

척추동물 발생 및 분화 조절 신기능성 유전자의 체계적
발굴과 zebrafish model system을 이용한 유전자 기능 분석

Systematic Isolation and Characterization of the
Developmental Control Genes and their Functional
Analysis in Zebrafish Model

경북대학교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “척추동물 발생 및 분화 조절 신기능성 유전자의 체계적 발굴과 zebrafish model system을 이용한 유전자 기능 분석에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

1999. 10. 20

주관연구기관명 : 경북대학교

주관연구책임자 : 허 태 린

연 구 조 원 : 박 해 철

연 구 조 원 : 여 상 엽

연 구 조 원 : 김 용 우

연 구 조 원 : 홍 성 국

연 구 조 원 : 김 석 형

요 약 문

I. 제 목

척추동물 발생 및 분화 조절 신기능성 유전자의 체계적 발굴과 Zebrafish model system을 이용한 유전자 기능 분석

II. 연구개발의 필요성 및 목적

1. 연구개발의 필요성

척추동물의 발생과정 중 gastrulation과 segmentation기간은 각종 조직과 장기, 신경계 및 두뇌생성을 포함한 central nerve system, 그리고 척추와 근육 등의 주요 발생, 분화가 이루어지는 기간이다. 그러므로 새로운 발생 분화 조절 유전자들의 분리과 기능분석은 학문적 연구가치와 실제 응용성 면에서 모두 매우 유용하여 현재 세계적인 큰 연구관심 분야로 대두되고 있다.

현재까지의 발생, 분화 관련 유전자 분리 및 기능 분석에 대한 연구는 주로 초파리를 model로 한 연구가 주를 이루고 있다. 그러나 초파리는 무척추 동물로서 인체를 포함한 고등척추 동물과는 세부적 발생, 분화 기작이 상이한 점이 많다.

한편 척추동물의 발생, 분화에 대한 새로운 유전자의 분리 및 규명에 대한 연구는 최근까지도 사용동물 model이 생쥐 등으로 한정되어 있어서 장기간의 연구기간이 소요되고 있고 더구나 발생과정중의 embryo를 직접 관찰하기가 거의 불가능한 점등의 척추동물의 발생관련 연구 model과 연구방법의 한계성에 의해 현재까지도 이에 대한 연구가 세계적으로도 초기단계이다.

이런 점을 볼 때 아직도 분리 또는 규명되지 않은 인체 등의 orphan 유전자들의 상당부분이 발생 및 분화조절 관련 유전자들 일 것으로 추정된다.

이에 따라 본 연구에서는 genetic analysis와 transgenic analysis가 동시에 가능하여 척추동물의 초파리 model로서 최근 각광을 받고있는 하등 척추동물인 zebrafish를 animal model로 하여 발생과정에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 대량으로 찾고 그 기능 연구를 시도하고자 한다. 본 연구팀이 zebrafish를 대상으로 하여 유전자들을 찾고자하는 이유는, zebrafish는 최근 세계적으로도 발생 기작의 연구와 유전자 기능연구에 탁월한 장점을 갖는 animal model로 이미 인정을 받고 있으며, 특히, 새로운 유전자의 기능은 mRNA transcript들을 수정란에 집어넣어 이들이 embryo의 발생기간 중 미치는 영향을 직접 육안으로 볼 수 있고 또한 in situ hybridization을 통해 유전자 발현이 미치는 다른 유전자들의 down regulation도 투명한 embryo를 통해 조사할 수 있다. 따라서 한 번에 수백개의 수

정란을 이용하여 대량으로 유전자의 신기능을 단기간 내에 연구하는데 zebrafish가 훌륭한 model로 이용될 수 있다.

본 연구 개발의 목적은 위와 같은 장점을 갖는 zebrafish를 model로 하여 발생 및 분화 조절 특이성을 갖는 새로운 유전자의 체계적 발굴과 이들 유전자의 기능 연구, 분석체계의 구축이다. 이에 따라 1단계의 3년 기간 동안 zebrafish의 발생기간별 특이 발현성을 갖는 유전자들을 체계적으로 발굴하고 분석하여 발생, 분화 특이 유전자를 찾고 이들의 인체 homologue를 분리하며, 향후 Postgenome Era에 필수적으로 요구될 유전자 기능을 생체 내에서 효율적으로 분석할 수 있는 기술 확보를 이룩하고자 한다.

인체를 포함한 고등동물의 발생 분화조절 유전자들을 직접 해당 고등동물에서 분리하는 것은 연구방법상 거의 불가능하며 혹시 분리되더라도 생쥐나 인체 등에서 직접 그 기능을 밝히는 것은 불가능하다. 그러나 하등동물에서는 발생, 분화단계별 시료채취가 비교적 용이하여 발생 분화조절 유전자들을 대량으로 분리할 수 있는 가능성이 높으며 이들 발생, 분화 관련유전자들은 특히 인체를 포함한 고등 포유류의 유전자와 매우 높은 상동성을 갖고 있다. 발생, 분화 관련유전자들은embryo의 발생 및 세포의 분화조절에 중요한 작용을 하는 것이 일반적으로 알려져 왔으나 이외에도 인체의 각종 질병유발 유전자들로 작용하고 있다는 것이 최근 1-2년 사이에 입증되고 있다. 이런 사실은 인체의 질병관련 변이 유전자를 신규로 확인해 낸 후 그 유전자의 기능을 모르는 상태에서 database 검색시 이들 질병 유발 인체 유전자들이 하등동물의 밝혀진 발생조절 유전자와 높은 상동성을 보여 이를 통한 유전자 변이가 일으키는 인체 질병 유발 기작을 이해할 수 있는 실마리를 제공하기 때문이다. 따라서 발생 및 분화 조절 관련 유전자들은 하등동물을 model로 하여 유전자의 분리과 기능을 확인한 후 인체 등의 homologue를 분리해 유전자 산물을 직접 산업화 하거나 혹은 이들의 인체 염색체 유전자의 위치를 규명해 나감으로서 인체질병 관련 기작을 규명하여 변이가 일어난 비정상적인 유전자 산물을 밝혀 치료제 개발의 대상으로 삼는 연구전략이 필요할 것으로 생각된다.

- 인체 oncogene인 *wnt-1* 유전자는 초파리의 날개 세포 증식과 형성에 관여하는 *wingless* 유전자의 인체 homologue임이 밝혀짐
- 초파리의 *wingless* 유전자를 억제하는 유전자로 분리된 *patched* 유전자의 인체 homologue는 가장 일반적인 피부암의 일종인 Basal Cell Nevus Syndrome의 원인 유전자로 밝혀져 *patched* 유전자는 developmental gene중 최초로 tumor suppressor gene의 작용을 하는 유전자로서 밝혀짐(Hann, H. Cell, 86, 841-851, 1996)
- 신경분화에서 lateral inhibition을 일으켜 cell fate의 결정을 하는 *notch* 유전자는 초파리에서는 1종이나 고등동물에서는 5종으로 존재한다. 인체에서 stroke나 dementia를 유도하는 치명적인 유전병인 CADASIL 질병유발 유전자의 분리결과 그 유전자 *notch-3* 유전자의 homologue이며 유전자 변이가 발생해 있음을 확인하여 이들 *notch* 유전자는 신경발생뿐 아니라 변이시 비 콜레스테롤성 동맥경화를 유발하는 질병을 유발함이 밝혀짐(Joutel, A. 등, Nature, 383, 707-710, 1996)
- Alzheimer's disease를 유발하는 presenilin 유전자는 *C. elegans*의 *notch* 유전자인 *lin-12*의 suppressor인 *sel-12* 유전자의 homologue임이 밝혀짐(Levitan, D. and Greenwald, I., 1995; Duff, K. 등, Nature, 383, 110-113, 1996)

2. 연구개발의 목적

본 연구개발은 현재까지 세계적으로 시도된바 없는 척추동물 발생 특이적 유전자들을 대량 분리, 확인하고 생체기능 확인 방법을 확립함으로써 현재까지 밝혀져 있지않은 유용 생리활성 물질 생산 유전자들의 확보를 목표로 하고 있다.

이에따른 구체적인 연구개발의 최종 목표는 아래와 같다.

- ◎ 발생특이 유전자 단편들을 분리하기 위한 Ordered Differential Display PCR(ODD PCR) 방법의 확립 및 이를 이용하여 발생단계별 총 300개 이상의 발생특이 유전자 단편의 분리.
- ◎ mRNA microinjection과 whole mount *in situ* hybridization 및 double-strand RNA injection을 이용한 유전자 기능확인 방법 확립.
- ◎ 약 10개의 발생특이 신규 Full-length cDNA들의 분리와 이들의 기능분석.
- ◎ 상기의 연구목표를 통한 발생특이 신기능성 유전자군의 대량확보.
- ◎ 신경세포의 발생 및 분화에 관련된 신경특이적 유전자들의 기능확인을 위한 신경계 특이적 형광을 나타내는 transgenic zebrafish의 제조 및 분석.

III. 연구개발의 내용 및 범위

척추동물의 발생과정중 gastrulation과 segmentation기간은 각종 조직과 장기, 신경계 및 두뇌생성을 포함한 central nerve system, 그리고 척추와 근육 등의 주요 발생, 분화가 이루어지는 기간이다. 그러므로 새로운 발생 분화 조절 유전자들의 분리와 기능분석은 학문적 연구가치와 실제 응용성 면에서 모두 매우 유용하여 현재 세계적인 큰 연구관심 분야로 대두되고 있다. 현재까지의 발생, 분화 관련 유전자 분리 및 기능 분석에 대한 연구는 연구의 어려움으로 인하여 주로 초파리를 model로 한 연구가 주를 이루고 있다. 그러나 초파리는 무척추 동물로서 인체를 포함한 고등척추 동물과는 세부적 발생, 분화 기작이 상이한 점이 많다.

한편 척추동물의 발생, 분화에 대한 새로운 유전자의 분리 및 규명에 대한 연구는 최근까지도 사용동물 model이 생쥐 등으로 한정되어 있어서 장기간의 연구기간이 소용되고 있고 더구나 발생과정중의 embryo를 직접관찰하기가 거의 불가능한 점등의 척추동물의 발생관련 연구 model과 연구방법의 한계성에 의해 현재까지도 이에 대한 연구가 세계적으로도 초기단계이다. 이런 점을 볼 때 아직도 분리 또는 규명되지 않은 인체 등의 orphan 유전자들의 상당부분이 발생 및 분화조절 관련 유전자들일 것으로 추정된다.

이에 따라 본 연구에서는 genetic analysis와 transgenic analysis가 동시에 가능하여 척추동물의 초파리 model로서 최근 각광을 받고있는 하등 척추동물인 zebrafish를 animal model로 하여 발생과정에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 대량으로 찾고 그 기능 연구를 시도하고자 한다. 본 연구팀이 zebrafish를 대상으로 하여 유전자들을 찾고자하는 이유는, zebrafish는 최근 세계적으로도 발생기작의 연구와 유전자 기능연구에 탁월한 장점을 갖는 animal model로 이미 인정을 받고 있으며 특히 새로운 유전자의 기능은 mRNA transcript들을 수정란에 집어넣어 이들이 embryo의 발생기간중 미치는 영향을 직접 육안으로 볼 수 있고 또한 in situ hybridization을 통해 유전자 발현이 미치는 다른 유전자들의 down regulation도 투명한 embryo를 통해 조사할 수 있다. 따라서 한 번에 수백개의 수정란을 이용하여 대량으로 유전자의 신기능을 단기간내에 연구하는데 zebrafish가 훌륭한 model로 이용될 수 있다

본 연구 개발의 목표는 위와 같은 장점을 갖는 zebrafish를 model로 하여 발생 및 분화 조절 특이성을 갖는 새로운 유전자들의 체계적 발굴과 이들 유전자들의 기능 연구 및 분석체계를 구축하는 것이다. 이에 따라 1단계의 3년 기간동안 zebrafish의 발생기간별 특이 발현성을 갖는 유전자들을 체계적으로 발굴하고 분석하여 발생, 분화 특이 유전자를 찾고 이들의 인체 homologue를 분리하며, 향후 Postgenome Era에 필수적으로 요구될 유전자 기능을 생체내에서 효율적으로 분석 가능한 기술 확보를 이룩하고자 한다.

이런 연구 목표의 달성을 위한 최대의 관문은 얼마나 많은 유전자들을 단시간

내에 분리하고 발생단계별로 분류할 수 있는지 이다. 이에 따라 본 연구팀에서는 발생 분화과정 유용 유전자들을 효과적으로 분리하는 방법으로서 소련의 Sergei Lukyanov에 의해 개인적으로 발표된 이론을 이용하여 본 실험실에서 독자적으로 Ordered Differential Display PCR (ODD-PCR) 방법을 확립하였다.

ODD-PCR 방법은 현재까지 Liang과 Pardee에 의해 개발되어 일반적으로 널리 사용되고있는 Differential Display Polymerase Chain Reaction(DD-PCR) 방법과는 달리 매우 높은 정확도를 갖고 있어 발현성이 차이가 나는 유전자나 message가 낮은 유전자들도 효율적으로 확인할 수 있는 방법이다. 즉 기존의 DD-PCR 방법은 arbitrary 10mer의 PCR primer를 사용함으로써 PCR-error에 의한 70 %이상의 false positive band가 나타나는 것이 단점으로 지적되어 왔다. 이에 비하여 ODD-PCR 방법은 adaptor를 이용한 suppression PCR 기술과 일반적인 Differential Display PCR 기술을 동시에 이용함으로써 첫째, 동일 시료에 대한 PCR의 재연성을 높이고, 둘째, false positive band의 형성을 완전히 제거할 수 있어서 발현성이 차이가 나는 유전자들만 분리할 수 있으며, 셋째, 낮은 빈도로 발현되는 유전자들도 체계적으로 탐색할 수 있는 방법이다.

이에 따라 본 연구팀에서는 zebrafish의 각 발생단계별로 mRNA를 분리한 후 ODD-PCR을 수행하여 각 발생단계별로 특이적으로 발현되는 유전자들에 대한 3'-UTR 단편을 분리하고 이들에 대한 분석을 2년 안에 모두 마친 후, 이들을 대상으로 antisense RNA probe를 이용한 whole mount in situ hybridization을 수행하여 이들의 발생에서의 시간적, 공간적 발현양상을 확인함으로써 발생에서의 유용 유전자들을 선별한 후 이들 유용 유전자들에 대해 full-length cDNA의 분리와 염기서열분석 그리고 zebrafish embryo에서의 DNA 및 RNA injection system을 이용한 유전자 기능확인을 수행하고자 한다.

이러한 연구목표를 달성하기 위하여 수행된 연구의 내용은 다음과 같다.

1. 1차년도 연구내용

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1996)	◎ Model animal 유지 및 번식	<ul style="list-style-type: none"> - Animal model 재배 장치의 조직적인 설계 및 제조 - Animal model 의 유지 번식 및 산란의 확대
	◎ 유전자 생체 기능분석 system의 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 수정란에 대한 DNA, mRNA microinjection system 구축 - 수정란에 대한 antisense RNA 를 이용한 whole mount <i>in situ</i> hybridization system 구축 - 수정란에 대한 doubl-strand RNA injection을 통한 유전자 발현 저해 system 구축
	◎ 유전자 생체기능분석 system의 검증 및 활용	<ul style="list-style-type: none"> - Human unknown 유전자 및 zebrafish의 발생특이 유전자들의 mRNA를 이용한 microinjection 및 whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통한 생체기능분석 system의 검증 및 활용
	◎ 총 10단계의 발생 단계별 Odered Differential Dsplay PCR에 의한 발생특이 유전자의 분리 및 whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통한 발현양상 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 총 10단계의 발생단계별 embryo에서 mRNA의 분리 - Double strand cDNA의 제조 - A tail fragment fool의 준비 - Subset의 증폭 및 전기영동 - Subcloning and sequencing - Whole mount <i>in situ</i> hybridization 을 통한 유용 유전자 발굴
	◎ Developmental stage별 cDNA library 제조 (총5종)	<ul style="list-style-type: none"> - 발생단계별 embryo의 수집과 mRNA분리 - Oligo dT primer 및 random primer를 이용한 발생 단계별 cDNA library 5종 제조

2. 2차년도 연구내용

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
2차년도 (1997)	<p>◎ 총 10 단계의 발생 단계별 Odered Differential Display PCR에 의한 발생 특이 유전자들의 대량분리 및 이들의 염기서열 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 총 20 종류의 primer set에 대한 ODD-PCR 수행 - 총 100개 이상의 발생특이 유전자 단편들의 분리 및 이들의 염기서열 분석
	<p>◎ ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자 단편들에 대하여 Whole mount <i>in situ</i> hybridization 에 의한 embryo내 유전자 발현 양상과 발현부위 조사를 통한 유용 유전자들의 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 antisense RNA probe의 대량제조 - 총 50개 이상의 Antisense RNA probe를 이용한 embryo의 whole-mount <i>in situ</i> hybridization 수행 - 발생 특이적인 유전자의 발생 단계별 발현 시기와 부위 및 발현 빈도 조사를 통한 유용 유전자들의 선별
	<p>◎ Whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통하여 선별된 발생특이 유용 유전자 단편들에 대한 full-size cDNA들의 분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통하여 선별된 총 5개 이상의 발생 특이적 유용 유전자들을 probe로 이용하여 full-size cDNA의 분리 - 분리된 full-size cDNA들의 염기서열 및 단백질 서열 분석과 database를 이용한 homology search
	<p>◎ Microinjection에 의한 유전자 기능 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 각종 sense 및 antisense mRNA transcript 제조 - Microinjection에 의한 embryo내 sense mRNA의 ectopic expression 및 antisense RNA의 target gene expression 의 저해 - Ectopic RNA injection에 따른 발생변이 유무 및 변이 상태에 따른 유전자 기능의 확인
<p>◎ 신경계 발생 및 분화 특이적 유전자들의 기능확인을 위한 신경계 특이적 형광 transgenic zebrafish의 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Zebrafish의 모든 신경계에서 발현하는 HuC 유전자의 promoter 분리 및 <i>in vivo</i>에서의 promoter 기능분석 	

3. 3차년도 연구내용

구 분	연구개발목표	연구개발내용및범위
3차년도 (1998)	<p>◎ 총 10 단계의 발생 단계별 Odered Differential Display PCR에 의한 발생 특이 유전자들의 대량분리 및 이들의 염기서열 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 총 20 종류의 primer set에 대한 ODD-PCR 수행 - 총 200개 이상의 발생특이 유전자 단편들의 분리 및 이들의 염기서열 분석
	<p>◎ ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자 단편들에 대하여 Whole mount <i>in situ</i> hybridization 에 의한 embryo내 유전자 발현 양상과 발현부위 조사를 통한 유용 유전자 들의 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 antisense RNA probe의 대량 제조 - 총 50개 이상의 Antisense RNA probe를 이용한 embryo의 whole mount <i>in situ</i> hybridization 수행 - 발생 특이적인 유전자의 발생 단계별 발현 시기와 부위 및 발현 빈도 조사를 통한 유용 유전자들의 선별
	<p>◎ Whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통하여 선별된 발생특이 유용 유전자 단편들에 대한 full-size cDNA들의 분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Whole mount <i>in situ</i> hybridization 을 통하여 선별된 총 5개 이상의 발생 특이적 유용 유전자들을 probe로 이용하여 full-size cDNA 의 분리 - 분리된 full-size cDNA들의 염기서열 및 단백질 서열 분석과 database를 이용한 homology search
	<p>◎ Microinjection에 의한 유전자 기능 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 각종 sense 및 antisense mRNA transcript 제조 - Microinjection에 의한 embryo내 sense mRNA의 ectopic expression 및 antisense RNA의 target gene expression 의 저해 - Ectopic RNA injection에 따른 발생변이 유무 및 변이 상태에 따른 유전자 기능의 확인
	<p>◎ 신경계 발생 및 분화 특이적 유전자들의 기능확인을 위한 신경계 특이적 형광 transgenic zebrafish의 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 전 신경계에서 특이적으로 발현하는 HuC promoter를 이용하여 전 신경계에서 형광을 나타내는 transgenic zebrafish의 제조 및 분석

IV. 연구개발결과

1. Zebrafish model system의 확립 및 생체기능분석 system의 확립

가. Zebrafish model system의 확립

(1) Zebrafish model의 사육을 위한 자동 수조 system의 설계 및 제조

Zebrafish의 사육을 위하여 총 18개의 수조를 제조하였으며 이들 수조의 물을 자동으로 정화하기 위하여 filtration system을 제조하였고, 또한 zebrafish의 사육에 적당한 물 온도를 유지하기 위한 온도조절 장치를 설치하였다.

(2) Zebrafish model의 유지, 번식 및 산란방법의 확립

Zebrafish는 여러 종류가 존재하며 이들 중 현재 전 세계적으로 가장 많이 사용하는 종인 *Danio rerio*의 치어를 일본 오사카대학 의과대학의 Naomasa Miki 교수로부터 제공받아 이들의 유지 번식 및 산란방법을 확립하여 사육한 결과 현재 암, 수 성어 120 마리와 치어 500 마리를 확보하여 실험에 이용하고 있다.

나. Zebrafish system을 이용한 유전자 생체기능분석 system의 확립 및 검증

(1) Developmental stage별 Ordered Differential Display PCR방법의 확립

ODD-PCR 방법은 현재까지 Liang과 Pardee에 의해 개발되어 일반적으로 널리 사용되고있는 Differential Display Polymerase Chain Reaction(DD-PCR) 방법과는 달리 매우 높은 정확도를 갖고 있어 발현성이 차이가 나는 유전자나 message가 낮은 유전자들도 효율적으로 확인할 수 있는 방법이다. 즉 기존의 DD-PCR 방법은 arbitrary 10mer의 PCR primer를 사용함으로써 PCR-error에 의한 70 %이상의 false positive band가 나타나는 것이 단점으로 지적되어 왔다. 이에 비하여 ODD-PCR 방법은 adaptor를 이용한 suppression PCR 기술과 일반적인 Differential Display PCR 기술을 동시에 이용함으로써 첫째, 동일 시료에 대한 PCR의 재연성을 높이고, 둘째, false positive band의 형성을 완전히 제거할 수 있어서 발현성이 차이가 나는 유전자들만 분리할 수 있으며, 셋째, 낮은 빈도로 발현되는 유전자들도 체계적으로 탐색할 수 있는 방법이다.

(2) Whole mount in situ hybridization을 이용한 유전자 기능분석 방법의 확립

Zebrafish embryo의 whole mount *in situ* hybridization은 Boehringer Mannheim사의 digoxigenin RNA labeling and detection kit를 사용하여 수행하였으며, digoxigenin-11-UTP가 포함된 4 종류의 nucleotide mixture를 이용한 *in vitro* transcription을 통하여 digoxigenin이 labeling된 target DNA의 antisense RNA를

합성하여 이를 probe로 사용하였다. 이러한 방법에 따라 zebrafish에서 분리한 neuron specific gene으로 알려진 HuC 유전자의 riboprobe를 제조하여 whole mount in situ hybridization을 수행한 결과 신경 조직에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다.

(3) Zebrafish embryo의 DNA 및 RNA injection system의 확립

Micromanipulater를 이용한 zebrafish embryo로의 DNA 및 RNA의 microinjection방법을 확립한 후 이 system을 검증하기 위하여 그 기능이 정확히 밝혀지지 않은 zebrafish의 notch-3 유전자의 mRNA를 two cell stage의 zebrafish embryo의 한쪽 cell에만 injection 한 결과 injection된 반쪽의 embryo에서는 somite가 형성되지 않는 결과를 얻었으며, 또한 zebrafish로부터 본 연구팀이 분리한 neuron-specific 유전자인 zHuC 유전자의 promoter에 reporter gene으로서 green fluorescence protein (GFP) 발현 유전자를 연결하여 DNA를 injection한 결과 reporter gene인 GFP 유전자가 zebrafish의 신경조직에서만 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다.

(4) Anti-sense RNA를 이용한 유전자의 기능분석

Anti-sense RNA를 injection하여 특정 유전자의 in vivo에서의 기능을 저해하는 system을 확립하기 위하여 in vitro transcription을 통한 anti-sense RNA를 제조하였다. embryo에 antisense RNA를 injection 함으로서 발생과정에서 특정 유전자의 발현을 저해하는 antisense RNA injection system을 확립하였으며, 이를 검증하기 위하여 ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자인 MG 54 clone을 injection한 결과 wildtype에서는 2개가 존재하는 귀의 otolith가 antisense RNA가 injection된 mutant에서는 하나의 monolith로 존재함을 확인함으로써 이러한 antisense RNA의 injection에 의한 유전자의 생체 내 기능분석 system이 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

Anti-sense RNA의 injection을 통한 발생특이 유전자들의 생체 내 기능을 재확인하기 위하여 이미 알려진 유전자인 심장의 발생에 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려진 *nkx-2.5* 유전자와 notochord의 형성에 중요한 transcription factor인 *ntl* 유전자의 antisense RNA를 이용하여 실험을 수행하였다.

(가) *nkx-2.5* 유전자의 anti-sense RNA injection

Zebrafish *nkx-2.5* 유전자는 Drosophila의 tinman 유전자와 유사성을 가지는 것으로 알려져 있으며 visceral과 cardiac mesoderm 형성에 필수적인 유전자로 알려져 있다. *nkx-2.5*에 대한 anti-sense RNA(100 pg)를 injection 하였을 때 injection된 embryo에서 발생된 심장은 atrium(심방)과 ventricle(심실)의 크기가 달라지고 precardiac vessle의 크기가 증가하며 심장의 전체적인 morphology가 기형으로 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 토대로 *nkx-2.5* 유전자

가 심장의 형성에 중요한 작용을 하는 유전자임을 알 수 있었다.

(나) *ntl* 유전자의 anti-sense RNA injection

또한 zerafish의 notochord가 현저히 없어져 body trunk의 발생이 완전히 이루어지지 않은 mutant인 no tail(*ntl*) 유전자로부터 anti-sense RNA를 만들어서 injection 하였을 때는 injection된 embryo에서는 정상적인 zebrafish의 notochord의 body trunk에 비해서 이 부위의 발생이 현저히 제한을 받음을 알 수 있었다 . 이를 통하여 *ntl* 유전자가 notochord의 형성에 중요함을 확인하였으며, 또한, anti-sense RNA의 injection에 의한 중요 유전자들의 생체 내 기능규명이 가능함을 알 수 있었다

(5) Double-strand RNA를 이용한 유전자 기능분석

최근 들어 특정 유전자에 대한 기능을 분석하기 위한 시도들이 다양하게 이루어지고 있으며, 그 대표적인 기능 분석 방법으로는 knockout mouse 제조에 의한 기능 분석이나 mutant 분석을 통한 유전자의 기능 분석이 주로 이루어지고 있다. 또한 특정 유전자의 anti-sense RNA의 주입이나 발현을 통한 lose of function을 관찰함으로써 그 유전자의 기능을 추정하는 방법이나 ectopic expression이 사용되기도 한다. 그리고 최근 보고에 의하면 double-strand RNA를 제조하여 생체 내에 주입하였을 시 anti-sense RNA의 주입으로 인한 효과와 비슷한 효과를 내는 것으로 알려지고 있어 이 방법이 새로운 기능 분석 방법으로 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서 분리된 *zSFRP5* 유전자를 이용하여 double-strand RNA injection 방법을 이용한 유전자 기능분석 system을 확립하였다.

zSFRP5 double-strand RNA injection에 의한 효과를 보면 우선 눈의 발달이 억제되는 현상이 나타나고 있다. 특히 약 70% 정도가 *cyclops* mutant와 비슷하게 나타났으며, 그 나머지도 눈의 size가 줄어드는 현상을 보임으로써 *zSFRP5* 유전자가 눈의 형성에 중요한 작용을 함을 추정할 수 있다. Wild type과 비교해보면 눈의 size가 줄어들었음이 확인되고 있으며, 또한 lens 역시 정상적으로 형성하지 못하였음을 확인 할 수 있다. 이러한 결과로 볼 때 double-strand RNA injection 방법이 zebrafish에서도 제대로 작동할 수 있을 것이라는 가능성을 제시하고 있다.

2. ODD PCR을 이용한 발생특이 유전자들의 분리 및 규명

각 발생단계별 embryo에서 분리된 RNA와 혈관생성이 저해된 mutant zebrafish에서 분리된 RNA를 대상으로 1차년도에 확립된 ODD PCR을 수행하여 발생기간 중에 유전자 발현변화를 보이는 발생특이 유전자 363개와 혈관생성에 관련된 혈관특이 유전자 31개 등 모두 394개의 발생특이 유전자들 및 혈관생성에 관련된 유전자들을 분리하여 이들의 염기서열을 분석하고 homology search를 수행하였다.

가. ODD PCR을 이용한 발생특이 유전자들의 분리 및 염기서열 분석

Zebrafish 수정란으로부터 초기 축 형성기간, gastrulation기간 그리고 신경 발생기간까지의 발생 시간대별인 일세포기에서 10시간까지의 발생기간을 중심으로 하여 일주일 된 치어 까지 총 15종류의 cDNA 에 대하여 Ordered Differential Display PCR을 수행하여 유전자 발현변화를 보이는 363종의 cDNA 단편들을 분리하고 이들의 유전자 서열을 확인한 후 database를 이용하여 이미 알려진 유전자들과의 homology search를 수행하였다. 이 결과 얻어진 전체 유전자들 중 9.6 %는 ribosomal RNA gene들이었으며, 7.7 %는 frog 및 drosophila등 다른 organism들에서 밝혀진 유전자들과 상동성을 갖고 있었다. 한편 알려진 zebrafish의 유전자와 일치하는 것은 EST clone을 포함하여 17.4 % 이었으며 나머지 65.3 %는 기존의 database에 수록이 안된 신규 유전자들이므로 추정되었다.

나. 혈관발생특이 유전자들의 분리 및 확인

(1) Zebrafish로부터 혈관발생 조절유전자의 분리

Zebrafish로부터 혈관발생 조절유전자의 분리를 위하여 혈관생성이 결여된 mutant 들을 이용한 ODD-PCR을 수행하였다. Mutant는 *flh*, *oep* 그리고 *clo* mutant 3종류로서 blood vessel specific 유전자로 알려진 *flk-1*을 probe로 사용하여 whole mount in situ hybridization을 수행하였을 때 floating head(*flh*) mutant에서는 dorsal aorta가 결여되었으며, one-eyed pinhead(*oep*) mutant는 axial vein, 그리고 cloche(*clo*) mutant에서는 dorsal aorta와 axial vein 모두 결여된 것을 확인할 수 있었다.

Mutant embryo를 얻기 위하여 heterozygote mutant로 판명된 *flh*, *oep* 그리고 *clo* mutant 각각의 암.수를 mating하여 이들로부터 얻어진 25% homozygote embryo 를 PCR 수행을 위한 시료로 사용하였다. 시료로 선별된 embryo의 발생단계는 혈관 형성이 이루어지는 26 somite stage(22 hr)이며, 효율적인 PCR을 수행하기 위하여 특별히 brain과 yolk를 제외한 body trunk 부위만을 절단하였다. 40-50개의 embryo로부터 절단한 body trunk 부위를 이용하여 total RNA의 분리한 후 double-stranded cDNA를 합성하여 A-tail fragment pool을 제조하였다.

이들 3종류의 mutant fish에 대한 ODD PCR을 192 개 PCR primer set를 이용하여 모두 분석하고 유전자 발현의 변화를 보이는 유전자들을 분리하였다.

(2) 혈관발생특이 유전자들의 발현양상 분석

혈관발생특이 유전자들의 발생기간중의 발현양상을 확인하기 위하여 분리된 유전자를 probe로 사용하여 whole mount in situ hybridization을 실시하여 이들 중 혈관생성에 관여하는 양상을 보이는 6 개(152-2, 152-3, 154-2, 154-3, 156-1, 168-1)의 유전자들을 분리하였으며 이들 유전자가 발현하는 부위를 확대하여 관찰한 결과 blood vessel precursor cell임을 확인하였다. 이를 통하여 ODD PCR 방법을 이용하여 mutant zebrafish로부터 혈관발생 조절유전자의 분리 및 확인이 성공적으로 이루어 졌음을 확인하였다.

3. 발생특이 유용 유전자들의 full-size cDNA 분리 및 기능분석

가. *zfx8a*, 8b (zebrafish *frizzled*) full-size cDNA의 분리

지금까지 분리된 발생특이 유전자들 중에서 MG77 clone은 database 검색결과, 초기발생에서의 축의 형성에 중요한 기능을 수행하는 wnt signal의 신호전달 과정 중에서 receptor로 작용하는 것으로 알려진 mouse *frizzled* 8과 homologous한 유전자로 추정되었다. mouse *frizzled* 8 (*mfz8*) 유전자는 mouse에서 알려진 여러 *frizzled* family 가운데에서 mouse *frizzled* 5 (*mfz5*) 와 함께 초파리에서 wingless 의 receptor를 coding 하는 유전자인 *Dfz2*와 가장 유사한 단백질 구조를 coding 하는 유전자이다. 그러나 *mfz8*의 경우는 조직별 RNase protection assay나 *in situ* hybridization에서 전혀 나타나지 않아 그 중요성에 비하여 기능이 거의 밝혀지지 않았으므로, 우선적으로 이들의 full-size cDNA를 cloning하여 염기서열을 분석하였다. Full-size cDNA cloning을 위한 probe로써 MG77 clone을 이용하여 screening을 수행하였다.

1차 screening에서 30개의 plaque을 선별하였으며, 그중 5개의 clone이 강한 signal을 나타내고 나머지는 약한 signal을 나타내었다. 그 이유는 MG77 clone이 mRNA 내부에 adenosin nucleotide 가 많은 부분에서 cDNA가 합성되어 증폭된 clone으로 cysteine rich domain (CRD)을 포함하고 있는데, 이 CRD부분은 *frizzled* family에서 매우 잘 보존된 부분으로 screening시에 다른 *frizzled* 유전자와 hybridization한 것으로 보여진다. Phage DNA를 추출하여 *EcoR* I으로 digestion한 다음 Southern blot hybridization을 수행한 결과 1.4kb - 2.3kb 정도의 크기를 가진 clone들을 확인할 수 있었다. 그들 중에서 여섯 개의 plaque을 이차 screening한 결과 가장 강한 signal을 보이는 clone이 *EcoR* I digestion을 하였을 때 내부의 *EcoR* I 부위에 의해 400bp 정도의 조각이 나오는 것을 확인하고 2.2kb 와 0.4kb 의 insert를 각각 pGEM7Zf(+)*EcoR* I site에 cloning하고 *BamH* I 으로 digestion하여 2.6kb의 insert가 나오는 것을 확인하고 pSK(+)*BamH* I site에 cloning하였다. 각각의 clone을 양방향으로 sequencing하여 mouse *frizzled* 8과 일치하는지 BLAST를 통하여 비교하였다. 그 결과 3'부분의 아미노산 서열이 일치함을 확인하고 zebrafish *frizzled* 8a (*zfx8a*)이라 명명하고

full-size sequencing을 진행하였다.

그리고 두 번째로 강한 signal을 나타내는 clone을 sequencing한 결과 그 또한 *mfz8*과 높은 homology를 갖고 있어서 zebrafish *frizzled 8b* (*zfz8b*)라 명명하고 *zfz8a* 와 함께 full-size sequencing을 실시하였다.

(1) *zfz8a*, *8b* full-size cDNA의 염기서열 분석

2.2kb (*zfz8*) 과 2.5kb (*zfz8b*) 의 insert를 가지는 clone을 deletion을 위한 재료로 사용하여 점진적인 deletion mutant를 제조하여 양방향으로 sequencing을 하였다. 그 결과들을 PC/GENE program을 사용하여 염기서열을 통합하였다. DNA 염기서열 분석 결과 zebrafish *frizzled 8a* 유전자의 크기는 2,263 bp 이며, start codon인 ATG로 시작하여 stop codon인 TGA로 끝나는 1737 bp의 open reading frame을 가짐을 알 수 있었다. 이 유전자의 ORF는 29개의 leader peptide를 포함하며 전체 579개의 아미노산을 coding 하고있었다. 3'-UTR 부위는 *EcoR I* 으로 digestion 되어서 따로 sequencing을 실시하였다. zebrafish *frizzled 8b* 유전자의 크기는 2,522 bp 이며, start codon인 ATG로 시작하여 stop codon인 TGA로 끝나는 1728 bp의 open reading frame을 가졌다. 이 유전자의 ORF는 30개의 signal sequence를 포함하며 전체 576개의 아미노산을 coding하고 있다.

아미노산 sequence 유사성을 비교해 본 결과 Fig. 16과 같이 *zfz8a*는 *mfz8* 과 83.2%, *zfz8b*와 77.8%, *hfz5*와 68.6% 그리고 *Dfz2*와 58.7% homology를 나타내었다. *zfz8b*의 경우에는 *mfz8*과 83.2%, *zfz8*과 77.8%, *hfz5*와 66.7% 그리고 *Dfz2* 와 57.5%의 homolo호를 나타내었다. *zfz8a*, *8b*는 모두 *frizzled* family의 공통구조인 10개의 cysteine을 가진 CRD (Cysteine Rich Domain)를 가지고 7개의 transmembrane domain을 갖고 있었다.

(2) *zfz8a*의 시간적, 공간적 발현 양상 분석

pGEM7Zf(+)/*EcoR I*에 cloning 되어 있는 약 2.2kb의 coding region 유전자를 *in vitro* transcription 시켜서 DIG-labelled RNA를 probe로 사용하였다. Hybridization은 55°C에서 O/N 수행하고 probe washing을 70°C에서 두 시간동안 하여 stringency를 높이고 염색 시간을 짧게 하여 다른 *frizzled* family와의 cross hybridization에 의한 background 생성을 줄였다. 그 결과 초기 gastrula 상태에서 *zfz8a* expressing cell들이 dorsal marginal region에 모여서 zebrafish의 중배엽 유도 center인 shield를 형성함을 관찰 할 수 있었다. 이 시기 에서는 또한 epiblast 세포에서도 signal이 관찰되었는데 이 부위는 neuroectoderm 으로 운명이 결정된 세포들이 있는 부분으로 알려져 있다. 이 부분에서 발현하는 세포들은 이미 동물극까지 broad 하게 발현하는 것으로 보여진다. 70-90% epiboly 상태에서 *zfz8a*를 발현하는 세포들은 hypoblast

(mesendoderm)의 머리쪽 말단에서 계속 발현하며 이동하는 것으로 보여진다. 그리고 외배엽에서 *zfp8a*를 발현하는 세포들은 mesendoderm의 이동과 더불어 같이 anterior pole로 이동하는 것으로 보여진다. 10시간 근처의 embryo에서는 외배엽에서 발현하는 세포들이 축 방향으로 서서히 이동하는 모습을 보여준다. 외배엽에서 *zfp8a*를 발현하는 세포들의 전체적인 발현양상으로 보아 zebrafish의 neural ectoderm fate map과 비교해 볼 때 이 부위는 telencephalon, diencephalon, retina로 운명지어진 세포들이 존재하는 곳으로 추측된다. Gastrula 까지의 발현양상으로 보아 *zfp8a*가 mesendoderm에서 발현하여 머리부위의 말단으로 이동하는 것은 hypoblast의 머리부위의 말단에서 발현하여 머리 형성에 관련되어 있다고 알려진 *gooseoid*와 발현부위가 일치하는 것으로 보여지고 neuroectoderm에서 발현하는 세포의 발현양상은 anterior neuroectoderm을 유도하는 *otx2*와 일치하는 것으로 보여진다. 특히 *otx2*는 *Xenopus*에서 *gooseoid*와 함께 LiCl, UV, retinoic acid, activin, and Xwnt8에 의해 조절을 받는 다고 알려져 있다.

이들 결과를 종합해 볼 때 *zfp8a*는 zebrafish에서 중기 blastula에서 발현하여 dorsal induction을 유발하는 wnt-8의 수용체로써 작용하여 그 결과 *gooseoid*의 발현을 유도하여 dorsal 발달을 촉진하는 것으로 생각되며 동시에 *otx2*의 발현을 조절하여 anterior neuroectoderm의 발달을 유도하는 것이라 생각되어 진다.

후기 embryogenesis 동안에는 먼저 3 somite stage에서의 발현은 prechordal plate와 prenephric duct에서 지속적으로 발현을 유지하며 뇌가 될 부분에서 전체적으로 발현을 유지 한다. 25hr에서의 발현은 코가 될 부분인 olfactory placode와 diencephalon, tegmentum, hindbrain의 ventral side(vhb)와 lateral primordia, prenephric duct, 그리고 neural tube의 ventral side(vnt)에서 발현하는 것으로 관찰되었다. 36시간 larva에서는 medial telencephalon과 optic recess, tegmentum, myelencephalon, prenephric duct에서 발현이 관찰되었고 ventral neural tube에서는 관찰되지 않았다. 그리고 이 시기에서 branchial mesenchyme에서도 발현함이 관찰되었다.

Late stage에서의 정확한 발현부위를 관찰하기 위해서 24hr, 36hr, 40hr의 sample을 5 μ m 두께로 cross-section을 하여 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 olfactory placode와 ventral diencephalon, optic recess, tegmentum, ventral hindbrain 그리고 otic vesicle에서 일부의 세포에서 *zfp8a*의 발현이 관찰되었다. 36hr transverse-section sample서는 medial telencephalon, optic recess, tegmentum, eye, mesenchymal cell, medial hindbrain, otic vesicle, ventral spinal cord에서의 발현이 관찰되었다. 그리고 40시간 sample의 midsagittal section에서는 눈의 뒷쪽에 위치하는 5th ganglion, 턱뼈가 되는 mandibular

mesenchyme, 아가미가 되는 세포인 branchial mesenchyme, otic vesicle과 optic recess, tegmentum, hindbrain에서의 발현이 관찰되었다.

(3) zfz8b의 시간과 공간적인 발현 양상 분석

zfz8b의 경우는 zfz8a와 매우 homology가 높은 유전자로 이 유전자 또한 head organizer로서의 기능을 수행 할 것으로 생각되었다. 그래서 whole-mount *in situ* hybridization을 실시하였다. 그 결과 zfz8b의 경우는 그 발현 양상이 zfz8a와 비슷한 시기에 발현이 유도되는 것으로 관찰되었다. sphere의 dorsal side에서 유도 (arrow)되는 것으로 보였다. Shield stage에서는 발현이 shield에서만 관찰되며, epiboly가 진행되는 동안 hypoblast의 첨단에서만 발현이 유지되었다. 또한 이동하는 동안 세포의 수가 일정하게 유지되는 것으로 보아 blastula에서 운명이 결정된 세포가 동물극까지 이동하는 것으로 추측되어 진다. Bud stage에서는 polster 부위에서만 발현이 관찰되고 ectoderm에서는 발현이 관찰되지 않았다. polster의 세포들이 이동하여 머리의 앞쪽 면을 이루며 시간이 감에 따라 발현이 점차적으로 감소됨을 보여 준다. 25시간 sample에서는 optic recess의 윗쪽과 ventral diencephalon에서 발현함을 보여 주었다. zfz8b의 발현은 지금까지 head organizer로 알려진 goosecoid보다 앞쪽에서 발현하며 실제로 hypoblast의 convergent extension에 관련된 유전자일 가능성을 보여 주었다. 이들 결과를 종합하여 zfz8과 비교를 해보면 다음과 같다.

첫째, zfz8a가 MBT(mid-blastula-transition) stage에서 발현이 시작하는 것과(data not shown) 달리zfz8b는 epiboly가 시작되는 시기에 발현이 유도되는 것으로 보여진다. 둘째, 또 다른 점으로 zfz8이 anterior of hypoblast와 함께 바깥층 세포(epiblast)에서도 동시에 발현하는 것과 달리 anterior tip of hypoblast에서만 계속 발현을 하였다. 셋째, zfz8a이 bud stage에서 polster region에서는 약하게 발현을 하고 polster와 연결된 prechordal plate에서 발현을 하여 gsc와 발현부위가 겹치는 것과 달리 zfz8b를 발현하는 세포들은 bud stage에서 polster 부위에서만 관찰되었다. 넷째, zfz8a는 somito- genesis 기간 이후에 발현이 다른 곳으로 이동하여 여러 곳에서 발현을 하는데 반해 zfz8b는 다른 곳에서는 관찰이 되지 않고 그 발현 정도만 감소하는 것으로 보아 단일한 기능을 수행하는 유전자로 보여진다.

(4) RNA injection에 의한 ectopic overexpression을 이용한 zfz8a, 8b의 기능 분석

zfz8a 와 zfz8b의 whole mount *in situ* hybridization 에 의한 발현양상이 head organizer 유전자로 알려진 goosecoid, otx2 등과 비교해 보았을 때 거의

일치하는 것으로 보아 zfz8a 와 zfz8b는 dorsal region의 발달과 anterior neuroectoderm 발생에 관련된 유전자일 것이라고 추측되었다. 그러므로 발생 초기에 이들 zfz8a 와 zfz8b 유전자들을 RNA injection에 의한 overexpression을 시킴으로서 이들 유전자들의 생체내에서의 기능을 확인하기 위하여 *in vitro* transcription에 의하여 합성된 zfz8a 와 zfz8b의 5'-capped RNA를 100-200ng/ μ l 의 농도로 one cell stage의 zebrafish embryo에 microinjection 하였다.

그 결과 microinjection된 zebrafish의 embryo에서 zfz8과 zfz8b 모두 거의 유사한 pattern을 보이는 mutant phenotype이 나타났었다.

우선 초기에 organizer에서 발현하여 축 형성에 관련된 기능을 알아보기 위하여 몇가지 실험을 수행하였다. 먼저 organizer marker 유전자인 goosecoid의 발현에 변화를 주는지 알아보기 위해 shield 형성시기에 gsc를 marker로 하여 *in situ* hybridization을 수행하였다.

그 결과 zfz8a와 zfz8b 모두에서 그 발현 부위가 넓어지거나 두 개로 나뉘는 양상을 나타내었다. 이 실험으로 zfz8a와 8b가 wnt signal에 의해 축형성을 할수 있는 가능성을 가진 유전자로 추정하였다. 그 다음 실험으로는 LiCl처리에 의한 dorsalization이 일어나는데 이때 또한 goosecoid가 발현부위가 넓어진다는 보고 (Scott E. Stachel etc)와 실제로 이러한 결과는 세포 내부의 β -catenin의 증가에 따른 dorsalization에 의한 것이라는 것이 최근 밝혀졌다(Peter S. Klein etc). 이는 Wnt signal의 결과 나타나는 β -catenin의 증가와 관련이 있다고 생각되어 0.3M LiCl를 10분간 처리하여 Zfz8a와 Zfz8b의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과 goosecoid 와 동일하게 원형의 발현양상을 보였다. 이는 Zfz8a와 Zfz8b도 또한 wnt signal을 받아서 전반적으로 발현이 증가하는 유전자임을 보여 주었다. 그 다음 실험으로는 실제로 새로운 축이 생성되는 가를 확인하기 위하여 척추에서 발현하는 유전자인 axial과 shh를 marker로 하여 *in situ* hybridization를 수행 한 결과 두 갈래로 나뉜 발현 모습을 보였다. 이것으로 보아 Zfz 유전자들이 축 형성에 직접적으로 연관되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 2cell 이상 분열한 다음 injection한 결과 축을 중심으로 한 쪽이 더 넓은 embryo가 관찰되었는데 이 원인을 알기 위해 neuronal differentiation 중인 세포에서 발현하는 HuC를 marker로 하여 실험을 수행한 결과 왼쪽의 세포가 uninjected sample나 오른쪽의 세포들 보다 1시간 이상 분화가 지연되는 양상을 보였다. 25hr이 경과한 embryo에서는 일부의 개체들이 forebrain-midbrain boundary (FMB)에서 brain이 정확히 duplication되는 뇌의 구조를 보였다. 이들 결과는 두 유전자의 기본적인 기능이 brain 형성에 직접적인 관련이 있다는 것을 보여주는 것이라 생각된다. 이들 두 유전자의 발현 양상과 RNA injection 결과를 토대로 추측해 볼 때, zfz8a와 8b의 기본적인 기능은 유사하나 이들의 발현이 각각의 promoter에 의해 조절되어 두 유전자가 서로 다른 region으로 나뉘어 발현하여 실험은 약간의 다른 기능을 수행하게 된 것으로 보여지며 zfz8b는

enveloping 세포들의 말단에서 발현하여 *gsc*의 발현을 조절하여 머리형성을 유도하고 *zfp8a*의 경우는 WNT signal의 downstream 인 *gsc*의 기능이 축형성 organizer 유전자인 *ntl*(no tail)의 발현을 조절한다고 알려져 *zfp8a*가 *gsc*의 발현을 조절하여 organizer 유전자들의 발현을 조절하는 직접적인 receptor의 기능을 수행하는 것으로 생각되어 진다.

나. HMG clone의 full-size cDNA의 분리

(1) HMG 유전자의 염기서열 분석

MG44 clone은 database 검색 결과 HMG1 family protein과 높은 homology를 나타내었다. HMG1 단백질은 HMG-I, HMG-Y, 그리고 HMG1-C의 세가지 종류가 있으며, 이 유전자들은 정상인 성인 조직에서는 아주 낮은 발현을 나타내지만, 배 발생 조직에서는 상당히 높은 발현을 보인다. 특히 발생의 초기에는 모든 조직에서 아주 높은 발현이 측정되었다. 이후 시간이 감에 따라 비록 모든 조직에서 발현이 나타나기는 하지만, 몇몇 조직에서만 특이적으로 높은 수준의 발현을 보인다. 이러한 결과로 발생과정에서 HMG 유전자가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정되어 이들의 full-size cDNA를 분리하고 그 염기서열을 분석하였다.

(2) HMG clone의 시간적 공간적 발현양상 분석

최초의 발현은 MBT에서부터 아주 강하게 전체적으로 발현을 하는데 시간이 지날수록 brain과 spinal cord에서 강하게 발현을 유지하고 나머지는 억제 받아 발현이 급격히 감소함을 보였다. 이 유전자의 기본적인 기능은 neural tissue의 proliferation 에 관련된 유전자로 생각되어 진다.

다. Zebrafish neurolin homolog의 full-size cDNA 분리

(1) Zebrafish neurolin- like gene full-size cDNA의 분리 및 분석

MG 159 clone은 database 검색결과 cell adhesion molecule인 Immunoglobulin superfamily중의 한 member인 zebrafish neurolin/DM-GRASP/CD166과 homology를 나타내었다. fish의 neurolin은 처음 이 유전자가 밝혀진 chicken에서 DM-GRASP/BEN/SC-1으로 명명되어 있으며 이 유전자는 종마다 다른 neuron에 특이적으로 발현하는데 chicken에서는 motor neuron 과 sensory neuron등에 특이적으로 neurite outgrowth에 관여한다고 밝혀져 있다.

MG159 clone을 probe로 두 단계의 plaque hybridization screening을 통하여 3kb의 유전자를 획득하였다. 그리고 이 유전자의 restriction map을 결정하여 0.5에서 1kb size로 각각을 construction한 후 automatic sequencer로 nucleotide

sequencing을 수행 결과 3,062bp의 cDNA임을 확인하였다.

그리고 PC-GENE program을 이용하여 아미노산 sequence를 추정한 결과 이 neuroilin-like gene은 117base의 5' UTR 이후 ATG start codon이후 TAA의 stop codon까지 562개의 아미노산을 coding하고 있다. 562개의 아미노산으로 이루어진 이 유전자의 open reading frame은 N-terminal 부분에 18개의 signal sequence를 가지고 있으며 504번째 아미노산에서 528번째까지 transmembrane domain을 가지고 있는 membrane bound protein임을 확인할수 있었다.

이 protein은 50에서 100개의 아미노산 사이의 간격으로 cystein을 가짐으로 확인 하고 이는 disulfide bond를 형성하여 Immunoglobulin superfamily의 adhesion molecule과 같은 protein structure를 형성함을 추정하였다. 아미노산 sequence의 유사성을 비교해 본 결과 zebrafish DMGRASP과는 48% , goldfish neuroilin과는 47.6% 그리고 chick DMGRASP과는 37%의 amino acid homology를 나타내었다.

(2) Zebrafish neuroilin-like MG159의 시간적 공간적 발현 양상

지금까지 알려진 neuroilin/DM-GRASP류의 protein은 종마다 그리고 시간별로 다른 발현 양상을 보인다. Goldfish의 경우는 28hr 이후의 retinal ganglion cell에서의 발현이 확인되었고 chick의 경우 sensory neuron이나 motor neuron 그리고 sympathetic neuron에서 발현된다고 알려져 있다. 반면 zebrafish DM-GRASP의 경우는 Trigeminal ganglion, primary sensory neuron인 Rohon-Beard cell, notochord , 그리고 귀 부위에서 발현되며 48hr 이후에서는 motor neuron에서의 발현도 확인되었다.

Zebrafish neuroilin과 48%의 identity를 가지는 MG159 cDNA clone의 발현 양상을 확인하기 위하여 pBluescript SK(+)의 Eco RI/Xho I site에 cloning 되어있는 3,062base의 cDNA를 T7 RNA polymerase로 DIG-UTP와 NTP mix를 이용하여 in vitro transcription을 수행하여 DIG-labelled RNA를 제조하였다.

이를 Probe로 whole mount in situ hybridization을 수행하였다. Hybridization 은 65 ℃ 에서 O/N 수행하였으며, probe washing은 70 ℃ 에서 2시간 동안 실시하여 stringency를 높였다. Alkaline phosphatase antibody로 BCIP/NBT를 이용하였다.

MG159 의 발현은 maternal mRNA로 존재함을 나타내며 MBT시기를 지나면서 그 발현이 증가되는 것이 확인된다. Shield 형성시기인 6hr의 동물극 관찰결과 ectoderm 전체에서 세포들중 선택된 세포에서 강하게 발현된다. 3-somite시기가 되면서 forebrain의 특정부위와 midbrain특정부위에서 강한 발현이 관찰되며 dorsal view 의 neuroectoderm에서 motor neuron과 sensory neuron의 전구체로 생각되는 3개의 line으로 발현되는 세포들이 관찰된다. 14-hrs embryo에서는 이전까지의 non-specific한 발현이 점차로 감소하면서 특정한 region에서만 발현이 유지되었다. 18-somite stage 에서 forebrain, midbrain 그리고 primary sensory neuron인 Rohon-Beard neuron에서 발현이 확인되었다.

24 hr과 36 hr embryo에서는 brain의 특정한 부위인 olfactory placode, tectum, r-2 trigeminal ganglion, otic vesicle, 그리고 Rohon-Beard sensory neuron 에서 강한 발현을 보였다.

또한 이들의 발현을 더 정확하게 확인하기 위하여 24hr embryo를 대상으로 하여 axon surface를 specific하게 detection하는 monoclonal Anti-HNK-1/N-CAM antibody를 이용하여 immunostaining을 수행하였다.

수행결과 DIG-labelled RNA로 in situ 하여 detection한 위치를 정확히 확인할 수 있었다. 24hr 이후의 발현 양상을 관찰하기 위해 33hr 과 36hr embryo의 WISH결과 이 유전자의 발현이 좀더 특이적으로 Telencephalon, Tectum, ventral diencephalon region의 Hypothalamus 그리고 VLT(ventral longitudinal tract) 에서 관찰되었다.

이상의 관찰결과로 보아 zebrafish neurolin-like gene인 MG159 clone은 발생초기에서 특정지어진 세포들의 aggregation에 관여하는 cell-cell adhesion molecule로 추정된다. 그리고 발생단계를 거치면서 특정 위치에서만 발현을 함으로 sensory neuron 이나 motor neuron, 그리고 다른 신경특이적인 위치에서 발현을 통해 알려진 DM-GRASP류의 protein들 처럼 axonal guidance에 관여할 것이라고 추정한다.

라. zSFRP5 (zebrafish secreted frizzled related protein)

(1) zSFRP5 유전자의 full-size cDNA의 분리

발생과정 동안 pattern 형성에 영향을 미치는 중요한 요인 중의 하나인 wnt는 frizzled receptor의 ligand로 작용한다고 알려지고 있으며, 특히 frizzled의 cysteine rich domain (CRD)이 wnt와의 결합에 중요하게 작용한다고 보고되어지고 있다. 또한 최근에 이 CRD를 가진 다른 종류의 유전자들이 지속적으로 발견되고 있으며, 기능적으로도 중요하다고 여겨지고 있다. 하지만 CRD domain을 가진 여러 유전자들은 발생의 여러 단계에서 공간적으로 서로 다른 위치에서 발현하는 것으로 알려지고 있지만 기능에 대해 확실히 알려진 것은 거의 없다. 따라서 우리는 그전에 선별된 30개의 plaque 중에서 일부를 cloning하여 염기서열을 분석한 결과 human secreted frizzled related protein (hSFRP) 유전자와 유사성을 가진 것으로 확인된 약 1.5kb의 clone이 발생 단계에서 중요할 것으로 여겨져, 이 clone에 대한 분석을 하기로 하였다.

우선 9-2 clone의 full-size cDNA를 screening을 수행하였다. 1차 screening에서 6개의 plaque을 선별하여 phage DNA를 추출하여 BamHI으로 digestion한 다음 Southern blot hybridization을 수행한 결과 1.5kb-2kb 정도의 크기를 가진 clone 들을 확인하였다. 그 중에서 가장 크기가 큰 clone을 포함하는 phage들로 2차 screening을 하여 phage를 BamHI으로 digestion하여 2kb의 insert가 나오는 것을 확인하고 pSK(+)의 BamHI site에 cloning하였다. 이 clone의 3' 부분의 염기서열

을 확인한 결과 9-2 clone과 동일함을 확인하고 full-size sequencing을 실시하였다.

(2) zSFRP5 full-size cDNA의 염기서열 분석

우선 pSK에 cloning된 zSFRP cDNA의 restriction map을 세우기 위해 여러 제한 효소로 digestion한 결과 대략적인 mapping을 수행하였으며, 그 중 BamH I과 Cla I, Hind III에 의해 잘려진 3개의 유전자 단편들은 각각 0.7kb, 0.8kb, 0.5kb로 다시 pSK에 subcloning하였다. 이 각각의 subclone들은 자동 염기서열 분석기를 통해 염기분석을 한 후 다시 full-size clone을 deletion을 위한 재료로 사용하여 점진적 deletion mutant를 제조하여 sequencing을 통해 염기서열을 재확인하였다. 하지만 5'쪽에 약 200개 정도의 poly A sequence가 존재하여 정확한 염기 갯수를 확인할 수 없었으므로 여기서는 편의상 5'쪽의 poly A sequence를 제외한 염기서열을 나타내었다. DNA 염기서열 분석 결과는 start codon인 ATG로 시작하여 stop codon인 TGA로 끝나는 933 bp의 open reading frame을 가짐을 알 수 있었다. 이 유전자의 ORF는 26개의 secretory signal peptide를 포함하며 전체 310개의 아미노산을 coding 하고있었다.

아미노산 aequence 유사성을 비교해 본 결과 zSFRP5는 hSFRP5와 77%, mSFRP5와 76%, mSFRP1와 75%, mSFRP2와 62%, mSFRP4와 54%, mSFRP3와 42%의 homology를 나타내었다. 또한 PC gene program을 이용하여 dendrogram으로 근연 상관관계를 확인하여 본 결과 human과 mouse의 SFRP5와 가장 유사함이 확인되었다. 따라서 이 zebrafish SFRP clone은 zSFRP5로 명명하였다.

(3) zSFRP5의 시간적, 공간적 발현 양상 분석

pSK(+)/BamH I 에 cloning 되어 있는 약 2kb의 zSFRP5 유전자는 5'쪽의 약 200개 정도의 poly A sequence 때문에 바로 *in vitro* transcription할 수가 없었다. 따라서 zSFRP5 유전자에서 개시 codon을 포함하면서 5'쪽의 poly A sequence를 제거한 새로운 construct를 만들어 *in vitro* transcription을 수행하였다. 이 새로운 construct는 5'쪽의 primer인 cgggatcctctcctgaatcacagcag (underline is BamH I site)과 3' 쪽의 primer인 T3 universal primer를 이용하여 PCR을 한 후, PCR product를 BamH I으로 digestion하여 pSK(+)의 BamH I site에 cloning하였다. PCR된 zSFRP5 유전자의 size는 약 1.8kb로 이후로는 zSFRP5P로 명칭하였다. zSFRP5P를 이용하여 *in vitro* transcription시켜서 DIG-labelled RNA를 만들어 whole mount *in situ*의 probe로 사용하였다. Hybridization은 65°C에서 O/N 수행하고 probe washing을 0.2%SSC로 70°C에서 한 시간동안 하여 stringency를 높이고 염색 시간을 짧게 하여 background 생성을 줄였다. 그 결과 후기 gastrula 상태에서까지는 staining이 되지 않으며 neurulation이 시작하는 10시간이후부터 staining되어지는 발현 양상을 보이고 있다.

zSFRP5의 발현 양상을 살펴보면 11시간(3-somite stage) embryo의 dorsal neural tube에서 점차 발현하여(data not shown), 12시간(6-somite) embryo에서 neural tube의 anterior(미래의 forebrain)와 dorsal 부위에서 부분적으로 발현함을 관찰할 수 있다. 14시간(10-somite stage) embryo에서는 dorsal 부위의 발현 위치가 분리되어 3개이상의 band로 이루어져 있음을 확인할 수 있고, 특히 anterior 부위에서 staining이 진하게 되는 것으로 보아 zSFRP5의 발현이 증가함을 추측할 수 있다. 이러한 양상은 zSFRP5의 발현이 neurula stage동안의 brain의 구조 형성에 작용함을 추측할 수 있다. 18.5시간(19-somite stage) embryo에서는 forebrain의 말단 부위, optic stalk, optic placode, fore-midbrain boundary, rhombomere 1, 3, 5 등에서 발현되고 있으며 특히, rhombomere에서는 ventral side에서 발현되고 있다. rhombomere 1, 3, 5의 발현은 같은 stage의 embryo를 zebrafish pax A와 pax B를 marker로 사용하여 in situ hybridization한 결과와 비교하여보면 brain 구조 중 특이하게 mid-hindbrain boundary에서 zSFRP5가 발현하지 않음을 관찰할 수 있다. Mid-hindbrain boundary(MHB)의 위치를 결정하기 위해 MHB의 marker인 pax B와 함께 zSFRP5를 double in situ hybridization하여 zSFRP5의 공간적 발현 위치를 비교 확인하였다. 또한 zSFRP5가 눈이 형성되는 위치인 optic placode와 optic stalk에서 넓게 발현함을 관찰할 수 있으며, 다른 SFRP 유전자들도 눈의 여러 층에서 각각 다르게 발현된다는 최근 보고들을 종합해보면 이 zSFRP5도 역시 눈 형성과 관련이 있음을 추측할 수 있다.

마. *Drosophila* ELAV-type RNA binding protein인 Hu family 유전자의 분리 및 발현양상분석

지금까지 발생에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 발생관련 유전자들의 발굴 및 이들의 기능에 대한 연구는 *Drosophila*와 *C. elegans*, 그리고 zebrafish와 같은 model 동물들을 이용한 mutagenesis에 의한 mutant의 분석을 통하여 주로 이루어져 왔다. 이러한 발생관련 돌연변이에 관여하는 유전자들의 발굴과 이들 유전자들의 분자생물학적 연구는 발생관련 유전자들에 의한 발생조절 mechanism의 연구에 커다란 공헌을 하였다. 이러한 발생관련 유전자들중 한 family로서 RNA recognition motif(RRM) 이라 불리는 conserved domain을 가지는 RNA binding protein들은 발생과정에서 RNA metabolism을 조절함으로써 중요한 기능을 수행하고 있다. 이러한 RRM motif를 가지는 RNA binding protein들은 RNA processing, RNA transport 그리고 translation등의 post transcriptional regulation에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 발생에 관여하는 RNA binding protein들 중에서 특히 신경세포에 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 RNA binding protein은 신경세포의 발생 및 분화, 유지에 필수적으로 요구되어지는 중

요성으로 인하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

가장먼저 발견된 신경세포 특이적인 RNA binding protein은 발생관련 연구에 있어서 가장 많이 사용된 model 동물인 *drosophila*에서 밝혀진 elav(embryonic lethal, abnormal visual system) protein으로서 이 유전자는 X chromosome에 존재하는 normal neural development에 필수적인 locus로서 이들의 mutation은 embryonic lethality를 유발하며 또한 genetic mosaic mutant에서 정상적인 눈의 형성을 저해함으로써 embryonic lethal, abnormal visual system (Elav)라고 명명되었다. 이후의 연구에서 그 발현이 embryo나 adult eye, 그리고 developing optic lobe에 국한되지 않고 embryo, larvae, pupae and adults에 이르기까지 발생의 전반에 걸쳐서 central nervous system과 peripheral nervous system에서 특이적으로 발현되며 neuronal progenitor cell인 neuroblast나 glial cell에서는 발현되지 않음으로서 이들은 초기 neuron의 형성과 mature neuron의 분화 및 유지에 필수적인 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. Elav 유전자는 두 개의 ribonucleotide consensus sequence(RNP1, RNP2)를 각각 세 copy 가지고 있으며, 이러한 RNP1, RNP2 motif는 이전에 밝혀진 다른 RNA binding protein들에 존재하는 것과 같은 방식으로 배열되어있는 것으로 인하여 이들의 기능이 신경세포에서의 RNA metabolism에 관여하는 것으로 추정된다.

Drosophilar elav의 human homolog인 이들 Hu antigen protein들 중에서 Hel-N1, HuC, 그리고 HuD는 Elav와 마찬가지로 neuron specific RNA binding protein으로 작용하며, 이들은 신경세포에서 cell growth와 proliferation을 조절하는 c-Myc, c-Fos 그리고 Id repressor의 mRNA의 3'-UTR에 존재하는 AU-rich element(ARE)에 선택적으로 결합하여 이들의 stability를 조절한다. 이에 비추어 볼 때 이들 Hu-antigen family역시 target 유전자들의 mRNA stability를 조절함으로써 neuron의 분화와 mature neuron의 유지기능을 담당하는 것으로 생각된다. HuR/HuA의 경우에는 신경세포 뿐 아니라 모든 세포에서 발현되는 RNA binding protein으로 다른 Hu-antigen들과는 다르게 신경특이성을 나타내지 않으며, 최근의 연구결과에 의하면 HuR/HuA는 세포의 증식에 관여하는 유전자들 중에서 Myc, Jun 그리고 Fos등의 protein을 만드는 early-response 유전자들의 mRNA의 3' UTR에 존재하는 ARE sequence에 결합하여 이들의 stability를 조절하는 것으로 밝혀졌다.

Human 이외의 animal에서는 mouse와 *Xenopus* 그리고 zebrafish에서 각각 4종류의 elav homolog 유전자들이 존재하며, 이들은 HuA, HuB, HuC, HuD (HuA=HuR, HuB=Hel-N1, HuC, HuD)라 명명되었고 이들 역시 모두 세계의 conserved sequence인 RNA recognition motif(RRM)를 가지는 RNA binding protein으로 작용한다.

그러나 발생에 있어서 유전자들의 발현 시기 및 발현양상은 이들의 기능에 대하여 매우 중요한 정보들을 제공함에도 불구하고 이들의 기능연구는 주로 세포수준에서 연구되어왔으며, 아직까지 발생과정에서 이들 Hu family 유전자들의 발현 시기나 발현양상이 정확하게 규명된 바는 없다. Mouse와 chicken에서 이들의 발현

양상이 서로 비교, 확인되었으나 이는 이들 model 동물들이 가지는 발생연구의 한계점으로 인하여 모두 neurulation이 끝난 이후의 발생단계에서 이루어졌으므로 초기발생에서의 발현양상은 아직 밝혀지지 않았다. 그러므로 다른 어떤 동물들보다 초기 발생에 관한 유전자들의 연구에서 커다란 장점을 가지는 zebrafish에서 이들 Hu family 유전자들을 분리하였으며 또한 이들의 초기발생과정에서의 발현시기 및 발현양상을 확인하였다.

(1) HuA, HuG, HuC 그리고 HuD의 단백질 염기서열 비교

이미 알려진 HuC 유전자를 probe로 사용하여 low stringency plaque hybridization을 수행하여 zebrafish에서 아직까지 분리되지 않은 HuA, HuG 및 이미 분리되어 sequence가 알려진 HuD 유전자의 full-size cDNA를 분리하여 이들의 유전자 및 단백질 염기서열을 확인하고 이들 단백질들 사이의 homology를 비교하였다. Screening하는 과정에서 HuB 유전자는 분리되지 않았으나, 아직까지 알려지지 않은 새로운 Hu family 유전자인 HuG가 분리되었다. 이들은 서로간에 매우 높은 sequence homology를 가지는 것으로 확인되었다.

(2) Hu family 유전자들의 발현양상 분석

분리된 HuA, HuG, HuC 및 HuD 유전자들을 이용하여 이들의 발현양상을 확인하기 위하여 24시간이 경과한 zebrafish의 embryo를 대상으로 whole-mount in situ hybridization을 수행하였다. Hu family 유전자들의 coding region은 sequence homology가 매우 높으므로 whole-mount in situ hybridization을 위한 probe는 이들 유전자들의 3' UTR region을 사용하였다. HuA의 발현은 human의 HuR의 경우와 마찬가지로 tissue specificity를 나타내지 않고 전체적으로 발현되었다. 특히 눈과 귀 부위에서 eye lens와 optic stalk, 그리고 ear vesicle에서 발현이 됨을 확인하였다. HuB의 발현은 기본적인 양상이 HuA와 매우 유사하였으나, 눈에서는 optic stalk에서의 발현이 보이지 않았다. HuC와 HuD의 발현은 다른 종에서 알려진 바와 같이 기본적으로 신경특이적인 발현양상을 나타내었다. 이들 Hu family 유전자들의 발생과정에서의 시간적인 발현 양상은 현재 whole-mount in situ hybridization을 이용하여 분석중에 있다.

4. 신경계특이적 발생 유전자들의 기능분석을 위한 신경특이적 형광 발현 transgenic zebrafish의 제조 및 분석.

계속적인 연구에서 얻어질 신경발생 조절 유전자들의 신경계에서의 *in vivo* 기능을 확인하는 동물모델의 제조를 목적으로 하여 모든 분화되는 신경에서만 특이적으로 GFP단백질 유전자를 발현하는 형광 zebrafish의 제조를 수행하였다. 이를 위해 일차적으로 초기 신경분화시기로부터 성체의 분화된 신경조직 전체에 유전자

발현이 된다고 알려진 HuC 유전자 promoter를 분리한 후 in vivo에서 promoter analysis를 수행하여 이들의 신경 특이적 영역을 확인하였고 이를 이용하여 모든 신경계에서 reporter gene으로서 형광단백질인 GFP 유전자를 발현하는 형질전환 형광 zebrafish를 제조하였다.

가. 신경 특이적 발현을 보이는 pan-neuronal HuC 유전자 promoter의 분리 및 구조 확인

*Drosophila*에서 가장 먼저 밝혀진 신경세포 특이적인 RNA binding protein은 ELAV(embryonic lethal, abnormal visual system) protein으로서 이 유전자는 X chromosome에 존재하는 normal neural development에 필수적인 locus이다. 이들의 mutation은 embryonic lethality를 유발하며 embryo, larvae, pupae and adults에 이르기까지 발생의 전반에 걸쳐서 모든 종류의 신경세포에서 특이적으로 발현되지 만 neuronal progenitor cell인 neuroblast나 glial cell에서는 발현되지 않음으로서 이들은 초기 neuron의 발생과 mature neuron의 분화 및 유지에 필수적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

Mammalian에서는 지금까지 HuR, Hel-N1, HuC, HuD의 4종류의 elav homolog 유전자들이 밝혀져 있다. Drosophilar elav의 homolog인 이들 유전자들 중에서 Hel-N1, HuC, 그리고 HuD는 Elav와 마찬가지로 neuron specific RNA binding protein으로 작용하며, 이들은 신경세포에서 cell growth와 proliferation을 조절하는 c-Myc, c-Fos 그리고 Id repressor의 mRNA의 3'-UTR에 존재하는 AU-rich element(ARE)에 선택적으로 결합하여 이들의 stability를 조절하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 이들은 신경세포에서 세포분화와 증식에 관여하는 유전자들의 mRNA stability를 조절함으로써 neuron의 발생 및 분화와 mature neuron의 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.

Mammalian의 neuron specific RNA binding protein들 중에서 특히 HuC는 neuronal precursor cell 들이 나타나는 시기인 late gastrular 시기부터 발현이 시작되며, CNS와 PNS의 모든 종류의 neuron에서 발현되는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 계속적인 연구에서 얻어질 신경발생 조절 유전자의 in vivo 기능을 확인하는 동물모델을 제조하기 위하여 그 첫 단계로서 먼저 zebrafish로부터 모든 종류의 신경세포에서 특이적으로 발현되는 HuC 유전자의 promoter를 분리한 후 이들의 염기서열을 분석하여 이들의 발현을 조절하는 가능한 nuclear factor들의 결합부위를 확인하였으며, GFP (green fluorescence protein) 유전자를 reporter gene으로 이용하여 HuC promoter deletion mutant의 재조합 유전자를 구성하고 이들을 zebrafish의 embryo에 microinjection한 후 in vivo에서 이들 GFP 유전자의 발현을 조사함으로써 모든 신경세포에서 특이적으로 발현되는 신경 특이적 promoter를 분리, 확인하였다.

(1) Zebrafish embryo에서의 HuC 유전자의 발현 조사

Zebrafish HuC 유전자의 promoter를 분리하기 이전에 먼저 발생과정에서의 이 유전자의 시간적 공간적 발현양상을 whole-mount in situ hybridization을 통하여 확인하였다. 그 결과 zebrafish의 HuC 유전자는 late gastrular stage (11 h)의 neuronal precursor cell들에서부터 발현이 시작되며 이후에는 CNS와 PNS의 모든 신경세포에서 특이적으로 발현됨을 확인하였다.

(2) Zebrafish genomic library로부터 HuC promoter의 분리 및 염기서열 분석

Zebrafish HuC 유전자의 5' UTR 부분을 probe로 사용하여 zebrafish의 genomic library를 screening함으로써 약 3 kb 크기의 HuC 유전자의 promoter를 분리하였다. 이들의 염기서열을 분석하고 5' termini를 확인하기 위한 primer extension analysis를 수행한 결과, 이들의 신경특이적인 발현을 조절하는 것으로 추정되는 E-boxes sequence들을 포함하는 core promoter sequence를 확인하였다.

(3) Living zebrafish embryo에서의 HuC promoter의 기능분석

분리한 3 kb의 HuC promoter에서 HuC 유전자의 신경세포 특이적인 발현을 조절하는 cis-acting element들을 확인하기 위하여 reporter gene으로서 GFP(green fluorescence protein) 유전자를 포함하는 HuC promoter의 점진적인 deletion mutant들을 제조하였다. 각각의 construct들을 one cell stage의 살아있는 zebrafish embryo에 microinjection한 다음 일정시간이 지난 후 형광 현미경을 이용하여 이들 GFP protein에서 나오는 형광을 관찰함으로써 각각의 deletion construct들의 발현을 in vivo에서 확인하였다. 그 결과, 3 kb의 HuC promoter-GFP construct에서는 endogeneous한 HuC 유전자의 발현 양상과 일치하는 형광단백질의 발현을 확인하였으며, 이들이 점진적으로 deletion될수록 이들 형광 단백질의 신경 특이적 발현이 감소함과 동시에 근육에서의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(4) 신경 특이적 HuC promoter에 의한 형광단백질의 발현양상

앞에서 수행한 형광단백질을 이용한 living zebrafish embryo에서의 HuC promoter deletion analysis를 통하여 형광단백질의 가장 완벽한 신경 특이적 발현을 유발하는 것으로 확인된 3 kb의 HuC promoter-GFP construct의 발현양상을 정밀하게 조사하기 위하여 살아있는 1 cell stage의 zebrafish embryo에 이들의 DNA를 microinjection 한 후 형광 현미경을 통하여 GFP의 발현을 관찰하였다. 그 결과 injection한 후 48 시간이 경과한 embryo에서 이들 형광단백질은, brain의 telencephalic cluster, retinal ganglion cells 그리고 trigeminal ganglion neurons 등에서 발현되는 것이 확인되었으며 또한, brain뿐만 아니라 spinal cord 전반에 걸쳐서 motor neuron, sensory neuron 그리고 commissure neuron등 모든 중

류의 neuronal cell의 subtype에서 발현됨이 확인되었다. 또한 이들의 발현은 신경 세포의 cell body뿐만 아니라 신경세포에서 나오는 axon들에서도 발현됨으로서 후에 axonal guidance에 관여하는 유전자들의 기능연구에도 충분히 활용될 수 있음을 확인하였다.

또한 이들의 발현을 더 정확하게 확인하기 위하여 HuC promoter-GFP construct를 microinjection한 후 48 시간이 경과한 embryo를 대상으로 하여 GFP에 대한 polyclonal antibody를 이용하여 immunostaining을 수행한 결과 staining 된 cell 들이 앞에서 확인한 형광단백질을 발현하는 neuronal cell들과 일치함을 확인 함으로써 분리한 HuC promoter가 완전한 pan-neuronal promoter임을 확인할 수 있었다.

나. 형광단백질을 신경 특이적으로 발현하는 transgenic zebrafish의 제조 및 확인

계속적인 발생특이 유전자들의 발굴을 통하여 얻어질 발생특이 유전자들 중에서 특히 신경발생 조절 유전자들의 in vivo 기능을 확인할 수 있는 동물모델을 제조하기 위하여 앞에서 얻어진 zebrafish의 pan-neuronal promoter인 HuC promoter를 이용하여 모든 신경세포에서만 특이적으로 GFP단백질 유전자를 발현하는 transgenic zebrafish의 제조를 수행하였다.

먼저 앞에서 확인된 가장 완벽한 pan-neuronal promoter인 3 kb의 HuC promoter에 reporter gene으로서 형광단백질인 GFP 유전자를 fusion시킨 재조합 유전자를 구성하였다. 얻어진 HuC promoter-GFP construct를 one-cell stage의 zebrafish에 microinjection 한 후 이들을 배양하였다. 약 3개월 후에 microinjection된 이들 zebrafish들이 알을 낳을 수 있을 정도로 자란 후 이들을 암 수 한쌍씩 각각의 어항에서 따로 breeding하여 알을 받은 다음 형광현미경을 이용하여 이들 embryo들이 신경세포에서 특이적으로 형광을 나타내는지의 여부를 확인하였다. 이렇게 하여 얻어진 embryo에서 신경세포에 특이적으로 형광단백질이 발현됨을 확인함으로써 이들 embryo를 낳은 founder zebrafish는 microinjection한 HuC promoter-GFP construct가 germline으로 transmission된 transgenic zebrafish임을 확인할 수 있었다.

Founder transgenic zebrafish로부터 얻어진 제 2 세대의 heterozygotic transgenic zebrafish들을 키운 후 이들을 교배함으로써 homozygotic transgenic zebrafish를 확보하였다. 이렇게 하여 얻어진 transgenic zebrafish를 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, brain과 spinal cord의 모든 종류의 신경세포에서 특이적으로 형광단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 이들 transgenic zebrafish를 신경계 특이적으로 돌연변이가 유발된 mutant zebrafish의 분석에 이용하기 위하여 이들을 mindbomb mutant line과 교배시켰다. Mindbomb mutant는 early neurogenesis에 관련된 유전자에 돌연변이가 유발된 것으로서 이들은 primary

neuron들이 정상보다 많이 형성되는 phenotype을 보이는 것으로 알려져 있다. HuCP-GFP transgenic line과 mindbomb mutant line과의 교배를 통하여 얻어진 HuCP-GFP/mindbomb transgenic mutant embryo를 대상으로 GFP에 대한 polyclonal antibody를 이용하여 immunostaining을 수행한 결과, 예상했던 대로 primary neuron들이 증가된 phenotype을 확인할 수 있었다.

이와 같이, 얻어진 transgenic zebrafish는 모든 신경세포에서 형광을 나타내므로 지속적인 발생특이 유전자 발굴을 통하여 얻어질 신경 특이적인 유전자들의 기능을 연구하는 데에 매우 유용한 모델 동물로서 활용될 수 있을 것이며, 또한 mutagenesis를 통하여 얻어진 신경계 변이 zebrafish 돌연변이체들의 분석에도 유용하게 이용될 것이다. 이와 더불어 본 연구에서 분리된 pan-neuronal promoter는 그동안 밝혀진 모든 종류의 neuron specific promoter중에서 유일하게 모든 신경세포에서 발현되는 것이므로, 그 기능이 알려지지 않은 신경 특이적인 유전자들을 in vivo에서 신경세포 특이적으로 발현시킴으로서 이들 신경특이 유전자들의 기능연구에 transgenic zebrafish와 더불어 매우 유용하게 활용될 것이다.

V 연구개발결과의 활용계획

1. 발생특이적 유용 유전자들의 활용계획

Genome 연구는 앞에서 언급한대로 유용 유전자의 선점과 이들의 기능을 규명하여 실제로 보건 의료기술 등의 관련 산업화에 적용하는 것이 중요하다. 본 연구를 통하여 얻어진 발생특이 유용 유전자들은 척추동물의 신경계 및 주요 기관의 생성과 분화에 직접적인 관련을 가지고 있으며, 특히 이들 발생관련 주요 유전자들에 이상이 유발되면 중요한 유전적 질병을 유발하거나 관련 장기 및 조직에서 암 및 기타 치명적인 질병을 유발하게 된다. 따라서, 본 연구를 통하여 얻어진 신규 발생특이 유용 유전자들은 산업화 가능성이 비교적 높을 것으로 예측되어 일차적으로 보건, 의료 그리고 제약 등의 관련산업에 직접적으로 활용될 것으로 기대된다. 이와 같은 직접적인 신기능성 유전자 산물에 의한 혜택뿐 아니라 genome연구의 부산물로서 얻어질 자동화 기기 및 분석 기기산업의 발전과 함께 각종 생물학적 신소재의 개발에도 파급효과를 미칠것으로 생각된다.

2. 유전자 발굴 및 기능분석 기술의 활용계획

지금까지의 genome 연구에서 얻어진 많은 유전자들은 실질적으로 아직까지 그 기능연구가 대부분 이루어지지 않고 있다. 그러므로 앞으로의 genome 연구는 발굴된 유전자들의 기능연구가 중요한 과제가 될 것이다. 하지만 척추동물의 연구의 한계로 인하여 그러한 기능연구는 많은 시간을 필요로 하게 된다. 따라서 본 연구에서 확립된 각종 기능연구 system은 발생관련 타 유전자들의 기능분석 뿐만 아니라 기타 유용 유전자 및 산물의 확보 및 이들의 기능분석에 관련된 타 연구의 기술적 효율성 증진에 유용하게 활용될 것이다.

3. 신경계 특이적 형광발현 transgenic zebrafish의 활용계획

본 연구에서 얻어진 신경계 특이적 promoter 및 신경계 특이적 형광발현 transgenic zebrafish는 여러 가지 방법을 통하여 신경계의 발생, 분화 및 질병유발의 원인을 규명하는데 유용한 model로서 활용될 것이다.

- 신경계의 발생 및 분화과정의 연구
- 기능이 밝혀지지 않은 신규 유전자들을 신경계에 특이적으로 발현시킴으로서 이들의 신경계에서의 기능연구에 활용
- transgenic zebrafish를 대상으로하여 mutagenesis를 수행함으로써 신경계 특이적 유전자들의 발굴에 활용
- 이들을 이용하여 신경계에 이상이 유발된 disease model을 제작함으로써 신경계 관련 질병의 기작 연구에 활용

S U M M A R Y

In the vertebrate embryogenesis, gastrulation and segmentation stages are very important developmental periods for the formation of major organs such as central nerve system, bone, and muscle, eye, blood cells and heart. Therefore, systematic analyses of the developmental genes assessed by the isolation and functional analysis have great potency applicable to the development of new drugs and therapy for curing the degenerative diseases as well as regeneration of impaired organs.

In contrast to the invertebrate, zebrafish is a vertebrate and interestingly, it shares very similar organ structures with human being. In addition, the developmental control genes found in zebrafish are highly homologous to that of human and mouse. Furthermore, zebrafish reveals numerous advantages to be used as a model organism: i) have a short period of embryonic development(3 days), ii) have an optically transparent chorion (egg shell) that permits viewing of the development of all of the organs and tissues of the animal, iii) have an easily visualized cell that can be microinjected with exogenous DNA to produce transgenic animals, iv) can produce hundreds of eggs(200-300 eggs) daily for experimentation. Based On the genetic accessibility, the zebrafish has become the drosophila of vertebrate developmental biology.

To establish zebrafish model system, we constructed zebrafish facility where 70 fish tanks are equipped. The technical system for functional analysis of the developmental genes and efficient methodology for the isolation of developmental genes were also newly established. Therefore, basic technical tools such as ordered differential display (ODD) polymerase chain reaction, whole mount in situ hybridization method, DNA/RNA injection system, anti-sense RNA/double-strand RNA injection and transgenesis were established and tested for set the optimal experiment of this research and development.

In order to isolate the specifically expressed genes during zebrafish development, we performed Ordered Differential Display(ODD) PCR and 363 different kinds of cDNA were isolated from 15 developmental stages of the zebrafish embryos and followed by nucleotide sequence analyses. As results, 65.3% of isolated cDNA clones were identified as novel genes.

The genes involved in vasculogenesis were also isolated by comparing the differential expression patterns between vasculogenesis defective-cloch

mutant and wild type zebrafish. As a result 31 genes were cloned as candidate genes for controlling the vasculogenesis and their expression patterns during embryogenesis were characterized by the whole mount in situ hybridization. Finally, 6 of 31 genes were further isolated as genes that might control the formation of blood vessels.

Among the isolated developmental control genes, several clones were fully characterized in their nucleotide sequence and functions as follows.

i) The Frizzled (Fz) family of cell-surface proteins are the receptors for Wnt /Wg proteins, by a number of genetic and biochemical criteria. We have isolated and characterized two complete cDNA clones, *Zfz8a* and *Zfz8b*, which encode zebrafish Frizzled (Fz) homologues. The predicted protein sequences, spanning 579 and 576 amino acid residues for *ZFz8a* and *ZFz8b*, respectively, were highly homologous (78%) to each other and contained an extracellular cysteine-rich domain and seven transmembrane domains that are well conserved in Fz receptor protein members.

In comparison with other Fz family members, *ZFz8a* and *ZFz8b* showed the highest homology with mouse *Fz8* (MFz8), sharing 84% and 76% amino acid identity, respectively. The presence of *Zfz8a* and *Zfz8b* transcripts was easily detected by *in situ* hybridization in zebrafish embryos. *Zfz8a* and *Zfz8b* are the first reported *fz* genes expressed in the organizer tissue of any vertebrate, as well as the first completely characterized *fz* cDNAs in zebrafish. Lithium perturbation induces radialized expression of *Zfz8a* and *8b* expression. Frizzled misexpression induces expanded expression of goosecoid and duplicated brain axis formation. Our results suggest a role for Frizzled in organizer and axis formation during embryogenesis.

ii) HMG gene is expressed from MBT to adult zebrafish embryo and its strong expression regions are brain, spinal cord. Function of HMG clone was assumed that the proliferation of neural tissue.

iii) Zebrafish neurolin-like gene is cell adhesion molecule of immunoglobulin superfamily. During the zebrafish neurogenesis, neurolin-like gene was expressed at the olfactory placode, tectum, r-2 trigeminal ganglion, otic vesicle, and Rohon-Beard sensory neuron. It means that Zebrafish neurolin-like gene was involved in axonal guidance.

iv) Novel secreted frizzled related protein(SFRP) gene is 1,904 bp and the predicted protein sequence is spanned 310 amino acid residues. *ZSFRP5* is expressed in a weakly and spatially restricted to prospective neuroepithelium at early neurula stage(10hpf). At later stages *ZSFRP5* expression is found in optic stalk, optic premodium, forebrain tip of anterior, rhombomere 1, 3, 5, otic placode, gut and heart. For functional analysis of *ZSFRP5*, we have

investigated with microinjection system of dsRNA. This experiment revealed that dsRNA treatment induces gene-specific defects at a relatively high frequency and the mechanism involves a reduction in the amount of endogenous mRNA. By microinjecting *ZSFRP* dsRNA, embryos defects eye formation.

v) In order to understand the expression and regulation of neuron-specific *HuC* promoter, we have cloned and characterized 5'-upstream region of zebrafish *HuC* gene. The 2.8kb of the 5'-flanking sequence is enough to restrict *HuC* gene expression in the neuron, and primer extension analysis identified one major transcription start site.

The core promoter spanning 251bp was found to have a CCAAT-box and one Spl sequence but proximal TATA-box was not present near the transcription start site. In vivo functional analyses revealed that MyT1 binding site and at least 17 E-box sequence are necessary to maintain the neuron-specificity of *HuC* expression.

vi) We firstly constructed transgenic zebrafish conferring fluorescence neurons using *HuC* promoter-GFP fused gene. In this transgenic zebrafish, almost all the neurons are visualized by the GFP fluorescence in living embryos and its temporal and spatial expression patterns for GFP were coincided with those of endogeneous *HuC* mRNA. When *HuC*-GFP transgenic fish was crossed with *mindbomb(mib)* mutant, the neuronal hyperplasia occurred in *mib* mutant can be easily characterized by its highly increased intensity of fluorescence by the neuronal hyperplasia occurred in the *mib* mutant fish. Therefore, the transgenic zebrafish that we developed can be used as a good model organism for analysing the functions of genes involved in the vertebrate neurogenesis and axogenesis.

In conclusion, we established zebrafish system as a model organism for the isolation of developmental control genes. Of 363 genes isolated and characterized, the five genes and one promoters were completely analyzed in their functions. In addition, all the neuronal cells in the transgenic zebrafish that we constructed were fluorescent, thus their neuronal network can be easily visible, thereby it is an important model organism can be used to reveal the function of the genes involved in the neurogenesis.

C O N T E N T S

I. Introduction	
A. Importance of Research and Development	38
1. Technological Aspects	38
2. Industrial Aspects	42
3. Social and Cultural Aspects	43
B. Aims and Scope	45
II. Research Process Overview	
A. World-wide Research	46
B. Domestic Research	49
III. Research Development Results	
A. Content of Research	51
1. Year 1	53
2. Year 2	54
3. Year 3	55
B. Materials and Methods	56
1. Establishment of zebrafish facility and maintenance	56
2. Collection of zebrafish embryo	56
3. Construction of cDNA library	57
4. Ordered Differential Display PCR	58
5. Full-size screening by plaque hybridization	61
6. DNA sequencing	61
7. Whole mount <i>in situ</i> hybridization	61
8. mRNA microinjection	62
9. Double-strand RNA injection	62
C. Results	63
1. Zebrafish model system set up	63
2. Isolation and verification of developmental control genes by ODD-PCR	75
2-1. Isolation of developmental gene and sequencing	75
2-2. Isolation of blood vessel specific genes	103
3. Isolation and functional analysis of full-size cDNA	109
3-1. <i>zfp8a</i> , 8b(zebrafish <i>frizzled</i>)	109
3-2. HMG	129
3-3. Zebrafish neurexin homologue gene	132

3-4. zSFRP5(zebrafish secreted frizzled related protein)	137
3-5. Drosophila ELAV-type RNA binding protein <i>Hu</i> family	146
4. Construction of transgenic GFP zebrafish for functional analysis of neuron-specific expression genes	152
4-1. Isolation and characterization of pan-neuronal <i>HuC</i> promoter	152
4-2. Construction and identification of transgenic GFP zebrafish	160
 IV. Research Schedule and Achievement	
A. Achievement of Research Development	163
B. Contribution and Impact of Research Development	166
 V. Application	
A. Application of Developmental Control Genes	167
B. Application of Established Technology	167
C. Application of Transgenic Zebrafish conferring Fluorescence Neurons	167
 VI. References	168

목 차

제 1 장 서론	
제 1 절 연구개발의 필요성	38
1. 기술적 측면	38
2. 경제, 산업적 측면	42
3. 사회, 문화적 측면	43
제 2 절 연구개발의 목적 및 범위	45
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 1 절 국외 기술개발 현황	46
제 2 절 국내 기술개발 현황	49
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 연구개발 수행 내용	51
1. 연구내용	51
가. 1차년도 연구내용	53
나. 2차년도 연구내용	54
다. 3차년도 연구내용	55
제 2 절 연구방법	56
1. Zebrafish 관리	56
2. Zebrafish embryo의 발생단계별 수집	56
3. cDNA library의 제조	57
4. Ordered Differential Display PCR	58
5. Plaque hybridization에 의한 full-size cDNA 분리	61
6. DNA sequencing	61
7. Whole mount <i>in situ</i> hybridization	61
8. mRNA microinjection	62
9. Double-strand RNA injection	62
제 3 절 연구결과	63
1. Zebrafish model system의 확립 및 생체기능분석 system의 확립	63
2. ODD PCR을 이용한 발생특이 유전자들의 분리 및 규명	75
가. ODD PCR을 이용한 발생특이 유전자들의 분리 및 염기서열 분석	75
나. 혈관발생 특이적 유전자들의 분리 및 확인	103
3. 발생특이 유용 유전자들의 full-size cDNA 분리 및 기능분석	109
가. <i>zfz8a</i> , <i>8b</i> (zebrafish <i>frizzled</i>) full-size cDNA의 분리	109

나. HMG clone의 full-size cDNA의 분리	129
다. Zebrafish neurolin homolog의 full-size cDNA 분리	132
라. zSFRP5 (zebrafish secreted frizzled related protein	137
마. Drosophila ELAV-type RNA binding protein인 <i>Hu</i> family 유전자의 분리 및 발현양상분석	146
4. 신경계특이적 발생 유전자들의 기능분석을 위한	
신경특이적 형광 transgenic zebrafish 제조	152
가. 신경 특이적 발현을 보이는 pan-neuronal <i>HuC</i> 유전자 promoter의 분리 및 구조 확인	152
나. 형광단백질을 신경 특이적으로 발현하는 transgenic zebrafish의 제조 및 확인	160
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	163
제 1 절 연구개발목표의 달성도	163
제 2 절 연구결과의 대외 기여도	166
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	167
1. 발생특이적 유용 유전자들의 활용계획	167
2. 유전자 발굴 및 기능분석 기술의 활용계획	167
3. 신경계 특이적 형광발현 transgenic zebrafish의 활용계획	167
제 6 장 참고문헌	168

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

세계적으로 Human Genome Project가 예정보다 빨리 진행됨에 따라 하등 및 고등 동물에서 새로운 유전자들이 속속 밝혀져 오고 있다. 현재까지 주 대상 생명체는 *C. elegans*, *Drosophila*, 효모, mouse 및 인체에 집중되어 오고 있어 이미 효모의 전체 유전자 염기서열 규명이 종료되었으며, 인체와 mouse의 염색체 유전자에 대한 contig map도 올해로 완전히 끝나서 인체는 0.7 cM, mouse는 0.2 cM의 resolution을 갖는 map이 완성되어 있다(Jordan *et al.*, 1996). 이에 따라 올해부터는 미국 NIH가 주관하는 대단위 염기서열 분석이 진행 중에 있으며 예상기간인 6년보다는 일찍 유전자 서열분석이 일찍 끝날 것으로 예상된다. 이뿐만 아니라 이미 경제성이 있는 소, 돼지, 닭 그리고 개 등을 포함한 여러 고등동물의 genome project도 세계 곳곳에서 이미 진행 중에 있다.

한편 이런 genome project에 의해 염색체 유전자 서열이 완전히 이루어지더라도 실제적으로 생체 내에서 발현되는 모든 유전자의 발굴에는 많은 시간이 소요되리라 예상되나, 적어도 인체의 각종 장기 및 조직에서 발현되는 유전자의 발굴에는 이미 세계적으로 많은 연구 그룹들이 참여하여 많은 연구 결과를 얻어 이를 발표하여 database에 들어가 있고, 일부 외국 기업체에서는 얻어진 연구결과들을 특허와 관련시켜 일반에게 공개하고 있지 않은 실정이다.

그러므로 세계적인 게놈해석과 분석연구의 진행속도 및 투자 재원 상황을 감안시에 후발 연구주자인 국내의 현재 초기 연구역량과 연구투자 비용으로 광범위한 게놈해석연구에 주안점을 두기보다는 적절한 animal model의 확립을 통한 척추동물의 발생, 분화 특이적 신기능성 유전자들을 연구개발대상으로 집중 연구하는 것이 시기적절하며 시리적이 면에서 유리하다고 판단된다.

척추동물의 발생과정 중 gastrulation과 segmentation기간은 각종 조직과 장기, 신경계 및 두뇌생성을 포함한 central nerve system, 그리고 척추와 근육 등의 주요 발생, 분화가 이루어지는 기간이다. 그러므로 새로운 발생 분화 조절 유전자들의 분리와 기능분석은 학문적 연구가치와 실제 응용성 면에서 모두 매우 유용하여 현재 세계적인 큰 연구관심 분야로 대두되고 있다.

현재까지의 발생, 분화 관련 유전자 분리 및 기능 분석에 대한 연구는 주로 초파리를 model로 한 연구가 주를 이루고 있다. 그러나 초파리는 무척추 동물로서 인체

를 포함한 고등척추 동물과는 세부적 발생, 분화 기작이 상이한 점이 많다.

한편 척추동물의 발생, 분화에 대한 새로운 유전자의 분리 및 규명에 대한 연구는 최근까지도 사용동물 model이 생쥐 등으로 한정되어 있어서 장기간의 연구기간이 소용되고 있고 더구나 발생과정중의 embryo를 직접관찰하기가 거의 불가능한 점등의 척추동물의 발생관련 연구 model과 연구방법의 한계성에 의해 현재까지도 이에 대한 연구가 세계적으로도 초기단계이다.

이런 점을 볼 때 아직도 분리 또는 규명되지 않은 인체 등의 orphan 유전자들의 상당부분이 발생 및 분화조절 관련 유전자들일 것으로 추정된다.

그러므로 세계적인 게놈해석과 분석연구의 진행속도 및 투자 재원 상황을 감안시에 후발 연구주자인 국내의 현재 초기 연구역량과 연구투자 비용으로 광범위한 게놈해석연구에 주안점을 두기보다는 적절한 animal model의 확립을 통한 척추동물의 발생, 분화 특이적 신기능성 유전자들을 연구개발대상으로 집중 연구하는 것이 시기적절이 며가 시기적절이 며에서 유리하다고 판단된다.

이에 따라 본 연구에서는 genetic analysis와 transgenic analysis가 동시에 가능하여 척추동물의 초파리 model로서 최근 각광을 받고있는 하등 척추동물인 zebrafish를 animal model(Kimmel C. B., 1989)로 하여 발생과정에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 대량으로 찾고 그 기능 연구를 시도하고자 한다. 본 연구팀이 zebrafish를 대상으로 하여 유전자들을 찾고자하는 이유는, zebrafish는 최근 세계적으로도 발생기작의 연구와 유전자 기능연구에 탁월한 장점을 갖는 animal model로 이미 인정을 받고 있으며 특히 새로운 유전자의 기능은 mRNA transcript들을 수정란에 집어넣어 이들이 embryo의 발생기간 중 미치는 영향을 직접 육안으로 볼 수 있고 또한 in situ hybridization을 통해 유전자 발현이 미치는 다른 유전자들의 down regulation도 투명한 embryo를 통해 조사할 수 있다. 따라서 한 번에 수 백개의 수정란을 이용하여 대량으로 유전자의 신 기능을 단기간 내에 연구하는데 zebrafish가 훌륭한 model로 이용될 수 있다(Driever 등., 1994) (zebrafish model의 자체적 장점은 후술 참조).

본 연구 개발에서는 위와 같은 장점을 갖는 zebrafish를 model로 하여 발생 및 분화 조절 특이성을 갖는 새로운 유전자의 체계적 발굴과 이들 유전자의 기능 연구, 분석체계의 구축이다. 이에 따라 1단계의 3년 기간동안 zebrafish의 발생기간 별 특이 발현성을 갖는 유전자들을 체계적으로 발굴하고 분석하여 발생, 분화 특이 유전자를 찾고 이들의 인체 homologue를 분리하며, 향후 Postgenome Era에 필수적으로 요구될 유전자 기능을 생체내에서 효율적으로 분석 가능한 기술 확보를 이룩하고자 한다.

현재 zebrafish genome 연구는 아주 초기 단계로 전 세계적으로 3-4개의 그룹만이 참여하고 있는데 우선 genetic marker를 개발하는데 주력하고 있다(Concordet

et al., 1994). 이는 하등 척추동물인 물고기의 발생 및 생명보존에 필요한 유전자 종류를 이해하는 것 뿐 아니라 나아가서 진화적 유전학을 이용하여 인체유전자 기능연구에 기여할 것으로 사료된다. 현재 많은 과학자들이 효모나 초파리 유전자 발굴에 힘쓰는 까닭은 단순한 개체에서의 생명보존에 관련된 유전자를 발굴하고 그 기능을 연구함으로써 생명 현상의 이해 뿐 만 아니라 고등 동물에서의 유전자 기능 연구에 기여할 수 있는 가능성 때문이다. 가령 *E. coli*의 유전자는 만개 정도인데 인체에서 발현되는 유전자가 10만 종류라면 이는 우선 생명 유지에 관련된 최소한의 유전자를 만개로 보고 인체 유전자는 이들 유전자의 반복 및 변화의 결과로 생각할 수 있다. 따라서 간단한 개체에서의 생명 유지에 관련된 기능이 밝혀진 유전자가 발굴되어 있으면 인체에서의 기능 연구에 상당히 기여할 수 있어서 현재 많은 연구자들이 박테리아, 효모, 초파리에서 발굴된 흥미로운 유전자의 human homolog를 찾는 일을 하고있다. 좋은 예로서 Genome project를 이용하여 *E. coli*의 DNA repair에 관련된 유전자의 human homolog를 찾고 보니 실제로 대장암에 관련된 유전자로 밝혀진 예가 증명하듯 간단한 개체에서의 발생 및 생명보존에 필요한 유전자를 발굴하고 그 기능을 연구하는 것은 복잡한 생명체의 발생 및 분화 기작 연구에 크게 기여할 것으로 예상된다.

그런 의미에서 진화적으로 사람과 상당히 먼 *E. coli*, 효모나 초파리보다는 현재 경쟁이 심하지 않은 하등 척추동물인 물고기에서 유전자를 발굴하고 기능 연구를 한 후 인체의 homolog를 찾는 전략이 고유의 유전자 영역의 구축과 신규 유용 유전자의 확보 면에서 국가적으로도 실리적인 면이 있고 향후 진행될 인체 유전자 기능연구에 한층 기여할 것으로 사료된다. 이에 대한 구체적인 이유들은 다음과 같다.

◎ 첫째, 세계적으로도 척추동물의 발생, 분화 특이적 유전자들의 대량 발굴은 아직 시도된바 없어서 현재까지 발굴되어 있지 않은 새로운 독자적인 유전자원을 확보할 수 있고,

◎ 둘째, 발생과정은 모든 장기와 조직의 생성 및 세포 분화과정이 일어나므로 발굴되어 얻어질 유전자 및 그 산물의 산업적인 응용가능성이 높아 가시적인 경제 파급효과가 기대되며,

◎ 셋째, 세계적으로도 유전자들의 발굴이 어느 정도 이루어진 후에는 유전자의 기능분석 연구가 필수적인 핵심 기술로 대두될 것이며

◎ 넷째, 연구대상인 zebrafish는 genetic analysis가 곤란한 frog나 복어와는 달리 genetic study가 잘 연구되어 있으며, 대량의 transgenic analysis도 간편하고 빠른 결과를 얻을 수 있어서(Driever *et al.*, 1994)척추동물의 초파리로 알려져 있다.

Zebrafish model 의 장점

- 인체의 유전자와 크기와 수가 비슷하며, 더욱이 단백질간의 상동성도 80%로 매우 높아 기존의 알려진 인체 유전자의 기능유추도 손쉬우며 발생을 포함한 생체유전자 기능연구에 기술적, 경제적인 많은 장점이 있다.
- 이에따라 세계적으로도 최근에 대표적인 type organism으로 각광을 받기 시작하고 있어서 4,800종의 각종 mutant line이 제조되어 있고, 발생기간이 48 시간 미만으로 유전자의 기능을 짧은 시간내에 확인하기가 용이하다.
- Gynogenetics가 가능 하여 haploid 상의 발생에 의한 homozygote를 쉽게 얻을 수 있다.
- Transgenesis가 간편하다.
- 또한 embryo가 투명하여 발생기간동안의 유전자 기능 분석을 위한 세포의 이동 및 특성화와 조직의 구성을 확인하기가 쉬워 유전자 발현효과 및 그 기능의 연구 재료로 적당하다.
- 또한 개체의 크기도 3 cm미만으로서 실험실에서 대량 번식 유지가 가능하고, egg도 마리당 일주일내 600-1,000개씩 얻을 수 있어 척추동물의 발생 유전자의 기능분석에 매우 적합하여 연구방법의 효율성과 함께 경제적인 연구가 가능하

인체를 포함한 고등동물의 발생 분화조절 유전자는 직접 해당 고등동물에서 분리하는 것은 연구방법상 거의 불가능하며 혹시 분리되더라도 생쥐나 인체 등에서 직접 그 기능을 밝히는 것은 불가능하다. 이 반면 하등동물에서는 발생, 분화 단계별 시료채취가 비교적 용이하여 발생 분화조절 유전자들을 대량으로 분리할수 있는 가능성이 높으며 이들 발생, 분화 관련유전자들은 특히 인체를 포함한 고등 포유류의 유전자와 매우 높은 상동성을 갖고 있다. 발생, 분화 관련유전자들은embryo의 발생 및 세포의 분화조절에 주작용을 하는 것이 일반적으로 알려져 왔으나 이외에도 인체의 각종질병 유발 유전자들로 작용하고 있다는 것이 최근 1-2년 사이에 입증되고 있다 (다음 page 참조). 이런 사실은 인체의 질병관련 변이 유전자를 신규로 확인해낸후 그 유전자의 기능을 모르는 상태에서 database 검색시 이들 질병 유발 인체 유전자들이 하등동물의 밝혀진 발생조절 유전자와 높은 상동성을 보여 이를 통한 유전자 변이가 일으키는 인체 질병 유발 기작을 이해할 수 있는 실마리를 제공하기 때문이다. 따라서 발생 및 분화 조절 관련 유전자들은 하등동물을 model로하여 유전자의 분리와 기능을 확인한 후 인체 등의 homolog를 분리해 유전자 산물을 직접 산업화하거나 혹은 이들의 인체 염색체 유전자의 위치를 규명해 나감으로서 인체질병관련 기작을 규명하여 변이가 일어난 비정상적인 유전자 산물을 밝혀 치료제 개발의 대상으로 삼는 연구전략이 필요할 것으로 생각된다. 이런 전략의 기술적인 가능성을 보여주는 실제적인 예는 다음과 같다.

- 인체 oncogene인 *wnt-1* 유전자는 초파리의 날개 세포 증식과 형성에 관여하는 *wingless* 유전자의 인체 homologue임이 밝혀짐
- 초파리의 *wingless* 유전자를 억제하는 유전자로 분리된 *patched* 유전자의 인체 homologue는 가장 일반적인 피부암의 일종인 Basal Cell Nevus Syndrome의 원인 유전자로 밝혀져 *patched* 유전자는 developmental gene 중 최초로 tumor suppressor gene의 작용을 하는 유전자로서 밝혀짐(Hann, H. Cell, 86. 841-851, 1996)
- 신경분화에서 lateral inhibition을 일으켜 cell fate의 결정을 하는 *notch* 유전자는 초파리에서는 1종이나 고등동물에서는 5종으로 존재한다. 인체에서 stroke나 dementia를 유도하는 치명적인 유전병인 CADASIL 질병유발 유전자의 분리결과 그 유전자가 *notch-3* 유전자의 homologue이며 유전자 변이가 발생해 있음을 확인하여 이들 *notch* 유전자는 신경발생뿐 아니라 변이시 비 콜레스테롤성 동맥경화를 유발하는 질병을 유발함이 밝혀짐(Joutel, A. 등, Nature, 383, 707-710, 1996)
- Alzheimer's disease를 유발하는 presenilin 유전자는 *C. elegans*의 *notch* 유전자인 *lin-12*의 suppressor인 *sel-12* 유전자의 homologue임이 밝혀짐(Levitan, D. and Greenwald, I., 1995; Duff, K. 등, Nature, 383, 110-113, 1996)

2. 경제, 산업적 측면

Genome project가 출범 초기까지도 genome project 자체에 대한 연구의 성공여부 그리고 얻어질 연구결과의 공익적인 파급효과에 대한 회의적인 의견도 많이 대두되었다. 그러나 현재까지의 연구진행 속도 및 연구결과 그리고 부차적인 신 연구기술의 확보속도 등으로 인하여 높은 연구 가치들이 증명되었으며 이를 상업화하는 기업들도 속속 탄생되고 있어 이미 경제, 산업적으로 미칠 영향의 중요성은 입증되어 있다. 따라서 이런 새로운 의료기술을 포함한 전반적 생명공학 산업기술에 지대한 영향을 주게될 genome project가 국내에서도 수행되어야함은 종속적인 기술의존도를 탈피하여 장래의 선진 기술입국을 추진하고있는 국가정책에도 잘 부합되고 있다. 그러나 현시점에서 볼 때 genome project의 후발주자로서, 한정된 연구 인력과 연구비로 시작하는 국내 연구는 아래와 같은 현재까지의 국제적 연구 진행 상황과 이의 연구결과들을 감안할 때 구미 선진국과 동일한 대상에 대해 연구를 하며 경쟁하기보다는 실질적으로 산업화가 가능한 유전자들을 대상으로 하는 것이 실리적인 면에서 우선적으로 필요하다고 생각된다.

◎ 이미 인체의 chromosome들은 선진국에서 6년 전부터 대단위 연구를 시작하여 몇몇 chromosome들에 대한 mapping은 끝났으며 나머지도 상당부분 진행이 되

어있는 실정이다(Marchall *et al.*, 1996). 따라서 더 이상의 인체 orphan chromosome은 존재하지 않으므로 연구를 시작하더라도 얻어질 결과들의 국제 경쟁력이 약하다고 보여진다.

◎ 더구나 금년부터는 미국 NIH 주관하에 6년간의 대단위 genomic DNA sequencing이 시작되며, 또한 얻어진 인체 genomic DNA sequence는 즉각적으로 일반에게 공개하도록 되어 있다(Dickson *et al.*, 1996). 이에 따라 인체 염색체 유전자 mapping과 sequencing에 대한 연구는 선발주자들에 비하여 국제경쟁력이 없다고 생각되며 특히 실리성이 부족하다고 생각된다.

◎ 또한 인체의 cDNA sequence인 Expressed Sequence Tag (EST)도 이미 GenBank/EMBL data base에 200,000개가 발표되어 있어서 아직 발굴되지 않은 유전자는 발현시기, 발현부위가 매우 특이적이거나, 또는 발현성이 극히 적은 것으로 보여지고 있으므로 이들에 대한 발굴은 쉽지 않을 것으로 예상된다.

위와 같은 사항을 고려한다면 시작단계인 국내 genome project 연구는 뚜렷한 새로운 기술 없이 선진국들에 의해 상당부분이 수행되어진 인체 유전자의 발굴에 뒤늦게 참여하여 이미 발굴되어진 유전자들을 중복적으로 확인하는 결과를 초래할 확률에 연구비와 시간 및 노력을 투자하기보다는, 선진국들과는 좀 다르면서도 실질적인 유용 유전자 영역을 확보할 수 있는 경제적인 연구내용과 함께 Human Genome Project 이후의 차세대 기술확보인 유전자 기능 분석 방법 확립에 초점을 두는 것이 바람직하다고 생각된다.

따라서 본연구 개발과제의 연구 개발 대상인 발생,분화 특이적 유전자들의 체계적 발굴과 유전자 기능 분석 기술 확립은 한국고유의 유전자 영역도 구축할 수 있으며 이를 통하여 얻어질 연구결과들은 신기능성 물질의 생산 및 질병 치료제 등에 직접 응용할 수 있어서 국내의 생명공학 관련 산업의 활성화에 도움을 줄 수 있다.

3. 사회. 문화적 측면

유전정보는 두 가닥의 DNA내에 존재하며 모든 생체의 기능을 조절한다는 것이 밝혀진 이래 생물학분야는 지난 반세기간 급속한 발전을 거듭해 왔으며 이에 따라 각종 질병의 치료를 위한 의학분야의 발전이 가장 현저히 이루어져오고 있어 학술적인 발전 뿐 아니라 인류의 복지향상에 실질적인 기여를 하여왔다. 이런 유전자연구를 바탕으로 한 연구의 발전과 그 연구결과의 사회적 파급효과의 근원은 30년 이상 지속되고 있는 암의 정복을 위한 대단위 연구과제들에 대한 집중적인 연구지원과 연구발전을 위한 노력의 산물들이다. 이에 따라 아직도 직접적인 암의 완전 정복은 성취하지 못하였으나 부수적으로 유전자와 직접 연관된 분자생물학의 탄생과 발전이 이루어지게 하여 관련 세포생물학, 생화학, 분자유전학 등의 연구결과들이 함께 발전됨으로써 직간접으로 많은 질병의 원인과 치료방법을 제시하여 주었다.

Human Genome Project(Marshall *et al.*, 1996)는 24종류의 인체 염색체내의 유전자 지도의 작성과 그 유전자 서열의 완전규명을 목적으로 1990년 10월 1일 공식적으로 미국 국립 보건연구원 (NIH)의 주관 하에 미국 국책과제로 시작되어 현재 6년간 진행되어 오고있으며 유럽 선진국들도 비슷한 수준으로 연구해 오고 있다. 이런 Human Genome Project의 직접적인 동기는 인체유전자들에 개체마다 달리 존재하는 polymorphism을 찾아내고 이를 marker로 이용하여 인체 유전 질병 유전자의 확인을 목적으로 한 restriction fragment length polymorphism (RFLP)의 연구가 1979년부터 성공적으로 이루어지면서 나타나게 되었다. 이런 3,000,000 kb 크기의 인체 유전자를 대상으로 모든 유전자의 위치와 그 염기 서열을 모두 밝힌다는 계획은 처음에는 연구계획 자체가 무모하고 얻어질 연구결과의 공익적인 파급효과에 많은 의문과 논란이 있어왔다. 그러나 거의 6년동안 연구가 진행되어온 현재 Cystic Fibrosis, Huntington disease 및 Alzheimer 등의 대표적 유전병 유전자 위치들과 변이부위들이 밝혀졌으며 그 외에도 Cololectical cancer 및 breast cancer 등의 수많은 암 유발 유전자 및 p53 등의 암 억제 유전자들도 밝혀진바 있어 사회적인 측면에서의 공익적 공헌도에 따른 연구의 중요성 및 필요성은 완전히 입증되어 있다.

이런 Human Genome Project의 공익적인 필요성에 따라 현재는 산업적 및 질병미생물들과 효모 그리고 다양한 종류의 경제적 이용가치가 있는 가축들을 대상으로 한 연구가 진행되어오고 있다. 이에 따라 현재는 인체의 염색체 유전자만을 대상으로 한 Human Genome Project로서가 아니라 여기서 파생된 지식과 연구방법을 모체로 한 넓은 범위의 의미를 갖는 Genome Project들이 genomic DNA 및 cDNA 연구를 대상으로 하여 구미와 일본을 포함한 선진국들간에 광범위하게 진행되고있어서 향후 10년 이후에는 이들로부터 얻어질 다양한 연구결과들을 놓고 세계적으로 치열한 경쟁을 벌이고 있다.

이런 Genome Project들로부터 얻어질 직접적인 연구 결과들에 의해 의학과 농학 분야 및 생명공학 신소재 개발과 환경분야들의 획기적인 발전이 예상되며, 간접적인 효과로서는 자동화가 어려운 생명공학 연구개발과정의 자동화 및 새로운 연구방법과 연구 기기 및 장치 등을 포함한 다양한 technology 개발과 같은 부수적인 파급효과가 산업전반에 걸쳐 이루어 질 것으로 생각된다. 이런 사회 전반적인 파급효과에의 예측은 1960년대의 우주산업 개발의 결과로 인해 현대와 같은 첨단소재, 반도체 등의 전자산업 그리고 digital시대의 통신산업 등의 혁신이 이루어 진 사실을 볼 때 지나친 과장이 아니라고 생각된다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

본 연구개발은 현재까지 세계적으로 시도된바 없는 척추동물 발생 특이적 유전자들을 대량 분리, 확인하고 생체기능 확인 방법을 확립함으로써 현재까지 밝혀져 있지 않은 유용 생리활성 물질 생산 유전자들의 확보를 목표로 하고 있다.

이에따른 구체적인 연구개발의 최종 목표는 아래와 같다.

- ◎ 발생특이 유전자 단편들을 분리하기 위한 Ordered Differential Display PCR(ODD PCR) 방법의 확립 및 이를 이용하여 발생단계별 총 300개 이상의 발생특이 유전자 단편의 분리.
- ◎ mRNA microinjection과 whole mount *in situ* hybridization 및 double-strand RNA injection을 이용한 유전자 기능확인 방법 확립.
- ◎ 약 10개의 발생특이 신규 Full-length cDNA들의 분리와 이들의 기능분석.
- ◎ 상기의 연구목표를 통한 발생특이 신기능성 유전자군의 대량확보.
- ◎ 신경세포의 발생 및 분화에 관련된 신경특이적 유전자들의 기능확인을 위한 신경계 특이적 형광을 나타내는 transgenic zebrafish의 제조 및 분석.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

발생분화 기작을 조절하는 유전자의 대량분리와 그 기능 규명에 대한 연구는 아직 세계적으로도 시작된 바 없다. 그러나 신경발생 등과 같은 특정 생체부위의 발생조절 기작에 대한 연구들이 최근에 활발히 수행되어져오고 있으며 대부분 초파리 등의 무척추동물을 대상으로 한 분자 발생학적 연구가 주를 이루고 있다. 한편 최근 들어서 초파리와는 달리 척추동물에서는 매우 세분된 발생조절이 이루어지며 이에 따른 발생 조절 유전자들의 다양성이 보고되고 있다. 그럼에도 불구하고 mouse와 같은 척추동물의 발생 조절 유전자들에 대한 연구는 embryo 내에서의 기능을 밝히는 데에 현재까지는 여러 가지 기술적인 한계성이 있어서 큰 진전을 보이지 않고 있다. 따라서 발생과정 특이성을 보여주는 유전자의 생체내 기능을 밝히기에 적합한 동물 model이 확보될 수 있다면 아직까지 세계적으로도 연구되어져 있지 않은 척추동물 발생조절 유전자들의 대량발굴은 거대한 유전자원의 금광이나 다름없다. 이에 따라 최근 7년 사이에 zebrafish의 특정 발생 단계에 변이가 일어난 mutant들을 중심으로 한 유전자의 발굴작업과 기능연구가 세계적인 연구관심사로 부가되고 있다.

1. Zebrafish의 연구동향

Zebrafish는 열대어로서 최근 들어 아주 유용한 척추동물의 model system으로 각광받고 있다 (Postlethwait *et al.*, 1994). 이는 이 zebrafish model이 experimental embryology와 함께 genetic analysis에 모두 사용하기가 손쉬운 점이 있어서 복잡한 embryological manipulation에만 주로 이용되고 있는 frog과 chicken, 또는 advanced genetics에만 주로 이용되고 있는 mouse에 비하여 embryology와 genetic analysis에 모두 사용될 수 있어 훨씬 유용함이 증명되었기 때문이다 (Driver *et al.*, 1994). 이런 zebrafish model의 알려진 장점들은 다음과 같다.

(1) Sexual maturation기간이 3-4 개월로 짧고, 성체의 크기도 3-4 cm 미만으로 작아서 실험실에서 대량 유지가 손쉽고 빠르며 발생기간 중 gastrulation이 12 시간후에 끝나고 48 시간 이후에 알에서 hatching이 되므로 단기간 내에 유전자 기능을 확인할 수 있다.

(2) 수정란 및 미 수정란을 쉽게 채취할 수 있고 수정에 의한 diploid 및

parthenogenetic diploid의 제조가 가능하여 mutational analysis가 쉽다.

(3) 알도 마리 당 2일에 1번씩 200개 이상 얻을 수 있어서 대량으로 유전자 주입에 의한 발달, 분화 과정의 연구가 가능하다.

(4) egg의 크기가 비교적 크고 (0.7 mm) 투명하여 microinjection이 용이하며 이에 따른 transgenic fish line도 손쉽게 안정성 있게 구축될 수 있을 뿐 아니라, genetic mosaic fish도 제조 가능하므로 gene interaction과 function을 쉽게 관찰할 수 있다.

(5) embryo가 투명하여 cell movement도 눈으로 확인이 가능하다. 따라서 cell lineage의 분석도 가능하며, 주입된 유전자의 기능을 살아 있는 상태의 embryo에서 직접 관찰할 수 있는 유일한 척추동물이다.

(6) 하등 척추동물이지만 고등 포유동물과 매우 상동성이 높은 단백질의 구조를 갖고 있어 얻어진 결과를 직접 인체의 유전자 기능과 연결시킬 수 있다.

(7) 전체 염색체 유전자의 크기가 1.7×10^6 kb로서 인체 유전자의 3/5 크기에 해당되므로 다양한 유전자들을 갖고 있다.

(8) Mutant의 제조가 손쉬우며 이에 따라 이미 전세계적으로 4,800 종 이상의 유용한 mutant line이 존재하고 있으며 25개의 chromosome에 대한 genetic map도 상당부분 이루어져 오고 있다(Postlethwait *et al.*, 1994).

2. Zebrafish를 이용한 연구의 세계적 동향

척추동물의 발생은 일반적으로는 초파리에서 밝혀진 발생기작을 기본으로 하고 있으나 무척추 동물과는 생체 기본구조가 크게 차이가 나므로 초파리에서 밝혀진 body plan을 직접 적용하기는 어렵다. 이에 따라 척추동물의 발생에 미치는 유전자들의 기능을 연구하기 위해서는 embryo에서 mutant제조 및 유전자의 분리가 가능하고 정상적인 유전자를 도입하는 대단위 transgenic system의 동물 model이 필요하다. 이런 관점에서 볼 때 zebrafish는 상기에 언급된 바와 같이 대표적인 척추동물 model인 frog, chicken 그리고 mouse등과 발생기작이 비슷하고 연구 기술적인 면에서도 많은 장점이 있고, embryogenesis 기간중의 cellular study와 genetic analysis가 함께 가능한 우수한 척추동물 발생 model로서 각광을 받기 시작하고 있다. 이에 따른 세계적 연구 분야와 연구 동향은 다음과 같다.

가. University of Oregon

University of Oregon은 zebrafish연구의 발생지이며 집중적인 zebrafish 연구가 이루어지고 있으며 주로 mutant line제조를 통한 발생변이 유전자의 분리에 초점을 두고있다. Oregon 대학 신경과학연구소의 연구 그룹들의 연구결과와 진행현황은 다음과 같다.

Postlethwait 교수 group은 zebrafish의 contig map을 작성하는 연구를 수행하

여 현재까지 652개의 random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) marker들을 확인하였고(Johnson *et al.*, 1996) 13개의 simple sequence repeat들을 확인한바가 있다.

같은 대학 연구소의 Kimmel 교수는 일찍이 후손세포 추적실험을 통하여 gastrula의 각각의 세포는 한정된 조직으로 분포되고 gastrula 시기의 세포위치가 후손세포의 운명을 결정하는데 영향을 미친다는 사실을 밝혔다. 한편 최근에는 발생단계의 특정세포를 제거하기 위한 laser ablation 실험방법을 이용하여 특정세포가 발생과정에서 결여되었을 때 야기되는 표현형질을 관찰함으로써 특정세포와 유전자의 기능을 유추하는 연구들을 수행하여 오고 있다. 이외에도 발생 조절 유전자들을 확인하기 위하여 각종 mutant zebrafish line들을 확립하는 연구를 수행하고 있으며 최근 muscle과 floor plate mutant는 tail 형성유전자의 이상과도 관련이 있음을 보고하였다 (Halpern *et al.*, 1993).

또한 Eisen 교수등은 neuron과 neural crest cell의 발달과정을 주 연구로 수행하여 오고있으며(Raible *et al.*, 1994). Andrews교수 연구팀은 haploid screen 방법을 이용하여 발생과정에서 중요한 역할을 하는 유전자를 분리하는 실험을 해오고 있다. 대부분의 돌연변이 표현형질에 반영되는 유전자들이 열성이므로 이런 haploid screen은 발생조절 유전자 연구에 좋은 방법으로 알려져 있다. 예로서 haploid 발생란은 전형적으로 몸이 짧고 굽으며, 눈 및 두뇌의 형성이 미숙하다. 따라서 haploid 발생란 생성과정 중에 야기된 염색체 유전자의 변이 부위는 PCR 기법을 통해 쉽게 발굴될 수 있다.

나. 독일 막스 프랑크 연구소 연구그룹

초파리에서 homeotic selector gene의 연구로 1995년 노벨상을 수상한바 있는 Nusslein-Volhard 박사 연구진들도 최근 7년전 부터 zebrafish를 이용한 발생조절 유전자의 연구를 수행하여 오고 있다. 연구방법은 saturation screening(포화 돌연변이)방법을 이용하여 표현형질이 서로 다른 1600개 이상의 돌연변이체들을 개발해왔다(Haffter and Nusslein-Volhard, 1996). 이들 돌연변이체들 중 40%는 척추동물의 중앙신경계를 형성하는데 관여하는 표현형질에 변이를 보이고 있어서 이들의 분자유전학적인 분석은 척추동물의 중앙신경계 분화 및 발달에 관여하는 결정적인 유전자를 분리하고 규명하는데 큰 공헌을 할 것으로 예상되고 있다. 이방법은 Oregon 대학의 Kimmel 교수 미국 Havard 의과대학의 Driever 교수 그리고 미국 Utah 대학의 Grunwald 교수 연구 그룹들도 적용하고 있다. 또한 Nusslein-Volhard 연구 팀은 zebrafish의 embryonic stem (ES) cell을 개발을 시도하고 있어서 미국 MIT 대학의 Hopkins 교수연구팀과 경쟁을 벌이고 있다.

3. 향후의 연구방향

상기와 같은 zebrafish의 척추동물 발생연구의 용이성으로 인하여 노벨상 수상

자들을 포함한 여러 연구 그룹들이 계속적으로 이 분야로 진입하고 있다. 이에 따른 연구의 발전 즉, 분자유전학적 및 돌연변이 유전학적인 연구내용과 연구방법들의 발전에 따라 장기적으로는 척추동물의 발생과정, 특히 뇌, 심장, 시각, 후각 그리고 중양 신경계의 발달과 분화과정에 관여하는 유전자들의 기능이 점차적으로 밝혀질 것으로 전망된다. 또한 이런 척추동물의 발생 분화에 대한 이해는 곧 조직과 장기의 재생에도 직접적으로 관여되므로 향후 20년간은 중요학문분야로 자리잡을 것으로 보인다.

한편 본 연구 그룹이 시도하고자 하는 연구접근방법은 이들 세계적 연구 그룹이 수행하고 있는 연구방식과는 다른 reverse genetics의 개념으로서 각 발생 시기 별로 다량의 발생 분화과정 유용 유전자들을 체계적으로 분리하고 이들의 기능을 zebrafish의 발생단계의 embryo에서 확인함으로써 비교적 단시간에 많은 유용유전자를 경제적인 방법으로 확보하고자 함을 연구전략으로 하였다. 이런 연구 전략의 최대 관문은 얼마나 많은 유전자들을 단 시간내에 분리하고 발생단계별로 분류할 수 있는지 이다. 이에 따라 본 연구팀에서는 발생 분화과정 유용 유전자들을 효과적으로 분리하는 방법으로서 소련의 Sergei Lukyanov에 의해 개인적으로 발표된 이론을 이용하여 본 실험실에서 독자적으로 Ordered Differential Display PCR (ODD-PCR) 방법을 확립하여 각 발생단계별로 발현되는 유전자들을 단편을 제조하고 이들에 대해 full-length cDNA의 분리와 염기서열분석 그리고 zebrafish embryo에서의 유전자 기능확인을 수행하고자 하였다.

따라서 본 연구과제의 핵심은 새로운 ODD-PCR 방법의 장점을 학술적이나 산업적 파급효과가 큰 발생 특이성 유전자들을 대상으로 적용시킨것이므로 연구개시 시기와 연구 집중도가 국제적인 경쟁력을 갖는 연구결과를 얻는데 매우 중요할 것으로 생각된다.

제 2 절 국내 기술개발 현황

국내에서는 zebrafish (*Danio rerio*)가 본연구계획의 연구책임자인 경북대학교 유전공학과 허태린 교수의 연구실에서 4년 전부터 유일하게 유지되어져오고 있다. 현재까지의 직접적인 관련 연구경험은 zebrafish의 neurogenesis 과정중 neuron의 초기단계인 neural plate의 precursor인 neuroblast와 epidermal cell들의 운명을 결정하는 lateral inhibition을 일으키는 Notch 유전자들에 대한 분리 확인과 기능 연구를 일본 오사카 대학과 공동으로 수행하였다. 또한 미국의 NIH내의 NICHD에서 Zebrafish neurogenesis(A.J Chitinis) 및 organogenesis(B.M Weinstein)그룹과 ODD-PCR을 이용한 wild type과 mutant에서의 유전자 분리연구를 수행하였다. 이에 따라 이미 핵심 기술인 microinjection과 whole mount *in situ* hybridization기술도 확립되어 있다.

이와 유사한 연구로서는 고려대학교 김현 교수는 본 연구자들과 공동으로 뇌 발생 및 발달 관여 유전자 기능 연구를 zebrafish에서 수행하고 있으며, 충남대학교 이명철 교수 연구실도 zebrafish의 thyroid hormone receptor가 머리 발생에 미치는 영향 등에 대하여 연구하고 있으며 전북대학교 고규영 교수 연구진은 zebrafish를 이용한 심장 순환계 발생 유전자 기능 연구를 수행하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 내용

1. 연구내용

척추동물의 발생과정 중 gastrulation과 segmentation기간은 각종 조직과 장기, 신경계 및 두뇌생성을 포함한 central nerve system, 그리고 척추와 근육 등의 주요 발생, 분화가 이루어지는 기간이다. 그러므로 새로운 발생 분화 조절 유전자들의 분리와 기능분석은 학문적 연구가치와 실제 응용성 면에서 모두 매우 유용하여 현재 세계적인 큰 연구관심 분야로 대두되고 있다. 현재까지의 발생, 분화 관련 유전자 분리 및 기능 분석에 대한 연구는 연구의 어려움으로 인하여 주로 초파리를 model로 한 연구가 주를 이루고 있다. 그러나 초파리는 무척추 동물로서 인체를 포함한 고등척추 동물과는 세부적 발생, 분화 기작이 상이한점이 많다.

한편 척추동물의 발생, 분화에 대한 새로운 유전자의 분리 및 규명에 대한 연구는 최근까지도 사용동물 model이 생쥐 등으로 한정되어 있어서 장기간의 연구기간이 소용되고 있고 더구나 발생과정중의 embryo를 직접관찰하기가 거의 불가능한점 등의 척추동물의 발생관련 연구 model과 연구방법의 한계성에 의해 현재까지도 이에대한 연구가 세계적으로도 초기단계이다. 이런 점을 볼 때 아직도 분리 또는 규명되지 않은 인체 등의 orphan 유전자들의 상당부분이 발생 및 분화조절 관련 유전자들일 것으로 추정된다.

이에 따라 본 연구에서는 genetic analysis와 transgenic analysis가 동시에 가능하여 척추동물의 초파리 model로서 최근 각광을 받고있는 하등 척추동물인 zebrafish를 animal model로 하여 발생과정에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 대량으로 찾고 그 기능 연구를 시도하고자 한다. 본 연구팀이 zebrafish를 대상으로 하여 유전자들을 찾고자하는 이유는, zebrafish는 최근 세계적으로도 발생기작의 연구와 유전자 기능연구에 탁월한 장점을 갖는 animal model로 이미 인정을 받고 있으며 특히 새로운 유전자의 기능은 mRNA transcript들을 수정란에 집어넣어 이들이 embryo의 발생기간중 미치는 영향을 직접 육안으로 볼수있고 또한 in situ hybridization을 통해 유전자 발현이 미치는 다른 유전자들의 down regulation도 투명한 embryo를 통해 조사할 수 있다. 따라서 한 번에 수 백개의 수정란을 이용하여 대량으로 유전자의 신 기능을 단기간 내에 연구하는데 zebrafish가 훌륭한 model로 이용될 수 있다

본 연구 개발의 목표는 위와 같은 장점을 갖는 zebrafish를 model로 하여 발생 및 분화 조절 특이성을 갖는 새로운 유전자들의 체계적 발굴과 이들 유전자들의 기능 연구 및 분석체계를 구축하는 것이다. 이에 따라 1단계의 3년간 동안 zebrafish의 발생기간별 특이 발현성을 갖는 유전자들을 체계적으로 발굴하고 분석

하여 발생, 분화 특이 유전자를 찾고 이들의 인체 homologue를 분리하며, 향후 Postgenome Era에 필수적으로 요구될 유전자 기능을 생체 내에서 효율적으로 분석 가능한 기술 확보를 이룩하고자 하였다.

이런 연구 목표의 달성을 위한 최대의 관문은 얼마나 많은 유전자들을 단 시간 내에 분리하고 발생단계별로 분류할 수 있는지 이다. 이에 따라 본 연구팀에서는 발생 분화과정 유용 유전자들을 효과적으로 분리하는 방법으로서 소련의 Sergei Lukyanov에 의해 개인적으로 발표된 이론을 이용하여 본 실험실에서 독자적으로 Ordered Differential Display PCR (ODD-PCR) 방법을 확립하였다.

ODD-PCR 방법은 현재까지 Liang과 Pardee에 의해 개발되어 일반적으로 널리 사용되고있는 Differential Display Polymerase Chain Reaction (DD-PCR) 방법과는 달리 매우 높은 정확도를 갖고 있어 발현성이 차이가 나는 유전자나 message가 낮은 유전자들도 효율적으로 확인할 수 있는 방법이다. 즉 기존의 DD-PCR 방법은 arbitrary 10 mer의 PCR primer를 사용함으로써 PCR-error에 의한 70 %이상의 false positive band가 나타나는 것이 단점으로 지적되어 왔다. 이에 비하여 ODD-PCR 방법은 adaptor를 이용한 suppression PCR 기술과 일반적인 Differential Display PCR 기술을 동시에 이용함으로써 첫째, 동일 시료에 대한 PCR의 재연성을 높이고, 둘째, false positive band의 형성을 완전히 제거할 수 있어서 발현성이 차이가 나는 유전자들만 분리할 수 있으며, 셋째, 낮은 빈도로 발현되는 유전자들도 체계적으로 탐색할 수 있는 방법이다.

이에 따라 본 연구팀에서는 zebrafish의 각 발생단계별로 mRNA를 분리한 후 ODD-PCR을 수행하여 각 발생단계별로 특이적으로 발현되는 유전자들에 대한 3'-UTR 단편을 분리하고 이들에 대한 분석을 2년 내에 모두 마친 후, 이들을 대상으로 antisense RNA probe를 이용한 whole mount in situ hybridization을 수행하여 이들의 발생에서의 시간적, 공간적 발현양상을 확인함으로써 발생에서의 유용 유전자들을 선별한 후 이들 유용 유전자들에 대해 full-length cDNA의 분리와 염기서열분석 그리고 zebrafish embryo에서의 DNA 및 RNA injection system을 이용한 유전자 기능확인을 수행하고자 하였다.

이러한 연구목표를 달성하기 위하여 수행된 연구의 내용은 다음과 같다.

가. 1차년도 연구내용

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1996)	◎ Model animal 유지 및 번식	<ul style="list-style-type: none"> - Animal model 재배 장치의 조직적인 설계 및 제조 - Animal model 의 유지 번식 및 산란의 확대
	◎ 유전자 생체 기능분석 system의 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 수정란에 대한 DNA, mRNA microinjection system 구축 - 수정란에 대한 antisense RNA 를 이용한 whole mount <i>in situ</i> hybridization system 구축 - 수정란에 대한 double-strand RNA injection을 통한 유전자 발현 저해 system 구축
	◎ 유전자 생체기능분석 system의 검증 및 활용	<ul style="list-style-type: none"> - Human unknown 유전자 및 zebrafish의 발생특이 유전자들의 mRNA를 이용한 microinjection 및 whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통한 생체기능분석 system의 검증 및 활용
	◎ 총 10단계의 발생 단계별 Ordered Differential Display PCR에 의한 발생특이 유전자의 분리 및 whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통한 발현양상 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 총 10단계의 발생단계별 embryo에서 mRNA의 분리 - Double strand cDNA의 제조 - A tail fragment pool의 준비 - Subset의 증폭 및 전기영동 - Subcloning and sequencing - Whole mount <i>in situ</i> hybridization 을 통한 유용 유전자 발굴
	◎ Developmental stage별 cDNA library 제조 (총5종)	<ul style="list-style-type: none"> - 발생단계별 embryo의 수집과 mRNA분리 - Oligo dT primer 및 random primer를 이용한 발생 단계별 cDNA library 5종 제조

나. 2차년도 연구내용

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
2차년도 (1997)	<p>◎ 총 10 단계의 발생 단계별 Ordered Differential Display PCR에 의한 발생 특이 유전자들의 대량분리 및 이들의 염기서열 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 총 20 종류의 primer set에 대한 ODD-PCR 수행 - 총 100개 이상의 발생특이 유전자 단편들의 분리 및 이들의 염기서열 분석
	<p>◎ ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자 단편들에 대하여 Whole mount <i>in situ</i> hybridization에 의한 embryo내 유전자 발현 양상과 발현부위 조사를 통한 유용 유전자들의 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 antisense RNA probe의 대량제조 - 총 50개 이상의 Antisense RNA probe를 이용한 embryo의 whole-mount <i>in situ</i> hybridization 수행 - 발생 특이적인 유전자의 발생 단계별 발현 시기와 부위 및 발현 빈도 조사를 통한 유용 유전자들의 선별
	<p>◎ Whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통하여 선별된 발생특이 유용 유전자 단편들에 대한 full-size cDNA들의 분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통하여 선별된 총 5개 이상의 발생 특이적 유용 유전자들을 probe로 이용하여 full-size cDNA의 분리 - 분리된 full-size cDNA들의 염기서열 및 단백질 서열 분석과 database를 이용한 homology search
	<p>◎ Microinjection에 의한 유전자 기능 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 각종 sense 및 antisense mRNA transcript 제조 - Microinjection에 의한 embryo내 sense mRNA의 ectopic expression 및 antisense RNA의 target gene expression 의 저해 - Ectopic RNA injection에 따른 발생변이 유무 및 변이 상태에 따른 유전자 기능의 확인
<p>◎ 신경계 발생 및 분화 특이적 유전자들의 기능확인을 위한 신경계 특이적 형광 transgenic zebrafish의 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Zebrafish의 모든 신경계에서 발현하는 HuC 유전자의 promoter 분리 및 <i>in vivo</i>에서의 promoter 기능분석 	

다. 3차년도 연구내용

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
3차년도 (1998)	<p>◎ 총 10 단계의 발생 단계별 Ordered Differential Display PCR에 의한 발생 특이 유전자들의 대량분리 및 이들의 염기서열 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 총 20 종류의 primer set에 대한 ODD-PCR 수행 - 총 200개 이상의 발생특이 유전자 단편들의 분리 및 이들의 염기서열 분석
	<p>◎ ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자 단편들에 대하여 Whole mount <i>in situ</i> hybridization 에 의한 embryo내 유전자 발현 양상과 발현부위 조사를 통한 유용 유전자 들의 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 antisense RNA probe의 대량 제조 - 총 50개 이상의 Antisense RNA probe를 이용한 embryo의 whole mount <i>in situ</i> hybridization 수행 - 발생 특이적인 유전자의 발생 단계별 발현 시기와 부위 및 발현 빈도 조사를 통한 유용 유전자들의 선별
	<p>◎ Whole mount <i>in situ</i> hybridization을 통하여 선별된 발생특이 유용 유전자 단편들에 대한 full-size cDNA들의 분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Whole mount <i>in situ</i> hybridization 을 통하여 선별된 총 5개 이상의 발생 특이적 유용 유전자들을 probe로 이용하여 full-size cDNA 의 분리 - 분리된 full-size cDNA들의 염기서열 및 단백질 서열 분석과 database를 이용한 homology search
	<p>◎ Microinjection에 의한 유전자 기능 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> transcription에 의한 각종 sense 및 antisense mRNA transcript 제조 - Microinjection에 의한 embryo내 sense mRNA의 ectopic expression 및 antisense RNA의 target gene expression 의 저해 - Ectopic RNA injection에 따른 발생변이 유무 및 변이 상태에 따른 유전자 기능의 확인
	<p>◎ 신경계 발생 및 분화 특이적 유전자들의 기능확인을 위한 신경계 특이적 형광 transgenic zebrafish의 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 전 신경계에서 특이적으로 발현하는 HuC promoter를 이용하여 전 신경계에서 형광을 나타내는 transgenic zebrafish의 제조 및 분석

제 2 절 연구방법

1. Zebrafish 관리

가. Zebrafish (*Danio rerio*)의 유지 번식

Zebrafish는 관상용 열대어로서 세계적으로 일반 수족관에서 쉽게 구입할수 있다. Zebrafish의 유지를 위하여 45 L 용량의 수조에서 수온을 28.5℃로 맞추어서 한 개의 수조당 25 마리의 Zebrafish를 사육한다. 수온이 31℃ 이상이거나 25℃ 이하로 내려가면 Zebrafish의 번식과 embryo의 발생이 비정상적으로 이루어진다. 또한 매일 1/3의 물을 갈아주면서 찌꺼기들을 제거함으로써 청결 상태를 유지하여, 먹이는 하루에 1-2회에 걸쳐 적당량을 줌으로서 너무 살이 찌지 않도록 주의한다.

나. Zebrafish 인공 산란 조건 확립 및 embryo 배양

최적의 산란상태를 유지하기 위하여 7 - 18 개월 사이의 암컷과 수컷의 비율을 1:1 로 맞춘 후 10 gallon의 수조에서 사육한다. 수조의 물은 매일 1/3씩 갈아주면서 산란에 필요한 충분한 영양상태를 유지하기 위하여 하루에 3 차례씩 먹이를 준다. 산란을 시키기 전날 밤이 되면 구슬이 깔린 수조에 옮긴 후 12 시간동안 암 처리를 해준 후 다음날 아침 빛을 주면 산란을 시작한다. 30 분이 경과하면 구슬이 깔린 밑바닥으로부터 알을 모아 비이커에 넣고 28℃에서 배양한다.

2. Zebrafish embryo의 발생단계별 수집

발생단계별 zebrafish embryo 는 gastrulation stage (5, 6, 8, 9, 10 시간 배양 embryo) 와 segmentation period (12, 16, 18, 22 시간 배양 embryo)로 부터 전체 10 stage 들로부터 수집될 것이다. 각 stage 별 embryo 의 발생 수준은 다음과 같다.

- (1) 3.5시간 ; blastular stage
- (2) 6 시간 ; shield stage
- (3) 7 시간 : 60% epiboly stage
- (4) 8 시간 ; 75% epiboly stage
- (5) 8.5시간 ; 85% epiboly stage
- (6) 9 시간 : 90% epiboly stage
- (7) 10 시간 ; bud stage
- (8) 11 시간 ; 5-somite stage
- (9) 12 시간 ; 14-somite stage
- (10) 18 시간 ; 18-somite stage
- (11) 22 시간 ; 26-somite stage

3. cDNA library의 제조

발생시기별 embryo들로부터 분리된 mRNA를 이용하여 oligo dT primer 를 사용한 각각 2가지 방법에 따라 cDNA library들을 전체 12 종류로 제조한다. 이런 방법에 따라 제조된 cDNA library 들 외에도 필요시 random promoter를 이용한 cDNA library 들도 제조할 것이다. 이에 따라 full-length cDNA 들의 분리가 가능하게 할 것이다. cDNA library 제조 방법은 다음과 같다.

가. Embryo들로부터 total RNA 분리

분리된 각 발생 시기별 (5 stages in gastrulation, 3 stages in segmentation period) mRNA를 분리하여 일부는 cDNA library 제조에 이용하며 나머지 일부는 ODD-PCR에 사용한다

나. Poly(A⁺) RNA 의 분리

Poly(A⁺) RNA 는 분리된 total RNA를 oligo(dT)-cellulose column 에 통과시켜 poly(A⁺) RNA 들을 분리 후 정제하고 농도를 결정하여 -70°C 에 보관하여 필요시 사용한다.

다. cDNA의 합성

cDNA의 합성은 Stratagene (LA Jolla, CA, USA) 제품인 λZAP-cDNA synthesis kit를 사용하여 수행한다. First strand cDNA 를 합성하기 위하여 5 μl 의 10 X first strand synthesis reaction buffer, 5 μl의 0.1 M DTT, 3 μl의 10 mM first strand methyl nucleotide mixture, 2 μl의 linker-primer, 1 μl의 RNase block I, 5 μg의 mRNA를 넣고 24°C에서 10 분간 반응시킨 후 20 unit의 MMLV reverse transcriptase를 넣고 37°C에서 1 시간동안 반응시킨다. Second cDNA의 합성을 위하여 45 μl의 first strand cDNA mixture에 40 μl의 second strand synthesis reaction buffer, 2 μl의 (α-³²P) dCTP, 15 μl의 0.1 M DTT, 6 μl의 second strand nucleotide mixture, 4.5 μl의 RNase H, 11.2 μl의 DNA polymerase I을 첨가한 후 16°C에서 2 시간 30 분간 반응시킨다.

라. λ UNI-ZAP XR vector arms로의 ligation과 in vitro packaging

합성된 cDNA에 EcoRI adaptors를 ligation한 다음 T4 polynucleotide kinase 를 이용하여 cDNA에 ligation된 Eco RI end를 kinasing한후 Xho I으로 digestion 한다. 다음으로 sephacryl S-400 spin column을 사용하여 합성된 cDNA를 size에 따라 fractionation한후 각각의 fraction 에서 5 μl를 취하여 5 % nondenaturing acrylamide gel에서 전기영동 함으로서 적절한 크기로 합성된 cDNA를 선별한다. 선별된 cDNA를 침전시킨 후 100 ng의 cDNA에 0.5 μl의 10 X ligase buffer, 0.5 μl 의 10 mM rATP, 1 μl의 Uni-ZAP XR vector, 0.5 μl의 T4 DNA ligase를 첨가한후 4

℃에서 12 시간동안 반응시킨다. Ligation이 끝나면 ligation mixture에서 1 μ l를 취하여 Gigapack II Gold packaging extract를 사용하여 packaging시킨다. Packaging은 Stratagene에서 제시된 방법에 따라 sonic extract와 freeze-thaw extract를 녹여서 첨가하여 bubble이 생기지 않도록 잘 섞은 다음 22℃에서 2 시간 동안 반응시킨 후 phage dilution buffer를 첨가하고 chloroform을 처리하여 잘 섞은 다음 supernatant를 취하여 chloroform을 2%가 되도록 넣은 후 4℃에서 보관한다.

마. λ UNI-ZAP recombinant phage의 titration

In vitro packaged phage를 phage dilution buffer (SM buffer)로 10^2 , 10^4 , 10^6 으로 dilution하여 host cell인 XL1-Blue MRF' 200 μ l과 혼합한 후 37℃에서 20 분간 preadsorption시킨다. 50℃에서 보관된 3 ml의 LB top agar(0.7%)에 0.1 M IPTG, 2% X-gal을 첨가한 후 preadsorption시킨 mixture와 섞어서 LB-agar plate에 부어 조금 식힌 다음 inverting하여 37℃에서 8 시간동안 배양한 후 형성된 white plaque의 숫자를 세어서 recombinant phage의 titer를 계산한다.

4. Ordered Differential Display PCR

가. Total RNA의 분리

Zebrafish embryo를 발생단계별로 분리해낸 후 이를 denaturing solution (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)에서 homogenize 한 후 phenol/chloroform/isoamylalcohol로 extraction 하고 isopropanol로 침전시켜 total RNA를 분리하였다(26).

나. Chromosomal DNA의 제거

50 μ g의 total RNA에 10 unit의 human placental ribonuclease inhibitor, 그리고 10 unit의 DNase I을 넣고 37℃에서 30 분간 반응시킨 후 이들을 phenol/chloroform으로 extraction 하고 ethanol로 침전시켜 chromosomal DNA가 제거된 순수한 RNA를 분리하였다.

다. Double-stranded cDNA 준비

먼저 각각(Normal, BDL/S) 2 μ g의 total RNA를 template로 cDNA synthesis kit (borhrienger mannheim)를 사용하여 T-primer(table. 1)로 double stranded cDNA를 만들었다. 만들어진 total cDNA를 RsaI(PosCO)으로 1.5시간 digestion 한 후 65에서 20분간 heat inactivation 시키고, EtOH 침전 후 TsM용액(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM MgCl₂) 10 μ l에 녹였다.

라. A-Tail fragment pools 준비

각각의 ds cDNA 5 μ l를 Rsa I restriction endonuclease로 digestion한 다음, 각각 1 μ l의 adaptor-L, S(20 μ M each)와 섞어 total 10 μ l로 만든후 16 $^{\circ}$ C에서 overnight ligation 하였다. Ligation mixture를 1/5dilution 한 후 1 μ l를 template로 하여 OU 와 T primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭 반응엔 10X PCR buffer(100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 10mM DTT, 500 μ g/ml BSA, 150 μ M Ammonium sulfate, 2.5mM dNTPs)를 이용하여, 먼저 2 μ l의 10 \times PCR buffer와 각각 6pmole의 primer를 template와 섞은 다음 Taqstart antibody(0.22 μ g/ μ l, Clontech)와 Taq polymerase(1unit/ μ l, Bioneer)를 포함한 2 μ l의 Taq polymerase mixture를 넣어 total volume을 20 μ l로 맞추어 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨후 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 65 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초의 조건으로 20 cycle의 PCR 반응을 수행하였다

마. Subset의 증폭 및 전기영동

T4 polynucleotide kinase를 이용하여 각각의 InE primere들을 [γ -³²P]dATP로 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 labelling 시킨후 100 $^{\circ}$ C에서 1분간 heat inactivation 시킨다음, 2 μ l를 덜어 8 μ l의 PCR mixture(10mM Tris-HCl (pH 8.3), 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM DTT, 50 μ g/ml BSA, 15 μ M Ammonium sulfate, 250 μ M dNTPs, 2pmole non-labelled TE primer, 2 μ l Taq polymerase mixture)와 섞은 후 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 69 $^{\circ}$ C 에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초의 조건으로 23 cycles의 PCR 반응을 수행하여 증폭하였다. 증폭된 band들은 6% polyacrylamide gel에서 xylene cyanol FF가 바닥에 닿을 때까지 전기영동 한 후 70 $^{\circ}$ C에서 건조 시키고, 형광자를 부착시켜 방향을 정확하게 표시한 후 X-ray film에 12-24시간 노출 시켰다.

바. Reamplification of bands

얻어진 autoradiogram으로부터 cirrhosis에 특이적으로 증폭된 cDNA band를 sequencing gel에서 cutting 하여 얻어진 gel slice로부터 DNA를 추출해 낸다. 이를 위하여 gel slice를 20 μ l의 TE에 넣고 60 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 반응시킨 후 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 끓인 다음, 2 μ l를 덜어내어 18 μ l의 PCR mixture(10mM Tris-HCl (pH 8.3), 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM DTT, 50 μ g/ml BSA, 15 μ M Ammonium sulfate, 250 μ M dNTPs, 6pmole In, T primer)에 섞어 95 $^{\circ}$ C 30초, 65 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초의 조건으로 20 cycle의 PCR 반응을 수행한 후 2% Agarose gel에서 확인하였다.

Scheme of the Ordered Differential Display PCR

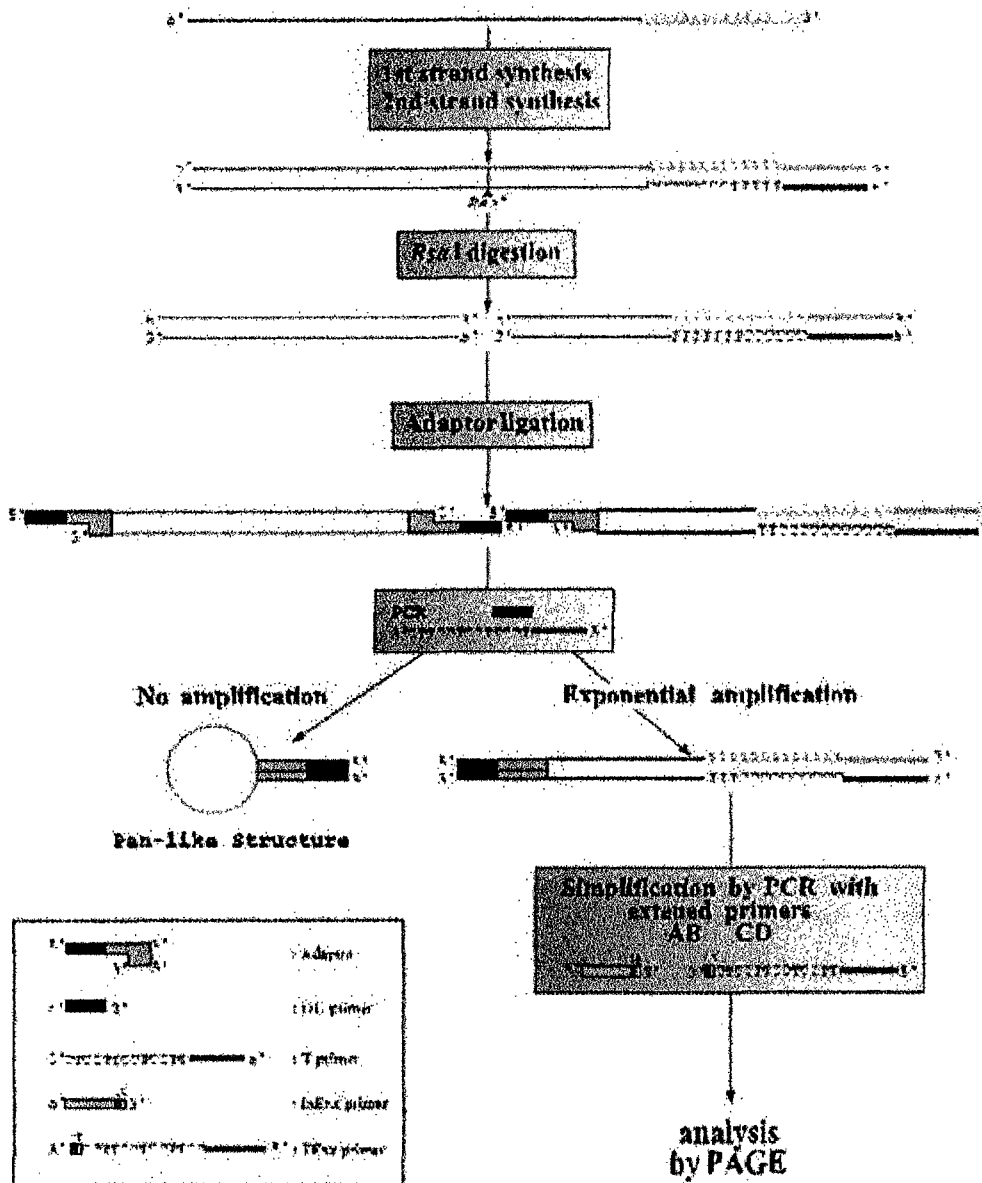


Fig. 1. Scheme of the Ordered Differential Display PCR (ODD-PCR)

사. Subcloning and sequencing

증폭된 band들을 GeneClean II kit(BIO101)로 agarose gel 상에서 elution 한 후 klenow enzyme으로 10분간 end-filling 한 다음 EcoRV restriction endonuclease로 digestion한 pGEM5(+)-zf 와 18°C에서 overnight ligation 반응을 시킨후 DH5 α 에 형질전환 하였다. 형질전환체들을 선별하여 size 확인후 Sequencing kit(USB)를 사용해서 양쪽방향으로 sequencing 하였다.

5. Plaque hybridization에 의한 full-size cDNA 분리

cDNA의 분리를 위하여 먼저 ODD-PCR 에 의하여 분리되어진 3'-UTR 단편을 random primer labeling 방법에 의해 [α -³²P]dCTP로 labeling 시켜 probe 로 사용하여 plaque hybridization method에 의하여 full-size cDNA를 가지는 plaque 들을 분리한다. 이를 위하여 약 10⁶ 개의 plaque 들로부터 screening 을 행한다. 1차 선발로 부터 얻어질 positive clone 들을 계속적인 2차, 3차 screening 에 의해 최종적으로 순수 분리하고 액체 배양으로 phage 를 증폭하여 이들로부터 DNA 를 분리한 후 정제된 phage 에 의해 분리된 cDNA들의 크기를 확인한다.

6. DNA sequencing

전체적인 DNA sequencing 을 위해서 얻어진 cDNA insert를 promega사의 erase-a-base system을 사용하여 deletion mutant를 제조한 후 각각 sequencing vector 인 plasmid pGEM7 등에 ligation 시키고 얻어진 plasmid 들에 대해 DNA sequencing 을 실시한다. 이때 사용될 DNA sequencing 방법은 double strand DNA template 에 대한 dideoxynucleotide chain termination방법에 의해 실시될 것이다.

7. Whole mount *in situ* hybridization

Zebrafish embryo의 whole mount *in situ* hybridization(Tautz and Pfeifle, 1989; Michelson *et al.*, 1990) 은 Boehringer Mannheim사의 digoxigenin RNA labeling and detection kit를 사용하여 수행한다. 그 방법으로는 먼저, digoxigenin-11-UTP가 포함된 4 종류의 nucleotide mixture를 이용한 *in vitro* transcription을 통하여 digoxegenin이 labeling된 target DNA의 antisense RNA를 합성하여 이를 probe로 사용한다. Embryo를 4 % paraformaldehyde가 포함된 PBS buffer에서 4 °C 에서 overnight 반응시켜 fixation한 후 50 % xylene 과 50 % ethanol mixture에서 4-12 시간동안 dehydration 시키고 100 % ethanol로 두 번 세척한다.

Hybridization은 20-100 ng의 RNA probe를 사용하여 20-40 μ l의 HYB buffer(50 % formaldehyde, 5 \times SSC, 0.1% Tween-20) 용액에 넣은 후 55 °C 에서 overnight 반응시킨다. 반응이 끝나면 37 °C에서 2 \times SSCT solution으로 10 분간 세

번 세척한 후 30 분간 RNase A로 digestion하고 blocking reagent로 1 시간동안 blocking 한 다음 Fab-alkaline phosphatase를 처리한다. Alkaline phosphatase의 반응이 끝나면 embryo를 0.1 % Tween (PBT; pH 7.2)을 포함한 PBS buffer(PBST)로 세 번 세척한 후 embryo를 4.5 μ l의 NBT/ml 와 3.5 μ l의 X-Phosphate/ml를 포함하는 staining buffer에 넣고 30 분에서 overnight 까지 staining한다. Staining 이 끝나면 PBS buffer로 washing 한 후 100 % methyl alcohol로 dehydration 하여 현미경을 통하여 확인한다.

8. mRNA microinjection

가. *In vitro* transcription을 통한 sense RNA 및 anti-sense RNA의 제조

Microinjection을 위한 sense RNA 경우에는 5' capped RNA는 Kintner (1988)의 방법에 의하여 제조한다. Anti-sense RNA는 3'에서 5' 방향으로 *In vitro* transcription을 실시하였다. 이후 DNase I 을 처리하여 template DNA를 제거한 후 Sephadex G-50 chromatography 를 이용하여 RNA를 분리한다. 분리된 RNA는 phenol extraction을 한 후에 ethanol로 침전시키고 distilled water에 녹인 후 formaldehyde 가 첨가된 denaturing gel에서 전기영동을 수행하여 분리된 RNA의 상태를 확인한다.

나. 2-cell embryo에 대한 microinjection 및 발생 이상 확인

3 개월 이상 키운 Zebra fish 암 수 10 쌍을 밤이 되기 1-2 시간전에 구슬이 깔린 수조에 옮겨 하룻밤을 지낸 후 다음날 아침 구슬이 깔린 밀바닥으로 부터 알을 모은다. 이렇게 모은 알을 현미경을 통하여 관찰함으로써 2-cell embryo stage에 있는 알들을 선별한 후 10% Hanks' saline (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM MgSO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.25 mM Na₂HPO₄, 4.2 mM NaHCO₃) 로 씻어낸 다음 micromanipulator 가 장착된 inverted microscope 에서 얻어진 mRNA들을 10-20 nl 의 injection buffer(88mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.0)에 10-200 ng/ μ l 의 농도로 섞어 2-cell embryo의 single blastoma에 microinjection 한다. microinjection 할 때 control로서 lacZ gene mRNA를 함께 injection함으로써 injection된 mRNA가 정상적으로 발현되는지를 X-gal staining 등을 통해 확인한다.

9. Double-strand RNA injection

ODD-PCR에서 얻어진 유전자의 full-size cDNA로부터 Sense와 Anti-sense RNA를 *in vitro* transcription을 수행하여 제조한다. 제조된 두 transcript를 섞어 KCl buffer를 넣고 30분간 37°C에서 annealing하여 double-strand RNA를 만든 후 agarose gel에서 shift정도로 확인한다. double-strand RNA injection 시의 RNA 농도는 50 ng/ μ l를 사용하며 embryo당 100 - 200 pg정도 주입한다.

제 3 절 연구결과

1. Zebrafish model system의 확립 및 생체기능분석 system의 확립

가. Zebrafish model system의 확립

(1) Zebrafish model의 사육을 위한 자동 수조 system의 설계 및 제조
Zebrafish의 사육을 위하여 Fig. 2 에서 보는바와 같이 총 18개의 수조를 제조하였으며 이들 수조의 물을 자동으로 정화하기 위하여 filtration system을 제조하였고, 또한 zebrafish의 사육에 적당한 물 온도를 유지하기 위한 온도조절 장치를 설치하였다.



Fig. 2. Zebrafish의 사육을 위한 자동수조의 사진

(2) Zebrafish model의 유지, 번식 및 산란방법의 확립

Zebrafish는 여러종류가 존재하며 이들중 현재 전 세계적으로 가장 많이 사용하는 종인 *Danio rerio*의 치어를 일본 오사카대학 의과대학의 Naomasa Miki 교수로부터 제공받아 이들의 유지 번식 및 산란방법을 확립하여 사육한 결과 현재 암, 수 성어 120 마리와 치어 500 마리를 확보하여 실험에 이용하고 있다.

나. Zebrafish system을 이용한 유전자 생체 기능분석 system의 확립 및 검증

(1) Developmental stage별 Ordered Differential Display PCR방법의 확립

(가) Developmental stage별 Ordered Differential Display PCR의 수행

ODD PCR에 사용된 Zebrafish의 발생단계별 embryo는 maternal effect(3.5 시간 배양 embryo), gastrulation stage (6, 7, 8, 9, 10, 11 시간 배양 embryo), segmentation period (12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 시간 배양 embryo), adult(7일간 배양 embryo)로부터 전체 15 stage를 사용하였다. 먼저, 10개 정도의 embryo로부터 total RNA의 분리한 후 double-stranded cDNA를 합성하여 A-tail fragment pool을 제조하였다. 이를 위하여 각각의 ds cDNA 5 μ l를 Rsa I restriction endonuclease로 digestion한 다음, 각각 1 μ l의 adaptor-L, S(20 μ M each)와 섞어 total 10 μ l로 만든후 16 $^{\circ}$ C에서 overnight ligation 하였다. Ligation mixture를 1/5dilution 한 후 1 μ l를 template로 하여 OU 와 T primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭 반응엔 10X PCR buffer(100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 10mM DTT, 500 μ g/ml BSA, 150 μ M ammonium sulfate, 2.5mM dNTPs)를 이용하였다. 또한 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 각각의 InE primer들을 [γ -³²P]dATP로 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 labelling 시킨 후, Taqstart antibody(0.22 μ g/ μ l, Clontech)와 Taq polymerase(1unit/ μ l, Bioneer)를 포함한 2 μ l의 Taq polymerase mixture에 TE primer를 첨가하여 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 69 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초의 조건으로 23 cycles의 PCR 반응을 수행하여 증폭하였다. 또한, 증폭된 시료를 필요시 재사용하기 위하여 PCR 반응을 95 $^{\circ}$ C 30초, 65 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초의 조건으로 20 cycle이하의 PCR 반응을 수행하여 사용하였다. PCR 반응이 끝난 후 증폭된 다양한 pattern을 확인하기 위하여 urea가 포함된 6% polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다.

(나) 6% polyacrylamide gel을 이용한 ODD PCR product의 전기영동

증폭된 ODD PCR product의 전기영동은 2 μ l 시료와 3 μ l dye를 혼합한 후 96 $^{\circ}$ C에서 3분간 열을 가한 후 실시하였다. 전기영동은 urea가 포함된 6% polyacrylamide gel에서 xylene cyanol FF가 바닥에 닿을 때까지 전기영동 한 후 70 $^{\circ}$ C에서 fixing을 하지않고 건조 시켰다. Gel로부터 DNA 분리를 위하여 형광자를

부착시켜 방향을 정확하게 표시한 후 X-ray film에 12-24시간 노출 시켰다. 그 결과, fig. 3에서 보는바와 같이 초기에는 발현하지 않지만 발생 후반기로 갈수록 점점 더 발생이 많아지는 형태를 보이는 경우와 이와 반대로 발생후기에서 점점 사라지는 양상들이 관찰되었다. 이를 통하여, 발생 초기와 후기에서 유전자의 증감을 확인함으로써 흥미로운 유전자가 ODD PCR을 통하여 분리할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 이러한 유전자들의 확보를 위하여 증감을 나타내는 유전자를 분리한 후 이들의 DNA 염기서열 규명을 실시하였다.

(다) Developmental gene의 cloning 및 DNA 염기서열규명

ODD PCR을 통하여 발생단계에서 나타난 다양한 유전자들은 gel로부터 흥미있는 band를 오려내고, TE 20 μ dp 담구어 70°C에서 2 시간 두어 elution 한 후 이들을 동일한 primer set을 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 유전자들은 Geneclean II kit(BIO101)로 agarose gel상에서 elution한 후 klenow enzyme으로 10분간 end-filling을 실시하였다. 다음으로, EcoRV restriction endonuclease로 digestion한 플라스미드 pGEM5(+)-zf와 blunt-end ligation을 실시하였다. 18°C에서 overnight ligation 반응을 시킨후 DH5 α 에 형질전환 하였다. 형질전환체들을 선별은 ampicillin이 포함된 LB 배지에서 실시하였고, phenol cracking을 통하여 insert가 포함된 형질전환체의 크기를 확인하였다. DNA 염기서열 규명은 dideoxynucleotide-chain termination 방법에 따라 [α -³⁵S]dATP 와 sequenase™를 사용하여 urea가 포함된 6% polyacrylamide gel 전기영동에 의해 실시하였다. 이때 사용된 sequencing primer는 T7 및 SP6 sequencing primer를 사용하였으며 sequencing이 끝난 유전자의 염기서열 분석 및 비교는 Blast search를 사용하여 실시하였다. 그 결과 394개의 유전자를 cloning하여 sequencing 하였으며, 각각의 유전자 크기는 150bp에서부터 600bp까지 다양하게 나타났다. Blast search를 통하여 분석한 결과 ribosomal RNA와 기존에 밝혀진 유전자도 있었으며, 지금까지 알려지지 않은 유전자도 많이 있음을 알 수 있었다. 이미 밝혀진 유전자와의 유사성을 보면 *Drosophila*, *Xenopus*, *C. elegans*, *Zebrafish*, 그리고 식물인 *Arabidopsis*등과 높은 유사성을 가짐을 알수있었다. 특히 이미 기능이 밝혀지지 않은 유전자와 unknown 유전자들의 발현 양상과 발현부위를 알아보기 위하여 공간적, 시간적인 분석이 가능한 whole mount *in situ* hybridization을 실시하였다

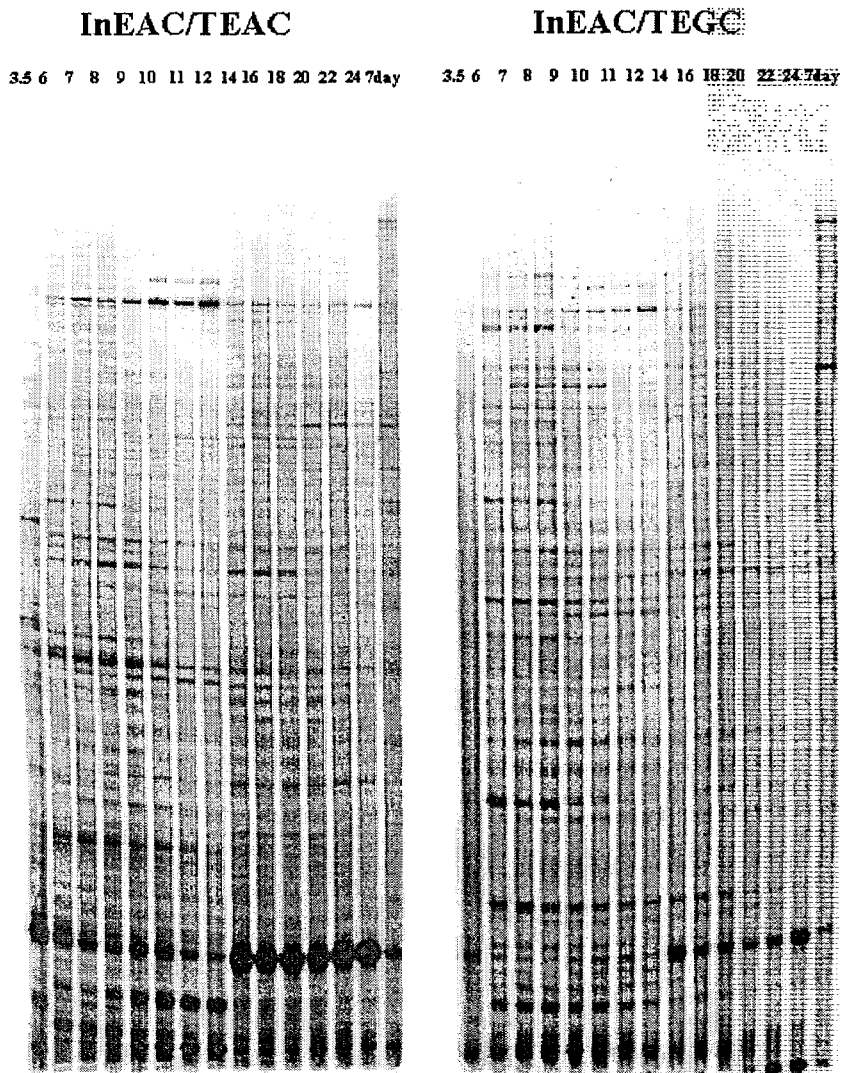


Fig. 3. Ordered Differential Display(ODD) profiles for in zebrafish embryos Two subsets of ODD pattern from 15 embryonic stages (3.5 hrs, 6 hrs, 7 hrs 8hrs, 9 hrs, 10 hrs, 11 hrs, 12 hrs, 14 hrs, 16 hrs, 18 hrs,20 hrs, 22 hrs 24 hrs, and 7 days) of embryos were displayed in 6% polyacrylamide gel.

(라) Whole mount *in Situ* hybridization의 수행

분리된 유전자들의 발현을 시간적, 공간적으로 분석하기 위하여 Zebrafish embryo의 whole mount *in situ* hybridization(Tautz and Pfeifle, 1989; Michelson *et al.*, 1990)을 실시하였다. 이를 위하여 Boehringer Mannheim사의 digoxigenin RNA labeling and detection kit를 사용하였다. 먼저, digoxigenin-11-UTP가 포함된 ATP, CTP, GTP, UTP 4 종류의 nucleotide mixture를 이용한 *in vitro* transcription을 통하여 digoxigenin이 labeling된 target DNA의 anti-sense RNA를 합성하여 이를 probe로 사용하였다. 시간대별로 다양하게 수집한 embryo를 4 % paraformaldehyde에서 4 °C 에서 overnight 반응시켜 fixation한 후 100 % methanol로 dehydration한 후 proteinase K(10 mg/ml)를 사용하여 membrane-bounded protein들을 제거하였다. Hybridization은 20-100 ng의 RNA probe를 사용하여 20-40 μ l의 HYB buffer(50 % formaldehyde, 5 \times SSC, 0.1 % Tween-20) 용액에 넣은 후 55 °C 에서 overnight 반응시킨다. 반응이 끝나면 55°C에서 세척을 실시한 후, blocking reagent인 sheep serum으로 1-2 시간동안 blocking한 다음 Fab-alkaline phosphatase를 처리한다. Alkaline phosphatase의 반응은 상온에서 2 시간 실시하였으며, 반응이 끝나면 antibody를 이용하여 blue color detection을 실시하였다. Staining은 4.5 μ l의 NBT/ml 와 3.5 μ l의 X-Phosphate/ml를 포함하는 staining buffer에 넣고 30 분에서 overnight까지 staining을 실시하였다. Staining이 끝나면 PBS buffer로 washing 한 후 100 % methyl alcohol로 dehydration 하여 현미경을 통하여 X10 및 X20에서 확인하였다..

그 결과, zebrafish embryo의 발생기간 중 분리된 유전자들의 다양한 시간적, 공간적 발현 양상을 확인할 수 있었다. 이들 중에서 Fig. 4 에서처럼 MG 83 clone의 경우 brain과 somite에서 특이적으로 발현하는 것을 알 수 있었으며 이를 통하여 이 유전자는 zebrafish 발생과정 중에서 somitogenesis에 관련된 유전자임을 알 수 있었다. 따라서 whole mount *in situ* hybridization 결과들로부터 zebrafish의 발생과정에서 수행되는 발생관련 유전자들을 ODD-PCR을 통하여 유전자 분리가 성공적으로 이루어질 수 있음을 확인할 수 있었다.

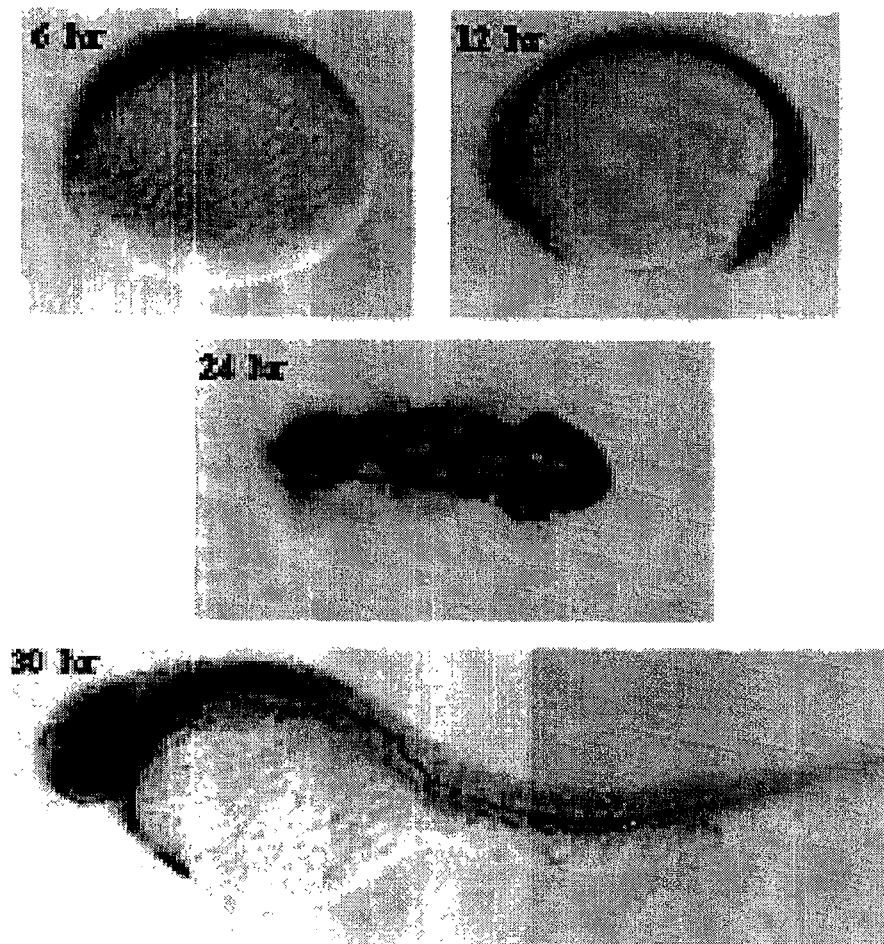


Fig. 4. Whole mount *in situ* hybridization of zebrafish embryos for MG83 gene at different developmental stages.

(2) Whole mount in situ hybridization을 이용한 유전자 기능분석 방법의 확립

Zebrafish embryo의 whole mount *in situ* hybridization은 Boehringer Mannheim사의 digoxigenin RNA labeling and detection kit를 사용하여 수행하였으며, digoxigenin-11-UTP가 포함된 4 종류의 nucleotide mixture를 이용한 *in vitro* transcription을 통하여 digoxigenin이 labeling된 target DNA의 antisense RNA를 합성하여 이를 probe로 사용하였다. 이러한 방법에 따라 zebrafish에서 분리한 neuron specific gene으로 알려진 HuC 유전자의 riboprobe를 제조하여 whole mount *in situ* hybridization을 수행한 결과 Fig. 5 에서 보는바와 같이 신경 조직에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다.

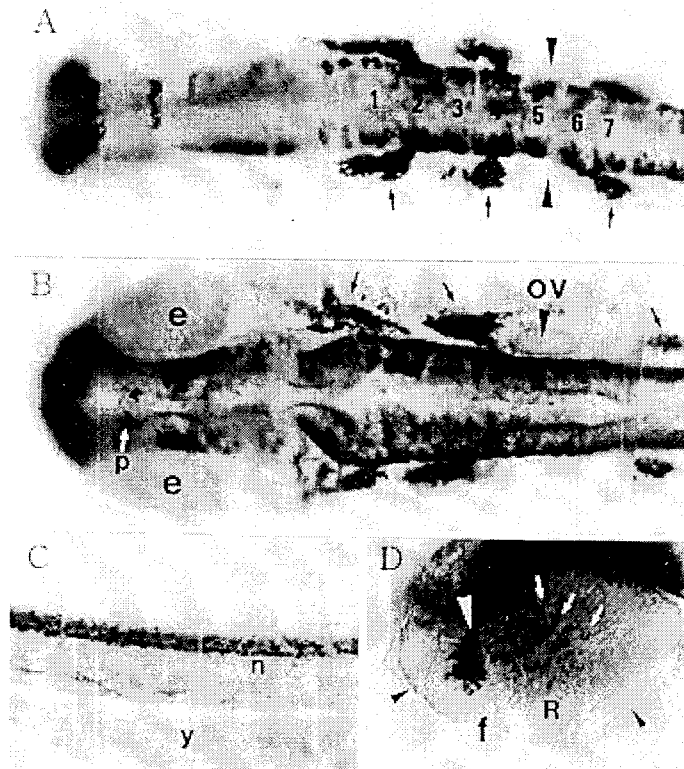


Fig. 5. Neuronal specificity of the HuC gene expression detected by whole mount in situ hybridization

(3) Zebrafish embryo의 DNA 및 RNA injection system의 확립

Micromanipulator를 이용한 zebrafish embryo로의 DNA 및 RNA의 microinjection 방법을 확립한 후 이 system을 검증하기 위하여 그 기능이 정확히 밝혀지지 않은 zebrafish의 notch-3 유전자의 mRNA를 two cell stage의 zebrafish embryo의 한쪽 cell에만 injection 한 결과 Fig. 6에서 보는바와 같이 injection된 반쪽의 embryo에서는 somite가 형성되지 않는 결과를 얻었으며, 또한 zebrafish로부터 본 연구팀이 분리한 neuron-specific 유전자인 zHuC 유전자의 promoter에 reporter gene으로서 green fluorescence protein (GFP) 발현 유전자를 연결하여 DNA를 injection한 결과 Fig. 7에서 보는바와 같이 reporter gene인 GFP 유전자가 zebrafish의 신경조직에서만 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다.



Fig. 6. Injection of Notch3 mRNA into zebrafish embryo



Fig. 7. Injection of HuCP-GFP DNA into zebrafish embryo

(4) Anti-sense RNA를 이용한 유전자의 기능분석

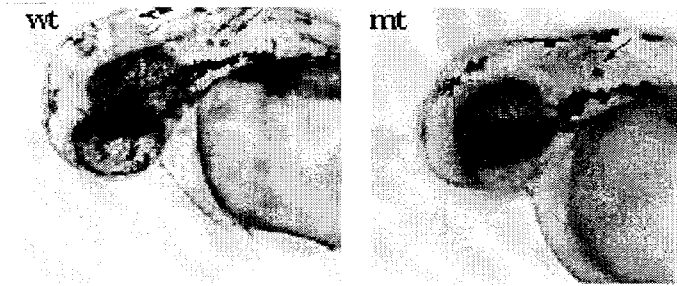
Anti-sense RNA를 injection하여 특정 유전자의 *in vivo*에서의 기능을 저해하는 system을 확립하기 위하여 *in vitro* transcription을 통한 anti-sense RNA를 제조하였다. *In vitro* transcription 실시 후에 DNase I 을 처리하여 template DNA를 제거한 후 Sephadex G-50 chromatography 를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 anti-sense RNA는 phenol extraction을 한 후에 ethanol로 침전시키고 DEPC가 처리된 distilled water에 녹인 후 injection에 사용하였다. Anti-sense RNA injection에 사용된 zebrafish embryo는 현미경 관찰을 통하여 1 cell 및 2 cell 단계의 embryo를 선택하여 실시하였다. 선택된 embryo들은 10% Hanks' saline (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM MgSO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.25 mM Na₂HPO₄, 4.2 mM NaHCO₃)로 씻어낸 다음 micromanipulator가 장착된 inverted microscope에서 1 cell 및 2 cell embryo의 single blastoma에 microinjection 하였다. Microinjection 할 때 control로서 lacZ gene mRNA를 함께 injection 함으로서 injection된 mRNA가 정상적으로 발현되는지를 X-gal staining등을 통해 확인하였다. embryo에 antisense RNA를 injection 함으로서 발생과정에서 특정 유전자의 발현을 저해하는 antisense RNA injection system을 확립하였으며, 이를 검증하기 위하여 ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자인 MG 54 clone을 injection한 결과 Fig. 8에서 보는바와 같이 wildtype에서는 2개가 존재하는 귀의 otolith가 antisense RNA가 injection된 mutant에서는 하나의 monolith로 존재함을 확인함으로써 이러한 antisense RNA의 injection에 의한 유전자의 생체내 기능분석 system이 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

Anti-sense RNA의 injection을 통한 발생특이 유전자들의 생체내 기능을 재확인하기 위하여 이미 알려진 유전자인 심장의 발생에 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려진 *nkx-2.5* 유전자와 notochord의 형성에 중요한 transcription factor인 *ntl* 유전자의 anti-sense RNA를 이용하여 실험을 수행하였다.

(가) *nkx-2.5* 유전자의 anti-sense RNA injection

Zebrafish *nkx-2.5* 유전자는 *Drosophila*의 *tinman* 유전자와 유사성을 가지는 것으로 알려져 있으며 visceral과 cardiac mesoderm 형성에 필수적인 유전자로 알려져 있다. Fig. 9에서 보는바와 같이 *nkx-2.5*에 대한 anti-sense RNA(100 pg)를 injection 하였을때 injection된 embryo에서 발생된 심장은 atrium(심방)과 ventricle(심실)의 크기가 달라지고 precardiac vessle의 크기가 증가하며 심장의 전체적인 morphology가 기형으로 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 토대로 *nkx-2.5* 유전자가 심장의 형성에 중요한 작용을 하는 유전자임을 알 수 있었다.

Ear (mono-otolith) Mutation



Eye Mutation

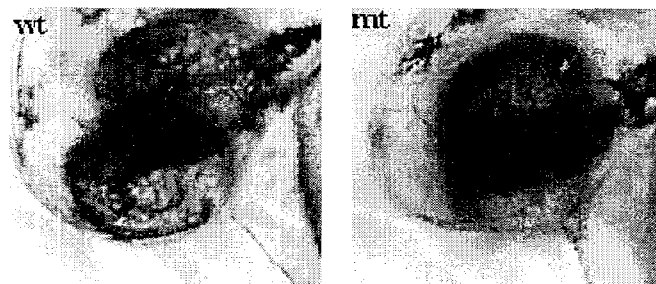


Fig. 8. Effect of anti-sense RNA injection for MG 54 clone at 2-day old zebrafish embryos. Red arrow indicates the effect of anti-sense RNA at the otolith(upper), and lens(lower).

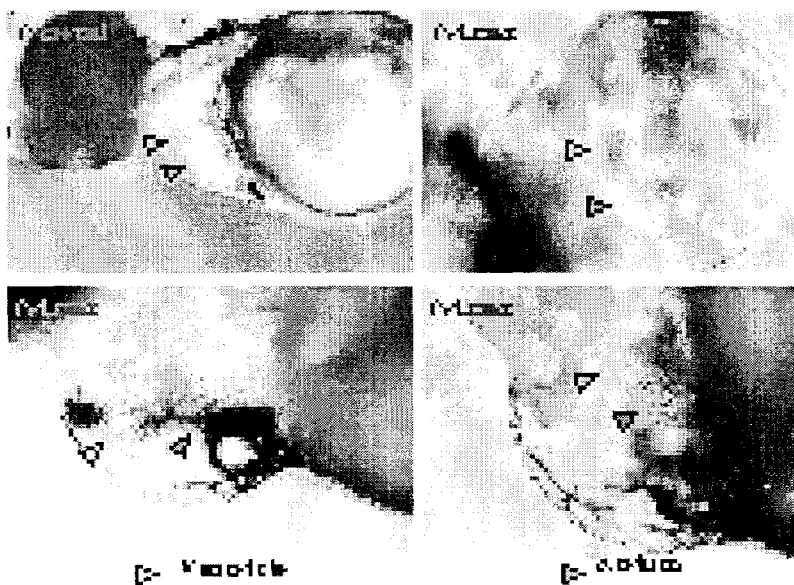


Fig. 9. Injection of antisense RNA of *nkx-2.5* DNA into one-cell stage zebrafish embryos. 100pg of anti-sense RNA was used for injection from *nkx-2.5* DNA. Anti-sense injected embryo shows enlarged atrium and ventricle compared to normal zebrafish heart. All embryos are 2-days old larva stage.

(나) *ntl* 유전자의 anti-sense RNA injection

또한 zerafish의 notochord가 현저히 없어져 body trunk의 발생이 완전히 이루어지지않은 mutant인 no tail(*ntl*) 유전자로부터 anti-sense RNA를 만들어서 injection 하였을 때는 Fig. 10에서 보는바와같이 injection된 embryo에서는 정상적인 zerafish의 notochord(Fig. 10. A)의 body trunk에 비해서 이 부위의 발생이 현저히 제한을 받음을 알 수 있었다 Fig. 10. B). 이를 통하여 *ntl* 유전자가 notochord의 형성에 중요함을 확인하였으며, 또한, anti-sense RNA의 injection에 의한 중요 유전자들의 생체내 기능규명이 가능함을 알 수 있었다

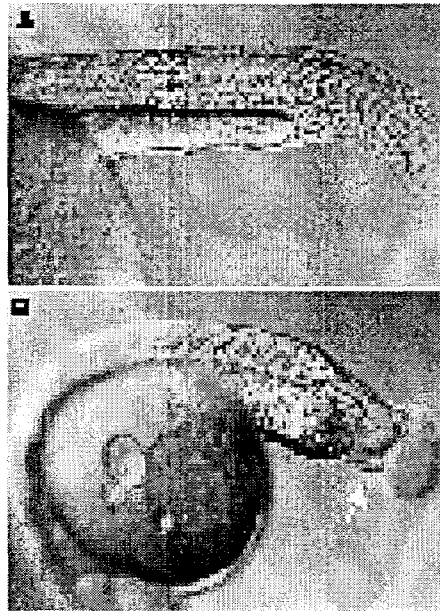


Fig. 10. Injection of anti-sense RNA of *ntl* DNA into one-cell stage zerafish embryos. 100pg of anti-sense RNA was used for injection from *nkx-2.5* DNA. A, lateral view of 1-day old zerafish body trunk region; B lateral view of 1-day old zerafish body trunk region injected by anti-sense. Yellow arrowhead in B indicates the disrupted body trunk region by injected *ntl*-antisense RNA. All embryos are 1-day old larva stage.

5). Double-strand RNA를 이용한 유전자 기능분석

최근 들어 특정 유전자에 대한 기능을 분석하기 위한 시도들이 다양하게 이루어지고 있으며, 그 대표적인 기능 분석 방법으로는 knockout mouse 제조에 의한 기능 분석이나 mutant 분석을 통한 유전자의 기능 분석이 주로 이루어지고 있다. 또한 특정 유전자의 anti-sense RNA의 주입이나 발현을 통한 lose of function을 관찰함으로써 그 유전자의 기능을 추정하는 방법이나 ectopic expression이 사용되기도 한다. 그리고 최근 보고에 의하면 double-strand RNA를 제조하여 생체 내에 주입하였을 시 anti-sense RNA의 주입이나 발현으로 인한 효과와 비슷하다고 알려지고 있어 이 방법이 새로운 기능 분석 방법으로 대두되고 있다(Kennerdell et al, Fire et al). 따라서 본 연구에서 분리된 *zSFRP5* 유전자를 이용하여 double-strand RNA injection 방법을 이용한 유전자 기능분석 system을 확립하였다.

zSFRP5 유전자의 double-strand RNA를 제조하기 위해 다른 frizzled family와 유사성이 매우 높은 CRD domain을 제거하였는데 이는 *zSFRP5* 이외의 유전자들과도 비특이적으로 작용할 가능성이 있었기 때문이다. 우선 full-size *zSFRP5*로부터 CRD domain을 coding하는 부분을 제거한 약 1.3kb의 fragment를 pSK(+)/*BamH* I & *Cla* I site에 subcloning(*zSFRP5*(B/C))한 다음, T7과 T3 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription을 수행하여 각각의 transcript를 제조하였다. 제조된 두 transcript를 섞어 KCl buffer를 넣고 30분간 37°C에서 annealing하여 double-strand RNA를 만든 후 agarose gel에서 shift정도로 확인하였다. *zSFRP5* double-strand RNA injection 시의 RNA 농도는 50 ng/ μ l를 사용하였으며 embryo당 100 - 200 pg정도 주입하였다.

zSFRP5 double-strand RNA injection에 의한 효과를 보면 우선 눈의 발달이 억제되는 현상이 나타나고 있다. 특히 약 70% 정도가 *cyclops* mutant와 비슷하게 나타났으며, 그 나머지도 눈의 size가 줄어드는 현상을 보임으로써 *zSFRP5* 유전자가 눈의 형성에 중요한 작용을 함을 추정할 수 있다. Wild type과 비교해보면 Fig.11 B는 눈의 size가 줄어들었음이 확인되고 있으며, 또한 eye lense 역시 정상적으로 형성하지 못하였음을 확인할 수 있다. Fig.11.C는 *zSFRP5* double-strand RNA injection시 주로 나타나는 현상으로 눈이 하나밖에 형성되지 않는 *cyclops* mutant와 유사함을 알 수 있다. 이러한 결과로 볼 때 double-strand RNA injection 방법이 zebrafish에서 특정 유전자 발현을 억제하는데 효율적으로 이용될 수 있음을 보여주고 있다.

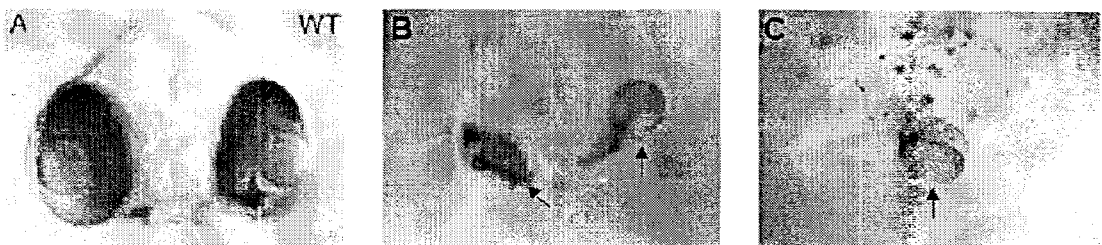


Fig. 11. Mutant phenocopy of 36 hpf zebrafish embryos induced by the double stranded antisense RNA for *zSFRP5* gene.

A, wild type embryo showing normal eye, B and C: embryos showing mutant phenocopy of eyes by the injected double-strand antisense RNA for *zSFRP5*(B/C).

2. ODD PCR을 이용한 발생특이 유전자들의 분리 및 규명

각 발생단계별 embryo에서 분리된 RNA와 혈관생성이 저해된 mutant zebrafish에서 분리된 RNA를 대상으로 1차년도에 확립된 ODD PCR을 수행하여 발생기간중에 유전자 발현변화를 보이는 발생특이 유전자 363개와 혈관생성에 관련된 혈관특이 유전자 31개등 모두 394개의 발생특이 유전자들 및 혈관생성에 관련된 유전자들을 분리하여 이들의 염기서열을 분석하고 homology search를 수행하였다.

가. ODD PCR을 이용한 발생특이 유전자들의 분리 및 염기서열 분석

Zebrafish 수정란으로부터 초기 축 형성기간, gastrulation 기간 그리고 신경 발생기간까지의 발생 시간대별인 일세포기에서 10시간까지의 발생기간을 중심으로 하여 일주일 된 치어 까지 총 15종류의 cDNA들에 대하여 Ordered Differential Display PCR을 수행하여 유전자 발현변화를 보이는 363종의 cDNA 단편들을 분리하고 이들의 유전자 서열을 확인한 후 database를 이용하여 이미 알려진 유전자들과의 homology search를 수행하였다. 이 결과 얻어진 전체 유전자들 중 9.6 %는 Ribosomal RNA gene들이었으며, 7.7 %는 frog 및 drosophila등 다른 organism들에서 밝혀진 유전자들과 상동성을 갖고 있었다. 한편 알려진 zebrafish의 유전자와 일치하는 것은 EST clone을 포함하여 17.4 % 이었으며 나머지 65.3 %는 기존의 database에 수록이 안된 신규 유전자들이므로 추정되었다.

Table 1. ODD에 의해 분리된 유전자 서열을 이용한 database 검색

Serial Number	Clone Number	Sequence	Description
MG AF 096503	1 4-17-2	gacctgctagagcagcgtgtgctgacgtgtcgtcaatccca ttgtgtgtgtgtgtgtgtgtgagttagcactttaactg	Unknown
MG AF 096504	2 4-17-5	ggccattcctttaaaccctagagggtgtgtgcatgaaaatcca agtagatcagcggtttctgaaattctctcagaccaggctgtctgg caccaacaacctgcaactttcaaagtcacctaaatcaccctttg tcccattttgatgtctacatgacctaaatgcatgagtgcagccata tgattggctgatagaatgtgtgtacgagcagt	MHC II
MG AF 096505	3 4-17-6	catcaatctctacagaggaacgggtcaaagggttctgagaaccg caggatggcaactgggtgcattcaggagtgccacactggaacaa agcgtggaccgccctccgcacca	Unknown
MG AF 096506	4 4-17-7	tcgttacgggtccgagacagaggacgcttcgggaggggggggtg gggaaattaaacatcggccggcaggccccgggacggcgtctcct ctctgcttcccccggtgggaaacgcgagagtgctttaaac cacggccc	Unknown
MG AF 096507	5 4-17-9	aggtcacctcgccctcggcagaggggcggggattcggcgtact tttccctctcgtc	28s rRNA
MG AF 096508	6 4-17-10	ggtgcgggcgcctcggccggcggcctaagcagccagcttagaac tgtcgcgaccagggaatccgactgtttaattaaacaaagca tcgcaaggccctcggcggggtgtgactcgatgtgatttct gcccagtgctctgaatgtcaaag	18s rRNA

MG 7	4-17-11	cgcacacgtctctgattctggctgaagactcagaaactcaag aggaagagccttcgagaaattggcccatgtggctctgggttga gaaatgctcctcgctgttggcctgtcattcagccgttgctg tgttgccgttt	Unknown
AF 096509			
MG 8	4-17-12	gggtccctcgcctcggcagagggcggggattcggcgctgg acttttccctcttcgctcgcgctactgggggaatcccggtt ggttcttttccctcggcttagtaatatgcttaaatcagcggg tcttctcgtctgagctgaggtcg	28s rRNA
AF 096510			
MG 9	4-17-13	ggggcccggagcgtttaccttgaaaaattagagtgttcaaa gcaggccgccagccgcgctgaataccgcagctaggaataa gaataggatctccggttctattttgtgggttcttggaaaccg gggcc	18s rRNA
AF 096511			
MG 10	4-17-14	cagcagttcgaagtgtcagctgcttagtctgttgagctgagt tgacaaactgatttcaaagatttaagcaatactgaatcaat actgatatgaatactcatcgcacaatcgtaatcttttgcgtg ttga	Unknown
AF 096512			
MG 11	4-17-15	agatcaagcagcttttggccttctgctctacgggaggttc tgtccccctgagctcgccttaggacacctgcgttaccgttga cag	28s rRNA
AF 096513			
MG 12	4-17-15.1	tgcatagtgtgtcaattaggacacaactttaactccactat atttatttcacgaataatttggtaaccattaacatcgcag agaaaatggtt	Unknown
AF 096514			
MG 13	4-17-16	tagtgccaccctcaccctccaattcacctttatgctctagt ccctagtgtcaggaggcctggcatgtccatgocggtctctgt gtaacaccac	Unknown
AI 204702			
MG 14	4-17-17	gttagtccaggaaggcactttatgtatatgggaaagtgcaca ctgcatctagaggcttacgaaagggcccaaaatcgc	Unknown
AI 204703			
MG 15	4-17-18	cgcgggcgcagatcttgggtgtagtaagcaaatattcaaag agagatttgaaggc	28s rRNA
MG 16	4-22-1.1	ccctgtaacttgatccatttctaattatgtagctctttgtca gggagtgttccctatccaatcaatcttgcataacgcaagt tcccagttggagctcc agcctgacatc	H u m a n m e t h i o n i n e a d e n o s y l t r a n s f e r a s e a l p h a s u b u n i t g e n e
AI 204704			
MG 17	4-22-2	gaccaggggaatccgactgtttaattaaacaaagcatcgcg aaaggccctcggcgggtgttgactcgatgtgatttctgcc cagtgcctcgaattcaaa	16s rRNA
AI 204705			
MG 18	4-22-3	aacagcctaaaaagaggaaatggtttattttggctcagttc agccaagtcagctccagggtgcttggccctttgctttggggc tgggaaagaagcactatgtcatggcggaggagagctgctcat ttcacagcaactggc	Unknown
AI 204706			
MG 19	4-22-4	aaagaagcactatgtcatggcggaggagagctgctcatttca cagcaactggcagtgagaggcatggaccgactgtgcagctc cactcaggcctctgcgatgtc	Unknown
AI 204707			
MG 20	4-22-5	acggtcggggcgcctcggccggcggcctaagcagccagcttag aactgtcgc	16s rRNA
MG 21	4-22-8.1	atcgcaaggtggctttattggattagttgctgggggaagca gttcttcccagagacatcaagtgcagggga	t r p m 2 h o m o l o g u e
AI 204708			
MG 22	4-22-9	gtgtgtatgagtgtatgtgtgtatgtgtcaatgtgtgtat gtgtttgtatgtgtgtgtttgtgtcaaggtgtgtatgtgtat tgtgtgtctcagtatat	Unknown
AI 204709			

MG 23	4-75-1	gagggcgggtccggagcttgtgcaaccagtggtggaccgatc catcaagatcgccatgacaacctgtgagcagatagtcaggaa ggactttgctctagactcagaggagtctcgatgctgtggc tgctcaccacatgatgctgaacctgactgccggcatggccat gatcacctgcagagagcccctgctgatgagcattgccaccaa tctgaagctaccggcc	O. mykiss vtgl gene
AI 204710			
MG 24	4-75-1.1	gcggtcccgcAAAatgctcgacaaaagcctttgcagaaagaat cattcagactacaaggacatatttaagcaggccacggagga ccgacttacaagtgctacgagctgccctatttcgaggggtga ttttggcccaatgttctggaggaaagcatcaaagagctgga gcaggaggaggaaagcatcaaagagct	Human CREB binding protein mRNA
AI 204711			
MG 25	4-75-2	gtcccggcccggacacggaaaggattgacagattgacggctc tttctcgattctgtgggtggtggtgcatggccgttcgtagtt ggtggagcgatttgttgggtgatccgataacgaacgagact ctggcatgctaactagttacgcggccccgcggctcggcgtc tgcaacttcttagagggacaagtg	18s rRNA
AI 204712			
MG 26	4-75-3	acatcagctatcagacaaaacgcagatgctctgatgcttcaat tgctaactctgaattgtgagcttcagctaaggcctcaaggc gtagagctgttacctcaaagagctccaagccacgggtgtgca caattcatgaactaactca	Unknown
AI 204713			
MG 27	4-75-4	ttagaatactgatcatggcacgagtggttataagttcaag gatgttttaatgctccgaacaataaatatttagcgatcatt caatatcattaagactaataagaaaacattttacttcccag atgctatctcacagcttatatactct	Unknown
AI 204714			
MG 28	4-75-5	ttagaatactgatcatggcacgagtggttataagttcaag gatgttttaatgctccgaacaataaatatttagcgatcatt caatatcattaagactaataagaaaacattttacttcccag atgctatctcacagcttatatactctaccatttttaacaag cagttcattatttaataaagtgaagatggctta	Xenopus mitoch ondrial cytochrome oxidase
AI 204715			
MG 29			
	4-75-6	cittgaaaactgatcttcagctatactagaagacg	Unknown
MG 30	4-75-7	gtatagtgattatgctctaaaatatattcttttaaatgct tgggtaaaaaaaactaaaaccttttccccctttaacacaat atattttattttgagaacatttaaaatattttggagcagta aagatgccaggctaaataattcaaatgaatcattgactctg ctgcttcatttgttttaaacacatatttctttaccatttg aatggcatccttatacttttctgctgaaga	Salmo trutta antigen mRNA
AI 204716			
MG 31			
	4-75-8	gctggcctctcggggcgtgggttcaaagacctcccgtctgg acttattcgcacccggg	rRNA gene
MG 32	4-75-9	gggaccgcctccgcaccctgaacacttttaatatcaaaaat aagatctggaggattatttacagctctgcataaaatcatgtt gtatgatattttatttttggaaatagcaccatcagacgatgc agcggatgatgaatagctgacagcactggatcctggttgggt tgt	Human retinoblastom a susceptibilit y gene exon
AI 204717			
MG 33	4-75-10	gtcttctagtatagctgaagatcagttttcaagaattcaag tgagacggcttcgactacaatgggcataaaagctgtggttagc ccctcagatttcagagcatgtccgtagaatacacctggacg tggaacaataaaaagcgggttgggttaatccgtccgggaccgc cc	Small nuclear RNA gene
AI 204718			
MG 34	4-75-11	gcaaacgagccctgatgcaccaccagaccgacacagcgggtg cgagcgtgagggtgcagaaagaggaagagaagaagttaaag aggcggcggaggccttcaactgtgctttccga	Human tetratricopep tide repeat protein
AI 204719			

MG 35	4-75-12	catcagctatcagacaaacgcagatgctctgatgcttcaatt gctaattcttgaattgtgagcttcagctaaggcctcaaggcg tagagctgttacctcaaagagctccaagccacgggtgttgac aaattcatgaactaactcaagcgactgactgaaaaagaaag ggtttggagcagaggcctgcaagcagcccagcagtagctgta agacaccctgtaagagttctggcagtagca	Unknown
AI 204720			
MG 36	4-75-13	ctccacgcagttggaaaatagcaagcttgtccccggccgtgg cgtgggtggactacgtctgtatattcctacatcttccaag agcccttgcggcattactggggagggtaaaacat	Xenopus ribosomal protein S8
AI 204721			
MG 37	4-75-14	cgcacacacacacgcaaaaaacgacacacacaca	Unknown
MG 38	4-75-15	ggacacggaaaggattgacagattgacggctgtttgtggatt ctgtgggtgggtggatgcatggccgttcgtagttggtagaca tttgttggttgattccgtataacgaacg	18s rRNA
AI 204722			
MG 39	4-75-15.1	ggctaattggccaagagctcttgaacttgcacattgtccatgc tgcagtgtgaaaaggttcaactttaggatccataaagcgc aacgactgcctctgtctctttaactatgtggtaattcgacg tcgttgccttt	Unknown
AI 204723			
MG 40	4-75-16	cgtctgatgttacaacttagccaagagtgatgatgct aaaattagtaaacagcagcgtgtgatggttaaaatgctagcc tagaacgccatctgat	Unknown
AI 204724			
MG 41	4-75-18	gggaacttgattccctgaaggtcgttgaagaccacgacgttg ataggctgggtgtggaagagtaccacctcaccgacccggct tagccttagagctaaaaaaaaa	rRNA gene
AI 204725			
MG 42	4-77-2	ccgtgtgcacttaagacttgcattggcttaattctttgagaca agcatatattcatgca	18s rRNA gene
MG 43	4-77-3	cgtaatatcctctttggacaccacaagagcacagaaacatg cctattcaggatgccatgggttggggcgcacaactttgat agtttggttcaggattct	Unknown
AI 204726			
MG 44	4-77-4	ccctgcacagcagccaactgaactcataaccgaccactaacc attggctcccactgacgttttgatcccagcaccaataagctt gtcttaattccttac	Unknown
AI 204727			
MG 45	4-82-1.1	gtagtgcgatgtggggacggagaaggtagctcagccaactg ttggatatgttgggtcaagcctgtagtcgtgcctggtaggca aatccgocgggcttagatgaggggtgataacgagctctgcttg cagacgaagtgagtataacctgcttccgggaaaagccacta agcttcagctacacacagaccgtaccgcaaaccgacactgg tgccgagatgagtatctaaaggcgttgagagacc	23s rRNA gene
AI 204728			
MG 46	4-82-2	ttccaatgactttgggtatggaggacagaagaggccccttga agatggaggttaagttcatggaaaatgttgttggatgatggat taaatgattaactaaattatttggtagtaaaataatcgtaa aactttaaatttaagtgtctaatgtgacttaggcaggttaca cattcaagttagca	Unknown
AI 204729			
MG 47	4-82-2.1	ggaaccagcgatcaagatgtccctcgtcatcccagagaagtt tcagcacatccttcgttcctcagcacgaacattgatggaag acgtaaaatcgcatttgccatcaccgctattaagggtgttgg aaggcgatatgccatgtggttctgaggaagctgatattgatt taataagagggtggag	18s rRNA
AI 204730			
MG 48	4-82-3	ctctaggtttacacttgaacacagagttgacttactctgaga tgggaaactcagctctttcagtttcagatcagctgaagttag ttcaatcaactccgagattggagcttctctacttgacaaagt taaaacttgacaaatagctgttttttattgattgcattaag attatttttaattcctcaaggatagataatttacttaagcc aaatgcatttaatttgaatgccc	fad3 gene
AI 204731			

MG 49	4-82-6	ggcagggagaacatgcaaactcacacagaaatgccaactgagccgaggctcgaaccagcggcaggcctgggggtcg	Danio reio DANA element
AI 204732			
MG 50	4-84-1	cggacacggaaaggattgacagattgacggctctttctcgatctgtgggtgggtgcatggccgttcgtagttgggtggagcgacttgtcggttgattccgataaocgaacgagactctggcatgctaactagtacgcggccccgcgggtcggcgtctgcaactctta	18s rRNA
AI 204733			
MG 51	4-84-3	gaattgggtaggctaaattgtccgcagtgatgagtgtgtgtgtgaatgtgtgtgtggatgtttgatgggttggctggaaggcatccgctgcgtaaaaacttgcctggataagttggcagttcattacgctgtggcaacccccggattaataaaaagggactaagccg	Danio rerio notail (ntl) gene
AI 204734			
MG 52	4-84-6	ataatggtcaagagtctttgaacttgcacattgtccgatgctgcagtggtgcgacggaaacaagacgggaggatccataaagcgcaacgactgcctcttgtctcttaactatgtgtaattcgacgtcgttgcccttgacaa	Unknown
AI 204735			
MG 53	4-84-7	gggtcggaggcgggtcccgcacaaccgacactgggtgcgcgagatgagatcttaaggcgttgagagaactcaggagaaggaaactcggcaattgacaccgtaactcgggagaagggtgtgccctatagtggtgaagtgaacaacggagcatgaacgg	Arabidopsis thaliana cDNA
AI 204736			
MG 54	4-84-8	gaattgggtaggctaaattgtccgcagtgatgagtgtgtgtgtgaatgtgtgtgtggatgtttgatgggttggctggaaggcatccgctgcgtaaaaacttgcctggataagttggcagttcattacgctgtggcaacccccggattaataaaaagggactaagccg	Hypophthalmichthys growthhormon (scGH)
AI 204737			
MG 55	4-84-16	gogtggagctccagcttttgttccctttagtgagggttaattcogagcttggcgtaatcatggctcatagctgtttcctgtgtgaa	18s rRNA
AI 204738			
MG 56	15-4-4	tggagggctctgaaaaatcgtggctactgctgtcggagtcattcctaaactggaatcatcttcacattatgggggcaggagaagacgacgatgatgaggaagagaagagaagaaa	Unknown
AI 204739			
MG 57	15-7	agggaggagacatctccctcagctgtcagctccactcaggctctctgattgtccttttgggatgg	Unknown
MG 58	15-9	aggaagtgcctctctacttagtgaactgaaattagttagtatacaacatggccctttgctttg	Unknown
MG 59	15-13-1	ccacaagcatcctgcaggcgttactgtaaagacgctctagaaataaacgtaaaagtacggcgtgagaaaccgctggaggatccta	Unknown
AI 204740			
MG 60	17-1	ggcctacatgagcccggagatggcaacctcatggacgcctggccctttgatggcggcatgatcggcttcaggagcggcagggaactctaccgggaaggaggtccagtatagacatgctggatgacctcgcgtgtgaagggcgcgagtggtgtaactgcnctcaatctcaacgccgctgtgaagaagagacggaaccggacactaccgtgcaacgcgtgtcggcctttaccacaagatgaacggcatcatacgaccttt	Xenopus GATA-4/5 homologue
AI 204741			
MG 61	17-2	caggttacngccggacacagacagtgtaatgtccacatgatgcatgatgaanatcggctcctcctgagctctgatagggaactcgcagatgtctcgatg	Unknown
AI 204742			
MG 62	17-3	atgtgtgtatgagtgatataatgtgtgtatgtgtcaatgtgtgtatgtgtttgtatgtgtgtttgtgtcaagggtgtgtatgtgtatgtgtctcagtatataatgtgtatata	Unknown
AI 204743			
MG 63	17-4	acaatggaggtgatgatttccagtttcttcaaaatatcttatttgtgttcaactgaacgaagaactaaaaaggtttggaccacttgagggtgagaagattttgattttagggtaaaccatccctttaaactacataaagcatgtttttacattttattacacaacgttttaggccactaatacatttgtgttttagtgatgaatggaatcacaacaggattatttcttattctcttata	pes homologue
AI 204744			

MG 77	22-5	cccgatatgcctggaggactataagaacccttccgccgtgc cgggtgcgtctgcgagagagccaaggcngctgcgccgtcactg cgcaatacggcttcccttggccggatcggtgaagggtgcgac tactgcccgtagcaaggagccccagacacgctgtgcatggacta caacagaaccgactccaccacagtgctgaagggtgctgtccaaa cccaccaactaccgacga	Mouse frizzled 8 homologue
AI 204758			
MG 78	22-6	gcatgtccacagggatcttaagatgggtgcgtttgtctttcagg gctttgctgttaggtttttttattgatgcgtaatgatgctga acacaaatggcatgctccgaaatccctgagtgtagctgcta gagcattagatgctgcatgctggaaacaggcatgaacggga ccaaaaggaactcgtcatttgttttccctggaagcttggtta tcattcaggatggctgaagacactgaacgtgc	Unknown
AI 204759			
MG 79	22-7	ctgtcctcagtcacatatttgtcactagctacaaataagcc ggggagagttcatcgaggcttatctgagctcaagctgcaaa ggaggcaggccatgctataaaaaaaatgtaaaagtgtattat atagcgcatttactgtgtatggccataagcgtgtctctccgga ccactaccagtgtgcagc	Unknown
AI 204760			
MG 80	22-8	gcacactcacacatacacgtgcgtttatttagaccatattgca gtggagattatagcggtaagatttacatggtaattttacttt cttttttcaaacaggctctgttttaaaaccttaaaacttga caaaagcttataataatcagaattgcaacagatattttaatcc ttgttcttt	Unknown
AI 204761			
MG 81	22-9	gtgtggcatttgtgcaaagtagaatgtgagtaaaagatcagca atagccttaaggggatattcaagaacttgattgtggatgtgt gaaataatgaaactagcttagggcaagagatacaactttgg gcatgacagttttggtagatgagtgaaggtaattccatcagca gag	Unknown
AI 204762			
MG 82	22-10	aatgtgtgttatgccttcacaatatatcgttatcataatgta gcatactgcaatagtgacatcgcaagatatgcaatgttgaat atgaattatagttgaccgggagctacagaattgtatttaatta ttgtatttatatggaattactatgattttaatg	Unknown
AI 204763			
MG 83	22-11	tgaaaatgaagggtcaggccttgtgatcttcaaagagatcaa cagtgctccaacgcctccgttcaatgcagggttcccattt tatgacaaacctatgcgtattcagtttcaaagcaggactctg atatcattg	U1 snRNP
AI 204764			
MG 84	22-13	cacagatatgtgtaaacaaatcccgtagcttttccaaaaca tttaaggttatttgttttccaaacttttccgggcctcgaaa aagccttgtaaacctcatgactccatgaacctgatgtatgc	bithorax complex
AI 204765			
MG 85	22-14	taggtgcgtcagtcactgaatccagcaaatagnagttctcaac agtccaccgcattccatctttattttatgctctgtaaaacatt tcccaaagcgtttttcgaatgc	C. elegans clathrin- associated protein homologue (DEA P50)
AI 204766			
MG 86	22-15	agaggttctggagaatctgggcaacagtcacctgtcgcaggac aataatgaggtctccacaggcttccctaacctggctgtgttca cacgagaggtcactgcactcttcaaaaacctgggtgagc	Unknown
AI 204767			
MG 87	22-16	ttctattccaggtttcaaacccagatcacctctaattctt ccatgacggaaatacacaatatctcagcgtaaatccaagggc tagtttagaatcatgtgcaaccgtatgagtggtgt gtggaccgccctcgcacacgcct	Unknown
AI 204768			
MG 88	22-17	actgctaagatctccgtcaagaagaaggatgtgaatctgatga tgtcttcaggacagatactcggcattogctttctagataaact ctgctcgc	zinc finger 5 protein mRNA
AI 204769			

MG 89	22-18	cttgtaaaagggttccaatgtagcagaatttaatatcaagacta cttttggcacatttggtaacttaaaacttgggttcttctagt tcaccagtgtgcactgattacaataaaacaatttcacgc	Unknown
AI 204770			
MG 90	4-144-6	aagtgtatttatatagcgcatttactgtgtatggccataagcg tgtctctccggaccactaccagtgtgcagc	Unknown
AI 204771			
MG 91	13-1	acgcaagtcttgctttttggacctgaaactacaagtaatgcc ttggaaigcaatcaaggcaactgtcaaaacactgaagccoccaa cagaatgcaaacgaattagaaagcctagtaaaagactcattga atggacagaagaatacgcattggttttctgctaagaagaaa accaaaaaagaaa	unknown
AI 204772			
MG 92	13-2	ccccctcagaggtcgacggatcgataagcttgatcogaattc ctgcagcccgggaggcagaggttgacgtgagctgagatggcaa cattgcactccagcctgggogacagagcagactctgtcttaa aacaaaacaaacacaaaaatagctgggtgtgggtggcgcacac ctgtagtcgcagctactcaggaggctgaggcangagaatttgc ttgaaccaggac	Alu subfamily
AI 204773			
MG 93	13-5	acgggtgtctgcactgagagtggttattctgtgtgtgtgtgt tgatgagtgattgctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt tttctctcctatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ctctctgggtcgcgtgggctgggttatactgtgtgtgaagag gccagctt	unknown
AI 204774			
MG 94	13-6	tttttaaaaagcatgcaagatataggaactaataaagtatc acaggttcccgagggaaggaatgttgagtgacttaggtta aacaaaatgaaagagtcgattgagaaggcagaaggaagagcag gttgttttggtaagtcattgtgtgtctcgtgtggagacactg ttgattcttgcicaaaaacagataagaggcaagcaggaaaat tctcaga	unknown
AI 204775			
MG 95	13-7	acgaatcaatcagcgggtgctatagattgacaattctccaggg gaggggcccagaccagacgtaagttctgcagattttgtgtga tacaacatgaagaattaaactttacagacagttgtgttca atgtgaatggtaattcataatgaaatgcaattgtaagtttgg agtgaattttggagaatttgatgtttctcattcaaacggaa tgccccagagctttcaaaagatggtctccagatgaaatgactt cttaagagactttatccactctcagcctaattaaaaaa	unknown
AI 204776			
MG 96	13-8	actaccttttaagaattaaatgtaacatcctgttgatcaaaa gtgaaagatgtttgcaatcttactatttctaatcaaagcaatt atttaaactttatcaaacagaagaataagcactgggatatta acattttgtttacattggaagaaaattaaactactacagtgg gtatggaagtatttt	unknown
AI 204777			
MG 97	13-9	acctttgcatcatgatttagccaacaccactaagcaagagacc tttagtttaaagccccgaatccaggcagctaccccagacagcc tatttaacttagggccaaccogtctctgtggcaatagagtggaa gagctccgggtagaagtgcagacctatogaacctggcaatagct ggtgtctgggagatgaataaagttcagcttcgtacacc	16S rRNA
AI 204778			
MG 98	13-10	tctcctctagactcgaggaattcctcaaaactgcctttaagctg gacttcgagacacgttgtgatgatggtcagtatgaggtttaa aaaa	unknown
AI 204779			
MG 99	13-11	acgaaccagcaaccctcttgcctgtgagacgacagttctatcca ctgagccaciatgccaccctttacaaatgtttatcttgtgaa attataatcatattgcaagctatattgcagaaaaactaaatat cgcaatgcatattttttcaatatcgtgcagccgtattgca cactgaaatccgaattttcatctgtaatttt	Danio rerio myocyte enhancer factor 2C similar form
AI 204780			
MG 100	13-12	tgctcctctagactcgaggaattcccttgaataaccttgaagt ttcaaccatctgaaatgtgacgtttctttggatttgtgttt gttattcatatgtgaaatgggtaataaatgctttcattgttt attttagccattgtttcaaaaggacatgttaaaaaaa	unknown
AI 204781			

MG 101	13-15	aagaattcggcgtggtgCGGagggcggtAagaatcggcgtggtgCGGagggcggttcacatacagctgtgccacgagtcaagggatgatgaatgcacaactgtagatttcagaactcagactctcaaccacacatctccatcaacatctttcaaagtctaatgaagatgctgatagcttaaaaaa	H o x - 2 homeodomain protein
AI 204782			
MG 102	13-16	tttttaagcgaacgctgCGggcggtgtggcaccgttccctttcgCGcttgCctgCCggccgaccacttacctccttgTggaggctttccgctgcaaccCGtttGtccactcagctcactgtgtga	unknown
AI 204783			
MG 103	13-16	acaaaaaattttgctaaaaggatttgacatttactatgtctgtcatatcttttaaacatttagtatgtaaaataaaagtattgacaacagacaaatttgactcattttgattgcatttaaaaa	unknown
AI 204784			
MG 104	14-3	ttttactccgtggtgcccccaaccgaaggagaggtttatcttttactagtttaacacttttattggtttgcttgatgtaaattaatcg	Danio rerio frankel mitochondrial ribosomal RNA
AI 204785			
MG 105	14-4	ttttatcatgggacaattcaatcagaccatgggcccttgccctctatggcatgaggggggagcagccc	unknown
MG 106	14-6	ttttacaaatatgtgtgtaatttattaattacttcatgtgacgtaattcacaagtttgagacaatcaaatcacaactttgctgttactagcatgaagattgaattc	unknown
AI 204786			
MG 107'	14-7	ttttacatctgatccacaaatctgttttctgtgtcagacaccatataaaaataactaaagtaattttagtaataactagttgttttaaccatactcacacatccaatagagaaagagatgttgactatcagctaataatgttgctagaattttgcttttatgcaa	Zebrafish Alu repetitive element
MG 107	14-8	acgCGctcctaagcctgcatgacctccggactccaccctcaagcctgacgcagaatcttaagctttggacttgaccacaaactctgaccatcaatcccttttttcttccataacctccatttctagggtttcaccagaagagtttaccagccactacaacatttggaattggagtaaaaa	Danio rerio cDNA clone 978658 3' similar to gb:L25085 PROTEIN TRANSPORT PROTEIN SEC61 BETA SUBUNIT
AI 204787			
MG 108	14-9	gaattcgttcatagaaaggattttggaatgtaagtgggtgataagaatggatttaagggatagttcaccacaaactgaaaacgctcgtcatttaccacccttccctcaactgctaaccattgacttcaataagtaggagaaatactactatggaagtcaatgattataggttctaacatcatctaaatactctttttgtgttt	zebrafish embryo 15 19hr Danio rerio cDNA clone 978617 3'
AI 204788			
MG 109	14-10	acctgtcaaacgtaacgcagggtgcctaaggcgagctcaggggggacagaaacctcccgtagagcctggccggcgctagcagccagcttagaactgtcgcggaccaggggaatccgactgtttaattaaacaagcatcgcataggccctcggtc	EGF/TGF-alpha receptor [Gallus gallus]
AI 204789			
MG 110	14-11	agcagagctcaaaagagtCGGccaccttgCagccgttcttcaCGctgCagctggacatccagctctgagaagatccgcacagtccaggagctctggaggtaggtggcgCGggagctccgttcagggctacaccaagaagcaagcaagaggtgggaatcatcaacactttacatgatctacacaccggcatgcaactgtgaaattacatcagtaactt	Mouse mRNA for ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (UBP)
AI 204790			
MG 111	14-13	aaaaatttgaactggcagctctcagaatggacagtttaattatagtagttttcacacatgcgctcacctttttctctatcccaatgctttgttactgagtgaaatcacattttatgaacatcttttccacctgtttatcttaatgacaaaaaaaggcattgaaatgtagaaaaa	unknown
AI 204791			

MG 112	14-14	agtaaacctagggtattattgtattcaaatatgacgtggc tttgcttttaaaagtcagcttctgaaaaaagtgcaaggccta tgtataattgggaatcggattgaattaatttgctaataaat ctgaattccccatgtaaaaa	unknown
AI 204792			
MG 113	14-14	cttctccaagcacaagtgtagccaagtggacaaaccattgg caattaacgagcccaaaaaagggaatgtgagttaaaaac tgagaaaaatccacaacagacatcgttaccocccacactggagt gcatatgaggaaagactaaaaa	zebrafish embryo Danio rerio cDNA clone 1035925 3'
AI 204793			
MG 114	14-15	ttttacattaaatcatagtaattccatataaatacaataatt aaatacaatcctgtagctcccgggtcaactatattcatattcaa cattgcatatcttgcgatgtcactattgcagatatgctaacat tatgataacgatatatgtgaagggcataaacacacat	unknown
AI 204794			
MG 115	14-17	agaaatgtaaagaaaaatatgtgcataactgagtaggacaaa ctttttattcgataaaacaagatgcacataaaactaaaatgcaa acacttctactgaataaattcctgtatgcgtaaaaa	unknown
AI 204795			
MG 116	14-18	acgcgcaataatgggtgacgtttacactgaggggtggaatggg ctttattcagtggttaaaggctgccaatgtgagctagcaaaataa aagccattctgtgttctgcaatgtaaaaa	unknown
AI 204796			
MG 117	14-19	ccgtgaattgggtaggctaaattgtccgaattgtatgagtggtg tgtgtggatgtttcccagagatgggttgcagctggaaaggcat cctctgcgtaaaaa	Danio rerio mRNA for MINDINI
AI 204797			
MG 118	14-20	ttttactccgtggctgccccaacccaaggtagaggtttatct tttactagtttaatacacttttattgggttgcttgatgtaaaatt aaatcgt	Danio rerio mitoch ondrial large subunit rRNA
AI 204798			
MG 119	15-3	tttttagcgggttttaaatcgcaagtagtgctatgggttattt gattaaccctttaagattactgctgactgactgactgactgac tgactgactgacaggtgcatgatgcgtgaggcagcaaacccga cgtcgctttcaattaagatgaacagtttcataattatacttt agttatagataaagtctgtggttctgcatacattact	unknown
AI 204799			
MG 120	15-4	ctgcagggatgagcagacatgagctggaatggcttgttagga cacatgatcaaaagcttgtctccctgctctccgcttcttgcca gtcaactctctgtcaccctgtgaggcagacgttaaatagatt tttttttaacgttgcgggcattctgccactcttcggactctg acaaaaatgatagcgtctgctcgtcctgtctttctcctcagag ggaaagctactctattgacaagccttcagcactaaaaa	unknown
AI 204800			
MG 121	15-6	acgcgatatccagatacagttacagcgccacctgctggccaca ggaaatgacatgatttacggagtataaactcctcccacaaat tttatcgtatcagcaccaatattgggtgggttattctgaaagc tctagtaatgataattgtaaagatctagagtttcgcagaggc ggcgnogtatgacaacctcacactc	unknown
AI 204801			
MG 122	15-6	ctgcaccggcagaatcagtcattctgatctcggagtgttgcg tggaactttaatgccacatgttagagtcacgtggcgtctgcgca gcagcaatccggacaaaaatttctaaccggcatcagggttcac gctaaggaatttcaactggccgattggaccagtgggtcagat tttacttgcctgccaaa	unknown
AI 204802			
MG 123	15-7	tttttagcttacaggagtggcaccctgtagtgggtcttctgctg ctgtagccaatctgcctcaaggttgtgtgttagagatgctct cctgcatttctcgattgtaacgagtggttgtttgagtgctgt tgccctctctatcagcttgaaccagactaattattctcctctga catcaacatggcatttgcgcccacagaactgcagccggg	similar to cut repeat region of homeobox protein cut and to paired-typed homeobox proteins
AI 204803			

MG 124	15-8	acagatggagtgaaatggagtttctggagcacaaggaccgtctttgaccaccatatgagcctttgccagcaatgtcaagttttattatgacgggaagcatatgaaactcagcccaaatgcagaggagggtggccaccttcttctcaaaatgttggaccacaagtaaccactaagacatctttcgtaaacttctttaagatggaggaggaat	DNA topoisomerase I [Gallus gallus]
AI 204804			
MG 125	15-9	acgctgtcaggaagtagagtgacttgctcctcacgctcaagacacggacagcccgcatacactttgggccaacattattagggccgagcaccgaaacggcgtaggcctattggaattgctccgttatattac	unknown
AI 204805			
MG 126	15-10	acggaaatgggatccaagcaaaaggtgaccaaggaatccatctccatcatcagagtcgtcaagcccacaggggaagacctgatcgtcagaaaccagagagctctcagattcaagaacagtgctgacctcgagactggccactggagaagaaggttcagacctgctgagaagagatacgaaccacttcgcccagagaccaaccgtgttcagact	unknown
AI 204806			
MG 127	15-11	actatatcaataaagtgttttagtcttttaaaaactgctgtatacatctgagccactaaacattgttcttaigacgttttcaacaggaggaaaacgcaaattacttccaaactcttcataatagcttgtgttacttaatgtaagactattcatgaatccagcataaacctgtatgacacacttcagatgacggcttagagcctacagctaatcaatctgacagatctggagtgattacagctctaaaaa	unknown
AI 204807			
MG 128	15-12	ctgcagagaacaagaaccccgtaaaaaggaaacggagtgaataaagctgaaaaaaagaagcttaaaagagggtctgacaaaaagaccaatccaactcttctcctcatcttcagactctgaggactctaatagtgtgtgaaagatgtctgacaagatcagctcaaagaa gttggagaagagggtcatgattgctaaaaa	unknown
AI 204808			
MG 129	15-13	acgaaatgttgtctaaaaacaaaaagaatgatgcattttatggctggatctggtttttattacattctgaattggacgttgaaaatgagcttatctcagccagcagagaggtcaatcacagtaatgcaaa ctcagtcagagacatagatttacttgcaacttgcttaacatgttacagtgcatgaatgtgtctaaaaa	unknown
AI 204809			
MG 130	15-14	acgagaggatcctccaggaggcggcgcagtggttaaaggagattgagaagcatgacccaagtgccaaacgaactgaaggtaaccaaa aagatgctgacaaatagtcctgatcatgagctcgctggcaatcttagttcctgctatattttttttggttaatattcactgacaa gtaggagcaacgcttctagactaaaaaaa	Z e b r a f i s h s a t e l l i t e t y p e I D N A
AI 204810			
MG 131	15-15	tttttgggttaataccaaagctactacaaattttaaaggccaa atagtaactacataacatctatttatagagcaaatgtgaataa tcagaatcacatggcaactttgatagcaacgaacctttcattt tcagttaagtggcagcactgca	unknown
AI 204811			
MG 132	15-16	tttttgtgaagattataccgtcagaatcttatacccgccaat cacctcacagcaagaaggtcgctggtttgagctccagctccat cagttggcatttctgtgtggaggttgcatttctcccgtgttt gcgtgggtcggccaagtagcctccggttt	Z e b r a f i s h m e r m a i d r e p e a t
AI 204812			
MG 133	15-17	agccccittacaaggatacaacctttcaggagaataaaga tcataatttacaacacggttgcgtagtgggcctggaagcag ccacctaaaaagaaagcgttaaagctcaggtgaagaagaatc ataattctgacaataatcttacttcgctaaaaa	f a 1 7 b 0 7 . s 1 Ekker early gastrulation z e b r a f i s h e m b r y o D a n i o r e r i o c D N A c l o n e 1 0 3 5 9 2 5 3'
AI 204813			

MG 134	3-2	attcttaaaaaaaaaacggtcgactgcggaattccgcaggtgct atTTTTTtactcttccatcccaaccacaccgcctccgcacc acgg	unknown
AI 204814			
MG 135	3-8	aaagtagtccgtgttccagcctatgatccagaggccgttgctg aacacgccatcggtatgatgatgacgctgaaccgccgtattca ccgcgcgtatcagcgtaccggtgatgctaacttctctctggaa ggcttgaccggcttttactatgtatggcaaacggcagcggtt atcggtaccggtaaaatcgg	Escherichia c o l i D - l a c t a t e dehydrogenase (ldhA) gene
AI 204815			
MG 136	3-10	TTTTtaggaaaaatagctctacagatagaaactgacctggat tactccggtctgaactcagatcagctaggactattaatcggtg aacaacgaacccttaatagcggctgcaccattaggatgtctg atccaccatcgagggtgtaaaccc	zr13b11.s1 Stratagene hNT neuron (# 9 3 7 2 3 3) Homo sapiens cDNA clone 648669 3'
AI 204816			
MG 137	3-10'	TTTTtagtgTTTTcctctgTTTattgacagctgctgtatatta cattagagcgttagactcctcgcgggcttgaagttcatgcc gaccggagctgagtgacctgcag	zbr2454 3' similar to gb:M13932 40S R I B O S O M A L PROTEIN
AI 204817			
MG 138	3-12	TTTTtagctgtcagttcagcattgacttcttctcatcctcca gtctctcagtcgtctctttgagtttagcctcaagctggatTTT gctcttgatcagaccctcacatcttctcagcatctgagaga ttctctgattcagaagcctggcgatggctgatgctgggaaa	C y p r i n u s carpio mRNA for myosin heavy chain
AI 204818			
MG 139	3-14	ctgcagtttgaaggacactgcgcacgccatgatcgctctgaa ctggaccccgagtttgaccgcatgtgogaggagatcaaggagt cccgcaggaagagagcccctcagacagcaccaccgcccgct cactccaagcactgtggcaaccaggaagcgatgggagaggagc ggattaagcagctctcaggg	unknown
AI 204819			
MG 140	3-14	TTTTtagcgtcttctagtagctgaagattagTTTTcaag aattcaagtgggacggcttcgactacaatgggcataaagctgt ggctagccccgagatttcagagcattgtccgtagaatacacc tgacgtgaacataaa	C y p r i n u s c a r p i o cytochrome c oxidase II
AI 204820			
MG 141	3-15	gaccagaaaaccacaaactgatggacacgggactgtctgcc agagcggctcagagactgcacaactcacacagcaatgaccac tgtgacactgctataccacacacacacacactgttgatg ggttatTTTtataaccagtgtcttaaattgtgtttatTTT	unknown
AI 204821			
MG 142	4-6	cagcacctcgggtgaaattcatcactgTTTgtTTTcacctaa atgtggatgagaacggcatcatctgcttagacatttgaaaga caagtggcctgcgtatatgacgttcgctccatactactgtca ttcagagtcttcttggagaaccaacaatgatagtca	cyclin-select ive ubiquitin c a r r i e r protein [Homo sapiens]
AI 204822			
MG 143	4-7	gaggaacctcgggttcagacatttggttcgtgcgcttggtgg ggagccactggcgcgaagccaccatctgctccaatgggtcctc gcccatgggttgggatgcataaaaaaa	28s rRNA
AI 204823			
MG 144	4-8	aagtagtccgtcttccagcctatcatccagaggccgttgctgg aacacgccatcggtatgatgatgacgctggaaccggcccctat tcaccgcgctattcagcgtaccgctcatgctaacttctctct ggaaggtatgaccggcttactatgtatggcaacgcagcgtatc gtaccggtaaatcggtgatgct	Escherichia c o l i D - l a c t a t e dehydrogenase (ldhA) gene
AI 204824			
MG 145	4-9	tggtctcactctctacaaataggcataacagaacaataaatat atacttcaggcatctTTTgaaccactgtgaggggtgtgacact aagtgtgaatgccttgtataactcacaccctcctagggaaatct gatatag	unknown
AI 204825			

MG 146	4-10	aaccaggaactggtttaacgatcaatatgagaagctgaagcaa aagatgactgaaaccttcaattaa	R A T APOLIPOPROTEIN C-IPRECURSOR (APO-CI)
AI 204826			
MG 147	4-11	tacaaacgacgaaagtggcctattgatcctttaactttacaag tttaagctagagggtgtcagaaaagttaccacagggataactg gcttgtggcggcggcagcgcacatagcgcgacttgctttttgacc ttcgatgtcggctcttccatcatgtgaagcataattcgcaacg	28S ribosomal RNA
AI 204827			
MG 148	4-12	atatttaggtgggatgctttagtgtttgcttattcagcgg ccctagcagccgagccttttctgaagcgtgggtgaccogtgt ggtctttgacgtgttatggttatggtctggttgaattgtg gcggctgggttttattaactggtgacactggttattaatac ggttgatgctttaagagttctgtatcgagctcag	C R O L A NADH-UBIQUINO N E OXIDOREDUCTAS E CHAIN 6
AI 204828			
MG 149	4-13	ccactcaaaggtgtgagagcgggcaagtgtgccagtgcctac ttcgatatgtaaggctctaagcacttagaggaattcttggaa aaaaacattctcaatataaaaa	Danio rerio ras-related n u c l e a r protein Ran mRNA
AI 204829			
MG 150	4-16	agtcgagtcaataactgnctgtttttatacttgtggaactgt atgtgctcgttaaaccctgattatcaaggattgatctgtttg tctaatcaatgtgtactgcactgttgaactgagatgcatagg aactaacattattacat	unknown
AI 204830			
MG 151	4-17	gggcgtgggtcggaggcgggtccaaatacctatgtgtcagcgt agtggcagatttaaaaacaagattaacatccacgtgctagcaa gggaagatcgtcacatagggcggcttctcacttgataaacac acaagagatgtcatcaaggt	unknown
AI 204831			
MG 152	4-18	ccaactagtagattacacacaggaattgagaaaagagcactct taaattacagctgttagtcagcggcctctttttgcgcg tcaatncgtctttgtcgtgtgtgtgtaaagttagacgatcgg attacngtcatttaaaagataatgtaagcaggtcataaaaaaa aa	HAEIN BIOTIN SYNTHETASE pir:11F64108 b i o t i n synthetase
AI 204832			
MG 153	4-19	cattctccaacaacgacacttactgctaaaacagcctaactgg tgctccatgatttgcttgatgtctcatgtctttctatccaaat ctatittgtatgtcttactgtttgatagttttactaacaga aattccatgtatcagttattctgaataactaaaaaaaa	2F3 3' similar to SW:GTP_HUMANP 0 9 2 1 1 GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
AI 204833			
MG 154	4-20	cagctgctgataacctgggtgggttatttctccgaaaaagggg gctgggtgtatattacaccagtaaaacattacagagcaacact ctgagcttatatccagagcagctgtcatatgatgacgcctca gatatgct	unknown
AI 204834			
MG 155	4-21	catttgctggatgagtaggtggttcattccactgtggtgacc cggattaataaagggattaagcttaaaagaaaatgaatgacgt aaatggttactgatttctaacttcccttccaaaatgtatgt gtgttcaataaaaaaaaa	Danio rerio clone DANA-m1 D A N A retroposon
AI 204835			
MG 156	4-22	tgcagggtcattaggggacaaccaggacaccaaactgtctct acattccagtagtaaggaagcccacaggctgaatcaaaaactt tggaccgcctccgcacc	unknown
AI 204836			
MG 157	4-23	aaanaaaataactgatctagaacaggaagttagcaaacttgc gatgaagtgaagacactgatggaaaaatgcaacgaacaggaaa gatacaaaaaggagatggaacttgccttagagctttaataaaaa aaaa	unknown
AI 204837			

MG 158	4-24	gattiaatttacatcaagcaaaccaataaaaagtgattaaacta gtaaaagataaacctctaccttcgggttggggcgaccacggaat aaaaaaa	Danio rerio frankel mitochondrial ribosomal RNA large subunit gene
AI 204838			
MG 159	18-1	ggactctgggtgtgtatgaatgigtgtttacaatgcttggcctc aagaagacacagacatttgacttgaatgttcatgggcaaccac tgatcaagagcctgaccaagaagctgggtgatggtacaacaaga tcctgagctgtgaagctgaaggatcaccaaagccaacgggtgca gtggattaccaatggcactgatgtgaaatttcaagagagcgaa catgtgaaatggaaagatcacatactatcactgtcagtccaa aggccaatgtcactgtgt	neurolin homologus
MG 160	18-3	ttttcccagtgagaagactgaagtcaggtttatgaaacggt gtatgacaaacgtggtcaggttatgagtttggacagtaaagat tcagacgggtggaga	unknown
MG 161	18-5	ttttcctgaacttgaaaaatgattgtcagaatcgtagaat gctggtttaagatcgtctagggggctgaatcgagatcgcaata ttaacgattaattgtgcagctctagtggtgcacatctgatact tcagctttagaatacacgtttacatgggtgcacatgtctcagat t	unknown
AI 204839			
MG 162	18-6	acgtattgttcatgttagttaatagattaactaatgaattctt attaaaaagtgtagccggttggctctattttgtcatgtaagg attactttaaatgagcttctgtgatttctgtaga	unknown
AI 204840			
MG 163	18-7	tgcaggctccccctggagcaaatggaggttcaggttcagctcgg gtatcataacgatccgcaagtgacattgaaaacaagggtctctc cctgttccctccgccagcacacctccaataaacgtcattttca gcttttcatcgggtgtgtgtattgcacataatat	unknown
AI 204841			
MG 164	18-8	agcctggaggaccgctctttacagcacaaggatatattgaaat cacgactcagttgtgtgctgctctctagcagagatctggagtc atcaagtgacagtgaggatgttagaggagggtgaaagcagagg	unknown
AI 204842			
MG 165	18-10	ggagagtcacacatttatacagcgtctatcttattttattact ttgtttgtttgtaataactgtaaaatgcattttgatatacttg acatgttttgatatttcagtcactaccaatgaatactacgaga tattgggttacgcgaaaaa	unknown
AI 204843			
MG 166	18-11	taaaatacaatacaaaattattgatataattggaatgaatgca aatgtgaatgatgattagggctgcattagtgcaaatcacttt atgtcgattttgtttgcacggagatagttcatgctcttttgg acagggaaaaa	unknown
AI 204844			
MG 167	18-12	tccttctactttaaacagatgaggttgagagaaggctgacgc tcctcacgctctcggcacacggcaacacatatgagggtgaaa catcgtgaggagctttgccgaatctcattaaccaagcaggta gtcattaacagcgcgaccttggaaatca	unknown
AI 204845			
MG 168	49-02	gactataaaaaatacaattaattcattttatcattagaagcgg aatataacacacactgctgccacacaaccttataaagtgatt tgcatgataggctcgg	unknown
AI 204846			
MG 169	49-05	aattttgtgttaaatataatttatttttaatttgggggtgta cgaagctgaactttatccatctccagacaaccagctattgcc aggctgataggctgtcacttctaccggagctcttccactcta tgcacagagacgggtg	rRNA
AI 204847			
MG 170	49-06	aatggatcagatgatggagacacttcaataaatcgcaactcag ttatcaacagtcacaacagttcgtttatcaatatagagcgtc gaagctccggagaagcgatac	unknown
AI 204848			

MG 171	49-08	aaagggagcgaatnaaataaactatgagacagacgagacggca taataacacagagccatcgagatgagagaagagcgcttactct ctaagttatcctaatacagttct	unknown
AI 204849			
MG 172	49-09	ctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagc gactgtctatcttgcctcatccatagttgcctgactccccgctg ttagataactacgatacgggagggttaccatctggcccagtg gctgcaatgataccgcgagaccagctcac	H u m a n telomeric DNA sequence
AI 204850			
MG 173	49-11	gcaccgggttccccacaaacatgagggtgcgtcactggaagagg ggcggentcgttctagccgcgcccgttactgtcacgaaatggc tctc	rRNA
AI 204851			
MG 174	49-12	aaccacaactgtaagacaatacatatcttattacaatgcacatc tcatgtgttcatctaatgttatgtcagtttactaaacatatct taatt	unknown
AI 204852			
MG 175	50-04	caccaaaatgagaagtattaaaatacagtaggcccagtaaagc agctacaactctgcacagtaaaaaaaaaaaaaacngtcgactg cagttatcg	unknown
AI 204853			
MG 176	50-06	cctgcagcccgggggatccactagttctagagcggccgccacc ncgtggagctccagcttttgtcccttttagtgagggttaattt cgagcttggcgtaatcatggcatagctgttctctgtgaaat tggt	c a l o t h r i x genomic DNA
AI 204854			
MG 177	48-04	taacacagggatataatccactctggccagtgacatgtggaa tatgcattgcattttattgccacatatctaaagatttcagc tgaagtgtttacttctcaaaggg	unknown
AI 204855			
MG 178	48-06	cccttactctctgaaccataatcgataaaaaataaagtaaca acaacaacaacaacaaaaaaaaaacggctcgactgcggaattc cgagnnttttttaccgccctccgcacc	unknown
AI 204856			
MG 179	48-09	ttcaacattaattgaaaaacttacattttaactacatcc aaaaaagaccaaaggtcacagaacactacgaaaacctttaga tatttttgaatgacgggtg	keratin
AI 204857			
MG 180	48-15	ttggcagagaaagggcacagcttgaacgggggttgggattt cattttaatttcagagagattgcttccagggctttttttcaa attctatgggtggcttggctttacaggggttgattctgtgtc cgaa	unknown
AI 204858			
MG 181	47-06	ttcgtgatcttcatgagcacctcgcaaaaaaaaaaaaaacggt cgactgcaggcgtgggtgcggagggcggtccatttctctttaa tatgcattaccaagttgtgcctttccctagatgttaaaaaa aaa	unknown
AI 204859			
MG 182	48-12	cattagcgcctaccatggtgaccacgggtaacggggaatcag ggttcgattccggacagggagcctgagaac	18s rRNA gene
AI 204860			
MG 183	48-14	ttaagctacagtataactaataactcaaatggaccattaaataa agtgttgccaaaatcagtaattttt	unknown
AI 204861			
MG 184	48-18	ccattttgattgacagctttataaagcccgaaccaattacag ccgacattattcaagtggtgctcatgcacacagctctaagca tttttcaagaatgagtcatttagatgttt	unknown
AI 204862			
MG 185	48-20	ccatttcaacattaattaaaaaacttacattttaacttac atccaaaaaagaccaaagggtcacagaacactacgaaaacctt tagatatttttgaatgacagtgaaatgttta	unknown
AI 204863			
MG 186	48-21	aaaagtgtcttttatggaaaagactagacatcatgacaacaa cacaacatcgaacaaaatggaacaattggcgatctaaacattc actgtcattacaaaatatctaaagg	keratin
AI 204864			
MG 187	48-22	ccatcgtcctacaggagatcatcggtaaaggccgcttcggtga gggtgtcggagggcggtggagaggtggagacgtcgcagtc aat	unknown
AI 204865			

MG 188	48-23	ccatgcacacgaacac taaacgcaacacgcagagacatttcag gaaaacatttcagtccatacacttatacacacacatactgaa atatgaagcaggaatcacaaccacgaacataagaactacatga gactttatagac	unknown
AI 204866			
MG 189	47-11	ccatgattgtgattaaccgtgcatctctttgtcctgaaatc aaggcctgagagctgttttacagtgttttcgtgattcaaact gattttgggatgtgattttgtttgtttactttacagtcccagtt ggagcttataccttgaactgatgctcggaa	unknown
AI 204867			
MG 190	47-12	gtccaaagcattttcccaaaatagtcccaaaataagattigt caccaaaaatcattccatttgcctgagacgcagagaaaattgtg gacaaattaaactcaaaatcaccacggatggatgaaatcat	zf BMP4 gene
AI 204868			
MG 191	48-05	tacataagacaccaatactcoggttttaatatgattaagataa tactctataaaattctagggtagccttaaaaggacctta ccttaaagaacaccgagtcacgaaatgaggagga	unknown
AI 204869			
MG 192	50-01	caaggcaaaagacattacatttatitgtaggaacatacagag cagcattataaaaaccacatttattagtcactttccaatggc ggatacagagacaatacactgaagacactaataatgaggg g	unknown
AI 204870			
MG 193	51-01	tgaatgtttattttaaacagaacaatctcaaagctagttag acttcacctgatgcaacaatcttgacagctgtaaggaacacgc ttcggagtagtctggaactgaagtgcgatggatccagaagcc aggctggaaaacgactcgtaggttggaggctctgatiga	unknown
AI 204871			
MG 194	51-02	catatctgttcgtataaattacttacactaggttaatttgtta cattttatttactttatttgcattgggccacttcatctggtag actgggtgaaacgagcagattttgtcagtgttgtaatttatggg acgcctoga	unknown
AI 204872			
MG 195	51-03	gtgtagtaactgaggtgtttcctcaacactgatgtttgcaa aacaatttgctgaaaatgtgttttaattttggaaagtagatg ctttccatacataaataatgatgtcttcatttcccacaattta acatgtg	unknown
AI 204873			
MG 196	51-04	ggcgtggtgocggaggcggtcccagacaaaagcaaaaagt attaaggaagttgacattttgttgcatgaacataaaggccttc cactatTTTTTtacagtttttacagtttcatctttgggtag agaaaatacactaaccttactttcaatatatcagctgag cacagagtgacttcattca	unknown
AI 204874			
MG 197	51-05	goggtcttctagtatagctgaagatcagtttcaaagaattca agtgggacggcttcgactacaatgggcataaagctgtggttag ccgcagatttcagagcattgtcgtagaatacacctggacgtg aacataagcgttgttatcgtcgg	unknown
AI 204875			
MG 198	51-06	gatcactgaactgatccctgttctgtgcaggtgtgttggcttg agcagtcagcagattgccttcgccttgacttaccgagtggtg tttctgagcgcagggtcgtgttccagtaatagaggacctcgc gogatcacaccatacacagagaga	unknown
AI 204876			
MG 199	51-07	catatgggtgattatgtctcaaaatataatctttttaaatgt ctgggtaaaaaaac taaaaccttttcccttttaacacaatat atitattttgagaacattaaaatattttggagcagtaaagat gtcaggctaaatattcaatgatcatgactctgcgcttcatgt t	unknown
AI 204877			
MG 200	51-08	ttttacacacttctaacacgcgaggggaatagcattccgcccag ttaccaatttctgttctgaacacitggttagcagagatgcttgt actaacatgaattggagggatacagtagaacaccctacatcat cattggacaatagcatcatcatatcaca	unknown
AI 204878			
MG 201	51-09	cagtataataaattgccataacgttattgttatgatgtattaa aatgagaaatgttagacggagggtgttaaaatattgtaatgta tttatgttaatgaattaggatattactatatgcacagcgttt attgactgcattacatctgatactatgcataaaaataatgatc tcc	unknown
AI 204879			

MG 202	51-10	ggtgaccattttaacatctgttcagggacaacagataaaaaaa	unknown
AI 204880		cgcttctggctaattcttgtgcaitttaagtcggatgctag ttaatgatgctgcccttgccaaaacaaaaataaaataagtagc acaaatatttctctaattgcacttggactctcgaca	
MG 203	51-11	gtaaggaattaagacaactatggctgctgggatcaaaacgtcag	unknown
AI 204881		tggagtcaatggtagtggctggatagagttcagttggcgtgc tgtgcagctgaaaaaacacaatttaagagtgtatgggaccgcc	
MG 203	51-12	agatctacaccttcataattgccatctcaatgaattatagtta	unknown
		gaggagtgcagctgatgtacgagtgagtgggttcatgatgca gta	
MG 204	52-01	gctttgaaaaattatgttgccttcaatcctccattttactc	ribosomal protein
AI 204882		ggttgggcactcaacgcaccgctgttgatgcatcaatgacat catggggaaggcgaccatcaatggctgagccacagactgagct gtgcaacaattcttaattggacgctctgacagtgagatgagtt	
MG 205	52-02	tgctcctgccaattcacaaggtgctggcagatcaaacgtctctg	unknown
AI 204883		gctataaaccaggacttccctggaggccatggcatcctgaagg caaaccctgctctgtcttccatgtcgttagatcttctctctc ctccatatctgccaatcagaactgctgcaacattgcctgtgg caggtgcttatlgactgtgggcaggatgatcaccagcttggt	
MG 206	52-03	ttgaacgttgcttccagcatggtttctgacttagaggctttc	ribosomal RNA
AI 204884		agtcataatccagcagatggtagcttcacggcattagctttca gtaaccgataaccaattatctgatctaacggctctctcgact aagtaagattactgtcgcaacatcgattcatcagtaggtaaac tactgttccactacggctaacc	
MG 207	52-04	tggtaaaaggcgtatggcaacttcagatcaagaaaaacttaa	unknown
AI 204885		acagttgtacaatagaacgggtgacagcattaaaacaaaaat tatattacactcaaaaacaagatattaggaggtcacgatgaaa cgagctgcttaattcatatacctgagttcgctcaacatgacag cat	
MG 208	52-05	acattagaaactacatgaaagagaaactagtggcggatagttt	unknown
AI 204886		tgtgatggctgacgcaacaattcaatgtatggggtacactgt tcacaaactttgtagctgctgcaaatcgcaacttatgacta cctacgccattttgtagtataaatactgtaagtagttgcacac taactactataaaaacattagtgcaacttaataccgcagc	
MG 209	52-06	cacaaatttgagtggtgtatctgaaagctcagcagatgatata	unknown
AI 204887		ttgtgaagatctagagtttctgcagagggcggtttgtggcg gcatgacaaacctcaacgcttcgccagccaacaggaagtctta taactcaaccacaccaagtcgatcagcctaaacttcacatgct tgataaagtcttccgacacatccatac	
MG 210	52-07	cccaccgcaaagctcgtcccctcaaccgggaacgaactgtgat	unknown
AI 204888		agccagtgtaaacggagcggcaaggtggacacgggcgatcc acccccatgaggagtcacaaagcctggcgccgttgaagacgt cctctatcgggga	
MG 211	52-08	gggactgagggactctcagtacatacacaggtatttgggcagg	unknown
AI 204890		aagctggcggaaacctcagaagtgcatttgctatgggaatgca tctgcatcctgggagcaggggctaattgggggtggggggccag cggttccggcagacctacatcttcatgctgtacttggggcttc tctcagtgagctcaggacctcagcacctgctgtgctgagaga gcatgag	
MG 212	52-09	caggaaccgttagatcagataattggttaatacggtagctga	unknown
AI 204891		aaagctaattgccgtgaagctaccatctgctggattatgactga aagcctctaagtcagaacctgctggaaagcaacgttcaatc aa	
MG 213	52-10	aatctgcacaatatagctttgctcaacatgcccaggggttgc	unknown
AI 204892		aactacattttaatacaaatatttgttacacta	

MG 214	19-1	acataaaatcaaaactaacatattgagtttatttagctcgcat tgctagttttgtggcgacaattcatctgtgcatgtcattaag aaaaataatagtttgcacctataatcttcaattgaaatctgaa gacgcactttctgtttgtttcagtcattcgatta	gastrulation zebrafish embryo Danio rerio cDNA clone 1036064 3'
MG 215	19-2	acggggctcgcgtgcatttatcagatccaaaacccatgcgggtg cgcgggcggtggagagggggcctcgcgcctacccgcccgt ccgccccggcctcgccttgggtgactctagataacctcgggccc gatcg	rRNA
MG 216	19-3	acagactacgtcccactccactgcagcactacatctttccagcag ggggcagtgactccatcttgcgtggatgagaacggagagttta gagaagacaatttaacatccgcaatgcaggctcttagggatgog ggggcacaggaggcaacactggggccaaatgggacccccaaaggc agaaaagggtggaacaaaa	Human mRNA for KIAA0052 gene
AI 964735			
MG 217	19-4	acgcctatcggactaagcctgcccagctttgtcaaagtagtgcg ttttcacacttttcagtaaagggtgacaaagaacacgcagacct tgtcgagatctgaagagaaatgcaagaaagcagccattggcagaa cagccgagagaagcgcacatctatagcttggacttcttttgc acaagttcctcgcctgagtttgaatcactcattgttt	unknown
AI 964736			
MG 218	19-5	ttttcgtctctccagtttattaactggtgaatctacagcca cgtacctctgctcagtttaagtcgaaggcctttagacctcact gaagcctcctcgtccgagcagatgcaagagcaggtaacggcat ttagcgtaggatgatctttaaactgggagttatcttcatgtg gattctcttgagctcgcggatgtgaagattacgcacacgctcc aaccgctccagttccacctggatctcccttctccttctttac	Homo sapiens mRNA for PKU-beta
AI 964737			
MG 219	19-6	acacacacatacacactacagttgatattgaccacatcactga gccacacttttagcnccttagtttgggtgtgtgtgcnccgctg tgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtatatactcagtatctctgc tgttgtgtgttctgcttactga	unknown
AI 964738			
MG 220	19-7	acggctgataagcacacgggacgacactttgagctactgttca acacttgactcaatctgagctctatttgataaagcataaaaat acatttatacatcatagcatagtttgcacctgaaattgaaaa taaaaagaacattccaccctcgc...ttcattcgcacctc agcagttattgctctctgacttcagcaggagagctgaaaa	unknown
AI 964739			
MG 221	19-8	acctgtccaactgcttgttaacacaaattattaatcagccaat cacatggcggcaacttaagcatttaggcatgtagacatggcc aaactgagcatcatcatggggaagaaaggctatttagtgact gaatgtggcagtttgttggtagacagaccgagctggtttatctt acctggggttt	Brachydanio rerio major histocompati bility class II protein
MG 222	19-9	ctgagctctatttgataaagcataatacatttatacatcatag catagtttgcacctgaaattgaaaaataaaaagaacatttcc caccctcgcctggccttcatctgcacctcagcgttatgtctt ctctgacttcagcaggagagctgaaaaaaa	unknown
AI 964740			
MG 223	19-10	acgaatcatgacgtcatgaattcacttcgcgaactgaaacggt tcatggttgttttgcgtgattttcgttaagcccagtttattt catcacacagagtttataaaaatttgaattatttgcatagac acacgtgtctatggattgttctgttttagcac	unknown
AI 964741			
MG 224	20-1	acgtgtgtgtttataagttgttatattgattattatgacatgc ctaatttcaagttgaattaaaccattactactgttataaca catctagtaaatgggtattgattggaatttaaagtagtaagaa gagaatagtaatctgaatgtctggtggttaaccacaattatggt g	unknown
AI 964742			
MG 225	20-2	acgatttaatttacattaagcaaccaataaaaagtgattaac tagtaaaagataaacctctaccttcgggtggggcgaccacggag taaaaacaacctccaagcgggaacgggcacagcctaaaaccaa gagaacatctctaagcctcagaacacctgaccaa	unknown
AI 964743			

MG 226	20-3	ttttctttccagactaatttatttagtcatatacgtataacc ccaaaaggatcattttcaaaaaccaacactgaccagtggccagat ttaatagcaatgcaatgaaagaacatgttcaccctgcacaaaa ttaccaaaaaacccttgtaattcactcaacaactgcttgttg aacattttaagctttcatttctccacaaagaagatattgaga aacgacacgccactt	acetyltransf erasese [Homo sapiens]
AI 964744			
MG 227	20-4	ttttcttctctctgttttttgacctggagtcttcgaatagcc cccaaatggcattatttgaaagtcagagtgggtgcagggggc tagagaacctcgtcgtctcctcgtcgttgagctgagtgctg cagcgtccgtcactactgctcctcgtgattcctccacctcgt tgagcagagggatagtcacaggagtgcaggctcatcatcat ct	Human cell division cycle protein 27 homologue
AI 964745			
MG 228	20-5	acgagataacaagactggaaaaacacgtttagtggttactagt gacagataacaagactcagcaatatgaatgagtggtgctg cttaatactgtgtgtaatcagcttgacaatctcaggtggg agagtgta	unknown
AI 964746			
MG 229	20-6	acgcaagttaactcagagatctggcggatgacaaaacttagtt aaaaatacagttttatgggtattatgattactgctctaaaa ttttattgttaatgctgggtaaaaaacacccacctccac ccccattttaacaaaattttattttgagaaaacatttata tattttggagcagtaaacatatagctaaataattcaaatgaa tcattctgctgtcttca	fa08e08.s1 Zebrafish ICRFzfls Danio rerio cDNA clone 5A5 3'
MG 230	20-7	acgggtaagtgcaatgagatcgggtggatgtccctttatattgg tctgaactcagaaaattgacttcaaggaaaagttctcccaat ataaatgaaactcaccttgaaccggttccaaccttactagt ttctttcatctgttgaacacaataaacatctccaagccacc ttcaaacctatgttatgtgtttaacaaaattaaagaagggaat gggtttgaacagttc	unknown
AI 964747			
MG 231	20-8	acgagatgaacgcacaatatagatcaacttcatttcatttgt tgatatactccttctctgtcattcagtttagctttagcgcagta tcaggtaactgctgacatgggttaaagataatgacagggtgatg gtgatgatgatctgcctcaaaagcagcatcaggaaagcgttag tgctttaggagcagagatgggcagaggatcgcagtttaccac agatatgagagaaagtgagt	unknown
AI 964748			
MG 232	20-9	acgccttcccaccgcccggcccgagagcaagattgataagga gttggcaacaggcgagttcttctcgtgagagcgagaagaga cgcaagaagatgagtgagattaaggttaagcaggctgaggctt tatctaaacgacaagaggagcgaagaaatccttcttctcc caaagagaaaacagcagtgaaaga	21,600,000,0 00strong similarity to human Rev interacting protein Rip-1
AI 964749			
MG 233	20-10	acaacattttgctagatattttttaaactactagtatcagctt aaattgacatttacagacctaacctaggttattatggttaattta acaggccagggtaggtagacaataaaaaacgtagggaatagta ataatattgacctaaaattgtttttaaataattttaaactta ctttattcagccaaactaaaattaaaaagacctacccagaa aaaaaa	unknown
AI 964750			
MG 234	20-11	acgtgtctttggactgtgggagaaacccacgcgaaggcaggga gaacatgcaaacctccacacagaaacgcaactgagccgaggtt cgaaccagcnncttcttctgtgtgaggcgaacttgctaccac tgcgccactgctcagacatatagtaattagacttgatataatca aaactgttatgttcagaaaaa	Danio rerio spermine synthase gene
MG 235	20-12	acggaaagtgggttcatttagatataagattagattcagaaaaa gattgtgaaggcaaacctgggtgcttgttaactaatgtgggttaa cgattaaggcacgggttaatacacaagctgaagagcattgtgg gtgttacggataggggatctgtgtgcaaggacagggaacttt ttctcagaaaaa	unknown
AI 964751			

MG 236	20-13	acgagatgacgctgttagggaacatcactctggatcaaacggga tctctgatcatcacaacagcacaaccgaacactctggagttt ataactactggatcatcagcatccgagagaccaaacacaagaga ttcagagttgcaatacatgagaaaaa	Unknown
AI 964752			
MG 237	20-14	acaccgcccgtcgctactaccgattgagcggctcagtgggtc ctcggatcggccccgcccgggtcccttaccggggccctggg ggagcncggagaagacgatcgaactcggctcgtttagaaaaa	18s rRNA
MG 238	18-4-1	ggctctaaaactgcctagccttggattcataagagatctgaag atggtgaaaatttacatctgatgtgctgaatggagcatgaac attaggcttaacttctctgggttggcgcatttcaaatcttta agccaagacaccagactaacaattgagatggactacagtctg gggtgtaaggaaa	unknown
AI 964753			
MG 239	18-4-2	cccccaacacagcacaaaagtttagaaatgaaacgttggta atattggctatgtagtatttagttaagatgcagcttccact tgtgcacagatgaaaaaaaaataatgtaactgaaactac acttggtagagaccagagaccagggttgtaaaa	unknown
AI 964754			
MG 240	18-9	ccaaatgtcaagtatttagttttttgatagatttcaaact tttcgaaaacttgggttttagggtgaaacatgtttattatatt ttttgtctgtattgctgtttacagtatattacagcactttaca acaggtttttacagaactgtatc	unknown
AI 964755			
MG 241	18-10	acactgatctattatagataaatgattataaggtgcgaggagc tattacaagttacaacacacaattaaacacatatttgc aaac tacacaaaatgaggcaacaatttaattacacatacatgttat gatcc	unknown
AI 964756			
MG 242	16-1	cacgaacgcccacaattacaggttgctaattatctctctgag aatggaaaaatgcagcggcatgatcagagctgaggctcgagggt gctgatgatgatgatgactggcacaacatttctaaaccatc ctgaaactccactgatgtgatgcagggttagtctgtatgtag aaag	unknown
AI 964757			
MG 243	16-4	gtaccttaggaaccgtatagcaaagcattttgacaattttaa accttgactttccagaccggaataaccttgaaaacagttat cgtcccatgacctagtctctctgtccatigtaaaacaaca tcagctcacgcgagtttgacgcgcacacaccacaccaaaca cagagggggg	unknown
AI 964758			
MG 244	16-6	gcagcatatataaacgaaatttacctcgctgaaaaagcataa aaatgcacattaaagtgcttgaaatgtgctggaatttgaagt tggaaaagggtcaagagccctgttatttccagtaaaagtc aaaagggaatggctcattcaggaatggctcattgactgatgtg catataa	unknown
AI 964759			
MG 245	16-7	tttggacttaaacaccatgtcacaaaaaatccacaagcgacc acattatctccatgcaactaatcctaacaagacctgtgtggg acatgggggggagaaagcatatcaaaactagatagttacattgt cccaaaacacatggattacatgtgaaaccggagttttcatctg catccatttt	unknown
AI 964760			
MG 246	16-8	gtctcttcagtcacatcatcacaagctagaataagcc ggggggagttcattgagatcttcttgagctcaaactctcctct catcctgcaaaccgggaggaagccctgggctcgaggatctcata agggacagcatgatctctcaccagcatggtaacaagcttta ttatcaatcatcagctaagtggaaactctaaagatcg	unknown
AI 964761			
MG 247	16-9	aagcctcgctgtttacaaaaacatcgccctctgacatccca atataggaggtccagcctgcccagtgacaatagtttaactgcc tgcggattttgaccgtgcaaaggtagcgcaatcactcgtcct ttaattaggggctgtatgaa	unknown
AI 964762			

MG 248	16-10	gtgcacactagagtattctcatagcttgatataatattccgact ggaggcacatggacaattttgagcatatTTTTgtatttttct ggaaatttgatcgggtcatgaatggtgatgtaagtggaggatga gggagctctcgaatttaataaataaatctcaatttggtttca aagacaaacgaaagtctcagg	unknown
AI 964763			
MG 249	16-11	gctcactccgtttgacttctcattcgggtgctttctctacaaagt gacctcagtatgaaccaatggctcttagaatggaaaaaagaag agttatggagttatTTTgctgggggcacaaatcgattttaaaa tgtatcattcaaagatctttcattttttatactttatttgacac cact	unknown
AI 964764			
MG 250	16-12	aaaatataataggatgctggcaaaagacatggttacaacatga caatggaaaagataacttattttgagaaataatacaagatact tgtgggagcttaggcaccttcaaatggttctctaaaatgtggtg gagttggaaatgtgttgatta	unknown
AI 964765			
MG 251	16-13	gtgtgtgatgtgtctttgaatgtgogagtgagtttagtgaagc gctgtagtgatctttccttttgggggagtgtagagttcgcct tggtttgtgattttaaaggaatagtttgcaaaataataacag cggtttgtggatgagag	unknown
AI 964766			
MG 252	16-14	gtagactgagtatgattttcttactgtagggtgtaaaaaactca ggctctgaggtagaggtctgcattcccgatcagaggtctgcattc cggacccgaccagatttctacggcgcgaatataaatttcga	unknown
AI 964767			
MG 253	16-15	ggctgggatcgaaaagctgacattccctcttactgaatagcaa tttaaagttgtattacaacaacagcagctctcccgcgagct ttttcattctgcttcccttcccctgtctga	unknown
AI 964768			
MG 254	16-16	cctataaaacacaagtggaaatgtcacgaaggggtttccacatgg aacggatctctcacattttataacggacgaacatcagcgttcg taaatcagtgtcc	unknown
AI 964769			
MG 255	23-1	ctccagaagtgtcaaagaaactggaagacatccgaacacgctat gccttctaggatcttcacatctggcagccgcacatgagaaaat caattgttttccgggcttccatggctgtgggcatcaaacctt cctaccacaagtataggagctgcaatctgggtgactgctgaagga agttccccatttaactggggccagatgggagctgtcaaagt	HYPOTHETICAL PROTEIN.
AI 964770			
MG 256	23-2	gtgtgctttggcgattatcaattagaatagctgagcgttgatt tggcatctttaacatttggttttgtgccttacaagataaaaatg aaaccgtagaagggaaaaaagtgaatgaagtcaccttatgca caaaagtaaatgcatcgttgccattagaacacattcagctcaa aggaagatccaacatgctgatgctgaagagtctgcaactggca	unknown
AI 964771			
MG 257	23-6	tgtgtaatatccaggagctctttattgttctactgacaaaacc gatgtcagaggttaaaccagatggcattcgttcatcacaacc ttttatagactatttagacacggacgcccccgtagagagcg atcccttccactgcatgaggagcgggctcaggacagacttaaat atagaaaa	unknown
AI 964772			
MG 258	23-7	gaaccgatgtgttggccacgtatgtagaggcatcgcagagac actcacacagtgatgcttaggatggactggatgagccaacttc aaaaatgtgtcggttgtctgaaaaggctgccgtttttaaaccct tgaaatagattacagtgtatt	unknown
AI 964773			
MG 259	23-8	acgicattggaggctctggaaaaatcgttggtcactgctgtcgga gtcaattcccaaacggaaatcgtcttcacattattgggggcagg agaagacgacgatgatgaggaagagaagagaagaaaaaa	plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase 2
AI 964774			
MG 260	23-9	ggaggctaataccacacacactggattcacttagacgttact tattgcatcaaaagcccacacaagtttgtgtttccaatggagg cgtgtgctcactgtttccaggcgcacctgaaagattgccacga gtgcaccacgtgaaaagaactggactgattagcttcatctctg gtatggaatata	unknown
AI 964775			

MG 261	23-10	cacttatggattattattgtgtttcaaaacaacatatccagacc atacaaaccttaataaatacatttaattgattaaaacacaatttt atattacaatgttagagattaacagaccaaaaaagacactttag cagtatttatcctgaaaa	Danio rerio cDNA clone MG67 3'
MG 262	23-11	gcctcgcaagtttgcacccagagaccaacaacctgatcc tgatcgaaaccgacacaatgcctacactgaagccacaaagccc agcgcaagagcagatggctgaggtcagtgagactggacttcaca gggcagtggtca	KIAA0017 protein
AI 964776			
MG 263	23-12	taaaatagtctgacaattcccagggcaccggaccacctcggag atccttacttgtgtattaaaaagtgttaagagtgaaagtgagt catcggggaaattcactgtgtgtttatgtgaacgtagcgga	unknown
AI 964777			
MG 264	22-1	tgtcctggctgcctggagagctggggctgctgctgtgtccgtgg ctccagacgggctcgggctatggctgccactgctgtcccgtc tcttacctttctgctctgtttttctctcaatgtccgaggcctca ctgtcactttcactgtagtcagggacaaacgcagcctcatcgg	unknown
AI 964778			
MG 265	22-2	gatttaatttacatcaagcaaaccaataaaagtgattaaactaa taaaagataaacctcaccttcggttggggcgaccacggagtaaa aaacaacctccaagcggaacgggcacagcctaaaaccaagagaa acatctctaagcctcagaacacctgaccaaaagcagatccggcct ataagccgatcaacgaaccaa	unknown
AI 964779			
MG 266	22-5	tatattataatcgccaatcatggcactaaagaccatggatgaaa cattcattttgaggaggtttgccttctttatgcttaagaaaaca ctgacagaactactatagcataactgattgtaaaccaatataat cctcgtgaaaaa	unknown
AI 964780			
MG 267	22-6	ctgcaggtaaagtataattgatcgcaagtgtcagtttgtggta tatgtcggttttgttatgttgattgtaagtcaaatatcgttag cttgataagatggaaatgaagttcagtaaaagctagcaaaaca gattcgtatttccggatcaaataactcatgtcattatgaccta ttcgctcttaggatgactaacgttactaacgttatggcgagggc ttaa	unknown
AI 964781			
MG 268	22-7	gtgaaaacaaaatttacatgittattttgctggcgcaaagttgt cactttgacagattgggtgaaatatcttagccagcccctcatt agtttgacgcaaggaagattggaggacaaaagtaaaactccgc ctctat	unknown
AI 964782			
MG 269	22-8	cacattgattgaacattgatttacagcagcgtttgcttaata tccttcgccatttcaaagcctttcatataaaacgtgaacata taataaagatttacaaagcttattcacagcaggagtataatc tactaagtgaatcatt	unknown
AI 964783			
MG 270	22-10	tctccgagttctctcagctatgtctcgaatgctggaatcgaaa gagcctcgcaccaccaagacacagcttggttgatggatattcgt aaaatagcacgatatt	unknown
AI 964784			
MG 271	22-12	ttaaaattggttgtaaagcgtatcaacaaatatttttctcca caccataagatgggacagcgcacgaactacggaagctggat tggcttaaaaaggcgcagtgctttttcggttgagtctgtttta ttcagatccag	Danio rerio developmental receptor tyrosine kinase (Dtk) mRNA
MG 272	16-4	atggcaggatttttttttcccactaatgggaaaaagggatt ggaggacttttatacaggaatttacctttgatggcaacaaaga ttaggtttgtggaagagaattt	unknown
MG 273	16-5	ataccttaggaacctatagcaaagcattttgacaattttaaa ccttgactttccagaccgggaataccttgaaaacattatcgt ccatgccatgttctctctgtcattgaaa	unknown
AI 964785			

MG 274	21-1	ttactaaaaatacaggtgttttttagagcccgtccacagtcca cacattactgtctggctagtttctgtcctcttcttatgctaaaa aggcaataatagtcacaactgcctgacaattatccaataaac ctagaaaacagggcatcaatatattataccgatagttaatatac cttacagttacaagaatattt	unknown
AI 964786			
MG 275	21-2	gacagtgaccgcgaaagatgcagttctttcataacaacctgcac ccaaacgaggactaaagaacagcctgacgacgaaaccggttaagt gtgcttttcaactaagttctgaaatcggataataagcattagtg gtatcaggttaagagttgattagctgtaccc	unknown
AI 964787			
MG 276	21-3	atacgtttacagataccatggatgacattgtgtcattcgcttag acagattggcggatcatgtagcgtcatcaatttatgccttcgaa caccgacctgaaatcggatgtaaatgcagtttcaacacaggct aataattacaggttaactttacagatcaatgcaaatt	unknown
AI 964788			
MG 277	21-4	gtatcagcgccttttctacttctgtcttgtgaatgtgccatcag atctttatcccacattttgtttgtattcccaggagcagatgaat gagttgtgccgatggactcagattgcagtgat	Homo sapiens skeletal muscle alpha 2 actinin
AI 964789			
MG 278	21-5	gatttgttatactttcaaaggtttggggttggatagttttgt ttgcttgggttggttttaaatacttaaggctgatttatacttct gcttcaagcgcagcgtcactgatggcacgctgacacgtcacct ttaagaatgtactacttgca	unknown
AI 964790			
MG 279	21-6	gagattttacctcataacactctggctgttctatgaaatgtcac actctattgggtgcatgtaaatatgctgcttttacatccatgcat gaacaatttccgatttctttgcatatacaccttacacagcagag cagtgaggagaagac	unknown
AI 964791			
MG 280	21-7	ggatggagtgaaatggaagtttctggagcacaaggacctgtct ttgaccaccatctgagcctttgccagcaatgtcaagttttat tatgaccactggaagcatataactcagccaatgcagaggaggtg gccacctt	DNA topoisomeras e I homologe
AI 964792			
MG 281	21-8	tatggccaatttagtttcttcaattcacagcatgtctttggaat gttgggaaatcggagcaccggagaaacttacacaaacacaagg agaactgcaactccacaacaaatgccagccgagactcgaacaa gcgatcttgc	Danio rerio myocyte enhancer factor 2C
MG 282	21-9	tataagcattcttgcctgtctttttttgagttgaatcaaaaa aactttttagttatctcaacttactttacttaacagactaaa aatattaagttaagtgtgtataactcagataattagttgaaac ttgatttatttctttaaataaagttaaa	unknown
AI 964793			
MG 283	21-10	gatttacagttgtatttatttggccagctcaggtaaaaacagga acattcactgaataagactgggaggctctatttgggtccatcatt caaccttagctcaacctgaatcacatcaatcacattcaactgat aaaaggcaaatctttggaaataaaaatcaaaa	unknown
AI 964794			
MG 284	21-11	aaagtccttatttgttttatttcggctagagtataaaagcagttt ttaatttttaaacaccattttaaggtcaataatattatcccct ttaagcttatttttcaatagctccagaaatgcacgggcagcc agtaaagagagtatctagcttagtcc	zf BMP 4 precursor (BMP4) gene homologue
MG 285	21-12	ggaattgatgcgaatgtggaggacactcagctgaacgtggacct ggcgcatcacagatactcaaatatttccagctctgtgtccaaca accgctggctgctcatcaagatgttcttagtctctgctcatcttt ttcattgcttgtactcttcatgacct	unknown
AI 964795			
MG 286	21-13	atgtttttggactgggtgggggaaactgaagcaccggagaaacc cacgccaacacggggagaccatgcaaacctccacacagaaatgcc aactggcccagccgtactcgaaccagcaaccttctttgactgt	Zebrafish mermaid repeat

MG 287	21-14	gagaagcattttctagaccagcacaaatatagcttgttttgt agaaataatgagtcaaaataaagtgaatattigtgcttgcctag aaaatN(g)cttcctgatttaaggatctttagatatttggacta gaaatgagactgaaa	unknown
AI 964796			
MG 288	21-14-1	tttaccagcttcatagaagagtattagtagctttacctgagagc cttacagcagcggagagcaggtaatgatgagggtgtgtgatgtaa tgagagaggtccaagt	unknown
AI 964797			
MG 289	22-23	ctgacatatacttccattgtgtgggaacacaattgaaggtcctg gccttgttctttccttaagaacactccactgttttagggaaa tatgcagatttacaaca	unknown
AI 964798			
MG 290	22-24	tcacatctgtaatcccaagcactttgggggcctgaaggcaggag gattgcttgagcccaccatttgagaccggcctggtaataata	Human proliferating cellNucleolar protein P120
MG 291	22-25	aaaaagctcatgtgatgttttttttatataaatgaattaata aaaatgtctgtgtttcctcacagactgaggctgaggaccgaca gaggtcagccatgtatgcgctgtggagaacgtgt	unknown
AI 964799			
MG 292	181-05	aagcaggtatgtaatgcaggtttatttaacaagtattttacat atgaacagttgtgtacattacatacactgtcaacgcatatgatg tgaaggcatcgttttcgcagctctacagtacacttagtggt gtctgagggatttactcaaaa	unknown
AI 964800			
MG 293	181-06	tcctttgcctctaataatattgctgtggctcttcagctcccc tgtggactctgtgctgttttacgctattacgactctacacaacc tgctactgcaccaagaagggagccaagatggatgttcgactggcc ggacg	Danio rerio b-catenin mRNA
MG 294	181-07	tttgtgttaaatataattatatttttaatttgggggtgtacga agctgaacttttattcatctcccacataaccagctattgccagg ttcgataggtctgtcactgtacccggagctcttcccactctat tgccacagagacgggttggcctaag	rRNA gene
MG 295	181-09	agggcggctccttttgcacatgatttagccaacaccactaagca aagagaccttagtttaaagccccgaatccaggtgagctacccc gagacagcctatttaacttagggccaaccgctctctgtggcaat agagtgggaagagctccgggtagagtgacagacctatcgaacct ggcaata	rRNA gene
MG 296	181-11	tactaatactcaaatgagaagcaattggcatgttgttgcaatgt aaattttggcaacaaaatcaatcaatatgtcaaccagtcaata ttaacttacagcggcgcacaattcagccatcaa	unknown
AI 964801			
MG 297	181-12	tccttttgcacatgatttagccaacaccactaagcaagagac ctttagtttaaagccccgaatccaggtgagctaccccgagacag cctatttaacttagggccaaccgctctctgtggcaatagagtgg gaagagctccgggtagaagtgcagacctatcgaacctggcaata gctggttgtgtgggagatgaataaag	rRNA gene
MG 298	181-13	gttaattcttacaactaaattgtttcacagtacatacacacac taacaagtcacggaagaaaaggttttcgacttttgtacaaag acagatgttaatcagtagagattactaatt	unknown
AI 964802			
MG 299	183-12	ggcgtggtgdcggagggcggctcctcagccattcctctcctatca acagactgaaggttgcctttatcttctgcaaatgatatttgaa agcttaccagagcagaatcttttctcaataatggccactgctg gcgctcggc	unknown
AI 964803			
MG 300	184-12	cgacagagtagaggccaagaccttccctagaccctgttttcaag gtgaattgcttgccttcccaaatcggcctgaatgcaactgtcga cggggctccatcatttaacagctcgccattcagcagagcagctt ggcaaga	unknown
AI 964804			

MG 301	182-02	aaaatcagccaaaggatttttctctggattgctctttaaact atattgggttagagaagtggtgtgtgggtcagtgctttt gaaaaaacactatcgggtgggttaagaaaggaggagg	unknown
AI 964805			
MG 302	182-04	ccacaaaatataataggatgctggctaaaagacatggttaca catgacaatggaaaggataacttatttgagaaataaatacaag atacttgggagcttaggcaccttcaaatgttccataaatg tggtggagtggaaatggtgattaataaaaaaaaa	unknown
AI 964806			
MG 303	182-05	acattattgcaggattctctatatatgaatattgtgctggtt gatcagtggttagtgaaggcacagatcacatcgatcagc agatgaacatgttgacagcgcaggctca	unknown
AI 964807			
MG 304	182-06	ccagaaattagctgtaacatgagagaggaggaaaagtacag ccagcaggttactgggccacagtgaagtaaaagagaagaatgg agtttacttcatctctcaattgaagtgaataagggtctctgc tgtaagtgtcagtgaaagattgtcagcaa	unknown
AI 964808			
MG 305	182-08	ccaaaaatattgggctgaggaaaactatctacttttaattata taaaaaacactgacatcafttaaatcggattgcctaaaaa agttaagtaataaaatggaaaatagacatattgtcaaaaaac atgacaaaa	unknown
AI 964809			
MG 306	182-09	aatgtgcacaaataggttagcaattcataataagttgaagcac attgttaaaaaactgttccgggtggattgcaatglatagttgac tctaatagcataanaataagtaagctgaccaaaagtcttacgtgga gaaactt	unknown
AI 964810			
MG 307	182-10	gtttcctttaacttagttcaacagccagaagttaagatgagtcg tcatcaagtcgagaaataatctgttgaataaactgttgggtt aaaagttcctgacgttagttatttcatctatttacactga	unknown
AI 964811			
MG 308	182-12	acccttcttggtaagaacttaattgtgtttgttggtagttt ccctggctgagaagaagcttatggacgtgaagctcgggcaactg acagcttggctcggacaagagacttcaccccaat	unknown
AI 964812			
MG 309	182-13	cTTTTgtgttaaatataatttctTTTTtaatttggggtgatca agctgaacttttattcatctccagacaaccag	rRNA
MG 310	182-14	tttTgtgttaaatataatttatttTtaatttggggtgatcga agctgaacttttattcatctccagacaaccagctattgccaggt tcgataggctgtcacttctaccggaagct	rRNA
MG 311	183-03	tcctctacagagatcctgaggagattgagaaggaagagcaggccgc tgctgagaaggatgttggcaaggaggattccagggtgaatggact gaaaatgtgccgactcaaccagcctgaggttgctgac	Human laminin receptor homology
AI 964813			
MG 312	183-05	ttattttaaagaagtttaagtttaacaagcttaagaagaaaaactg aggagtaagttgttTgtccaaaagagtcctatggcaaaagtagaga cccggatacaaaattacagaatactttccaccagtcataagctt	unknown
AI 964814			
MG 313	183-06	tccttgatgaagcaatgtttatatgtattcagctattttcactt atttattgttTgtatgctactaactgcaagcataacaatattac aatcaaaaataaattagctactgtttattcactgtatc	zf annexin
MG 314	183-07	tcttcttatatgcactccagtggtggggaacgatgctgtgtgt ggattttctcagtttttaactcacattgccctcttTgttgggct cgtaattgccaatgttTgcaactgctacactgtgctgag	unknown
AI 964815			
MG 315	183-09	cctttacgtatttgaattTgtTgtatctcttcagatgaatgttata ttgttctcaactttgttcttTcacttttttagttcttatattgtt tcttcaaaagcacgtctatttTaaattTgtcattgttc	unknown
AI 964816			
MG 316	183-11	cttcatgactaatgaacacggctgcctTgtctccacagaacatcca tTaaatcctctgactattttTaaaaatgcaaatcaaacctTgtct gatttatcataactTgttatgcctactgcaactct	unknown
AI 964817			

MG 317	183-13	cctttgcatcatgatttggccaacaccactaagcaaagagacct tagttaagccccgaatccaggtagctaccccagacagccta ttaacttagggccaaccogtctctgtggcaatagagtgggaaga gtccggtagaagtgacggaccttacgactgcatactgtgtt	rRNA
MG 318 AI 964818		183-14	ggtcgctgctgaaaagtttgggaacccctggcttagaggaaga tgaggcaagctgaaggccaacatcaagcaactgggctaccata acatctcaactatgtcaaggctgatcgcc
MG 319	183-15	cctttgcataatgaattttaaatttttacatacgtatatac caaaaataatcatgatctatggcttactaaatggaaataacg aatcaaaagtataacttattattagtttgggttcttcagcttgt gacgtgtg	unknown
AI 964819			
MG 320	184-02	cagctcaatgagcaggacacagtttacatccccgatgaatgagg ctaattgggtgtcttctgctgagagaatgtccattgctcttctct ggattcctgattgcctcaacgtgat	unknown
AI 964820			
MG 321	184-03	cctttgcataatgggcccagtaagtttatttttttagcaagcct aattataaataaaataggcgtagagaaatcaagtttaaaaag ctttattagttatgaaaataagacccgaaactgagtgatcta tatgaacagattga	rRNA unknown
AI 964821			
MG 322	184-04	ccttgaagctgtgaaaaagatgaccggatttgacggatcaacaa atagattttcagttccatcaacagcacttaaactacgacattct cttataaagtggcacaaatttgaagggaggcctt	unknown
AI 964822			
MG 323	184-06	ttgtttactttttttacatttgagttagcgataatctaaaaa gtgaggttactcacacaactgcttcgaatcgtgttttaac agaaatgtttatgtaaaacactaaattcaaacattagctgtgaa a	unknown
AI 964823			
MG 324	184-07	gggccgaaactacattgtggaagatggagacatcgtcttcttca aattcaacacacctagtcagcccaagaagaagtgaagccattgt gtgatgaccgatggatctgctgaccacttcatttaaggctttg gaacattcaaaactc	ZF adult heart library Danio rerio cDNA 5 prime, mRNA sequence.
MG 325	184-08	tttatagtaaatcatatttttgttgcaaaatgcaatttcatc agataaatcgcagttagatttttttnccaaatcttgcaagccc tacttaacaatttgtatttttatttccagttttaaacagagtg aaacaccaaaggctaaagtcaa	unknown
AI 964824			
MG 326	184-09	tttgccactgttgagttcagggccctgaaaagaagaagagca agcttctggcaaaatgcagggctctcttgaggatcagatcattg ctgccaaccctctgcttgaggattatggtaatgccaagactgtg ag	Cyprinus carpio adult myosin heavy chain homology
AI 964825			
MG 327	184-10	ggagggcgtgggctgaaaagattggatctagggtagcagattag acttatcatcaataaaccagagagtatctttaaataaaattacg caatatttattcccttagagaagaaaaaaacttgcatagcac tcttccgagcatactttcagagtata	unknown
AI 964826			
MG 328	184-11	tgttatagtgttttgcccctggcgtaatttcccttttagtt taattatgtagatcagatgtcatctgaagagacttctgttat caaatgtattttggcttagtttagtcattagattaggtat agttataatataccat	unknown
AI 964827			
MG 329	184-13	tccttctggagaaatctagagttgtgtccaggcaagtgagga gagaaactaccacatctctatcagctctgtgcctgcntctcat ttacctgaatttaaacctctaaagtattatgcgctgatgatt ttccttac	myosin heavy chain homology
AI 964828			
MG 330	184-14	ttctccaagcacaagtgtgaagccaagttggacaaaccattggc aattaagagcccaacaaagagggcaatgtgagttaaaactg agaaaaatccacaacagacatcgttccccacactggagtg	unknown
AI 964829			

MG 331	184-15	cttctctgccagttaaagggtgttcccttccctggttcgccttacg actatntntncatctacataaccaaaaggatcaacaacaattc ttggaagacattcaagaatgtcaacaagatgtgtatct	unknown
AI 964830			
MG 332	184-16	gcaacttagaccaaagaatttacatataacagttttgtttt tataaaggaagtataataagcttttgctacttaagcaaagggtt agggactcaaaaacagatatagaatccagtgtgaaccactgac agatcctagattt	unknown
AI 964831			
MG 333	184-17	ttcacagcacttcaggctatagaatactatgaagccccattta cnattgcagacggagtataatggacttcacagcacttaggctat agaatcatgaagccccatttacattgcagacggagtatatgct caaca	cytochrome c oxidase subunit III
AI 964832			
MG 334	184-20	tggactgtggtcttggtatantgtgtatatacagtgatggt ggctttatctgaacaataaaataaataatgttgctatgtgaa attatagtggtgatatgaccgagtatcattttaaaagccatgc cattttgtttcccacagcaagac	unknown
AI 964833			
MG 335	183-02	tcttcttgaagttaaaaaataaatgttgctttctttcacccaa aaaaaaaaaaaaaaaaacggctcgactgacagagaatcgaggct tttgtttcactttctaaaaaaaaaaaaaaaaacggctcgactgcagc ccgggatccactagtctagagcgcgcaccgcgtggagctcca gctttgttcccttagtgaggatcgcagcttggcgtaatacatgt ca	unknown
AI 964834			
MG 336	184-05	cctttgtttactttttttacatttgagttatcgataattcta aaaagtgaggttactcacacaatactgcttcgaacgtgtttt taacagaaatgtttatgtaaaacactaaattcaaacattagct gtgaatagtg	unknown
AI 964835			
MG 337	3-1	agttactagaaaagcacaagaacttaggaccaaggaagatga gatcgttaagtaagaagattaataccggcgagacggttagaagag aagacgacgccgtagtcgatcgt	unknown
AI 964836			
MG 338	3-4	gagtcaatacaatcgcgaaaaatccataaccgtctttatctc ctccgaaagcctccgaaccctagatacacgaagctaagcctca tgataaaccatgtacgcgaacacatcaacaccagaaccatcc ccc	unknown
AI 964837			
MG 339	3-11	acaactagctactcgactctggagtgccgctgtcggatcccaa cgttatcgcgagagctatgccgtactcgtgtagtggttaactt ggataaaaccctcaa	Rat lactate dehydrogenas e
MG 340	3-13	ccgacgtcgaccatagcaacgaaacacggttacacgcttccaaa taaccataatgaataacgtactggcttgggattttatagggaaa gccaagattccttcaataactgtcctaaccaccacgagcct catactccatacgcgcg	unknown
AI 964838			
MG 341	3-16	atcagatcgcgaatgggtatggcgctcgcgcggacgaggaccga aacctcttacgacatcgtcagctagcgaagaagcgcgccgcg cttctagtt	unknown
MG 342	3-17	tcccagacgttcccacgaaggagcccagctgtcgcagcctcgt tccacacgacctatatacaacccagaccgtaggtaacgatcc gccggaagtatccgcgctcgaat	unknown
MG 343	3-18	cgaaaccaccacgctatgacatcacaacccaggttatgac atcacaataagtagaacctattacattaagcagcacgcgaca atgcaccaacctaccaatctaa	unknown
MG 344	3-19	acccaagctcctaaaagtcggcggagagagattaggctataaa tgcccagaatataacgagtaattcaatagtcctaagctcaaaagtc cgtcctagcgatcatg	unknown
MG 345	3-20	aaaaagcgtcgtacaataacgaacggagtcgctacgatacta atgagcgtctagagccctattgccaatcaaccatagtcggac gagtc	unknown

MG 346	3-21	agtttgggggacttatcagcctcagagtgggtgttattgtgcg gagtccttagtccccgccttcccagcgaggccaaccctagggtcc gggtcaacctacggctcagtcgcctcgcgcaacgcactga	unknown
AI 964839			
MG 347	3-22	tcatgcaggtaatggatgctattcaagctagatgattaaagcg acaattatcttgagatcatgattacacataaggaagtttaatt gttagagtgattgagttcaactggcatgcataaattgatcctg	unknown
AI 964840			
MG 348	3-23	aatctttaacttaactacatcaaggaacataacctccacccaaa cggtagtgcactaaagttagaccagtcttccatcagtggtgaag gattttagcgcgaacgtctgcaatggtgagatggagcttaaca cca	unknown
AI 964841			
MG 349	3-25	aaaccagacattgttttgttacataatttacatacaataacta caatgttaagtatgctccaattactgggcagccttcatagag gcaaacggttcggaacaatg	C. carpiobeta -actin gene homologue
MG 350	3-26	aaaatctttaataatctgggctaagggtgtaggaataaaaaaag gtttgtccaataaaaaatgacactgggtgagcattcttttag attggtatcaatgagtagagacgcacgat	unknown
AW 096905			
MG 351	3-27	tgtgoccatcagccatagtgagggctatgacccgocgcaaagg ctgggcaggaacatatgtatgcgcttgacacagaataatata agtataaa	unknown
AW 096906			
MG 352	3-28	ggaccgccctccgcaccacgccctgcagccgggggatccact agtcttagagcggccgccaccgctggagctccagctttgtt ccttagtgagggttaatttcgagcttggcgtaatcatgggtca tagctgttctgtgtg	unknown
AW 096907			
MG 353	3-29	tttacagatttatgtgaaaccaatgaaagcttagaatcgg agcttctggaagaaccatttcttcttgcctcttggaccgcc ctccgaccacgccctgcagccgggatccactagttctacag cggccgccaccgcggtggagctccagcttgttctt	unknown
AW 096908			
MG 354	4-1	agtgattgtaagaaagtgtctacaaaatgtgcaaaacctgtgca agtgttataaagaaaaatttctacaggtgggttgtgaagcc cactaacctgctgagggacacctacaattaataatggttggg aactaatgggttataaataaaaggaagtattgagtagcaca cgttt	unknown
AW 096909			
MG 355	4-4	tcaggatgaagaacgcgggcaggtggagaaggtggaggtgtgt gccgctgttccctctgctggagctggactgaagggtgtgtcaa tctctcgtcttacctcgcactcacctcgcacccctcatcagc gcaca	unknown
AW 096910			
MG 356	73-4	cttttagcacctcgattgggtgcatcagttgtgtttgattag gattggagcaaagctgocggccctccaggaatcgactttgacac ctatgctatagatcagtggttagggaacctatggctctcagacc acatgaggata	unknown
AW 096911			
MG 357	73-5	gtgttaattaaatttaatttttaatttgggggtgtacgaagc tgaacttttattcatctcccagacaaccagctattgccaggtt cgataggtctgtcacttctaccggacgtgttccactctgttcg acagagacgggtcctagtaataggcgggt	rRNA
MG 358	73-6	gtaaggaattgcgaaagagaaacgaacaatttgcaaaagtaa caaaaagtaaagaccaattccgcatccccgtactacgacca gttaatatatcaagtaagagattcccagccaagtttcagct agacggtcagtttgaga	unknown
AW 096912			
MG 359	73-8	gocccgcaagccagtaaggcggagaggtagatgaaggaggacc cgatcgcccaaagtgcgatctccacctcgtttccacacctcg acggtctctatcccaaa	unknown
AW 096913			
MG 360	73-9	aaaacgcccgtctcctcgtctcgtcgttaaggttgccttaaga taaacgattctacgtgggtcccacaccggctcgtcccaaagagt aagaaggaccttagcgaagcctctcgtagttcgacaacgcac gaaa	unknown
AW 096914			

MG 361	73-10	aaactaacaagcggagacacaattcgaatatcatacaaacgct	unknown
AW 096915		aaagaccagcggctctacgcctacaccctcatcaccacccccacc accaccctcacctacaccgcctgacgtcgcgtagataggatggc agagacacgt	
MG 362	73-13	tttgacgacttcctaaaatccaggtgtacaaaacttcggatcta	unknown
AW 096916		attaaaatctggtagaccttctaccataatgtaggttacctcg aaatattcggccccgccgttaccgtcactcctcccttaatcctc cactccagctcctg	
MG 363	73-14	ttgacgacgcgcgtggagcttctcccggactatctcccggccccg	unknown
AW 096917		tggcggcggagtgccgctccgaaaatcctactcccgtacctac gtcacgaaataacaaactcg	

Table 2. ODD PCR에 의해 분리된 유전자들의 database 검색 결과에 따른 유형별 분포

Known gene	Unknown gene	EST clone	rRNA gene
7.7 %	65.3 %	17.4 %	9.6 %

나. 혈관발생 특이적 유전자들의 분리 및 확인

(1) Zebrafish로부터 혈관발생 조절유전자의 분리

Zebrafish로부터 혈관발생 조절유전자의 분리를 위하여 혈관생성이 결여된 mutant 들을 이용한 ODD-PCR을 수행하였다. Mutant는 *flh*, *oep* 그리고 *clo* mutant 3종류로 서 blood vessel specific 유전자로 알려진 *flk-1*을 probe로 사용하여 whole mount in situ hybridization을 수행하였을 때 Fig. 12에서 보는바와 같이 floating head(*flh*) mutant에서는 dorsal aorta가 결여되었으며, one-eyed pinhead(*oep*) mutant는 axial vein, 그리고 *cloche(clo)* mutant에서는 dorsal aorta와 axial vein 모두 결여된 것을 확인할 수 있었다.

Mutant embryo를 얻기 위하여 heterozygote mutant로 판명된 *flh*, *oep* 그리고 *clo* mutant 각각의 암.수를 mating하여 이들로부터 얻어진 25% homozygote embryo 를 PCR 수행을 위한 시료로 사용하였다. 시료로 선별된 embryo의 발생단계는 혈관

형성이 이루어지는 26 somite stage(22 hr)이며, 효율적인 PCR을 수행하기 위하여 특별히 brain과 yolk를 제외한 body trunk 부위만을 절단하였다. 40-50개의 embryo로부터 절단한 body trunk 부위를 이용하여 total RNA의 분리한 후 double-stranded cDNA를 합성하여 A-tail fragment pool을 제조하였다.

이들 3종류의 mutant fish에 대한 ODD PCR을 192 개 PCR primer set를 이용하여 모두 분석하고 유전자 발현의 변화를 보이는 유전자들을 분리하였다. 이 결과 전체 300여 개의 유전자들을 분리하였고 이중에서 31개의 유전자 염기서열 분석하여 Table 3에 나타내었으며, 분리된 유전자들의 database 검색 결과에 따른 유형별 분포를 Table 4에 나타내었다.

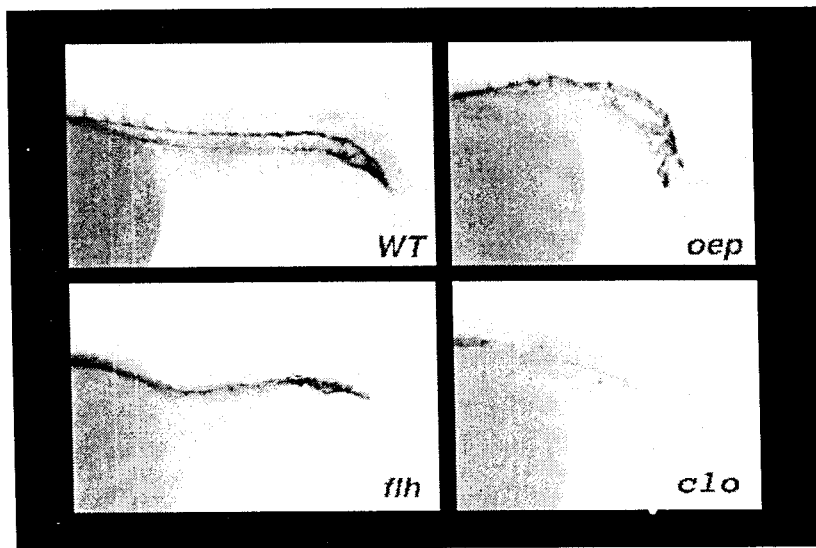


Fig. 2. Profile of zebrafish mutants defective in blood vessels. All wild and mutant embryo's were 2-day old zebrafish. By whole mount in situ hybridization using blood vessel specific *flk-1* gene, defects in dorsal aorta, axial vein and both of dorsal aorta and axial vein were detected in *oep*, *flh* and *clo* mutants, respectively.

Table 3. ODD PCR에 의해 분리된 혈관 발생특이 유전자들의 염기서열 및 database 검색

Serial Number	Clone Number	Sequence	Description
BV 1	4-1	gggttattattaaaagcgcgatgtgcaatatatattaatggctggt ttgcacagtaaattgtttgag	Unknown
BV 2	4-2	ctgttttaagtttttcatttgatctgaaagttgccatacgcct tttgaccattaaaaaccaatcttttc	unknown
BV 3	4-3	aaggatcggaaaaagggggcccatactaaaagcacgccccacc taaatttatgaataaag	unknown
BV 4	6-1	acataaaacaagaatacagaaggaaataaagagtttagataaag tttggtaaatttcccaacatgattaataataaccaccaactagt gataacagcttaaagcgaataagaagactgcattctctctctat gtgtgcgattctctctgatgttgcgtgagc	unknown
BV 5	17-1	gttgctgttatggactgatatgccagaattgtaattgtcagagc aagagagctgtcaggagttctcaaatgcatgcttgtgatgctg ctatgctgcaattgctcacatttcatgacgttgctgagcacat gtgctcactgtgctcagctg	unknown
BV 6	21-1	gattacacaggctactctttcttgcagcagctttcctcatggcg gccagtggttgctgagctcttctcttctcttagcgggatgt gagtcaccttctgatgactgagagcacgtatctgacactcagc actcatg	unknown
BV 7	23-1	ttgtgcagtttaattcacagactttctatcaagtatgttgtatg tttttggtcacatccataactcatgtttatcttctcatttaa aatatagaaaatgttacagatgatatttctgatccatactctg tagtagtgttgagactacgtgctatatatgctgacgt	unknown

BV 8	28-2	cacactgattgagaactcttttttcaagatttgtgtaagtgg tttagtctcgtgttgggccttggaggtagagctgaccacttt cctaccaccacctcttccactaattggca	unknown
BV 9	28-3	atthaatttacatcaagcaaaccaataaaagtattaaactagt aaaagataaacctctaccttcggttggggcgaccacgg	Danio rerio frankel mitochondrial ribosomal RNA
BV 10	28-5	tggtagtggagctgtgggggttctcgtcggaccgccctccgca ccacgccgaattaactactagtgattcgcggccgctgcaggt cgaccatattgggagagctccaacgttggatgcatagcttgagt atctatagtgtactaatgctggctatcatgtca	unknown
BV 11	44-1	ctttctggaatacaggccgagaagatggactcgggtgtaaaat aaatatacgtga	unknown
BV 12	58-1	cgacttgatcatgcagctctgggtgggttgctatggttatcaggg tgctgatgttgctgggaatagatactggattgtgaagaacagct ggctcgacaatgggtgacaaggctacactatcat	Danio rerio mRNA for cathepsin L
BV 13	62-1	gaaacctatgtttgcatggcactgtgtggcgtggatccagt gtgtcacctctttacgatggcaagctgctaacagatacaccc tttgcacctcttcaaacctcgtctgcatgcatcaagattat gtaattgcagctgatcatctgtgctgca	unknown
BV 14	71-1	cttaaaccaaattgggtggttctgcgccttccccactcactgct catctttatctatgatgaaatcagaaaacttatcatccgacgca gccaggaggatgggtggagaggagacctactattaagcatcag ctgccatcacacagttatgcatgggtg	h u m a n Na, K - ATPase alpha-1 subunit
BV 15	73-1	gtgctggaggcatgcctgggtggaatgccgaaggcatgcccggt ggattcccagggtgcctgggtgctgctccagggtggatcctccg gccaaccatcgaggaggctgacttagcattccaagcacattgcat ctcatagcatgttactgtgcttgtgtgactcttaataatacta ctgagtt	Danio rerio heat shock cognate (hsc70) mRNA
BV 16	77-1	aacgttccctggcaattgatctgtgctcatgacgcgggcaatg ttgacgatctcatcaaaagcaacacttccagagtgcttgatgtt cttgacctcttctcgtcacggggagggttcttccagagcttgat aatgagggcagagctgt	unknown
BV 17	95-1	tatatccaattactacatgatgaggcaaatgcttcaatcaagt ttatttgacaggaatactgtatttatttctttcttctgtgct gcatgcagaacaagcatalctgctcacagaatactgtattctg atgtgcaaccaatgtggattctataacaatcg	unknown
BV 18	98-1	aggaaccgcggttcagacatttggctcgtgcnttggctgagga gccactggcgcgaagcaccatctgcgggattatgactgaaacg ctctaagtcagaatccgctaaaagcag	unknown
BV 19	127-1	agtgcgggaggaccaccgcctgaagaggccgaagagaaggacga gctgtagacacacaggggacttttattttgaaaagacttgatg tttcttctgttcttctcactctggtgagattcgtggctgcttat tcgag	unknown
BV 20	133-3	caatcctcgaattcaagcagcatcacaggaacagccacgagttc gataatatttcagttcaacgtctatcaagcagcattaatgaaga aaagactcaaaacgttgacttttctccgcttcatgtgcccttg atccaatgtgcgctcagatacaaaaacgtt	Danio rerio Wnt4 (Wnt4) mRNA
BV 21	145-1	aacagagaatccgtgaatcctgacaatgcacatgcaagtgtaaa atatttttcttccacaaaaatcaagttgtgtttgattattt gagagtgtgtcagctctgtctcagagagcctttaagcaggtg	unknown

BV 22	145-2	ggtagtatcgtgatactatggcttcaaaatactggaggccac tgtatTTTTaaacggtagtattattataacagctctctaca atacataatgttgcattgtgaaaagtactaaaatatcacacata tgcacatgc	unknown
BV 23	146-1	tgaaaagaaaatgaacgaatgaataaatgtatTTTgttcacatt ttgttgttagcagtgaaTTTaatagctattacaaattactca tggggctttatggcatgtctagacatgtgtttgctcccaaaat gTTTT	unknown
BV 24	147-1	cccggacgattaaaacaaaaccgcttttattgtttcacgtcca gggtgtattctacgcatgctctgaaagctgctgggctaacac	unknown
BV 25	152-1	gtctatatcacactTTaaagcctagcttgttgtttcaaatgccag atttcgctctgctgtaagttaatacactgctacatcacggt	unknown
BV 26	154-1	taatcgcgagtgatctgatTTTgattaatcacacagcctaatt tccgtatTTTgtgctagaacattgactaatcataaatgagagca	unknown
BV 27	172-5	agtatTTTccagacagacagacgggtgctgagctgcagaaca tcacacctgggaaacatccctttgcctg	unknown
BV 28	172-6	atccgcttctgcacgatagatcaatttactgacttgatgggg gagacagttagcctcgttggcattcatacagtcctatagacgag tgatgcgcta	Daniorerio frankei mitochondrial ribosomal RNA
BV 29	174-2	cagagagcagctcgaagaggaagagacgcggcagggaggaa gaggcgttacaggagctgcactgcactttacgtcatcagcagt cagagctctgcata	unknown
BV 30	182-2	agtaaacggtgatgccacatcagtgatggatctgatggcgtga gcacgtctgcacgggtcaggatgagttgaccgtaatgcgcgc gcatt	unknown
BV 31	189-2	tcaggtaataaaaaagttaagtatgagacaaacaaaaattgc attgagttgagtcacatacatatTTTtatatttttcatgttg a	unknown

Table 4. ODD PCR에 의해 분리된 혈관발생특이 유전자들의 database 검색결과에 따른 유형별 분포

Known gene	Unknown gene	EST clone	rRNA gene
19 %	75 %	3 %	3 %

(2) 혈관발생특이 유전자들의 발현양상 분석

혈관발생특이 유전자들의 발생기간중의 발현양상을 확인하기 위하여 분리된 유전자를 probe로한 whole mount in situ hybridization을 실시하여 Fig. 13에서 보는바와 같이 이들 중 혈관생성에 관여하는 양상을 보이는 6 개(152-2, 152-3, 154-2, 154-3, 156-1, 168-1)의 유전자들을 분리 하였으며 이들 유전자가 발현하는 부위를 확대하여 관찰한 결과 blood vessel precursor cell임을 확인하였다(Fig. 14). 이를 통하여 ODD PCR 방법을 이용하여 mutant zebrafish로부터 혈관발생 조절 유전자의 분리 및 확인이 성공적으로 이루어 졌음을 확인하였다.

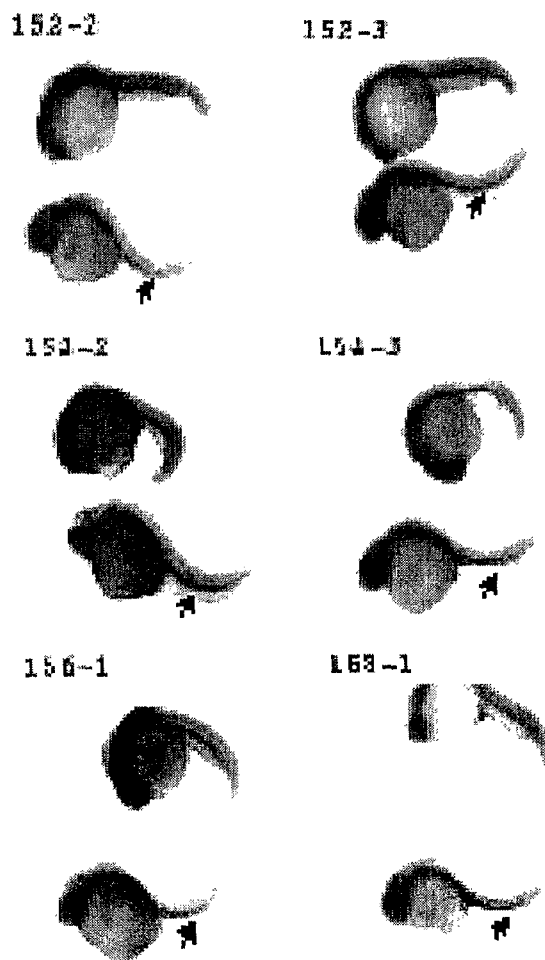


Fig. 13. Blood vessel specificity of the cloned genes isolated from ODD-PCR. Zebrafish embryos at 24 hph were used for in situ hybridization. Arrow indicates the blood vessel sepecific expressions of 152-2, 152-3, 154-2, 154-3, 156-1, and 168-1 genes.

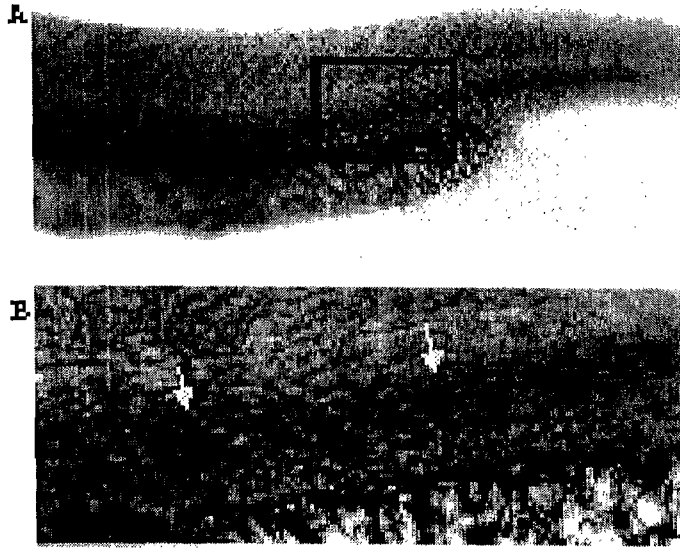


Fig. 14. Magnified images showing the gene expression in the aorta. Yellow arrowhead in B indicates the precursor cells for blood vessel. A, X100; B, X400

3. 발생특이 유용 유전자들의 full-size cDNA 분리 및 기능분석

가. *zfp8a*, *8b* (zebrafish *frizzled*) full-size cDNA의 분리

지금까지 분리된 발생특이 유전자들 중에서 MG77 clone은 database 검색결과, 초기발생에서의 축의 형성에 중요한 기능을 수행하는 wnt signal의 신호전달 과정 중에서 receptor로 작용하는 것으로 알려진 mouse *frizzled* 8과 homologous한 유전자로 추정되었다. mouse *frizzled* 8 (*mfz8*) 유전자는 mouse에서 알려진 여러 *frizzled* family 가운데에서 mouse *frizzled* 5 (*mfz5*) 와 함께 초파리에서 wingless 의 receptor를 coding 하는 유전자인 *Dfz2*와 가장 유사한 단백질 구조를 coding 하는 유전자이다. 그러나 *mfz8*의 경우는 조직별 RNase protection assay나 *in situ* hybridization에서 전혀 나타나지 않아 그 중요성에 비하여 기능이 거의 밝혀지지 않았으므로, 우선적으로 이들의 full-size cDNA를 cloning하여 염기서열을 분석하였다. Full-size cDNA cloning을 위한 probe로써 MG77 clone을 이용하여 screening을 수행하였다.

Table 5. Alignments of MG77 clone and mouse *frizzled 8*

A) Nucleic acid alignment of MG77 clone and mouse <i>frizzled 8</i>	
MG77 :	1 C C C C G A T A T G C C T G G A G G A C T A T A A G A A A C C C C T T C C G C C G T G C C G G T G C G T C T G C G A G A 60
mfz8 :	465 C G C C C A T C T G C C T G G A G G A C T A C A A G A A G C C T C T G C C G C C T T G T C G C T C T G T G T G T G A A C 524
MG77 :	61 G A G C C A A G G C G N G C T G C G C 79
mfz8 :	525 G C G C C A A G G C C G G C T G C G C 543
MG77 :	122 G T G C G A T C T A C T G C C C G T G C A A G G A G C C C C A G A C A C G C T G T G C A T G G A C T A C A A C A G A A 181
mfz8 :	588 G C T G C G A T C G G T T G C C G G A G C A G G G C A A C C C G G A C A C T C T G T G C A T G G A C T A C A A C C G C A 647
MG77 :	182 C C G A C T C C A C C A C A G 196
mfz8 :	648 C C G A C C T C A C C A C G G 662
Sequence homology : 77% (118/152 base pair)	

B) Amino acid alignment of MG77 clone and mouse <i>frizzled 8</i>	
MG77 :	2 T P I C L E D Y K K P L P P C R C V C E R A K A X C A 82 T P I C L E D Y K K P L P P C R V C E R A K A C A
mfz8 :	93 T P I C L E D Y K K P L P P C R S V C E R A K A G C A 119
MG77 :	123 R C D L L P V Q G A P D T L C M D Y N R T D S T T V S 203 R C D L P Q G P D T L C M D Y N R T D T T +
mfz8 :	134 R C D R L P E Q G N P D T L C M D Y N R T D L T T A A 160
Sequence homology : 85% (46/54 Amino acid)	

1차 screening에서 30개의 plaque을 선별하였으며, 그중 5개의 clone이 강한 signal을 나타내고 나머지는 약한 signal을 나타내었다. 그 이유는 MG77 clone이 mRNA 내부에 adenosin nucleotide 가 많은 부분에서 cDNA가 합성되어 증폭된 clone으로 cysteine rich domain (CRD)을 포함하고 있는데, 이 CRD부분은 *frizzled* family에서 매우 잘 보존된 부분으로 screening시에 다른 *frizzled* 유전자와 hybridization한 것으로 보여진다. Phage DNA를 추출하여 *EcoR* I으로 digestion한 다음 Southern blot hybridization을 수행한 결과 1.4kb - 2.3kb 정도의 크기를 가진 clone들을 확인할 수 있었다. 그들 중에서 여섯 개의 plaque을 이차 screening한 결과 가장 강한 signal을 보이는 clone이 *EcoR* I digestion을 하였을 때 내부의 *EcoR* I 부위에 의해 400bp 정도의 조각이 나오는 것을 확인하고 2.2kb 와 0.4kb 의 insert를 각각 pGEM7zf(+)*EcoR* I site에 cloning하고 *BamH* I 으로 digestion하여 2.6kb의 insert가 나오는 것을 확인하고 pSK(+)*BamH* I site에 cloning하였다. 각각의 clone을 양방향으로 sequencing하여 mouse *frizzled 8*과 일치하는지 BLAST를 통하여 비교하였다. 그 결과 3'부분의 아미노산 서열이 일치함을 확인하고 zebrafish *frizzled 8a* (*zfz8a*)이라 명명하고 full-size sequencing을 진행하였다.

그리고 두 번째로 강한 signal을 나타내는 clone을 sequencing한 결과 그 또한 *mfz8*과 높은 homology를 갖고 있어서 zebrafish *frizzled 8b* (*zfz8b*)라 명명하

고 *zfp8a* 와 함께 full-size sequencing을 실시하였다.

(1) *zfp8a*, *8b* full-size cDNA의 염기서열 분석

2.2kb (*zfp8*) 과 2.5kb (*zfp8b*) 의 insert를 가지는 clone을 deletion을 위한 재료로 사용하여 점진적인 deletion mutant를 제조하여 양방향으로 sequencing을 하였다. 그 결과들을 PC/GENE program을 사용하여 염기서열을 통합하였다. DNA 염기서열 분석 결과 Fig. 15. (A) 에서와 같이 zebrafish *frizzled 8a* 유전자의 크기는 2,263 bp 이며, start codon인 ATG로 시작하여 stop codon인 TGA로 끝나는 1737 bp의 open reading frame을 가짐을 알 수 있었다. 이 유전자의 ORF는 29개의 leader peptide를 포함하며 전체 579개의 아미노산을 coding 하고 있었다. 3'-UTR 부위는 *EcoR* I 으로 digestion 되어서 따로 sequencing을 실시하였다. zebrafish *frizzled 8b* (Fig. 15. B) 유전자의 크기는 2,522 bp 이며, start codon인 ATG로 시작하여 stop codon인 TGA로 끝나는 1728 bp의 open reading frame을 가졌다. 이 유전자의 ORF는 30개의 signal sequence를 포함하며 전체 576개의 아미노산을 coding하고 있다.

아미노산 sequence 유사성을 비교해 본 결과 Fig. 16과 같이 *zfp8a*는 *mfz8* 과 83.2%, *zfp8b*와 77.8%, *hfz5*와 68.6% 그리고 *Dfz2*와 58.7% homology를 나타내었다. *zfp8b*의 경우에는 *mfz8*과 83.2%, *zfp8*과 77.8%, *hfz5*와 66.7% 그리고 *Dfz2* 와 57.5%의 homology를 나타내었다. *zfp8a*, *8b*는 모두 *frizzled* family의 공통구조인 10개의 cysteine을 가진 CRD (Cysteine Rich Domain)를 가지고 7개의 transmembrane domain을 갖고 있었다.

(A)

```

-314                                     GAGAAAGCCTCTCGC
GAACACCACGAATGTTGAAAACGCGTTTACACCGGGAGTTTTCTTGTGTGACAGAGAAGTT
TTGAAGAACAACCGCGGCTTTATGTTTTAACACATCGCCGGAGCGGAATAAGGAGAGG
AAATACGAGACGGCTGCATTTATTCCTCAGCCATTTTGCCTGCGCCCCGCCGAGGGCT
ATTTATTCTCGGTATGCAACCCAACCGGACTCCGTGCCAAACAAGTGAAGCGGAGATGG
GTCTGCTCTGCAACATCTGAACTGAACTGTTCCAGCGCCGCTTTCTTGTGTGACAGG

ATGGAGTGCTACCTGTTGGGGATTTACCTGTTCTCGCGCTGGCTCTGCTGCCCCGATCG      60
1  M E C Y L L G I Y L F L A L A L L P R S
AGCGGTACCACGGCCAAGGAGATCACCTGTCAGGAGATCGCCGTCCGCTGTGCAAGGGC      120
21  S G T T A K E I T C Q E I A V P L C K G
ATCGGTTATAACTACACCTACATGCCCAACAGTTCAACCACGACACGCAGGATGAAGCC      180
41  I G Y N Y T Y M P N Q F N H D T Q D E A
GGCTTGGAGGTGACCAAGTTCTGGCCTCTGGTGGAGATTCAGTGTCCCGGATCTCAAG      240
61  G L E V H Q F W P L V E I Q C S P D L K
TTCTTCTTGTGAGCATGTACACCCGATATGCCTGGAGGACTATAAGAAACCCCTCCG      300
81  F F L C S M Y T P I C L E D Y K K P L P
CCGTGCCGGAGCGTCTGCGAGAGAGCCAAGGGGGCTGCGCCCCGCTCATGGCAATAC      360
101 P C R S V C E R A K A G C A P L M R Q Y
GGCTTCCCTTGGCCGGATCGGATGAGGTGCGATCTACTGCCCGTGAAGGAGCCCCAGAC      420
121 G F P W P D R M R C D L L P V Q G A P D
ACGCTGTGCATGGACTACAACCGAACCAGCTCCACCACAGTGTGCCGGTGTGTCCAAA      480
141 T L C M D Y N R T D S T T V S P V L S K
CCCACCAACTACCCAGCAAAGCCATTAATCCGCACAAAAAGAAAGCGGGCGGCCAGGC      540

```

161 P T N Y P S K A I N P H K K K S G R P G
 GTCGGACCCAATAAGAATAAGCCCTGCGAGCCGGGCTGCCAGTGTCCGCGCCGATGGTG 600
 181 V G P N K N K P C E P G C Q C R A P M V
 CCGGTGAACAGCGATCGACACCCGCTCTACAACCGCGTAAAGACGGGTCAAATCCCAAAC 660
 201 P V N S D R H P L Y N R V K T G Q I P N
 TGGCCCATGCCATGTCACAACCCCTATTTTACGCAGGACGAGCGGACTTTCACGGCCTTC 720
 221 C A M P C H N P Y F T Q D E R T F T A F
 TGGATCGGACTTTGGTCCGTGTTGTGCTTCATATCCACCTTCGCCACAGTCGCCACCTTC 780
 241 W I G L W S V L C F I S T F A T V A T F
 CTAATCGACATGGAGCGGTTTAAATACCCAGAGCGCCCTATTATTTTCTCTCGCGCTGC 840
 261 L I D M E R F G K Y P E R P I I F L S A C
 TACATGTTTGTGTCGATCGGTATATTTGTGCGATTGATCGCCGGGCACGAAAAAGTGGCG 900
 281 Y M F V S I G Y I V R L I A G H E K V A
 TGCAATCGGGAGTATGACGTGGAGCACATTTACTACGAGACCACCGGCCCGCCTTGTGC 960
 301 C N R E Y D V E H I H Y E T T G P A L C
 ACCGTTGTGTTCTCTGCTTATCTACTTCTTCGGAATGGCCAGCTCCATATGGTGGGTGATC 1020
 321 T V V F L L I Y F F G M A S S I W W V I
 CTCTCGCTCACCTGGTTCTCGCGGGGGCATGAAGTGGGAAACGAGGCCATCGCGGGC 1080
 341 L S L T W F L A A G M K W G N E A I A G
 TACTCTCAGTACTTTCACCTGGCCGCTTGGCTCATCCCGTCCATGAAGTCTATAGCCGTC 1140
 361 Y S Q Y F H L A A W L I P S M K S I A V
 CTCGCGCTGAGCTCGGTGGACGGAGATCCGGTCCGCGGGATCTGCTACGTCCGCAACCAG 1200
 381 L A L S S V D G D P V A G I C Y V G N Q
 AACTTGACAATCTGCGGGGCTTCGTGCTGGCCCCCTGGTTCATATACCTATTCATAGGC 1260
 401 N L T I C G A S C W P P L V J Y L F I G
 ACCATGTTTCTTTGGCTGGATTGTGTCGCTTTTAGGATCAGGAGTGCATTAAACAG 1320
 421 T M F L L A G F V S L F R I R S V I K Q
 GGGGGCACTAAAACGGACAAGCTGGAGAAGCTGATGATCCGAATTGGGATTTTCACGGTG 1380
 441 G G T K T D K L E K L M I R I G I F T V
 CTCTACACGGTTCGCCACCATCATCGTGGCGTGTATTTCTATGAGCAGCACAAACAGA 1440
 461 L Y T V P A T I I V A C Y F Y E Q H N R
 CAGAGTTGGGAGATCACTCATAACTGTTCTGTTTACTGGAGCAGGAGATCAAGAGGCCG 1500
 481 Q S W E I T H N C S C L L E Q E I K R P
 GACTATGCCGCTTTCATGCTCAAATACTTCATGTGCCCTTCTGGTGGGCATCACCTCTGGA 1560
 501 D Y A V F M L K Y F M C L L V G I T S G
 GTTTGGACCTGGTCCGGTAAGACATTGGAGTCTCGGAGGATTTCTGACCGCGCTGCTGT 1620
 521 V W T W S G K T L E S W R S F C T R C C
 TGGGGCAGCAAAGGGCTCCGGTGGCTCCATGTACAGTGACGTGAGCAGGGGATTAACGTGG 1680
 541 W G S K G S G S M Y S D V S T G L T W
 AGGTCCGGTACGGCCAGCTCCGTGTCGTGCCCAAGCAGATGCCTTTGTCCCAAGTCTGA 1740
 561 R S G T A S S V S C P K Q M P L S Q V -

AACCAGAAAACCCCATTAATTGTTGGGGTCTCCTGGTCTTTCAGACATTTGCATACAAA
 TGAAC TTGTTGATGGTTTCTATTAGCCGACGGACTGGTTGAAACAATGCAGCGATGCAGA
 AACAATTACGTTTCGCTAATTCATTCTATTGATATGGACATGACATGCAATCAGTCATT
 CTTAAGGAGAATTCCTCGAGTCTAGAGG 1948

(B)

-186

CTCTGT
 ACGGAATTGCATTTGTTTTCAGCCTGTATGCACAGCATGTTATTCTGGTGTCCGGTGAAT
 ACAGGCTATGCTTTTTATTTTACTAGGCTATAATTAAGAAAAAGACTCTTGCCAGAGCAC
 ATGCCAGCGCATCCTTTATTTAGCAGACAGAAGGGAGCGGCTGCCGAAACTGACCGAGG

ATGGACTCGCTACACAGGGGACCCACTGGTCTGCTCTCGCGCTCTGCGTCTGCTATTG 60

1 M D S P T Q G T H W S A L A L C V L L L 60
 TGGAGCTCCGTGTGTGGCCGTGAGCATGTGTGTCAGGAGATTTCCGGTCCACTGTGTAGA 120

21 W S S V C G R E H V C Q E I S V P L C R
GGGATTGGTTATAACTACCTACATGCCCAATCAATTCACCACGACAACCAGGATGAA 180
41 G I G Y N Y T Y M P N Q F N H D N Q D E
GCCGGACTTGAGGTGCACCAGTTCTGGCCCCTCGTGGAGATCCAGTGTCCCTGACCTG 240
61 A G L E V H Q F W P L V E I Q C S P D L
CGCTTCTTTCTGTGCAGTATGTACACGCCTATTTGCTTGGAGGATTATAAGAAACCTTTG 300
81 R F F L C S M Y T P I C L E D Y K K P L
CCGCCGTGCAGGAGTGTGTGCGAGCGGGCGAAAGCGGGATGCGCGCCGCTGATGAGGCAG 360
101 P P C R S V C E R A K A G C A P L M R Q
TACGGGTTCCCGTGGCCGGACAGAATGAGGTGCGATCTTCTACCTGTGCAGGGGATCCG 420
121 Y G F P W P D R M R C D L L P V Q G D P
AACACTCTGTGTATGGACTACAACAGGACTGATGCCACATCATCTCCAGCTGCTCCAAAA 480
141 N T L C M D Y N R T D A T S S P A A P K
ACAACAAGCCGACCAGGGAACCATTCAAACGGAAAAATAAAAGCAGTCCCTGGATCTTCA 540
161 T T S R P G K P F K R K N K S S P G S S
TCTTGTGAACCGGAGTGTACTGTGCGCGCCAATGGTGCCCGTGCACAGTGACCATCAT 600
181 S C E P E C Y C R A P M V P V H S D H H
CCGCTGTATAACCGCGTAAAGACGGGACAGATCCCCAACTGCGCTATGCCCTGCCACAAC 660
201 P L Y N R V K T G Q I P N C A M P C H N
CCCTATCTATCCCAAGAGGAAAGGACCTTTGCTACATTTTGGATAGGGATTTGGTCAGTT 720
221 P Y L S Q E E R T F A T F W I G I W S V
TTGTGTTTTCTGTCAACGTTCCGCCAGTAGCCACTTTCCTCATTGACATCGAGAGGTTT 780
241 L C F L S T F A T V A T F L I D I E R F
AAATACCCCGAGCGTCCCATTATTTTCTGTGCGCCTGTTATATGTTTCGTGTCCTGGGC 840
261 K Y P E R P I I F L S A C Y M F V S L G
TATATTATCAGACTCATCGCTGGACATGAGAGAGTGGCGTGCAACCAGAATCATGAGGTG 900
281 Y I I R L I A G H E R V A C N Q N H E V
GACCATATACACTACGAAACTACTGGACCTGCACCTTTGCACGCTTGATTTTCTCCTCATC 960
301 D H J H Y E T T G P A L C T L V F L L I
TATTTTTTCCGGATGGCGAGCGCCATCTGGTGGGTGATTCTGTCCCTTACATGGTTCCCTC 1020
321 Y F F G M A S A I W W V I L S F T W F L
GCGGCAGGACTGAAGTGGGGGAATGAAGCGATAGCGCGGTACTCGCAGTATTTCCACATG 1080
341 A A G L K W G N E A I A R Y S Q Y F H M
GCTGCTGGCTCATCCCGAGCGTTAAATCCATCACTGTTCTCGCGCTGAGTTCAGTGGAC 1140
361 A A W L I P S V K S I T V L A L S S V D
GGGACTCGATCGCGGAATCTGCTATGTGGAAACCAGAATTTAGACAACCTGCGGGGC 1200
381 G D S I A G I C Y V G N Q N L D N L R G
TTCGTGCTCGCGCCGCTCGTGATTTACCTGTTTATCGGCACGATATTTTTATTTCGAGGT 1260
401 F V L A P L V I Y L F I G T I F L F A G
TTTGTGTCCATGTTTCGCATACGGAGCGTCATTAAGCAAGGAGGAACGAAAACGGACAAA 1320
421 F V S M F R I R S V I K Q G G T K T D K
CTCGAGAGGCTGATGGTTCGCATCGGGGTGTTTACAGTACTCTACACGGTGTGTGCAATC 1380
441 L E R L M V R I G V F T V L Y T V V A I
ATGATTTGGCTTGCTATGTTTACGAACACCACAACCGGAGGCGTGGGAAATCGCGCAT 1440
461 M I V A C Y V Y E H H N R E A W E I A H
GCGTGCAACTGTTCTGTCGGATAAAAAAGCCCCGAAACCGGACTACGCTGTGTTTATGCTT 1500
481 A C N C S S D K K A P K P D Y A V F M L
AAATACTTCATGTGCCTTTTGATTGGGATCACGTGCGGCGCGTGGACGTGGTCCAGTAAA 1560
501 K Y F M C L L I G I T S G A W T W S S K
ACTCTAGATTCTGGCGCGCCTGTGCACGCGCTGCTGCTGCTGCAGGTGGGCCACTAAA 1620

HFZ5	LAGFVSLFRIRSVIKQGG--T---KTDKLEKLMIRIGIFTLLYTPASIV	464
MFZ8	LAGFVSLFRIRSVIKQGGPT---KTHKLEKLMIRLGLFTVLYTPAAVV	545
ZFZ8a	LAGFVSLFRIRSVIKQGG--T---KTDKLEKLMIRIGIFTVLYTPATII	469
ZFZ8b	FAGFVSMFRIRSVIKQGG--T---KTDKLERLMVRIGVFTVLYTVVAIMI	462
	.*****.***** * . *..***.***.*.*..**** * ..	
	-----TM-7-----	
DFZ2	IGCYLYEAAAYFEDWIKALACPCAQVKGPGK--KPLYSVLMMLKYFMALAVG	597
HFZ5	VACYLYEQHYRESWEAALTCACPGHDTGQPRAKPEYVWLMLKYFMCLVVG	514
MFZ8	VACLFYEQHNRPRWEATHNCPCLRDLQPDQARRPDYAVFMLKYFMCLVVG	595
ZFZ8a	VACYFYEQHNRQSWIEITHNCSCLLE---QEIKRPDYAVFMLKYFMCLLVG	516
ZFZ8b	VACYVYEHNRREAWIEIAHACNCSSD---KKAPKPDYAVFMLKYFMCLLIG	509
	..* ** * . . * * . * * *.***** * .*	
DFZ2	ITSGVWIWSGKTLESWRRFWRRLLGAPDRGTGANQALIKQRPPIPHYPYAGS	647
HFZ5	ITSGVWIWSGKTVESWRRFTSR--CCC--RPRRGHKSGGAMAAGD-----	555
MFZ8	ITSGVWVWSGKTLESWRALCTR--CC---WASKGAAVGAGAGGSGP--GGS	639
ZFZ8a	ITSGVWTWSGKTLESWRSFCTR--CC---WGSKGS-----	546
ZFZ8b	ITSGAWTWSSKTLDSWRALCTR--CCCCRWATKGT-----	543
	****.*.*.*.*.*.* * .	
DFZ2	GMGMPVGSAAAGSLLATPYTQAGGASVASTSHHHLHHHVLKQPAASHV	694
HFZ5	-----YPEASAALTGRTGPPGPAATYHKQVSLSHV	585
MFZ8	GPGPGGGGGGHGGGGLYSVDVSTGLTWRSGTASSVSY-P-KQMPLSQV	685
ZFZ8a	-----GSMYSVDVSTGLTWRSGTASSVSCP-KQMPLSQV	579
ZFZ8b	-----GSVYSDASSGLTWRSGTASSVLCPPKQMPLSRV	576
	*..... * ..** . *.*	

Fig. 16. Multi-alignment of amino acids of zfz8a & zfz8b with Dfz2, hfz5, and mfz8.

The deduced amino acid sequences of Dfz2, hfz5, mfz8, zfz8a and zfz8b were aligned using PC/GENE software. Spaces inserted for the best alignment purpose are indicated by hyphens. '*' indicates perfectly conserved amino acid sequences, and '.' indicates well conserved amino acid sequences. DFZ2 ; *Drosophila frizzled 2*, HFZ5 ; Human *frizzled 5*, MFZ8 ; Mouse *frizzled 8*, ZFZ8a ; zebrafish *frizzled 8a* and ZFZ8b ; zebrafish *frizzled 8b*. CRD ; Cysteine rich domain, TM- ; Transmembrane domain-. The amino acid numbers were indicated on the right side.

(2) zfz8a의 시간적, 공간적 발현 양상 분석

pGEM7Zf(+)/EcoR I에 cloning 되어 있는 약 2.2kb의 coding region 유전자를 *in vitro* transcription 시켜서 DIG-labelled RNA를 probe로 사용하였다. Hybridization은 55°C에서 0/N 수행하고 probe washing을 70°C에서 두 시간동안 하여 stringency를 높이고 염색 시간을 짧게 하여 다른 *frizzled* family와의 cross hybridization에 의한 background 생성을 줄였다. 그 결과 초기 gastrula

상태에서 (Fig. 17. A-D) *zfp8a* expressing cell들이 dorsal marginal region에 모여서 zebrafish의 중배엽 유도 center인 shield를 형성함을 관찰 할 수 있었다. 이 시기 에서는 또한 epiblast 세포에서도 signal이 관찰되었는데 이 부위는 neuroectoderm 으로 운명이 결정된 세포들이 있는 부분으로 알려져 있다. 이 부분에서 발현하는 세포들은 이미 동물극까지 broad 하게 발현하는 것으로 보여진다(B, D). 70-90% epiboly 상태에서 (E-H) *zfp8a*를 발현하는 세포들은 hypoblast (mesendoderm)의 머리쪽 말단에서 계속 발현하며 이동하는 것으로 보여진다 (E, F). 그리고 외배엽에서 *zfp8a*를 발현하는 세포들은 mesendoderm의 이동과 더불어 같이 anterior pole로 이동하는 것으로 보여진다 (G, H). 10시간 근처의 embryo 에서는 외배엽에서 발현하는 세포들이 축쪽으로 서서히 이동하는 모습을 보여준다 (K, L). 외배엽에서 *zfp8a*를 발현하는 세포들의 전체적인 발현양상으로 보아 zebrafish의 neural ectoderm fate map과 비교해 볼 때 이 부위는 telencephalon, diencephalon, retina로 운명지어진 세포들이 존재하는 곳으로 추측된다. Gastrula 까지의 발현양상으로 보아 *zfp8a*가 mesendoderm에서 발현하여 머리부위의 말단으로 이동하는 것은 hypoblast의 머리부위의 말단에서 발현하여 머리 형성에 관련되어 있다고 알려진 *gooseoid*와 발현부위가 일치하는 것으로 보여지고 neuroectoderm에서 발현하는 세포의 발현양상은 anterior neuroectoderm을 유도하는 *otx2*와 일치하는 것으로 보여진다. 특히 *otx2*는 *Xenopus*에서 *gooseoid*와 함께 LiCl, UV, retinoic acid, activin, and Xwnt8에 의해 조절을 받는 다고 알려져 있다.

이들 결과를 종합해 볼 때 *zfp8a*는 zebrafish에서 중기 blastula에서 발현하여 dorsal induction을 유발하는 wnt-8의 수용체로써 작용하여 그 결과 *gooseoid*의 발현을 유도하여 dorsal 발달을 촉진하는 것으로 생각되며 동시에 *otx2*의 발현을 조절하여 anterior neuroectoderm 의 발달을 유도하는 것이라 생각되어 진다.

후기 embryogenesis 동안에는 먼저 3 somite stage(A)에서의 발현은 prechordal plate와 prenephric duct에서 지속적으로 발현을 유지하며 뇌가 될 부분에서 전체적으로 발현을 유지 한다. 25hr에서의 발현은 코가 될 부분인 olfactory placode와 diencephalon, tegmentum, hindbrain의 ventral side(vhb) 와 lateral primordia, prenephric duct, 그리고 neural tube의 ventral side(vnt)에서 발현하는 것으로 관찰되었다(Fig. 18. B, C). 그리고 Fig. 18. D는 동일한 sample의 dorsal side view인데 이때 귀(otv: otic vesicle)의 앞쪽 일부 부분에서도 *zfp8a* 가 발현함을 관찰할 수 있었다. 36시간 larva에서는 medial telencephalon과 optic recess, tegmentum, myelencephalon, prenephric duct에서 발현이 관찰되었고 ventral neural tube에서는 관찰되지 않았다. 그리고 이 시기에서 branchial mesenchyme 에서도 발현함이 관찰되었다.

Late stage에서의 정확한 발현부위를 관찰하기 위해서 24hr, 36hr, 40hr의 sample을 5 μ m 두께로 cross-section을 하여 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 19와 같은 결과를 얻게 되었다. A-C에서 보이는 것과 같이 olfactory placode와 ventral diencephalon(Fig. 19. A, B), optic recess, tegmentum,

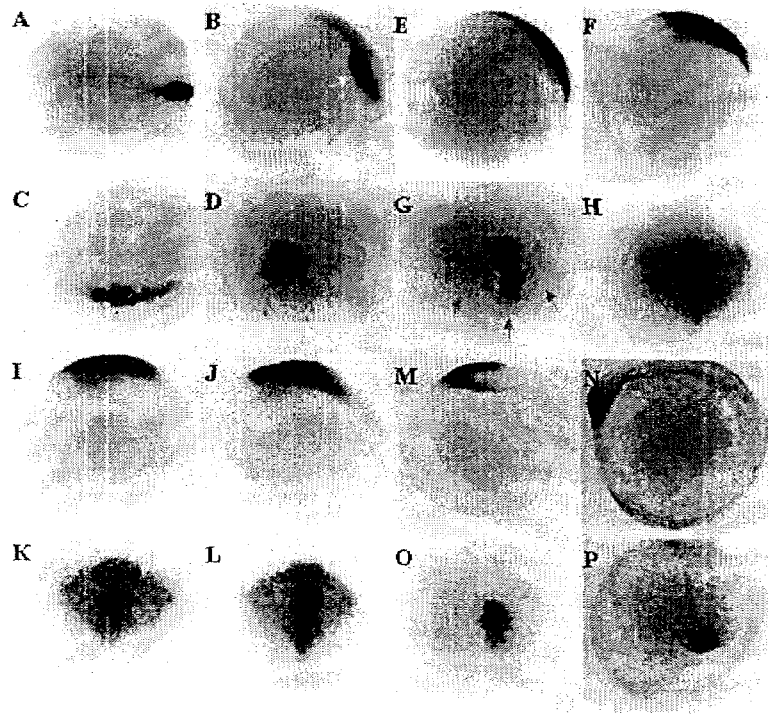


Fig. 17. Spatial expression patterns of *zfz8a* during early embryogenesis. The regions of *zfz8a* expressions were stained by blue color. (A) Lateral view and (C) dorsal view of 50% epiboly embryo. In this stage embryo, *zfz8a* is exclusively expressed in the first involuting cells at the dorsal side (A, C), and weak expression is detected in the epiblast (C). (B) Lateral view and (D) dorsal view of shield stage embryo. Accumulation of *zfz8a*-expressing cells in the dorsal midline by dorsal convergence at this stage (B). (E, F) Lateral view and (G, H) dorsal view of 70%-90% epiboly embryos. *zfz8a*-expression cells are at the leading edge of the dorsal hypoblast (E, F, I, J). Green and Yellow arrows indicate migration of *zfz8a*-expressing cells in the epiblast and hypoblast, respectively (E, F). Red arrows indicate migration of posterior margin of anterior neuroectoderm (G). (I, J) lateral view and (K, L) anterior view of 10-10.5hr embryos. *zfz8a*-expressing cells in anterior neuroectoderm start to fold to the dorsal midline (K, L). (M, N) Lateral view and (O, P) anterior view of 11hr, 12hr embryos. Staining in dorsal midline has decreased intensity, but there are still cells expressing high levels of *zfz8a* at anterior tip (M-P). (P) Shifted expression of *zfz8a* is detected in the margin of the head region.

ventral hindbrain 그리고 otic vesicle에서 일부의 세포에서 *zfp88a*의 발현이 관찰되었다. 36hr transverse-section sample(Fig. 19. D-G)에서는 medial telencephalon, optic recess(Fig. 19. D), tegmentum, eye, mesenchymal cell(Fig. 19. E), medial hindbrain, otic vesicle(Fig. 19. F), ventral spinal cord(Fig. 19. G)에서의 발현이 관찰되었다. 그리고 40시간 sample의 midsagittal section(Fig. 19. H, I)에서는 눈의 뒷쪽에 위치하는 5th ganglion, 턱뼈가 되는 mandibular mesenchyme, 아가미가 되는 세포인 branchial mesenchyme, otic vesicle(Fig. 19. H)과 optic recess, tegmentum, hindbrain(Fig. 9. I)에서의 발현이 관찰되었다. Section을 통한 결과를 분석한 결과 *zfp88a*는 특히 CNS의 ventral side에서 축을 따라서 발현함을 알 수 있었다. *zfp88a*가 발현하는 부위는 proneuronal 유전자인 ASH-1, Neurogenin, ATH4A, HES-1이 발현하는 ventricular zone으로써 neuron으로 되기 전의 세포들이 존재하는 부분으로 알려져 있다(Roztocil, T., Lidia M.S., Alliod, C., Ballivet, M. and Matter, J. M. 1997, Development 124, 3263-3272, NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis). 또한 이들 proneuronal 유전자는 neuroblast를 결정하는 Notch/Delta signalling pathway에 속하는 유전자이며 최근에 Wingless signalling pathway와 동시에 작용하여 neuroblast를 결정할 수 있다는 가설이 보고되어 있다(Blair, S.S. 1996, Science 271, 1822-1823, Notch and Wingless Signals Collide). 이러한 가설을 근거로 볼 때 *zfp88a*는 이들 두 pathway를 연결하는 유전자으로써 in vivo에서 이들 두 signal이 함께 존재함을 증명할 수 있는 열쇠가 되는 유전자라고 추정된다

(3) *zfp88b*의 시간과 공간적인 발현 양상 분석

*zfp88b*의 경우는 *zfp88a*와 매우 homology가 높은 유전자로 이 유전자 또한 head organizer로서의 기능을 수행 할 것으로 생각되었다. 그래서 whole-mount *in situ* hybridization을 실시 하였다. 그 결과 *zfp88b*의 경우는 그 발현 양상이 *zfp88a*와 비슷한 시기에 발현이 유도되는 것으로 관찰되었다. Fig. 20.의 B에서와 같이 sphere의 dorsal side에서 유도(arrow)되는 것으로 보였다. Shield stage(C)에서는 발현이 shield에서만 관찰되며(C, D), epiboly가 진행되는 동안 hypoblast의 첨단에서만 발현이 유지되었다(E-H). 또한 이동하는 동안 세포의 수가 일정하게 유지되는 것으로 보아 blastula에서 운명이 결정된 세포가 동물극까지 이동하는 것으로 추측되어 진다. Bud stage에서는 polster 부위에서만 발현이 관찰되고 ectoderm에서는 발현이 관찰되지 않았다. polster의 세포들이 이동하여 I, J 에서와 같이 머리의 앞쪽 면을 이루며 시간이 감에 따라 발현이 점차적으로 감소됨을 보여 준다(J-L). 25시간 sample에서는 optic recess의 윗쪽과 ventral diencephalon에서 발현함을 보여 주었다. *zfp88b*의 발현은 지금까지 head organizer로 알려진 gooseoid보다 앞쪽에서 발현하며 실제로 hypoblast의 convergent extension에 관련된 유전자일 가능성을 보여 주었다. 이들 결과를 종합하여 *zfp88*과 비교를 해보면 다음과

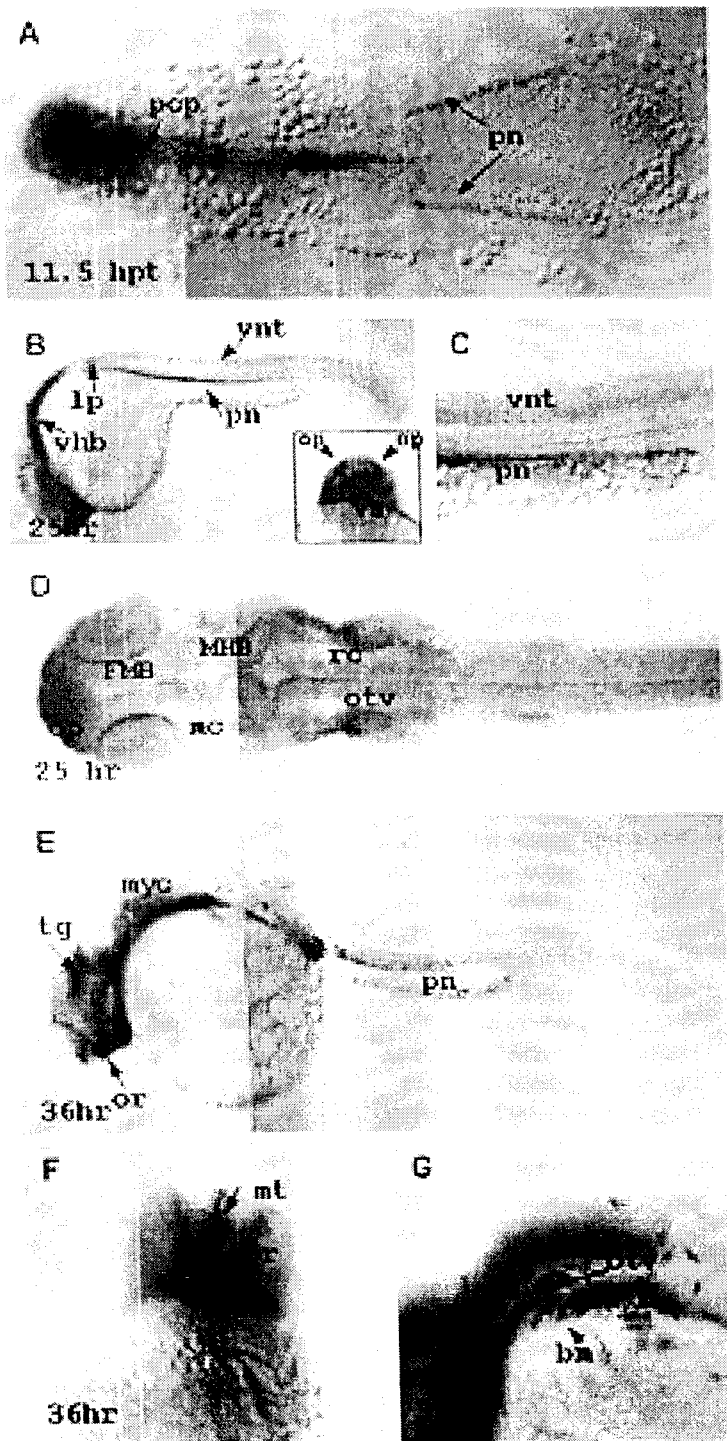
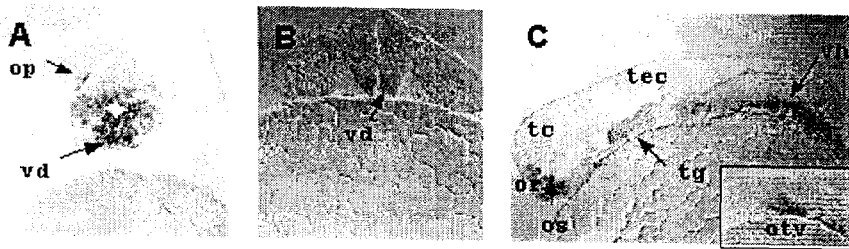


Fig. 18.

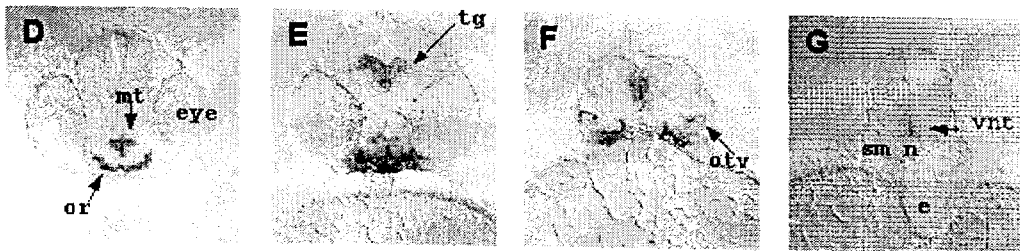
Expression of *zfx8a* during late embryogenesis.

(A) Lateral view of 24hr-old, (B) dorsal view of 30hr-old larva, (C) lateral view of 36hr-old larva. Orange arrow indicates migrating primordia (A, C), Red arrows indicate telencephalon and optic stalk(D), unidentified ectodermal region at head, yellow arrows indicate the most anterior-telencephalon and unidentified region at telencephalon(F).

24hr



36hr



40hr

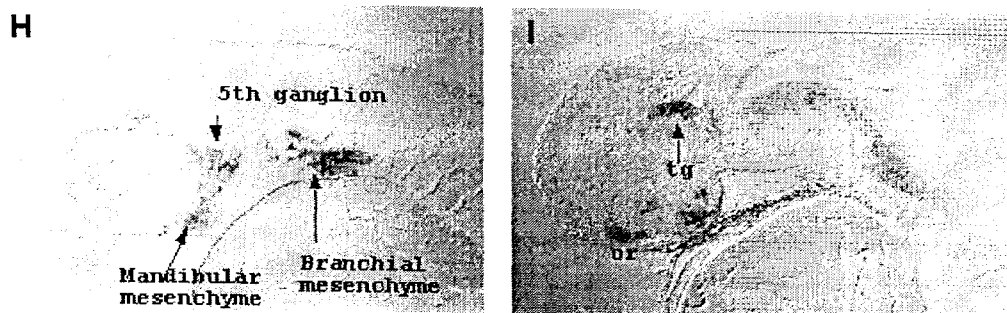


Fig. 19. Expression of *zfz8a* during late embryogenesis by transverse and midsagittal section.

A, B: Transverse section of 24hr-old larva, C: midsagittal section of 24hr-old larva, D-G: transverse section of 36hr-old larva, H, I: midsagittal section of 40hr-old larva. (A, B) stained in olfactory placode and diencephalon, (C) shows expression at optic recess, ventral diencephalon, tegmentum and ventral hindbrain. Figure in small box shows expression of *zfz8a* at otic vesicle. (D) shows expression in midline telencephalon and optic recess, (E) shows expression in tegmentum and eye, (F) shows expression in medial hindbrain which exist proliferative neuronal cell, (G) shows expression in ventral neural tube and weak expression in endoderm, (H, I) shows expression in 5th ganglion, mandibular mesenchyme, branchial mesenchyme, optic recess and tegmentum.

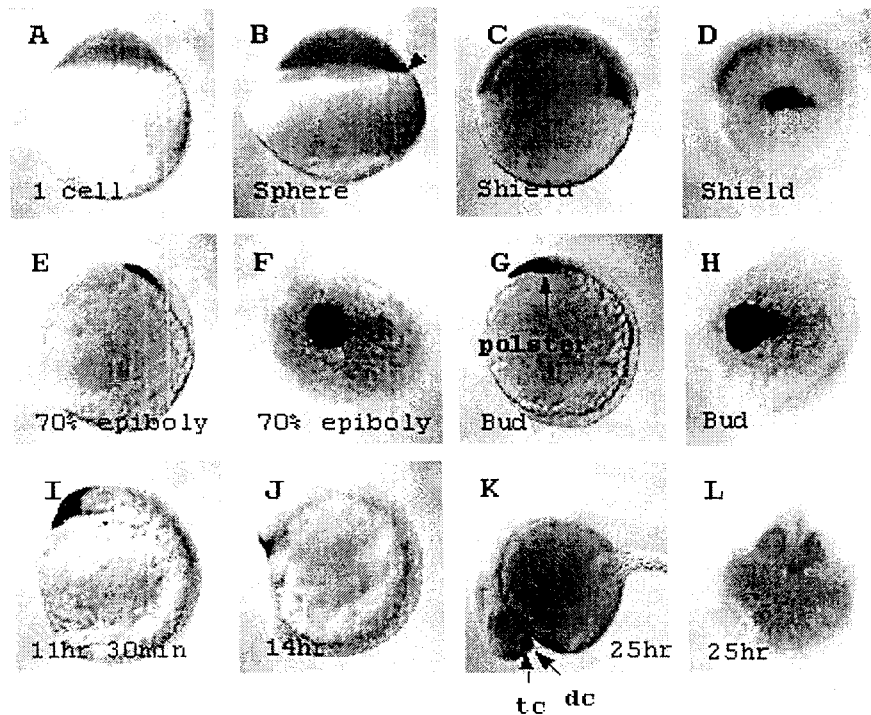


Fig. 20. The spatial expression of *Zfz8b* mRNA transcripts in the zebrafish embryos. A) At The 1 cell stage, broad expression of *Zfz8b* mRNA is noticed. B) Between the oblong and sphere stages, future dorsal region start to express *Zfz8b* transcripts as indicated by an arrow. C) Shield stage, D) dorsal view of C. Unlike *Zfz8a* transcripts expressed in both of epiblast and shield, expression of *Zfz8b* mRNA transcripts are only detected in the shield. E-F) At 70% epiboly, *Zfz8b* transcripts are expressed in the anterior mesendoderm thus mark the prechordal plate. G-H) At tail bud stage, *Zfz8b* transcripts are further restricted to the most anterior prechordal plate. I) Around 3 somite stage, *Zfz8b* mRNA transcripts mark the anterior neurectoderm and prechordal plate including polster. In this stage, expression pattern of *Zfz8b* is very similar to that of *Zfz8a* except *Zfz8b* mRNA expression in the polster. J) At 10-somite stage, *Zfz8b* transcripts have almost disappeared except the most anterior structure of the embryo. K-L) At 25 hr stage, *Zfz8b* transcripts are remined at anterior tip of diencephalon. (A,B,C,E,G,I,J,K) Lateral views, animal pole to the top. (D) Dorsal view, animal pole to the top. (F,H) Animal pole view, dorsal to the right. (L) Anterior-dorsal views, anterior to the top. tc: telencephalon, dc: diencephalon

같다.

첫째, *zfp8a*가 MBT(mid-blastula-transition) stage에서 발현이 시작하는 것과(data not shown) 달리 *zfp8b*는 epiboly가 시작되는 시기에 발현이 유도되는 것으로 보여진다. 둘째, 또 다른 점으로 *zfp8*이 anterior of hypoblast와 함께 바깥층 세포(epiblast)에서도 동시에 발현하는 것과 달리 (Fig. 17. A-C) anterior tip of hypoblast에서만 계속 발현을 하였다(Fig. 20. C-E). 셋째, *zfp8a*이 bud stage에서 polster region에서는 약하게 발현을 하고 polster와 연결된 prechordal plate에서 발현을 하여 *gsc*와 발현부위가 겹치는 것과 달리 *zfp8b*를 발현하는 세포들은 bud stage(Fig. 20. G)에서 polster 부위에서만 관찰되었다. 넷째, *zfp8a*는 somitogenesis 기간 이후에 발현이 다른 곳으로 이동하여 여러 곳에서 발현을 하는데 반해 *zfp8b*는 다른 곳에서는 관찰이 되지 않고 그 발현 정도만 감소하는 것으로 보아 단일한 기능을 수행하는 유전자로 보여진다.

(4) RNA injection에 의한 ectopic overexpression을 이용한 *zfp8a*, *8b*의 기능 분석

zfp8a 와 *zfp8b*의 whole mount *in situ* hybridization 에 의한 발현양상이 head organizer 유전자로 알려진 *gooseoid*, *otx2* 등과 비교해 보았을 때 거의 일치하는 것으로 보아 *zfp8a* 와 *zfp8b*는 dorsal region의 발달과 anterior neuroectoderm 발생에 관련된 유전자일 것이라고 추측되었다. 그러므로 발생 초기에 이들 *zfp8a* 와 *zfp8b* 유전자들을 RNA injection에 의한 overexpression을 시킴으로서 이들 유전자들의 생체내에서의 기능을 확인하기 위하여 *in vitro* transcription에 의하여 합성된 *zfp8a* 와 *zfp8b*의 5'-capped RNA를 100-200ng/ μ l의 농도로 one cell stage의 zebrafish embryo에 microinjection 하였다.

그 결과 microinjection된 zebrafish의 embryo에서 *zfp8*과 *zfp8b* 모두 거의 유사한 pattern을 보이는 mutant phenotype이 나타났었다.

우선 초기에 organizer에서 발현하여 축형성에 관련된 기능을 알아보기 위하여 몇가지 실험을 수행하였다. 먼저 organizer marker 유전자인 *gooseoid*의 발현에 변화를 주는지 알아보기 위해 shield 형성시기에 *gsc*를 marker로 하여 *in situ* hybridization을 수행하였다.

그 결과 Fig. 21에서와 같이 *zfp8a*와 *zfp8b* 모두에서 그 발현 부위가 넓어지거나 두 개로 나뉘는 양상을 나타내었다. 이 실험으로 *zfp8a*와 *8b*가 wnt signal에 의해 축형성을 할수 있는 가능성을 가진 유전자로 추정하였다. 그 다음 실험으로는 LiCl처리에 의한 dorsalization이 일어나는데 이때 또한 *gooseoid*가 발현부위가 넓어진다는 보고(Scott E. Stachel etc)와 실제로 이러한 결과는 세포 내부의 β -catenin의 증가에 따른 dorsalization에 의한 것이라는 것이 최근 밝혀졌다

(Peter S. Klein etc). 이는 Wnt signal의 결과 나타나는 β -catenin의 증가와 관련이 있다고 생각되어 0.3M LiCl를 10분간 처리하여 Zfz8a와 Zfz8b의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 22에서와 같이 goosecoid와 동일하게 원형의 발현양상을 보였다. 이는 Zfz8a와 Zfz8b도 또한 wnt signal을 받아서 전반적으로 발현이 증가하는 유전자임을 보여 주었다. 그 다음 실험으로는 실제로 새로운 축이 생성되는 가를 확인하기 위하여 척추에서 발현하는 유전자인 axial과 shh를 marker로 하여 in situ hybridization를 수행한 결과 Fig. 23. A, B에서와 같이 두 갈래로 나뉜 발현 모습을 보였다. 이것으로 보아 Zfz 유전자들이 축형성에 직접적으로 연관되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 2cell 이상 분열한 다음 injection한 결과 축을 중심으로 한 쪽이 더 넓은 embryo가 관찰되었는데 이 원인을 알기 위해 neuronal differentiation 중인 세포에서 발현하는 HuC를 marker로 하여 실험을 수행한 결과 Fig. 23. C, D에서와 같이 왼쪽의 세포가 uninjected sample(C)나 오른쪽의 세포들 보다 1시간 이상 분화가 지연되는 양상을 보였다. 25hr이 경과한 embryo에서는 일부의 개체들이 forebrain-midbrain boundary (FMB)에서 brain이 정확히 duplication되는 (Fig. 24. B, C, D) 뇌의 구조를 보였다. 이들 결과는 두 유전자의 기본적인 기능이 brain 형성에 직접적인 관련이 있다는 것을 보여주는 것이라 생각된다. 이들 두 유전자의 발현 양상과 RNA injection 결과를 토대로 추측해 볼 때, zfz8a와 8b의 기본적인 기능은 유사하나 이들의 발현이 각각의 promoter에 의해 조절되어 두 유전자가 서로 다른 region으로 나뉘어 발현하여 실로는 약간의 다른 기능을 수행하게 된 것으로 보여지며 zfz8b는 envoluting 세포들의 말단에서 발현하여 gsc의 발현을 조절하여 머리형성을 유도하고 zfz8a의 경우는 WNT signal의 downstream인 gsc의 기능이 축형성 organizer 유전자인 ntl(no tail)의 발현을 조절한다고 알려져 (Latinkic, B. V. etc) zfz8a가 gsc의 발현을 조절하여 organizer 유전자들의 발현을 조절하는 직접적인 receptor의 기능을 수행하는 것으로 생각되어 진다.

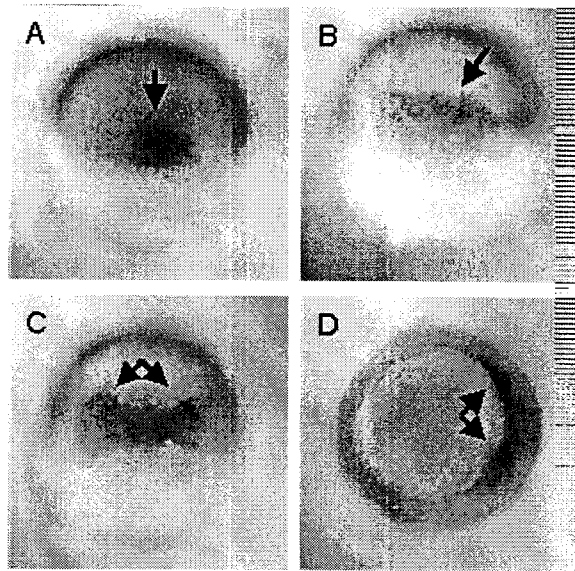


Fig. 21. The spatial localization of *gsc* transcripts in *Zfz8b* injected embryos at shield stage.

Embryos in A, B, C are dorsal view, D is viewed from animal pole. A) *gsc* expression in uninjected embryo, B-D) *gsc* expression in *Zfz8b* RNA injected embryos. Arrows indicate expanded(B) or split expression of *gsc*.

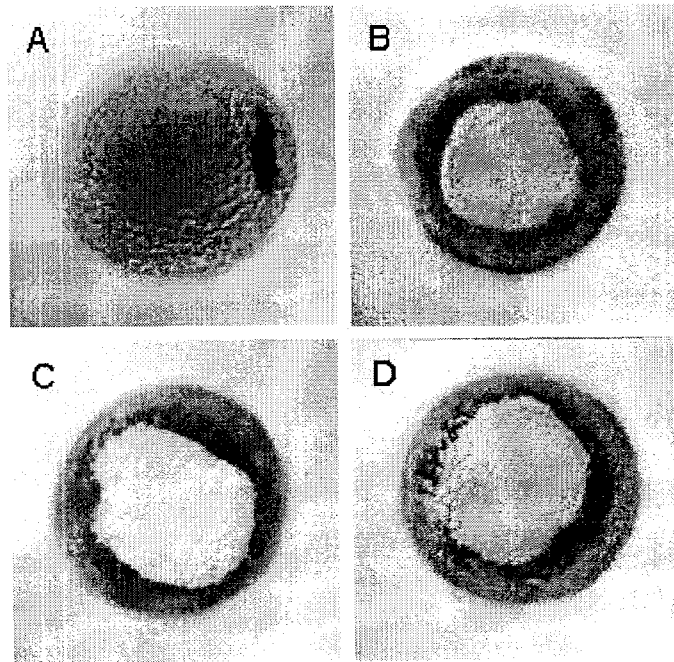


Fig. 22. Spatial localization of goosecoid, Zfz8a and Zfz8b transcripts in lithium-lithium embryos.

B,C,D are exposed to 0.3M LiCl for 10 minutes at 256cell stage. A-D show animal pole view of 6 hr embryos. A) shows normal expression of Zfz8b in untreated embryo. B) shows radialized expression of *gsc*. C) and D) show radialized expression of *Zfz8a* and *Zfz8b* , respectively.

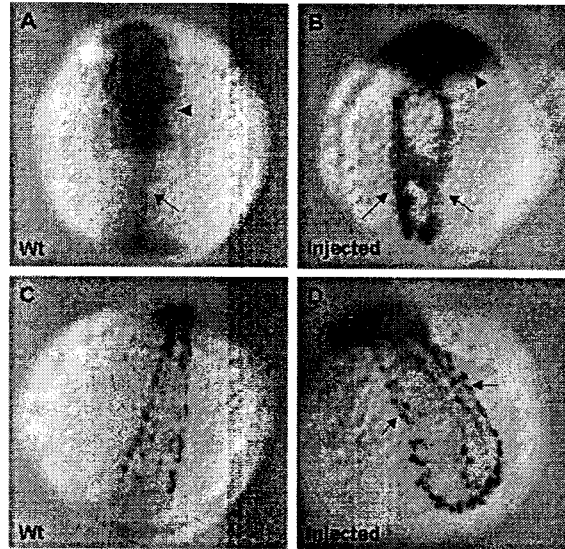


Fig. 23. Spatial localization of *otx2*, *axial*(A, B) and *HuC*(C,D) in *Zfz8a* injected embryos.

A) *otx2*(arrow head) and *axial*(arrow) expression in uninjected embryo at 12hr. B) shows duplicated *axial*(arrow) expression and broad expression of *otx2*(arrow head) in *zfz8a* injected embryo at 12 hr, C) shows *HuC* expression in uninjected embryo at 14hr embryo D) shows *HuC* expression in *Zfz8a* injected embryo at 14hr embryo. Left side arrow shows delayed neuronal precursor cells.

Brain axis duplication

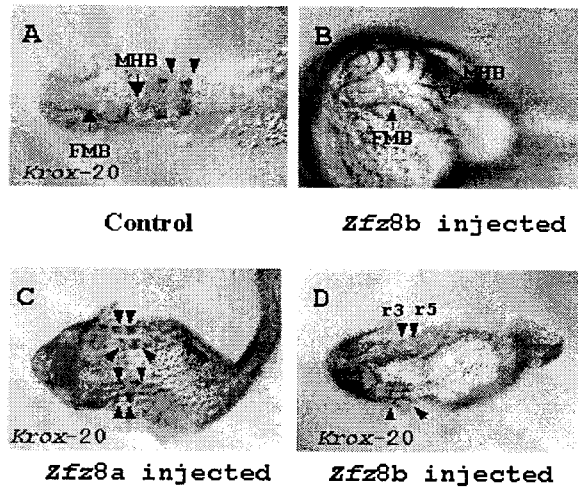


Fig. 24. Brain axis duplication by the ectopic expression of *zfz8a*, *8b* genes. Dorsal views of 25hr embryos injected with *zfz8a*(C), *zfz8b*(B, D). Stained with *krox-20* (A, C, D), (A) Non-injected 25hr larva, (B) shows duplicated brain axis at MHB in *zfz8b* injected 25hr larva, (C, D) shows injected *zfz8a*, *8b* 25hr larva with duplicated brain axis. Arrow heads indicate *krox-20* stained r3, r5. FMB; fore-midbrain boundary, MHB; mid-hindbrain boundary.

나. HMG clone의 full-size cDNA의 분리

(1) HMG 유전자의 염기서열 분석

MG44 clone은 database 검색 결과 HMGI family protein과 높은 homology를 나타내었다. HMGI 단백질은 HMG-I, HMG-Y, 그리고 HMGI-C의 세가지 종류가 있으며, 이 유전자들은 정상외의 성인 조직에서는 아주 낮은 발현을 나타내지만, 배 발생 조직에서는 상당히 높은 발현을 보인다. 특히 발생의 초기에는 모든 조직에서 아주 높은 발현이 측정되었다. 이후 시간이 감에 따라 비록 모든 조직에서 발현이 나타나기는 하지만, 몇몇 조직에서만 특이적으로 높은 수준의 발현을 보인다. 이러한 결과로 발생과정에서 HMG 유전자가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정되어 이들의 full-size cDNA를 분리하고 그 염기서열을 분석하였다.

```

-89                                GCGGCCGCGGATCCCGCGGACCTCGCTG
GTGTGCACACTTTGGACTTTGTCCCGACCGCTCCTTTAAAAGGTGTTCCAGTAAGACACA
ATGAGTGATTCTGGCGAGGACACAGTGGCGACTAAAGAGAAAGATGGAGCAGAGAAGAGA 60
M S D S G E D T V A T K E K D G A E K R
GGACGTGGAAGACCCCGAAAAACCCACAGCAGGAGGCCAGTGGATCTCCTACACCGAAG 120
G R G R P R K H P Q Q E A S G S P T P K
AGACCCAGAGGAAGACCAAAGGGCAGCAAAAACAAGCCGAGCTCTACTGTGTCTCGGGGC 180
R P R G R P K G S K N K P S S T V S R G
AAAAAAGCAGCAGCGCTTCGGCACCTGCAGGACTAAACGCCGAGGACGACCCAAGAAAG 240
K K A A A L R H L Q G L N A E D D P R K
CAGAGAAGGAGGAGCAGCCATCCAAGTCTCCGAGGAGGAAGAAGAGGAGGAAGAGGAAC 300
Q R R R S S H P S P P R R K K R R K R N
AGTAACTAGCGACTCGTGCTACCTACAATCCAACGTTATTTCTTCTCCTGTTGACCAGAGC 360
S N -
TGGACTGACCCTTTCCCCCACCCTGATTTCTCCCCTCTTCCCTCTCTCTTTTCCCGTTCA 420
CTTAGTGCCACCCTCACCTCCAATTCACCTTTATGCTCTAGTGCCCCCTAGTGTCAGGG 480
AGGCTGGCATGTCCATGCGGCTTCTGTGTAACACCACTGGAAAAAACAATAAAGGACTC 540
AAAATATACTGTATGTCCATTCATGGATGCATGCACACATGTATGCGTGTATGTAATGT 600
CTCNNNNNCTCAAAGGGTAATTGGTCTATCATCATACTGGACAAAGATATGCTCTGACGG 660
CGGCTTGACACAGCGATTTGCAAAATACTGAAGTTTCTTTTSTTTTTCTCGTCTCACAAA 720
CAGTTTCAGGCCTTGGGGATTACGTTTATNNNTGCAAGTCTAAATCTAAAATTGCGGTA 780
GGTTGNGTGAAATTCATGTCGTCGWGTA CTGGACAAAGGTGNAATTGACCTACTGTTAAC 840
TTTATTACCATTTTTGAATATAAATTCCTGCAGTCCACAATAGAAAATGCAGAGTGATA 900
CATTGAAAAGACTGATCCCAAACAGTTGTGTGCACGGGCACATAAAAAACAAGACATCAG 960
TAATGAAGGGCATGTTAAAAACCACTGCGTCAAACAGCCGTATATAGTACCATCATGATC 1020
TACCAAAAACAAGGGCTCGGAGCTAAAGCGGCTAGCAGGATGAGGAAGTTTAAATCGGAGA 1080
CAGGAGAAATAAACAACCCTAGGCTTCAGGTGCCACACTAAAGTCATTTTATTTCAGGAT 1140
AAGATAAAGCAAAAATAAGTCAATTCAGTGCACCGAACAAATACGTACAGAAGAAAATAA 1200

```

```

AACCTAGATCTCTACCACAGTCTGTGAACACGTTTTGCATCTCTCTGACTCAATGCATCC 1260
CGCTGTTGGCGTCTCCAGATGATTTCTACAGGAATTAATGATGCACACCGCTGTAAAGC 1320
AAAACCAGTTTGAAACAAAAACAGAGCAACAATAACCCACACTAGAGGAGGATCAAACG 1380
AGCGCTCTCGGCAAACGCTGCACTGAGACCAGTTGAACGGCGTCAGGAAAATTAACAGAG 1440
GAGAGAAATCCGTCATAGGCTGTTGTAAAGTGAGGTATGAAAGTGACGGTCAAGTCCAGA 1500
GTAGAACTGACCGGGTTGCAGTATTCCGGGTTTTTAGTTAACCATGTTTGTAGCAGCATT 1560
AAGTTCTGAGAGGAGACCCAGTCACTGGACCGATCAGCGTTCCTGAC 1628

```

Fig. 25. Nucleotide and deduced amino acid sequence of MG44 cDNA for zebrafish. The entire nucleotide and deduced protein sequences are shown. Nucleotide numbers are indicated on the right. The canonical initiation codon, ATG and the termination codon, TAG were marked by underline.

```

MG44  MSDSGEDTVATKEKDGAEKRGRGRPRKHPQQEASGSPTPKRPRGRPKGSK 50
HHMGI  -SKSSQPLASKQEKGTEKRGRGRPRKQPQKEPSEVPTPKRPRGRPKGSK 49
HHMGY  -SKSSQPLASKQEKGTEKRGRGRPRKQPPKEPSEVPTPKRPRGRPKGSK 49
MHMGY  -SKSSQPLASKQEKGTEKRGRGRPRKQPPKEPSEVPTPKRPRGRPKGSK 49
HHMGC  MSARGEGAGQPPAAPAPQKRGRGRPRKQ-QQEPTGEPSPKRPRGRPKGSK 49
MHMGC  MSARGEGAGQPPAAPVPQKRGRGRPRKQ-QQEPTCEPSPKRPRGRPKGSK 49
      * ... . ..*****. ..*.. *.*****

MG44  NKPSSTVSRGKAAAALRHLQGLNAEDDPKQRRRSSHPSPRRKRRKRN 100
HHMGI  NKGATTTTPGRKPRGR--PKKLEKEEEEGISQESSEE----- 84
HHMGY  NKGATTTTPGRKPRGR--PKKLEKEEEEGISQESSEE----- 84
MHMGY  NKGAATRKTVTTAPGRKRPKKLEKEEEEGISQESSEE----- 86
HHMGC  NKSPSKAAQ-----KKAETGEKRPRGRPRKWPQQVVQKKPAQEE 89
MHMGC  NKSPSKAAQ-----KKAETIGEKRPRGRPRKWPQQVVQKKPAQET 89
      ** .... . . . .

MG44  SN  102
HHMGI  EQ  86
HHMGY  EQ  86
MHMGY  EQ  88
HHMGC  TE  91
MHMGC  EE  91
      ..

```

Fig. 26. Alignment of amino acids of MG44 for zebrafish with those of HMG homologue proteins from other sources. Identical amino acids are indicated by the asterisk (*) and hyphens are inserted for the alignment of protein sequences. Dot (.) denotes the similar amino acid residues.

(2) HMG clone의 시간적 공간적 발현양상 분석

최초의 발현은 MBT에서부터 아주 강하게 전체적으로 발현을 하는데 시간이 지날수록 brain과 spinal cord에서 강하게 발현을 유지하고 나머지는 억제 받아 발현이 급격히 감소함을 보였다 (Fig. 27). 이 유전자의 기본적인 기능은 neural tissue의 proliferation 에 관련된 유전자로 생각되어 진다.

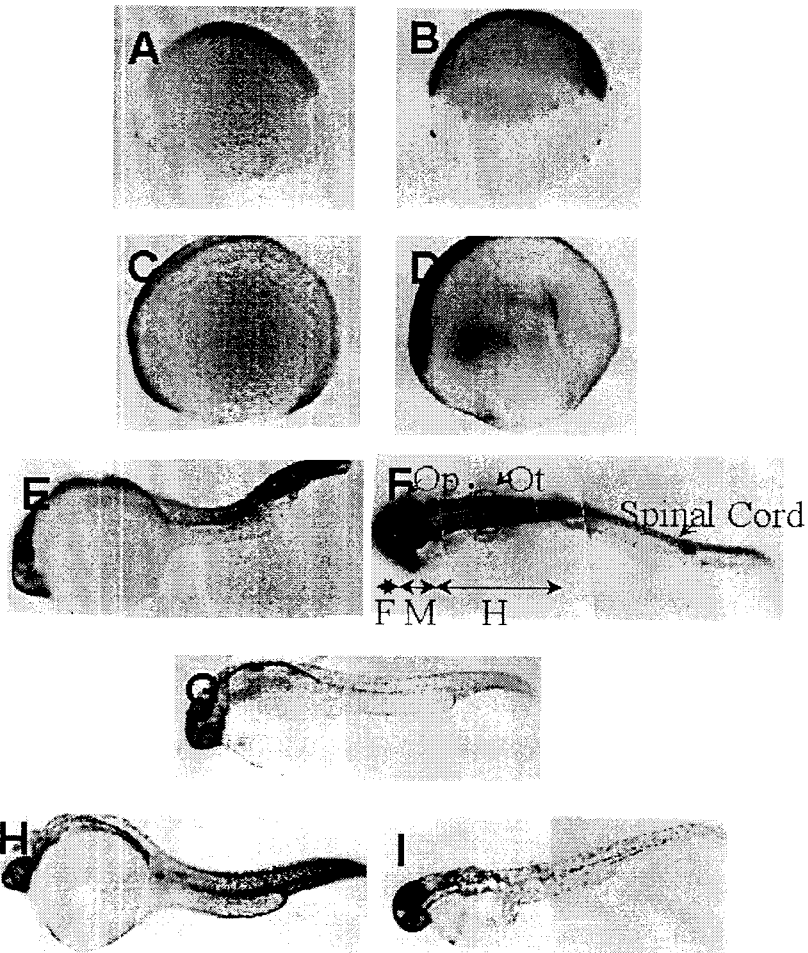


Fig. 27. Whole mount in situ hybridization of the HMG clone in the developing zebrafish embryos. A full-length cDNA was used as a template for synthesis the antisense RNA probe. A, 5.25 hr; B, 7 hr; C, 8.5 hr; D, 10 hr; E, 20 hr; F, 24 hr; G, 30 hr; H, 36 hr; and I, 48 hr zebrafish embryos.

다. Zebrafish neurolin homolog의 full-size cDNA 분리

(1) Zebrafish neurolin-like gene full-size cDNA(MG 159)의 분리 및 분석

MG 159 clone은 database 검색결과 cell adhesion molecule인 Immunoglobulin superfamily중의 한 member인 zebrafish neurolin/DM-GRASP/CD166과 homology를 나타내었다. neurolin은 처음 chicken에서 발견된후 DM-GRASP/BEN/SC-1 으로 명명되어 있으며 이 유전자는 종마다 다른 neuron에 특이적으로 발현하는데 chicken에서는 motor neuron 과 sensory neuron등에 특이적으로 neurite outgrowth에 관여한다고 밝혀져있다.

MG159 clone을 probe로 두 단계의 plaque hybridization screening을 통하여 3kb의 유전자를 획득하였다. 그리고 이 유전자의 restriction map을 결정하여 0.5에서 1kb size로 각각을 construction한 후 automatic sequencer로 nucleotide sequencing을 수행 결과 Fig. 28에서 보는바와 같이 3,062bp의 cDNA임을 확인하였다.

그리고 PC-GENE program을 이용하여 아미노산 sequence를 추정 한 결과 이 neurolin-like gene은 117base의 5' UTR 이후 ATG start codon이후 TAA의 stop codon까지 562개의 아미노산을 coding하고 있다. 562개의 아미노산으로 이루어진 이 유전자의 open reading frame은 N-terminal 부분에 18개의 signal sequence를 가지고 있으며 504번째 아미노산에서 528번째까지 transmembrane domain을 가지고 있는 membrane bound protein임을 확인할수 있었다.

이 protein은 50에서 100개의 아미노산 사이의 간격으로 cystein을 가짐으로 확인하고 이는 disulfide bond를 형성하여 Immunoglobulin superfamily의 adhesion molecule과 같은 protein structure를 형성함을 추정하였다. 아미노산 sequence의 유사성을 비교해 본 결과 Fig. 30과 같이 zebrafish DMGRASP과는 48% , goldfish neurolin과는 47.6% 그리고 chick DMGRASP과는 37% 의 amino acid homology를 나타내었다.

이이에 따라 MG 159은 Ig superfamily cell adhesion molecule로서 Fig. 29에서와 같이 extracellular domain과 transmembrane domain, cytosolic domain을 가지는 protein을 생성하는 유전자 인 것으로 확인되었다.

(2) Zebrafish neurolin-like MG159의 시간적 공간적 발현 양상

지금까지 알려진 neurolin/DM-GRASP류의 protein은 종마다 그리고 시간별로 다른 발현 양상을 보인다 .Goldfish의 경우는 28hr 이후의 retinal ganglion cell에서의 발현이 확인 되었고 chick의 경우 sensory neuron이나 motor neuron 그리고 sympathetic neuron에서 발현된다고 알려져 있다. 반면 zebrafish DM-GRASP의 경우는 Trigeminal ganglion, primary sensory neuron인 Rohon-Beard cell, notochord , 그리고 귀 부위에서 발현되며 48hr 이후에서는 motor neuron에서의 발현도 확인되었다.

AATTTACTGACGTACGCAACGAGTGTGTACTTTCCAGAACATTATCCAACAACGAC
GCTCGTTAGGCAAGGATATTATTTCTCAGGAGTGCAGAACTATCGCAGACTGCAGAAAAG
1 ATGCAGCGGACCGCTTTTTAACGTGTCTGCTCACCGTGTCCCTCATGAATCAAGTGTGG 20
M Q R T A F L T C L L T V S L M N Q V W
61 GGTTTGGAAAACGGTCACTGGCAAGTACGGAGACACTGTTGAAATCCCATGCAACAGTGGGA 40
G L E T V T G K Y G D T V E I P N S G
121 CTTGTCTCAGACGTAGGAGTACAGTGTGTTAACTGGAAATCTGACAAAGATGGCAGCATT 60
L V S D V G V T F V N K S D K D G S I
181 CTGGTAAAACACACGGGTCAGAATGCCTGGTCTCCCACTGATGGTAACTACAAGAACAGA 80
L V K H T G Q N A W S P T D G N Y K N R
241 GTCAGTATTAAGGATTTTGGTCTCATCATCACACAAGTGTCCCTGGCGGATCAGAAA 100
V S I K K D F G L I I T Q V S L A D Q K
301 ACCTTACCTGCATGGTTGTGGCAGCAGATGACATTTTGGAGTATCCTGTCCAACCTGGTC 120
T F T M V V A A D D I L E Y P V Q L V
361 ATTTACAAGACTCCATTGCAGCCTCAGATTGCAAACCTAACCACTGCGATGGAATCGGA 140
I Y K T P L Q P Q I A N L T T A M E I G
421 AAGCTGACTACATTGGCACAGTGTCACTGAAGGTGCCAATCCAGCTGCCAACATCAG 160
K L T T L A Q H T E G A N P A A N I T
481 TGGTTCAAGAACAAAACCTCCGCTTATTGCTGATGGAACAGCCATTAATAACCAATGAT 180
W F K N K T P L I A D G T A I K I T N D
541 GTGGCTGTTGATAAAGCGACAGGACTGTCTGCCACTACATCTAAGCTGGAGTACACTGCA 200
V A V D K A T G L S A T T S K L E Y T A
601 GTGAAGGATGACATTAATTCCAAGTTTACCTGTCAGGTTGAGCACATTAAGTCTGCTAAC 220
V K D D I N S K F T Q V Q H I K S A N
661 ATGGATTCCCTACCGCTCGTCTTACCGTGAACCTACCCTTCGGAGACGATCAGTTTCCAT 240
M D S S P L V F T V N Y P S E T I S F H
721 GTGCTGCCCGATGGTCTGTTAAAGAAGGAGACAATGTGACCCTCAAATGCACGGCAGAT 260
V L P D G P V K E G D N V T L K T A D
781 GGAAACCCCCACCCTCTCGCTACAACCTTCTACATCAAGGGAGAGAAGAAGACAGTGGAG 280
G N P P P S R Y N F Y I K G E K K T V E
841 AAATCGAACATCTTTATCTTGAGTAATGTAAGTACAGGCAAAACACCGGAGAATACAAATGT 300
K S N I F I L S N V T R Q N T G E Y K
901 TCATTGGTGGATAATGAGATATTGACGGCGTCTAAAAATATCACCGTTGAATATCTTGAT 320
S L V D N E I L T A S K N I T V E Y L D
961 GTGATTCTTAGCACCCTGGTAAGGTTTTCAAGAACTTGGCGATAGTTTTGAAAACAACT 340
V I L S T T G K V F K K L G D S F E T T
1021 CTCGATATTAAGCTTCAGGAAAAACAGAAACCTTTTGTAAAGGGTGGTAAAAGCTG 360
L D I K A S G K T E T F C K K G G E K L
1081 GTTGGCCCTCCTAAATTTGCCAGCTTAAAGTACACAGACTCTGGTGTGTACGAGTGTGTT 380
V G P P K F A S L K Y T D S G V Y E C V

1141 GTTACAATGCTTGGCCTCAAGAAGACACAGACATTTGACTTGAATGTTTCATGGGCAACCA
V T M L G L K K T Q T F D L N V H G Q P 400
1200 CTGATCAAGAGCCTGACCAAGAAGCGTGGTGATGGTACAAACAAGATCCTGAGCTGTGAA
L I K S L T K K R G D G T N K I L S C E 420
1261 GCTGAAGGATCACCAAAGCCAACGGTGCAGTGGATTACCAATGGCACTGATGTGAAATTT
A E G S P K P T V Q W I T N G T D V K F 440
1321 CAAGAGAGCGAACATGTGAATGGAAAGATCACATACTATATCACTGTCAGTCCAAAGGCC
Q E S E H V N G K I T Y Y I T V S P K A 460
1381 AATGTCACCTGTCTGCTGCACAATCTCCAATGATTTGGGTTCTGACACGAGGAGCATCGAT
N V T V S C T I S N D L G S D T R S I D 480
1441 GTGTCGTCGCTTGTGAGGACGTGACAATGGACAAACAAGATCAGTCAGAGGACTACAGT
V S S L V E D V T M D K Q D Q S E D Y S 500
1500 GACCAGACGGCGCTGGCTGTTGGCATTGTTGTTGGCTTGATGCTGGCAGCACTTTTGATA
D Q T A L A V G I V V G L M L A A L L I 520
1561 GGACTGGCCTACTGGCTGTATATGAAGAAATTCAGGCAAGGATCCTGCAAACCGGAGAG
G L A Y W L Y M K K F R Q G S C K T G E 540
1621 AAGGAAGACGGTCAAGAGAGAGCAAGAAGCTGGAGGAGAATCAGAGCCAAAAGCT
K E D G S A E E S K K L E E N Q S Q K A 560
1681 GAAGTGAATGACAAAGACATTCAGGGATTAATTTGATTAAAATCCCATTTTCCCTGAGA
E V 562
GATGGAAGGAAAAACATTGGTGGAGTCTGTGAAAAATGGAGTCAGAAGCTGTAATGGAGG
ACTTGAGTAGCTGTGTCAGTTACATCGCCACCATTGTCTGTAACGTGTCTGTGCTCCAC
ATGTCGGGGCATTAAATTGAATTGAATTCATAATGCGTGTGTAAAATATGTGAATCTTT
TACATTTGAAGATCCAGCTTGTTCGAAACCCGTGTCTGTTAAGTGTTCCTGGGTTTCAC
ATTTGATCGTGTGTTTTATTGATTTATTTCTTTTGTCTAGGTATTTAGTTAATGCAA
ATTAGTTTTTTGCAGTTTTCATATGGTAGAAACACTGTGGCCTTTAGTGTCTGTAACGGAT
TTTTTCCTTTAGAATTACACATAGTAATCTGTGGCATGAATACGAAGCATGTTTTTTTT
CTTTTTCCACATTTATACTGAGCACTTGGCTAGTTTTTCAGGTTTTAAGTCAGTGAGCAAA
AATATATCCCAATATTATACTTGTGGGACCCGATGACCATTATTTACCAATATTTAGA
CATTTGATGCATTTGAATGAAGATTTGCCCTACAATTTGAAGACATCATGAAAGCCATG
CCTTTTGCTTGAAGCAAACAGAAGAATCACAAGAATCCCAGTTAAATTTCTTTTTCTT
TTTTCTTGGTTTTGAAAAATGAAAAGTCTGTTCTCGATAATGTATATGTACATTAACACA
CTTCATCATCATCGCAGATCATCATAAGGTTGTTAATCTTTATTGTTTCGTTTTGCTGCA
GAATGTGTGTGTGCTCTGGTTTAAGCATTACTTGTAATATGGCAACCTTTTTTTATTGT
TTTTGTTTTATTATATTGTTATGGTTTAGCTAAATACCAGTGTGTTTGACATGTACACTA
GCTAGTTTTAGCCAATTTTCCCTGAAAATATACCTCTGTGCTGTTGAATGGTATGGTGAA
ATTGATGGTATTTACTTGCAAGCTTTAAAATTTGTAATGTAATCTTGCAGCTTTCCAAC
TTTATTGCAGTGTGCTGCGTTTTCTCCTTGAGCGTCAACTCAGCGAATTTAATCCACCAT
CAAAACCAAAGAGGTTGAATGTGGCCATGCAAGTATTGTACATACTGACCGTTGTTTTGT
ACTCTTAGTTCGGATAAAGTGTACATTTTTAGGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAA

Fig. 28. Nucleotide and deduced amino acid sequences of MG159. The entire nucleotide and deduced amino acid sequence of zebrafish neurolin-like gene (MG159) . Nucleotide numbers are indicated at the left, and amino acid numbers are indicated at the right, pink-shadows are cysteins that form disulfide bonds each other. The underline indicates signal sequence, and italic and gray-shadow amino acids are indicated transmembrane domain region.

Zebrafish neuroilin과 48%의 identity를 가지는 MG159 cDNA clone의 발현 양상을 확인하기 위하여 pBluescript SK(+)¹의 Eco RI/Xho I site에 cloning 되어있는 3,062base의 cDNA를 T7 RNA polymerase로 DIG-UTP와 NTP mix를 이용하여 in vitro transcription을 수행하여 DIG-labelled RNA를 제조하였다.

이를 Probe로 whole mount in situ hybridization을 수행하였다. Hybridization은 65 °C 에서 O/N 수행하였으며, probe washing은 70 °C 에서 2시간 동안 실시하여 stringency를 높였다. Alkaline phosphatase antibody로 BCIP/NBT를 이용하였다.

MG159의 발현은 maternal mRNA로 존재함을 나타내며 MBT시기를 지나면서 그 발현이 증가되는 것이 확인된다(Fig. 31. A). Shield 형성시기인 6hr의 동물극 관찰(Fig. 31. B)결과 ectoderm 전체에서 세포들중 선택된 세포에서 강하게 발현된다.

3-somite시기가 되면서 forebrain의 특정부위와 midbrain특정부위에서 강한 발현이 관찰되며 (Fig. 31.C) dorsal view의 neuroectoderm에서 motor neuron과 sensory neuron의 전구체로 생각되는 3개의 line으로 발현되는 세포들이 관찰된다.

14-hrs embryo(Fig. 31. D)에서는 이전까지의 non-specific한 발현(Fig.31 A-D)이 점차로 감소하면서 특정한 region에서만 발현이 유지되었다. 18-somite stage(Fig. 4. E)에서 forebrain, midbrain 그리고 primary sensory neuron인 Rohon-Beard neuron에서 발현이 확인되었다.

24 hr과 36 hr embryo에서는 brain의 특정한 부위인 olfactory placode, tectum, r-2 trigeminal ganglion, octic vesicle, 그리고 Rohon-Beard sensory neuron에서 강한 발현을 보였다(Fig. 31. F,G).

또한 이들의 발현을 더 정확하게 확인하기 위하여 24hr embryo를 대상으로 하여 axon surface를 specific하게 detection하는 monoclonal Anti-HNK-1/N-CAM antibody를 이용하여 immunostaining을 수행하였다. 이 결과 in situ hybridization에 의해 확인된 유전자 발현부위를 좀더 정확히 확인할 수 있었다.(Fig. 31. H, I).

24hr 이후의 발현 양상을 관찰하기 위해 33hr 과 36hr embryo들에서 in situ hybridization에 의해 유전자 발현 부위를 조사한 결과 (Fig. 31. J-M) 이 유전자의 발현이 Telencephalon, Tectum, ventral diencephalon region의 Hypothalamus 그리고 VLT(ventral longitudinal tract)에서 특이적으로 발현됨을 관찰 할 수 있었다.

이상의 결과들로 보아 zebrafish neuroilin-like gene인 MG159 clone은 발생초기에서 특정 세포들의 aggregation에 관여하는 cell-cell adhesion molecule로 추정된다. 그리고 발생단계를 거치면서 특정 위치에서만 발현을 함으로 sensory neuron이나 motor neuron의 형성에 필요하며, DM-GRASP류의 protein들의 기능과 유사하게 axonal guidance에도 관여할 것이라고 추정된다.

라. zSFRP5 (zebrafish secreted frizzled related protein)

(1) zSFRP5 유전자의 full-size cDNA의 분리

발생과정 동안 pattern 형성에 영향을 미치는 중요한 요인 중의 하나인 wnt는 frizzled receptor의 ligand로 작용한다고 알려지고 있으며, 특히 frizzled의 cysteine rich domain (CRD)이 wnt와의 결합에 중요하게 작용한다고 보고되어지고

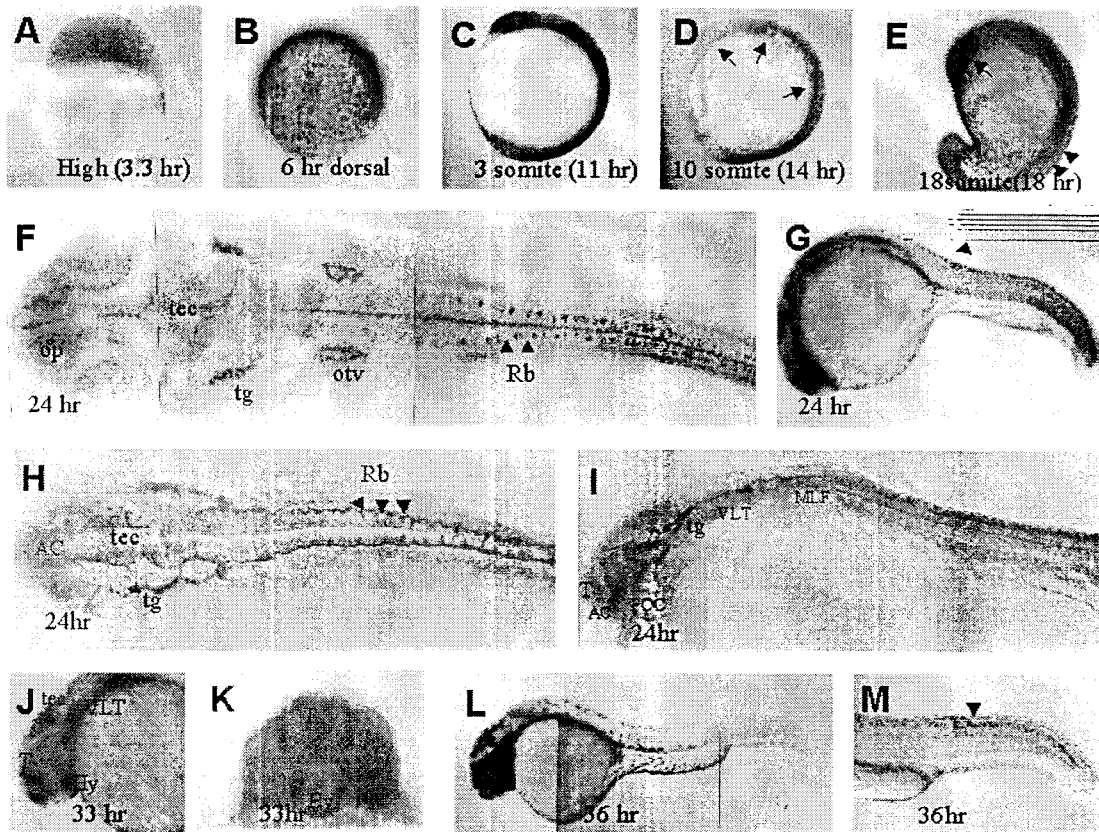


Fig. 31. Spatiotemporal expression patterns of zebrafish neuroilin-like gene(MG159) during developmental zebrafish embryo.

In situ hybridization (except H, I) with the MG 159 Dig-labelled RNA probe and immunostaining (Fig H, I) with anti-HNK-1 monoclonal antibody. (A) Lateral view of high stage shows broad expression. (B) Animal pole view of 6hr embryo, which shows regular scattered cell , highly expressing MG 159. The expression pattern is specified in C, D, E. Arrows indicate specialized region (forebrain, midbrain) and arrow-head indicates Rohon-Beard sensory neuron. (F, G) 24hr-old embryo, MG159 mRNA expression by op(olfactory placode), tec (tectum), tg (r-2 trigeminal ganglion), otv (optic vesicle) , Rb (Rohon-Beard sensory neuron) (H, I) Stained brown color is axonal marker that stained by HNK-1 antibody. AC (anterior commissure) , MLF(Medial longitudinal fasciculus), POC (postoptic commissure) , VLT(ventral longitudinal tract). (J , K) Brain of 33hr embryo, MG159 expressed in Hy (Hypothalamus), VLT, T(Telencephalon), tec. (L, M) Lateral view of 36hr embryo.

있다. 또한 최근에 이 CRD를 가진 다른 종류의 유전자들이 지속적으로 발견되고 있으며, 기능적으로도 중요하다고 여겨지고 있다. 하지만 CRD domain을 가진 여러 유전자들은 발생의 여러 단계에서 공간적으로 서로 다른 위치에서 발현하는 것으로 알려지고 있지만 기능에 대해 확실히 알려진 것은 거의 없다. 따라서 우리는 그전에 선별된 30개의 plaque 중에서 일부를 cloning하여 염기서열을 분석한 결과 human secreted frizzled related protein (hSFRP) 유전자와 유사성을 가진 것으로 확인된 약 1.5kb의 clone(9-2)이 발생 단계에서 중요할 것으로 여겨져, 이 clone에 대한 분석을 하기로 하였다.

Table 6. Alignments of 9-2 clone and human SFRP

A) Nucleic acid alignment of 9-2 clone and human SFRP	
9-2	: 64 gtgtgtccaccctgtgacaacgagttgaaagcgacaccataatggagcactactgcgcc 123
hSFRP	: 852 gtgtgtcctccctgtgacaacgagttgaaatctgaggccatcattgaacatctctgtgcc 911
9-2	: 124 agtgattttgcactcaagatgaaattaaagaggcgaaaaaggaaaaaggcgac 177
hSFPP	: 912 agcgagtttgcactgaggatgaaaataaaagaagtgaaaaaggaaaaatggcgac 965
Sequence homology : 81% (93/114 base pair)	
B) Amino acid alignment of 9-2 clone and human SFRP	
9-2	: 4 DLCIPMQF-SAGHATQTPVSKVCPDNLKADTIMEHYCASDFALXXXXXXXXXXXXXXXXX 180
hSFRP	: 163 DVCIAMTPPNATEASKPQGTTCVCPDNLKSEAIIEHLCASEFALRMKIIEVKKENGDK 222
9-2	: 181 XLIAAQKKKKVLMGILRKKD 243
hSFRP	: 223 KIV--PKKKKPLKLGPIKKKD 241
Sequence homology : 60% (49/80 Amino acid)	

이를위해 우선 9-2 clone의 full-size cDNA를 screening을 수행하였다. 1차 screening에서 6개의 plaque을 선별하여 phage DNA를 추출하여 BamHI으로 digestion한 다음 Southern blot hybridization을 수행한 결과 1.5kb-2kb 정도의 크기를 가진 clone들을 확인하였다. 그 중에서 가장 크기가 큰 clone을 포함하는 phage들로 2차 screening을 하여 phage를 BamHI으로 digestion하여 2kb의 insert가 나오는 것을 확인하고 pSK(+)-의 BamHI site에 cloning하였다. 이 clone의 3' 부분의 염기서열을 확인한 결과 9-2 clone과 동일함을 확인하고 full-size sequencing을 실시하였다.

(2) zSFRP5 full-size cDNA의 염기서열 분석

우선 pSK에 cloning된 zSFRP cDNA의 restriction map을 세우기 위해 여러 제한 효소로 digestion한 결과 대략적인 mapping을 수행하였으며, 그 중 BamH I과 Cla I, Hind III에 의해 잘려진 3개의 유전자 단편들은 각각 0.7kb, 0.8kb, 0.5kb로 다

시 pSK에 subcloning하였다. 이 각각의 subclone들은 자동 염기서열 분석기를 통해 염기분석을 한 후 다시 full-size clone을 deletion을 위한 재료로 사용하여 점진적 deletion mutant를 제조하여 sequencing을 통해 염기서열을 재확인하였다. 하지만 5'쪽에 약 200개 정도의 poly A sequence가 존재하여 정확한 염기 갯수를 확인할 수 없었으므로 여기서는 편의상 5'쪽의 poly A sequence를 제외한 염기서열을 나타내었다. DNA 염기서열 분석 결과는 Fig. 32에서 나타내었으며 start codon인 ATG로 시작하여 stop codon인 TGA로 끝나는 933 bp의 open reading frame을 가짐을 알 수 있었다. 이 유전자의 ORF는 26개의 secretory signal peptide를 포함하며 전체 310개의 아미노산을 coding 하고있었다.

아미노산 aequence 유사성을 비교해 본 결과 Fig. 33과 같이 zSFRP5는 hSFRP5와 77%, mSFRP5와 76%, mSFRP1와 75%, mSFRP2와 62%, mSFRP4와 54%, mSFRP3와 42%의 homology를 나타내었다. 또한 PC gene program을 이용하여 dendrogram으로 근연 상관관계를 확인하여 본 결과 human과 mouse의 SFRP5와 가장 유사함이 확인되었다. 따라서 이 zebrafish SFRP clone은 zSFRP5로 명명하였다.

-72 AAGGATTAACAT

TTAGATTTTAAAATTTTGATTTACACTTACCCCCCGTTCTCCTGAATCACAGCAGAGG
 ATGGCGGAGCTGAAGAGGCAGGTGTCTCTGACCCAGGCTGTGACCCTGGCGCTGTTCTA 60

1 M A E L K R Q V S L T Q A V T L A L V L
 CTCACCTCAGCCTCTTCGGCAGAGGAGTACGACTACTACAGCTGGCAGTCGGACAATTTTC 120

21 L T S A S S A E E Y D Y Y S W Q S D N F
 CACAGCGGCCGCTTCTATGCCAAGCAGCCGAGTGTGTGGATATCCCAGCCGACCTGCGG 180

41 H S G R F Y A K Q P Q C V D I P A D L R
 CTCTGCTACACGTGGGCTACAAAAAGATGCGCCTGCCAAACCTATTGGACCAGGAGACC 240

61 L C Y N V G Y K K M R L P N L L D H E T
 ATGCCTGAGGTCAAGCAGCAGGCTGGCAGCTGGGTGCCGCTTCTAGCAAAGCGATGCCAC 300

81 M P E V K Q Q A G S W V P L L A K R C H
 GCTGACACGCAGGTGTTCCCTCTGCTCACTGTTTGCTCCGGTGTGCCTGGACCGGCCATC 360

101 A D T Q V F L C S L F A P V C L D R P I
 TACCCCTGCAGGTCTCTGTGTGAGGCGGTGCCGGACAGCTGCGCCCCGGTATGGAGACC 420

121 Y P C R S L C E A V R D S C A P V M E T
 TACGGCTTTCCTGGCCGGAGATGCTACAGTGTGAGAAGTTCCTCCATCGATAATGATCTA 480

141 Y G F P W P E M L Q C C E K F P I D N D L
 TGCATTCCTATGCAGTTCTCCGAGGACAGCCACTCAGACTCCAGTTTCCAAAGTGTGT 540

161 C I P M Q F S A G H A T Q T P V S K V C
 CCACCCTGTGACAACGAGTTGAAAGCCGACACCATAATGGAGCACTACTGCGCCAGTGAT 600

181 P P C D N E L K A D T I M E H Y C A S D
 TTTGCACTCAAGATGAAAATTAAGAGGGCGAAAAAGGAAAAAGGCGACCCGAAGCTCATC 660

201 F A L K M K I K E A K K E K G D R K L I
 GCAGCGCAAAAGAAAAAGAAGTTCTGAAAATGGGAATACTGAGAAAGAAAGACCTAAAG 720

221 A A Q K K K K V L K M G I L R K K D L K
 AAGCTCAGCTATACATCAAGAACGGAGCCAACCTGCCCTGCTCACAACCTGGACAACCTA 780

241 K L T L Y I K N G A N C P C S Q L D N L
 GGGAGCAACTTCTCATCATGGGCCGAAAGTAGACCAACAGCTACTGCTCATGTCCATC 840

261 G S N F L I M G R K V D Q Q L L M S I
 CACAAGTGGGACAAAAAGAGCAAGGAACCTCAAGTTGCCATTAATACATCAAGTCTCAG 900

281 H K W D K K S K E L K F A I K Y I K S Q
 CAGTGTCCCACCTATCACAGTGTCTTCCAGTGA 933

301 Q C P T Y H S V F Q -

CCAATGACTTTTTGGAGGTCTTCCAATAACTCTTTCAGAGACTGTATCCATGCCTAATTC
 CGACCATTAGTACAGATGTATTTTACTCAAGAAACGGCTTTTTGGAACTGCTTAGGA
 CTTAATCCATCATCAAGTACAGCTACGTTCTGTTGGCAACTGTATCTGCATAAAAAGTTA
 TTGTTTATGAAGCAATCAGCACACTTACGATACTCATGCATATATTTAGGGAACTTTC
 CTGGTTCAGACTACAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAAGACATTGACGACCC
 TTTCAATCAACGTAAGAGAAAATTTGAACAAAAGCTTTAAAGTTAATGAGCACATATTT
 GATTCAGTGGCCAGATTCCATTTAAAAGAGTGA AAAAGAGCAAACATGGTGCCAACCTG
 GGTTTTATTTGTATCTTCTATTTGTAGATAAGGAATAAAAAGTTTTTTATTATATACCAC
 ATTGACACAATCGTGATCATTAGCACCAGATTGGGACATAACTCGGGTTGTGGCTTGAAT
 CTTGGGAGGTAAGACAGCTGATGGATTGAAAAGTGTGGTCAGGATGGCAGCCCAAATAC
 ATCAACCGCAGGCCAGTGAGCAAGTCTGGACAATATCATATTGGCCGAGCTCATGACAGA
 CTATGGACTCGTTCGAGCAGTTGGTTGGTGAGGTGTTTCTATTCTGCTTCTATACAGT
 ATGCAACTGTGTTTTCTTTTTTACCAAAGTTATTATATATTGCTACAAACCTATGTACAG
 TACATGGTATGAAAAGAGCCTTCCAACATTTTCATCTGACTGTAATAAAGGATAACATTC
 AAAAAAAAAA 1782

Fig. 32. Nucleotide and deduced amino acid sequence of SFRP5 cDNA for zebrafish. The entire nucleotide and deduced protein sequences are shown. Nucleotide numbers are indicated on the right. Amino acid sequences are indicated on the left.

(A)

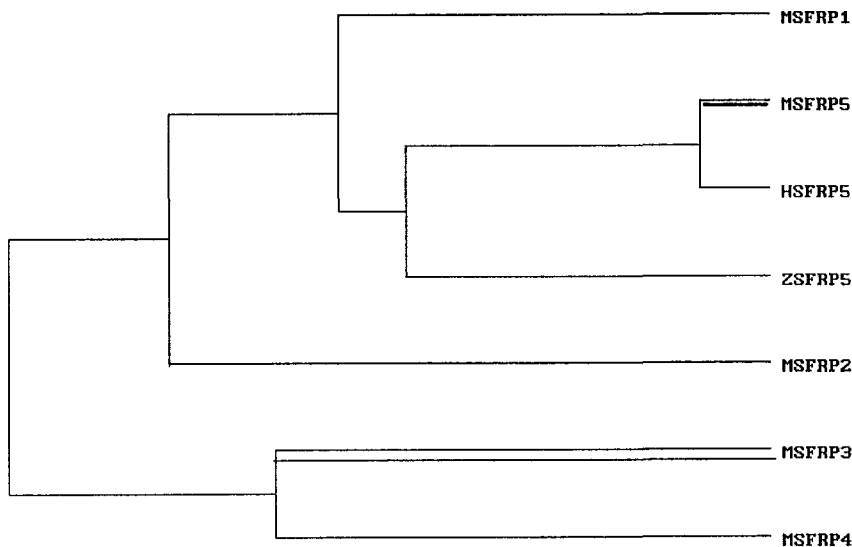
MSFRP1	MGVGRSARGRGAASGVLLALAAALLAAGSASEYDYVSF-QSDIGSYQSG	49
MSFRP2	M-----PRGPASLLLLVLASHCCLGSARGL---FLFG-QPDFS-----	34
MSFRP3	M--VCCGPGRMLLGWAGLLVLAALCL-----LQVP-G-----	29
MSFRP4	M--LRS-----ILVALCL-----WLRLALG-----	18
MSFRP5	MWVAWSA---RTAALALLLALHG--APTRGQEYDYYGW-QAE--PLH-G	41
HSFRP5	MRAAAAAGGVRTAALALLLALHG--APARCEEYDYYGW-QAE--PLH-G	44
ZSFRP5	MAELKRQVSL-TQAVTLALVLLTS--ASS-AEEYDYYSW-QSD--NFHSG	43
	*	
MSFRP1	RFYTKPPQCVDIPVDLRLCHNVGYKKMVLPNLLEHETMAEVKQQASSWVP	99
MSFRP2	--Y-KRSNCKPIPANLQLCHGIEYQNMRLPNLLGHETMKEVLEQAGAWIP	81
MSFRP3	---AQAAAC--EPVRIPLCKSLPWNMTKMPNHLHHSTQANA ILAMEQFEG	74
MSFRP4	---VRGAPC--EAVRIPMCRHMPWNI TRMPNHLHHSTQENA ILAIEQYEE	63
MSFRP5	RSYSKPPQCLDIPADLPLCHTVGYKRMRLPNLLEHESLAEVKQQASSWLP	91
HSFRP5	RSYSKPPQCLDIPADLPLCHTVGYKRMRLPNLLEHESLAEVKQQASSWLP	94
ZSFRP5	RFYAKQPQCVDIPADLRLCYNVGYKKMRLPNLLDHETMPEVKQQAGSWVP	93
	. . * . . . * . . . * * *	
MSFRP1	LLNKNCHMGTQVFLCSLFAPVC-LDR---PIYPCRWLCEAVRDSCEPVMQ	145
MSFRP2	LVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVC-LDDLDETIQPCHSLCVQVKDRCAPVMS	130
MSFRP3	LLGTHCSPDLLFFLCAMYAPICTIDFQHEPIKPKSVCERARQGCEPILI	124
MSFRP4	LVDVNCSSVLRFFLCAMYAPICTLEFLHDPKPKSVCQRARDDCEPLMK	113
MSFRP5	LLAKRCHSDTQVFLCSLFAPVC-LDR---PIYPCRSLCEAARAGCAPLME	137
HSFRP5	LLAKRCHSDTQVFLCSLFAPVC-LDR---PIYPCRSLCEAVRAGCAPLME	140
ZSFRP5	LLAKRCHADTQVFLCSLFAPVC-LDR---PIYPCRSLCEAVRDSCAPVME	138
	*. * **...**.* . . * ** . * . . * . * . .	
MSFRP1	FFGYFWPEMLKCDKFP--EGDVCIA-----MTPPNTTEASK	179
MSFRP2	AFGFPWPDMLECDRFPQ--DNDLCIP-----LASSDHLIPAT	165
MSFRP3	KYRHSWPESLACDELVPYDRGVCISPEAIVTA-----DGADFPMD	165
MSFRP4	MYNHSWPESLACDELVPYDRGVCISPEAIVTDLPEDVKWIDITPDMVQE	163
MSFRP5	AYGFPWPEMLHCHKFPL--DNDLCIA-----VQFGHLPATAP	172
HSFRP5	AYGFPWPEMLHCHKFPL--DNDLCIA-----VQFGHLPATAP	175
ZSFRP5	TYGFPWPEMLQCEKFP I--DNDLCIP-----MQFSAGHATQT	174
	. ** . * . * . . . ** .	
MSFRP1	PQGTTCVCP-----CDNELKSE-AIIEHLCASEFALRMKIKEVKKENG	221
MSFRP2	EEAPKVCEA-----CKTKNEDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINR	208
MSFRP3	ST--GHCARGASSERCKCPVVRTKQTYFRNNYN--YVIRAKVKEVKM-K-	209
MSFRP4	RSFDADCKRLSPDRCKCKKVPKPTLATYLSKNYS--YVIHAKIKAVQR-SG	210
MSFRP5	P-VTKICAQ-----CEMEHSAD-GLMEQMCSSDFVVKMRIKEIKIDNG	213
HSFRP5	P-VTKICAQ-----CEMEHSAD-GLMEQMCSSDFVVKMRIKEIKIENG	216
ZSFRP5	P-VSKVCP-----CDNELKAD-TIMEHYCASDFALKMKI KEAKKEG	215
	* * *	
MSFRP1	DKKIVP--KKKPLKLGPIKKKELKALVFLKNGADCPCHQLDNL SHNFL	269
MSFRP2	DTKI ILETKSKTIYKLNVSERDLKKSVLWLKDSLQCTCEEMNDINAPYL	258
MSFRP3	CHDVTAVVEVKEILKASLVN---IPRDTVNLYTTSGCLCPPLT-VNEEYV	255
MSFRP4	CNEVTTVVVDVKEIFK-SLSP---IPRTQVPLITNSSCQCPHIL-PHQDVL	255
MSFRP5	DRKLI GAQKKKKLLKAGPLKRKDTKKLVLHMKNAGSCPCPQLDNL TGSFL	263
HSFRP5	DRKLI GAQKKKKLLKPGPLKRKDTKRLVLHMKNAGSCPCPQLDSL AGSFL	266
ZSFRP5	DRKLI AAQKKKKVLMGILRKKDLKLLTLYIKNGANCPCSQLDNLG SNFL	265
	. . . * * * * .	
MSFRP1	IMGRKVK--SQYLLTA-----IHKWDKKNKEFKNFMKRMKN	303
MSFRP2	VMGQKQG--GELVITS-----VKRWQKQREFKRISRIRK	292
MSFRP3	IMGYEDEERSRLLLVEGSAIEKWDRLGKVKRWDMKL-----RH	295
MSFRP4	IMCYE--WRSRMMLLENCLVEKWRDQLSRRSIQWEERLQEQQRTIQDKKQ	303

MSFRP5	VMGRKVE--GQLLLTA-----VYRWDKKNKEMKFAVKFMFS	297
HSFRP5	VMGRKVD--GQLLLMA-----VYRWDKKNKEMKFAVKFMFS	300
ZSFRP5	IMGRKVD--QQLLLMS-----IHKWDKKSSELKFAIKYIKS	299
	. * *	
MSFRP1	HECPTFQSVF-----K-----	314
MSFRP2	LQC-----	295
MSFRP3	LGLGKTDASDSTQNQKSGRNSNPRPAR-----S	323
MSFRP4	IASRTSRTSRSNPPKSKGRPPAPKASPKNKIKARSAPKKSNLKKSAS	351
MSFRP5	YPCSLYYPFFYGAAEPH-----	314
HSFRP5	YPCSLYYPFFYGAAEPH-----	317
ZSFRP5	QQCPTYHSVF-----Q-----	310

Fig. 33. (A) Multi-alignment of amino acids of zSFRP5 with mSFRP1, mSFRP2, mSFRP3, mSFRP4, mSFRP5, and hSFRP5.

The deduced amino acid sequences of mSFRP1, mSFRP2, mSFRP3, mSFRP4, mSFRP5, hSFRP5 and zSFRP5 were aligned using PC/GENE software. Spaces inserted for the best alignment purpose are indicated by hyphens. '*' indicates perfectly conserved amino acid sequences, and '.' indicates well conserved amino acid sequences. The amino acid numbers were indicated on the right side. mSFRP1 ; mouse secreted frizzled related protein 1, mSFRP2 ; mouse secreted frizzled related protein 2, mSFRP3 ; mouse secreted frizzled related protein 3, mSFRP4 ; mouse secreted frizzled related protein 4, mSFRP5 ; mouse secreted frizzled related protein 5, hSFRP5 ; human secreted frizzled related protein 5, zSFRP5 ; zebrafish secreted frizzled related protein 5.

B)



Dendrogram of the alignment.

(B) Dendrogram of SFRPs. zSFRP5 is the most similar with hSFRP5.

(3) zSFRP5의 시간적, 공간적 발현 양상 분석

pSK(+)/BamH I 에 cloning 되어 있는 약 2kb의 zSFRP5 유전자는 5'쪽의 약 200개 정도의 poly A sequence 때문에 바로 *in vitro* transcription할 수가 없었다. 따라서 zSFRP5 유전자에서 개시 codon을 포함하면서 5'쪽의 poly A sequence를 제거한 새로운 construct를 만들어 *in vitro* transcription을 수행하였다. 이 새로운 construct는 5'쪽의 primer인 cgggatacctctcctgaatcacagcag (underline is BamH I site)과 3' 쪽의 primer인 T3 universal primer를 이용하여 PCR을 한 후, PCR product를 BamH I으로 digestion하여 pSK(+의 BamH I site에 cloning하였다. PCR된 zSFRP5 유전자의 size는 약 1.8kb로 이후로는 zSFRP5P로 명칭하였다. zSFRP5P를 이용하여 *in vitro* transcription시켜서 DIG-labelled RNA를 만들어 whole mount *in situ*의 probe로 사용하였다. Hybridization은 65°C에서 O/N 수행하고 probe washing을 0.2%SSC로 70°C에서 한 시간동안 하여 stringency를 높이고 염색 시간을 짧게 하여 background 생성을 줄였다. 그 결과 후기 gastrula 상태에서까지는 staining이 되지 않으며 neurulation이 시작하는 10시간이후부터 staining되어지는 발현 양상을 보이고 있다.

zSFRP5의 발현 양상을 살펴보면 11시간(3-somite stage) embryo의 dorsal neural tube에서 점차 발현하여(data not shown), 12시간(6-somite) embryo(Fig. 34. A)에서 neural tube의 anterior(미래의 forebrain)와 dorsal 부위에서 부분적으로 발현함을 관찰할 수 있다. 14시간(10-somite stage) embryo(Fig. 34. B)에서는 dorsal 부위의 발현 위치가 분리되어 3개이상의 band로 이루어져 있음을 확인할 수 있고, 특히 anterior 부위에서 staining이 진하게 되는 것으로 보아 zSFRP5의 발현이 증가함을 추측할 수 있다. 이러한 양상은 zSFRP5의 발현이 neurula stage동안의 brain의 구조 형성에 작용함을 추측할 수 있다. 18.5시간(19-somite stage) embryo(Fig. 34. C)에서는 forebrain의 말단 부위, optic stalk, optic placode, fore-midbrain boundary, rhombomere 1, 3, 5 등에서 발현되고 있으며 특히, rhombomere에서는 ventral side에서 발현되고 있다. rhombomere 1, 3, 5의 발현은 같은 stage의 embryo를 zebrafish pax A와 pax B를 marker로 사용하여 *in situ* hybridization 한 결과와 비교하여보면(Fig. 34. F, G, H, I, K, L, M, N.) brain 구조 중 특이하게 mid-hindbrain boundary에서 zSFRP5가 발현하지 않음을 관찰할 수 있다. Mid-hindbrain boundary(MHB)의 위치를 결정하기 위해 MHB의 marker인 pax B와 함께 zSFRP5를 double *in situ* hybridization하여 zSFRP5의 공간적 발현 위치를 비교 확인하였다(Fig. 34. J, O.). 또한 Fig. 34. D에서 보면 zSFRP5가 눈이 형성되는 위치인 optic placode와 optic stalk에서 넓게 발현함을 관찰할 수 있으며, 다른 SFRP 유전자들도 눈의 여러 층에서 각각 다르게 발현된다는 최근 보고들을 종합해보면 이 zSFRP5도 역시 눈 형성과 관련이 있음을 추측할 수 있다.

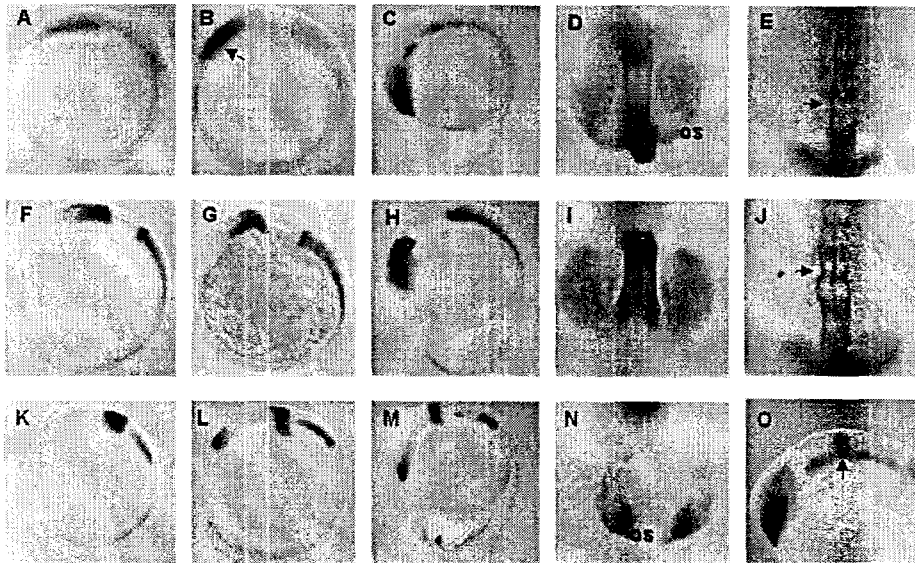


Fig. 34. Spatiotemporal expression patterns of zSFRP5 during early development (A, B, C, D, E.). The regions of zSFRP5 expressions were stained by blue color. Pax A is indicated at F-I, and pax B is indicated K-N. A, F, and K are 12hr(6-somite) stage. B, G, and L are 14hr(10-somite) stage. C-E, H-J, and M-O are 18.5hr(19-somite) stage. J and O were stained by zSFRP5 and pax B with double in situ hybridization. (B) The arrow is anterior neural tube. (E), (J) and (O) The arrows indicate MHB and not stained in (E). os : optic stalk.

마. *Drosophila* ELAV-type RNA binding protein인 Hu family 유전자의 분리 및 발현양상분석

지금까지 발생에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 발생관련 유전자들의 발굴 및 이들의 기능에 대한 연구는 *Drosophila*와 *C. elegans*, 그리고 zebrafish와 같은 model 동물들을 이용한 mutagenesis에 의한 mutant의 분석을 통하여 주로 이루어져 왔다. 이러한 발생관련 돌연변이에 관여하는 유전자들의 발굴과 이들 유전자들의 분자생물학적 연구는 발생관련 유전자들에 의한 발생조절 mechanism의 연구에 커다란 공헌을 하였다. 이러한 발생관련 유전자들중 한 family로서 RNA recognition motif(RRM) 이라 불리는 conserved domain을 가지는 RNA binding protein들은 발생과정에서 RNA metabolism을 조절함으로써 중요한 기능을 수행하고 있다. 이러한 RRM motif를 가지는 RNA binding protein들은 RNA processing, RNA transport 그리고 translation등의 post transcriptional regulation에 관여하는 것으로 알려져 있다(Burd *et al.*, 1994). 이러한 발생에 관여하는 RNA binding protein들 중에서 특히 신경세포에 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 RNA binding protein은 신경세포의 발생 및 분화, 유지에 필수적으로 요구되어지는 중요성으로 인하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

가장먼저 발견된 신경세포 특이적인 RNA binding protein은 발생관련 연구에 있어서 가장 많이 사용되온 model 동물인 *drosophila*에서 밝혀진 elav(embryonic lethal, abnormal visual system) protein으로서 이 유전자는 X chromosome에 존재하는 normal neural development에 필수적인 locus로서 이들의 mutation은 embryonic lethality를 유발하며 또한 genetic mosaic mutant에서 정상적인 눈의 형성을 저해함으로써 embryonic lethal, abnormal visual system (Elav)라고 명명되었다(Campos *et al.*, 1985). 이후의 연구에서 그 발현이 embryo나 adult eye, 그리고 developing optic lobe에 국한되지 않고 embryo, larvae, pupae and adults에 이르기까지 발생의 전반에 걸쳐서 central nervous system과 peripheral nervous system에서 특이적으로 발현되며 neuronal progenitor cell인 neuroblast나 glial cell에서는 발현되지 않음으로서 이들은 초기 neuron의 형성과 mature neuron의 분화 및 유지에 필수적인 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. (Jimenez *et al.*, 1987, Robinow *et al.*, 1988a). Elav 유전자는 두 개의 ribonucleotide consensus sequence(RNP1, RNP2)를 각각 세 copy 가지고 있으며(Robinow *et al.*, 1988b), 이러한 RNP1, RNP2 motif는 이전에 밝혀진 다른 RNA binding protein들에 존재하는 것과 같은 방식으로 배열되어있는 것으로 인하여(Adam *et al.*, 1986) 이들의 기능이 신경세포에서의 RNA metabolism에 관여하는 것으로 추정된다.

인체에서는 지금까지 HuR/HuA(Ma *et al.*, 1996), Hel-N1(Levine *et al.*, 1993), HuC(Sakai *et al.*, 1994), HuD(Szabo *et al.*, 1991)의 4종류의 elav homolog 유전자들이 밝혀져 있다. 이들중 Hel-N1과 HuC 그리고 HuD는

paraneoplastic encephalomyelitis(PEM), paraneoplastic sensory neuronopathy(PSN), 그리고 small-cell lung cancer를 가진 환자의 serum에서 central nervous system과 peripheral nervous system에서 발현되는 protein과 immunoreactivity를 가지는 autoantibody를 통하여 확인되었다. 이러한 환자들의 serum에서 발견된 autoantibody를 이용하여 human cDNA cerebellar library를 screening 하여 발견된 이들 antigen protein들은 Hu antigen이라 명명되었으며 모두 drosophila의 Elav homolog로서 세 개의 conserved RNA recognition motif(RRM)를 가지며 서로간에 86% - 90%의 sequence homology를 가지는 것으로 밝혀졌다. PEM과 PSN등의 neurologic syndrom에서 Hu antigen들에 대한 autoantibody가 형성되는 이유와 small-cell lung cancer와 paraneoplastic neurologic syndrom과의 상관관계, 그리고 Hu-antigen들에 대한 autoimmunity가 PEM과 PSN을 유발하는 직접적인 원인인지에 대해서는 아직까지 밝혀져 있지 않으며 현재 많은 연구가 진행되고 있다.

*Drosophila elav*의 human homolog인 이들 Hu antigen protein들 중에서 Hel-N1, HuC, 그리고 HuD는 Elav와 마찬가지로 neuron specific RNA binding protein으로 작용하며, 이들은 신경세포에서 cell growth와 proliferation을 조절하는 c-Myc, c-Fos 그리고 Id repressor의 mRNA의 3'-UTR에 존재하는 AU-rich element(ARE)에 선택적으로 결합하여 이들의 stability를 조절한다(Levine *et al.*, 1993). 이에 비추어 볼 때 이들 Hu-antigen family역시 target 유전자들의 mRNA stability를 조절함으로써 neuron의 분화와 mature neuron의 유지기능을 담당하는 것으로 생각된다. HuR/HuA의 경우에는 신경세포 뿐 아니라 모든 세포에서 ubiquitously 하게 발현되는 RNA binding protein으로 다른 Hu-antigen들과는 다르게 신경특이성을 나타내지 않으며, 최근의 연구결과에 의하면 HuR/HuA는 세포의 증식에 관여하는 유전자들중에서 Myc, Jun 그리고 Fos등의 protein을 만드는 early-response 유전자들의 mRNA의 3'UTR에 존재하는 ARE sequence에 결합하여 이들의 stability를 조절하는 것으로 밝혀졌다.

Human 이외의 animal에서는 mouse와 Xenopus 그리고 zebrafish에서 각각 4종류의 elav homolog 유전자들이 존재하며, 이들은 HuA, HuB, HuC, HuD (HuA=HuR, HuB=Hel-N1, HuC, HuD)라 명명되었고 이들 역시 모두 세개의 conserved sequence인 RNA recognition motif(RRM)를 가지는 RNA binding protein으로 작용한다(Good, 1995).

그러나 발생에 있어서 유전자들의 발현 시기 및 발현양상은 이들의 기능에 대하여 매우 중요한 정보들을 제공함에도 불구하고 이들의 기능연구는 주로 세포수준에서 연구되어왔으며, 아직까지 발생과정에서 이들 Hu family 유전자들의 발현 시기나 발현양상이 정확하게 규명된 바는 없다. Mouse와 chicken에서 이들의 발현양상이 서로 비교, 확인되었으나 이는 이들 model 동물들이 가지는 발생연구의 한계점으로 인하여 모두 neurulation이 끝난 이후의 발생단계에서 이루어졌으므로 초

기발생에서의 발현양상은 아직 밝혀지지 않았다. 그러므로 다른 어떤 동물들보다 초기 발생에 관한 유전자들의 연구에서 커다란 장점을 가지는 zebrafish에서 이들 Hu family 유전자들을 분리하였으며 또한 이들의 초기발생과정에서의 발현시기 및 발현양상을 확인하였다.

(1) HuA, HuG, HuC 그리고 HuD의 단백질 염기서열 비교

이미 알려진 HuC 유전자를 probe로 사용하여 low stringency plaque hybridization을 수행하여 zebrafish에서 아직까지 분리되지 않은 HuA(Fig. 35.), HuG(Fig. 36.) 및 이미 분리되어 sequence가 알려진 HuD 유전자의 full-size cDNA를 분리하여 이들의 유전자 및 단백질 염기서열을 확인하고 이들 단백질들 사이의 homology를 비교하였다. Screening하는 과정에서 HuB 유전자는 분리되지 않았으나, 아직까지 알려지지 않은 새로운 Hu family 유전자인 HuG가 분리되었다. Fig. 37.에서 보는바와 같이 이들은 서로간에 매우 높은 sequence homology를 가지는 것으로 확인되었다.

```

          10      20      30      40      50      60      70
          |      |      |      |      |      |      |
1  GGCACGAGGTTTCATTCATCTGCAGATTCGGAGAGACGTTGAAGTCGGAGGTGTACGACATGTCGAACGGT
71  TACGAAGACCACATGGCCGATGAGCTCATCGACTCCAAAACCAACCTTATCGTCAACTACCTGCCACAGA
141 ATATGAGCCAGGATGAGCTGCGGAGTCTCTTCAGCAGCATTTGGGAGGTGGAGTCTGCCAAACTTATCCG
211 AGACAAAGTAGCAGGCCACAGTTTAGGGTACGGATTTGTTAACTATGTTAAACCCTAATGATGCAGAAAAGA
281 GCAATCAGTACTCTCAATGGACTGAGACTACAGTCTAAAACCTATCAAGGTGTCATATGCCAGGCCAAGCT
351 CTGACTCCATCAAGGATGCTAATCTTTACATCAGTGGGCTGCCTAAAACAATGACACAAAAGGATGTTGA
421 AGAAATGTTCCGACGTTATGGTCGAATAATCAACTCCCGTGTACTTGTGATCAGGCATCAGGACTCTCT
491 CGTGGTGTGGCTTTTCATTCGATTTGACAAAAGGGCAGAGGCAGAGGACGCAATCAAGGACTGAAATGGAC
561 AAAAACACCAGGCGCTGCTGAGCAGATGACTGTGAAGTTTGCAGCCAGTCCCAACCAAGTAAAAACAC
631 ACAAGTTATCCCCAGGTGTATCACCAACAGTCTCGCCGCTTTGGAGGACCCGTCCACCACCAGGCCAG
701 AGATTCAGGTTTTCTCCGATGAGCGTGGACCACATGAGCGGCATGTCTGGTGTAAACGTGCCTGGAAACT
771 CTTATCAGGCTGGTGCATCTTCACTACAACCTTGGGCCAGGACGAGATGAGGGCATTCTGTGGCAGAT
841 GTTCGGGCCCTTCGGCGCAGTCAAAAACGTCAAAGTTATCCGTGACTTCAACCAACAAGTGCAAAGGA
911 TTTGGGTTTGTACCATGACACACTACGAAGAGGCCGCCATGGCTATCGCCAGTCTCAACGGCTACCGTC
981 TCGGGGACAAGATTTTACAAGTGTCAATCAAAAACAAGCAAGTCGCACAAGTAGAAAGCAGGGTTTGCCCTG
1051 CAAAATGAAGGAGAGAGGGGGGGAGGAAGGGAGGGTTTTTTCTGCGATGCCAGAGAAATTGGCAGTTTTG
1121 AAAAATATTATTTTAGTGTATAATCAAGTCTTTGCAAATGTTACGTTTTCTCAGTCTCGTTTAGACAT
1191 CTGTTTGACAGGTTATTTTGTCTTTTAAAGATTTAAGCTGTTTGATGCTTCAAATTCAGTGTTTTAG
1261 GTGTTCTGGTAAATCCCAATATTTGACCAATTTCCGATTTGATAAAAAATTTATCTCCGATGTTAGCCTGA
1331 TATTGTTGCTACGTGCCATATGTGGTCGGACGCCTCATTCCGCCAGATGCTGGATTTAAAACCTGAGATTT
1401 TAAGTTTTTTAATCTTTCCGCCAGTATGTACACCTACATTTGTTCTTCAGTATCTACAATGCCTTAATTTG
1471 ATGACGGTTGCTCTTTGCTCTCAATAATGTAGCACTTTTTGGTTTGGCAGGAAGCTCCTTGCTCATCT
1541 CACAACAGATCATTGTTCAATTAATAACCGAGTTTTAAATCCAGCATGCTGAGTGTTCACAGAAAAGAA
1611 GAGAGGCAGTGGTAAAGGAACCCGAGTGTCTATGAAATGCCTGTTGTCAGTGAGGGGAAAGTCTTAACT
1681 AACGTGTTACTTGTGTTGTAAGGGACCCCTCTGAAAAGACTGATATCTTAGAAGGACCAAAGACATGAATG
1751 GAAAGTTTAGTTTTCTCCCGTCAAGAGTGCAGCTTGACACATCTCTGAGCATATTCCAAAAATATATTTGG
1821 ACATGTTAAACTAGTACTGAGTATTTATGTAATAATGTTATTACATTTGAGCATCAGCATCTTCTGTT
1891 TATGGTTGATTTTTTTGTTTTTTTCTCTAGAGTAAAAACTACTTTGAGTTTAGTTTGGTCTTTTGG
1961 AAAATAGATATACAGTACTAATGTGTATGCTTTTTAAGACTGCCTGTGATTTAATTTTGTGTTGTTCCA
2031 TTTAGTTTTTTTCTTTTTGTTAATTTGCTTTTGTCTTTCTTTTGAACCTTTCTTTTTGTTTCACAT
2101 GGCATTACAATCATTAAATTTTATTTGCTTTTGGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 35. Full-size cDNA sequence of zHuA gene

```

          10      20      30      40      50      60      70
          |      |      |      |      |      |      |
1  TTGGACTGGTTAGGATTCGCAGCAAACCTTGACTGTGATCGGTTTCAGAGGCTCCAGATGGCTTAGACCCAT
71 TTAGATCTTTAATAGCTTCCTCTGCTTCAGACCTCTTATCAAAACGAATAAATGCAACTCCGCGTGATAG
141 ACCTGATGCCTGATCAACCAGTATGCGGGAGTTTATGATGCGACCATACTGGGTGAACATGTCCTCCACA
211 TTCTTCTGTGCATGGTCTTAGGTAACCAGTGTACAGGTTGGCATCTTTGATGCCGTCAGAGCTTG
281 GCGGGGCATATGAGACCTTGATCGTTTTAGACTGTAGTCTCAGGCCATTGAGTGTATTGATTGCCCTTTC
351 TGCATCACTAGGGTTAACATAGTTAAACAAATCCGTACCCTAACTGTGGCCTGCCATCTTGTCTCTAATG
421 AGTTTGGCTGACTCCACCTCTCCAATGCTGCTGAAGAGACTCCGAAGTTCCTCCTGACTCATATTCTGGG
491 GTAGGTAGTTGATGATCAGGTTGGTTTTGGCATCACTGGCTCATCGCCATGGGGTCCCTATAACCAATT
561 CGGCATATCGTATACTTCCTGCTTTATTGAGCTGGCACCCTTGTGAGAGTCTCTGTCATTACCTGGTTC
631 TGAACCTCACAAACTTCAAATACCTTATGTGTCCTCTTCTGACGGCCATGTAGACACTTACAGCTTAT
701 AATGTTCACTAATCCACGGGACTTCTTCTTCTAATGATATTTTATGGCAGATGGCAAACCCACTTTC
771 ACGGATCCGCGGCCGCGGGATCCGCGGCCGGAATTCACAGCTTCTGTCTCAGTGTACCACTACTCAG
841 TCTCGACGATTTGGAGGGCCTGTTTCATCACCAGCCACAGCGCTTCAGGTTTTACCTATGAGTGTGACC
911 ACAGTGTCTCTAGTATGAATGTGGCAAGCAGCTCCTCCTCAGGATGGTGTATCTTTGTCTATAATTTGGG
981 TCAAGATGCAGATGAAGGGATCCTTTGGCAGATGTTGGTCCATTTGGTGTGTACCAATGTCAAGGTC
1051 ATACGTGACTTTAATACCAGCAAATGCAAAGGGTTTGGGTTTGTACCATGACAAACTATGAGGAGGCAG
1121 CAATGGCCATTTCCAGCCTGAATGGATACCGCCTGGGAGACAAAGTCCCTCAAGTGTCAATCAAATCCAG
1191 CAAATCTCACAAAGTAAAGAGGCTATTTCTTTTTTTTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTAGTTTTCTGAAC
1261 TCAAAGATCTGAAAATTAATGGTGTCTTTTGATGTCTGCAGTTTTTTTTTTACATTATAAACGCTTTTAT
1331 TGAAGTGAATAGGTTTGTGTTAGTGTTTTTTAGTGTGAGTAACAAATTGAATATTGCAAAAGTAACTT
1401 GTCCTGATGCCTAACATTGCTAGGACTTAAAAGCACTGACAAATCAAAGGATCAGTCTTGGTGTCCATT
1471 GTTTTTAGTTGGTATAAACTACACATCTGCACATTCTCCATGTTTGTATACAGAAATCACTTCTCAGTG
1541 TTCATGTTTGTACCTTTAAGGTATAAGAAGTTGGTGTAAACTAAATGACTTAAAGTGTTCAGTTTCC
1611 TGTATGGAAGTATTTTTTAAACATTAATTTTTTTTAACTAAGGTGTTTTGTCCCTCAGTGCAATTTA
1681 TATTTTTAGTCAAAAATTAGTTTGAAGTCTCTCACACCACCTCCACCTCACCCAAAATTACCAGCTA
1751 CACTGATTTATTTATTTTTTTCCCATGTAGAAGTGAAT

```

Fig. 36. Full-size cDNA sequence of zHuG gene

HUAPROTEIN	MS-----NGYEDHMADE	12
HUGPROTEIN	MAVRRGHIRYLKVCEVQNQGNDRSDSHKGASSIKQEVYDMPNGYEDPMGDE	50
HUCPROTEIN	MVTIISTME----TQVSNGPSGTSLPNGPV-----ISTNGATD	34
HUDPROTEIN	M--IISNME----PQVTNGPNSAT-ANGPSSNSRSC---PSPMQTGGSD	40
	*	
HUAPROTEIN	LIDSKTNLIVNYLPQNMSQDELRSLFSSIGEVEAKLIRDKVAGHSLGYG	62
HUGPROTEIN	PSDAKTNLIINYLPQNMSQEELRSLFSSIGEVEAKLIRDKMAGHSLGYG	100
HUCPROTEIN	--DSKTNLIVNYLPQNMTQEEFKSLFGSIGEIESCKLVRDKITGQSLGYG	82
HUDPROTEIN	--DSKTNLIVNYLPQNMTQEEFRSLFGSIGEIESCKLVRDKITGQSLGYG	88
	*.*****.*****.*.*.***.****.* * *.***.*.*****	
HUAPROTEIN	FVNYVNPDAERAISTLNGRLQSKTIKVSYPSSDSIKDANLYISGLP	112
HUGPROTEIN	FVNYVNPDAERAINTLNGRLQSKTIKVSYPSSDGIKDANLYISGLP	150
HUCPROTEIN	FVNYVDPNDADKAINTLNGRLQTKTIKVSYPSSASIRDANLYVSGLP	132
HUDPROTEIN	FVNYIDPKDAEKAINTLNGRLQTKTIKVSYPSSASIRDANLYVSGLP	138
	.*.*.*.*.**.*.*****.***.*.*****.***	
HUAPROTEIN	KTMTQKDVEEMFGRYGRIINSRVLVDQASGL---SRGVAFIRFDKRAEAE	159
HUGPROTEIN	KTMTQKNVEDMFTQYGRINSRILVDQASGL---SRGVAFIRFDKRSEAE	197
HUCPROTEIN	KTMSQKDMEQLFSQYGRITSRILVNQVTGI---SRGVGFIRFDKRNEAE	179
HUDPROTEIN	KTMTQKELEQLFSQYGRITSRILVDQVTGPTGGSRGVGFIRFDKRIEAE	188
	.*.*.*.*.**.*.*.*.*.*.***.*****.***	
HUAPROTEIN	DAIKDLNGQKPPGAAEQMTVKFAASPNQVKNTQVIPQVYHQSSRRFGGPV	209
HUGPROTEIN	EAIKDLNGSKPSGASEPITVKFAANPNQSKNSQLLSQLYHTQSSRRFGGPV	247
HUCPROTEIN	EAIKGLNGQKPLGAAEPITVKFANNPSQKTGQALLTQLYQTAARRYTGPL	229
HUDPROTEIN	EAIKGLNGQKPSGAAEPITVKFANNPSQKTSQALLSQLYQSPNRRYPGPL	238
	.***.*** ** **.*.*****.*.*. . . . *.*. . . **.*.	
HUAPROTEIN	HHQAQRFR-----FSPMSVDHMSGSGVNVPGNSSSGWCIFI	246
HUGPROTEIN	HHQPQRFR-----FSPMSVDH--SVSSMNVASSSSSGWCIFV	282
HUCPROTEIN	HHQTQRFRLDNLLNASYGVKRFSPITIDSMTSLAGVNLTGPTGAGWCIFV	279
HUDPROTEIN	HHQAQRFRLDNLLNMAYGKRFSPITIDSMTSLVGMNIPGHTGTGWCIFV	288
	. ** **.*.*****.*.*. . . . *.*. . . *****.	
HUAPROTEIN	YNLGQDADEGILWQMGFPGAVTNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTNYEEA	296
HUGPROTEIN	YNLGQDADEGILWQMGFPGAVTNVKVIRDFNTSKCKGFGFVTMTNYEEA	332
HUCPROTEIN	YNLSPEADESVLWQLFGFPGAVTNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTNYDEA	329
HUDPROTEIN	YNLSPDSDESVLWQLFGFPGAVNNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTNYDEA	338
	. . . **.*.**.*****.*.*****.***.***	
HUAPROTEIN	AMAIASLNGYRLGDKILQVSFKTSKSHK-	324
HUGPROTEIN	AMAISSLNGYRLGDKVLQVSFKSSKSHK-	360
HUCPROTEIN	AMAIASLNGYRLGDRVLQVSFKTSKQHKA	358
HUDPROTEIN	AMAIASLNGYRLGDRVLQVSFKTNKTHKS	367
	.**.*.*****.* **	

Fig. 37. Protein sequence alignment of Hu protein family.

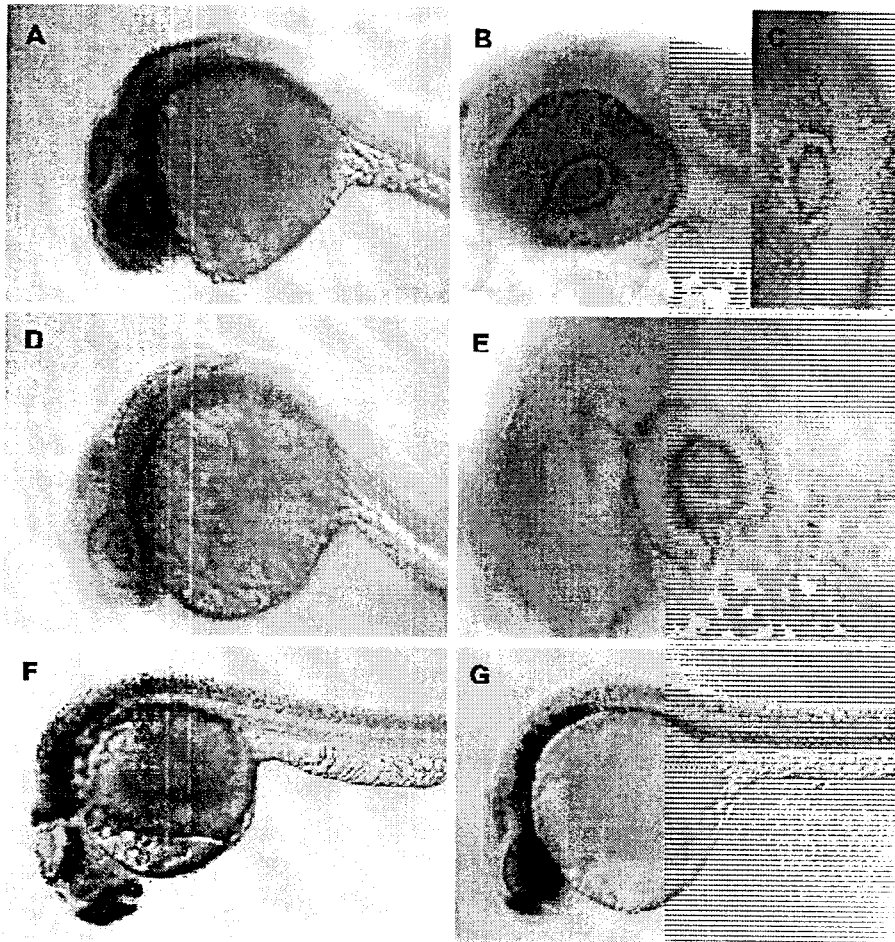


Fig. 38. Whole-mount *in situ* hybridization of 24h embryo using anti-sense RNA probe of Hu genes. (A-C) : HuA 3'UTR probe, (D,E) : HuG 3'UTR probe, (F, G) : HuC and HuD 3'UTR probe.

(2) Hu family 유전자들의 발현양상 분석

분리된 HuA, HuG, HuC 및 HuD 유전자들을 이용하여 이들의 발현양상을 확인하기 위하여 24시간이 경과한 zebrafish의 embryo를 대상으로 whole-mount in situ hybridization을 수행하였다. Hu family 유전자들의 coding region은 fig. 35에서 보는바와 같이 sequence homology가 매우 높으므로 whole-mount in situ hybridization을 위한 probe는 이들 유전자들의 3' UTR region을 사용하였다. HuA의 발현은 human의 HuR의 경우와 마찬가지로 tissue specificity를 나타내지 않고 전체적으로 발현되었다 (Fig. 38A). 특히 눈과 귀 부위에서 eye lens와 optic stalk, 그리고 ear vesicle에서 발현이 됨을 확인하였다 (Fig. 38B,C). HuB의 발현은 기본적인 양상이 HuA와 매우 유사하였으나 (Fig. 38D), 눈에서는 optic stalk에서의 발현이 보이지 않았다(Fig. 38E) HuC와 HuD의 발현은 다른 종에서 알려진 바와 같이 기본적으로 신경특이적인 발현양상을 나타내었다 (Fig. 38F, G). 이들 Hu family 유전자들의 발생과정에서의 시간적인 발현 양상은 현재 whole-mount in situ hybridization을 이용하여 분석중에 있다.

4. 신경특이적 발생 유전자들의 기능분석을 위한 신경특이적 형광 transgenic zebrafish의 제조 및 분석.

계속적인 연구에서 얻어질 신경발생 조절 유전자들의 신경계에서의 *in vivo* 기능을 확인하는 동물모델의 제조를 목적으로 하여 모든 분화되는 신경에서만 특이적으로 GFP단백질 유전자를 발현하는 형광 zebrafish의 제조를 수행하였다. 이를 위해 일차적으로 초기 신경분화시기로부터 성체의 분화된 신경조직 전체에 유전자 발현이 된다고 알려진 HuC 유전자 promoter를 분리한 후 *in vivo*에서 promoter analysis를 수행하여 이들의 신경 특이적 영역을 확인하였고 이를 이용하여 모든 신경계에서 reporter gene으로서 형광단백질인 GFP 유전자를 발현하는 형질전환 형광 zebrafish를 제조하였다.

가. 신경 특이적 발현을 보이는 pan-neuronal HuC 유전자 promoter의 분리 및 구조 확인

*Drosophila*에서 가장 먼저 밝혀진 신경세포 특이적인 RNA binding protein은 ELAV(embryonic lethal, abnormal visual system) protein으로서 이 유전자는 X chromosome에 존재하는 normal neural development에 필수적인 locus이다. 이들의 mutation은 embryonic lethality를 유발하며 embryo, larvae, pupae and adults에 이르기까지 발생의 전반에 걸쳐서 모든 종류의 신경세포에서 특이적으로 발현되지만 neuronal progenitor cell인 neuroblast나 glial cell에서는 발현되지 않음으로서 이들은 초기 neuron의 발생과 mature neuron의 분화 및 유지에 필수적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

Mammalian에서는 지금까지 HuR, Hel-N1, HuC, HuD의 4종류의 elav homolog 유전자들이 밝혀져 있다. Drosophilar elav의 homolog인 이들 유전자들 중에서 Hel-N1, HuC, 그리고 HuD는 Elav와 마찬가지로 neuron specific RNA binding protein으로 작용하며, 이들은 신경세포에서 cell growth와 proliferation을 조절하는 c-Myc, c-Fos 그리고 Id repressor의 mRNA의 3'-UTR에 존재하는 AU-rich element(ARE)에 선택적으로 결합하여 이들의 stability를 조절하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 이들은 신경세포에서 세포분화와 증식에 관여하는 유전자들의 mRNA stability를 조절함으로써 neuron의 발생 및 분화와 mature neuron의 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.

Mammalian의 neuron specific RNA binding protein들 중에서 특히 HuC는 neuronal precursor cell 들이 나타나는 시기인 late gastrular 시기부터 발현이 시작되며, CNS와 PNS의 모든 종류의 neuron에서 발현되는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 계속적인 연구에서 얻어질 신경발생 조절 유전자의 in vivo 기능을 확인하는 동물모델을 제조하기 위하여 그 첫단계로서 먼저 zebrafish로부터 모든 종류의 신경세포에서 특이적으로 발현되는 HuC 유전자의 promoter를 분리한 후 이들의 염기서열을 분석하여 이들의 발현을 조절하는 가능한 nuclear factor들의 결합부위를 확인하였으며, GFP (green fluorescence protein) 유전자를 reporter gene으로 이용하여 HuC promoter deletion mutant의 재조합 유전자를 구성하고 이들을 zebrafish의 embryo에 microinjection한 후 in vivo에서 이들 GFP 유전자의 발현을 조사함으로써 모든 신경세포에서 특이적으로 발현되는 신경 특이적 promoter를 분리, 확인하였다.

(1) Zebrafish embryo에서의 HuC 유전자의 발현 조사

Zebrafish HuC 유전자의 promoter를 분리하기 이전에 먼저 발생과정에서의 이 유전자의 시간적 공간적 발현양상을 whole-mount in situ hybridization을 통하여 확인하였다. 그 결과 zebrafish의 HuC 유전자는 late gastrular stage (11 h)의 neuronal precursor cell들에서부터 발현이 시작되며 이후에는 CNS와 PNS의 모든 신경세포에서 특이적으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 39).

(2) Zebrafish genomic library로부터 HuC promoter의 분리 및 염기서열 분석

Zebrafish HuC 유전자의 5' UTR 부분을 probe로 사용하여 zebrafish의 genomic library를 screening함으로써 약 3 kb 크기의 HuC 유전자의 promoter를 분리하였다. 이들의 염기서열을 분석하고 5' termini를 확인하기 위한 primer extension analysis를 수행한 결과, 이들의 신경특이적인 발현을 조절하는 것으로 추정되는 E-boxes sequence들을 포함하는 core promoter sequence를 확인하였다 (Fig. 40).

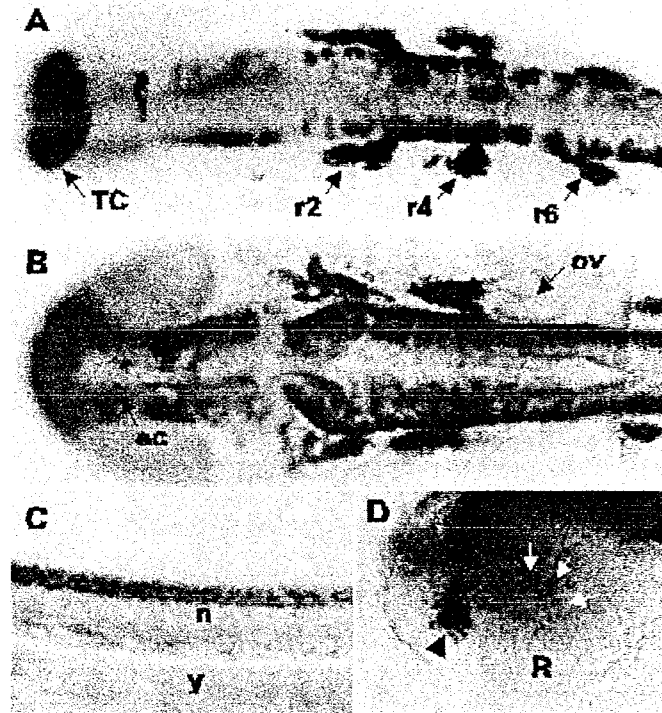


Fig. 39. *In situ* localization of HuC transcripts in zebrafish embryos. Whole-mount preparation of zebrafish embryos were hybridized with a DIG-labeled HuC antisense RNA probe, and stained with an alkaline phosphatase conjugated anti-DIG antibody. (A) Dorsal view of the 18-somite stage embryo showing HuC expression in various regions of the brain. High expression of HuC in the telencephalic cluster and rhombomere 2,4,6 is also observed. (B) Dorsal view of the HuC mRNA expression in 25-hour-old embryo. The number of cells expressing HuC increased in the nervous system, probably due to an increase in newly emerged postmitotic neurons. Staining is also detected in the epiphysial cluster in the midline of the diencephalon. (C) Lateral view of the HuC mRNA expression in the spinal cord of 32-hour-old embryo. High expression of the HuC is also observed in spinal cord. (D) Retina of 32-hour-old embryo showing HuC expression in developing retinal ganglion cells and cluster (arrow and arrowhead). Anterior to the left. TC, telencephalic cluster; e, eye; ec, epiphysial cluster; ov, otic vesicle; n, notochord; y, yolk; R, retina.

(3) Living zebrafish embryo에서의 HuC promoter의 기능분석

분리한 3 kb의 HuC promoter에서 HuC 유전자의 신경세포 특이적인 발현을 조절하는 cis-acting element들을 확인하기 위하여 reporter gene으로서 GFP(green fluorescence protein) 유전자를 포함하는 HuC promoter의 점진적인 deletion mutant들을 제조하였다. 각각의 construct들을 one cell stage의 살아있는 zebrafish embryo에 microinjection한 다음 일정시간이 지난 후 형광 현미경을 이용하여 이들 GFP protein에서 나오는 형광을 관찰함으로써 각각의 deletion construct들의 발현을 in vivo에서 확인하였다. 그 결과, Fig. 41에서 보는바와 같이 3 kb의 HuC promoter-GFP construct에서는 endogeneous한 HuC 유전자의 발현 양상과 일치하는 형광단백질의 발현을 확인하였으며, 이들이 점진적으로 deletion될 수록 이들 형광 단백질의 신경 특이적 발현이 감소함과 동시에 근육에서의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(4) 신경 특이적 HuC promoter에 의한 형광단백질의 발현양상

앞에서 수행한 형광단백질을 이용한 living zebrafish embryo에서의 HuC promoter deletion analysis를 통하여 형광단백질의 가장 완벽한 신경 특이적 발현을 유발하는 것으로 확인된 3 kb의 HuC promoter-GFP construct의 발현양상을 정밀하게 조사하기 위하여 살아있는 1 cell stage의 zebrafish embryo에 이들의 DNA를 microinjection 한 후 형광 현미경을 통하여 GFP의 발현을 관찰하였다. 그 결과 injection한 후 48 시간이 경과한 embryo에서 이들 형광단백질은 Fig. 42에서 보는 바와같이, brain의 telencephalic cluster, retinal ganglion cells 그리고 trigeminal ganglion neurons 등에서 발현되는 것이 확인되었으며 또한, brain뿐만 아니라 spinal cord 전반에 걸쳐서 motor neuron, sensory neuron 그리고 commissure neuron등 모든 종류의 neuronal cell의 subtype에서 발현됨이 확인되었다. 또한 이들의 발현은 신경세포의 cell body뿐만 아니라 신경세포에서 나오는 axon들에서도 발현됨으로서 후에 axonal guidance에 관여하는 유전자들의 기능연구에도 충분히 활용될 수 있음을 확인하였다.

또한 이들의 발현을 더 정확하게 확인하기 위하여 HuC promoter-GFP construct를 microinjection한 후 48 시간이 경과한 embryo를 대상으로 하여 GFP에 대한 polyclonal antibody를 이용하여 immunostaining을 수행한 결과 Fig. 43에서 보는바와 같이 staining 된 cell 들이 앞에서 확인한 형광단백질을 발현하는 neuronal cell들과 일치함을 확인함으로써 분리한 HuC promoter가 완전한 pan-neuronal promoter임을 확인할 수 있었다.

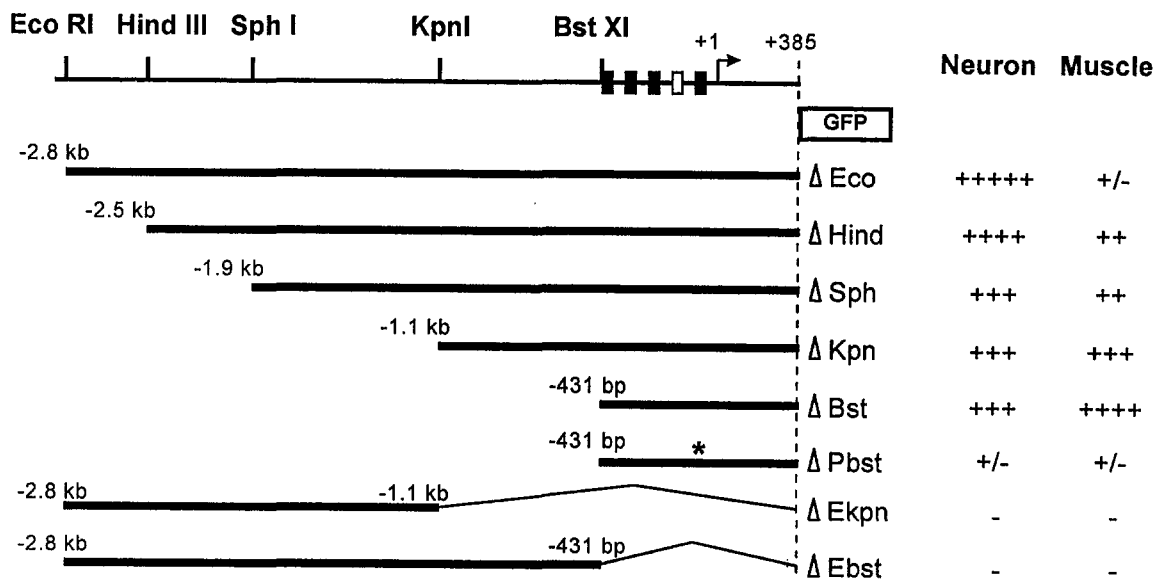


Fig. 41. Analysis of HuC 5 flanking sequences by transient expression. The diagrams show the different HuC promoter sequences that were analyzed in microinjected embryos. All constructs had the same 3 end (+385 of HuC cDNA), except for Kpn (-2772/-1157) and Ebst (-2772/-431), and were fused to the green fluorescence gene. The Pbst construct has point mutations (CCAAT) in the CCAAT box at position -64 and indicated by asterisk. The boxes represent different potential *cis*-regulatory elements. The filled boxes correspond to E box sequences, and the unfilled box corresponds to the putative GATA-1 transcription factor binding site.

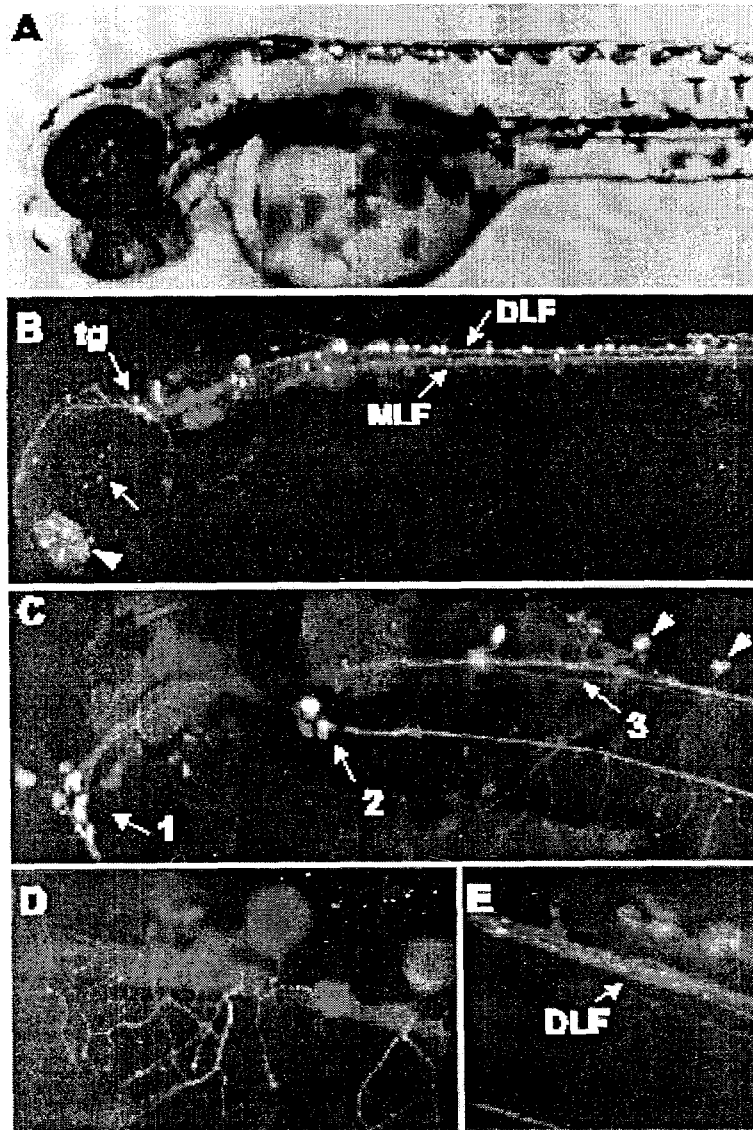


Fig. 42. GFP expression driven from HuC promoter construct (Eco) in 48 h of living zebrafish embryo. (A and B) At 48 h, GFP was expressed in the most regions of the nervous system including the telencephalic cluster (arrowhead), retinal ganglion cells (arrows), trigeminal ganglion neurons and throughout the spinal cord in the medial longitudinal fasciculus (MLF) and dorsal longitudinal fasciculus (DLF). (C) GFP was expressed in the brain, including the trigeminal ganglion neuron (arrow 1), post-otic commissure neuron (arrow 2) and Rohon-Beard neuron (arrow 3). GFP expression was also observed clearly in the individual neuron cells including neuron cell bodies and extended axons. Arrowheads indicate Rohon-Beard cell bodies. GFP expression in peripheral process of Rohon-Beard axons (D), and in the dorsal longitudinal fasciculus of spinal cord (E) were also observed. (F) Ectopic expression of GFP was often observed in muscle cells (arrow). (G) GFP expression driven by Sph construct in neurons and muscles. Dorsal to the top, anterior to the left.

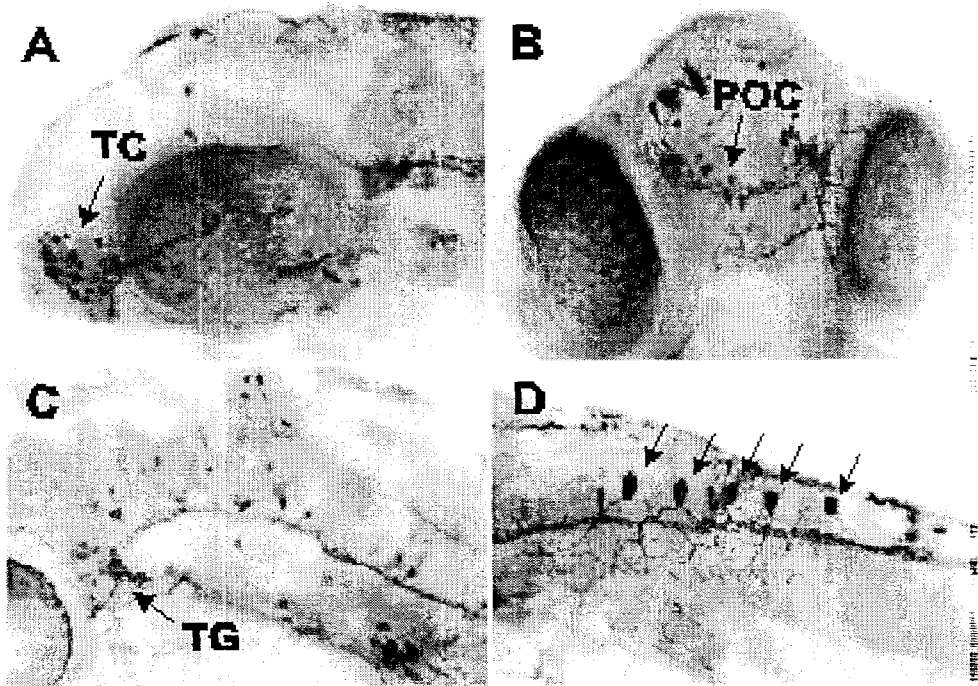


Fig. 43. Whole-mount immunostaining of 48 h of zebrafish embryos micro injected with Eco construct. Microinjected embryos were immunostained by anti-GFP polyclonal antibody. GFP expression were detected in telencephalic cluster (A), anterior post-optic commissure (B), trigeminal ganglion neuron (C) and Rohon-Beard neuron (D), which is consistent with the GFP expression under the fluorescence microscopy. Arrows indicate the cell bodies of the Rohon-Beard neurons. Anterior to the left, dorsal to the top except B (anterior view, dorsal to the top). TC, telencephalic cluster; POC, post-optic commissure; TG, trigeminal ganglion; RB, Rohon-Beard neuron.

나. 형광단백질을 신경 특이적으로 발현하는 transgenic zebrafish의 제조 및 확인

계속적인 발생특이 유전자들의 발굴을 통하여 얻어질 발생특이 유전자들 중에서 특히 신경발생 조절 유전자들의 in vivo 기능을 확인할 수 있는 동물모델을 제조하기 위하여 앞에서 얻어진 zebrafish의 pan-neuronal promoter인 HuC promoter를 이용하여 모든 신경세포에서만 특이적으로 GFP단백질 유전자를 발현하는 transgenic zebrafish의 제조를 수행하였다.

먼저 앞에서 확인된 가장 완벽한 pan-neuronal promoter인 3 kb의 HuC promoter에 reporter gene으로서 형광단백질인 GFP 유전자를 fusion시킨 재조합 유전자를 구성하였다. 얻어진 HuC promoter-GFP construct를 one-cell stage의 zebrafish에 microinjection 한 후 이들을 배양하였다. 약 3개월 후에 microinjection된 이들 zebrafish들이 알을 낳을 수 있을 정도로 자란 후 이들을 암수 한쌍씩 각각의 어항에서 따로 breeding하여 알을 받는다음 형광현미경을 이용하여 이들 embryo들이 신경세포에서 특이적으로 형광을 나타내는지의 여부를 확인하였다. 이렇게 하여 얻어진 embryo에서 신경세포에 특이적으로 형광단백질이 발현됨을 확인함으로써 이들 embryo를 낳은 founder zebrafish는 microinjection한 HuC promoter-GFP construct가 germline으로 transmission된 transgenic zebrafish임을 확인할 수 있었다.

Founder transgenic zebrafish로부터 얻어진 제 2 세대의 heterozygote transgenic zebrafish들을 키운 후 이들을 교배함으로써 homozygotic transgenic zebrafish를 확보하였다. 이렇게 하여 얻어진 transgenic zebrafish를 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, Fig. 44에서 보는바와 같이, brain과 spinal cord의 모든 종류의 신경세포에서 특이적으로 형광단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 이들 transgenic zebrafish를 신경계 특이적으로 돌연변이가 유발된 mutant zebrafish의 분석에 이용하기 위하여 이들을 mindbomb mutant line과 교배시켰다. Mindbomb mutant는 early neurogenesis에 관련된 유전자에 돌연변이가 유발된 것으로서 이들은 primary neuron들이 정상보다 많이 형성되는 phenotype을 보이는 것으로 알려져 있다. HuCP-GFP transgenic line과 mindbomb mutant line과의 교배를 통하여 얻어진 HuCP-GFP/mindbomb transgenic mutant embryo를 대상으로 GFP에 대한 polyclonal antibody를 이용하여 immunostaining을 수행한 결과, 예상했던 대로 primary neuron들이 증가된 phenotype을 확인할 수 있었다 (Fig. 45).

이와 같이, 얻어진 transgenic zebrafish는 모든 신경세포에서 형광을 나타내므로 계속적인 발생특이 유전자 발굴을 통하여 얻어질 신경 특이적인 유전자들의 기능을 연구하는 데에 매우 유용한 모델 동물로서 활용될 수 있을 것이며, 또한 mutagenesis를 통하여 얻어진 신경계 변이 zebrafish 돌연변이체들의 분석에도 유용하게 이용될 것이다. 이와 더불어 본 연구에서 분리된 pan-neuronal promoter는 그동안 밝혀진 모든 종류의 neuron specific promoter중에서 유일하게 모든 신경세포에서 발현되는 것이므로, 그 기능이 알려지지 않은 신경 특이적인 유전자들을 in vivo에서 신경세포 특이적으로 발현시킴으로써 이들 신경특이 유전자들의 기능연구에 transgenic zebrafish와 더불어 매우 유용하게 활용될 것이다.

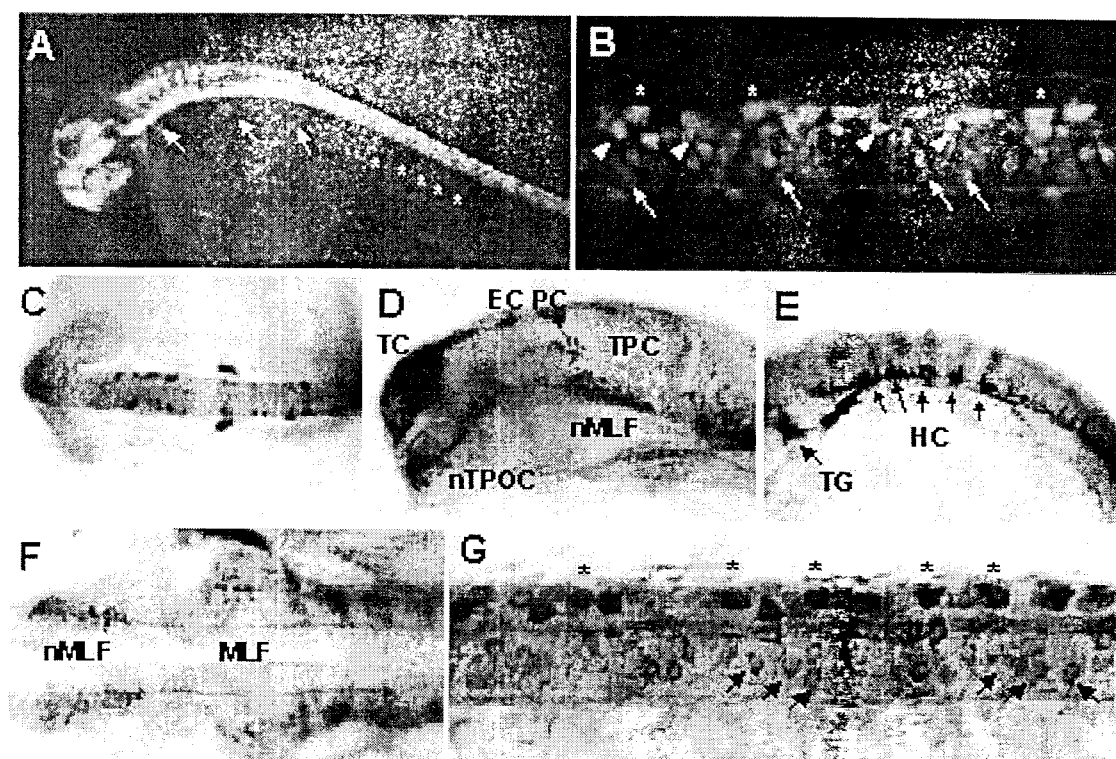


Fig. 44. GFP expression driven by the HuCP-GFP construct in neurons of transgenic zebrafish embryos.

(A) Lateral view of 24-hour-old transgenic embryo under the fluorescence stereomicroscopy. CaP axons in the ventral somites (asterisks) and cranial ganglia extended from the rhombomere 2, 4 and 6 (arrows) are indicated. (B) Lateral view of spinal cord of 48-hour-old transgenic embryo. The Rohon-Beard cells (asterisks), CoSA neurons (arrowhead) and primary motoneurons (arrows) are indicated. (C) Dorsal view of 15-hour-old transgenic embryo immunostained using anti-GFP polyclonal antibody. GFP expression was detected in several neurons of brain. (D-G) Whole-mount immunostaining of 24-hour-old transgenic embryos using anti-GFP polyclonal antibody. (D) Lateral view of forebrain and midbrain of transgenic embryo. (E) Lateral view of hindbrain of transgenic embryo. (F) Dorsal view of midbrain and hindbrain of transgenic embryo. Axon tract of MLF was expressed GFP. (G) Lateral view of spinal cord of transgenic embryo showing GFP expression in Rohon-Beard cells (asterisks), three primary motoneurons (arrows) and several types of interneurons. Anterior to the left. TC, telencephalic cluster; nTPOC, nucleus of the tract of the postoptic commissure; nMLF, nucleus of the medial longitudinal fasciculus; EC, epiphysial cluster; PC, posterior commissure; TPC, tract of the posterior commissure; TG, trigeminal ganglion; HC, hindbrain cluster; MLF, medial longitudinal fasciculus.

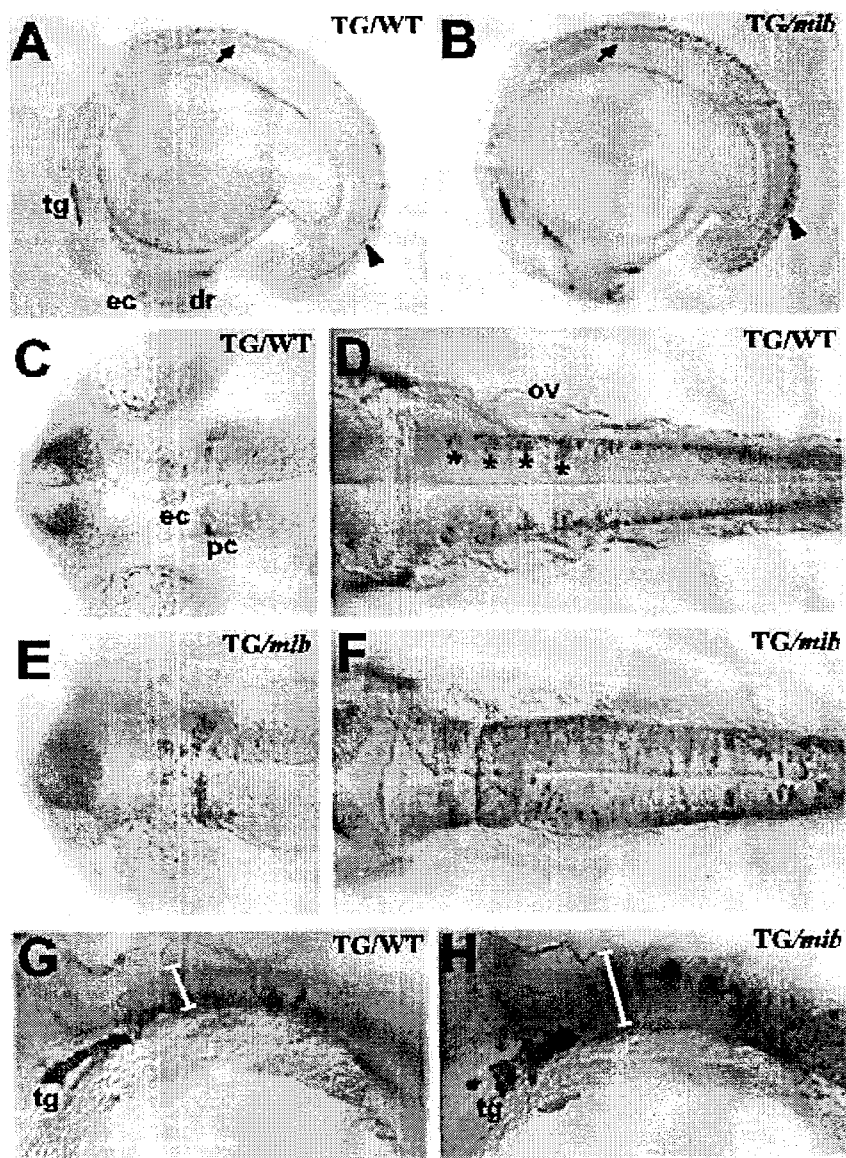


Fig. 45. Comparison of GFP expression in transgenic *mib* mutant embryos and transgenic embryos. Lateral view of transgenic embryo (A) and transgenic *mib* mutant embryo labeled with GFP antibody at the 18 somite stage. Dorsal view of forebrain, midbrain (C) and hindbrain (D) of transgenic embryo, and forebrain, midbrain (E) and hindbrain (F) of transgenic *mib* mutant embryo labeled with GFP antibody at the 24 hpf. The increased CoSA neurons (arrow) and presumptive rhombomere 2, 3 and 4 (asterisks) are indicated. Anterior to the left. tg, trigeminal ganglion; rb, Rohon-Beard.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1절 연구개발목표의 달성도

1. 1차년도 연구개발목표 및 평가 착안점

- 가. Model animal 재배장치의 조직적인 설계, 제조와 zebrafish의 유지, 번식 및 산란기술의 확립여부
- 나. Zebrafish model을 이용한 유전자의 생체 기능분석 system의 확립 및 이의 검증 여부
 - (1) Zebrafish 수정란에 대한 DNA 및 RNA의 microinjection system의 확립 및 검증
 - (2) Zebrafish 수정란에 대한 antisense RNA를 이용한 whole mount in situ hybridization system의 확립 및 검증
- 다. 총 10단계의 발생단계별 RNA를 대상으로한 Odered Differential Dsplay PCR(ODD-PCR)에 의한 발생특이 유전자의 분리방법의 확인 및 검증
- 라. ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자들의 full-size cDNA를 분리하기 위한 발생단계별 총 5 종류의 cDNA library의 제조 여부

2. 평가의 착안점에 따른 1차년도 연구개발 목표의 달성도

- Model animal 재배장치의 조직적인 설계, 제조와 zebrafish의 유지, 번식 및 산란기술의 확립여부
: 100 %
- Zebrafish model을 이용한 유전자의 생체 기능분석 system의 확립 및 이의 검증 여부
: 100 %
- 총 10단계의 발생단계별 Odered Differential Dsplay PCR(ODD-PCR)에 의한 발생특이 유전자의 분리 방법 확립 여부
: 100 %
- ODD-PCR에 의해 분리된 발생특이 유전자들의 full-size cDNA를 분리하기

위한 발생단계별 총 5 종류의 cDNA library의 제조 여부
: 100 %

3. 2차년도 연구개발목표 및 평가의 착안점

가. Ordered Differential Display PCR에 의한 총 100개의 발생특이 유전자들의 분리 및 이들의 염기서열 분석여부

나. Whole mount in situ hybridization에 의한 발생특이 유용유전자들의 선별

다. 총 5개의 신규 발생특이 유용유전자들의 full-size cDNA들의 분리 및 이들의 염기서열 분석여부

라. Ectopic RNA injection에 의한 분리된 신규 유용 유전자들의 기능분석여부

마. 신경계 특이적 HuC 유전자의 promoter 분리 및 in vivo에서의 이들의 기능 분석 여부

4. 평가의 착안점에 따른 2차년도 연구개발목표의 달성도

- Ordered Differential Display PCR에 의한 발생특이 유전자들의 분리 및 염기서열분석 여부

: 100 %

- Whole mount in situ hybridization에 의한 발생특이 유용유전자들의 선별

: 100 %

- 발생특이 유용유전자들의 full-size cDNA들의 분리 및 염기서열분석

: 100 %

- Ectopic RNA injection에 의한 유용 유전자들의 기능분석

: 80 %

- 신경계특이적 HuC promoter의 분리 및 분석

: 100 %

5. 3 차년도 연구개발목표 및 평가의 착안점

- 가. Ordered Differential Display PCR에 의한 총 200개의 발생특이 유전자들의 분리 및 이들의 염기서열 분석여부
- 나. Whole mount in situ hybridization에 의한 발생특이 유용유전자들의 선별
- 다. 총 5개의 신규 발생특이 유용유전자들의 full-size cDNA들의 분리 및 이들의 염기서열 분석여부
- 라. Ectopic RNA injection에 의한 분리된 신규 유용 유전자들의 기능분석여부
- 마. 신경계 특이적 HuC 유전자의 promoter를 이용한 형광 transgenic zebrafish의 제조 및 분석 여부

6. 평가의 착안점에 따른 3차년도 연구개발목표의 달성도

- Ordered Differential Display PCR에 의한 발생특이 유전자들의 분리 및 염기서열분석 여부
: 150 %
- Whole mount in situ hybridization에 의한 발생특이 유용유전자들의 선별
: 100 %
- 발생특이 유용유전자들의 full-size cDNA들의 분리 및 염기서열분석
: 70 %
- Ectopic RNA injection에 의한 유용 유전자들의 기능분석
: 70 %
- 신경계특이적 HuC promoter를 이용한 형광 transgenic zebrafish의 제조 및 분석 : 100 %

제 2 절 연구결과의 대외 기여도

- ◎ 본 연구 기술개발로 부터 얻어진 발현변화를 보이는 유전자들의 분리 및 확인 방법들은 향후 질병유발 유전자 등의 체계적인 분리와 분류 및 확인 기술에 직접 적용
- ◎ 기타 유용 유전자 및 산물의 확보 및 이들의 기능분석에 관련된 타 연구의 기술적 효율성 증진
- ◎ 분리 확보된 신기능성 유전자들은 생명공학 관련 제품의 산업화 기술 증진에 기여
- ◎ 현재까지 그 기능이 밝혀져 있지않은 database상의 인체 유전자들의 기능을 유추하는 기술의 습득 (Zebrafish와 인체의 단백질 서열은 80 % 이상 상동성 존재)
- ◎ 향후 Postgenome Era에 필수적으로 요구될 유전자 기능분석 기술의 확보

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 발생특이적 유용 유전자들의 활용계획

Genome 연구는 앞에서 언급한대로 유용 유전자의 선점과 이들의 기능을 규명하여 실제로 보건 의료기술 등의 관련 산업화에 적용하는 것이 중요하다. 본 연구를 통하여 얻어진 발생특이 유용 유전자들은 척추동물의 신경계 및 주요 기관의 생성과 분화에 직접적인 관련을 가지고 있으며, 특히 이들 발생관련 주요 유전자들에 이상이 유발되면 중요한 유전적 질병을 유발하거나 관련 장기 및 조직에서 암 및 기타 치명적인 질병을 유발하게 된다. 따라서, 본 연구를 통하여 얻어진 신규 발생특이 유용 유전자들은 산업화 가능성이 비교적 높을 것으로 예측되어 일차적으로 보건, 의료 그리고 제약 등의 관련산업에 직접적으로 활용될 것으로 기대된다. 이와 같은 직접적인 신 기능성 유전자 산물에 의한 혜택뿐 아니라 genome연구의 부산물로서 얻어질 자동화 기기 및 분석 기기 산업의 발전과 함께 각종 생물학적 신 소재의 개발에도 파급효과를 미칠 것으로 생각된다.

2. 유전자 발굴 및 기능분석 기술의 활용계획

지금까지의 genome 연구에서 얻어진 많은 유전자들은 실질적으로 아직까지 그 기능연구가 대부분 이루어지지 않고 있다. 그러므로 앞으로의 genome 연구는 발굴된 유전자들의 기능연구가 중요한 과제가 될 것이다. 하지만 척추동물의 연구의 한계로 인하여 그러한 기능연구는 많은 시간을 필요로 하게 된다. 따라서 본 연구에서 확립된 각종 기능연구 system은 발생관련 타 유전자들의 기능분석 뿐만 아니라 기타 유용 유전자 및 산물의 확보 및 이들의 기능분석에 관련된 타 연구의 기술적 효율성 증진에 유용하게 활용될 것이다.

3. 신경계 특이적 형광발현 transgenic zebrafish의 활용계획

본 연구에서 얻어진 신경계 특이적 promoter 및 신경계 특이적 형광발현 transgenic zebrafish는 여러 가지 방법을 통하여 신경계의 발생, 분화 및 질병유발의 원인을 규명하는데 유용한 model로서 활용될 것이다.

- 신경계의 발생 및 분화과정의 연구
- 기능이 밝혀지지 않은 신규 유전자들을 신경계에 특이적으로 발현시킴으로서 이들의 신경계에서의 기능연구에 활용
- transgenic zebrafish를 대상으로하여 mutagenesis를 수행함으로써 신경계 특이적 유전자들의 발굴에 활용
- 이들을 이용하여 신경계에 이상이 유발된 disease model을 제작함으로써 신경계 관련 질병의 치료 및 신경계 재생 신물질 기능 연구에 활용

제 6 장 참고문헌

- Adam, S.A., Nakagawa, M.S., Swanson, T.K. and Dreyfuss, G. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2932
- Alan F, Williams and A. Neil Barclay (1988) "The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition ". *Ann.Rev. Immunol.* **6**: 388-405
- Barami, K., Iversen, K., Furneaux, H. and Goldman, S.A. (1995) *J. Neurobiol.* **28**, 82-101
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994) *Science* **265**, 615-621
- Campos, A.R., Grossman, D. and White, K. (1985) *J. Neurogenet.* **2**, 197-218
- Choi B., Chun, J.S., Lee, Y.S., Sonn, J.K., and Kang, S.-S. (1995): Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 1034-1040.
- Choi, Jang Won et al. (1995). "Cyclosporin A block apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 437-441.
- Chung, J., Lee, S. and Song, G. (1995). "Identification of a human homolog of a putative RNA helicase gene (mDEAD3) expressed in mouse embryoid cells. *Kor. J. Biochem.* **27**, 193-197
- Concordet, J.P. and Ingham, P. (1994) "Catch of the decade". *Nature.* **369**: 19-20
- Dickson, D. (1996). "NIH seeks rapid sequence release". *Nature.* **380**: 279
- Driever, W., Stemple, D., Schier, A. and Solnica-Krezel, L. (1994). "Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development". *Trends Genet.* **10**: 152-159

- Eisen, J.S. (1991) "Determination of primary motoneuron identity in developing zebrafish embryos". *Science*. **252**: 256-257
- Elgar, G., Sandford, R., Aparicio, S., Macrae, A., Venkatesh, B and Brenner, S. (1996). "Small is beautiful: comparative genomics with the pufferfish(*Fugu rubripes*)". *Trends. genet.* **12**: 145-150
- Frank R. Burns, Stephanie von Kannen, Leslie Guy, Jonathan A. Raper, John Kamholz and Susannah Chang (1991) " DM-GRASP, a novel immunoglobulin super family axonal surface protein that supports neurite extension". *Neuron* **7**: 209-220
- Good, P.J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4557-4561 Jimenez, F. and Campos-ortega, J.A. (1987) *J. Neurogenet.* **4**, 179
- Haffter, P. and Nusslein-Volhard, C. (1996). "Large-scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish". *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 221-227
- Halpern, M.E., Ho, R.K., Walker, C. and Kimmel, C.B. (1993) "Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish no tail mutation". *Cell*. **75**: 1-20
- Johnson, S. L., Gates, M. A., Johnson, M., Talbot, W. S., Horne, S., Baik, K., Rude, S., Wong, J. R., and Postlethwait, J. H., 1996. Centromere-linkage analysis and the consolidation of the zebrafish genetic map. *Genetics* **142**, 1277-1288 (April, 1996).
- Jordan, E. and Collins, F.S. (1996). "A march of genetic maps". *Nature*. **380**: 111-112
- John P, Kanki, Susannah Chang, and John Y, Kuwada (1994) "The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse ". *Journal of Neurobiology* **25**: 831-845
- Johnson, S., Midson, E. Ballenger, and Postlethwait, J. (1994) "RAPD primers that identify genetic polymorphism between standard strains of zebrafish". *Genomics*. **19**: 152-156

Katja A. Paschke, Friedrich Lottspeich, and Claudia A. O. Stuermer (1992) "Neuroilin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration" *The journal of cell biology* **117**: 863-875

Kimmel, C.B. (1989). "Genetics and early development of zebrafish". *Trends. genet.* **5**: 283-288

Kimmel, C.B., R.M. Warga, and Schilling, T.F. (1990) "Origin and organization of the zebrafish fate map". *Development.* **108** : 581-594

Kintner, C. (1988). "Effects of altered expression of the neural cell adhesion molecule, N-CAM, on early neural development in *Xenopus* embryos". *Neuron.* **1**: 545-555

Knittel, T., Kessel, M., Kim, M.H., and Gruss, P. A (1995) "Conserved enhancer of the human and murine *Hoxa-7* gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development". *Development* **121**, 1077-1088.

Ko, T.H. and Lee, S.H. (1993b). "Establishment of a biological assay for the fertilizing ability of equine spermatozoa". *Korean J. Anim. Sci.* **35**(3), 175-179.

Lantinkic B. V. and Smith J.C. (1998) "Goosecoid and *Mix.1* repress *Brachyury* expression and are required for head formation in *Xenopus*." , *Development*, **126**: 1769-1779

Lee, J.H., Park, H.Y. and Lee, S.H. (1993a). "Spatial and temporal analysis of embryonic development in loach (*Misgurnus mizolepis*)". *Korean J. Anim. Sci.* **35**(3), 155-162.

Lee, J.H., Yeo, S.Y., Huh, T.L. and Lee, S.H. (1995) "Non-invasive screening for foreign gene expression in developing fish embryos by green fluorescent protein (GFP) gene" *Proc .5th Annual Congress Korean Fed. Soc. Anim. Sci.* **241**. Chung-Nam Univ. Daejun.

Lee, S., Lee, I., Park., S., Kang, C. and Song G. (1995). " Identification and characterization of a human cDNA homologous to yeast SK12". *Genomics* **25**, 215-219.

Lee, Y.S., Marks, A.R., Gureckas, N., Lacro, R., Nadal-Ginard, B., and Kim,

- D.H. (1992). "Purification, characterization and molecular cloning of a 60-Kda phosphoprotein in rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum which is an isoform of phosphoglucosyltransferase". J. Biol. Chem. **267**, 16-20.
- Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L, Turner, D.L. and Lipnick, N. (1995) Science **268**, 836-844
- Levine, T.D., Gao, F., King, P.H. *et al.* (1993) Mol. Cell. Biol. **13**, 494-3504
- Ma, Q., Kintner, C. and Anderson, D.J. (1996) Cell **87**, 43-52
- Ma, W.J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A. and Furneaux, H. (1996) J. Biol. Chem. **271**, 8144-8151
- Manley, G.T., Smitt, P.S., Dalmau, J. and Posner, J.B. (1995) Annals of Neurology **38**, 102-110
- Maniatis, T. (1990). "Expression of a MyoD family member prefigure muscle pattern in Drosophila embryos". Genes Dev. **4**: 2086-2097
- Marshall, E. and Pennisi, E. (1996). "NIH Launches the final push to sequence the genome. Science. **272**: 188-189
- Min, W., Cho, M., Jang, S.I., Chang, H.-H., Lee, C.-S., Jun, M.H., and Kim, M.H. (1996). "Sequence and functional analysis of an upstream regulatory region of human HOX A7 gene". Gene (in press).
- Peter S. Klein and Douglas A. Melton. (1996) "A molecular mechanism for the effect of lithium on development.", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**:8455-8459
- Postlethwait, J., Johnson, S., *et al.* (1994) "A genetic map for the zebrafish". Science **264**: 699-703
- Postlethwait, J.H., Johnson, S.L., Midson, C.N., Talbot, W.S., Gates, M., Ballinger, E.W., Africa, D., Andrews, R., Carl, Tim., Eisen, J.S., Horne, S., Kimmel, C.B., Hutchinson, M., Johnson, M. and Rodriguez, A. (1994). "A genetic linkage map for the zebrafish". Science. **264**: 699-703
- Raible, D.W. and Eisen, J.S. (1994) "Restriction of trunk neural crest cell fate in the embryonic zebrafish". Development, in press

Robinow, S. and White, K. (1988a) *Dev. Biol.* **126**, 294

Robinow, S. and White, K. (1988b) *Science*. **242**, 1570-1572

Sakai, K., Kitagawa, Y., *et al.* (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1200-1208

Scott E. Stachel, David J. Grunwald, and Paul Z. Myers. (1993) "Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish.", *Development*, **117**: 1261-1274

Shaw, G., and Kamen, R. (1986) *Cell* **46**, 659-667

Szabo, A., Dalmau, J., Manley, G. *et al.* (1991) *Cell*. **67**, 325-333

Tautz, D., and Pfeifle, C. (1989) "A non-radioactive in situ hybridization method for localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*". *Chromosoma*. **98**: 81-85

Yao, K.M. and White, K. (1994) *J. Neurochem.* **63**, 41-51. *Biochem. J.* **292**: 705-710.