rich fraction이 위암 세포주 SNU-C1에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 43과 같이 1mg/ml과 0.1mg/ml의 농도에서 각각 17.12%와 9.75%의 세포 증식을 보였고

0.01, 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 각각 4.75% 와 5.49%의 세포 증식률을 나타내었다. 다른 암세포와는 달리 위암 세포주는 IGF-I rich fraction의 첨가에 의해서 세포의 증식을 증진하는 것으로 나타났다. 이와는 달리 누에 IGF-I rf은 1mg/ml과 0.1mg/ml의 농도에서 각각 24.3%와 16.74%의 세포 성장 억제율을 측정 할 수 있었다.

초유의 IGF-I과 누에의 IGF-I은 구조적인 유의성은 확인 되었지만 생리 기능적 비교 검토에서는 순수하게 분리된 성분이 아니며 다른 기타의 물질들이 혼재하기 때문에 정상세포와 암세포의 성장에 미치는 영향들이 다소 차이가 나는 것으로 관찰되었다. 차후에 이에 관해서는 좀 더 지속적인 연구가 필요하리라 생각되어진다.

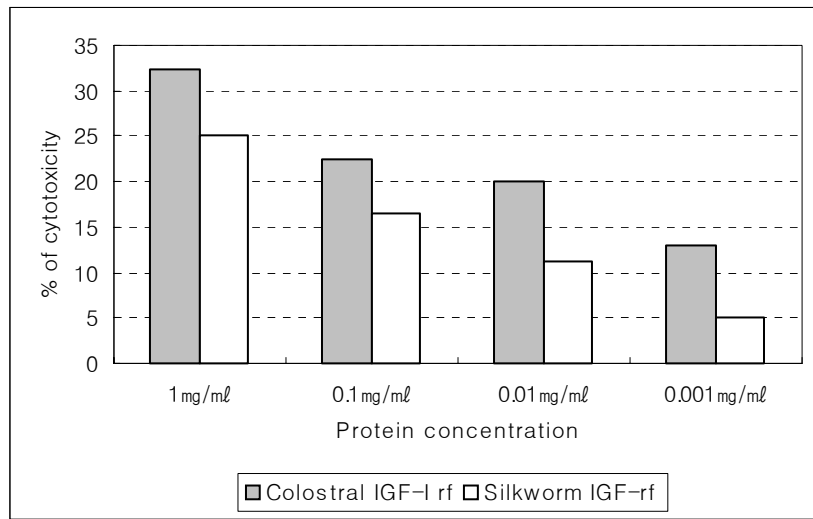


Fig. 38. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration on the cytotoxicity to A427.

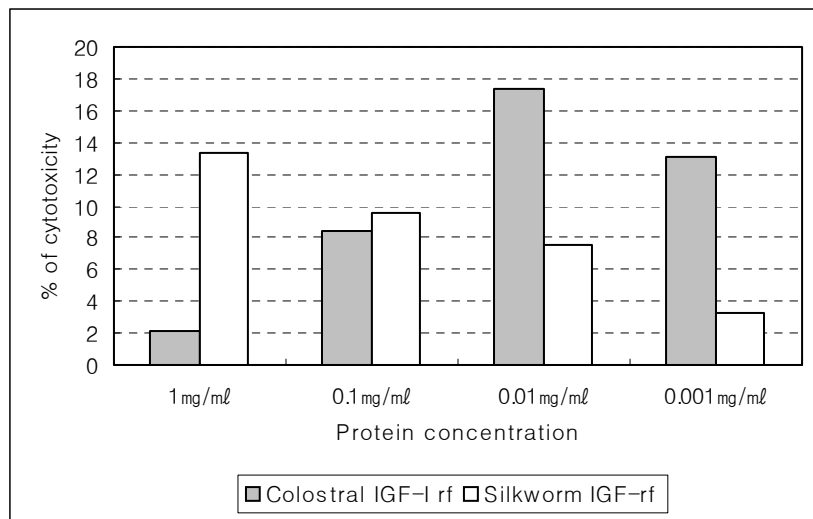


Fig. 39. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration on the cytotoxicity to SK-HEP-1 cells.

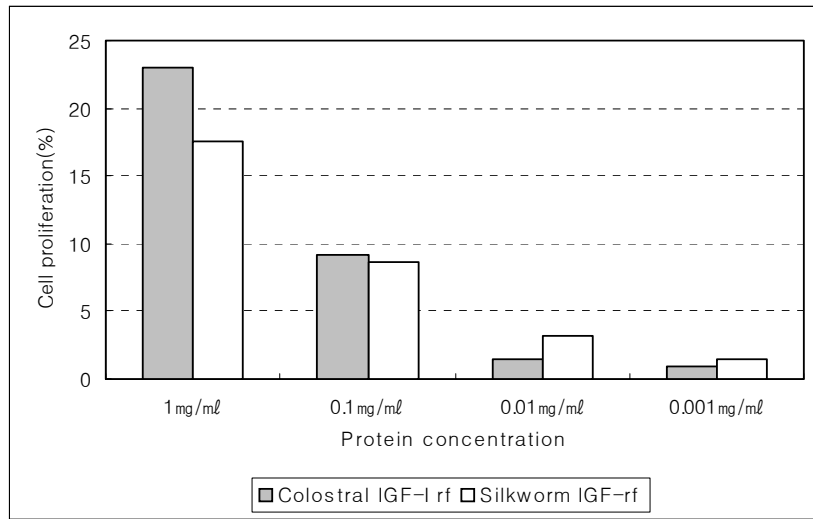


Fig. 40. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silk worm by ultrafiltration on the cytotoxicity to A498 cell.

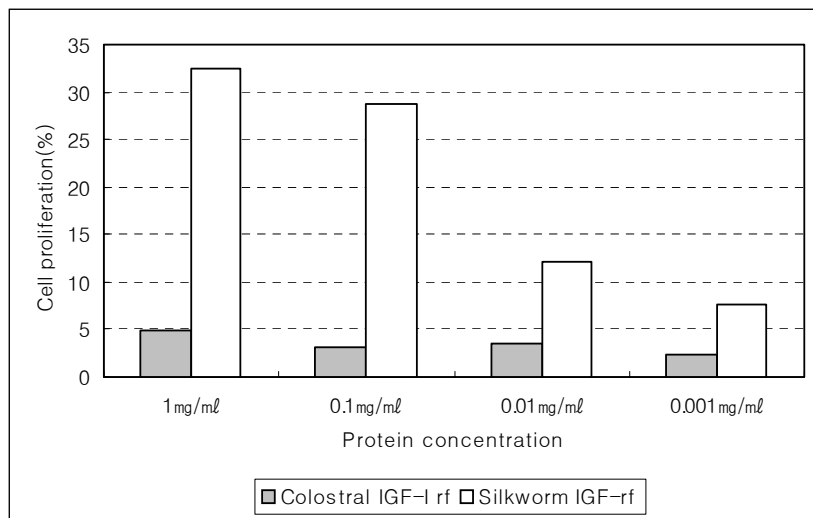


Fig. 41. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silk worm by ultrafiltration on the cytotoxicity to HeLa cells.



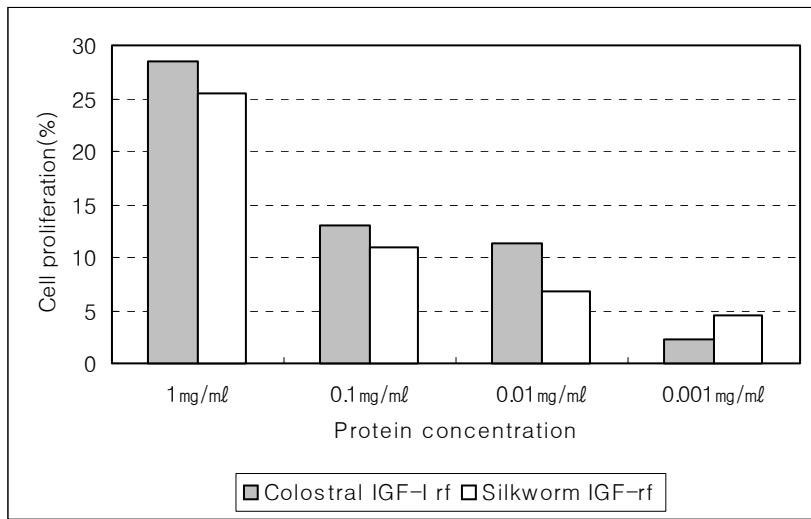


Fig. 42. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration on the cytotoxicity to WiDr cells.

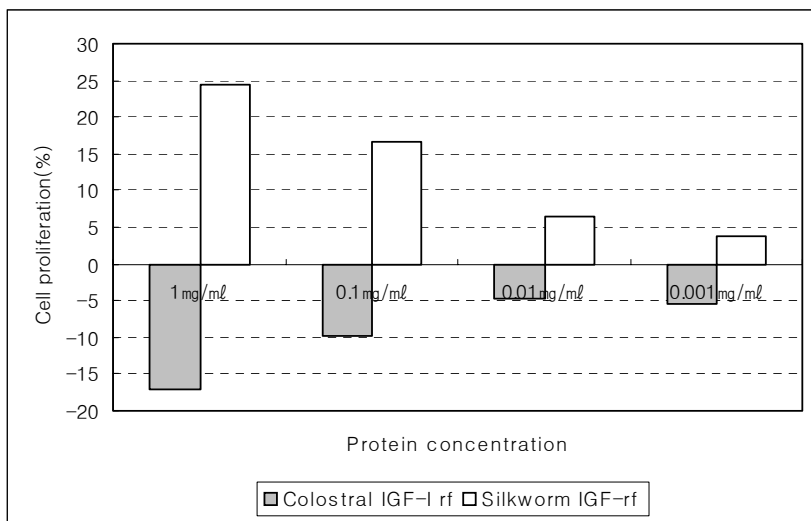


Fig. 43. The Effects of IGF-I rich fractions separated from colostral whey and transgenic silkworm by ultrafiltration cytotoxicity to SNU-C1 cells.

## 제 2 절 IGF-I의 형질전환 누에의 작성(제2세부과제)

### 1. 서론

여러 가지 유용물질의 대량생산을 위하여 그동안 대장균에서 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 대장균에서의 유용물질 생산은 고등생물에서 필요로 하는 특징을 대체하지 못하는 단점이 있어 이를 보완할 수 있는 생물을 찾게 되었다. 누에는 이런 단점을 보완할 수 있는 고등생물로서의 특징을 가지고 있어 post-translational modification을 하므로 누에에서의 유용물질을 생산하는 것이 그 기대효과가 크다고 할 수 있다. 따라서 누에에 IGF-I 유전자를 도입함으로써 IGF-I을 생산하는 형질전환 누에 품종을 육성하고자 하였다.

#### 가. 누에의 생태와 피브로인

곤충 중에는 인류에게 해를 끼치기도 하지만 그 반대로 많은 이익을 주는 곤충들이 있는데 그중 누에는 견사 섬유를 생산하는 유용한 산업 곤충이다. 양잠의 기원은 중국에서 이미 선사 시대부터 시작되었으며, 우리나라에서는 문헌상 3천년 전이라고 추정되고 있다. 이와 같이 누에는 인간에 의해 수 천년간 사육되어 오면서 순화, 가축화되어 인류의 의(依)를 해결해 주었으며 이에 못지않게 일찍부터 연구가 되어져 온 곤충이기도 하다.

누에는 분류학상 곤충각(Insectada), 인시목(lepidoptera), 가잠아과(Bombyxidae), 가잠아속(Bombyx), 가잠종(mori)에 속한다. 누에는 완전변태곤충으로 알에서 부화한 유충이 발육하여 번데기로 되고, 또한 성충(나방)이 되어 알을 낳고 일생을 마친다. 누에의 life cycle은 평균 60일 정도로 비교적 짧아 실험동물로써의 잇점을 가지고 있다. 산란된 알에는 방치하면 착색하여 다음해 봄까지 부화하지 않는 것과 착색하지 않고 부화하는 것이 있다. 1년에 몇 회 부화하는 가는 각각의 유전자 작용에 의하여 식도하 신경절 내에서 생산되는 휴면 호르몬의 분비량에 의해 결정된다. 누에알에서 수정핵은 여러번 분열하여 분열핵을 형성하고 핵주위에 원형질이 둘러싸게 되고 이들은 알의 가장자리를 향하여 이동하게 된다. 산란 후 12시간이 지나면 세포융합(Syncytial blastoderm)이 형성되고 20시간 후면 인공부화법의 하나인 침산처리가 가능해진다. 산란 후 30시간이면, 완전한 난황세포가 되고 약 10일 후면, 개미누에로 부화된다. 개미누에는 3내지 14일 정도 뽕잎을 먹으면, 잠에 들어간다. 이와 같이 첫잠을 들어간 상

태를 1면이라 하고, 이때의 누에를 1면잠이라 한다. 1면잠은 16시간 정도 잠을 잔 후 허물을 벗고 2령인 누에가 된다. 누에는 보통 4번의 잠을 잔다. 누에는 5령이 되어서 7내지 8일정도 뽕잎을 먹으면 가장 크게 자라고, 뽕잎 먹기를 중지하고 토사를 시작한다. 이때의 누에를 익은 누에(matured silkworm larva)라고 한다. 익은 누에는 2내지 3일 정도에 걸쳐서 누에고치를 짓고 그 속으로 들어가 누에 번데기로 탈바꿈한 다음 누에 번데기는 10~15일 정도 지나서 누에나방으로 다시 탈바꿈한 다음에 누에고치를 뚫고 나와 교미 및 산란을 하고 그 1세대를 마친다.

누에는 heavy-chain fibroin, light-chain fibroin, 그리고 P25 단백질로 이루어진 견단 단백질을 생산한다. 견 단백질 발현은 특히 fibroin은 5령기 유충의 후부견사선에서 아주 강력한 발현을 하여 전체 체중의 약 20% 이상이나 되는 fibroin 단백질을 생산한다. 이러한 fibroin의 강력하고 조직 특이적인 발현 조절기작을 해명하는 것은 유전자 발현조절 연구에 중요한 실마리를 제공할 수 있으리라 기대되며, 이 조절기작을 이용하면 진핵생물에서 유용물질의 대량생산에 이용할 수 있다.

누에 피브로인 유전자의 강력한 발현은 유전자의 증폭이나 구조의 변화에 의한 것이 아니고 주로 전사에 의해 조절된다고 알려져 있다. 이 전사 조절 기작을 연구하기 위해 지금까지는 무세포 전사계가 이용되어 왔고, 그 결과 H 사슬에서는 피브로인 유전자의 5'상류부위의 -230~ -73 부위가 enhancer와 유사한 기능을 하며, L 사슬에서도 H 사슬의 enhancer like element와 상동성이 있는 부위의 분석으로 enhancer와 유사한 영역이 밝혀져 있다.

피브로인 유전자의 연구는 분자량이 큰 아미노산 배열의 특수성을 이용하여 5령 말기의 후부견사선으로부터 Suzuki와 Brown에 의하여 처음으로 1972년에 mRNA가 분리되었으며, 이어서 1976년에는 누에의 genomic DNA로부터 피브로인 유전자를 클로닝하였다. 그리고 이후의 연구로 가잠에서 H 사슬과 L 사슬이, 야잠에서 H 사슬이 클로닝되어 그 구조와 조절의 연구가 활발하게 진행중에 있다. 가잠의 H사슬은 16~17kb의 길이로 2개의 exon으로 이루어져 있으며, L 사슬의 경우 13472bp 길이로 7개의 exon으로 이루어져 있다. 피브로인의 H 사슬 b전자의 전사는 배 발생의 25 stage에서 활성화 된 후 유충 발생시기에 후부견사선에서 반복적으로 switch on, -off를 한다. Nuclear run-on assay를 통한 전사 조절 연구에 의하여 5령기 유충의 후부견사선의 전반부에서 국한되어 전사가 일어남을 밝혔다. 그리고 이때 L 사슬이 H 사슬과 같이 전사됨이 밝혀졌다. 피브로인 유전자는 세포 분화 과정에 유전자의 증폭이나 methylation과 같은 구조적 변화가 일어나지 않음이 확인되었고, 이것은 피브로인 유

전자의 발현은 대부분 전사에 의해 조절된다는 것을 의미한다. 이러한 전사 조절 기작을 연구하기 위해 무세포 전사계와 여러 가지의 결핍 돌연변이를 이용하여 피브로인의 cis-acting element 연구가 활발하게 진행되어졌다. 피브로인 H 사슬 유전자의 5'상류부의 분석결과 TATA box를 포함한 40bp의 basal promoter를 가지고 있으며, 특히 -238~ -73 부위는 enhancer-like function을 가지고 있고, 이곳을 인식하는 factor가 후부 전사선 특이적으로 basal promoter를 자극하는 것으로 생각되어지고 있다.

본 연구에서는 피브로인 단백질 유전자의 promoter는 재조합 단백질의 대량 생산에 매우 적합한 강력한 promoter라 생각되며, fibroin light chain의 promoter를 발현벡터의 개발에 이용하였다. 그리고 현재 사용하고 있는 발현벡터의 프로모터인 Bombyx mori의 light chain(Fib-L) promoter 및 heavy chain(Fib-H) promoter, Bombyx mandarina의 Fib-L promoter, Fib-H promoter 그리고 Antheraea yamamai, Antheraea pernyi의 heavy chain promoter의 염기서열 비교와 transcriptional binding site의 분석을 통해 promoter의 전사조절 기작을 알아보았다.

#### 나. 형질전환 동물

형질전환 동물이란 외래의 유전자가 숙주의 genome상에 삽입되어 그 형질의 일부가 변한 동물을 말하며 그때의 외래유전자를 transgene이라 한다. 이러한 외래 유전자가 생식세포계에 도입되어 후대에게 안정적으로 같은 형질을 전해주는 계통을 형질전환 계통이라 한다. 1970년 중반부터 체세포나 생식세포에 recombinant virus를 사용하여 외래유전자를 도입하기 시작하였고, 1980년도에는 microinjection방법으로 고든에 의해 supermice를 생산하게 되었다. 외래유전자를 도입하는 기술로는 인산칼슘법, 전기천공법, DEAE-덱스트란법, liposome법, 미세주사법, bombardment법 등이 있는데, DEAE-덱스타란법과 전기 천공법은 세포를 DNA가 열린구멍을 통해 직접 세포질로 들어가게 하는 방법이다. 이 두 방법에서는 DNA가 손상을 입을 수도 있다. liposome을 이용하는 방법은 DNA를 인공지질 소포체인 liposome을 넣어 세포막과 융합시켜 직접 세포내로 운반시키는 방법으로 광범위하게 사용되고있다. 미세주사법은 1세포기 수정란에 미세조작기를 사용하여 난에 손상을 주지 않을 정도의 미세주사침으로 DNA를 직접 주입하는 방법이다.

외래유전자를 도입하는 기술은 초기에 초파리, mouse등에 사용되었으며, xenopus, sea urchins, 모기, C. elegans, 어류, 누에 최근에는 가축에게까지 그 실용화 단계에

있다. 이러한 외래 유전자가 성장률 조절, 극한 환경에서의 내성, 유전자 치료에 관련된 것이라면 인류에게 무한한 혜택을 줄 수 있을 것이다.

누에알은 곤충알로 분열초기에 핵분열만 하므로 실험적 조작이 용이한데 일본에서는 일찍이 누에알에다 microinjection방법을 사용하여 transgenic silk worm을 만들려는 시도가 있었으나, 일시적인 발현만을 나타내었다. microinjection 방법은 미세한 텅스텐 바늘을 사용하여 누에의 수정란에 미세한 구멍을 낸 후 다시 DNA를 직접 주입하는 방식을 사용하였다.

최근 유전공학의 발전으로 사람의 인슐린을 비롯하여 유용물질을 대장균에서 대량 생산하게 되었다. 대장균에서의 유용물질 생산은 생산원가가 저렴하다는 장점이 있으나, 고등생물 post-translational modification 기능을 갖고 있지 않아, 고등생물 대부분의 효소와 같은 산물들은 대장균에서 만들어지면 생체 내 활성을 갖지 않는다는 단점이 있다. 그러나 누에는 고등생물로 고등생물의 유용물질 생산에 적합하다.

#### 다. 전이인자를 이용한 형질전환 벡터

대부분의 유전자들은 염색체위에 고정적으로 위치한다고 생각되어졌으나 1940년대 몇몇 연구자들에 의해 움직이는 DNA서열이 발견되었고, 이러한 DNA 서열을 transposon이라 하며 그 크기가 500-10,000 Nucleotide쌍 정도의 범위이며 이들 전이인자가 존재하는 생물체는 원핵생물과 진핵생물에 다양하게 있다. 이들 전이인자는 구조와 기능에서 많은 변이를 보여주고 있는데, 몇몇 개체에서 특정 전이인자계의 전이를 촉진시키며, 이것에 의해 자연돌연변이 율도 증가된다. 이러한 전이인자는 고등생물의 형질전환에도 이용된다. 형질전환연구는 초파리에서 이들 인자를 사용하여 발달하였는데 그 중 P인자가 가장 많이 연구가 되어 있다. P인자에 대한 연구는 자연집단에 존재하는 염색체를 추출하여 분석하는 도중에 발견되었는데 구조적으로 complete형과 defective형으로 나눌 수 있으며 기능적인 면에서 autonomous형과 nonautonomous형으로 나누어진다. complete P인자는 양끝에 31bp의 완전한 Inverted repeat sequence(ITRs)를 가지고 있고 125bp 부근에 11bp의 subterminal inverted repeat sequence가 있다. 이들의 반복구조는 P인자의 mobility에 중요한 기능을 갖고 있다. defective P인자의 구조는 이 인자 내 deletion을 가지고 있고, deletion의 크기나 위치는 다양하나, 양끝의 repeat sequence는 항상 남아 있는 것이 특징이다. autonomous 형은 움직이는데 필요한 transposase라는 효소를 만들어 자율적으로 움직일 수 있는 것을 말하며, nonautonomous형은 4개의 open reading frame에 deletion

이나 mutation에 의해 기능이 있는 transposase를 만들지 못하기 때문에 자가적으로 움직일 수 없는 것을 말하며, 다른 완전한 P인자가 만든 transposase가 있을 때에만 움직일 수 있다. P인자의 이동이 germ line에 제한되어있고, 체세포조직에서 발현할 수 없기 때문이다. 1982년, G.M. Rubin, Ac. Spradling은 초파리에서 P인자 매개 유전자 도입이 가능함을 M계열의 배안으로 P인자를 가진 플라스미드를 주입함으로써 증명하였다. 이로써 P인자가 유전자의 전달을 위한 운반체로써 유용함을 제시하였으며, 형질전환 벡터로 사용되고 있다. 초파리에서 벡터와 helper로 이루어진 P 벡터가 주로 사용되는데 벡터는 양 말단에 ITRs를 가짐으로써 전이효소에 의해 삽입될 수 있는 부위를 가지며, helper는 전이효소를 발현할 수 있지만, ITRs의 결여로 자신의 효소 활성화에 의해 숙주로 삽입되거나 전이할 수 없는 특성을 가진다. 따라서 이 두 가지를 동시에 주입하면, 외래 유전자를 가진 벡터가 helper의 전이효소 활성화로 인해 일시적으로 숙주 DNA로 삽입되게 된다. P벡터계를 도입하려는 시도는 효모, 모기, nondrosophilide, LTK cell에서 있었으나, P인자의 활성이 발견되지 않았다. 그러나 누에에서는 Rous sarcoma virus(RSV) long terminal repeat(LTRs)를 가진 벡터를 사용하여 외래유전자 도입을 시도하여 발현된 예를 있다. 본 연구에서는 실험동물로써 많은 가치를 가진 누에의 수정란에 일본에서 시도된 방법과는 달리 유리주사침을 미세하게 만들어 숙주의 genome에 삽입효율이 뛰어난 P벡터를 이용한 전이벡터계를 개발하고, 이를 바탕으로 궁극적으로 IGF-I 형질전환 누에의 제작을 위하여 fibroin 유전자의 promoter를 이용한 발현벡터를 제작하였다.

## 2. 연구개발 내용

### 가. IGF-I gene 발현벡터 개발

IGF-I 유전자는 153개의 아미노산을 코딩하고 있으며, protein maturation 과정을 거쳐 70개의 아미노산으로 이루어진 성숙한 IGF-I가 형성된다. 이러한 IGF-I 코딩 영역의 DNA 단편을 단리하는 방법으로 oligonucleotide 합성법을 채용하였다. 누에의 fibroin light chain 유전자의 코돈을 참고하여 IGF-I 유전자의 코돈의 염기를 동의치환하였고 cloning의 편의를 위해 upstream 및 downstream부위에 각각 EcoR I, Nar I 및 pst I, xba I 등의 restriction enzyme site를 첨가하여 IGF-I 코딩 영역의 cDNA 염기서열을 변형하여 upstream 및 downstream oligonucleotide를 합성하였다(Table 1). 합성된 두 가닥의 oligonucleotide(IGF-up 128mer, IGF-down 129mer)를 혼합하여

Taq polymerase를 이용한 PCR을 실행하였다.

Table 1. PCR primer sequences of IGF- I gene

Sequence	
IGF-up(128mer)	5'-GAATTCGGCGCCGGTCTGAGACGCTCTGCGGTGCAGAGCTGGT GGATGCACTTCAGTTCGTGTGTGGTGACAGGGGTTTTATTC AACAAAGCCTACAGGTTATGGTTCATCATCACGGAGGGCACCC-3'
IGF-down(129mer)	5'-CTGCAGTCTAGATTATGCTGACTTTGCAGGCTTGAGGGGTGCG CAATACATCTCCAGCCTCCTTAGATCACAGCTCCGGAAGCAGC ACTCATCCACGATACCTGTCTGAGGTGCCCTCCGTGATGATGA-3'

Underlined bases represent overlapped sequence.

#### 나. IGF-I 형질전환 누에 작성

##### 1) 공시누에

본 실험에 사용된 누에는 잠사곤충연구소에서 잠123과 잠124를 교배하여 얻은 백옥잠 계통의 집누에 (*Bombyx mori*)알을 받아 본 연구실에서 사육하여 성충으로 우화시킨 후 교배시켜 수정란을 채란하여 실험하였다.

##### 2) 누에의 알 준비

50일간 누에를 사육하여 얻은 pupa를 암수 구분하여 25℃에서 12일정도 두면, 성충으로 깨어난다. 이것을 암수 교미하여 2시간정도 둔 후에 알을 받는 두꺼운 종이에 놓아둔다. 1시간 후에 알을 수거하여 미세주사할 준비를 한다. 보통 누에는 알을 300내지 500개를 낳는 것으로 알려져 있다.

##### 3) 미세주사

앞서 만든 발현벡터를 helper(transposase - p $\pi$ 25.7wc $\Delta$ 2-3)와 함께 injection buffer에 녹여 시간당 6.6cc로 미세주입한다. 20배의 해물현미경하에서 injector를 사용하여 천천히 미세 바늘 내의 vector가 알속으로 주입됨을 보면서 찌른다. 찌르고 난 알의 구멍을 파라핀으로 막아 침산처리 시 염산의 직접적인 침투를 막는다.

#### 4) 미세주입된 알의 인공부화

미세주사한 알을 화학적 처리에 의해 인공부화하기 위하여 비중 1.1의 염산에서 침산처리한다. 침산처리를 하기전에 소독효과 및 종이와 알 사이의 접착력을 강화하기 위하여 2% formaldehyde에 담가두었다가 공기 중에서 건조한다. 건조된 알판을 염산에 넣고 50분동안 침산 한 후에 흐르는 물에서 30분 동안 세척한다. 그리고 다시 공기 중에서 하루동안 건조하면, 다음날 알의 색이 노란색에서 황토색으로 변한다. 이것을 10일간 25℃에 두면 개미누에가 부화된다.

#### 5) 누에의 사육

부화되어 나온 개미누에에 뽕잎을 잘게 썰어서 조금씩 공급한다. 매일 3차례 먹이를 공급하고 사육 바구니를 갈아준다. 병잠에 유의하면서 25±2℃의 사육실에서 기르며, 성체까지 약 60일이 소요된다. 누에는 larva로 5번의 탈피를 하고 pupa가 되기 전에 고치를 짓기 시작한다. 종에 따라서 고치를 짓는 것도 있고 안짓는 것도 있으나 본 실험에서 사용한 누에는 잠123과 잠124를 교배하여 얻은 백옥잠(Bombyx mori)을 사용하였다. 사육에 사용한 바구니는 세제로 깨끗이 닦고 소독한다. 소독제로는 2% formaldehyde를 사용하며, 항상 사육실내의 소독 및 청소를 수행하였다.

#### 다. IGF-I 유전자가 형질전환 된 개체 선별

##### 1) 누에 및 나방의 genomic DNA 추출

E-tube에 sample 누에를 넣고 grinding buffer [(0.2 M Sucrose, 0.05M EDTA, 0.5%(w/v) SDS, 0.1M Tris(pH9.2)] 400 $\mu$ l 첨가한 후 파쇄한다. 68℃에서 20분간 incubation후 5M potassium acetate 100 $\mu$ l를 첨가하면서 혼합한 후 30분간 4℃에 방치한다. 12000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 2 volume 100% ethanol로 처리한다. 15분간 -70℃에 방치한 후 원심분리하여 pellet 만을 얻어 200 $\mu$ l D.W에 녹인다. RNase를 처리한 후 동량의 phenol:chloroform(25:24)으로 2번 처리한 후 상층액 만을 회수하여 1/10volume 3M sodium acetate와 2 volume의 100% ethanol로 처리한 후에 -70℃ 15분간 방치한다. 10분간 12000rpm에서 원심분리하여 얻은 pellet을 vacuum dry한 후 50 $\mu$ l의 D.W에 녹인다 이중 일부를 취하여 전기영동으로 확인한다.

##### 2) PCR법에 의한 형질전환체의 선별

형질전환 여부를 확인하기 위해 알을 받고 난 성충의 암수에서 genomic DNA를 추



출하여 PCR를 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1 에 나타내었다. PCR을 통하여 원하는 product가 나타난 것만을 선택하여 사육하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 2 에 나타내었다.

Table 2. PCR primer sequences of IGF- I expression vector

Sequence	
IGF-I-for	5`-CTGCAGTCTAGATTATGC-3` (18mer)
IGF-I-rev	5`-GAATTCGGCGCCGGTCCT-3` (18mer)
FLS-for	5`-GTACAGTTGTTTGATA-3` (16mer)
SVPS-R	5`-CCCCCTGAACCTGAAACATA-3` (20mer)

2) 염기서열 분석

염기서열 분석은 ABI 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer)와 BigDye terminator (Perkin-Elmer)를 이용하여 결정하였다.

라. 형질전환 누에에서 발현된 IGF-I의 분리 정제 방법 확립

누에로부터 발현된 IGF-I을 회수하여 특성을 연구하기 위해 누에의 각 부위 및 누에고치로부터 IGF-I 함량을 측정하고 이를 효과적으로 분리·정제 하기 위한 방법을 탐색하였다.

형질전환 누에로부터 IGF-I을 추출하기 위하여 누에몸체, 누에고치를 PBS와 40% lithium thiocyanate에 녹여 용출 시킨 후 sandwich ELISA로 용출되어 나온 IGF-I의 함량을 측정하였다.

PBS처리는 누에와 PBS(2X)를 5g/500ml의 비율로 섞어 저온실에서 하룻 밤 교반 후 거름 종이로 거른 후 100kDa membrane을 장착한 ultrafiltration kit를 사용하여 거른다. 빠져나온 용액은 1kDa membrane을 사용하여 염 제거와 동시에 농축하여 동결건조하여 사용한다. Lithium thiocyanate 처리는 누에 50mg에 40% lithium thiocyanate 2ml 비율로 섞어 완전히 녹인 후 원심 분리하여 상등액을 1kDa membrane을 사용하여 시약을 제거하고 농축하여 시료로 사용하였다.

### 3. 연구개발 수행 결과

#### 가. IGF-I gene screening 및 발현벡터 개발

##### 1) IGF-I gene screening

IGF-I 코딩 영역의 cDNA 염기서열 변형하여 upstream 및 downstream oligonucleotide를 합성하였다(Fig. 1). 합성된 두 가닥의 oligonucleotide (IGF-up 128mer, IGF-down 129mer)를 혼합하여 Taq polymerase를 이용한 PCR법에 의해 완전한 dsDNA를 완성하였다(Fig. 2).

```
GAA TTC GGC GCC GGT CCT GAG ACG CTC TGC GGT GCA GAG CTG GTG GAT GCA CTT CAG TTC  
EcoR I  Nar I  G  P  E  T  L  C  G  A  E  L  V  D  A  L  Q  F  
CTT AAG CCG CGG CCA GGA CTC TGC GAG ACG CCA CGT CTC GAC CAC CTA CGT GAA GTC AAG  
  
GTG TGT GGT GAC AGG GGT TTT TAT TTC AAC AAG CCT ACA GGT TAT GGT TCA TCA TCA CGG  
V  C  G  D  R  G  F  Y  F  N  K  P  T  G  Y  G  S  S  S  R  
CAC ACA CCA CTG TCC CCA AAA ATA AAG TTG TTC GGA TGT CCA ATA CCA AGT AGT AGT GCC  
  
AGG GCA CCT CAG ACA GGT ATC GTG GAT GAG TGC TGC TTC CGG AGC TGT GAT CTA AGG AGG  
R  A  P  Q  T  G  I  V  D  E  C  C  F  R  S  C  D  L  R  R  
TCC CGT GGA GTC TGT CCA TAG CAC CTA CTC ACG ACG AAG GCC TCG ACA CTA GAT TCC TCC  
  
CTG GAG ATG TAT TGC GCA CCC CTC AAG CCT GCA AAG TCA GCA TAA TCT AGA CTG CAG  
L  E  M  Y  C  A  P  L  K  P  A  K  S  A  *  xba I  pst I  
GAC CTC TAC ATA ACG CGT GGG GAG TTC GGA CGT TTC AGT CGT ATT AGA TCT GAC GTC
```

Fig. 1. The modified cDNA sequence for cloning the IGF-I gene. Synthesized oligonucleotides were printed in bold and restriction enzyme sites for cloning were underlined.

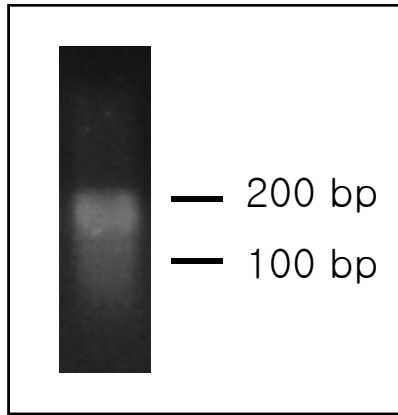


Fig. 2. Agarose gel image of PCR product

## 2) IGF-I 발현벡터 개발

IGF-I 유전자가 삽입되어 있는 T vector 및 누에의 fibroin promoter 및 fibroin signal peptide를 포함하고 있는 발현벡터를 *Nar* I 및 *Xba* I으로 digestion하여 분리, 정제된 IGF-I 유전자 단편을 발현벡터에 삽입하여 p[FpIGF-I]을 제작하였다 (Fig. 3).

제작된 vector는 PCR, 제한효소 처리, 염기서열분석을 통해 발현벡터의 완성을 확인하였다.

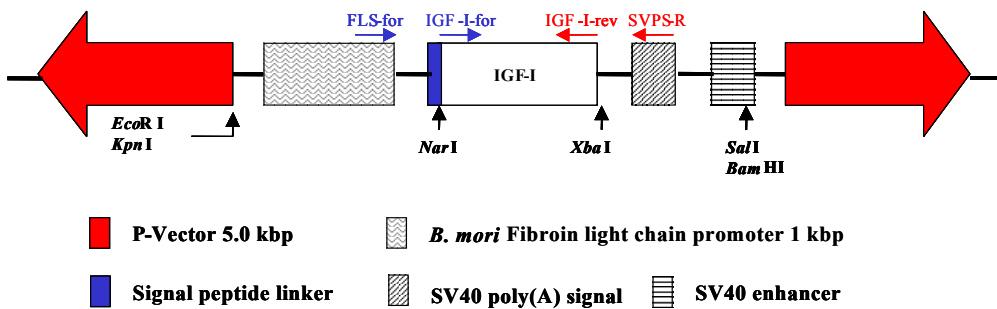


Fig. 3. physical map of IGF-I expression vector (p[FPIGF-I])

나. IGF-I 형질전환 누에 작성

본 연구실에서는 전이인자를 이용하여 매우 높은 삽입률로 형질전환 누에를 작출하였다. 미세주사의 착색률, 부화율 및 형질전환 효율은 Table 3과 같다.

Table 3. Survival of embryos and yield of positive larvae

	Injected eggs	Pigmented eggs	1 <sup>st</sup> instar	Pupae	Adult	Transgenic silkworm
NO.	4,605	109	70	53	37	5
Rate(%)		2	64	75	69	13

70 of 4605 microinjected eggs were survived

다. IGF-I 유전자가 형질전환 된 개체 선별

1) PCR법에 의한 형질전환체의 선별

미세주사하여 부화된 나방 중 형질전환체를 선별하기 위하여 PCR 방법을 이용하였다.

IGF-I 발현벡터를 미세주사하여 부화된 나방(G0세대) 37마리를 자가 교배시켜 알을 받은 후 각각의 나방에서 genomic DNA를 추출하였고, 4쌍의 primer (FLS-for/IGF-I-rev, FLS-for/SVPS-R, IGF-I-for/IGF-I-rev, IGF-I-for/SVPS-R)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 방법을 통해 미세주사하여 얻은 37마리 나방 중 5마리가 형질전환체임을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

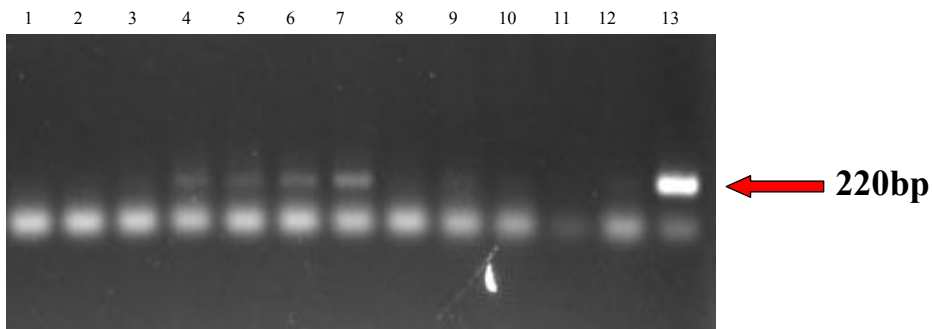


Fig. 4. Analysis of PCR of transgenic silkworm (G<sub>0</sub> adult). PCR primer was designed to produce 220bp of IGF-I gene. lane 1 : negative control, Bakokjam genomic DNA, lane 2~12 : injected silkworm 1~11, lane 13 : positive control, expression vector.

2) 형질전환체의 유전여부 확인

PCR 방법으로 선별된 형질전환체가 다음세대로 유전이 이루어 졌는지를 알아보기 위해 F1, F2세대의 5령기 누에 건사선 및 F3세대 개미누에의 genomic DNA를 추출하여 G0세대와 같은 방법으로 PCR법을 통해 형질전환체를 선별하였다(Fig. 5,6,7). F2세대의 PCR product를 T-vector에 삽입하여 클로닝 한 후, ABI 377 자동염기서열 분석기를 이용하여 PCR product의 염기서열을 확인하였다. PCR 방법을 통해 F<sub>1</sub>,F<sub>2</sub>,F<sub>3</sub>F<sub>4</sub>세대에서 형질전환체를 확인할 수 있었으며, 염기서열 분석을 통해 PCR product가 미세주사한 IGF-I expression vector의 염기서열과 일치하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

M    1    2    3    4

← 420bp

Fig. 5. Analysis of PCR of transgenic silkworm (F<sub>2</sub>). PCR products were amplified to designed to produce 420bp of IGF-I gene and SV40 poly(A) signal. lane M : marker, lane 2 : negative control, Bakokjam genomic DNA, lane2,3 : transgenic silkworm, lane 4 : positive control, IGF-I expression vector

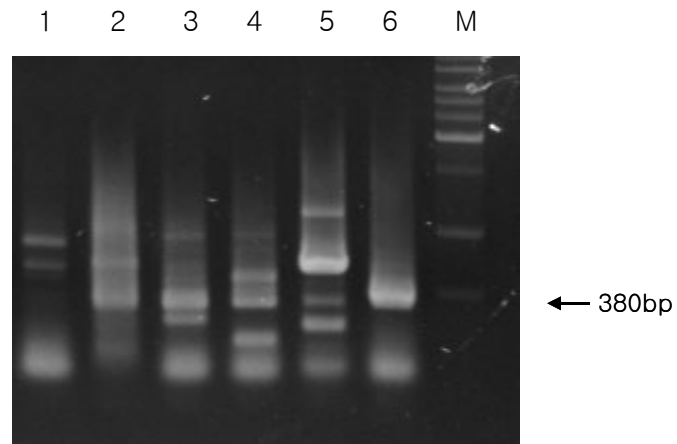


Fig. 6. Analysis of PCR of transgenic silkworm (F<sub>2</sub>,F<sub>3</sub>). PCR products were amplified to designed to produce 380bp of IGF-I gene (FLS-for/IGF-I-rev). lane 1 : negative control, Bakokjam genomic DNA, lane 2,3 : transgenic silkworm (F<sub>2</sub>), lane 4,5 : transgenic silkworm(F<sub>3</sub>), lane 6 : positive control, IGF-I expression vector

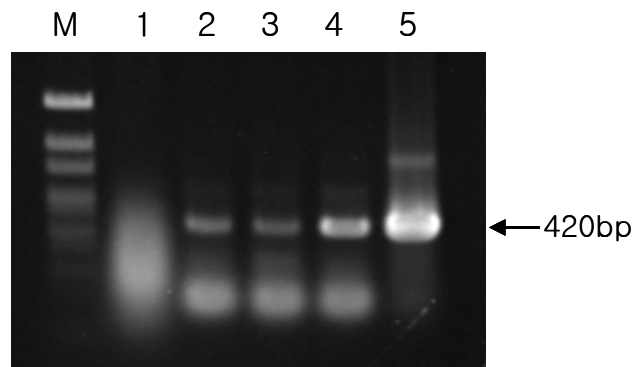


Fig. 7. Analysis of PCR of transgenic silkworm (F<sub>4</sub>). PCR products were amplified to designed to produce 420bp of IGF-I gene and SV40 poly(A) signal. lane M : marker, lane 1 : negative control, Bakokjam genomic DNA, lane2 : anterior silk gland of transgenic silkworm, lane 3 : middle silk gland of transgenic silkworm

lane 4 : posterior silk gland of transgenic silkworm lane 5 : positive control, IGF-I expression vector

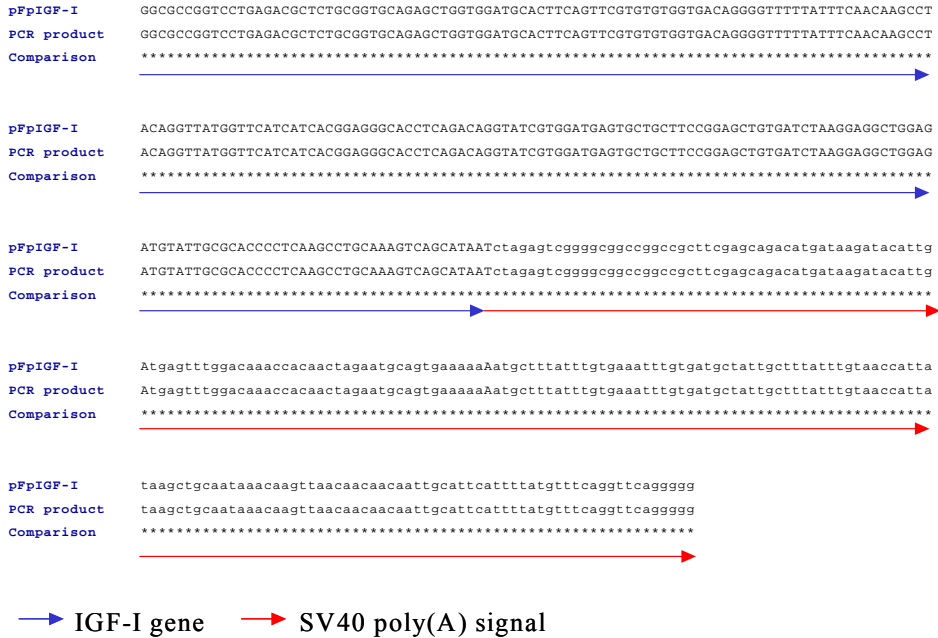


Fig. 8. Result of comparison with PCR products sequence of transgenic silkworms F<sub>2</sub> and IGF-I gene/ SV40 poly(A) signal which used for foreign DNA in microinjection. PCR product represents to sequence of PCR products which 420bp of IGF-I gene and SV40 poly(A) signal in transgenic silkworms F<sub>2</sub> and IGF-I expression vector means IGF-I gene and SV40 poly(A) signal sequence which was used for microinjection vector

### 3) IGF-I의 발현여부 확인

형질전환체가 IGF-I을 발현하는지를 알아보기 위하여 번데기의 무게와 크기, 고치 크기를 비교하였다. (Table 4, Fig. 9,10)

Table 4. The comparison with normal pupae and transgenic pupae weight.

	Normal( <i>Bakokjam</i> )		Transgenic silkworm	
	Male	Female	Male	Female
Advantage(g)	1.286	0.907	1.499	1.108
SD	0.093	0.076	0.078	0.085



Fig. 9. The comparison with normal pupae and transgenic pupae size. The transgenic pupae is larger than normal pupae.





Fig. 10. The comparison with normal cocoon and transgenic cocoon size. The transgenic cocoon is larger than normal cocoon.

#### 라. Fibroin promoter 분석

B. mandarina 와 A. yamamai의 promoter를 cloning 하기 위하여, 이미 알려져 있는 B. mori 의 Fib-L, Fib-H promoter 염기서열과 A. pernyi 의 Fib-H promoter의 염기서열을 바탕으로 Table 5와 같이 primer를 작성하여 PCR을 수행하였다. PCR product를 pGEM-T easy vector에 cloning 한 후, pBluescript에 다시 subcloning 하여 ABI 377 자동염기서열 분석기를 이용하여 각 clone의 염기서열을 결정하고, ClustalW로 분석하여 두 유전자의 속간, 종간의 일치서열을 탐색하였다. MatInspector program([www.genomatrix.de](http://www.genomatrix.de))을 사용하여 전사인자부착부위를 추정하였다.

B. mandarina 5' 측면서열은 880 bp 그리고 A. yamamai는 1200 bp를 결정하여 이미 발표된 B. mori와 A. pernyi의 염기서열과 비교한 결과 피브로인 프로모터는 핵심 프로모터, 반복서열, Fib-H 혹은 Fib-L에서 추정되는 전사인자 부착부위가 종간에 잘 보존되어있음을 알 수 있었다. Fib-H와 Fib-L 프로모터부위는 같은 속간은 매우 유

사했으며, Fib-H와 Fib-L 사이는 몇 개의 보전부위가 있었다 (Fig. 11).

전자인자부착부위 추정결과 프로모터 전체에 걸쳐 전사활성이자 부착부위가 나타나, 때때로 억제자와 활성화 부착부위가 근접하여 나타나는 것을 알 수 있었다 (fig. 12).

Table 5. Primer sequence for amplification of the fibroin promoter region

---

1. <i>B. mandarina</i>	
Fib-L For	5`-ACAAAGTGGATCCTATCCCCTTTT-3`
Fib-L Rev	5`-AAATATAGGATCCATTTTAGTGGTC-3`
Fib-H For	5`-GTAGTGTTTAAGCTTGTTGTACAA-3`
Fib-H Rev	5`-CAGCTCCGGTACCCGCACCAGAACC-3`
2. <i>A. yamamai</i>	
5`AyFibSeq	5`-CGTATTAGATGGCGGTTACGA-3`
5`RT-R	5`-GGATCCTCTTCGAGG-3`

---

**DFD** **DL**

Bmor i-FibH -899 -----TGAAAAATGCTCATGTGTTATACCTTTCCAAAAACCCAT**TAATTA**-GGTAGTGTTAAGCTTGTGTACAAAACTGCCA---CACGCATTT**TTTTCTCCACTGTAGGTTG**  
 Bmandar ina-FibH -----TGAAAAATGCTCATGTGTTATACCTTTCCAAAAACCCAT**TAATTA**-GGTAGTGTTAAGCTTGTGTACAAAACTGCCA---CACGCATTT**TTTTCTCCACTGTAGGTTG**  
 Bmor i-FibL -1027 GAATTCAAATAACAAAGTGGTGCCTATCAAGCTTTTTTTGATCCAGACAAGAAA-ATAAGTGTTTCGGTGAGCTGAAAAATTAATTT---CAGGAAACAA**CAAAAAATAAG**-ACGCAA  
 Ayamamai-FibL GAATTCAAATAACAAAGTGGTGCCTATCAAGCTTTTTTTGATCCAGACAAGAAA-ATAAGTGTTTCGGTGAGCTGAAAAATTAATTT---CAGGAAACAA**CAAAAAATAAG**-ACGCAA  
 Apernyi-FibH -----**TCACAGGTTACCAATGAGAGCGCTTCAAAATCTTTACAACCTCATTAGATACGTCGATTTTCTCTACTT**-CA-

**DL DL DFD DL HB CAD** **HB DFD**

Bmor i-FibH -792 TAGTACGC**CAAAA**GAAAAATCGTT-CT-GT**GAAAA**-TTCAACA**AAAA**---TATTT---TTTGG**AAAA**ACACTTATCAATG-AGTAAAGTAA**CAATCATGAATAATTT**CATG-----  
 Bmandar ina-FibH TAGTACGC**CAAAA**GAAAAATCGTT-CT-GT**GAAAA**-TTCAACA**AAAA**---TATTT---TTTGG**AAAA**ACACTTATCAATG-AGTAAAGTAA**CAATCATGAATAATTT**CATG-----  
 Bmor i-FibL -912 AAGTACACCGGAGT**GAAAA**TAAACAC-**TAAGAAA**-GTAATGGCTAAAAATTA**TTCA**-TCTCGTGAATGATT**GAGCGGATAA**ACGCAGTACTAT**GGAGAGATTCTATGTT**AAATAT  
 Bmandar ina-FibL AAGTACACCGGAGT**GAAAA**TAAACAC-**TAAGAAA**-GTAATGGCTAAAAATTA**TTCA**-TCTCGTGAATGATT**GAGCGGATAA**ACGCAGTACTAT**GGAGAGATTCTATGTT**AAATAT  
 Ayamamai-FibH -783 **TAATAAT**CTATAGATGTGATTATTA**TA**-**CATAAA**-**ACCATT**AAAAATATGTCTCAACTATTGTG**AAAACTGTCAAAATCT**-GTTACGTAGT-----TCAGAAA**CACTAAG**-----  
 Apernyi-FibH **TAATAAT**CTATAGATGTGATTATTA**TA**-**CATAAA**-**ACCATT**AAAAATATGTCTCAACTATTGTG**AAAACTGTCAAAATCT**-GTTACGTAGT-----TCAGAAA**CACTAAG**-----

**CROC ELF DL** **DL**

Bmor i-FibH -688 ---**TA**AAAA**AAAA**TA**CTAGAAA**AGGAATTTTT**CTTACG**-AGATGCT**TA**AA**AA**CTCTG-----TTCAAGGTAGAGACTTT**TCGAT**-ATTTCGG---AA---AATTTGT**TA**---  
 Bmandar ina-FibH ---**TA**AAAA**AAAA**TA**CTAGAAA**AGGAATTTTT**CTTACG**-AGATGCT**TA**AA**AA**CTCTG-----TTCAAGGTAGAGACTTT**TCGAT**-ATTTCGG---AA---AATTTGT**TA**---  
 Bmor i-FibL -795 ATTAATGATATGATA**TA**AAAA**AGGGT**GGTGTACTATGTACGCGGTAA**AGGTTATACTTT**ATTTT**CAATAA**TTATTTCT**TTTTTTT**TA**TTCAATTT**TAATCAATTT**GAAAA**---  
 Bmandar ina-FibL ATTAATGATATGATA**TA**AAAA**AGGGT**GGTGTACTATGTACGCGGTAA**AGGTTATACTTT**ATTTT**CAATAA**TTATTTCT**TTTTTTT**TA**TTCAATTT**TAATCAATTT**GAAAA**---  
 Ayamamai-FibH -680 ---GAACACACA**AAATATACAGAT**ATT---TT**TTACG**AAAGTACGGAGAT**ATATAA**---ATTA**TTCAAT**ACTTTAGAA**TACATAA**---AACTATTT**GACAAT**  
 Apernyi-FibH ---GAACACACA**AAATATACAGAT**ATT---TT**TTACG**AAAGTACGGAGAT**ATATAA**---AATTA**TTCAAT**ACTTTAGAA**TACATAA**---AACTATTT**GACAAT**

**CAD CAD CAD HB CAD** **DFD**

Bmor i-FibH -593 -AACTGTA**AAATCGT**AAAAATTT**GTCTAA**CA**ATATA**TTG---TGTTGTTT**GGTAAGTATT**GACCCAA**AGTATCACCT**CTG---CAGTATG**TCGTGCTA**TT**CTG**GCACACAT**GTATAA**  
 Bmandar ina-FibH -AACTGTA**AAATCGT**AAAAATTT**GTCTAA**CA**ATATA**TTG---TGTTGTTT**GGTAAGTATT**GACCCAA**AGTATCACCT**CTG---CAGTATG**TCGTGCTA**TT**CTG**GCACACAT**GTATAA**  
 Bmor i-FibL -678 -AAAA**TCGAATAA**ACAACAT**CTCA**AA**CGATGCAT**TT**GG**-ACAT**CCCTTTCTTG**ACAT**ATATAA**TT**CGGTAAT**TT**TCGGTACG**TT**CGTAAAGT**TCAC**CTGCGGCTATAT**T---CGAC  
 Bmandar ina-FibL -AAAA**TCGAATAA**ACAACAT**CTCA**AA**CGATGCAT**TT**GG**-ACAT**CCCTTTCTTG**ACAT**ATATAA**TT**CGGTAAT**TT**TCGGTACG**TT**CGTAAAGT**TCAC**CTGCGGCTATAT**T---CGAC  
 Ayamamai-FibH -593 TGATT**GCAAA**T**ATAG**ACCA**TAA**AGACCA**CCACTCT**TT**GT**-AT**CTAA**AA**CA**CGT**AGCA**CA**CGACTCT**TT**CGCG**TT**AT**TCG---AG**GAAT**CT**AGCAGATA**TT**GGCG**TTTT**TT**---CGCA  
 Apernyi-FibH TGATT**GCAAA**T**ATAG**ACCA**TAA**AGACCA**CCACTCT**TT**GT**-AT**CTAA**AA**CA**CGT**AGCA**CA**CGACTCT**TT**CGCG**TT**AT**TCG---AG**GAAT**CT**AGCAGATA**TT**GGCG**TTTT**TT**---CGCA

**TLL**

Bmor i-FibH -480 CAGTCCACTG**TATTGACA**ATA**AAAA**CTCT**CTCATTGACT**-GAGAATG**CTGGACAGATTGGCTTT**---GTATTT**TGATTACAA**ATG**TTT**---TTT**GGTATTACCCAT**CC**AAAG**  
 Bmandar ina-FibH CAGTCCACTG**TATTGACA**ATA**AAAA**CTCT**CTCATTGACT**-GAGAATG**CTGGACAGATTGGCTTT**---GTATTT**TGATTACAA**ATG**TTT**---TTT**GGTATTACCCAT**CC**AAAG**  
 Bmor i-FibL -561 TCGCCAA**GTACGT**CGT**CGTATGTA**AT**GAGCG**-ATT**TAGTG**-G**CA**ACT**CTCAT**CT**TAATTT**GT**GT**CA**CGGTGCGCGCGCAT**CGT**AAAACTC**ACT**CTCATAGATT**TT**TCATA**AG**CG**  
 Bmandar ina-FibL TCGCCAA**GTACGT**CGT**CGTATGTA**AT**GAGCG**-ATT**TAGTG**-G**CA**ACT**CTCAT**CT**TAATTT**GT**GT**CA**CGGTGCGCGCGCAT**CGT**AAAACTC**ACT**CTCATAGATT**TT**TCATA**AG**CG**  
 Ayamamai-FibH -478 TCGCCAA**GTAA**AG**AGT**AGAA**ATG**-TACC**GTATTA**AA**TCAGT**GC**GA**AA**TTTTTCC**AT**AGAGT**GC**CTTCC**-AT**ACA**AT**CTATAG**TT**ACATATCT**TC**GGGAA**AA**TAAT**TC**GTGCCA**  
 Apernyi-FibH TCGCCAA**GTAA**AG**AGT**AGAA**ATG**-TACC**GTATTA**AA**TCAGT**GC**GA**AA**TTTTTCC**AT**AGAGT**GC**CTTCC**-AT**ACA**AT**CTATAG**TT**ACATATCT**TC**GGGAA**AA**TAAT**TC**GTGCCA**

**HSF DL**

Bmor i-FibH -365 GCAT**CTCCAGGAT**GGT**GTGG**CA**TCACG**CG**GATTGG**CA**AA**CA**AAAA**CT**AAA**---AT**GAA**ACT**A**---AAA**GAA**CA**AGTTCCG**CT**GTCCG**TT**CTCT**AG**TGGG**AA**AGCA**T**GAAGT**-A**AG**  
 Bmandar ina-FibH GCAT**CTCCAGGAT**GGT**GTGG**CA**TCACG**CG**GATTGG**CA**AA**CA**AAAA**CT**AAA**---AT**GAA**ACT**A**---AAA**GAA**CA**AGTTCCG**CT**GTCCG**TT**CTCT**AG**TGGG**AA**AGCA**T**GAAGT**-A**AG**  
 Bmor i-FibL -561 TCGCCAA**GTACGT**CGT**CGTATGTA**AT**GAGCG**-ATT**TAGTG**-G**CA**ACT**CTCAT**CT**TAATTT**GT**GT**CA**CGGTGCGCGCGCAT**CGT**AAAACTC**ACT**CTCATAGATT**TT**TCATA**AG**CG**  
 Bmandar ina-FibL TCGCCAA**GTACGT**CGT**CGTATGTA**AT**GAGCG**-ATT**TAGTG**-G**CA**ACT**CTCAT**CT**TAATTT**GT**GT**CA**CGGTGCGCGCGCAT**CGT**AAAACTC**ACT**CTCATAGATT**TT**TCATA**AG**CG**  
 Ayamamai-FibH -361 CCGCA**GA**AA**AGAGT**AGAA**ATG**-TACC**GTATTA**AA**TCAGT**GC**GA**AA**TTTTTCC**AT**AGAGT**GC**CTTCC**-AT**ACA**AT**CTATAG**TT**ACATATCT**TC**GGGAA**AA**TAAT**TC**GTGCCA**  
 Apernyi-FibH CCGCA**GA**AA**AGAGT**AGAA**ATG**-TACC**GTATTA**AA**TCAGT**GC**GA**AA**TTTTTCC**AT**AGAGT**GC**CTTCC**-AT**ACA**AT**CTATAG**TT**ACATATCT**TC**GGGAA**AA**TAAT**TC**GTGCCA**

**CAD CAD KNL DFD**

Bmor i-FibH -249 TTCTTT**AAATAT**ACA**AAA**---AA**ATTGA**CG**ATATA**---TAA**ATCTTT**AA**ATATA**AA**AGTAA**-GA**ACA**AA**ATAGAT**CA**ATTAAT**CA**ATAA**TT**AA**---C-AC**ATTG**TT**CAT**  
 Bmandar ina-FibH TTCTTT**AAATAT**ACA**AAA**---AA**ATTGA**CG**ATATA**---TAA**ATCTTT**AA**ATATA**AA**AGTAA**-GA**ACA**AA**ATAGAT**CA**ATTAAT**CA**ATAA**TT**AA**---C-AC**ATTG**TT**CAT**  
 Bmor i-FibL -324 GCT**TA**AA**GAAGT**ATA**ACTTCA**ATA---ATT**TA**AA**TTTT**AA**AAAA**AA**CAATGCAT**---AG**A**TA**AT**-AT**ATGA**AT**TA**-TT**TA**AA**ATG**CA**TTTACG**CA**TTGACAT**TA**ACGACG**AG**CTTAA**G  
 Bmandar ina-FibL GCT**TA**AA**GAAGT**ATA**ACTTCA**ATA---ATT**TA**AA**TTTT**AA**AAAA**AA**CAATGCAT**---AG**A**TA**AT**-AT**ATGA**AT**TA**-TT**TA**AA**ATG**CA**TTTACG**CA**TTGACAT**TA**ACGACG**AG**CTTAA**G  
 Ayamamai-FibH -243 **AAAA**AC**CG**AA**AGT**GC**GGGCA**ATA---AT**AA**AG**CTT**GT**AGTATG**AT**TTGTA**AA**GTGA**-AT**CT**GA**AACT**GT**CTG**TT**GG**-AT**G**CA**CT****TAAT**AT**TTAA**GG**TTA**TT**AA**TT**AA**  
 Apernyi-FibH **AAAA**AC**CG**AA**AGT**GC**GGGCA**ATA---AT**AA**AG**CTT**GT**AGTATG**AT**TTGTA**AA**GTGA**-AT**CT**GA**AACT**GT**CTG**TT**GG**-AT**G**CA**CT****TAAT**AT**TTAA**GG**TTA**TT**AA**TT**AA**

**HB KNL BRC24 DFD**

Bmor i-FibH -144 ---GAT**CACA**AT**TTA**---AT**TTACT**---CAT**ACG**TT**GTAT**GT**ATGTTAA**AAAA**---**GAT**TA**AT**TTCTAT**GT**AA**TT**GTATCTGTA****CAAT**CA**ATGT**GT**AGT**TT**AT**  
 Bmandar ina-FibH ---GAT**CACA**AT**TTA**---AT**TTACT**---CAT**ACG**TT**GTAT**GT**ATGTTAA**AAAA**---**GAT**TA**AT**TTCTAT**GT**AA**TT**GTATCTGTA****CAAT**CA**ATGT**GT**AGT**TT**AT**  
 Bmor i-FibL -210 ---GA**CA**CA**ACTTA**---G**TTTAA**CT**AGAG**GG**GTAC**CT**CA**GA**AA**CT**CATCTT**CA**TAGA**AA**CTAA**AG**CTTAA**AT**CG**CA**ATAA**AA**AGCA**T**AGTCAAT**TT**TA**CT**G**-AA**AGTCA**AA**G**  
 Bmandar ina-FibL ---GA**CA**CA**ACTTA**---G**TTTAA**CT**AGAG**GG**GTAC**CT**CA**GA**AA**CT**CATCTT**CA**TAGA**AA**CTAA**AG**CTTAA**AT**CG**CA**ATAA**AA**AGCA**T**AGTCAAT**TT**TA**CT**G**-AA**AGTCA**AA**G**  
 Ayamamai-FibH -127 ---GAT**AG**GG**TTA**---ACT**ATGAT**TT**GT**TT**AA**CT**CTATAG**AT**TTCACT**TT**CCAT**TT**---**GT**CA**AT**TTA**---AA**ATG**TT**TTA**TT**GG**-AA**ATG**TA**AA**AG**CA**-AC**AT**TA**CA**AA  
 Apernyi-FibH ---GAT**AG**GG**TTA**---ACT**ATGAT**TT**GT**TT**AA**CT**CTATAG**AT**TTCACT**TT**CCAT**TT**---**GT**CA**AT**TTA**---AA**ATG**TT**TTA**TT**GG**-AA**ATG**TA**AA**AG**CA**-AC**AT**TA**CA**AA

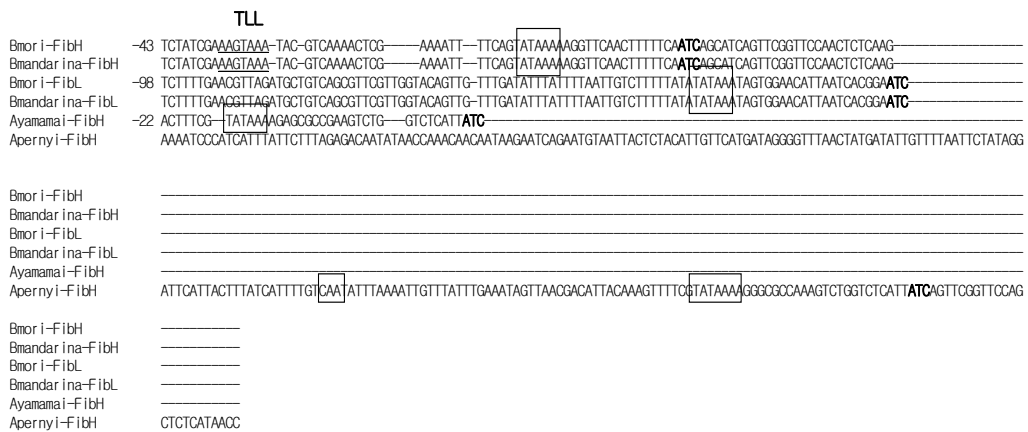
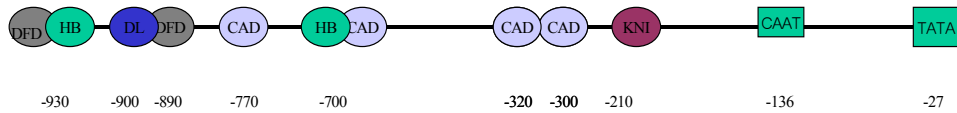


Fig. 11. Sequence comparison of 5'-upstream regions of *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*, *Antheraea yamamai* and *Antheraea pernyi*. Comparison of Fib-H genes and Fib-L genes in *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*, *Antheraea yamamai* and *Antheraea pernyi*. The *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi* sequences were taken from published information. The nucleotide sequence was oriented with transcription preceding from left to right and numbered with the transcription start site designated as +1. The binding sites of the homeodomain proteins or transcription factors were shown above the nucleotide sequence. CAAT box and TATA box represent in the box. Putative binding sites of transcription factor were underlined. Transcription initiation site was bold letter. --- indicate gaps inserted to improve the alignment

### A. *Fib-L*



### B. *Fib-H*

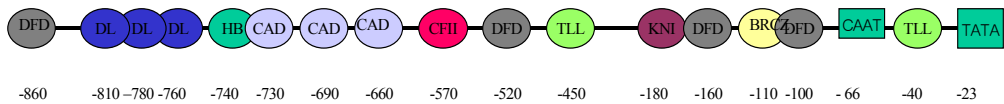


Fig. 12. Diagram of putative transcription factor binding site by MatInspector program ([www.genomatrix.de](http://www.genomatrix.de)) derived with insect clones of fibroin light(A) and heavy chain (B) gene promoter in *bombyx mori*. DFD is deformed transcription factor of *Drosophila* and HB is hunchback, KNI: Kirps CAD: constitutive activating domain.

마. 형질전환 누에에서 발현된 IGF-I의 분리 정제 방법 확립

형질전환 누에로부터 IGF-I을 추출하기 위하여 누에몸체, 누에고치를 PBS와 40% lithium thiocyanate에 녹여 용출 시킨 후 SDS-PAGE와 western blot으로 존재 유무를 확인 하였다(Fig. 13). 그림에서 보는 것처럼 C lane은 누에고치 추출액으로 standard IGF-I과 초유로부터 분리된 IGF-I rich fraction과 마찬가지로 최하단 부분에 위치한 분리대가 western blot에서 항체와 반응함을 보여 IGF-I의 존재를 확인할 수 있었다.

그리고 각각의 용매처리로 용출되어 나온 IGF-I의 함량을 sandwich ELISA로 측정하였다. 누에 몸체의 경우 PBS처리로 단백질은 어느 정도 용출이 되나 IGF-I의 함량은 누에 1g 당 90ng 정도의 IGF-I 만이 검출되었다. 누에고치의 경우에도 PBS 처리시에는 하루이상 교반을 해야 수용성 단백질이 용출되기 시작하며 검출되는 IGF-I 함량은 120ng/g 수준이다.

누에고치를 40% lithium thiocyanate로 처리 시에는 완전히 용해되지만 ultrafiltration을 거치게 되면 fibroin은 응집되어 제거해야만 한다. 남은 상등액에 고형분 함량은 매우 작지만 g당 1,300ng의 IGF-I 함량이 측정되었다. 이러한 결과로 볼 때 지질을 포함한 여러 물질을 함유하고 있는 누에의 몸체보다는 단백질로만 이루어진 누에고치를 사용하여 IGF-I을 추출하는 방법이 효율적이라고 판단되어졌다.

단, 이 방법은 누에고치를 녹이는 용매인 lithium thiocyanate의 가격이 높을 뿐 아니라 녹일 수 있는 양이 적기 때문에 회수율이 높다고 해도 대량 정제를 위한 방법으로는 부적격한 것으로 생각되어진다. 또한 누에의 몸체를 용해시키기에도 적합하지 않기 때문이다. 차후에 누에고치를 이용하여 좀 더 적절한 용매와 알맞은 chromatography 처리로 분리해내는 방법을 사용해야 될 필요가 있다고 생각되어진다.

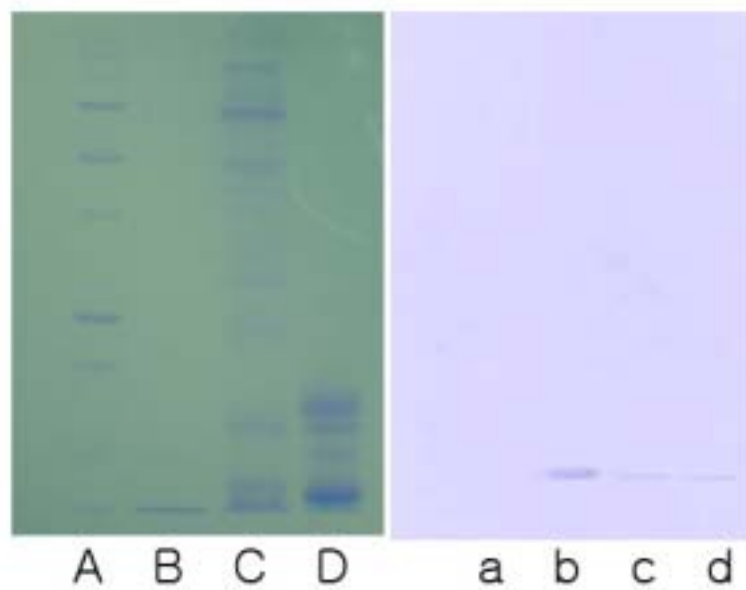


Fig. 13. SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis patterns of IGF-I rich fraction separated from membrane filtration. Lane A(a) : Low molecular weight marker (Bio-Rad, USA), lane B(b): Standard IGF-I(R&D system, USA), lane C(c) : IGF-I rich fraction from cocoon of the silkworm , lane D(d) : colostral IGF-I rich fraction

바. IGF-I 형질전환 누에 대량생산

위의 연구 과정을 통해 형질전환체라고 확인된 성체를 자가교배를 하여 F<sub>3</sub>세대까지 확보하였고, 현재 F<sub>5</sub> 세대 알판을 확보하여 계통을 유지하고 있다.

본 연구실에서는 항상 23~25℃를 유지 할 수 있는 누에 사육상을 보유하고 있어 언제든지 누에의 대량생산이 가능하다.

### 제 3 절 *In vivo*에서의 IGF-I의 생리활성 검증 및 실용화 기술개발 (협동과제)

#### 1. 연구개발 내용

##### 가. IGF-I enriched whey fraction의 primary cell 증식효과 검증

###### 1) IGF-I enriched whey fraction (1-30kDa)

Cream 및 acid casein을 제거한 초유의 whey를 1세부과제로부터 공급받아 30kDa cut-off membrane으로 ultrafiltration하여 30kDa이하의 분획을 수집하였다. 그후 1kDa cut-off membrane을 사용하여 1kDa이하의 분획을 제거하여 1-30kDa의 분획만 실험에 사용하였다. ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)방법을 이용하여 분획 내에 존재하는 IGF-I의 함량을 정량하여 본 실험의 IGF-I 시료로 사용하였다.

###### 2) Primary cell의 증식효과 검증

IGF-I enriched whey fraction의 primary cell 증식효과(splenocyte)는 5주령의 female Balb/c 마우스의 비장을 무균 적으로 분리하여 single cell을 만들어  $1 \times 10^5$  spleen cell을 96 well microplate에 분주하여 20ng/ml 상당의 IGF-I enriched whey fraction을 주입하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 배양하였다. 그리고 대조군의 경우 세포의 증식의 측정은 배양 종료 2시간 전에 BrdU labeling solution을 well 당 10 $\mu$ l 주입하고 세포의 DNA 합성량을 측정하여 세포의 증식을 표시하였다.

##### 나. IGF-I enriched whey fraction의 장관기능 증진에 미치는 효과 검증

###### 1) 항암제 투여에 의한 장관궤양의 유도

7주령 male Sprague-Dawley rat을 7일 동안 적응시킨 다음 3일 동안 1일 1회 Methotrexate(Sigma, USA) 2.5mg/kg를 견갑골 부위에 피하 주사하여 장관궤양을 유도하였다.

###### 2) Experimental diet의 조제 및 투여

실험식이의 조성은 Table 1에서와 같이 IGF-I의 함량이 5ng, 20ng 그리고 50ng/ml



에 상당하는 IGF-I enriched whey fraction을 조제하여 2ml 씩 하루에 2회(오전 9시와 오후 5시) 항암제 투여와 동시에 개시하여 5일 동안 gavage feeding 하였고, 희생하기 전 24시간 동안은 절식하였다.

Table 1. Composition of experimental diets

Group	Experimental Diet	Treatment
A	No IECWF	MTX-non- treated
B	No IECWF	MTX treated
C	IECWF- 5*	MTX treated
D	IECWF- 20**	MTX treated
E	IECWF- 50***	MTX treated

\* IECWF-5: IGF-I enriched colostral whey fraction(IGF-I 5ng),

\*\* IECWF-20: IGF-I enriched colostral whey fraction(20ng),

\*\*\* IECWF-50: IGF-I enriched colostral whey fraction(50ng)

### 3) Mucosal weight, mucosal protein, mucosal DNA 정량

Mucosal protein과 DNA 함량을 분석하기 위한 시료는 Berseth 등(1983)의 법에 따라서 전처리 하였다 즉, 장점막 시료를 0.5N HClO<sub>4</sub> 8ml을 넣어 tissue homogenizer로 균질 화하였다. 4℃에서 10분간 2,000rpm으로 원심분리 한 다음 상등액은 제거하고 침전물에 0.2N potassium acetate 3.5ml를 주입하고 분산시킨 후 4℃에서 15분 동안 2,000rpm으로 원심분리 하였다. 얻어진 침전물을 3.5ml의 ethanol과 ethyl ether 혼합물(3:1/ethanol : ethyl ether)로 지질을 추출한 다음 4℃에서 15분간 2,000rpm으로 원심분리시켜 상등액은 버리고 침전물에 잔존하는 ether는 vacuum desicator를 이용하여 제거하였다. 그 후 0.1N KOH 3.5ml로 침전물을 분산시킨 다음 뚜껑을 닫고 37℃에서 16-18 시간 동안 반응시킨 다음 실온에서 15분간 2,000rpm으로 원심분리하여 상등액을 취하여 0.15ml 0.6N HCl과 3.75ml 0.5N HClO<sub>4</sub>를 첨가하여 혼합한 후 4℃에서 30분 이상 방치하여 침전물이 형성되도록 한 다음 4℃에서 15분간 2,000rpm으로 원심분리하였다. 상등액은 버리고 침전물은 단백질과 DNA의 측정을 위한 시료 조제를 위해 3.5ml의 0.5N perchloric acid를 넣어 분산시킨 다음 DNA를 용해하기 위해

90℃에서 25분 동안 열처리하고 실온에서 냉각한 후 4℃에서 20분 동안 4,000rpm으로 원심분리하였다. 상등액은 DNA분석을 위한 시료로 취하였다. 침전물에는 3.5ml의 0.1N NaOH를 넣고 하룻밤 동안 반응시켜 단백질을 용해시켜 단백질 분석용 시료로 사용하였다.

Mucosal DNA는 Burton(1956)법에 의해서 실시하였고 mucosal protein은 Lowry 등(1951)의 법으로 실시하였다.

다. 투여방법에 따른 IGF-I의 활성변화

#### 1) 장관궤양의 유발

5주령의 ICR계 mice를 중앙실험 동물사에서 구입하여 1주일간 적응시킨 후 3일 동안 1일 1회 methotrexate(Sigma, USA) 2.5mg/kg을 견갑골 부위에 피하 주사하여 장관궤양을 유발하였다. 각 실험군은 10마리로 하였다. 실험동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 물과 식이는 제한 없이 공급하였다.

#### 2) IGF-I의 투여

장관궤양이 유발된 마우스에 IGF-I의 함량이 10, 20 ng/kgB.W.이 되도록 생리식염수에 녹여 하루 2회(오전 9시와 오후 5시) 5일 동안 복강투여와 근육주사 방법으로 투여하였다.

#### 3) 체중변화 및 식이효율 (FER)

매일 같은 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하고 식이 효율 (Food Efficiency Ratio: FER)은 실험식이 공급 일로부터 희생 일까지를 총 실험기간으로 하여 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

#### 4) 채혈 및 조직의 채취

희생 전날 밤 실험동물을 16시간 절식시킨 후 심장채혈을 통해 채혈한 혈액은 30분간 방치한 후 5000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 이들 시료는 분석 시까지 -70℃에서 보관하였다. 마우스의 척추분리법으로 희생시킨 후 간장, 심장, 및 신장을 적출하여 무게를 측정하였다. 이들 시료는 분석 시까지 -70℃에서 냉동 보관하였다.

5) 혈청내 IGF-I 농도측정

혈청내의 IGF-I 농도는  $^{125}\text{I}$ -IGF-I과 polyclonal anti-IGF-I 항체를 이용한 방사면역 측정법(radioimmuno assay, RIA)을 이용하여 측정하였다.

6) 공장의 dry mass 및 조직학적 관찰

5일째 되는 날 실험동물을 희생시켜 공장을 적출하고 생리식염수로 씻은 후 샘플로 사용하였다. 공장의 dry mass를 측정하고 10%중성 포르말린용액에 고정시킨다. 고정된 조직을 H&E staining하여 villus 높이 및 crypt 깊이 변화, Apoptotic cell과 mitotic cell 변화 등을 관찰하였다.

7) Determination of mucosal DNA and protein

공장(jejunal intestine)을 적출하여 cold saline에 washing후 조심스럽게 스펀지로 용액을 제거한 후 mucosa를 긁어내고 mucosal weight를 측정하였다. 긁어낸 mucosal을 ice-cold phosphate buffer saline solution(100mg per ml)를 넣고 균질화를 시켰다. 균질된 시료를  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

장점막 시료를 0.5N  $\text{HClO}_4$  8ml를 넣고 균질화 시킨 후에  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 2,000rpm으로 원심분리를 하였다. 얻어진 침전물을 3.5ml ethanol과 ethyl ether혼합물(3:1/ethanol :ether)로 지질을 추출한 다음  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 2,000rpm으로 원심분리를 하여 상등액은 버리고 침전물에 잔존하는 ether는 vacuum desicator를 이용하여 제거하였다.

0.1N KOH 3.5ml로 침전물을 분산시킨 후 뚜껑을 닫고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 16-18시간 동안 반응시킨 후 실온에서 15분 동안 2,000rpm으로 원심분리를 하여 상등액을 취한 후 0.15ml 0.6N HCl과 3.75ml 0.5N  $\text{HClO}_4$ 를 첨가하여 혼합한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 이상 방치하여 침전물을 형성한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 2,000rpm으로 원심분리를 하였다. 상등액은 버리고 침전물을 단백질과 DNA를 정량하는데 사용하기 위하여 3.5ml의 0.5N perchloric acid를 넣어 분산시킨 다음 DNA를 용해하기위하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 25분 동안 열처리하고 실온에서 냉각한 후  $90^{\circ}\text{C}$ 에서 20분동안 4,000rpm으로 원심분리하였다.

상등액은 DNA분석을 하였고 침전물은 3.5ml의 0.1N NaOH를 넣고 하룻밤동안 반응시킨 단백질을 용해시켜서 단백질 분석을 하였다. DNA는 Burton의 방법에 따라 분석하였고 단백질은 Lowry 등의 방법에 의하여 분석하였다. DNA와 protein의 함량은 mg/g jejunal mucosal weight로 표현하였다.

#### 8) 최적 투여 방법 설정

위의 복강투여와 근육주사방법으로 IGF-I enriched whey fraction 투여 후 장관 내 국소적 활성 변화 차이를 관찰하여 IGF-I의 생리활성을 검증하고, 투여량에 따른 변화 정도를 관찰한 후 최적의 투여방법과 투여량을 설정하여 손상된 장관기능을 증진 빠르게 재생할 수 있는 방법을 제시하도록 하였다.

라. 인슐린 의존성 당뇨병에 미치는 효과 검증

#### 1) 당뇨병 유발 mice의 생산

3주령의 ICR mice(25-40g)를 중앙실험 동물사에서 구입하여 1주일간 적응시킨 후 streptozotocin (STZ, Sigma Chemical Co.)을 1회 복강투여하여 당뇨병을 유발하였다. STZ주사는 실험동물을 16시간 절식한 후 75mg/kg B.W.농도로 citric acid buffer(0.1M pH4.2)에 녹여 최대 주사량이 0.4ml이내가 되도록 투여하고 일주일 후 혈당을 검사하여 공복혈당치가 200mg/dl 이상이 되는 것을 당뇨군으로 사용하였다. 각 실험군은 10마리로 하였다. 실험동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 물과 식이는 제한없이 공급하였다.

#### 2) 실험식이 및 IGF-I의 투여

IGF-I enriched fraction을 생리식염수에 녹여(20 $\mu$ g/kg BW) 14일 동안 매일 일정한 시간에 경구투여한다. 마우스식이와 물은 자유로이 섭취하도록 하였다.

#### 3) 체중변화 및 수분섭취량 측정, 식이효율 (FER)

매일 같은 시간에 체중과 식이섭취량, 수분섭취량을 측정하고 식이 효율 (Food Efficiency Ratio: FER)은 실험식이 공급 일로부터 희생 일까지를 총 실험기간으로 하여 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

#### 4) 당부하검사, 공복혈당검사

각 군의 마우스를 12시간 절식시킨 후 공복혈당을 측정하였다. 그 후에 각 군 마우스

에 먼저 시료를 경구투여한 후 sucrose(2g/kg BW)를 경구 투여하였다. 경구투여 후 30분, 90분, 120분 경과 시마다 혈당을 측정하였다. 혈액은 꼬리정맥에서 취하여 자동 혈당측정기 (GlucoDr, Korea)를 이용하여 측정하였다.

#### 5) 채혈 및 조직의 채취

희생 전날 밤 실험동물을 16시간 절식시킨 후 심장채혈을 통해 혈액중 포도당 (blood glucose)농도와 지질조성을 측정하고 마우스의 척추분리법으로 희생시킨 후 간장, 심장, 비장 및 신장을 적출하여 무게를 측정하였다. 지질성분분석을 위해 채혈한 혈액은 30분간 방치한 후 5000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 이들 시료는 분석 시까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

#### 6) 혈중 Total cholesterol, Triglyceride함량 측정

혈청의 콜레스테롤과 중성지방의 함량은 Sigma Chemical Co.(St.Louis, MO)에서 나온 kit를 이용하여 효소비색법으로 측정하였고, 혈액의 중성지방농도는 triglyceride kit(Sigma Chemical Co.)을 사용하여 측정하였다. HDL-cholesterol은 침전시약인 dextran sulfate  $\text{MgCl}_2$ 을 이용하여 LDL과 VLDL을 침전시킨 후, 상등액의 콜레스테롤 함량을 Kits (Sigma, USA)를 이용하여 비색 정량하였다.

### 마. 형질전환 IGF-I의 실용화 기술 개발

#### 1) 식이

본 실험에 사용된 기본식은 삼양사료에서 공급되는 고품사료를 사용하였으며, 실험식은 기본식에 누에가루와 IGF 함유 누에가루를 각기 4%씩 혼합하여 만든 pellet형의 식이를 사용하였다.

#### 2) 실험동물

평균체중 30g의 웅성 ICR mice 70마리를 중앙실험동물에서 구입하여 일주일간 고품사료로 적응시킨 후, 정상군 (CON)과 당뇨군 (STZ)으로 나누고, 각군은 다시 대조군 (CON, STZ), 4% 누에가루군 (CON+silverworm, STZ+silverworm+), 4% IGF 함유 누에가루군 (CON+IGF, STZ+IGF)군으로 나누어 3주간 사육하였다. 실험동물은 한

cage에 5 마리씩 사육하였으며 물과 식이는 자유로이 섭취시켰다. 실험환경은 항온, 항습조건 (온도  $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 5\%$ )을 유지하고 명암은 1일 12시간씩 교대하였다. 모든 실험군은 glucose strip을 이용하여 매주 꼬리에서 혈당을 측정하였으며, 3주후 intraperitoneal glucose tolerance test (IPTG) 실험을 위하여 공복시 혈당을 쟈측시 glucose ( $25\text{mg/kg BW}$ )를 복강주사하여 15, 30, 60, 90분 간격으로 혈당을 측정하였다. 식이섭취량은 매주 2번씩 측정하였다.

### 3) 당뇨병유발

실험식이에 들어가기 전, 당뇨병유발은 streptozotocin ( $80\text{mg/kg BW}$ )을 0.1M citrate buffer (pH 4.5)에 용해시켜 2일 간격으로 3번 주사하였다. 마지막 주사 후 24시간 후에 공복시 혈당을 측정하여  $250\text{mg/dl}$  이상을 확인하였다.

### 4) 혈청 분리 및 insulin 측정

채혈 후 혈액은 얼음에 30분간 방치한 뒤  $3,000\text{ rpm}$ 에서 20분간 원심분리하여 얻었으며,  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 혈청 인슐린 농도는 Shibaygi. Co.(Japan)의 kit를 사용하였다.

### 5) 형질전환 IGF-I 함유 누에 분말을 이용한 제품 개발

당분해효소 억제에 기인하는 약리학적 메커니즘이 확인된 누에분말은 가급적 음식물과 함께 섭취하는 것이 좋기에 누에분말을 함유한 분말 식품을 제조하였다. 우리나라의 식이특성에 의하면 탄수화물의 섭취가 비교적 많기에 누에분말 또는 IGF-I 함유 누에분말은 식후의 급격한 혈당 상승을 막아주고 공복 시의 허기짐과 저혈당을 방지해주는 기능을 기대할 수 있다. 누에분말은 약 60%의 조단백질을 함유하고 있기에 기본 배합비 설정에 있어서 단백질의 함량 조절에 주안점을 두고 식품 배합비를 결정하였다. 기존의 연구결과에 의하면 누에분말은 간 독성 회복효과 시험에서도 간 기능을 30~40%의 개선 효과가 있다고 하였으며 장관운동에도 이와 유사한 이로운 효과가 있다고 보고되어 있다(지와 정, 2000).

## 2. 연구개발 수행 결과

### 가. IGF-I enriched whey fraction의 primary cell 증식효과 검증

20ng/ml 상단에 상당하는 IGF-I enriched whey fraction의 5주령의 female Balb/c splenocyte의 증식효과는 Fig. 1과 같다. IGF-I enriched whey fraction의 mouse splenocytes의 증식효과는 whole whey에 비해서 2배 이상의 세포증식효과를 나타내었다( $p < 0.01$ ). 그리고 IGF-I의 함량에 따른 mouse splenocytes의 증식효과는 Fig. 2과 같이 5ng/ml IGF-I에 상당하는 IGF-I enriched whey fraction은 대조군과 거의 비슷한 증식효과를 나타냈지만 20ng/ml의 IGF-I에 상당하는 IGF-I enriched whey fraction은 약 250%의 증식효과 보였다. 따라서 본 연구에서 실시한 *in vitro* immune enhancing 효과에서는 IGF-I은 투여량에 따라서 면역증진효과가 다르며 투여량이 높을수록 면역증강효과가 높은 것으로 나타났다.

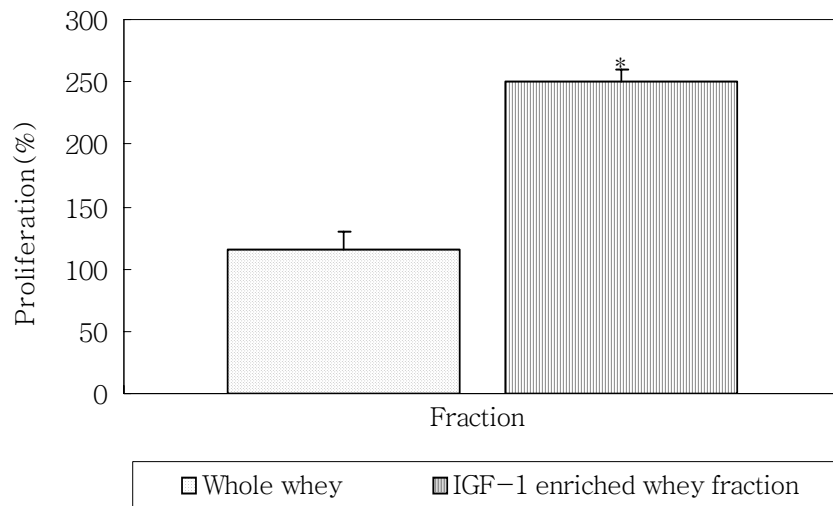


Fig. 1. Effect of IGF-I enriched whey fraction on proliferation of mouse splenocytes. Cell proliferation was expressed as the percentage of growth of cells in the presence of IGF-I enriched whey fraction compared with proliferation of cell grown in the medium without IGF-I enriched whey fraction or whole whey. \* Significant difference between whey and IGF-I enriched whey fraction at  $p < 0.01$ .

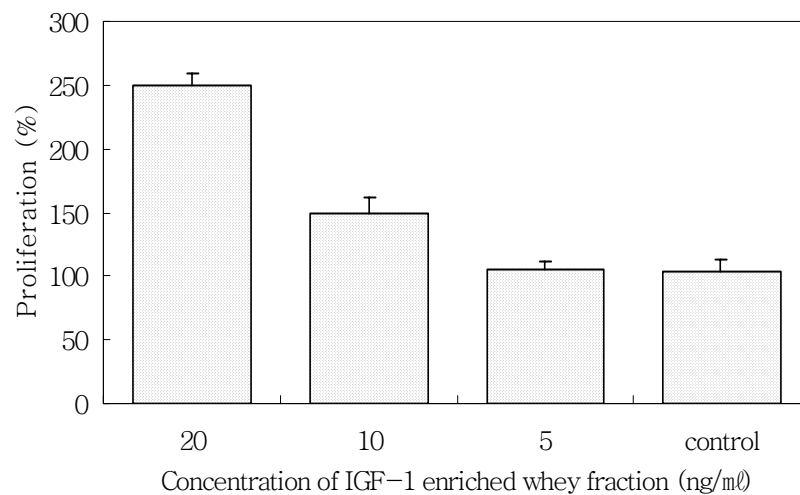


Fig. 2. Effect of IGF-I enriched whey fraction on the proliferation of mouse splenocytes depending on dosage. Cell proliferation was expressed as the percentage of growth of cells in the presence of IGF-I enriched whey fraction compared with proliferation of cell grown in the medium without IGF-I enriched whey fraction.



나. IGF-I enriched whey fraction의 장관기능 증진에 미치는 효과 검증

1) Mucosal weight에 대한 영향

Table 2에서와 같이 IGF-I enriched whey fraction은 공장과 회장의 점막의 중량에는 영향을 주지 않았다.

Table 2. Comparison of mucosal weight in jejunum and ileum of rats during the experimental period

Group	Mucosal weight(mg/cm)	
	Jejunum	Ileum
A	45.03 ± 7.74	45.60 ± 10.54
B	43.11 ± 8.26	35.99 ± 7.95
C	47.34 ± 16.55	45.60 ± 7.18
D	46.81 ± 6.81	51.42 ± 10.34
E	53.84 ± 10.35	48.63 ± 14.50
Differences	NS*	NS

Values were expressed as means ±SD. \* NS means statistical non-significance.

2) Mucosal Protein의 함량에 대한 영향

Table 3에서와 같이 IGF-I enriched whey fraction은 공장의 점막단백질 함량에는 거의 영향을 주지 않았으나 회장의 mucosal protein 함량을 증가시키는 효과가 있었으며 50ng의 IGF-I에 상당하는 IGF-I enriched whey fraction을 투여한 group에서 가장 높게 나타났다(p<0.05).

3) Mucosal DNA 함량에 대한 영향

IGF-I enriched whey fraction은 공장과 회장의 mucosal DNA 함량에는 영향을 주지 않았다(Table 4).

4) Mucosal/DNA ratio

Mucosal protein/DNA 비율은 control group 중에서 MTX를 투여한 group에서 가장 낮게 나타났고 IGF-I enriched whey fraction을 투여한 group이 가장 높게 나타났

다.

그러나 공장에서는 실험식이간에 통계적인 유의차가 없었다. 회장에서는 IGF-I의 함량이 증가할수록 mucosal protein/DNA 비율은 증가하는 경향을 보였으며 20ng/ml 과 50ng/ml 투여군이 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05)

Table 3. Changes of mucosal protein content in jejunum and ileum of rats during the experimental period

Group	Mucosal protein(mg/cm)	
	Jejunum	Ileum
A	56.46 ± 2.60	50.02 <sup>b</sup> ± 9.45
B	42.50 ± 7.36	47.72 <sup>b</sup> ± 3.28
C	48.94 ± 4.51	51.94 <sup>ab</sup> ± 9.15
D	56.29 ± 6.88	51.25 <sup>ab</sup> ± 7.15
E	50.24 ± 5.32	70.04 <sup>a</sup> ± 20.12
Differences	NS*	P<0.05

Values were expressed as means SD. \* NS means statistical non-significance. Letters with different superscript in each column are significantly different at p<0.05.

Table 4. Changes of mucosal DNA content in jejunum and ileum of rats during the experimental period

Group	Mucosal DNA(mg/g)	
	Jejunum	Ileum
A	1.967 ± 0.574	2.424 ± 0.416
B	1.388 ± 0.466	1.767 ± 0.293
C	1.583 ± 0.336	2.298 ± 0.497
D	1.866 ± 0.189	2.174 ± 0.189
E	1.622 ± 0.331	2.135 ± 0.409
Differences	NS*	NS

Values were expressed as means SD. \* NS means statistical non-significance.

Table 5. Changes of mucosal protein/DNA ratio in jejunum and ileum of rats during the experimental period

Group	Mucosal Protein/DNA ratio	
	Jejunum	Ileum
A	30.620 ± 0.762	26.678bc ± 5.514
B	28.704 ± 11.760	20.624c ± 1.334
C	30.916 ± 5.579	21.209c ± 2.120
D	30.166 ± 5.415	23.704bc ± 3.829
E	30.974 ± 6.593	30.935ab ± 6.187
Differences	NS*	P<0.05

Values were expressed as means ± SD. \* NS means statistical non-significance. Letters with different superscript in each column are significantly different at p<0.05.

다. 투여방법에 따른 IGF-I의 활성변화

1) 초유 유청 분획으로부터 IGF-I enriched whey fraction (1-30kDa)의 농축

Cream 및 acid casein을 제거한 초유의 whey를 1세부과제로부터 공급받아 30kDa cut-off membrane으로 ultrafiltration하여 30kDa이하의 분획을 수집하였다. 그후 1kDa cut-off membrane을 사용하여 1kDa이하의 분획을 제거하여 1-30kDa의 분획하여 동결건조하였다. 동결건조 시료를 증류수에 일정농도로 희석하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)방법을 이용하여 분획 내에 존재하는 IGF-I의 함량을 정량하였다.

2) 장관궤양의 유발

5 주령의 ICR계 mice를 3일동안 1일 1회 methotrexate(Sigma, USA) 2.5mg/kg을 견갑골 부위에 피하주사하여 장관궤양을 유발한 결과 jejunum mucosal의 DNA와 protein의 함량이 낮았다. 이를 토대로 장관궤양의 유발을 확인 후 실험 식이를 투여하였다.

### 3) 체중변화량

Methotrexate(MTX)를 투여 한 군에서는 체중 증가율이  $0.11 \pm 0.02$  g/day였으나 IECWF를 투여한 군에서는 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 근육주사 (intramuscular)를 한 경우 10ng/kg의 농도에서는  $0.11 \pm 0.02$  g/day 였으나 20ng/kg의 농도에서는  $0.15 \pm 0.02$  g/day로 유의하게 증가 하였다. 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우에서도 10ng/kg의 농도에서는  $0.09 \pm 0.01$  g/day 였으나 20ng/kg의 농도에서는  $0.12 \pm 0.02$  g/day로 유의하게( $p<0.05$ ) 증가 하였다(Table 6).

### 4) 식이섭취량과 식이효율(FER)

근육주사(intramuscular)를 한 경우 IECWF를 투여하지 않은 군은  $0.69 \pm 0.23$ 이며, 10ng/kg의 농도로 IECWF를 투여한 군은  $0.62 \pm 0.15$  였으나 20ng/kg의 농도에서는  $0.86 \pm 0.11$  으로 유의하게 증가하였다. 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우에서도 10ng/kg의 농도에서는  $0.52 \pm 0.13$  였으나 20ng/kg의 농도에서는  $0.72 \pm 0.22$ 로 유의하게( $p<0.05$ ) 증가 하였다(Table 7).

Table 6. Initial weight, final weight and weight gain

Injection Route	IECWF dose (ng/kg)	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g/day)
Intramuscular	0	30.20±0.92	31.12±0.82	0.13±0.01 <sup>ab</sup>
	10	29.23±0.77	30.01±0.34	0.11±0.02 <sup>b</sup>
	20	29.75±1.56	30.79±1.69	0.15±0.02 <sup>a</sup>
Intraperitoneal	0	30.09±0.87	30.78±0.79	0.09±0.02 <sup>b</sup>
	10	29.63±0.92	30.24±0.78	0.09±0.01 <sup>b</sup>
	20	30.05±0.81	30.99±0.92	0.12±0.02 <sup>a</sup>

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p<0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

Table 7. Food intake and Food efficiency ratio

Injection Route	IECWF dose (ng/kg)	Food intake (g/day)	Weight gain (g/day)	FER
Intramuscular	0	18.52±2.25	0.13±0.01	0.69±0.23 <sup>b</sup>
	10	18.03±3.31	0.11±0.02	0.62±0.15 <sup>b</sup>
	20	17.22±1.86	0.15±0.01	0.86±0.11 <sup>a</sup>
Intraperitoneal	0	18.06±1.34	0.09±0.02	0.48±0.18 <sup>b</sup>
	10	17.44±2.67	0.09±0.01	0.52±0.13 <sup>ab</sup>
	20	17.27±3.01	0.12±0.02	0.72±0.22 <sup>a</sup>

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

5) 조직(간, 신장, 이자, 공장)의 무게

조직의 무게는 군간에 유의적인 차이는 없었으나 spleen의 무게에서 복강주사 (intraperitoneal)를 한 경우 10ng/kg의 농도에서는  $0.124 \pm 0.046$ 으로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가 하였다. Jejum 무게는 근육주사(intramuscular)를 한 경우 IECWF를 투여한 것의 영향이 없었으나 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우에서도 10ng/kg의 농도에서는  $0.122 \pm 0.045$  였으나 20ng/kg의 농도에서는  $0.166 \pm 0.026$ 으로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가 하였다(Table 8).

Table 8. Liver, kidney, spleen and jejunum weight

Injection Route	IECWF dose(ng/kg)	Liver weight(g)	Kidney weight(g)	Spleen weight(g)	Jejunum weight(g)
Intramuscular	0	1.91±0.11	0.47±0.05	0.098±0.014	0.130±0.044
	10	1.73±0.12	0.43±0.02	0.103±0.024	0.130±0.045
	20	1.75±0.15	0.45±0.05	0.103±0.030	0.137±0.045
Intraperitoneal	0	1.96±1.34	0.48±0.02	0.088±0.018	0.121±0.031
	10	1.68±0.11	0.43±0.02	0.124±0.046	0.122±0.045
	20	1.69±0.15	0.42±0.01	0.110±0.033	0.166±0.026

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

6) Mucosal weight 무게

장점막의 무게는 IECWF를 20ng/kg의 농도로 투여 한 군에서 유의적인 차이 ( $p < 0.05$ )를 보였다. 특히 IECWF의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 근육주사(intramuscular)를 한 경우 10ng/kg의 농도에서는  $27.7 \pm 6.2\text{mg}$ 으로 대조군에 비하여 유의하지는 않았고 20ng/kg의 농도에서는  $29.4 \pm 5.3\text{mg}$ 으로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가 하였다. 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우에서도 10ng/kg의 농도에서는  $28.1 \pm 4.2$  이었으나 20ng/kg의 농도에서는  $30.2 \pm 6.3$ 으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가 하였다(Table 9).

Table 9. Mucosal weight in jejunum

Injection Route	IECWF dose (ng/kg)	Jejunum mucosal weight (mg/cm)
Intramuscular	0	23.1 ± 4.5 <sup>b</sup>
	10	27.7 ± 6.2 <sup>ab</sup>
	20	29.4 ± 5.3 <sup>a</sup>
Intraperitoneal	0	24.3 ± 2.7 <sup>b</sup>
	10	28.1 ± 4.2 <sup>ab</sup>
	20	30.2 ± 6.3 <sup>a</sup>

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

#### 7) Mucosal DNA와 protein 농도

근육주사(intramuscular)를 한 경우 Mucosal DNA 함량과 protein 함량은 군간에 유의적인 차이는 없었으나, 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우 protien 함량은 10ng/kg의 농도에서는  $3.0 \pm 0.3$  mg/g tissue로 유의하지 않았으나, 20ng/kg의 농도에서는  $3.9 \pm 0.6$  mg/g tissue로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가 하였다. Mucosal DNA 함량도 protein 함량과 비슷한 경향을 보였다. IECWF의 10ng/kg 농도에서는  $30.2 \pm 4.5$  mg/g tissue로 유의하지 않았으나, 20ng/kg의 농도에서는  $36.7 \pm 4.7$  mg/g tissue로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가 하였다(Table 10).

#### 8) 혈청내 IGF-I 농도 측정

혈청내의 IGF-I 농도는 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우 군간에 차이는 유의하지는 않았으나 IECWF 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였고, 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우에서도 10ng/kg의 농도에서는  $1060.3 \pm 190.8$   $\mu$ g/L 였으나 20ng/kg의 농도에서는  $1210.6 \pm 209.4$   $\mu$ g/L로 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가 하였다(Table 11).

Table 10. Mucosal protein and DNA content in jejunum

Injection Route	IECWF dose (ng/kg)	Mucosal protein (mg/g tissue)	Mucosal DNA (mg/g tissue)
Intramuscular	0	31.2 ± 2.3	2.6 ± 0.4
	10	33.8 ± 6.1	2.5 ± 0.2
	20	34.2 ± 4.0	2.8 ± 0.9
Intraperitoneal	0	29.3 ± 5.2 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>b</sup>
	10	30.2 ± 4.5 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.3 <sup>b</sup>
	20	36.7 ± 4.7 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.6 <sup>a</sup>

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05 by Duncan's Multiple Range Test.

Table 11. Serum IGF-I concentration

Injection Route	IECWF dose (ng/kg)	IGF-I (µg/L)
Intramuscular	0	909.7 ± 199.6
	10	950.3 ± 198.5
	20	1121.3 ± 237.8
Intraperitoneal	0	937.3 ± 227.9 <sup>b</sup>
	10	1060.3 ± 190.8 <sup>ab</sup>
	20	1210.6 ± 209.4 <sup>a</sup>

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05 by Duncan's Multiple Range Test.



### 9) 공장 조직학적 관찰

공장의 dry mass를 측정하고 10%중성 포르말린용액에 고정시킨 후 고정된 조직을 H&E staining하여 조직학적 관찰을 한 결과 Methotrexate(MTX)를 투여 한 군에서는 villus의 높이가 낮았다가 IECWF를 복강주사(intraperitoneal) 한 경우 villus 높이의 증가를 볼 수 있었으며 mucosal의 발달이 왕성하여 두터운 층을 이루었으며, crypt의 깊이도 깊게 발달되어 영양소 흡수의 면적을 넓혀주는 역할을 할 수 있으리라 여겨진다(Fig. 3).

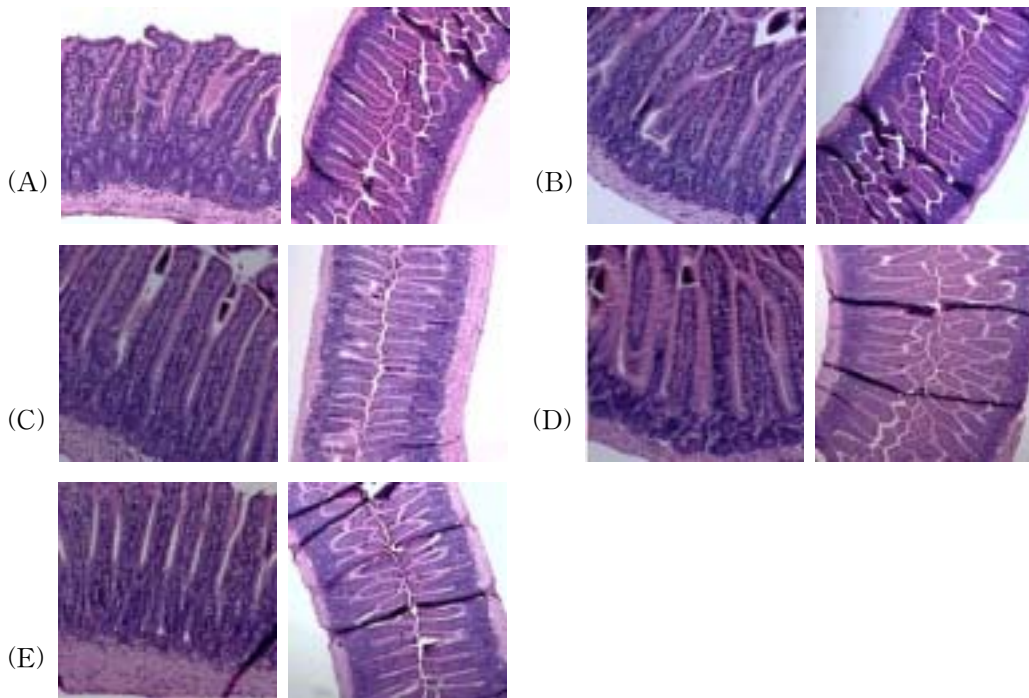


Fig. 3. Histology of the Jejunum.

(A) Control, (B) Intramuscular injection group(10ng/kg), (C) Intramuscular injected group(20ng/kg) (D) Intraperitoneal injection group(10ng/kg), (E) Intraperitoneal injection group(20ng/kg)

### 10) 공장의 Villus height

IECWF 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였고, 복강주사(intraperitoneal)를 한 경우에서도 10ng/kg의 농도에서는  $850.2 \pm 112.1 \mu\text{g/L}$  였으나 20ng/kg의 농도에서는  $890.5 \pm 99.5 \mu\text{g/L}$ 로 증가하는 경향은 보였으나 유의한 차이는 없었다(Table 12).

Table 12. Villus height in jejunum

Injection Route	IECWF dose (ng/kg)	Villus height/crypt depth (uM)
Intramuscular	0	803.2 ± 78.5
	10	830.1 ± 90.3
	20	853.6 ± 69.9
Intraperitoneal	0	799.6 ± 88.2
	10	850.2 ± 112.1
	20	890.5 ± 99.5

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

라. 인슐린 의존성 당뇨병에 미치는 효과 검증

1) 당뇨병 유발 mice의 생산

3주령의 ICR mice(25-40g)를 중앙실험 동물사에서 구입하여 1주일간 적응시킨 후 streptozotocin (STZ, Sigma Chemical Co.)을 1회 복강투여하여 당뇨를 유발하였다. STZ주사는 실험동물을 16시간 절식한 후 75mg/kg B.W.농도로 citric acid buffer(0.1M pH4.2)에 녹여 최대 주사량이 0.4ml이내가 되도록 투여하고 일주일 후 혈당을 검사하여 공복혈당치가 200mg/dl이상이 되는 것을 당뇨군으로 사용하였다. 각 실험군은 10마리로 하였다. 실험동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 물과 식이는 제한없이 공급하였다.

IGF-I enriched fraction을 생리식염수에 녹여(20 $\mu$ g/kg BW) 14일 동안 매일 일정한 시간에 경구투여하였다. 마우스식이와 물은 자유로이 섭취하도록 하였다.

2) 체중변화량

실험기간동안의 최종 체중은 DM군보다 IECWF를 투여한 군에서 약간의 증가를 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았고, 당뇨군에서는 체중 증가량이  $0.04 \pm 0.01$  g/day였으나 IECWF를 투여한 군에서는 농도  $0.06 \pm 0.02$  g/day로 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가 하였다.(Table 13)

Table 13. Initial weight, final weight and weight gain

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g/day)
DM	23.11±0.53	25.36±0.46	0.04±0.01
DM+IECWF	22.47±0.58	27.33±0.74	0.06±0.02*

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) \* P<0.05 Significantly different from DM group

3) 수분섭취량, 식이섭취량 및 식이효율 (FER)

실험기간동안의 수분 섭취량과 식이 섭취량은 DM군보다 IECWF를 투여한 군에서 약간의 증가를 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 식이 효율 역시 당뇨군에서는  $0.51 \pm 0.22$ 였으나 IECWF를 투여한군에서는 농도  $0.48 \pm 0.09$ 로 유의한차이가 없었다.(Table 14)

Table 14. Water and food intake and Food Efficiency Ratio

Group	Water intake (ml/day)	Food intake (g/day)	FER
DM	23.4±0.8	13.64±2.67	0.51±0.22
DM+IECWF	18.7±0.9	16.36±2.77	0.48±0.09

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

3) \* P<0.05 Significantly different from DM group

4) 당부하검사

각 군의 마우스를 12시간 절식시킨 후 공복혈당을 측정하고 각 군 마우스에 먼저 시료를 경구투여한 후 sucrose(2g/kg BW)를 경구 투여 후 30분, 90분, 120분 경과시

마다 혈당을 측정하였다. 혈당의 변화는 DM군에서 189.5±21.1 mg/dL에서 30, 60, 90 분 동안의 변화는 297.4±19.7, 223.7±42.9, 163.4±35.9로 나타났으며, IECWF 투여군은 191.3±23.0 mg/dL에서 30, 60, 90분 동안의 변화는 270.2±30.2, 241.6±30.6, 216.7±20.5로 혈당의 변화가 완만한 변화를 가져오면서 생체 내당능을 개선할 수 있는 가능성있는 물질로 여겨지지만 효능 실험에 있어서 좀더 다양한 농도의 투여에 의한 실험이 진행되어야 할 것이다. (Table 15, Fig. 4)

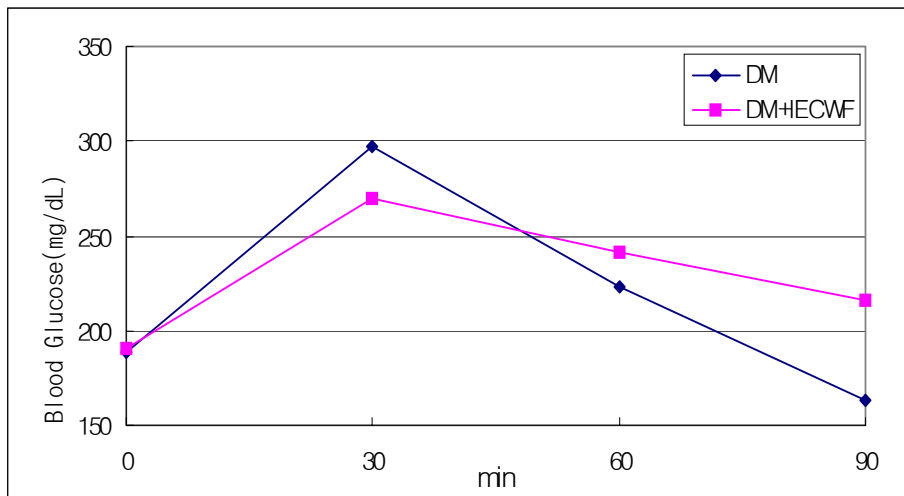


Fig. 4. Changes of blood glucose concentration

Table 15. Changes of blood glucose concentration(mg/dL)

Group	0 min	30 min	60 min	90 min
DM	189.5±21.1	297.4±19.7	223.7±42.9	163.4±35.9
DM+IECWF	191.3±23.0	270.2±30.2	241.6±30.6	216.7±20.5

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group

5) 혈중 Total cholesterol, Triglyceride 함량 측정

혈청 중성지방의 함량은 DM군에서 117.26±41.09 mg/dl, IECWF를 투여한 군에서 89.28±30.14 mg/dl로 감소를 하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았고, Total cholesterol 함량은 군간에 차이가 없었다. HDL-cholesterol 함량은 DM군에서

33.87±9.56 mg/dl, IECWF를 투여한 군에서 39.25±3.55 mg/dl로 증가를 하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. (Table 16)

Table 16. Effect of IECWF feeding on serum lipids levels. (mg/dl)

Group	Triglyceride	Total cholesterol	HDL cholesterol
DM	117.26±41.09	70.47±19.56	33.87±9.56
DM+IECWF	89.28±30.14	68.53±16.71	39.25±3.55

1) Values are Mean±SD 2) n=10/group 3) \* P<0.05 Significantly different from DM group

마. 형질전환 IGF-I의 실용화 기술 개발

1) 식이섭취량 변화

IGF-I을 함유한 누에 가루와 대조군을 15일간 식이 섭취한 결과는 Fig. 5와 같다. 당뇨 대조군의 평균 식이섭취량은 16±5g이었으며, 정상군은 10±4g으로 유의적으로 크게 차이는 없었으나 당뇨대조군의 섭취량이 많은 것으로 나타났다. 이것은 당뇨 증상인 다식의 결과임을 알 수 있다.

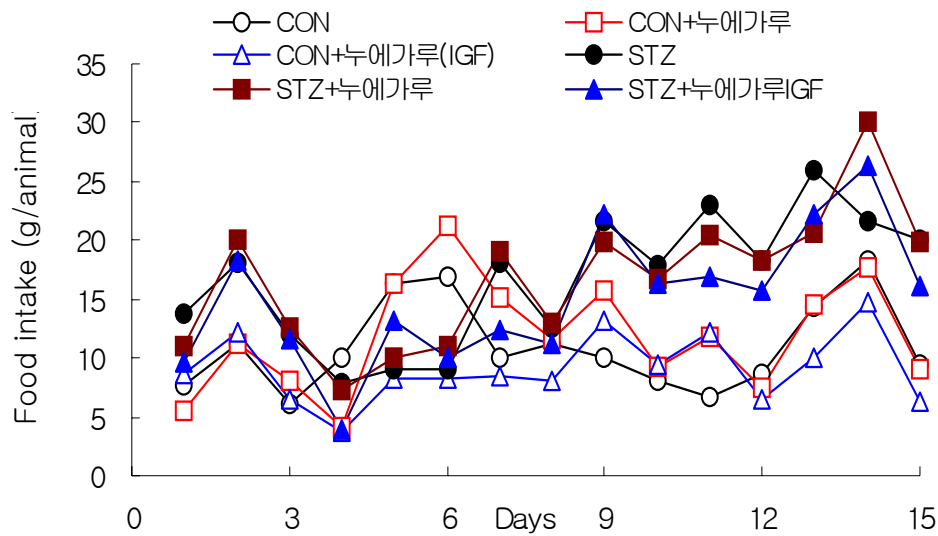


Fig. 5. Food intake in control and streptozotocin-induced diabetic mice. CON: control mice, CON+Silverworm: silverworm fed control mice, CON+IGF: IGF containing silverworm fed control mice, STZ: streptozotocin induced diabetic mice, STZ+Silverworm: silverworm fed STZ-induced diabetic mice, STZ+IGF: IGF containing silverworm fed STZ-induced diabetic mice

## 2) 체중량 변화

IGF-I이 함유된 사료를 대조군과 당뇨대조군에 식이 섭취한 실험에서의 동물의 체중 변화는 Fig. 6 와 같다. 당뇨가 유발되지 않은 정상군의 체중 증가에 비해 당뇨 실험군의 체중은 변화가 거의 발생하지 않은 것으로 나타났다. 이처럼 당뇨 발병 시 체중의 감소 또는 증가 속도의 저하가 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

인슐린은 단백질 대사에 관여하여 골격근으로의 아미노산 유입을 촉진시켜 단백질 합성을 증가시키도록 하는데, 당뇨가 유발된 동물에서는 췌장 세포의 파괴로 인한 인슐린 생성의 부족과 작용의 저하로 인해 당대사에 의한 에너지 생산 부족을 초래하고 이로 인해 체중이 감소하게 된다고 한다. 본 실험의 결과에서도 당뇨 유발 군이 정상군에 비해 체중감소를 보였다.

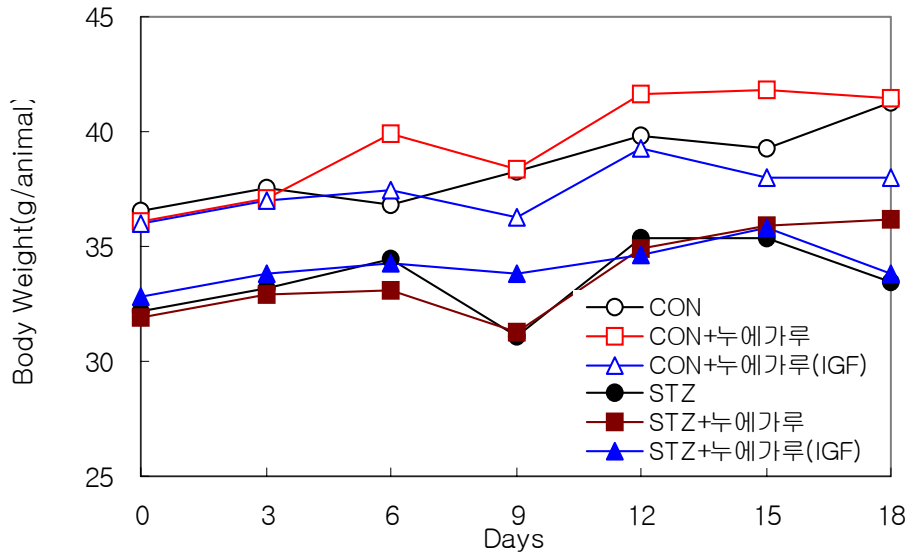


Fig. 6. Changes of body weight in control and streptozotocin-induced diabetic mice. CON: control mice, CON+Silverworm: silverworm fed control mice, CON+IGF: IGF containing silverworm fed control mice STZ: streptozotocin induced diabetic mice, STZ+Silverworm: silverworm fed STZ-induced diabetic mice, STZ+IGF: IGF containing silverworm fed STZ-induced diabetic mice

### 3) 공복시 혈당 변화

실험 시작시의 당뇨유발 실험군의 혈당 농도는 약 370 mg/dl이었으며, 정상군은 약 125mg/dl이었다. 누에가루와 IGF-I이 발현된 누에가루는 정상군의 혈당 농도에는 거의 영향을 미치지 못하는 못했으나 당뇨유발 실험 군에는 혈당 농도를 다소 낮추어 주는 효과가 있는 것으로 나타났다. 인슐린 비의존형 당뇨병환자에게 누에 분말을 4주간 섭취시킨 결과에서 변화수준은 유의적 차이가 없다고 했으나 정상 군과 당뇨군 에서 6~10%의 감소 효과는 나타났다고 하는 것과 유사한 결과가 나타났다(조미란 외 3인, 1998)(Fig. 7).

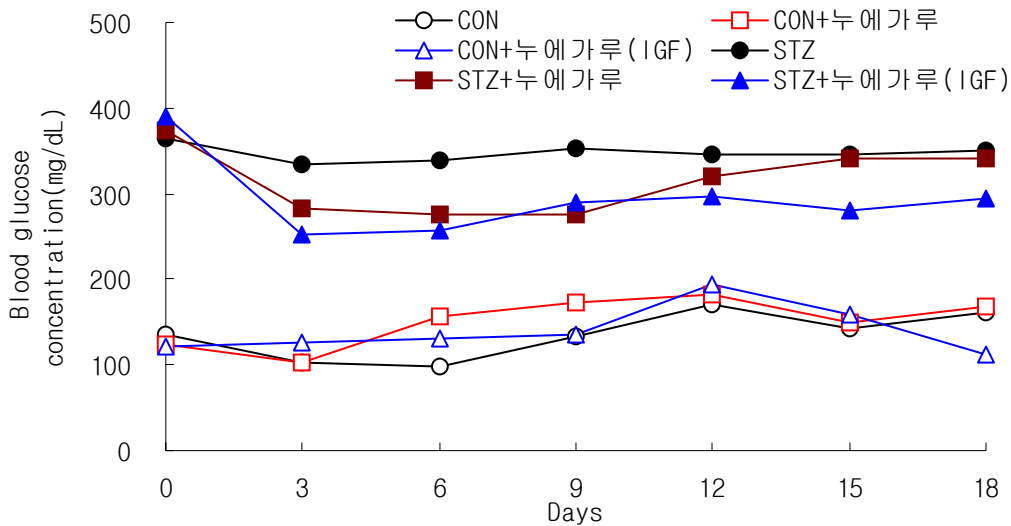


Fig.7. Fasting blood glucose concentrations in control and streptozotocin-induced diabetic mice. CON: control mice, CON+Silverworm: silverworm fed control mice, CON+IGF: IGF containing silverworm fed control mice, STZ: streptozotocin induced diabetic mice, STZ+Silverworm: silverworm fed STZ-induced diabetic mice, STZ+IGF: IGF containing silverworm fed STZ-induced diabetic mice

#### 4) 혈청내의 인슐린 농도 변화

누에분말과 IGF-I을 발현시킨 누에분말을 정상군과 당뇨군에게 18일 동안 식이한 결과는 Fig. 8과 같다.

정상군의 정상식이인 경우에는 인슐린 농도가  $0.57 \pm 0.08 \text{ ng/ml}$ , 누에가루 함유 식이를 한 정상군은  $1.14 \pm 0.29 \text{ ng/ml}$ , IGF함유 식이를 한 정상군은  $1.10 \pm 0.18 \text{ ng/ml}$ 이었다. 일반식이 정상군보다 누에나 IGF함유 누에 식이한 경우에 혈중 인슐린의 농도가 유의적 차이를 가지고 증가하는 것으로 나타났으나 당뇨군의 경우, 일반 식이한 당뇨군은  $0.43 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ , 누에식이 당뇨군은  $0.48 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$ , IGF 함유 누에 식이 당뇨군은  $0.48 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ 으로 나타났다.



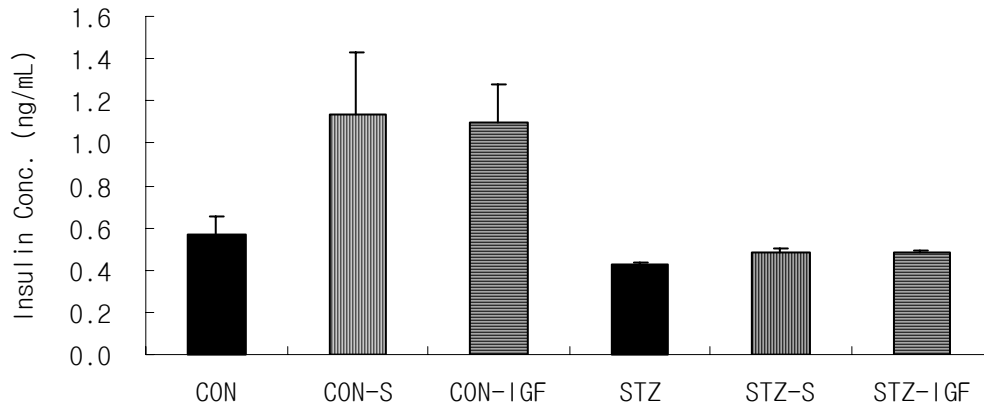


Fig. 8. Serum insulin concentrations in control and streptozotocin-induced diabetic mice. CON: control mice, CON+Silverworm: silverworm fed control mice, CON+IGF: IGF containing silverworm fed control mice, STZ: streptozotocin induced diabetic mice, STZ+Silverworm: silverworm fed STZ-induced diabetic mice, STZ+IGF: IGF containing silverworm fed STZ-induced diabetic mice.

이 결과는 누에 또는 IGF 함유 누에 식이는 당뇨 초기 또는 고탄수화물 식이를 하는 경우에는 혈당 농도를 낮추는 효과가 있을 수 있지만 당뇨가 진행된 상태에서는 혈당농도 또는 인슐린 농도에 영향을 끼치기 어렵다는 것을 알 수 있었다. 그러나 현재 우리나라 성인들의 열량구성비가 탄수화물 : 단백질 : 지방의 비가 남자 68:15:17 이며, 여자의 경우 69:16:15 이기 때문에 대한 당뇨병학회에서 권장하는 구성비에 비해 탄수화물 섭취가 높고 지방의 섭취비율이 낮은 것으로 알려져 있다. 이런 우리나라의 식습관에 적합한 혈당조정 보조제로서 사용이 가능하다고 볼 수 있다.

5) 형질전환 IGF-I 함유 누에 분말을 이용한 제품 개발

당분해효소 억제에 기인하는 약리학적 메커니즘이 확인된 누에분말은 가급적 음식물과 함께 섭취하는 것이 좋기에 누에분말을 함유한 분말 식품을 제조하였다. 우리나라의 식이특성에 의하면 탄수화물의 섭취가 비교적 많기에 누에분말 또는 IGF-I 함유 누에분말은 식후의 급격한 혈당 상승을 막아주고 공복 시의 허기짐과 저혈당을 방지해주는 기능을 기대할 수 있다. 누에분말은 약 60%의 조단백질을 함유하고 있기에 기본 배합비 설정에 있어서 단백질의 함량 조절에 주안점을 두고 식품 배합비를 결정하였다(Table 17, 18). 기존의 연구결과에 의하면 누에분말은 간독성 회복효과 시험에서도 간기능을 30~40%의 개선 효과가 있다고 하였으며 장관운동에도 이와 유사한 이로운 효과가 있다고 보고 되어있다(지와 정, 2000).

Table 17. Formulas of New powder product for new silkworm power contained IGF-I

Element	Unit	Content	Element	Unit	Content
Silkworm(IGF)	g	2	Niacin	mg	6.8
Casein	g	13	Folic acid	mg	0.1
Maltodextrin	g	33	Biotin	mg	0.1
Sugar	g	24	Taurine	mg	49.0
Fiber	g	5.2	Carnitine	mg	49.0
Oil	g	12	Calcium	mg	284.0
Vitamin A	mgRE	0.3	Phosphate	mg	284.0
Vitamin B1	mg	0.9	Potassium	mg	442.0
Vitamin B2	mg	1.0	Zinc	mg	4.8
Vitamin B4	mg	1.0	Copper	mg	0.4
Vitamin B12	mg	0.010	Iodine	mg	39.2
Vitamin C	mg	70.0	Iron	mg	4.9
Vitamin D	mg	0.0	Sodium	mg	314.0
Vitamin E	mg	10.0	Trace	mg	1240
Vitamin K	mg	0.1	Total	g	95

Table 18. Ratio of nutritional element and calories in New powder product for new silkworm power contained IGF-I

Element	Unit	Content	Amount of Daily Recommendation (%)	Ratio of calories (%)
Calories	kcal	400		2600 kcal
Protein	g	15	15~20	15
Lipid	g	12	15~25	27
Carbohydrate	g	63	65	58

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

구 분	연구 목표 및 달성도	
	연구목표	달성도(%)
1차년도 (2001 ~2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생리활성 인자의 분획 및 면역세포 증식효과 검증</li> <li>○ IGF-I gene screening 및 발현 벡터개발</li> <li>○ <i>in vivo</i>계에서의 IGF-I 분획의 생리활성 검증</li> </ul>	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
2차년도 (2002 ~2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ IGF-I의 항암효과 및 cytokines분비능력 검증</li> <li>○ IGF-I의 형질전환 누에 선발 및 발현분석체계의 확립</li> <li>○ 체내 IGF-I의 활성변화 및 형질전환IGF-I의 당뇨병에 대한 효과 검증</li> </ul>	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
3차년도 (2003 ~2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 초유 IGF-I과 형질전환 IGF-I의 특성 비교 분석</li> <li>○ 형질전환 IGF-I의 정제 및 형질전환 누에의 대량 생산 시스템 확립</li> <li>○ 형질전환 IGF-I의 실용화 기술개발</li> </ul>	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ IGF-I의 생리화학적 특성 검증</li> <li>○ IGF-I의 형질전환 누에의 작성</li> <li>○ <i>in vivo</i>에서의 IGF-I의 생리활성 검증 및 실용화 기술 개발</li> </ul>	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 1) 생리활성인자가 다량으로 함유되어 있는 초유의 가치를 증진시켜, 초유의 자원화를 위한 방안을 획득
- 2) *in vitro* 및 *in vivo*계에 의한 IGF-I의 세포증식효과, 장관 면역 증강 효과 등의 생리활성이 검증되어, 새로운 형태의 조제분유의 개발이 가능
- 3) 신생아용 기능성 식품으로서의 개발은 물론이고, 노화에 의해 발생하기 쉬운 골절 또는 골다공증 등의 성인병 치료용 특수 건강식품으로의 개발이 가능
- 4) 생리활성물질의 대량생산 시스템의 확립으로, 우수한 유제품 생산을 위한 양적인 문제가 해결되고, 이에 따른 국민 보건과 건강증진에 기여
- 5) 인슐린 의존성 당뇨병환자를 위한 대체 의약으로 개발하기 위한 기초적 시스템의 확립
- 6) 축산과 잠업을 연계시킨 새로운 형태의 고부가가치 산업이 확립되고, 첨단 생명공학의 기술적 우수성을 국내·외에 홍보
- 7) 초유중의 다른 유용자원에 대한 형질전환 누에 제작기법의 확립 및 실용화 모색

### 2. 경제 · 산업적 측면

- 1) 수입자유화에 따른 국내 낙농산업과 잠사산업에 새로운 가능성을 부여
- 2) 생리활성물질을 함유한 누에 분말제품의 생산 등으로 국민 건강에 크게 기여
- 3) 미량의 생리활성물질을 대량으로 생산할 수 있는 시스템을 확립함으로써 수입 의존형 형질 전환 물질을 국내에서 생산 가능
- 4) 우유의 우수성에 대한 소비자 인식 전환 및 이에 따른 우유 소비량의 증가와 안정적인 낙농산업의 전개
- 5) 새로운 생리활성물질의 대량생산 시스템으로의 전환 가능
- 6) 생리활성물질의 형질전환기술 확립에 따른 국제 경쟁력 강화 및 각종 부가산업으로의 전환으로 수익 증대

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

### 제 1 절 활용계획

1. 생리활성물질이 안정된 상태로 함유된 고품질 유제품의 생산 가능
2. 낙농가 및 잠업농가에게 새로운 부가가치 산업으로서의 가능성을 부여
3. 모유에 근접한 신생아용 고급 조제분유의 생산이 가능
4. 질병 치료, 예방용 건강식품 개발 가능, 대체의약품으로의 개발을 선도
5. 형질전환하여 대량생산할 수 있는 시스템을 확보하므로써, 새로운 의약품 및 기능성 식품의 소재화를 이룩함
6. 생리활성물질의 형질전환시스템 확보로 특허를 출원하고, 국제 경쟁력을 향상시키고, 해외 수출 모색
7. 연구 결과를 토대로 연구개발 참여기업 (주)한국메디칼푸드에서 실용화 계획을 수립하여 사업화를 계획

### 제 2 절 추가 연구의 필요성

여러 가지 유용물질의 대량생산을 위하여 그동안 대장균에서 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 대장균에서의 유용물질 생산은 고등생물에서 필요로 하는 특징을 대체하지 못하는 단점이 있는데 누에는 이런 단점을 보완할 수 있는 고등생물로서의 특징을 가지고 있어 post-translational modification을 하므로 누에에서의 유용물질을 생산하는 것은 의의가 크다. 또한 본 연구에서 사용된 형질 전환 기술은 무한한 유전 자원적 잠재력을 가진 곤충에 접목함으로써 고부가 곤충 산업 창출로 직결 될 수 있기 때문에 앞으로 이 분야는 집중적으로 투자되어야 할 것이다.

### 제 3 절 타 연구의 응용성

본 연구에서 개발된 IGF-I 형질전환 누에에서 IGF-I 을 추출하여 생리활성물질이 안정된 상태로 함유된 고품질 유제품의 생산을 가능하게 하여 낙농가 및 잠업농가에게 새로운 부가가치 산업으로서 가능하리라 생각된다.

그리고 누에 형질전환 기술을 통하여 유용물질을 대량생산하여 질병 치료, 예방용 건강식품 개발, 대체의약품으로의 개발에도 충분히 활용할 수 있으리라 생각된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

Bienvu G, Seurin D, Grellier P, Froment P, Baudrimont M, Monget P, Le Bouc Y, Babajko S. 2004. Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice: postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities. *Endocrinology*. May;145(5):2412-20. Epub 2004 Jan 28.

Froment P, Staub C, Hembert S, Pisselet C, Magistrini M, Delaleu B, Seurin D, Levine JE, Johnson L, Binoux M, Monget P. 2004. Reproductive abnormalities in human insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic male mice. *Endocrinology*. Apr;145(4):2080-91. Epub 2004 Jan 15.

Konno-Takahashi N, Takeuchi T, Shimizu T, Nishimatsu H, Fukuhara H, Kamijo T, Moriyama N, Tejima S, Kitamura T. 2003. Engineered IGF-I expression induces glandular enlargement in the murine prostate. *J Endocrinol*. Jun;177(3):389-98.

Yakar S, Wu Y, Setser J, Rosen CJ. 2002 The role of circulating IGF-I: lessons from human and animal models. *Endocrine*. Dec;19(3):239-48. Review.

Sjogren K, Sheng M, Moverare S, Liu JL, Wallenius K, Tornell J, Isaksson O, Jansson JO, Mohan S, Ohlsson C. 2002. Effects of liver-derived insulin-like growth factor I on bone metabolism in mice. *J Bone Miner Res*. Nov;17(11):1977-87.

## 제 7 장 참고문헌

Ashburner, M 1989. Helper plasmids for transformation. In "Drosophila -A laboratory" Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Habor, New York, pp. 1020-1024

Battelli, MG., Abbondanza, A., Musiani, S., Buonamici L., Strocchi, P., Tazzari, PL., Gramantieri, L. and Stirpe, F. 1999. Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Clin. Chim. Acta.* 281(1~2) : 147~158.

Belford, DA., Rogers, ML., Francis, GL., Payne, C., Ballard, FJ., and Goddard, C. 1997. Platelet-derived growth factor, insulin-like growth factors, fibroblast growth factors and transforming growth factor  $\beta$  do not account for the cell growth activity present in bovine milk. *J. Endocrinol.* 154(1) : 45~55.

Chan SJ. Nagamatsu S, Cao Q-P, Steiner DF. 1992. Structure and evolution of insulin and insulin-like growth factors in chordates. *Prog Brain Res* 92: 15-24

Couble, P., Chevillard, M., Moine, A., Ravel-Chapuis, P., and Prudhomme, J. C. . Structural organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5' flanking DNA with that of the fibroin gene. *Nucleic Acids Res.* 13: 1801-1814.

Couble, P., Mione, A., Garel, A., and Prudhomme, J. C. 1983. Developmental variations of a nonfibroin mRNA of *Bombyx mori* silkgland, encoding for low-molecular-weight silk protein. *Dev. Biol.* 97: 398-407.

Durand, B., Drevet, J., and Couble, P. 1992. P25 gene regulation in *Bombyx mori* silk gland: two promoter-binding factors have distinct tissue and developmental specificities. *Mol. Cell Biol.* 12: 5768-5777.



Eggleston, WB. 1990. P element transposition and excision in *Drosophila*: Interactions between elements. Thesis of University of Wisconsin, Genetics 203.

Francis, GL., Read, LC., Ballard, FJ., Bagley, CJ., Upton, FM., Gravestock, PM., and Wallace, JC. 1986. Purification and partial sequence analysis of insulin-like growth factor-1 from bovine colostrum. *Biochem. J.* 233(1) : 207~213.

Golic, K. G. 1994. Local transposition of P elements in *Drosophila melanogaster* and recombination between duplicated elements using a site-specific recombinase. *Genetics.* 137: 551-63.

Haenlin, M., H. Steller, V. Pirrotta and E. Mohier. 1985. A 43 kilobase cosmid P transposon rescues the fs(1)K10 morphogenetic locus and three adjacent *Drosophila* developmental mutants. *Cell* 40: 827-837.

Handler, AM., Gomez, SP. and O'Brochta, DA. 1993. A functional analysis of the P-element-gene-transfer vector in insects. *Arch. Insect Biochem. Physikl.* 22: 373-384

Honegger A. and Humbel, RE. 1986. Insulin-like growth factors I and II in fetal and adult bovine serum purification, primary structures and immunological cross-reactivities. *J. Biol. Chem.* 261(2) : 569~575.

Hossner, KL. and Yemm, RS. 2000. Improved recovery of insulin-like growth factors(IGFs) from bovine colostrum using alkaline diafiltration. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32(3) : 161~166.

Inoue, S., Tanaka, K., Arisaka, F., Kimura, S., Ohtomo, K., and Mizuno, S. 2000. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecularmass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol Chem.* 275: 40517-40528.

Kassis, J. A., Noll, E., VanSickle, E. P., Odenwald, W. F., and Perrimon, N. 1992.

Altering the insertional specificity of a *Drosophila* transposable element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1919–1923.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259) : 680~685.

Liao, G. Rehm, E.J. and Rubin, G.M. 2000. Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 3347–3351.

Nagaraju, J., Kanda, T., Yukihiro, K., Chavancy, G., Tamura, T., and Couble, P. 1996. Attempt at transgenesis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) by egg-injection of foreign DNA. *Appl. Entomol. Zool.* 31: 587–596.

Nikolaev, A.I., T.T., Semenova, N.A., Gening, L.V., Gazaryan, K.G, and Kafiani, C.A. 1989. Microinjections of recombinant DNAs into early embryos of the silkworm *Bombyx mori*. *Mol. Biol. (USER)* 23:1177–1187

Nikolaev, A.I., Tchkonja, T.T., Kafiani, C.A. and Tarantul, V.Z. 1993. Preferential extrachromosomal localization of exogenous DNA in transgenic silkworm *Bombyx mori* L. *Mol. Gen. Genet.* 236: 326–330

Obara, T., and Suzuki, Y. 1988. Temporal and spatial control of silk gene transcription analyzed by nuclear run-on assays. *Dev. Biol.* 127: 384–391.

Okimura, T., Ogawa, M. and Yamauchi, T. 1986. Stress and immune responses.III. Effect of restraint stress on delayed type hypersensitivity(DTH) response, natural killer(NK) activity and phagocytosis in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 41(2) : 229~235.

Pakkanen, R. and J. Aalto. 1997. Growth factor and antimicrobial factors of bovine colostrum. *Int. Dairy J.* 285~297.

Qureshi, FG., Tchorzewski, MT., Duncan, MD., and Harmon, JW. 1997. EGF and IGF-I synergistically stimulate proliferation of human esophageal epithelial cells. *J. Surg. Res.* 69(2) : 354~358.

Stossel, TP. 1973. Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood.* 42(1) : 121~130.

Yandell, CA., Francis, GL., Wheldrake, JF. and Upton, Z. 1998. Purification, amino acid sequence and characterisation of kangaroo IGF-I. *J. Endocrinol.* 156(1) : 195~204.

Yasukoshi, Y. 1998. A dense genetic map of the silkworm, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics.* 150: 1513-1525.

Zurovec, M., Vaskova, M., Kodrik, D., Sehnal, F., and Kumaran, A. K. 1995. Light-chain fibroin of *Galleria mellonella*. *Gen. Mol. Biol.* 247: 1-6.

조미란, 조여원, 정성현, 류재환. 1998. 인슐린 비의존형(Type II) 당뇨병자에서 누에분말 섭취가 혈당 및 혈중지질농도에 미치는 영향. *한국영양학회지* 31(7) : 1139-1150.

지용진, 정성현. 2000. 고탄수화물 식이 섭취 마우스에서 잠분의 항당뇨활성 및 기전연구. *경희약대논문집* 28 : 79-86,