

597.08
L 293 6

최 종
연구보고서

GOVP 12009312

어류로부터 생리활성 유전자의 발굴과 실용화 연구
Studies on excavation and practical use of
biologically active genes from fish

어류 산란유도 유전자의 실용화 연구
(Development studies on gonadotropin releasing
hormone for practical use)

연골어류 혈관생성 억제 유전자의 발굴과 그 응용연구
(Cloning and application of angiogenesis
inhibitor genes from cartilaginous fishes)

연구기관

국립수산진흥원
부산대학교 분자생물학과

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “어류로부터 생리활성 유전자의 발굴과 실용화 연구에 관한 연구” 과제 (제 1 세부과제 : 어류 산란유도 유전자의 분리와 실용화 연구, 제 2 세부과제 : 연골어류 혈관생성 억제 유전자의 발굴과 그 응용연구) 의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. .

주관연구기관명 : 부산대학교

총괄연구책임자 : 김 규 원

연 구 원 : 이 재 동

연 구 원 : 김 영 진

연 구 원 : 송 현 석

연 구 원 : 김 지 태

연 구 원 : 김 명 순

연 구 원 : 김 기 영

협동연구기관명 : 국립수산진흥원

협동연구책임자 : 이 상 준

연 구 원 : 김 윤

연 구 원 : 백 혜 자

연 구 원 : 이 정 호

연 구 원 : 이 종 휘

연 구 원 : 진 현 주

요 약 문

I. 제 목

어류로부터 생리활성 유전자의 발굴과 실용화 연구

제 1 세부과제 : 어류 산란유도 유전자의 실용화 연구

제 2 세부과제 : 연골어류 혈관생성 억제 유전자의 발굴과 그 응용연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

제 1 세부과제

어류 산란유도 유전자 (GnRH: gonadotropin releasing hormone)는 고나도트로핀 (GTH: gonadotropin)의 생성을 유도하는 유전자로 잘 알려져 있다. 어류가 산란하기 위해서는 성성숙이 일어나야 하는데 그것을 산란유도유전자 (GnRH)가 고나도트로핀의 생성을 유도하고, 분비된 고나도트로핀이 성성숙을 유도할 수 있다고 알려져 있다. 이러한 산란유도유전자 (GnRH)의 유사성을 이용하여 양식어종을 대상으로 화학적으로 합성된 산란유도 단백질을 이용한 산란유도 연구가 진행되었고 어종에 따라 좋은 효과를 나타내기도 하였다.

그러나 산란유도 단백질은 길이가 짧기 때문에 유전공학적으로 생산할 수 있는 기술이 미흡하여 지금까지 화학적으로 합성되어 고가로 판매되므로 양식현장에서 활용은 매우 어려운 실정이다. 유전공학적으로 산란유도 단백질을 대량생산하기 위해서는 산란유도 유전자의 반복된 DNA를 클로닝할 수 있는 기술, 산란유도 단백질의 다중체를 생산할 수 있는 기술, 산란유도 단백질 다중체로부터 산란유도 단백질 단일체를 분리하고 회수할 수 있는 기술이 확보되어야 한다. 하지만 짧은 단백질의 복합체를 사슬형태로 생산할 수 있는 기술과 짧은 단백질의 단일체를 효율적으로 회수할 수 있는 방법이 개발되지 못하였다.

그러므로 본 연구에서는 지금까지 유전공학적으로 생산하지 못하고 있는 산란유도 단백질을 효율적인 방법으로 대량생산할 수 있는 기술을 개발하여 산란유도 단백질을 저가로 어민에게 보급함으로써 첨단기술을 이용한 양식기술개발로 양식어종의 계절적 피해를 방지하고 또 새로운 어종의 양식화 개발을 위해 유전공학적으로 생산된 어류산란 유도단백질을 실용화하고자 한다.

제 2 세부과제

연골 (cartilage)은 다른 조직에 비해 특이적으로 혈관이 드물게 분포된 조직으로, 이 조직에는 혈관생성 (angiogenesis) 억제 단백질이 합성되어 혈관생성 억제작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 상어를 비롯한 연골어류는 그 연골의 양이 다량 존재하고, 그 연골에 포함된 혈관생성 억제 단백질의 활성이 매우 높은 것으로 보고되어 있다. 따라서 연골의 혈관생성억제인자는 혈관생성이 과다한 질병인 악성암, 류마티스성 관절염, 만성염증 등의 예방과 치료제로 활용될 수가 있다. 실제로 상어연골 추출물이 관절염 치료제, 또는 항암제로서의 효능이 있다고 하여 민간에서 사용되고 있는 실정이나 이에 대한 본격적인 연구는 추진되지 않고 있는 상태이다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 근해에 서식하는 두툽상어 (*Scyliorhinus torazame*)의 연골조직에서부터 혈관생성 억제단백질의 활성을 확인하고, 그 구체적인 혈관생성억제 인자들을 동정한 후, 이들 인자들이 악성암의 혈관생성억제 및 항진에 대한 항암작용을 검증하여 어류로부터 난치성 악성암 및 혈관생성관련 질병에 대한 새로운 의약품의 개발을 시도하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 유전공학기법에 의한 해양생물의 유전자원개발과 이의 실용화를 위하여 다음 두가지 연구분야를 설정하여 효율적으로 추진하고자 하였다.

제 1세부과제 : 어류 산란유도 유전자의 실용화 연구

1. 산란유도 유전자의 반복적 클로닝 기술 개발

지금까지 유전공학적 방법은 비교적 길이가 긴 단백질을 생산하는데 효율적이지만, 짧은 단백질을 생산하는 데에는 비효율적이었다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 일시적으로 반복된 DNA를 클로닝할 수 있는 기술, 짧은 단백질의 다중체를 생산할 수 있는 기술, 다중체로부터 짧은 단백질 단일체를 분리하고 회수할 수 있는 기술이 확보되어야 한다. 하지만 짧은 단백질을 다중체의 사슬형태로 생산할 수 있는 기술과 짧은 단백질의 단일체를 효율적으로 회수할 수 있는 방법이 개발되지 못하였다. 그러므로 본 연구에서 절단될 수 있는 연결단백질을 원래의 단백질 양쪽에 연결하여 변형된 단백질을 만들고, 합성 DNA 단일체 카세트에 반복된 DNA 다중체의 카세트를 만들어, 연결단백질과 원래의 단백질을 연속적으로 반복되게 생산할 수 있는 DNA 카세트를 만드는 방법을 개발한다.

2. 산란유도 단백질의 최적 발현을 위한 벡터 재구성

지금까지 어류 산란유도 유전자는 발현이 되지 않는다고 알려져 왔다. 산란유도 단백질을

유전공학적으로 발현시키기 위해 제 1 차년도에 산란유도 유전자의 DNA 카세트를 반복적으로 pPROEX-1 벡터에 클로닝하였으나 매우 적은 양이 발현되었다. 발현이 잘 되지 않은 이유는 아마도 이 클론된 벡터의 mRNA의 translation 시작부위가 hair pin구조를 형성하여 효과적인 translation을 방해했다고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 효율적인 발현을 위해 translation이 개시되는 뉴클리오타이드를 RNA secondary structure가 최소한의 에너지를 갖도록 디자인한 합성 DNA를 사용하여 발현을 용이하게 최적화 시킬 수 있도록 발현벡터를 재구성하고자 한다.

3. GnRH 유전자의 실용화 연구

유전공학적으로 대량 생산될 cGnRH-II(chicken gonadotropin releasing hormone II)의 유사체가 활성을 가지는가를 조사한 뒤 클로닝된 벡터로부터 산란유도 단백질을 대량생산하기 위해서 cGnRH-II 유사체를 화학적으로 합성하여 어류뇌하수체를 이용하여 GTH(gonadotropin hormone) 유도효능을 조사하고, 만약 cGnRH-II 유사체가 GTH 유도 효능을 가지고 있으면 유전공학적으로 cGnRH-II 다중체를 대량생산한다. 또한 단백질 분리가 잘 확립되어 있는 His-tag를 이용한 분리방법을 확립하고, cGnRH-II 단백질의 다중체를 대량으로 생산 분리하여, 트립신으로 절단한 뒤 생겨난 cGnRH-II 유사체의 아미노산 서열을 확인하고, 대량생산하여 testosterone 유도효능을 조사함으로써 인공산란 유도효능 여부를 조사하고자 한다.

제 2세부과제 : 연골어류 혈관생성 억제 유전자의 발굴과 그 응용연구

1. 연골어류로부터 혈관생성억제활성의 조사 및 유전자 클로닝

연골은 다른 조직에 비해 특이적으로 혈관이 드물게 분포된 조직으로, 이 조직에서는 혈관생성 억제인자가 합성되어 혈관생성 억제작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 상어를 비롯한 연골어류는 그 연골의 양이 다량 존재하고, 그 연골에 포함된 혈관신생 억제 물질의 활성이 매우 높은 것으로 보고되어 있으나 아직 구체적인 인자의 동정은 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구에서는 연골어류 중 가오리와 우리나라 근해에서 서식하는 두툽상어의 연골을 대상으로 그 추출물에 대한 혈관생성 억제 효능을 조사하고, 두툽상어 조직으로부터 cDNA library 합성하여 그 library로부터 혈관생성에 관련된 유전자를 클로닝하고자 한다.

2. 연골어류 혈관생성억제 유전자의 분석 및 기능조사

두툽상어 연골조직 뿐만 아니라 다른 여러 조직에서 추출한 RNA부터 3', 5' RACE 및 RT-PCR등의 방법을 수행하여 혈관생성에 관여하는 유전자의 일부 및 전체 염기 서열을 클로닝하고, 상어로부터 동정된 유전자와 이미 밝혀진 다른 종의 유전자의 단백질 수준에서 구조적 특징과 mRNA 수준에서 조직 특이적 발현을 조사할 예정이다.

3. 연골어류 혈관생성억제 유전자의 발현벡터 시스템의 확립 및 항암 효능 조사

2차년도에서 밝힌, 이들 혈관생성에 관련된 유전자들의 발현 벡터 시스템의 구축을 위해 먼저 full-length TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) 및 MT3-MMP (membrane-type 3 matrix metalloproteinase)의 발현벡터를 구축하고자 한다. 구축된 발현벡터로부터 대량의 단백질을 발현시킬 수 있는 조건을 개발하고, 이들 대량발현 시스템으로부터 혈관생성 억제 또는 유도에 작용하는 단백질을 획득하고자 한다. 또한 단백질 수준에서 이들 유전자들이 혈관 생성 억제 혹은 촉진에 어떠한 효과를 나타나는지 조사하고, 본 실험실에 구축된 *in vitro* angiogenesis assay, *in vitro* invasion assay, wounding migration assay와 *in vivo* CAM assay 등을 통해 악성암의 혈관생성억제 및 항진에 대한 항암작용과 허혈성 질환에 대한 혈관생성 촉진 작용을 검증하여 어류로부터 난치성 악성암 및 혈관생성관련 질병에 대한 새로운 의약품의 개발을 시도하고자 한다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

제 1세부과제 : 어류 산란유도 유전자의 실용화 연구

1. 산란유도 유전자(GnRH)의 디자인, 합성 및 클로닝

유전공학적인 방법을 사용하여 짧은 펩타이드인 산란유도 단백질을 효율적으로 생산하기 위해서 산란유도 단백질의 염기서열을 반복적으로 클로닝할 수 있는 독창적인 방법을 확립하였다. 첫 번째, 여러 가지 종류의 절단될 수 있는 새로운 연결 펩타이드를 디자인하였고, 두 번째 연결펩타이드를 원래의 펩타이드 양쪽에 붙여 변조된 펩타이드의 기본구조를 디자인하였고, 세 번째, 변조된 기본단위 펩타이드의 뉴클리오타이드를 연역하였고, 네 번째, 반복적으로 클로닝할 수 있도록 변조된 펩타이드의 기본구조에 해당하는 합성 DNA를 디자인하고 합성하였고, 다섯 번째, 변조된 펩타이드의 기본구조에 해당하는 합성 DNA를 반복적으로 연결하여 하나의 DNA 카세트를 만들었다. 실험을 통해서 우리는 디자인된 3' 돌출 cGnRH-II(M) 합성 DNA가 3개까지 쉽게 연결됨을 확인하였고, 그것은 클로닝 동안 *recA+* 형 균주내에서도 안정하였다.

2. GnRH 유전자의 발현 및 안정성 연구

클로닝된 산란유도 유전자 cGnRH-II(M)-3R DNA를 발현벡터 pRSET-B vector에 재클로닝하였으나, 발현이 잘 되지 않았다. 발현이 잘 되지 않은 이유는 아마도 처음 디자인한 synthetic DNA에 의해서 생성된 mRNA의 translation시작부위가 hair pin구조를 형성하여

효과적인 translation을 방해했다고 생각된다.

그러므로 본 연구에서는 발현벡터의 발현율을 증가시키기 위해, 우리는 RNA 이차구조의 에너지 ΔG 값을 기본으로 Met-linker peptide-cGnRH-II 부분의 올리고뉴클레오타이드를 디자인하여, 낮은 ΔG 값을 가진 염기서열을 사용하여 성공적으로 반복된 산란유도 단백질 다중체를 생산할 수 있었다.

발현된 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과 산란유도 단백질을 반복적으로 생산하기 위해 디자인한 염기서열로부터 번역된 아미노산서열과 동일한 아미노산 서열이 확인되어 짧은 펩타이드 다중체를 용이하게 생산할 수 있는 방법을 확립하였고, 발현된 산란유도 단백질의 다중체의 최적발현조건을 조사하였으며, 발현된 단백질은 대장균 내에서 매우 안정하였다.

3. GnRH 유전자의 실용화 연구

본 연구에서는 유전공학적으로 생산될 cGnRH-II의 유사체를 대량생산하기 전에 화학적으로 합성한 동일한 산란유도 단백질의 유사체가 GTH 유도 여부를 조사한 뒤 클로닝된 벡터로부터 산란유도 단백질을 대량생산하여 트립신으로 4반복 연쇄발현된 펩타이드 다중체를 절단하여 산란유도 단백질을 고효율적인 방법으로 생산하였다.

절단된 cGnRH-II 유사체 단편의 아미노산 서열을 분석한 결과 디자인한 아미노산 서열을 정확히 가진 (Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-Gly-Lys), cGnRH-II(Gly11, Lys12)가 정확히 생산되어 대량생산 방법을 완전히 확립하였다.

이 생산된 cGnRH-II-(Gly11, Lys12)는 testosterone의 유도력을 가지고 있어 생체가 가지고 있는 amidated된 cGnRH-II 중간체의 하나로서 carboxypeptidase E에 의해서 C-말단의 Lys12가 제거되고, 계속해서 peptidyl glycine alpha-amidating monooxygenase에 의해서 amidated 된 cGnRH-II된 형태로 변환되어 testosterone의 생성을 유도했다고 사료되어 아미노산 유도체를 가지고 있는 화학적으로 합성된 산란유도 단백질보다 생체가 가지고 있는 중간체를 사용하기 때문에 더욱 안전한 물질로 사료된다.

제 2세부과제 : 연골어류 혈관생성 억제 유전자의 발굴과 그 응용연구

1. 연골어류로부터 혈관생성억제활성의 조사 및 유전자 클로닝

연골어류의 연골추출물에서 혈관생성억제활성을 조사하기 위해 *in vivo* CAM assay를 실시한 결과, 가오리 연골 추출물에서는 약한 혈관형성 억제효과를 관찰하였으나, 상어연골 추출물에서 강한 혈관생성억제효과를 관찰하였다. 또한 *in vitro* assay 방법인 MTT assay에 의해 상어 연골 추출물이 CPAE (Calf Pulmonary Arterial Endothelial) 세포 증식을 억제하는 효과를 관찰하였고, wounding migration assay에 의해 세포의 이동을 억제하는 작용이 있음을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 상어연골 추출물에 혈관형성 억제물질이 있음을 추측할 수 있었다. 또한, 두툽상어의 살 및 뇌 cDNA library를 합성하여 혈관생성조절에 관여

되는 MT-MMP 유사 cDNA클론을 확보하였다.

2. 연골어류 혈관생성억제 유전자의 분석 및 기능조사

두툽상어 연골조직에서 추출한 RNA부터 3', 5' RACE 및 RT-PCR 등의 방법을 수행하여 혈관생성 억제에 관여하는 full-length TIMP-3 cDNA의 전체 염기 서열을 클로닝하여 이미 밝혀진 포유동물 TIMP-3와 비교하여 그 단백질의 구조적 특징을 조사하였으며, 동정된 TIMP-3가 연골 조직과 뇌조직에서 특이적으로 많이 발현됨을 확인하였다. 또한 두툽상어 뇌조직에서 추출한 RNA부터 5' RACE, 3' LD-PCR, RT-PCR 등의 방법을 수행하여 혈관생성 조절에 관여되는 MT3-MMP cDNA의 전체 염기 서열을 동정하였고, 그 단백질의 구조적 특징과 조직특이적 발현 역시 조사하였다. 덧붙여, 두툽상어의 연골에서 추출한 RNA로부터 혈관생성억제활성을 나타내는 endostatin, angiostatin, 그리고 TIMP-1 유전자를 RT-PCR 방법에 의해 일부 클로닝하였다.

3. 연골어류 혈관생성억제 유전자의 발현벡터 시스템의 확립 및 항암 효능 조사

2차년도에서 밝힌 두툽상어의 TIMP-3 및 MT3-MMP 염기서열을 토대로 하여, 원핵세포 발현 벡터 (prokaryotic expression vector)를 구축하였다. 상어 TIMP-3 발현 vector의 경우, induction 시작 O.D₆₀₀ 값이 1.0에 도달했을 때 최종농도 1.0 mM IPTG로 첨가하여 30℃에서 5시간동안 배양했을 때 가장 많은 단백질을 획득하였으며, 상어 MT3-MMP 발현 vector의 경우 IPTG 0.4 mM과 1.0 mM의 농도로 3시간과 5시간 동안 37℃에서 induction시 발현됨을 관찰하였다. 또한 이들 유전자의 세포수준에서 혈관생성활성을 조사하기 위해 포유동물 발현벡터도 함께 구축하였다. 구축된 벡터를 상어 TIMP-3는 HT1080 세포에 stable transfection하고, 상어 MT3-MMP는 NIH3T3 세포에 transient transfection시킨 후, total RNA를 추출하여 RT-PCR을 이용하여 각각의 유전자 발현을 조사한 결과, transfectant에서만 다량 발현됨을 확인하였다. 이들 transfectant를 이용하여 암의 전이와 침윤에 중요한 기능을 하는 MMP-2의 단백질 수준에서 활성화 정도를 확인하기 위해 gelatin-based zymography를 수행한 결과, TIMP-3의 경우 active MMP-2의 양이 현저히 감소하였고, MT3-MMP의 경우는 active MMP-2가 증가됨을 확인하였다. 상어 TIMP-3의 혈관 생성 억제능을 *in vitro* 수준에서 *in vitro* invasion assay, *in vitro* angiogenesis assay, wounding migration assay등을 통하여 확인하였으며, *in vivo* 수준에서 transfectant의 CCM을 이용한 CAM assay, recombinant shark TIMP-3 fusion protein을 이용한 CAM assay 및 새로운 실험 방법인 human Alu sequence PCR-based CAM assay를 구축하여 상어 TIMP-3의 혈관생성 억제 및 항전이, 항침윤작용을 확인하였다. 덧붙여 상어 MT3-MMP의 침윤촉진능을 확인하기 위해 invasion 능력이 약한 NIH3T3 transfectant를 이용하여 *in vitro* invasion assay를 실시한 결과, 상어 MT3-MMP transfectant가 현저히 높은 침윤 능력이 있음을 밝혀내었다.

2. 활용에 대한 건의

제 1세부과제 : 어류 산란유도 유전자의 실용화 연구

우리의 실험결과, 유전공학적인 방법으로 디자인된 짧은 펩타이드인 산란유도 단백질의 뉴클리오타이드 기본구조를 반복적으로 클로닝해서 짧은 펩타이드를 반복적인 다중체로 생산할 수 있었고, 생산된 펩타이드 다중체는 효소로 연결 펩타이드를 절단함으로써 정량적으로 단일체의 짧은 펩타이드로 전환되어 효율적으로 생산할 수 있었다. 우리는 이 연구에서 하나의 짧은 펩타이드와 하나의 연결 펩타이드를 예로서 변조된 펩타이드를 디자인하는데 사용하였지만, 만약 펩타이드의 기본단위를 디자인하는데 많은 절단될 수 있는 연결 펩타이드를 성공적으로 사용한다면, 우리는 이 새로운 방법으로 여러 가지 짧은 펩타이드의 생산성을 높일 수 있다고 믿는다.

그러므로 이 방법은 실험적 연구 및 산업화를 위해 호르몬, 효소, 면역화학적 단백질, 항생제단백질 및 다른 짧은 활성기능 단백질들을 생산하는데 쉽게 응용될 수 있을 것이다. 이렇게 생산할 수 있는 짧은 펩타이드는 유전공학적인 방법으로 생산됨으로 현재 화학적으로 합성시 사용하는 유도체를 전혀 사용하지 않으므로 매우 안전한 단백질을 대량으로 생산할 수 있어 앞으로 농수산 분야 첨단기술개발을 위해 광범위하게 적용할 수 있다고 사료된다.

제 2세부과제 : 연골어류 혈관생성 억제 유전자의 발굴과 그 응용연구

본 연구과제에서 두툽상어 TIMP-3의 혈관생성 억제 효능 및 두툽상어 MT3-MMP의 전이 및 침윤 활성 증가 효능을 밝혀내었다. 앞으로 두툽상어 TIMP-3와 MT3-MMP의 혈관생성 억제제 및 항암제 또는 혈관생성 촉진제로서의 효능은 동물실험 및 여러 다른 실험을 통하여 더욱 깊이 증명되어야 할 것이며, 더 나아가 신약개발의 가능성 타진을 위해 임상실험도 행해져야 할 것이다. 또 이들 결과에서 상어의 TIMP-3의 경우, 암 뿐만 아니라 혈관신생이 병적으로 발생하는 당뇨병성 망막증, 류마티스성 관절염, 건선, 화농성 육아종, 신혈관 녹내장 등 여러 질병에서 혈관생성 억제제로써 이용될 수 있을 것이며 MT3-MMP의 경우, 혈관생성이 부족한 질병 즉, 만성궤양, 지연성 상처치유, 선천성 기형, 그리고 허혈성 뇌졸중과 동맥경화성 치매 등 노인성 질환등의 치료제로써 사용가능 하리라 사료된다.

SUMMARY

Studies on excavation and practical use of biologically active genes from fish

The 1st detail subject

I. Title

Development studies on gonadotropin releasing hormone for practical use

II. Objective and significance

It is well known that GnRH(gonadotropin releasing hormone) induce the secretion of gonadotropin, which has an important role for fish maturation and spawning. Several GnRH peptides have been synthesized and applied to induce spawning in fish. It has been known that few GnRHs are very effective to induce maturation and spawning in several fishes.

However, there has been no effective method to produce short peptides by genetic engineering technique. So far short peptides were synthesized by chemically, sold very expensively to the customers, and hardly used in the fishery aquaculture.

To produce short peptides in large scale with genetic engineering technique, it is necessary to clone the nucleotide sequence of short peptide repetitively, to produce the short peptide multimers, and then to collect the short peptide monomer. However no general method has yet been developed to produce the concatameric short peptide multimers and to collect the short peptide monomer effectively. Therefore, in this study we tried to develop the cloning technique for making tandem repeated DNA cassette, to produce the concatameric short peptide multimers from the tandem repeated DNA cassette, and then to collect the cleaved short peptide monomer from the concatameric short peptide multimers.

Therefore in this study, we want to develop the general method of producing the short peptide in large scale with genetic engineering technique and supply the produced

GnRH peptide to the aquaculture farmer with cheap price to prevent the seasonal hazard in aquaculture industry and to develop new aquaculture fish species.

III. Content and scope

1. Designing, synthesizing and cloning of GnRH gene

So far genetic engineering technique is very convenient to produce a relatively long peptide, but uneconomical for anything other than short peptides. To solve this problem, it is necessary to clone the nucleotide sequence of short peptide repetitively, to produce the short peptide multimers, and then to collect the short peptide monomer. However no general methods has been developed to produce the concatameric short peptide multimers and to collect the short peptide monomer effectively. Therefore, in this study we tried to develop the general method for making tandem repeated DNA cassette to produce the concatameric short peptide multimers

2. Expression and stability of GnRH

So far it has been known that GnRH gene could not be expressed by genetic engineering techniques. To express GnRH gene, at the 1st year we cloned the repetitive cGnRH-II(M) DNA cassette in the pPROEX-1 vector. The cloned vector produced very small amount of cGnRH-II peptide multimers. We guessed that the translation of mRNA might be inhibited by the hair pin structure of the upstream sequence of mRNA. Therefore we tried to reconstruct the expression vector to get the lowest free energy of RNA secondary structure with the designed oligonucleotide at the 5' of the open reading frame.

3. Study on GnRH for practical use

Before producing cGnRH-II peptide in large scale, we will check the inducing activity of the chemically synthesized cGnRH-II analog for gonadotropin hormone with rainbow trout pituitary gland *in vitro*. If the chemically synthesized cGnRH-II analog has the inducing activity, we will produce the cGnRH-II peptide multimer in large scale with genetic engineering technique, establish the purifying technique of cGnRH-II peptide multimers with His-tag method, cleave the cGnRH-II peptide multimers with trypsin to obtain the cGnRH-II monomer, identify the amino acid sequence of the cGnRH-II

peptide monomer, and test the produced monomeric cGnRH-II peptide monomer for the inducing activity of testosterone *in vivo*.

IV. Results

1. Designing, synthesizing and cloning of GnRH gene

We designed a basic unit of the modified peptide by attaching a cleavable linker peptide to both ends of the original peptide, that is, a cleavable linker peptide-original peptide-cleavable linker peptide, deciphered the nucleotide of the modified peptide, and also designed a synthetic DNA from the nucleotide of the modified peptide for repetitive ligation. Then we constructed a bigger DNA cassette by ligating few basic units of the synthetic DNA monomer, cloned the repeatedly ligated synthetic DNA cassette into vector after ligating adaptors. As a result we developed a noble technique to clone the nucleotide sequence of a cleavable linker peptide-original peptide repeatedly.

2. Expression and stability of GnRH

The cloned cGnRH-II(M)-3R in pRSET-B vector could not produce any expected size of GnRH fusion protein. We guessed that the reason might be caused by the beginning of the cGnRH-II(M)-3R DNA sequence, which would involve in the formation of hair pin structure of mRNA and inhibit the effective translation of mRNA. To improve the rate of expression, we designed the nucleotide sequence of Met-linker peptide-cGnRH-II portion based on the ΔG value to reduce the free energy of mRNA and produced the cGnRH-II peptide multimers successfully.

The amino acid sequence of the expressed protein was coincided with the deduced amino acid sequence of cGnRH-II peptide multimers after amino acid sequencing. As a result, we developed a noble technique for the effective production of the short peptide very easily in a concatameric multimer. We optimized the expression conditions for the protein. It seems likely that the protein was very stable in *E. coli* host.

3. Study on GnRH for practical use

In this study, we synthesized chemically the expected cGnRH-II analog before producing cGnRH-II analog in a large scale by genetic engineering technique, assured

the inducing activity of chemically synthesized cGnRH-II analog for gonadotropin releasing hormone *in vitro*, and then produced the cGnRH-II monomeric analog very effectively from the cGnRH-II multimers by cleaving the linker peptide with trypsin.

The cleaved cGnRH-II monomer analog has the correct amino acid sequence of (Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-Gly-Lys), cGnRH-II(Gly11, Lys12). Therefore, we developed a mass production technique for short peptide successfully. The produced cGnRH-II-(Gly11, Lys12), an intermediate form of the amidated cGnRH-II, has the inducing activity of testosterone. It is considered that cGnRH-II-(Gly11, Lys12) will be converted to the amidated form of cGnRH-II by removing Lys12 by carboxypeptidase E and subsequently by peptidyl glycine alpha-amidating monooxygenase. We believed that cGnRH-II-(Gly11, Lys12) induced testosterone, which is more safe materials than the chemically synthesized cGnRH analog because the cGnRH-II-(Gly11, Lys12) is a natural intermediate of the pro-cGnRH-II, cGnRH-II-(Gly11, Lys12, Arg13).

The 2nd detail subject

Title

Cloning and application of angiogenesis inhibitor genes from cartilaginous fishes

Cartilage has been known to be a source of active molecules which suppresses formation of a new blood vessel, i.e., angiogenic inhibitors and has relatively more resistant effect on tumor growth. In contrast to mammalian cartilage, there's rare chance of neoplasms in shark cartilage, so it may be an ideal sources of angiogenic inhibitors. It has been reported that shark cartilage contains several unknown substances which strongly inhibit angiogenesis of solid tumors. However, any angiogenic inhibitors have not been identified in shark cartilage until now.

In this study, firstly it was demonstrated that the cartilage extract of *Scyliorhinus torazame* has anti-angiogenic activity using *in vivo* CAM assay. And then, We cloned and identified the full-length TIMP-3 from cartilage tissues and the full-length MT3-MMP from brain tissues of *Scyliorhinus torazame*. We also identified partial cDNA of various angiogenic inhibitor (angiostatin, endostatin, TIMP-1) and activator (MT-MMP) genes from cartilage tissues. In order to investigate the anti-angiogenic activity of shark TIMP-3 and the angiogenic effect of shark MT3-MMP, we initially constructed stable shark TIMP-3 transfected HT1080 cell and shark MT3-MMP transfected NIH3T3 cell. Increased level of shark TIMP-3 reduced the activation of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) by gelatin zymography with concentrated conditioned media from transfected HT1080 cell. *In vitro* invasion and migration assays showed that overexpression of shark TIMP-3 decreased invasive activity and migration. Also, *in vitro* tube formation assay, concentrated conditioned media of shark TIMP-3-transfected HT1080 decreased the ability of tube formation in HUVECs.

To determine whether shark TIMP-3 had an effect of anti-angiogenesis *in vivo*, we used chorioallantoic membrane (CAM) assay. Concentrated conditioned media of transfectant inhibited new blood vessels of chicken embryo. In a second *in vivo* assay, human Alu PCR based CAM assay, shark TIMP-3-transfected HT1080 had inhibition effect of invasiveness and metastasis. In addition, to produce recombinant sTIMP-3

protein, prokaryotic sTIMP-3 expression vector was constructed. Unfortunately recombinant sTIMP-3 fusion protein was formed as inclusion body but extracted from pellet protein. *In vivo* CAM assay on recombinant sTIMP-3 fusion protein, formation of new blood vessels were inhibited too. These results suggest that TIMP-3 of *Scyliorhinus torazame* has anti-angiogenic activities and shark MT3-MMP has angiogenic activity.

CONTENTS

The 1st detail subject

Chapter I. Introduction	23
Chapter II. Designing, synthesizing and cloning of GnRH gene	24
Section 1. Introduction	24
Section 2. Materials and methods	24
1. Molecular biological techniques	24
2. Bacteria, plasmid and phage	25
3. Chemicals and oligonucleotides	25
4. Design of the cleavable linker peptide	25
5. Design of the modified peptide and its nucleotide and synthetic DNA	25
6. Expression of protein	25
Section 3. Results	26
1. Design of GnRH gene	26
2. Repetitive cloning of the GnRH DNA cassette	26
3. Construction of the GnRH expression vector	27
Section 4. Discussion	27
Chapter III. Expression and stability of GnRH	29
Section 1. Introduction	29
Section 2. Materials and methods	29
1. Chemicals and oligonucleotides	29
2. Bacteria, plasmid and phage	29
3. Oligonucleotides	29
4. Construction of the expression vector	30
5. Expression of protein	30
6. Isolation of the GnRH peptide multimers	30
7. Amino acid sequencing	30
8. Optimal condition for expression	31

9. Stability of protein	31
Section 3. Results	31
1. Study of GnRH expression	31
2. Optimal conditions for expression	32
3. Stability of GnRH peptide multimers	32
Section 4. Discussion	32
Chapter IV. Study on GnRH for practical use	34
Section 1. Introduction	34
Section 2. Materials and methods	34
1. Synthesizing and construction of GnRH-II peptide	34
2. In vitro GTH assay	34
3. Expression and isolation of GnRH peptide multimers	35
4. Trypsin digest of GnRH peptide multimers	35
5. FPLC	35
6. Amino acid sequencing	35
7. In vivo steroid assay	35
Section 3. Results	35
1. Activity of GnRH peptide	35
2. Mass production of GnRH peptide	36
3. Induction of steroid hormone	37
Section 4. Discussion	37
Chapter V. Reference	39
Table	41
Figures	42

The 2nd detail subject

Chapter I. Introduction	55
Chapter II. Examination of angiogenesis inhibition effect and gene cloning from cartilaginous fishes	56
Section 1. Introduction	56
Section 2. Materials and methods	56
1. Isolation of protein extract from shark cartilage	56
2. Isolation of protein extract from sting ray	56
3. Chorioallantoic membrane (CAM) assay	57
4. MTT assay for examination of endothelial cell proliferation	57
5. Wounding migration assay	58
6. Total RNA extration	58
7. mRNA isolation	58
8. cDNA library construction from isolated mRNA	58
9. Analysis of gene sequence	59
Section 3. Results	59
1. Examination of angiogenesis inhibition activity	59
2. Construction of cDNA library and cloning of angiogenesis regulating gene	61
Section 4. Discussion	64
Chapter III. Sequence analysis and functional examination of angiogenesis inhibitor gene from cartilaginous fishes	65
Section 1. Introduction	65
Section 2. Materials and methods	65
1. Total RNA extration	65
2. Construction of primers	66
3. RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)	67
4. 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)	68
5. 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)	69
6. Long distance RT-PCR for 3' region of the MT3-MMP	70

7. Sequence analysis	70
Section 3. Results	71
1. Cloning and sequence analysis of full-length TIMP-3 from <i>Scyliorhinus torazame</i> .	71
2. Cloning and sequence analysis of full-length MT3-MMP from <i>Scyliorhinus torazame</i>	71
3. Exmination of shark TIMP-3 and MT3-MMP tissue expression	76
4. Sequence analysis and homology search of shark endostatin homologue	78
5. Sequence analysis and homology search of shark angiostain homologue	81
6. Sequence analysis and homology search of shark TIMP-1 homologue	84
Section 4. Discussion	86
 Chapter IV. Establishment of expression vector system of angiogenesis inhibiting gene from cartilaginous fishes and examination of anti-cancer effect	87
Section 1. Introduction	87
Section 2. Materials and methods	87
1. Construction of large scale expression system	87
2. Animal cell transfection	88
3. Chorioallantoic membrane (CAM) assay	88
4. Incubation of endothelial cell	88
5. ³ H-Thymidine incorporation assay	89
6. Wounding migration assay	89
7. <i>In vitro</i> angiogenesis assay	89
8. Invasion assay	89
9. human Alu sequence PCR-based CAM assay	90
Section 3. Results	90
1. Construction of fish angiogenesis inhibiting gene expression system	91
2. Development of large scale expression condition of fish angiogenesis inhibiting gene	92
3. Examination of inhibiting effect of cancer cell proliferation and metastasis	97
Section 4. Discussion	109
 Chapter V. Reference	110

목 차

제 1 세부과제

제 1 장 서 론	23
제 2 장 산란유도 유전자(GnRH)의 디자인, 합성 및 클로닝	24
제 1 절 서 설	24
제 2 절 재 료 및 방 법	24
1. 분자생물학적 기술	24
2. 박테리아, 플라스미드 및 파아지	25
3. 시약 및 올리고뉴클레오타이드	25
4. 절단될 수 있는 연결 단백질의 디자인	25
5. 변조된 단백질의 뉴클레오타이드 및 합성 DNA의 기본단위	25
6. 단백질의 발현	25
제 3 절 결 과	26
1. 산란유도 유전자의 디자인	26
2. 산란유도 유전자 DNA 카세트의 반복적 클로닝	26
3. GnRH 유전자의 발현 벡터의 제조	27
제 4 절 고 찰	27
제 3 장 GnRH 유전자의 발현 및 안정성 연구	29
제 1 절 서 설	29
제 2 절 재 료 및 방 법	29
1. 시약 및 올리고뉴클레오타이드	29
2. 박테리아, 플라스미드 및 파아지	29
3. 올리고뉴클레오타이드	29
4. 발현벡터의 구성	30
5. 단백질의 발현	30
6. 산란유도 단백질 다중체의 분리	30
7. 아미노산 서열분석	30
8. 최적 발현 조건 확립	31

9. 단백질의 안정성 조사	31
제 3 절 결 과	31
1. GnRH 유전자의 발현 연구	31
2. 최적발현 조건 확립	32
3. GnRH의 안정성 조사	32
제 4 절 고 찰	32
제 4 장 GnRH 유전자의 실용화 연구	34
제 1 절 서 설	34
제 2 절 재료 및 방법	34
1. GnRH 단백질 유도체의 합성 및 구성	34
2. In vitro GTH assay	34
3. 산란유도 단백질의 발현 및 분리	35
4. 산란유도 단백질 다중체의 트립신 절단	35
5. FPLC	35
6. 아미노산서열분석	35
7. In vivo steroid assay	35
제 3 절 결 과	35
1. GnRH 단백질의 활성 연구	35
2. GnRH 단백질의 대량생산	36
3. 인공 산란유도 기술개발	37
제 4 절 고 찰	37
제 5 장 참고문헌	39
표	41
그림	42

제 2 세부과제

제 1 장 서 론	55
제 2 장 연골어류로부터 혈관생성 억제활성의 조사 및 유전자 클로닝	56
제 1 절 서 설	56
제 2 절 실험 재료 및 방법	56
1. 상어연골 단백질 추출물의 분리	56
2. 가오리연골 단백질 추출물의 분리	56
3. 혈관형성에 관한 chick embryo의 chorioallantoic membrane (CAM) assay	57
4. 혈관내피세포의 증식조사를 위한 MTT assay	57
5. Wounding migration assay	58
6. Total RNA extration	58
7. mRNA isolation	58
8. 분리된 mRNA로 부터 cDNA library의 제조	58
9. 염기서열의 분석	59
제 3 절 결 과	59
1. 혈관생성 억제활성의 조사	59
2. cDNA library 제조 및 혈관생성 조절 유전자의 클로닝	61
제 4 절 고 찰	64
제 3 장 연골어류 혈관생성억제 유전자의 분석 및 기능조사	65
제 1 절 서 설	65
제 2 절 재료 및 방법	65
1. 상어에서 Total RNA extration	65
2. Primer의 제작	66
3. RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)	67
4. 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)	68
5. 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)	69
6. Long distance RT-PCR for 3' region of the MT3-MMP	70
7. 염기서열의 분석	70
제 3 절 결 과	71

1. 두릅상어 full-length TIMP-3 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석	71
2. 두릅상어 full-length MT3-MMP 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석	71
3. 상어 TIMP-3 및 MT3-MMP 유전자의 각 조직별 발현조사	76
4. 상어의 endostatin 유전자의 염기서열 분석 및 homology arch	78
5. 상어의 angiostatin 유전자의 염기서열 분석 및 homology search	81
6. 상어 TIMP-1 유전자의 염기서열 분석 및 homology search	84
제 4 절 고 찰	86
제 4 장 연골어류 혈관생성억제 유전자의 발현벡터 시스템의 확립 및 항암 효능 조사	87
제 1 절 서 설	87
제 2 절 재료 및 방법	87
1. 대량발현 시스템의 구축	87
2. Animal cell transfection	88
3. Chorioallantoic membrane (CAM) assay	88
4. 혈관내피세포의 배양	88
5. 혈관내피세포의 증식조사 (³ H-Thymidine incorporation assay)	89
6. Wounding migration assay	89
7. <i>In vitro</i> angiogenesis assay	89
8. Invasion assay	89
9. human Alu sequence PCR-based CAM assay	90
제 3 절 결 과	90
1. 어류 혈관생성억제 유전자의 발현벡터의 구축	91
2. 어류 혈관생성억제 유전자의 대량발현 조건의 개발	92
3. 악성 암세포의 증식 및 전이억제 작용조사	97
제 4 절 고 찰	109
제 5 장 참고문헌	110

제 1 세부과제

제 1 장 서 론

해산어류는 까다로운 번식특성과 주기를 가지고 있기 때문에 인공산란을 유도하기 위해서는 이러한 까다로운 생리적 요인을 해결해야만 한다. 이러한 번식기작에 관여하는 호르몬으로는 산란유도 유전자인 GnRH (gonadotropin releasing hormone)가 알려져 있고 지금까지는 뇌하수체에서 분리하여 소규모로 사용하거나 또는 대부분 펩타이드의 길이가 짧기 때문에 화학적으로 합성하여 사용하고 있는 실정이다. 이러한 산란유도유전자 (GnRH)를 이용하여 양식어종을 대상으로 화학적으로 합성된 산란유도 단백질을 이용한 산란유도 연구가 진행되었고 어종에 따라 좋은 효과를 나타내기도 하였다.

본 연구는 유전공학적인 방법을 이용하여 어류의 뇌하수체로부터 분리하는 경우와 화학적으로 합성하여 얻을 수 있는 산란유도 단백질의 기존 생산방법을 대체할 수 있는 유전공학적인 첨단기술을 활용하여 매우 저렴한 가격으로 대량 생산하여 양식기술개발에 실용화하고자 한다.

유전공학적으로 산란유도 유전자를 값싸게 생산하게 되면 경제성이 있고 또한 멸종위기에 있는 해산어류의 새로운 종묘생산 연구와 기존 양식어류에 대한 종묘생산시기의 조절로 출하기의 고수온·저수온에 의한 환경적 피해를 방지할 수 있고 성장시기를 조절할 수 있으며 산란유도 유전자의 특성을 이용한 정자형성·난자형성 및 성장유도 연구에 활성화는 물론, 양식기술의 첨단화를 이룩할 수 있을 뿐만 아니라, 산란유도 유전자의 생산에 국제 경쟁력을 확보할 수 있다.

그러나 산란유도 단백질은 길이가 짧기 때문에 유전공학적 방법을 이용하여 효율적으로 생산할 수 있는 기술이 미흡하여 지금까지 화학적으로 합성되어 고가로 판매되므로 양식현장에서 활용은 매우 어려운 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 지금까지 유전공학적으로 생산하지 못하고 있는 산란유도 단백질을 효율적인 방법으로 대량생산할 수 있는 기술을 개발하여 산란유도 단백질을 저가로 어민에게 보급함으로써 첨단기술을 이용한 양식기술개발로 양식어종의 계절적 피해를 방지하고 또 새로운 어종의 양식화 개발을 위해 유전공학적으로 생산된 어류산란 유도단백질을 실용화하고자 한다.

제 2 장 산란유도 유전자(GnRH)의 디자인, 합성 및 클로닝

제 1 절 서 설

유전공학적인 방법은 여러 가지 긴 단백질을 생산하는데 많은 장점이 있지만, 짧은 단백질을 생산하는 데에는 기술적인 한계에 의해서 거의 활용할 수가 없다. 지금현재, 산란유도 단백질처럼 짧은 단백질은 화학적으로 합성되어 실험 및 임상에 쓰이고 있다. 그러나 화학적으로 합성된 짧은 단백질은 가격이 비싸고 좀 길이가 긴 단백질을 생산시 원가가 높아 비경제적이다.

지금까지 유전공학적인 방법에 의해 단백질을 생산하기 위해서는 필요로 하는 발현벡터를 제조하고, 대장균 내에서 단백질을 생산하였다. 하지만 이 방법은 비교적 길이가 긴 성장호르몬 단백질, 인슐린, 제한효소 단백질을 생산하는데 효율적이지만, 짧은 단백질을 생산하는 데에는 비효율적이다.

이러한 문제를 해결하기 위해서 일시적으로 반복된 DNA를 클로닝할 수 있는 기술, 짧은 단백질의 다중체를 생산할 수 있는 기술, 다중체로부터 짧은 단백질 단일체를 분리하고 회수할 수 있는 기술이 확보되어야 한다. 하지만 짧은 단백질의 다중체를 사슬형태로 생산할 수 있는 기술과 짧은 단백질의 단일체를 효율적으로 회수할 수 있는 방법이 개발되지 못하였다.

그러므로 우리는 본 연구에서 절단될 수 있는 연결단백질을 원래의 짧은 단백질 사이에 삽입하여 변형된 단백질을 만들고, 합성 DNA 단일체로 반복된 DNA 다중체의 카세트를 만들어, 연결단백질과 원래의 단백질을 연속적으로 반복되게 생산할 수 있는 DNA 카세트를 만드는 방법을 확립하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 분자생물학적 기술

합성된 올리고뉴클레오타이드는 T4 polynucleotide kinase(PNK)로 5' 말단을 phosphorylation시킨후 pUC18 vector에 ligation시켰고, E. coli strain에 형질전환시켜 white colony로부터 plasmid를 추출하여 universal primer를 사용하여 Sanger의 방법(1977)으로 염기서열을 결정하고 선택된 벡터에 다시 클로닝하였다. 위의 모든 분자생물학적 실험 방법은 Maniatis 등(1982)의 방법에 따랐다.

2. 박테리아, 플라스미드 및 파아지

대장균 JM101(Messing, 1983), JM109, DH10B (*mcrA*, *mcrBC*, *mrr*, *hscRMS*, *recA1*, *deoR*) 및 플라스미드 pUC19(Yanish-Peron et al., 1985) 및 pPROEX-1을 사용하였다.

3. 시약 및 올리고뉴클레오타이드

DNA 조작을 위한 모든 효소는 Boehringer Mannheim (USA)으로부터 구입하였고, 사용조건은 공급자의 제시조건에 따랐다. 올리고뉴클레오타이드는 한국의 Bioneer Co.에 의뢰하여 인산화시켰고, 역상 고압 액체크로마토그래피로 정제하였다.

왼쪽 어댑터 합성 DNA 올리고뉴클레오타이드는 5'-A ATT CAA GGA TCC CCC GGG GGG AAG AGA-3' 및 5'-CCC GGG GGA TTC TTG-3'를 사용하였고, 오른쪽 어댑터 합성 DNA 올리고뉴클레오타이드는 5'-CTC GAG AAG CTT ACG-3' and 5'-T CGA CGT AAG CTT CTC GAG TCT CTT CCC-3'를 사용하였고, cGnRH-II(M) 합성 DNA 올리고뉴클레오타이드는 5'-GAG CAC TGG TCC CAC GGG TGG TAC CCA GGC GGG AAG AGA-3' 및 5'-GCC TGG TGA CCA CCC GTG GGA CCA GTG CTC TCT CTT CCC-3'를 사용하였다.

정지 코돈 합성 DNA는 자가 상보적 한가닥 올리고뉴클레오타이드인 5'-AG CTT TGA CAG CTG TCA A-3'를 사용하였다.

Met-linker peptide-cGnRH-II 부분 합성 DNA 올리고뉴클레오타이드인 5'-T ATG GGC AAA CGA GAG CAT TGG TCA CAC GGG TGG TAC C-3' 및 5'-CC CGG GTA CCA CCC GTG TGA CCA ATG CTC GCT TTT CCG CAT-3'를 사용하였다.

4. 절단될 수 있는 연결 단백질의 디자인

짧은 단백질의 복합체를 만들기 위해 우리는 짧은 단백질 사이의 연결고리로서 연결단백질을 고안했으며, 그것은 짧은 단백질 단일체를 만들기 위해서 쉽게 절단된다. 이러한 목적을 위해 우리는 상업적으로 시판되는 단백질 분해효소나 화학물질에 의해서 절단되는 절단 아미노산 서열로부터 여러 가지 절단될 수 있는 연결단백질을 고안하였다 (Table 1).

5. 변조된 단백질, 변조된 단백질의 뉴클레오타이드 및 합성 DNA의 기본단위의 디자인

짧은 단백질의 사슬모양 복합체를 만들기 위해서, 우리는 절단될 수 있는 단백질-원래의 짧은 단백질을 반복적으로 정렬하여 변조된 단백질을 만들었고, 그리고 합성 DNA를 반복적으로 결합시키기 위해 변조된 단백질의 비대칭 상보적 결합성의 말단을 가진 합성 DNA의 기본구조를 만들었다.

6. 단백질의 발현

plasmid를 *E. coli* DH10B에 형질전환시켜 ampicillin 50 μ g/ml 이 첨가된 LB broth에 0/N 동안 배양하였다. 이 culture를 LB broth로 1/200로 희석하여 37 °C에서 배양하였다. 0. D₆₀₀ 값이 0.5에 도달했을 때 IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)를 최종농도 2mM로 첨가

하여 6, 24시간동안 각각 배양한 뒤, 1ml의 배양액으로부터 pellet을 얻었다. 이 pellet을 200 μ l의 sample buffer (0.05M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 1% glycerol, 0.1% bromphenol blue)에 현탁시킨 후 90 °C에서 5분간 가열한 후 10 μ l의 sample을 20%의 acrylamide를 사용하여 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 분석하였다.

제 3 절 결 과

1. 산란유도 유전자의 디자인

우리는 닭 고나도트로핀 분비 호르몬 II인 cGnRH-II 펩타이드(Miyamoto et al., 1984)를 짧은 펩타이드의 모델로 사용하였다. 짧은 산란유도 단백질을 사슬구조의 다중체로 반복적으로 생산하고, 짧은 산란유도 단백질 단일체를 회수하기 위해, 우리는 짧은 산란유도 단백질 사이를 결합시키기 위해 그리고 또 절단 후 짧은 산란유도 단백질 단일체 및 그 유사체를 생산하기 위해 단백질 분해효소 및 화학물질의 절단 특이성을 이용하여 여러 가지 절단 가능한 연결 단백질을 고안하였다 (Table 1).

이러한 연결 단백질은 만약 원래의 생산하고자 하는 짧은 단백질이 연결할 연결 단백질의 특이적 절단부위를 갖지 않으면 여러 형태의 변조된 단백질의 기본구조를 디자인 할 수 있다. 이러한 연결 단백질을 이용하여, 우리는 원래 단백질의 양끝에 단백질 분해효소 트립신으로 절단 될 수 있는 아미노산 서열 Gly-Lys-Arg (Nikolics et al., 1988)을 붙여 변조된 cGnRH-II (modified cGnRH-II: cGnRH-II(M)) 단백질을 만들었다. 그 다음 cGnRH-II(M) 단백질의 기본구조 뉴클레오타이드를 연역한 후, 우리는 합성 cGnRH-II(M) DNA를 반복적으로 결합시키기 위해 단일 가닥의 5' overhang 및 3' overhang의 결합성 말단을 가진 cGnRH-II(M)의 합성 DNA를 만들었다 (Fig. 1).

cGnRH-II(M) 합성 DNA의 5' 및 3' 돌출 결합성 말단은 연결 단백질의 양쪽 끝을 한가닥의 뉴클레오타이드로 만들었다. 그러므로 한 쪽 끝의 한 가닥 뉴클레오타이드 말단은 다른 쪽 끝의 한 가닥 뉴클레오타이드 결합성 말단과 상보적인 서열을 가지고 있다. 이러한 상보적 결합성 서열은 기본단위 cGnRH-II(M) 합성 DNA 끼리 결합시키는데 매우 효율적이었다.

2. 산란유도 유전자 DNA 카세트의 반복적 클로닝

우리는 한가닥 3' overhang 결합성 말단을 가진 cGnRH-II(M) 합성 DNA를 반복적으로 클로닝하기 위한 전략을 마련했다. 왼쪽 및 오른쪽 어댑터와 cGnRH-II(M) 합성 DNA의 기본구조를 위한 올리고뉴클레오타이드를 합성하였고, 합성 DNA를 만들기 위해 결합시켰다(Fig. 2). 왼쪽 어댑터 합성 DNA는 왼쪽에 *EcoRI*, *BamHI*, *XmaI/SmaI* 부위를 가지고 있고, 오른쪽에 한 가닥의 3' 돌출 결합성 말단을 가지고 있다. 오른쪽 어댑터 합성 DNA는 왼쪽에 상보적인 한 가닥의 3' overhang 결합성 말단을 가지고 있고, 오른쪽에 *XhoI*, *HindIII* 및 *SalI* 부위를 가지고 있다. cGnRH-II(M) 합성 DNA는 양쪽 끝에 상보적인 3' 돌출 결합성 말단을

갖도록 고안되었다.

3' overhang 결합성 말단을 가진 cGnRH-II(M) 합성 DNA의 기본구조는 반복된 cGnRH-II(M)의 합성 DNA를 만들기 위해 T4 DNA 연결효소로 자가결합 시켰고 그리고 난 뒤 어댑터를 붙여 클로닝될 수 있는 cGnRH-II(M) DNA cassette를 만들었다. 어댑터가 결합된 cGnRH-II(M) 합성 DNA 카세트는 pUC19벡터의 *EcoRI/SaI* 부위에 삽입되었고, 그리고 대장균 JM101 또는 JM109에 형질전환 시켰으며, 흰 콜로니로부터 분리된 일부 플라스미드는 제한효소분석(Sambrook et al., 1989)과 염기서열분석(Sanger et al., 1977)에 의해서 분석되었다. 우리는 17개의 콜로니로부터 왼쪽 어댑터-cGnRH-II(M) 합성 DNA-오른 쪽 어댑터를 가지는 하나의 플라스미드와 왼쪽 어댑터-3개의 cGnRH-II(M) 합성 DNA-오른 쪽 어댑터를 가지는 하나의 플라스미드를 분리하고 pUC19-cGnRH-II(M)-3R(repeat)(Fig. 3)라고 명명하였다.

3. GnRH 유전자의 발현 벡터의 제조

구성된 pUC19-cGnRH-II(M)-3R로부터 cGnRH-II(M)-3R의 DNA 카세트를 *EcoRI-SaI*으로 분리하여 발현벡터 pPROEX-1의 *EcoRI-SaI* 위치에 삽입한 후 발현을 조사하였다. pPROEX-1 vector는 pTrc promoter를 가지고 있고 Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilo-tri-acetic acid) resin에 결합할 수 있는 6xHis부분과 space region, rTEV protease에 의해서 분해될 수 있는 TEV protease cleavage site, 그리고 mutiple cloning site (MCS)로 되어 있어서 cloning을 이 MCS(multiple cloning sites)에 행하였다. 이 vector에 cloning된 plasmid pPROEX-1-cGnRH-II(M)-3R를 DH10B host에 형질전환 시켜 cGnRH-II 단백질 다중체의 fusion protein을 조사하였으나, 아주 적은 양이 발현되었다(data not shown), 그러나, 이 발현은 fusion된 cGnRH-II의 다중체 단백질이 박테리아 내에서 독성(toxicity)을 나타내지 않음을 알 수 있다.

제 4 절 고 찰

우리는 이 연구에서 유전공학적인 방법을 사용하여 짧은 펩타이드인 산란유도 단백질의 효율적 생산 방법을 독창적으로 확립하였다. 첫 번째, 여러 가지 종류의 절단될 수 있는 새로운 연결 펩타이드를 디자인하였고, 두 번째 연결 펩타이드를 원래의 펩타이드 양쪽에 붙여 변조된 펩타이드의 기본구조를 디자인하였고, 세 번째, 변조된 기본단위 펩타이드의 뉴클레오타이드를 연역하였고, 네 번째, 반복적으로 클로닝할 수 있도록 변조된 펩타이드의 기본구조에 해당하는 합성 DNA를 디자인하고 합성하였고, 다섯 번째, 변조된 펩타이드의 기본구조에 해당하는 합성 DNA를 반복적으로 연결하여 하나의 DNA 카세트를 만들었다.

우리는 이 연구에서 짧은 펩타이드 한 가지를 예로서 연속적으로 생산할 수 있는 DNA 카세트를 클로닝할 수 있는 방법을 개발하였다. 이 방법을 사용하면 어떤 짧은 펩타이드도 적절한 연결 펩타이드를 부착시킴으로서 짧은 펩타이드를 연속적으로 생산하는데 필요한 DNA 카세트를 제작할 수 있는 보편적인 방법이다.

실험을 통해서 우리는 디자인된 3' 돌출 cGnRH-II(M) 합성 DNA가 3개까지 쉽게 연결됨을 확인하였고, 그것은 클로닝 동안 *recA*+형 균주내에서도 안정하였다. 그러나 구성된 산란유도 유전자의 DNA 카세트를 반복적으로 클로닝한 cGnRH-II(M)-3R을 pPROEX-1 벡터에 클로닝하여 pPROEX-1-cGnRH-II(M)-3R로부터 반복된 산란유도 단백질은 매우 적은 양이 발현되었다. 발현이 잘 되지 않은 이유는 아마도 이 클론된 벡터의 원래 mRNA의 translation 시작부위가 클론된 cGnRH-II(M) DNA 반복 카세트와 hair pin구조를 형성하여 효과적인 translation을 방해했다고 생각된다.

제 3 장 GnRH 유전자의 발현 및 안정성 연구

제 1 절 서 설

지금까지 어류산란 유도유전자(GnRH)를 유전공학적으로 발현시킨 연구는 전무하며, 캐나다 그룹의 과학자들의 경우 연구를 수행하였으나 어류산란 유도유전자는 발현이 되지 않는다고 알려져 왔다. 또한 이제까지 산란유도 유전자를 성공적으로 발현시킨 논문도 전무한 실정이다.

산란유도 단백질을 유전공학적으로 발현시키기 위해 제 1 차년도에 산란유도 유전자의 DNA 카세트를 반복적으로 클로닝한 cGnRH-II(M)-3R을 pPROEX-1 벡터에 클로닝하여 pPROEX-1-cGnRH-II(M)-3R을 구성하였으나 매우 적은 양이 발현되었다. 발현이 잘 되지 않은 이유는 아마도 이 클론된 벡터의 mRNA의 translation 시작부위가 hair pin구조를 형성하여 효과적인 translation을 방해했다고 생각된다.

그러므로 본 연구에서는 발현이 까다로운 어류 산란유도 유전자(GnRH)를 기존의 상업적으로 가용한 클로닝 벡터를 사용하여 발현을 유도하고, 발현이 어려울 시 효율적인 발현을 위해 translation이 개시되는 뉴클리오타이드를 RNA secondary structure가 최소한의 에너지를 갖도록 디자인한 합성 DNA를 사용하여 발현을 용이하게 최적화 시킬 수 있도록 발현벡터를 재구성하고, 그 다음 단계에는 구성된 발현벡터로부터 산란유도 단백질을 최대량 생산하기 위한 조건확립 및 산란유도 단백질의 안정성을 규명하고자 한다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 시약 및 올리고뉴클리오타이드

DNA 조작을 위한 모든 효소는 Boehringer Mannheim 사로부터 구입하였고, 공급자의 지시에 따랐다. 올리고뉴클리오타이드는 한국생공에 의뢰하여 제작하였고, '5-말단은 인산화시켰고, 역고압 액체 크로마토그래피로 정제하였다.

2. 박테리아, 플라스미드 및 파아지

recA1 균주인 *E. coli* JM109과 *E. coli* TOP10F', 플라스미드 벡터 pUC19(Yanish-Peron et al., 1985)과 pRSET-B, 파아지 M13/T7 phage을 사용하였다. pRSET-B 벡터는 T7 RNA polymerase에 의해서 지시받는 T7 promoter를 가지고 있다. 그러므로 플라스미드내에 있는 목적 유전자는 M13/T7 파아지에 의해서 개시된다. T7 RNA polymerase는 isopropyl-1-thio- β -D-galactoside(IPTG)에 의해서 유도된다.

3. 올리고뉴클리오타이드

정지코돈 합성 DNA를 위해서는, 자가상보적 한가닥 올리고뉴클리오타이드 5'-AG CTT TGA CAG CTG TCA A-3'를 자가반응 시킨 뒤 사용하였고, Met-linker peptide-cGnRH-II portion 위한 synthetic DNA 올리고뉴클리오타이드를 위해서는 5'-T ATG GGC AAA CGA GAG CAT TGG TCA CAC GGG TGG TAC C-3' and 5'-CC CGG GTA CCA CCC GTG TGA CCA ATG CTC GCT TTT CCG CAT-3'를 사용하였다.

4. 발현벡터의 구성

cGnRHII DNA insert가 삽입된 pUC19-cGnRH-II(M)-3R에서 cGnRH-II(M)-3R을 BamHI/HindIII를 처리하여 분리한 후 pRSET-B벡터의 BamHI/HindIII에 삽입하고, 이 insert의 앞부분에는 Met-연결펩타이드-cGnRH-II 부분의 발현을 용이하게 하기 위해 낮은 값의 ΔG 값을 가지도록 디자인한 synthetic DNA를 NdeI/XmaI 부위에 대치시켰다. ΔG 값은 컴퓨터프로그램 DNASIS™(Hitachi, Japan)을 사용하여 분석하였다. 또한 cGnRH-II(M)-3R의 뒷부분에는 정지코돈을 갖는 synthetic DNA를 만들어 HindIII 위치에 삽입하여 발현 벡터를 제조하였다.

5. 단백질의 발현

발현벡터는 대장균 TOP10F'에 형질전환시켰고, 50 μ g/ml ampicillin을 첨가한 SOB 배지 (Tryptone, 20g; yeast extract, 5.0g; NaCl, 0.5g; KCl, 1.86mg/l)에 하룻밤 동안 배양하였다. 하룻밤 동안 배양한 배양액은 SOB 배지로 200배 희석시켰다. 희석시킨 배양액은 OD600에서 0.3에 도달할 때까지 배양하였고, 그리고 나서 IPTG 최종농도 1mM을 첨가한 후 1시간 동안 배양 후 M13/T7 파아지를 감염시켰다. 파아지가 감염된 배양액은 발현을 위해 5시간 동안 더 배양하였다. 발현된 세포 1ml로 펠렛을 만들기 위해 원심분리 시켰고, 그 펠렛은 200 μ l의 sample buffer(0.05M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1M DTT, 2% SDS, 1% glycerol, 0.1% bromophenol blue)에 현탁시켰다. 현탁액은 90 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 20%의 acrylamide SDS-PAGE (Laemmli, 1970) 상에서 분석되었다.

6. 산란유도 단백질 다중체의 분리

세포는 2000 x g에서 20분간 원심분리하여 수확하였다. 수확된 세포는 냉각시킨 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 두 번 세척한 후 1/10의 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 현탁시켰다. fast-protein liquid chromatography (FPLC) (Pharmacia LKB)로 Anion-exchange chromatography를 행하였다. 20mM Tris-HCl buffer at pH 8.0로 평형시킨 Mono-Q 5/5 anion-exchange column에 샘플을 적용시켰다. 기울기는 100%의 buffer A (20mM Tris-HCl at pH 8.0)로 시작하고, 100%의 buffer B (20mM Tris-HCl at pH 8.0 with 1.0M NaCl)로 종결시켜 확립하였다. 수집된 샘플은 탈염화시키고, 동결건조 시키고, 현탁시킨 후 아미노산서열을 분석하였다.

7. 아미노산서열분석

polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 단백질을 옮긴 단백질(Matsudaria, 1987)을 대전 기초과학지원센터에 의뢰하여 단백질서열분석기(Applied Biosystems, model 476A)로 아미노산서열을 분석하였다.

8. 최적 발현 조건 확립

최적 발현조건을 실험실 수준에서 확립하기 위해 배지별, IPTG 농도별, ampicillin 농도별, pH별, 시간별 발현결과를 조사하여 산란유도 단백질의 발현을 최적화 하였다.

9. 단백질의 안정성 조사

장시간 발현시킨 후의 산란유도 단백질의 발현양상을 조사하여 대장균내에서 발현된 산란유도 단백질의 대장균 내에서 안정성을 조사하였다.

제 3 절 결 과

1. GnRH 유전자의 발현 연구

pUC19-cGnRH-II(M)-3R 벡터를 *Bam*HI/*Hind*III로 절단하여 cGnRH-II(M)-3R 카세트를 분리하고, 이 카세트를 pRSET-B 벡터의 *Bam*HI/*Hind*III 위치에 삽입하고 pRSET-B-cGnRH-II(M)-3R로 명명하였다. 이 플라스미드는 정지코돈을 갖지 않으므로, 자가상보적 한각닥의 올리고뉴클리오타이드를 가진 DNA를 합성하여 자가결합시킨후 *Hind*III 위치에 삽입하고 pRSET-B-cGnRH-II(M)-3R-STOP이라 명명하였다. 우리는 또한 pRSET-B-cGnRH-II(M)-3R-STOP 벡터의 *Nde*I/*Xma*I DNA 부분을 RNA 이차구조가 최소한의 에너지 ΔG 값을 갖도록 디자인한 Met-linker peptide-cGnRH-II peptide 부분의 합성 DNA로 대체하고 pRSET-B-cGnRH-II(M)-4R-STOP로 명명하였다(Fig. 4). 마지막으로 이 발현벡터는 4개의 반복된 cGnRH-II(M) 합성 DNA를 가진 183bp의 하나의 전사틀로 구성되었다 (Fig. 5). 연역된 사슬구조의 펩타이드 다중체는 4반복의 절단될 수 있는 연결펩타이드-cGnRH-II 펩타이드 서열과 마지막에 하나의 더 절단될 수 있는 연결펩타이드가 부착된 형태이다.

우리는 이 플라스미드 pRSET-B-cGnRH-II(M)-4R-STOP를 대장균 *recA* 균주 TOP10F'에 형질 전환시켜, 발현시켰고, 발현된 단백질을 SDS-PAGE 상에서 분석하였다(Fig. 6). 발현된 단백질은 약 8.0 kDa(kilo Dalton)으로 계산되어 DNASIS™ 컴퓨터 프로그램으로 디자인한 뉴클리오타이드로부터 연역된 분자량 7.3 kDa에 매우 가까웠다.

이 발현된 단백질은 PVDF 막을 이용하여 분리한 후 아미노산 서열을 분석하였다. 그 결과 3번째에서 7번째까지의 5개 아미노산들은 디자인된 cGnRH-II(M)-4R-STOP 벡터의 뉴클리오타이드 서열과 잘 일치되었고, 두 번째 아미노산은 주된 피이크의 높이 Gly>Met>Ala로부터 Gly로 추정되었고, 첫 번째 아미노산은 Met는 분석되지 않았지만, 대부분의 단백질이 첫 번째 아미노산으로 Met를 가지므로 Met로 간주된다. 그러므로 부분적인 아미노산서열분석, 분자량, 확인된 뉴클리오타이드 서열의 결과로부터, 우리는 이 단백질이 반복적 생산을 위

해 cGnRH-II(M) 펩타이드 기본구조를 토대로 디자인된 cGnRH-II(M)-4R-STOP 뉴클리오타이드로부터 생산된 것으로 결론지었다.

2. 최적발현 조건 확립

pRSET-B-cGnRHII-4R*(STOP)의 최적 발현조건을 실험실 수준에서 확립하기 위해 배지별(LB 및 SOB), IPTG 농도(1.0 및 5.0 mM), ampicillin(50 및 250 μ g/ml), pH별(5.0, 7.0, 9.0), 시간별(1, 3, 5) 발현결과를 조사하였다(data not shown). 결과로부터 pRSET-B-cGnRHII-4R*로부터 산란유도유전자의 발현결과는 LB < SOB, IPTG 농도는 1.0 > 5.0 mM, ampicillin 농도는 50 = 250 μ g/ml, pH 농도는 5.0 < 7.0 > 9.0, 발현시간별로는 1 < 3 < 5로 나타나 산란유도 단백질의 발현 조건을 확립하였다.

실험한 배지에서는 LB보다 SOB가 양호하며, 실험한 IPTG 농도는 1.0과 5.0 mM에서 발현에 차이가 보이지 않으므로 1.0 mM의 농도에서도 M13/T7 파아지에 존재하는 T7 polymerase의 단백질이 발현을 위해 충분히 유도되었음을 알 수 있다. ampicillin의 낮은 농도에서도 발현에 아무런 차이가 보이지 않으므로 이 발현 벡터가 비교적 안정하게 복제되어 대부분의 발현 벡터에서 예상되는 불안정성이 존재하지 않음을 알 수 있었다. 발현시간별로는 5시간 정도에서 최대의 발현이 관찰되므로 mRNA의 전사와 아미노산의 전이가 비교적 서서히 진행되는 것을 알 수 있다. 실험한 pH 농도에서는 이 단백질의 복제, 전사, 전이에 크게 영향을 미침을 알 수 있고, 이 산란유도 단백질의 발현을 위해서는 pH 7.0이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

3. GnRH의 안정성 조사

pRSET-B-cGnRHII-4R*는 5시간 및 24시간 발현시킨 후의 산란유도 단백질의 발현양상을 조사하였다(data not shown). 그 결과 5시간 발현시킨 단백질과 24시간 발현시킨 단백질의 gel상에서의 현격한 차이는 보이지 않았다. 그러므로 대장균 내에서 발현된 산란유도유전자의 단백질은 대장균 내에서 매우 안정하게 보인다.

그러므로 발현된 산란유도 단백질은 24시간 이상 발현시켜도 최적발현시간 5시간의 단백질 패턴과 아무런 차이가 없어 이 발현된 산란유도 단백질이 대장균에 거의 영향을 주지 않으며, 다른 대부분의 생리적으로 민감한 유전자가 가지는 시간별 RNA의 안정성과 시간별 단백질의 안정성에 변화가 거의 없어 숙주 내에서 비교적 안정하게 발현되고 유지된다는 사실을 알 수 있다.

제 4 절 고 찰

유전자의 high level expression을 위해서는 multicopy replicon, strong promoter로부터 transcription, mRNA의 효과적인 translation이 필요하다. 상업적으로 시판하는 대부분의 vector의 경우는 앞의 두 조건들을 충족시킬 수 있으나 mRNA의 효과적인 translation의 경

우는 실험하는 목적상 다양한 구조의 유전자를 클로닝하므로, mRNA의 secondary structure가 최적 발현에 큰 문제가 된다. 특히 translation의 시작부위에 있는 mRNA의 secondary structure가 곧바로 mRNA의 translation을 방해할 수 있다. 어떤 특정한 염기 서열의 hair pin structure의 ΔG 값이 크면 클수록 mRNA의 translation이 어렵고, 낮으면 일반적으로 translation이 용이하다.

본 연구에서 pRSET-B vector는 ATG codon부분에 *NdeI* restriction enzyme site가 있고 뒷부분에 MCS가 있어 비교적 쉽게 디자인된 synthetic DNA를 클로닝이 용이하였다. 그러나 발현이 잘 되지 않은 이유는 아마도 처음 디자인한 synthetic DNA에 의해서 생성된 mRNA의 translation시작부위가 hair pin구조를 형성하여 효과적인 translation을 방해했다고 생각된다.

그러므로 본 연구에서는 발현벡터의 발현율을 증가시키기 위해, 우리는 RNA 이차구조의 에너지 ΔG 값을 기본으로 Met-linker peptide-cGnRH-II 부분의 올리고뉴클레오타이드를 디자인하여, 낮은 ΔG 값을 가진 염기서열을 사용하여 성공적으로 반복된 산란유도 단백질 다중체를 생산할 수 있었다.

발현에 사용된 염기서열은 원래 디자인한 cGnRH-II(M)-3R 카세트의 염기서열과 다르므로, 기본단위 cGnRH-II 올리고뉴클레오타이드 사이의 내부 상동성을 낮출 수 있다. 왼쪽 어댑터의 *XmaI* 부위는 pRSET-B-cGnRH-II(M)-3R-STOP 벡터의 *NdeI/XmaI* 부위에 Met-linker peptide-cGnRH-II 부분에 해당하는 합성 DNA를 삽입하는데 매우 편리하였다 (Fig. 4 and 5). 그러므로 어댑터나 연결펩타이드 뉴클레오타이드 내에 제한효소부위를 가지는 아미노산서열은 클로닝과 DNA카세트의 조작을 위해 대단히 편리하게 사용될 수 있을 것이다. 이러한 목적을 위해 우리가 디자인한 연결펩타이드(Table 1)의 여분의 아미노산(Xn)은 아미노산서열과 일치하는 제한효소부위를 삽입하는데 매우 편리할 것이다.

본 연구에서는 보는바와 같이 짧은 펩타이드의 다중체 단백질을 성공적으로 발현시키기 위해서는 mRNA의 secondary structure가 중요함을 알 수 있었고, 시판하는 대부분의 vector의 경우는, 실험하는 목적상 다양한 구조의 유전자를 클로닝하므로, mRNA의 secondary structure가 최적 발현에 큰 문제가 된다. 그러므로 효율적인 발현을 위해서는 translation이 개시되는 뉴클레오타이드를 RNA secondary structure가 최소한의 에너지를 갖도록 디자인한 합성 DNA를 사용하여 발현을 용이하게 최적화시킬 수 있도록 발현벡터를 재구성하는 것이 매우 중요함을 알 수 있었다.

본 연구에서 발현된 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과 산란유도 단백질을 반복적으로 생산하기 위해 디자인한 염기서열로부터 연역된 아미노산서열과 동일한 아미노산서열이 생성되어 이 방법으로 짧은 펩타이드를 용이하게 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

발현된 산란유도 단백질의 다중체의 배지별, IPTG 농도별, ampicillin 농도별, pH별, 시간별 최적발현조건을 조사하였으며, 이 단백질은 pH 7.0이 최적 발현조건을 가짐으로 중성 단백질로 간주되고, 24시간 발현시킨 단백질도 gel 상에서 분해되지 않았다. 그러므로 대장균 내에서 발현된 산란유도 단백질의 다중체는 대장균 내에서 매우 안정하게 보인다.

제 4 장 GnRH 유전자의 실용화 연구

제 1 절 서 설

유전공학적으로 대량 생산될 cGnRH-II의 유사체가 활성을 가지는가를 먼저 조사한 뒤 클로닝된 벡터로부터 산란유도 단백질을 대량생산을 하기 위해서 cGnRH-II 유사체를 화학적으로 합성하여 어류뇌하수체를 이용하여 GTH(gonadotropin hormone) 유도효능을 조사하고, 만약 화학적으로 합성된 cGnRH-II 유사체가 GTH 유도 효능을 가지고 있으면 유전공학적으로 cGnRH-II 다중체를 대량생산하고자 한다.

제2차년도에 유전공학적으로 pRSET-B-cGnRH-II(M)-4R에서 산란유도 단백질의 다중체가 반복되게 잘 발현되었지만 FPLC 정제과정의 resource Q와 mono Q의 anion exchanger resin을 사용하여 NaCl의 linear gradient로 elution한 결과, 산란유도 단백질의 분리가 효율적이지 못하여 정제에 어려움이 있었다. 그러므로 본 연구에서는 단백질 분리가 잘 확립되어 있는 His-tag를 이용한 산란유도 단백질의 정제방법을 확립하기 위하여 His-tag를 C-terminal에 가지고 있는 pET22b(+) 벡터에 subcloning 하여, cGnRH-II 단백질의 다중체를 대량으로 생산 분리하여, 트립신으로 절단한 뒤 생겨난 cGnRH-II 단일유사체의 아미노산 서열을 확인하고, 대량생산하여 인공산란 유도효능 여부를 조사하고자 한다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. GnRH 단백질 유도체의 합성 및 구성

본 실험에 사용된 산란유도 단백질 cGnRH-II의 유도체는 PepTron Co.에 의뢰하여 free acid 형태로 합성하였고, HPLC로 정제한 것을 사용하였다(Fig. 7). LHRH(L-4513) des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-LUTEINIZING HORMONE은 Sigma Co.로부터 구입하였다.

2. *In vitro* GTH assay

합성된 cGnRH-II analog로부터 GTH-II의 유도효과를 조사하기 위해서 250 g 내외의 미성숙된 무지개송어 뇌하수체를 분리하여 각각의 뇌하수체 조직을 50 ml의 Hank's balanced salt sol'n에 모아서 혈흔을 여러 번 세척한 후 각각의 조직을 RPMI 1640 배지 500 μ l에 18 °C에서 12시간 동안 전 배양을 한 후 다음날 아침에 테스토스테론을 100 ng/ml이 되게 RPMI 1640 450 μ l에 18 °C에서 3일간 배양한 뒤 각각의 뇌하수체에 테스토스테론 100 ng/ml와 GnRH analog를 10 nM의 농도로 첨가 후 18 °C에서 24시간 동안 더 배양한 후 조직과 배양액을 분리하였다. 배양액으로부터 유도된 GTH를 무지개송어 GTH-II($\alpha + \beta$) 항체를 사용하여 EIA법(Salbert et al., 1990)으로 측정하였다.

3. 산란유도 단백질의 발현 및 분리

산란유도 단백질을 용이하게 분리하기 위해서, 단백질 분리가 잘 확립되어 있는 His-tag를 이용한 산란유도 단백질의 정제방법을 확립하기 위하여 His-tag를 C-terminal에 가지고 있는 pET22b(+)(Invitrogen Co.)에 subcloning 하였다. Subcloning된 벡터는 pET22b(+)-cGnRH-II(M)-4R을 E. coli BL21(DE)pLysS에 형질 전환시켜 LB배지에 배양하여 0.6에서 IPTG를 최종농도 1mM로 첨가하여 3시간 더 배양한 후 2000 x g에서 20분간 원심분리하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포는 냉장시킨 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 두 번 세척한 후 1/10의 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 현탁시켜 파쇄시킨 후 inclusion body를 회수하여 8M urea에 용해시켜 Ni-NTA column(Qiagen)에 부착시킨 후 elution시켰다.

4. 산란유도 단백질 다중체의 트립신 절단

분리된 산란유도 단백질 다중체를 트립신으로 20mM Tris-HCl (pH 8.0)에서 3hr 동안 실온에서 절단반응 시켰다. 절단된 단백질은 10-20% Tricine gel (Novex)로 분석하였다.

5. FPLC(fast-protein liquid chromatography)

증류수로 평형시킨 μ Bondapak column(3.9×300mm)에 샘플을 적용시켰다. 기울기는 100%의 buffer A (dH₂O/10%TFA)로 시작하고 100%의 buffer B (CH₃CN/10% TFA)로 종결하였다. 수집된 샘플은 동결건조 시키고, 현탁시킨 후 아미노산서열을 분석하였다.

6. 아미노산서열분석

절단된 단백질을 부산대 기초과학연구소, Korea Basic Science Institute(KBSI)에 의뢰하여 아미노산서열분석기 (Applied Biosystems, model 476A)로 아미노산서열을 분석하였다.

7. *In vivo* steroid assay

생체 내에서 산란유도 단백질의 산란유도 효과를 조사하기 위해서 가장 효율적으로 조사할 수 있는 스테로이드 호르몬의 분석을 행하였다. 길이 20cm, 체중 100g 내외의 산란 직전의 성숙된 은어 암컷만을 2-phenoxyethanol(0.4ml/l)에 마취시킨 후 산란유도 단백질 50 또는 150 μ g을 100ml의 0.85% NaCl에 용해시켜 복강에 주사한 후 6 시간 후 해파린으로 처리한 주사기로 혈액을 채취하여 원심분리 후 얻은 혈장으로부터 EIA 방법(Aida et al., 1984)으로 스테로이드 호르몬의 함량을 조사하였다. 본 실험에 사용된 호르몬 항체는 Sigma 제품을 사용하였고, 방사선 표지 스테로이드는 Amersham에서 구입하였다.

제 3 절 결 과

1. GnRH 단백질의 활성 연구

제2차 년도에 cGnRH-II(M)-4R DNA cassette로부터 산란유도 단백질 다중체를 효율적으로 발현시켰다. 그러므로 본 연도에서는 생산될 cGnRH-II(M)의 유사체가 활성을 가지는가를 조사한 뒤 클로닝된 벡터로부터 산란유도 단백질을 대량생산을 하기 위해서 cGnRH-II(M)-4R DNA 카세트로부터 생성될 수 있는 유사체를 화학적으로 합성하였다 (Fig. 7).

cGnRH-II(M)-4R DNA 카세트에서 유전공학적으로 연속해서 생산하여 절단시킨 후 생산될 수 있는 유사체는 원래의 cGnRH-II의 C-말단에 Gly-Lys-Arg를 부착시켜 반복생산 후 절단될 수 있도록 디자인된 cGnRH-II(Gly11, Lys12)의 형태이다.

이 cGnRH-II(Gly11, Lys12)의 *in vitro* 내에서 GTH 유도효능을 조사하기 위해서 LHRH를 대조구로 사용하여 *in vitro* assay를 수행하였다(Fig. 8). 이 실험 결과 0.8% NaCl을 투여한 control에서는 GTH가 유도되지 않았고, cGnRH-II(Gly11, Lys12) 및 LHRH를 투여한 무지개송어 pituitary cell에서 GTH가 유도되어 클로닝된 벡터에서 유전공학적으로 생산할 cGnRH-II(Gly11, Lys12)가 LHRH와 마찬가지로 GTH 유도효능이 있음을 확인하였다. 그러므로 화학적인 합성시 유도체를 사용한 LHRH 경우는 생체 내에서 잘 분해되지 않지만 본 연구에서 합성한 cGnRH-II(Gly11, Lys12)는 생체가 가지는 자연형태의 아미노산만을 사용하므로 생리적인 면에서 더욱 생체조건에 적합한 아미노산 구성을 가진다고 생각되므로 앞으로 개발 가능성이 높다고 생각된다.

2. GnRH 단백질의 대량생산

2차년도에 pRSET-B-cGnRH-II(M)-4R에서 산란유도 단백질의 다중체가 반복되게 잘 발현되었다. 하지만 발현을 용이하게 하기 위해서 pRSET-B 벡터가 원래 가지고 있던 his-tag 부분이 제거하여 발현된 단백질이 his-tag 부분을 갖지 않으므로 FPLC 정제과정의 resource Q와 mono Q의 anion exchanger resin을 사용하여 NaCl의 linear gradient로 elution한 결과, 산란유도 단백질의 분리가 효율적이지 못하여 정제에 어려움이 있었다. 그러므로 단백질 분리가 잘 확립되어 있는 His-tag를 이용한 산란유도 단백질의 정제방법을 확립하기 위하여 His-tag를 C-terminal에 가지고 있는 pET22b(+)에 subcloning 하였다 (Fig. 9). Subcloning된 벡터는 pET22b(+)-cGnRH-II(M)-4R을 *E. coli* BL21(DE)pLysS에 형질전환시켜 cGnRH-II(M)-4R 단백질을 발현시켰다. 발현시킨 세포를 수집하여, 파쇄시킨 후 inclusion body를 회수하여 8M urea에 용해시켜 Ni-NTA column에 부착시킨 후 elution시켰다. 그 결과 1M imidazole에서 cGnRH-II(M)-4R가 잘 분리되었다(Fig. 10).

분리된 cGnRH-II(M)-4R 산란유도 단백질 다중체를 증류수에 투석시킨 후 다시 20mM Tris-Cl(pH 8.0)에 12시간 투석시킨 후, 연결부분을 절단하기 위해 트립신을 20℃에서 3시간 처리하여 연결 펩타이드 부분을 절단시킨 후 다시 Ni-NTA column에 elution시켜, His-tag의 C-terminal 부분을 제거한 후, 얻어진 절단된 단일 cGnRH-II 유사체를 FPLC로 회수하여 동결 건조시켰다 (Fig. 11).

회수한 단일 cGnRH-II 유사체 단편을 아미노산 서열을 분석한 결과 디자인한 아미노산 서열을 정확히 가진 (Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-Gly-Lys), cGnRH-II(Gly11,

Lys12)가 정확히 생산되어 대량생산 방법을 완전히 확립하였다. 최종 수확율은 100ml 당 10mg의 cGnRH-II(Gly11, Lys12)를 회수할 수 있어 대단히 성공적으로 대량생산이 가능하였다.

3. 인공 산란유도 기술개발

회수된 cGnRH-II (Gly11, Lys12)의 생체내 인공산란 유도효능을 조사하기 위해서 *in vivo* assay를 행하여 testosterone의 변화를 조사하였다 (Fig. 12). 그 결과 화학적으로 합성된 cGnRH-II(Gly11, Lys12)와 유전 공학적으로 생산된 cGnRH-II (Gly11, Lys12)는 별 차이가 없었고, 유전 공학적으로 생산된 cGnRH-II (Gly11, Lys12)는 어류 개체 당 50 및 150 μ g을 주사한 후 6시간 뒤 testosterone의 변화에는 농도에 따라 큰 차이가 없었다. 결과를 보면 유전공학적으로 생산된 cGnRH-II (Gly11, Lys12)는 6시간 후 분명히 testosterone을 유도함을 알 수 있었다.

Wetsel 등(1991)은 시상하부의 신경세포에서 pro-LHRH; LHRH-(Gly11, Lys12, Arg13)가 LHRH-(Gly11, Lys12), LHRH-(Gly11), 및 LHRH로 전환되는 것을 밝혔다. 그러므로 본 연구에서 생산된 cGnRH-II-(Gly11, Lys12)도 생체가 가지고 있는 중간체의 하나로서 carboxypeptidase E (EC 3. 4. 17. 10)에 의해서 C-말단의 Lys12가 제거되고, 계속해서 peptidyl glycine alpha-amidating monooxygenase (EC 1. 14. 17. 3)에 의해서 amidated 된 cGnRH-II로 변환되리라 사료된다. 그러므로 Fig. 12에서 결과는 cGnRH-II-(Gly11, Lys12)가 투입되어 amidated된 cGnRH-II로 전환되어 testosterone을 유도했다고 사료된다.

제 4 절 고 찰

절단될 수 있는 연결 펩타이드를 사용하여 cGnRH-II 펩타이드가 4반복된 연쇄발현은 짧은 펩타이드의 고효율 생산에 대한 첫 번째 성공이 될 것이다. 왜냐하면 사슬구조 펩타이드 다중체는 적당한 효소나 화학물질로 연결 펩타이드를 절단함으로써 정량적으로 단량체 펩타이드로 전환될 수 있기 때문이다. 우리는 Table 1에 보는 바와 같이 여러 가지 짧은 펩타이드를 연쇄적인 다중체로 생산하기 위해 연결 펩타이드를 디자인하기 위해 여러 가지 절단될 수 있는 아미노산과 아미노산서열을 사용할 수 있다.

우리는 이 연구에서 하나의 짧은 펩타이드와 하나의 연결 펩타이드를 예로서 변조된 펩타이드를 디자인하는데 사용하였지만, 만약 우리가 펩타이드의 기본단위를 디자인하는데 많은 절단될 수 있는 연결 펩타이드를 성공적으로 사용한다면, 우리는 이러한 새로운 방법으로 여러 가지 짧은 펩타이드의 생산성을 높일 수 있다고 믿는다.

더욱이, 우리는 잘 디자인된 연결 펩타이드는 잘 발현되지 않는 단백질의 발현을 위해 매우 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 왜냐하면, 사슬 다중체 생산을 통해서, 전하가 높으

면 다중체의 전하는 더욱 증가될 것이다. 이러한 문제는 여분의 아미노산으로서 연결 펩타이드 내에 반대되는 하전을 가진 아미노산을 삽입하여 해결될 수 있고, 그것은 단백질의 내부 하전을 안정화시킬 것이다. 더욱이, 우리는 연쇄 다중체내에 어떤 소수성 및 친수성 문제도 전하문제처럼 해결될 수 있다고 생각된다. 또한, 연결 펩타이드의 절단부위로부터 생겨난 펩타이드 유사체가 갖는 여분의 아미노산의 기능은 가까운 미래에 단백질의 생물학적 기능에 있어서 많은 관심을 가지게 될 것이다.

우리의 실험결과, 이 방법은 디자인된 변조된 짧은 펩타이드의 뉴클리오타이드 기본구조를 반복적 클로닝해서 짧은 펩타이드를 반복적으로 생산할 수 있다. 그러므로 이 방법은 실험적 연구 및 산업화를 위해 호르몬, 효소, 면역화학적 단백질, 항생제단백질 및 다른 짧은 단백질들을 생산하는데 쉽게 응용될 수 있을 것이다. 발현된 단백질은 확립된 단백질 화학에 의해서 연결단백질을 절단한 후 원래의 펩타이드 또는 그 유사체로서 수집될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 유전공학적으로 생산될 cGnRH-II의 유사체를 대량생산하기 전에 화학적으로 합성한 동일한 산란유도 단백질의 유사체가 활성 여부를 조사한 뒤 클로닝된 벡터로부터 산란유도 단백질을 대량생산하여 트립신으로 절단될 수 있는 연결 펩타이드와 cGnRH-II 펩타이드의 4반복 연쇄발현된 펩타이드 다중체를 절단하여 짧은 펩타이드를 고효율적인 방법으로 생산하였다.

절단된 cGnRH-II 유사체 단편의 아미노산 서열을 분석한 결과 디자인한 아미노산 서열을 정확히 가진 (Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-Gly-Lys), cGnRH-II (Gly11, Lys12)가 정확히 생산되어 대량생산 방법을 완전히 확립하였다.

이 생산된 cGnRH-II-(Gly11, Lys12)는 생체가 가지고 있는 amidated된 cGnRH-II 중간체의 하나로서 carboxypeptidase E에 의해서 C-말단의 Lys12가 제거되고, 계속해서 peptidyl glycine alpha-amidating monooxygenase에 의해서 amidated 된 cGnRH-II된 형태로 변환되어 testosterone의 생성을 유도했다고 사료되고 화학적으로 합성된 산란유도 단백질보다 생체가 가지고 있는 중간체를 사용하기 때문에 더욱 안전한 물질로 사료된다.

제 5 장 참고문헌

- Aida, K., T. Kato and M. Awaji., 1984. Effects of castration on the smoltification of precocious male masu salmon *Oncorhynchus masou*. Bull. Jpn. Soc. Fish., 50:565-571.
- Hartly, J.L., Gregori, T.J. 1981. Cloning multiple copies of a DNA segment. Gene 13, 347-353.
- Jiang, S.W., Trujillo, M.A., Eberhardt, N.L. 1996. An efficient method for generation and subcloning of tandemly repeated DNA sequences with defined length, orientation and spacing. Nucleic Acids Res. 15, 3278-3279.
- Johnson, D.A., Gautch, J.W., Sportsman, J.R. and Elder, J.H., Gene Anal. Techn. (1): pp3-8(1984).
- Kim, S.C., Szybalski, W. 1988. Amplification of cloned DNA as tandem multimers using BspMI-generated asymmetric cohesive ends. Gene 15, 1-8.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lee, J.H., Hong, S.S., Kim, S.C. 1988. Expression of an antimicrobial peptide magainin by a promoter inversion system. J. Microbiol. Biotechnol. (Korean Society for Applied Microbiology) 8, 34-41.
- Lee, J.H., Skowron, P.M., Rutkowska, S.M., Hong, S.S., Kim, S.C. 1996. Sequential amplification of cloned DNA as tandem multimers using class-IIS restriction enzymes. Genet. Anal. 13, 139-145.
- Matsudaria, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. 262, 10035-10038.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. 101, 20-98.
- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K., Matsuo, H. 1984.

Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3874-3878.

Nikolics, K., Seeburg, P. H., Ramachandran, J. 1988. The biosynthetic precursor of gonadotropin-releasing hormone. *In "Frontiers in Neuroendocrinology"* (L. Martini and W. F. Ganong, Eds.), Vol. 10, pp. 153-166. Raven Press, New York.

Pan, A., Tie, F., Yang, M., Luo, J., Wang, Z., Ding, X., Li, L., Chen, Z., Ru, B. 1993. Construction of multiple copy of alpha-domain gene fragment of human liver metallothionein IA in tandem arrays and its expression in transgenic tobacco plants. *Protein Eng.* 6, 755-762.

Salbert, G., Barlhache, T., Zohar, Y., Breton, B., Jego, P. 1990. A rapid and sensitive ELISA for rainbow trout maturational gonadotropin (tGtH II): Validation on biological samples: *in vivo* and *in vitro* response to GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78, 110-112.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Taylor, W.H., Hagerman, P.J. 1987. A general method for cloning DNA fragments in multiple copies. *Gene* 53, 139-144.

Wetsel, W.C., Mellon, P.L., Weiner, R.I., Negro-Vilar A. 1991. Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 129, 1584-1595.

Yanish-Peron, C., Vieira, J., Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Table 1. Protolytic enzymes and chemical compound containing specific cleavages, and the designed examples of their linker peptides in this study.

Proteases or chemical compound	Cleavage sequence	Designed linker peptides
Trypsin	Lys ↓ , Arg ↓	Lys, Arg, (X)n-Lys, (X)n-Arg, Lys-(X)n, Arg-(X)n, (X)n-Lys-(X)n, (X)n-Arg-(X)n,
Pepsin and chemotrypsin	Phe ↓ , Trp ↓ , Tyr ↓	Phe, Trp, Tyr, (X)n-Phe, (X)n-Trp, (X)n-Tyr, Phe-(X)n, Trp-(X)n, Tyr-(X)n, (X)n-Phe-(X)n, (X)n-Trp-(X)n, (X)n-Tyr-(X)n,
Enterokinase	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ↓	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, (X)n-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-(X)n, (X)n-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-(X)n,
rTEV protease	Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln ↓ -Gly	Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, (X)n-Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly-(X)n, (X)n-Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly-(X)n,
Factor Xa protease	Ile-Glu-Gly-Arg ↓	Ile-Glu-Gly-Arg, (X)n-Ile-Glu-Gly-Arg, Ile-Glu-Gly-Arg-(X)n, (X)n-Ile-Glu-Gly-Arg-(X)n,
CNBr	Met ↓	Met, (X)n-Met, Met-(X)n, (X)n-Met-(X)n,

↓ indicates the cleavage site.

*(X)n represents any kinds and any number of amino acid(s) as stuffy amino acid(s).

cGnRH-II peptide: Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly
(Free acids)

↓ attaching a cleavable

linker peptide with trypsin

Design of the basic unit of the modified cGnRH-II(cGnRH-II(M)) peptide:

Gly-Lys-Arg-Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-Gly-Lys-Arg

↓ deciphering nucleotides

Deciphered nucleotides of the basic unit of the cGnRH-II(M) peptide:

Gly- Lys- Arg- Glu- His- Trp- Ser- His- Gly- Trp- Tyr- Pro- Gly- Gly- Lys- Arg
GGG AAG AGA GAG CAC TGG TCC CAC GGG TGG TAC CCA GGC GGG AAG AGA
CCC TTC TCT CTC GTG ACC AGG GTG CCC ACC ATG GGT CCG CCC TTC TCT

↓ designing the synthetic DNAs

Basic unit of the cGnRH-II(M) synthetic DNAs:

I) a cohesive 3' overhang

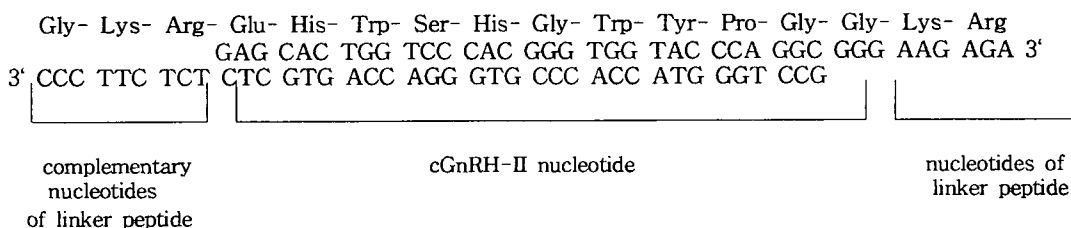
Gly- Lys- Arg- Glu- His- Trp- Ser- His- Gly- Trp- Tyr- Pro- Gly- Gly- Lys- Arg
 GAG CAC TGG TCC CAC GGG TGG TAC CCA GGC GGG AAG AGA
CCC TTC TCT CTC GTG ACC AGG GTG CCC ACC ATG GGT CCG

II) a cohesive 5' overhang

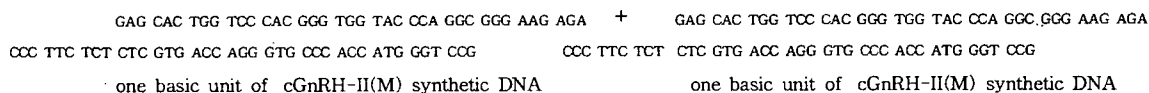
Gly- Lys- Arg- Glu- His- Trp- Ser- His- Gly- Trp- Tyr- Pro- Gly- Gly- Lys- Arg
GGG AAG AGA GAG CAC TGG TCC CAC GGG TGG TAC CCA GGC
 CTC GTG ACC AGG GTG CCC ACC ATG GGT CCG CCC TTC TCT

Fig. 1. Design of the basic unit of the modified cGnRH-II(cGnRH-II(M)) peptide and the adaptor synthetic DNAs. The cGnRH-II(M) peptide was designed by attaching a cleavable linker peptide, Gly-Lys-Arg with trypsin on both ends of the original peptide, deciphered the nucleotides of the basic unit of the cGnRH-II(M) peptide, and then three kinds of the basic unit of the cGnRH-II(M) synthetic DNAs were constructed. Lys and Arg are trypsin cleavable sites. The 5' and 3' overhang of the cGnRH-II(M) synthetic DNAs were designed with a full length of the basic unit of the cGnRH-II(M) nucleotides, but the blunt end of the cGnRH-II(M) synthetic DNA was designed without the right side of the nucleotides of the linker peptide.

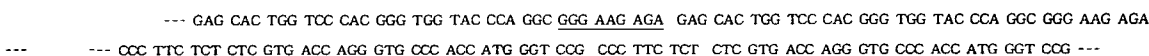
A cohesive 3' overhang cGnRH-II(M) synthetic DNA:



↓
Self-ligation for repetitive cloning
of cGnRH-II(M) synthetic DNAs



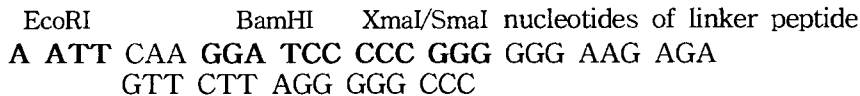
↓



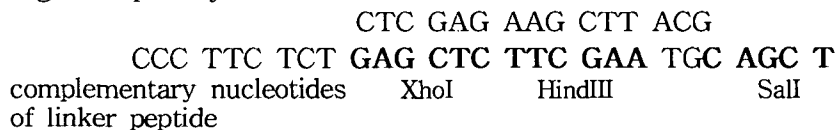
↓

Mix adaptor synthetic DNAs
and ligation

Left adaptor synthetic DNA:

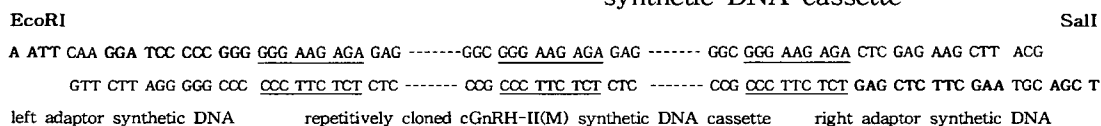


Right adaptor synthetic DNA:



↓

Constructing a clonable cGnRH-II(M)
synthetic DNA cassette



↓

Cloning the cassette into the EcoRI/SalI site of pUC19

Fig. 2. Strategy for repetitive cloning of cGnRH-II(M) synthetic DNAs.

The oligonucleotides for the nucleotides of left and right adaptor, and cGnRH-II(M) were synthesized and annealed to make synthetic DNA. A cohesive 3' overhang cGnRH-II(M) synthetic DNA was self-ligated first and then adaptor synthetic DNAs were mixed for second ligation to make a clonable cassette. The adaptor ligated cassette was cloned into the *EcoRI/SalI* site of pUC19. The underlined region represents the ligated nucleotide between the synthetic DNAs and the dotted line represents the abbreviated length of the cGnRH-II(M) nucleotides

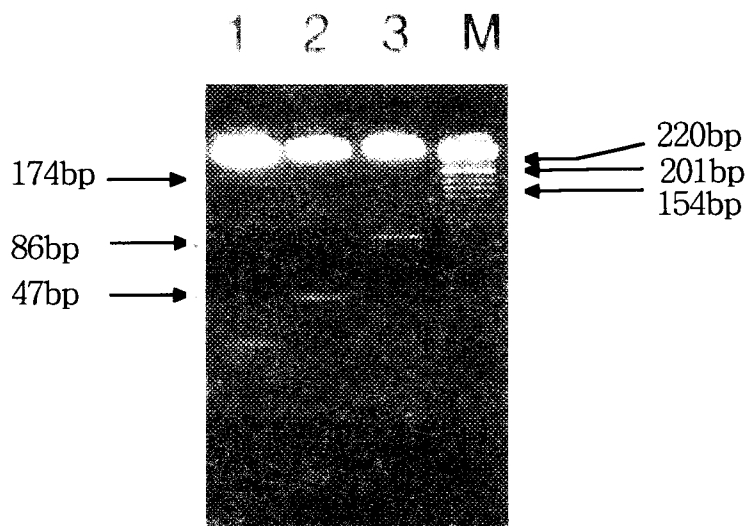


Fig. 3. Result of the repetitive cloning for the basic unit of the cGnRH-II(M) synthetic DNA cartridge. Plasmid DNAs were isolated from the white colonies, digested with *EcoRI/SalI* restriction enzymes, and analyzed on a 3% metaphor agarose gel. Left arrows indicate the size of the cloned *EcoRI/SalI* DNA cassettes and right arrows indicate the size of 1Kb ladder. Lane 1: Left adaptor-right adaptor synthetic DNA cassette (47bp); Lane 2: Left adaptor-cGnRH-II(M) DNA insert-right adaptor synthetic DNA cassette (86bp); Lane 3: Left adaptor-cGnRH-II(M) DNA insert-cGnRH-II(M) DNA insert-cGnRH-II(M) DNA insert-right adaptor synthetic DNA cassette (174bp); Lane 4: 1Kb ladder (Marker DNA)

Fig. 4. Construction of the expression vector containing four repetitive basic units of cGnRH-II(M) synthetic DNAs. Abbreviations: ΔC , Met-linker peptide-cGnRH-II portion synthetic DNA; C, cGnRH-II(M) synthetic DNA; L, left adaptor synthetic DNA; R, right adaptor synthetic DNA; S, stop codon synthetic DNA.

Met- Gly- Lys↓Arg↓Glu- His- Trp- Ser- His- Gly- Trp- Tyr- Pro- Gly	(14)
(T) ATG GGC AAA CGA GAG CAT TGG TCA CAC GGG TGG TAC CCC GGG	42
NdeI	Xma/SmaI

AC	
Gly- Lys↓Arg↓Glu- His- Trp- Ser- His- Gly- Trp- Tyr- Pro- Gly	(27)
GGG AAG AGA GAG CAC TGG TCC CAC GGG TGG TAC CCA GGC	81

C	
Gly- Lys↓Arg↓Glu- His- Trp- Ser- His- Gly- Trp- Tyr- Pro- Gly	(40)
GGG AAG AGA GAG CAC TGG TCC CAC GGG TGG TAC CCA GGC	120

C	
Gly- Lys↓Arg↓Glu- His- Trp- Ser- His- Gly- Trp- Tyr- Pro- Gly	(53)
GGG AAG AGA GAG CAC TGG TCC CAC GGG TGG TAC CCA GGC	159

C	
Gly- Lys↓Arg↓Leu- Glu- Lys↓Leu-***	(62)
GGG AAG AGA CTC GAG AAG CTT TGA CAG CTG TCA AAG CTT	198
XhoI HindIII PvuII HindIII	

R	S

Fig. 5. Cloned sequence of four repetitive basic units of the cGnRH-II(M) synthetic DNA sequence and its deduced amino acid sequence. Abbreviations are same as in Fig. 4. ***, stop codon; Gly-Lys-Arg, linker peptide sequence; ↓, trypsin cleavage; dotted bar, overlapping region. The bp numbers and amino acid numbers are indicated on the right margin as small plain figure and large plain figure in the brackets, respectively.

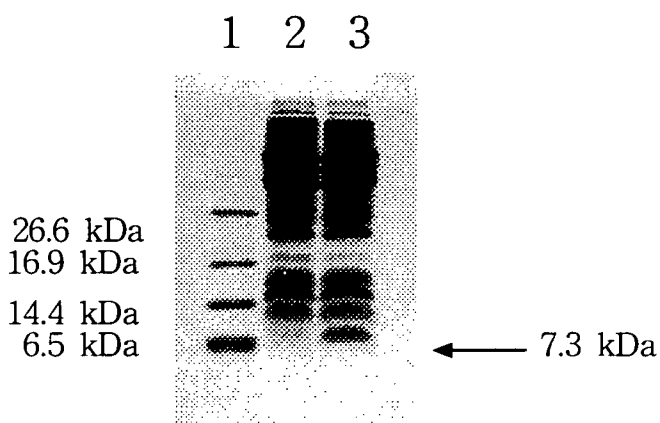


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of an expressed cGnRH-II peptide multimers with four repeats of cleavable linker peptide-cGnRH-II peptide sequences with a final cleavable linker peptide. Molecular mass of the standard polypeptides are indicated on the left and the expressed 7.3kDa cGnRH-II(M)-4R protein is indicated by an arrow on the right. Lane 1, Marker protein(polypeptide range, Bio-Rad Co.); Lane 2, pRSET-B-cGnRH-II(M)-3R-STOP control; Lane 3, pRSET-B-cGnRH-II(M)-4R-STOP.

cGnRH-II(Gly11, Lys12):

pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-Gly-Lys ↓

Fig. 7. Chemically synthesized cGnRH-II analog designed in this study. Stuffer amino acids are underlined. Arrow indicate the end of cleavage.

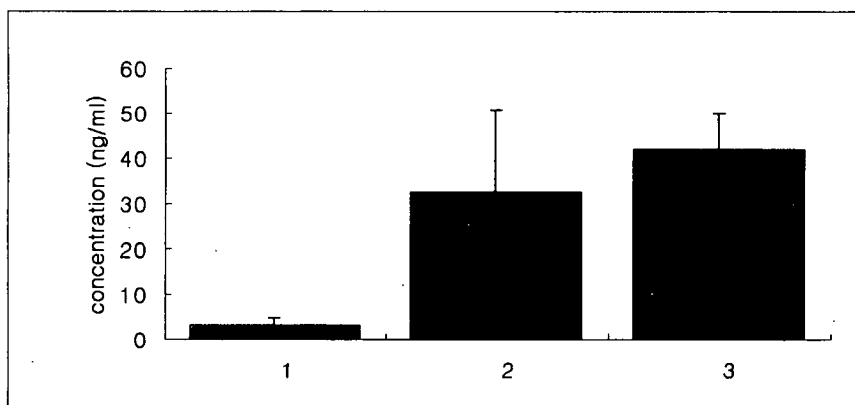
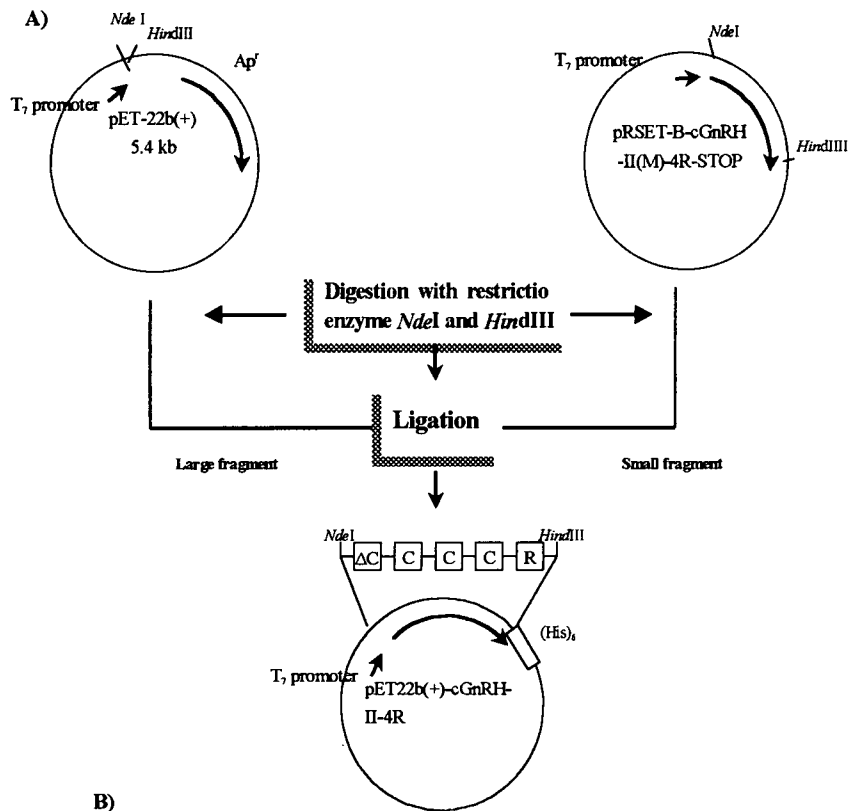
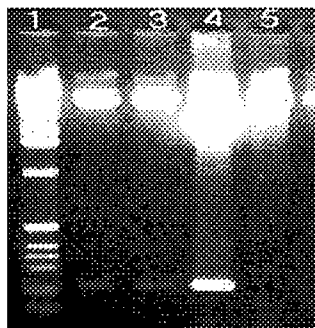


Fig. 8. EIA assay of the rainbow trout pituitary gland tissue with GTH-II ($\alpha + \beta$) antibody. Trout pituitary gland tissues were induced for 3 days and the supernatant was used for EIA assay. Lanes: 1, 0.8% NaCl; 2, cGnRH-II(Gly11, Lys12); 3, LHRH.



B)



A) Construction of GnRH expression vector using pET22b(+) vector

B) Digestion of cloned plasmid with restriction enzyme

1. 1kb ladder (Gibco BRL)
2. pET22b(+)-cGnRH-II-4R (*XmaI*/*HindIII*)
3. pET22b(+)-cGnRH-II-4R (*XmaI*/*HindIII*)
4. pRSET-B-cGnRH-II(M)-4R-STOP(*XmaI*-*HindIII*)
5. pET22b(+) (*XmaI*-*HindIII*)

Fig. 9. Subcloning of cGnRH-II(M)-4R in pET22b(+) vector. A: Subcloning strategy. **B:** Screening of the subcloned cGnRH-II-4R in pET22b(+) vector.

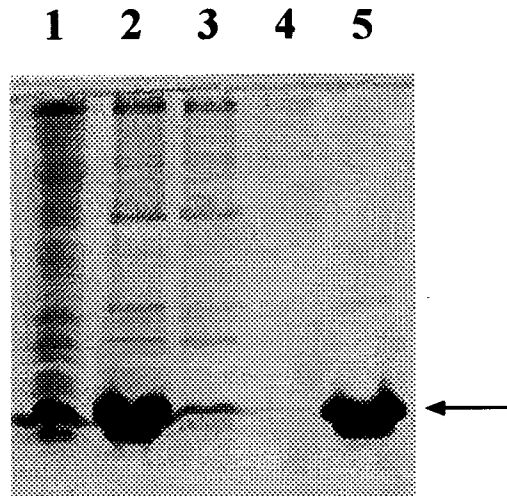


Fig. 10. Purification of cGnRH-II(M) multimers with nickel affinity chromatography.

Lanes: 1, total cell lysate; 2, inclusion body; 3, flow-through; 4, washed column (60mM imidazole); 5, eluted cGnRH multimers (1M imidazole). An arrow indicates the cGnRH-II multimers.

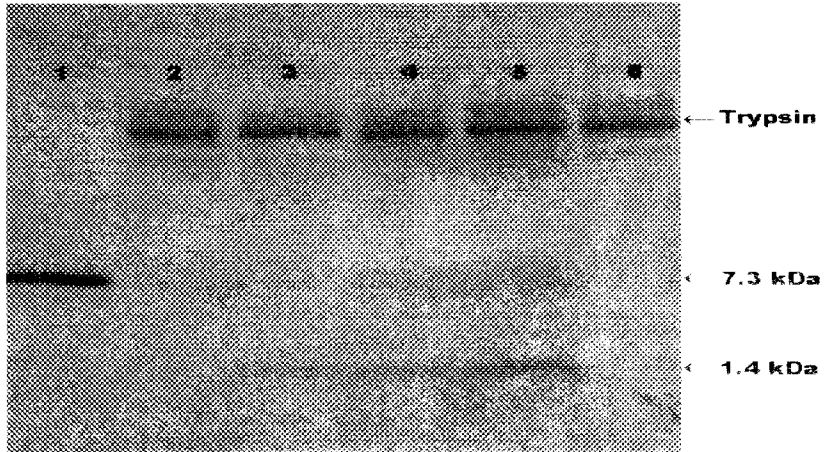


Fig. 11. Tricine gel analysis of the cleaved cGnRH-II analog monomer. Arrows indicate trypsin, the 7.3 kDa cGnRH-II multimer and the cleaved 1.4kDa cGnRH-II analog monomer, respectively on the right. Lane 1, 2 μ g of concatameric cGnRH-II multimer control; Lane 2-5, various amounts of cGnRH-II multimers (lane 2, 2 μ g; lane 3, 4 μ g; lane 4, 6 μ g; lane 5, 10 μ g) were digested with 1 μ g of trypsin; Lane 6, 1 μ g of trypsin control.

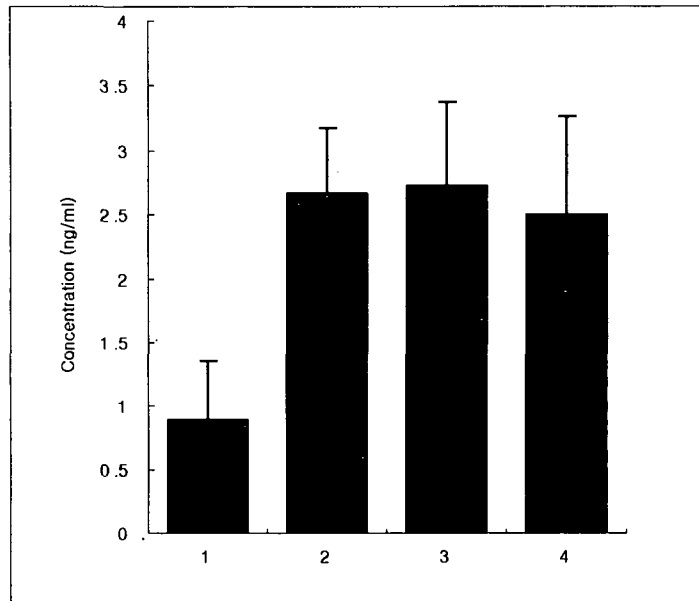


Fig. 12. Concentration of the induced testosterone in the matured ayu with cGnRH analogs after treating 6 hr. Lanes: 1, control(0.85% NaCl 100 μ l/fish); 2, chemically synthesized cGnRH-II (Gly11, Lys12)(50 μ g of 100 μ l/fish); 3, genetically engineered cGnRH-II (Gly11, Lys12)(50 μ g of 100 μ l /fish); 4. genetically engineered cGnRH-II (Gly11, Lys12)(150 μ g of 100 μ l /fish).

제 2 세부과제

제 1 장 서 론

혈관생성과정은 악성암과 같은 병적인 조건뿐만 아니라 상처치유 및 발생 과정과 같은 정상적인 생리과정에서도 찾아볼 수 있는 현상이다. 이 혈관생성과정의 이상에 의해 발생초기부터 성인에 이르기까지 다양한 질병과 연관이 되어 있다. 특히 악성암의 전이현상은 혈관생성과정에 의존적인 것으로 알려져 있다. 따라서 혈관생성과정을 조절할 수 있는 새로운 인자는 악성암과 같은 혈관생성관련 질병의 치료제로 쓰일 수 있을 것이다.

이와 관련해, 연골은 혈관생성이 차단된 조직으로, 이 조직에는 혈관생성 억제 단백질이 합성되어 혈관생성 억제작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 상어를 비롯한 연골어류는 그 연골의 양이 다량 존재하고, 그 연골에 포함된 혈관생성 억제 단백질의 활성이 매우 높은 것으로 보고되어 있다. 따라서 연골의 혈관생성 억제인자는 혈관생성이 과다한 질병인 악성암, 류마티스성 관절염, 만성염증 등의 예방과 치료제로 활용될 수가 있다. 실제로 상어연골 추출물이 관절염 치료제, 또는 항암제로서의 효능이 있다고 하여 민간에서 사용되고 있는 실정이나 이에 대한 본격적인 연구는 추진되지 않고 있는 상태이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 근해에 서식하여 손쉽게 구할 수 있는 연골 어류인 두툽상어 (*Scyliorhinus torazame*)의 연골을 대상으로 하여 혈관생성 억제능을 조사하고자 한다. 먼저, 단백질 수준에서 연골의 단백질을 추출한 후, 혈관생성 억제능을 확인한다. 그런 다음 유전자 수준에서 새로운 혈관 생성 관련 유전자들을 분리, 동정하여 그 유전자들의 기능을 조사한 후, 이들 유전자들을 발현 벡터에 넣어 혈관생성 억제 및 촉진 효능을 확인하고 그 단백질을 획득 하고자 한다. 이렇게 해서 밝힌 상어에서의 혈관생성 관련유전자들은 최근에 전세계적으로 각광을 받고 있는 angiogenesis therapy 즉, 혈관의 신생을 조절하여 질병을 치료하는 방법의 일환으로 사용될 수 있을 것이다.

제 2 장 연골어류로부터 혈관생성 억제활성의 조사 및 유전자 클로닝

제 1 절 서 설

혈관생성 (angiogenesis)은 착상, 배의 발생과 상처 치유 등 정상적 생리 활동에서 중요한 역할을 담당하지만, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증 그리고 특히, 암조직의 성장 및 전이 등과 같은 병적인 과정을 유도하기도 한다. 연골은 다른 조직에 비해 특이적으로 혈관이 드물게 분포된 조직이라는 사실에 근거하여 혈관생성 억제인자가 검색되어 왔으나, 포유동물인 소의 연골에서 분리한 collagenase 활성 저해 기능을 가진 CDI (cartilage-derived inhibitor)만이 지금까지 보고된 인자로, 다른 혈관생성 억제 인자의 동정은 아직 이루어지지 않은 상태이다. 특히 연골어류인 상어는 이러한 연골의 풍부한 보급원이 될 수 있고, 그 연골의 단백질 추출물이 혈관의 생성을 억제한다는 사실이 보고되어 왔다. 심지어 상어의 연골 extract가 의약품으로 사용되고 있으나, 아직 그 구체적인 인자의 동정은 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구에서는 연골어류 중 가오리와 우리나라 근해에서 서식하고 손쉽게 구할 수 있는 두툽상어의 연골 crude extract를 대상으로 그 추출물에 대한 혈관생성 억제 효능을 조사하고, 두툽상어 뇌와 살 조직으로부터 cDNA library 합성하여 그 library로부터 혈관 생성에 관련된 구체적인 유전자를 클로닝 하고자 한다.

제 2 절 실험 재료 및 방법

1. 상어연골 단백질 추출물의 분리

실험의 재료인 두툽상어는 부산 자갈치 시장의 창녕상회에서 구입하여 각 부위별로 절단한 후, 실험에 사용하기 전까지 -75°C 에 보관하였다. 두툽상어의 척추부위 연골을 도려내고 연골 이외의 조직을 잘 제거한 다음 액체 질소가 담긴 막자사발에서 곱게 부순다. 여기에 두배 부피만큼의 extraction buffer(1M guanidium HCl, 0.02M MES, pH 6.0)에 넣어 이틀동안 상온에서 추출한 다음 8,000rpm에서 30분간 원심분리한다. 상층액을 모아 D.W에서 48시간동안 dialysis시킨 다음 다시 8,000rpm에서 30분간 원심분리하고 상층액을 모아 lyophilize한 뒤 10ml의 D.W로 동결건조된 상어연골 추출물을 완전히 녹인 뒤 -70°C 에 보관한다.

2. 가오리연골 단백질 추출물의 분리

가오리의 척추부위와 지느러미부위의 연골을 도려내고 위와 같은 방법으로 가오리연골 단백질 추출물을 분리해 -70℃에 보관한다.

3. 혈관형성에 관한 chick embryo의 chorioallantoic membrane (CAM) assay

수정란은 욕용계 (아바에이카)를 사용한다. 수정란을 구입하여 45시간 동안 18℃에 놓아둔 다음 60% 습도가 유지되는 37℃ 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양한다. 2일배가 되면 계란의 끝 부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 1ml 뽑아낸다. 3일배가 되면 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 요오드 덩크로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3cm 크기의 원형 창문을 막는다. 이것을 계속 배양기에서 키워 4.5일배가 되면 Thermanox 13mm disk에 혈관형성을 억제할 것이라 여겨지는 상어연골 추출물을 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 올린 후 이를 30분 동안 말린다. 다 마른 것을 확인하고 이 disk를 4.5일배의 유리테이프를 떼어내고 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리테이프로 창문을 막는다. 이를 배양기에서 이틀동안 배양시킨후 10% fat emulsion (Intralipid, 녹십자)을 CAM 막 안쪽에 주입하여 Intralipid로 채워진 CAM의 사진을 찍고 혈관형성이 억제되었는지를 관찰한다.

4. 혈관내피세포의 증식조사를 위한 MTT assay

가. 혈관내피세포의 배양

Calf pulmonary anterior endothelial (CPAE) cell을 15% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)으로 배양한다. 분말상태의 medium을 2차 증류수에 녹인 후 sodium bicarbonate 3.7 g을 첨가하여 HCl로 pH 7.2를 맞춘다. 2 μm Millipore filter로 이를 여과한 다음, 사용 직전에 FBS 15%와 penicillin-streptomycin (P-S) 1%를 첨가한다. 여과한 후 serum을 첨가하지 않은 배지는 4℃에서 보관하며, FBS와 P-S는 -20℃에 보관한다.

배양용기는 T25 flask (25mm)에 5ml의 배지로 37℃, 포화습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 단층배양하며, cell이 flask에 monolayer로 딱딱하게 자라면, 0.05% trypsin-EDTA로 T75 flask (75mm)에 옮겨 키운다.

나. MTT assay

T75에 cell이 딱딱하게 자라면 0.05% trypsin-EDTA를 처리해, cell을 flask에서 떼 후, 한 well당 1×10^4 cells/ml되도록 24well에 심는다. 48시간 후 상어연골 추출물을 각각 C, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)농도로, 그리고 가오리연골 추출물을 각각 C, 10, 20($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)농도로 처리한 다음, CO₂ 배양기에 넣어 계속 키운다. 48시간후 24well에 MTT (3-[4,5-Dimethyl thizol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thizolyl blue) solution을 각각 100 μl 를 넣고 다시 3~4시간 정도 CO₂ 배양기에서 키운 뒤 꺼내어 MTT가 섞인 배지를 모두 버린 뒤 DMSO를 각각 500 μl 를 넣고 pipetting을 통해 완전히 녹인 다음

96well plate에 옮겨 540nm에서 absorbance를 측정한다.

5. Wounding migration assay

CPAE cell을 60mm culture dish에 바닥이 보이지 않는 정도가 될 때까지 배양한 후 면도날로 세포에 상처를 내어 reference line을 긋고 일부를 긁어낸다. Serum free medium으로 3번 씻어내고 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 3ml을 첨가한다. 그리고 동시에 1mM thymidin과 상어연골 추출물과 가오리연골 추출물을 첨가하여 24시간동안 37 °C, 포화 습도로 유지되는 5 % CO₂ 배양기에서 배양한다. 배지를 버리고 PBS로 씻어내고 methanol로 1분간 고정시키고 Giemsa로 5분간 염색한 후 물로 씻어낸다. Inverted microscopy를 이용하여 40배로 관찰하여 reference line을 넘어 이동한 세포 수를 센다.

6. Total RNA extration

두툽상어를 살과 뇌로 분리, 적출한 다음 TRIZOL Reagent (GIBCOBRL Cat. No. 15596)을 tissue 100g당 1ml을 써서 homogenizer로 tissue가 보이지 않을 만큼 충분히 homogenization시킨다. RNA분리는 manual에 기재된 방법을 변형하여 사용하였다. 상어에는 단백질, 핵산이외의 당과 같은 물질이 많이 존재하므로 manual의 troubleshooting guide에 명시된 Proteoglycan and polysacchalide combination method에 따라 high salt precipitation solution (0.8M sodium citrate와 1.2M NaCl)을 사용했으며 초기의 homogenized solution을 12,000g 10분 동안 원심분리 하여 상층액만 분리하였다. 분리한 RNA의 흡광도를 측정하여 protein이나 carbohydrate contamination이 일어났을 경우에는 8M LiCl을 동량처리한 후 약 2시간동안 incubation과정을 거친 후 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. mRNA isolation과정 이전에, RNA의 흡광도를 측정하여 0. D₂₆₀/0. D₂₃₀이 2 이상, 0. D₂₆₀/0. D₂₈₀이 1.65 이상이 되는 RNA만 선별적으로 초저온냉동고에 보관하였다.

7. mRNA isolation

1)에서 분리한 total RNA에서 Messenger RNA Isolation Kit (Stratagene, catalog #200347)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. total RNA extract를 oligo-dT cellulose를 통과 시킨 다음 high-salt buffer와 low-salt buffer를 순차적으로 통과 시키고 elusion buffer를 통과 시키면 mRNA만 분리되는데 3M Na·actate (pH 4.0)와 100% ethanol을 처리한 후 -70°C에 1시간동안 둔후 4°C 15,000rpm 30분간 원심분리하면 mRNA Pellet만 얻을 수 있다.

8. 분리된 mRNA로 부터 cDNA library의 제조

3)에서 얻은 mRNA를 cDNA Synthesis kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit, and ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene Catalog #200400, Catalog #200401, Catalog #200450)을 사용하여 cDNA를 제조하였다.

9. 염기서열의 분석

DNA 염기서열은 sequencing version 2.0 DNA sequencing kit (U. S. Biochemical Corp.)를 사용하여 수행하였다. 먼저 plasmid DNA 3-5 μ g (8 μ l)을 2M NaOH (1 μ l), 2mM EDTA (1 μ l)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분동안 반응시켜 denaturation시킨다. 그리고 3M sodium acetate (pH 4.5-5.5) (1 μ l)를 첨가하여 중화시키고 에탄올로 DNA를 중화시킨다. 이 DNA에 T3 혹은 T7 primer 1pM [T3 primer (5' -ATTAACCCCTCAC TAAAG- 3')와 T7 primer (5' -TAATACGACTCACTATAGGG- 3')], 반응 용액을 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 25분간 반응을 시킨 뒤 [35S] dATP (0.5 μ l), 0.1M DTT(1 μ l), diluted sequenase polymerase {sequenase dilution buffer (7 μ l) : sequenase T7 DNA polymerase (1 μ l)} (2 μ l), dATPs(3 μ M)를 첨가시켜 실온에서 5분 동안 labeling 반응을 시킨다. Labeling된 반응물들을 각각의 ddNTP (2.5 μ l)에 분주시켜 37-42 $^{\circ}$ C에서 5분동안 종결반응을 유도시킨 후 stop solution을 넣어 반응을 종결시킨다. 이 생성물들을 75 $^{\circ}$ C에서 2분동안 가열한 후 6% polyacrylamide gel상에서 전기영동을 하고, 감광된 X-ray film으로부터 얻어진 염기서열을 DNasis (Hitachi Software Engineering America, Ltd.)를 이용하여 DNA 상동성을 조사하였다.

제 3 절 결 과

1. 혈관생성 억제활성의 조사

혈관생성 억제능 뛰어난 것으로 알려진 연골어류인 두툽상어와 가오리의 연골에서 단백질 추출물을 얻은 다음 혈관 생성 억제 효능 조사를 위해, *in vivo* CAM assay를 실시하였다. Table 1과 같이 상어 연골 추출물에서는 50 μ g/egg에서 68%의 혈관형성 억제효과를 보인 반면, 가오리 연골 추출물은 50 μ g/egg에서 29%의 혈관형성 억제효과를 보았다. 이러한 결과를 통해 상어연골 추출물에 혈관형성 억제물질이 있음을 추측할 수 있었다. 또한 *in vitro* assay로서 Calf Pulmonary Arterial Endothelial (CPAE) 세포에 혈관내피세포 증식을 측정할 수 있는 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 가오리연골 추출물은 CPAE 세포의 증식억제 효과가 없었으나 상어연골 추출물은 20 μ g/ml 농도에서 약 38%의 증식억제 활성을 나타내었다. 이 결과는 *in vivo* CAM assay 결과와 일치한다. 그리고 이미 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관을 생성하기 위해서는 혈관내피세포가 혈관 주위의 extracellular matrix (ECM)을 분해하여 이동할 수 있어야 한다. 이것을 조사하기 위해 *in vitro* 실험으로서 CPAE 세포를 이용한 wounding migration assay를 실시하였다. Fig. 8과 같이 상어연골 추출물은 CPAE 세포의 이동을 억제하는 작용이 있음을 확인하였다. 이상의 결과들에 의해 상어의 연골조직에는 혈관생성 억제활성이 있음을 *in vivo* 및 *in vitro* assay에 의해 확인하였다.

Table 1 상어 연골 추출물 및 가오리 연골 추출물에 대한 CAM assay 결과

Compounds	dose ($\mu\text{g}/\text{egg}$)	Total test No.	No. of positive	%
Control (empty)		39	10	26
Retinoic acid (positive control)	1	20	16	80
상어 연골 추출물	20	25	7	28
가오리 연골 추출물	50	19	13	68
상어 연골 추출물	50	14	4	29

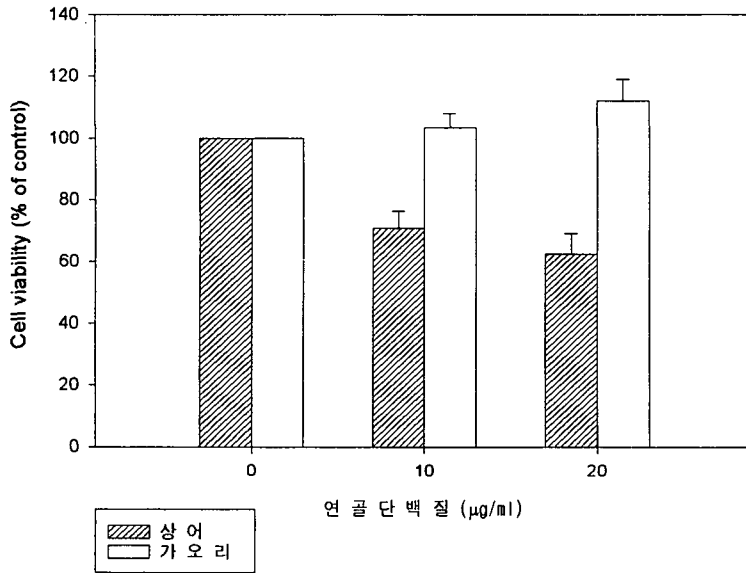


Fig. 1. 상어연골 추출물과 가오리연골 추출물에 대한 MTT assay

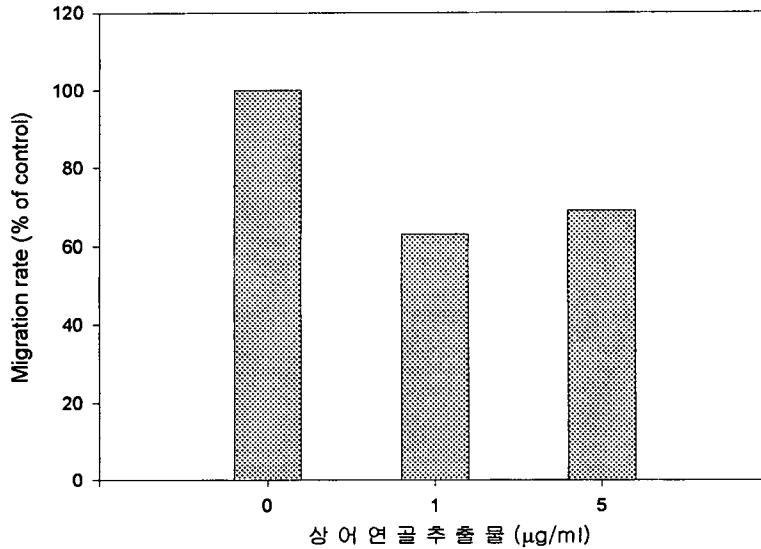


Fig. 2. 상어연골 추출물에 대한 wounding migration assay

2. cDNA library 제조 및 혈관생성 조절 유전자의 클로닝

연골어류인 드릅상어의 cDNA library는 뇌와 살조직의 mRNA를 분리한 후 cDNA library를 제작하였다. 제작한 cDNA library가 phagemid에 제대로 insertion되었는지, insertion되었다면 그 크기가 얼마나 되는지 여부를 알기위해 in vivo excision을 통한 alkaline lysis로 확인하였다 (Fig. 3). MT-MMP-1로 추정되는 s-1, s-2, s-3클론들을 얻었고, 이들의 염기서열과 MT-MMP-1의 염기서열을 비교해 보면 Fig. 4와 같이 부분적으로 상동성을 가지고 있다.

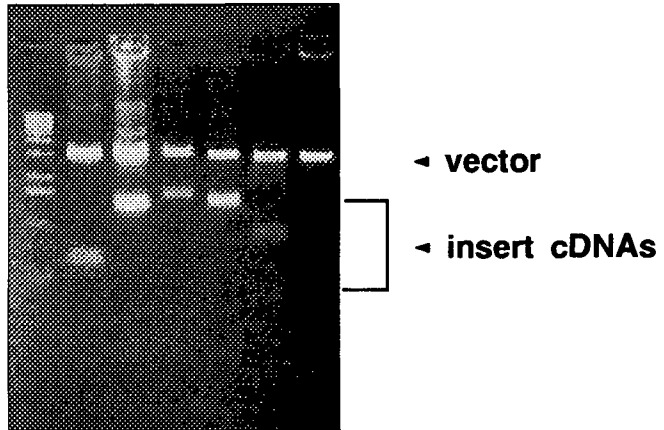


Fig. 3. 상어 cDNA library의 insert DNA 확인

A. S-1

```

1  CCGGC-CG-G-A--TGAGGGGAC-T--GAGGAGGAGACGGAGGTGATCAT      50
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
-1  ..GGCACGAGGACTCTGTTCG-ACCTCTGAG-A--AGCCC-AGCCGATCAG      48

51  CATTG-AGGTGACG-AGGAGG--GCGG-CGGGGGGGTG---AGCGCGGC      100
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
49  CATTGGAGATGT-CATGAG-AGGCTGCCAAGCCATCGGTGTCCA-CACCCAC      98

101 -TG--CC--G-TGGTGTGC--CCGTG-C-TGCT-G---C-TGCTCC--      150
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
99  CTGTGCCACGCT--T-CGCGAGCCGTGTCT-CTGAGAACCTTCTTGA      148

151 -T---GG-TGCTGC---GGTGGCC---CTTCA-GT---CTTCTCTT-      200
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
149  ATTTTGGTGTCTGCCAAGGTGGGGGACTCTG-AGTGGACTCCACCCCG      198

201 CAGAC-G--CC-A--T--G-GGACCCC-CAGG-CG-A-C---TGCTC-T      250
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
199  CAGCAGTTCACAGGTTAGAGGGCAGGTGAGGAGTACCAAGATGTTCAAT      248

251 --AC-T--GCCA-G-C-G-TTCCCT-G-CTGGA-CA--AGGT-CTGA..      300
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
249  TCACATGAGC-ATGACAGCTTGACAGTCTC-ATGATTCAGCCACGGAC.      298
  
```

B. S-2

```

1  CCGGC-CG-G-ATG-AGGGGACTG-AGGA-GGAGACGGAGG-TGAT--CA      50
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
-1  ..GGCACGAGCACACAACAACAGCAAGATGGA-AGCCACGCTCATTTGCC      48

51  -TCATTGAG-G-TGGA---C-GAGGAGGGCGG--CGGGCGGTTAGC--G      100
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
49  GTCMA-GAGCGATGGAGTTCAGAG-AGGTCTTATCGGAGAGATCATCAAG      98

101 CCGCT-G--C--CGTGTGCTGCC--CGTGC-TGCTGTGCTCTG--G-      150
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
99  CGATTGACATCGAGGTT-T-CAAC-T-CAT--TGG-G-T--TGAGA      148

151 TGCTG--GGGGT--G--GCGTT-GC-AGTCTTC-TTCT-TCAGACGC-C      200
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
149  TGGTGAACC-TACCGAAGATTTAGCCAAACATCATATATC-GAC-CTC      198

201 ATGGGACCCCAAGGCGACTGCT-CT---ACT--GCCAGGCTC-CCTGCT      250
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
199  AAGG-ACA---AGCC--CTTTTCTTGGACTTGTZAA--TTCACCT-CT      248

251 GGACAAAGTCTGA.....      300
   ||| |||
249  G--CT-GG.....      298
  
```

B. S-3

```

1  CCGGC-CGGATGAGGGGACTGAGGAGGAGACGGAGGTGATCATCA-----      50
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
-1  ..GGCACG-AGGAGG--AGCGTCCAG-AGAC--AGCT--TCCCCCCCCC      48

51  -TTAGGTTGACAGAGGAGGGCCCGGGGGCGGTGAGC-GC-GG-CTCCGCT      100
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
49  CTTT--TC--CT-----C--C--C--TC-GCAGGACTTT-GT      98

101 -GGT--GC--T---GCC---CGTGTG--CTGCTGCTC--C---TGGT-G      150
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
99  AGGTTGCAATCATGCTTTTCG-G--GAACA-CT-CACAAATAAGGAG      148

151 CTG-----GGGTGGGCTTGCAGT-CTTCTTC-T-TC-AGAGCC-      200
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
149  CTGATTTATTCAGGGAGG-C-T-GAA-TACCCCGACTCTCCAAACCA      198

201 -CATGGACC-C---CCA-GCC---GACTGCTC--TA-CTGCCAGGTT      250
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
199  ACAACA-ACCACATGGCCAGGCTTGTACTA-TGGATATCTACAGCA-      248

251 CCTGTCTGACAGGTTCTGA.....      300
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
249  CTC--C-GGACAGG.....      298
  
```

Fig. 4. Human MT-MMP-1 cDNA (upper low)와 상어 MT-MMP-1 (lower low)의 염기서열 분석

4. 고찰

연골어류의 연골 조직에서 혈관생성 억제활성을 조사하기 위해 상어와 가오리의 연골에서부터 단백질 추출하였는데, 그 과정이 매우 힘들었으며 많은 시간을 요하는 작업이었다. 그 추출물로 *in vivo* CAM assay를 실시한 결과, 가오리 연골 추출물에서는 약한 혈관형성 억제효과를 관찰하였으나, 상어연골 추출물에서 강한 혈관생성억제효과를 관찰하였다. 또한 *in vitro* assay 방법인 MTT assay에 의해 상어 연골 추출물이 혈관내피세포 증식을 억제하는 효과를 관찰하였고, wounding migration assay에 의해 세포의 이동을 억제하는 작용이 있음을 확인하였다. 즉, 연골에서 분리한 단백질에 혈관생성 억제활성을 지닌 인자가 있음을 확인하였고, 그 구체적인 인자의 동정을 위해 cDNA library를 구축하였다. Library 구축 시 RNA의 분리가 선행되어야 하며, 가장 중요한 단계임에도 불구하고 연골에서의 RNA 추출에 관련된 정보 또한 거의 없었고, 연골내에 단백질, 핵산 이외의 당과 지질과 같은 물질이 많이 존재하므로 그 분리가 매우 어려웠으나 본 과제를 수행하면서 상어의 조직으로부터 RNA 추출방법을 구축하였다. 이렇게 구축한 상어 cDNA library로부터 혈관생성 조절 인자인, MT-MMP의 cDNA클론들을 염기서열 비교에 의해 검정하였다. 또한, 최근에 보고된 angiostatin과 endostatin 등과 같은 새로운 혈관생성 억제인자들의 상어 연골내 존재 여부를 RT-PCR에 의해 검색하였으므로 연골어류로부터 혈관생성조절에 관여된 새로운 유용 유전자의 발굴이 가능할 것으로 사료된다

제 3 장 연골어류 혈관생성억제 유전자의 분석 및 기능조사

제 1 절 서 설

1차년도에 두릅상어 연골조직에서 추출한 단백질에서부터 혈관생성 억제효과를 검증하였고, 상어의 cDNA library로부터 혈관생성에 관련된 MT-MMP의 partial cDNA 또한 동정하였다. 따라서 제 2 세부과제에서는 연골어류인 상어로부터 혈관생성을 억제하는 구체적 유전자를 클로닝하기 위해 혈관생성에 관련된 여러 유전자의 염기서열을 토대로 하여 primer를 제작하였다. 암전이 과정에서 세포 외 기질성분들을 파괴하여 암세포의 전이가 용이하도록 하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는 혈관생성인자인 MMP 계열과 이런 MMP와 1:1 complex를 이룸으로서 MMP의 기능을 저해시키는 것으로 알려져 있으며 또한 혈관생성을 억제한다고 보고된 TIMP 계열, 그리고 최근에 혈관생성 억제능이 탁월하고 acquired drug resistance와 side effect가 거의 없다고 보고된 바 있는 혈관생성억제제인 angiostatin과 endostatin을 대상으로 연골과 뇌 등의 다른 여러 조직에서 추출한 RNA부터 3', 5' RACE 및 RT-PCR등의 방법을 수행하여 혈관생성에 관여하는 유전자의 일부 및 전체 염기 서열을 클로닝하고자 한다. 위의 방법으로 동정된 상어의 혈관생성 관련 유전자와 이미 밝혀진 다른 종의 유전자의 단백질 수준에서 구조적 특징과 mRNA 수준에서 조직 특이적 발현을 조사할 예정이다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 상어에서 Total RNA extraction

두릅상어를 조직별로 분리, 적출한 다음 TRIZOL Reagent (GIBCO BRL Cat. No. 15596)를 tissue 100g당 1ml을 사용하여, 연골의 경우 유발과 유봉으로, 뇌의 경우 homogenizer로 tissue가 보이지 않을 만큼 충분히 homogenization시킨다.

RNA분리는 manual에 기재된 방법을 변형하여 사용하였다. 상어에는 단백질, 핵산 이외의 당과 같은 물질이 많이 존재하므로 proteoglycan and polysacchhalide combination method에 따라 high salt precipitation solution (0.8M sodium citrate와 1.2M NaCl)을 사용했으며 초기의 homogenized solution을 12,000g 10분 동안 원심분리 하여 상층액만 분리하였다. 분리한 RNA의 흡광도를 측정하여 protein이나 carbohydrate contamination이 일어났을 경우에는 8M LiCl을 동량처리한 후 약 2시간동안 incubation과정을 거친 후 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. mRNA isolation과정 이전에, RNA의 흡광도를 측정하여 0.D₂₆₀/0.D₂₃₀이 2

이상, 0. D₂₆₀/0. D₂₈₀이 1.65 이상이 되는 RNA만 선별적으로 초저온냉동고에 보관하였다

2. Primer의 제작

가. TIMP primer의 염기서열

1) Partial degenerate TIMPs primer

gdTIMPs: 5'-CA(C/T)CCICA(A/G)(C/G)AIGCITT(C/T)TG(C/T)AA-3'

gdTIMPs: 5'-C(A/C)(A/T)(A/G)TCC(A/G)TCCAIA(A/G/T)(A/G)CA(C/T)TC-3'

2) 5' RACE shark TIMP-3 primer

sTIMP-R5'-1 : 5'-GTCAGAGTTGCAAACGCCTCCTGC-3'

sTIMP-R5'-2 : 5'-GTAACGCATTGTACCAAAGGGTCCG-3'

3) 3' RACE shark TIMP-3 primer

sTIMP-R3'-1: 5'-GCGAAGAATGAATGCTTCTGGACGG-3'

sTIMP-R3'-2: 5'-CAGATTGACCCTGTCACAACGCAAG-3'

4) Full-length Shark TIMP-3 primer

sTIMP-3NT: 5'-GGCTCGAGATGGTATTTTCTACCACAGC-3'

sTIMP-3CT: 5'-CCGAATTCTTGCTGTGTCACACGAGATG-3'

5) Human TIMP-1 primer 염기서열

hTIMP-1 S1 : 5'- ATG GCC CCC TTT GCA CCC- 3'

hTIMP-1 S2 : 5'- GTC ATC AGG GCC AAG TTC- 3'

hTIMP-1 As1 : 5'- ATC TGG GAC CGC AGG GAC- 3'

hTIMP-1 As2 : 5'- GTC CGT CCA CAA GCA ATG- 3'

나. MT3-MMP primer의 염기서열

1) Partial degenerate MMPs primer

M1: 5'-CCI(A/C)GI TG(C/T) GGI(A/G)(A/T)I CCI GA -3'

M2: 5'- TG ICC IA(A/T/G)(C/T)TC(A/G)TGI(A/G)C GC IAC -3'

2) Long-distance RT-PCR shark MT3-MMP primer

GSP2: 5'- CGT GCC TTT GAT GTG TGG CAG AAT G -3',

GSP3: 5'- TCA CAC CCA CTC TTG CAT AGA GCG -3'

3) 5' RACE shark MT3-MMP primer

GSP1 : 5'- CGC ATT AAC TGG GCA GAA GTG G -3'

AUAP : 5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'

다. Angiostatin과 endostatin primer 제작

최근에 혈관신생억제능이 탁월하고 억제내성과 부작용이 거의 없다고 알려진 혈관신생억제제인 angiostatin과 endostatin을 두릅상어에서 클로닝하기 위해 각각의 primer를 제조하였다. 이 혈관신생억제인자들은 전구단백질인 plasminogen과 alpha 1 (XVIII) collagen에서부터 절단되어 혈관신생억제활성을 나타내는데, 본 실험에 사용된 primer의 염기서열은 이들 전구체의 염기서열을 참조하여 다음과 같이 제작하였다.

1) Angiostatin primer 염기서열

5' primer : 5'-GGG GAA TTC GTG TAT CTG TCA GAA-3'

3' primer : 5'-GGG GTC GAC CTA TGT TGT GCA GCG GGG-3'

I5' primer : 5'-GGT GCT AYA CTA CWG ATC-3'

I3' primer : 5'-GTC CAG ACA TGG TCT TGG-3'

* Y는 C 혹은 T

W는 A 혹은 T

2) Endostatin primer 염기서열

5' primer : 5'-GGG GAA TTC AAG GAC GAG GTG CTA-3'

3' primer : 5'-GGG GTC GAC CTA TTT GGA GAA AGA GGT C-3'

I5' primer : 5'-GAC GGC ARR GAY GTC CTG-3'

I3' primer : 5'-CAA TGC ASA GSA CGA TGT-3'

* R은 A 혹은 G

Y는 C 혹은 T

S는 G 혹은 C

3. RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)

분리된 2~3 μ g의 total RNA로부터 oligo dT 또는 antisense PCR primer와 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하고 여러 종류의 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행한다. 이때 primer 농도는 50-100 pmol로 사용하고,

amplification은 아래와 같은 조건에서 각각 수행하였다.

가. TIMP-3 PCR 조건

1) Partial RT-PCR primer : denaturation - 94 °C, 30 sec ; annealing - 55 °C, 1 min ; extension - 72 °C, 1 min (40 cycles)

2) 5' RACE primer : denaturation - 94 °C, 1 min ; annealing - 55 °C, 1 min ; extension - 72 °C, 1 min (30 cycles)

3) 3' RACE primer : denaturation - 94 °C, 3 min ; annealing & extension - 72 °C, 3 min (30 cycles)

나. MT3-MMP PCR 조건

1) Partial RT-PCR primer: denaturation - 94°C, 1 min ; annealing - 60°C, 30 sec ; extension - 72°C, 1 min (35 cycles)

2) LD-PCR primer : denaturation - 94°C, 1 min ; annealing - 60°C, 1 min ; extension - 72°C, 3 min (30 cycles)

3) 5' RACE primer : denaturation - 94°C, 1 min ; annealing - 55°C, 1 min ; extension - 72°C, 1 min (30 cycles)

다. angiostatin : denaturation - 94°C, 30 sec ; annealing - 65°C, 30 sec ; extension - 72°C, 30 sec (40 cycles)

라. endostatin : denaturation - 94°C, 30 sec ; annealing - 55°C, 30 sec ; extension - 72°C, 30 sec (40 cycles)

바. TIMP-1 : denaturation - 94°C, 30 sec ; annealing - 55°C, 1 min ; extension - 72°C, 1 min (40 cycles)

RT-PCR 반응의 결과는 1.8% agarose gel electrophoresis로 확인한다.

4. 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)

두릅상어 TIMP-3 및 MT3-MMP의 5' 말단 부위를 cloning하기 위하여 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL)을 사용하였다.

가. First strand cDNA Synthesis

1µg의 두릅상어 total RNA, 10uM의 GSP1과 DEPC-D.W를 15.5µl로 혼합한 다음 70°C, 10분간 방치하고 ice에서 1분간 식혀준다. 2.5µl의 10×PCR buffer, 2.5µl의 25mM MgCl₂, 1µl의

10mM dNTP mix, 2.5 μ l의 0.1M DTT, 1 μ l의 SuperScript II RT (reverse transcriptase)를 RNA sample에 첨가한 다음 42 $^{\circ}$ C, 50분간 반응시키고, 70 $^{\circ}$ C, 15분간 방치함으로써 반응을 끝낸다. 그 다음 1 μ l의 RNase H mix를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 간단히 원심분리 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

나. GlassMax DNA Isolation Spin Cartridge Purification of cDNA

first strand cDNA 반응액에 120 μ l의 binding solution (6M NaI)를 첨가하고 cDNA/NaI solution을 GlassMax Spin Cartridge에 옮겨 15,000rpm에서 20초간 원심분리한다. 0.4ml의 wash buffer를 spin cartridge에 첨가하여 15,000rpm에서 20초간 원심분리하는 과정을 총 4번 반복하고, 400 μ l의 70% ethanol을 spin cartridge에 첨가하여 15,000rpm에서 20초간 원심분리하는 과정을 2번 반복한다. 그 다음 spin cartridge에 50 μ l의 증류수를 첨가하여 15,000rpm에서 20초간 원심분리하여 cDNA를 용출하였다.

다. TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) Tailing of cDNA

분리된 cDNA의 3' 말단에 여러개의 dCTP를 첨가하기 위하여 TdT를 이용한다. 6.5 μ l의 DEPC-D.W, 5.0 μ l의 5 \times tailing buffer, 2.5 μ l의 2mM dCTP, 10.0 μ l의 GlassMax purified cDNA sample 반응액을 94 $^{\circ}$ C, 3분간 반응시킨 후 ice에 1분간 방치하고, 1 μ l의 TdT를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 10분간 반응한다. 그 다음 65 $^{\circ}$ C, 10분간 방치하여 TdT의 활성을 없앤다.

라. Cloning of the 5' region of the TIMP-3 and MT3-MMP

TIMP-3의 경우, 두릅상어의 연골조직 cDNA, MT3-MMP의 경우 뇌조직 cDNA와 PCR 반응액 [10X PCR 완충용액, 1 μ M GSP1, 1 μ M AUAP (Abridged Universal Amplification Primer), 200 μ M each dNTP, 1.25 units Taq DNA polymerase]를 혼합하고, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C, 1분의 순서로 30cycle의 PCR 반응을 수행하였다. 5' RACE로 증폭된 DNA 단편들은 전기영동 후 gel로부터 분리한 다음 T easy-vector에 cloning하였다.

5. 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)

두릅상어 TIMP-3 3' 말단 부위를 cloning하기 위하여 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL)을 사용하였다.

가. First strand cDNA Synthesis

1 μ g의 두릅상어 total RNA, 10 μ M의 oligo-dT와 DEPC-D.W를 혼합한 다음 70 $^{\circ}$ C, 10분간 방치하고 ice에서 2분간 식혀준다. 2 μ l의 10 \times PCR buffer, 1 μ l의 10mM dNTP mix, 2 μ l의 0.1M DTT, 1 μ l의 SuperScript II RT (reverse transcriptase)를 상기 sample에 첨가한 다음 42 $^{\circ}$ C, 1시간 동안 반응시키고, 70 $^{\circ}$ C, 15분간 방치함으로써 반응을 끝낸다. 그 다음 1 μ l의 RNase H mix를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 간단히 원심분리 후 -20 $^{\circ}$ C

에 보관한다.

나. Cloning of the shark TIMP-3 3' region

두툽상어의 연골조직 cDNA와 PCR 반응액 [10X PCR 완충용액, 1 μ M GSP1, 1 μ M AUAP (Abridged Universal Amplification Primer), 200 μ M each dNTP, 1.25 units Taq DNA polymerase]를 혼합하고, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 3분의 순서로 30cycle의 PCR 반응을 수행하였다. 3' RACE로 증폭된 DNA 단편들은 전기영동 후 gel로부터 분리한 다음 T easy-vector에 cloning하였다.

6. Long distance RT-PCR for 3' region of the MT3-MMP

두툽상어 MT3-MMP의 3'부위를 클로닝하기 위하여 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 방법을 사용하였다.

가. First strand cDNA synthesis

5 μ g의 두툽상어 total RNA, 1 μ l의 oligo (dT)₁₂₋₁₈ 와 DEPC-D.W를 12 μ l로 혼합한 다음 70 $^{\circ}$ C, 10분간 방치하고 ice에서 2분간 식혀준다. 4 μ l의 10 \times first strand buffer, 1 μ l의 10mM dNTP mix, 2 μ l의 0.1M DTT, 1 μ l의 SuperScript II RT(reverse transcriptase)를 RNA sample에 첨가한 다음 42 $^{\circ}$ C, 50분간 반응시키고 ice에 방치한다. 그런 다음 1 μ l의 RNase.H를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 10분간 반응시켜 RNA를 제거하고 간단히 원심분리 후 PCR 반응을 수행하였다.

나. Cloning of the 5' region of the MT3-MMP

두툽상어 뇌 cDNA와 PCR 반응액 [10X PCR 완충용액, 2.5mM MgCl₂, 1 μ M GSP2, 1 μ M GSP3, 200 μ M each dNTP, 2.5 units Taq DNA polymerase]를 혼합하고, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C, 3분의 순서로 30 cycle의 long-distance PCR (LD-PCR) 반응을 수행하였다. RT-PCR로 증폭된 DNA 단편은 전기영동 후 gel로부터 분리한 다음 T-easy vector에 cloning하였다.

7. 염기서열의 분석

DNA 염기서열은 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle sequencing kit (Perkin Elmer ABI)를 이용하여 dideoxynucleotide chain termination method로 Automatic DNA sequencing을 수행하였다. DNA 염기서열의 분석은 BLAST database program (NCBI)와 DNasis program (Hitachi Software Engineering America, Ltd.)을 이용하여 DNA 상동성을 조사하였다.

제 3 절 실험 결과

1. 두릅상어 full-length TIMP-3 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

먼저 혈관생성 저해인자로 알려진 TIMPs 유전자의 동정을 위해, TIMPs degenerate primer와 상어 연골 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 417 bp의 PCR product를 cloning 하였으며, 동정된 clone의 염기서열을 분석한 결과 인간의 TIMP-3 유전자와 약 74%의 상동성을 나타내는 상어 TIMP-3 homologue임을 확인하였다. RT-PCR에서 얻어진 염기서열을 기초로 상어 TIMP-3 유전자의 전체 염기서열을 조사하기 위해, 5' RACE와 3' RACE를 수행하여 sequencing한 결과 891bp의 염기서열을 밝혀내었다 (Fig. 5). 동정된 두릅상어 TIMP-3 cDNA는 총 645 bp 이었고, 인간, 소, 쥐, 닭 및 *Xenopus*의 TIMP-3 염기서열과 비교 조사한 결과 각각 약 71%의 상동성을 나타냄을 확인하였다. 또한 DNA 서열로부터 유추한 아미노산 서열에 의하면 두릅상어 TIMP-3는 214개의 아미노산으로 구성되어 있으며, N 말단의 26개의 잔기에 해당하는 signal peptide와 다른 종들의 TIMPs 유전자에서 나타나는 12개의 cycteine 잔기, TIMP-3 유전자의 공통적인 특징인 당과 결합하리라 추측되는 184번째 asparagine 잔기가 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 6)

2. 두릅상어 full-length MT3-MMP 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

두릅상어에 존재하는 혈관생성 촉진인자 검색을 위해, MMPs degenerate primer와 상어 뇌 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 두릅상어의 MT3-MMP homologue를 동정하였으며, 전체 염기서열을 밝혀내기 위해 5' RACE와 3' 부위의 LD-PCR을 실시하였다. 이들로부터 얻어진 염기서열을 기초로 양쪽말단의 염기서열에 해당하는 MMP-NT, MMP-CT primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 약 1850bp의 PCR product를 얻었으며, 이를 gel로부터 분리하여 pGEM T easy-vector에 cloning하고 sequencing하였다. Sequencing 결과 두릅상어 MT3-MMP cDNA는 총 1846bp 이었고, 인간의 MT3-MMP 염기서열과 두릅상어의 염기서열을 비교조사한 결과 각각 약 70%의 상동성을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 7). 또한 DNA 서열로부터 유추한 아미노산 서열에 의하면 두릅상어 MT3-MMP는 614개의 아미노산으로 구성되어 있으며, N 말단의 28개의 잔기에 해당하는 signal peptide와 차례로 propeptide domain, catalytic domain, hinge domain, hemopexin-like domain이 존재하였고 C 말단에 hydrophobic membrane-spaning domain과 cytoplasmic domain이 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 8) 특히 catalytic domain은 인간 MT3-MMP와의 상동성이 90%에 해당하므로 이 부위가 종간에 보존되어 있음을 알 수 있다.

```

1 ACAGAACTGACATCTCTAAAAATATCCCACAAAACAACAAAATAGTATCAATAGTTTTCCT 60
61 TATTCCTGTTTGGTTCCTCAAACCTCTCATTATCAAAGCATCTCATCTCAGTGAAAAAG 120
121 AGCTTTTCTGAGAGAATGGTATTTTCTACCACAGCAGCTCTGAGCCTGCTGCTGGCTTTG 180
      M V F S T T A A L S L L L A L
181 AGCAGTATGCAGCTGAGCGAGGTATCGGAGGCTGTACTTGTATGCCAAACCATCCGCAG 240
      S S M Q L S E V S E A C T C M P N H P Q
241 GAGGCGTTTTGCAACTCTGACATAGTTATCAGGGCAAAGTGGTTGGGAAGAAGCTACTG 300
      E A F C N S D I V I R A K V V G K K L L
301 AAGGACGGACCCTTTGGTACAATGCGTTACACCATCAAACAAATGAAGATGTACCGTGGT 360
      K D G P F G T M R Y T I K Q M K M Y R G
361 TTCAGCAAAATGCAGCAGGTTCAAGTATATCTATACAGAAGCTGCGGAGAGCCTGTGTGGT 420
      F S K M Q Q V Q Y I Y T E A A E S L C G
421 GTCCGCTACAGGTGAACAAATCCAGTATCTGATCAGGAAGAGTTTTTGTATGGAGAA 480
      V R L Q V N K F Q Y L I T G R V F D G E
481 GTCTACACTGGAGTGTGTAACCTCATTGTGCCTTGGGACAGATTGACCCCTGTCAACAACGC 540
      V Y T G V C N F I V P W D R L T L S Q R
541 AAGGGTCTTAACCATCGTTACCAAGTACGGCTGTAAGTCAAGATTAAACCCCTGTTATTAC 600
      K G L N H R Y Q Y G C N C K I K P C Y Y
601 CTGCCATGTTTTCGTGACAGCGAAGAATGAATGCTTCTGGACGGATATGTTGCTGACCAG 660
      L P C F V T A K N E C F W T D M L S D Q
661 GGATACATGGGGCACCAGGCTAAGCACTATGTTTGTATCCGACAGAAAAGAGGGTTATTGC 720
      G Y M G H Q A K H Y V C I R Q K E G Y C
721 AGTTGGTATAGAGGTGCAGCGCCCCCAGACAAGACCAGGATCAATGCCACAGACCCCTGA 780
      S W Y R G A A P P D K T R I N A T D P *
781 ATGGGATCTTTCCTCTGTAATAATGCTGGCCAGCAAGGGCAGCCATCTCGTGTGACACAG 840
841 CAATGATTAATGCCTGACTCCAGTATTAGCACATCAAAAAAAAAAAAAA 891

```

Fig. 5. Full-length sequence of *Scyliorhinus torazame* TIMP-3 (NCBI Gene Bank accession number : AF110767). The deduced amino acid sequences in standard one-letter code are shown below the nucleotide sequence. *, the translation termination codon (TGA). Number refer to nucleic acid positions. Shark full-length TIMP-3 DNA contains 645-bp open reading frame.

		← SP →									
Homology with shark		10	20	30	40	50					
Human (72%)	-23	MT-PWLG-LI	VLLGSWSL--	GDWG--AEAC	TCSPSHPQDA	FCNSDIVIRA					
Bovine (73%)	-23	MT-PWLG-LV	VLLGSWSL--	GDWG--AEAC	TCSPSHPQDA	FCNSDIVIRA					
Mouse (72%)	-23	MT-PWLG-LV	VLLSCWSL--	GHWG--AEAC	TCSPSHPQDA	FCNSDIVIRA					
Chicken (74%)	-24	MT-AWLGFLA	VFLCSWSL--	--RDLVAEAC	TCVPIHPQDA	FCNSDIVIRA					
Xenopus (72%)	-26	MS-V-CA-LT	LILGCFLLEFL	GDISKPAEGC	TCAPSHPQDA	FCNSDIVIRA					
Shark	-26	MVFSTTAALS	LLLALSSMQL	SE---VSEAC	TCMPNHPQEA	FCNSDIVIRA					
		60	70	80	90	100					
Human		KVVGKLVKE	GPFGLVYTI	KQMKMYRGFT	KMPHVQYIHT	EASESLCGLK					
Bovine		KVVGKLLKE	GPFGLMVYTI	KQMKMYRGFT	KMPHVQYIHT	EASESLCGLK					
Mouse		KVVGKLVKE	GPFGLVYTI	KQMKMYRGFS	KMPHVQYIHT	EASESLCGLK					
Chicken		KVVGKLMKD	GPFGLMRYTV	KQMKMYRGFQ	IMPHVQYIYT	EASESLCGVK					
Xenopus		KVVGKLMKD	GPFGLMRYTV	KQMKMYRGFN	KMPQVQYIYT	EASESLCGVK					
Shark		KVVGKLLKD	GPFGLMRYTI	KQMKMYRGFS	KMQQVQYIYT	EASESLCGVR					
		110	120	130	140	150					
Human		LEVNKYQYLL	TGRVYDGKMY	TGLCNFVERW	DQLTLSQRKG	LNRYRYHLGCN					
Bovine		LEVNKYQYLL	TGRVYDGKMY	TGLCNFVERW	DQLTLSQRKG	LNRYRYHLGCN					
Mouse		LEVNKYQYLL	TGRVYEGKMY	TGLCNFVERW	DHLTLSQRKG	LNRYRYHLGCN					
Chicken		LEVNKYQYLI	TGRVYEGKVY	TGLCNWYEKW	DRLTLSQRKG	LNRYRYHLGCG					
Xenopus		LEVNKYQYLI	TGRVYEGKVY	TGLCNLIERW	EKLTFQRKG	LNRYRYPLGCT					
Shark		LQVNFQYLI	TGRVFDGEVY	TGVCNFIVPW	DRLTLSQRKG	LNRYRYQYGCN					
		160	170	180	190	200					
Human		CKIKSCYYLP	CFVTSKNECL	WTDMLSNEFGY	PGYQSKHYAC	IRQKGGY	CSW				
Bovine		CKIKSCYYLP	CFVTSKNECL	WTDMFSNEFGY	PGYQSKHYAC	IRQKGGY	CSW				
Mouse		CKIKSCYYLP	CFVTSKNECL	WTDMLSNEFGY	PGYQSKHYAC	IRQKGGYCSW					
Chicken		CKIRPCYYLP	CFATSKNECI	WTDMLSNEFGH	SGHQAKHYAC	IQRVEGYCSW					
Xenopus		CKIKPCYYLP	CFITSKNECL	WTDMLSNEFGY	PGYQSKNYAC	IKQKEGYCSW					
Shark		CKIKPCYYLP	CFVTAKNECF	WTDMLSQDQGY	MGHQAKHYVC	IRQKEGYCSW					
		210	220								
Human		YRGWAPPDKS	II	NATDP*..	188						
Bovine		YRGWAPPDKS	II	NATDP*..	188						
Mouse		YRGWAPPDKS	IS	NATDP*..	188						
Chicken		YRGWAPPDKT	II	NATDP*..	188						
Xenopus		YRGWAPPDKT	TI	NATDP*..	188						
Shark		YRGAAPPDKT	RI	NATDP*..	188						

Fig. 6. Comparison of deduced amino acid sequences of human bovine, mouse, chicken, *Xenopus* and Shark TIMP-3. SP is signal peptide cleavage site. This putative signal peptide were predicted using on-line server, <http://genome.cds.dtu.dk/htbin/nph-webface>. Twelve conserved cysteines are shown. Square is a conserved Asn residue and potential site for N-linked sugar.

```

S:1  ATGGCAAACGGGTTCACAGCCTTTAGCCACATGTACAAGGAAAAACA  50
H:1  ATG--AT-C---TT-ACTCA-CATTGACG-AC-TGG-A-A--G-A---CG  50
51  ACTTGCATTT-GT--AT-ATTCGGGTGGGTTTTAT-TTGCAAACCTTGCT  100
51  G-TTGGATTTGTCATCATTGGGGGTGTTTT-TCTGCAAACCTTGCT  100
101  TTGGATTATT-TGTTT-C-GTTTGTGGCGA-GGAGCAGCCCTTCAGCGT  150
101  TTGGATT-TTATGTCTACAGTCTGCGGA-ACGGAGCAGTATTTCATGT  150
151  GGAGATATGGTTACAGAAGTACGGCTATCTTCAAGCTAGTGAACCCAGAA  200
151  GGAGGTTTGTGTACAAAAGTACGGCTACCTTCCACCAGCTGACCCAGAA  200
201  TGTCAATTTATGGAATAA-AGTTACGGGGACTTTGGAT-GAAAACACA  250
201  TGTCAATTTATGGAATAA-AGTTACGGGGACTTTGGAT-GAAAACACA  250
251  CAGCAATTTATGGAATAA-AGTTACGGGGACTTTGGAT-GAAAACACA  300
251  CAGCAATTTATGGAATAA-AGTTACGGGGACTTTGGAT-GAAAACACA  300
301  ATAGACTGGATGAAGAAGCCCGCTGTGGTGTGCGCCGACAGTTGGGAG  350
301  ATTGACTGGATGAAGAAGCCCGCTGTGGTGTGCGCCGACAGTTGGGAG  350
351  C-AGCATT-AGATT-AGTGTAGAAAGAACGGTTACGCATTAACATGGGC  400
351  GTAGC-TCCAAATTTCA-TATTCTGTGAAAGCGATATGCATTGACAGGAC  400
401  AGAAGTGGCATAAACAATACACCTACAGCATTAAAGACTTCACTCCT  450
401  AGAAGTGGCATAAACAATACACCTACAGCATTAAAGACTTCACTCCT  450
451  AAGTAGGAAAAT-TAGAATCT--ACAGAGCGATACGCCGTGCTTTGA  500
451  AAGTAGGAAAAT-TAGAATCT--ACAGAGCGATACGCCGTGCTTTGA  500
501  TGTGTGGCAGAAATGAACACCCCTGACATTTGAAGAAATACCATA-C-GTG  550
501  TGTGTGGCAGAAATGAACACCCCTGACATTTGAAGAAATACCATA-C-GTG  550
551  GAGTTGGAACAAG-AAGAGG-GATGTGGACATACAATTATGTTTGGCT  600
551  AA-TTAGAAAATG-CGAA-ACGTGATGGATATAACCATATTTTGTCA  600
601  TCTGGTTTCCATGGGACAGCTCTCCCTTTGATGGAGAGGAGGATT-T  650
601  TCTGGTTTCCATGGGACAGCTCTCCCTTTGATGGAGAGGAGGATT-T  650
651  TG-CACATGCTTATTCCCTGGACCTGGCATTGG-GG-G-TGACACGCAC  700
651  TGGCACATGCTTATTCCCTGGACAGGAAATGGAGGAGAT-AC-C-CAT  700
701  TTCGACTCCGATGAGCCTTTGGACATTAGGAAACCAAATCATGATGGTAA  750
701  TTTGACTCAGATGAGCCTGGACATAGGAAATCCATATCATGATGGAAA  750
751  TGATCT-ATTCCTGGTTCGCCCCAGCAACTCGCCCATGCTAGGCTTG  800
751  TGA-CTTATTCTTGTAGCAGTCAATGAACGTGGACATGCTCTGGGATT  800
801  GAACACTCCAATGATCCAGTCAATCATGGCCCAATTTTATCAATATAT  850
801  GAGCATTTCAATGACCCACATGCAATCATGGCTCCATTTTACCAGTACAT  850
851  GGATACAGAAAATTTCCAGCTTCTTCAA-GATGACTTACAGGCAATCCAG  900
851  GGAACAGACAACCTCAAACCTACCT-AATGATGATTACAGGCAATCCAG  900
901  AAGATATATGGTCCACAGATAGATTCAC-ATCCTACAAAAC-CITA  950
901  AAGATATATGGTCCACCTGACAGATTTCTCCA-CCTACAAGACCTCT-A  950
951  CCTACAGTACCACACATCGTTTTATCCACCATCCGATCCAAG-AAAGC  1000
951  CCGACAGTGGCCCAACCCGCTTACTTCTCCGGTGACCCAAAGAAA--  1000

1001  CTAGCA-GACAA-CCAAGACCTCCTCGACCACCAGCTAGGATAAACCTT  1050
1001  --A--ATGACAGGCCAAAACCTCCTCGGCCCAACCC-GGCAGAC-CCT-  1050
1051  CCTTCCAGGTGCCAACCCCAACATCTGTGATGGAAA-TTTCACACTCT  1100
1051  CCTATCCGGAGCCAAAACCCCAACATCTGTGATGGGACTTT-AACACTCT  1100
1101  GGCTAT-CTTACGGGGTGAATGTTTGTTTTTAAGACCATTGGTTTTGG  1150
1101  AGCTATTCTT-CGTCGTGAGATGTTTGTTTTCAAGGACCAGTGGTTTTGG  1150
1151  CGTGTTCGAAACAATAGAGTTTGGGATGTTACCCCATGCAAAATGCTTA  1200
1151  CGAGTGAGAAAACAACAGGGGTATGGATGGATACCAATGCAAAATACTTA  1200
1201  TTTCTGGAGGGCTTGCCCTTCAAAAAC-ATT-T--ATCCAGCTAGGAACG  1250
1201  CTCTGGCGGGCTTGCCCT-CTAGTATCGATGAGTATGATAAAA  1250
1251  --GCCGACGAAAGTTTGTGTCTTAAAGGGAGTAACTAGGCTGCTTC  1300
1251  TAGC-GACGGGAATTTGTGTCTTAAAGGTAAACAAATATGGGTGTTTC  1300
1301  AAGGA-AGCTACG-TTGGAGTTAGGATACTTCA-GAATGTAG-TGGAAC  1350
1301  AAGGATA-CAACTCTTCAACT-GGTTACCTCATGACT-T-GAT--AAC  1350
1351  TC--GGAAGCGGATGCTTCTCAGGGTATTGATTACG-AGTGTGGTG  1400
1351  CCTTGGAAAGTGAATTCGCCCTCATGGTATTGATTACGACTT-TGGTGG  1400
1401  GAAGATGTGGGAAAACCTACTTCTCAAAGGAGACAGGACTGGAGGTA  1450
1401  GAGGACGCTGGGAAAACCTATTTCTCAAAGGAGACAGATATGGAGATA  1450
1451  CAATGAAGAAAAC-A--CA-TGTTGTAGGACAGTGGTATCCCAATCCAT  1500
1451  TAGTGAAGAAAATGAAAACAATG--G-ACCC--TGCTATCCCAAG-CCAA  1500
1501  TTCA-A-TATGGAAGGAATTC--AAGTCTCCACAAGG-GCCTTTGT  1550
1501  T-CACAGCTGGAAAGGAT-CCCTGAA-TCTCTCA-GGGAGCATTGT  1550
1551  -CAGCAAGAAAGTGGCTATACATTTTTTACAAGGAAAGGAGTACTGG  1600
1551  ACA-CAAAGAAAATGGCTTTACGATTTCTCAAAGGAAAGGAGTATGG  1600
1601  AAATTCATAATATAAATCAGGGTGGAGCTAGCTATCCCAAGGTAAC  1650
1601  AAATTCACAACCCAGTACTCAAGGTGACCTGGATATCCCAAGATCCAT  1650
1651  ACTTAAAGA---ATGGA-TGGGATGTGACCAGCACTAAGACTGGAG--AC  1700
1651  CCTCAAGGATTTTATGGGCTGTGATG-GACC-AAC-A-GACAG-AGTTA-  1700
1701  AAGGACAGG-CAC-GAT-ACTCAAGATGATTTGACATCGTGTATAAAAT  1750
1701  AAG-A-AGGACACAGCCCA-CA-GATGATGTAGACATGTGCATCAAAC  1750
1751  TGATAACACTTTG--AGCAGTGTGAATGCCATCGCCATGTTATCCCTG  1800
1751  GGACACACACA--GCCAGCACTGTGAAGGCCATAGCTATTGTCAATCCCTG  1800
1801  TACGCT-GGCCCTTGCTCTTCTGGTGTGATTTACACAGTGGTTCAATTT  1850
1801  CAT-CTTGGCCTTATGCTTCTTGTATTGGTTTACACTGTG-TTCCAGTT  1850
1851  -AAGAGGAAAGGAAAGCCACGCCACATATTTACAGTAAAGGCTCTATGC  1900
1851  CAAGAGGAAAGGAAACCCGCCACATACTGTACTGTAACGCTCTATGC  1900
1901  AAGATGGGTTGA.....  1950
1901  AAGATGGGTTGA.....  1950

```

Fig. 7. Comparison of shark MT3-MMP with human MT3-MMP.

Shark MT3-MMP had about 70% identity to human MT3-MMP. Sequences indicated in bold print are shark MT3-MMP. S=shark, H=human.

1 MANGFTQPLATLYKGKQLAFVYSGAFYL↓TLLWIICSVCGEEQPFSVEIWLQKYGY
signal peptide
57 LQASEPRMSVLRSSQSMHSAVAAMQQFYGIKVTGTLIDENTIDWMKKPRCGVPDQ
pro-peptide
112 FGSSIRFSV[REDACTED]YALTGQKWHHKHITYSIKNFTPKVGKLETHRAIRRAFDVWQNV
168 TPLTFEEIPYVE LENKKRDVDITIMFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFPGPGIGG
catalytic
224 DTHFDSDEPWTLGNPNHDGNDLFLVAACHELGHALGLEHSNDPSAIMAPFYQYMD
279 TENFQLPQDDLQGIQKIYGP|PDKIAHPTKPLPTVPPHRFNPPSPDRKPSRQPRPP
hinge
333 RPPTRDKPSFPGAKPNI|CDGNFNTLAILRGEMFVFKDHWFWVRVNRNRLDGYPM
387 QIAYFWRGLPSKHLSSLGTADGKFVFLKGSKYWVFKEATLELGYPNVVELGSGV
hemopexin
442 PSQGIDSAVWWEDVGKTYFFKGDYRWRYNEETHVVGSGYPKSIWKGIPKSPQ
496 GAFVSKESGYTFFYKKEYWKFNNHKL RVEPSYPR SILKEWMGCpBRTKTGDKDR
550 HDTQDDVDIVIKIDNTLSTVN|AIAIVPCTLALCFVLIYTVVQF|KRKGTPRHILYSKRS
IS (insertion) **transmembrane** **cytoplasmic**
610 MQEWW*

Fig. 8. Deduced amino acid sequence of shark MT3-MMP.
The MT3-MMP cDNA encoded a protein of 614 amino acids. The predicted signal peptide cleavage is indicated by a downward arrow. As shown is a cystein switch (RXKR motif) which is boxed. The transmembrane domain is underlined. Vertical lines separate distinct subdomains of MT3-MMP into pro, catalytic, hinge, hemopexin, transmembrane, and cytoplasmic domains.

3. 상어 TIMP-3 및 MT3-MMP 유전자의 각 조직별 발현조사

두릅상어의 각 조직에서 TIMP-3 와 MT3-MMP transcript의 발현정도를 알아보기 위해 위 실험에서 사용된 TIMP-3 및 MT3-MMP primer를 이용하여 각 조직별 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 우선, 각 조직 (뇌, 연골, 근육, 간)의 RNA를 추출하여 cDNA를 제조한 후, cDNA의 상태와 정량을 목적으로 actin primer로 PCR을 수행하였다. TIMP-3 유전자의 경우 Fig. 9에서 보이는 것과 같이 연골과 뇌 조직에서의 발현이 근육과 간에 비해 현저함을 관찰 할 수 있었으며, MT3-MMP유전자의 발현은 상어 조직중 뇌와 연골조직에서 높게 발현됨을 확인하였다 (Fig.10). 연골 조직에서 TIMP-3의 뚜렷한 발현 양상은 이미 보고된 바 있는 상어 연골의 혈관생성 억제에 관련된 인자로서의 가능성을 뒷받침 해 주며, 뇌조직에서 MT3-MMP의 높은 발현은 뇌 발생과정중 비정상적으로 일어날 수 있는 MMP-2의 활성화저해를 재 활성화 시킴으로서 정상적인 발생을 유도 할 것으로 예상된다.

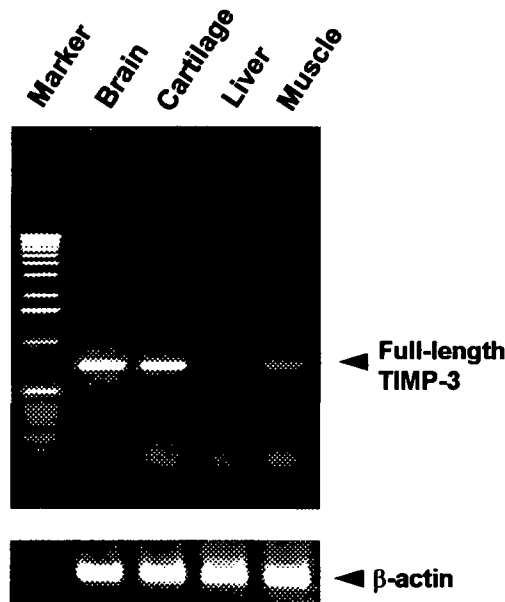


Fig. 9. Expression of TIMP-3 mRNAs in various tissues from *Scyliorhinus torazame*. RT-PCR with specific primers for TIMP-3 using total RNA (5 ug) of various shark tissues. In a control amplification, human actin (about 80% sequence homology with shark actin, data not shown) primers were used.

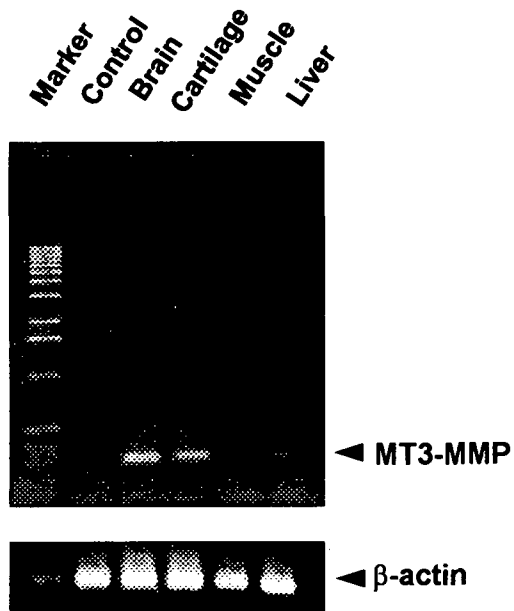


Fig. 10. Expression patterns of MT3-MMP in various tissues of shark . RT-PCR with specific primers for MT3-MMP using total RNA (5 μ g) of various shark tissues. In control amplification, human β -actin primers were used. Marker is 1kb size makers. Specific signals for shark's MT3-MMP were detected at 350bp in the brain and cartilage.

4. 상어의 endostatin 유전자의 염기서열 분석 및 homology search

가. 상어의 endostatin 유전자의 partial cDNA 염기서열 분석 및 homology search

상어의 연골조직에서 endostatin 유전자의 발현을 조사하기 위해 상기에 기술한 바와 같이 4종의 primer (5' primer, 3' primer, I5' primer, I3' primer)를 사용하여 RT-PCR 방법으로 발현 양상을 확인하였고 (Fig. 11), DNA gel에서 분리한 각각의 endostatin PCR product를 pGEM-T easy vector에 클로닝한 뒤, 클론된 cDNA 염기서열을 automatic DNA sequencing 방법으로 결정하였다. 이 염기서열들을 이미 보고된 human의 endostatin에 대한 염기서열과 비교한 결과 endostatin의 경우 383bp, 214bp, 301bp, 350bp의 transcript가 나타났는데, 그 중 214bp와 301bp 클론을 human endostatin과 homology search한 결과 약 80%의 상동성이 있음을 확인하였다 (Fig. 12).

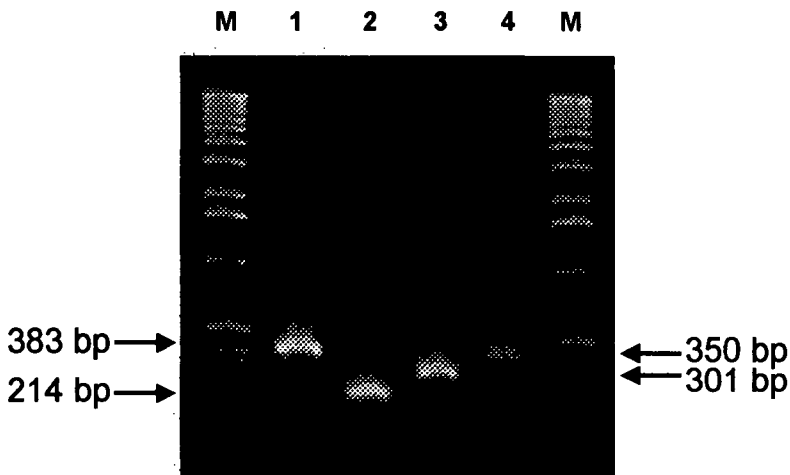


Fig. 11. RT-PCR을 이용한 상어 연골 endostatin transcript의 발현 조사.

- Lane 1 : 5' primer / 3' primer
- Lane 2 : I5' primer / I3' primer
- Lane 3 : 5' primer / I3' primer
- Lane 4 : I5' primer / 3' primer

나. 상어 endostatin 유전자의 각 조직별 발현조사

두툽상어의 연골 외의 다른조직에서 발현되는 endostatin transcript의 발현정도를 알아보기 위해, 위 실험에서 사용된 endostatin primer (5' primer, 3' primer)를 이용하여 각 조직별 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다.

각 조직별 endostatin transcript 발현을 조사한 결과, Fig. 13과 같이 상어의 endostatin 이라 추정되는 약 383bp transcript가 연골조직에서 특히 강하게 발현됨을 확인하였다.

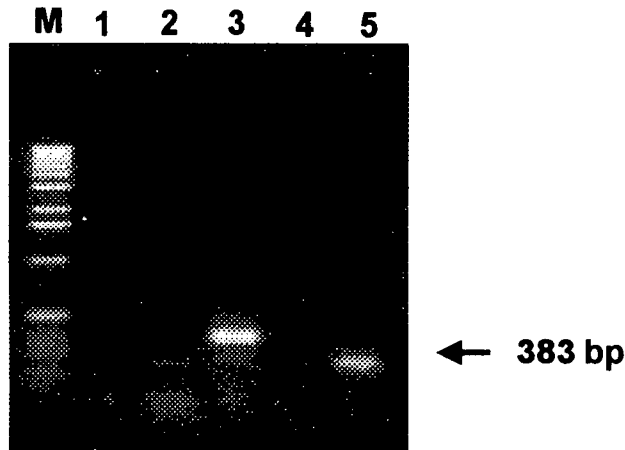


Fig. 13. 상어의 각 조직별 endostatin transcript의 발현양상 조사.

- Lane M : DNA size marker
- Lane 1 : HT-1080 cells (control)
- Lane 2 : 상어 brain 조직
- Lane 3 : 상어 cartilage 조직
- Lane 4 : 상어 liver 조직
- Lane 5 : 상어 muscle 조직

5. 상어의 angiostatin 유전자의 염기서열 분석 및 homology search

가. 상어의 angiostatin partial cDNA 염기서열 분석 및 homology search

상어의 연골조직에서 angiostatin 유전자의 발현을 조사하기 위해 endostatin의 경우와 같은 방법으로 human과 mouse의 conserved sequence를 토대로 제작한 4종의 primer (5' primer, 3' primer, I5' primer, I3' primer)를 사용하여 RT-PCR 방법으로 발현 양상을 조사하였고 (Fig. 14), DNA gel에서 분리한 angiostatin cDNA를 pGEM-T easy vector에 클로닝한 뒤, 클론된 cDNA 염기서열을 automatic DNA sequencing 방법으로 결정하였다. 이 염기서열을 이미 보고된 human의 angiostatin에 대한 염기서열과 비교한 결과, 상어의 angiostatin 317 bp 클론이 human angiostatin과 약 46% 정도의 상동성이 있었다 (Fig. 15).

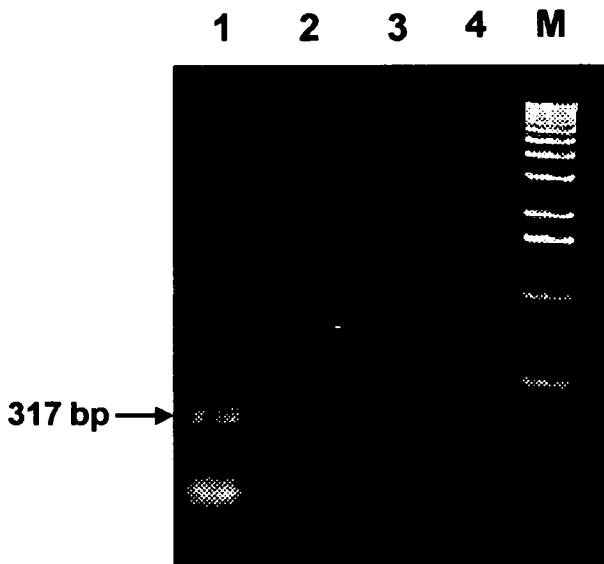


Fig. 14. RT-PCR을 이용한 상어 연골 angiostatin transcript의 발현 조사.

- Lane 1 : 5' primer / 3' primer
- Lane 2 : I5' primer / I3' primer
- Lane 3 : 5' primer / I3' prime
- Lane 4 : I5' primer / 3' primer

나. 상어 angiostatin 유전자의 각 조직별 발현조사

두릅상어의 연골 외의 다른조직에서 발현되는 angiostatin transcript의 발현정도를 알아보기 위해 위 실험에서 사용된 angiostatin primer (5' primer, 3' primer)를 이용하여 각 조직별 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. Fig. 16에서 나타난 바와 같이 상어의 angiostatin이라 추정되는 317bp transcript가 뇌, 간장, 근육등에서도 고르게 발현됨을 알 수 있었다.

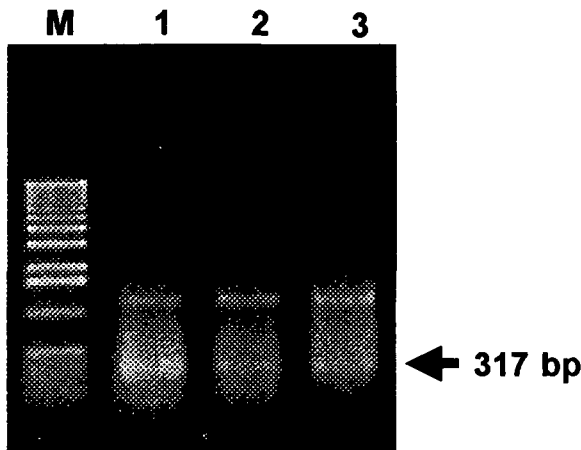


Fig. 16. 상어의 각 조직별 angiostatin transcript 발현양상 조사.

- Lane M : DNA size marker
- Lane 1 : 상어 brain 조직
- Lane 2 : 상어 liver 조직
- Lane 3 : 상어 muscle 조직

6. 상어 TIMP-1 유전자의 염기서열 분석 및 homology search

혈관신생인자에 의해 혈관내피세포들이 자극을 받으면, 이 세포들로부터 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)가 분비되어 혈관벽과 기저막 (extracellular matrix)을 분해 시켜 내피세포가 관통할 수 있는 통로가 만들어 지게 된다. 이러한 혈관신생인자인 MMP와 1:1 complex를 이룸으로서 MMP의 기능을 저해시키는 것으로 알려진 TIMP 계열 중, 특히 연골에서 많이 발현하며 MMP-9 (gelatinase B)와 complex를 이루는 것으로 알려진 TIMP-1의 conserved sequence를 토대로 위에서 서술한 바와 같이 primer를 제작하였다. 이렇게 제작한 primer 중 hTIMP-1 S2와 hTIMP-1 As2를 사용하여 상어의 연골조직에서 분리한 RNA로부터 RT-PCR 방법으로 TIMP-1 유전자의 발현 양상을 조사하였고 (Fig. 17), DNA gel에서 분리한 TIMP-1 PCR product를 pGEM-T easy vector에 클로닝한 뒤, 클론된 cDNA 염기서열을 automatic DNA sequencing 방법으로 구하였다. 이 염기서열들을 이미 보고된 human의 TIMP-1에 대한 염기서열과 비교한 결과 상어의 TIMP-1 클론의 경우, 366bp의 transcript가 관찰되었는데 human TIMP-1과 homology search한 결과 약 55%의 상동성이 있었다 (Fig. 18).

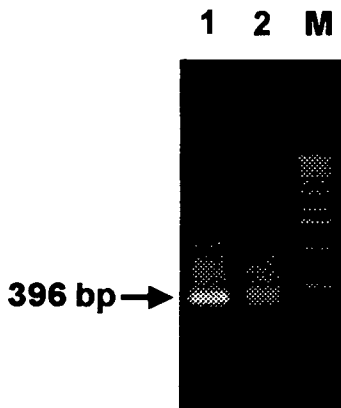


Fig. 17. RT-PCR을 이용한 상어 연골 TIMP-1 transcript의 발현 조사.

Lane 1 : Human cell line에서의 TIMP-1 transcript

Lane 2 : 상어 연골에서의 TIMP-1 transcript

제 4 절 고 찰

본 실험에서 밝힌 TIMP와 MMP는 혈관생성 및 암 침윤 및 전이에 중요한 역할을 하는 인자로 알려져 있다. 일반적으로 MMP는 collagen이나 proteoglycan과 같은 세포외 기질 구성성분을 분해하는데 관여하는 효소로서 정상적으로는 척추동물의 배 발생과정과 조직의 재배열에 중요한 역할을 하는 효소 군으로 보고되어 있다. 그러나, 최근 이들 효소 군은 악성 암 세포가 이웃하는 세포들로부터 떨어져 나와 주변의 기질을 파괴하고 이동하여 혈관기저세포 안으로 침투하는 암전이 과정에서 세포 외 기질성분들을 파괴하여 암세포의 전이가 용이하도록 하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들의 작용은 TIMP에 의해 효소활성이 저해되어 혈관신생의 균형을 조절하게 된다고 알려져 있다. TIMP는 이러한 MMP 활성저해 이외에 혈관생성 억제기능이 보고된 바 있다. 이러한 TIMP-3 및 MT3-MMP 유전자는 주로 인간, 쥐, 닭과 같은 척추동물에서 cloning되어 그 기능이 연구되고 있고, 이들 대부분의 유전자가 특허 출원되어 있다. 하지만, 어류에서는 존재여부 및 그 연구결과가 전혀 보고된 바가 없었으나 본 연구팀에서 최초로 연골어류로부터 이들 전체 염기서열을 밝혀내었고 MT3-MMP의 경우 현재 특허 출원중이다. 또한 상어 연골의 혈관생성 억제능에 관련된 구체적인 인자 역시 아직 밝혀지지 아니하였으나, 본 연구에서 밝힌 상어의 TIMP-3가 혈관생성 억제에 관련된 한 인자라는 사실 또한 제시하였다.

이렇게 동정된 상어 TIMP-3 및 MT3-MMP가 혈관생성에 어떠한 영향을 미치는지, 차기년도에 이를 조사하고, 이 인자들이 혈관생성에 관여한다면 혈관생성에 관련된 질병의 치료제로 쓰일 수 있다는 가능성을 제시하였다.

제 4 장 연골어류 혈관생성억제 유전자의 발현벡터 시스템의 확립 및 항암 효능 조사

제 1 절 서 설

2차년도에 상어의 연골 조직으로부터 TIMP-3 유전자의 전체 염기서열을, 뇌 조직으로부터 MT3-MMP 유전자의 전체 염기서열을 밝혀내었다. 이들 혈관생성에 관련된 유전자들의 발현 벡터 시스템의 구축을 위해 먼저 full-length TIMP-3 및 MT3-MMP의 발현벡터를 구축하고자 한다. 구축된 발현벡터로부터 대량의 단백질을 발현시킬 수 있는 조건을 개발하고, 이들 대량발현 시스템으로부터 혈관생성 억제 또는 유도에 작용하는 단백질을 획득하고자 한다. 또한 세포 수준에서 이들 유전자들이 혈관 생성 억제 혹은 촉진에 어떠한 효과를 나타내는 지 조사하고, 본 실험실에 구축된 *in vitro* angiogenesis assay, *in vitro* invasion assay, wounding migration assay와 *in vivo* CAM assay등을 통해 악성암의 혈관생성억제 및 항전이 에 대한 항암작용과 허혈성 질환에 대한 혈관생성 촉진 작용을 검증하여 어류로부터 난치 성 악성암 및 혈관생성관련 질병에 대한 새로운 의약품의 개발을 시도하고자 한다.

제 2 절 실험 재료 및 방법

1. 대량발현 시스템의 구축

가. 발현벡터의 제조

RT-PCR과 RACE를 통해 얻어진 full-length cDNA clone을 pGEMT-easy 벡터에 삽입한 뒤, XhoI/EcoRI 부위를 절단한다. 절단된 insert를 pRSET 발현벡터의 XhoI/EcoRI 부위에 삽입한 뒤, 대장균에 형질전환시켜 insert가 삽입된 클론을 분리한 후 제한효소 분석과 염기서열을 분석한다.

나. 혈관생성 억제단백질의 발현

이 발현벡터를 대장균에 형질전환시켜 ampicillin (50 μ g/ml)이 첨가된 SOB media (Tryptone, 20g ; yeast extract, 5.0g; NaCl, 0.5g; KCl, 1.86mg/liter)에 overnight (O/N) 동안 배양한다. 이 culture를 SOB media로 1/200로 희석하여 37 °C에서 배양하여 O.D 600 값이 0.3에 도달했을 때 IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)를 최종농도 1mM로 첨가하고 M13/T7 파아지를 감염시킨 후 5시간 동안 발현시킨다. 이 발현시킨 1ml의 배양액 으로부터 pellet을 얻고, 이 pellet에 200 μ l의 sample buffer (0.05M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1M DTT, 2% SDS, 1% glycerol, 0.1% bromophenol blue)에 현탁시킨후 90 °C에서 5분간 가

열후 10 μ l의 샘플을 20%의 acrylamide를 사용하여 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)로 분석한다.

다. 최적 발현 조건 확립

최적 발현조건을 실험실 수준에서 확립하기 위해 배지별, IPTG 농도별, 시간별 발현결과를 조사하여 혈관생성 억제단백질의 발현을 최적화 한다.

라. 단백질의 안정성 조사

장시간 발현시킨 후의 혈관생성 억제유전자의 발현양상을 조사하여 대장균내에서 발현된 혈관생성 억제단백질의 대장균내에서 안정성을 조사한다.

2. Animal cell transfection

강력한 promoter나 발현조절성 promoter에 연결시킨 eukaryotic expression vector는 calcium phosphate precipitation method를 이용하여 혈관형성 촉진작용이 강력한 인간 fibrosarcoma 세포인 HT 1080에 transfection시킨다. 먼저, calcium phosphate-DNA coprecipitation은 20 μ g의 DNA (220 μ l in TE buffer)와 250 μ l의 2 x HBS를 섞은 후 31 μ l의 2 M CaCl₂를 drop by drop으로 섞어 상온에서 25분간 방치한다. 지름 60 mm petri dish에서 monolayer로 자라고 있는 동물세포의 배지를 제거한 후 새 배지 5 ml을 가하고 흔들면서 calcium phosphate-DNA suspension을 drop by drop으로 넣고 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 배지를 제거하고 새배지 5 ml을 가한 후 이틀동안 더 배양한다. 이때부터 이틀에 한번씩 G418 (geneticin)을 처리하여 stable transfectant인 colony가 나타날 때까지 배양을 계속하도록 한다.

3. Chorioallantoic membrane (CAM) assay

수정란을 구입하여 45시간 동안 18 $^{\circ}$ C에 놓아둔 다음 90% 습도가 유지되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양한다. 3일배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 3 ml 뽑아낸다. 4일배가 되면 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 요오드 키팅크로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만든다. 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프를 구멍을 막는다. 혈관형성저해제의 검색을 위하여 이것을 계속 배양기에서 키워 4.5일배가 되면 thermanox coverslip에 sample을 도포한 후 이를 40분 동안 말린다. 다 마른 것을 확인하고 4.5일배의 유리테이프를 떼어낸 후, 이 coverslip을 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리테이프를 창문을 막는다. 이를 배양기에서 2일 동안 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipid, 녹십자)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부현미경 (magnification x 8)으로 혈관형성이 저해되었는지 관찰하고 CAM의 사진을 찍는다.

4. 혈관내피세포의 배양

American Type Culture Collection에서 구입한 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)을 fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 medium 199 (M199)로 배양한다. 분말 상태의 medium을 2차 증류수에 녹인 후 sodium bicarbonate 2.2 g을 첨가하여 HCl로 pH 7.2를 맞춘 후 2 μ m Millipore filter로 이를 여과한 다음, 사용 직전에 20 %의 FBS, 1 %의 penicillin-streptomycin (P-S), 3 ng/ml의 bFGF, 100 μ g/ml의 heparin을 첨가한다. 배양용기는 T25 flask (25 mm^2)에 5 - 7 ml의 배지로 37 $^{\circ}\text{C}$, 포화습도로 유지되는 5 % CO_2 배양기에서 단층배양하며, 0.05 % trypsin-EDTA로 계대배양하여 유지한다. 실험에 사용하는 세포는 passage 19와 30사이의 것을 사용한다.

5. 혈관내피세포의 증식조사 (^3H -Thymidine incorporation assay)

HUVEC을 gelatin으로 코팅된 24 well multiplate에 1×10^4 cells/well의 밀도로 분주하고 1 ml의 배지를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한다. 세포가 안정화되면 혈관신생저해인자를 처리한다. 증식을 조사하고자 하고자 하는 시간보다 4시간전에 1 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 농도로 ^3H -thymidine을 첨가한다. 4시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 배양한 후 배지를 버리고 100%의 methanol을 첨가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 고정시킨다. 그 후 PBS로 세포를 2번 씻고 10 %의 TCA로 한 번 씻은 후 10 %의 TCA를 300 μl 를 첨가하여 12시간동안 처리한다. 12시간이 지난 후 TCA를 버리고 0.2 M의 NaOH와 0.1 %의 SDS가 포함된 solubilization buffer를 150 μl 를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 처리하여 세포를 lysis시킨다. 세포를 lysis시킨 후 scintillation solution을 첨가한 후 Liquid Scintillation Counter (Packard)를 사용하여 방사능동위원소의 활성을 측정한다.

6. Wounding migration assay

HUVEC을 60mm culture dish에 바닥이 보이지 않는 정도가 될 때까지 배양한 후 면도날로 세포에 상처를 내어 reference line을 긋고 일부를 긁어낸다. Serum free medium으로 3번 씻어내고 10% FBS가 포함된 M199 배지를 3ml을 첨가한다. 그리고 동시에 1mM thymidin과 IGF-II를 첨가하여 24시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 포화 습도로 유지되는 5 % CO_2 배양기에서 배양한다. 배지를 버리고 PBS로 씻어내고 methanol로 1분간 고정시키고 Giemsa로 5분간 염색한 후 물로 씻어낸다. Inverted microscopy를 이용하여 40배로 관찰하여 reference line을 넘어 이동한 세포 수를 센다.

7. *In vitro* angiogenesis assay

10 mg/ml 농도의 Matrigel 300 μl 를 24 well plate에 떨어뜨려 겔화 되도록 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 둔다. Gel이 형성된 후 바닥이 보이지 않는 정도로 배양된 HUVEC을 trypsinizaion하여 4×10^5 cells/well로 분주하고 혈관신생저해인자를 포함하는 1 ml의 배지에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 배양하고 inverted microscope로 gel속을 파고 들어가 혈관과 유사한 모양을 형성하는지를 시간대 별로 관찰한다.

8. Invasion assay

Pore size 12 μm 인 Polycarbonate filter가 있는 insert chamber를 사용한다. Filter의 아래부분을 5 μg 의 type IV collagen으로 코팅하고 filter의 위부분은 25 μg 의 Matrigel (Collaborative Research, Inc., Waltham, MA)로 코팅한다. Main chamber (24 well multiplate)에 혈관신생저해인자를 첨가하고 insert chamber에는 HUVEC (2×10^5 cells/well)을 포함하는 배지 400 μl 을 넣은 후, insert chamber를 main chamber에 집어넣는다. 37°C 배양기에 넣어 6시간 배양한 후 insert chamber의 polycarbonate filter를 떼어 내어 고정한 후 hematoxylin-eosin 염색하여 Matrigel은 분해하고 filter를 통과한 세포의 수를 계수한다. 결과는 well 당 빠져 나온 HUVEC의 수로 나타낸다.

9. Human Alu sequence PCR-based CAM assay

1998년 Cell지에 게재된 새로운 전이, 침윤 활성을 조사하는 *in vivo* assay로써 상어 TIMP의 항전이, 항침윤 활성을 조사하기 위해 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

가. 인간유래 세포의 CAM 처리

수정란은 육용계 (아바에이카)를 사용한다. 수정란을 구입하여 45시간 동안 18°C에 놓아둔 다음 60% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양한다. 2일배가 되면 계란의 끝 부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 1ml 뽑아낸다. 3일배가 되면 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 요오드 덩크로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3cm 크기의 원형 창문을 막는다. 이것을 계속 배양기에서 키워 9일배가 되면, 전이나 침윤 정도를 알아보고자 하는 인간 유래 세포들을 counting한 후, 동일한 수의 세포들을 CAM에 처리하기 전까지 ice상에서 PBS내에 보관한다. PBS에 있는 동일한 수의 세포들을 upper CAM에 처리한 후, 12일이 되면 lower CAM으로부터 genomic DNA를 분리한다.

나. Alu-PCR

Lower CAM에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 인간 특이적으로 많이 분포하는 염기 서열인 human Alu sequences Specific primers를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 sequence와 PCR cycle은 다음과 같다.

Human Alu-sense: 5' ACG CCT GTA ATC CCA GCA CTT 3'

Human Alu-antisense: 5' TCG CCC AGG CTG GAG TGC A 3'

95 °C, 5 min (1 cycle) - 95 °C, 30 sec ; 58 °C, 45 sec ; 72 °C, 45 sec (15 cycles) - 72 °C, 8 min (1 cycle)

PCR 수행 결과 얻어진 product의 size는 224 bp이며, 각각의 band intensity를 비교하여 진

한 band의 경우 침윤활성이 높은 세포라 판단한다. 대조군으로 인간의 β -actin primers를 이용하여 PCR을 수행한다.

제 3 절 실험 결과

1. 어류 혈관생성억제 유전자의 발현벡터의 구축

가. 상어의 TIMP-3 유전자에 대한 발현 벡터 구축

2차년도에서 두릅상어 (*Scyliorhinus torazame*)의 연골조직에서부터 혈관생성 억제인자로 보고되어 있는 TIMP-3 유전자의 full-length cDNA 염기서열을 밝혀 내었다. 이를 토대로, 상어 full-length TIMP-3 cDNA를 제작 가능한 primer (Fig. 19)를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR product를 직접 발현 벡터에 클로닝하기 어려우므로, 먼저 PCR product 전용 벡터인 pGEMT-easy 벡터 (Promega)에 클로닝하였다. 이들 클로닝된 벡터에 *XhoI*, 및 *PstI* 제한효소를 처리하여 full-length TIMP-3 cDNA를 분리하고, 역시 같은 제한 효소으로 원핵 세포 발현벡터인 pRSETA (Invitrogen)에 처리한 후 gel에서 분리하였다. 분리한 두 product들을 ligation하여 상어의 TIMP-3 유전자를 발현할 수 있는 벡터를 구축하였다. pRSETA/sTIMP-3 이외의 다른 원핵세포 발현벡터인 pGEX-4T-1 (Pharmacia)에 *XhoI*과 *NotI* 제한효소를 이용하여 상기에 서술한 바와 동일한 방법으로 상어 TIMP-3 발현벡터를 제작하였다.

5' primer : 5'-GGCTCGAGATGGTATTTTCTACACAGC-3'

3' primer : 5'-CCGAATTCTTGCTGTGTCACACGAGATG-3'

Fig. 19. 상어 TIMP-3 full-length 유전자 클로닝에 사용한 primer 염기 서열

나. 상어의 MT3-MMP 유전자에 대한 발현 벡터 구축

혈관생성의 조절과 암침윤 및 전이에 관련되어 있는 것으로 보고되어 있는 MT3-MMP의 전체 염기서열을 상어의 뇌조직으로부터 이미 2차년도에 확인한 바 있다. 밝혀낸 상어의 full-length MT3-MMP 염기서열을 토대로 *BamHI* 제한 효소자리를 양쪽 말단에 붙인 primer (Fig. 20)를 제작하여 PCR을 수행한 후, 이 product를 full-length TIMP-3와 마찬가지로 pGEMT-easy vector에 클로닝하였다. 이 클로닝된 벡터와 원핵세포 발현 벡터인 pRSETB에 각각 *BamHI*을 처리한 후 gel에서 분리하였다. 특히 pRSETB의 경우 *BamHI*을 처리하면 양쪽 말단에 같은 제한 효소자리가 존재하므로, 분리하기 전에 self ligation을 방지하는 alkaline

phosphase, calf intestinal (CIP, NEB)를 처리하였다. 그런 다음 분리한 두 product들을 ligation하여 pRSETB-MT3-MMP 발현 벡터를 구축하였다.

5' primer : 5'-CGGGATCCGATGGCAAACGGGTTCAC-3'
3' primer : 5'-CGGGATCCTCACACCCACTCTTGCAT-3'

Fig. 20. 상어 MT3-MMP full-length 유전자 클로닝에 사용한 primer 염기서열.

다. 상어 TIMP-3 및 MT3-MMP 유전자에 대한 포유동물 발현벡터 제작

두릅상어의 TIMP-3 및 MT3-MMP 단백질 수준에서 혈관생성활성을 조사하기 위해 포유동물 발현벡터인 pCDNA3 (Invitrogen)에 클로닝하였다. TIMP-3와 MT3-MMP가 포함되어 있는 pGEMT-easy 벡터에 각각 *EcoRI*과 *BamHI*을 처리한 후, 같은 제한 효소를 처리한 pCDNA3와 ligation하여 shark TIMP-3 및 MT3-MMP 단백질을 발현하는 pCDNA3 벡터를 제작하였다.

2. 어류 혈관생성억제 유전자의 대량발현 조건의 개발

가. 상어 TIMP-3 단백질의 발현 조사

XhoI 및 *PstI* 제한효소를 사용하여 구축된 pRSETA/shark TIMP-3 발현벡터를 *E. coli* BL21(DE)pLysS에 형질전환 시킨 후, 0. D₆₀₀ 값이 0.6, 1.0, 1.5에서의 발현정도와 2, 5, 7시간 및 0/N induction 시간 및 30, 37°C에서의 단백질의 발현 정도를 조사한 결과, 0. D₆₀₀ 값이 0.6에 도달했을 때 induction 시킬 때만 단백질이 발현되었으며, 그 양 또한 소량이었다. 그리하여, *XhoI*과 *NotI* 제한효소를 이용하여 제작된 또 다른 원핵세포 발현벡터인 pGEX-4T-1/sTIMP-3 발현벡터를 *E. coli* BL21에 형질전환 시킨 후, induction시의 0. D₆₀₀ 값이 0.6, 1.0, 1.5에서의 발현정도와 2, 5, 7시간 및 0/N induction 시간 및 30, 37°C에서의 단백질의 발현 정도를 조사하였다. 그 결과 0. D₆₀₀ 값이 1.0에 도달했을 때 최종농도 1.0 mM IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactoside)로 첨가하여 30°C 5시간동안 배양했을 때 가장 많은 단백질을 획득하였다 (Fig. 21).

나. 상어 TIMP-3 단백질의 농축

상어 TIMP-3 단백질을 획득하기 위해 위에서 서술한 바의 조건으로 pGEX-4T-1/sTIMP-3 발현 벡터를 induction 하였다. 그런 다음, 상어 TIMP-3의 단백질이 soluble한 형태로 존재하는 지, insoluble한 inclusion body 형태로 존재하는지의 여부를 Triton X-100 cracking buffer를 사용하여 확인한 결과, 대부분의 단백질이 insoluble pellet으로 존재하였다. Pellet 형태로 존재하는 단백질로 그 활성을 조사하기 어려우므로, guanidinium buffer (6M

guanidinium-HCl, 0.1M NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, pH 8.0)를 사용하여 extraction하였다. 혈관생성 억제작용을 조사하기 위해 CAM assay에 필요한 농축한 recombinant shark TIMP-3 GST fusion protein과 GST protein을 각기 정량하여 준비하였다 (Fig. 22).

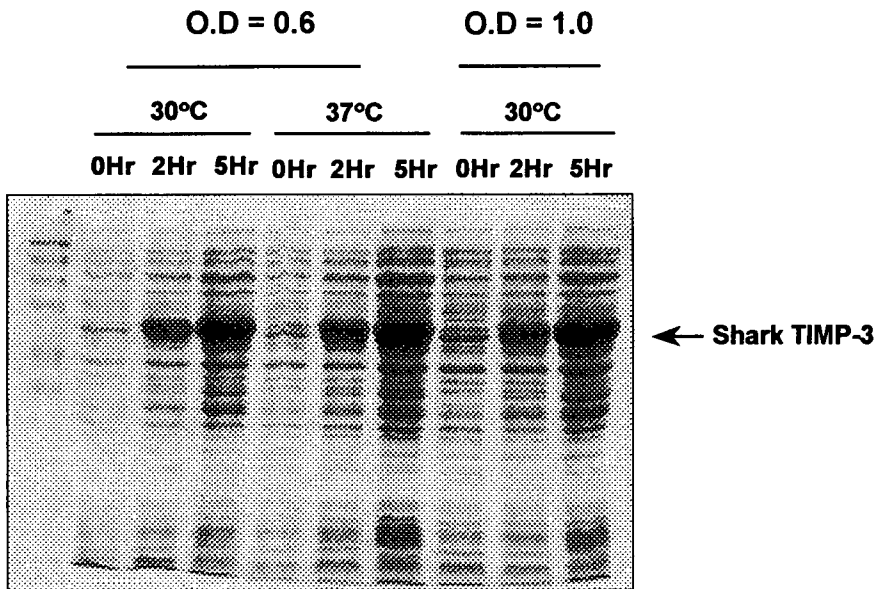


Fig. 21. SDS-PAGE of proteins from induced or without induced bacteria with shark TIMP-3 expression vectors.

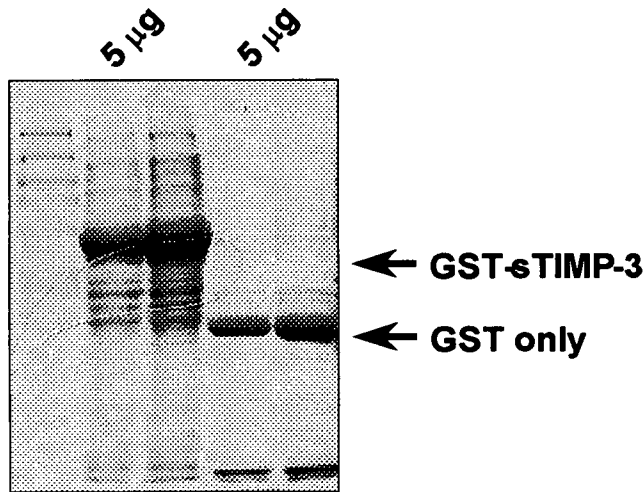


Fig. 22. Recombinant shark TIMP-3 fusion protein expressed by *E.coli* BL21.

Concentrated protein of GST fused shark TIMP-3 protein from inclusion body and GST protein from soluble fraction.

다. 상어 MT3-MMP 단백질의 발현 조사

pRSETB-MT3-MMP plasmid를 가지고 있는 *E. coli* BL21(DE)pLysS를 ampicillin 50 µg/ml와 chloramphenicol 35 µg/ml이 첨가된 LB broth에 16 시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양하여 형질전환된 *E. coli*를 LB broth로 1/200로 희석하여 37 °C에서 배양하였다. O.D₆₀₀ 값이 0.5에 도달했을 때 IPTG를 최종농도 0.4 mM와 1.0 mM로 첨가하여 3, 5시간동안 각각 배양한 뒤, 1ml의 배양액으로부터 단백질을 얻었다. 이 단백질을 200 µl의 sample buffer (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 % mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue)에 현탁시킨 후 100 °C에서 5분간 가열한 후 10 µl의 sample을 12.5%의 acrylamide를 사용하여 SDS-PAGE에 분석하였다. Fig. 에 보는 바와 같이 MT3-MMP 단백질은 IPTG 0.4 mM과 1.0 mM의 농도로 3시간과 5시간 동안 induction시킨 후 발현됨을 확인하였다 (Fig. 23).

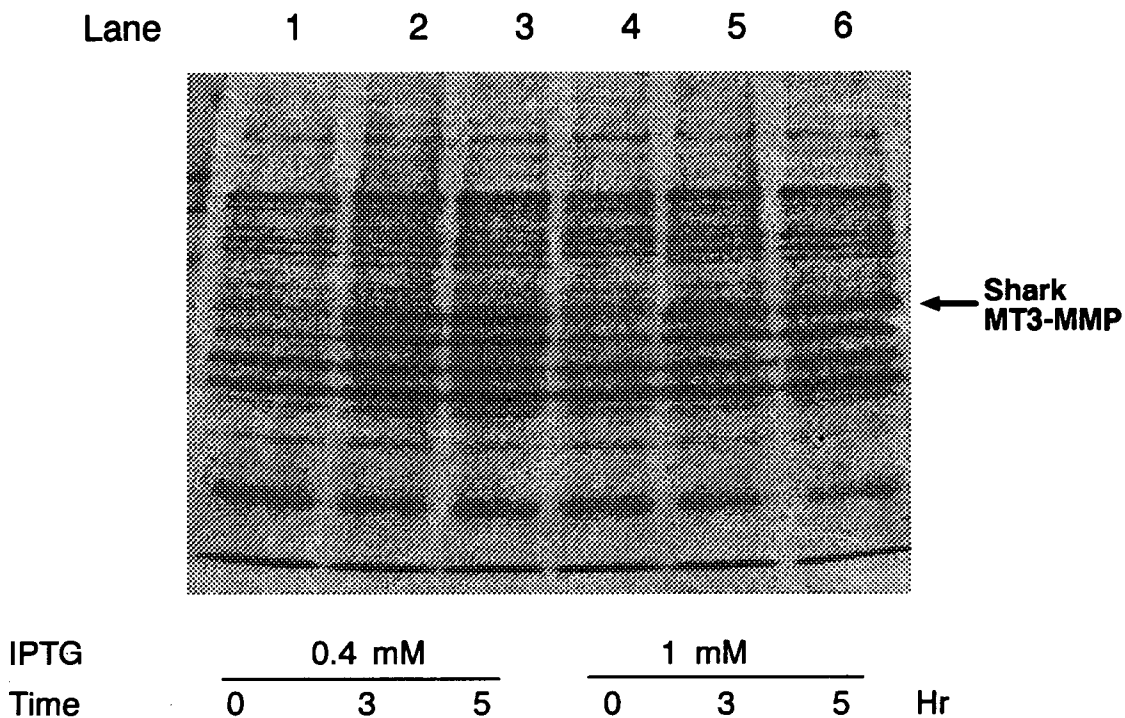


Fig. 23. SDS-PAGE of proteins from induced or without induced bacteria with shark MT3-MMP expression vectors.

Lane 1, No Induction

Lane 2, Induction with 0.4 mM IPTG for 3 hour

Lane 3, Induction with 0.4 mM IPTG for 5 hour

Lane 4, No Induction

Lane 5, Induction with 1.0 mM IPTG for 3 hour

Lane 6, Induction with 1.0 mM IPTG for 5 hour

라. 상어 TIMP-3 및 MT3-MMP 포유발현 벡터의 transfection

두릅상어 TIMP-3 포유발현 벡터를 lipofection 방법으로 HT1080 세포에 stable transfection시킨 후 total RNA를 추출하였다. 상어의 TIMP-3 발현을 Northern blot analysis 및 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과 상어 TIMP-3 transfectant에서만 특이적으로 다량 발현되고 있음을 확인하였다 (Fig. 24). 상어의 MT3-MMP 발현벡터는 calcium-phosphate 방법을 이용하여 전이와 침윤성이 거의 없는 NIH3T3 세포에 transient transfection시킨 후, total RNA를 추출하여 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, 역시 MT3-MMP transfectant에서만 다량 발현됨을 확인하였다 (Fig. 25).

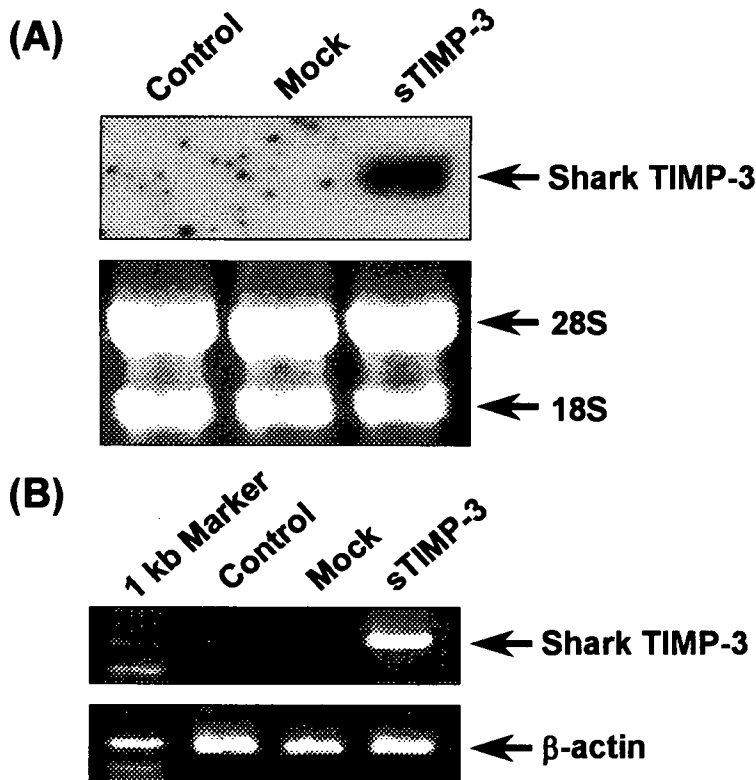


Fig. 24. Expression of shark's TIMP-3 in the HT1080 human fibrosarcoma cells transfected with sTIMP-3 expression vectors. (A) Northern blot analysis was performed using sTIMP-3 cDNA probe. **(B)** RT-PCR analysis was performed using total RNA ($5\mu\text{g}$) and amplified using gene-specific primers. In control amplification, human β -actin primers were used. Control, untransfected HT1080; Mock, transfected with empty vector; sTIMP-3, shark TIMP-3 expression vector transfected HT1080 cells.

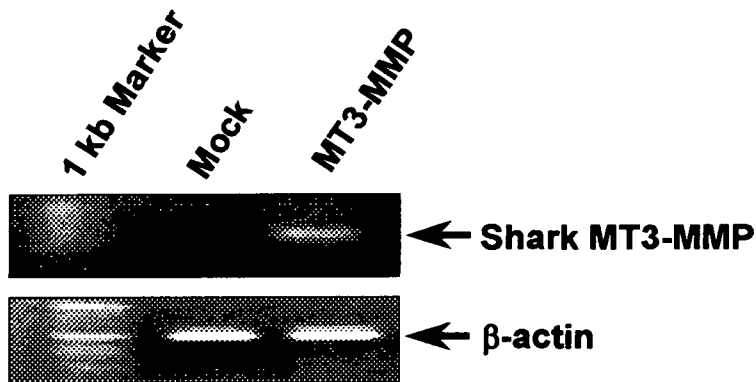


Fig. 25. Expression of shark's MT3-MMP in the expression vector transfected NIH3T3 cells. PCR product of 350bp amplified using gene-specific primers. In control amplification, human β -actin primers were used. Marker is 1kb size makers

3. 악성 암세포의 증식 및 전이억제 작용조사

가. Gelatin-based zymography를 통한 상어 TIMP-3 및 MT3-MMP의 MMP-2 단백질 활성 변화 조사

암의 전이와 침윤에 중요한 기능을 하는 MMP-2의 단백질 수준에서 상어의 TIMP-3와 MT3-MMP에 의한 활성화 정도를 확인하기 위해 gelatin-based zymography를 수행하였다. 먼저 상어의 TIMP-3가 미치는 MMP-2 활성 변화를 관찰하기 위해 HT1080 세포와 empty vector를 transfection 시킨 mock transfected HT1080 (Mock), TIMP-3 transfected HT1080 (sTIMP-3) 세포의 동량 concentrated conditioned media (CCM)의 MMP-2 활성도를 확인한 결과 상어 TIMP-3 transfectant에서 active MMP-2의 양이 현저히 감소함을 확인하였다 (Fig. 26). 또한 MT3-MMP transfected NIH3T3 세포와 mock transfectant의 conditioned media에서의 MMP-2 활성도 조사해 본 결과 MT3-MMP transfectant에서 active MMP-2가 다량 증가됨을 확인하였다 (Fig. 26).

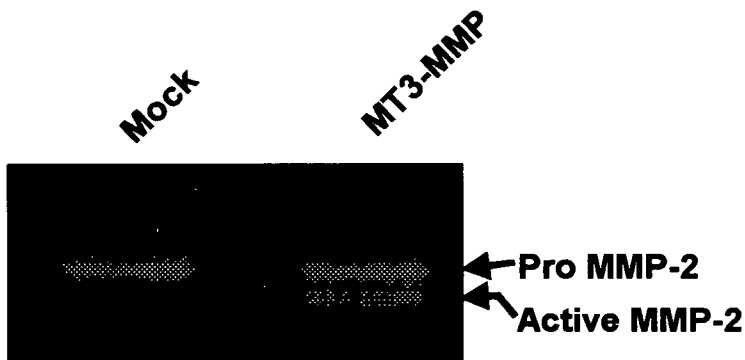
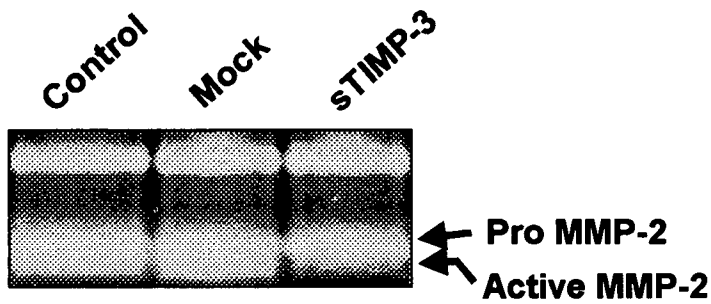


Fig. 26. Effects of shark's TIMP-3 on inhibition proMMP-2 activation in HT1080 cells and shark's MT3-MMP on activation of proMMP-2 in NIH 3T3 cells. The culture media were harvested and concentrated. And then, conditioned media were subjected to gelatin-based electrophoresis and the gel was stained with Coomassie brilliant blue. Arrows indicate 72 kDa type IV collagenase (proMMP-2), and 62 kDa activated form of 72 kDa type IV collagenase (active MMP-2), respectively.

나. 상어 TIMP-3에 의한 혈관내피세포의 증식 조사

상어 TIMP-3의 혈관내피세포 증식에 대한 영향을 조사하기 위해 HT1080과 mock, 상어 TIMP-3 transfectant의 conditioned media를 농축한 다음, 혈관내피세포인 HUVEC에 동량 처리하여 그 증식정도를 조사하였다. Fig. 27에서 보는 바와 같이 상어 TIMP-3는 혈관세포의 증식에 영향이 미치지 않는 것으로 판단된다

다. *In vitro* invasion assay

상어 TIMP-3의 침윤 억제능을 조사하기 위해 HT1080과 mock, 상어 TIMP-3 transfectant의 conditioned media를 농축한 다음, 혈관내피세포인 HUVEC에 동량 처리하여 *in vitro* invasion assay를 실시하였다. 18시간 후 관찰한 결과, 상어 TIMP-3 transfectant의 CCM를 처리한 HUVEC 세포에서 invasion이 매우 감소함을 확인하였다 (Fig. 28). 또한 상어 MT3-MMP의 침윤촉진능을 확인하기 위해 invasion 능력이 약한 NIH3T3세포에 transient transfection 시킨 후, *in vitro* invasion assay를 실시한 결과 상어 MT3-MMP transfectant가 현저히 높은 침윤 능력을 가지고 있음을 관찰하였다 (Fig. 29).

라. Wounding migration assay

상어의 TIMP-3에 의해 혈관 주위의 ECM을 분해하여 세포의 이동에 관여하는 효소들의 활성을 저해하는가를 조사하기 위해 HUVEC 세포를 이용한 wounding migration assay를 실시하였다. TIMP-3 transfectant의 CCM을 처리한 HUVEC 세포에서의 cell migration이 감소함을 확인하였다 (Fig. 30).

마. *In vitro* angiogenesis assay

HUVEC 세포를 대상으로 matri gel 상에서 *in vitro* angiogenesis assay를 실시한 결과, TIMP-3 transfectant의 CCM을 처리한 HUVEC 세포에서의 tubule 형태의 혈관이 HT1080과 mock transfectant의 CCM을 처리한 HUVEC에서보다 빠르게 파괴되어 가는 것을 관찰하였다 (Fig. 31).

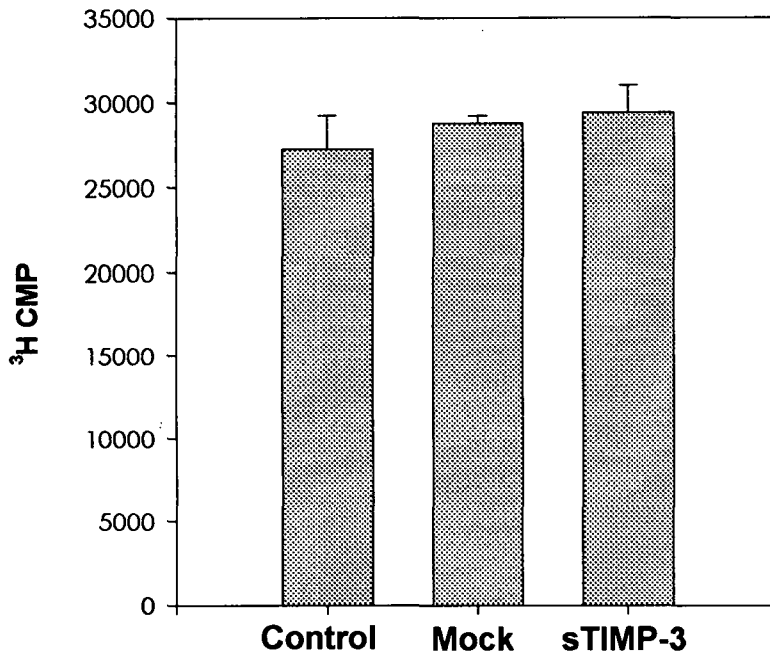
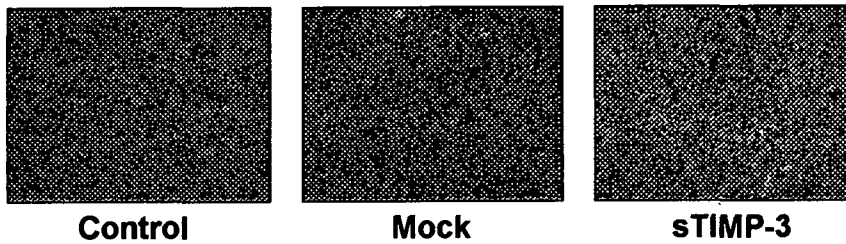


Fig. 27. Effects of CM from shark's TIMP-3 transfected HT1080 on the proliferation of BAECs. Following the dispensation and stabilizing incubation of 1×10^5 cells per well, 1mCi of methyl tritiated thymidine and each CM was added.

(A)



(B)

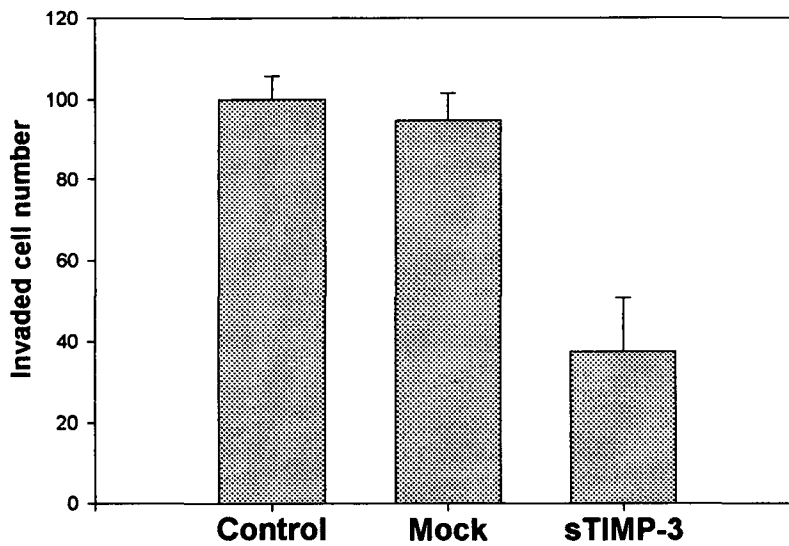


Fig. 28 . Effects of CCM from shark's TIMP-3 transfected HT1080 on the invasion of HUVECs. (A) Light microscopic examination of the HUVECs treated with CCM ($\times 400$). (B) The number of invaded cells was counted and mean values were determined under light microscopy ($\times 400$).

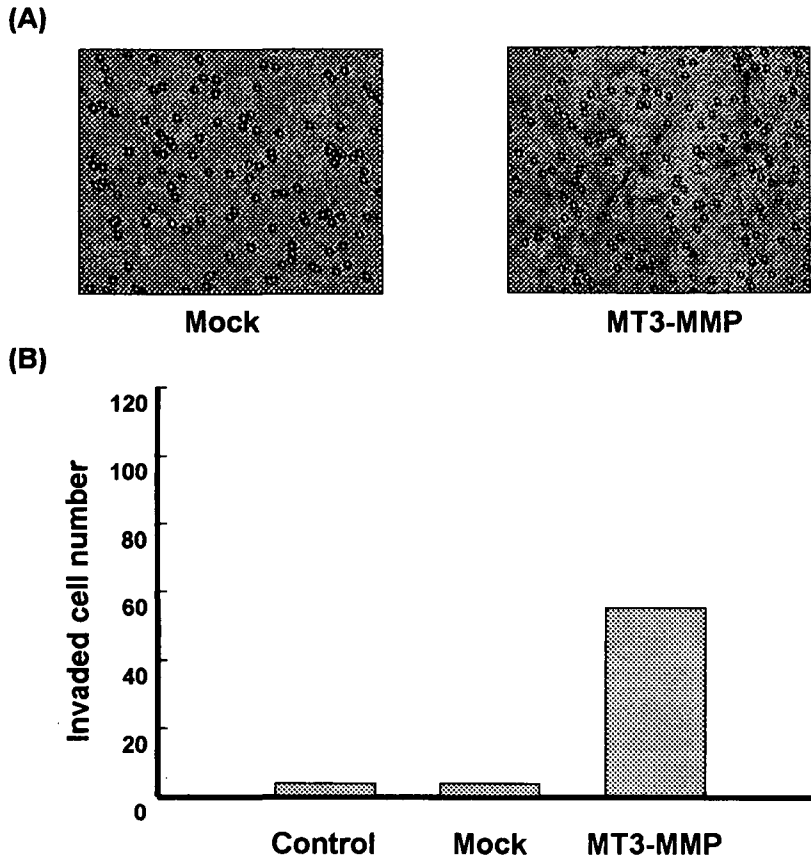
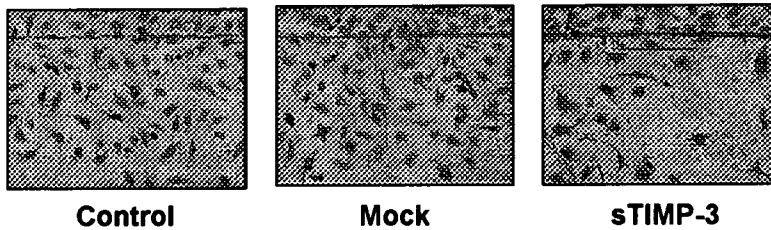


Fig. 29. Effects of shark's MT3-MMP on the invasion in NIH 3T3 cells, non-invasive cells. (A) Light microscopic examination of the transfected NIH 3T3 cells ($\times 400$). (B) The number of invaded cells was counted and mean values were determined under light microscopy ($\times 400$).

(A)



(B)

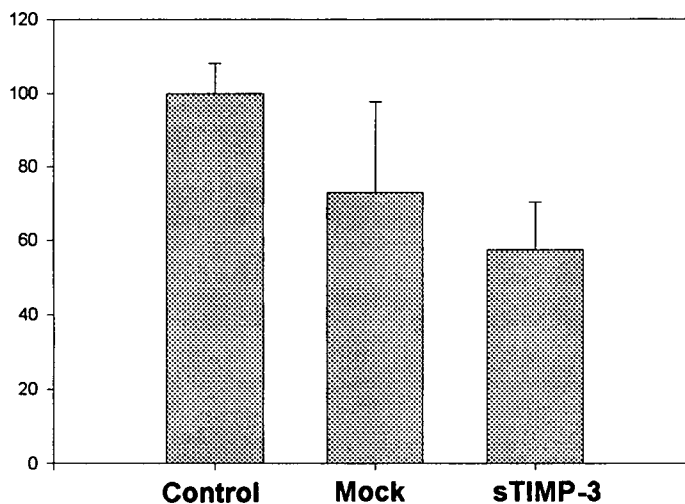
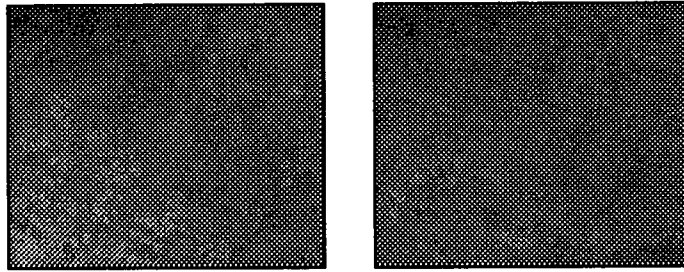
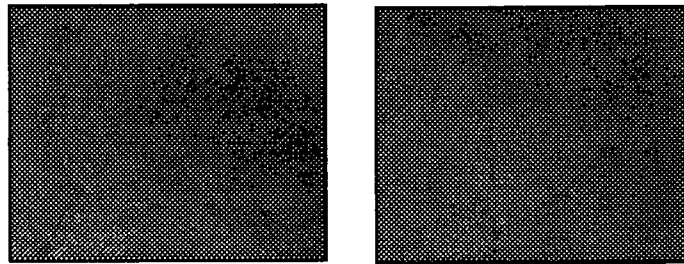


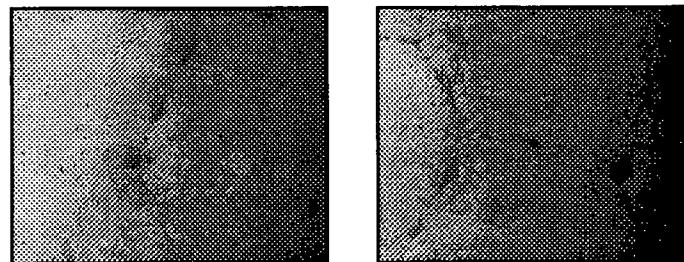
Fig. 30. Effects of CCM from shark's TIMP-3 transfected HT1080 on the migration of HUVECs. At the 90% confluency, the monolayers were wounded with a razor blade. Wounded cells were rinsed with serum free medium and then incubated with same amount of each CCM for 24h. The number of HUVECs that moved beyond the reference line was counted. (A) Light microscopic examination of the transfected HT1080 cells ($\times 400$). (B) The number of migrated cells was counted and mean values were determined under light microscopy ($\times 400$).



Control



Mock



sTIMP-3

Fig. 31. Effects of CCM from shark's TIMP-3 ransfected HT1080 on the tube formation of HUVECs on Matrigel. HUVECs were plated on Matrigel and cultured with M199 containing 5% FBS and same amount of each CCM. The formation of tubular structure was detected by phase-contrast microscopy.

바. *In vivo* assay

1) Chorioallantoic membrane (CAM) assay

가) TIMP-3 transfectant의 CCM을 이용한 CAM assay

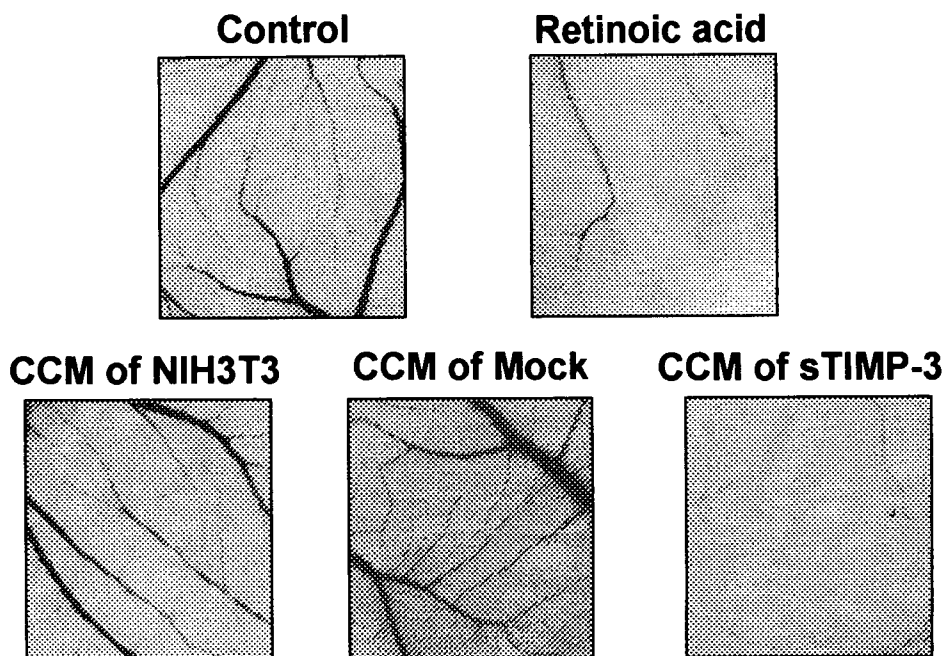
상어 TIMP-3의 혈관생성 억제기능을 *in vivo*에서 조사하기 위하여 계배에서 CAM assay를 실시하였다. 음성 대조군으로 coverslip만을 CAM에 부착시키고 혈관신생 억제효과가 있다고 이미 알려진 Retinoic acid 1 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 를 양성 대조군으로 처리한 후, 각각의 CCM을 30 μg 처리하여 비교 관찰하였다. Fig. 32 에서 보는 바와 같이 상어 TIMP-3의 CCM을 처리한 CAM에서 다른 CCM을 처리한 CAM보다 25%의 혈관생성 억제효과가 나타남을 확인하였다.

나) Recombinant shark TIMP-3 fusion protein을 이용한 CAM assay

혈관생성 억제작용을 조사하기 위해 CAM assay에 필요한 recombinant shark TIMP-3 GST fusion protein과 GST protein을 각기 정량하여 CAM에 처리하였다. 소량의 상어 TIMP-3 GST fusion protein을 처리하였을 시, 혈관생성에 큰 영향을 나타내지 아니하였으나, 50 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 로 처리시 100% 혈관생성 억제효과를 관찰하였다 (Fig. 33).

2) Human Alu sequence PCR-based CAM assay을 이용한 상어 TIMP-3의 항전이, 항침윤 작용의 조사

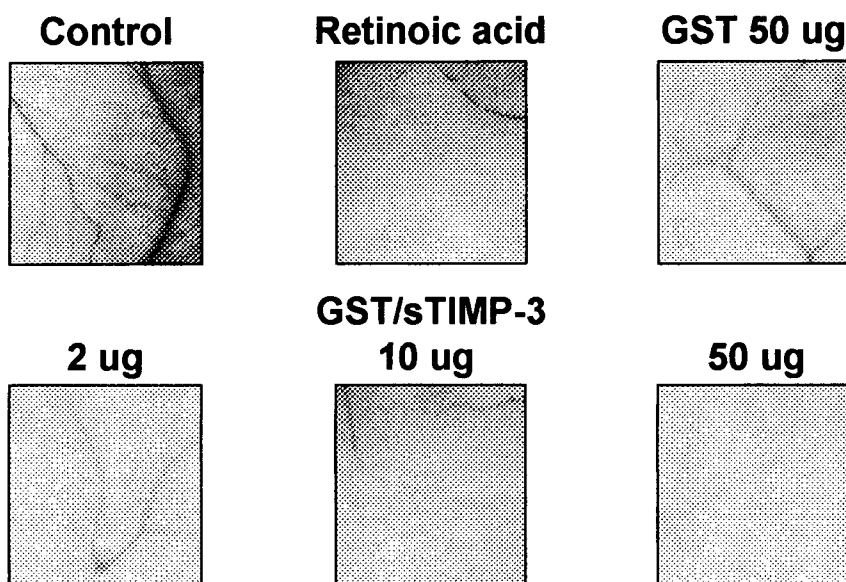
1×10^6 개의 동일한 숫자의 HT1080, empty vector transfectant HT1080, 상어 TIMP-3 transfectant HT1080 세포를 처리한 CAM에서 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 각각의 DNA를 정량하여 동량의 DNA를 주형으로 인간 Alu sequence PCR을 수행하였다. Fig. 34에서 나타난 바와 같이 상어 TIMP-3 transfectant HT1080을 처리한 CAM에서 가장 약한 band intensity를 나타내었다. 즉 상어 TIMP-3 transfectant HT1080의 전이 및 침윤 활성이 가장 낮은 것으로 판단되며, 이는 상어 TIMP-3가 항전이, 항침윤의 효과가 있음을 시사한다.



Anti-angiogenic activity of CCM from transfectant

Compounds	Dose ($\mu\text{g}/\text{egg}$)	Total No. tested in CAM assay	% positive
Control		4	25
RA	1	4	75
NIH CCM	30	12	25
Mock CCM	30	12	25
sTIMP-3 CCM	30	10	50

Fig. 32. Anti-angiogenic effect of CCM from shark's TIMP-3 transfected NIH3T3 on CAM inhibition assay. Fat emulsion (10%) was injected into chorioallantois to make the vascular network clear. Control CAMs were used to be treated with blank coverslips. Positive responses were seen in the CAMs implanted with coverslips loaded with R.A (1 $\mu\text{g}/\text{egg}$).



Anti-angiogenic activity of recombinant shark's TIMP-3 fusion protein

Compounds	Dose (µg/egg)	Total No. tested in CAM assay	% positive
Control		19	26
RA	1	9	100
GST protein	50	10	40
GST fused shark TIMP-3	2	14	36
	10	10	50
	50	5	100

Fig. 33. Anti-angiogenic effect of recombinant shark's TIMP-3 fusion protein on CAM inhibition assay. Fat emulsion (10%) was injected into chorioallantois to make the vascular network clear. Control CAMs were used to be treated with blank coverslips.

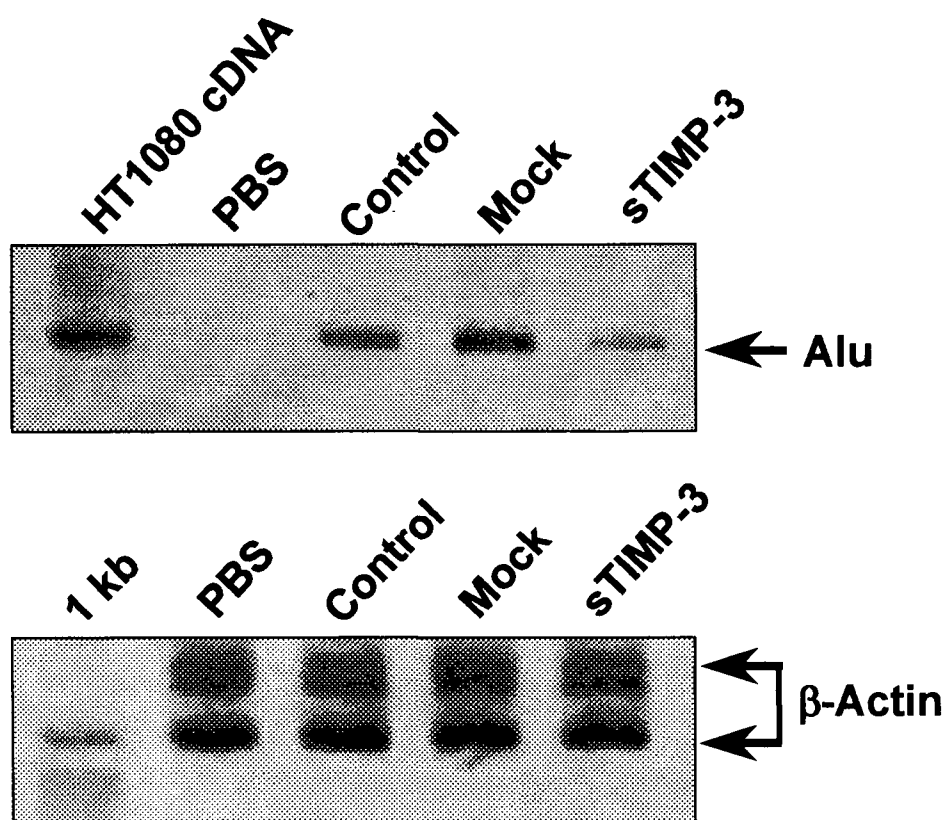


Fig. 34. Inhibition effects of invasiveness and metastasis by shark TIMP-3 overexpression. Control, Mock and sTIMP-3 transfected HT1080 cells were inoculated on CAMs at 5×10^6 cells per CAM. After 3 days, genomic DNA was isolated from lower CAMs and then used as template of PCR amplification. Human β -actin primers were used as control.

제 4 절 고 찰

먼저, 본 연구팀에서 동정한 상어 TIMP-3와 상어 MT3-MMP 유전자가 암의 전이와 침윤에 중요한 기능을 하는 MMP-2의 단백질 수준에서 활성화 정도를 확인한 결과, TIMP-3의 경우 active MMP-2의 양이 현저히 감소하였고, MT3-MMP의 경우는 active MMP-2가 증가됨을 확인하였다.

또한 상어 TIMP-3의 혈관 생성 억제능을 *in vitro* 수준에서 *in vitro* invasion assay, *in vitro* angiogenesis assay, wounding migration assay 등의 여러 실험을 수행하여 혈관생성 억제능을 확인하였으며, *in vivo* 수준에서 CAM assay와 새로이 구축한 실험 방법인 human Alu sequence PCR-based CAM assay를 이용하여 상어 TIMP-3의 혈관생성 억제 및 항전이, 항침윤작용을 확인하였다. 덧붙여 상어 MT3-MMP의 침윤촉진능을 확인하기 위해 *in vitro* invasion assay를 실시하여 현저히 높은 침윤 능력이 있음을 밝혀내었다.

위에서 언급한 바를 요약하면, 상어 TIMP-3의 경우 혈관생성 억제에, MT3-MMP의 경우 혈관생성 촉진에 관여함을 밝혀내었다. 따라서 상어 TIMP-3는 혈관생성억제에 의해 혈관신생을 저해하여 암세포의 증식과 전이를 차단하는 혈관생성억제 치료법 (anti-angiogenic therapy)의 차세대 암치료수단으로 사용되어 질 수 있다. 또한 상어 MT3-MMP는 근래에 새롭게 대두되고 있는 혈관신생촉진인자를 주입하여 동맥의 측부 혈관신생을 유발시키는 신혈관 조성치료법 (angiogenic therapy)의 일환으로 적용할 수 있을 것이다.

제 5 장 참고문헌

Anand-Apte, B., Bao, L., Smith, R., Iwata, K., Olsen, B.R., Zetter, B., Apte, S.S. (1996) A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem. Cell. Biol.* 74(6), 853-862.

Anand-Apte, B., Pepper, M.S., Voest, E., Montesano, R., Olsen, B., Murphy, G., Apte, S.S., Zetter, B. (1997) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38(5), 817-823.

Ausprunk, D.H., Knighton D.R. and Folkman, J. (1974) Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois. A structural and autoradiographic study. *Dev. Biol.* 38, 237-248.

Baker, A.H., Zaltsman, A.B., George, S.J., Newby, A.C. (1998) Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death *in vitro*. TIMP-3 promotes apoptosis. *J. Clin. Invest.* 101(6), 1478-1487.

Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., O'Reilly, M.S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature.* 390(6658), 404-407.

Brem, H., and Folkman, J. (1975) Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J. Exp. Med.* 141, 427-429.

Cawston, T. (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Molecular Medicine Today.* 130-137.

Davis, P.F., He, Y., Furneaux, R.H., Johnston, P.S., Ruger, B.M., and Slim, G.C. (1997) Inhibition of angiogenesis by oral ingestion of powdered shark cartilage in a rat model. *Microvasc. Res.* 54(2), 178-182.

Dupont, E., Savard, P.E., Jourdain, C., Juneau, C., Thibodeau, A., Ross, N., Marenus, K., Maes, D.H., Pelletier, G., Sauder, D.N. (1998) Antiangiogenic properties of a

novel shark cartilage extract: potential role in the treatment of psoriasis. *J. Cutan. Med. Surg.* 2(3), 146-152.

Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer. Inst.* 82(1), 4-6.

Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27-31.

Gomis-Ruth, F.X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H., and Bode, W. (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 389(6646), 77-81.

Hanahan, D., Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86(3), 353-364.

Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., Ossowski, L. (1998) Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay. *Cell.* 94, 353-362.

Kuiper, R.A., Schellens, J.H., Blijham, G.H., Beijnen, J.H., Voest, E.E. (1998) Clinical research on antiangiogenic therapy. *Pharmacol. Res.* 37(1), 1-16.

Lee, A., and Langer, R. (1983) Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science.* 221(4616), 1185-1187.

Moses, M.A., and Langer, R. (1991) Inhibitors of angiogenesis. *Biotechnology.* 9(7), 630-634.

Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R. (1990) Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science.* 248, 1408-1410.

Moses, M.A., Sudhalter, J., Langer, R. (1992) Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *J. Cell. Biol.* 119(2), 475-482.

Negro, A., Onisto, M., Grassato, L., Caenazzo, C., Garbisa, S. (1997) Recombinant human TIMP-3 from *Escherichia coli*: synthesis, refolding, physico-chemical and functional insights. *Protein Eng.* 10(5), 593-599.

Oikawa, T., Ashino-Fuse, H., Shimamura, M., Koide, U., and Iwaguchi, T. (1990) A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis. *Cancer Lett.* 51(3), 181-186.

Pei, D. (1999) Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J. Biol. Chem.* 274, 8925-8932.

Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K., Hayakawa, T. (1990) Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171(3), 1264-1271.

Woessner, J.F.J. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5, 2145-2154.

Yang, M., and Kurkinen, M. (1998) Cloning and developmental regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in *Xenopus laevis* early embryos. *Gene.* 211(1), 95-100.