GOVP1200508848

M10203000108

국가지정연구실사업

in vivo 생명과학 연구를 위한 유전자 변형 동물 모델(GEM)의 생산, 유지 및 표현형 분석

성 균 관 대 학 교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 "***in vivo* 생명과학 연구를 위한 유전자 변형 동물 모델(GEM)의 생산, 유지 및 표현형 분석**"과제의 보고서로 제출합니다.

2004. 9. 21.

주관연구기관명 : 성균관대학교

주관연구책임자 : 이 한 웅

연 구 원 : 정 철 호

〃 : 최 윤 식

〃 : 양 은 영

보고서 초록

<table>
<tr><td>과제관리번호</td><td>M10203000108</td><td>해당단계
연구기간</td><td>'02.06.25 ~
'04.06.24(24개월)</td><td>단계 구분</td><td>1단계/총 2단계</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구사업명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">국가지정연구실사업</td></tr>
<tr><td>세부사업명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구과제명</td><td>중 과 제 명</td><td colspan="4">(해당사항 없음)</td></tr>
<tr><td>세부(단위)과제명</td><td colspan="4">in vivo 생명과학 연구를 위한 유전자 변형 동물 모델(GEM)의 생산, 유지 및 표현형 분석</td></tr>
<tr><td>연구책임자</td><td>이 한 웅</td><td>해당단계
참여연구원수</td><td>총 : 15 명
내부 : 15 명
외부 : 0 명</td><td>해당단계
연구비</td><td>정부: 560,000 천원
기업: 200,000 천원
계: 760,000 천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소속부서명</td><td colspan="2">성균관대학교 의과대학</td><td>참여기업명</td><td colspan="2">(주)오리엔트 (장재진)</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="5">(해당사항 없음)</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="5">(해당사항 없음)</td></tr>
<tr><td colspan="4">요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)</td><td>보고서
면수</td><td>35</td></tr>
</table>

21세기에 들어 유전정보가 genome project에 의해 이미 알려진 이상, 그 기능을 알기 위한 기능적 게놈 프로젝트(Functional Genomics)가 더욱 중요한 의미를 갖게 되었으며, 이를 위한 유전자 과발현 혹은 적중 생쥐(형질 전환 동물, Genetically Engineered Mouse; GEM)의 생산과 그 표현형 연구가 매우 중요한 일이 되었다. 이를 해결하기 위해 먼저 1. MSPF 시설을 근간으로 infra를 구축하고, 2. 다수의 GEM을 생산하고, 3. 확보 또는 제작된 GEM들의 유전적 배경을 조절하여 국내의 과학자들에게 공급하며, 4. GEM의 표현형 분석에 필요한 정보 제공 및 공동연구를 통하여 우리나라의 전체적 의, 생명과학의 발전에 이바지함을 목표로 하였다.

그 결과 1) 수많은 GEM의 제작 및 도입으로 2) 현재 약 200 여종의 GEM을 포함하는 Mouse Bank를 설립하였으며, 3) 그 표현형을 분석할 수 있는 PAC (Phenotype Analysis Center) system을 원활히 이용하여 다수의 연구 논문 발표 및 특허출원의 성과를 얻었다. 확보 또는 제작된 GEM의 Mouse Bank는 국가적 "생명자원"이며, 이를 통해 GEM을 보관 및 국내 연구자들에게 공급한다.

<table>
<tr><td rowspan="2">색 인 어
(각 5개 이상)</td><td>한 글</td><td>생체 내, 유전자 변형 생쥐, 동물모델, 표현형 분석, MSPF (Microisolated Specific pathogen-free) system</td></tr>
<tr><td>영 어</td><td>in vivo, Genetically engineered mice, animal model, phenotype analysis, MSPF (Microisolated Specific pathogen-free) system</td></tr>
</table>

요 약 문

Ⅰ. 제 목 : *in vivo* 생명과학 연구를 위한 유전자 변형 동물 모델(GEM)의 생산, 유지 및 표현형 분석

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

21세기에 들어 유전정보가 genome project에 의해 이미 알려진 이상, 그 기능을 알기 위한 기능적 게놈 프로젝트(Functional Genomics)가 더욱 중요한 의미를 갖게 되었다. 그러므로 인간의 유전적 정보를 바탕으로 인간과 비슷한 모델 동물에서 인간 유전자의 기능을 연구하여 이를 인간에 적용시키는 것이 기능적 게놈 프로젝트의 핵심사항이 될 것이다. 따라서 이러한 기능적 게놈 프로젝트의 가장 신빙성 있는 기술, 특히 유전자의 기능연구에 있어서 이 각 유전자를 과발현 혹은 파괴시킨 생쥐(형질 전환 동물, Genetically Engineered Mouse; GEM)를 생산하여 그 표현형질을 연구하는 것이 매우 중요한 일이 될 것이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

이를 해결하기 위해 먼저 MSPF 시설을 근간으로 하는 실험동물실의 infra를 구축하고, 1. 본인의 연구 뿐 아니라 국내의 연구자들이 필요한 GEM을 생산하고, 2. 확보 또는 제작된 GEM들의 유전적 배경을 조절하여 국내의 과학자들에게 공급하며, 3. GEM의 표현형 분석에 필요한 정보 제공 및 공동연구를 통하여 우리나라의 전체적 의, 생명과학의 발전에 이바지함을 목표로 한다.

Ⅳ. 연구개발결과

부단한 노력으로 1) 수많은 GEM의 제작 및 도입으로 2) 현재 약 200 여종의 GEM을 포함하는 Mouse Bank를 설립하였으며, 3) 그 표현형을 분석할 수 있는 PAC (Phenotype Analysis Center) system을 원활히 이용하여 다수의 연구 논문 발표 및 특허 출원의 성과를 얻었다.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

확보 또는 제작된 GEM의 **Mouse Bank는 국가적 "생명자원"**이며, 이를 통해 GEM을 보관 및 국내 연구자들에게 공급한다. 이들을 통한 유전자의 기능연구는 high profile journal에의 논문게재를 통한 국가위상을 높이고 직접적인 결과들은 인간의 유전질환 및 생명 현상의 연구에 적극적으로 활용되도록 하여 국민 복지와 더불어 식품, 의약 및 제약 산업에 사용되어 효용을 창출하도록 활용될 계획이다.

S U M M A R Y

After the post-genomic era, "functional genomics" has more significance than before. Since animal models play important roles in both the studies for the gene functions and the characterization of pathophysiologial aspects of human diseases, these models give us alternative ways for the in vivo research in human. In this context, mice have prevalent advantages due to their genetical and physiological similarities to human. Therefore, mouse models will give us the definitive clues for the treatments of specific neuronal diseases and thereby will contribute to the promotion of the human welfare.

The main goal of this project has been to construct the infrastructure for the production of genetically engineered mice (GEM), Mouse bank with deposits and maintains large quantities of GEMs, and the phenotype analysis center (PAC) for the analysis of GEMs by GEM experts on various fields. In order to accomplish these objects, we have established the Specific pathogen-free (SPF) facility based on the microisolated caging system. GEM will be introduced to MSPF (Microisolated Specific Pathogen-Free) system to manage them according to their specific characteristics such as circumstantial and genetical properties. In addition to their breeding in MSPF system, we will preserve their sperms and fertilized eggs. Furthermore, we will manage the mouse bank by constructing the internet-based database of mouse models for various human diseases. This facility has been accredited from AAALAC (the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International).

We have tried to enhance the efficiency of GEM production, and thus our efficiency of transgenic mice production has reached the highest standard of the earth. In addition to GEM production, we established "Mouse Bank", which now contains more than 200 kinds of GEMs from internal and external sources. Based on this Mouse Bank, we are supplying GEMs to the scientists in Korea. In order to facilitate the in vivo researches using GEMs, we have also established Phenotype Analysis Center (PAC), by which we connects the researchers with the GEM experts in Korea.

Since it can be verified and applied to human diseases directly, these mouse models will help us to find the way for clinical treatments of human diseases as well as the biological significance of the gene functions in vivo.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ---------- [7]

Chapter 2. Current Status of Technical Development---------- [10]

Chapter 3. Specific Aims and Results---------- [12]

Chapter 4. Achievement and Contribution---------- [19]

Chapter 5. Future Study and Suggestion---------- [25]

Chapter 6. Newly achieved Information---------- [25]

Chapter 7. References---------- [25]

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ---------- [7]

제 2 장 국내외 기술개발 현황---------- [10]

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과---------- [12]

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도---------- [19]

제 5 장 연구개발결과의 활용계획---------- [25]

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보---------- [25]

제 7 장 참고문헌---------- [25]

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 국내외 연구 동향

21세기는 생명과학이 주도하는 세기가 될 것이라는 것은 이미 잘 인식되고 있다. 2003년에 마무리 될 것으로 예상했던 인간 게놈 프로젝트는 이미 발표되었으며, 미국의 국립기관 (NIH)에서는 이 sequence의 공용화를 위하여 노력하고 있다. 따라서 이제는 유전자의 기능을 규명하기 위한 **기능적 게놈 프로젝트(Functional Genomics)**의 중요성이 더욱 부각되고 있다. 윤리적으로 인간을 상대로 하는 실험은 불가능하므로 인간과 유전적으로 비슷한 동물 모델에서 인간 유전자의 기능을 연구하여 이를 인간에 적용시키는 것이 기능적 게놈 프로젝트의 핵심사항이 될 것이다. 이러한 점에 있어서 동물모델로서의 생쥐의 의미는 매우 크다. 현재 mouse genome project 결과물 또한 공개되고 있으며, 이를 바탕으로 **유전자를 과발현 혹은 파괴시킨 생쥐(형질 전환 동물, Genetically Engineered Mouse; GEM)를 생산하여 그 표현형질을 연구**하는 것이 궁극적인 연구수단으로 받아들여져 대단위로 대량화 시스템이 구축되고 있다. 더 나아가서 특정 조직이나 발생 단계에서만 특정 유전자를 파괴하거나 과발현 시킨 생쥐를 생산하고 그들을 교배하면 각 유전자의 장기별, 시간별, 및 세포별 기능을 각각 독립적으로 연구할 수 있으며 이렇게 생산된 생쥐들을 그 목적에 맞게 서로 교배하여 두 가지 이상의 유전자들의 상호연관성을 연구함으로써 특정 질병이나 생명 현상의 기전을 연구할 수 있는 **동물 모델을 생산**할 수 있다. 이러한 기술은 모든 인간의 유전병 및 생명 현상의 연구에 적용되므로 질병, 건강, 장수 등의 연구를 세계적 수준으로 끌어올리고 그로부터 창출되는 새로운 아이디어로써 의약, 식품, 진단 등 인체와 관련된 모든 산업의 고부가가치를 최대화하는 등 그 효용가치는 이루 측정할 수 없을 정도이다.

이러한 국제화에 발맞추기 위하여 형질전환 생쥐 제작 기술을 국내에서 확립하는 것은 당연하며 필수적인 것이다. 새로운 형질전환 생쥐의 개발을 위해 필수적인 사항은 각 동물 모델의 특수성과 환경적, 유전적 배경을 실험에 맞게 철저히 격리, 조절할 수 있는 환경을 설계, 유지하는 것이며, 이를 위해서는 철저한 외부와의 격리 공조가 이루어지는 SPF (Specific Pathogen-Free) 상태의 사육실에서 각 케이지별로 독립된 공조가 이루어지고 있는 **MSPF (Microisolated SPF) 동물실**을 갖추어야 한다. 더욱이 우리나라는 연구공간이 부족하고 SPF 사육실을 건설하는 데에 엄청난 경비가 소요되므로, 생쥐 사육용 랙 하나 당 유지할 수 있는 케이지의 수를 최대화하여야한다 (효율성의 극대화). 본 연구실에서는 주관 연구 기관의 적극적인 도움으로 미국의 여러 유전자 이식 및 파괴 생쥐 facility를 순방하여(Harvard, Rockefeller, Sloan-kettering Cancer Institute, Albert Einstein 등) 그 중 가장 효율적이면서도 국내 현실에 적합한 사육과 연구에 관한 정보를 입수해 왔다. 이러한 일환으로서 본 연구실은 Microisolated rack/cage system의 국내 생산을 위하여 1999년 초 국내의 한 업체를 선정하여 그 아이디어를 제공, 거의 2년 여 기간 동안 실제 실험동물을 사육하며 정밀 검사하여 결국 **국내 생산에 성공**하였고, KIST

를 비롯한 국내의 여러 기관에 납품 실적을 올리고 있으며, 이미 미국과 일본에도 수출을 시작하고 있다. 본 연구기관은 지난 1999년 11월 이러한 MSPF 시설을 완벽하게 갖춘 실험동물실을 완공하여, 그 전까지 일반적으로 사용되고 있는 사육 동물의 숫자에 대한 **SPF 공간의 활용률이 거의 두 배로 향상**되었고 각 케이지마다의 독립된 공조 시스템으로 오염을 철저히 예방할 수 있는 infra를 구축하여 다양한 연구실적을 얻고 있다.

이러한 동물 사육시설에서 탄생한 형질전환 생쥐(GEM)는 궁극적으로 이 동물이 가지고 있는 표현형(Phenotype)을 올바르게 해석하고, 이를 통하여야만 의과학분야에 적용할 수 있는 동물모델로의 정립이 완성되는 것이다. 그러나 국내의 여건상 생쥐 유전학 전공자의 부족과 세부 전공자들 간의 긴밀한 협조체계가 이루어지지 않아, GEM을 만들어 놓고도 분석에 있어 많은 차질을 빚어왔다. 이를 극복하기위해 본 연구실에서는 **Phenotype Analysis Center (PAC)을 확립**하여 국내 과학자들 사이의 정보교류 및 연구활성화에 기여하고자 하였다. 즉, 기본적인 Phenotype Analysis는 본 실험실 자체로 진행하되, 조직별, 장기별 특이 phenotype은 해당분야 전문가와의 긴밀한 협조를 통해 분석하고자 하는 의도였다. 궁극적으로 이를 바탕으로 **"GEM Mouse Bank"의 확립**이 이루어져, 의과학 종사 연구자들에게 강력한 infra를 제공할 수 있게 되었으며 앞으로 이를 통해 막대한 연구개발의 시너지 효과를 기대할 수 있게 되었다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 기술적 중요성

본 과제에 사용되는 기술은 일반적인 1) 분자 생물학적 기술, 2) 수정란의 미세주입 및 수정란의 이식 수술, 3) 동물의 유전학적 관리, 수정란 또는 정자 동결 보관 및 4) 동물 모델의 표현 형질 분석 기술로 나눌 수 있다.

이들 단계 중 일반 분자생물학적 기술은 국내의 의과학 및 생명과학 분야의 연구실에서 이미 잘 행해지고 있지만 실제로 유전자 적중에 특별히 필요한 분자 생물학적 경험을 가지고 있는 연구자는 극히 드물다. 본인의 정보에 의하면 이러한 기술은 현재 국내에서 단 두 곳에서 성공한 바 있고 그 중 한 곳에서만 발표되었다(Nature 389: 290, 1997 등). 미세 주입 및 수정란 이식 수술 기술은 사람의 인공 수정과 같은 불임을 연구하는 병원이나 연구실에서 성공적으로 수행되어 오고 있다. 그러나 이러한 기술과 연구들은 거의 모두 각 연구자의 특정 관심 분야에만 국한되어 오고 있다.

그러므로 2000년대에 필수적인 **기능적 게놈 프로젝트**를 수행하기 위하여 **국가적으로 동물 모델의 생산을 보조하여 직접적인 *in vivo* 실험을 가능케 하는 것**이 필수적이다. 이를 위해 위에서 기술한, 국내에서 이미 성공적으로 수행되고 있는 기본적 기술들과 본인이 지난 약 12 여 년간 수행하여 성공하였던 생쥐 배아줄기 세포(ES cell, embryonic stem cell)의 배양 및 생쥐에 관한 분자 유전학적 기술이 MSPF라고 하는 하드웨어와 합해져야만 한다. 이를 위해선 동물의 유전학적 관리가 국제적 수준의 연구 결과를 생산하

는 데에 필수적이나 전문가의 부족과 경제적인 이유가 아직 국내에서의 취약점으로 남아 있다. 현실적으로 지금까지 어려웠던 이 두 문제는 "본 연구실, 주관 연구 기관 및 정부"라는 세 팀의 연합으로 쉽게 해결될 수 있다. 또한, 동물 모델을 생산하고 그 표현 형질을 분석할 수 있는 전문가의 필요성은 유전자 파괴 및 과발현 생쥐를 이용한 연구의 핵심이라고도 볼 수 있는 중요한 부분이지만, 국내에서는 본인 및 극소수를 제외하고는 경험이 있는 연구자가 거의 없다고 사료된다.

2. 연구개발의 경제·산업적 중요성

GEM의 생산 및 유지 기술은 의과학 및 전반적인 생명 공학 분야에 해당하는 기술로 그 특징은 포유류 중에서 가장 경제적이고, 가장 빠른 기간 내에 연구가 가능하며, 사람의 생리학 및 유전학 등에 가장 유사한 결과 분석이 가능한 생쥐를 이용하여 그 유전자를 변형시켜 기능 분석에 이용함으로써 의학, 약학, 생물학 등의 국가적 부가가치 생성에 중요한 기반이 될 수 있다는 점에서 그 필요성이 절실하다. 특정 유전자를 파괴하여 그 기능이 소실되어 발생단계에서 생쥐가 생존하지 못하는 경우 dominant-negative transgenic 생쥐 혹은 조건적 유전자 파괴 기술을 도입할 수 있다. 이러한 기술로써 생산되는 생쥐는 여러 가지 인간의 질병 연구에 가장 필수적인 동물모델이 될 것이다. 그 예로 본인이 과거, 생산에 성공하여 미국에서 반입한 여러 종류의 유전자 파괴 생쥐들은 현재 국내에서도 종양의 치료와 노화의 방지 및 원인 연구에 이미 활발히 사용되고 있다. 그 중 한 종류는 그 특허를 미국의 한 제약회사인 제론(Geron)사와 공유하여 주식을 기증 받은 바가 있는데 이로써 특정 동물 모델의 상업적 가치 또한 증명된 셈이다. 대량으로 형질 전환 생쥐를 생산하여 그 중 사람의 질병과 유사한 모델을 얻어내면 곧 바로 특허 출원을 하여 국가의 지적 재산권을 높이는 데에 큰 기여를 하게 될 것임은 말할 나위가 없다. 특히, 최근 일본의 한 회사에서 본 연구실에 GEM 생산 및 분석을 의뢰하여 함께 회사를 설립하자는 제의가 들어온 바 있다. 이번 제의에서는 상당히 구체적인 계획을 보내왔는데 일단 앞으로 10년간 매년 knockout 생쥐 10 종의 생산(즉, 10년간 100종)을 본 연구실과 계약하자는 제안이었다. 그러나 일단은 보류한 상태이며, 만약 이러한 사업이 사업적 측면에서 가능하다면, 굳이 일본과 함께 해야 하는지 의문이다. 앞으로 consulting이 필요한 부분일 것으로 생각한다.

3. 연구개발의 사회적 중요성

1990년대 초 미국에서는 국방성(Pentagon)의 1 년 예산이 보건성(NIH)이 생긴 이후 100년 동안 사용한 예산보다 더 많았다는 아이러닉한 통계보고가 있었다. 이에 NIH에 의해 생긴 의·과학적 혜택에도 불구하고 너무나 적은 돈이 NIH의 연구에 사용됨을 인식하고 수많은 의·생명과학자들 뿐 아니라 일반 시민들의 서명과 운동에 의하여 NIH의 연구비를 상향조정했다는 보고가 있었다. 이것은 선진국의 국민이 이미 의과학 분야의 중요성을

인지하고 이 분야의 연구 투자가 절실함을 인지하고 있다는 일례라고 볼 수 있다. 특히 1996년 복제 양 Dolly의 탄생이후 대한민국의 국민들도 동물 복제기술 등의 의과학 분야의 첨단 연구 결과에 관심을 기울이고 있고, 신문이나 TV에서 인간 복제 문제에 대한 토론이 연이어 방송된다는 것은 이제 우리 국민의 의식 수준도 상당히 높아진 것이라고 볼 수 있다. 그러나 복제양 돌리 이후, 사람의 줄기세포(Stem Cell)의 배양, 복제 쥐의 탄생 등 모든 의과학 분야의 첨단 기술의 발전과 비교할 때 국내 의과학 기술의 발전은 미미한 상태이므로 대다수의 국민들의 신뢰성이 그 관심에 비해 떨어진 것은 사실이다. 국내에서의 복제 소와 고부가 가치의 약제를 생산하는 염소의 개발 등은 다시 우리 국민들로 하여금 의과학 분야에 다시 관심을 갖게 하기에 충분했다. 즉, 형질 전환 동물 개발 기술은 국가적 더 나아가 세계적으로 관심의 대상이 되는 사회적 이슈인 것이다. 이러한 사회적 분위기에, 그리고 새로운 밀레니엄을 맞아 본 연구를 통해 형질전환 생쥐 기술이 확립된 Mouse **bank의 탄생** 등은 국민적 관심과 신뢰를 얻기에 충분한 연구가 될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 국제적으로 인간 유전체 프로젝트(Human Genome Project)의 가치실현의 최종 단계에 있으며 이에 있어서 GEM이 중심적 역할을 하고 있다. 그 가치 평가의 예로서 미국 Foundation for Biomedical Research(FBR)의 총재는 "유전적으로 조작된 생쥐는 인간 질병에 대항한 전투의 선봉에 있으며, 유전자변형동물의 사용이 없이는 Human genome project는 완전히 비실용적이다."라고 천명하였다. GEM의 중요성은 세계적으로 이름있는 주요 학술지에 게재되는 연구 결과 중 GEM을 통한 연구 결과의 비중이 급격히 상승 중인 것으로 확인될 수 있다. 산업적으로 바이오산업에서 유전자변형마우스의 고부가가치성이 입증되고 있으며, 예로서 비만생쥐가 가격 2000만 달러의 가격에 팔린 것을 우리는 이미 알고 있다. 이러한 중요성을 파악한 선진국들은 인간 유전체 프로젝트(Human Genome Project)의 후속연구로 "유전자 기능에 대한 특허 확보"하여 대규모로 유전자변형마우스의 생산 한 후, 그 연구결과를 학술지 게재 및 특허화하여 그 가치를 Validation한다. 이러한 GEM들은 바이오산업(의약,제약)의 발전에 중추적인 역할을 하게 된다. 즉, 동물모델의 특허권 확보를 위한 법적 토대 위에 "대규모 자본에 의한 GEM 생산 및 연구의 산업화"가 이루어지고 있는 것이다.

국내의 현실은 현재 부정적이다. 아직도 선진국의 연구동향을 뒤쫓는 경향에서 벗어나지 못하고 있으며, 국내 생물학 연구의 대부분이 "실험관 내(in vitro) 생명현상"의 연구에 제한되어 있는 형편이다. 또한 대부분의 유전자에 대한 특허를 선진국에 빼앗기고 있는 형편으로 바이오산업의 종속화 우려마저 있다. 이를 추월하기 위한 궁극적인 최종수단은 GEM의 확립에 의한 인간질병모델의 확립이라고 여겨지고 있다. 현재 국내에서는 GEM을 생산하는 단 하나의 벤처기업이 운영되고 있으나 본인이 알고 있는 바에 의하면 유전자 적중 파괴 혹은 조건부 유전자 파괴의 기술은 아직 미약하며 생쥐의 분자 유전학

전문가가 없고 또한 MSPF 동물 사육 시설도 갖추어져 있지 않다. 이러한 과발현 생쥐의 경우는 KRIBB, 한림대, 카톨릭의대 등에서 현재 단일 연구실의 규모로 진행 중에 있다. 본 연구실에서는 이미 언급한 바와 같이 아마도 전 세계에서 가장 그 효율이 높게 (대리모가 낳는 새끼의 20-80%가 형질전환 생쥐; 미국은 보통 10-30%) 유전자 과발현 생쥐를 생산할 수 있다. 그러므로 현 기술상태에는 전혀 취약성이 없다. 한편, 유전자 파괴 생쥐의 경우는 포항공대에서 처음으로 1997년에 생산에 성공하여 훌륭한 논문을 발표한 선례가 있으며 대전의 한국생명과학연구소의 한 연구자가 유전자 파괴 생쥐의 생산에 노력하여 성공한 바 있지만 역시 소규모이며 특정연구 분야에 한정되고 있다. 최근 귀국한 일부 과학자들이 유전자 파괴생쥐 연구에 관련된 경험을 가지고 있으나 그 경험을 국내에서 활용하기에는 아직까지 역부족이라고 사료된다. 그러나 국내의 의, 생명과학의 발전에는 국제적으로 뒤지지 않기 위하여 시간이 많이 남아 있다고 생각할 수 없다. 국내의 기술 기반은 인력, 시설 및 자금 등에서 선진국 대비 상당히 열악한 형편에 있지만, 현재 본 과제의 주관 연구 기관에서는 이 모든 것에 상당한 비전을 가지고 지원해주고 있다. 본 연구실에서는 지난 해 5월 실험의 편의를 돕기위한 SPF가 아닌 Conventional mouse room과 embryonic stem cell 배양실을 별도로 연구실 옆방에 배당 받아 본 연구실의 박사급, 석사급 연구 인력들에게 노하우를 전수하고 있다. 즉, 본 연구소를 기반으로 실력있는 국내 과학자들과의 협력을 모색하면 국외와 견주어도 결코 뒤지지 않는 한층 진보된 기술의 확립이 충분히 가능하다고 본다. 다만 한 가지, 여기서 취약성을 말한다면 연구비의 부족(1 cage 당 하루에 약 500-1,000원의 사육비 및 인건비)으로 인한 인력의 부족과 공동연구의 한계를 들 수 있다. 현 국내 기술 수준은 GEM의 생산과 유지 및 분석기술이 산발적으로 존재하고 있으므로 집중적 투자에 의한 통합화 및 조직화의 필요성이 대두되었던 것이다.

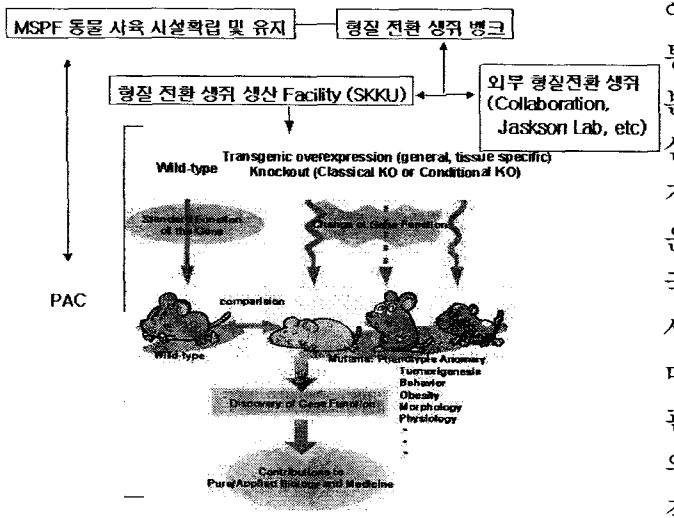
위에서 언급한 바와 같이 GEM을 통한 분자유전학적 연구는 선진국에서 그 효용과 가치를 인정받아 국가적으로 대규모의 연구비를 지원받아 진행되고 있다. 단적인 예로 일본의 RIKEN의 생쥐유전학 facility는 돌연변이생쥐의 생산과 표현형분석을 하나의 Institute에서 모두 해결 할 수 있도록 추진하여, 엄청난 연구비를 투자하여 소위 Mouse General Hospital를 설립하였다. 그러나 그러한 연구시설의 설립과 운영은 현 시점에서 우리나라에서 같은 방식으로 경쟁하기에는 한계가 있었으며, 오히려 현재 우리나라에서 개별 과학자들 규모로 진행되고 있는 **생쥐의 분자 유전학적 연구를 "Network화"**하여 구심점이 될 수 있는 소규모 센터(**PAC**)를 지향하는 것이 과제를 제안하는 시점에서 가장 나은 해결책이라 사료되었다. 그 동안 본 연구실을 중심으로 하여 GEM생쥐의 분석 및 유지를 효율적으로 추진하여 큰 성과를 얻었으며 앞으로 결코 일본의 RIKEN과 같은 Whole-in-One Institute에 뒤지지 않을 경쟁력을 가진 센터로 발전할 수 있을 것 이라고 전망한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 추진전략

상세한 내용은 다음에 기술된 "연구 추진 방법"과 같으며, 개략적으로 MSPF 동물 사육실 및 GEM Facility의 설립을 시작으로 현재 본 연구실 뿐 아니라 국내 의·생명과학자들이 필요로 하는 GEM 동물 모델을 생산하고 이용하여 국제 경쟁력과 의미 있는 의·생명과학적 결과를 얻고자 이 사업을 추진하였다. 또한 본인은 국외로 전 세계의 대표적인 GEM연구자들로부터 수시로 새로운 정보를 수집하고 있으며, 연구에 관련된 질문사항이나 애로 사항을 해결하고 있다. 국내에서는 지금까지 30여 명의 GEM 관련연구를 하고 있는 과학자들과의 교류를 유지하고 있다(Mouse Genomics 연구회; 회장 류대열 박사).

본 연구실은 주관 연구기관의 도움을 얻어 전 세계적으로 약 3~4 년 전부터 급속히 퍼져나가고 있는 microisolated 랙과 케이지를 국내에서 최초로 도입, 설비하였으며, 이 시설의 우수성은 AAALAC의 실사를 통해 이미 검증 받았다. 이러한 시설은 본 연구실에서 다루려고 하는 GEM의 생산에 필수적인 기반이 되는 infra이며, 지금까지의 기술과 경험을 토대로 새로운 기술과 새로운 동물 모델을 개발하고 국내 최초로 전국적인, 여러 과학자들이 사용할 수 있는 mouse bank의 시설을 마련한다. 즉, 본 연구실의 연구방향과 관련된 GEM을 제작할 뿐 아니라, 국내외 공동연구 혹은 Jackson Lab과 같은 전문적인 GEM 공급기관으로부터 수입한 생쥐들을 유지하여 mouse bank를 구축하고 필요한 쥐가 있으면, 일반연구자가 직접 외국에서 수입하여 사용할 때 보다 훨씬 더 빨리 (현재, Jackson Lab등에서 동물 반입 시 최소 약 2~3개월이 걸림), 저렴하게(현재 국외에서 GEM 반입 시 보통 50-100 만 원 이상) 실험에 필요한 생쥐를 공급할 수 있다. 전반적인 추진 체계를 옆의 그림과 같이 도식화 하였다.



제 2 절 연구추진 방법

1. MSPF 동물 사육시설의 건설 및 운영

가. 실험동물시설(Animal Facilities)

세계적인 경쟁력을 갖춘 동물실험을 하기 위해서는 국제적 수준의 실험동물 시설

에서 그에 합당한 동물 관리 및 사용 프로그램에 따라 실험을 실시하여야 한다. 본 연구기관은 설립 기획단계에서부터 이러한 요건을 구비한 연구시설을 만들고자 국제적 지침에 근거한 실험동물 시설을 설계, 세계적으로도 전혀 손색이 없는 첨단 실험동물시설을 구축하였다. 실험동물 시설의 하드웨어적인 측면 뿐 아니라 실제 운영에 있어서도 국제적 경쟁력을 구비하고자 국제적 동물실험 지침서인 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, USA, 1996)에 근거한 실험동물의 관리와 사용 프로그램을 도입하여 운영하고 있다. 이러한 노력의 결실로 **2001년 2월 국제 실험동물관리 공인협회**(AAALAC; Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)로부터 실험동물 시설과 동물 관리사용에 대한 국제적 전면 인증을 취득한 이후 계속해서 연례적인 실사를 성공적으로 통과하고 있다. 이는 아시아권의 대학에서 처음으로 국제 인증을 받은 것이며 또한 국제적 GEM facility로서의 경쟁력을 인정받은 것이다.

연면적 900평 규모의 시설로서 GEM의 생산, 관리, 실험 및 보존을 위해 설계하였으며 이에 필요한 기자재가 구비되어 있다. 청정 구역 내에 수정란 이식 연구실을 구비하여 효율성과 동물실내에 γ-irradiator 마련하여 안전성을 증대 시켰으며, Microisolated caging system을 구비하여 최상의 사육관리 환경을 제공하고 있다. 또한, 실험동물 전문수의사, 실험동물 기술사와 같은 전문 인력에 의해 운영되어 보다 전문화된 관리와 실험을 수행하고 있다. 동물실험의 입안 과정에서도 국제적 지침에 따라, 기관 내 동물실험위원회(IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee)의 심의 절차를 거쳐 동물실험을 실시하고 있으며 모든 활동에 대해 정기적으로 AAALAC에 보고하여 국제적 수준의 동물실험을 유지하고 있다.

1999년 11월 이후, 본 연구실은 국내의 한 기업과 협력하여 생산한 MSPF용 Cage와 Rack시스템을 사용하여, 하루 평균 보유량 약 6,000 마리의 생쥐를 성공적으로 사육하고, MSPF시설의 문제점들을 보완하여, 연구자와 관리자 모두에게 편리한 시스템으로의 최적화가 마무리 단계에 있다. 이러한 노력으로 앞으로 국내에 건설될 동물사육시설의 Standard가 될 것이며, 이미 개소 이후 많은 과학자 및 실무 담당자들이 본 동물실을 견학하여 도움을 얻고 있다.

나. Health Monitoring Program

(1) 목적

"살아 있는 시약" 이라고 불리는 실험동물은 실험의 재현성을 보장하기 위하여 그 품질이 일정하게 유지되어야 한다. 실험동물의 품질에 영향을 미치는 요소에는 유전학적 요인, 미생물학적 요인, 환경적 요인이 있는데 이러한 요인의 조절 하에서 양질의 실험동물을 사용하여야 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있다. 세 가지 요인 중 가장 조절하기 어려운 것이 미생물학적 요인이다. 미생물학적 요인에는 동물에게 질병을 일으키는 병원체 외에도 인수공통 전염병과 같은 생물학적 위해인자도 포함되기 때문에 직업안전관리상에서도 중요한 의미를 가진다. 특히 GEM facility에서는 타기관의 연구자와 동물 교류가 빈번하여 감염사고의 위험이 높아 검역(quarantine) 프로그램을 철저히 운영하여야 한

	Organism	Method
Virus	Hantaan virus (HAN)	ELISA
	Mouse Hepatitis Virus (MHV) Sialodacryoadenitis virus (SDAV)	ELISA
	Pneumonis virus of mice (PVM)	ELISA
	REO-3	ELISA
	GD-7	ELISA
	Minute Virus of Mice (MVM)	ELISA
	Mouse Parvo Virus (MPV)	ELISA
	Kilham Rat Virus (KRV)	ELISA
	H-1	ELISA
	Rat Parvo Virus (RPV)	ELISA
Bacteria	Mycoplasma pulm onis	ELISA
	C.piliforme	ELISA
	Bordetella bornchiseptica	agglutination test
	Corynebacterium kutscheri	agglutination test
	Pasteurella pneumotropica	culture
	streptococcus pneumoniae	culture
	Pseudomonas aeruginosa	culture
	Staphylococcus aureus	culture
Fungus	Dermatophyte	culture
Protozoa	Giadia muris	under microscope
	Hexamita muris (Spoironusleus muris)	under microscope
	Eimeris spp	fecal test
Parasite	Syphacia spp	cellophane tape test fecal test
	Myobia muscli	under microscope
	Radfordia affinis	under microscope

표 1. **Pathogen Test 검사 항목**

다.

(2) 방법

실험동물의 환경을 모니터링하기 위하여 낙하균검사, 음수검사, 선반이나 필터의 도말검사 등을 실행하여 지정병원체의 출현을 감시하며, 사체나 살아 있는 동물 또는 특별히 감시동물(sentinel animal)을 지정하여 직접 병원체를 분리·동정하거나 혈청검사를 통한 간접적 방법을 이용하여 표에 열거한 pathogen을 검사한다(표 1). 외부에서 반입되는 동물에 대해서는 3 - 4 주간의 검역을 거친 후 주요 지정병원체가 없는 것이 확인된 후 동물실로 반입하여 실험에 사용한다.

(3) 운영 현황

본 연구실에서는 동물군의 미생물학적 품질 상태를 정기적으로(연 4 회) 및 외부 동물 반입 시 수시로 평가하여 관리하고 있다. 이러한 정립된 미생물학적 진단법은 특히 GEM의 표현형분석에 있어 미생물 감염에 의한 요인을 배제하는데 유용하게 활용되고 있다. 세계적으로 최근 미생물학적 진단에 분자생물학적인 검사방법을 적용하는 예가 늘고 있어 본 연구실에서도 PCR 검사를 통한 진단을 도입하여 활용하고 있다. 본 연구실의 진단시스템은 국제적인 수준으로 운영(AAALAC 공인)되는 것으로서 해외 연구자와 공동연구를 하기 위하여 동물을 교환 시 유용하게 활용되고 있다.

최근 국내 실험동물시설에서 본 연구실로 반입된 동물에서 지정병원체 중 가장 문제 시 되는 마우스 간염 바이러스 (MHV), Hantaan virus 등이 검출되는 예가 있었다. MHV는 실험동물 시설에 가장 큰 피해를 주는 병원체로 전 세계적으로 많은 실험동물시설에서 피해를 입었으며, Hantaan virus는 연구자의 안전을 위협하는 인수공통전염병원체이다. 이와 같이 국내 실험동물시설에서 관리되고 있는 마우스의 미생물학적 품질 관리가 제대로 이루어지지 않는 것은 큰 문제가 아닐 수 없다. Health monitoring을 위해서는 비싼 재료비와 인건비를 포함하여 많은 예산이 필요하다. 본 연구실에서는 국제적 수준에서의 동물실험과 사람에게 올 수 있는 피해의 방지를 위하여 적극적인 미생물학적 품질

관리를 실시해 왔다.

2. 유전자 과발현/결손 생쥐(GEM)의 생산 및 유전적 정보의 Mouse bank 설립

본 연구실에서는 본인이 직접 제작한 4 종의 유전자 적중 파괴된 생쥐를 포함하여 현재 13 종의 유전자 적중 생쥐를 본 과제를 제안할 당시에 이미 확보하고 있었다. 앞으로 국내의 의과학 및 생명과학의 연구에 필요하다고 생각될 때에는 본인이 제작한 3 종의 다른 knockout 생쥐(Max, L-myc, glucokinase: 아직 일반에게 공개되지 않았으나 본인이 제작하였으므로 쉽게 얻을 수 있음)를 Harvard 대학의 DFCI로부터 국내에 들여올 수 있다.

이에 더하여 국내 연구자들이 외국으로부터 다양한 GEM 생쥐 도입을 원하였으며 위의 그림과 같은 과정을 거쳐서 현재 본 연구실에 의해 확보된 GEM 생쥐의 숫자는 유전자 적중 생쥐만을 기준으로 볼 때, 과제시작 당시의 4 배 이상으로 증가하였다. 즉, 본 연구실에서 설립할 mouse bank에 축적될 수많은 유전자들의 상호 연관성을 예상하여 가설을 세우고, 그 가설을 증명하기 위하여 해당되는 유전자 변환 생쥐들을 교배하면 double knockout, transgenic + knockout, triple knockout 등의 생쥐를 생산하여 여러 유전자들의 상호 연관성(crosstalk)을 생체 내에서 연구할 수 있게 되었다.

가. 과발현 생쥐의 제작

이 기술은 인공적으로 배란을 유도한 암컷과 수컷 생쥐와의 교배를 통해 생긴 수정란을 채취하여 그 전핵(Pronuclei)에 과발현 시킬 유전자를 주입한 후, 다시 foster mother 생쥐에 주입하여 특정 유전자가 과발현되는 생쥐를 제작하는 방법이다. 현재 본 연구팀은 이에 필요한, microinjector, 고배율 현미경, 세포 배양 시설 및 SPF 동물 유지 시설을 이미 완벽하게 확보하고 있으며, 과발현 생쥐를 지금까지 수 많은 GEM을 국내에서 제작해 오고 있다. 앞서 언급한 바와 같이 연구비와 인력이 확보된다면 **1년에 약 100 종의 과발현 생쥐를 제작**할 수 있는 capacity를 이미 확보하고 있다. 이 기술은 다시 일반적인 과발현 생쥐와 조직 특이적 과발현 생쥐의 제작으로 나눌 수 있다.

(1) 일반적인 과발현 생쥐

포유동물의 모든 장기에서 일반적으로 발현되는 promoter에 특정 유전자를 연결하여 조직 전체에서 과발현 되는 생쥐를 제조할 수 있다. 이에 본 연구실에서는 CMV enhancer 와 chicken β-actin promoter를 함께 지니고 있는 pCAGGS, pCAGGS-B2와 같은 효율성 있는 벡터 시스템을 이용하여 이의 목적을 달성하고 있으며 현재 이미 결과를 학술지에 게재 (***Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*** 98(18): 10367, 2001; ***Mol. Cell. Biol.*** 21: 7787, 2001; ***Mol. Cell. Biol.*** 22: 8409, 2002.)된 바 있다.

(2) 조직 특이적 및 발생 시간 특이적 과발현 생쥐

현재까지 조직 특이성이 확실하게 규명된 유전자들의 promoter는 많이 알려져

있다. 본 연구에서는 생체 내에서 그 중요성이 이미 인지된 조직에 특이적인 promoter를 이용하여 특정 조직 과발현 생쥐를 제작해 왔다. 앞으로 국내의 전 과학자들의 의과학 및 생명과학의 연구에 필요한 인프라를 구축하기 위하여 전 세계의 과학자들로부터 가능한 많은 종류의 조직 특이적 및 발생 시간 특이적 promoter 혹은 enhancer 들을 얻어 bank를 만들고자 노력하고 있다. 현재 10여 가지의 promoter 들을 확보해 놓은 상태이다. 이를 이용하여 본 연구실과의 공동연구로 이미 논문에 발표된 예가 있다(*J. Immunol.* 167: 805, 2001).

나. 유전자 파괴 생쥐의 제작

Knockout mice는 고전적인 knockout (KO) 생쥐 생산과 조건적 Knockout 생쥐 생산의 두 가지로 크게 구분된다. 본 연구실에서는 국내에서 여러 유전자의 KO 생쥐 제작에 자문을 하였으며 그 중에서도 이미 p62 유전자의 고전적인 KO는 매우 성공적이다. 또한 p62 KO 생쥐의 표현형 분석에도 많은 도움을 주어서 비만, 당뇨, 노화로 대표되는 성인병 모델의 표현형을 관찰하였으며, 따라서 이에 대한 국제특허 (미국 and PCT)를 출원하였으며, 이들의 표현형 중 비만/당뇨 관련 표현형에 관한 사항을 Nature지에 기고할 예정이다(2004년 5월 중 기고 예상).

특정 유전자가 파괴된 생쥐의 제작은 유전자의 기능연구에 매우 중요한 실마리를 제공하며, 이에 필수적인 ES 세포의 배양과 이를 통한 유전자 파괴생쥐의 제작의 방법론은 그 핵심을 이룬다. 지난 약 10 여 년간의 본인의 경험을 바탕으로 다음과 같이 각 단계에 관해 기술한다.

(1) 고전적인 유전자 적중법을 이용한 유전자 파괴 생쥐의 제작

a. 유전자 적중 파괴에 사용할 DNA construct의 제작: Genomic library에서 적중시킬 genomic DNA를 얻어 일반적인 분자 생물학적인 방법과 본 연구자의 경험을 토대로 생쥐의 유전체에 가장 효율적으로 적중할 수 있는 DNA를 제작한다. 최근에는 mouse genomic sequence의 많은 부분을 web site에서 받을 수 있으므로 sequence를 알면 long-range PCR로 DNA를 얻어 제작할 수 있다.

b. ES 세포의 배양: ES 세포를 키우기 위해서는 보통 embryonic fibroblast 혹은 immortalize 된 세포주를 feeder layer로 먼저 깔고 그 위에 ES 세포를 배양한다. 가장 중요하며 어려운 점은 blastocyst에 미세 주입 전까지는 세포 증식을 잘 하며 분화는 억제되어야 하며 그 후에는 증식과 분화가 모두 잘 되어야 한다. 즉, 분화를 억제하는 기술의 노하우가 상당한 수련을 필요로 하는 단계이다.

c. Transfection 및 Screening: 분화를 많이 하지 않고 잘 자란 ES 세포에 이미 제작한 DNA를 보통 electroporation 방법을 이용하여 핵 안에 넣고 항생제에 살아남은 colony를 고르고, 그 중에 homologous recombination을 통해 유전자가 적중된 ES clone을 Southern Blotting이나 PCR을 통하여 적중여부를 확인한다.

d. Blastocyst에 유전자 적중된 ES 세포의 주입: 교배를 통해 암컷의 uterus로부터 blastocyst를 수거한 후 ES 세포를 주입한 후 가임신(pseudopregnant)한 암컷 쥐의 자궁

에 transfer한다.

e. Chimera의 확인과 Heterozygous 유전자 적중 생쥐의 생산: 태어난 생쥐 중 털 색깔 로 구분하여 chimeric 생쥐를 얻고 이 생쥐를 정상 생쥐와의 교배를 통해 얻은 자손 생쥐로부터 꼬리를 잘라서 Southern blot과 PCR을 통해 유전자 적중 생쥐의 존재 여부를 최종 확인한다.

(2) 조건적 유전자 적중법을 이용한 유전자 파괴 생쥐의 제작

고전적인 유전자 적중법이 가지는 한계 중의 하나는 유전자 파괴에 의한 표현형질이 심하여 발생단계 혹은 생쥐의 출산 후 조기에 그 생쥐가 사망하는 경우, 정상적으로 성숙한 생쥐의 확보가 불가능하다는 점이다. 이러한 경우 그 유전자를 *in vivo*에서 연구할 수 있는 방법으로써 조건적 유전자 적중법을 도입할 수 있다. 간략히, 전핵에 특정 유전자를 주입하여 특정 조직에서 Cre recombinase를 과발현시킨 GEM과 유전자의 intron 부위에 cre recombinase 효소가 인지하여 잘라 낼 수 있는 loxP site가 삽입된 ES 세포 클론을 얻어낸다. Intron 부위의 loxP site 삽입으로 인한 영향은 거의 없으므로 이러한 유전적 배경을 지닌 생쥐는 정상이다. 이 생쥐를 특정 조직에서 Cre recombinase를 발현하는 과발현 생쥐와 교배를 하면 원하는 유전자의 부위가 파괴된 생쥐를 자손으로 얻게 된다. 이를 위해 본 연구실에서는 다양한 조직특이성을 보이는 Cre Tg 생쥐를 제작 또는 외부로부터 확보하고 있다 (*e.g.*, Albumin-Cre Tg, lck-Cre Tg, SV40-Cre Tg, K14-Cre Tg 등). 이러한 GEM이 만들어 지거나 확보되었을 때, 그 효율성을 확인하기 위한 시스템이 필요한데 본 연구실에서는 이를 위해 이미 그 효용성이 널리 알려진 GtROSA 생쥐를 확보하였으며 또한 본 연구실의 노력과 국내의 다른 연구자들의 Mouse banking에 의해 다양한 조건적인 KO 생쥐를 확보하고 있다.

다. Phenotype Analysis Center (PAC)

본인이 국내에 들어온 지 6년 여 동안, 가장 절실히 느낀 점은 GEM을 이용한 각 분야의 기초 및 임상의학을 전공한 과학자의 수가 극히 적다는 점이었다. 따라서 본 연구실은 제작된 생쥐 또는 반입된 형질 전환 생쥐의 phenotype을 체계적으로 분석하여 결과를 도출해 낼 수 있는 Phenotype Analysis Center (PAC)의 운영을 본 연구계획서에 제안하였다.

GEM이 생산되면 그 동물에서 얻을 수 있는 표현형을 신속 정확하게 진단하여 해당 유전자의 기능을 밝히는 체계화된 진단시스템이 필요하다. 고등 생물체인 생쥐의 경우 whole body에서 일어나는 복잡한 생리학적 요인에 의해 영향을 받기 때문에 단편적인 실험으로는 해당 유전자의 기능을 찾는데 실패할 수 있으며, 찾더라도 잘못 해석할 수 있는 오류를 범할 위험이 크다. 이러한 문제를 해결하고자 생쥐를 대상으로 실시할 수 있는 검사항목을 선정, 이를 통해 체계적으로 GEM을 검사하여 보다 신속 정확하고 경제적인 진단을 할 수 있는 시스템을 구축하고 있다. 본 연구실에서도 이러한 필요성을 절감하여 phenotype analysis program을 체계적으로 준비하여 운영하고 있다. 보다 전문화되고 수준 높게 운영하기 위하여 내부 조직을 molecular biology team, cell biology team,

phenotype analysis team으로 구분하여 운영하고 있으며, 검사의 전문성과 신뢰도를 높이기 위하여 삼성의료원의 임상 각과와, 동물실험 기자재가 잘 갖추어진 삼성생명과학연구소 실험동물연구실과 협력 체계를 유지하여 체계적인 진단시스템을 운영하고 있다.

(1) 연구 방법

해당 유전자의 *in vitro* 결과를 바탕으로 *in vivo*의 기능을 찾는 gene-driven phenotype analysis의 접근방식으로 표현형을 연구하는 것을 우선으로 한다. 그러나 전술한 바와 같이 특정 검사(targeted assessment)만으로는 유전자의 기능을 해석하는데 어려움이 있어 다음과 같은 체계로 운영을 하고 있다.

- 특정검사(targeted assessment)

유전자 선발과정에서 얻은 자료를 바탕으로 관심이 되는 검사항목을 우선 검사한다.

- 기본 검사(general primary screening)

검사단계를 구분하여 태아 단계부터 주령 별로 구분하여 아래와 같은 항목에 대한 검사를 실시한다. 기본검사 항목은 본 연구실의 phenotype analysis team에 의하여 일상 사육관리에서 검사가 실시되고 있으며, 이상동물에 대해서는 전임수의사(attending veterinarian)에 의해 부정기 검사를 실시하고 있다.

1. *Prenatal stage*

   Mating behavior/ libido, Body weight change during pregnancy

2. *Neonatal stage*

   Reproductive performance, Growth retardation

3. *Postnatal stage*

   1) Stages: Juvenile (3wks), Adolescence (5wks), Adult (10wks), Middle age (48wks), Senescence (78wks)
   2) Daily observation: Overall condition, Posture, Movement, General behavior, Respiration, Vocalization
   3) Intensive monitoring in the metabolic cage: water intake, Food intake, Urine output, Appearance of urine & feces
   4) Analysis of clinical pathology: Urine analysis, pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Keton body, Billirubin, Occult blood, Urobilinogen, Nitrogen, Body weight, Body temperature, Cardiovascular analysis, Non-invasive blood pressure, Heart rate, X-ray, CBC, WBC (neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil), RBC: hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, MCHC, RDW, Platelet (PCT, MPV, PDW), Blood chemistry, Liver function (AST, ALT, ALP, TBIL, TP, ALB), Renal function (BUN, CRE), Pancreatic function (GLU, AMYL), Lipid (TCHO, TG), Electrolite (Ca, IP, Na, K, Cl)
   5) Necropsy and histopathological analysis: Necropsy, Organ weight, Pathological reading

- 확장 검사(extended secondary assessment)

기본검사에서 유의한 결과를 얻은 항목과 관련된 검사를 추가로 실시한다.

1) Behavioral or Cognitive test: Open field test, Rota-rod test

2)Sensory Function: Olfactory, Auditory, Visual test; Taste, Touch, Pain sensitivity

3) Learning and Memory test: Passive avoidance test, Water maze test

4) Physiological assessment: ECG, Echocardiogram, EEG, Pulmonary function

5) Specialized Pathologic Evaluation: FACS, EM, IHC; Specific gestational points

(2) 운영 현황

기본 검사항목에 대한 검사 체계를 구축하여 운영하고 있으며, 확장검사 항목에 대한 검사 방법도 늘려가고 있다. 일부 항목의 경우 그간의 검사결과를 database화하여 통계적 유의성을 비교할 수 있는 자료를 확보하고 있으며, 특히 GEM 생산에 많이 사용하는 정상 FVB mouse에 대한 생리학적 정상치를 phenotype analysis에 필요한 각각의 단계별로 구분하여 이미 확보하고 있어 진단에 활용하고 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구제안시의 단계별 및 연차별 연구 목표

1. 계획대비 달성도

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	GEM Facility의 확립 및 GEM 생산	◈ GEM 생산에 필요한 요건기술을 확립하였다. GEM 생산 면에서 1 단계의 예상 목표치였던 14종을 초과하는 20 여종의 과발현 생쥐를 생산 하였다. ◈ 조건적 GEM의 생산을 추진하여 기존의 시스템을 발전시켜 Tetracycline에 의해 유전자를 발현 또는 억제할 수 있는 GEM을 제작하였다. ◈ 생산된 GEM을 사용하여 표현형분석이 이뤄졌으며 이를 토대로 논문을 발표하였다. 또한 본 연구실의 도움으로 제작된 p62 KO mice의 표현형 분석에도 큰 도움을 주었다.	200

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
2	Mouse bank 운영	◈ 본 연구실에서 직접 2가지 유전자 (Pierce1, Ei24)에 대한 Knock-out construct를 제작 완료와 2개 유전자(Jab1, ASC)에 대한 Knock-out construct가 제작 중이다. 또한 1 종류의 Knock-out construct와 3종류의 Knock-in construct가 제작, 총 5종의 유전자에 대해 ES cell에서의 gene targeting이 진행 중이다. ◈ Insertional inactivation에 의한 Unc5h3 유전자좌위에 50 Kb deletion에 의한 유전자 결핍생쥐 제작하여 이에 대한 표현형 분석을 논문을 발표하였다. ◈ GEM 생쥐의 계통유지를 위한 관련기술의 도입으로 아래와 같은 성과를 이루었다. - 수정란의 동결보관에 의한 재해대비. - 정자의 동결보관기술을 확립하여 수정란 동결보관보다 월등한 경제성 및 효율성을 확보. ◈ 본 실험실에 의해 제작 및 확보된 다양한 종류의 GEM을 체계적으로 정리 및 코드화 하였다. 그 결과 이미 아시아에서 가장 많은 200여 종(유전적 배경까지 고려 시)에 가까운 GEM을 확보하였다. ◈ 이를 인터넷을 기반으로 한 시스템을 통해 공개하여 국내 연구자들이 손쉽게 필요한 GEM 생쥐를 검색할 수 있도록 하였다. ◈ Mouse bank를 통해 국내외의 연구자에게 아래의 사항들을 공급하였다. - GEM (Live animals) - GEM에서 유래한 세포주 및 조직 - GEM을 사용한 실험 방법 - GEM 생산에 필요한 유전자 및 벡터 DNA ◈ Mouse Bank에 들어온 100여 종의 GEM은 Bacteria, virus, 기생충 등에 오염된 상태였으며 이들 오염원을 완전히 제거, SPF 시설로 도입한 후, 연구자들에게 재공급 및 안전한 계통유지를 위해 동결 보관하였다.	100

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
		◈ 외부연구자들의 **"Mouse bank"** 활용도는 통계로서 80건에 달하는 GEM 및 실험재료의 제공이 그 효용성을 입증한다.	
3	MSPF시설의 효율적 운영 및 유지	◈ 본인은 2003년 2월 성균관대학교 실험동물연구센터 부센터장으로 정식 임명됨에 따라 실질적 뿐만 아니라 행정적으로도 주관연구기관의 실험동물 facility를 운영 및 관리할 수 있게 되었다. ◈ 본 연구과제의 근간이 되는 MSPF시설을 효율적으로 정비 및 운영하였으며 이는 AAALAC의 실사(2003년도 11월)를 통과, 국제적으로 재공인되었다. ◈ 본인이 개발에 참여하고 본 시설에서 그 효용이 입증된 Microisolated SPF Rack의 성능이 국내외에 널리 알려져 국내의 KIST(25대), 백신연구소(6대), 국립암센터(20대), 연세대학교(원주) 의과대학(20대), 경북대학교 의과대학(20대), 전남대학교 의과대학(1대)에 판매 완료 또는 판매가 진행되고 있으며, 중국 상해 의과대학교(1대), 일본의 포트아일랜드 BT산업단지 내 허브연구소(15대)에 수출되었거나 계획되고 있다. 일본에는 연말까지 100여대의 추가적인 시장규모가 조성될 것으로 예상하고 있다. 또한 참여기업의 우수성은 중소기업청의 "기술혁신개발과제(2004.4. 1 년 간)"선정으로 또한 인정받고 있다. ◈ MSPF 시설의 사용의 편의와 GEM 생쥐를 이용한 연구의 촉진을 위해 아래의 과정을 지속적으로 독려 및 수행하고 있다. - MSPF 시설의 관리자들의 기술교육 및 자격증 취득. - 실험동물전문 기사들을 통한 technical service. - 연구자들의 MSPF 입문교육 및 기술교육 독려	100
4	PAC의 확립 및 운영	◈ GEM 생쥐의 표현형 분석에 필요한 전문가들을 국내 연구자들 중에서 PAC member로 위촉, PAC을 확립하였다. ◈ PAC에 의한 연구 Network를 통해 상당한 연구 성과를 산출하였으며 이를 통해 이미 논문발표가 이뤄졌으며 또한 논문발표를 위한 Manuscript가 준비 중이다.	100

2. 대표적 성공사례

가. Mouse Bank의 비약적 확대

본 과제는 기존에 본 연구실에서 보유중이거나 새로이 자체 제작하는 GEM 생쥐를 집적하여 "**Mouse Bank**"를 설립하고 이를 국내의 연구자들에게 공급하는 것을 그 목적으로 하였다. 그러나 예상치 못하게 외부에서 제작된 GEM 생쥐의 "Mouse banking" 의뢰가 쇄도하였다. 이는 **1)** 이미 검증된 GEM 생쥐 모델을 연구에 사용하고자 하는 국내 연구자들의 요망과 **2)** 이를 위한 GEM 생쥐 국내 반입의 전문성, **3)** 반입 후의 안정적인 교배와 계통 유지에의 전문성, **4)** 도입된 GEM 생쥐의 표현형 분석에 있어서의 전문가적 안목의 절대적 필요성에 기인한다. 따라서 본 연구실에서 마련한 절차에 따라 외국으로부터 안전한 SPF 시설 내로 기존에 그 효용성이 증명이 된 GEM 생쥐를 안정적으로 도입시킬 수 있었으며 그에 대한 성과는 기대이상으로, 유전자 적중 생쥐만을 고려하였을 때 기존에 보유하고 있던 13종을 포함하여 현재 약 50여 종이며, GEM 생쥐에서 나타나는 표현형이 생쥐의 유전적인 배경에 따라 상당한 차이를 보인다는 점을 고려하여 계통별로 교배에 의해 또는 도입한 계통에 따라서는 약 100여 종의 유전자 적중 생쥐를 mouse bank에 보유하게 되었다. 이는 2년 전 과제가 시작할 무렵에 비해 규모면에서 Mouse Bank가 비약적으로 성장하였음을 보여준다.

나. 직접적 연구 성과

(1) 대표적 성공사례

24 가지의 연구주제 중
국제학술지 게재: 13편(*Nature Genetics, Mol. Cell Biol., J. Neurosci.* 포함)
국제학술지 투고: 2편(*Science, Nature Cell Biol.* 포함)
Manuscript 준비 중: 9 편

[Novel Cytosolic Function of TERT independent of its Reverse Transcriptase activity (4종의 GEM 사용: Tert KO, Terc KO, Bax KO, and Tert Tg)]

TERT는 염색체 말단의 telomere를 안정적으로 유지하는데 필요한 reverse transcriptase로 알려져 왔다. 본 실험실에서는 이러한 TERT가 뇌세포가 입는 손상도 보호한다는 결과를 얻고 그 기작을 찾던 중, TERT가 apoptosis의 과정에 중요한 Bax와 상호 결합하고 Bax의 마이토콘드리아로의 Translocation을 Block한다는 것을 밝혔다. 특히 이러한 TERT의 기능을 위해서는 Reverse transcriptase activity는 중요하지 않다는 것 증거 또한 제시하였다(*Science*에 투고(2004.3.16) 후 in-depth review 중(2004.5.10.)).

[mTERT 유전자 과발현 생쥐의 신경계에서의 표현형 분석 (**1 종의 GEM 사용**: Tert Tg)]

암과 노화의 진행에 있어 핵심 효소인 텔로머레이즈의 catalytic subunit인 TERT의 과발현 생쥐를 제작 그 표현형을 분석하여 이전에 보고되지 않았던 telomerase의 새로운 기능, 즉 신경세포의 사멸을 억제 기능을 보고하였다 (***J. Neurosci.*** 24(6):1280-1287, February 11, 2004). 허혈을 유도한 실험에서 이 생쥐는 정상 야생형의 생쥐보다 신경세포의 사멸이 의미있는 수준에서 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이 생쥐는 허혈 저항성 모델로 특허로도 출원한 상태이다.

[Multiple developmental defects derived from impaired recruitment of ASC-2 to nuclear receptors in mice: implication for posterior lenticonus with cataract (**3 종의 GEM 사용**: Tg for DN1, DN1/m and wild-type of ASC-2)]

ASC-2는 최근에 보고된 Nuclear Hormone Receptor의 전사 활성에 관여하는 coactivator이다. 본 실험실에서는 ASC-2의 in vivo 기능을 살펴보기 위해 ASC-2의 기능을 저하시키는 dominant negative form (DN1)의 밝혀내고 이러한 DN1을 생쥐에서 과발현시킴 으로 인해 ASC-2의 기능저하에 따른 표현형질을 살펴보았다. 특히 ASC-2의 기능 저하는 눈의 발생 과정에 영향을 미쳐 Posterior Lenticonous를 일으켰고 심장에서는 Dilated Cardiomyopathy가 일어났다. (***Mol Cell Biol.*** 22(24):8409-14, Dec, 2002)

[Unc5h3 유전자 적중 생쥐의 생산 및 표현형 분석 (**1종의 GEM 사용**: Tert expressing Transgene이 Unc5h3 locus에 integration됨으로서 만들어진 Unc5h3 유전자 적중 생쥐)]

Transgene insertional mutant로써 Unc5h3 유전자 적중 생쥐를 생산하고 그 표현형을 분석하였다 (***Exp. Animals*** 52(4): 273-283, July 2003). 이 생쥐는 예전의 보고와 같이 (rcm mutant) 정상적인 뇌의 발달이 이루어지지 않았으며, 그 결과 ataxic gate라는 독특한 표현형을 나타내었다. 또한 행동 분석 실험에서 hyperactivity를 나타내었고, fat mass의 감소로 인한 저체중 현상을 관찰할 수 있었다.

[비만, 당뇨 및 노화 등을 나타내는 p62 유전자 결핍 생쥐의 생산과 표현형 분석 (**1 종의 GEM 사용**: p62 KO mice)]

아직까지 그 생리학적인 기능이 잘 알려지지 않은 p62 유전자의 기능을 알기 위한 p62 KO mice의 제작을 주도적으로 이끌었다. 그 결과 만들어진 p62 KO 생쥐는 인간의 성인병에서 발견되는 대표적인 현상인 비만, 당뇨 및 노화 등의 표현형을 보인다. 이러한 표현형을 바탕으로 국제특허를 출원하였다. 현재 Manuscript 준비 중이며 5월 중에 ***Nature*** 1편, 2004년 상반기 중에 ***EMBO J.***에 3편, ***Science*** 에 1편 투고 예정이다.

[tRNA synthetase cofactor인 p38의 유전적 연구 (**1 종의 GEM 사용**: p38 KO mice)]

*t*RNA synthetase cofactor인 p38의 기능을 보다 직접적으로 살펴보기 위해 p38이 결손된 생쥐를 제작하였고, 이 생쥐는 폐에 문제가 생겨 태어나자마자 죽게 되는데(RDS)라는 특히 신드롬을 나타내는 이유의 분자 생물학적 기작을 밝히던 중 p38이 잘 알려진 c-Myc과 fuse-binding protein의 전사 조절을 억제함으로서 그러한 표현형질이 나타나는

것을 알 수 있었다 (*Nature Genetics* 34(3):330-336, July 2003).

[Takashi Kondo 박사, **일본 Riken Institute (GEM 1종 제공)**]

Telomere의 구조와 Chromatin Structure에 대한 연구를 위해 본 실험실에서 제작한 TERC KO (Telomerase RNA Component KO) 생쥐의 Testis에서 연구하여 ***Nature Cell Biol.***에 Submit하였다.

(2) 공공기능수행실적

(가) 홈페이지 운영 및 활용 현황

홈페이지를 통한 정보교류 및 "Mouse Bank"에 포함된 GEM의 검색, GEM의 제작 과정에 관한 진도사항을 실시간으로 제공.

(나) 산·학·연 협력거점 활동현황

① 한화석유화학 BIO기초기술센터: 유전자 적중 생쥐 제작을 위한 기술정보 및 물질 제공 후 1개 유전자에 대한 유전자 적중 시도 및 2 개 유전자에 대한 유전자 적중 벡터 제작 중.
② (주)CJ 제약연구소: 유전자 과발현 생쥐의 제작을 위한 첨단기술정보의 제공 후 유전자 과발현 생쥐 제작 완료.

(다) 국내외 연구기관과의 협력정도

① 국내
GEM 제작, Mouse Banking, 표현형 분석을 위한 "**41건의 공동연구**"가 진행 중이다.
② 국외

㉮ Karl Lenhard Rudolph 교수, 독일 Hannover 의과대학 (GEM 3종 제작)

Telomere shortening을 좀더 빨리 유도할 수 있는 생쥐 모델을 만들기 위해 기존 연구를 통해 Telomere 길이를 짧게 하는 기능을 가진 dnTRF2 (TRF2의 dominant negative form)의 Conditional Tg (tetracycline-inducible)를 제작하였다. 또한 TERC KO 생쥐의 표현형질을 Conditional하게 유도할수 있는 mTERC-conditional Tg도 제작하였다. 이를 통해 Telomere Shortening이 Organism 레벨에서 끼치는 다양한 질병에의 연구가 가능할 것이다.

㉯ 이재운 교수, **미국 Baylor 대학교 (GEM 3종 제작)**

ES cell을 통한 유전자 적중 현상을 이용해 3개 유전자에 대한 KnockIn mice 제작을 시작하였다.

㉰ Ralph Steinman 교수, 미국 Rockefeller 대학교 (GEM 2종 제작)

최근 면역학에서 부각되고 있는 DC cell의 면역연구를 위해 DC cell에서 특이적으로 발현되는 CD11C-hDEC205 Tg와 CD11C-Cre Tg를 제작하였다. 이 Tg는 DEC205가 없는 상황에서 인간의 DEC205를 발현하는 좋은 인간면역연구의 모델이 될 것이다.

㉱ Prakash Hande 교수, Singapore 국립대학 (GEM 유래 MEF 1종 제공)

TERC KO에서 유래된 Mouse embryonic fibroblast 제공.

㉲ William C. Hahn 교수, **미국 DFCI, Harvard**

Telomerase의 연구에 필수적인 항체제작 (human과 mouse) 및 TERT 결손 생쥐의 표현형 분석에 대한 공동 연구

③ NRL Symposium 개최

1. 제1회 포유류 분자유전학 NRL Symposium.

강원도 평창군 피닉스파크. 2002년 12월 27일, 28일.

2. 제2회 포유류 분자유전학 NRL Symposium.

가톨릭대학교 의과학연구원 1층 강당. 2004년 02월 27일

④ NRL Seminar 개최

총 "**18회**"에 걸쳐 "**GEM의 제작 및 이용에 관련된 국내외 전문가들**"을 초청, NRL seminar를 개최하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

이러한 연구 성과는 **1. 앞으로 끊임없이 필요로 할 GEM의 원활한 생산 및 국외로부터의 확보에 있어서 큰 도움**이 될 것이며, 이는 곧 국내 연구진들이 필요로 하는, **2. GEM 또는 GEM으로부터 유도된 각종 cell line과 샘플들(조직 샘플, 단백질, RNA 등)을 손쉽게 제공**할 수 있음을 의미한다. 또한 GEM이 나타내는 **3. 표현형을 분석**하는 데에도 지대한 도움을 줄 것이며 이는 이미 효과를 나타내고 있다. 따라서 이전에 외국으로부터 복잡한 절차와 긴 시간을 거쳐서 얻을 수 있었던 효과들을 본 연구실을 통해서 단기일 내에 성취함으로써, 국내 연구자들의 연구 속도가 가속될 것이며 이는 생물학적 연구와 더불어 이와 연관된 의학 및 약학 관련 산업의 국제적인 국가 경쟁력 향상에 이바지할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

(해당사항 없음)

제 7 장 참고문헌

Bali, D., A. Svetlanov, H.-W. Lee, D. Fusco-DeMane, M. Leiser, B. Li, N. Barzilai, M. Surana, H. Hou, N. Fleischer, R. A. DePinho, L. Rossetti, and S. Efrat. Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. ***J. Biol. Chem.*** 270(37): 21464-21467, 1995.

Blasco, M. A. H.-W. Lee, M. Rizen, D. Hanahan, R. DePinho, C. W. Greider. Mouse models for the study of telomerase. in "Telomeres and telomerase". ***Ciba Found Symp*** 211: 160-170, 1997.

Chin, L., N. Schreiber-Agus, I. Pellicer, K. Chen, H.-W. Lee, M. Dudast, C. Cordon-Cardo, and R. A. DePinho. Contrasting roles for Myc and Mad proteins in cellular growth and differentiation. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*** 92:8488-8492, 1995.

Hatton, K., K. Mahon, L. Chin, F.-C. Chiu, H.-W. Lee, D. Peng, S. D. Morgenbesser, J. Horner, R. A. DePinho. Expression and activity of L-Myc in normal mouse development. ***Mol. Cell Biol.*** 16(4):1794-1804, 1996.

Herrera, E., E. Samper, J. Martin-Caballero, J. M. Flores, H.-W. Lee, M. A. Blasco. Diseases states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. ***EMBO J.*** 18(11): 2950-2960, 1999.

Kim D, Jun KS, Lee SB, Kang NG, Min DS, Kim YH, Ryu SH, Suh PG, Shin HS. Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. ***Nature*** 1997 Sep 18;389(6648):290-3.

Lee, H.-W. Study tumor suppressor genes by gene targeting: p16INK4a. ***Trend Med Res.*** 1: 116-119, 1998.

Lee, H.-W., M. A. Blasco, J. Horner, G. J. Gottlieb, C. W. Greider, R. A. DePinho. Essential role of telomerase in highly proliferative organs. ***Nature, Article*** 392:569-574, 1998.

Lee, H.-W. Study of a tumor suppressor gene by gene targeting: p16INK4a. ***Korean Soc. Med. Biochem. Mol. Biol. News*** 3(6):19-22, 1996.

Lee, H.-W.*, M. Serrano*, L. Chin, C. Cordon-Cardo, D. Beach, R. A. DePinho. Role of the *INK4a* locus in tumor suppression and cell mortality. *Lee, H.-W. and M. Serrano contributed equally to this work. ***Cell*** 85: 27-37, 1996.

Lee, H.-W. and R. A. DePinho. Analysis of *myc* Function by Gene Disruption. ***Einstein Quart. J. Biol. Med.*** 12(2): 55, 1995.

Lee, H.-W.*, M. A. Blasco*, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Landsdorp, R. A. DePinho, C. W. Greider. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Lee, H.-W. and M. A. Blasco contributed equally to this work. ***Cell*** 91:25-34, 1997.

Lee, H.-W. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. ***Proc. Kor. Assoc. Mol. Cancer Res.***. 4: 23-30, 1998.

Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, Liegeois, N., A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlow, H.-W. Lee, C. Cordon-Cardo, R. A. DePinho. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19ARF, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. ***Cell*** 92: 713-723, 1998.

Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. Liegeois, H.-W. Lee, A. Tam, K. P. Olive, R. A. DePinho, L. Chin. The role for INK4a in melanoma pathogenesis. One gene - two products - multiple pathways. in ***The Biology of Tumors***. E. Mihich and C. Croce (eds.) Plenum Publishing, New York, 1997.

Radfar, A., I. Unnikrishnan, H.-W. Lee, R. A. DePinho, N. Rosenberg. p19ARF induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. ***Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*** 95: 13194-13199, 1998.

Rudolph, K. L., S. Chang, H.-W. Lee, M. Blasco, G. Gottlieb, C. Greider, R. A. DePinho. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase deficient mice. ***Cell*** 96(5): 701-712, 1999.

Schreiber-Agus, N., Y. Meng, T. Hoang, H. Hou, Jr., R. Greenberg, C. Cordon-Cardo, H.-W. Lee, R. A. DePinho. Role of Mxi-1 in ageing organ systems and the regulation of normal and neoplastic growth. ***Nature*** 393: 483-487, 1998.

Teruhiko Wakayama & Ryuzo Yanagimachi. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. ***Nature Genetics*** 22(2) 127 - 128, 1999.