

GOVP1200406155

M1010400012401J00000551

국 가 지 정 연 구 실 사 업

National Research Laboratory

악성 림프종 관련 유전자 군의 기능 분석 및 병태생리의 규명

Functional Analysis of Malignant Lymphoma-related Genes and
Identification of Pathophysiology

서울대학교 의과대학

과학기술부

보고서 초록

과제관리번호	M1010400012401 J00000551	해당단계 연구기간	2001.7.11.-2003.7.10	단계 구분	1 단계 / 총 2 단계	
연구사업명	중 사업명	국가지정연구실사업				
	세부사업명	국가지정연구실사업				
연구과제명	중 과제명					
	세부(단위)과제명	악성 림프종 관련 유전자군의 기능 분석 및 병태생리의 규명				
연구책임자	박 성 회	해당단계 참여연구원수	총 : 10 명 내부 : 7 명 외부 : 3 명	해당단계 연구비	정부: 398,488 천원 기업 : 천원 계 : 398,488 천원	
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 의과대학 (병리학교실)		참여기업명			
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :				
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :				
요약					보고서 면수	45
<p>유전자 변형 마우스의 형질 판독 기법을 이용하여 악성 림프종과 연관된 유전자군인 D4와 JL1의 기능 분석을 위해 1단계에서는 D4 유전자 이식 마우스를 생산·분석하고, JL1 유전자를 클로닝하였다. D4는 CD99의 마우스 호몰로그로서 Northern Blot과 유세포 분석을 통해 거의 모든 장기에서 발현되며, D4에 대한 항체를 생산하여 D4가 시험관 내에서 세포사멸 유도, 동질 결합, 사이토카인 분비 증가 등의 기능이 있음을 밝혔다. D4가 과발현되는 유전자 이식 마우스는 정상 마우스와 차이를 관찰할 수 없었고, 유전자 적중 마우스를 통한 기능 분석을 위해 유전자 스크리닝을 진행 중이다. D4의 호몰로그인 CD99가 T 세포에서 CD3-zeta 사슬의 인산화 및 lipid raft 내로 유입을 증가시켜 활성을 증가시킨다는 것을 관찰하였다. JL1 항체를 생산하여 Expression cloning 기법으로 JL1이 CD43임을 밝혔다. 뿐만 아니라 다른 CD43 항체와 발현 양상이 다르다는 것을 관찰하였다.</p>						
색인어	한 글	악성 림프종, CD99 유전자 집단, 형질판독, 림프구, 유전자 변형 마우스				
	영 어	malignant lymphoma, CD99 gene family, phenotyping, lymphocytes, gene engineered mouse				

요 약 문

I. 제 목

악성 림프종 관련 유전자군의 기능 분석 및 병태 생리 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

악성 림프종 관련 유전자군인 D4 및 JL1 단백질의 유전자 이식 및 적중 마우스를 생산, 기능 분석을 통해 유전자 변형 마우스의 형질 관독 기법을 확립하며, 이를 바탕으로 다양한 유전자에 대한 기능 분석에 적용한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

(1) D4 유전자 분석

- 마우스 D4 유전자에 대한 단클론 항체 생산 및 정제
- D4 항원의 마우스 조직 장기 별 분포 파악
- D4 단클론 항체 및 D4 단백질의 시험관내 기능 분석
- D4 변형 유전자 클로닝
- D4 유전자 변형 형질전환 마우스의 생산 및 표현형 분석
- D4 유전자의 염색체 위치 확인
- 다양한 종 개체들로부터 D4/CD99 호몰로그 탐색 및 유전자의 phylogeny 완성
- 인체 T 세포 및 흉선세포에서 CD99의 기능분석
- 항 CD99항체의 epitope mapping

(2) JL1 단백질 클로닝

- 인간 JL1항체의 대량생산 및 정제
- 인간 JL1유전자 클로닝 및 단백질의 아미노산 서열 확인

IV. 연구개발결과

세부연구 개발목표	연구 개발 결과
D4 단클론 항체 생산 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 세포막외(extracellular fragment)부위와 GST 단백질의 GST-D4 잡종 단백질 대량 생산 ○ 대량 생산된 GST-D4 단백을 이용하여 D4에 특이적인 5개의 클론 (EJ1-5) 확립 ○ D4에 affinity가 높은 EJ2 와 EJ5를 선택하여 항체들을 정제, conjugation 시킴.
D4 항원의 마우스 조직 장기 별 분포 파악	<ul style="list-style-type: none"> ○ Northern blot 결과, D4 mRNA는 모든 장기(간, 폐, 심장, 신장, 비장, 흉선, 뇌, 난소, 고환)에서 고루 분포함. ○ 흉선과 뇌 조직에서 western blot을 실시한 결과, D4 단백질이 발현됨 ○ 유세포 측정 결과, 1) 흉선세포이 성숙함에 따라 D4 유전자의 발현이 낮아지며, 2) 비장세포 내 T 세포에 비해 B 세포(특히 germinal center B cell)에서 D4의 발현이 더 높음
D4 단클론 항체의 시험관내 기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 세포막외 부분을 면역 글로블린의 Fc 부분 혹은 Histidine Tag과 연결시킨 잡종 단백을 생산함. ○ B6 마우스의 흉선세포에 D4 단클론 항체를 처리한 결과 세포사멸이 증가함. ○ B6 마우스의 비장 세포에 D4에 대한 항체와 마우스 CD3에 대한 항체를 처리하여 자극하였을 때, IFN-γ의 분비가 증가함. ○ B6 마우스의 비장 세포에서 D4 항체처리에 의해 비장세포의 동질 결합 (homotypic aggregation)이 증가하였으며, 이는 Cytochalasin D, Okazadic acid, EDTA, EGTA등의 처리에 의해 저해되었다.
D4 변형 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 dominant negative form을 만들기 위하여, D4의 세포 막 부위와 세포질내 부위를 CD4 단백질의 그것들과 각각 치환된 잡종 단백질 (D4-TMDN, D4-DN) 을 coding하는 유전자 construction. ○ 이 유전자들을 293 세포에 발현시켰을 때 D4-TMDN 의 발현 안정성이 떨어짐을 확인. ○ 세포질내가 CD4 단백질로 치환된 잡종단백의 경우 D4에 대한 dominant negative로 작용하여 D4 신호전달을 저해시키므로, 이 단백질 (D4-DN) 을 과발현시키는 형질전환 마우스를 제작함.
D4 유전자의 기능을 in vitro에서 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항 D4 항체가 affinity가 높지 않으며, epitope에 대한 분석이 완전하지 않아 D4의 세포막외 부위를 인체 CD99로 치환한 CD99-D4 잡종단백을 마우스 T 세포주 (EL-4)에 발현시켜 항 CD99 항체로 자극 후 D4에 의한 신호전달 효과를 알아보았다. ○ CD99-D4 잡종 단백질의 과발현으로 인하여, EL-4 세포주에서 정상적으로는 발현되지 않는 CD8 단백질이 발현되었다. ○ CD99-D4를 발현하는 세포주에 CD99에 대한 항체를 처리한 결과 CD3, CD4, CD8 단백질의 세포표면 발현이 증가하였다.
D4 유전자 형질전환 마우스의 표현형 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4의 신호가 전달되지 않는 D4-DN 유전자 construct (D4 extracellular+ D4 transmembrane+ CD4 cytoplasmic domain) 로 유전자이식 마우스를 2라인을 확립했다. ○ 면역세포들에서 littermate와 유의한 표현형의 변화를 관찰할 수 없었다. ○ 유전자 이식 마우스와 littermate 간의 여러 장기별로 유의한 형태학적 차이를 관찰할 수 없었다. ○ 유전자 이식 마우스와 대조군간에 중앙, 면역질환 등의 발병여부 차이를 관찰할 수 없었다. ○ 소량이나마 정상 D4가 발현되는 한 D4-DN4에 대한 효과를 볼 수 없다고 판단된다.
D4 유전자 적중 마우스	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마우스의 BAC library 스크리닝을 여러 차례 시도하였으나, 양성 클론을 잡을 수 없었고. 외국 연구자들에 스크리닝을 의뢰하였으나 이들도 D4 양성 BAC 클론을 확보하지 못하였다. 또한 random knockout mouse의 screening 결과 D4 RNA가 발견되어 이를 사용할 수 없었다. ○ exon 간 PCR을 통하여 4.5 kb 의 genomic sequence 및 organization를 확보하였다.

	<ul style="list-style-type: none"> ◦ D4의 마우스 염색체상 위치가 Chromosome 4번에 있음을 FISH기법으로 확인하였다. ◦ 여러 species 개체들의 genomic 서열 분석을 시도하여 이 유전자의 phylogeny를 확립하였다.
CD99 분자의 기능 연구	<ul style="list-style-type: none"> ◦ CD99 단백질은 인체 CD3를 통한 T 세포 활성을 증가시키며, 이 기전은 CD3ζ chain의 인산화 및 lipid raft 내로 CD3ζ chain의 유입을 증가시키는 것이었다. ◦ CD99 항체 처리후에 나타나는 인체 흉선세포의 세포사 및 세포 표면 단백질의 발현증가 현상이 MHC class II 에 대한 항체를 처리함으로써 감소되었다. ◦ CD99에 대한 두개의 항체 DN16 과 YG32 의 epitope을 mapping하였다.
인체 JL항체의 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Bio-reactor를 사용하여 JL1 항체를 다량으로 생산하였다. ◦ 정제된 항체를 이용하여 인체 흉선세포에서 다량의 JL1 항원을 분리하였다. ◦ 기존의 JL1 항체 외에 추가적으로 2 종의 다른 JL1 항체를 생산하였다.
인체 JL1 단백질의 아미노산 서열확인	<ul style="list-style-type: none"> ◦ JL1 항체 및 Jachalin column을 이용하여 JL1 항원을 분리하였다. ◦ 농축된 다량의 JL1 항원을 MS/MS 방법으로 아미노산 서열 분석을 시도하였으나, trypsin으로 digestion 하는데 실패하여 JL1의 아미노산 서열을 밝힐 수 없었다. 하지만 뒤이은 Expression cloning에 의한 유전자 서열 분석으로 아미노산 서열은 자연스럽게 확보되었다.
JL1 단백질의 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ◦ retroviral cDNA library 및 3종류의 JL1 항체로 expression cloning 결과, JL1에 100% 양성인 세포를 얻었고 이 세포로부터 cDNA를 분석한 결과 JL1 항원이 CD43임을 확인하였다.
마우스 JL1 유전자 탐색 및 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ◦ JL1 단백질이 CD43임을 알게되어 마우스 JL1 단백질 클로닝은 진행되지 않았다. 대신 JL1 항체와 기존의 CD43 항체를 비교 분석하고, JL1 항체에 의한 인지능이 다른 CD43 항체와 다르다는 것을 알게되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

D4는 최근 CD99의 ortholog로 국제적 공인을 얻게 되어, 추후 CD99 연구에 획기적인 전환점을 가져오게 될 것이며, 본 연구팀은 선도적 거점을 지니게 될 것이다. 또한 D4 및 JL1 단백질에 대한 단클론 항체의 대량생산 및 정제 기술은 항체 개발과 생산 분야에 훌륭히 활용될 수 있다. CD99가 가지는 T 세포의 costimulatory function은 세계 최초로 본 연구팀이 밝힌 결과로 T 세포 생물학 연구에 많은 도움이 되리라 생각된다. 또한 JL1은 클로닝 결과 CD43 임이 밝혀 졌다.

S U M M A R Y

For the functional analysis of the malignant lymphoma-associated genes, D4 and JL1, using phenotyping techniques of gene engineered mice, we produced and analyzed D4 transgenic mice and cloned JL1 gene. It was disclosed that D4, as a mouse homolog of CD99, is expressed in almost all tissues examined by means of Northern blotting and flowcytometry. We also produced a specific antibody to D4 and revealed that D4 has a role in the induction of apoptosis, homotypic aggregation, and increase of cytokine secretion. There was no significant difference between the normal and D4 transgenic mice, so we are progressing the genomic DNA screening for the production of a knock-out mouse. CD99, a homolog of D4, increased the T cell activity through enhancing the association of TCR complexes with the lipid raft and phosphorylation of the CD3 zeta chains. We produced two more antibodies specific for JL1 with different binding epitope. Using the antibodies, we performed expression cloning of the genes encoding JL1 and found that CD43 is the genes encoding proteins with JL1 epitope.

C O N T E N T S

Chaptor 1. Outline of Research	9
Chaptor 2. Present Status of Technical Development of the inside and outside of the country	11
Chaptor 3. Contents and results of the Project	13
Chaptor 4. Achievement grade of Research Project	30
Chaptor 5. Application plan of the results of the Project	32
Chaptor 6. References	33

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	13
제 4 장 연구목표달성도	30
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	32
제 6 장 참고문헌	33

제 1 장 연구개발과제의 개요

인체에는 약 40,000 여개의 유전자가 있으며 이들 유전자의 염기서열이 인간게놈프로젝트에 의해 밝혀졌지만 그 유전자의 기능은 거의 밝혀진 바가 없다. 그리고 유전자들 자체가 기능하는 것이 아니고 유전자에 저장된 정보가 단백질로 변환되어야만 기능하기 때문에 단백질의 기능 연구가 게놈프로젝트 이후 크게 중요하게 되었다. 지난 십여 년 간 본 연구팀은 이들 인체내 단백질중에서 악성 림프종, 백혈병을 포함한 면역계 질환에 직·간접적으로 관련성이 높은 단백을 찾아내고 이의 기능을 규명하여, 질병의 병리기전을 연구하여 왔다. 이미 알려진 바와 같이 이 분야의 기술은 생명과학 및 의과학, 특히 종양학, 면역학, 단백질학, 분자생물학 분야에 해당하는 기술이며, 생물 산업과 의약산업 등의 21세기 지식기반산업의 핵심요소기술이다. 본 기술에는 지난 수년 간 본 연구팀에서 최초로 확립된 실험결과들을 토대로 인체 단백질중 악성 림프종 및 백혈병과 밀접한 관련이 있는 단백군을 찾아내고, 이를 바탕으로 동물질환 모델을 확립하며 형질 분석 기술 및 치료제 스크리닝 시스템을 구축하는 기술이 포함되어 있다. 특히 질병의 병태 생리를 이해하는데 중요한 단백군을 찾아내는 분자생물학적 기법과 병리형태학적 분석 및 각종 기능 분석 프로토콜에 의한 동물 모델의 표현형 분석(Phenotype Identification) 시스템의 구축이 가장 중요한 핵심 기술이다. 본 연구팀이 보유하고 있는 이러한 핵심 기술 및 유전자 클로닝 기술과 인간 게놈 프로젝트의 완성으로 이루어진 인간 유전자 염기서열 데이터베이스, 그리고 지금 이루어지고 있는 마우스 게놈 프로젝트가 만들어낼 마우스의 염기서열을 토대로 본 연구팀은 지금까지 악성림프종과 연관이 있다고 알려진 인체유전자들을 클로닝하고, 마우스 호몰로그를 찾아내어 유전자이식(transgenic) 마우스와 유전자 적중(knockout) 마우스를 만들어 생체 내에서 이러한 유전자들의 기능을 알아내고 더 나아가 인체에서 악성림프종 치료제 개발을 목표로 연구를 진행하려 한다.

보다 구체적으로 본 연구팀이 계획하는 연구는 크게 두 부분으로 나뉘어 진다. 하나는 최근 본 연구팀에 의해 알려진 CD99와 국내에 비해서는 구미에서는 전 악성림프종의 40-50%를 차지하는 호지킨병의 연관성을 생체 내에서 알아내기 위하여 CD99의 마우스 호몰로그에 대한 유전자 이식(transgenic) 마우스와 유전자 적중(knockout) 마우스를 만들고 그 마우스의 표현형 분석과 여러 실험을 통하여 CD99 분자의 기능을 규명한다. 이미 인체 CD99의 orthologue인 마우스 유전자를 클로닝하였고 이를 D4라고 명명하였다(아래 그림 참조). 본 연구팀이 밝힌 바와 같이 CD99의 발현이 없어지면 호지킨병에서 나타나는 H-RS세포가 만들어진다. 이는 CD99와 호지킨병의 연관성을 직접적으로 보여주는 증거임에도 불구하고, 아직 CD99의 생체 내 기능을 밝히는 데 어려움이 있었던 이유는 많은 과학자들이 CD99유전자의 마우스 호몰로그를 발견하지 못하였기 때문이고, 한 때는 마우스 호몰로그가 없다고 추정되기도 하였기 때문이다. 본 연구팀은 D4의 조직과 림프구에서 분포를 살핀 결과 인체 CD99와 유사한 경향을 보였으며, CD99에서 밝혀진 여러 성질이 D4에서도 동일하게 나타나는지를 현재 확인하고 있다. 이런 in vitro 실험결과와 더불어 유전자 변형 생쥐를 이용한 연구는 호지킨병에 대한 깊이 있는 이해와 더불어 치료약제 개발과 약제의 평가에도 큰 도움을 주리라 생각된다.

다른 하나는 본 연구팀에서 독자적으로 찾아낸 백혈병 연관 단백질 JL1의 연구이다. JL1

항원의 연구는 그 항체를 이용한 백혈병의 진단과 치료뿐 만 아니라 JL1항원 자체의 연구도 필수적이다. 본 연구팀은 JL1 유전자클로닝과 그 기능 연구를 하고자 한다. 이를 위하여 본 연구팀은 우선적으로 JL1 단백질의 아미노산 서열 분석에 힘을 기울이고 있으며, 성공적으로 결과가 나오면 JL1 역시 마우스 호몰로그를 찾아 형질전환 마우스와 넉아웃 마우스를 이용하여 생체내에서 JL1의 역할을 규명할 것이다. 위의 예시처럼 본 연구개발은 악성 림프종 및 백혈병과 연관있는 유전자를 중심으로 인체와 마우스 호몰로그 유전자를 클로닝하고 형질전환 마우스를 만들어 생체내에서 유전자의 기능을 밝혀 궁극적으로 인체질병의 발병과 치료에 이용하는 것이 목표이다. 이러한 과정이 성공적으로 수행되면 새로운 질병동물 모델의 표현형 분석방법을 확립하는데 결정적인 도움이 될 것이다.

```

Human CD99  MARGAALALLLFGLLGLV--AAPDGGFDLSDALPDNENKKPTA---IPKKPSAGDDFDL
             :.:.:. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
Mouse D4     M-EAAATVVLALALLGAAARGAASDD-FNLGDALED-PNMKPTPKAPTPKKPSGG--FDL

Human CD99  GDAVVDGENDDP--RPPNPPKMPNPNHPSSSGSFSADLAD--GVSGGEGKGGSDGG
             :.:. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
Mouse D4     EDALPGGGGGGAGEKPGNRPQDPKP-PRPHGDSGGISDSDLADAAGQGGGAGPRGSGDE

Human CD99  GSHRKEG--EADAP-GVIPGIVGAVVVAVAGAISSFIAYQKKKLCFKENAEQGEVDMES
             :.:. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
Mouse D4     GGHGGAGRAEPEGTPQGLVPGVVAAVVAAGAVSSFVAYQRRRLCFREGG-----

Human CD99  HRNANAEPAYQRTLLEK
             . .:
Mouse D4     -----SAPV-----

```

그림1. 인체 CD99와 마우스 D4 아미노산 배열비교

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내의 기술동향 및 수준

국내에서는 지금까지 여러 학자에 의해 기존에 알려진 단백질 질환과의 연관성에 대한 연구가 진행되었으나, 새로운 단백군을 찾고 그 기능을 인체질환과 연결하여 질병의 발병 기전을 밝힌 경우는 비교적 드물다고 할 수 있다. 국내에서 본 기술과 관련된 인력 및 시설은 선진국과 비교하여 양적으로는 절대 열세이나 질적으로는 큰 차이가 없다고 생각된다. 그러나, 국내에서는 단백질 기능을 규명하는 연구가 선진국에 비해 활발하지 못하고, 이것은 이들에 대한 국가적 관심이 다른 선진국에 비하여 부족함을 나타낸다.

제 2 절 국외의 기술동향 및 수준

최근 선진국에서는 정부 주도로 알려지지 않은 단백을 찾고 이의 기능 및 인체질환과의 연관성을 분석하는 기능을 중심으로 한 유전자 연구를 생물의약 분야의 핵심기술분야로 간주하여 그 중요성을 부각시키고 있다. 특히, 악성 림프종을 포함한 혈액종양은 흔한 질병으로 전세계적으로 널리 연구되어 지고 있는 질병들이며 각종 단백질이 이들의 병태생리에 어떤 역할을 할 것인가는 매우 중요하게 간주되고 있다. 기술적인 측면에서 형질전환 마우스를 만드는 기술에서 외국의 일부 기업은 무차별적으로 녹아웃 마우스를 만드는 실정이나 그 표현형의 분석에서 어려움을 겪고 있으며 이는 숙련된 병리의사들이 이 부분의 연구에 참여하는 비율이 낮기 때문으로 생각된다.

제 3 절 현 기술상태의 취약성

국내(본 연구팀)기술	국내 기술/ 국외 기술	국외 기술
단클론 항체의 생산	100	100
유전자 이식 마우스의 제조	70	100
유전자 knockout 마우스의 제조	20	100
항체를 이용한 유전자 기능 연구	90	100
유전자 변형마우스의 표현형 분석	100	100
질병 치료제 개발 및 상품화	20	100
유전자 변형 마우스를 위한 동물 facility	40	100

현재 국내에서 본 기술수준은 선진국과 비교하여 기술수준 및 여건은 큰 차이가 없다고 보이나, 본 기술을 이용하여 국제적으로 검증되고, 상품화에 성공된 사례는 비교적 드물다. 그러나, 향후 4-5년간 국내에서 독자적으로 연구개발된 본 기술을 이용하여 면역 단백질군의 인체 면역계 질환에서의 역할 및 이 단백질들을 표적으로 하는 치료제의 개발에 앞장선다면, 앞서 CD99단백 연구에서

입증된 바와 같이 5년 이내에 선진국과의 격차는 거의 없을 것으로 추정된다. 특히, 형질 판독기술은 병리형태 분석이 중요한데, 병리학과 기초 생물학적 바탕이 확실한 본 연구팀의 질환 모델의 형질 판독 기술은 국내외에서 생산될 각종 유전자 이식 생쥐들을 연구하는데 큰 반향을 일으킬 것으로 사료되는 바이다. 나아가 이러한 기술은 다른 단백질 연구에도 큰 영향을 주고, 21세기 생물학 및 의학의 보고랄 수 있는 유전자의 기능적 연구에 큰 도움이 될 것이다.

제 4 절 앞으로의 전망

수 만 종의 알려지지 않은 유전자중에서 인체 질환과의 연관성이 있는 유전자를 찾고 이를 토대로 새로운 치료제를 개발하는 것은 전 세계 모든 제약회사 및 생명공학 회사들이 목표로 한다. 이들은 각종 질환에 그 원인으로 작용하는 단백을 찾고, 이들 유전자로 형질전환 또는 녹아웃 생쥐를 거의 자동화되어 생산하고 있다. 특히, 생산된 이들 유전자 이식 생쥐의 미세한 이상을 찾아내는 형질 분석은 병리 형태 분석이 그 핵심이며, 향후 수많은 질병 모델 확립에 가장 중요한 기술로 자리매김할 것이다. 이는 향후 생물산업, 의약산업의 기초 핵심 기술로서 치료제, 진단 시약을 개발하는데 이용되고 있다. 이러한 기능이 알려지지 않은 단백질의 기능을 밝히고, 이를 토대로 치료제를 개발하려는 움직임은 그 성공여부에 따라 21세기 회사 및 국가 산업경쟁력을 좌우할 만큼 그 위력이 크다고 할 수 있다. 향후 본 기술은 아직 밝혀지지 않은 유전자를 중심으로 이들의 기능을 분석하는 방식으로 전개될 것이고, 이에 따라 더욱더 그 기술의 수요는 증가되리라고 추정되는 바이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 개발 방법

1. 마우스 D4 유전자에 대한 단클론 항체 생산 및 정제
 - 마우스 흉선 세포 cDNA library 스크리닝으로 D4 유전자의 full cDNA sequence 확보
 - D4 유전자의 세포막외 (extracellular fragment) 부위와 GST-fusion 단백질 생산
 - Lew rat에 면역, poly sera 확보. 단클론 항체를 생산하는 hybridoma clone 확보
 - 얻어진 항체들을 FITC, PE, Biotin들과 결합하여, 실험에 이용함
2. D4 항원의 마우스 조직 장기 별 분포 파악

정상 마우스들의 각 장기로 부터, 세포 및 조직을 얻어 D4 항원의 분포를 확인하였다

 - Northern Blotting: 간, 폐, 심장, 신장, 비장, 흉선, 뇌, 난소, 고환에서 RNA 추출
 - Western Blotting: 흉선과 뇌 조직으로부터 단백질 추출
 - 면역 조직 화학 분석: 냉동 보관된 조직 혹은 파라핀 포매 조직에 D4-Biotin + Avidin-biotin-complex에 의한 immunoperoxidase 염색법 이용하여 발색.
 - 유세포 측정 분석 : 마우스의 흉선세포, 말초 혈액세포, 비장세포, 임파선 세포들을 FITC, 혹은 PE가 결합된 D4 항체들로 염색후 FACs analysis.
 - In Situ Hybridization: D4의 antisense-RNA, 와 Sense-RNA를 probe로 냉동 보관된 마우스의 각 장기와 배아 및 태아에 대해 hybridization.
3. 단클론 항체의 시험관내 기능 분석
 - D4-Fc 과 D4-Histidine Tag 잡종 단백질 생산 및 이 단백질들을 이용한 세포 염색
 - D4 유전자의 세포막외 부분을 인체 면역 글로블린의 Fc 부위와 연결시키는 유전자 construct 제작.
 - D4 유전자의 세포막외 부분과 Histidine을 연결시키는 유전자 construct 제작
 - 두가지 유전자 construct를 293T 세포에 transfection 후 세포 배양액으로부터 분리된 각 단백질 정제, 농축 후 다른 마우스 세포와 반응시키고 이차 항체로 염색하여 유세포 측정, 혹은 면역조직 화학법 으로 발색.
 - D4 항체 처리로 인한 세포사 측정

D4 항체와 이차항체 goat anti-rat Ab를 흉선 세포에 처리한후 시간별로 AnnexinV-FITC/PI staining으로 early apoptosis와 late apoptosis 에 있는 세포의 percentage를 FACs analysis로 확인

- D4 항체처리에 의한 면역 조절물질 분비 및 세포 분화의 변화
 - 마우스의 비장세포에 D4 항체와 2차 항체 처리후 세포배양액에서 나오는 IL-4, INF-r의 분비량을 ELISA로 측정
- D4 항체 처리에 의한 homotypic aggregation의 관찰
 - 마우스 비장세포에 D4 항체와 2차 항체로 처리한 후 배양 시간에 따른 aggregate 형성을 현미경 하에서 관찰.
 - 또한 세포 배양액에 EDTA, EGTA Klazadic acid, cytochalasinD, socium Azide 등을 처리하여 aggregate 형성도를 동시에 측정

4. D4 변형 유전자 클로닝

- D4 full length과 D4 TMDN (D4 extracellular + CD4 transmembrane + CD4 cytoplasmic domain), D4 DN (D4 extracellular + D4 transmembrane + CD4 cytoplasmic domain)의 세가지 유형의 단백 발현
- 각각의 유전자들을 mammalian expression vector인 pCI-neo vector에 클로닝
- D4full-, D4TMDN, D4DN-pCI-neo vector들을 각각 293 T 세포에 transfection후 3일 배양
- 세포들을 D4에 대한 항체로 유세포 측정. 세포 부유물을 전기영동후, D4에 대한 항체로 western blot

5. D4 유전자의 기능 in vitro 분석

- D4 단백 신호전달에 의한 세포 변화 분석을 위해, eptiope를 알고 signaling을 전달하는 항체 신호전달을 하기위하여 CD99-D4 잡종 단백 유전자 생산
 - CD99의 세포막외 부위 와 세포막 부위와 D4의 세포질내 부위를 연결시킨 유전자 제작
 - CD99-D4 유전자를 retrovirus vector에 클로닝-> virus packaging cell line에 transfection -> virus solution을 마우스 종양 T 세포주 EL-4에 transduction-> limiting dilution하여 CD99-D4를 과발현하는 세포주 확립
- CD99-D4 잡종 단백질의 과발현과 신호전달에 의한 변화
 - CD99-D4 잡종단백이 과발현되는 세포주의 CD3, CD4, CD8 단백질의 발현정도를 유세포 측정법으로 확인
 - CD99-D4 단백을 CD99에 대한 항체 (DN16)와 이차 항체로 신호를 전달한후 각 단백질의 발현 정도 변화를 유세포 측정법으로 확인

6. D4 유전자 형질전환 마우스의 표현형 분석

- D4DN 단백질의 경우 D4 단백질의 cytoplasmic domain이 없는 변형 단백질이므로, 이 단백질이 과발현될 경우 D4 단백질의 ligand 에 대한 경쟁으로 D4의 정상적인 신호전달이 차단될 것이라는 가정하에 D4DN 유전자가 과발현되도록 형질 전환 마우스 제작

- founder mouse를 꼬리 DNA의 PCR 및 southern blot으로 확인하여 2마리 확립
- heterozygote들 끼리 교배를 하여 Tg homozygote, heterozygote를 얻고 정상 마우스와 비교실험
- 각 세대 마다 형질 전환 마우스들을 1년 이상 관찰하면서, 발병여부 및 각 장기의 histological study를 통하여, 비정상적인 phenotype을 검색
- 특히 흉선세포, 비장 세포의 각 세포군들의 분포 현황을 유세포 측정으로 확인

7. D4 유전자 적중 마우스를 위한 genomic study

■ Genomic southern blotting

- B6 마우스의 genomic DNA를 꼬리로 부터 추출하여 southern hybridization 실시

■ Genomic library screening

- BAC clone library를 구입후 amplify한 후 Southern hybridization에서 signal이 강한 부위를 탐색자로 하여 library screening
- 본 연구실에서 양성 clone을 찾지 못한후 BAC clone을 찾는 전문 회사인 미국 Resgen사와 Incyte genomics사에 의뢰

■ Random KO 마우스 시도

- Random KO 마우스를 제작는 미국 Lexicon 사에 D4 유전자에 대한 random KO screening 의뢰

■ DATA base search 및 이를 이용한 genomic PCR과 chromosomal localization

- D4 cDNA 염기서열과 Trace Archive Database에서 얻은 부분적인 genomic sequence를 바탕으로 하여 추정되는 모든 exon에 대한 primer를 제작하여 역으로 exon 바깥에 해당하는 intron 부위들에 대한 PCR를 시도하여 조각들을 모자이크로 연결
- D4 유전자에 대한 염색체상 위치를 확인하기 위하여 D4 유전자의 2 kb genomic clone을 biotinylation시키고, 이를 탐색자로 하고 streptavidin-FITC를 이용한 FISH 기법으로 D4 유전자의 chromosome 위치 확인

■ 다른 종 개체들에 대한 PCR 및 염기 서열 분석

- Cercopithecus aethiops, Mus musculus, Rattus norvegicus, Cricetulus griseus, Xenopus laevis등의 동물에서 CD99의 호몰로그를 찾아 비교 분석 phylogenic tree 분석 후 진화적 거리 확립
- 얻어진 phylogenic tree와 CD99, D4 유전자의 염기서열을 마우스 유전자에 대한 심사기관인 미국의 Jackson Laboratory 연구소에 보내어 D4 유전자가 CD99의 마우스 호몰로그인지를 심사요청.

8. CD99 분자의 기능연구

CD99 분자의 T 세포에서의 역할 및 신호 전달 체계의 확립은 D4 유전자 기능의 추정에 대한 근거로 필요. CD99 단백질과 CD3단백에 대한 동시 신호 전달이 T 세포 활성화에

미치는 영향을 평가하고자 함.

■ CD99+CD3 신호 전달에 의한 T 세포의 향상된 활성화 측정

- CD3에 대한 항체를 suboptimal에서 optimal 수준까지 그 농도를 달리하면서, 동시에 CD99 항체를 처리한 경우 그렇지 않은 경우로 나누어 말초 혈액내 T 세포의 세포 분열정도를 3H-Thymidine uptake 기법으로 측정 비교하고 marker인 CD69 항원에 대한 발현정도를 유세포측정으로 확인.
- CD99+CD3 에 의한 T 세포 수용체에 의한 활성화 측정을 각 세포 부유물에서 TCR ζ 의 인산화 정도를 TCR ζ 에 대한 항체로 immunoprecipitation을 하고 다시 phosphorylated tyrosine (PY)에 대한 항체를 이용한 western blot으로 확인

■ CD99에 의한 보조 신호전달 기전 확인

- CD99 ligation에 의한 lipid raft의 변화를 GM1-FITC를 이용한 유세포 측정으로 확인
- CD99, CD99+suboptimal CD3, optimal CD3 처리후 세포의 부유물을 sucrose gradient ultracentrifuge 후 각 fraction을 lck 와 CD45 에 대한 항체로 western blot 하여 lipid raft와 heavy membrane fraction을 구별
- 각 fraction에서 TCR ζ 에 대한 항체로 western blot을 하여 TCR ζ 단백질의 lipid raft로의 유입 정도를 비교
- lipid raft fraction에 존재하는 PY 기를 함유하는 단백질의 양을 anti-PY 항체로 immunoprecipitation을 한 후 이를 다시 anti-PY 항체로 western blot
- 각 조건에 따른 lipid raft의 분포 변화를 확인하기 위하여 각 조건 처리후 세포를 고정하고 CTx-B-FITC로 염색한 후 confocal microscopy

9. 인체 JL1 항체의 대량 생산 및 정제

- JL1 항체를 생산하는 hybridoma를 대량 배양하여 그 배양액에서 bio-reactor를 이용하여 항체 분리
- JL1 항체를 이용하여 immunoprecipitation 방법으로 흉선세포 부유물에서 JL1 항원을 분리 정제
- 농축된 JL1 항원을 마우스에 주사하여, 다른 종류의 JL1에 대한 단클론 항체 확보
- 다시 이 단클론 항체들을 생산하는 hybridoma 의 배양액으로부터 각 단 클론 항체의 순수 분리 정제

10. 인체 JL1 단백질의 아미노산 서열 확인

- 흉선세포 부유물로부터 JL1 항원의 immunoprecipitation방법이 효율이 낮아 당단백 분리에 효과적인 lectin column을 이용하여 분리
- 농축된 JL1의 확인은 전기영동후 통상적인 coomassie blue staining이 아닌 cyroruby 염색을 이용
- 농축된 JL1 항원을 trypsin 처리후 단백을 조각낸 후 MS/MS column으로 각 조각

에 대한 아미노산 서열 확인

11. 인체 JL1 단백 유전자의 클로닝

■ Bacterial expression을 이용한 cDNA library screening

- 인체 흉선세포의 mRNA로부터 cDNA 만들어 bacteriophage expression vector인 λ gt11에 library를 제작.
- Phage library를 bacteria host에 infection 시키고 단백질 합성을 유도한후 JL1 항체와 125I-rabbit anti mouse 이차 항체를 이용하여 library 스크리닝

■ Mammalian expression screening

- Bacterial expression 스크리닝으로 양성 클론을 잡지 못하여 mammalian expression vector에 library 제작
- cDNA library vector를 293T 세포에 transfection, 3일후 세포에 JL1 항체를 binding 시켜 JL1을 표현하는 세포를 유세포 측정으로 확인
- JL1 항체에 반응하는 세포를 sorting하여 이 세포들로부터 vector를 추출하고 다시 vector를 large prep하여 2차로 293 T 세포에 transfection하고 3일 후 세포에 JL항체로 유세포 측정

■ Retrovirus를 이용한 expression screening

- mammalian expression screening으로 JL1에 대한 항원 유전자 확보에 성공하지 못한 이유중 하나가 흉선세포에 너무 다양한 항원이 발현되기때문이라고 판단. JL1의 발현이 높은 종양 T 세포주 CEM 세포의 cDNA library 제작하기로 전략 선회.
- Transfection에 의한 유전자 도입의 효율이 낮아 expression cloning이 안되었다고 판단하여 retrovirus system을 도입하기 결정
- CEM 세포에서 cDNA를 만들고 이를 retrovirus vector에 library 제작-> packaging cell line에 transfection
- virus 배양액을 293 세포에 transduction. 7일 후 세포를 JL1 항체로 염색, 양성인 세포군 확인
- 이 세포들을 2차, 3차 배양하여 JL1 항체에 반응하는 세포수 증폭. limiting dilution으로 subclone하여 JL1 항체에 100% 인 세포주 확립
- 세포의 DNA에서 retrovirus primer를 이용해 vector내에 있는 JL1 항원 유전자를 PCR로 증폭, pGEM-T vector에 클로닝 후 sequencing
- 다시 이 유전자를 mammalian expression vector에 클로닝하여 293T 세포에 transfection 한 후 JL1 항원으로 염색하여 이 유전자가 JL1 항원의 유전자임을 확인

12. 마우스 JL1 유전자의 탐색 및 클로닝

- JL1 항원의 유전자 클로닝 결과 CD43인 것으로 밝혀짐에 따라, mouse CD43유전자 서열을 자연적으로 확보.
- JL1 항체에 의한 인지능이 다른 CD43 항체와 다르다는 것을 확인.

제 2 절 연구 결과

번호	세부연구 개발목표	연구 결과
1	마우스 D4 유전자에 대한 단클론 항체 생산 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 세포막외 (extracellular fragment) 부위를 GST 단백을 만드는 벡터에 클로닝하여 GST-D4 잡종 단백을 박테리아에서 대량 생산 하였다. ○ 대량 생산된 GST-D4 단백을 Lewis rat 의 복강에 반복 주사한후 비장 세포로부터 단클론 융합세포들을 만든후 D4 단백질에 특이적인 5개의 클론들을 확립한후 EJ1-5라 명명하였다. ○ 특히 D4에 대한 affinity가 높은 EJ2 와 EJ5를 선택하여배양한 이 배양액으로부터 항체들을 분리 정제하고 FITC, PE, Biotin 등과 결합한후 실험들에 이용하였다.
2	D4 항원의 마우스 조직 장기 별 분포 파악	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정상 B6 마우스의 각 장기로부터 RNA를 추출하여, D4 유전자 탐색체를 이용하여 Northern blot을 수행한 결과, 모든 장기(간, 폐, 심장, 신장, 비장, 흉선, 뇌, 난소, 고환)에서 고루 분포됨을 확인하였다. (Fig.1) ○ 흉선과 뇌 조직으로부터 적출된 단백질에 Biotin이 결합된 D4에 대한 항체를 이용하여 western blot을 실시한 결과 이 두 조직으로부터 D4 단백질이 발현됨을 확인하였으며, 미성숙 흉선세포들의 발달 단계에 따라 D4 유전자의 발현이 낮아짐을 유세포 측정으로 확인하였다. ○ 비장세포내 T 세포와 B 세포에 대한 발현 비교에 있어서 B 세포군에 발현이 약간 더 높으며, 특히 germinal center에 있는 B 세포군에서 표현 정도가 더 높음을 유세포 측정으로 확인하였다. ○ 냉동 보관된 조직과 파라핀 포매 조직을 이용한 면역 조직 화학분석에 D4에 대한 항체의 이용에 있어서 이 항체들의 affinity가 충분하지 못함을 발견하였다.
3	D4 단클론 항체의 시험관내 기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 세포막외 부분을 면역 글로불린의 Fc 부분 과 연결 혹은 Histidine Tag 과 연결시킨 잡종 단백을 생산하였고 이를 D4 항원의 리간드를 찾는 데 이용하였으나, 이 잡종 단백질에 binding하는 세포를 찾지 못하였다. ○ B6 마우스의 흉선세포를 추출하여 D4 단클론 항체로 처리하여 이로 인하여 세포사에 미치는 영향을 측정한 결과 이 항체를 이차항체로 cross-link 시킬때 세포사멸이 다른 control에 비하여 증가함을 확인하였다. 이 결과는 D4의 유전자 서열 및 아미노산 서열의 유사성과 더불어 D4가 인체 CD99의 호몰로그임을 시사한다. ○ B6 마우스의 비장 세포를 추출하여 D4에 대한 항체와 마우스 CD3에 대한 항체를 처리하고 이차항체로 cross-link 시킨 결과, Th1 분화와 밀접한 IFN-γ의 분비가 많아, D4의 기능이 T 세포의 Th1 분화에 관련있음을 확인하였다. D4가 인체 CD99의 호몰로그임을 시사한다.(Fig.2) ○ B6 마우스의 비장 세포를 추출하여 D4 항체와 이차항체 처리에 의해 세포가 동질 결합 (homotypic aggregation)이 증가하였으며, 이는 Cytochalasin D, Okazadic acid, EDTA, EGTA등의 처리에 의해 저해되었음. 이 결과는 D4 처리에 의한 homotypic aggregation이 세포골격(cytoskeleton)과 연관되었음을 시사한다.
4	D4 변형 유전자	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 각 부위에 대한 발현 양상에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 세포막 외 부위는 남기고 세포 막 부위와 세포질내 부위를 CD4 단백질의 그것들과 치환된 잡

	<p>중 단백들을 합성할 수 있는 유전자 construct를 만들었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 이 유전자들을 293 세포에 유전자 도입을 시도하여 western blot을 한 결과 세포질 부위만 치환된 것은 발현되나, 세포막부위+세포질 부위가 CD4 로 치환된 단백질이 세포내에서 단백질의 안정도가 떨어지는 것을 확인하였다. (Fig.3) ◦ 따라서 세포질내 부위만 CD4 단백질로 치환된 잡종단백(D4DN) 의 경우 D4에 대한 신호가 전달될 수 없으므로, 이 단백을 과발현시키는 형질전환 마우스를 제작하는데 이용하였다. ◦ antisense-D4 유전자 construct를 만들어서 세포에 과발현 시켰으나, antisense에 의한 효과가 미비하였다.
5	<p>D4 유전자의 기능을 in vitro에서 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ D4 에 대한 항체가 D4에 대한 affinity가 높지 않으며, epitope에 대한 분석이 완전하지 않은 이유로 D4를 통한 신호전달에 대한 역할을 규명하는데 미흡함을 확인하였다. ◦ 따라서, D4의 세포막외 부위를 인체 CD99로 치환한 단백을 생산하여 CD99에 대한 항체로 신호를 주었을때, D4를 통한 신호전달을 확인할수 있도록 CD99-D4 잡종 단백을위한 유전자 construct 제작하여 293 T 세포에 유전자 도입하여, 이 유전자 construct로부터 잡종 단백질이 안정하게 발현됨을 확인하였다. ◦ 이 유전자 construct를 tumor T 세포주 (EL-4)에 발현이 높게 되도록, retrovirus를 이용한 construct 제작하여 CD99-D4 잡종 단백질이 과발현되는 세포주를 확립하였다. ◦ CD99-D4 잡종 단백질의 과 발현으로 인하여, EL-4 세포주에서 정상적으로는 발현되지 않는 CD8 단백질이 발현되기 시작함을 발견하였다. ◦ D99-D4를 발현하는 세포주에 CD99에 대한 항체와 이차 항체를 처리한후 세포 표면 단백질의 발현 변화를 확인한 결과 CD3, CD4, CD8 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다. (Fig.4) ◦ 이 결과 또한 D4가 인체 CD99의 마우스 호몰로그임을 강력히 뒤바침한다.
6	<p>D4 유전자 형질전환 마우스의 표현형 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ D4의 신호전달이 이루어지지 않는 D4DN 잡종 단백질 (D4 extracellular+ D4 transmembrane+ CD4 cytoplasmic domain)을 만드는 유전자 construct로 형질 전환 마우스를 2라인을 확립했다. ◦ 혈액림프계 세포발달의 표지가 되는 여러 항체를 이용하여 유전자이식마우스의 흉선, 비장, 림프절, 말초혈액의 면역세포들을 FACS analysis한 결과 litermate와 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. ◦ 유전자이식마우스의 여러 장기에서의 형태학적 이상여부를 histochemical staining을 통하여 관찰한 결과 litermate와 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. (Fig. 5) ◦ 유전자 이식 마우스와 대조군을 SPF 조건에서 1년간 관찰한 결과 종양, 면역질환 등의 발병여부등의 차이를 litermate와 비교하였으나 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. ◦ 이런 결과를 바탕으로, 비록 D4의 cytoplasmic domain이 없는 D4DN이 D4의 신호전달을 방해할지라도, 소량이라나마 정상 D4가 발현되는 한 D4DN4에 대한 효과를 볼 수 없음을 알았다. ◦ 위의 CD99-D4를 이용한 실험관내 실험결과와 종합해서 판단하면, D4DN을 이용한 형질 전환 마우스 보다는 D4 자체의 과발현 형질 전환 마우스제작이 D4 기능확인을 위한 형질전환에 유용할 것이라 판단한다.

7	D4 유전자 적중 마우스	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 적중 마우스 제작을 위하여, genomic southern blotting을 D4 유전자에 대한 cDNA를 탐색자로 실시한 결과 마우스 genome 내에 D4 유전자가 들어있음을 확인하였다. (Fig. 6) ○ 같은 탐색자로 마우스의 genomic library인 BAC library 스크리닝을 여러차례 시도하였으나, 아무런 양성 클론을 잡을 수 없었다. 이후 미국의 Resgen사와 Incytegenomics사 두 군데에 의뢰하였으나, 두 회사들도 D4 양성 BAC 클론을 확보하지 못하였다. ○ D4 deficient 마우스를 얻기 위한 일환으로 random KO 마우스중 D4 에 해당하는 KO 마우스를 찾는 시도를 하였으나, 미국 Lexgen사에서 얻은 random KO 마우스에서 D4 RNA가 발견됨으로써, random KO 마우스에서 D4 KO 마우스를 찾는 것이 불가능하게 되었다. ○ D4 cDNA 서열을 이용한 마우스 genome data base search 한 결과, 오로지 1.9 kb의 genomic sequence만 찾을 수 있고, 아직도 genbank database에서 염색체 위치가 밝혀지지 않은 불완전한 서열로 분류되고 있다. ○ 여러 가지 시도가 성공하지 못함에 따라, 실험실내에서 직접 genomic sequence를 일일이 밝혀내는 일을 시도하기로 결정하였다. ○ 그 일환으로 mouse D4 cDNA의 염기서열과 Trace Archive database에서 얻은 부분적인 genomic sequence를 바탕으로하여 추정되는 모든 exon을 각각의 exon 특이 primer를 제작하여 9개의 작은 유전자 조각으로 증폭한 후 염기 서열을 분석하였다. ○ 그결과 마우스 D4 유전자의 전 coding sequence를 포함하는 전체 genomic sequence는 약 4.5kbp의 유전자 서열을 확보하였으며, sequence를 GenBank(accession number AY26235)에 등록하였다.(계획하지 않은 연구 성과) ○ D4의 마우스 염색체상 위치가 Chr #4에 있음을 FISH기법으로 확인하였다. (계획하지 않은 연구성과) ○ D4의 cDNA 염기서열은 9개의 exon으로 구성되어 있는 반면, sequencing을 통해 얻어진 D4의 genome은 한 개의 exon이 추가되어 (E1b) 모두 10개의 exon으로 나누어져 있다. 추가된 exon은 D4-1 pseudogene을 형성하는데, D4 cDNA는 E1a와 E2-E9로 구성되고, D4-1은 E1b와 E2-E9로 구성된다. (Fig.7) ○ 이러한 D4 유전자의 genomic 서열을 얻기위한 실험을 진행하는 동안 다른 종의 개체들의 genomic 서열 분석을 시도하여 이 유전자의 phylogeny를 확립하였다. (계획하지 않은 연구성과) ○ 각종의 genomic 서열 분석으로 얻어진 이 유전자의 phylogenetic tree를 바탕으로 마우스 유전자 명명 심사기관인 Jackson 연구소로부터 D4 유전자가 인체 CD99의 ortholog 임이 심사 후 인정되었다.
8	CD99 분자의 기능 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 유전자의 기능을 확인하기 위한 일환으로 인체 tumor T 세포주 (Jurkat)에서 인체 호몰로그인 CD99 단백질의 기능을 확인하였다. ○ CD99 단백질은 인체 CD3를 통한 T 세포 활성을 증가시켰다.(Fig. 8) ○ CD99에 의한 신호는 CD3ζ chain의 인산화, 다른 신호전달 물질의 인산화등을 증가시키는 메커니즘을 이용하였다. (Fig.9) ○ CD99 단백질은 특히나 CD3 신호전달에 있어서 중요한 microdomain인 lipid raft 내에 CD3ζ chain의 유입을 증가시키는 역할을 하였다.

		<ul style="list-style-type: none"> ○ CD99를 통한 신호전달에 의해 CD3ζ chain의 lipid raft 내의 농도가 증가하게 되고, 동시에 CD3 ligation이 있어야만 신호전달이 일어났다. (Fig. 10) ○ 즉 CD99 신호와 적은양이나마 CD3 ligation 신호가 있으면, 증가된CD3ζ chain에 의해 적은양의 신호라도 적절한 신호로 증폭이 되어 적정의 T 세포 활성화 일어나게 됨을 확인하였다. 이 결과들로 CD99는 CD28 만큼이나 강력한 보조신호 전달 물질임이 밝혀졌다. (J.Exp.Med) ○ CD99 항체 처리후에 나타나는 인체 흉선세포의 세포사 및 세포 표면 단백질의 발현 증가 현상이 MHC class II 에 대한 항체를 동시 처리함으로써 감소되는 것을 관찰하였다. ○ CD99에 대한 두개의 항체 DN16 과 YG32 가 binding하는 epitope mapping으로 두 항체가 서로 다른 부위에 반응하는 것을 확인하였다. (계획하지 않은 연구 성과)
9	인체 JL항체의 대량생산 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> ○ Bio-reactor를 사용하여 JL1 항원에 반응하는 YG5 잡종융합 세포주에서 생산되는 항체를 정제하여 6 mg 이상의 항체를 얻었다. ○ 정제된 항체를 이용하여 인체 흉선세포의 세포 부유물로부터 JL1 항원의 분리 및 정제를 시도하였다. ○ 기존의 JL1 항체 하나로만 항원 정제 및 유전자 클로닝이 비 효율적인 것을 인식하여, JL1에 대한 항체를 더 확보하기 위하여 JL1 에 대한 항체 생산을 시도 2 종의 다른 항체를 생산하였고, 이 항체들이 JL1 항원을 인식함을 정제된 JL1 항원에 대한 western blot 과 유세포 측정으로 확인할 수 있었다.
10	인체 JL1 단백질의 아미노산 서열확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ JL1 항체를 이용하여 JL1 항원의 순수 분리 및 정제를 반복하는중 JL1 항원이 당단백인 것을 확인하였다. 이후 분리 방법을 Lectin column을 도입하는 것으로 변형하였고, 특히 Jachalin를 이용한 column이 가장 효과적이었다. ○ 분리 및 정제된 JL1 항원의 gel 염색하는 것도 통용되는 방법인 coomassie staining 법을 하지 않고, cyproruby 염색을 시도하여 분리된 JL1 항원의 양을 정확히 측정할 수 있었다. (Fig. 11) ○ 이와 같이 변형된 방법으로 농축된 JL1 항원을 다량으로 확보하였으며, 이를 MS/MS 방법으로 아미노산 서열 분석을 시도하였으나, JL1 아미노산 서열 분석을 위하여 trypsin으로 digestion 하는데 실패하여 JL1의 아미노산 서열을 밝힐 수 없었다. 하지만 뒤이은 Expression cloning에 의한 유전자 서열 분석으로 아미노산 서열은 자연스럽게 확보되었다.
11	인체 JL1 단백질의 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ○ JL1 단백질의 유전자 클로닝을 위하여 인체 흉선세포의 cDNA library를 bacteria에서 단백을 발현시킨후 JL1 항체를 이용한 스크리닝을 library 10¹⁰ 수준에서 시도하였으나 양성인 클론을 잡지 못하였다. ○ 인체 흉선세포의 cDNA library를 pCDNA3 vector에 만든후 293 T 세포에 library를 transfection한 후 JL1 항체를 이용한 expression cloning을 10⁹ library 수준으로 시도하였으나 양성인 세포를 얻을 수 없었다. ○ JL1 항체 하나로만 expression cloning 하는 것이 불가능한 것이 확인이 되어 JL1에 대한 다른 항체를 2개 (YG10, K06) 더 확보하였다. 또한 JL1이 높게 발현되는 CEM tumor 세포주를 다량 배양하여 cDNA library를 만들었고, 이를 retroviral vector에 넣어 retroviral cDNA library를 만들었다. ○ JL1 단백을 발현하지 않는 293 세포에 CEM cDNA retrovirus를 transduction한 후

		JL1 항체와 다른 2개의 항체를 섞어서 expression screening을 한 결과 양성 population을 얻을 수 있었고, 이 세포들을 증폭하여 2차, 3차 스크리닝결과 양성도가 더 높아져서, limiting dilution으로 JL1에 100% 양성인 세포를 얻었다. (Fig. 12) ◦ 이 세포로부터 retrovirus에 있는 primer를 이용하여 PCR로 vector에 들어있는 JL1 cDNA를 PCR로 증폭하고 sequencing 한 결과 JL1 항원 CD43임을 확인하였다.
12	마우스 JL1 유전자 탐색 및 클로닝	◦ JL1 단백질이 CD43임을 알게되어 마우스 JL1 단백질 클로닝은 진행되지 않았다. 대신 JL1 항체와 기존의 CD43 항체를 비교 분석하고, JL1 항체에 의한 인지능이 다른 CD43 항체와 다르다는 것을 알게되었다.

<연구결과 그림>

Northern blot analysis of D 4 in several tissues

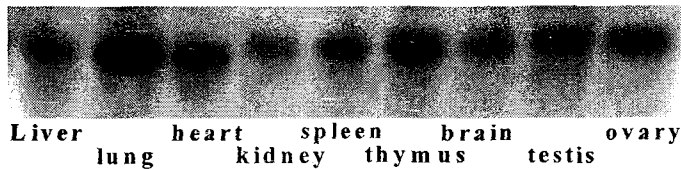


Fig.1 D4 항원의 조직별 분포-Northern Blot

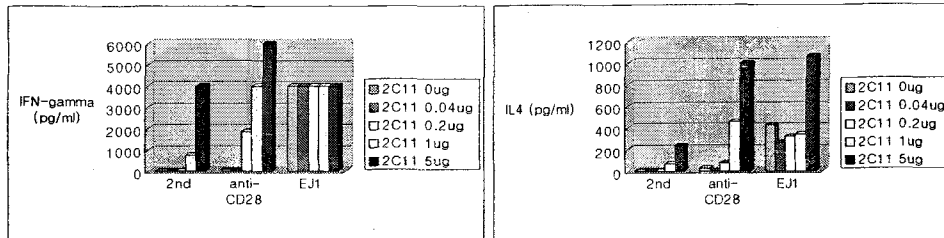


Fig.2 D4의 세포 분화에 끼치는 영향 및 조절 물질 분비 양상 조사 : IL4/IFN- γ assay

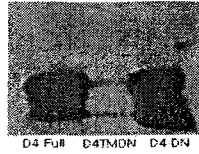


Fig.3 D4 변형 유전자 construct의 293 T 세포내 발현 유도

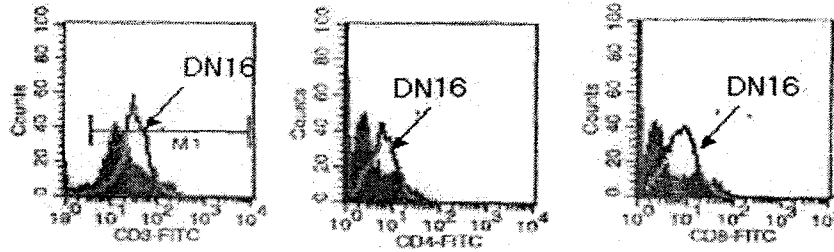


Fig. 4 CD99-D4 단백질 과발현된 세포주에서 CD99 항원처리에 의한 신호전달시 세포 표면 단백질들의 발현 증가

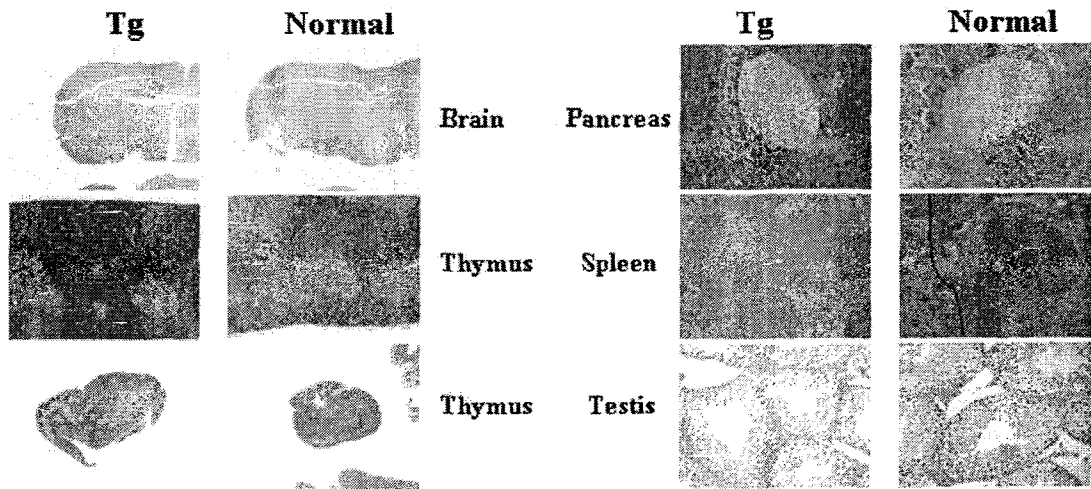


Fig. 5 D4DN 과발현 형질 전하 마우스 장기들의 조직 화학적 연구

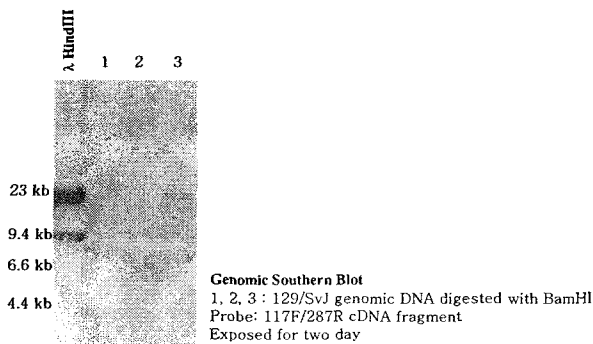


Fig. 6 D4 유전자의 genomic southern

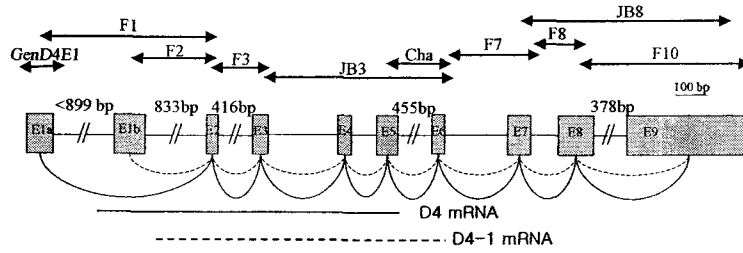


Fig. 7 Genomic structure of D4

Exon들은 박스로 표시. D4 genomic clones 은 각각의 이름으로 표시하였다. D4 와 D4-1 cDNA clone이 서로 다른 방법으로 만들어지며, 각각을 dashed line과 dotted line으로 표시하였다.

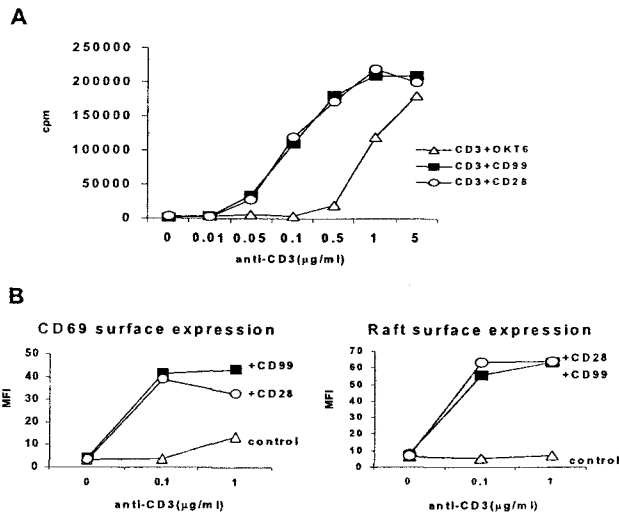


Fig. 8 CD99가 CD3 T 세포의 활성화에 CD28 만큼 강력한 보조 신호물질로 작용

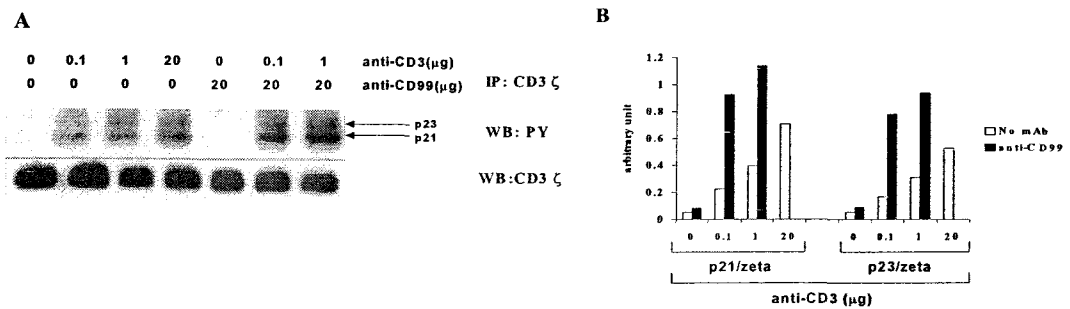


Fig. 9 CD99 처리에 의한 CD3를 통한 신호 향상으로 CD3 ζ 과 인산화 유도

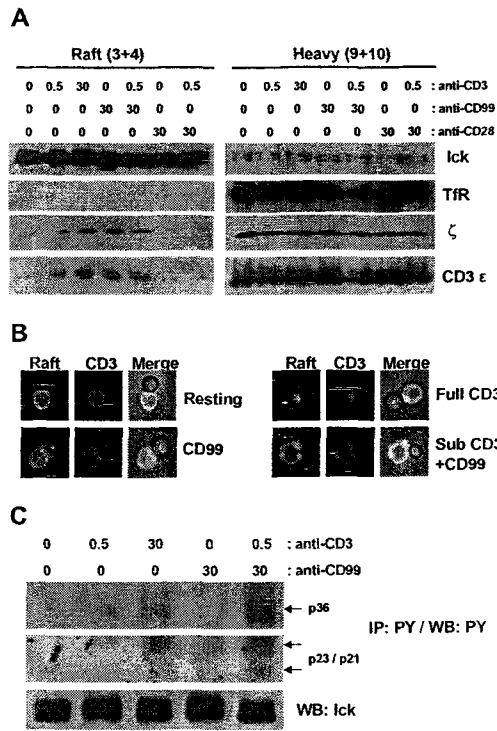


Fig. 10 CD99 처리로 CD3 ζ의 raft 내 유입증가 유도 및 CD3 관련 신호 전달물질 활성화 향상.

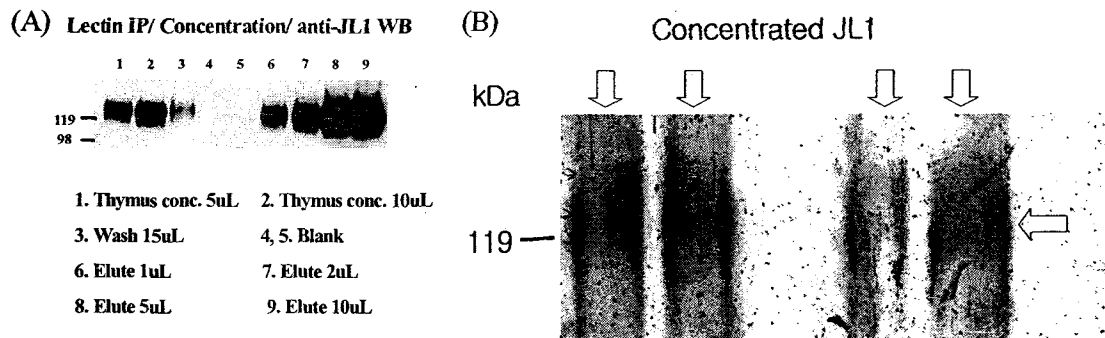


Fig. 11 JL1 단백질의 purification 과 concentration : cyproruby staining

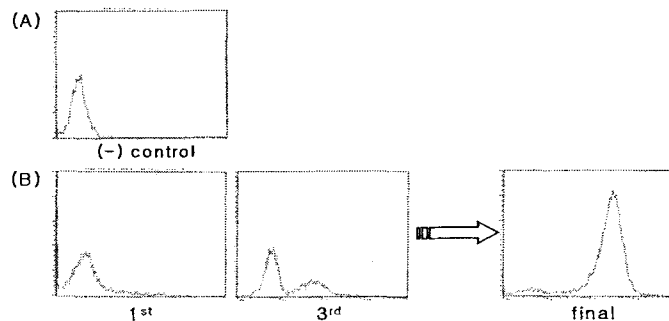


Fig. 12 JL1 항원의 유전자 클로닝

제 3 절 대표적 성공사례

1. 마우스 D4 단백질이 인체CD99 단백질의 마우스 ortholog임이 국제적으로 공인됨.

처음 인체 CD99 유전자를 클로닝한 영국의 유전학자 Dr. Goodfellow가 CD99의 마우스 호몰로그는 없다고 발표한 (1999년, Hum Mol Genet) 이후 최초로, 본 연구팀의 연구결과로 D4가 CD99의 마우스 ortholog로 미국 Jackson 연구소로부터 인정을 받고 그 염기서열을 GenBank (accession number AY26235)에 등록.

2. D4 유전자의 phylogeny tree 완성

본 연구 수행중 다양한 종 개체들에서 얻은 D4 유전자 genomic 서열 분석으로 완성한 D4 유전자의 phylogenetic tree는 환경과 생명 진화의 상호적 인과 관계에 있어서 이 유전자가 차지하는 역할과 이 유전자의 본질적 기능을 진화적 차원으로 이해하는데 있어서 초석이 되며, 진화 방향을 제시함에 있어서도 귀중한 자료가 될 것이다.

3. 강력한 보조 신호 전달 물질로서의 CD99 기능 확인

본 연구 결과 밝혀진 강력한 보조 신호 물질로서의 CD99는 대표적인 보조 신호 전달 물질인 CD28의 역할이 T 세포 활성화에 있어서 필요한 당분을 공급해주는 것으로 밝혀진 것에 비교하면, 신호 전달 관련 분자들의 재분포를 유도하고 CD3를 통한 신호 자체를 향상시킬 수 있는 유일 무이한 보조 신호 분자가 되는 것이다. 이 결과는 면역학계에 획기적인 반향을 불러일으킬 것으로 확신되며, 본 연구결과는 현재 J. Exp. Med에 심사중에 있다.

4. JL1 유전자의 클로닝

끊임없는 try and error로 결국 JL1 항체가 인지하는 항원이 CD43임이 본 연구결과 확인되었다. JL1 단백질이 CD43임을 알게되어 마우스 JL1 단백질 클로닝은 진행되지 않았다. 대신 JL1 항체와 기존의 CD43 항체를 비교 분석하고, JL1 항체에 의한 인지능이 다른 CD43 항체와 다르다는 것을 알게되었다.

제 4 절 기타 계획하지 않은 연구성과

1. D4 유전자 분석

■ D4 유전자의 Chromosomal localization

FISH 기법으로 D4 유전자가 염색체 4번(C7-D1 region)에 있음을 확인

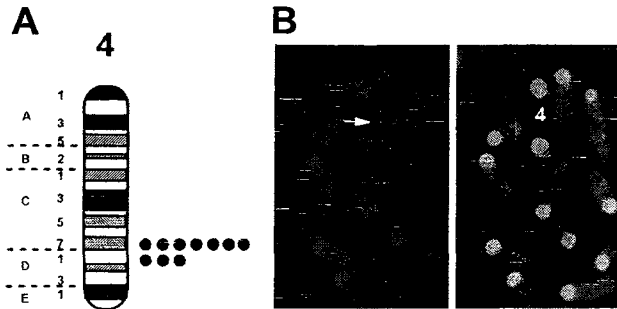


Fig.1 FISH를 사용한 D4 유전자의 Chromosomal localization

■ 서로 다른 종들 간의 CD99 단백 아미노산 서열 비교 분석

여러 종들에서 CD99 호모로그를 찾아 인간 CD99 단백질과 아미노산 서열을 비교분석하였다. Homo sapiens CD99 (hCD99), Cercopithecus aethiops CD99 (cCD99), Mus musculus CD99 (mCD99; D4), Rattus norvegicus CD99 (rCD99), Cricetulus griseus CD99 (VAP21), Xenopus laevis CD99 (xCD99) 등의 동물에서 CD99의 호모로그를 찾아 비교 분석하였다.(Fig.2) 각각의 종에 Highly conserved region(I, II, III)이 있고, 특히 Transmembrane 부분이 종들 간에 일정하게 유지됨을 알 수 있었다.(Fig.3) 이상의 내용을 바탕으로 진화상에서 CD99 와 CD99-like 2 유전자 패밀러, PBDX의 유전적 관계를 Phylogenetic tree를 통하여 확인하였다.(Fig.4)



Fig.2 서로 다른 종들 간의 CD99단백 아미노산 서열 배열. Homo sapiens CD99 (hCD99), Cercopithecus aethiops CD99 (cCD99), Mus musculus CD99(mCD99; D4), Rattus norvegicus CD99 (rCD99), Cricetulus griseus CD99 (VAP21), Xenopus laevis CD99 (xCD99). 일치하는 아미노산은 검은색 박스로 표기하였고, conserved residue는 회색 박스로 표기하였다.

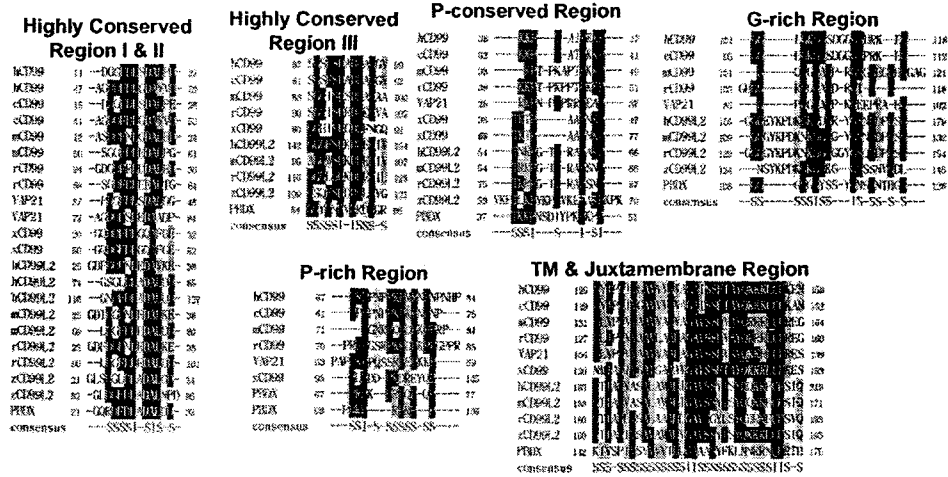


Fig.3 CD99 family member 들의 아미노산 서열 다중 배열 비교. Homo sapiens CD99 (hCD99), Cercopithecus aethiops CD99 (cCD99), Mus musculus CD99 (mCD99; D4), Rattus norvegicus CD99 (rCD99), Cricetulus griseus CD99 (VAP21), Xenopus laevis CD99 (xCD99), Homo sapiens CD99-like 2 (hCD99L2), Mus musculus CD99-like 2 (mCD99L2), Rattus norvegicus CD99-like 2 (rCD99L2), Danio rerio CD99-like 2 (zCD99), and PBDX (Claustal W multi-sequence alignment program)

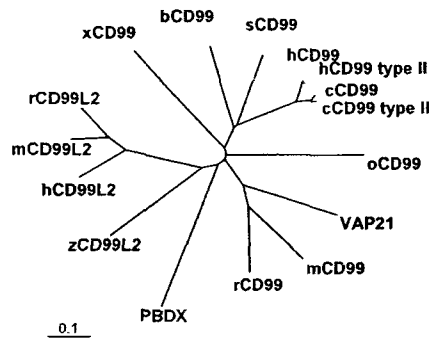


Fig.4 CD99 와 CD99-like 2 유전자 패밀리, PBDX의 유전적 관계. Phylogenetic tree는 Clustal W 에 의한 아미노산 다중 배열법으로 구성했으며, TreeView에 의해 도식화하였다. 진화적 관계는 가지의 거리에 비례한다. Database accession numbers ; NP_002405 (hCD99), U82165 (c CD99), AY262355 (mCD99), AY262357 (rCD99), AY262358 (xCD99), AY078165 (hCD99L2) AY078163 (mCD99L2), AF481858 (rCD99L2), AY078168 (zCD99L2), AAL04055 (PBDX).

2. 사람 CD99에 대한 두가지 단클론 항체 DN16과 YG32 의 epitope mapping

본 실험실 개발한 CD99에 대한 두 가지 단클론 항체의 기능적 도메인을 알아보기 위하여 DN16과 YG32의 epitope mapping을 시행하였다. CD99단백의 전부 혹은 일부와 GST 의 융합단백을 합성하여, 항체의 인지여부를 확인해 본 결과, DN16과 YG32는 각각 다른 sugar moiety를 인지하는 것을 알아내었다 (Fig.5).

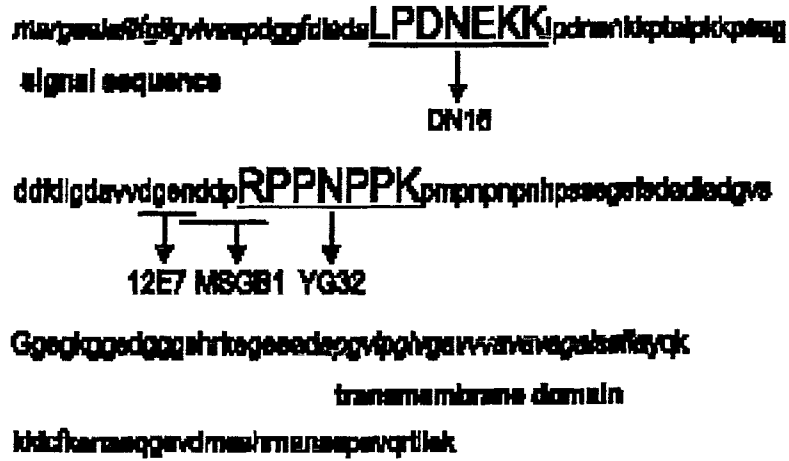


Fig.5 항 CD99 단클론 항체 DN16, YG32, 12E7, MSGB1 의 epitope 위치.

제 4 장 연구 목표 달성도

번호	세부연구개 발목표	달성내용	달성도 (%)
1	D4 단클론 항체 생산 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 세포막외(extracellular fragment)부위와 GST 단백질의 GST-D4 잡종 단백질 대량 생산 ○ 대량 생산된 GST-D4 단백을 이용하여 D4에 특이적인 5개의 클론 (EJ1-5) 확립 ○ D4에 affinity가 높은 EJ2 와 EJ5를 선택하여 항체들을 정제, conjugation 시킴. 	100
2	D4 항원의 마우스 조직 장기 별 분포 파악	<ul style="list-style-type: none"> ○ Northern blott 결과, D4 mRNA는 모든 장기(간, 폐, 심장, 신장, 비장, 흉선, 뇌, 난소, 고환)에서 고루 분포함. ○ 흉선과 뇌 조직에서 western blot을 실시한 결과, D4 단백질이 발현됨 ○ 유세포 측정 결과, 1) 흉선세포이 성숙함에 따라 D4 유전자의 발현이 낮아지며, 2) 비장세포내 T 세포에 비해 B 세포(특히 germinal center B cell)에서 D4의 발현이 더 높음 	100
3	D4 단클론 항체의 시형관내 기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 세포막외 부분을 면역 글로불린의 Fc 부분 혹은 Histidine Tag과 연결시킨 잡종 단백을 생산함. ○ B6 마우스의 흉선세포에 D4 단클론 항체를 처리한 결과 세포사멸이 증가함. ○ B6 마우스의 비장 세포에 D4에 대한 항체와 마우스 CD3에 대한 항체를 처리하여 자극하였을 때, IFN-γ의 분비가 증가함. ○ B6 마우스의 비장 세포에서 D4 항체처리에 의해 비장세포의 동질 결함 (homotypic aggregation)이 증가하였으며, 이는 Cytochalasin D, Okazadic acid, EDTA, EGTA등의 처리에 의해 저해되었다. 	100
4	D4 변형 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4 단백질의 dominant negative form을 만들기 위하여, D4의 세포 막 부위와 세포질내 부위를 CD4 단백질의 그것들과 각각 치환된 잡종 단백질 (D4-TMDN, D4-DN) 을 coding하는 유전자 construction. ○ 이 유전자들을 293 세포에 발현시켰을 때 D4-TMDN 의 발현 안정성이 떨어짐을 확인. ○ 세포질내가 CD4 단백질로 치환된 잡종단백의 경우 D4에 대한 dominant negative로 작용하여 D4 신호전달을 저해시키므로, 이 단백질 (D4-DN) 을 과발현시키는 형질전환 마우스를 제작함. 	100
5	D4 유전자의 기능을 in vitro에서 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항 D4 항체가 affinity가 높지 않으며, epitope에 대한 분석이 완전하지 않아 D4의 세포막외 부위를 인체 CD99로 치환한 CD99-D4 잡종단백을 마우스 T 세포주 (EL-4)에 발현시켜 항 CD99 항체로 자극 후 D4에 의한 신호전달 효과를 알아보았다. ○ CD99-D4 잡종 단백질의 과발현으로 인하여, EL-4 세포주에서 정상적으로는 발현되지 않는 CD8 단백질이 발현되었다. ○ CD99-D4를 발현하는 세포주에 CD99에 대한 항체를 처리한 결과 CD3, CD4, CD8 단백질들의 세포표면 발현이 증가하였다. 	100
6	D4 유전자 형질전환 마우스의 표현형 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ D4의 신호가 전절되지 않는 D4-DN 유전자 construct (D4 extracellular+ D4 transmembrane+ CD4 cytoplasmic domain) 로 유전자이식 마우스를 2라인을 확립했다. ○ 면역세포들에서 littermate와 유의한 표현형의 변화를 관찰할 수 없었다. ○ 유전자 이식 마우스와 littermate 간의 여러 장기별로 유의한 형태학적 차이를 관찰할 수 없었다. ○ 유전자 이식 마우스와 대조군간에 중앙, 면역질환 등의 발병여부 차이를 관찰할 수 없었다. ○ 소량이나마 정상 D4가 발현되는 한 D4-DN4에 대한 효과를 볼 수 없다고 판단된다. 	100
7	D4 유전자 적중 마우스	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마우스의 BAC library 스크리닝을 여러 차례 시도하였으나, 양성 클론을 잡을 수 없었고, 외국연구자들에게 스크리닝을 의뢰하였으나 이들도 D4 양성 BAC 클론을 확보하지 못하였다. 또한 random knockout mouse의 screening 결과 D4 RNA가 발견되어 이를 사용할 수 없었다. ○ exon 간 PCR을 통하여 4.5 kb 의 genomic sequence 및 organization를 확보하였다. ○ D4의 마우스 염색체상 위치가 Chromosome 4번에 있음을 FISH기법으로 확인하였다. 	90

		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 여러 species 개체들의 genomic 서열 분석을 시도하여 이 유전자의 phylogeny를 확립하였다. 	
8	CD99 분자의 기능 연구	<ul style="list-style-type: none"> ◦ CD99 단백질은 인체 CD3를 통한 T 세포 활성을 증가시키며, 이 기전은 CD3ζ chain의 인산화 및 lipid raft 내로 CD3ζ chain의 유입을 증가시키는 것이었다. ◦ CD99 항체 처리후에 나타나는 인체 흉선세포의 세포사 및 세포 표면 단백질의 발현증가 현상이 MHC class II 에 대한 항체를 처리함으로써 감소되었다. ◦ CD99에 대한 두개의 항체 DN16 과 YG32 의 epitope을 mapping하였다. 	100
9	인체 JL항체의 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Bio-reactor를 사용하여 JL1 항체를 다량으로 생산하였다. ◦ 정제된 항체를 이용하여 인체 흉선세포에서 다량의 JL1 항원을 분리하였다. ◦ 기존의 JL1 항체 외에 추가적으로 2 종의 다른 JL1 항체를 생산하였다. 	100
10	인체 JL1 단백질의 아미노산 서열확인	<ul style="list-style-type: none"> ◦ JL1 항체 및 Jachalin column을 이용하여 JL1 항원을 분리하였다. ◦ 농축된 다량의 JL1 항원을 MS/MS 방법으로 아미노산 서열 분석을 시도하였으나, trypsin으로 digestion 하는데 실패하여 JL1의 아미노산 서열을 밝힐 수 없었다. 하지만 뒤이은 Expression cloning에 의한 유전자 서열 분석으로 아미노산 서열은 자연스럽게 확보되었다. 	100
11	JL1 단백질의 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ◦ retroviral cDNA library 및 3종류의 JL1 항체로 expression cloning 결과, JL1에 100% 양성인 세포를 얻었고 이 세포로부터 cDNA를 분석한 결과 JL1 항원이 CD43임을 확인하였다. 	100
12	마우스 JL1 유전자 탐색 및 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> ◦ JL1 단백질이 CD43임을 알게되어 마우스 JL1 단백질 클로닝은 진행되지 않았다. 대신 기존의 CD43항체는 JL1 단백질이 CD43임을 알게되어 마우스 JL1 단백질 클로닝은 진행되지 않았다. 대신 JL1 항체와 기존의 CD43 항체를 비교 분석하고, JL1 항체에 의한 인지능이 다른 CD43 항체와 다르다는 것을 알게되었다. 	100

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과 CD99가 T 세포 활성화에 있어서 강력한 보조 신호 분자임이 확인되었다. 이로써, CD99 단백질이 면역 활성화 및 증강을 위한 chemical 혹은 drug screening의 target으로 활용될 수 있는 가능성이 커졌다. 현재 CD28에 대한 항체 및 CD3에 대한 항체가 면역 질환의 치료에 사용되고 있는 현실에 비추어, 본 연구에 사용된 CD99에 대한 항체는 장차 임상에 적용될 가능성이 큰 물질들이다.

- D4가 CD99의 마우스 ortholog 임이 판명되었다. 현재 CD99의 마우스 유전자를 본 연구팀이 확보한 상황에서 이 유전자에 대한 연구는 인체 CD99와 마찬가지로 인체 면역 활성화와 면역 질환에 대한 연구로 활용될 수 있으며, D4 유전자를 이용한 동물 모델은 면역 활성화제 혹은 면역 질환 치료제의 screening을 위한 동물 모델로 활용될 수 있다.
- 본 연구팀은 연구를 수행하는 과정 중에 독자적으로 개발한 기술을 이용하여, 여러 가지 항체를 개발하였고, 항체를 이용한 기능연구의 노하우를 축적하였다.
- 본 연구팀의 연구 수행과정에 쌓은 큰 업적중 하나는 phenotype data base를 구축한 것이다. 인체 유전자의 기능을 밝히기 위하여는 생쥐의 유사유전자를 찾아낸 후 이 유사유전자를 변형시킨 생쥐를 이용한 연구가 필수적이다. 본 연구팀은 순수 국내 기술로 유전자 조작 마우스 모델의 표현형을 분석하는 시스템을 확립하였다. 여러명의 전문 병리의를 주축으로 가장 기본적인 조직형태분석과 함께 CBC, chemistry 등의 혈액검사를 마우스에 맞도록 시스템을 정립하였고, 많은 trial and error를 거쳐 체계적이고 안정적인 결과가 나오는 검색체계를 구축하였다. 또한 각종 마우스들의 표현형 검색을 하는 동안 쌓인 노하우와 데이터를 인터넷 상에 데이터 베이스로 구축함으로써 타 연구자들이 참고할 수 있도록 하였다. 이로써 기존에 외국에 의뢰하던 일부 마우스 모델의 형질 분석을 국내 기술로 해결할 수 있게 되어 경제적 효과를 이룰 수 있겠으며, 보다 정밀한 검색을 통해 적절한 마우스 질병 모델을 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.
- 많은 노력 끝에 결국 JL-1 단백질의 클로닝에 성공하여 JL-1 단백질이 CD43임을 알게 되었다. 그 결과, 기존 다수의 항 CD43 항체와 비교하여 인지 항원이 같아도 항체가 붙는 epitope가 특이함으로써 항체의 기능이 달라질 수 있음을 알게 되었고, 그만큼 JL1 항체 자체의 가치를 인식하게 되었다.

제 6 장 참고문헌

1. Adams MD, Venter JC, et al: Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377:3, 1995.
2. Alberti S, Bucci C, Fornaro M, Robotti A, Stella M: Immunofluorescence analysis in flow cytometry better selection of antibody-labeled cells after fluorescence overcompensation in the red channel. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39:701, 1991.
3. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Somoza C, Williams AF: The analysis and architecture of the leucocyte cell surface. In *The Leukocyte Antigen Factbook*. London, Academic press, 1993.
4. Chung JK, So Y, Hong MK, Choi SR, Jeong JM, Lee DS, Lee MC, Koh CS, Choi EY, Park SH. In vitro and in vivo properties of murine monoclonal antibody for a novel immature thymocyte-differentiated antigen, JL1. *Nucl Med Biol.* 1997 Jul;24(5):433-7.
5. Collins F, Galas D: A new five-year plan for the U.S human genome project. *Science* 262:43, 1993.
6. Cuticchia AJ, Chipperfield MA, Porter CJ, Kearns W, Pearson PL: Managing all those bytes: The human genome project. *Science* 262:47, 1993.
7. Dell'arciprete R, Stella M, Fornaro M, Ciccocioppo R, Capri MG, Naglieri AM, Alberti S: High-efficiency expression gene cloning by flow cytometry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44:629, 1996.
8. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Froschl G, Buchinger P, Mann G, Gadner H. CD99 (MIC2) expression in paediatric B-lineage leukaemia/lymphoma reflects maturation-associated patterns of normal B-lymphopoiesis. *Br J Haematol.* 1999 Jun;105(3):690-5.
9. Fidler LM: Genetics institute in deal to share biochemical library. *The New York Times*, September 26, 1996.
10. Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM: Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308:149, 1984.

11. Hedrick SM, Nielsen EA, Kavaler J, Cohen D, Davis MM: Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins. *nature* 308:153, 308.
12. Holden C: Biotech biggies band for protein hunt. *Science*, 274:39, 1996.
13. Jordan E, Collins FS: A march of genetic maps. *Nature* 380:111, 1996.
14. Kavathas P, Sukhatme VP, Herzenberg LA, Parnes JR: Isolation of the gene encoding the human T-lymphocyte differentiation antigen Leu-2(T8) by gene transfer and cDNA subtraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7688, 1984.
15. Kee Shin Y, Young Choi E, Hyung Kim S, Chung J, Hyun Chung D, Seo Park W, Cheon Jung K, Sik Kim H, Park S, Jin Kim H, Hee Park M, Ki Min C, Choo Kim C, Hoe Park S. Expression of Leukemia-Associated Antigen, JL1, in Bone Marrow and Thymus. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1473-1480.
16. Kim TJ, Park SH. Immunotherapeutic potential of JL1, a thymocyte surface protein, for leukemia. *J Korean Med Sci.* 1998 Oct;13(5):455-8. Review.
17. Kim SH, Choi EY, Shin YK, Kim TJ, Chung DH, Chang SI, Kim NK, Park SH. Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (Mic2). *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):4287-95.
18. Kim SH, Shin YK, Lee IS, Bae YM, Sohn HW, Suh YH, Ree HJ, Rowe M, Park SH. Viral latent membrane protein 1 (LMP-1)-induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype. *Blood.* 2000 Jan 1;95(1):294-300.
19. Korman AJ, Knudsen PJ, Kaufman JF, Strominger JL: cDNA clones for the heavy chain of HLA-DR antigens obtained after immunopurification of polysomes by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1844, 1982.
20. Lee GK, Jung KC, Park WS, Kook MC, Park CS, Sohn HW, Bae YM, Song HG, Park SH. LFA-1- and ICAM-1-dependent homotypic aggregation of human thymocytes induced by JL1 engagement. *Mol Cells.* 1999 Dec 31;9(6):662-7.
21. Miklos GLG, Rubin GM: The role of the genome project in determining gene function: insight from model organisms. *Cell* 86:521, 1996.

22. Miller A 3rd, Glasel JA. Comparative sequence and immunochemical analyses of murine monoclonal anti-morphine antibodies. *J Mol Biol.* 1989 Oct 20;209(4):763-78.
23. Nowak R: Bacterial genome sequence bagged. *Science* 269:468, 1995.
24. Oliver SG: From DNA sequence to biological function. *Nature* 379:597, 1996.
25. Park SH, Bae YM, Kwon HJ, Kim TJ, Kim J, Lee SJ, Lee SK. JL1, a novel differentiation antigen of human cortical thymocyte. *J Exp Med.* 1993 Oct 1;178(4):1447-51.
26. Park WS, Bae YM, Chung DH, Kim TJ, Choi EY, Chung JK, Lee MC, Park SY, Park MH, Park SH. A cell surface molecule, JL1; a specific target for diagnosis and treatment of leukemias. *Leukemia.* 1998 Oct;12(10):1583-90.
27. Rice GC, Pennica D, Borree JB, Williams SR: Measurement of transient cDNA expression in mammalian cells using flow cytometric cell analysis and sorting. *Cytometry* 12:221, 1991.
28. Schuler GD, Hudson TJ et al: A gene map of the human genome. *Science*, 274:540, 1996.
29. Seed B, Aruffo A: Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3365, 1987.
30. Sohn HW, Shin YK, Lee IS, Bae YM, Suh YH, Kim MK, Kim TJ, Jung KC, Park WS, Park CS, Chung DH, Ahn K, Kim IS, Ko YH, Bang YJ, Kim CW, Park SH. CD99 regulates the transport of MHC class I molecules from the Golgi complex to the cell surface. *J Immunol.* 2001 Jan 15;166(2):787-94.
31. Soslow RA, Bhargava V, Warnke RA. MIC2, TdT, bcl-2, and CD34 expression in paraffin-embedded high-grade lymphoma/acute lymphoblastic leukemia distinguishes between distinct clinicopathologic entities. *Hum Pathol.* 1997 Oct;28(10):1158-65.
32. Tashiro K, Tada H, Heiker R, Shirozu M, Nakno T, Honjo T: Signal sequence trap-a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261:600, 1993.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국가지정연구실사업		
	세부사업명	국가지정연구실사업		
과제명	약성립프중 관련 유전자군의 기능 분석 및 병태생리의 규명			
연구기관	서울대학교 의과대학	연구책임자	박 성 회	
총연구기간	2001년. 7 월. 11 일. ~ 2003 년. 7 월. 10 일. (24개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	398,488	-	398,488	
기술분야	보건의료기술 (의과학 : 721)			
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(V)	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2004 년 2 월 25 일

연구책임자 : 박 성 회 (인)
연구기관장 : 서울대학교 의과대학 (인)

과학기술부장관 귀하

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

악성 림프종 관련 유전자군인 D4 및 JL1 단백질의 유전자 이식 및 적중 마우스를 생산, 기능 분석을 통해 유전자 변형 마우스의 형질 판독 기법을 확립하며, 이를 바탕으로 다양한 유전자에 대한 기능 분석에 적용한다. 구체적으로 유전자 변형 마우스의 형질 판독 기법을 이용하여 악성 림프종과 연관된 유전자군인 D4와 JL1의 기능 분석을 위해 D4 유전자 이식 마우스를 생산·분석하고, JL1 유전자를 클로닝하였다. D4는 CD99의 마우스 호몰로그로서 Northern Blot과 유세포 분석을 통해 거의 모든 장기에서 발현되며, D4에 대한 항체를 생산하여 D4가 시험관 내에서 세포사멸 유도, 동질 결합, 사이토카인 분비 증가 등의 기능이 있음을 밝혔다. D4가 과발현되는 유전자 이식 마우스는 정상 마우스와 차이를 관찰할 수 없었고, 유전자 적중 마우스를 통한 기능 분석을 위해 유전자 스크리닝을 진행 중이다. D4의 호몰로그인 CD99가 T 세포에서 CD3-zeta 사슬의 인산화 및 lipid raft 내로 유입을 증가시켜 활성을 증가 시킨다는 것을 관찰하였다. JL1 항체를 생산하여 Expression cloning 기법으로 JL1이 CD43임을 밝혔다. 뿐만 아니라 다른 CD43 항체와 발현 양상이 다르다는 것을 관찰하였다.

2. 연구수행결과 현황

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

마우스 형질 분석 기술 및 데이터베이스

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연도	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
Exp Mol Med	Characterization and epitope mapping of two monoclonal antibodies against human CD99	2002	34(6)	대한생화학·분자생물학회	Korea	○
J. of Cancer Res. & Clin Oncology	Identification of antigenic peptide recognized by the anti-JL1 leukemia-specific monoclonal antibody from combinatorial peptide phage display libraries	2002	128(12)	Springer Verlag	USA	○
FEBS Lett	Engagement of CD99 triggers the exocytic transport of ganglioside GM1 and the reorganization of actin cytoskeleton.	2003	10(540)	Elsevier Science	Europe	○
Cancer Immunol Immunother	Targeted cytotoxic effect of anti-JL1 immunotoxin against a human leukemic cell line and its clinical implications.	2003	52(8)	Springer Verlag	USA	○
FEBS Lett	MHC class II engagement inhibits CD99-induced apoptosis and up-regulation of T cell receptor and MHC molecules in human thymocytes and T cell line	2003	546(2-3)	Elsevier Science	Europe	○
계: 5 건						

○ 학술회의 발표 실적

학술회의 명칭	제목	게재연도	호	발행기관	국명
The 29th Congress of International Society of Hematology	Molecular mechanism of CD99 down regulation by EBV-LMP1 in H-RS cells of Hodgkin's lymphoma	2003		International Society of Hematology	한국
춘계 대한면역학회	CD99-induced costimulation via enhanced TCR signaling	2003		대한면역학회	한국
춘계 대한면역학회	Differential role of CD99 isoform in differentiation of Ewing's sarcoma cells	2003		대한면역학회	한국
계: 3 건					

3. 연구성과

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획 및 활용방법

- 본 연구 결과 CD99가 T 세포 활성화에 있어서 강력한 보조 신호 분자임이 확인되었다. 이로써, CD99 단백질이 면역 활성화 및 증강을 위한 chemical 혹은 drug screening의 target으로 활용될 수 있는 가능성이 커졌다. 현재 CD28에 대한 항체 및 CD3에 대한 항체가 면역 질환의 치료에 사용되고 있는 현실에 비추어, CD99에 대한 항체를 임상에 적용하는 것을 모색하려한다.
- D4 가 CD99의 마우스 ortholog 임이 판명되었다. 현재 CD99의 마우스 유전자를 본 연구팀이 확보한 상황에서 이 유전자에 대한 연구는 인체 CD99와 마찬가지로 인체 면역 활성화와 면역 질환에 대한 연구로 활용될 수 있으며, D4 유전자를 이용한 동물 모델은 면역 활성화제 혹은 면역 질환 치료제의 screening을 위한 동물 모델로 활용될 수 있다.
- 많은 노력 끝에 결국 JL-1 단백질의 클로닝에 성공하여 JL-1 단백질이 CD43임을 알게 되었다. 그 결과, 기존 다수의 항 CD43 항체와 비교하여 인지 항원이 같아도 항체가 붙는 epitope 가 특이함으로써 항체의 기능이 달라질 수 있음을 알게 되었고, 그만큼 JL1 항체 고유의 가치를 인식하게 되었다.

다. 차년도이후 활용계획

- 본 연구팀은 연구를 수행하는 과정 중에 독자적으로 개발한 기술을 이용하여, 여러 가지 항체를 개발하였고, 항체를 이용한 기능 연구의 노하우를 축적하였다. 이를 바탕으로 항체 개발과 응용에 축적된 기술을 활용하려 한다.
- 본 연구팀의 연구 수행과정에 쌓은 큰 업적중 하나는 phenotype data base를 구축한 것이다. 인체 유전자의 기능을 밝히기 위하여 생쥐의 유사유전자를 찾아낸 후 이 유사유전자를 변형시킨 생쥐를 이용한 연구가 필수적이다. 본 연구팀은 순수 국내 기술로 유전자 조작 마우스 모델의 표현형을 분석하는 시스템을 확립하였다. 여러 명의 전문 병리의사를 주축으로 가장 기본적인 조직형태분석과 함께 CBC, chemistry 등의 혈액

검사를 마우스에 맞도록 시스템을 정립하였고, 많은 시행착오를 거쳐 체계적이고 안정적인 결과가 나오는 검색체계를 구축하였다. 또한 각종 마우스들의 표현형 검색을 하는 동안 쌓인 노하우와 데이터를 인터넷 상에 데이터 베이스로 구축함으로써 타 연구자들이 참고할 수 있도록 하였다. 이로써 기존에 외국에 의뢰하던 일부 마우스 모델의 형질 분석을 국내 기술로 해결할 수 있게 되어 경제적 효과를 이룰 수 있겠으며, 보다 정밀한 검색을 통해 적절한 마우스 질병 모델을 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.

5. 기대효과

본 연구팀에서 확립한 Phenotype Database를 바탕으로 마우스를 이용한 유전자 기능 분석시 효율성이 기존에 비해 50% 이상 증가할 것으로 판단된다.

6. 문제점 및 건의사항

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

마우스 형질 분석 기술 및 데이터베이스

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1010400012401J00000551			
과제명	악성 림프종 관련 유전자군의 기능 분석 및 병태생리의 규명			
사업명	국가지정연구실사업			
세부사업명	국가지정연구실사업			
연구기관	서울대학교 의과대학	기관유형	학교	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001. 7. 11 - 2003. 7. 10. (총 24개월)			
총연구비	정부(398,488)천원 민간()천원 합계(398,488)천원			
연구책임자 1	성명	박 성 회	주민번호	471003-1069111
	근무기관 부서	서울대학교 의과대 학 병리학교실	E-mail	pshoe@plaza.snu.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	740-8266
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	이 현 규	소속/부서	서울대학교 의과대학 병리학교실
	직위/직급	조교	E-mail	junpoo23@snu.ac.kr
	전화번호	740-8261	FAX	763-6625
	주소	(110 - 799) 서울 종로 연건동 28 서울대학교 의과 대학 기초연구동 병리학교실 122호		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

인체 유전자의 기능을 밝히기 위하여 생쥐의 유사유전자를 찾아낸 후 이 유사유전자를 변형시킨 생쥐를 이용한 연구가 필수적이다. 본 연구팀은 순수 국내 기술로 유전자 조작 마우스 모델의 표현형을 분석하는 시스템을 확립하였다. 여러 명의 전문 병리학자를 주축으로 가장 기본적인 조직형태분석과 함께 CBC, chemistry 등의 혈액검사를 마우스에 맞도록 시스템을 정립하였고, 많은 시행착오를 거쳐 체계적이고 안정적인 결과가 나오는 검색체계를 구축하였다. 또한 각종 마우스들의 표현형 검색을 하는 동안 쌓인 노하우와 데이터를 인터넷 상에 데이터베이스로 구축함으로써 타 연구자들이 참고할 수 있도록 하였다. 이로써 기존에 외국에 의뢰하던 일부 마우스 모델의 형질 분석을 국내 기술로 해결할 수 있게 되어 경제적 효과를 이룰 수 있겠으며, 보다 정밀한 검색을 통해 적절한 마우스 질병 모델을 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.

<기술적 특징>

- (1) 전문 병리 의사가 조직형태분석에 참여함으로써 조직에 대한 보다 정확한 기술이 가능하다.
- (2) 다양한 경험을 데이터베이스로 구축함으로써 향후 연구에서 비교 분석이 가능하다.
- (3) 의학적 지식을 바탕으로 조직형태분석뿐만 아니라 이를 통한 질병 모델로의 응용이 가능하다.

[용도 · 이용분야]

- (1) 유전자 조작 마우스의 병태생리 분석을 통해 유전자의 기능 규명에 활용한다.
- (2) 인간 질병과 비교함으로써 마우스의 질병 모델로의 활용에 이용할 수 있다.

■ 기술의 분류

이전형태	<input type="checkbox"/> 유상 <input type="checkbox"/> 무상	최저기술료	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전 소요기간	년 개월	실용화예상시기	년도
기술이전시 선행요건			

- * 기술이전시 선행요건 : 기술이전을 위한 사전준비사항(필수 설비 및 장비, 전문가 확보 등)을 기술
- * 실용화예상시기 : 기술을 활용한 대표적인 제품이 최초로 생산이 시작되는 시기를 기재

■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도]

	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
V	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기]

	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
V	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준]

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
V	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.