

M1-0016-00-0040

백내장 생쥐를 이용한 백내장 발병 기전 연구

Mechanism of Cataractogenesis of Ir2 mouse

가톨릭대학교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “백내장 생쥐를 이용한 백내장 발병 기전 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2003 . 7 . 31.

주관연구기관명 : 가톨릭대학교

주관연구책임자 : 김 성 주

연 구 원 : 김 은 민

” : 배 윤 정

” : 양 금 진

” : 신 혜 선

” : 박 진 희

보고서 초록

과제관리번호	M1-0016-00-0040	해당단계 연구기간	3 단계 -2000. 8. -2003.5.	단계 구분	3 / 3
연구사업명	중 사업명	국책연구개발사업			
	세부사업명	생명현상 및 기능연구사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	백내장 생쥐를 이용한 백내장 발병 기전 연구			
연구책임자	김 성 주	해당단계 참여연구원수	총 : 14 명 내부 : 3 명 외부 : 11 명	해당단계 연구비	정부: 155,000천원 기업: 천원 계: 155,000천원
연구기관명 및 소속부서명	가톨릭대학교 의과학연구원		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위 탁 연 구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)					보고서 면수
<p>◆ 마우스 염색체 D14Mit28 의 0.6 cM 지역, 물리적으로 1.4Mb 이상의 지역에 대하여 고휘상 STS-content map을 작성함.</p> <p>◆ 이 지도는 총 106개의 clones과 64개의 마커를 이용하여 작성이 되었으며 해상도가 23Kb/마커 임.</p> <p>◆ 마커들 중 14개가 유전자를 대표하는 마커로서 1개는 유전적 방법, 4개는 sequencing 방법, 나머지는 physical mapping 방법으로 후보 유전자로부터 제외하였음.</p> <p>◆ 클론을 이용한 genomic sequence로부터 새로운 유전자 <i>lr2</i>를 분리하여 비교 sequencing으로 원인유전자임을 밝혔으며 genotyping으로 확인하였음.</p> <p>◆ 또한 마우스 안구로부터 mRNA를 추출하여 eye-specific cDNA library를 제작하고 2304 spots (1152 종)이 집적된microarray chip을 제작하였음.</p> <p>◆ 1 주령 마우스안구의 유전자 발현을 동정하였으나 정상 마우스와 백내장 마우스간의 특이한 차이가 없었음.</p> <p>◆ <i>lr2</i> 유전자의 전장 cDNA를 cloning하였으며 kidney, brain, spleen 등에서 10Kb transcript를 발현하며 약 200KDa 단백질을 발현한다는 것을 밝혔으며 안구에서도 발현된다는 것을 확인하였음.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	백내장, 마우스, 원인유전자, 위치클로닝, 물리적지도, <i>lr2</i> , 안구특이 cDNA 라이브러리			
	영 어	cataract mouse, disease-causing gene, positional cloning, physical map, eye specific cDNA library chip			

요 약 문

I. 제 목

백내장 생쥐를 이용한 백내장 발병 기전 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

백내장은 발생빈도가 지역 간 어느 정도 차이는 있지만 60세가 지나면서 급격히 증가하고, 그 진행 및 수정체의 혼탁정도가 현저히 증가하는 성인병으로 전세계적으로는 시각장애 인구의 42%, 우리나라를 포함한 아시아에서는 39%가 백내장에 의해서 발생되고 있는 실정이다. 따라서 백내장은 노년 인구가 증가하고 있는 현 시점에서 점점 심각한 문제로 대두 되고 있다. 백내장의 유전적 원인 규명은 아직도 초창기로서 몇 유전자가 알려져 있으나 아직도 규명되지 않은 유전자가 다수 존재한다. 따라서 본 연구에서는 CXSD라는 백내장 모델마우스를 활용하여 백내장의 원인유전자를 분리하고 그 기능을 동정하여 백내장의 기전 이해의 초석이 되고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 (1) CXSD마우스의 백내장 연쇄 지역인 D14Mit28 지역을 대상으로 YAC, BAC clone based STS-content 고해상 지도를 작성하여 이 지역의 genomic organization를 동정. (2) 이 지역의 유전자를 database, EST 탐색, genomic sequence로부터 발굴하고 후보 유전자 여부를 RT-PCR, sequencing 등으로 결정하고 백내장 원인유전자 lr2를 positional cloning 방법으로 분리. (3) 안구 cDNA library를 제작하고 cDNA array를 제작 활용하여 백내장 마우스와 정상마우스 간의 발현 차이를 동정. (4) 분리된 lr2 유전자를 대상으로 유전적 원인 규명을 마우스 mating과 genotyping, 발현 양상을 MTN Northern blot analysis, 세포내 발현을 GFP-fusion protein으로 transfection, confocal microscopy 조사, protein 조사를 위한 항체제작 등으로 동정하여 분자생물학적 기능을 이해하고자 한다.

IV. 연구개발결과

마우스 염색체 D14Mit28 의 0.6 cM 지역, 물리적으로 1.4Mb 이상의 지역에 대하여 고해상 STS-content map을 작성하였다. 이 지도는 총 106개의 clones과 64개의 마커를 이용하여 작성이 되었으며 해상도가 23Kb/마커이다. 마커들 중 14개가 유전자를 대표하는 마커로서 1개는 유전적 방법, 4개는 sequencing 방법, 나머지는 physical mapping 방법으로 후보 유전자로부터 제외하였다. 이 중 genomic sequence로부터 새로운 유전자 *lr2*를 분리하여 strain당 비교 sequencing으로 원인유전자임을 밝혔으며 genotyping으로 확인하였다. 또한 마우스 안구로부터 mRNA를 추출하여 eye-specific cDNA library를 제작하고 2304 spots (1152 종)이 집적된 microarray chip을 제작하여 1주령 마우스안구의 유전자 발현을 동정하여 정상 마우스와 백내장 마우스간의 특이한 차이를 발견하지 못하였다.

lr2 유전자의 전장 cDNA를 cloning하였으며 kidney, brain, spleen 등에서 10Kb transcript를 발현한다는 것을 밝혔고 안구에서도 발현된다는 것을 확인하였다. 현재는 수정체 상피세포내의 발현을 조사하기 위하여 *lr2* 전장 cDNA를 GFP protein과 fusion protein을 제작하였으며 confocal microscopy로 발현위치 조사가 진행 중이다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 유전질환의 원인유전자를 positional cloning이라는 기법과 방대하게 축적되어 있는 정보를 database를 활용하여 발굴해 내었다. 이 같은 방법은 외국의 경우 사례가 많으나 우리나라에서는 처음으로 활용된 것으로 장차 새로운 유전자의 발굴에 성공적으로 사용될 수 있다.

또한 본 연구를 통하여 밝혀진 백내장 원인 유전자인 *lr2*는 지금까지 알려진 백내장 유전자들과는 다른 새로운 기전을 제시할 것으로 사료되며 이는 백내장의 원인을 이해하는데 우리의 시야를 넓힐 것으로 생각된다.

지금까지 알려진 백내장 loci는 인간에서 약 37개, 마우스에서는 30개가 넘으나 50%의 유전자도 밝혀지지 않은 상태로 *lr2* 유전자를 활용하여 이와 상호작용하는 유전자를 확인 분리할 수 있을 것으로 사료되며 이는 또 다른 백내장의 원인 유전자일 가능성이 있다. 장차 더욱 심도 깊게 *lr2*의 기능연구가 시행된다면 이를 바탕으로 장차 백내장 치료제 개발 혹은 예방약 개발에 직 간접으로 활용될 것이다.

S U M M A R Y

A mouse mutant is an excellent model system in dissecting human disorders. A recessive cataractous mouse, CXSD (D), showed the first clinical symptom of cataract at 5 weeks old and the penetrance was complete. In order to identify the responsible gene, lens rupture 2 (*lr2*) by positional cloning, we mapped the locus genetically and constructed the physical map spanning the critical region. Using total of 586 intersubspecific F2 mice between cataract D mutant mice and *Mus musculus molossinus* (MSM), linkage analysis, homozygosity mapping and additive mating experiments revealed the commonly inherited region at *D14Mit28* and *D14Mit87*. The construction of STS-content physical map resulted in isolation of the genomic DNA clones encompassing the critical region and determination of the physical order of 63 STSs that were dispersed among 20 YAC clones and 75 BAC clones. The markers included 11 genetic, 39 clone-end, 13 gene specific EST markers which map to the human chromosome 8p21-22. The sequence analysis of the genomic clones revealed a putative cDNA in the critical region that harbored 27 bp deletion in CXSD mouse genome, indicating this gene was the cataract-causing gene. Understanding the function of the this gene will provide a new insight into cataractogenesis.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	8
Chapter 2. The Current Status of Technical Development	10
Chapter 3. The Contents and Results of This Research	12
Chapter 4. The Attainment of Aim and Contribution	33
Chapter 5. The Further Study and Application Plan	36
Chapter 6. Collecting the Abroad Scientific Techniques	37
Chapter 7. References	38

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.	12
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	33
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	36
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	37
제 7 장 참고문헌.....	38

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발의 배경 및 필요성

1. 기술적 측면

-백내장의 원인은 당뇨병, 부갑상선 기능항진증 등 다른 질환의 합병증 또는 oxidative stress, osmotic pressure 등 환경적 요인들이 관여한다고 보고되었으나 이들의 의의성을 증명하기 어려움

-백내장의 원인 규명을 위해 유전학적, 분자 생물학적 접근 방법을 통하여 그동안 수정체의 구성 단백질인 crystallins, 수정체 상피 세포막의 단백질인 MIP, GAP junction 등의 변이가 백내장과 직접적인 관계가 있음이 보고됨.

-그러나 그 변이가 수정체 상피 세포에 어떤 영향을 미쳐 백내장으로 발전하는지 그 기전에 대한 연구가 미흡함.

-따라서 sample의 제한적인 사람의 백내장을 벗어나 모델 동물을 통한 총체적 연구로 그 기전연구를 제시하고자 함.

-CXSD 마우스는 autosomal recessive inheritance mode를 보이며 생 후 5주면 완전한 백내장을 보이는 모델임.

-CXSD 마우스는 백내장 질환과 함께 lens rupture가 동반되는 모델 마우스로서 그 원인(lr2) 을 규명하는 것은 백내장의 발병 기전을 이해할 뿐만 아니라 조직의 구조를 유지하기 위한 필요조건을 이해하게 되는 중요한 정보를 제시할 것임.

-CXSD 마우스는 BALB/cHeA 와 STS/A 교배의 recombinant inbred 로서 본 연구자는 백내장 마우스의 원인 유전자(lr2)를 positional cloning 기법으로 추적하고 있음. lr2 locus는 genetic linkage 분석으로부터 마우스 염색체 14의 D14Mit143 과 D14Mit156 사이에 존재하며 D14Mit28에 가까이 존재하는 것으로 보고됨.

-원인 유전자 규명과 동시에 이 유전자 변이가 수정체 상피세포에 미치는 영향을 총체적으로 연구하여 백내장 발병 기전을 조사할 필요성이 있음.

2. 경제 · 산업적 측면

-매년 미국에서는 약 200만 예, 한국에서는 약 10만 예의 백내장 시술이 되고 있어 전 세계적으로 약 2,000만 예에 이릅니다

-미국에서 단일 질병으로 전 의료비 지출의 12%에 이르는 질병임

-따라서 백내장 원인 규명은 예방, 치료제 개발의 초석을 제공하여 의료비 지출을 삭감하는데 유용할 것입니다.

3. 사회 · 문화적 측면

-백내장은 발생빈도가 지역 간 어느 정도 차이는 있지만 60세가 지나면서 급격히 증가하고, 그 진행 및 혼탁정도가 현저히 증가하는 성인병임

-전세계적으로는 시각장애 인구의 42%, 우리나라를 포함한 아시아에서는 39%가 백내장에 의해서 발생되고 있는 실정임

-우리나라에서 백내장의 나이별 분포는 40-49세 사이가 4.16%, 50-59세 사이가 13.3%, 60-69세 사이가 37.5%, 70세 이상이 45%로 나타남.

-이와 같이 백내장과 후발성백내장은 국가경제와 문화의 발달로 노령인구가 증가하고 있는 시점에서 점점 심각한 문제로 부각되고 있는 질병실명원인 중 가장 흔한 원인 질환임

-현 사회가 노령화 시대를 맞이하여 백내장이 접하는 비율은 해마다 증가하는 추세임

-따라서 백내장 정복은 노인 복지에 중요함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내

백내장은 수정체 혼탁을 일으키는 눈병으로 심각한 시각장애 뿐 만 아니라 blindness를 초래할 수 있다. human cataract는 여러 병의 합병증으로도 나타나며 genetically 여러 유전자에 의해 발병되는 질병이다. 백내장 원인 규명 및 기전에 관한 연구로는 주로 세포 생물학적 방법으로 접근하며 생화학적인 연구 (증식, 이동, 변형과정, 이들 과정에서 유전자 발현, integrin과의 관계, 세포외기질에 대한 연구, cytokine에 의한 영향, steroid therapy에 의한 수정체 혼탁의 기전, oxidative stress와 UV에 의한 세포사 규정) 등 이 연구되고 있으나 동물 모델과 같은 in vivo system에서 유전학적 접근연구는 희소한 상황이다.

BALB/c 와 STS mouse의 교배에서 얻어진 recombinant inbred mouse에서 자연 발생적 백내장 model이 보고되었다 (Song et al. 1997 mammalian genome). 본 연구자는 백내장 원인유전자를 밝히기 위하여 모델 동물인 CXSD strain의 원인 유전자를 positional cloning 기법으로 추적하고 있다. Ir2 생쥐의 원인 locus는 genetic linkage analysis에 의해 mouse 유전체 14의 D14Mit28 부위에 연쇄 되어있는 것을 알았다.

국내에서는 positional cloning이라는 기법으로 원인유전자를 분리하는 방법의 성공사례가 알려지지 않은 연구 방법이며 백내장 외 다른 질환, 동물, 인체 등 에서도 시도된 바가 없는 방법으로 외국과의 격차가 심한 연구기법이다..

2. 국외

외국의 경우 백내장 원인 유전자 규명은 활발히 이루어지고 있는 편이다. 마우스모델 뿐만 아니라 인체에서도 백내장이 co-segregation 하는 가계를 대상으로 원인유전자가 규명되고 있어 이미 수정체 구조 단백질인 crystalline, lens 세포 세포막의 Mip, gap junction protein 등의 원인유전자가 알려져 있다. 또한 백내장 lens와 정상 lens 간의 발현차이를 보기 위한 연구는 최근 들어 RT-PCR을 이용하여 human(Kantorow et al. 1998 IOVS)과 rat (Sun et al. 2000 Exp Eye Res)을 대상으로 시도되고 있다. rat을 대상으로 한 연구는 organ

culture를 이용한 것으로 vivo system이 아니라는 제약이 있으며 human을 이용한 경우는 단일 sample이 아닌 pooled samples로 개체간의 차이를 무시하고 있다. 또한 이들 연구뿐만 아니라 그 외의 연구에서도(Kantorow et al. 1998 Mol Vis) RT-PCR이라는 기술적 제한을 지니고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.

제 1절. 연구 개발 전략 및 방법

1. lr2 백내장 원인 유전자를 규명하기 위한 연구

positional cloning 방법으로 원인 유전자를 규명하기 위하여 genetic linkage 분석으로 좁혀진 genetic 위치인 D14Mit143과 D14Mit86 사이를 대표할 수 있는 transcript를 포함하는 상세한 physical map을 BAC clone(Halaf et al, 1996)을 이용하여 작성하였다.(Kim et al. 2003)

- 이 부위에 내재한 유전자들을 database로부터 확인하여 상응하는 mouse cDNA를 STS로 개발하고 physical map에 mapping.하였으며 고해상 물리지도작성에 활용하였다.

- 이들이 원인유전자일 가능성을 조사하기 위하여 genetic linkage mapping방법으로 후보유전자 명단에서 제외하기도 하였으며 physical mapping 위치를 고려하여 제외하였다.

- 여전히 후보유전자인 유전자에 대해서는 BalbC, STS, CXSD 세가지 strains의 안구로부터 뽑은 total RNA를 대상으로 RT-PCR 과 sequencing 방법으로 각 유전자의 전장 cDNA를 염기서열을 비교 조사하는 mutation analysis 방법으로 원인 유전자를 규명하였다.

2. 고해상 물리지도의 완성

DNA marker를 개발하여 마우스 BAC library를 Southern blot analysis로 screening하고 양성 clones의 STS content를 PCR로 결정하여 STSs의 중복을 바탕으로 sequence의 중복을 결정하여 map을 작성하였다. 지도가 완성될 때까지 수차례 반복하여 지도를 완성하였다. 본 물리지도는 Dietrich에 의해 보고된 유전적 지도 (1992)에 사용된 다형성마커를 물리지도에 mapping함으로써 유전적 지도와 물리적 지도의 통합을 이룬 고해상 지도이며 또한 여러 transcripts를 mapping함으로써 이 지역에 연쇄된 질환의 원인유전자 클로닝에 효과적으로 활용될 것이다.

3. 원인 유전자 *lr2* 분리를 위하여 새로운 유전자 발굴과 후보 유전자 탐색

human genome project에 의해 보고되어 있는 정보를 활용하였다.--human synteny 부위 sequence를 활용하여 인체유전체에 이미 mapping되어 있는 유전자 정보를 얻었으며 (NCBI gene map) 이를 바탕으로 mouse homolog를 EST로부터 발굴하여 마우스 눈에서 발현되는 RNA로부터 RT-PCR로 증폭, sequencing하여 mutation을 분석하였다.

이 때 이미 작성된 물리적 지도에 mapping되는지 확인 후 mutation 분석을 시행하였다.

또한 본 지도의 BAC clones을 마우스 genome center에 제공함으로써 mouse genome sequence를 제공받아 genomic sequence로부터 genscan이라는 알고리즘을 이용하여 cDNA sequence를 예측하였다. 이를 physical mapping 하였다.

4. *lr2* 분리 및 확인

Positional cloning 방법으로 이 지역의 고해상 BAC map을 작성하고 본 지도의 BAC clones을 마우스 genome center에 제공함으로써 mouse genome sequence를 제공받아 genomic sequence로부터 genscan이라는 알고리즘을 이용하여 cDNA sequence를 예측하였다. 이 중 선별된 cDNA에 대하여 안구의 RT-PCR을 시행하여 실제 존재 여부를 확인하였다. 또한 이에 대하여 Sequencing을 3개의 마우스 strain에 결정하고 비교하여 변이를 발견함으로써 원인 유전자 *lr2*를 cloning하는 쾌거를 이룰 수 있었다.

발현위치 결정을 위하여 full-length *lr2* cDNA를 cloning 후 green fluorescent protein과 fusion 하여 cell transfection 하고 cellular localization를 결정하였다.

4. *lr2* 백내장 마우스의 눈에서 발현되는 유전자 분리를 위한 연구

마우스의 눈은 태어나서 눈을 뜨는 2주 때까지 계속 발생학적인 변화를 하므로 시기적으로 발현되는 mRNA가 상이하다. 또한 백내장이 표현되는 시기는 5주 때 이므로 원인 유전자의 발현되는 정확한 시기가 불확실하다. 따라서 각 시기에 따라 mRNA 분리하고 이들을 총체적으로 모아 cDNA library를 제작하였으며 눈에서 발현되는 유전자들의 ID를 밝히고 cDNA microarray를 제작하는데 있어 중복된 유전자의 사용을 줄이기 위하여 cDNA clone들의 염기서열을 결정하였다.

5. mouse cDNA microarray 제작

마우스 eye cDNA library에서 redundant clones을 Southern hybridization 방법으로 제거하고 clone으로부터 insert를 증폭한 후 약 2000 점을 포함하는 chip을 제작하였다. 제작된 chip으로 1차연도에서 human chip을 이용하여 확립된 실험기법을 재확립하였으며 마우스 eye cDNA microarray chip을 활용하여 1 주령의 발현 양상을 조사한다.

제 2절 . 개발 내용 및 결과

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 결과
1차년도 ('00)	1. lr2 원인 유전자를 분리하기 위해 positional cloning 방법으로 이 지역의 physical map을 작성	<p>▶ 고해상 물리적지도의 작성</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 유전자 특이 혹은 clone-end Probes를 32P-dCTP로 표지하여 202752 BAC clone을 포함하는 11장의 filter를 (22cmX22cm)Southern Hybridization으로 screening. 2. 양성 clones을 PCR로 확인한 후 이들의 STS content를 PCR로 결정 3. 위의 과정을 모든 gap이 없어질 때 까지 반복하여 고해상 물리적 지도 작성. 4. mapping된 clones의 ends를 sequence하여 새로운 STS를 개발하여 mapping에 이용 <p>▶ 고해상 물리적지도의 작성 성과</p> <p>현재 D14Mit143과 D14Mit86 사이 지역의 고해상 물리적 지도는 1개의 gap만을 남겨놓고 있으며 rm 거리는 genetically 0.6 cM이나물리적으로 1.6 Mb로 추정됨. 이 지역에 현재 87 BAC clones에 62 marker들이 순서적으로 mapping 되어 있어 해상도는 23Kb/marker임.</p> <p>표1. 지도 요약 표2. 본 연구에서 개발된 새로운 clone-end STSs</p>
	2. mutation analysis로 원인 유전자를 검색	<p>▶ 후보유전자의 mapping과 mutation 분석</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. synteny를 이루고 있는 인체유전자 8p21 부위에 내재한 유전자 및 ESTs를 database 탐색으로 발굴하여 이들에 상응하는 mouse homolog의 sequence를 mouse EST 혹은 유전자에서 탐색하여 mouse 특이 STS를 개발. 2. 이들 중 일부 유전자들의 관련성을 조사하기 위하여 안구의 RNA로부터RT-PCR로 cDNA를 제조하여 sequencing으로 mutation이 없는 것을 확인 --후보유전자로부터 배제. <p>▶ 후보유전자의 mapping과 mutation 분석 성과</p> <p>후보유전자 대상인 13개의 유전자를 이 지역에 mapping하였으며 이 중 6개는 물리적 위치가 D14Mit143과 D14Mit86의 바깥쪽이므로 제외되었고 (표3) 나머지 유전자를 대상으로 후보 가능성이 높은 순서로 mutation 분석을 실시하여 2개의 유전자를 배제하였음</p>

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 결과
1차년도 (’00)	3. 눈에서 발현되는 유전자 3000종 이상을 포함하는 cDNA library를 제작	<p>▶cDNA library 제작</p> <p>1. Balb/C mouse를 1주령 7마리의 안구 14, 2주령 안구10, 3주령 10, 4 주령 6, 5 주령 4로부터 Trizol로 추출하여 총 약 1mg의 Total RNA를 취득</p> <p>2. oligo-dT column으로 mRNA만 추출한 후 Reverse transcriptase로 1st strand 와 2nd strand를 합성하여 cDNAs를 합성</p> <p>3. adapter linker를 붙인 후 pSport1 vector의 NotI/SalI site에 cloning하여 library 제작</p> <p>4. Normalization cDNA clones을 대상으로 cDNA pool을 probe 사용하여 colony hybridization 방법으로 abundant clones을 제거. 재차 반복하여 2회에 걸쳐 abundant clone을 제거하고 그 외 clone을 96 well format으로 저장.</p> <p>▶cDNA library 제작 성과</p> <p>RNA source : 1-5주령 Balb/C mouse의 안구</p> <p>Normalization : 2 회</p> <p>Library size : 2회 normalization 후 total 4032 clones</p> <p>Average insert size : 1 Kb</p> <p>Plate PCR 결과 : 70 % 성공률</p> <p>나머지 clones은 plasmid DNA를 추출하여 PCR 결과 모두 insert가 있었으므로 < 1% 정도가 insert가 없는 뛰어난 library임</p> <p>그림 1. Plate PCR 결과</p>
	4. 눈 발현 EST의 1000종 개발과 염기서열을 결정	<p>▶Sequencing</p> <p>96 well plate에 저장된 clones을 대상으로 vector의 M13F, M13 R primer로 colony PCR을 수행.</p> <p>PCR products를 각각 column purify한 후 Big Dye sequencingkit을 이용하여 Dye-terminator chemistry로 cycle sequencing 하여 automated sequencer로 염기서열을 결정.</p> <p>▶Sequencing 성과</p> <p>High throughput sequencing으로 염기서열을 결정함.</p> <p>표3</p>

구분	연구개발목표	연구개요 및 결과
1차년도 ('00)	5. cDNA microarray를 이용하는 실험 기법을 확립	<p>▶ cDNA microarray 실험방법 확립</p> <p>1. lr2 백내장 mouse와 정상 mouse의 눈에서 발현되는 유전자를 비교하기 위한 연구로 조직 확보--lr2 mouse 시기별로 0, 1, 2, 4 주령, Balb/C의 경우 1, 2, 3, 4 주령 눈</p> <p>2. cDNA microarray를 이용한 실험 기법을 human cDNA array (2048 cDNA clone이 집착된 chip)를 이용하여 RNA 양, hybridization condition, Scanning condition, 분석 방법을 확립함.</p> <p>3. human Brain과 Testis에서 발현되는 total RNA 각각 50 ug을 Cy3dCTP,와 Cy5dCTP로 reverse transcriptase를 이용하여 labeling한 것과 mRNA를 추출하여 각각 2ug씩을 같은 Cy3 와 Cy5로 labeling한 Probe를 같은 hybridization 조건에서 비교함.</p> <p>▶ cDNA microarray 실험방법 확립성과</p> <p>total RNA 50ug vs. mRNA 2ug probe의 경우 mRNA 쪽의 signal이 깨끗하기는 하나 mRNA를 추출하는 수고보다는 total RNA를 사용해도 유사한 결과를 얻을 수 있는 것으로 사려됨.</p> <p>Hybridization 조건은 25 ul 용액 (3X SSC, 2.5X Denhardt's, 0.08% SDS, 320ng polydA, 10ug Cot1 DNA, 4ug yeast tRNA), 65oC 18-24hr incubation하고 washing 과정을 거쳐 형과 발색을 scanner로 Image를 얻음.</p>

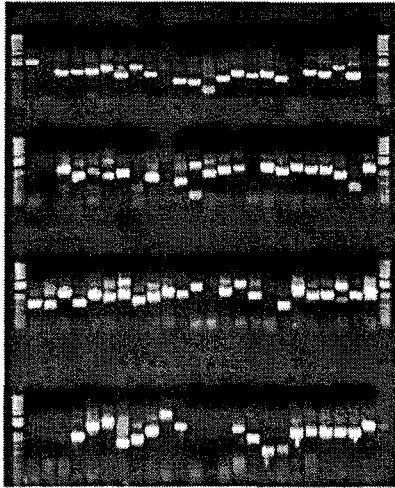
구분	연구개발목표	연구개발내용 및 결과
2차년도 (01)	1. 고해상 물리지도의 완성	<p>기존하는 contig의 end probes인 MB450H16/T7, MB457G1/SP6, 23-427K16/T7으로 RPCI-22, 23 library를 screening하여 새로운 BAC 분리 실행 STS content mapping vectorette PCR로 end rescue Southern blot screening을 실행하여 2 clones (23-18C11, 23-319K8)이 양성으로 반응하였음. 이 clones을 STS content mapping으로 이 지역에 mapping 하였으며 end-rescue하여 염기 서열을 결정하여 모두 repeat sequence로 조성됨을 밝힘.. 2개의 contig으로 구성된 고해상 물리지도가 완성되었음.</p>
	2. 백내장 <i>lr2</i> 원인유전자 분리를 위한 연구	<p>▶ human 8p21부위에 mapping되어 있는 genes의 mouse homologs를 EST database에서 확인하여 sequence를 확보 ▶ human 8p21부위에 mapping되어 있는 genes의 mouse homologs를 EST database에서 확인하여 sequence를 확보하고 gene-specific STS를 개발하여 mapping.--16유전자 중 8 유전자가 이 지역에 mapping 되었음. --표 4. list of genes ▶ mouse eye total RNA를 template로하여 RT-PCR로 cDNA fragment를 확보, cloning하여 염기서열 결정--STS, BalbC, CXSD 마우스에서 염기서열을 결정하고 비교 분석을 통하여 mutation 분석. ▶ 고해상지도에 mapping이 된 유전자중 D14Mit143과 D14Mit86 사이에 mapping된 유전자에 대하여 변이 분석을 하였음. -- mouse eye total RNA를 template로하여 RT-PCR로 cDNA fragment를 확보하고 direct sequencing으로 염기서열 결정--STS, BalbC, CXSD 마우스에서 염기서열을 결정하고 비교 분석을 통하여 mutation 분석. --표 5. polymorphisms found in genes</p>

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 결과
2차년도 (01)	<p>3. 고해상 물리지도의 BAC clone의 genomic sequences를 결정하여 cDNA를 예측하고 cloning하여 sequence 확인</p> <p>4. 백내장 마우스 CXSD와 parental strain인 STS, BalbC 모두에서 변이 분석을 실행</p>	<p>▶genomic sequences로부터 유전자 예측. 이 지역의 genomic sequences를 AECOM의 Dr. Kucherlapati와 공동연구를 통하여 결정하는 과정에서 2개의 clones, 324C9과 358B23의 genomic sequence로부터 Genscan program을 이용하여 유전자를 예측하였음. 이중 가능성 있는 순서로 후보유전자에 대한 변이분석을 실시하였음. 그림2. current Map과 요약</p> <p>▶이 과정을 통하여 <i>lr2</i> 유전자를 분리하였음. mutation을 RT-PCR로 cDNA에서 분석한 후 마우스 genomic DNA로 재증명하였음. 그림3. <i>lr2</i> 유전자의 변이 분석 결과</p> <p>▶ <i>lr2</i> 유전자의 발현을 MTN blot을 사용하여 Northern Analysis로 조사한 결과 900bp probe에 의하여 7.5 Kb, ~10Kb mRNA transcripts로 발현됨을 확인하였음. 그림4. Northern blot analysis of <i>lr2</i> 그림5. cDNA expression</p>
	<p>5. 2000종 mouse cDNA를 집착한 microarray 제작 및 hybridization condition 확립</p> <p>6. CXSD와 STS, BalbC 마우스의 시기별 안구로부터 추출한 RNAs를 probe로 사용하여 differential display</p>	<p>▶1152종의 clones으로부터 inserts를 PCR로 증폭한 후 precipitation으로 정제하여 농축한 후 slide에 duplicate으로 집적하였음.</p> <p>▶1주령 CXSD와 STS마우스의 RNA를 probe로 이용하여 hybridization하여 differential display를 실행하였음.</p> <p>그림6. Hybridization 결과와 분석도</p>

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 결과
3차년도 (02)	<p>lr2 기능 연구</p> <p>1. 2 종의 full-length cDNA cloning</p> <p>2. 세포내 발현 위치 동정을 위한 2개의 constucts 제작과 시험</p>	<p>▶lr2 단백질의 기능연구를 위하여</p> <p>1. full-length cDNA clone을 확보.</p> <p>2. GFP가 fuse된 constructs를 정상 lr2와 백내장 lr2유전자를 제작하여 세포내 발현을 동정.</p> <p>1. RT-PCR과 cDNA library search 등으로 full-length cDNA를 cloning하고 염기 서열을 결정하여 cDNA와 genomic DNA sequence를 조사하여 genomic organization을 규명함.</p> <p>2. 정상 lr2와 백내장 lr2 cDNA clones을 각각 cloning하고 GFP 표지자를 붙인 fusion constructs를 제작한 후 LEP cell line에 transfection 하여 GFP를 이용한 발현위치를 동정하고 western blot analysis로 lr2 단백질의 MW를 측정함.</p>
	<p>3. 항체 제작을 위한 2종의 항원 과발현 constructs 제작과 1 종의 항체 제작</p> <p>4. 안구조직에서 lr2 발현 동정</p>	<p>3.단백질의 기능연구를 위해 필수적인 항체제작을 위하여 2가지 항원을 과발현하고 정제하여 1종의 항체를 제작.</p> <p>4. STS 마우스와 CXSD마우스의 안구에서 lr2 발현의 차이를 분석</p> <p>3. 항체제작을 위하여 pET plasmid를 이용한 consturcts를 제작하여 과발현을 검색하고 과발현단백질을 정제하여 항체제작을 도모함.</p> <p>4. mRNA 발현을 Northern blot analysis로 조사하고 제작된 항체로 endogenous 단백질의 발현 위치와 MW를 재 측정하여 정상안구와 백내장안구 사이의 차이점을 조사함.</p>

그림1. Plate PCR 에 (NBE#8)

Clone insert size 결정



size	clone ID	size	clone ID	size	clone ID	size
0.45kb	9C2	0.65kb	9E 8	1kb	11A4	0.8kb
1kb	9C3	0.6kb	9E 11	0.9kb	11A8	0.6kb
1kb	9C4	0.65kb	9F1	0.6kb	11A6	1.45kb
1.6kb	9C6	1kb	9F3	1.2kb	11A5	1.6kb
0.9kb	9C8	0.35kb	9F8	1.4kb	11A9	1kb
0.6kb	9C9	1.65kb	9F8	0.4kb	11A10	1.65kb
0.65kb	9C10	1.7kb	9F9	1.3kb	11A11	1kb
0.45kb	9C12	0.4kb	9F10	0.7kb	11B2	1kb
1kb	9D1	1kb	9F11	0.7kb	11B3	0.6kb
1.5kb	9D2	1.7kb	9F12	1.3kb	11B4	1.2kb
0.6kb	9D5	1kb	9G2	0.5kb	11B6	1.3kb
0.7kb	9D7	0.7kb	9G3	0.6kb	11B7	1kb
0.55kb	9D8	1.65kb	9G4	2kb	11B8	0.85kb
0.65kb	9D9	1.75kb	9G7	0.6kb	11B9	1.6kb
1kb	9D10	1.72kb	9H0	1.5kb	11B10	0.65kb
0.6kb	9D11	1.7kb	9H4	0.4kb	11B11	1.3kb
0.75kb	9D12	1.6kb	9H5	1.6kb	11B12	1kb
0.5kb	9E 1	1.6kb	9H6	1.6kb	11C1	0.4kb
0.6kb	9E 2	1.65kb	9H7	0.6kb	11C3	1kb
0.65kb	9E 3	0.5kb	9H8	1.55kb	11C4	0.65kb
0.5kb	9E 4	1kb	9H10	1.65kb	11C7	1kb
0.6kb	9E 6	0.9kb	11A1	0.9kb	11C10	0.4kb
0.55kb	9E 6	1.6kb	11A2	1kb		
0.6kb	9E 7	1.5kb	11A3	1.25kb		

⚡ 1.current status of the physical map

Genetic distance:D14Mit 143-D14Mit 39(0.6cM)

Physical distance Estimate: >1.6Mb

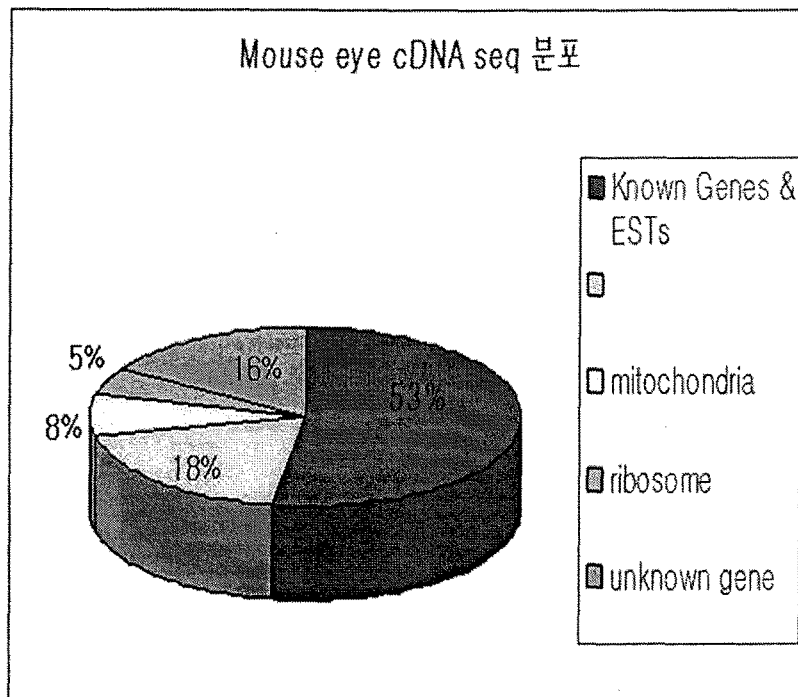
Total clones	95
YACs	20
BACs	75
Total markers	62
Genetic	11
Gene	13
Clone-End	38
Marker Resolution	23Kb/marker

표 2. 본연구에서 개발된 clone-end STS

Marker ID	Sequence(5'→3')	
	Fwd	Rvs
MB816G8/T7	GCCGCTACATGTTACCCAC	AAAGAAACTCGAAGGGCTCA
MB328C9/SP6	TCAGGACCCTGTGTCATCT	ATGCATTACTCTGGGGCAAA
MB451A20/SP6	CCAGCAGAGACAACCTTGGAA	ACACTGCCATCCTTCCTCAT
MB513H6/SP6	CTGTTCGCATACCCTAGCCAT	GGTAGCAAGCGCAAAGAAAT
MB442P23/SP6	TTCCAGGGAAAGGAAAATCTCT	GGTGATGAAGCCAGGTCATA
MB450H16/T7	TGCAGATGATATCCC AATCG	AGAGGCATGGATGAGCTGTT
MB451A20/T7	GGACTTCTGAGCCATCCCTT	AGAGAITCAATTTTGCACCGA
MB328C9/T7	AGCAGCACGACGCATACTTT	ACGTGACCTGAC AATGAGCA
MB309K13/T7	CCCTTCATGTTCTTCCTCA	TGCCACCAGGACATTTGTTA
MB513H6/T7	GATTTGCGGACTGTGTCTT	TGCCACCAGGACATTTGTTA
MB309K13/SP6	TGAATTGGGCAACTGTGAGA	TTTGCATACTGGCTGTGGTC
MB314C14/T7	CACCTCAGCAGGAACCATCA	AGGCTTGGCTACAACCTGAA
MB474P20/T7	GCAAAAGGAGAACTGAGGCA	AITCTATGCACTGGATCGGC
MB387O19/SP6	GGGACTGTGTGAGTCAGGGT	GAGAGGCAGACAACGGAAAG
MB425M7/SP6	CCATCAGGGCTGCTGTTTAT	TCTGGAGCACATTCATAGCG
MB425O7/SP6	CCATCAGGGCTGCTGTTTAT	TCTGGAGCACATTCATAGCG
MB474P2/SP6	GC AATCCTGGTGGAAAATG	ATGGCTGGTCTTGTCCAAAG
MB486H20/T7	TGCATTGGAATATGGAGCAG	GAGACAAGCATACGCCCATC
MB488K16/SP6	AAGGTGTTGTCTCTCTGATCCA	TCTCCATTCTCCCTTACCTGA
MB290D10/T7	AAGACTCAGAGCCCTTGCTG	AGCGAACGTTTCTTTTGGTG
MB450H16/SP6	TTCCACCTCACACCAGTCAG	CCAGGAGAGGTATGTCTGGA
MB450H16/T7	CACAGGGATTACCCAATGCT	AGGGAACTCTTGTGGCCTCT
MB457G1/T7	GTTGTTGCTCTGATCTCACCTA	AAATCTGTAAGGTTTGCATGC
MB457G1/SP6	GGCTGTTGTTCTAATTTCCATGA	CCACAAAGCAAGTCTCCACA
MB389E10/T7	GACAGTCAGAAAAGGCTTCCA	GGATGGGGACTTTTGGTAT
MB389E10/SP6	TCTTG AAGGGCTGCTAAGGA	GGCCAGGTTTGATTCCTA
MB356G1/T7	CCTTTGTCTCTGCACGATCA	CTTGGGATCTTCCCTTTTC
MB356G1/SP6	TTGTGAATGCTCTACCCATCC	ATGCAGGC AAAACCCTAATG
MB353G16/T7	ACAGCAGATGCTGGTGAGG	TTCTTACCGGTTGGGACATC
23-431P12/T7	AACCAGGAACGGAGAAGAAAG	GTTTGGTGGTTTTCGGGTT
23-431P12/SP6	TTCC TTGCTGTGGTTGCC	CCTCTCGGCATGCTAAA
23-413P13/T7	CACAGGGCCACCTAAACATT	GGGGATCCTGATGTTGTTCA
23-413P13/SP6	TGAATCAAGGGG AATCAGAG	AGTCAAGGACACCAGGAACC
23-222L18/T7	CATCTCTCCCTCACACGGTA	TGGGCAGAATCAAAACAACA
23-222L18/SP6	TGTGATGCCAGTGTCTCGAT	AACTCCAGGTTTCCCTGTT
23-358B23/T7	TGGGGATAAGAGTTCGTTCCG	CTCCCTGGCAATTAGTCAA
23-427K16/T7	GTGTTCCACC AAGCATCCACA	GCTCAAAGGGCACTGTTTTC
23-427K16/SP6	GTCCAAAGAGGCCCTGGTGA	ATGGACTCTGCCCTAGGTT
23-216C22/T7	TGGTG ACCATGCGAGTATGT	GTTGCTAGCTAATTGCCCCA
23-216C22/SP6	TCTTCTCTCCCTCTCCTCC	GTGCTGGGACACAGTGTAA
23-264D24/SP6	CCAGTGGTTTTCCCAATTA	CACTGGCTCCCTGCAGAT

표3. SEQUENCING 결과

Known gene (362)	Crystallin (80, 16%)	gamma-II M.musculus gamma-B-crystallin gene gamma-1, gamma-2, gamma-3 Mouse lens alpha-A-crystallin Mus musculus beta-B1 crystallin Crya2, Cryba2, Cryba4, Crybb3, Cryga, Crygc, Crygd, Cryge, Crygs crygs Cryba1 gene, crybb3 gene, cryba4 gene
	Mitochondria DNA (34, 6%)	
	Ribosomal (22)	Rpl13, Rpl13a, rpL18, Rpl23, Rpl26 Rpl28, Rps15, Rps19, RPS26, Uba52
	Gene (226)	
Unknown gene (69)	Unknown EST (69)	



☒ 4. List of Genes

Gene name	Primer sequence	Contig	Mutation analysis
<i>Adam</i>	F TGCCTGAAAGTCAAGCCTG	No	—
	R TGATGACTACCGACTACCAGAA		
<i>Egr3</i>	F CCCTTCTTTCCCTCCAG	No	—
	R GGTGTGAAAGGTGGAAAT		
<i>Srev9</i>	F TCTGAGAGGGCCACAGAGA	Yes	Negative
	R CACCATCGGTGTTTTCTTG		
<i>Lor2</i>	F ATGGCTCATGCCTGTAATCC	No	—
	R TTCCTTCCTCCTTCCTTCC		
<i>Nkx3-1</i>	F CCCTTCTTTCCCTTCCAGT	Yes	Negative
	R CAAACTTGCCTGGCTCTCTC		
<i>Bnip31</i>	F CAAACTCTGTTGGGGCATT	Yes	Negative
	R AATGATGCAGGTGACTGGTG		
<i>Atrc2</i>	F CCTAGGTGGCTGGGGAAATA	No	—
	R CTGGCCGTTTAAGAAAGCTG		
<i>Stc</i>	F GGTTTTCGGCTGAGTACTGG	Yes	Negative
	R GGAATTCACCAAAGGCTTCA		
<i>LOC51312</i>	F TCTGTCTTGCGGATCTTCAC	No	—
	R CTCCGTGAAGGTCACTGTT		
<i>Lox12</i>	F TGGCCAAGTATGATGGAGAT	No	—
	R AAGTGGGGTTGGATCTTCT		
<i>LAP70</i>	F CCTTGGGGTTGTTTGAGTG	Yes	Negative
	R TCTGAACAGTGGGACGACAG		
<i>Dtgn1</i>	F CCGAGTGCTGGGATTAAGG	No	—
	R GGAAAAATGCCCAAGTTGTC		
<i>PPP2R2A</i>	F TGAAGGCGTTCCTGTGTTT	Yes	Excluded
	R CATGGAGAAAGCTGTGTGGA		
<i>Tgfbli4</i>	F TAGGAAGGACAAGCCACACC	No	—
	R GTGACACAACGGTGACGGT		
<i>mAdam28</i>	F GCATGTTCTGGTTTGTGCT	Yes	Negative
	R CACATCAATCCCCTCCAAA		
<i>mdecys</i>	F TTTTCTGGCTCGTGGGAAT	Yes	Negative
	R CAAAACCAATGAATGAAG		

5. Polymorphisms found in genes

Decysin

cDNA fragment	Primer sequence	Nucleotide position	DB (AJ242912) /CXSD/STS	A.A change
1 - 510	F: GCCACTGGAGAGACCATAGC R: GAGGCTTTATTTGATATCTC	41	T/C/C	None
		44, 45	TC/GA/GA	None
		121	A/G/G	Asp→Gly
		152	C/T/T	None
401 - 930	F: CTATGAAGGCCACATCCAAA R: GGATCCTTTTCCCCAGGTTA	509	T/C/C	None
808 - 1240	F: AAGTGTCTTTGGTGGGCAT R: CACCTTGCATTTCTAGATGA		none	none
1088 - 1490	F: CCACGCCCTTGGTATGAA R: GAGGCAGGGTCTGGACTTCT		none	none

Adam28

cDNA fragment	Primer sequence	Nucleotide position	DB (AJ242912) /CXSD/STS	A.A change
	F: AATTCGGCACGAGCTCGTGC R: CCTTGACTGATGATTCCCCG		none	none
341 - 774	F: AAACAAGGTCACCACAAGCC R: AATTGGCCATCTCAAGCACT		none	none
624 - 1015	F: CTGCCACCAGGTTGATTA R: AGGTGAACACATCGACGACA	844	G/C/C	None
871 - 1280	F: CAACACCACCCTGGAAAAC R: GATATCTGATGGCAATGGGC	1001	G/T/T	None
		1004	G/A/A	None
1257 - 1596	F: GAGCAGTCACTAAGGTTCCA R: ACATTTGCCCTTCAAGCAGT	1352	G/C/C	Glu→Asp
1391 - 1779	F: AAAGCAGGTTTCCAGTGTGC R: CTGATCCGCCTTACAGAAC		none	none
1633 - 2098	F: CAGGAACCAAGGTTGCAAAT R: ACTGCTAGGGGGAAAAGCAC	1978	C/G/G	Ala→Gly
2001 - 2429	F: TGTCAGTGCAAGGAAGGAAG R: CAAAATTTTCGAGGCTTCCAC	2172	C/T/T	Pro→Ser

Æ6. Putative genes identified by GENESCAN

•genes (RPCI23-324C9)

Gene number	DNA size	Protein size	Homology
1	1719 bp	572 a.a	gag gene
2	987 bp	328 a.a	Integrase, RT
3	222 bp	73 a.a	No similarity
4	57 bp	18 a.a	.
5	228 bp	75 a.a	.
6	216 bp	71 a.a	.
7	492 bp	163 a.a	No similarity
8	885 bp	294 a.a	SH3 domain contain, pol RT
9	732 bp	243 a.a	No similarity
10	2823 bp	941 a.a	Similar to DOCK180

•genes (RPCI23-358B23)

Gene number	DNA size	Protein size	Homology
1	1386 bp	462a.a	Similar to DOCK180
2	678 bp	225a.a	Similar to DOCK180
3	783 bp	260 a.a	Similar to DOCK180
4	1062 bp	354a.a	Similar to DOCK180
5	615 bp	204 a.a	.
6	3357 bp	1118 a.a	.
7	1128 bp	375 a.a	Unknown
8	393 bp	130 a.a	GnRH-GAP precursor
9	345 bp	114 a.a	Similar to hypothetical protein
10	1272 bp	424 a.a	REVERSE TRANSCRIPTASE

그림 3. Genotype of offspring of CXSDxSTS mating

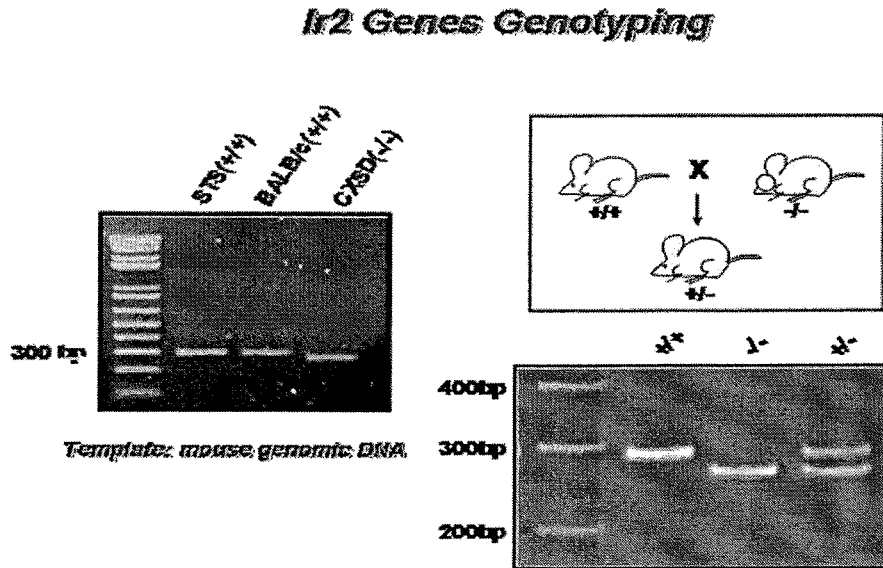


Figure. Genotype of *Ir2* mice. 27bp deletion in genomic DNAs of mice affected with *Ir2* gene mutation.

그림 4.

Figure 4. Identification of transcripts by Northern blot analysis

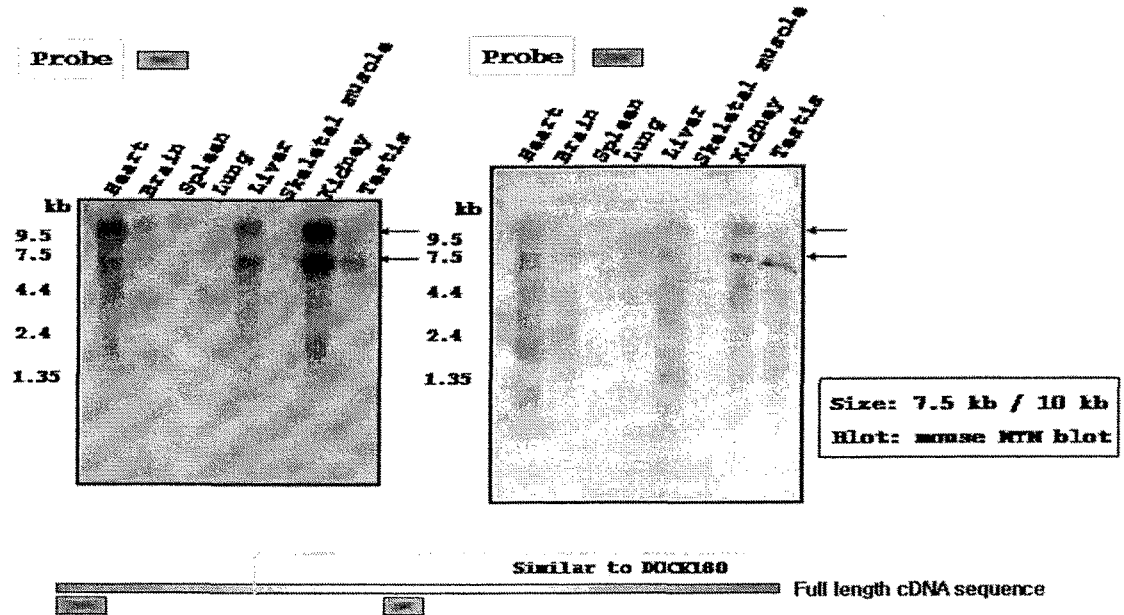
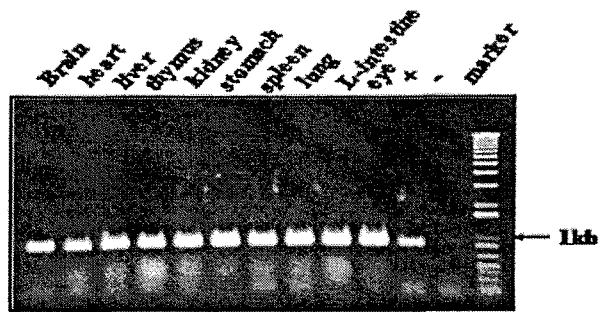


그림 5.

cDNA level 에서 *Ir2* expression 여부

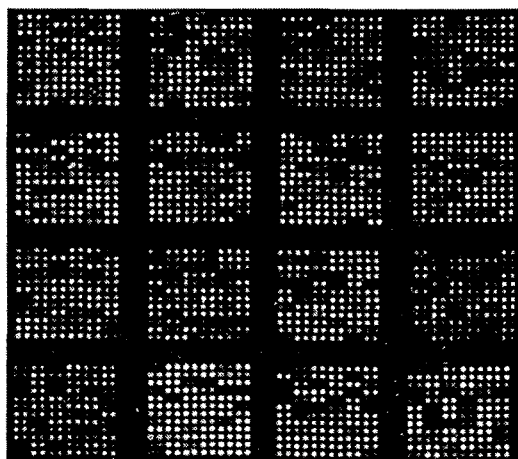


Primer : GeneL3 Fwd+Kvs
PCR cycle: 35 times

sscDNA template: Balb/c
+ : Ir2 clone
- : D.W

그림 6.

Differential expression of 1 wk old eye
using cDNA microarray

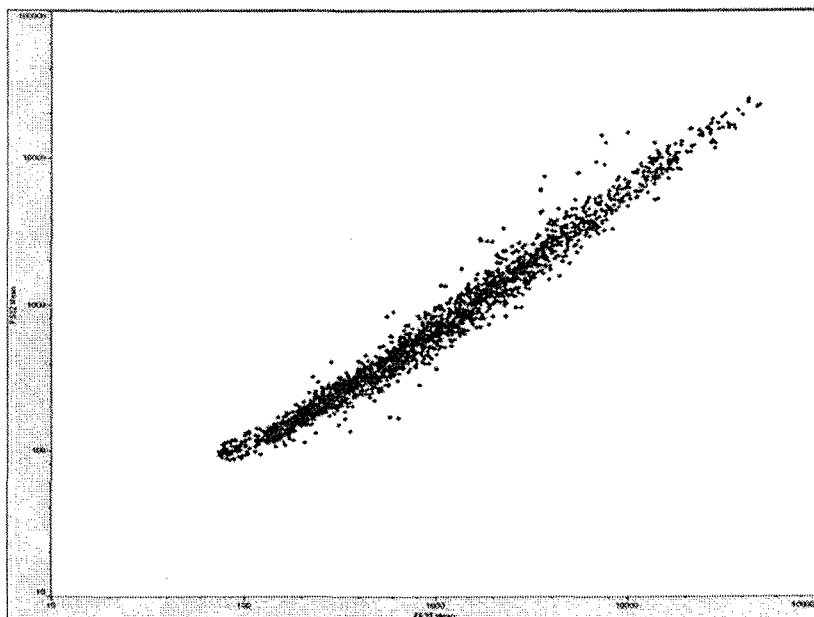


2834 spots/1152 clone

Cy3 :CXSB

Cy5 :SIS

Probe : 50 ug of total RNA
from 1 wk old eye



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

번호	세부연구개발목표 (선정시 계획서상의 연구목표)	달성내용	달성도(%)
1	CXSD 마우스의 유전적 연쇄지역의 고해상 물리적지도 작성	<p>CXSD 백내장 마우스는 원인인 Ir2 locus 가 마우스 염색체14의 D14Mit28 부위에 연쇄되어 있다. 이 지역을 대상으로 YAC 20, BAC 86 clones을 활용하여 genetic marker 11, gene marker 14, clone-end marker 39개로 총 64개의 마커로 고해상 지도를 작성하였다.</p> <p>이는 23Kb/marker의 해상도를 갖는 지도로 positional cloning 및 이 지역의 genomic organization을 이해하는데 유용한 map이다.</p> <p>이 지도 작성을 위하여 53개의 마커가 개발되었고 BAC clones은 유전자 탐색, genome sequencing에 활용되었다.</p>	100
2	Ir2 locus의 유전자 탐색 및 백내장 원인유전자 Ir2 분리	<p>물리적 지도 작성과 동시에 이 지역의 유전자를 탐색하였다. 3가지 방법을 활용하였는바 첫째는 기존에 마우스에서 이 지역에 mapping되는 것으로 알려진 유전자의 존재 여부, human synteny에 있는 유전자들의 존재여부, 마우스 genome sequence를 대상으로 cDNA prediction을 이용한 유전자 탐색 등의 방법을 활용하여 이 지역에 14개의 유전자를 mapping 하였다.</p> <p>이들을 대상으로 RT-PCR, sequencing방법으로 mutation analysis를 실시하여 4개의 유전자를 exclude하고 원인유전자 Ir2를 분리하여 변이가 coding 부위의 27bp deletion임을 결정하였다. wildtype, heterozygote, homozygote에서 genotype pattern을 확인하였다.</p>	100

3	eye 발현 유전자의 cDNA library 제작과 chip을 이용한 발현양상	BalbC 마우스의 안구에서 mRNA를 추출하여 7000 종 이상의 clones 으로 구성된 cDNA library를 제작하였다. 이 library를 2회 normalize 하여 3000종 정도의 clones으로 구성된 library를 제작하였으며 평균 insert가 약 1Kb 정도임을 동정하였다. 이것은 eye-specific cDNA library로서 안질환연구에 유용하게 활용될 것이다. 이 중 500 종에 대하여 염기서열을 결정하여 약간의 중복성이 있으며 1152 종을 이용하여 microarray chip을 제작하였다. 이를 활용하여 1주령 STS와 CXSD 마우스 안구의 mRNA 발현을 조사한 결과 발현 양상의 차이를 발견할 수 없었다.	100
4	lr2 유전자의 기능을 이해하기 위하여 수정체 상피세포에서의 발현연구	lr2 유전자를 RT-PCR로 변이 분석과 함께 전장의 cDNA를 cloning하였다. 총 coding 길이가 5.6 Kb 이며 transcript 자체는 10Kb 가 되는 대형 유전자이며 1868 AA를 encoding하고 있어 200Kd의 MW로 추정된다. 이 유전자는 kidney, heart, brain, spleen 등의 조직에서 발현되는 것을 Northern blot으로 동정하였으며 안구에서의 발현 여부는 RT-PCR로 결정하였다. 이 유전자의 세포내 발현위치를 조사하기 위하여 green fluorescent protein과 fusion gene을 정상1종과 변이1종을 제작하여 발현 위치를 조사한 결과 세포질에 발현되며 과발현시 괴사를 유도하는 것으로 조사되었다. 이 유전자는 cytokinesis 1과 높은 homology를 가진 유전자 이며 SH3 domain을 포함하고 있어 protein-protein interaction을 할 것으로 예상된다. 장차 심도 깊은 기능 연구를 통하여 백내장의 기전제시가 가능할 것이다.	100

2. 정성적 연구성과(대표적 성공사례)

1. CXSD 백내장 마우스의 원인유전자 lr2 분리

백내장의 발병기작을 조사하기 위한 본 연구의 실험모델인 CXSD 마우스는 백내장이 상염색체 열성 유전하는 마우스로서 특이하게도 백내장과 함께 lens rupture가 동반하는 동물이다. 본 연구에서는 CXSD 원인 유전자를 분리하고자 Positional cloning이라는 접근 방법을 사용하였다. 마우스 염색체 14의 D14Mit27 주변 0.6 cM 지역의 linkage로부터 YAC, BAC을 이용한 physical mapping, HGP data와 tool을 100% 활용하여 이 지역에 내재하는 유전자를 결정하였으며 이들 유전자를 대상으로 mutation analysis를 실시한 결과 원인유전자 lr2를 분리하였다.

lr2 유전자는 27bp (inframe 9AA) deletion으로 인하여 백내장이 발병되는 것으로 조사되었다. 이 유전자는 10Kb transcript를 발현하며 안구를 비롯한 여러 조직에서 발현되고 1863AA로 약 200KD의 유전자로 dedicator of cytokinesis 1 과 매우 높은 유사성을 지니고 있다. 현재까지 알려진 백내장의 원인유전자들로는 crystallins과 같은 lens의 구조단백질(Chang et al., 1999; Graw et al., 2001; Bu et al., 2002), gap junction protein (Gong et al., 1997; Shiels et al., 1999), Mp26 같은 세포막에 있거나 주변세포와의 communication 단백질, 또는 transcription factors들이 알려져 있다. dedicator of cytokinesis 1 과 유사성이 매우 높은 lr2는 지금까지 알려진 것과는 다른 기전으로 백내장을 유발할 가능성이 매우 높다. 이 유전자에 대한 기능 연구는 장차 새로운 백내장 발병 기전을 제시할 수 있을 것이다.

2. BalbC 안구 cDNA library 제작 및 partial characterization

총체적 발현연구를 위한 재료로 마우스 안구의 cDNA library가 2회에 걸친 normalization을 통하여 약 3000 종의 cDNA clones으로 구성, 제작되었다. 이 clones들은 평균 약 1.0 Kb inserts를 지니고 있으며 본 연구에서는 제한적으로 사용되었으나 장차 마우스를 이용한 안질환 연구에 긴요하게 활용될 것이다.

3. 기타 계획하지 않은 연구 성과

마우스 physical map을 C57BL6 BAC을 작성함으로써 genome center에서 수행하고 있는 마우스 sequencing project에 map을 제공할 수 있었으며 새로운 유전자의 발굴로 유전자의 기능과 이 기능의 defect가 유발하는 질환을 연결지을 수 있었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 기술적 효과

지금까지 알려진 백내장 loci는 인간에서 약 33개, 마우스에서는 30개가 넘으나 50%의 유전자도 밝혀지지 않은 상태로 아직도 원인유전자 규명이 활발히 이루어져야 하는 분야이다. 본 연구를 통하여 유전질환의 원인유전자를 positional cloning이라는 기법과 반대하게 축적되어 있는 정보를 database를 활용하여 발굴해 내었다. 이 같은 방법은 외국의 경우 사례가 많으나 우리나라에서는 처음으로 활용된 것으로 장차 새로운 유전자의 발굴에 성공적으로 사용될 수 있다.

또한 본 연구를 통하여 밝혀진 백내장 원인 유전자인 *lr2*는 지금까지 알려진 백내장 유전자들과는 다른 새로운 기전을 제시할 것으로 사료되며 이는 백내장의 원인을 이해하는데 우리의 시야를 넓힐 것으로 생각된다.

lr2 유전자를 활용하여 이와 상호작용하는 유전자를 확인 분리할 수 있을 것으로 사료되며 이는 또 다른 백내장의 원인 유전자일 가능성이 있어 장차 계속 연구가 진행되어야 할 것이다.

앞으로 더욱 심도 깊게 *lr2*의 기능연구가 시행된다면 이를 바탕으로 백내장 치료제 개발 혹은 예방약 개발에 직 간접으로 활용될 것이다.

2. 경제적 효과

본 연구과제는 직접적인 경제 산업적 상승효과는 기대할 수 없으나 연구과제의 성공적인 수행으로 백내장 발병기전을 규명함으로써 장차 예방 치료제 개발에 필수적인 기초 지식을 제공하였다고 사려 된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과정 중, database를 활용하여 마우스 genome의 염기서열 정보를 수집하였으며 인간과 마우스에서 보고된 백내장 좌위와 관련 유전자에 대한 정보를 수집하였다. 염기서열을 바탕으로 genescan이라는 방법으로 유전자를 추정하는 알고리즘을 활용하여 새로운 유전자를 추측하였으며 이를 RT-PCR 이라는 방법으로 확인하였다.

lr2 locus와 연쇄지역에 있는 마우스 염색체 14의 중간부위에 내재되어 있는 모든 유전자들에 대한 정보와 특히 마우스 synteny 관계의 인간 유전자들에 대한 정보를 수집하였으며 이 정보는 백내장 원인유전자를 규명 분리하는데 중요한 정보가 되었다.

제 7 장 참고문헌

Bu L, Yan S, Jin M, Jin Y, Yu C, Xiao S, Xie Q, Hu L, Xie Y, Solitang Y, Liu J, Zhao G, Kong X. 2002 The gamma S-crystallin gene is mutated in autosomal recessive cataract in mouse. *Genomics*. 80(1):38-44.

Chang, B., Hawes, N.L., Roderick, T.H., Smith, R.S., Heckenlively, J.R., Horwitz, J., and Davisson, M.T. 1999. Identification of a missense mutation in the alphaA-crystallin gene of the *lop18* mouse. *Mol. Vis.* 5:21.

Dietrich, W.F., Miller, J., Steen, R., Merchant, Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M.J., Ingalls, K.A., O'Connor, T.J., Evans, C.A., DeAngelis, M.M., Levinson, D.M., Kruglyak, L., Goodman, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Hawkins, T.L., Stein, L., Page, D.C., and Lander, E.S. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380: 149 -152

Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N.M., Horwitz, J., and Gilula, N.B. 1997. Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 91: 833 - 843.

Graw J, Loster J, Soewarto D, Fuchs H, Meyer B, Reis A, Wolf E, Balling R, de Angelis MH. 2001. Characterization of a new, dominant V124E mutation in the mouse alphaA-crystallin-encoding gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(12):2909-15

Graw J, Loster J, Soewarto D, Fuchs H, Meyer B, Reis A, Wolf E, Balling R, Hrabe de Angelis M. 2001. Characterization of a mutation in the lens-specific MP70 encoding gene of the mouse leading to a dominant cataract. *Exp Eye Res.* 73(6):867-76. Graw J, Loster J, Soewarto D, Fuchs H, Reis A, Wolf E, Balling R, de Angelis MH. 2002b. V76D mutation in a conserved gD-crystallin region leads to dominant cataracts in mice. *Mamm Genome.* 13(8):452-5

Haldi ML, Strickland C, Lim P, VanBerkel V, Chen X, Noya D, Korenberg JR, Husain Z, Miller J, Lander ES. 1996. A comprehensive large-insert yeast artificial chromosome library for physical mapping of the mouse genome. *Mamm Genome.* Oct;7(10):767-9.

MGD. Mouse Genome Database, Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory,

Bar Harbor, Maine. (URL: <http://www.informatics.jax.org/searches/linkmap.cgi> and <http://www.informatics.jax.org/reports/mitmap/12555.2.shtml>)

NCBI GenBank, Mouse to Human Homology region Map, Chromosome 14.
(URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Homology/mouse14.html>)

Shiels, A., Mackay, D., Ionides, A., Berry, V., Moore, A., and Bhattacharya, S. 1998
A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 526 - 532.

Song, C-W., Okumoto, M., Mori, N., Kim, J-S., Han, S-S., and Esaki, K. 1997b.
Mapping of new recessive cataract gene (lr2) in the mouse. *Mamm. Genome* 8: 927-931.

Song, C-W., Okumoto, M., Mori, N., Yamate, J., Sakuma, S., Kim, J-S., Han, S-S., Hilgers, J. and Esaki, K. 1997a. A new hereditary cataract mouse with lens rupture
Lab. Anim. 31: 248-253

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서				
사업명	중사업명	국책 연구 개발 사업		
	세부사업명	생명현상 및 기능연구사업		
과제명	백내장 생쥐를 이용한 백내장 발병 기전 연구			
연구기관	가톨릭대학교	연구책임자	김성주	
총연구기간	2000년. 8월. 1일. ~ 2003 년. 5월. 31일. (34개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	155,000,000			
기술분야				
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용() 8. 기타()
	5. 선행 및 기초연구(√)	6. 기타목적활용(교육,연구)()	7. 활용중단(미활용)()	
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2003 년 7 월 30 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 김 성 주 연구기관장 : 가톨릭대학교 총장</p>				
<p>과학기술부장관 귀하</p>				



[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

본 연구의 목표는 백내장 발생 마우스 CXSD의 발병 기전을 규명하는 것이다.

이 목표를 달성하기 위하여 본 연구과제는

1. 백내장 원인유전자 lr2를 분리하기 위하여 연쇄지역의 genomic organization을 동정하기 위하여 마우스 YAC과 BAC 클론을 이용하고 genetic 마커와 새로이 개발된 STS physical 마커를 활용하여 physical map을 작성하였다.
2. 연쇄지역을 대상으로 이 지역에 내재된 유전자를 database와 synteny 정보를 활용하여 mapping하며 동시에 이 지역의 염기서열을 결정하고 이를 바탕으로 genscan이라는 알고리즘을 사용하여 CXSD의 원인유전자 lr2 를 positional cloning 방법으로 분리하였다.
3. 또한 백내장 마우스와 정상 마우스의 눈에서 발현되는 유전자 양상을 cDNA microarray technology로 동정하고자 안구에서 발현되는 유전자로 cDNA library를 제작하였으며 이로 cDNA chip을 제작하여 발현 비교 연구를 실행하였다.
4. 유전자들의 기능을 조사하고 상호 작용을 동정하여 이들이 백내장 발병에 기여하는 바를 규명하고자 하였다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 노하우 내역

- Positional cloning 기법
- 물리적 지도 작성 기법
- DNA 재조합 기법
- PCR 기법
- 다양한 database 활용 기법

나. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
Korean Journal of Lab. Ani. Sci	유전성 백내장 마우스 CXSD의 가령에 따른 기초연구	2001년 6월 1일	17(2)	한국실험동물학회	한국	부
Korean Journal of Lab. Ani. Sci	백내장 마우스의 유전적 연쇄지역 D14Mit86의 physical map 과 candidate 유전자 탐색	2003년 3월 1일		한국실험동물학회	한국	부
계: 2 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월 일	호	발행 기관	국명
International Mouse Genome Conference (IMGC) 2000	Physical Mapping of the Region Containing The New Recessive Cataract Gene (<i>Ir2</i>) on Mouse Chromosome 14	2000년 10월 11일	14	IMGC	일본
International Mouse Genome Conference (IMGC) 2000	Genetic Analysis of Autosomal Recessive Cataract Gene, <i>Ir2</i> , using Intersubspecific F2 mice: Fine Mapping and Exclusion of Several Candidate Genes.	2000년 10월 11일	14	IMGC	일본
International Mouse Genome Conference (IMGC) 2001	Toward the identification of the New Recessive Cataract Gene (<i>Ir2</i>) on Mouse Chromosome 14 by positional cloning	2001년 11월 3일	15	IMGC	Scotland
KSMBMB	Genomic Organization of the Region Encompassing Cataract Causing Gene, <i>Ir2</i> locus, on Mouse Chromosome 14.	2001년		KSMB MB	한국
KSMBMB	Mutation analysis and exclusion of several candidate genes of cataract causing <i>Ir2</i> gene	2001년		KSMB MB	한국
Genome sequencing and biology	Toward the identification of the New Recessive Cataract Gene (<i>Ir2</i>) on Mouse Chromosome 14 by positional cloning	2002년		CSHL	미국
한국유전체학회	Identification of the new recessive cataract gene <i>Ir2</i> on mouse chromosome 14 by positional cloning	2002년 8월		KGC	한국
한국유전체학회	Gene identification of the Myotonia mouse derived from ENU mutagenesis	2002년 8월		KGC	한국
한국생화학학회	An ENU derived Myotonia was caused by a mutation in the Muscle Chloride Channel gene, <i>CLCN1</i> .	2002년 10월	59	한국생 화학회	한국
한국생화학학회	Construction of mouse eye specific cDNA microarray	2002년 10월	59	한국생 화학회	한국
계: 10건수					

3. 연구성과

가. CXSD 백내장 마우스의 원인유전자 lr2 분리

백내장의 발병기작을 조사하기 위한 본 연구의 실험모델인 CXSD 마우스는 백내장이 상염색체 열성 유전하는 마우스로서 특이하게도 백내장과 함께 lens rupture가 동반하는 동물이다. 본 연구에서는 CXSD 원인 유전자를 분리하고자 Positional cloning이라는 접근 방법을 사용하였다. 마우스 염색체 14의 D14Mit27 주변 0.6 cM 지역의 linkage로부터 YAC, BAC을 이용한 physical mapping, HGP data와 tool을 100% 활용하여 이 지역에 내재하는 유전자를 결정하였으며 이들 유전자를 대상으로 mutation analysis를 실시한 결과 원인유전자 lr2를 분리하였다.

lr2 유전자는 27bp (inframe 9AA) deletion으로 인하여 백내장이 발병되는 것으로 조사되었다. 이 유전자는 10Kb transcript를 발현하며 안구를 비롯한 여러 조직에서 발현되고 1863AA로 약 200KD의 유전자로 dedicator of cytokinesis 1 과 매우 높은 유사성을 지니고 있다. 현재까지 알려진 백내장의 원인유전자들로는 crystallins과 같은 lens의 구조단백질(Chang et al., 1999; Graw et al., 2001; Bu et al., 2002), gap junction protein (Gong et al., 1997; Shiels et al., 1999), Mp26 같은 세포막에 있거나 주변세포와의 communication 단백질, 또는 transcription factors들이 알려져 있다. dedicator of cytokinesis 1 과 유사성이 매우 높은 lr2는 지금까지 알려진 것과는 다른 기전으로 백내장을 유발할 가능성이 매우 높다. 이 유전자에 대한 기능 연구는 장차 새로운 백내장 발병 기전을 제시할 수 있을 것이다.

나. BalbC 안구 cDNA library 제작 및 partial characterization

총체적 발현연구를 위한 재료로 마우스 안구의 cDNA library가 2회에 걸친 normalization을 통하여 약 3000 종의 cDNA clones으로 구성, 제작되었다. 이 clones들은 평균 약 1.0 Kb inserts를 지니고 있으며 본 연구에서는 제한적으로 사용되었으나 장차 마우스를 이용한 안질환 연구에 긴요하게 활용될 것이다.

다. 기타 계획하지 않은 연구 성과

마우스 physical map을 C57BL6 BAC을 작성함으로써 genome center에서 수행하고 있는 마우스 sequencing project에 map을 제공할 수 있었으며 새로운 유전자의 발굴로 유전자의 기능과 이 기능의 defect가 유발하는 질환을 연결지을 수 있었다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

본 연구실에서 클로닝된 백내장 원인유전자인 *lr2*의 분자생물학적 기능을 발현 위치 동정, ectopic expression이 세포의 성장 사멸에 미치는 영향, 9AA deletion이 *lr2*의 발현 위치, 세포의 성장, 사멸에 미치는 영향을 연구비가 확보 되는 대로 수행할 계획이다.

또한 안구발현 cDNA library는 안질환 연구실이나 cDNA chip제작 기업에 이전 가능성을 올해 타진할 계획이다.

나. 활용방법

본 연구에서 제작된 클론들을 transfection 연구, cell biology 연구 방법 등에 활용할 것이며 cDNA library 클론은 장차 기업에서 cDNA array를 제작하는데 활용될 것이다.

다. 차년도이후 활용계획

lr2 클론은 transgenic 마우스를 제작하여 백내장을 구제하는지 여부의 연구에 활용되기 위하여 본 연구실과 화학연구소의 마우스 변이연구실과 공동연구를 진행할 예정이다.

5. 기대효과

가. 기술적 효과

지금까지 알려진 백내장 loci는 인간에서 약 33개, 마우스에서는 30개가 넘으나 50%의 유전자도 밝혀지지 않은 상태로 아직도 원인유전자 규명이 활발히 이루어져야 하는 분야이다. 본 연구를 통하여 유전질환의 원인유전자를 positional cloning이라는 기법과 반대하게 추적되어 있는 정보를 database를 활용하여 발굴해 내었다. 이 같은 방법은 외국의 경우 사례가 많으나 우리나라에서는 처음으로 활용된 것으로 장차 새로운 유전자의 발굴에 성공적으로 사용될 수 있다.

또한 본 연구를 통하여 밝혀진 백내장 원인 유전자인 *lr2*는 지금까지 알려진 백내장 유전자들과는 다른 새로운 기전을 제시할 것으로 사료되며 이는 백내장의 원인을 이해하는데 우리의 시야를 넓힐 것으로 생각된다.

lr2 유전자를 활용하여 이와 상호작용하는 유전자를 확인 분리할 수 있을 것으로 사료되며 이는 또 다른 백내장의 원인 유전자일 가능성이 있어 장차 계속 연구가 진행되어

야 할 것이다.

앞으로 더욱 심도 깊게 Ir2의 기능연구가 시행된다면 이를 바탕으로 백내장 치료제 개발 혹은 예방약 개발에 직 간접으로 활용될 것이다.

나. 경제적 효과

본 연구과제는 직접적인 경제 산업적 상승효과는 기대할 수 없으나 연구과제의 성공적인 수행으로 백내장 발병기전을 규명함으로써 장차 예방 치료제 개발에 필수적인 기초 지식을 제공하였다고 사려 된다.

6. 문제점 및 건의사항

연구자의 입장에서 연구를 결산하는 방법은 여러 가지가 있다고 생각된다. 연구된 바를 학술지를 통해 발표하는 방법, 학회에서 발표하는 방법 등은 본 연구자 뿐만 아니라 같은 분야의 연구자와 정보를 교환하여 서로의 연구에 도움이 될 수 있다는 장점이 있다.

연구과제를 관리함에 있어 최종보고서를 작성해야 하는 행정적 이유를 이해 못하는 바는 아니나 각 교육 연구 기관의 도서관에 비치하기 위하여 무려 32 권 이상의 최종 보고서를 인쇄 제본 하여 우편으로 각 기관에 보내야하는 행정적 조치는 정보를 공유하기 위한 조치로 이해되지 않는다. 아마도 Web site에 file을 올리고 필요한 연구자의 검색에 의해 정보를 retrieve하게 하는 것이 연구 결과를 공유할 수 있는 더 나은 방법으로 사려되어 이를 건의하는 바이다.

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

본 연구는 백내장 원인유전자를 분리하는 순수 기초연구이므로 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술은 확보되지 않았다고 판단된다.

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호				
과제명				
사업명				
세부사업명				
연구기관			기관유형	
참여기관(기업)				
총연구기간				
총연구비	정부()천원	민간()천원	합계()천원	
연구책임자 1	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명		소속/부서	
	직위/직급		E-mail	
	전화번호		FAX	
	주소	(-)		

■ 기술의주요내용

[기술의 개요]

<기술적 특징>

(1)

(2)

(3)

[용도 · 이용분야]

(1)

(2)

(3)

■ 기술의 분류

[기술코드] □□□ (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업
- 기계설비
- 소재
- 정밀화학·공정
- 생명과학
- 원자력
- 자원
- 에너지
- 항공·우주
- 해양
- 교통
- 보건·의료
- 환경
- 기초·원천
- 기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발
- 신공정개발
- 기존제품개선
- 기존공정개선
- 기타 ()

[기술의 용도] (복수 선택(√로 표시)가능합니다)

- 기계설비
- 부품소자
- 원료재료
- 소프트웨어
- 가공처리기술
- 자동화기술
- 불량률 감소 등 현장애로기술
- 제품설계기술
- 공정설계기술
- 기타 ()

■ 산업재산권 보유현황(기술과 관련한)

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호

* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재
 * '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

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

[기술을 도출한 과제현황]

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