

해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업  
연구보고서

어류 apolipoprotein 유전자의 활용을 통한  
지질대사 조절 기술 및 물질 개발

(Engineering of lipid metabolism with fish  
apolipoprotein gene)

2002. 10. 9.

부경대학교(교) SG연구사업단

해양수산부

## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “어류 apolipoprotein 유전자의 활용을 통한 지질대사 조절 기술 및 물질 개발”의 보고서로 제출합니다.

2002. 10. 9.

주관연구기관명 : 부 경 대 학 교

주관연구책임자 : 김 동 수

연 구 원 : 이 형 호

” : 김 성 구

” : 김 기 홍

## 최종(단계)보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	12개월	단계 구분	1단계/총1단계
연구사업명	해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업				
연구과제명	어류 apolipoprotein 유전자의 활용을 통한 지질대사 조절 기술 및 물질 개발				
연구책임자	김 동 수	해당단계 참여연구원수	총 : 4명 내부 : 4명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부: 4610 천원 대학: 3000 천원 계: 7610 천원
연구기관명 및 소속부서명	부 경 대 학 교		참여기업명	성암산업	
국제공동연구	상대국명 :		상대국 연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>어류는 인간과 유사한 apolipoprotein 유전자 염기서열을 가지며 그 유전자 활성도 매우 높아 인간에서 다발하는 동맥경화, 고혈압 및 치매 증상이 전혀 보고된 바 없고 인간에 이로운 혈중 HDL 농도가 여타 척추동물에 비해 매우 높다. 따라서 어류는 apolipoprotein 활성이 매우 높을 것으로 추측되고 있다. 본 연구는 효율적인 apolipoprotein 유전자의 탐색을 위해 3종의 어류로부터 4종류의 cDNA library를 제작하여 그들에서 14종의 apolipoprotein 유전자를 확인한 후, 미꾸라지 간에서 얻어진 apolipoprotein 유전자를 가지고 그의 구조적 특징을 분석하여 그 유전자가 apolipoprotein A1임을 확인하였다. 이후 FV4a promoter와 얻어진 apolipoprotein A1 유전자가 융합된 vector를 제작하였고 제작된 vector를 미꾸라지 수정란에 microinjection하여 형질전환 어류를 생산한 후 이들의 유전자 삽입양상과 발현양상을 조사하였다. 그결과 형질전환 어류는 1~2 copy의 외래유전자가 삽입되어 있음이 확인되었고, 대조군에 비해 T-CHO와 HDL-CHO의 혈중 농도가 최대 2.3배 증가되는 경향을 보였다. 이후 안정적 line 확보를 위한 두 개의 서로 다른 TG Fo 어류로부터 F<sub>1</sub> 형질전환 어류를 생산한 후 다양한 먹이를 공급하며 신기능성 형질전환어류의 T-CHO 및 HDL-CHO 축적량을 조사한 결과 혈중 T-CHO는 그다지 증가되지 않으나 HDL-CHO는 최대 4배까지 축적되는 신기능성 어류가 생산되었음이 확인되었다.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	미꾸라지, 아포지질단백질, 고밀도지질단백질, 콜레스테롤, 형질전환			
	영 어	mud loach, apolipoprotein, HDL, cholesterol, transgenic			

# 요 약 문

## I. 제 목

(국문) 어류 apolipoprotein 유전자의 활용을 통한 지질대사 조절 기술 및 물질 개발  
(영문) Engineering of lipid metabolism with fish apolipoprotein gene

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

인간 유전체 초안이 완성됨에 따라 유용 유전자의 기능 규명과 함께 의약품 개발 등 이의 활용을 통한 고부가가치 창출이 선진 각국에서 첨예한 경쟁 분야로 대두되고 있으며 이러한 노력은 인간 및 포유류 뿐만 아니라 척추동물 중 가장 광범위하고 다양한 유전자 자원군인 어류로 급속히 확대되고 있다. 특히 어류는 인간의 유전자와 매우 유사한 유전자 구조를 갖고 있으나 아직 원시적 조절기능을 유지하고 있다. 특히 어류는 인간과 유사한 apolipoprotein 유전자 염기서열을 가지며 그 유전자 활성도 매우 높아 인간에서 다발하는 동맥경화, 고혈압 및 치매 증상이 전혀 보고된 바 없고 인간에 이로운 혈중 HDL 농도가 여타 척추동물에 비해 매우 높다. 특히, 미꾸라지는 여타 어류와는 달리 양식산일 경우에도 체내 복강지방이 전혀 발견되지 않으며 그 외 간도 다른 어류와는 달리 지방을 거의 함유하지 않아 그의 apolipoprotein A 활성이 매우 높을 것으로 추측되고 있다. 따라서 본 연구는 미꾸라지 apolipoprotein 유전자를 활용하여 인간의 동맥경화 예방을 위한 형질전환 어류모델을 개발하고 체내 HDL-CHO 농도가 높은 신기능성 형질전환 미꾸라지를 개발하고자 하였다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

어류 몇 종으로부터 apolipoprotein 유전자를 탐색하고 이를 클로닝한 후 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 vector를 개발하였다. 이후 이 유전자의 발현 유무 확인을 위해 형질전환어류 Fo를 생산한 후 이들의 혈중 T-CHO와 HDL-CHO를 분석하여 유전자 발현 양상을 조사한 후 2개의 안정된 line을 확보, 이들로부터 F<sub>1</sub>을 생산한 후 다양한 조건의 먹이를 공급하여 신기능성 형질전환 어류의 효율성을 검토하였다.

#### IV. 연구개발결과

효율적인 apolipoprotein 유전자의 탐색을 위해 3종의 어류로부터 4종류의 cDNA를 제작하여 그들에서 14종의 apolipoprotein 유전자를 확인하였고, 이들 중 미꾸라지의 간에서 밝혀진 apolipoprotein 유전자를 가지고 그의 구조적 특징을 분석하여 그 유전자가 apolipoprotein A1임을 확인하였다.

이후 FV4a promoter가 발현율이 미꾸라지에서 높음을 확인하고 상기 promoter와 apolipoprotein 유전자가 융합된 vector를 제작하였다. 제작된 vector를 미꾸라지 수정란에 microinjection하여 형질전환 어류를 생산한 후 이들의 유전자 삽입양상과 발현양상을 조사하였다. 그결과 형질전환 어류는 1 ~ 2 copy의 외래유전자가 삽입되어 있음이 확인되었고, 대조군에 비해 T-CHO와 HDL-CHO의 혈중 농도가 최대 2.3배 증가되는 경향을 보였다. 이후 안정적인 line 확보를 위한 두 개의 서로 다른 TG Fo 어류로부터 F<sub>1</sub> 형질전환 어류를 생산 다양한 먹이를 공급하며 신기능성 형질전환어류의 HDL-CHO 축적량을 조사한 결과 최대 4배까지 혈중 HDL-CHO가 축적되는 것이 확인되었다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과 클로닝 한 apolipoprotein A1 유전자 vector는 HDL-CHO가 다량 축적되는 다른 신기능성 어류의 생산은 물론 apolipoprotein의 생화학합성을 통한 대량생산에 이용될 수 있을 것이며 만일 포유류 실험결과 상기 단백질의 동맥경화 저해 효과가 입증된다면 인체의 동맥경화 억제제로 사용도 가능할 것이다.

#### VI. 기대효과

그간 어류 유전자 이식 기술은 학문적으로 고성장, 내병성 쪽에 머물러 있었으나 앞으로 본 실험 결과에 고무되어 어류유전자 이식 기술 및 연구 방향이 신기능성 형질전환어류의 개발로 이동하는 결과를 가져올 것이다. 또한 앞서 활용계획에서 언급한 바와 같이 미꾸라지 apolipoprotein A1이 포유류의 동맥경화 억제 효과가 있다면 생화학공학적 공정을 이용 의약품 개발에도 일조 할 것이다.

## S U M M A R Y

Apolipoprotein AI, the major protein component of high density lipoproteins is linked to numerous metabolic pathways of animals especially with respect to lipid metabolism involved in a development of coronary artery diseases in mammals. Fish species, which have higher concentration of HDL in their serum than mammalian species, are believed to represent relatively strong activity of the apolipoproteins. To initiate the engineering project of fish lipid metabolism, we discovered various types of apolipoprotein genes from several fish species including our experimental model organism, mud loach (*Misgurnus mizolepis*) based on high density screening and EST profiling of cDNA libraries: 14 different transcripts encoding fish apolipoproteins were obtained with 4 kinds of cDNA libraries from 3 species (loach, shark and hagfish). The selected mud loach Apo-AI were fused to carp beta-actin promoter to develop a mud loach Apo AI-expression vector. Transgenic mud loaches were generated by microinjecting the vector into one-celled embryos. Various genotypes of transgene were detected in transformants with 1 or 2 copy number of transgene(s) per cell. Founder transgenics exhibited the remarkable increase in serum levels of total CHO and HDL-CHO up to more than 200%. F1 fish propagated from the selected transgenic lines showed more increased level of expression up to 3-fold when compared to control normal levels. Various feeding experiments with the feeds supplemented by high fat and/or chemical inducers, many transgenic fish accumulated the preferentially the HDL-CHO (up to 4-fold of control value) rather than LDL-CHO, indicating that the fish would acquire novel function to change the composition of CHO in a desirable manner.

# C O N T E N T S

1. Introduction .....	8
2. Global trends of transgenic fish .....	9
3. Material methods and results .....	10
3-1. Material and methods .....	10
3-1-1. Screening and molecular cloning of fish apolipoprotein gene .....	10
3-1-2. Construction of apolipoprotein expression vector .....	15
3-1-3. Generation of transgenic fish for expression of apolipoprotein .....	16
3-1-4. Change the serum level of cholesterol by fenofibrate feeding in apo-transgenic fish .....	17
3-2. Results .....	19
3-2-1. Screening and molecular cloning of fish apolipoprotein gene .....	19
3-2-2. Construction of apolipoprotein expression vector .....	28
3-2-3. Generation of transgenic fish for expression of apolipoprotein .....	37
3-2-4. Change the serum level of cholesterol by cholesterol or fenofibrate feeding in apo-transgenic fish .....	47
4. Scientific and economic contributions .....	54
4-1. Scientific contributions .....	54
4-2. Economic contributions .....	55
5. Deliverables from the achievement in this study .....	56
6. Scientific information on the recent progress .....	57
7. Literature cited .....	58

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	8
제 2 장 국내외 연구개발 현황 .....	9
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	10
제 1 절 연구개발 수행 내용 .....	10
1. 어류 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝 .....	10
2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터 개발 .....	15
3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환어류 생산 .....	16
4. Cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환 어류의 cholesterol 농도변화 .....	17
제 2 절 결 과 .....	19
1. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝 .....	19
2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터개발 .....	28
3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환어류 생산 .....	37
4. Cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환 어류의 cholesterol 농도변화 .....	47
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	54
제 1 절 목표 달성도 .....	54
제 2 절 관련분야에의 기여도 .....	55
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획 .....	56
제 1 절 추가연구의 필요성 .....	56
제 2 절 타 연구에의 응용 .....	56
제 3 절 상업화 추진방향 .....	56
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 .....	57
제 7 장 참고문헌 .....	58



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

인간 유전체 초안이 완성됨에 따라 유용 유전자의 기능 규명과 함께 의약품 개발 등 이의 활용을 통한 고부가가치 창출이 선진 각국에서 첨예한 경쟁 분야로 대두되고 있으며 이러한 노력은 인간 및 포유류뿐만 아니라 척추동물 중 가장 광범위하고 다양한 유전자 자원군인 어류로 급속히 확대되고 있다. 특히 어류는 인간의 유전자와 매우 유사한 유전자 구조를 갖고 있으나 아직 원시적 조절기능을 유지하고 있다. 예컨대, 인간 및 일반 어류는 비타민 C를 합성하지 못하나 원시어류인 상어는 비타민 C를 생합성 함은 물론 그 유전자의 활성화도 기존에 보고된 쥐의 약 20배에 달함이 본 연구진에 의해 보고된 바 있다.

최근 인간에게 있어 지질 대사와 관련하여 동맥경화, 고혈압 및 치매 등의 질병이 다발하고 있으며 특히 apolipoprotein 유전자의 활성화가 이들 질병과 직접적으로 관련되어 있음이 밝혀지고 있다. 어류는 인간과 유사한 apolipoprotein 유전자 염기서열을 가지며 그 유전자 활성화도 매우 높아 인간에서 다발하는 동맥경화, 고혈압 및 치매 증상이 전혀 보고된 바 없고 인간에 이로운 혈중 HDL 농도가 여타 척추동물에 비해 매우 높다. 특히, 미꾸라지는 여타 어류와는 달리 양식산일 경우에도 체내 복강 지방이 전혀 발견되지 않으며 그 외 간도 다른 어류와는 달리 지방을 거의 함유하지 않아 그의 apolipoprotein 활성화가 매우 높을 것으로 추측되고 있다.

이에 본 연구는 미꾸라지 apolipoprotein 유전자를 유전공학 및 생화학공학적으로 활용함으로써 인간 동맥경화 예방을 위한 형질전환 어류 모델을 개발하고, 아울러 본 유전자의 대량 발현을 통해 HDL의 농도를 증가시킬 수 있는 혈액순환제 개발 기술을 제시함으로써 현재 주로 1차 산업에 머물러 있는 수해양 생물산업을 고부가가치를 창출할 수 있는 3차 산업화 하고자 하였고, 아울러 체내 HDL 농도가 높은 형질전환 미꾸라지를 개발함으로써 궁극적으로 양식생산성을 높여 어민을 보호하고 소비자의 건강유지에 탁월한 신기능성 미꾸라지를 개발하고자 하였다.

## 제 2 장 국내외 연구개발 현황

외국의 경우 유용 유전자가 이식된 어류의 개발은 현재 캐나다의 수해양부 소속의 West Vancouver Laboratory 및 University of New Brunswick에서 고성장 및 저수온 적응형질에 대한 연구가 진행되고 있다. 특히 West Vancouver Laboratory에서는 이미 30배 정도 빨리 성장하는 연어를 개발한 바 있다. 그러나 아직 고기능성 형질전환 어류를 개발하지는 못하고 있는 실정이나, 최근 IWK health center와 Dalhausie University는 AquaNet Canada Program으로부터 연구비를 지원 받아 인간의 insulin을 생산하는 tilapia를 생산하기 위해 노력하고 있다.

미국의 경우, 캐나다와 함께 지난 10여년간 어류의 유전자 이식에 대한 연구를 끊임없이 수행하여 현재 잉어, 송어 및 차넬메기 등에 유전자 이식을 수행하고 있으나 그리 큰 성공사례는 보고되어 있지 않으며, 단지 잉어의 경우 그의 성장이 30% 정도 빨라진 보고가 있다.

영국의 경우 University of Stirling과 University of Southhamton의 과학자들에 의해 reporter 유전자가 이식된 무지개송어 및 유용유전자가 이식된 tilapia가 생산되는 등 고성장 형질을 target으로 한 연구가 진행되고 있다.

이웃 일본의 경우 냉수성 어종에 대한 고성장 형질에 target을 둔 연구가 진행되고 있으나, 그리 큰 성공을 거두지는 못하고 있다. 그러나 일본은 일본산 송사리를 model로 이용한 experimental transgenesis 기술이 매우 앞서 있으므로 앞으로 많은 발전이 예상되고 있다.

핀란드의 경우에는 무지개송어를 이용 포도당 대사와 관련된 연구를 수행하고 있으나 아직 성공을 두지는 못하고 있으며, 쿠바의 경우 약 2배정도 성장이 빠른 tilapia를 개발 산업화를 위한 연구를 진행 중에 있고, 인도의 경우 잉어과 어류에 대한 고속성장 어류 개발에 주력하고 있다.

우리나라의 경우 본 연구실에서 미꾸라지와 잉어에 대해 고성장 형질전환 어류가 생산된 바 있으며, 넙치와 쥐노래미의 고성장 형질이 연구되고 있으나 형질전환 기술을 도입하여 어류를 의약품 생산의 model system으로 사용하거나 다른 특정 유용물질이 다량 축적되는 신기능성 형질전환어류의 생산은 국내외를 통틀어 본 연구가 최초의 연구이다.

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 수행 내용

#### 1. 어류 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝

##### 가. Complementary DNA library 제작 및 Express Sequence Tag

###### (1) 조직 선별 및 RNA 분리

Library를 제작하기 위해 미꾸라지, 상어, 멍장어 등 3종의 어종들에 대해 장 (intestine)과 간 (liver) 조직을 대상으로 Library 제조를 제조하였으며, 그 개략적인 방법은 다음과 같다. 각 조직 100 mg 당 1 ml TriPure™ Isolation Reagent (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 이용하여 조직을 완전히 분쇄한 후, 실온에서 10분간 방치하고 chloroform extraction과 원심분리 (12,500 rpm, 15분)를 수행하였다. 원심분리를 실시하여 RNA를 포함하는 상층액을 취한 후, 동일량의 isopropanol을 첨가하여 total RNA의 침전을 유도하였다. 250  $\mu$ g의 total RNA로부터 mRNA Isolation Kit (Roche, Germany)를 이용하여 mRNA만을 순수 분리하였다. RNA 시료에 lysis buffer (0.1 M Tris, 0.3 M LiCl, 10 mM EDTA, 1% lithium dodecylsulfate, 5 mM dithiothneitol, pH 7.5)를 첨가하여 65°C에서 2분간 방치한 후 100 pmol/ $\mu$ l, biotin-labeled oligo d(T)<sub>20</sub> 2  $\mu$ l를 넣어 완전히 섞어주고, poly (A)와 oligo d(T)간의 hybrid 반응을 유도하였다. 이후 streptavidin magnetic particles 1.5 mg을 첨가하여 37°C에 5분간 방치하여 biotin과 streptanidin과의 결합반응을 유도하였다. 반응이 완료되면 magnetic particle separator (BM Co., Germany)를 이용하여 washing buffer (10 mM Tris, 0.2 M LiCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 250  $\mu$ l로 3회 씻어준 후, DEPC 처리된 멸균수로 65°C에서 2분간 가온하여 magnetic particle로부터 poly (A) mRNA를 elution 하였다.

## (2) cDNA 합성 및 library 제작

분리된 poly (A) tail의 mRNA를 이용, cDNA library를 제작하였으며 cDNA library 제작을 위한 실험과정은 Stratagene사의 ZAP-cDNA Synthesis Kit와 ZAP-cDNA GigapackIII Gold Cloning Kit를 이용하여 수행하였다. 제조사의 protocol을 바탕으로 mRNA로부터 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였으며 클로닝을 용이하게 하기 위해 합성된 cDNA의 말단을 조작용으로써 XhoI과 EcoRI의 양쪽 끝 말단을 갖도록 하였다. 합성된 cDNA 단편들 중 0.6 Kb 이상되는 cDNA strand들만을 선택하기 위해 sepharose column을 이용하여 size fraction을 수행하였다. Column 제작은 Stratagene사의 cDNA Synthesis Kit manual에 따라 Falcon 1 ml pipette과 10 ml sterile syringe를 이용하여 제작하고 이때 column의 매질은 sepharose CL2를 이용하였다. 제작된 drip column에 cDNA를 loading한 후 각 100  $\mu$ l 씩 12 분획을 얻었으며 전기영동으로 각 분획에 있는 cDNA의 길이를 확인한 후 0.6 Kb 이상되는 cDNA를 선택하여 vector와 ligation을 수행하였다

Ligation된 cDNA/vector를 bacteriophage에 packaging하기 위해 1.0  $\mu$ g ligated DNA 4  $\mu$ l를 준비된 packaging extract (Stratagene Co., USA)와 즉시 섞어준 후 실온 (23°C)에서 2시간 동안 반응을 유도하였다. 반응이 완료되면 SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 0.01% gelatin) 500  $\mu$ l와 chloroform 20  $\mu$ l를 첨가하여 천천히 섞어서 4 °C에 보관하며 실험에 사용하였다. Packaging의 효율을 분석하기 위해 titer를 조사하였다. 숙주세포를 준비하기 위해 agar plate에 bacterial glycerol stock (XL1-Blue MRF'와 SOLR cell)을 도말하여 37°C에서 16시간 배양한 후 single colony를 취하여 액체배지 (10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% maltose in 1X LB)에 접종하여 37°C에서 OD<sub>600</sub> = 1.0이 넘지 않을 때까지 배양한 후 10 mM MgSO<sub>4</sub>로 OD<sub>600</sub> = 0.5가 되게 조정하여 실험에 사용하였다. Primary library titring을 위해 10 mM MgSO<sub>4</sub>에 OD<sub>600</sub> = 0.5로 희석된 host cell 200  $\mu$ l와 packaging된 lambda phage 1  $\mu$ l를 첨가 후, 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 NZY top agar (melted and cooled to ~48°C) 3 ml, 0.5 M Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) 15  $\mu$ l와 250 mg/ml X-gal (in N,N-Dimethylformamide) 50  $\mu$ l를 첨가한 즉시 NZY agar plate에 붓고 10분

간 실온에 방치한 후 37 °C에서 16시간 동안 배양하였다.

### (3) Plasmid vector로의 sub-cloning

Lambda phage에 포함되어 있는 cDNA clone들을 plasmid vector로 sub-cloning 하기 위해 mass in vivo excision을 수행하였다. Excision반응을 위해 phage들의 숙주 세포들인 XL1-Blue MRF'와 SOLR cell strain을 10 mM MgSO<sub>4</sub>와 0.2% maltose가 첨가된 LB배지에서 OD<sub>600</sub> = 1.0 (8 × 10<sup>8</sup> cells) 까지 성장시킨 후 10 mM MgSO<sub>4</sub>에 OD<sub>600</sub> = 1.0의 농도로 조정하여 실험에 사용하였다. 먼저 phage stock : XL1-Blue MRF' cell : ExAssist helper phage를 1 : 10 : 100으로 혼합하여 37°C 15분간 반응시킴으로써 phage들이 모든 숙주 세포들에 부착되도록 하였다. 반응이 완료되면 20 ml의 LB 배지를 넣고 3시간 동안 37°C에서 shaking culture를 수행하였고 배양 후 67°C에서 세포들을 불활성화 시키고 cell debris들을 원심분리 (1,000×g, 10분)를 통해 제거하였다. Excision이 효과적으로 이루어졌는지 확인하기 위해 상기 excised phage 1 μl를 준비된 SOLR cell 200 μl에 37°C 15분간 감염시켰다. Excised된 phagemid는 ampicillin 내성 유전자를 포함하도록 조작되었으므로 감염된 SOLR cells (phagemid를 포함하는 세포)만을 선택적으로 얻기 위해 LB- ampicillin agar 배지 (50 μg/ml)에 도말하였다.

### (4) EST clone 준비

Sequencing을 위한 PCR용 template를 준비하기 위하여 cDNA를 포함하는 bacteria colony들을 LB-ampicillin 액체 배지에 접종하고 16시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 원심분리를 통해 세포들을 회수하고 proteinase K (100 μg/ml in DW) 용액으로 resuspend한 후 실온에서 2시간 동안 방치하였으며 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 94°C에서 15분간 proteinase K를 불활성화 시키고 다시 원심분리 (12,000 rpm, 5분)를 통해 cell debris를 제거하고 plasmid를 포함하는 상등액을 취하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 나. Library Screening을 통한 apolipoprotein 유전자 탐색

제작된 library의 1차 profile 조사 후 여타 housekeeping gene들을 포함한 중복성 클론들의 간섭효과를 제거함으로써 무작위 염기서열 분석시 얻어질 수 있는 유전정보의 다양성을 극대화하였다. Normalization을 수행하기 위해 1차 BLAST profile에서 library내 20% 이상의 중복성을 보이는 EST clone들을 대상으로 PCR을 통해 DIG-labeling을 수행하여 probe를 제조하였으며, 또한 1차 EST를 통해 확보된 클론 중 apolipoprotein과 유사성을 나타내는 클론을 대상으로 PCR을 통해 DIG-labeling을 수행하여 filter screening용 probe를 제조하였다. 96 well format 또는 원형 replica에 등간격으로 정렬되어 있는 500개 bacteria colony set들을 대상으로 nylon membrane을 배양 접시 위에 올려놓고 1 분 뒤 떼어 내어 순차적으로 변성화 용액 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 2 분, 중성화 용액 (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl)에 5 분, 2 X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate)에 1 분간 담근 후 membrane에 DNA가 견고하게 부착되도록 UV crossing chamber (Bio-Rad, USA)에서 150 mJ을 조사하여 UV cross linking 시켜 앞서 제조된 probe와 multi-hybridization을 수행함으로써 중복성 클론의 제거 및 positive clone들을 확보하였다.

#### 다. Apolipoprotein 유전자 선발 및 염기서열 결정

확보된 각 bacteria colony들은 2 ml LB-ampicillin 액체 배지에서 밤새 배양하였다. 원심분리를 통해 세포들을 회수하고 proteinase K (100 µg/ml in DW) 용액에 현탁하여 실온에서 2시간, 50°C에서 30분간 반응시킨 후, 94°C에서 15분간 proteinase K를 불활성화시키고 다시 원심분리 (12,000 rpm, 5분)를 통해 plasmid를 포함하는 상등액을 얻었다.

Primer extension을 위해 lysate 11 µl와 SK primer (5' CGCTCTAGA ACTAGTGGATC 3') 3.2 pmole, 형광 표지된 ddNTP를 포함하는 BigDye terminator (Perkin Elmer Co., USA) 2 µl, 및 2.5× dilution buffer 6 µl를 넣어 reaction mixture를 만들고 PCR cycling을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 3분간 initial denaturation 단계를 거친 후 96°C에서 10초, 50°C에서 5초 및 60°C에서 4분을 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후 PCR 산물을

ethanol 침전반응 시키고 70% ethanol wash를 수행하였다. 최종적으로 3.5  $\mu$ l의 loading buffer (5:1 deionized formamide to 25 mM EDTA, 50 mg/ml blue dextran)에 resuspend하여 분석에 이용하였다. Sequencing gel은 제작사의 protocol (PE Co., USA)에 따라 만든 후 ABI 377 sequencer (PE Co., USA)를 이용하여 염기서열 data들을 확보하였다.

#### 라. Apolipoprotein 유전자의 구조적 특성분석

Sequence gel에서 얻어진 data를 염기서열 분석 software인 Sequencher 3.1.1 (Gene Codes Co., USA)를 이용하여 data를 분석 후 vector 부분의 sequence를 포함한 불필요한 염기서열 data를 제거하고 Genbank 탐색을 수행하였다. 다른 어종들과의 염기 서열 및 아미노산 서열 수준에서의 유사성 비교는 NIH BLAST 프로그램 blastx와 blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 동시에 수행하였다. 또한 유전자의 구조 및 특징 분석은 CGG 염기 서열 분석 프로그램 (<http://genomic.sanger.ac.uk/gf/gfb.html>)과 BCM Search Launcher: Gene Feature Searches (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/gene-search.html>) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 또한 얻어진 염기 서열 및 이로부터 유추된 아미노산 서열은 MultAlin (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>), Clustal W (<http://www.clustalw.genome.ad.jp/>) 등의 multiple sequence alignment 프로그램을 이용하여 다중 배열함으로써 상동성을 비교 분석하였다.

Apolipoprotein 아미노산 서열의 hydropathicity plot은 ProtScale (<http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/protscale.pl>)을 이용하여 그리고 서열 내 signal peptide의 유무 및 cleavage sites의 예측은 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)를 이용하여 분석하였으며, PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)와 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 등의 프로그램을 이용하여 발현된 apolipoprotein 단백질의 sorting signal과 세포내 위치 등을 예측하였다. 또한 SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>)을 이용하여 종간의 단백질의 3차 구조를 재구성하여 비교하였다.

## 2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터 개발

### 가. 어류 프로모터 확보 및 기능성 평가

Apolipoprotein 유전자의 효율적 발현을 유도하기 위해 RSV/LTR promoter와 잉어  $\beta$ -actin의 두가지 promoter에 reporter 유전자인 CAT을 구조 유전자로 하는 발현벡터를 제조하였다. 이들 재조합 발현벡터들의 발현 조절 능력 평가를 위해 미꾸라지 근육에 direct injection한 후 두 promoter간 미꾸라지 근육 세포에서의 발현율을 조사하였으며, 아울러 plasmid form에 따른 발현율의 차이도 검증하였다. 즉 두 종류 유전자의 plasmid form에 따른 발현 양상을 조사하기 위하여 miniprep에 의해 얻어진 각각 100 $\mu$ g의 plasmid DNA를 circular form과 EcoR1으로 digestion 한 linear form과 circular form 그대로 미꾸라지 근육에 주사하고 48시간 후 CAT assay를 통해 이들 promoter의 발현 유도 정도를 비교하였다.

### 나. Apolipoprotein 유전자 발현용 벡터 개발

Apolipoprotein 유전자 발현 벡터의 제조를 위해 pBluscript II KS(-) (pBS; Stratagene, USA) 벡터내에 cloning되어있는 ML003 plasmid와 pFV4a plasmid 2  $\mu$ g을 제한효소 NotI과 XhoI 10 U으로 2 시간 동안 반응시켜 절단한 후, 이를 전기영동하여 크기별로 분리하였다. 해당 band를 포함하는 gel 조각으로부터 GeneClean kit (Bio 101, USA)를 이용하여 회수하고 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. 이어 50 mM CaCl<sub>2</sub>를 처리한 대장균 숙주 세포 XL-1 blue MRF' 균주에 형질전환시키고, 배양한 후 나타난 흰색 콜로니를 무작위로 선택하여 37 $^{\circ}$ C에서 2 ml LB 배양액에 밤새 배양하였다. 배양액 중 1.5 ml을 알칼리 용해 방법에 따라 플라스미드 DNA를 추출하여 일부를 제한 효소로 절단, 정확한 insert가 들어 있는지 여부를 확인하였다.



### 3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환어류

#### 생산

##### 가. Microinjection을 통한 유전자이식

###### (1) Microinjection의 최적 조건 조사

성숙된 암컷과 수컷 미꾸라지(4 ~ 5년생)에 HCG를 어체중 g당 10 IU의 농도로 복강주사한 후 난과 정자를 얻어, 수정시켰다. 수정된 알을 15°C에 보관하면서 1세포기에 도달한 수정난의 할구세포 중앙에 다양한 조건으로 microinjection을 실시하였다. 이후 microinjection이 끝난 알을 25°C의 부화기로 옮겨 부화율과 초기생존율을 구하여 가장 효율적인 microinjection 조건을 구하였다.

###### (2) 최적 microinjection 조건에 의한 유전자 이식

상기 가. (1)의 방법에 의해 얻어진 최적조건의 microinjection 방법을 이용 3쌍의 미꾸라지를 대상으로 3회에 걸쳐 수정난을 대량 처리한 후 이들을 부화시켜 실험에 사용하였다.

##### 나. Southern blot에 의한 유전자 삽입구도 분석

부화 3개월 후 꼬리지느러미를 절취한 후 상법의 SDS/proteinase K 방법에 의거 DNA를 추출하였다. Southern blot을 위하여 10  $\mu$ g의 DNA를 Dra II 효소로 잘라 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 옮겨 non-isotopic labeling and detection kit (Boehringer-Mannheim, Germany)를 이용 Southern blot 하였다.

##### 다. 유전자 발현 유무 분석

상기 나.의 southern blot에서 positive signal과 high molecule weight DNA band가 보여 integration이 확인된 개체를 선정 그의 피를 뽑아 T-CHO와 HDL-CHO를 측정 Apo-A1 유전자의 형질전환 어체내 발현 유무를 직접 조사하였다.

라. Stable line 확보를 위한 F<sub>1</sub> 생산

(1) 대조군과 교배 F<sub>1</sub> 생산

상기 다의 실험에서 발현율이 높은 두개의 line (TG 6 및 TG 9)을 선정하여 산란용의 실험사료를 공급한 후 대조군의 암컷(4 ~ 5년생)으로부터 산란을 유도하고 TG 6 및 TG 9로부터 정액을 채취 상법에 의해 수정시켜 F<sub>1</sub> TG 어류를 생산하였다.

(2) F<sub>1</sub>의 발현 양상

각 line에서 20마리씩을 채취한 후 상기 다에서 상술한 동일한 방법으로 T-CHO 및 HDL-CHO를 측정함으로써 F<sub>1</sub> 어류들의 발현율과 그 양상을 조사하였다.

#### 4. Cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환어류의 cholesterol 농도 변화

가. 돼지 비계 첨가사료 공급에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

LDL-CHO가 높은 것으로 이미 잘 알려진 돼지의 비계부분을 미꾸라지 사료에 0, 5 및 10%의 농도로 대조군 미꾸라지에 4일간 먹인 후 T-CHO 및 HDL-CHO의 농도 변화를 측정하여 대조군 미꾸라지에 있어서 고농도 cholesterol 사료 공급시 그의 혈중농도의 변화 여부를 조사하였다.

나. Cholesterol 농도 및 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

(1) 대조군 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 나타나는 농도 및 처리 시간에 따른 변화

Cholesterol (Sigma, USA)을 미꾸라지 사료에 0, 1, 2 및 4%의 농도로 섞어 미꾸라지에 6일간 공급하며 2일 간격으로 T-CHO의 농도 및 HDL-CHO의 농도를 조사하여 농도 및 처리 시간에 따른 대조군 미꾸라지의

혈액내 cholesterol 변화 양상을 측정하였다.

(2) 형질전환 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 T-CHO와 HDL-CHO의 농도변화

상기 두 F<sub>1</sub> 계통(TG 6 및 TG 9)의 stable TG line에 4%의 cholesterol이 함유된 사료를 6일간 공급한 후 2일 간격으로 혈중 T-CHO와 HDL-CHO의 농도를 조사하였다. 이때 대조군으로는 cholesterol 무첨가 사료를 공급한 군(control 1)과 4%의 cholesterol 첨가 사료를 공급한 군(control 2)로 나누어 대조군과 형질전환 미꾸라지의 cholesterol 축적량과 HDL-CHO의 전환효율을 분석하였다.

다. Fenofibrate 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

시궁쥐에 투여하면 Apo-A1 mRNA의 양을 감소시키나, 인간에게는 Apo-A1 유전자의 발현을 증가 시키는 것으로 알려진 fenofibrate를 사료에 섞어 공급함으로써 미꾸라지 Apo-A1 유전자의 기능이 fenofibrate에 의해 어떠한 영향을 받으며, 본 종의 Apo-A1 유전자는 어떠한 type에 속하는가를 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다. 본 실험을 위하여 1% 농도의 fenofibrate가 함유된 사료를 대조군과 TG 13 군의 미꾸라지에 공급, 6일과 10일 후 이들의 혈액을 채취 T-CHO 및 HDL-CHO의 농도 변화를 관찰하였다.

라. T-CHO 및 HDL-CHO의 측정

(1) T-CHO 측정

혈액 채혈은 1.0 ml/cc (26G ½") syringe를 사용하여 200 ~ 300  $\mu$ l 채집 하였으며, 채집된 혈액을 7000 rpm에서 5분간 원심분리 후 serum만 새로운 tube에 보관 하였다. 보관된 각 개체의 serum을 ESLISA plate reader (Bio-rad, USA)를 사용하여 분석하였다. 분석 시약으로는 총 cholesterol 측정용 시약(아산테크, 한국)을 사용하였으며, 분석 방법은 fish serum 2  $\mu$ l에 300  $\mu$ l 효소액(cholesterol esterase + cholesterol oxidase; 아산테크 T-CHO 측정용 시액, 한국)을 섞어준 후 serum과 효소액이 섞인 microwell plate를

상온에서 10분간 반응시켰다. 이때 공시험에는 PBS와 표준시험에는 표준액 (cholesterol 300 mg/dl)을 사용 하였으며, 490 nm (500 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

## (2) HDL-CHO 측정

혈액 채혈 및 serum의 채집은 상기 T-CHO 측정법에서와 같은 방법으로 하였다. 분석 시약으로는 HDL-CHO 측정용 시약(아산테크, 한국)으로 시약 A (계면활성제 + ASOD: HDL과 친화성이 큰 계면 활성제를 이용하여 HDL-CHO만 선택적 용해하기 위한 시약)와 시약 B (cholesterol esterase + cholesterol oxidase: 효소반응에 의해 용해된 HDL-CHO를 정량화하기 위한 시약)로 구성되어 있으며, 분석 방법으로는 fish serum 3  $\mu$ l에 300  $\mu$ l 시약 A와 100  $\mu$ l 시약 B를 섞어준 후 serum과 측정 시약이 섞인 microwell plate를 상온에서 5 ~ 10분간 반응시켰다. 이때 공시험에는 PBS와 표준시험에는 표준액(HDL-CHO 50 mg/dl)을 사용 하였으며, ESLISA plate reader를 사용하여 655 nm (주파장: 600 nm; 부파장: 700 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

## 제 2 절 결 과

### 1. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝

#### 가. cDNA library 제작

##### (1) 제작된 cDNA library 평가

선발된 모델 어류들과 원시 어류 총 8종으로부터 19개의 library (8 종류 조직)가 구축되었다. 구축된 library들의 기본적인 평가를 위해 각 cDNA library들이 충분한 유전자들을 포함하고 있는지를 1차로 확인하고 이들 각 library들로부터 무작위 48개의 클론들을 선발하여 재조합 클론들이 포함하고

있는 cDNA insert들의 평균 길이를 확인하였다. 그 결과 제조된 primary library들의 크기는  $5.0 \times 10^5$  pfu/ml에서  $1.0 \times 10^7$  pfu/ml 사이였으며 증폭된 library 및 excised 된 library 역시 각각 최대  $2.5 \times 10^{12}$  pfu/ml 및  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml로 나타냄으로써 다양한 유전정보를 포함하고 있는 cDNA library가 합성되었음을 알 수 있었다. 제작된 이들 library 중 apolipoprotein 과 유사성을 갖는 clone을 포함하는 library를 Table 1에 나타내었다.

#### 나. Express Sequence Tag과 Library Screening을 통한 apolipoprotein 유전자 탐색

##### (1) EST 데이터 베이스 구축

염기서열의 구조 및 유사성에 관해 (a) 5' upstream 쪽 또는 poly(A) signal이 보존되어 있는지 여부 (b) Start codon이 잘 보존되어 있는 ORF 인지 여부, (c) 조직내 반복되는 공통 염기서열의 contig 작성 및 그 빈도, (d) 조직간 반복되는 공통 염기서열의 contig 작성 및 그 빈도, (e) GenBank의 데이터베이스내 염기서열과 match되는지 여부, (f) match되었다면 그 유사성 (%) 정도 (50% 이상, 30-50%, 30% 미만), (g) query-Subject간 alignment가 염기서열의 전반에 걸쳐서 있는지 또는 국한된 염기서열 영역에서만 존재하는지 여부, (h) unmatched 염기서열간 상동성이 있는지 또 이들 염기서열이 정확한 ORF인지 여부 등을 분석하였다. 구축된 cDNA library들 및 EST의 기본적인 특성을 Table 2에 나타내었다.

##### (2) Apolipoprotein의 탐색

Library 검색을 통해 확인된 apolipoprotein 유전자 clone들은 미꾸라지 간 cDNA library에서 10개, 두툽상어 간 cDNA library에서 2개와 뇌 cDNA library에서 1개, 및 Hagfish 간 cDNA library에서 1개 등 총 14개의 positive clone이 확인되었다. Table 3은 본 연구결과 미꾸라지, 상어 및 hagfish로부터 확인된 apolipoprotein 연관 유전자 정보이다.

Table 1. Summary of cDNA library construction

Fish species	Tissue	Primary size (pfu/ml)	Amplified size (pfu/ml)	Excised size (cfu/ml)	Average length of insert (kb)
Mud loach	Liver	$1.2 \times 10^6$	$1.0 \times 10^{11}$	$7.5 \times 10^7$	1.6
Tiger shark	Liver	$2.1 \times 10^6$	$2.5 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^7$	1.7
	Brain	$1.5 \times 10^6$	$6.5 \times 10^{10}$	$2.8 \times 10^7$	2.0
Hagfish	Liver	$2.8 \times 10^6$	$2.0 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^8$	2.5

Table 2. Summary of EST profiles

Fish species	Tissue	No. EST	% of novel gene	% unique seq.	% full length clone
Mud loach	Liver	320	11	76	75
Tiger shark	Brain	365	21	85	46
	Liver	288	17	88	55
Hagfish	Brain	192	35	84	51

Table 3. Putatively identified cDNA clones as apolipoprotein

EST source	Clone No.	Putative Identification	Accession No.	Species	Length (aa)	% ID	Score (bits)
	ML003	apolipoprotein A-I	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	171	61	221
	ML007	28KDa apolipoprotein	BAB40960	eel <i>Anguilla japonica</i>	222	50	227
	ML035	28KDa apolipoprotein	BAB40960	eel <i>Anguilla japonica</i>	222	50	227
	ML036	28KDa apolipoprotein	BAB40960	eel <i>Anguilla japonica</i>	222	50	227
Mud loach Liver	ML037	apolipoprotein A-I	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	161	59	202
	ML038	apolipoprotein A-I	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	155	60	196
	ML045	apolipoprotein A-I-2	AAB96973	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	249	40	194
	ML049	apolipoprotein A-I-2	AAB96973	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	257	41	196
	ML061	apolipoprotein A-I	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	149	59	187
	ML092	apolipoprotein A-IV	P06727	Human <i>Homo sapiens</i>	245	26	118
Tiger shark Liver	SL0139	apolipoprotein B	JT0382	pig <i>Sus scrofa</i>	161	26	66
	SL0231	apolipoprotein E	NP_571173	Zebra fish <i>Danio rerio</i>	90	31	60
Tiger shark Brain	SB188	apolipoprotein E	NP_571173	Zebra fish <i>Danio rerio</i>	194	25	76
Hag fish Liver	HL116	apolipoprotein 1 precursor	A26602	sea lamprey <i>Petromyzon marinus</i>	55	25	32



#### 다. Apolipoprotein 유전자 선발 및 염기서열 결정

EST 염기서열 분석과 library 검색을 통해 apolipoprotein 유전자와 유사성을 갖는 총 14개의 clone을 확보하였다 (Table 3). 이들 clone들의 염기서열 분석 및 유사성 확인 결과 미꾸라지 간 cDNA library에서 확보한 10개의 clone들중 ML092를 제외한 나머지 9개의 clone들은 각각 염기서열에서 97-100%의 상동성을 보이면서 뱀장어의 28kDa-2 apolipoprotein과 무지개송어의 apolipoprotein A-I-1 및 apolipoprotein A-I-2, 그리고 잉어와 대서양 연어, sea bream 등의 apolipoprotein A-I과 약 40-60%의 유사성을 나타내었다. 반면 이들과 다른 ML092 clone은 사람의 apolipoprotein A-IV와 상동성을 나타내었다. 또한 두툽상어의 간 cDNA library에서 확보된 1개의 clone은 돼지의 apolipoprotein B와 유사성을, 그리고 나머지 1개와 뇌 DNA library에서의 1개의 clone은 zebrafish의 apolipoprotein E와 상동성을 나타내었다. 그 밖에 hagfish에서 확인된 1개의 clone은 sea lamprey의 apolipoprotein 1과 낮은 수준에서 상동성을 나타내었다 (Fig. 1).

#### 라. Apolipoprotein 유전자의 구조적 특성분석

Apolipoprotein 유전자 full clone의 확보를 위해 유연 관계가 가까운 잉어와 비교적 높은 상동성을 보이는 ML003 clone에 대해 forward와 reverse primer를 이용하여 cloning된 insert의 전체 염기서열을 결정하였다. 확인된 미꾸라지 apolipoprotein 유전자는 1090 bp의 길이 중 762 bp가 254개의 amino acid를 coding하고 있었으며, 32 bp의 5' UTR 영역과 TAA stop codon으로부터 274 bp 뒤에 poly (A) signal sequence가 연이어 2개가 나타났으며 이로부터 8 bp 지나 poly (A) 서열이 확인되는 등 전사 종결점까지 293 bp의 3' UTR 영역이 확인되었다 (Fig. 2).

이들 염기서열로부터 유추된 254개의 아미노산 서열로 이루어진 apolipoprotein은 분자량이 약 29.3 KDa, pI 6.12 이었으며, 평균 hydrophobicity는 -0.500787로 특히 N-terminal 부위에서 높은 소수성 특성을 보였으며 (Fig. 3), SignalP를 이용한 서열 내 signal peptide의 유무 및 cleavage sites의 예측에서 N-MRFIALAVTVLLAGCQA의 17개 아미노산의 signal peptide와 17-18번째 아미노산 사이의 절단 부위 등이 확인되었다

A.

ML003 225 LGQSVNHLHGYFQHFQGIAPFAGQFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQLEPKREELRAVIE 404  
 Carp ApoA1 1 LGQSVNHLHGYFQNGFQAITPIGDQVLEATKDTREKLVKDVVEELRKKIEPMRAELRQVLE 60  
 LGQSVNHLHGYFQ+ FQ I P Q E E+ KD+E++RK++EP R ELR V+E

ML003 405 KHFEYSTELKPIVDEYLAKHDKEMAELKVKLEPVVESLKQKIPVNWEETKSKLLPILEI 584  
 Carp ApoA1 61 KHLQEYRDELKPFVVEEYLTQHFKFLEEMRIKLEPVVKSLREKFGPNWEETKSKLMPILEA 120  
 KH QEY ELKP V+EYL KH K + E+++KLEPVV+SL++K NWEETKSKL+PILE

ML003 585 VRNKITAQVQDLKAQLEPYIQDYKDSVEKGALEFREKVRSGELRKKMDELG 737  
 Carp ApoA1 121 VREKVAEHLQDLKLLLEPYMQDYREQMEKGAQEFRQSVKSGELRKKMDELG 171  
 VR K+ +QDLK LEPY+QDY++ +EKGA EFR+ V+SGELRKKM+ELG

B.

ML007 31 MRFIALAVTVLL-AGCQARFMQ---DAPPSQLEHVKSVLQVYADQLKQSAHKALNHLDDT 198  
 Eel Apo 1 MKFVALALTVLLVAGSQARFLQADAPAPPSQLEHVRAAVGMYLQQVKETAQKALEHLD 60  
 M+F+ALA+TVLL AG QARF+Q APPSQLEHV++ + +Y Q+K++A KAL HLD 198

ML007 199 EFKDYKGLGQSVNHLHGYFQHFQGIAPF----AGQFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQL 366  
 Eel Apo 61 EYKDYKRLSQSLDNIQGYIQSASAALSPYTDVSSQFMELTKDMRDKIQADVQDKKDL 120  
 E+KDYK L QS+DN+ GY Q A ++P+ + QF E+ ++ + D++ ++K L

ML007 367 EPKREELRAVIEKHFEYSTELKPIVDEYLAKHDKEMAELKVKLEPVVESLKQKIPVNWE 546  
 Eel Apo 121 QPKRDELKEVVQKHLDEYRAKLEPLVKEYTEKHQEMEELKTKLQPVVEDLRARIQVNV 180  
 +PKR+EL+ V++KH EY +L+P+V EY KH +EM ELK KL+PVVE L+ +I VN E

ML007 547 ETKSKLLPILEIVRNKITAQVQDLKAQLEPYIQDYKDSVEKA 672  
 Eel Apo 181 ETKSKLVPIVEAIRAKLTERLEELRTLAEPYVQYKDHLESEA 222  
 ETKSKL+PI+E +R K+T ++++L+ EPY+Q+YKD + +A

C.

ML049 33 MRFIALAVTVLLAGC-QARFMQDAPPSQLEHVKSVLQVYADQLKQSAHKALNHLDDTEFK 209  
 Rainbow Trout ApoA1 1 MQFLALALTI LLAATQAVPMQADAPPSQLEHVKVAMMEYMAQVKETAQRSIDHLD 60  
 M+F+ALA+T+LLA QA MQ PSQLEHVK + Y Q+K++A ++++HLDDTE+K

ML049 210 DYKGLGQSVNHLHGYFQHFQGIAPFAG----QFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQLEPK 377  
 Rainbow Trout ApoA1 61 EYKVLQSLDNLQQYQTAASESLAPYSEAGVQLTEATAAVRAEVMKDVVEELRSQLEPK 120  
 +YK L QS+DNL Y Q A + +AP++ Q E A + KD+E++R QLEPK

ML049 378 REELRAVIEKHFEYSTELKPIVDEYLAKHDKEMAELKVKLEPVVESLKQKIPVNWEETK 557  
 Rainbow Trout ApoA1 121 RAEKVELDKHIDEYRKRLEPLIKDIVEQRRTELEAFRVKIEPVVEEMRAKVSANVEETK 180  
 R EL+ V++KH EY L+P++ + + + E+ +VK+EPVVE ++ K+ N EETK

ML049 558 SKLLPILEIVRNKITAQVQDLKAQLEPYIQDYKDSVEKAPWNSVRSPIRRTTEKDGRTGS 737  
 Rainbow Trout ApoA1 181 AKLMPIVETVRAKLERLEELRTLASPYAEYKEMKAVGEVREKVVPLTTDFKQQLGP 240  
 +KL+PI+E VR K+T ++++L+ PY ++YK+ + KA + T + G+ G

ML049 738 GGQAHFELL\*ALKVLIS 788  
 Rainbow Trout ApoA1 241 AAQAKEKLMALYETIS 257  
 + E L AL IS

D.

ML092 31 VLVVLALAVFTGCQANLFYADEPKPQLEQLTDAFWSYVAKATHAEETVQMI RNSQLGQD 210  
 Human Apo1-IV 6 VVLTALAVAGARAIEV-----SADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL 57  
 V++ LAL G +A + +Q+ W Y ++ ++ A+E V+ ++ S+L Q

(Fig. 1 continued)

ML092 211 VNARLTQSDMASEYAVTLKHKVDPLTEELMTK I TKEAEVLRERLGDLLSVR----- 369  
Human ApoI-IV 58 LNALFQDKLGEVNTYAGDLQKKLVFATELHERLAKDSEKLKEE I GKELEELRARLLPHA 117  
+NA + YA L+K + P EL ++ K++E L+E +G++L +R

ML092 370 -----DKLEPYADN I K S Q I Q Q R V E D L R T A M A P F A D S L D -----SETLKA 486  
Human ApoI-IV 118 NEVSQK I G D N L R E L Q Q R L E P Y A D Q L R T Q V N T Q A E Q L R R Q L T P Y A Q R M E R V L R E N A D S L Q A 177  
+LEPYAD +++Q+ + E LR + P+A ++ +++L+A

ML092 487 TLLQKSEELRGSVEESVKELKAQLEPYTAD I KEKVDQHLQEFQKT V N P M A E E L Q P R C + E S 666  
Human ApoI-IV 178 SLRPHADELKAK I D Q N V E E L K G R L T P Y A D E F K V K I D Q T V E E L R R S L A P Y A Q D T Q E K L N H Q 237  
+L ++EL+ ++++V+ELK +L PY + K K+DQ ++E ++++ P A++ Q +

ML092 667 KDGST 681  
Human ApoI-IV 238 LEGLT 242  
+G T

E.

SB188 6 LGTQLGPYSD----RFNSDLEEASERLKH DHTAMRSMVMYHDELNLMVQNQVDDVHRTL 173  
Zebra fish ApoE 83 LQTQMPYASDAAGQLSKDLQLLAGKLGTDMDAKERSTQYLQELKTMMEQNADDVKNRV 142  
L TQ+ PY+ + + DL+ + +L+ D T + Y EL M+ QN DDV +

SB188 174 AXXXXXXXXXNRDQAT I RNKFQEYSELLR SKKERTLSDFQAMVAPYTSVSDKVVQHSQ 353  
Zebra fish ApoE 143 GTYTRKLLKRLNKDTEE I RNTVATYMSEMQRASQNADAVKDRFQPYMSQAQDQATQKLG 202  
N+D IRN Y ++S+ + + PY S D Q

SB188 354 NIQQSLAQQAEVKS----KAAALQGH I SENADDLRHSLRQKMEE I SAWFESEAQQ I SER 521  
Zebra fish ApoE 203 AISELMKAQAQEVSEQLVQAGALKKEKLEETAENLRSLRQVDELTSLLAPYSQK I REQ 262  
I + + QA+EV +A AL+ + E A++LR SL +++E+++ +Q+I E+

SB188 522 FTGLLNLYSDSAHA 563  
Zebra fish ApoE 263 LQEVMDK I KEATAA 276  
+++ + ++ A

F.

SL139 20 TASQYQKVEATNFKLFRADKVANVDVEQKVTTLLDA I SNLTQEQYQSKLDL I EAA I KF 199  
Zebra fish ApoB 2191 TTKSYQQWKDRAQSLYQKLLAQEDQGDFQGLRNKVFDSV I GVTQEYNVTVKRAVDLSL I KS 2250  
T YQ+ K+ L+++ + DF+ + D++ +TQEY +K +++ IK

SL139 200 LKYTKFQLPGLADQYTQGELYTMS I NHGTQLFVKFDN I VKDHLENAVEY I RELEFNMMVPG 379  
Zebra fish ApoB 2251 LKFTRFQLPGRARNYTGDEL CNMVMTEVGEVLSQ I YSK I HSGLE I LLSYFQDLMEKSKLN 2310  
LK+T+FQLPG A YTG EL M + ++ + + + LE + Y ++L

SL139 380 NNSTIK-----ASE ILSQLGGSLKQVLT K V I D V L T K M 475  
Zebra fish ApoB 2311 KARK I K F T F D S V K Y Q L T D V V S E Y G E Q L K S L S Q D V Q K A L S D L 2351  
IK ++++S+ G LK + V L+ +

G.

HL116 559 NAVTR I E M I L G E I R S S R M G E L T K E L A G E T M K V M K P H L A A L R E H I S Q G I Q E Y T A T E 395  
Lamprey ApoI 49 NVSMEFKKMHGLQTSN I GEHAKSLYTDTVAVLTPYLQK I RENVTKMYQVYVESK 103  
N + ++ +++S +GE K L +T+ V+ P+L +RE++++ Q Y ++

Figure 1. Blast search results of putatively identified clone

```

1 GGCACGAGACCAGCTACATCAACAGATCCAGGATGAGGTTTATAGCTCTTGCAGTCACAG
                                M R F I A L A V T V 10
61 TTCTGCTGGCAGGTTGCCAGGCACGTTTCATGCAGGATGCACCTCCATCGCAGCTGGAAC
   L L A G C Q A R F M Q D A P P S Q L E H 30
121 ATGTGAAGTCTGTTCTGCAGGTGTATGCAGATCAACTGAAACAATCTGCACACAAAGCCC
   V K S V L Q V Y A D Q L K Q S A H K A L 50
181 TCAATCACCTCGATGACACAGAGTTCAAAGACTACAAAGGTTCTGGGCCAGTCCGTGG
   N H L D D T E F K D Y K G F L G Q S V D 70
241 ACAACCTCCATGGCTACTTTTCAGCATGCCTTCCAAGGCATTGCCCATTTGCCGCCAGT
   N L H G Y F Q H A F Q G I A P F A G Q F 90
301 TCGCTGAAGTCTTGGCTCCAAAGATCGAGCAGTTCAAGAAGGATATGGAGGACATGCGCA
   A E V L A P K I E Q F K K D M E D M R K 110
361 AGCAGCTCGAACCCAAGCGAGAGGAGCTGAGGGCTGTGATAGAGAAGCACTTTCAGGAGT
   Q L E P K R E E L R A V I E K H F Q E Y 130
421 ACAGCACTGAGCTCAAGCCCATCGTCGATGAGTACTTGGCCAAACACGACAAGGAAATGG
   S T E L K P I V D E Y L A K H D K E M A 150
481 CGGAGCTGAAGTCAAGCTGGAGCCTGTGGTAGAGAGCTTGAAGCAGAAAATTCCTGTTA
   E L K V K L E P V V E S L K Q K I P V N 170
541 ACTGGGAGGAGACCAAGTCCAAGCTGCTGCCATCTTGGAGATTGTGCGTAACAAGATTA
   W E E T K S K L L P I L E I V R N K I T 190
601 CTGCTCAGGTCAGGATCTGAAGGCCAGCTAGAGCCCTACATCCAGGACTATAAAGATT
   A Q V Q D L K A Q L E P Y I Q D Y K D S 210
661 CAGTGGAGAAAGGCGCCCTGGAATTCCTGAGAAAGTCCGATCCGGAGAACTGAGGAAAA
   V E K G A L E F R E K V R S G E L R K K 230
721 AGATGGACGAACTGGGAGCGGAGGTCAAGCCCCACTTTGAGGCTATTTTTGCAGCTCTCC
   M D E L G A E V K P H F E A I F A A L Q 250
781 AAAAGTCTTTGAGTAAAGCAATCGCTTTTTAACATTCCCACTTCTTTCTCTTTCCAC
   K S F E * 254
841 TTATACCCAATACGAAAACCTCAGCCTTTCTCAGAGAATACACCAGTCTGTCTTTCTTCT
901 AGAGTACACTTCATATGCACTTTTCACCAAACCACTAAACTTATGGACTTTAATCTTATG
961 ATCAAACAGAGATATAAACATGAGAACACAATTCGGTTTAAACGTTACAGAAATCTTAG
1021 CAAAATCCTTTGTTAAATGCTTTTTTTGGTAAAAAATTGATTTGCAATGTTAAATAAAATA
1081 AAAACTGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

**Figure 2.** Complete nucleotide sequence of the mud loach apolipoprotein cDNA. The deduced amino acid sequences are shown with a single letter code below the corresponding codons. Numbering of the nucleotide and amino acid sequences are given at the left and right. The translational start codon (ATG), termination codon (TAA), and polyadenylational signal sequence are shown in boldface letters.

(Fig. 4). 또한 PSORT와 TargetP 등의 프로그램을 이용한 apolipoprotein 단백질의 세포내 위치의 예측은 sorting signal에 의해 secretion되는 extracellular의 형태로 나타났다.

미꾸라지의 apolipoprotein 아미노산 서열을 현재 알려진 어류들과 포유류의 생쥐와 사람의 것과 서열 다중 배열 분석 결과, 유연 관계가 가까운 잉어와 60%를 비롯하여 다른 어류들과는 34 ~ 43%의 상동성을 그리고 사람과는 불과 16%의 낮은 서열 상동성을 나타내었으며 (Fig. 5, Table 4), 이들 서열 상동성에 기초한 계통도에서는 종간의 유연 관계가 잘 나타났다 (Fig. 6). 그러나 이들 단백질의 3차 구조의 예측에서는 서로 낮은 상동성에도 불구하고 구조가 매우 유사한 것으로 나타났다 (Fig. 7).

## 2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터개발

### 가. 어류 프로모터 확보 및 기능성 평가

Table 5에서 보듯이 plasmid 형태에 따른 유전자의 발현율은 동일 유전자간에는 circular form의 경우 18.25 pg/mg 단백질 그리고 linear form의 경우 18.39 pg/mg 단백질로 차이를 보이지 않았다. 또한 RSVCAT의 경우에는 circular form은 13.14 pg/mg 단백질 그리고 linear form의 경우 13.84 pg/mg 단백질로 역시 차이를 보이지 않았다. 그러나 promoter의 종류에 따라 발현율의 차이를 보여 FV4 promoter가 RSV보다는 약 25% 정도 더 발현율이 높은 것으로 나타났다.

### 나. Apolipoprotein 유전자 발현용 벡터 개발

발현 벡터의 제조를 위한 apolipoprotein 유전자는 EST 결과 전체 염기 서열을 포함하는 ML003 clone으로부터 확보하였으며, 발현 벡터의 promoter 영역으로는 잉어  $\beta$ -actin 유전자의 조절부위를 포함하는 pFV4a 벡터를 이용하였다. ML003 plasmid와 pFV4a plasmid의 제한효소 NotI과 XhoI 절단으로 1.2 Kb의 apolipoprotein 유전자 단편과 pFV4a 벡터를 회수하여 ligation 시킴으로 재조합 발현벡터를 제조하였다 (Fig. 8).

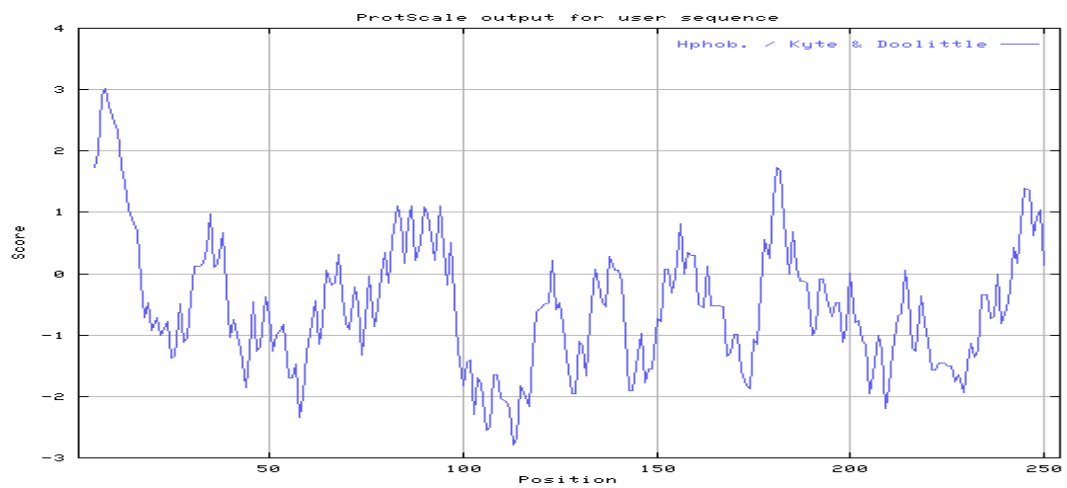
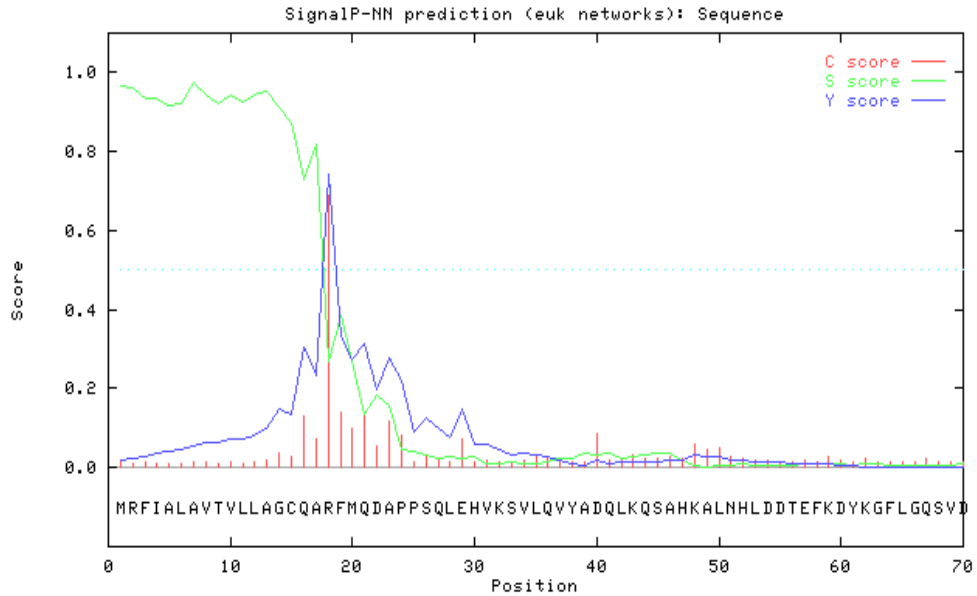


Figure 3. Hydropathicity profile of apolipoprotein genes. Hydropathy scores were calculated by amino acid scale value of Kyte and Doolittle (1984) using a setting 9 residues.

A



B

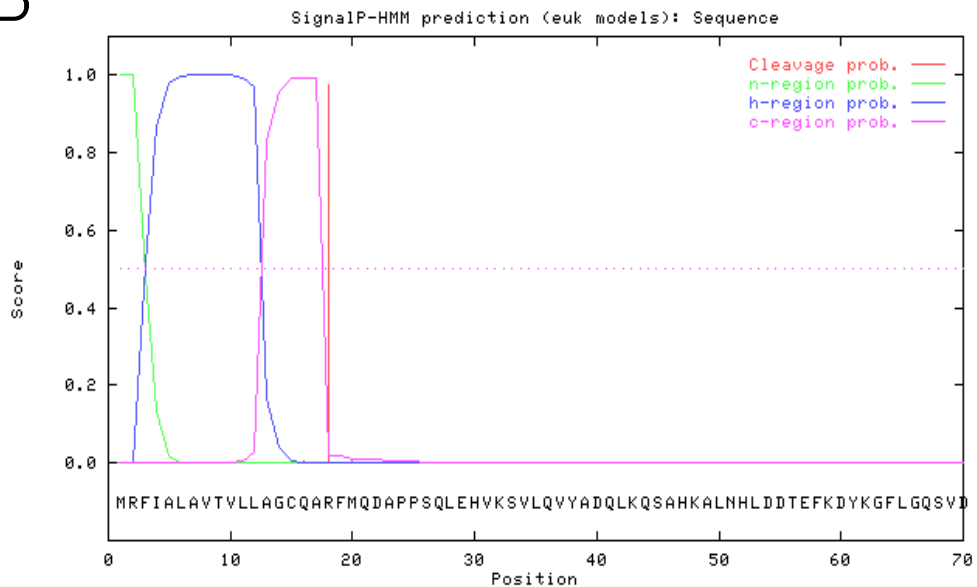


Figure 4. Prediction of signal peptide cleavage sites in apolipoprotein amino acid sequences. Both of Signal-NN prediction (A) and Signal-HMM (B) are predicts the presence and location of signal peptide cleavage sites . C-score, raw cleavage site score; S-score, signal peptide score; Y-score, combined cleavage site score.

mud loach	MRFIALAVTVLLAG-CQARFMQDAPPS---QLEHVKSVLQVYADQLKQSAHKALNHLDDT
carp	-----
Rainbow trout	MKFLALALTI LLAAGTQAFPMQADAPS---QLEHVKAALSMYI AQVKLTAQRS IDLLDDT
Atlantic Salmon	MKFLVLALTI LLAAGTQAFPMQADAPS---QLEHVKAALNMYI AQVKLTAQRS IDLLDDT
Zebra fish	MKFVALAL TLLLALGSQANLFQADAPT---QLEHYKAAALVYLNQVKDQAEKALDNLGDT
eel	MKFVALAL TVLLVAGSQARFLQADAPPPSQLEHVRAAVGMYLQQVKETAQKALEHLLDDT
Sea bream	MKFAALALALLAVGSHAASMQADAPS---QLDHARAVLDVYL TQVKDMSLRVAVNQLDDP
human	MKAAVLTAVLFLTGSQARHFVQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVVSQFEGS
Mouse	MKAVVLAVALVFLTGSQAWHVWQQDEP-QSQWDKVKDFANVYVDAVKDSGRDYVVSQFESS
mud loach	EF-KDYKGFLGQSVNDLHGYPQAHFQGI AP----FAGQFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQ
carp	-----LQGSVDNLHGYPQNGFQA I TP---- I GDQVLEATKDTREKL VKDVEELRKK
Rainbow trout	EY-KEYKMLTQSLDNLQQYADATSQSLAPYSEAFGTQL TDATAAVRAEVMKDVEELRSQ
Atlantic Salmon	EY-KEYKMLTQSLDNLQQFADSTSKSWPPTPRSS-APSCDATATVRAEVMKDVEDVRTQ
Zebra fish	DY-EQYKQLQSLSESLTKLQEYAQTTSQALTPYAETI STQLMENTKQLRERVMTDVEDLRSK
eel	EY-KDYKLRLSQSLDNI QGYI QSASAAALSPYTDVAVSSQFMELTKDMRDKI QADVQQLKKD
Sea bream	QY-AEFKTNLAQRIEEMYTQIKTLQGSVSPMTDSFYNTVMEVTKDTRRESLNVLDLEALKSS
human	ALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLRQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAK
Mouse	SLGQQNLNLLLNWDTL GSTVSQLQERLGPL TRDFWDNLEKETDWWVQEMNKDLEEVKQK
	* : : . * . . * : : .
mud loach	LEPKREELRAVIEKHFQEYSTELKPI VDEYLAKHDKEMAELKVKLEPVVESLQKQIPVNW
carp	I EPMRAELRQVLEKHLQEYRDELKPFVVEEYLTKHQKFL EEMRI KLEPVVKSLEKFGPNW
Rainbow trout	LEPKRAELKEVLDKHI DEYRKKLEPLIKEHI ELRRTEMEAFRAKMEPI VEELRAKVAI NV
Atlantic Salmon	LEPKRAELTEVLNKHIDEYRKKLEPLIKQHI ELRRTEMDAFRAKI DPVVEEMRAKVAVNV
Zebra fish	LEPHRAELYTALQKHI DEYREKLEPVFQEYSALNRQNAEQLRAKLEPLMDDIRKAFESNI
eel	LQPKRDELKEVVQKHLDEYRAKLEPLVKEYTEKHKQEMEELKTKLQPVEDLRARIQVNV
Sea bream	LAPQNEQLKQVIEKHLNDYRRTLTPINYDYKTKHDEEMAALKTRLEPVMEELRTKI QANV
human	VQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHV
Mouse	VQPYLDEFQKKWKEDVELYRQKVGPL-AELQESARQKLQELQGRSPVAEEFRDRMRTHV
	: * : : . . . : * : * : : : : : * : . . . : :
mud loach	EETKSKLLPILEIVRNKI TAQVQDLKAQLEPYIQDYKDSVEKGALEFREKVR--SGELRK
carp	EETKSKLMPILEAVREKVAEHLQDLKLLLEPYMQDYREQMEKGAQEFRQSVK--SGELRK
Rainbow trout	EETKTKLMPIVEIVRAKLERLEELRTLAAPYAEEYKEQMI KAVGEVREKVSPLSEDFKG
Atlantic Salmon	EETKTKLMPIVEIVRAKLERLEELRTLAAPYAEEYKEQMFKAVGEVREKVAPLSEDFKA
Zebra fish	EETKSKVPMVEAVRTELTERLEDLRTMAAPYAEYKEQLVKAVEEAREKI APHTQDLQT
eel	EETKSKLVPIVEAIRAKLERLEELRTLAEYVQYKDHLSALTDVKDKVQ--GEDLQS
Sea bream	EETKAVLMPVETVRTKTERLESLREVVPYVQYKEQMKQMYDQAQTVDT---DALRT
human	DALRTHLAPYSDELQRQLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQ
Mouse	DSLRTQLAPHSEQMRESLAQRLAELKSN--PTLN EYHTRAKTHLKTG EKARPALEDLRH
	: : : * : : * : : : * : . : * : :
mud loach	KMDELGAEVKPHFEAIFAALQKSFE--
carp	KMDELGRRR-----
Rainbow trout	QVGPAAEQAKQKLLAFYETISQAMKA-
Atlantic Salmon	RWAPPPRRPSKSSWLSTRPSARP----
Zebra fish	RMEPYMENVRTTFAQMYETIAKAIQA-
eel	KLKPYAEELKTKLVALWESLSQPKAS-
Sea bream	KITPLVEEIKVKMNAIFEIIAASVTKS
human	GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTO
Mouse	SLMPMLETLKTKAQSVIDKASETLTAQ

Figure 5. Alignment of amino acid sequences of the apolipoproteins.



Table 4. Sequence homology of the mud loach apolipoprotein at the amino acid levels

Specises	mud loach 254 aa	common carp 174 aa	Zebra fish 262 aa	eel 263 aa	rainbow trout 262 aa	Atlantic salmon 258 aa	Sea bream 260 aa	human 267 aa	Mouse 263 aa
mud loach	100	60	34	43	39	37	35	16	17
common carp		-	39	41	41	37	37	23	20
zebra fish			-	47	55	49	37	23	20
eel				-	53	47	42	25	22
rainbow trout					-	78	39	23	23
Atlantic salmon						-	35	22	21
sea bream							-	19	20
human								-	62
mouse									-

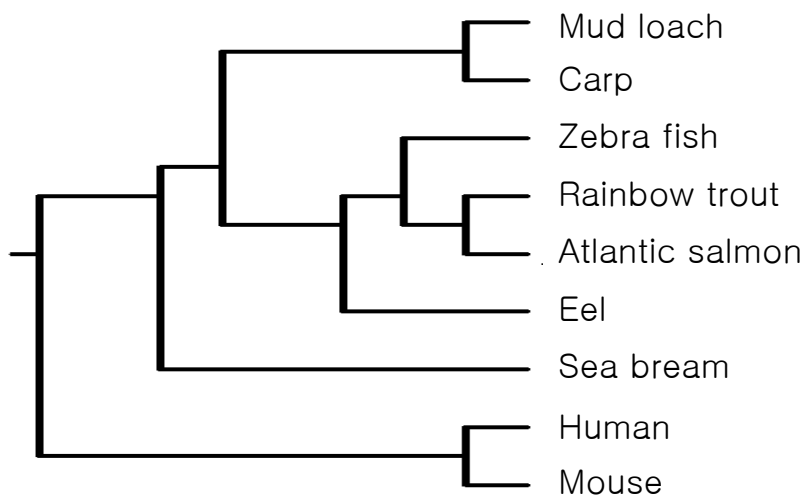


Figure 6. Phylogenetic tree of apolipoprotein based on amino acid sequences. Distances between amino acid sequences were estimated using PRODIST. The distance matrix was analyzed using the Neighbor-Joining method of NEIGHBOR. Lines are proportional to the estimated branch lengths.

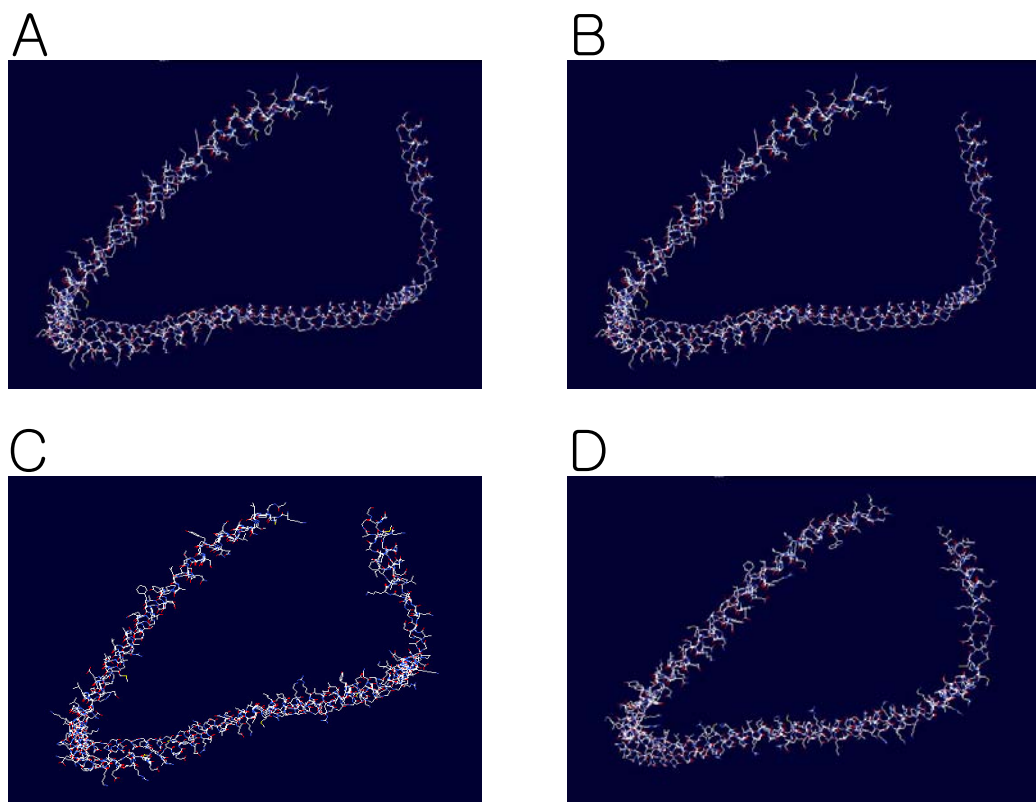


Figure 7. Tertiary structure of apolipoprotein reconstructed by automated protein structure homology-modeling server, SWISS-MODEL. A. mud loach; B. zebra fish; C. rainbow trout; D. mouse

**Table 5.** Comparison of plasmid form on gene expression following intramuscular injection in mud loach

Plasmid form	gene	No. of fish examined	CAT expression (pg/mg protein)
Circular	FV4CAT	5	18.25±1.48 <sup>a</sup>
	RSVCAT	5	13.14±1.26 <sup>b</sup>
Linear	FV4CAT	5	18.39±1.54 <sup>a</sup>
	RSVCAT	5	13.84±1.39 <sup>b</sup>

The expression was assayed by ELISA.



### 3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환어류 생산

#### 가. Microinjection을 통한 유전자 이식

##### (1) Microinjection의 최적 조건 조사

다양한 microinjection 방법에 따른 생존율과 부화율을 Table 6에 나타내었다. Table 6에서 보듯이 유전자를 microinjection 하지 않은 군의 초기 상실배와 생존율은 98%이었고 부화율은 86% 그리고 초기생존율은 76%로 나타났다. 그러나 주입하는 DNA 농도를 10 ~ 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 주사했을 때, 그의 상실배의 생존율과 부화율이 농도의 증가에 따라 크게 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 부화된 자어의 난황 흡수시까지 생존율은 각 실험군간 큰 차이가 없었다. Microinjection에 사용된 needle은 직경을 5 및 10  $\mu\text{m}$ 로 하여 미꾸라지 난에 주사한 결과 역시 구경의 크기가 커지면 생존율이 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 DNA의 형태에 따른 미꾸라지 수정란의 생존율은 두 형간 큰 차이가 없었다.

##### (2) 최적 microinjection 조건에 의한 유전자 이식

상기 연구에서 나타난 가장 효율적 microinjection 조건인 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DNA 농도로 5  $\mu\text{m}$  구경의 capillary를 사용 circular 와 linear DNA를 섞어 3쌍의 각각 암수로부터 수정된 미꾸라지 수정란에 microinjection 한 결과 유전자 이식율은 Table 7에서 보는 바와 같이 22 ~ 41%로 나타났고 평균 33.3%로 나타났다.

#### 나. Southern blot에 의한 유전자 삽입구도 분석

Southern blot에 의해 이식된 유전자의 삽입 형태를 조사한 결과는 Fig 9와 같이 나타났다. Southern blot에 의해 분석된 81미 중 27미가 southern positive pattern으로 나타났고 그들의 삽입형태를 분류한 결과 Fig 9에서 보듯이 11 type의 southern pattern을 나타내었다. 이들 11 type의 어류들은 모두 high molecular weight 부위에 band를 가지고 있었고, 대체로 1 ~ 2 copy가 핵내 DNA에 삽입된 형태였다.

Table 6. Factors affecting the viability of mud loach embryos subjected to various conditions of microinjection.

Factors	% viable embryo at morula stage	Hatching success (%)	Early survival up to yolk sac absorption (%)
Non-injected control	78	86	76
<i>DNA concentration (ug/ml)</i>			
10	62	42	84
20	57	26	86
40	42	20	80
<i>Diameter of capillary (um)</i>			
5	65	45	79
10	51	39	81
<i>DNA form</i>			
linear	64	45	88
circular	67	39	89

Average value of at least 3 observations

Table 7. Incidence of transgene in the hatched larvae developed from the eggs microinjected either with pmlectGH (for mud loach), pca $\beta$ -actfGH (for flounder), pca $\beta$ -actGH (for carp) or pHx $\beta$ -actGH (for greenling)

Species	Incidence of transgene (%)			Average (%)
	Trial I	Trial II	Trial III	
Mud loach	22	41	37	33.3 $\pm$ 10.01

Each transgene was detected with Southern blot analysis using randomly chosen 27 fish. Data indicate the presence of transgene in the fish as both integrated and extrachromosomal forms.



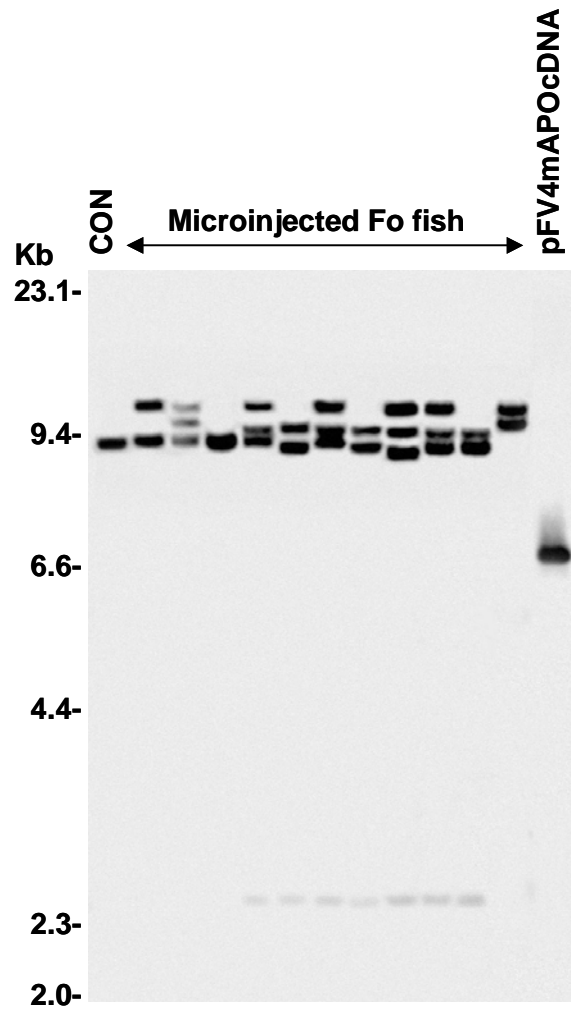


Figure 9. Representative Southern blot of transgenic Fo fish developed from the embryos injected with pFV4mAPOcDNA. DNA was digested with DraII, separated onto 0.8% agarose gel, and probed with DIG-labeled mud loach apolipoprotein cDNA. CON, non-injected control fish. Figures in left panel are molecular weight sizes determined by lambda/HindIII DNA marker.

**Table 8.** Serum level of total CHO (arbitrary reading value at 490 nm) in transgenic and non-transgenic mud loach. Each reading value is average of triplicate examinations

Exp. group	Incubation period	
	5 min	10 min
Control-1	234	221
Control-2	233	218
Control-3	197	210
Control-4	195	197
Control-5	175	182
Control-6	120	138
Mean±SD	192±43	194±31
Transgenic-1	120	128
Transgenic-2*	262	277
Transgenic-3*	268	271
Transgenic-4	224	230
Transgenic-5*	272	296
Transgenic-6	199	208
Transgenic-7*	259	266
Transgenic-8	183	174
Transgenic-9	223	221
Transgenic-10*	345	368
Transgenic-11*	349	370
Transgenic-12*	299	326
Transgenic-13*	392	445

\* Labels might be individuals showing significantly higher level of total CHO by over-expression of transgene

**Table 9.** Serum level of HDL-CHO (arbitrary reading value at 655 nm) in transgenic and non-transgenic mud loach. Each reading value is average of triplicate examinations

Exp. group	Incubation period	
	5 min	10 min
Control-1	108	119
Control-2	102	124
Control-3	121	137
Control-4	115	125
Control-5	93	98
Control-6	118	126
Mean±SD	110±11	121±13
Transgenic-1	97	94
Transgenic-2*	209	213
Transgenic-3*	141	166
Transgenic-4*	174	180
Transgenic-5*	131	175
Transgenic-6*	184	195
Transgenic-7*	191	188
Transgenic-8*	174	181
Transgenic-9*	209	234
Transgenic-10*	162	189
Transgenic-11*	210	239
Transgenic-12*	207	240
Transgenic-13*	218	261

\* Labels might be individuals showing significantly higher level of HDL-CHO by over-expression of transgene

**Table 10.** Brief summary of transgenic lines containing pFV4mAPOcDNA

LINE	Relative fold (%) to control at 10 min incubation		Summary
	TOTAL CHO	HDL-CHO	
Transgenic-1	66	77	• Contain the transgene, but not express the transgenic mAPOI cDNA
Transgenic-2	143	176	• Moderate increases in both • total CHO ↑ < HDL-CHO ↑
Transgenic-3	140	137	• Moderate increases in both • total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-4	118	148	• Moderate increase only in HDL-CHO
Transgenic-5	153	144	• Moderate increases in both • total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-6	107	161	• Moderate increase only in HDL-CHO
Transgenic-7	137	155	• Moderate increases in both • total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-8	90	149	• Moderate increase only in HDL-CHO
Transgenic-9	114	193	• Significant increase in only HDL-CHO
Transgenic-10	190	156	• Significant increase in total CHO • Moderate increase in HDL-CHO • total CHO ↑ > HDL-CHO ↑
Transgenic-11	191	197	• Significant increases in both • total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-12	168	198	• Moderate increase in total CHO • Significant increase in HDL-CHO • total CHO ↑ < HDL-CHO ↑
Transgenic-13	229	215	• Significant increases in both • total CHO ↑ = HDL-CHO ↑

다. 유전자 발현 유무 분석

60미의 대조군 어류와 형질전환어류(TG)중 분석시 까지 살아남은 13미의 Fo 어류를 대상으로 T-CHO를 분석한 결과 control group의 T-CHO reading value는 190정도 나타났다. 그러나 TG Fo군에 있어서는 128 ~ 445로 나타나 개체에 따라 다양성을 보여주었다. 가장 많은 T-CHO 치를 보인 개체는 대조군 어류에 비해 약 2.3배의 발현율을 나타내었다(Table 8).

HDL-CHO의 분석결과에 있어서도 대조군은 10분간 incubation시 120 정도의 수치를 나타내었으나 TG group의 경우 94 ~ 261로 나타나 HDL 농도도 개체에 따라 최대 2.2배까지 증가되는 경향을 보였다(Table 9).

Table 10은 TG Fo 어류의 개체간 T-CHO와 HDL-CHO 양의 분석에 따른 각 개체간 Apo-A1 유전자의 발현정도를 보여주고 있다. Table 10에서 보듯이 대조군보다 두 수치가 모두 낮은 개체(TG 1), 대조군보다 두 수치가 모두 약간 높은 개체(TG 2, 3, 5 & 7) 그리고 둘 중 한 개의 수치만 높은 개체(TG4, 6, 8, 9, 10 & 12) 그리고 두 개의 수치가 모두 높은 개체(TG 11, 13)으로 나눌 수 있었다.

라. Stable line 확보를 위한 F<sub>1</sub> 생산

(1) 대조군과 교배 F<sub>1</sub> 생산

형질전환 Fo 어류 중 T-CHO와 HDL-CHO 중 특히 HDL-CHO의 발현 농도가 모두 높았던 TG 6과 TG 9의 정자를 대조군 암컷과 수정시킨 후 그의 부화율과 초기 생존율은 Table 11과 같이 나타났다. Table 11에서 보듯이 암컷의 난질에 따른 부화율의 차이는 관찰되었으나 부화된 개체의 초기 생존율이나 TG Fo 어류에 따른 부화율, 초기 생존율의 차이는 나타나지 않았다.

(2) F<sub>1</sub>의 발현 양상

TG 6 및 TG 9로부터 얻어진 20마리의 물고기의 혈중 T-CHO 및 HDL-CHO 농도로 그들의 발현 양상을 분석한 결과는 Table 12와 같다.

**Table 11.** Hatching rate and early survival of two different F<sub>1</sub> transgenic lines

Female No.	Male No. (TG)	Hatching rate (%)	Early survival (%)
1	TG 6	83.5	85.9
	TG 9	81.4	88.8
2	TG 6	75.6	87.5
	TG 9	77.4	86.4

Table 12. Germ line transmission and expression of apolipoprotein activity determined by blood concentration of T-CHO and HDL-CHO

TG fish number	Incidence of TG fish (%)	Range of T-CHO (mg/dl)	Range of HDL-CHO (arbitrary unit)
6	TG 14/20 (70)	354 ~ 532	279 ~ 508
	NTG 6/20 (30)	292 ~ 324	203 ~ 246
9	TG 17/20 (85)	407 ~ 518	340 ~ 682
	NTG 3/20 (15)	240 ~ 361	195 ~ 279

TG 6 F<sub>1</sub> 어류의 경우 분석된 20마리 중 14마리에서 T-CHO와 HDL-CHO의 농도가 유의하게 증가함이 관찰되었고 그 범위는 T-CHO의 경우 354 ~ 532 mg/dl 혈청이었다. HDL-CHO의 경우 arbitrary value가 279 ~ 508로 나타나 대조군에 비해 1.4 ~ 2.2배 증가되는 것으로 나타났다.

TG 13 F<sub>1</sub> 어류의 경우에는 17마리에서 모든 분석치의 증가를 보여 85%의 빈도로 TG 어류가 존재하는 것으로 나타났으며 T-CHO의 증가치와 HDL-CHO의 증가치 모두에서 TG 6 F<sub>1</sub> 어류 수치보다 약간 높은 경향을 보여 TG 9의 F<sub>1</sub> fish의 Apo-A1 유전자 발현율이 TG 6보다 약간 높은 것으로 나타났다.

#### 4. Cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환 어류의 cholesterol 농도 변화

가. 돼지 비계 사료 공급에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

4일간 대조군 사료를 먹인 개체들의 T-CHO의 혈중 농도는 236.5이었다. 그러나 5% 돼지비계를 4일간 공급한 실험군의 혈중 T-CHO의 농도는 78%가 증가된 301.0으로 나타나 유의한 증가를 보였다. 이는 미꾸라지의 경우에 있어서도 cholesterol의 농도가 증가된 사료를 공급하면 혈중 CHO가 증가된다는 결과를 말해준다. 그러나 10%의 돼지 비계를 공급한 군의 경우 사육시 관찰결과 먹이 섭취가 지극히 저조하였고, 혈중 T-CHO 농도를 측정 한 결과 대조군과 별 차이가 없이 나타났다(Table 13).

나. Cholesterol 농도 및 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

(1) 대조군 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 나타나는 농도 및 처리 시간에 따른 변화

상기의 예비 실험결과를 바탕으로 cholesterol을 사료에 다양한 농도로 섞어 6일간 대조군에 공급한 결과 처리 기간에 따라 T-CHO와 HDL-CHO에



Table 13. Plasma T-CHO level in control mud loach treated for 4 days with fat from pig

Experimental group	T-CHO <sup>*</sup>	
	day 0	day 4
Control	205.0 ± 0.02	236.5 ± 0.045
5%	-	301.0 ± 0.040
10%	-	224.5 ± 0.044

\* Arbitrary unit

서 모두 유의한 증가를 보였다. T-CHO 분석결과 대조군의 경우 처리기간이 증가함에 따라 유의한 증가가 관찰되지 않았으나 1 ~ 4% CHO 공급군은 모두 처리기간에 따라 유의한 증가를 보였고 특히 4% 처리군의 경우에는 공급 2일째부터 유의한 차이를 보여 공급 6일째에는 대조군에 비해 거의 1.6배인 433 mg/dl의 T-CHO 농도를 보였다(Table 14). 혈중 HDL-CHO의 경우에 있어서도 T-CHO와 유사한 경향을 보였다. 즉 대조군은 모두 처리구에서 동일한 HDL-CHO의 혈중 농도 값을 보여 주었으나 여타 처리군에 있어서는 농도에 따라 뚜렷한 HDL-CHO 양의 증가를 보여 주었다. 특히 T-CHO의 경우와 마찬가지로 4%, 6일 처리군은 대조군에 비해 2.39배인 251 mg/dl의 혈중 농도를 보여 미꾸라지에 있어 cholesterol 양이 높은 사료를 공급할 때 혈중 T-CHO 및 HDL-CHO의 양이 모두 증가된다는 것을 알 수 있었다.

(2) 형질전환 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

상기 실험에서 4%의 CHO 처리가 대조군 미꾸라지의 T-CHO 및 HDL-CHO가 증가된다는 것이 밝혀졌으므로 이 실험에서는 TG fish의 혈중 내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도를 분석하였다. 그결과 CHO 무첨가 사료 공급군(control 1)은 실험 4(1)의 결과와 마찬가지로 실험기간 중 전혀 변화가 없었다. 또한 4% 공급 대조군의 결과도 상기실험 나(1)의 경과와 마찬가지로 T-CHO 및 HDL-CHO의 농도가 모두 처리기간에 따라 증가되는 향상을 보였다. 그러나 TG 6 및 TG 9의 형질전환 어류군은 T-CHO의 경우 약간 증가하는 경향을 보였으나 control 2에 비해 그리 큰 증가는 아니었다. 그러나 HDL-CHO의 경우 처리 4일자에는 TG 6 군은 1.3배 및 TG 9군은 1.7배가 대조군에 비해 증가되는 경향을 보였고 처리 6일 후에 TG 6군은 무려 1.8배, TG 9군은 2.3배가 증가되는 경향을 보여 주었다(Table 15).

**Table 14.** Plasma total cholesterol and HDL-cholesterol levels in control mud loach treated for 6 days with various concentrations of cholesterol

Dose (%)	T-CHO (mg/dl)				HDL (mg/dl)			
	0 day	2 day	4 day	6 day	0 day	2 day	4 day	6 day
0	271	278	260	274	119	106	121	105
1	265	311	346	366	115	118	180	161
2	276	325	302	335	124	180	208	164
4	272	366	392	433	108	215	203	251

\* Average data from 4 fish. Each plasma samples were calculated 4 times.

**Table 15.** Plasma T-CHO and HDL-CHO levels in two different transgenic lines and non transgenic mud loach treated for 6 days with 4% cholesterol feed

Exp. group	T-CHO (mg/dl)				HDL-CHO (mg/dl)			
	0 day	2 day	4 day	6 day	0 day	2 day	4 day	6 day
Control 1*	266	255	271	266	120	148	196	153
Control 2**	270	351	373	363	119	133	126	156
TG 6**	281	293	391	398	202	214	247	276
TG 9**	323	411	467	433	250	261	339	354

Average data from 8 fish. Each plasma samples were calculated 4 times.

\* Feed without cholesterol.

\*\* Feed with 4% cholesterol.

다. Fenofibrate 처리 기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

1%의 fenofibrate를 공급한 후 대조군에 있어서는 T-CHO 및 HDL-CHO 모두에서 처리 기간에 따라 약간의 증가는 관찰되었으나 처리 시간에 따른 유의한 차이는 없었다. 그러나 TG 9 F1 어류에 fenofibrate를 공급한 경우에는 처리 6일 후 T-CHO는 1.1 배, 그리고 HDL-CHO의 경우 1.8배의 증가를 보였다. 처리 10일 후에도 이들보다 약간 더 큰 증가를 보여 T-CHO는 1.3배, HDL-CHO는 1.8배의 증가를 보여 time dependent한 양상을 보여주었다(Table 16).

**Table 16.** Plasma T-CHO and HDL-CHO levels in transgenic line (TG 9) and nontransgenic mud loach treated for 10 days with 1% fenofibrate

Exp. group	T-CHO (mg/dℓ)			HDL (mg/dℓ)		
	0 day	6 day	10 day	0 day	6 day	10 day
Control 1	272	345	326	126	200	204
TG 9	273	395	432	208	363	370

Average data from 11 to 15 fish. Each plasma samples were calculated 4 times.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

본 연구는 apolipoprotein 유전자를 미꾸라지로부터 찾는 것이 우선의 연구 목표였으나 연구 결과에서 보듯이 본 연구진은 미꾸라지뿐만이 아니라 상어 및 hagfish로부터도 apolipoprotein 유전자를 탐색하고 클로닝하는 등 연구 계획 및 목표를 상향 조정하여 우수한 유전자를 찾고자 노력하였으며 그 결과 혈중 HDL-CHO를 크게 높이는 apolipoprotein 유전자는 분석한 14개중 미꾸라지 유래 apolipoprotein A1 유전자이었다.

제 3 장의 연구결과에서 보듯이 상기한 내용에서 찾아낸 미꾸라지 apolipoprotein A1 cDNA 유전자를, 미꾸라지에서 발현율이 높은 promoter인  $\beta$ -actin promoter (FV4a)에 부착시켜 이식용 벡터를 개발하였고, 이들을 직접 미꾸라지 수정란에 이식한 후 이의 발현 유무를 실제 혈중 T-CHO 및 HDL-CHO를 이용하여 검토하였음.

최초 실험실에서 이식용 벡터가 합성되면 이 외래 유전자의 발현을 in vitro 수준에서 분석하는 것이 연구계획이었으나 본 연구실의 어류유전자 이식 기술을 이용하여 직접 in vivo 수준에서 apolipoprotein A1 유전자의 발현을 분석하고 형질전환 어류를 얻었기 때문에, 실험 개시시에는 유전자를 이식한 형질전환체의 Fo만을 생산하는 것이 연구의 최종 목표였으나 과제 담당관(수산과학원 김경길 박사)과 상의하여 이를 상향 조정 F<sub>1</sub>을 생산하고 실제 양식 산업에 이용할 수 있도록 다양한 종류의 사료를 공급하면서 유도된 형질전환 미꾸라지의 apolipoprotein A1 유전자의 효용성과 생산된 F<sub>1</sub> 미꾸라지의 신기능성 어류로서의 능력도 검증하였음.

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

본 연구결과는 수해양 분야의 유전자이식 연구 중 세계 최초로 유용물질을 다량 축적한 새로운 기능을 가진 형질전환 어류를 개발한 연구결과이다. 그간의 어류 유전자이식 연구는 주로 성장과 내병성에 주안점을 두었으며 단지 핀란드의 연구그룹이 무지개송어를 대상으로 유용물질 축적 어류를 생산하고자 하였으나 실패한 바 있다.

따라서 본 연구결과는 앞으로 동일 방법을 이용 학술적으로 고 효율의 신기능성 어류를 유전자이식 기법에 의해 생산할 수 있음을 증명함과 아울러 고품질의 미꾸라지를 양식할 수 있는 길이 열렸으며, 기존 보고된 고성장 및 내병성 미꾸라지와 교배 등에 의해 다기능성 형질전환어류를 쉽게 생산 양식 생산성 향상에 기여할 것이다.

또한 본 연구에서 얻어진 apolipoprotein A1 유전자는 그의 활성이 여타 포유류에서 보고된 것 보다 높아 앞으로 동맥경화를 방지하기 위한 의약품 생산 연구에 쓰일 수 있을 것이다.



## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

본 연구결과의 최초의 목표는 그간의 재배식 어류 이용사업이 1차 산업에 머물러 있으므로 이들의 유전자를 이용 고부가가치 의약품을 생산할 수 있는 시스템으로 개발하여 3차 산업화함으로서 생산성의 극대화를 꾀하는 것이었다. 따라서 당초 연구계획은 1차년도에 유전자를 개발하여 이의 효능을 검사한 후 2차년도에 이들을 이용 생화학적 및 생화학공학적 기법에 의해 *in vitro* 상태에서 apolipoprotein을 생산하며, 1차년도에서 유도된 형질전환 어류의 F<sub>1</sub>을 받아 양식산업에 적용하는 것이었다.

그러나 사정상 연구비가 당초 2년에서 1년으로 단축되어 본 연구에서는 최초 연구계획의 1차년도와 2차년도 연구 중 양식산업적용 가능성만이 타진되었다. 따라서 연구비의 추가 투입에 의해 본 연구결과 만들어진 유전자의 *in vivo* 활용을 통한 인간의 동맥경화 억제제에 대한 개발이 필요할 것으로 사료된다.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구에서 얻어진 apolipoprotein 유전자는 그 기능성이 기존에 보고된 포유류의 결과들 보다 비록 어류계이기는 하나 매우 강력하였다(약 1.5배). 따라서 이 유전자를 이용 transgenic mouse 등을 만들어 포유류에서 본 유전자의 효율성 검토가 필요할 것이다.

### 제 3 절 상업화 추진방향

유도된 형질전환 미꾸라지는 생명공학의정서가 발효된 후 양식산업계를 통해 산업화가 추진될 수 있을 것이다. 이를 위해 본 연구진은 유도된 유전자와 형질전환 어류를 특허출원 할 것이다.

## 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술 정보

현재 어류 유전자 이식기법을 이용한 신기능성 어류의 개발은 다음의 4가지가 매우 중요한 것으로 조사되었다.

### 1) Transgenic Fish with Improved Freeze Resistance by Antifreeze Gene Transfer

- Dr. Garth Fletcher : Ocean Sciences Centre, Memorial University of Newfoundland
- Dr. Peter Davies : Department of Biology and Biochemistry, Queen's University
- Dr. Choy Hew : Department of Biological Sciences, National University of Singapore

### 2) Production of Disease Resistant Transgenic Salmonids Expressing Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes at all Temperatures

- Dr. Brian Dixon : Department of Biology, University of Waterloo
- Dr. Patricia Schulte : Department of Biology, University of Waterloo
- Dr. Matt Vijayan : Department of Biology, University of Waterloo
- Dr. Patrick Woo : Department of Zoology, University of Guelph
- Dr. Garth Fletcher : Ocean Sciences Centre, Memorial University of Newfoundland

### 3) Improved Freeze and Stress Resistance with Glycerol

- Dr. K. Vanya Ewart : NRC Institute for Marine Biosciences
- Dr. William Driedzic : Ocean Sciences Centre, Memorial University of Newfoundland

### 4) Production of Transgenic Tilapia for the Treatment of Diabetes : ES-cell Approach

- James R. Wright, Jr., MD, PhD : Department of Pathology, IWK Grace Health Centre
- Dr. Bill Pohajdak : Department of Biology, Dalhousie University

## 제 7 장 참고문헌

보고서이므로 서술시 참고문헌을 제외하였음.

특허와 논문으로 출판할 예정이므로 이때 참고문헌을 인용할 것 임.