

간질환 모델동물개발을 위한
유전자 스위치 시스템 확립

Establishment of genetic switch system for the
production of disease model mice associated with
liver disease

Lee Dong Seok

한국생명공학연구원

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 간질환 모델동물개발을 위한 유전자 스위치 시스템 확립 ” 에
관한 연구의 보고서로 제출합니다.

2004. 08.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 이 동 석

연 구 원 : 유 대 열

연 구 원 : 왕 애 국

” : 이 미 란

위탁연구기관명 : 전남대학교 치과대학

협동연구책임자 : 이 태 훈

보고서초록

과제관리번호	CBMI-B222-001-1-0-0	해당단계 연구기간	2001.12.-2004.06	단계 구분	1단계 / 3단계
연구사업명	중 사업명	21세기 프론티어 연구개발사업			
	세부사업명	생체기능조절물질개발사업			
연구과제명	중 과제명	중과제가 있을 경우에는 기재 (단위과제일 경우에는 아래 기재)			
	세부(단위)과제명	간질환 모델동물개발을 위한 유전자 스위치 시스템 확립			
연구책임자	이 동 석	해당단계 참여연구원수	총 : 5명 내부 : 4명 외부 : 1명	해당단계 연구비	정부: 266,025 천원 기업: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 인간유전체연구실		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 : 전남대학교 치과대학 연구책임자 : 이태훈				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>-본 연구과제는 생체기능조절물질에 대한 in vivo 기능 연구를 위한 모델동물의 제작방법으로서 조직 특이적 목적 유전자 결손을 유도하여 조직 특이적 질환을 유도할 수가 있는 유전자 스위치 시스템 확립을 목적으로 하였으며, 목적 유전자로서 최근 발견된 항산화효소 유전자, <i>Peroxiredoxin III(PrxIII)</i>를 이용하였다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 유전자 스위치 시스템 개발을 위한 기반기술 확립 및 조직특이적 cre recombinase 발현 마우스 확보 <ol style="list-style-type: none"> 1) <i>PrxIII</i> genomic DNA cloning 2) <i>PrxIII</i> 유전자 조건적 결손용 <i>loxP</i>가 도입된 조건적 유전자 적중용 벡터 개발 3) 재조합 벡터에 의한 Embryonic Stem (ES) cell에 유전자 적중조건 확립 4) 조직특이적 cre recombinase 발현 마우스 확보 5) 간조직 특이적 cre 발현 마우스 확보 2. 유전자 스위치 모델 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) 표적유전자가 적중된 ES cell 선발 2) 적중된 ES cell의 미세주입 및 이식 3) chimeric 마우스생산 및 genotyping 4) Cre 과발현 마우스 genotyping 및 대량확보 3. 유전자 스위치가 도입된 유전자 결손 마우스 생산 <ol style="list-style-type: none"> 1) <i>loxP</i> 적중 마우스 생산 2) Cre/<i>loxP</i> 마우스 생산 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	유전자 결손 마우스, 항산화효소, 모델동물, 조직특이적, 유전자 적중방법			
	영어	Knock-out mice, antioxidant enzyme, model animal, tissue specific, conditional gene targeting			

요 약 문

I. 제 목

간질환 모델동물개발을 위한 유전자 스위치 시스템 확립

II. 연구개발의 필요성 및 목적

인간유전체의 염기서열이 모두 밝혀져 가고 있음에 따라, 모델생물의 유전체 염기서열 역시 인간유전자의 기능을 이해하고 유추하기 위해 이용될 수 있는 중요한 자료로 부각되고, 특히, 마우스는 인체질환연구를 위한 최상의 실험계이며, 형질전환 기술을 이용한 마우스 질환모델동물 확립과 병리학적 연구는 인간질환의 병리학적 이해를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 새로운 치료제 개발을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

전통적인 유전자 결손(Conventional gene knock-out) 시스템은 생체내 상동재조합(homologous recombination) 기능을 이용한 유전자 적중(gene targeting) 방법을 이용한다. 그러나, 유전자 결손 마우스 역시 조직 특이적인 결손과 발현시기 조절연구가 아직 미흡한 실정이며, 특히 초기 발생에 관여하는 유전자의 경우 마우스가 태어나기 전에 사망하게 되므로 발생단계 및 여러 시기에 발현이 조절되어야 하는 유전자의 기능연구 및 질환모델의 개발에는 이용할 수 없는 큰 단점을 지니고 있다. 특히 유전자 결손은 유전자의 기능에 대한 정보가 제한적일 때 돌연변이를 기대 또는 예측할 수 없다. 따라서 유전자 스위치 시스템 도입을 통해 조직 특이적 결손과 발현시기 조절 연구가 필수적이다.

활성산소화합물 (reactive oxygen species, ROS)은 본 생체기능조절 Frontier 과제에서 목적으로 하는 여러 질환과 매우 관련성이 높다. ROS에 의한 oxidative stress는 노화, 즉 현재 사회적으로 문제가 되고 있는 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, 당뇨병 등의 질환에 관여하고 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에 이용될 목적유전자는 최근 발견된 항산화효소 유전자, *Peroxiredoxin III(PrxIII)*는 미토콘드리아에만 존재하는 항산화효소로서 특히 유전자 스위치 시스템이 도입된 항산화효소 유전자 결손 마우스를 활용한 생체내 ROS 관련 간질환연구는 물론 질환 초기기전 연구 및 치료제 개발에 매우 귀중한 자료를 제공될 수 있을 것이며, 유전자 스위치 개념이 도입된 마우스 모델을 개발하여 실험모델로 이용하여 신약 개발의 표적물질(유전자 또는 단백질)인 단백질 연구 역시 신약단백질의 확보를 가능하게 하여 향후 연구개발을 가속화할 것이며, 상품화 할 경우 부가가치는 매우 클 것으로 생각된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

I) 1년차

구분	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2001.10.1.- 2002.06.30)	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 스위치 시스템 개발을 위한 기반기술 확립 <ol style="list-style-type: none"> 1. Peroxiredoxin III genomic DNA cloning 2. <i>loxP</i>가 도입된 조건적 유전자 적중용 벡터 개발 (1건) 3. ES cell에 유전자 적중조건 확립 4. ES cell 배양용 mouse embryonic fibroblast (MEF)의 제작 - 조직특이적 cre 발현 마우스 확보 <ol style="list-style-type: none"> 1. 간조직 특이적 cre 발현 마우스 확보(1종) 2. 발달단계(태아 10.5일) 특이적 cre 발현 마우스 확보(2종)

II) 2년차

구분	연구개발내용 및 범위
2차년도 (2002.7.1 - 2003.6.30)	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 스위치 모델 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1. 표적유전자가 적중된 ES cell 선발 (1건이상) 2. 적중된 ES cell의 미세주입 및 이식 (500회 이상) 3. chimeric 마우스생산 및 genotyping (20건 이상) 4. Cre 과발현 마우스 genotyping 및 대량확보 (16마리 이상)

III) 3년차

구분	연구개발내용 및 범위
3차년도 (2003.7.1 - 2004.6.30)	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 스위치가 도입된 유전자 결손 마우스 생산 <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>loxP</i> 적중 마우스 생산 (1마리 이상) 2. Cre/<i>loxP</i> 마우스 생산(1마리 이상) 3. 유전자 결손 마우스 계통 확립을 위한 지속적인 breeding

IV. 연구개발결과

질환모델동물 생산분야는 유전자 재조합, 수정란 회수 및 배양, 표현형 분석 등 다양한 분야의 협력연구와 기술이 필요하다. 이는 orchestra 연주와 마찬가지로 다분야 전문가의 공동작품이다. 따라서 다방면의 연구자들과 협력체계를 구축하여 본 과제를 수행했다.

1. 유전자 스위치 시스템 개발을 위한 기반기술 확립

*loxP*가 삽입된 목적유전자(Peroxiredoxin III)의 상동성 재조합 벡터 개발기술을 확립하기 위해서 본 실험실에 구축되어온 conditional targeting 벡터 재조기술을 이용했다. 마우스 PrxIII genomic DNA를 cloning하기 위하여 마우스(C57BL/6) liver genomic DNA library를 template로 이용하여 PCR cloning을 수행하여 product를 TA cloning vector에 cloning하였다. 이를 sequencing, southern blotting 한 결과하여 PrxIII genomic DNA 임을 확인하였고, Conditional knock-out vector는 cloning된 genomic DNA를 중심으로 knockout vector제작하였다. 그 후에 다양한 primer를 이용한 정확한 knockout vector제작 여부를 확인 하였다. 다음 step으로 C57BL/6마우스 유래 J1세포에 각각의 lot별 serum을 15% 및 30%를 혼합하여 제조한 배양액 하에서 배양한 후 약 5~7일간 형태학적인 관찰 및 colony 형성율을 비교하여 Plating efficiency가 가장 좋은 것을 ES cell에 유전자 적중조건으로 확립 하였다.

2. 조직특이적 cre 발현 마우스 확보

간 특이적 Cre recombinase 과발현 마우스를 기존에 개발된 마우스(C57BL/6-TgN(AlbCre)21Mgn)를 Jackson Lab.으로부터 수입하여 확보하여 최종 목표인 간질환 마우스 모델 동물(*loxP/Cre*)을 생산하기 위해서 Genome analysis (마우스 genomic DNA의 분리 및 PCR analysis)를 통해 분석된 마우스는 C57BL/6J와의 breeding을 통해 그 계통을 유지, 관리를 한국생명공학연구원의 동물실험실에서 계통보존 및 사육을 하고 있다. 현재 Alb-cre는 수컷 17마리, 암컷 9마리로, 또 하나의 (IFN- γ inducible)Mx1-cre는 수컷 14마리, 암컷 16마리 있다.

3. 유전자 스위치 모델 개발

loxP 시스템을 이용한 유전자 스위치용 벡터를 만들고, 다시 한 번 PCR로 스위치용 벡터가 정확히 만들어진 것을 확인한 후에 J1 mouse 유래의 ES 세포에 electroporation (EP)을 콜로니의 선발 후 증식하여, ES 세포를 LN₂에 동결 보존하고 적중 ES 클론의 분석은 ES cell 배양 후 동결된 ES 세포로부터 genomic DNA를 분리 후 PCR을 이용했다. 이 때도 다양한 Primer에 의한 PCR을 이용하여 동결된 ES cell 약 23 개clone으로부터 *loxP*유전자가 적중된 1 clone을 선발 하였

다. 이 선발된 J1 ES cell 중에 세포막이 선명하게 관찰되는 세포만을 골라서 Blastocyst(배반포)에 미세주입을 현재 본 실험실에서 microinjector를 이용하여 하였다. 미세주입된 배반포는 위임신유기 2.5일령의 ICR 암생쥐의 한쪽 자궁에 8~12개씩 이식했다. 그리고 미세주입 배반포로부터 안정적인 산자 및 chimera 생산을 위해 ICR의 대리모를 사용했다. 이 과정에서 대리모 ICR 암생쥐에 이식하기 전에 미세주입 전의 배반포의 임신율에 있어서는 배반포가 3.5 일령이 2.5 일령에 비해서 2배 정도 임신이 더 잘되었고, 3.5일령의 배반포를 이용한 군의 경우 숫컷은 지금까지 총 14마리에 chimeric중 90%가 1마리가 나왔다. 이상의 결과는 Experimental animals 논문에 발표를 하였으며, 유전자 스위치 모델 개발을 위한 기술확립 및 Chimera 생쥐의 생산하였다.

4. 유전자 스위치가 도입된 유전자 결손 마우스 생산

Chimera 생쥐의 생산을 계속 수행하여 총 21마리에 chimeric중 chimeric의 90%가 숫컷1마리, 80% 암컷 1마리가 생산되었다. Chimeric 마우스로부터 heterozygote 마우스를 생산을 위하여 B6 line과 교배시켜 표현형이 갈색 (germ line)이 숫컷 3마리가 태어나 loxP 적중 마우스를 생산하였다. 계속해서 Cre/loxP 마우스 생산을 위해서 albumin Cre 과발현 마우스와는 교배하여 현재 1개월령의 숫컷2마리, 암컷 4마리를 얻어 4개월령이 되는 오는 11월경에 Prx III의 조직적 발현을 점검하고, 유전자 결손 마우스 계통 확립이 되면 수정관동결보존을 할 예정이다.

5. 초기세포계를 이용한 목적단백질(Peroxiredoxin III)의 세포내 기능검색을 위한 기초기술 확립.

현재 본 연구실의 간암모델동물을 이용하여 primary hepatocyte culture을 확립하여 sex간의 다른 ROS생성량을 FACS로 측정하여 PrxIII KO 마우스의 기능검색을 위한 기술을 확립하였다. 이 결과는 현재 hepatology 논문에 투고 중이다. 그 외에 PrxIII가 존재하는 mitochondria에 PrxIII가 KO가 되었을 경우 Mitochondria 의분리 및 Krebs cycle enzyme 중에 Aconitase activity를 측정하는 방법을 확립하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 유전자 스위치 개념을 이용한 조직 특이적 유전자 결손 마우스는 조직 특이적 질환을 생체기능조절분야 연구를 앞으로 더욱 더 가속화 될 것으로 기대되며, 이러한 유전자 결손 마우스를 이용한 *in vivo* 모델의 기능연구가 주가 될 전망이다. 특히 인간의 질병과 노화 진행의 중심을 차지하고 있는 redox signaling에 대한 모델 동물을 제시함으로써 생체기능연구를 기초로 신약개발 연구에 일익을 담당할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 유전자 결손 마우스는 신약개발연구는 물론 생체 내 유전자 기능연구에 활용될 수 있는 실험동물로 개발될 것이고, 다른 모델동물과의 교배 연구를 통한 다 기능성 실험동물로도 활용될 것이다.

3. 개발된 질환모델동물을 활용하여 질환관련 신규유전자의 발굴에도 활용 가능하다. 특히 이러한 부분은 향후 추진될 신규모델동물 생산에 유용하게 이용될 것이다.

4. 유전자 결손 마우스는 환경호르몬의 검색시스템으로 활용 가능성이 충분히 있어 개발된 마우스를 이용하고자 하는 모든 연구팀과의 협력연구의 가능성이 높다.

S U M M A R Y

Title: Establishment of genetic switch system for the production of disease model mice associated with liver disease

-Purpose

Genetically modified model mice such as transgenic mice and knockout mice may be very useful for the characterization of transgene *in vivo* function as well as for the validation of newly developed candidate drug. Until now many knockout mice have been generated using functionally unknown genes. Among them some exhibited embryonic lethal, therefore the mice can not be used further. To overcome the problem, it may be very important to establish genetic switch system. We would like to establish Cre/loxP system in generating knockout mice deleted peroxiredoxin(Prx)III, which may be responsible for the reduction of reactive oxygen species, expecting development of liver disease associated model mice.

-Key Ideas

PrxIII expresses abundantly in mitochondria and cytoplasm of many tissues. Therefore conventionally generated knockout mice might be embryonic lethal. To circumvent the limitation and to develop liver disease associated model mice, Cre/loxP system should be introduced in order to block PrxIII gene expression only in liver.

-Methods & Research Contents

1. Cloning of mouse PRxIII genomic DNA and construction of the gene targeting vector with loxP site.
2. Maintaining of Cre mice specifically inducing Cre expression in liver.
3. Gene targeting into ES cells, introduction the cells to embryo, and embryo transfer to uterus of recipient mice.
4. Generation of chimeric mice.
5. Generation of Cre/loxP mice deleted PrxIII by mating Cre mice and chimeric mice.
6. Identification of the establishment of genetic switch system by examining genotype and phenotype in Cre/loxP mice.

-Result

Disease model animal production field need cooperation study and a technology of gene recombination, fertilized egg withdrawal and cultivation,

phenotype analysis etc.. various field. So, This is commonness work with many expert such as orchestra performance. Therefore, it was achieved assignment that construct cooperation system with many-sided investigators.

1. Infratechnology establishment for gene switch system development

Used conditional targeting vector was constructed in this laboratory which see to establish homology recombination vector development technology of purpose gene (Peroxiredoxin III) that loxP was inserted. Mouse PrxIII genomic DNA was achieved by PCR cloning to use mouse (C57BL/6) liver genomic DNA library and TA cloning vector system. Cloned PrxIII genomic DNA was confirmed by sequencing, southern blotting. the knockout vector was manufactured by Conditional knock-out vector and Cloned PrxIII genomic. The best culture conditon for electroporation (EP) and homology recombination was established by ES cell comparing observation and the colony formation rate using each lot mixing 15% and 30% in C57BL/6 mouse origin J1 cell during 5~7 days,

2. Security of Liver specific Cre expression mouse

Developed Liver specific Cre recombinase over expression mouse (C57BL/6-TgN (AlbCre) 21Mgn) was improted From Jackson Lab. U.S.A..

To produce Liver specific Cre recombinase over expression mouse, which is final target to loxP/Cre with liver disease, construed through Genome analysis (separation and PCR analysis of mouse genomic DNA) and is doing system through breeding with C57BL/6J and preservation, administration and stock preservation and breeding in Korean research institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB). Present, Alb-cre is 17 males, 9 females, another (IFN-r inducible) Mx1-cre has 14 males, 16 fe emales.

3. genetic switch system model development

it was selected that one transfected ES cell clone from 23 clones by PCR using various Primer. Gene targeted ES cells, introduction the cells to embryo, and embryo transfer to uterus of recipient mice. So far, it was generated one male mice of 90% and one female mice of 80% chimeric among 21 chimeric mice. Chimeric mice was mated with B6 line for production of heterozygote mouse (germ line). It was generated three male of loxP gene targeted mice. Continually, loxP gene targeted mice interbred with an albumin Cre for Cre/loxP mouse production and got 2 male mice and 4 females mice.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	13
Chapter 2. State of the Art Report	20
Chapter 3. Contents and Results of Research	22
Chapter 4. Accomplishment and Contribution	31
Chapter 5. Future Applications	33
Chapter 6. Collected informations	35
Chapter 7. References	39
Appendix 1.	43
Appendix 2.	47

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성 및 목적

제 2 절 연구개발의 연차별 추진전략 및 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발성과의 실용화

제 2 절 연구개발성과의 응용잠재력 및 산업·공공분야 파급효과

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 연구사례의 조사

제 2 절 세부 기술사항의 검토 분석

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성 및 목적

1) 기술적 측면

마우스는 인체질환연구를 위한 최상의 실험계이다.

인간유전체의 염기서열이 모두 밝혀져 가고 있음에 따라, 모델생물의 유전체 염기서열 역시 인간유전자의 기능을 이해하고 유추하기 위해 이용될 수 있는 중요한 자료로 부각되고 있다. 인간유전체의 염기서열이 모두 밝혀진 이후 생물학적 연구 분야에서 가장 흥미있는 분야는 역시 유전자의 기능을 밝히는 연구이다. 현재까지 밝혀진 인간유전자를 중심으로 그와 상동성을 가진 각각의 실험계(마우스, *C. elegans*, *Nematodes* 등)에 대한 유전자를 변형하여 돌연변이(결핍 혹은 과발현)체를 개발하고, 그 표현형을 분석함으로써 인간유전자의 기능을 밝히고자 하는 노력들이 진행되고 있다. 이들 실험계들 중 마우스는 유전학, 생리학, 발생학을 비롯한 진화론적인 측면에서 볼 때 인간유전체와 가장 큰 유사성을 가지고 있다. 실제로 인간과 마우스 유전체는 유사한 크기를 가지고 있으며, 상동성을 지닌 단백질의 경우 아미노산 수준에서 약 90%정도의 상동성을 가지고 있다. 이러한 측면에서 마우스 질환모델동물 확립과 병리학적 연구는 인간질환의 병리학적 이해를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 새로운 치료제 개발을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

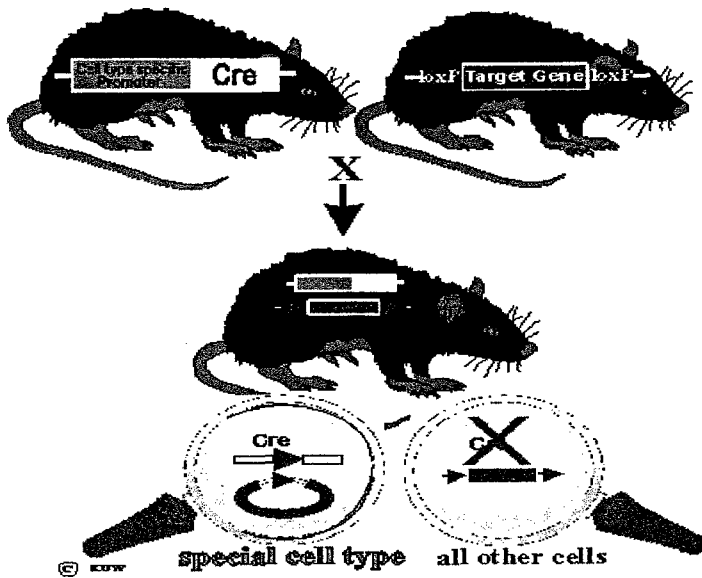
형질전환 마우스는 신약개발 연구에 꼭 필요한 도구이다.

목적유전자 발현을 인위적으로 조절하는 시스템은 유전자의 기능 및 신약개발 연구에 필수적이다. 현재까지 개발되어 마우스모델에 이용되고 있는 시스템은 목적유전자 과발현(over-expression) 시스템과 목적유전자를 결손(Knock-out)시켜 그 발현을 정지시키는 두 가지시스템으로 구분할 수 있다. 마우스 과발현 시스템의 경우 Brinster 등(1981), Costantini와 Lagacy(1981) 연구팀에서 각각 herpes thymidine kinase 및 rabbit β -globin gene를 주입하여 transgenic mice를 탄생시켰다. 그 후 인간 성장호르몬 유전자를 가진 형질전환마우스가 생산되었고 수백종의 과발현 마우스를 이용한 연구가 추진되었다. 하지만 20여년이 지난 지금까지도 조직 특이적인 발현과 발현시기 조절이 불가능하여 목적유전자의 기능을 파악하는데 많은 어려움을 안고 있다. 최근 항생제 Doxycycline을 이용한 과발현 유도 시스템이 개발되어 발현시기는 조절하고 있지만 실제 생체에서와 같은 조직 특이적 발현은 아직 연구과제로 남아있다.

과발현 및 유전자 결손 마우스 모델은 상호 보완적인 연구방법이다.

전통적인 유전자 결손(Conventional gene knock-out) 시스템은 생체내 상동재조합(homologous recombination) 기능을 이용한 유전자 적중(gene targeting) 방법

을 이용한다. 유전체는 유전자 적중에 유용한 엑손(exon)부위와 인트론(intron) 그리고 유전자의 발현에 관여하는 프로모터(promoter) 등 유전자 발현조작에 필요한 모든 잠재성을 지니고 있다. 또한 수정란 유래 간세포(embryonic stem cell)의 분리 및 배양이 가능해 지면서 *in vitro*상에서 어떤 목적유전자를 상동 재조합에 의해 결손시키고, 이 세포를 수정란에 재이식하여 전통적인 유전자 결손 마우스 모델의 생산이 가능해 졌다. 이러한 모델마우스는 과발현 모델과 상반된 개념에서 유전자 기능 연구 및 질환모델로 이용되고 있다. 하지만 유전자 결손 마우스 역시 조직 특이적인 결손과 발현시기 조절연구가 아직 미흡한 실정이며, 특히 초기 발생에 관여하는 유전자의 경우 마우스가 태어나기 전에 사망하게 되므로 발생단계 및 여러 시기에 발현이 조절되어야 하는 유전자의 기능연구 및 질환모델의 개발에는 이용할 수 없는 큰 단점을 지니고 있다. 특히 유전자 결손은 유전자의 기능에 대한 정보가 제한적일 때 돌연변이를 기대 또는 예측할 수 없다. 예를 들면 마우스 Huntington's disease 유전자는 호모 개체에서 발현되며, 그 유전자가 결손되는 호모 접합체는 배아체 7~8.5일에 죽게 되어 그 생물학적 기능을 규명하는데 한계가 있다(Duyao 등. 1995). 따라서 유전자 스위치 시스템 도입을 통해 조직 특이적 결손과 발현시기 조절 연구가 필수적이다.



유전자의 조직 특이적 결손과 발현시기 조절이 가능하다.

과발현 및 유전자결손 마우스 개발에 대한 문제점 중 조직특이성과 발현시기를 조절하고자 하는 연구가 많은 연구자들에 의해 진행 중에 있다. 이들 중 가장 최근에 개발된 연구방법은 유전자 스위치를 이용한 유전자 적중방법(conditional gene targeting)이다. 이 방법은 전통적인 유전자 적중 방법과 조직 및 발현시기 특이적 재조합(recombination)을 접목한 방법이다. 조직 및 발현시기 특이적 재조합효소는 특정유전자 염기서열에 작용하여 목적단백질의 염기서열을 재조합 함으로써 그 유

전자의 발현을 중지시킬 수 있다. 박테리오페이지 P1의 Cre recombinase와 효모의 Flp recombinase는 가장 잘 알려진 recombinase이다. 이들 Cre와 Flp는 각각 *loxP*와 *frt*부위의 34bp 염기서열을 인식하고, 동일한 DNA가닥 위에 *loxP*와 *frt*가 다수 존재할 경우 recombination을 일으켜 두 개 또는 그 이상의 *loxP* 사이의 유전자 염기서열을 제거한다. 이러한 재조합 기능을 유전자 스위치 개념에 도입하고자 할 때 두가지 선행연구가 추진되어야 한다. 먼저 recombinase의 조직특이적 발현과 *loxP*가 삽입된 재조합 벡터가 구성되어야 하고, *loxP* 염기서열을 가진 목적유전자의 적중이 필요하다. 특히 *loxP*를 가진 목적유전자의 적중은 수정란 간세포(embryonic stem cell)를 이용하여 추진되므로 전통적인 유전자결손 방법이 확립되어 있어야 한다.

본 연구에 이용할 목적유전자는 여러 가지 질환모델 개발에 적용성이 매우 높다.

활성산소화합물 (reactive oxygen species, ROS)은 본 생체기능조절 Frontier 과제에서 목적으로 하는 여러 질환과 매우 관련성이 높다. 특히 이러한 ROS는 세포내외의 많은 molecules와 반응하는데 단백질의 활성 혹은 불활성화, DNA break, lipid peroxidation 등을 유도한다. ROS에 의한 oxidative stress는 노화, 즉 현재 사회적으로 문제가 되고 있는 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cystic fibrosis, amyotrophic lateral sclerosis, 당뇨병 등의 질환에 관여하고 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에 이용될 목적유전자는 최근 발견된 항산화효소 유전자, *Peroxiredoxin III(PrxIII)*를 이용하고자한다. *PrxIII*는 미토콘드리아에만 존재하는 항산화효소로서 특히 유전자 스위치 시스템이 도입된 항산화효소 유전자 결손 마우스를 활용한 생체내 ROS 관련 간질환연구는 물론 질환 초기기전 연구 및 치료제 개발에 매우 귀중한 자료를 제공될 수 있을 것이다.

2) 경제·산업적 측면

질환모델동물의 경제 가치 창출에 기여할 수 있다.

오늘날까지 전 세계적으로 많은 형질전환마우스가 개발되었으나, 실험모델 동물로써 WHO의 공인을받은 것으로는 일본에서 개발한 Polio Virus Receptor 형질전환 마우스가 첫 번째이다. 현재 매년 약 20,000마리가 실험용으로 전 세계적으로 공급되고 있는데 앞으로의 경제가치를 추정해보면 엄청난 부가가치가 있는 실험동물이 될 것으로 판단되고 있다. 현재의 가격은 마리당 10,000이다. 미국 Taconic Farm 회사는 형질전환 동물(마우스, 쥐)을 판매하는 회사로, 제약회사를 대상으로 형질전환 마우스 개발에 적극 투자하고 있다. Taconic사는 현재 TNF- α 형질전환 마우스를 비롯한 30여종의 형질전환마우스를 100 - 250\$의 가격으로 공급하고 있으며, 일본에서도 독성시험이나, 의약품의 스크리닝의 목적으로 형질 전환마우스가

일반적으로 사용되고 있어, 이 분야의 시장형성 확대가 기대된다. 본 연구팀 또한 전통적인 K.O. 시스템을 이용한 질환모델마우스 개발시스템을 구축하였으며, 현재 분석중인 항산화효소 관련 모델마우스의 표현형 분석이 완료되어 실험동물로의 가치를 인정받게 되면, ROS 관련 질환의 원인 규명은 물론 치료제의 약효검정에 필요한 모델동물로 발전될 것으로 기대되며 그 만큼 경제적인 가치가 있다고 생각한다. 특히 본 연구를 통해 유전자 스위치 개념이 도입된 마우스 모델을 개발하여 실험모델로 이용할 경우 그 부가가치는 매우 클 것으로 생각된다.

신약창출가능성 및 표적단백질 확보를 가속화 할 수 있다.

신약 개발의 두 축은 표적물질(유전자 또는 단백질)과 이를 조절하는 물질 (일반적으로 분자량이 1,000이하인 유기화합물)이다. 특정 질환모델 마우스를 이용한 단백질 연구 역시 신약단백질의 확보를 가능하게 하여 향후 연구개발을 가속화할 것이다.

3) 사회·문화적 측면

본 연구과제를 통해 제안된 순환기계 질환, 대사성 질환, 간질환 그리고 골다공증, 관절염, 알러지 등은 우리 나라에서 호발하는 질환으로써 이 질환으로 인한 가정 및 사회적인 문제는 매우 심각한 실정이다. 이에 따라 이들 질병을 예방하고 치료할 수 있는 치료제 개발이 절실하다. 이와 관련된 질환모델동물은 후보 신약의 약효를 검증하는 데 유용한 실험계이므로, 활용 가치가 높은 질환모델동물의 개발은 맞춤형약시대를 예고하는 현재의 질병치료 분야에 매우 중요한 사회 문화적 역할을 담당할 것으로 생각한다.

제 2 절 연구개발의 연차별 추진전략 및 범위

1) 추진전략

- 질환모델동물 생산분야는 유전자 재조합, 수정란 회수 및 배양, 표현형 분석 등 다양한 분야의 협력연구와 기술이 필요하다. 이는 orchestra 연주와 마찬가지로 다분야 전문가의 공작품이다. 따라서 다방면의 연구자들과 협력체계를 구축하여 본 과제를 수행한다.
- Cre recombinase 과발현 마우스는 기존에 개발된 마우스를 수입하여 확보한다.
- loxP가 삽입된 목적유전자의 상동성 재조합 벡터 개발기술은 본 실험실에 구축되어 있다.
- 수정란 미세조작 관련 기술은 본 연구실에서 10여년 이상 연구하여온 특정기술 중 하나이다.
- 유전자 스위치 시스템이 도입된 유전자 결손 마우스를 다량 생산하여 Genotyping 과 표현형 관찰 후 신약개발 연구에 활용할 수 있도록 한다.
- 동물 유전자원 확보 차원에서 유전자 결손 마우스의 계통을 확립하고 수정란을 동결 보존한다.
- 병리조직학적 연구는 원광대 의대 병리학교실과의 협력 하에 수행한다.
- 유전자 결손 마우스의 계통보존은 본 연구원 실험동물실과 공동으로 실시하고 이 마우스에 관심 있는 연구자들의 연구를 도울 수 있도록 분양할 계획도 있다.

2) 연구개발 내용 및 범위

1) 1년차

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2001.10.1.- 2002.06.30)	조직특이적 cre 발현 마우스 확보	<ol style="list-style-type: none"> 1. 간조직 특이적 cre 발현 마우스 확보 2. 발달단계(태아 10.5일) 특이적 cre 발현 마우스 확보
	유전자 스위치 시스템 개발을 위한 기반기술 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. Peroxiredoxin III genomic DNA cloning 2. loxP가 도입된 조건적 유전자 적중용 벡터 개발 (1건) 3. ES cell에 유전자 적중조건 확립 4. ES cell 배양용 mouse embryonic fibroblast (MEF)의 제작

2) 2년차

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
2차년도 (2002.7.1 - 2003.6.30)	유전자 스위치 모델 개발	<ol style="list-style-type: none"> 1. 표적유전자가 적중된 ES cell 선발 (3건) 2. 적중된 ES cell의 미세주입 및 이식 3. chimeric 마우스생산 및 genotyping 4. Cre 과발현 마우스 genotyping 및 대량확보

3) 3년차

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
3차년도 (2003.7.1 - 2004.6.3 0)	유전자 스위치가 도입된 유전자 결손 마우스 생산	<ol style="list-style-type: none"> 1. loxP 적중 마우스 생산 2. Cre/loxP 마우스 생산 3. 유전자 결손 마우스 계통 확립을 위한 지속적인 breeding 4. 초기세포계를 이용한 목적단백질(Peroxiredoxin III)의 세포내 기능검색을 위한 기초기술 확립.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

질환모델 개발연구는 세계적으로 추진되고 있으나 국내에서의 개발수준은 아직 걸음마 단계에 있으며 특히 유전자 스위치 개념이 도입된 질환모델 개발 연구는 아직까지 시발단계에 있다.

1) 국외의 기술동향 및 수준

- 수 많은 형질전환 마우스들이 보고되어 있다. 그 수를 열거하는 것은 의미가 없는 것으로 생각되어 참고 가능한 web site를 표1에 소개한다.

표 1. 유전자 변형 마우스를 소개한 데이터베이스

Internet address	Contents
www.rodentia.com	catalogue of mouse home pages
biomednet.com/bd/mkmd	mouse knock-out and mutation database
www.jax.org	transgenic/targeted mutation database
www.emma.rm.cnr.it	european mouse mutant archive
www.gsf.de	ENU-mouse mutagenesis screen project
www.genomesystems.com	private company providing mouse knock-out service
www.lexgen.com	gene-trap mouse mutagenesis screen project

- 캘리포니아 의과대학에서는 gp130 유전자를 conditional knockout하여 심장질환 모델을 보고하였다 (1999). 이외에도 수많은 연구들이 조직특이적, 시기적 발현을 유도하기 위해 진행중에 있다.

2) 국내의 기술동향 및 수준

- 한국생명공학연구원에서는 HBX 유전자의 과발현을 통한 간암모델 마우스(1996)를 개발하였고, 이와 아울러 MT1-MMP 과발현을 통해 유방암 마우스(2001)를 개발하였으며 지속적인 표현형 연구를 통해 신약 스크리닝에 이용될 예정이다.
- 한국생명공학연구원에서는 또한 Peroxiredoxin II knock-out 마우스를 개발하여 이를 빈혈(hemolytic anemia) 모델로 개발하기 위한 표현형 연구가 진행 중에 있다.
- 포항공과대학에서는 Phospholipase C knock-out 마우스 개발을 통해 epilepsy와 ataxia를 보이는 모델동물을 개발하였다(1997).
- 유전자 스위치 개념이 도입된 모델마우스의 개발은 아직 보고된 바 없다.

3) 현기술상태의 취약성

연구내용	본연구팀	국 내	국 외
유전자재조합기술	100	100	100
유전자도입기술	80	80	100
수정란 미세조작기술	100	80	100
유전자분석	100	100	100
표현형검색	80	80	100
MEF 제조	100	100	100
세포배양	100	100	100
세포사멸탐색기술	80	80	100

*국외상위연구팀의 기술을 100%기준으로 사용하였음.

- 유전자 결손 마우스의 기능을 연구하는 데는 다양한 방법이 요구된 다. 따라서 유전자 스위치 개념이 도입된 마우스의 기능을 해석하는데 부족한 점은 본 국내의 전문가의 지원을 받아 연구를 추진하였다.

4) 앞으로의 전망

유전자 스위치 개념을 중심으로 한 생체기능조절분야 연구는 앞으로 더욱 더 가속화 될 것으로 기대되며, 유전자 결손 마우스를 이용한 *in vivo* 모델의 기능연구가 주가 될 전망이다. 특히 인간의 질병과 노화 진행의 중심을 차지하고 있는 redox signaling에 대한 모델동물을 제시함으로써 생체기능연구를 기초로 신약개발 연구에 일익을 담당할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

구분	연구목표	연구내용	연구 결과
1년차	<p>1.조직특이적 cre 발현 마우스 확보</p> <p>2.유전자 스위치 시스템 개발을 위한 기반기술 확립</p>	<p>1. 조직특이적 cre 발현 마우스 확보</p> <p>2.목적유전자 확보</p> <p>3. loxP 유전자 결손 벡터 제작</p> <p>4. 유전자 적중기술개발</p> <p>5. MEF제작</p>	<p>1. 간조직 특이적 cre 발현 마우스 확보 2종류의 Cre 발현 마우스를 2002년 6월에 도입하고, 본 연구원의 실험동물 팀에서 사육 관리시작</p> <p>1) C57BL/6-TgN(AlbCre)21Mgn 2 pair 2) C57BL/6-TgN(Mx1Cre)21Mgn 2 pair</p> <p>2. Cre 마우스의 선발 및 유지 Genome analysis (마우스 genomic DNA의 분리 및 PCR analysis)를 통해 분석된 마우스는 C57BL/6J와의 breeding을 통해 그 계통을 유지했다.</p> <p>3. Peroxiredoxin III genomic DNA cloning 마우스 PrxIII cDNA를 cloning하기 위하여 마우스(C57BL/6) liver cDNA library(Stratagene, #937330)를 template로 이용하여 PCR cloning을 수행하여 product를 TA cloning vector에 cloning하였다. 이를 sequencing, southern blotting 한 결과하여 PrxIII cDNA임을 확인하였다 (그림 1, 2).</p> <p>4. loxP가 도입된 조건적 유전자 적중용 벡터 개발 Conditional knock-out vector는 cloning된 genomic DNA를 중심으로 knockout vector제작하였으며, 그 제작에 이용되는 구조는 그림 3에 제시된 바와 같다.</p> <p>5. ES cell에 유전자 적중조건 확립 Plating efficiency는 $1\sim 2 \times 10^3$ cells/100 mm culture dish의 농도로 J1 세포를 약 5~7일간 각각의 lot별 serum을 15% 및 30%를 혼합하여 제조한 배양액하에서 배양한 후 형태학적인 관찰 및 colony 형성율을 비교하여 산정하였다 (표 1).</p> <p>6. ES cell 배양용 mouse embryonic fibroblast (MEF)의 제작 Neo유전자가 도입된 MEF 및 ES cell의 증식 및 유지가 가능함으로 유전자 도입에 필요한 제반 여건을 확립(그림4)</p>

2년차	유전자 스위치 모델 개발	<p>1. <i>loxP</i> 유전자가 적중된 ES cell 선발</p> <p>2. 적중 ES cell의 미세주입 및 이식</p> <p>3. chimeric 마우스 생산</p> <p>4. Cre 과발현 마우스 대량 확보</p> <p>5. Cre 과발현 마우스 genotyping</p>	<p>1. <i>loxP</i> 유전자가 적중된 ES cell 선발 1차년도에 loxP 시스템을 이용한 유전자 스위치용 벡터를 만들고, 다시 한 번 PCR로 스위치용 벡터가 정확히 만들어진 것을 확인한 후에 J1 mouse 유래의 ES 세포에 electroporation (EP)을 콜로니의 선발과 증식에 사용되는 배양액의 조성은 기간별로 표 2와 같으며, ES 세포는 LN₂에 동결 보존하고 적중 ES 클론의 분석은 ES cell 배양 후 동결된 ES 세포로부터 genomic DNA를 분리 후 PCR을 이용했다. 아래의 그림 5.에서와 같이 적중된 ES 클론을 분석하였다.</p> <p>2. 적중 ES cell의 미세주입 및 이식(그림 6) Blastocyst(배반포) injection은 현재 본 실험에서 J1 ES 세포를 이용하여, 그림 6. A에서 화살표로 표시된 것과 같이 세포막이 선명하게 관찰되는 세포만을 골라 주입한다. 미세주입된 배반포는 위임신유기 2.5 일령의 ICR 암생쥐의 한쪽 자궁에 8~12개씩 이식했다. 그리고 미세주입 배반포로부터 안정적인 산자 및 chimera 생산을 위해 ICR의 대리모를 사용했다.</p> <p>3. chimeric 마우스 생산 (2년차 까지 결과) Blastocyst injection한 후 대리모 ICR 암생쥐에 이식한 결과 미세주입된 배반포의 임신율에 있어서는 3.5 일령이 2.5 일령에 비해서 2배 정도 임신이 더 잘되었고, 3.5일령의 배반포를 이용한 군의 경우 수컷은 지금까지 총 14마리에 chimeric중 90%가 1마리가 나왔다(표 4). 그림 7. 에서 보는 바와 같이 빨간색의 화살표로 표시한 chimeric 90% 마우스이며, 이상과 같은 Chimera 생쥐의 생산을 계속 수행하여 보다 많은 Chimeric %가 높은 생쥐를 3차 년도에도 더욱 많이 확보할 것이다.</p> <p>4. Cre 과발현 마우스 대량 확보 및 genotyping(그림 8.) 2003년 4월 1일 현재 2002년 6월에 Jackson Lab. 으로부터 도입한 (liver-specific expression) Alb-cre는 수컷 17마리, 암컷 9마리로, (IFN-α inducible)Mx1-cre는 수컷 14마리, 암컷 16마리의 조직 특이적 cre발현 마우스를 한국생명공학연구원의 동물실험실에서 계통보존 및 사육을 하고 있으며, 본 연구의 최종 목표인 Cre/loxP 유전자 스위치 시스템을 이용한 마우스 모델을 생산하기 위해서 조직 특이적 Cre expression mice를 확보, 유지, 관리하고 있다.</p>
-----	---------------	--	---

3년차	유전자 스위치가 도입된 유전자 결손 마우스 생산 및 표현형 검색	<p>1. chimeric 마우스 생산</p> <p>2. loxP 적중 마우스 생산</p> <p>3. Cre/loxP 마우스 생산</p> <p>4. 초기세포계를 이용한 목적단백질의 세포내 기능검색</p>	<p>1. chimeric 마우스생산 (3년차 결과) 2차년도에 생산된 chimeric마우스로부터 germ line의 마우스가 생산이 되지 않아서 2차 targeting ES cell의 Chimera 마우스의 생산을 시도하여 스킷은 지금까지 총 21마리에 chimeric중 chimeric의 90%가 스킷1마리, 80% 암컷 1마리가 생산되었다(표 5.).</p> <p>2. loxP 적중 마우스 생산 Chimeric 마우스로부터 heterozygote 마우스를 생산을 위하여 B6 line과 교배시켜 현재 표현형이 갈색 (germ line)이 스킷 1마리가 태어나 있으나, 계속 breeding을 하여 loxP 적중 마우스를 생산할 예정이다.</p> <p>3. Cre/loxP 마우스 생산 아직 loxP 적중 마우스가 4월 9일 현재 mating이 불가능하여 albumin Cre 과발현 마우스와는 교배가 불가능하여 5월경에는 mating이 가능할 것으로 생각된다. 유전자 결손 마우스 계통 확립이 되면 수정란동결보존을 할 예정이다.</p> <p>4. 초기세포계를 이용한 목적단백질의 세포내 기능검색 a) hepatocyte 분리 배양기술 확립 및 세포내 ROS 반응성 연구: 현재 본 연구실의 간암모델 동물을 이용하여 primary hepatocyte culture 을 확립하여 sex간의 다른 ROS생성량을 FACS로 측정하여 PrxIII KO 마우스의 기능검색을 위한 기술을 확립하였다. (그림 8, 9.) b) Mitochondrial aconitase activity assay방법 확립: PrxIII가 존재하는 mitochondria에 PrxIII가 KO가 되었을 경우 Mitochondria의 분리 및 Krebs cycle enzyme 중에 Aconitase activity를 측정하는 방법을 확립하였다. (그림 10, 11)</p>	90
1단계 (종합)	유전자 스위치 시스템 확립	Cre/loxP 적중 마우스 생산 및 목적단백질의 기능 검색	<p>1) loxP 적중 마우스 생산 및 간 특이적 Cre 발현 마우스 대량 확보하여 Cre/loxP 유전자 적중 마우스생산 예정.</p> <p>2) 목적 단백질의 기능검색을 위한 기초기술 확립.</p>	


```

AGGCAGAAGC ACACCCGCGT GCTCCGGCTA CTCCTCGGTA TCTCCGCCTA TCGTGCCTCT
TGCCTGCTCT GAAGATGGCG GCAGCTGCGG GAAGGTTGCT CTGGTCCCTG .(Intron I
      M A A A A G R L L W S S 12
;1,400bp).. GTTGCTCGTC ATGCAAGTGC TATTTCCCGG AGTATTTCTG CCTCAACAGT
      V A R H A S A I S R S I S A S T V 29
TCTTAGGCCT GTTGCTTCTA GAAGAACCTG TTTGACAGAC ATACTGTGGT CTGCCTCTGC
      L R P V A S R R T C L T D I L W S A S A 49
CCAAGGAAAG TCAGCCTTTA GCACCA..(Intron II; 1,300bp)..GT TCCTCTTTCC
      Q G K S A F S T S S S F H 62
ACACCCCTGC TGTACCCAG CACGCGCCCT ATTTTAAAGG TACTGCTGTT GTCAATGGAG
      T P A V T Q H A P Y F K G T A V V N G E 82
AGTTCAAAGA GCTGAGTCTC GACGACTTTA AGGGAAAATA CTGGGTGCTT TTCTTCTACC
      F K E L S L D D F K G K Y L V L F F Y P 102
CTTTGGATTT..(Intron III; 1,200bp)..CACATTG TGTGTCCCTAC AGAAATTGTT
      L D F T F V C P T E I V 114
GCTTTCAGTG ACAAAGCCAA TGAATTTTCA TGTGTAAGTGTG GTGAAGTAGT TGCAGTTTCA
      A F S D K A N E F H D V N C E V V A V S 134
GTGGATTCCC ACTTCAGTCA TCTTGCCTGG ATCAACACAC CAAGAAAG..(Intron IV;
      V D S H F S H L A W I N T P R K 150
2,300bp).. AATGGTGGTT TGGGCCACAT GAACATCACA CTGTTGTCCG ATATAACTAA
      N G G L G H M N I T L L S D I T K 167
GCAGATATCC CGAGACTACG GAGTGTGCTT GGAAAGTGCT GGCATTGCAC TCAG..(Int
      Q I S R D Y G V L L E S A G I A L R 185
ron V; 2,000bp).. AGGT CTCTTCATTA TTGACCCTAA TGGTGTGCTC AAGCACCTGA
      G L F I I D P N G V V K H L S 200
GTGTCAACGA CCTTCCGGTG GGCCGCAGTG TGAAGAAAC ACTCCGTTTG GTAAAGGCGT
      V N D L P V G R S V E E T L R L V K A F 220
TCCAGTTTGT AGAGACCCAT GGAGAAGTCT GCCCAGCCAA CTGGACACCA GAGTCCCCTA
      Q F V E T H G E V C P A N W T P E S P T 240
CG..(Intron VI; 453bp).. ATCAAGCC AAGTCCAACA GCTTCCAAAG AGTACTTTGA
      I K P S P T A S K E Y F E 253
GAAGGTCCAT CAGTAGGCCA TCCTATGTCT GCAATTACCT GAAGCTTTTC AGGCCAAAAA
      K V H Q * 257
AGAGCCCAG CTGGAATCCT TCCAATGCCT TGAAGATTAT TTATAGAATG GCAAAACCTC
ATTATGTTTG TGTTTATAAG TACTGCTCCA CAGGCTTTGT AATTCTAAGA CAGGTTTCAGG
CTCTCTAAAG GTGGCTAGCT GCTTCCATAG CTGCCCTTAC TAGGGACTTC TTGGTGGCTA
ACCAATICTC CCCGAGTGTG TTGCCCCCAT TTCTTGGATC ATGTCCTTAG AGGGTAAGCA
TTCTTTCCCT TAGCCTGCC TGAACCTTGG TCTACAGTGA AGTAGCACAT AGTGCCAGTA
CTTGGTGAAG TGAAGTAGCA CATAGCACCA GCACTTAATG GAAGCTTCTG ATCAAGGTCC
TAAAAATTCC TCTTGAATTT TTGTGAATTA TGCTGAATTT CCCTTTTTTT TTTTTTAAAC
AGTGTCTCTG TGTGTTCTGA GGTATTGAAG AGGTATAATC ATGAAGGACT ATGTCTAATC
CATAAGTCAT TTCTTCAAG AGCTGGATAT ATAGAAT

```

그림 1. *Prx III* 유전자의 Exon/intron 구조. Intron의 위치와 크기는 ()안에 표시하였고, poly(A)+ signal sequence는 underline되어 있다. 아미노산 서열은 잠정적인 ORF를 기준으로 single letter code로 표시하였다.

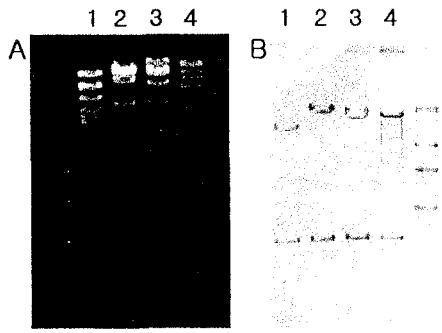


그림 2. PrxIII genomic DNA를 포함하는 BAC clone의 확인. A. 각각의 BAC clone을 KpnI 제한효소로 절단한 후 0.6% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색한 결과. B. A의 결과를 nylon membrane에 transfer하고 이를 DIG-labelled PrxIII cDNA로 southern blotting 한 결과임. 1, BACM-300; 2, BACM-306; 3, BACM-319; 4, BACM-320.

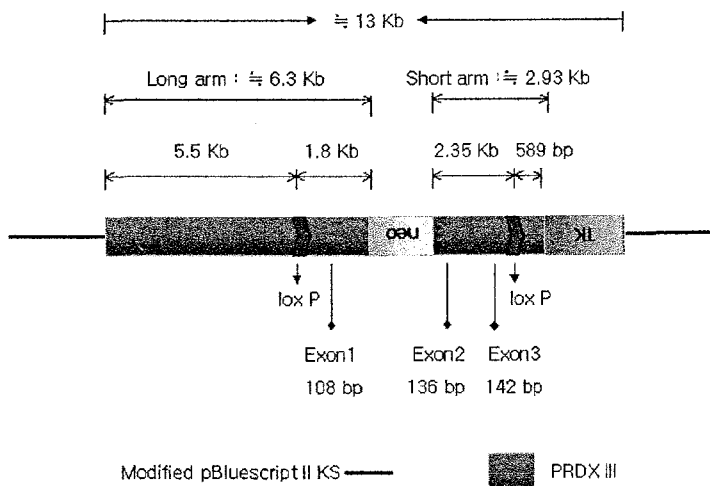


그림 3. 유전자 적중 vector의 구조. 제한효소의 위치는 그림 3과 같고, loxP sequence는 intron II와 V에 삽입하고, positive selection marker인 Neo 유전자는 intron IV에 도입한다.

표 1. 세포의 저농도 배양을 통한 ESQ-FBS (GibcoBRL, 16141-079)의 선발.

Lot number	Quality of morphology		No. of cells colonized	
	15%	30%	15%	30%
32N2051	+++++	+++++	328	354
1019529	++++	++++	381	338
1028187	++	++	329	331
1026234	+	+	318	361

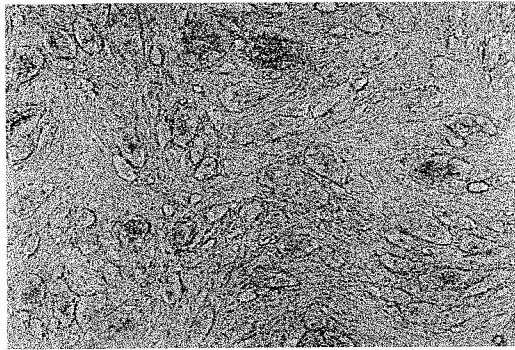


그림 4. MEF 위에서 증식중인 ES 세포의 사

진

표 2. 유전자 적중 ES 세포 콜로니 선발 및 증식 기간중의 배양액 조성.

Component	Composition of medium following culture days				
	SD-1	SD-2	SD-3 ~ 10	P1	P2
DMEM	1×	1×	1×	1×	1×
H-FBS	10%	10%	10%	10%	10%
ESQ-FBS	10%	10%	10%	10%	5%
NEAA	1×	1×	1×	1×	1×
β-ME	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M
P/S	1×	1×	1×	1×	1×
LIF	500 U/ml	-	-	-	-
	-	200 U/ml	200 U/ml	200 U/ml	200 U/ml
G418	200 μg/ml	200 μg/ml	200 μg/ml	-	-
GANC	-	-	2 μM	-	-

Abbreviations are H-FBS, Hyclone FBS; ESQ-FBS, ES qualified FBS; β-ME, β-mercaptoethanol; P/S, penicilline and streptomycin; LIF, leukemia inhibitory factor; GANC, gancyclovior; SD, selection day, P1, proliferation in 96-well culture dish; P2, proliferation in 24-well culture dish.

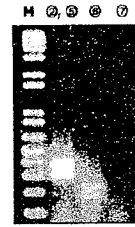
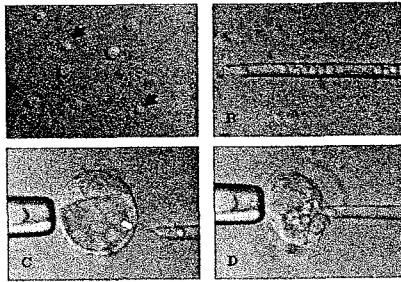
(A)

(B)

그림 5. PCR 방법을 이용한 PRDX III 유전자 적중 ES cell의 분석. (A) primer set을 이용한 분석 계획. (B) 각각의 primer set와 PRDX III 유전자 적중 clone으로부터 추출한 genomic DNA 을 이용한 PCR후의 전기영동사진.

그림 6. 포배강내로 ES 세포의 미세주입. 15개의 작고 둥근 ES 세포 (A, 화살표)를 피펫에 잡은 후 (B), trophectoderm 세포사이의 junction 부위를 통하여 (C) 미세주입 (D).

표 3. 2.5와 3.5일경으로부터 PRDXIII 카이메라마우스의 생산 결과.



Embryo donors (dpc)	No. of BLs		Preg/FM (%)	No. of Offspring(%)		No. of chimera (Chimeric %)		
	Injec	Xfer		Born	Survived	Prod	M	F
2.5	249	361	9/26 (34.6)	27	21 (77.7)	0	0	0
3.5	128	214	10/15 (66.0)	40	38 (95.0)	10	8	2
							1(90%) 1(30%) 6(10%)	1(30%) 1(10%)

Abbreviations are injec, injected; Xfer, transferred; FM, foster mother; preg, pregnant FM; prod, produced; M, male; F, female.



그림 7. Chimera 생쥐의 생산. 화살표(Chimera 마우스).

표 4. 1차 targeting ES cell의 Chimera 마우스의 생산 결과 (2002.10.-2003.5.)
02.10. ~ 03.5.

Embryo donors (dpc)	No. of BLs		Preg/FM (%)	No. of Offspring(%)		No. of chimera (Chimeric %)		
	Injec	Xfer		Born	Survived	Prod	M	F
2.5	249	361	9/26 (34.6)	27	21 (77.7)	0	0	0
3.5	128	214	10/15 (66.0)	40	38 (95.0)	10	8 1(90%) 1(30%) 6(10%)	2 1(30%) 1(10%)
3.5	143	21	7/9 (77.0)	20	18 (90.0)	4	2 1(70%) 1(40%)	2 1(10%) 1(10%)

Abbreviations are injec, inected; Xfer, transferred; FM, foster mother; preg, pregnant FM; prod, produced; M, male; F, female.

표 5. 2차 targeting ES cell의 Chimera 마우스의 생산 결과 (2003.10.-2004.2.)

Embryo donors (dpc)	No. of BLs		Preg/FM (%)	No. of Offspring(%)		No. of chimera (Chimeric %)		
	Injec	Xfer		Born	Survived	Prod	M	F
3.5	520	78	26/33 (81.8)	147	113 (76.8)	21	13 1(90%) 4(40%) 8(20%)	8 1(80%) 4(40%) 3(20%)

Abbreviations are injec, inected; Xfer, transferred; FM, foster mother; preg, pregnant FM; prod, produced; M, male; F, female.

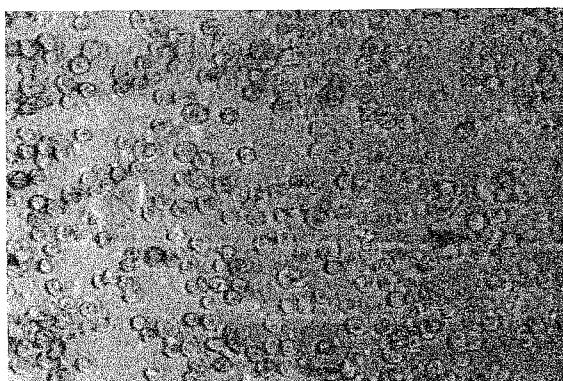


그림 8. Mouse 초기 간싯질세포 분리 및 배양

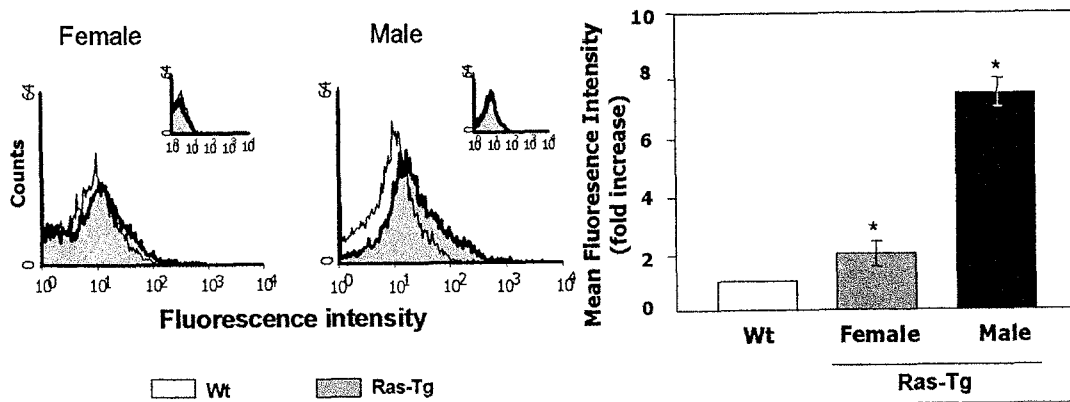


그림 9. 마우스 초기 간실질세포를 이용한 세포내 ROS 생성량 측정 기술 확립

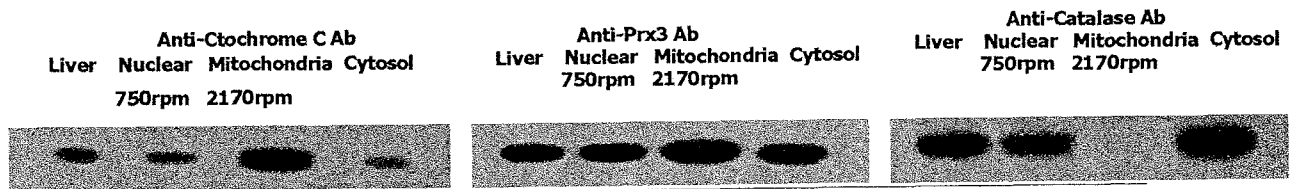


그림 10. 마우스 초기 간실질세포로 부터 mitochondria 분리 방법 확립

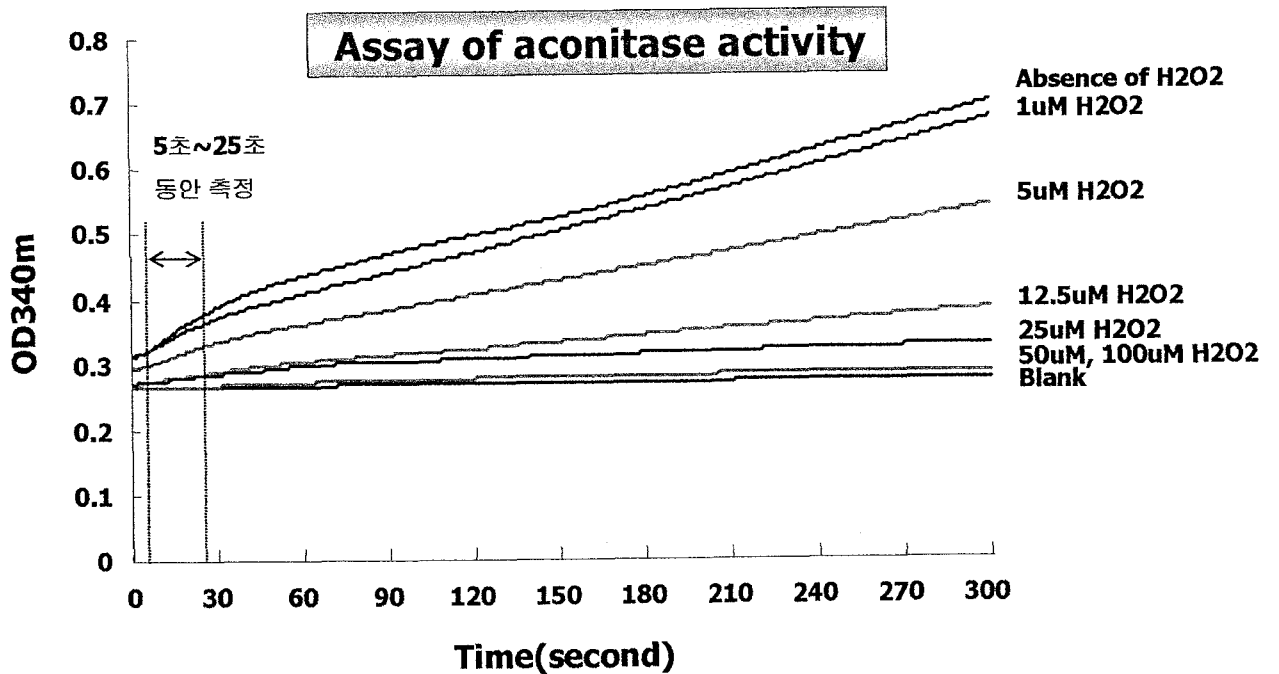


그림 11. 마우스 초기 간실질세포로 부터 mitochondria의 Aconitase activity 측정방법 확립

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구목표 달성도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	조직 특이적 cre 발현 마우스 확보	cre 마우스 2종 확보	100
2	Peroxiredoxin III gDNA cloning	cDNA 및 genomic DNA 확보 및 특성규명	100
3	<i>loxP</i> 가 도입된 조건적 유전자 적중용 벡터 개발	유전자 스위치 개발용 벡터 구축	100
4	ES cell에 유전자 적중조건 확립	배양액의 적정조건 및 colony형성조건 확립	100
5	ES cell 배양용 mouse embryonic fibroblast (MEF)의 제작	Neo 발현 유전자가 도입된 MEF 확보	100
6	표적유전자가 적중된 ES cell 선발	유전자 적중된 ES cell의 선발	100
7	Chimeric 마우스생산	미세주입 및 이식	100
8	Cre 과발현 마우스 생산	Genotyping 및 대량확보	100
9	초기세포계를 이용한 목적단백질의 세포내 기능검색	hepatocyte의 ROS반응성 검토	100

2. 연구목표 달성에 필요한 핵심기술 확보의 대표적 성과

1) 과배란유기 또는 체외배양으로 준비한 임신 2.5 또는 3.5 일령의 C57BL/6 배반포를 이용하여 효율적인 미세주입 가능성을 조사하여, 과배란유기 및 자연교미 후 3.5 일령에 배반포를 회수할 경우 투명대가 없는 배반포의 회수율 (2.83/생쥐 및 1.05/생쥐)이 높은 반면, 2.5일령에서는 과배란유기 및 자연교미와 무관하게 그 발생율 (0.01/생쥐 및 0.05/생쥐)이 현저하게 감소하였다. 최종적으로 유전자 적중된 J1 배아주세포의 생식선이행능력을 검증함으로써 과배란유기 및 체외배양 기법을 통하여 생쥐의 유전자 적중을 위한 미세주입가능한 배반포를 효율적으로 생산할 수 있음을 알 수 있었다.(Experimental animals (in press))

2) Ros의 생성 반응성 측정 기술을 확립하기 위해서 본연구실이 보유하고 있는 H-Ras transgenic mice을 이용하여 초기 배양 간질세포로 실험을 하던 중에 male과 female이 확연히 Ros의 생성이 다른 것을 주목하고 연구를 한 결과 sex hormone의 차이로 Ros의 생성 및 반응이 male과 female이 다르다는 것과 그로 인한 세포내의 signal pathway의 변화가 다르다는 것을 연구한 내용을 현재 Hepatology에 투고 중이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발성과의 실용화

1) 국내외 시장 현황 및 전망

앞의 연구개발의 필요성에서 언급을 한 것과 같이 실험모델 동물로써 WHO의 공인을 받은 것으로는 일본에서 개발한 Polio Virus Receptor 형질전환 마우스가 첫 번째이다. 현재 매년 약 20,000마리가 실험용으로 전 세계적으로 공급되고 있는데 앞으로의 경제가치를 추정해보면 엄청난 부가가치가 있는 실험동물이 될 것으로 판단되고 있다. 현재의 가격은 마리당 10,000¥이다. 미국 Taconic Farm 회사는 형질전환 동물(마우스, 쥐)을 판매하는 회사로, 제약회사를 대상으로 형질전환 마우스 개발에 적극 투자하고 있다. Taconic사는 현재 TNF- α 형질전환 마우스를 비롯한 30여종의 형질전환마우스를 100~250\$의 가격으로 공급하고 있으며, 일본에서도 독성시험이나, 의약품의 스크리닝의 목적으로 형질 전환마우스가 일반적으로 사용되고 있어, 이 분야의 시장형성 확대가 기대된다. 본 연구팀 또한 전통적인 K.O. 시스템을 이용한 질환모델 마우스 개발시스템을 구축하였으며, 현재 분석중인 항산화효소 관련 모델마우스의 표현형 분석이 완료되어 실험동물로의 가치를 인정받게 되면, ROS 관련 질환의 원인 규명은 물론 치료제의 약효검정에 필요한 모델동물로 발전될 것으로 기대되며 그 만큼 경제적 가치가 있다고 생각한다. 특히 본 연구를 통해 유전자 스위치 개념이 도입된 마우스 모델을 개발하여 실험모델로 이용할 경우 그 부가가치는 매우 클 것으로 생각된다.

2) 사업성과

본 연구결과의 활용도 측면에서는 본 생체기능조절 Frontier 과제에서 목적으로 하는 여러 질환과 매우 관련성이 높다. 특히 활성산소화합물 (reactive oxygen species, ROS)는 세포내외의 많은 molecules와 반응하는데 단백질의 활성 혹은 불활성화, DNA break, lipid peroxidation 등을 유도한다. ROS에 의한 oxidative stress는 노화, 즉 현재 사회적으로 문제가 되고 있는 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cystic fibrosis, amyotrophic lateral sclerosis, 당뇨병 등의 질환에 관여하고 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에 이용될 목적유전자는 최근 발견된 항산화효소 유전자, *Peroxiredoxin III(PrxIII)*를 이용하고자 한다. *PrxIII*는 미토콘드리아에만 존재하는 항산화효소로서 특히 유전자 스위치 시스템이 도입된 항산화효소 유전자 결손 마우스를 활용한 생체내 ROS 관련 간질환연구는 물론 질환 초기 기전 연구 및 치료제 개발에 매우 귀중한 자료를 제공될 수 있을 것이다.

제 2 절 연구개발성과의 응용잠재력 및 산업·공공분야 파급효과

1) 기술적 응용잠재력 (과학기술적 성과 측면 포함)

과발현 및 유전자결손 마우스 개발에 대한 문제점 중 조직특이성과 발현시기를 조절하고자 하는 연구가 많은 연구자들에 의해 진행 중에 있다. 이들 중 가장 최근에 개발된 연구방법은 유전자 스위치를 이용한 유전자 적중방법(conditional gene targeting)이다. 이 방법은 전통적인 유전자 적중방법과 조직 및 발현시기 특이적 재조합(recombination)을 접목한 방법이다. 하지만 전통적인 유전자 적중방법과 조직 특이적 발현 시스템이 적절하게 조합되어야 함으로 많은 시간과 기술이 요구된다. 그러나, 앞에서도 언급한 바와 같이 질환모델 동물 개발에 꼭 도입되어야 할 연구방법이며, 또한 인간게놈의 염기서열과 프로테옴 연구가 활발해 지고 있어, 이들 유전자의 기능을 밝히기 위한 적절한 모델동물의 개발의 효율적 추진을 위한 기술적 응용 잠재력은 충분히 있다.

2) 사업화로서의 활용가능성

신약 개발의 두 축은 표적물질(유전자 또는 단백질)과 이를 조절하는 물질(일반적으로 분자량이 1,000이하인 유기화합물)이라고 생각된다. 특정 질환모델 마우스를 이용한 단백질 연구 역시 신약단백질의 확보를 가능하게 하여 향후 연구개발을 가속화할 것이며, 신약창출가능성 및 표적단백질 확보 연구를 위한 질환모델도 수요가 증가 할 것이다.

3) 산업·공공분야 파급효과

본 연구과제를 통해 제안된 순환기계 질환, 대사성 질환, 간질환 그리고 골다공증, 관절염, 알러지 등은 우리 나라에서 호발하는 질환으로써 이 질환으로 인한 가정 및 사회적인 문제는 매우 심각한 실정이다. 이에 따라 이들 질병을 예방하고 치료할 수 있는 치료제 개발이 절실하다. 이와 관련된 질환모델동물은 후보 신약의 약효를 검증하는데 유용한 실험계이므로, 활용 가치가 높은 질환모델동물의 개발은 맞춤형약시대를 예고하는 현재의 질병치료 분야에 파급효과가 클것으로 생각한다.

4) 연구개발 인프라 구축

Micromanipulator (3천만원) 을 1년차에 구입하여 유전자 스위치 시스템 확립의 본 연구과제에 절대적으로 필요한 포배강내로 ES 세포의 미세주입 기술을 확립하였다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 연구사례의 조사

1) 외국의 경우

가. 산업화 된 사례

○ 과발현 마우스

- Polio virus receptor과발현 마우스 : 10,000엔, WHO 공인.
- TNF- α 과발현 마우스 : 100 - 250 \$.

○ cre/loxP 유전자 조절마우스

- 보고된 바 없음.

나. 연구보고된 사례 (cre/loxP 유전자 조절마우스)

○ 간질환

- Nuclear factor 4 α 유전자 조절마우스 (Hayhurst 등, 2001)

○ 허혈성 질환

- Connexin 43 유전자 조절마우스 (Liao 등, 2001)
- Glycoprotein VI 유전자 조절마우스 (Nieswandt 등, 2001)

○ 당뇨

- Foxa2 유전자 조절마우스 (Sund 등, 2001)
- GLUT4 유전자 조절마우스 (Kim 등, 2001)
- Hnf-1 α 유전자 조절마우스 (Lee 등, 1998)
- Insulin receptor 유전자 조절마우스 (Kulkarni 등, 1999)

○ 유방암

- Brca2 유전자 조절 마우스 (Ludwig 등, 2001)

○ 뇌질환

- Rumpshaker-like proteolipid protein 유전자 조절마우스 (Uschkureit 등, 2001)
- NF1 유전자 조절마우스 (Zhu 등, 2001)
- Beta-catenin 유전자 조절마우스 (Brault 등, 2001)
- Mineralocorticoid receptor 유전자 조절마우스 (Gass 등, 2001)
- Mecp-2 유전자 조절마우스 (Guy 등, 2001)
- Plasma fibronectin 유전자 조절마우스 (Sakai 등, 2001)

○ 면역질환

- Prosaposin (Saposin A domain) 유전자 조절마우스 (Matsuda 등, 2001)
- Pten 유전자 조절마우스 (Suzuki 등, 2001)

○ 피부질환

- Beta-catenin 유전자 조절마우스 (Huelsenken 등, 2001)

2) 국내의 경우

○ 보고된 바 없음.

3) 조사연구개발사례에 대한 평가

고등동물의 유전자 재조합 기술과 이를 발생공학 기술에 접목시켜 유용한 표현형을 갖는 동물을 생산하는 기술은 미지 유전자의 기능 연구 및 질환모델동물 분야에 매우 유용한 기술이다. 질환모델동물개발에 관한 전 세계적 연구동향을 조사한 결과, 일부분에서 자연발증 모델동물을 중심으로 연구가 진행되고 있으나 형질전환동물을 활용하는 경우는 아직 개발 단계에 있다. 최근 형질전환기법에 의한 실험동물을 개발하여 후보 의약품의 효능검정에 활용하려는 움직임이 선진국을 중심으로 활발히 전개되고 있어 질환모델동물 개발 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

제 2 절 세부 기술사항의 검토 분석

1) 국내·외 기술수준 비교표

내 용	국외	국내
1. 유전자 재조합기술	상	상
2. 조직특이적 발현 스위치 개발기술	상	하
3. 유전자 결손마우스 생산	상	중
4. 유전자 결손마우스의 유전성 검색	상	상
5. 유전자 결손마우스의 계통 보존	상	상
6. 유전자 결손마우스의 대량생산	상	상
7. 유전자 결손마우스의 기능연구	상	중

2) 공정단위별로 주요 기술사항 및 그 기술수준의 분석평가를 다음 사항에 걸쳐 기술함

가) 외국의 경우

- 유전자 스위치 개념 도입 : 90년대 중반에 확립됨.
- 유전자 결손마우스의 유전성 검색 : 80년대 중반에 확립됨.
- 형질전환마우스의 수정란 동결보존 : 80년대 중반에 확립됨.
- 유전자 결손마우스의 계통 보존 : 80년도 중반에 확립됨.
- 유전자 결손마우스의 대량생산 : 80년도 말에 확립됨.
- 질환모델용 유전자 결손 마우스의 개발 : 90년대 후반부터 연구되고 있음.

나) 국내의 경우

- 유전자 스위치 개념 도입 : 보고된 바 없음.
- 유전자 결손마우스의 유전성 검색 : 90년대 중반에 확립됨.
- 형질전환 마우스의 수정란 동결보존 : 90년대 초반에 확립됨.
- 형질전환 마우스의 계통 보존 : 한국생명공학연구원 유전자원센터의 실험동물팀이 지정 연구실임으로 가능.
- 형질전환 마우스의 대량생산 : 한국생명공학연구원 유전자원센터 실험동물팀에 의해 추진중임.
- 질환모델용 유전자 결손 마우스의 개발 : 보고된 바 없음.

다) 개발되었거나 개발 중인 새로운 기술

- 개발된 기술
 - 수정란 미세주입기술
 - 유전자 재조합 기술

- 원시세포 배양기술
- 개발중인 기술
 - 조직특이적 프로모터 선별기술

라) 특허 및 기술도입과의 중복여부에 대한 검토·분석

질환모델 관련 유전자결손마우스는 실험동물로 개발되어 활용되고 있는 것이 극히 소수이므로 특허 및 기술도입의 중복에 대한 검토가 필요하지 않다. 단지 전기자극법에 의한 ES cell에 대한 유전자도입 기술만이 특허로 등록되어 있다. 이 기술에 의해 형질전환동물을 개발/산업화하려는 사람은 어느 누구나 이 특허를 피할 수는 없다.

제 7 장 참고문헌

○ 국내전문학술지

- (1) 김선옥, 구본실, 정상균, 이태훈, 유성란, 남윤이, 김정립, 현병화, 신희섭, 이경광, 상병찬, 유대열. 2001. J1 배아주세포를 이용한 효율적인 생식선 이행 카이메라의 생산. 한국가축번식학회지. 25(1):63-70.
- (2) S.L. Yu, T.H. Lee, B.C. Sang, S.T. Shin, K.K. Lee, D.Y. Yu. 2000. Characterization of lactoferrin gene 5' flanking region of korean native goat. Korean Journal of Animal Science. 42(1): 9-20.

○ 국외전문학술지

- (1) Ha HY, Moon HB, Nam MS, Lee JW, Ryoo ZY, Lee TH, Lee KK, So BJ, Sato H, Seiki M, Yu DY. 2001. Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. Cancer Res. 61(3):984-90.
- (2) Kim G, Lee T, Wynshaw-Boris A, Levine RL. 2001. Nucleotide sequence and structure of the mouse carbonic anhydrase III gene. Gene. 265(1-2):37-44.
- (3) Seo M.S., Kang S.W., Kim K., Baines IC, Lee T.H., Rhee S.G. 2000. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. J Biol Chem. 275, 20346-20354.
- (4) Tae-Hoon Lee, Sun Jung Kim, Sang Won Kang, Kyung-Kwang Lee Sue Goo Rhee, Dae-Yeul Yu. 2000. Molecular cloning and characterization of mouse *peroxiredoxin V* gene. Biochemical and Biophysical Research Communications. 270, 356-362.
- (5) Kim, H, Lee, T.H., Park, E.S., Suh, J.M., Park, S.J., Chung, H.K., Kwon, O-Y, Kim, Y.K., Ro, H.K., Shong, M.H. 2000. Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. J. Biol. Chem. 275, 18266-18270.
- (6) Lee, T.H., Yu, S.L., Kim, S.U., Kang, S.W., Rhee, S.G., Yu, D.Y. 1999. Characterization of the murine gene encoding 1-Cys peroxiredoxin and identification of high homologous genes. Gene. 234, 337-344.
- (7) Lyu, M.S., Rhee, S.G., Chae, H.Z., Lee, T.H., Adamson, M.C., Kang, S.W., Jin, D.Y., Jeang, K.T., Kozak, C.A. 1999. Genetic mapping of six mouse peroxiredoxin genes and fourteen peroxiredoxin related sequences. Mamm. Genome. 10, 1017-9 .

- (8) Lee, T.H., Yu, S.L., Kim, S.U., Lee, K.K., Rhee, S.G., Yu, D.Y. 1999
Characterization of mouse peroxiredoxin I genomic DNA and its expression
Gene. 239, 243–250.

보고서 초록

과제관리번호	CBM1-B222-001-1-0-0	해당단계 연구기간	2001.12.-2004.06	단계 구분	1단계 / 3단계
연구사업명	중 사업명	21세기 프론티어 연구개발사업			
	세부사업명	생체기능조절물질개발사업			
연구과제명	중 과제명	중과제가 있을 경우에는 기재 (단위과제일 경우에는 아래 기재)			
	세부(단위)과제명	간질환 모델동물개발을 위한 유전자 스위치 시스템 확립			
연구책임자	이 동 석	해당단계 참여연구원수	총 : 5명 내부 : 4명 외부 : 1명	해당단계 연구비	정부: 266,025 천원 기업: 천원 계: 천원
		연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 인간유전체연구실	참여기업명	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 : 전남대학교 치과대학 연구책임자 : 이태훈				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>-본 연구과제는 생체기능조절물질에 대한 in vivo 기능 연구를 위한 모델동물의 제작방법으로서 조직 특이적 목적 유전자 결손을 유도하여 조직 특이적 질환을 유도할 수가 있는 유전자 스위치 시스템 확립을 목적으로 하였으며, 목적 유전자로서 최근 발견된 항산화효소 유전자, <i>Peroxioredoxin III(PrxIII)</i>를 이용하였다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 유전자 스위치 시스템 개발을 위한 기반기술 확립 및 조직특이적 cre recombinase 발현 마우스 확보 <ol style="list-style-type: none"> 1) <i>PrxIII</i> genomic DNA cloning 2) <i>PrxIII</i> 유전자 조건적 결손용 <i>loxP</i>가 도입된 조건적 유전자 적중용 벡터 개발 3) 재조합 벡터에 의한 Embryonic Stem (ES) cell에 유전자 적중조건 확립 4) 조직특이적 cre recombinase 발현 마우스 확보 5) 간조직 특이적 cre 발현 마우스 확보 2. 유전자 스위치 모델 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) 표적유전자가 적중된 ES cell 선발 2) 적중된 ES cell의 미세주입 및 이식 3) chimeric 마우스생산 및 genotyping 4) Cre 과발현 마우스 genotyping 및 대량확보 3. 유전자 스위치가 도입된 유전자 결손 마우스 생산 <ol style="list-style-type: none"> 1) <i>loxP</i> 적중 마우스 생산 2) Cre/<i>loxP</i> 마우스 생산 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	유전자 결손 마우스, 항산화효소, 모델동물, 조직특이적, 유전자 적중방법			
	영 어	Knock-out mice, antioxidant enzyme, model animal, tissue specific, conditional gene targeting			

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	21세기 프론티어 연구개발사업			
	세부사업명	생체기능조절물질개발사업			
과제명		간질환 모델동물개발을 위한 유전자 스위치 시스템 확립			
연구기관		한국생명공학연구원	연구책임자	이 동 석	
총연구기간		2001년. 12월. 01일. ~ 2004년. 6월. 30일. (31개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		266,025		266,025	
기술분야					
참여기업					
공동연구기관					
위탁연구기관		전남대학교 치과대학			
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진()	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

2004년 8월 30일

연구책임자 : 이 동 석 (인)

연구기관장 : 한국생명공학연구원 원장 (직인)

과학기술부장관 귀하

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

과발현 및 유전자결손 마우스 개발에 대한 문제점 중 조직특이성과 발현시기를 조절하고자 하는 최근에 연구방법은 유전자 스위치를 이용한 유전자 적중 방법이다. 재조합 기능을 유전자 스위치 시스템을 확립하기 위해서 먼저 *loxP*가 삽입된 재조합 벡터를 만들고, *loxP* 염기서열을 가진 목적유전자 (*Peroxiredoxin III*)의 적중된 ES cell을 이용한 전통적인 유전자결손 방법, 적중된 ES cell을 배반포에 미세주입한 후 대리모에 이식하여 *loxP*가 삽입된 목적유전자가 적중된 Chimeric, *loxP* 적중 마우스를 생산하였다, 목적 단백질의 기능을 탐색을 위한 기초 기술을 확립하였다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록 (해당사항 없음)

나. 프로그램 등록목록 (해당사항 없음)

다. 노하우 내역

과배란유기 또는 체외배양으로 준비한 임신 2.5 또는 3.5 일령의 C57BL/6 배반포를 이용하여 효율적인 미세주입 가능성을 조사하여, 과배란유기 및 자연교미 후 3.5 일령에 배반포를 회수할 경우 투명대가 없는 배반포의 회수율 (2.83/생쥐 및 1.05/생쥐)이 높은 반면, 2.5일령에서는 과배란유기 및 자연교미와 무관하게 그 발생율 (0.01/생쥐 및 0.05/생쥐)이 현저하게 감소하였다. 최종적으로 유전자 적중된 J1 배아주세포의 생식선이행능력을 검증함으로써 과배란유기 및 체외배양 기법을 통하여 생쥐의 유전자 적중을 위한 미세주입가능한 배반포를 효율적으로 생산할 수 있음을 알 수 있었다.(Experimental animals (in press))

라. 발생품 및 시작품 내역

구분	품명	규격	단위	수량	단가	금액(원)	비고
구입	micromanipulator 시스템(I)	Laica	시스템	1	30,300,000	30,300,000	
합계					30,300,000	30,300,000	

바. 논문게재 및 발표 실적

○논문게재 실적

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
Experimental animals (in press)	Establishment of a Practical Way of Producing Microinjectable Blastocysts for Germ-line Transmission of Embryonic Stem cells	in press		일본 실험 동물학회	일본	
Hepatology	Gender Dependent Generation of Hepatocellular Carcinoma in the Transgenic Mice Expressing H-ras12V	Submit			미국	
계: 건수	2					

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	계재연월일	호	발행기관	국명
한국가축번식학회	Characterization of mouse peroxiredoxin III genomic DNA and its expression	2002년 월 일		한국가축번식학회	한국
계: 건수	1				

3. 연구성과

※ 기술이전이나 기업화 완료(추진중 포함) 실적(해당사항 없음)

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

나. 활용방법

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

4. 기대효과

1) 기술적 응용잠재력 (과학기술적 성과 측면 포함)

과발현 및 유전자결손 마우스 개발에 대한 문제점 중 조직특이성과 발현시기를 조절하고자 하는 연구가 많은 연구자들에 의해 진행 중에 있다. 이들 중 가장 최근에 개발된 연구방법은 유전자 스위치를 이용한 유전자 적중방법(conditional gene targeting)이다. 이 방법은 전통적인 유전자 적중 방법과 조직 및 발현시기 특이적 재조합(recombination)을 접목한 방법이다. 하지만 전통적인 유전자 적중방법과 조직 특이적 발현 시스템이 적절하게 조합되어야 함으로 많은 시간과 기술이 요구된다. 그러나, 앞서서도 언급한 바와 같이 질환모델 동물 개발에 꼭 도입되어야 할 연구방법이며, 또한 인간게놈의 염기서열과 프로테옴 연구가 활발해 지고 있어, 이들 유전자의 기능을 밝히기 위한 적절한 모델동물의 개발의 효율적 추진을 위한 기술적 응용 잠재력은 충분히 있다.

2) 사업화로서의 활용가능성

신약 개발의 두 축은 표적물질(유전자 또는 단백질)과 이를 조절하는 물질(일반적으로 분자량이 1,000이하인 유기화합물)이라고 생각된다. 특정 질환모델 마우스를 이용한 단백질 연구 역시 신약단백질의 확보를 가능하게 하여 향후 연구개발을 가속화할 것이며, 신약창출가능성 및 표적단백질 확보 연구를 위한 질환모델도 수요가 증가 할 것이다.

3) 산업·공공분야 파급효과

본 연구과제를 통해 제안된 순환기계 질환, 대사성 질환, 간질환 그리고 골다공증, 관절염, 알러지 등은 우리 나라에서 호발하는 질환으로써 이 질환으로 인한 가정 및 사회적인 문제는 매우 심각한 실정이다. 이에 따라 이들 질병을 예방하고 치료할 수 있는 치료제 개발이 절실하다. 이와 관련된 질환모델동물은 후보 신약의 약효를 검증하는데 유용한 실험제이므로, 활용 가치가 높은 질환모델동물의 개발은 맞춤형의약시대를 예고하는 현재의 질병치료 분야에 파급효과가 클것으로 생각한다.

4) 연구개발 인프라 구축

Micromanipulator (3천만원) 을 1년차에 구입하여 유전자 스위치 시스템 확립의 본 연구과제에 절대적으로 필요한 포배강내로 ES 세포의 미세주입 기술을 확립하였다.

5. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

Establishment of genetic switch system for the production of disease model mice associated with liver disease

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	CBM1-B222-001-1-0-0			
과제명	간질환 모델동물개발을 위한 유전자 스위치 시스템 확립			
사업명	21세기 프론티어 연구개발사업			
세부사업명	생체기능조절물질개발사업			
연구기관	한국생명공학연구원	기관유형	정부출연기관	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001년. 12월. 01일. ~ 2004년. 6월. 30일. (31개월)			
총연구비	정부(266,025)천원 민간()천원 합계(266,025)천원			
연구책임자 1	성명	이 동 석	주민번호	
	근무기관 부서	인간유전체연구실	E-mail	lee10@kribb.re.kr
	직위/직급	선임연구원	전화번호	042-860-4349
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	이 동 석	소속/부서	인간유전체연구실
	직위/직급	선임연구원	E-mail	lee10@kribb.re.kr
	전화번호	042-860-4349	FAX	042-860-4608
	주소	(305-333) 대전시 유성구 어은동 52번지		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

과발현 및 유전자결손 마우스 개발에 대한 문제점 중 조직특이성과 발현시기를 조절하고자 하는 연구가 많은 연구자들에 의해 진행 중에 있다. 이들 중 가장 최근에 개발된 연구방법은 유전자 스위치를 이용한 유전자 적중방법(conditional gene targeting)이다. 이 방법은 전통적인 유전자 적중 방법과 조직 및 발현시기 특이적 재조합(recombination)을 접목한 방법이다. 조직 및 발현시기 특이적 재조합효소는 특정유전자 염기서열에 작용하여 목적단백질의 염기서열을 재조합 함으로써 그 유전자의 발현을 중지시킬 수 있다. 박테리오페이지 P1의 Cre recombinase와 효모의 Flp recombinase는 가장 잘 알려진 recombinase이다. 이들 Cre와 Flp는 각각 *loxP*와 *frt*부위의 34bp 염기서열을 인식하고, 동일한 DNA가닥 위에 *loxP*와 *frt*가 다수 존재할 경우 recombination을 일으켜 두 개 또는 그 이상의 *loxP* 사이의 유전자 염기서열을 제거한다. 이러한 재조합 기능을 유전자 스위치 개념에 도입한 기술로서 먼저 recombinase의 조직특이적 발현과 *loxP*가 삽입된 재조합 벡터가 구성되어야 하고, *loxP* 염기서열을 가진 목적유전자의 적중이 필요하다. 특히 *loxP*를 가진 목적유전자의 적중은 수정란 간세포(embryonic stem cell)를 이용하여 추진되므로 전통적인 유전자결손 방법이 확립되어 있어야 한다. 이와 같은 기술로 개발한 마우스는 조직특이성과 발현시기를 조절이 가능하다.

<기술적 특징>

- (1) *loxP*가 도입된 조건적 유전자 적중용 벡터 개발
- (2) ES cell에 유전자 적중조건 확립
- (3) 적중 ES cell의 미세주입 및 이식

[용도·이용분야]

- (1) 치료제의 약효검정에 in vivo 모델동물 이용.
- (2) 특정 질환모델 마우스를 이용한 단백질 연구 역시신약창출가능성 및 표적단백질 확보를 가속화 할 수 있다.

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	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 확보된 기술

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

[기술을 도출한 과제현황]

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 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

첨부자료: 연구개발 성과물 목록(3년간 실적 기재)

가. 논문(2 건) :

논문 제목	국내	저널	accepted (년.월.일)	published (년.월.일)	권/호/page		국명	acknowledgment
	국외	(SCI여 부표시)			(학술지명)	발생기관		
1 제목: Gender Dependent Generation of Hepatocellular Carcinoma in the Transgenic Mice Expressing H-ras12V 저자: Ai-Guo Wang, Mi-Ran Lee, Hyung-Bae Moon, Chae Young Hwang, Ki-sun Kwon, Seong-Lan Yu, Dong-Seok Lee, Eun-Yi Moon, Tae-Hoon Lee, Sang-Keun Kim, Dae-Yeul Yu								The Center for Biological Modulators of the 21st Century Frontier R&D Program, the Ministry of Science and Technology, Korea Grant (CBM1-B222-001-1-0-0)
	국외	0	Hepatology (Submit)					
2 제목: Establishment of a Practical Way of Producing Microinjectable Blastocysts for Germ-line Transmission of Embryonic Stem cells 저자: Sun-Uk KIM, Ying-Hao HAN, Tae-Hoon LEE, Byung-Hwa HYUN, Sang-Ho LEE, Dong-Seok LEE, and Dae-Yeul YU								This research was supported by a grant (CBM1-B222-001-1-0-0) from the Center for Biological Modulators of the 21st Century Frontier R&D Program, the Ministry of Science and Technology, Korea.
	국외	0	Experimental animals (in press)					

나. 국내외 학술대회 발표(1 건) :

학술대회발표		국내	학회명	초청	참가	장소	권/호/page		acknowledgment
		국외				(년.월.일)	(국명)		
1	제목	국내	한국가 축번식 학회	()	(0)	경상대학교			This research was supported by a grant (CBM1-B222-001-1-0-0) from the Center for Biological Modulators of the 21st Century Frontier R&D Program, the Ministry of Science and Technology, Korea.
	저자					2002	한국		