

최종연구보고서

NF- κ B 전사인자의 *in vivo* 방사선
반응인자로서의 역할 규명을 위한
형질전환 동물모델 개발

Development of a transgenic animal model to
characterize the role of NF- κ B pathway as a radiation
response element *in vivo*

연구기관
한양대학교

과 학 기 술 부

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “*NF- κ B* 전사인자의 *in vivo* 방사선반응인자로서의 역할 규명을 위한 형질전환 동물모델 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “000에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2002. 4. 30.

연 구 기 관 명 : 한양대학교

연 구 책 임 자 : 정희용

연 구 원 : 박정아

요 약 문

I. 제 목

“ NF- κ B 전사인자의 *in vivo* 방사선반응인자로서의 역할 규명을 위한 형질전환 동물모델 개발”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

방사선의 대표적인 평화적 용도는 방사선의 의학적 이용이며 이 중 특히 암의 치료에 있어 방사선의 중요성은 지난 수 십 년간의 임상경험에 의해 충분히 증명된 바 있다. 그러나 이러한 항 암 치료도구로서의 방사선의 유용성은 인체 정상조직의 손상에서 오는 부작용에 의해 크게 제한 받고 있는 실정이다. 본 연구는 NF- κ B pathway를 차단하는 것으로 밝혀진 dominant-negative(DN) I κ B- α 단백질의 발현을 간(liver)에서 특정 시기에만 선택적으로 유도할 수 있는 동물모델을 개발하여 간에서의 방사선에 대한 반응에 있어 NF- κ B pathway의 상대적인 중요성을 검증하기 위한 연구이다. 이러한 모델은 현재까지 세계적으로 수립된 바가 없으며, 본 연구에서는 이러한 방사선의 생체 영향에 대한 연구모델의 수립에 최신 분자유전학적 방법을 도입하여, 독자 모델을 개발함으로써 방사선영향 연구 뿐 아니라, 국내 생명공학연구 전반의 질적 향상에 이바지하고자 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
제 1차년도 (2000-2001)	1. Tet-dependent DN-IkB- α 발현벡터의 합성 및 기능 규명	1. Tet-dependent, HA-tagged DN-IkB- α 발현벡터의 합성 및 기능 검증. 2. rTTA-M2 발현 retroviral vector의 합성 및 바이러스 생산 3. Jurkat 세포에서의 HA-tagged DN-IkB- α 발현이 방사선 민감성에 미치는 영향 검증 4. 제작된 Tet-dependent, HA-tagged DN-IkB- α 발현벡터를 이용한 형질전환 생쥐 제작
	2. Liver-specific rTTA-S2 발현 Vector의 합성, 기능 검증 및 선별	1. a-1-antitrypsin promoter, transthyretin promoter의 hepatocyte에서의 specificity 비교 및 선별 2. liver-specific rTTA-M2 (vsv, flag-tagged) 발현 벡터 합성 및 hepatocyte에서의 발현 검증
제 2차년도 (2001-2002)	Liver-specific rTTA-M2 발현 Vector를 이용한 형질전환 생쥐 생산	1. Liver-specific rTTA-M2 발현 Vector의 fertilized egg에의 주입 2. 2 개 이상의 founder line 형질전환 생쥐의 확보 3. rTTA-S2의 liver 특이적인 발현 확인
	생성된 형질전환 생쥐의 유전자 transmission 여부 확인 및 homozygote 생	1. 유전자전달이 확인된 생쥐를 이용하여 정상 쥐와의 backcross에 의해, 유전자의 F2 세대로의 전달여부 확인하며, 이를 통한 한 유전자 당 3개 이상의 founder line 확보 2. Founder Line 끼리의 내부 교배 및 backcross에 의해 homozygote 확인
	위의 두 founder line의 교배에 의한 F1 형질전환 생쥐 생산 및 Tet주입에 의한 DN-IkB- α 발현 유도	1. 생쥐의 교배 및 두 transgene의 전달 확인 2. DN-IkB- α 의 Tet 주입 후 발현 유도 확인 3. 방사선 조사 후 radiation hepatitis 증상 및 liver morphology 조사. 4. 정상 쥐와의 방사선 민감성간염 유발에 필요한 방사선 선량비교.

IV. 연구개발결과

연구개발결과

1. dominant-negative (DN) I κ B α 의 Jurkat 세포에의 유전자 전달을 통하여 방사선 민감성이 증가함을 확인하였다
2. 또한 이 과정에서 DN I κ B α 가 NF κ B p65의 핵내로의 이동을 완벽하게 차단함도 확인하였다
3. Tet-inducible system을 구축하였으며, rTTA-M2에 VSV tag을 부착시킨 형태로 발현이 가능한 3가지 벡터를 합성하여, 293T 세포에서의 DN I κ B α 의 발현 유도를 확인하였다
4. tet-dependent promoter포함한 벡터에 의해 발현되는 DN I κ B α 의 DNA sequence를 재차 확인한 후, ES 세포에의 유전자 전달 대신 이를 이용하여 직접 형질 전환생쥐의 제작에 착수하였다.
5. 5가지의 liver-specific promoter를 확보한 후, 이에 LacZ reporter 유전자를 cloning하고 liver-origin의 세포주와 그렇지 않은 세포주에서 LacZ의 발현 정도를 측정한 결과, TTR 프로모터가 가장 조직 특이성이 뛰어난 것으로 나타났으며 여기에 rTTA-M2의 cloning을 완료하였다
6. Liver-specific rTTA-M2 발현 Vector의 blastocyte에의 주입 및 6 개의 founder line 형질전환 생쥐의 확보 완료
7. rTTA-M2의 liver 특이적인 발현을 Northern Blot으로 확인 함.
8. 6 line의 Founder 형질전환 생쥐 확보
9. 유전자 발현 확인
10. Liver-specific tTA-M2 발현 생쥐 및 Tetracyclin-dependent promoter에 의한 I κ B α 발현 생쥐의 founder 내에서의 homozygote 생쥐 생성을 위한 교배 개시.
11. 동시에 복합 형질 전환 생쥐 생산을 위한 교배 개시.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 과제에서는 현재까지 세 종류의 형질전환생쥐의 제작을 완료하였다. 이들 형질 전환생쥐를 이용하여 homozygote를 생성하고, 이들을 다시 상호교배하여 최종적인 모델의 생산을 위한 연구를 계속할 것이다. 이러한 생쥐모델은 방사선영향연구 뿐 아니라 면역학, 약리학, 병리학 및 뇌 신경학의 연구에 유용하게 쓰일 수 있는 모델이며, 계속연구에 따른 경비 지원과 기술 이전에 관해 현재 (주)마크로젠과 협의 중이다. 모델로서의 일차적인 유용성 검증은 금년 중에 완료할 예정이며 이를 기반으로 차기년도에 실용화연구 분야의 정부지원연구비를 확보하고자 한다. 장기적으로는 기타 조직에서도 Dominant-negative 형태의 전사인자억제유전자의 조직 특이적인 한시적 발현시스템을 통하여 각 전사인자가 생체 각 조직에서 지니고 있는 기능에 대한 심도 있는 이해를 위해 필수적인 다양한 동물모델을 개발 할 예정이며, 이러한 기술의 국제 특허 확보, 기술이전, 상용화에 대한 노력도 계속할 것이다.

S U M M A R Y

(영 문 요약 문)

We developed a transgenic mouse model that will be useful in studying the role of NF- κ B pathway in radiation response in vivo. The model would allow liver-specific, and temporal tetracyclin-dependent expression of dominant-negative I κ B α , thus blocking the NF- κ B pathway in tissue-specific, and controlled manner. For this, we tested different liver-specific promoters for their ability to direct liver-specific expression of LacZ reporter gene. We chose two promoters, transthyretin and alpha-1-anti-trypsin promoters, for this purpose. We also cloned dominant-negative form of I κ B α downstream of tetracyclin-dependent promoter. The three constructs mentioned above were used to construct transgenic mice. Two different kinds of transgenic mouse lines were independently established; one with dominant-negative I κ B α gene being expressed in tetracyclin-dependent manner, and the other with rtTA-M2 transgene controlled by liver-specific promoter. So far, 12 founder lines were established among which six have I κ B α transgene, and the other six have rtTA transgene. These founder lines were further bred to obtain homozygotic offsprings. The mating of the homozygotic mouse lines will generate offsprings that will be the model system in which NF- κ B pathway is blocked in liver-specific-, and tetracyclin-dependent manner. These mice will be used in investigating the possible role of NF- κ B pathway in radiation-induced hepatitis. The sophisticated transgenic mice that we are developing will be useful in other area of research such as T cell immunology, pharmacology, specifically drug-metabolism, and brain research.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1	Summary of the Research	1
Chapter 2	State of the Art of Technology	6
Chapter 3	Results of the Research	7
Chapter 4	Achievements obtained in terms of the Goal of Research and Contribution to the Science in General	19
Chapter 5	Plans of Further Studies and Application	21
Chapter 6	References	24

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 2 장	국내·외 기술개발 현황	6
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	7
제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	19
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	21
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	24

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 필요성

방사선의 대표적인 평화적 용도는 방사선의 의학적 이용이며 이 중 특히 암의 치료에 있어 방사선의 중요성은 지난 수 십 년간의 임상경험에 의해 충분히 증명된 바 있다. 그러나 이러한 항 암 치료도구로서의 방사선의 유용성은 인체 정상조직의 손상에 오는 부작용에 의해 크게 제한 받고 있는 실정이다. 이러한 부작용의 대표적인 예로서는 방사선유발 간염(hepatitis), 폐렴(pneumonitis), 신장염(nephritis)을 들 수 있다. 이와 같은 부작용의 발병기전의 이해 및 치료기술의 개발을 위해서는 인체 정상조직의 방사선에 대한 기관(organ) 혹은 개체 수준에서의 반응에 관한 연구가 필수적이나 이러한 연구는 일본에서와 같이 원자폭탄에 노출된 집단 혹은 방사선 사고 및 방사선치료에 의해 방사선에 노출된 집단을 대상으로 한 연구가 제한적으로 이루어지고 있을 뿐이다. 그러나 이 경우 정확한 방사선 노출량의 추정이 어렵고, 샘플조직의 확보가 어려워 *in vitro* study 외에 개체 및 기관(organ)을 대상으로 한 방사선영향 연구는 답보상태에 있는 실정이다. 이와 같은 기관(organ) 수준의 연구를 위해서는 동물모델의 수립이 선행되어야 하나 현재 이를 위한 적당한 동물모델은 존재하지 않는다. 따라서 본 연구에서는 현재 비약적인 발전이 이루어지고 있는 형질전환 동물의 생산기술을 한 단계 더 발전시킴과 동시에 이 기술을 이용하여 정상 조직에서 방사선에 대한 반응 인자로서의 NF- κ B pathway의 역할을 규명하고자 한다

본 연구에서 초점을 맞추고 있는 NF- κ B pathway는 그 동안 세포의 방사선에 대한 반응에 관한 많은 연구에서 방사선으로부터 세포를 보호하는 기능을 지니고 있는 것으로 알려져 왔으나(Cancer Res. 1999 vol.59, 6038-41; J Natl Cancer Inst. 1999 vol.91, 1956-60) 이에 관해 반론을 제기하는 보고도 있어왔으며(J Natl Cancer Inst. 1999 vol.91, 1910-1), 더욱이 대부분의 연구가 *in vitro*에서의 세포주를 대상으로 한 연구이어서 정상조직에서의 NF- κ B pathway의 역할은 아직 분명치 않은 상태이다. 본 연구에서는 NF- κ B pathway를 차단하는 것으로 밝혀진 dominant-negative(DN) I κ B- α 단백질의 발현을 간(liver)에서 특정 시기에만 선택적으로 유도할 수 있는 동물모델을 개발하여 간에서의 방사선에 대한 반응에 있어 NF- κ B pathway의 상대적인 중요성을 검증 할 것이다. 이러한 동물모델의 생산기술은 약간의 변형을 거치면 비단 방사선에 대한 정상조직의 반응에 관한 연구뿐 아니

라 hematopoiesis, inflammation, 및 organogenesis를 포함한 분화현상 전반에서의 NF-kB pathway의 역할을 밝히는 데에도 유용하게 사용될 수 있어 의과학 연구 전반에 매우 큰 파급효과를 나타낼 것으로 판단된다.

- 기술적 측면

* 방사선에 대한 조직손상 기전을 정상적인 생체조직에 수준에서 연구할 수 있는 동물 모델을 개발함으로써 방사선에 의한 조직손상 기전에 관한 보다 정밀한 연구를 가능토록 하며, 보다 효과적인 치료기술의 확립에 기여함.

* 유전자의 특정 시기에서의 선별적인 활성화가 가능한 새로운 형질전환 동물의 생산 기법 확보

- 경제·산업적 측면

* 보다 개선된 방사선영향 연구용 동물모델을 제공함으로써 방사선 장애 극복에 관한 연구수준의 향상 및 치료기법 개발의 기반 구축에 기여함.

* 장기(organ) 특이적인 유전자 발현유도 시스템의 구축 및 이를 이용한 특허 취득.

* 생산된 형질전환 생쥐의 기타 의과학 기초연구에의 유용성 제시에 의한 대량 생산 및 판매.

- 사회·문화적 측면

* 방사선의 의학적 이용에 관한 연구에 국내에 이미 확보된 최첨단 생명공학 기술을 접합시켜 이 분야에서의 세계적으로 선도적인 위치를 확립하는 데에 기여할 것임.

제 2 절 현 기술상태의 취약성

- 본 과제의 수행을 위해 필수적인 기술인 벡터의 합성 및 이의 분석에 관한 기술은 본 연구진이 국제 수준에 뒤지지 않는다고 판단됨. 형질전환 동물의 생산은

(주)마크로젠에서 담당할 것임.

- DN-I κ B-a와 같이 발생초기단계에 독성을 나타내는 유전자의 생체에서의 역할 규명을 위해서는 adult에 유전자발현 유도물질을 투입하여 그 발현을 선택적으로 유도할 수 있는 기술이 필수적임. 그러나 국외를 포함하여 현재 이를 달성한 보고는 없음.

- 이러한 목적의 성공적인 달성을 위해서는 유전자 발현을 조직 특이적으로 tight하게 조절할 수 있는 기술이 필수적임.

- 또한 본 연구에서는 매우 최근에 발표된 rTTA-M2 transactivator를 사용함으로써 현재까지 달성하기 어려웠던 높은 효율의 유전자발현 유도 및 background 발현의 최소화를 달성할 수 있을 것으로 판단됨.

제 3 절 앞으로의 전망

- NF- κ B pathway는 방사선으로부터 세포를 보호하는 기능을 지닌 것으로 알려져 있으나 실제 *in vivo*에서의 역할은 아직 확실치 않음.

- 본 과제와 성공적인 수행은 이러한 불확실성을 제거하고, 나아가서는 장기별로 NF- κ B pathway의 방사선 영향 감소에 있어서의 역할을 규명할 수 있는 중요한 기회를 제공할 수 있을 것으로 판단됨.

- NF- κ B pathway는 비단 방사선에 대한 immediate early response에서의 중추적인 역할 뿐 아니라, 세포의 분화에서도 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있음.

- 따라서 DN-I κ Ba의 *in vivo*에서의 선택적인 발현에 의해 NF- κ B pathway를 원하는 시기에 조직 특이적으로 차단할 수 있는 동물모델의 개발은 방사선영향에 대한 연구외에도 hematopoiesis, embryo development, organ development, neurodevelopment등 다양한 생명현상에서의 NF- κ B pathway의 역할을 규명할 수 있는 기회를 제공할 것임.

- 본 과제에서 개발하고자하는 형질전환 동물의 이러한 다양한 용도는 특허권 취득 및 상용화가 가능함을 의미하기도 함.

제 4 절 현기술상태의 취약성

- 본 과제의 수행을 위해 필수적인 기술인 벡터의 합성 및 이의 분석에 관한 기술은 본 연구진이 국제 수준에 뒤지지 않는다고 판단됨. 형질전환 동물의 생산은 (주)마크로젠에서 담당할 것임.

- DN-I κ B-a와 같이 발생초기단계에 독성을 나타내는 유전자의 생체에서의 역할 규명을 위해서는 adult에 유전자발현 유도물질을 투입하여 그 발현을 선택적으로 유도할 수 있는 기술이 필수적임. 그러나 국외를 포함하여 현재 이를 달성한 보고는 없음.

- 이러한 목적의 성공적인 달성을 위해서는 유전자 발현을 조직 특이적으로 tight하게 조절할 수 있는 기술이 필수적임.

- 또한 본 연구에서는 매우 최근에 발표된 rTTA-S2 transactivator를 사용함으로써 현재까지 달성하기 어려웠던 높은 효율의 유전자발현 유도 및 background 발현의 최소화를 달성할 수 있을 것으로 판단됨.

제 5 절 앞으로의 전망

- NF- κ B pathway는 방사선으로부터 세포를 보호하는 기능을 지닌 것으로 알려져 있으나 실제 *in vivo*에서의 역할은 아직 확실치 않음.

- 본 과제의 성공적인 수행은 이러한 불확실성을 제거하고, 나아가서는 장기별로 NF- κ B pathway의 방사선 영향 감소에 있어서의 역할을 규명할 수 있는 중요한 기회를 제공할 수 있을 것으로 판단됨.

- NF- κ B pathway는 비단 방사선에 대한 immediate early response에서의 중추적인 역할 뿐 아니라, 세포의 분화에서도 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있음.

- 따라서 DN-I κ Ba의 *in vivo*에서의 선택적인 발현에 의해 NF- κ B pathway를 원하는 시기에 조직 특이적으로 차단할 수 있는 동물모델의 개발은 방사선영향에 대한 연구 외에도 hematopoiesis, embryo development, organ development, neurodevelopment등 다양한 생명현상에서의 NF- κ B pathway의 역할을 규명할 수 있는 기회를 제공할 것임.

- 본 과제에서 개발하고자하는 형질전환 동물의 이러한 다양한 용도는 특허권

취득 및 상용화가 가능함을 의미하기도 함.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

- 국내 -

* NF- κ B pathway의 *in vivo*에서의 방사선에 대한 세포반응에서의 역할에 대한 연구는 국내뿐 아니라 국외에서도 아직 진행되고 있지 않으며, 그 이유는 적절한 동물모델의 부재에 있음.

* *in vitro*에서의 방사선에 대한 세포의 반응기전에 관한 연구, 특히 NF- κ B pathway의 역할에 대한 연구는 원자력병원 및 원자력연구소를 중심으로 많은 연구가 진행되고 있음.

* 형질전환 동물(생쥐)의 생산 및 판매는 국내 최초의 상장 생명공학 벤처 회사이고 본 연구에 참여하고 있는 (주)마크로젠에서 이미 시행되고 있음 (Immunology, 1998 vol.95, 559-65).

* 유전자의 조직 특이적인 발현이 가능한 형질전환 동물, 특히 선택적인 발현 유도가 가능한 동물모델의 생산은 아직 시도되지 않고 있음.

* tetracycline-responsive promoter를 이용한 vector의 합성 및 그 기능 분석은 본 연구진에 의해 수행된 바 있음(Mol Cells, 1997 vol.7, 514-20).

-국외-

* 일부 유전자를 이용하여 형질전환 동물에서 조직 특이적인 발현을 달성하였음(Immunity, 2000 May;12(5):537-46).

* 유전자발현의 조직 특이적인 발현유도가 일부 형질전환 동물모델에서 이루어진 사례가 있음(Immunity, 2000 May;12(5):459-69, .

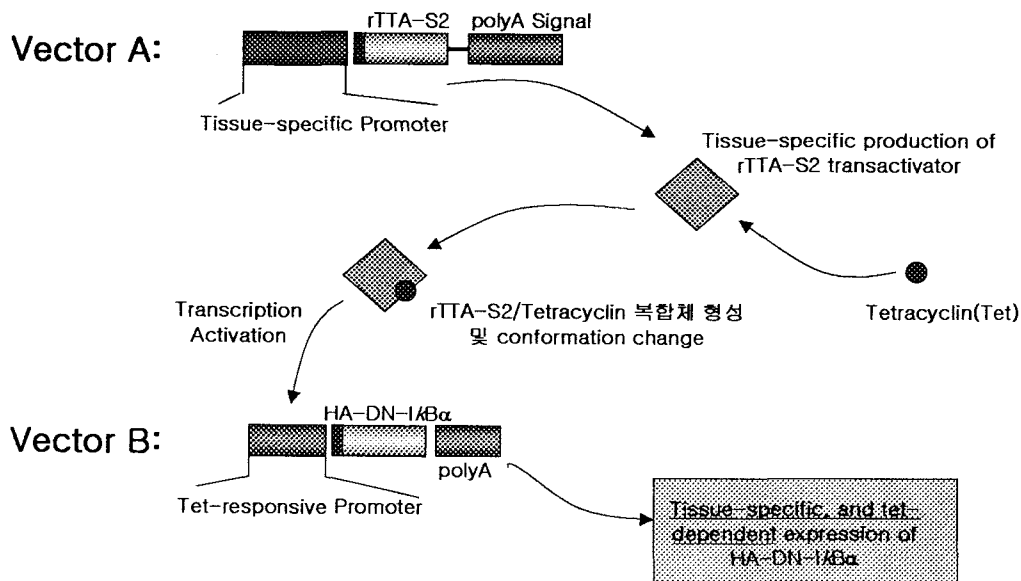
* 그러나 NF- κ B inhibitor protein인 I κ B- α 와 같이 embryonic toxic(배아독성) 유전자의 선택적인 발현유도에 의한 *in vivo*에서의 그 기능연구에 관한 보고는 없음.

* 최근 rTTA(reverse tetracycline-dependent transactivator, 그림 1 참조)의 saturation mutation에 의해 기존의 rTTA에 비해 안정성과 유전자발현 유도 특이성이 향상된 rTTA-S2의 유전자 구조가 발표된 바 있으며 본 과제에서도 이 새로운 transactivator를 사용할 예정인 바, 본 연구의 성공 가능성이 매우 높아졌음 (PNAS, 2000, vol 97, 7963-7968).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실험개요

그림 1. Tet-inducible, Tissue-specific Expression of HA-DN-I κ B α



본 과제에서 사용하는 Tet-dependent, inducible expression vector의 작용원리를 그림 1에 설명하였으며, 이 시스템은 그림 1에서와 같이 vector A, B의 두 vector로 구성되어 있다. rTTA는 tetracyclin이 존재하는 경우에만 vector B의 tet-dependent promoter 부위에 결합하여 유전자발현을 활성화하게 되어 DN-I κ B- α 단백질의 발현이 유도된다. 이 때 rTTA는 조직특이적인 promoter를 이용하여 발현시킬 것이며, 이 경우 유전자 발현의 조직특이성은 vector A에 의하여 결정되며, 유전자 발현의 특정시기에의 유도(Tet에 의한)는 vector B에 의해 결정된다. 이러한 시스템을 생체 내에서 작용하도록 하기 위해서는 Vector A와 Vector B 각각을 이용하여 형질전환 생쥐를 만든 후, 이들 형질전환 생쥐를 서로 교배시켜 시스템의 두 구성요소 (즉 Vector A, B)가 하나의 쥐에 동시에 존재할 수 있도록 하여야 한다. 이와 같은 연구의 수행과정은 크게 1. Vector의 제작 및 기능 검증, 2. 형질전환 생쥐의 생성, 3. 형질전환 생쥐의

기능 분석 등의 세 가지 분야로 나눌 수 있다.

제 2 절 연구내용 및 수행방법

1. Vector의 제작 및 기능 분석

가. IkBa의 방사선 민감제로서의 기능 확인

dominant-negative (DN) IkBa 의 Jurkat 세포에의 유전자 전달을 통하여 방사선 민감성이 증가함을 확인하였다. 이는 그림 2 에서와 같이 DNikBa를 발현하는 세포에서 세포의 분열에 미치는 방사선의 영향이 현저히 증가됨으로서 판단할 수 있었다. 또한 이 과정에서 DNikBa가 NFkB p65의 핵내로의 이동을 완벽하게 차단함도 확인하였다 (그림 3).

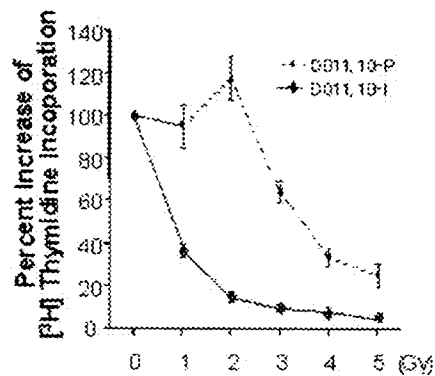


그림 2. D0.11.10 세포에서의 DNikBa의 방사선에 대한 민감성에 미치는 영향 (D011.10-P; plasmid control, D011.10-I; DNikBa Expression Group)

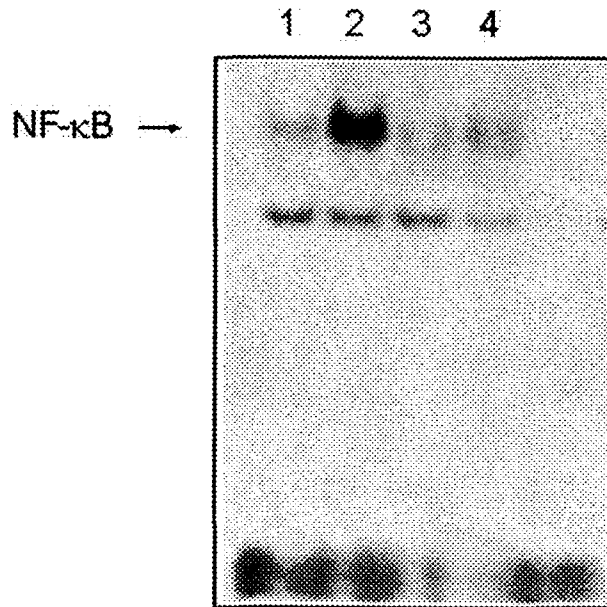


그림 3. D011.10 세포에서의 IkBa에 의한 NFκBa 의 핵내로의 이동저해. 5 Gy 가 조사된 세포의 Nuclear Extract를 Nf-κB-specific Oli해를 이용하여 EMSA로 분석하였음. (lane1: 1Gy, control with cold oligo, lane 2: plasmid control group, lane 3: DNikBa group, lane 4: MFG.IkBa group.)

나. rTTA-S2 발현 벡터의 합성 및 Tet-dependent expression induction의 확인

rTTA-S2(M2) 유전자를 독일의 Dr.Bujard Group으로부터 전달받아 우선 그림 4와 같은 3가지의 발현 벡터를 합성하였다.

각 합성된 벡터에서 기능적인 rTTArk 합성이 되는가를 확인하기 위하여 이들 벡터를 tet-dependent promoter에 의해 DNikBa가 발현되는 벡터(pUHD10-3.DNikBa, 그림 6)와

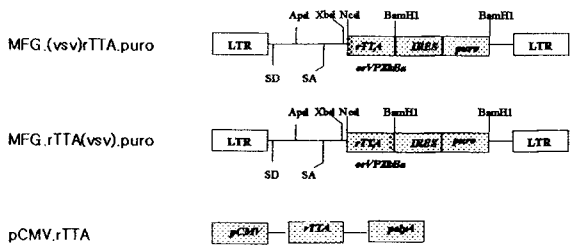


그림 4. rTTA expression vector의 구조. MFG retroviral vector의 경우 vsv tag를 5' (MFG.(vsv)rTTA.puro) 혹은 3' (MFG.rTTA(vsv).puro) 에 부착한 형태로 rTTA를 발현시켰음.

함께 293T 세포에 cotransfection하고, doxycycline에 의한 발현 유도 현상을 확인하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이, 각 벡터에서 모두 발현의 유도가 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 이 때 1kBa의 발현은 HA tag에 대한 항체를 이용하여 western blot 상에서 확인하였다.

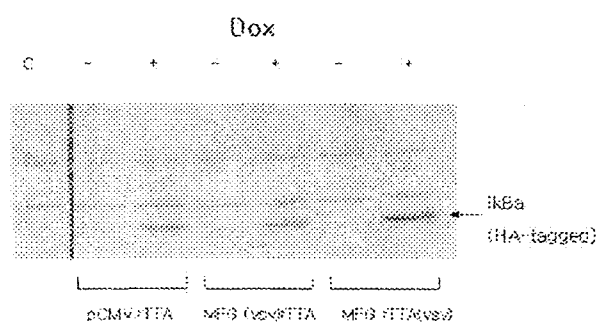


그림 5. rTTA 발현 벡터에 의해 transfection된 293 T 세포에서의 Doxycycline에 의한 DN1kBa의 Induction 양상. DN1kBa는 tet-dependent promoter를 포함하는 pUHD10-3.DN1kBa (그림 6) 에 의해 발현되고 있음.



pcmv* Tet은 tet-dependent promoter 임. DNikBa는 5'에 HA tag sequence를 부착시켜 발현의 확인에 사용되도록 합성하였음

그림 6. Tet-dependent IkBa 발현벡터, pUHD10-3.DNikBa의 구조다. liver-specific promoter 들의 조직특이성 비교

최적의 liver-specific promoter를 선별하기 위하여 그림 7과 같은 3가지의 liver-specific promoter를 확보하여, 각각에 LacZ 유전자를 reporter로서 사용하기 위하여 cloning 하였다. 이들을 각각 NIH3T3 세포(fibroblast), 293(H29D, Kidney Epithelial Cell) 세포, HepG2 (Hepatoma), HepG3 (Hepatoma) 세포에 MFG.egfp vector를 transfection 채내기 vector로 하여 cotransfection 하였다. Transfection efficiency를 감안하여 normalize한 data는 Table 1, 2, 3와 같다. 이로부터 TTR LacZ, 그리고 ApoE/AAT.LacZ의 경우가 가장 조직 특이성과 발현강도가 비교적 큰 것으로 나타나, 이를 이용하여 rTTA(vsv), 그리고 rTTA.flag의 cloning을 완료하였으며, 형질 전환 생쥐의 생성에 착수하였다.



그림 7. 각 promoter의 Liver-specific 발현유도 정도의 검증을 위해 합성된 3가지 reporter vector의 구조

Table 1. TTR.LacZ의 조직 특이적 발현

	3T3	H29D	HepG2	HepG3
CONTROL	-	-	-	-
MFG.LacZ. MFG.EGFP.ires.puro	7.2	3.8	7.9	1.1
TTR.LacZ + MFG.EGFP.ires.puro	0.9	1.3	55.2	21.0

Table 2. ApoE/AAT.LacZ의 조직 특이적 발현

	3T3	H29D	HepG2	HepG3
CONTROL	-	-	-	-
MFG.LacZ+ MFG.EGFP.ires.puro	7.2	3.8	7.9	1.1
ApoE/AAT.LacZ. + MFG.EGFP.ires.puro	1.2	0.9	22.0	13.0

Table 3. AAT.LacZ의 조직 특이적 발현

	3T3	H29D	HepG2	HepG3
CONTROL	-	-	-	-
MFG.LacZ. MFG.EGFP.ires.puro	7.2	3.8	7.9	1.1
AAT.LacZ. + MFG.EGFP.ires.puro	0.8	1.1	17.1	12.0

라. Liver-specific rTTA-M2 발현 Vector의 합성, 기능 검증 및 선별

우선 앞서 그림 7에서 설명한 바와 같이 형질전환생쥐에서의 발현확인을 쉽게 하기 위하여 rTTA-M2에 vsv, 혹은 flag tag을 부착시켰으므로 이의 발현 확인 가능여부를 western blot으로 확인하였다. 그림 7에서 보는 바와 같이 vsv tag을 3'에 부착시킨 경우에 예측된 분자량의 단백질이 검출되어 이를 추후 형질전환 생쥐의 구축에 사용하기로 결정하였다.

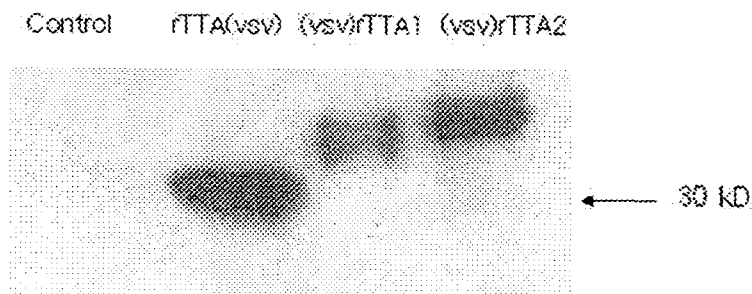


그림 8.
rTTA(vsv)
의 vsv tag
항체를 이
용한 검출.

2. 형질전 환 생쥐의

생성

가. Tet-dependent DN-I κ B- α 발현벡터를 이용한 형질전환 생쥐의 제작

Tet-dependent promoter포함한 벡터 (그림 5)에 의해 발현되는 DN κ B α 의 DNA sequence를 재차 확인한 후, ES 세포에의 유전자 전달 대신 이를 이용하여 직접 형질 전환생쥐의 제작에 착수하였다. 이는 생쥐제작을 담당하고 있는 (주) 마크로젠과의 협의에 따른 것으로, ES 세포의 검색 및 chimera 제작에 걸리는 시간/노력 대신 형질전환 생쥐를 다수 제작하여 이들을 screening 하기로 결정하였다. 즉 전체적인 추진전략이 그림 8에서 설명하는 바와 같이, 두 가지 형질전환 생쥐의 교배를 통하여, 생쥐모델을 수립하는 방향으로 전환된 것으로서 ES 세포를 이용한 chimera 구축은 일단 보류되었다. 현재 embryo에 DNA를 주입한 후, 이를 대리모에 이식하여 이로부터 66 마리의 생쥐가 태어나 Transgene의 존재여부를 genomic PCR로 screen 하였다.

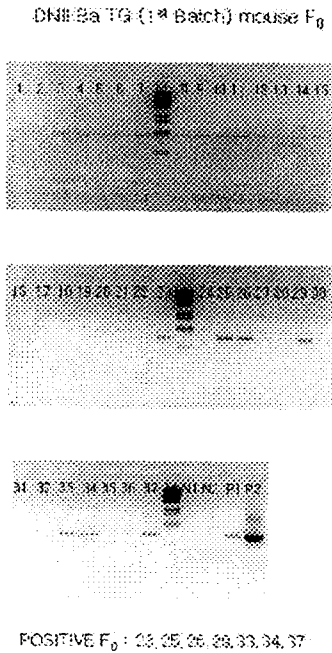


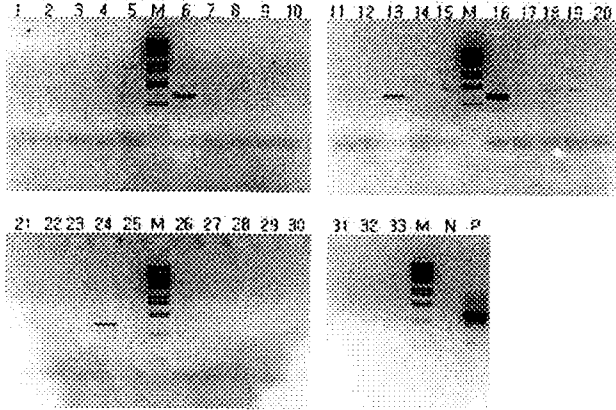
그림 9. Tetracyclin-dependen IkBa 발현이 가능하도록 합성된 벡터를 생쥐의 수정란에 주입한 후 이를 대리모에 이식하여 태어난 생쥐에서 부터 추출한 DNA에서 IkBa 유전자의 존재를 PCR로 검증하여 위에서 보는 바와 같이 유전자가 체세포에 전달된 7개의 형질전환생쥐를 확보하였다

여기서 positive로 확인된 생쥐 line들을 정상 쥐와 교배시켜 다음의 그림 10과 같은 결과를 얻었다.

그림 10. 위의 첫 번째 screen에서 양성으로, 즉 transgene을 전달받은 것으로 확인된 쥐들을 재차 정상 쥐와 교배시켜 그림과 같은 결과를 얻었다.

이상의 결과에서 1st Batch에서 자손으로 transgene을 전달하는 Founder Line을 3개 확보하였으며, 계속된 형질전환 생쥐 생성과정에서는 다음의 그림 11과 같은 결과를 얻었다.

DNikBa TG (2nd Batch) mouse F₀



N : A20 genomic DNA
 P : ST3.MFG.(HA)E-Baires puro genomic DNA
 POSITIVE F₀ : 6, 13, 16, 24

그림 11. 두 번째 시도에서 확보된 형질 전환 생쥐의 유전자 보유 여부 검색 결과.

그림에서 보는 바와 같이 모두 4 마리의 생쥐가 Transgene을 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 이들이 자손에 transgene을 전달하는지를 정상쥐와의 교배 및 그 자손의 검색을 통하여 확인한 결과, 다음의 그림 12와 같은 결과를 얻었다.

그림 12. F1 세대에의 유전자 전달 확인 결과.

그림에서 보는 바와 같이 3개의 mouse line에서 다음 세대로 유전자를 전달함이 확인되어 다시 founder line 3 개를 추가로 확보하였다.

이상의 결과를 요약하면 tetracyclin에 의해 발현이 유도되는 벡터에 DNikBa 유전자를 삽입한 DNA의 생쥐의 수정란에의 이식을 통하여 F1 세대에 유전자를 전달함이 밝혀진 6개의 founder line이 확보된 상태이다.

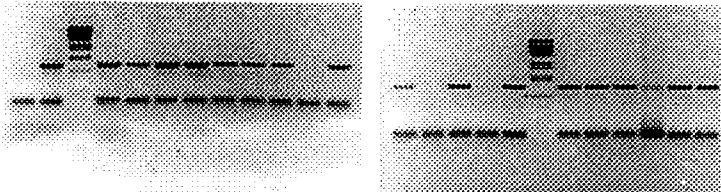
이상의 Founder Line의 line 내에서의 내부교배를 통하여 Homozygote (즉 양쪽 염색체에 모두 Transgene을 함유하고 있는 생쥐)을 얻기 위한 실험의 결과를 다음의 그림13에서 보여주고 있다.

DNIKBa TG (2nd Batch) mouse F₁

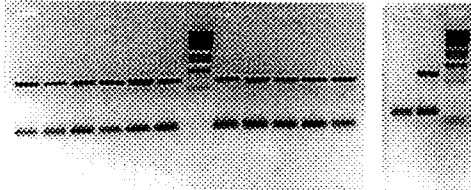
N P M 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 M 48 49 50 51 52 53

DNIKBa TG (1st Batch) mouse F₂

N P M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M 15 16 17 18 19 20



21 22 23 24 25 26 M 27 28 29 30 31 N P M



POSITIVE F2 : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21,
22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31

그림 13 . Homozygote을 얻기
위한 F1 끼리의 교배 결과.
이중 일부를 정상쥐와 교배하
여 Homozygote을 screen 하고
있음.

나. Liver-specific promoter를 이용한 rtTA-M2 발현 벡터를 이용한 형질전환 생쥐생
성

(1) Transtretin(TTR) promoter를 이용한 경우

앞에서와 마찬가지로 생쥐의 수정란에 TTR promoter를 이용하여 제작된 rtTA-M2 발현 벡터를 주입하여 생쥐를 생산하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(TTR Promoter) rtTA-M2 TG mouse F₀

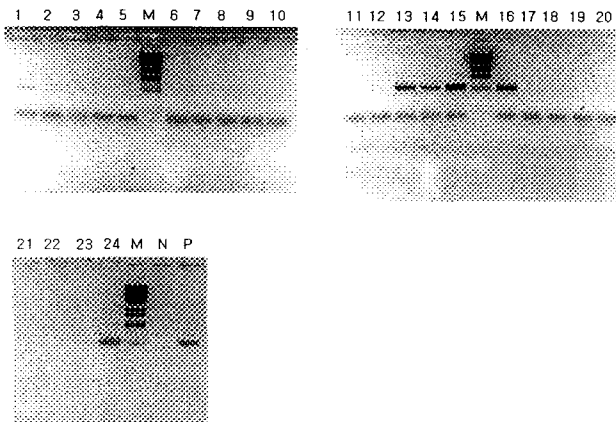


그림 14. TTR-rtTA-M2 형질 전환 생쥐의 일차 screening 결과

그림에서 보는 바와 같이 모두 다섯 마리의 생쥐에 rtTA-M2 유전자가 전달된 것을 확인할 수 있었으며, 이들이 다음세대에도 유전자를 확인하는가를 정상쥐와의 교배를 통해 F2 세대의 생쥐를 얻은 다음 screen한 결과 다음의 그림 15와 같은 결과를 얻었다.

POSITIVE F₀ : 1,13,14,15,16,24

(TTR Promoter) rtTA-M2 TG mouse F₁

(TTR Promoter) rtTA-M2 TG mouse F₁

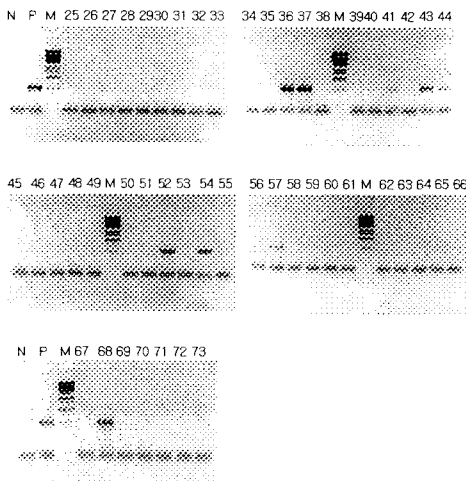


그림 15. F1 세대에의 유전자 전달 결과 확인.

이상이 실험을 통하여 rtTA-M2를 다음세대에 안정적으로 전달하는 founder line을 다시 3개 확보하게 되었다.

이들 세 founder line이 과연 rtTA를 liver에서 과 발현하고 있는지를 확인하기 위하여 각 founder line의 Kidney, Liver, Brain, Spleen에서 RNA를 추출하여 Northern Blot을 수행하였고, 그 결과를 다음의 그림 16에 나타내었다.

POSITIVE F₁ : 36,37,41,43,44,52,54,57,68

(TTR Promoter) rtTA-M2 TG mouse
NORTHERN BLOTTING

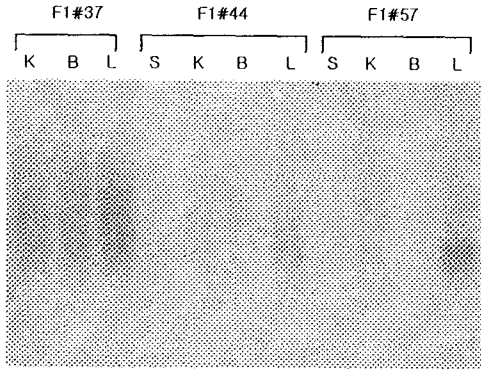


그림 16. rtTA-M2의 조직별 발현 정도 검색.

그림에서 보는 바와 같이 세 founder 모두에서 rtTA RNA는 주로 간에서 검출되었고, 일부 마우스에서는 Brain에서도 검출되었다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	I κ Ba의 방사선 민감제로서의 기능 확인	1. dominant-negative (DN) I κ Ba 의 Jurkat 세포에의 유전자 전달을 통하여 방사선 민감성이 증가함을 확인하였다 2. 또한 이 과정에서 DN I κ Ba가 NF κ B p65의 핵내로의 이동을 완벽하게 차단함도 확인하였다	100
2	I κ Ba의 Tet에 의한 발현 유도 시스템 확립	Tet-inducible system을 구축하였으며, rTTA-S2에 VSV tag을 부착시킨 형태로 발현이 가능한 3가지 벡터를 합성하여, 293T 세포에서의 DN I κ Ba의 발현 유도를 확인하였다	100
3	Tet-dependent DN-I κ B- α 발현 벡터의 ES 세포에의 삽입 및 Clone 선별	tet-dependent promoter포함한 벡터에 의해 발현되는 DN I κ Ba의 DNA sequence를 재차 확인한 후, ES 세포에의 유전자 전달 대신 이를 이용하여 직접 형질 전환생쥐의 제작에 착수하였다.	100
4	Liver-speicific rTTA-S2 발현 Vector의 합성, 기능 검증 및 선별	3가지의 liver-specific promoter를 확보한 후, 이에 LacZ reporter 유전자를 cloning하고 liver-origin의 세포주와 그렇지 않은 세포주에서 LacZ의 발현 정도를 측정한 결과, TTR 프로모터가 가장 조직 특이성이 뛰어난 것으로 나타났으며 여기에 rTTA-S2의 cloning을 완료하였다	100
5	Liver-speicific rTTA-S2 발현 Vector를 이용한 형질전환 생쥐 생산(2 개 이상의 founder line 형질전환 생쥐의 확보)	1. Liver-speicific rTTA-S2 발현 Vector의 blastocyte에의 주입 및 6 개 의 founder line 형질전환 생쥐의 확보 완료 2. rTTA-S2의 liver 특이적인 발현을 Northern Blot으로 확인함.	100
6	pUHD10-3.DN I κ Ba를 이용한 1 line 이상의 DN I κ Ba 발현 founder mouse 확보	1. 6 line의 Founder 형질전환 생쥐 확보 2. 유전자 발현 확인	100
7	Founde 생쥐의 상호교배를 통한 Homozygote 확보 및 복합 형질전환 생쥐 생산	1. Liver-specific tTA-M2 발현 생쥐 및 Tetracyclin-dependent promoter에 의한 I κ Ba 발현 생쥐의 founder 내에서의 homozygote 생쥐 생성을 위한 교배 개시. 2. 동시에 복합 형질 전환 생쥐 생산을 위한 교배 개시.	75

-관련분야에의 기여도

방사선의 대표적인 평화적 용도는 방사선의 의학적 이용이며 이 중 특히 암의 치료에 있어 방사선의 중요성은 지난 수 십 년간의 임상경험에 의해 충분히 증명된 바 있다. 그러나 이러한 항 암 치료도구로서의 방사선의 유용성은 인체 정상조직의 손상에서 오는 부작용에 의해 크게 제한 받고 있는 실정이다. 본 연구는 NF- κ B

pathway를 차단하는 것으로 밝혀진 dominant-negative(DN) I κ B- α 단백질의 발현을 간(liver)에서 특정 시기에만 선택적으로 유도할 수 있는 동물모델을 개발하여 간의 방사선에 대한 반응에 있어 NF- κ B pathway의 상대적인 중요성을 검증하기 위한 연구이다. 이러한 모델은 현재까지 세계적으로 수립된 바가 없으며, 본 연구에서는 이러한 방사선의 생체 영향에 대한 연구모델의 수립에 최신 분자유전학적 방법을 도입하여, 독자 모델을 개발함으로써 방사선영향 연구 뿐 아니라, 국내 생명공학연구 전반의 질적 향상에 이바지하고자 하였다. 이러한 목적 아래 형질전환 생쥐의 제작에 착수하여 일 차 년도에 모든 기초연구를 마치고, 2 차년도 부터는 실제 생쥐제작에 착수하였다. 그 결과 현재 12 개의 Founder Line을 확보하여 현재 상호교배를 통한 본격적인 생쥐모델 생산에 착수하였다.

본 연구는 특정신호전달 경로가 생체 내에서의 방사선에 대한 반응에서 어떠한 역할을 담당하고 있는지를 밝힐 수 있는 최초의 동물모델이 될 것이며, 기술적으로도 특정시기에 특정유전자의 발현을 특정 장기에서만 선택적으로 유도할 수 있는 동물의 생산이라는 신기술의 확립이라는 큰 파급효과를 지니고 있다. 특히 본 연구에서 다루고 있는 NF- κ B pathway의 경우, 방사선 뿐 아니라 면역학, 약리학, 및 뇌신경학 등 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단되어, 생명공학 전반에 큰 파급효과를 미칠 수 있을 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 연구목표 및 내용

방사선의 대표적인 평화적 용도는 방사선의 의학적 이용이며 이 중 특히 암의 치료에 있어 방사선의 중요성은 지난 수 십 년간의 임상경험에 의해 충분히 증명된 바 있다. 그러나 이러한 항 암 치료도구로서의 방사선의 유용성은 인체 정상조직의 손상에서 오는 부작용에 의해 크게 제한 받고 있는 실정이다. 본 연구는 NF- κ B pathway를 차단하는 것으로 밝혀진 dominant-negative(DN) I κ B- α 단백질의 발현을 간(liver)에서 특정 시기에만 선택적으로 유도할 수 있는 동물모델을 개발하여 간에서의 방사선에 대한 반응에 있어 NF- κ B pathway의 상대적인 중요성을 검증하기 위한 연구이다. 이러한 목적 아래 형질전환 생쥐의 제작에 착수하여 일 차 년도에 모든 기초연구를 마치고, 2 차 년도 부터 실제 생쥐제작에 착수하였다. 그 결과 현재 12 개의 Founder Line을 확보하여 현재 상호교배를 통한 본격적인 생쥐 모델 생산에 착수하였다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점 까지)

가. 발생품 및 시작품 내역

- 1) 세포신호전달에 관여하는 NF- κ B 전사인자의 특이적으로 저해능력을 지니고 있는 dominant-negative (DN) I κ Ba 단백질의 Tetracyclin을 이용한 발현조절 시스템.
- 2) Tetracyclin에 의해 DN I κ Ba 유전자 발현 조절이 가능한 DNA 절편을 지닌 형질전환생쥐
- 3) 간특이적으로 (liver-specific) rtTA-M2 (tetracyclin에 반응하여 활성화되는 전사활성인자)의 발현이 가능한 벡터시스템 및 이를 함유하는 형질전환 생쥐
- 4) 위의 두 형질전환 생쥐의 교배에 의해 확보되는 tetracyclin 주입시 DN I κ Ba의 간 특이적인 발현이 가능한 생쥐

나. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지 사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재여부
Molecules and Cells	Generation of Fusion Genes Carrying Drug Resistance, Green Fluorescent Protein, and Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Genes in a Single Cistron.	2001년 4월 30일	vol 11. No.2	한국분자세포생물학회	한국	yes
Molecules and Cells	Primary Structures and Chain Dominance of anti-DNA Antibodies.	2001. 2월 28일	vol.11, No.2	"	"	"
Stress and Chaperone	Role of Inducible Heat Shock Protein 70 in Radiation Induced Cell Death	2001. 7. 31.	vol.6, No.3	국제 스트레스학회	미국	"
FEBS Letter	Ionizing radiation can overcome resistance to TRAIL in TRAIL-resistant cancer cells	2001.10.31	vol 505, No.1	FEBS	미국	"
Molecules and Cells	Simultaneous Expression of Allogenic Class II MHC and B7.1 (CD80) Molecules in A20 B-lymphoma Cell Line Enhances Tumor Immunogenicity	2002.2.28	vol. 13, No.1	한국분자세포생물학회	한국	yes
계: 건수	5					

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지 사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
		년 월 일			
계: 건수					

3. 연구성과

본 연구에서는 방사선의 생체 영향에 대한 연구모델의 수립에 최신 분자유전학적 방법을 도입하여, 독자 모델을 개발함으로써 방사선영향 연구 뿐 아니라, 국내 생명공학연구 전반의 질적 향상에 이바지하고자 하였다. 이러한 목적 아래 형질전환 생쥐의 제작에 착수하여 일 차 년도에 모든 기초연구를 마치고, 2 차년도 부터는 실제 생쥐제작에 착수하여, 그 결과 현재 12 개의 Founder Line을 확보하여 현재 상호교배를 통한 본격적인 생쥐모델 생산에 착수하였다. 본 연구를 통하여

확보된 구체적 기술 및 동물은 다음과 같다.

- 1) 세포신호전달에 관여하는 NF- κ B 전사인자의 특이적으로 저해능력을 지니고 있는 dominant-negative (DN) I κ Ba 단백질의 Tetracyclin을 이용한 발현조절 시스템.
- 2) Tetracyclin에 의해 DN I κ Ba 유전자 발현 조절이 가능한 DNA 절편을 지닌 형질 전환 생쥐
- 3) 간특이적으로 (liver-specific) rtTA-M2 (tetracyclin에 반응하여 활성화되는 전사활성인자)의 발현이 가능한 벡터시스템 및 이를 함유하는 형질전환 생쥐
- 4) 위의 두 형질전환 생쥐의 교배에 의해 확보되는 tetracyclin 주입 시 DN I κ Ba의 간 특이적인 발현이 가능한 생쥐

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

본 과제에서는 현재 세 종류의 형질전환생쥐의 제작을 완료하였다. 이들 형질 전환생쥐를 homozygote를 생성하고, 이들을 교배하여 최종적인 모델의 생산을 위한 연구를 계속할 것이다. 이러한 생쥐모델은 방사선영향연구 뿐 아니라 면역학, 약리학, 병리학 및 뇌 신경학의 연구에 유용하게 쓰일 수 있는 모델이며, 계속연구에 따른 경비 지원과 기술이전에 관해 현재 (주)마크로젠과 협의 중이다.

이러한 계속연구 결과를 기반으로 추가지원을 확보하고, 현재 간 특이적인 발현시스템 구축을 연장하여, 혈액림프구, 그리고 뇌에서의 NF- κ B pathway의 역할을 연구할 수 있는 중요한 생쥐모델의 확립에 관한 연구를 계속하고자 한다. 이러한 중장기연구는 특히 생쥐모델 개발에 주력하고 있는 (주)마크로젠 등 기업과의 협동연구를 통하여, 유용한 동물자원의 확보 및 이를 위한 기술이전에 많은 기여를 하리라 판단된다.

5. 기대효과

본 연구는 특정신호전달 경로가 생체 내에서의 방사선에 대한 반응에서 어떠한 역할을 담당하고 있는지를 밝힐 수 있는 최초의 동물모델이 될 것이며, 기술적으로도 특정시기에 특정유전자의 발현을 특정 장기에서만 선택적으로 유도할 수 있는 동물의 생산이라는 신기술의 확립이라는 큰 파급효과를 지니고 있다. 특히 본 연구에서 다루고 있는 NF- κ B pathway의 경우, 방사선 뿐 아니라 면역학, 약리학, 및 뇌 신경학 등 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단되어, 생명공학 전반에 큰 파급효과를 미칠 수 있을 것으로 판단된다. 특히 기업에의 기술이전 및 상용화를 통하여, 장기적으로는 연 10억 이상의 매출을 발생시킬 수 있으리라 판단된다. 그리고 기타 조직에서의

Dominant-negative 형태의 전사인자 기능 억제유전자의 조직 특이적인 한시적 발현시스템을 통하여 각 전사인자의 생체 각 조직에서 지니고 있는 기능에 대한 심도 있는 이해를 위해 필수적인 다양한 동물모델을 개발 할 수 있을 것으로 판단되어, 기술의 국제 특허 확보, 기술이전, 상용화에 의한 매출은 계속 증대되리라 판단된다.

6. 문제점 및 건의사항

*연구기간의 중도변경에 의해 많은 차질이 발생하였음.

*기초연구 종료과제의 일부를 실용화 과제로 편입하는 제도적 장치의 확립이 고려되어야 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

본문에 삽입하였음