

과제번호

2000-N-NL-01-C-149

국가지정연구실사업

생체시계 유전자와 조절인자를 이용한 유전자
발현 제어 기술 개발

Biological Clock-motivated Gene Regulation

서울대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “국가지정연구실사업”과제 (단위과제 “생체시계 유전자와 조절인자를 위한 유전자 발현 제어기술 개발”) 의 보고서로 제출합니다.

2003. 11.

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 김경진

보고서 초록

과제관리번호	2000-N-NL-01-C-1 49	해당단계 연구기간	2002.06.14-2003.09.30	단계 구분	(2단계)/ (총2단계)
연구사업명	중 사업명	국가지정연구실사업			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	생체시계 유전자와 조절인자를 이용한 유전자 발현 제어 기술 개발			
연구책임자	김 경 진	해당단계 참여연구원수	총 : 19 명 내부 : 1 명 외부 : 18 명	해당단계 연구비	정부: 862,422 천원 기업: 0 천원 계: 862,422 천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 생명과학부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	60
<p>본 연구과제는 뇌 시상하부 시신경교차상핵 (SCN)을 주 모델 시스템으로 생체시계의 조절 메커니즘을 규명하고 신경호르몬 혹은 새로운 조절인자를 탐색하여 새로운 유전자 발현 제어기술을 개발하여 유전자 치료 등 타 기술에 응용 할 수 있는 기반확립을 목표로 수행되었다. 주요 연구 결과는 다음과 같다.</p> <p>1. 일주기성 신경호르몬의 실시간 유전자 발현 측정기술 확립을 위해서 1) 칼슘 증가 및 인산화/탈인산화 효소의 영향에 의한 일주기 유전자 mPer1 발현을 RNase protection assay로서 실시간 발현을 규명하였으며, 2) SEAP reporter를 이용한 GT1 세포주에서 GnRH 프로모터의 활성을 측정하였다. 3) 세포내 생리활성물질 및 유전자 발현 측정에 FRET을 적용하여 표적 mRNA 측정의 효율을 확인하였으며, 또한 YFP 유사체 YFPins, Caspase3의 활성측정을 위한 DEVDins 등 4종 이상의 바이오센서와 유사체를 개발하였다.</p> <p>2. 1) 실시간 발현측정을 위한 리포트 시스템인 tetracycline 조절유전자 (TRE)를 생체시계 조절인자 측정용 리porter M34-luc에 적용하여 CLOCK:BMAL1의 기능분석을 성공적으로 수행하였으며, 2) 세포내에서의 실시간 발현측정을 위해 GFP 형광단백질을 표지한 일주기 유전자 리porter 시스템을 구축하였다. 또한 3) SCN, Retina, GT1 cDNA library를 구축함으로써 일주기 유전자 발현을 조절하는 인자를 탐색할 수 있는 발판을 마련하였다.</p> <p>3. 1) 생체시계 생리활성 측정을 위한 실험 모델 연구의 일환으로 in vitro 모델로 SCN 기원세포주인 SCN2.2에서의 NMDA 수용체의 아형태의 특이적 발현양상 확인 및 송과선 기원 세포주인 PGTβ 배양을 구축함과 동시에 멜라토닌 수용체의 발현을 통해서 NAT-luc 리포트의 활성에 제한됨을 확인하였다. 2) 또한 GFP가 결합된 일주기 유전자에 대한 재조합 Adenovirus를 통해 신경세포인 GT1, GH3, SCN2.2에서의 유전자 도입 효율성을 향상시킴으로써 세포에서 일주기 단백질의 세포내 분포를 확인 했을 뿐만 아니라, 차후 일주기성 유전자 돌연변이 모델을 적용할 수 있는 기반을 구축하였다. 2) 곤충세포에서 일주기 유전자의 세포내 발현 및 위치변화 측정법을 확립함으로써 생체시계 유전자의 세포내 분포에 영향을 주는 새로운 신물질을 스크리닝할 수 있는 가능성을 시사하였다. 이외에 일주기성을 분석할 수 있는 Real-time RT-PCR 측정기술을 적용하여 실시간 발현 측정법을 정립하였다.</p> <p>4. 1) 일주기 유전자에 대한 adenovirus를 제작하여 세포내 유전자 도입을 향상시켰으며, SCN2.2 세포주에서 일주기 단백질들의 세포내 분포를 확인하였다.</p> <p>이상의 연구결과는 생체시계 유전자 발현제어의 분자기작을 규명하는 것은 물론 생체리듬을 이용한 바이오센서 개발, 유전자치료 등에 활용할 수 있다고 사료된다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	생체시계, 교차상핵, GnRH 맥동성, 일주기 유전자, 형광공명에너지전위			
	영 어	circadian clock, suprachiasmatic nucleus, GnRH pulse generator, clock gene, FRET			

요 약 문

I. 제 목

생체시계 유전자와 조절인자를 이용한 유전자 발현 제어 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- ▶ 뇌 시상하부를 주 모델 시스템으로 생체시계의 조절 기작을 규명하고 신경호르몬의 맥동적 합성, 분비 기작의 연결고리를 규명하여 생체시계의 핵심조절 인자를 탐색, 개발하여,
- ▶ 생체시계를 이용한 새로운 유전자 발현 제어기술을 개발하고, 타 기술에 응용할 수 있는 기반을 확립한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 실시간 유전자 발현 측정기술 확립으로 다양한 유전자군 발현의 동시측정을 위해서 RNase protection assay, luciferase assay, SEAP reporter 활성 측정법과 생리활성 물질 혹은 표적유전자 발현의 실시간 측정을 위하여 FRET 기술을 응용.
- 일주기성 신경호르몬 유전자의 새로운 조절인자 탐색의 수행을 위해서 교차상핵, GnRH 신경세포주인 GT1, Retina cDNA library를 제작.
- 생체시계 유전자 발현 제어기술 및 활성변조기술 확립의 일환으로 Real-time RT-PCR, Tet on/off 및 cis-element의 기능분석을 수행.
- 생체시계 생리활성 측정을 위한 in vitro 및 in vivo 실험을 위해서 Adenovirus 및 Baculovirus 시스템을 적용하여 유전자 도입기술의 향상 및 모델을 구축.

IV. 연구개발결과

- 일주기성 신경호르몬의 실시간 유전자 발현 측정기술 확립을 위해서 칼슘 증가 및 인산화/탈인산화 효소의 영향에 의한 일주기 유전자 mPer1 발현을 RNase protection assay로서 실시간 발현을 규명하였으며, SEAP reporter를 이용한 GT1 세포주에서 GnRH 프로모터의 활성을 측정하였다. 세포내 생리활성물질 및 유전자 발현 측정에 FRET을 적용하여 표적 mRNA 측정의 효율을 확인하였으며, 또한 YFP 유사체 YFPins, Caspase3의 활성측정을 위한 DEVDins 등 4종 이상의 바이오센서와 유사체를 개발 하였다.
- 실시간 발현측정을 위한 리포트 시스템인 tetracycline 조절유전자 (TRE)를 생체시계 조절인자 측정용 리포터 M34-luc에 적용하여 CLOCK:BMAL1의 기능분석을 성공적으로 수행하였으며, 세포내에서의 실시간 발현측정을 위해 GFP 형광단백질을 표지한

일주기 유전자 리포터 시스템을 구축하였다. 또한 SCN, Retina, GT1 cDNA library를 구축함으로써 일주기 유전자 발현을 조절하는 인자를 탐색할 수 있는 발판을 마련하였다.

- 생체시계 생리활성 측정을 위한 실험 모델 연구의 일환으로 in vitro 모델로 SCN 기원세포주인 SCN2.2에서의 NMDA 수용체에 대한 아형태의 특이적 발현양상 확인 및 송과선 기원 세포주인 PGT β 배양을 구축함과 동시에 멜라토닌 수용체의 발현 통해서 NAT-luc 리포트의 활성화에 제한됨을 확인하였다. 또한 GFP가 결합된 일주기 유전자에 대한 재조합 Adenovirus를 통해 신경세포인 GT1, GH3, SCN2.2에서의 유전자 도입 효율성을 향상시킴으로써 세포에서의 일주기 단백질의 세포내 분포를 확인했을 뿐만아니라, 차후 일주기성 유전자 돌연변이 모델을 적용할 수 있는 기반을 구축하였다. 곤충세포에서 일주기 유전자의 세포내 발현 및 위치변화 측정법을 확립함으로써 생체시계 유전자의 세포내 분포에 영향을 주는 새로운 신물질을 스크리닝할 수 있는 가능성을 시사하였다. 이외에 일주기성을 분석할 수 있는 Real-time RT-PCR 측정기술을 적용하여 실시간 발현 측정법을 정립하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 형광단백질을 이용한 GFP 바이오센서를 개발하여 유전자 발현을 조절하거나 측정할 수 있는 센서로 연구자들의 요구에 맞게 변형되어 사용될 것으로 기대되며 앞으로 지속적인 기능 향상에 더 진보적인 센서 개발에 일조할 것으로 기대된다.
- Real-time RT-PCR에 의한 유전자의 정량적 측정법 확립을 통해서 세포사, 세포분열, 전사/번역 등 24시간 주기의 일주기성 및 실시간 기능 분석에 활용함으로써 보다 심도 있는 연구를 하는데 기여할 것으로 사료된다.
- Baculovirus 시스템을 이용한 단백질 과잉발현을 통한 기능연구 및 항체생산을 위한 항원생산에 기여할 것으로 사료되며, Adenovirus를 이용한 효율적 유전자 발현 및 도입법은 특정 유전자에 대한 형질전환/knock-out 모델에서 기능 회복 및 저해에 적용함으로써 보다 명확한 기능연구에 기여할 뿐만 아니라, 유전자 도입 효율이 낮은 신경세포에서의 일주기 연구에 중요한 기반이 될 것이다.

S U M M A R Y

The present study aims to elucidate the molecular mechanism underlying the biological clock-regulated genetic network and to search for neurohormone/neurotransmitter or novel clock gene and regulatory elements in the model of suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. Furthermore, this platform technique is able to develop clock-motivated gene therapy vector system and chronogenetherapy model system by genetic manipulation that allows the circadian expression of target genes at a specific time of a day:

Firstly, we attempted to develop several novel techniques to monitor gene expression in a real-time manner by examining the cytoplasmic influx of Ca^{+2} and activation of PKA, which were closely involved in induction of circadian clock gene (*mPer1*). GnRH promoter activity was measured the activity of GnRH promoter using a SEAP (secreted alkaline phosphatase)-based technique to monitor GnRH secretion and expression simultaneously in GnRH-producing GT1 cell line. we succeeded in application of FRET (fluorescence resonance energy transfer) technology to measuring target mRNA and developed several YFP analogues such as YFPins and DEVDins for analysis of caspase3 activity. Accordingly, these tools provided possibility for real-time analysis of physiological activity of intracellular molecules and gene expression in a single cell level.

Secondly, to construct the reporter system for real-time measurement, we measured transcription activity of CLOCK:BMAL1 heterodimer using M34-Luciferase reporter system, which contains a promoter with luciferase tagged clock-controlled cis-element (E-box) and is inserted TRE (tetracycline response element) sequence as a inducible factor to control the expression. Moreover, we prepared the SCN, retina and GT1 cDNA library to search a novel gene that regulates the circadian clock genes.

Thirdly, to generate *in vivo* and *in vitro* model for the measurement of the physiological activity of circadian clock, we verified specific expression pattern of NMDA isotypes in SCN2.2 cell line originated from SCN and confirmed the restriction of NAT-luc reporter activity in pineal gland immortalized cell line, PGT β . Also the efficiency of gene delivery was improved into neuronal cell lines such as GT1, GH3 and SCN2.2 using GFP-tagged clock adenovirus and then imaged specific-distribution of clock proteins in the cell lines. Promotion of exogeneous gene delivery by clock adenovirus could be applied for restoration of the mutant model for circadian gene and for chronogenetherapy. In addition, we provide a potential tool to screen new molecules that could be expected to influence the cellular expression and distribution in the insect cell, SF21 and real-time RT-PCR was set up for analysis of circadian rhythmicity.

Taken Together, the present study contributes not only elucidation of molecular feedback mechanism of biological clock genes but also application of chronogenetherapy and biosensor for study of circadian rhythms in the future.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction of project	1
1. Purpose	1
2. Necessity	1
Chapter 2. State-of-Art	5
1. Abroad status	5
2. Domestic status	8
3. Prospects	9
Chapter 3. Experimental approaches and results	10
1. Experimental approaches	10
1) 1st year in the 1st phase	10
2) 2nd year in the 1st phase	11
3) 1st year in the 2nd phase	12
4) 2nd year in the 2nd phase	14
2. Results	15
1) 1st year in the 1st phase	15
2) 2nd year in the 1st phase	16
3) 1st year in the 2nd phase	18
4) 2nd year in the 2nd phase	22
Chapter 4. Achievement and contribution	47
1. 1st phase	47
2. 2nd phase	50
Chapter 5. Future applications	52
Chapter 6. Scientific technology information obtained abroad	56
Chapter 7. References	58

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
1. 연구개발 개요	1
2. 연구개발의 필요성	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	5
1. 국외현황	5
2. 국내현황	8
3. 앞으로의 전망	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	10
1. 연구방법 및 내용	10
1) 1단계 1차년도 연구방법 및 내용	10
2) 1단계 2차년도 연구방법 및 내용	11
3) 2단계 1차년도 연구방법 및 내용	12
4) 2단계 2차년도 연구방법 및 내용	14
2. 연구수행 결과	15
1) 1단계 1년차 연구내용 및 결과	15
2) 1단계 2차년도 연구내용 및 결과	16
3) 2단계 1년차 연구내용 및 결과	18
4) 2단계 2년차 연구내용 및 결과	22
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	47
1. 1단계 목표 달성도	47
2. 2단계 목표 달성도	50
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	52
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	56
제 7 장 참고문헌	58

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 개요

▶ 유전자재조합 기술을 기반으로 한 생명공학기술의 발전으로 기초 생명과학 분야는 물론 유전자 치료를 비롯한 제반 생명공학 분야에 있어 특정 유전자를 다른 세포나 조직에서 임의로 발현시키고, 이를 제어할 수 있는 기술의 개발이 절실하게 요구된다.

▶ 박테리아로부터 식물, 동물, 인간에 이르는 모든 생명체의 보편적인 생명현상 중의 하나는 약 24시간을 주기로 하는 일주기 리듬(circadian rhythm)이다. 지난 수십 년 동안 일주기성을 비롯한 생체시계(biological clock)는 현상학적 기술에 근거하여 생리, 행동학적 수준에 머물러 왔으나, 최근 다양한 분자생물학적 방법에 의해서 여러 생물체에서 생체시계를 관장하는 리듬 유전자가 클로닝 되었다.

▶ 생체시계 조절 유전자를 활용, 개발하고자 하는 본 기술은

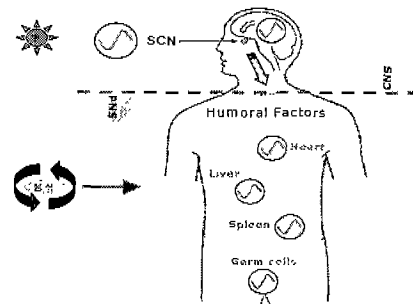
- (1) 뇌 시상하부를 주 모델 시스템으로 생체시계의 조절 메커니즘을 규명하고 신경호르몬의 맥동적 합성, 분비 기작의 연결고리를 규명하여 생체시계의 핵심조절 인자를 탐색, 개발하고,
- (2) 생체시계를 이용한 새로운 유전자 발현 제어기술을 개발하고, 타 기술에 응용할 수 있는 기반을 확립한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

○ 기술적 측면

▶ 생명체의 체온, 심장박동, 수면-각성 주기, 대사활동, 생식활동, 행동양식 등 대부분의 생명현상은 내인적인 생체시계에 의해서 그 기능이 유지된다. 특히 포유류와 같은 고등생물의 중추 생체시계는 뇌 시상하부에 위치한 시신경 교차상핵 (suprachiasmatic nucleus, SCN)에 있다. SCN은 망막으로부터의 일주기 정보와 뇌 중양에 위치한 송과선(pineal gland)에서 분비되는 일주기성의 biomarker인 멜라토닌을 통하여 일주기성 정보를 종합하여 생체시계의 조절을 관장하는 가장 중요한 핵심 기관으로 알려져 있을 뿐만 아니라 현재 많은

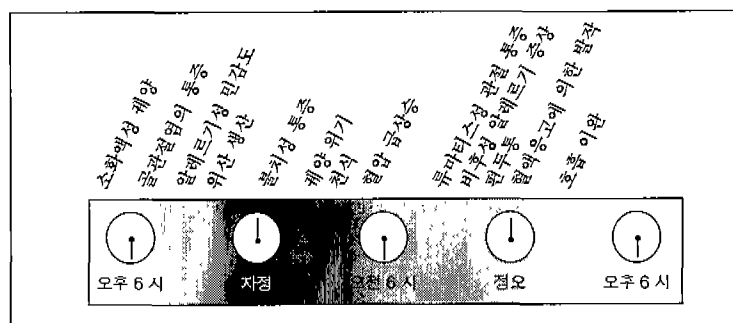


(그림 1) 중추 일주기 리듬과 말초기관의 상호 네트워크

연구결과 중추 생체시계를 조절하는 것이 교차상핵임은 명백하지만 모든 다른 말초기관에서도 독특한 조직 특이적인 생체주기 리듬을 관장하고 있는 것으로 밝혀지고 있다 (그림 1).

▶ 생체시계의 중요성은 질병에 있어서도 예외가 아니다. 최근의 연구결과에 의하면 하루 중의 어느 시기에 약물을 투여하는가에 따라 그 효과도 크게 달라지고 약물의 작용 메커니즘도 역시 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 고전적인 방법으로 약물을 오랜 시간에 걸쳐 만성적으로 투여하는 방법은 점차 그 합리성을 잃고 있으며, 질병의 일주기 리듬에 맞추어 약물을 투여하는 생체리듬 치료요법의 필요성이 강하게 제기되고 있다.

▶ 대표적인 예로, 천식은 주로 밤에 그 증상이 심해지므로 천식을 막기 위한 약물은 밤에 고농도로 투여하고 낮 동안에는 적은 양만을 투여하는 것이 훨씬 효과적이다. 천식과 같이 시간에 따른 약물 처방이 필요한 질병으로는 소화액성 궤양, 고혈압, 암 등으로 그 범위가 점차 확대되고 있다(Lemmer, 1996, 그림 2).



(그림 2) 질병 증상의 일주기 리듬. 각 증상이 최고조에 이르는 시각을 표시하였다

▶ 현재 개발중인 유전자 치료기술은 viral promoter에 의해서 유전자의 발현을 강하게 유도할 수 있으나 벡터의 독성과 발현하는 단백질에 의한 면역 반응 뿐만아니라 효과의 지속성, 치료 시기의 적합성의 한계를 가지고 있다. 결과적으로 외부에서 유전자의 발현을 임의로 조절하는 것이 불가능하다는 문제점이 있다.

▶ 유전자 치료 기술 개발의 핵심기술은 조직 특이적으로 공간적인 유전자 발현을 유도하는 방법이다. 조직특이적유전자의 promoter-응용, 시간적인 발현을 조절하기 위해서는 유전자 치료 벡터의 promoter에 특정한 외부 신호에 반응할 수 있는 cis-element 서열을 넣는 것이 일반적인 접근 방법이다. 그러나, 이러한 기존의 접근법은 환자의 내인성 요인에 의해서 영향을 받게되고 또한 외부로부터 끊임없이 특정 유도물질을 주기적으로 주입해야 한다는 문제점을 안고 있다.

▶ 따라서, 치료 목적의 단백질을 표적 조직에서만 특이적으로 발현하게 하는 한편, 이 단백질이 가장 적절한 시기에 발현이 유도될 수 있도록 만듦으로써 유전자 치료의 부작용을 최소화하고 치료 효과를 극대화하는 것이 현재 유전자 치료 기술의 핵심과제라 할 수 있다.

▶ 본 연구팀이 제안하는 생체시계를 이용한 유전자 발현 제어 기술은 기존 유전자 치료 기술이 가지고

있는 이러한 근본적인 문제점을 원천적으로 해결하고자 하는 적절한 대안으로서 생체시계 관련 유전자 변조 기술 및 생체리듬 pacemaker에 대한 기초연구를 기반으로 유전자 치료 기술의 문제점을 극복하고 나아가 질환모형을 대상으로 치료요법에 활용하고자하는데 그 취지가 있다.

○ 경제-산업적 측면

▶ 유전자 치료 기술은 생명공학 분야에서 차세대 핵심산업이 될 것임은 의심의 여지가 없으며, 수년 내에 임상적으로 적용 가능한 실용화 단계에 들어갈 것으로 전망되고 있다. 또한, 그 응용 범위도 점차 확대되어 최근에는 자궁 내 태아를 통해 출생 전 각종 유전병이나 질병을 근본적으로 치료하는 방법(Utero human gene therapy)으로 활발히 연구되고 있다. 이렇듯 전세계적으로 불고 있는 유전자 치료 기술의 발달과 투자를 고려한다면 유전자 치료 기술의 실용화 및 최적화에 불가피한 생체시계 유전자 활용 기술에 대한 수요 또한 현저히 증가할 것이다.

▶ 생체시계 유전자를 활용하는 본 기술은 현재 근로자의 20% 이상을 차지하는 밤에 일하는 근로자(shift-worker) 및 시차적응(Jet-lag), 불면증과 같이 직접 생체시계와 관련된 분야는 물론 생체리듬 이상으로 초래되는 신경내분비 유전병인 Kallmann syndrome, precocious puberty (조숙), delayed puberty, 신경행동학적 질환 등 향후 5년 내 본 기술이 확보되면 유전자 치료 및 암과 같은 장기적 치료가 요구되는 약물 치료, 화장품 및 발모제와 같은 신경호르몬과 관련된 상품에 직접 응용될 충분한 시장성이 있다. 또한, 본 기술의 핵심성을 고려할 때 그 응용 범위도 폭발적으로 증가할 것이다.

○ 사회-문화적 측면

▶ 본 기술개발이 갖는 사회-문화적인 의의 또한 지대하다. (표 1)에서 볼 수 있듯이 생체시계와 관련된 사회비용은 실로 엄청나다. 체르노빌 핵발전소 사고를 비롯한 크고 작은 사건들이 모두 생체리듬과 관련된 것이며, 자동차에 의한 사고 또한 생체리듬과 밀접한 관련을 맺고 있다.

▶ 응급실의 의료사고, 밤에 일하는 노동자, 대륙간 횡단에 따르는 시차적응 등도 생체시계와 직접적으로 관련되며, 자궁암, 유방암 등을 비롯한 난치병들도 생체리듬요법의 필요성이 강하게 대두되고 있다. 또한, 많은 사람들이 잠과 관련된 질병들로 곤란을 겪고 있다.

▶ 한편, 생체리듬을 조절하는 약물인 melatonin은 현재 25개 제조회사에서 만들어져 연간 4500kg이상이 소비되는 것으로 알려져 있다.

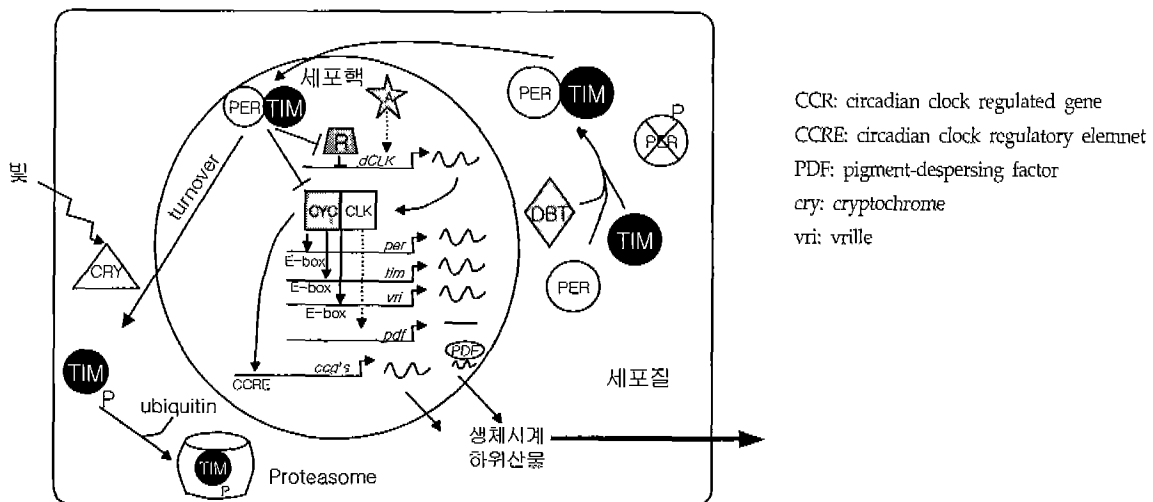
항목	내용		비고	
수면과 관련된 질병	수면 불규칙		6천만 (미국)으로 집계의료비 160억 불 수면제 40%가 노인층에서 소비	
	Sudden infant death syndrome		선진국에서 신생아 사망의 주요인	
	Sleep apnea		수면중 호흡곤란	
	Restless leg syndrome		천2백만 (미국) 환자 집계	
	Narcolepsy		25만 (미국)	
생체리듬 치료 필요질환	자궁암: 두 가지 다른 약물을 오전 및 오후 6시에 투여 나누어 투여			
	유방암 : 배란전에 수술할 경우 5년 후 76% 암조각이 발견된 반면 생리중에 수술했을 때 37% 환자에서 암조각 발견			
기타	의료사고 (응급실)		Center for Biological Timing에서 자료 수집 및 평가	
	밤에 일하는 노동자(shift work)		전체 노동자의 20% Circadian Technolitics, Inc 등으로부터 건설팅	
	시차적응(Jet-lag)		비행기 탑승객수의 폭발적 증가	
수송 중 발생 사고	연간 평균 승객 사망자수	연간 1억 여객 마일당 사망자수		
운송수단	비행기	119.1	0.033	자가용 사고의 경우, 수면-각성 주기가 호트러지는 한밤중에서 새벽 7와 오후 1시에서 4시 사이에 대부분 발생
	기차	6.5	0.055	
	버스	36.3	0.030	
	자가용	23585.0	1.040	
멜라토닌	25개 제조회사, 24개 상품(A Good Day Starts with A Good Night, Adjust Your Body Clock To Any Time, Mellodream, Circadin 등의 상품명), 연간 4,500 kg 이상 소비			

<표1. 생체시계와 관련된 사회 비용>

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외현황

▶ 미국 Rockefeller대의 Mike Young 박사팀, Brandeis대의 Michael Rosbash와 Jeffrey Hall 박사팀이 초파리에서 최초로 *per* 일주기성 유전자를 클로닝하고 PER 단백질을 밝힌데 이어 *tim* 유전자를 클로닝함으로써 초파리와 빵곰팡이 등에서 *per*, *tim*, *frq* 등과 같은 생체시계 유전자가 밝혀졌다(Scully and Kay, 2000). 최근, 생쥐와 같은 고등동물에서 Northwestern대의 Joseph Takahashi 연구팀은 *clock* 유전자를 클로닝하여 생체리듬 유전자 연구의 일대 개가를 이루었으며 *per*, *tim* 유전자 발현에 미치는 *clock*, *bmal*과 *cycle* 등 전사유전자의 조절 메카니즘을 연구중이다(Dunlap, 1999; Hastings and Maywood, 2000) (그림 3). *per*와 *tim* 유전자는 PAS 단백질 부위를 갖는 전사조절인자로서 *per*와 *tim*의 경우 자신의 promoter에 negative feedback regulation을 하며 *clock*, *cycle* 등이 E-box (CACGTG) 유전자 조절 부위에 positive feedback하여 유전자 발현의 주기성을 제어하는 것으로 알려져 있다. 이러한 일주기성 유전자의 가장 큰 특징은 mRNA의 발현이 일주기 리듬을 보인다는 것이며, 더욱이 E-box를 포함하는 *per* 유전자 promoter의 69개 염기(일주기성조절부위, circadian regulatory sequence; CRS)가 일주기 유전자의 주기적인 발현을 조절하는데 중요한 것으로 보고되었다(Hao et al., 1997). 일주기성 유전자에 reporter 유전자를 붙여서 유전자의 발현과 동물의 일주기 행동 및 세포 대사를 연관시켜 분자유전학적 연구가 전세계적으로 활발히 이루어지고 있다.



(그림 3) 초파리의 리듬 유전자 조절과정 모식도

● 지난 수십 년 동안 일주기성을 비롯한 생체시계 관련 연구는 현상학적 기술에 근거하여 생리, 행동학적 수준에 머물러 왔으나, 최근 여러 생물체에서 생체시계를 관장하는 리듬 유전자가 클로닝 되었다. 특히, 인간게놈 프로젝트의 완성과 동시에 S. Reppert 그룹에 의해서 hPer4, 생체시계 유전자들의 인산화에 관여하는 효소를 발견하였다(Clayton et al., 2001; Gotter and Reppert, 2001). 또한, 일주기 유전자 단백질의 인산화과정이 일주기성에 중요하다는 사실이 밝혀졌다(Lee et al., 2001).

● 사람의 수면, 체온과 멜라토닌 주기성이 네 시간 길어진 유전성 수면질환 (hereditary sleep disorder)인 familial advanced sleep phase syndrome(FASPS)이 생체주기 유전자의 하나인 hPer2의 점돌연변이에 의해서 발병한다는 사실이 2001년 1월 하워드 휴즈 의학 연구소(Howard Hughes Medical Institute)의 L. Ptacek 그룹에 의해서 처음으로 보고되었다(Toh *et al.*, 2001). 다른 한편으로 Per2의 결여에 의해서 종양이 발생한다는 사실이 밝혀졌다. Per2의 결핍은 세포 DNA 손상에 의한 세포사가 억제되지 않으므로 종양 발생율이 증가함을 규명함으로써 생체시계를 이용한 함암 치료법에 새로운 장을 열었다고 사료 된다 (Fu *et al.*, 2002).

● 미국 Johns Hopkins대의 S. Snyder 박사팀은 최근 송과선에서 분비되는 멜라토닌의 유전자 및 그 분자적 조절기작을 연구 중이며(Borjigin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998) 멜라토닌 합성의 주효소인 serotonin N-acetyltransferase(NAT)의 프로모터를 변조한 형질전환생쥐가 이용되고 있다(Burke *et al.*, 1999). 또한, 대뇌의 송과선에서 분비되는 호르몬인 멜라토닌이 햇빛을 볼 수 없는 시각장애자의 일주기 리듬으로 인한 수면장애에 도움이 된다는 연구결과가 발표됨으로써 햇빛을 볼 수 없는 시각장애자들은 정상인처럼 매일 생물학적 시계를 다시 설정할 수 없기 때문에 불면증에 시달리는 것으로 밝혀졌다 (Sack *et al.*, 2000). 이에 발맞춰서 M. Rollag 박사 팀은 사람의 눈에서 낮과 밤의 24시간 주기를 조절하는데 결정적인 역할을 하는 멜라놉신(melanopsin)을 발견하였다(Provencio *et al.*, 2002).

● 미국 버지니아 대학의 M. Menaker 박사를 비롯한 연구팀은 식사시간이 생체시계를 재조정하는데 중요한 역할을 한다는 사실을 발견하였다(Stokkan *et al.*, 2001; Hara *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2001). 이 연구결과는 시차를 극복하는데 현실적인 도움을 주게 될 것으로 보인다. 또한 식사 습관에 따라 생체시계를 조절하는 역할을 하고 있는 기관이 간이라는 사실은 간 질환을 치료하는 데에도 중요한 의미를 갖으며 독성해독 및 체내 대사라는 간의 본래 기능을 고려할 때, 이상의 발견은 치료제의 복용시간이나 치료시간을 조절하는데도 도움을 줄 것으로 보인다.

● 하워드 휴즈 의학 연구소의 KW. Yau 박사는 기존의 시각 시스템과는 달리 인체 내부 시계(internal clock)와 직접 상호 작용하는 소위 이차 시각(second sight)이라 부르는 광감각 회로(light-sensing circuitry)를 밝혔다(Hattar *et al.*, 2002). 이 회로에 아주 약간의 유전적 결함만 있어도 수면 장애(sleep disorders)를 일으킬 수 있는 것으로 추측하고 있다. 멜라놉신 함유 망막 신경절 세포의 구조와 회로, 광민감성을 밝히는 것이 일주기 시스템이 어떻게 조절되는지 이해하는데 가장 중요한 단계가 될 것이며, 광유입 효과를 없앤 형질전환 생쥐의 행동변화 양상, 신경 회로 형성 및 배 발달 동안 회로형성에 대한 연구가 진행 중이다.

● 멜라토닌은 사람의 24시간 일주기성에 중요한 호르몬으로 알려져 있으며 수면치료에 처방되고 있으며 최근 혈관계와 신경 면역계의 기능에 관련되어 있음이 밝혀졌다. 멜라토닌은 혈관계에서 세포사멸 (apoptosis)을 감소시켜 항 허혈 작용을 하며 멜라토닌의 MT1 수용체는 유방암과 밀접한 관련이 있는 것으로 규명되었다. 또한 면역계에서 스트레스에 의한 면역 억제 및 이차적 면역성 결핍을 상쇄하는 사이토카인의 방출을 증가시켜 치사성 바이러스 뇌염과 박테리아 질환, 패혈 쇼크를 방지할 수 있는 것을 나타냈다 (Maestroni *et al.*, 2002).

● 생체시계 유전자에 대한 연구는 기초연구의 수준에 머무르고 있으나 그 영역이 점차 확대되어지고 있으며 앞으로 일주기리듬과 관련된 신경질환의 병임 규명에 큰 성과가 있

을 것으로 사료된다. 하지만, 응용분야에 있어서는 광선치료(bright light therapy)나 멜라토닌 정제의 양조절에 의존하고 있으며 세계적으로 생체시계를 활용한 유전자 치료 기술은 아직 개발된 바가 없다.

● 미국 펜실베이니아대 환경치료센터의 P. McNamara 박사는 혈관조직에서 호르몬과 비타민이 생체주기 리듬을 어떻게 관장하며 비타민A 수용체가 어떻게 리듬을 조절할 수 있는지에 대한 증거를 처음으로 제시하였다(McNamara *et al.*, 2001). 이 결과를 통해서 빛의 강도에 따라 혈관계의 생체주기리듬이 혈액내의 호르몬과 대사신호의 전달에 중요한 역할을 수행할 것으로 보고 있다. 이들이 생체주기 리듬의 작동을 알리는 신호가 무엇이며 각각의 시계가 어떻게 중추신경계의 시계와 동시에 작동하는가를 규명하는 것이 현재 중요한 연구분야로 대두되고 있으며, 생체주기에 의거해 보다 효과적인 약물설계의 가능성을 강력히 시사하고 있다.

● Grundschober박사 그룹은 동기화된 섬유아세포(synchronized fibroblasts)에서 많은 유전자의 mRNA가 일주기성을 보인다는 사실을 규명하였다(Grundschober *et al.*, 2001). 이런 일주기성을 나타내는 유전자들은 세포분열, 세포죽음, 채널, 효소, G-protein 수용체, 호르몬, 세포신호전달, 전사요소 등의 다양한 생물학적 기능에 있어서 포괄적인 것으로 나타났다. 이를 통해서 앞으로 생물학적으로 다양한 분야에서 일주기성 리듬의 연구가 활발히 이루어 질 것으로 기대된다.

● 또한 약 24 시간 정도 주기의 일주기성보다는 짧은 주기(ultradian)를 이해하고자 생쥐와 같은 고등동물에서 ultradian 관련 유전자를 탐색하려는 functional genomics 연구가 진행 중이며(Kippert and Hunt, 2000), Wisconsin대의 Terasawa박사팀, 미국 NIH의 Catt 박사팀을 비롯한 일련의 연구그룹들은 뇌하수체 생식 호르몬을 관장하는 시상하부 신경 호르몬인 gonadotropin-releasing hormone(GnRH) 맥동발진기의 분자적 조절 메커니즘을 연구하고 있으나, 분자적 기작은 현재까지도 초보적인 수준에 있다.

● 24시간 일주기성 리듬보다 짧은 주기성을 보이는 ultradian rhythm이 호르몬의 분비나 다양한 세포내 대사에 일주기성 리듬과 상호 연관성이 있을 것으로 보고 되어왔으나 뚜렷한 증거가 제시되지 못해왔다. 하지만 2002년 10월 'Science'지에 Kageyama그룹에 의해서 발생단계에 Notch의 영향 하에 있는 Hes1이란 전사조절인자가 혈청자극 (serum shock)에 의해서 2시간 간격으로 리듬적인 발현을 하는 것이 밝혀짐으로써 앞으로 일주기성 리듬현상 외에 생명체의 세포 생리·생화학적인 짧은 시간조절에 의한 현상을 규명하는데 초석이 되었다 (Hirata *et al.*, 2002).

● 일주기 조절의 중추인 시신경교차상핵 (SCN)과 말초기관 사이의 연결 분비물질:
신체의 24시간 일주기 리듬을 관장하는 기관은 뇌의 시상하부의 앞부분인 시신경교차상핵 (SCN)이라는 사실은 오래전부터 알려져 오고 있지만 이런 뇌의 특정부위에서 다른 신체부위, 즉 말초기관에 생체시계리듬을 전달하는 신호가 무엇인지에 대한 연구가 끊임없이 진행되고 있지만 이를 규명한 바는 없는 실정이다. 최근 PK2 (prokineticin)라는 위와 장의 평활근을 수축시키는 분자로서 알려진 PK2가 교차상핵에서 낮에 높은 발현을 보이고 밤에는 낮게 발현되며 PK2가 결여되면 행동에 불규칙적인 일주기성 행동양상을 보이는 것으로 보고되었다 (Cheng *et al.*, 2002).

● 신경세포의 발생과 분화에 있어서 전사조절인자로 알려진 Dec1과 Dec2가 일주기성 유전자의 발현을 억제하는 것으로 밝혀짐으로써 일주기 리듬을 관장하는 유전자가 지금까지 알려진 몇 가지

의 핵심적인 유전자 이외에 호르몬이나 다른 신호 분자에 의해서 조절된다는 사실이 시사되고 있다 (Honma *et al.*, 2002).

● 인간 유전체 프로젝트 종결됨과 동시에 생체시계 조절 유전자에 대한 생물정보학적 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 최근 생체시계 조절 유전자 결핍 생쥐(Bmal1, DBP 등)가 생산되었다. 또한 FRET 기술이 인간 질병에 대한 치료제 검색용 기술로 주목을 받고 있으며 (예, cAMP 측정, Caspase 활성 측정 등), 형광단백질(GFP)의 들연변이체를 이용한 세포내 칼슘 형광체(cpGFP)와 같은 새로운 Bio-sensor의 개발되고 있다.

● 이런 국외적인 동향에 견주어 볼 때 일주기리듬 유전자들이 세포사, 발생, 호르몬 분비, 세포분열과 같은 다양한 생물학적 현상에 깊숙이 연관되어 있음을 알 수 있다.

2. 국내현황

▶ 1998년 미국의 저명 과학잡지인 Science에 실린 기사처럼 생쥐에서 일주기성 유전자의 규명이 일년 동안 수행된 과학기술 전 분야에서 10대 발견중의 하나로 꼽힐 정도로 기념비적인 업적이나 국내에서는 생체리듬, 맥동성에 관한 전문연구인력이 거의 없는 실정이며 분자생물학적 연구방법으로 십여 년 간 지속적으로 연구를 수행하는 팀은 찾아보기 힘들다. 국내 의과대학 기초의학자와 임상 의사는 호르몬의 일주기성, 사람의 수면-각성 주기 등에 관심이 많으나 대부분 현상적이거나 생리적 수준에서 단발적인 연구를 수행하고 있는 실정이며 국제경쟁력을 지닌 연구팀도 거의 없다.

▶ 본 연구팀은 지난 15년간 뇌 신경호르몬인 GnRH의 유전자 발현, 신경분비세포의 발생과 분화 뇌하수체 호르몬과의 상호작용, 수용체와의 상호작용, 전사적 조절과 신호전달계의 coupling 기작, 호르몬 분비의 맥동성 등 분자 메커니즘에 대한 기초연구를 심도 있게 수행하여 이제는 고등생물에서 생체시계 조절 유전자를 활용할 수 있는 수준에까지 이르게 되었다(표 2).

생체시계 활용기술	보유/개발 중인 기술 내용	비고
실시간 유전자 발현 측정 기술	뇌전공법에 의한 뇌조직 특이적 경쟁적 역전사 중합효소연쇄반응법	뇌 조직특이성 신경호르몬과 수용체 전사체의 측정 (극미량, 10^{15} g 수준)
	SEAP reporter 유전자 실시간 측정기술	호르몬 분비와 유전자 발현을 실시간대 (min 단위) 동시 측정
	FRET-based real-time gene expression monitoring 기술	단일 세포에서 유전자 발현의 실시간 측정
생체시계 조절 유전자 활용	GnRH, HSP 유전자 등의 promoter 분석	신경호르몬 맥동성의 genomic drive 가설 검증
	Circadian regulatory sequence (CRS)	일주기 유전자 발현 조절
생체시계 조절 인자 검색	Yeast hybrid assay	주기성 조절 인자 스크리닝
	GFP-tagged expression library	형광 단백질 표지 유전자 검색

(표 2) 본 연구진에서 확보하거나 개발 중인 생체시계 유전자 활용 기반 기술

▶ 현재 국내 생명공학 분야는 급속히 성장하고 있다. 특히 신약 개발 및 각종 분석시스템에서 proteomics에 이르기까지 많은 분야별로 다양하게 접근되고 있기는 하지만 국제적으로 투자비용 및 그 성과가 아직 미흡한 실정이다. 선진국에 비해 시장성이나 경쟁력이 대부분 국내에 한정되어 있는 것도 사실이다. 하지만 본 실험실에서 과제 수행동안 진행된 생체시계의 분자적 분석은 이미 상당한 수준으로 그 토대를 마련하였다고 볼 수 있다.

3. 앞으로의 전망

▶ 의약산업은 전세계적으로 볼 때 천여 개의 다국적 제약회사가 연간 250억불 매출에 해당되는 시장규모이며, 유전자 치료 등 신약개발에 대한 R&D 투자액은 연간 약 36억불에 이른다. 한 개의 신약개발의 가치는 연간 500만불에 해당하고 개발기간은 평균 15년이 소요된다. 유전자 치료는 전세계적으로 가장 활발한 연구개발 분야이나 생체리듬 유전자를 활용한 유전자 치료 개발은 시도된 바 없다.

▶ 생체리듬을 이용한 기존의 약물치료 방법은 전세계적으로 큰 관심과 임상적 연구가 진행되고 있으나 본 연구진이 제안한 생체시계 유전자를 활용하는 신약개발 페러다임은 국내외를 막론하고 현재까지 수행된 바 없다.

▶ 생체시계 유전자 활용에 관한 개념 자체를 본 연구팀이 최초로 제시하는 것일 뿐 아니라, 유전자 발현 측정 기술 분야에 있어서도 본 연구진이 상당한 노하우를 확보하고 있으므로 국제 경쟁력은 충분히 확보할 수 있다. 또한, 이와 관련된 기술을 활용할 수 있는 여건이 최근 생체시계와 관련한 분자생물학의 비약적인 진보에 의해서 구체화되고 있다는 점은 이러한 전망을 더욱 밝게 해주고 있다.

▶ 생체시계 유전자를 이용한 유전자 발현 제어 기술은 본 연구팀이 최초로 제안하는 것으로 기술도입은 불가능하며, 상기한 바와 같이 경제, 산업적 측면에서 큰 시장성이 있다. 따라서 본 연구진의 그간의 연구로 확보한 노하우를 바탕으로 국내 연구개발하는 것이 타당하다고 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구방법 및 내용

1) 1단계 1차년도 연구방법 및 내용

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
실시간대 유전자 발현 측정을 위한 기반 기술 구축	1. 다양한 유전자군의 발현을 동시에 측정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ RNase protection assay 방법을 이용하여 일주기 유전자군의 발현 동시 측정 ▶ 다양한 생체시계 관련 유전자의 promoter를 클로닝하고 luciferase assay를 이용하여 발현을 측정하는 기술 개발
	2. 유전자 발현을 시간대별로 측정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ RNase protection assay 방법을 이용하여 일주기 유전자의 발현을 시간대 별로 측정 ▶ 세포신호전달자인 세포내 칼슘을 증가시키거나 혹은 세포성장인자를 처리한 후 일주기 유전자의 발현을 시간대별로 측정
유전자 발현과 호르몬 분비의 동시 측정기술 개발	1. SEAP 단백질을 프로모터 활성을 관찰하는 reporter로 사용	<ul style="list-style-type: none"> ▶ GnRH 신경호르몬 프로모터 및 멜라토닌 합성에 관련되는 α-NAT 유전자의 프로모터 활성을 시간대 별로 조사 ▶ SEAP 단백질이 세포 외부로 분비되는 특성을 이용하여 동일 세포에서 여러 시간대의 유전자 활성도를 측정
	2. 호르몬 분비를 면역방사측정법(radioimmunoassay) 방법으로 측정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ GnRH 신경호르몬의 분비를 시간대 별로 측정
FRET을 이용한 단일 세포에서 생리활성물질 혹은 표적 유전자 발현의 실시간 측정기술 개발	1. FRET 기술을 이용하여 생리활성물질의 변화를 측정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ FRET 기술을 적용하여 생리활성물질을 실시간에 측정 ▶ FRET 벡터를 발현한 후 단백질을 얻어 테스트 튜브에서 정량
	2. 단일 세포에서 유전자 발현을 측정하기 위한 FRET 기술 구축	<ul style="list-style-type: none"> ▶ FRET vector를 세포내 주입한 후 특정 유전자의 발현을 실시간 측정

2) 1단계 2차년도 연구방법 및 내용

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
일주기성 신경호르몬 유전자 및 생체시계 유전자 발현 조절인자 탐색	1. 실시간 유전자 발현 측정 기술의 확립	<ul style="list-style-type: none"> ▶ c-fos와 같은 immediate early gene, mPer1, mPer2, BMAL1 등과 같은 일주기 유전자와 신경 호르몬 생성 효소인 α-NAT 유전자와 같은 다양한 유전자의 발현을 시간대 별로 측정하는 기술을 확립 ▶ 호르몬 분비 및 효소 활성화에 미치는 genetic driver 검증
FRET을 이용한 실시간 측정기술 확립	2. 표적 유전자의 범위 확대 및 FRET 벡터 기능 향상	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 유전체 수준(genome-wide)의 스크린 ▶ 교차상핵에서 Yeast cDNA library 구축 ▶ GT1 세포주 Yeast cDNA library 구축 ▶ Retina Yeast cDNA library 구축 ▶ Yeast two hybrid 스크린을 통해서 유전체 단위의 스크린과 일주기 조절인자의 동정

3) 2단계 1차년도 연구방법 및 내용

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
In vitro 모델 구축	1. 시신경교차상핵 (SCN) 기원 세포주 배양	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Earnest 등에 의해 만들어진 SCN 2.2 세포주는 흰쥐의 시신경교차상핵 (SCN)에서 기원한 세포주이며 분양 받은 SCN 2.2 세포주에 대한 배양 조건 확립 (Earnest <i>et al.</i>, 1999). ▶ 흰쥐의 시신경교차상핵에서 기원한 SCN 2.2 세포주에서 glutamate에 의한 신호가 전달될 수 있는 수용체인 NMDA 수용체 아형태 유전자의 발현 여부를 RT-PCR로 확인. ▶ SCN 2.2 세포주에서 glutamate 처리에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화를 관찰.
	2. 시상하부 신경 세포주 GT1 배양	<ul style="list-style-type: none"> ▶ ultradian 리듬을 갖는 GnRH 분비신경세포를 연구하기 위하여, 흰쥐의 시상하부에서 기원한 신경세포주인 GT1 세포주를 배양. ▶ GnRH promoter에 의해 유도되는 luciferase 리포터 유전자를 융합한 pGnRH-dsLuc construct를 제작. ▶ 신경 호르몬의 전사적 맥동성과 transfection의 비효율성을 극복하기위해 adenovirus를 생산, GT1 세포주에 infection해서 새로운 in vitro 세포주 모델 구축.
	4. Baculovirus와 adenovirus에 이용한 다양한 세포에 유전자 도입 가능성 확보	<ul style="list-style-type: none"> ▶ SF21 곤충세포에서 CFP-baculovirus 감염여부를 형광 현미경을 이용하여 측정. ▶ 여러 세포주에서 GFP-adenovirus의 감염정도를 형광 현미경을 이용하여 측정.
	1. Tet on/off TRE-Bmal1 발현 측정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Tet on/off TRE-Bmal1 제작 및 발현 세포주를 이용하여 Doxycycline에 의한 발현양상(luciferase 활성) 측정 ▶ TRE-Bmal1의 발현에 의한 일주기 유전자 Cry1 등 발현을 Northern blot으로 측정

생체시계 조절유전자 발현의 on/off 시스템 구축	2. 일주기유전자 Bmal1기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 형광단백질인 EGFP (Enhanced green fluorescence protein)가 결합된 BMAL1의 과발현이 세포사를 유도함을 caspase 활성측정법과 형광이미징법 등으로 측정 ▶ Glucocorticoid의 유사체인 Dexamethasone 처리에 의 해서 BMAL1 과발현에 의한 세포사가 억제됨을 세포사 억제 유전자인 Bcl2의 발현 변화 측정을 통해 확인
	3. Real-time RT-PCR을 이용한 생체시계 유전자 발현의 측정기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Real-time RT-PCR을 이용하여 생쥐 간에서 mBmal1, mPer1, mPer2, 그리고 mCry2의 24시간 발현의 정량적 측정
조절인자에 의한 일주기 활성의 변 조기술 확립	1. 인간 Per1 유전자의 (hPer1) 프로모터 상의 cAMP-response element (CRE)에 의한 일주기 활성 조절	<ul style="list-style-type: none"> ▶ CLOCK/BMAL 이합체에 의한 hPer1 프로모터의 활성변화를 luciferase assay로 측정 ▶ 다양한 신호전달경로를 통한 hPer1 프로모터의 활성변화가 CRE를 경유하는지 알아보기 위해 CRE가 제거된 hPer1을 사용하여 활성을 비교
	2. Adeno virus에 의한 일주기유전자 발현 측정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ mPer2-EGFP Adenovirus의 제작 및 발현 확인 ▶ Serum shock에 의한 mPER2-EGFP의 핵에서의 발현 변화 확인
	3. Baculovirus에 의한 SF21에서의 일주기 유전자 발현 양상 측정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 일주기 유전자 Clock, Bmal1, Per1, 그리고 Per2에 대한 CFP 형광 Baculovirus 제조 ▶ 일주기 유전자 Clock, Bmal1, Per1, 그리고 Per2 유전자의 곤충세포내 위치변화를 형광현미경으로 분석

4) 2단계 2차년도 연구방법 및 내용 (1/4분기용)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
생체시계 생리활성 측정을 위한 실험모델 개발	1. In vitro 모델 확립 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 일주기 유전자의 Baculovirus 제작 ▶ In vitro 모델을 활용 신경 호르몬 맥동성 연구 모델 확립 및 분석 ▶ 종양세포주에서 일주기 유전자의 기능 측정 및 분석 ▶ 일주기 유전자에 대한 Baculovirus/Adenovirus를 이용한 일주기 유전자 조절인자 탐색 및 분석
	2. 효과적 유전자 도입 기 술 확립	▶ 일주기 유전자에 대한 Adeno virus를 제작하여 세포 내 유전자 도입기술 확립 및 향상

2. 연구수행 결과

1) 1단계 1년차 연구내용 및 결과

연구내용	연구결과
1. 실시간 유전자 발현 측정을 위한 새로운 기반 기술 구축	
RNase protection assay 방법을 이용하여 생체시계 유전자의 발현	<ul style="list-style-type: none"> NIH3T3 섬유아세포, SK-N-SH 신경아세포에서 생체시계 유전자 Period1의 발현이 세포내 칼슘 증가에 의해서 mPer1 유전자 발현이 촉진 규명하였으며, 인산화 효소 PKA, PKC의 활성화 및 탈인산화 효소의 억제에 의해서 mPer1 유전자의 발현이 촉진됨을 확인하였다.
세포내 생리활성물질에 의한 일주기 유전자의 발현 양상 측정	<ul style="list-style-type: none"> 세포내 칼슘, 인산화효소의 활성화 및 생리활성물질에 의해 mPer1은 세포내 칼슘의 증가에 의해 24 시간 주기로 발현이 조절 받으며 c-fos의 경우는 1 시간 후 짧은 시간 증가함을 확인하였다.
생체시계 유전자의 프로모터 활성인자 및 프로모터 조절 부위 탐색	<ul style="list-style-type: none"> mPer1 프로모터의 다양한 변이체를 이용하여 세포내 칼슘이 미치는 프로모터 부위를 측정함으로써 활성인자 및 조절부위를 확인하였다 (그림1).
2. SEAP reporter를 이용한 유전자 발현과 신경호르몬분비의 동시측정	
GnRH 신경호르몬의 분비와 유전자 발현 동시 측정	<ul style="list-style-type: none"> SEAP 리포터로 표지된 GnRH 프로모터를 GT1 신경세포에 transfection 시킨 후 세포주를 확립하고 serum shock으로 GT1 세포주를 동기화 시킨 상태에서 호르몬 분비를 radioimmunoassay (RIA)로 측정하고 GnRH 프로모터의 활성을 SEAP 활성으로 측정하였다 (그림 2).
맥동성과 신경세포의 분화 및 발생 모델 구축	<ul style="list-style-type: none"> GT1 GnRH 신경세포주에 PKC 활성화제 (TPA)의 처리에 의한 기능적 신경분화를 유도한다는 사실을 밝혔으며 세포접착인자인 N-cadherin과 β-catenin에 의한 transactivation 기능을 규명하였다. GABA-A agonist인 muscimol에 의한 세포내 칼슘변화와 GnRH 신경호르몬 분비의 상관관계 규명하였으며, PKC alpha 아형에 의한 GABA-A 수용체의 인산화가 GT1 신경세포의 pulse generator를 변조한다는 사실을 확인하였다 (그림 3).
3. FRET의 이용으로 생리활성물질 및 표적유전자 발현 실시간 측정기술 개발	
실시간으로 생리활성물질을 측정	<ul style="list-style-type: none"> 칼슘 형광체인 Cameleon을 C2C12 세포주에 발현시킨 후 CFP와 YFP 형광 단백질간의 FRET 효율을 이용하여 세포 내 칼슘을 측정하였으며, 신경전달물질인 glutamate를 C2C12에 처리하여 세포내 칼슘의 증가를 확인함으로써 근육세포에서 glutamate 수용체가 기능적임을 밝혔다 (그림 4C).
칼슘 형광체 개발	<ul style="list-style-type: none"> 공초점 현미경에 FRET 기술을 적용하기 위해서 RFP와 GFP 형광을 이용하여 단백질의 현광 전이현상을 성공적으로 적용하였다 (그림 4A, C).
표적 mRNA 측정법 확립	<ul style="list-style-type: none"> MS-coat 단백질 양쪽에 CFP와 YFP를 발현하는 FRET 벡터(CMY 벡터)를 제작하고, MS-coat의 인지 RNA를 발현하는 MS-sis를 이용하여 표적 mRNA를 합성한 후 CMY 벡터를 세포내에 발현하여 CMY 단백질을 합성하여 MS-sis mRNA를 각각 반응시켜 in vitro에서 mRNA의 양을 FRET 효율로 측정하였다 (그림 4B).

2) 1단계 2차년도 연구내용 및 결과

연구 내용	연구 결과
<p>1. 실시간 유전자 발현 측정 기술의 확립</p>	
<p>생체시계 재설정 관련된 mPer1 유전자의 전사 증가 시 CLOCK:BMAL1 생체시계 조절인자의 기능 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Serum shock에 의해서 mPer1의 mRNA는 대조군으로 사용된 c-fos의 경우와는 달리 증가된 후 24시간 후에 다시 증가함을 확인하였다 (그림 5B1). ● 전사와 번역 억제제인 actinomycin D와 puromycin을 각각 처리한 후 serum shock에 의해 mPer1 mRNA가 증가하는 것으로 보아 mPer1의 증가는 이미 존재하는 단백질을 사용하여 전사가 촉진된 결과를 확인하였다 (그림 5B2). ● 생체시계 조절인자 활성 측정용 리포터 M34-Luc를 제작하고 ClockΔ19가 CLOCK:BMAL1의 활성에 음성적 작용을 한다는 사실을 확인 (그림 5C1)하였으며, Clock 생체시계 조절인자의 돌연변이인 ClockΔ19를 과발현하는 NIH-3T3 세포주를 확립하고, ClockΔ19 발현 유전자와 mPer1 프로모터 Luc 리포터를 동시에 형질도입 시킨 후 serum shock을 준 결과 대조군에 비해 Luc 활성의 증가폭이 현저히 감소했음을 확인하였다 (그림 5C2). ● Serum shock 후 짧은 시간대에 각각 세포에서 핵을 추출하여 electromobility shift assay (EMSA) 실험을 수행한 결과, serum shock 후 30분 이내에 CLOCK:BMAL1 이합체의 E-box에 대한 결합력이 증가함을 다양한 E-box 절편을 사용하여 확인하였다. (그림 5D).
<p>생체시계 유전자에 의한 유전자 발현 제어 기술</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Tetracycline에 의해 전사활성이 증가하는 전사조절인자와 생체시계 조절인자 중 최상위 수준에서 전사 조절을 담당하는 BMAL1 유전자를 tetracycline 조절 유전자(TRE)와 재조합하여 NIH-3T3 세포주에 stable transfection 시켰다. ● Tetracycline에 의해서 유전자의 발현을 on/off시킬 수 있는가 조사하기 위하여 TRE-Luc를 세포내 주입하고 tetracycline의 유사체인 doxycycline을 처리하였을 경우 TRE-Luc의 활성을 증가시키는 특정 유전자의 발현을 on/off시킬 수 있는 세포주를 확립하였다. ● 생체시계 조절인자 활성 측정용 리포터 벡터인 M34-Luc를 세포내 transfection 하고 doxycycline을 처리하였을 경우 M34-Luc의 활성이 시간에 의존적으로 증가하였다가 감소하는 것으로 보아 생체시계 조절인자인 BMAL1의 활성을 외부적으로 조절할 수 있다는 사실을 입증하였으며, 생체시계 유전자에 의한 in vitro 유전자 발현 제어 시스템을 구축하였다 (그림 6).
<p>2. 시신경교차상핵에서 일주기 유전자 발현을 조절하는 조절인자 탐색 및 동정</p>	
<p>교차상핵, retina, GT1에서 3종의 cDNA expression library 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● GT1 신경세포와 50 여 마리의 생쥐로부터 SCN과 retina의 total RNA를 추출하고, oligo-dT 컬럼을 사용하여 mRNA를 분리한 후 이를 cDNA로 변환하고 HybriZap 벡터를 이용하여 HybriZap mouse SCN, retina, GT1 cDNA phage library를 구축하였다.
<p>생체시계 조절인자 관련 유전자 탐색 및 동정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● pBD GAL4 Cam에 NPAS2, BMAL1, Cryptochrome 등의 생체시계 유전자를 클로닝하여 조절인자 탐색용 Bait로 사용하여 SCN, retina, GT1 그리고 mouse testis cDNA library를 포함 4개 library에서 yeast two hybrid screening을 수행하여 positive clone들을 확보하고, 플라스미드의 염기서열을 분석하여 생체시계 조절인자 관련 유전자로서 testis library에서 NDAP7, Hexokinase 등 17개와 SCN library에서 TOLLIP, TRIM32 등의 13개의 clone을 확보하였다 (표 1).

3. FRET 벡터의 기능 향상 및 범용성 확보	
형광 바이오센서의 기능 향상 및 범용성 확보	<ul style="list-style-type: none"> ● YFP의 145번째 Tyr 자리에 YGGSGAS 아미노산 서열을 삽입하고 PCR-based mutagenesis를 이용하여, 192번째 Proline을 Leucine으로 바꾼 YFP 변종(Peridot)을 생산. 이 Peridot은 세포내 소기관 targeting이 가능하고 현재까지 가장 기능이 향상된 YFP인 Citrin보다 10배 더 형광이 강하다는 사실을 밝혔다 (그림 7A). ● 145 Tyr 자리에 GGTGEL 아미노산 서열을 삽입한 다른 YFP 유사체를 구축하였다(YFPins). ● 삽입형 칼슘 형광체인 Bio-Cart for Calcium (BCC)를 개발하였으며, BCC는 증가된 형광의 밝기가 장기간 유지되는 성질을 가지는 것으로 조사되었으며, 세포사 측정용 형광체 DEVDins를 개발하여 세포사 과정에서 Caspase-3의 활성을 세포 수준에서 실시간 측정할 수 있는 바이오센서를 구축하였다. ● Peridot의 기능을 향상시키기 위해 site-directed mutagenesis를 수행하여 3종의 유사체를 개발하였다.
실시간 유전자 측정용 CMY FRET 벡터의 기능 향상	<ul style="list-style-type: none"> ● CMY FRET 벡터의 기능을 향상시키기 위해서 MS-sis 시퀀스의 mutagenesis를 수행하였으며, IRE 시퀀스를 CMY에 도입하여 FRET 효율을 향상시켰다. ● CMY 발현 세포주를 구축하고 MS-coat 인지 MS-sis luciferase 벡터를 이용하여 유전자 발현을 측정하였다.
SCN 유래 세포주에서 FRET 기술의 응용	<ul style="list-style-type: none"> ● SCN2.2 생체시계 세포주에 glutamate 신경전달물질이 NMDA 수용체를 통해서 세포내 칼슘을 증가시킨다는 사실을 밝혔다 (그림 7B).

3) 2단계 1년차 연구내용 및 결과

연구 내용	연구 결과
1. In vitro 모델 구축	
시신경교차상핵(SCN) 기원 세포주, SCN2.2 배양	<ul style="list-style-type: none"> ● RT-PCR 방법을 통해 NMDA 수용체 아형체인 NR1, 2A, 2B, 2C, 그리고 2D의 발현을 조사한 결과, 전체 뇌조직에서는 이들이 모두 발현하고 있었다. 반면 SCN 2.2 세포주에서는 NR1, 2C, 그리고 2D만이 발현하는 것을 확인하였다 (그림8A). ● 활성이 없는 이성질체인 D-glutamate를 처리했을 때는 세포내 칼슘의 증가가 일어나지 않았으나, L-glutamate를 처리한 경우에는 SCN 2.2 세포주에서 시간에 따른 세포내 칼슘농도의 증가를 확인할 수 있었다 (그림 8B).
시상하부 신경세포주, GT1 배양 및 adenovirus를 infection한 새로운 모델 구축	<ul style="list-style-type: none"> ● GT1 세포주에서 주기가 짧은 맥동성의 전사적 조절과 transfection의 문제점을 극복하기 위하여 ds-luciferase를 이용한 adenovirus를 만들기 위한 벡터를 제작하였다. ● GnRH 프로모터 (pGnRH)와 ds-luciferase가 연결된 벡터인 pSC-R1Lamda2R2와 adenovirus backbone 벡터인 pAD-HTS3-GN를 준비하였다. (그림9A, B) ● Transcriptional inhibitor인 cyclohexamide에 의한 dsLuciferase 민감기 감소결과로 일주기성보다 짧은 주기의 전사활성 측정의 가능성을 시사하였다 (그림9 C,D).
송과선 기원 세포주, PGTβ 배양	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰쥐 송과체에서 기원한 PGTβ세포주에서 멜라토닌 수용체의 발현을 RT-PCR을 통해 살펴본 결과 아형태 1a와 1c 그리고 또 다른 멜라토닌 수용체로 알려진 RORα와 β 유전자 발현을 확인하였다 (그림10A). ● 그러나 멜라토닌 합성에 필수적인 NAT 프로모터의 활성을 luciferase assay를 통해 살펴본 결과 멜라토닌을 분비하지 않는 섬유세포기원 세포주인 NIH-3T3와 비교해서 특이적인 NAT 프로모터의 활성이 증가되지 않아 이 세포주의 차후 활용이 제한된다 (그림10B).
Baculovirus와 adenovirus에 이용한 다양한 세포에 유전자 도입 (새로운 세포배양 방법 고안)	<ul style="list-style-type: none"> ● 형광리포터 유전자인 CFP를 발현하는 baculovirus(CFP-Bac)를 제작하여 곤충세포주인 SF21에 감염시킨 후, 형광현미경을 이용해 SF21에서 발현하는 CFP를 확인할 수 있었다 (그림11A). ● 형광리포터 유전자인 GFP를 발현하는 adenovirus(GFP-Adv)를 제작하여 GT1, GH3, SCN2.2 그리고 NIH3T3 등 세포주에 감염시킨 후, 바이러스 농도 의존적인 GFP 발현 증가를 형광현미경을 통해 확인하였다 (그림11B).
2. 생체시계 조절유전자 발현의 on/off system 구축	
생체시계 조절 유전자 Bmal1 발현의 Tet-On/Off 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> ● TRE (tetracycline response element)에 일주기 유전자인 Bmal1을 결합하여 Tet-on Bmal1 벡터를 클로닝하고 CHO세포에 유전자 도입 후 안정적으로 발현하는 세포를 항생제인 neomycine을 사용하여 선별적으로 분리, 동정하였다 (그림 12A, B). ● M34-Luc (Clock/Bmal1 이합체가 결합하는 cis-element인 E-box를 가진 luciferase reporter vector)와 pcDNA3.1에 클로닝된 Clock과 Bmal1 유전자를 CHO 세포에 transfection하여 luciferase 활성분석을 분석하였다 (그림12 C).

	<ul style="list-style-type: none"> ● TRE-Bmal1 시스템이 안정화된 세포주에 M34-Luc를 transfection 후 TRE를 활성화하기 위해서 tetracycline 유사물질인 doxycycline을 처리하여 Bmal1을 과발현됨을 확인함으로써 Bmal1을 발현시킬 수 있는 Tet-on/off 시스템의 기반을 구축하였다. ● Doxycycline에 의한 Bmal1을 발현하는 세포주에서 Cry1의 일주기 발현을 확인하였고, 일주기 유전자의 조절을 받는 것으로 알려진 SRp40의 시간에 따른 발현변화를 Northern blot 분석법으로 비교분석하였으나 SRp40의 일주기적 발현양상에는 변화를 주지는 않았다 (그림13). ● 이상의 연구 결과는 Tet-on 시스템을 사용하여 일주기 유전자 조절 시스템을 인위적으로 증가 조절하기 보다는 새로운 물질 및 유전자의 영향에 의한 조절의 중요성을 시사한다.
<p>Real-time RT-PCR을 이용하여 생쥐 간조직에서 여러 일주기 유전자 (Bmal1, mPer1, mPer2, mCry2)의 24시간 발현의 정량적 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET)와 probe hybridization을 응용하여 PCR을 실시간으로 측정할 수 있는 정량적 Real-time PCR 방법을 이용하여 생쥐의 간에서의 생체시계 유전자 발현을 측정하였다 (그림14). ● 생체시계 유전자 중 24시간 일주기 리듬이 상대적인 Bmal1과 Per1, Per2 그리고 Cry2의 전사를 정량적으로 측정하여 Per1과 Per2의 일주기 리듬과 Bmal1의 일주기 리듬이 생쥐의 간에서도 서로 상대적인 발현을 하는 것을 통해 이들이 상호작용하여 조절함을 확인하였을 뿐만 아니라 생체시계 유전자의 전사를 실시간으로 정량적 측정기술을 확립하였다 (그림15).
<p>일주기 유전자 Bmal1의 발현에 의한 세포사</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Stress 호르몬으로 알려진 Glucocorticoid(GC)에 의한 외부적 자극이 생체시계 유전자에 직·간접적으로 영향을 주고 있다는 기존의 보고에 의거하여 GC에 의한 일주기 유전자의 일주기성 발현과 상호연관성을 밝히고자 하였다. ● HeLa 세포에서 일주기 유전자인 Bmal1의 발현과 기능을 확인하기 위해서 형광단백질인 EGFP가 결합된 Bmal1 벡터를 제작하여, Bmal1-EGFP 벡터를 HeLa 세포에 transfection한 후 형광현미경상에서 이미징한 결과 Bmal1이 과잉 발현되면 세포사가 발생함을 확인하였다 (그림16A). ● 세포사에 Bmal1의 관계성을 보기 위해서 Bmal1-EGFP를 HeLa 세포에 transfection하였고 12시간, 4일 후에 caspase3의 활성화 확인을 위해서 caspase3의 기질인 PARP {(poly (ADP-ribose) polymerase} 분해의 양적 변화를 western blot을 통해 확인함으로써 세포사가 유발함을 보았다 (그림16B). 이외에 DNA fragmentation, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) 실험을 통해 세포사를 확인하였다 (그림16 C, D). ● Glucocorticoid의 유사물질인 dexamethasone을 Bmal1-EGFP가 발현되는 HeLa 세포에 처리한 후 형광이미징과 세포수 측정에 의해 단순히 EGFP만이 발현되는 대조군과 다르게 Bmal1-EGFP이 확연히 세포사가 감소됨을 확인하였다 (그림17). ● Dexamethasone 처리에 의해 세포사 억제유전자인 Bcl-2의 발현양이 급격히 증가함을 Northern blot을 통하여 확인하였다 (그림18 A,B). 이는 Bmal1에 의한 세포사를 GC가 차단, 세포사를 억제하는 역할을 함을 시사한다. ● GR (Glucocorticoid Receptor)과 Bmal1의 기능적 연관성을 타진하기 위해서 Bmal1-EGFP가 dexamethasone 처리에 의한 세포내 위치변화를 조사한 결과 dexamethasone을 처리하지 않은 그룹에서는 Bmal1이 핵 전체에 존재하고 있지만 dexamethasone을 처리한 그룹에서는 핵 내에서 nuclear body를 형성함을 확인하였다 (그림18 C).

3. 조절인자에 의한 일주기 활성화도 변조기술 확립

<p>전사조절인자인 CRE에 의한 일주기 유전자인 hPer1의 발현 활성화도 변조</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● hPer1 프로모터 (GeneBank Acession No. AB030817)를 RT-PCR 방법을 통해서 클로닝 하고 염기서열 분석을 하였다. 이 프로모터 상에 CLOCK/BMAL1 이합체가 결합하는 E-box가 세 개 존재하며 다른 cis-element인 CRE가 존재함을 확인하였다. 이 4 kb의 hPer1 promoter 부분을 GL3-basic에 옮겨서 phPer1-Luciferase 리포터 벡터를 제작하였다 (그림 19A, B). ● pcDNA3.1에 클로닝된 Clock, Bmal 그리고 Clock의 19번째 엑손이 결손된 dominant negative 형태인 Δ19Clock을 phPer1-Luc와 transient transfection을 수행하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 결과 CLOCK/BMAL1 이합체에 의해서 7배의 Luciferase 활성을 확인하였고, Δ19CLOCK에 의해서 경쟁적으로 저해되었다 (그림 19 C). ● hPer1 프로모터에 존재하는 CRE에 영향을 주는지를 확인하기 위해서 site-directed mutagenesis 방법을 사용하여 CRE가 결손된 돌연변이 벡터인 phPer1ΔCRE-Luc를 제작하였고 위와 동일한 luciferase 리포터 활성 실험을 수행하였다. PKA의 활성제인 forskolin, calcium A23187, PKC 활성을 위해서는 TPA, 또한 EGF를 처리함으로써 MAPK (mitogne-activated protein kinase) 신호전달체계를 활성화시킴으로써 세포내 신호전달에 의한 hPer1 promoter 영향을 확인하였다 (그림 20). ● PKA, Calcium 신호전달, ERK, MAPK경로가 각각 hPer1의 발현에 CRE를 경로한다는 사실을 확인하였다. 또한 CRE 결손 프로모터는 이러한 다양한 세포신호전달에 영향을 받지 않음으로 일주기 유전자인 hPer1은 E-box를 통한 CLOCK/BMAL1의 작용 이외에 CRE를 경로하는 다양한 신호전달에 의해서 활성화됨을 규명하였다 (그림20 C). ● 이런 각각 단일 신호전달에 의한 발현조절보다 두개의 다른 신호전달이 상호 협력적으로 더 높은 활성을 나타냄으로써 하나의 신호에 의한 것이라기보다 다양한 세포내 입력신호에 의해서 일주기 유전자가 발현됨에 상할 수 있으며, 이 중 특히 PKA가 hPer1 발현에 중요한 기능을 수행할 것으로 사료된다. ● 위의 결과를 종합해보면 일주기 유전자인 hPer1의 일주기 리듬이 E-box 이외에 CRE에 의해서 조절될 수 있으며, 24시간 일주기성은 하나의 경로가 아닌 다양한 세포외적인 요인에 의해서 활성화 될 수 있고 조절 받음을 보임으로써, 앞으로 일주기성 변조에 다양성을 제시함과 동시에 잠재적인 응용성을 밝히는데 그 의의가 있다고 사료된다.
<p>mPer2의 세포핵에서의 변역수준의 변화 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● HeLa 세포에 mPER2-EFGP에 대한 Adenovirus를 감염시키고 이틀 후 50% serum을 처리하여 핵에서의 mPER2의 변역 후의 변화를 한 시간 동안 관찰하였다 (그림21). ● mPER2는 핵에서 주로 존재하고 있으며 혈청 자극에 의해서 핵에서 세포질로의 변화는 나타나지 않지만, 18분 경과부터 핵에서의 발현양이 부분적으로 감소함을 확인할 수 있었다. ● 혈청에 의한 mPER2의 핵에서의 변화는 일주기 리듬의 하부단위 유전자의 발현 및 일주기 유전자 상호간에 단백질의 생성 및 분해와 같은 양적 변화에 의해서 조절되고 변화됨을 시사한다.
<p>곤충세포에서 일주기 유전자의 세포 내의 발현 및 위치 변화 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Clock, Bmal1, Per1, 그리고 Per2 유전자를 CFP형광단백질 결합형태의 Baculovirus로 제작하였다. ● Baculovirus를 SF21에 감염시켜서 각각의 일주기 유전자에 대한 세포내 위치를 형광현미경을 이용하여 확인하였다 (그림22). mPer1과 mPer2는

	<p>세포질에 넓게 퍼져있으며 BMAL1은 특이하게 핵 속에서 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한 CLOCK은 세포질과 세포막 주변에 speckle로 분포하고 있음을 확인하였다 (그림22).</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Baculovirus를 이용하여 곤충세포에서 일주기 유전자들의 특이적인 세포내 분포를 확인할 수 있었다. 따라서 Baculovirus를 이용한 발현시스템을 SF21 세포주에 적용하는 모델은 생체시계 유전자의 세포내 분포에 영향을 주는 새로운 신물질을 스크리닝할 수 있는 가능성을 시사한다.
--	---

4) 2단계 2년차 연구내용 및 결과 (1/4분기)

연구 내용	연구 결과
1. In vitro 모델 확립 및 효과적인 유전자 도입기술 개발	
Adenovirus를 infection한 세포주에서 일주기 유전자 및 Reporter 유전자 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> ● 일주기 유전자의 세포내 발현 및 분포를 분석하기 위해서 일주기 유전자인 생쥐의 Bmal1, Clock, Npas2, Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2와 일주기 유전자의 조절 하위단계의 유전자인 DBP에 형광단백질인 GFP를 결합된 일주기 유전자에 대한 Adenovirus를 합성 제작하였다. ● 위에서 만들어진 각각의 일주기 단백질들의 세포내 발현을 탐색하기 위해서 SCN2.2세포에 감염시킨 후 관찰한 결과 특이적으로 각 일주기 단백질들의 분포를 나타냄을 확인하였다 (그림 23).
GnRH의 맥동성 연구모델 확립 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> ● GnRH의 짧은 맥동성과 24시간의 일주기리듬의 관계성 분석을 위하여 rGnRH promoter에 destabilization luciferase를 결합시킨 벡터를 제작함으로써 일반 Luciferase의 반감기를 극소화시킴으로써 GnRH 맥동연구를 위한 prGnRH3.0-dsLuc 벡터를 만들었다 (그림 9참조). ● GT1-1세포에 prGnRH3.0-dsLuc를 Lipofectamine Transfection에 의해서 발현시켜 반감기를 확인한 결과 일반적인 Luciferase보다 반감기가 급격히 감소함을 확인함으로써 (그림 9참조) 맥동성연구 모델을 확립하였다.

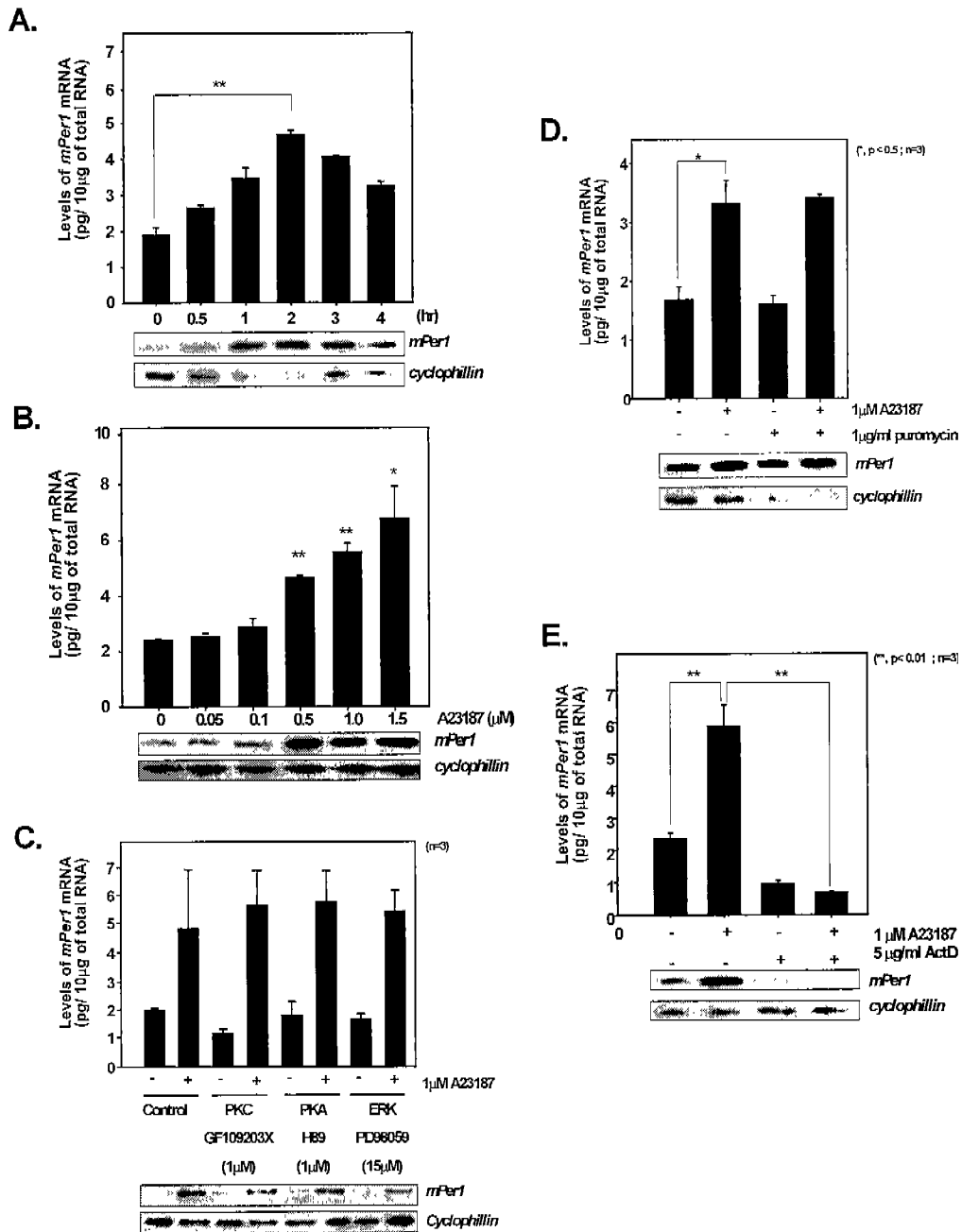


그림 1. 세포내 칼슘 증가에 의한 mPer1 유전자 발현의 조절

- A. 칼슘 ionophore A23187 처리 후 시간에 따른 mPer1 유전자 발현.
- B. 칼슘 ionophore A23187의 농도 의존적 mPer1 유전자 발현.
- C. 인산화 효소 A, C 및 ERK inhibitor 처리에 따른 mPer1 유전자 발현.
- D. 번역 억제제 Puromycin 처리에 따른 mPer1 유전자 발현.
- E. 전사 억제제 Actinomycin D 처리에 따른 mPer1 유전자 발현.

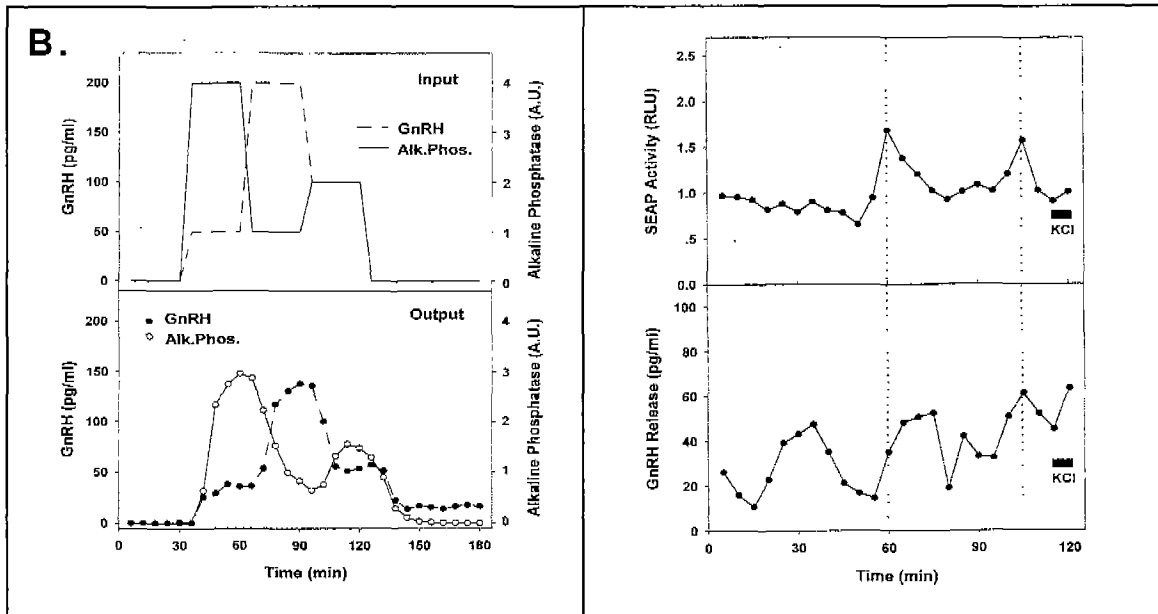
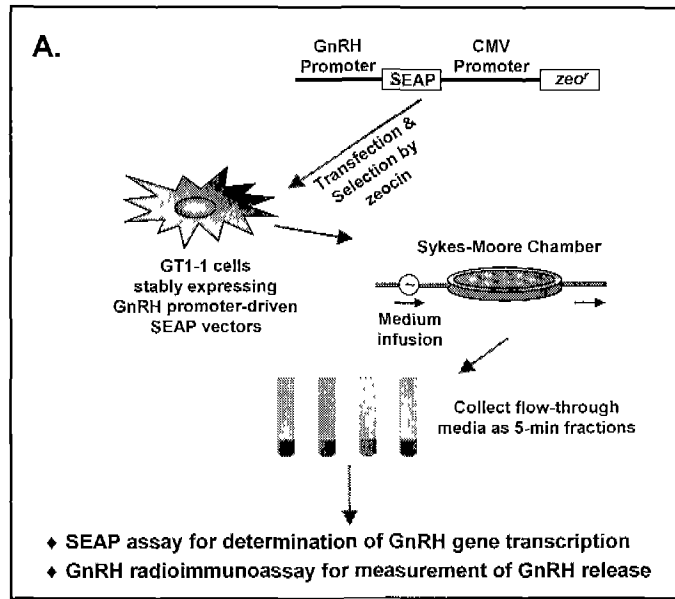
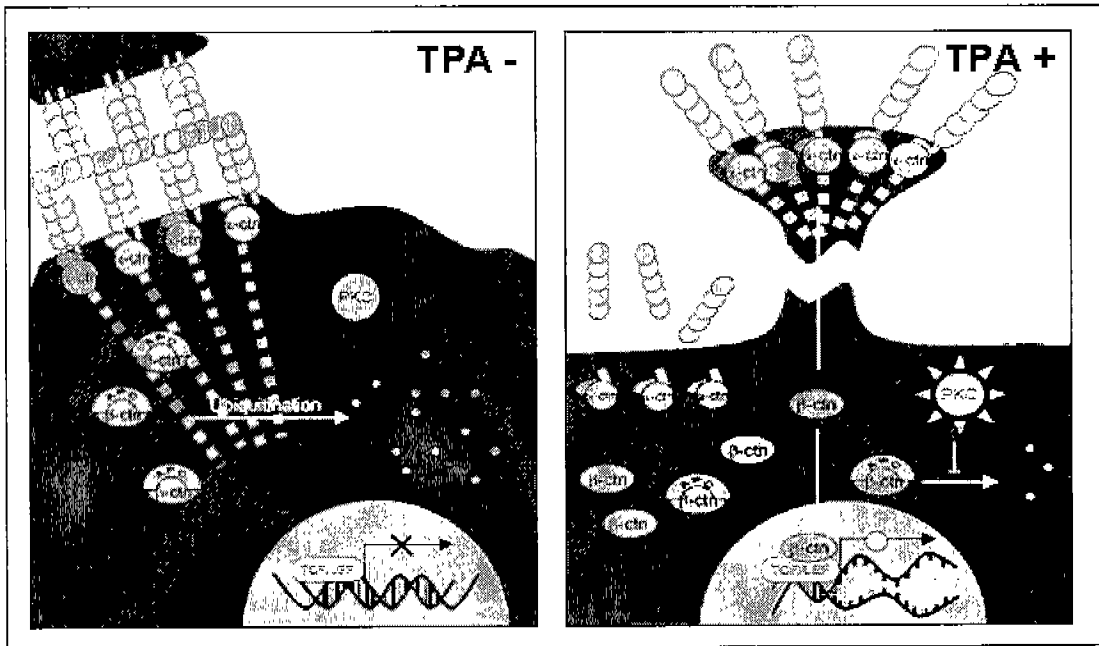
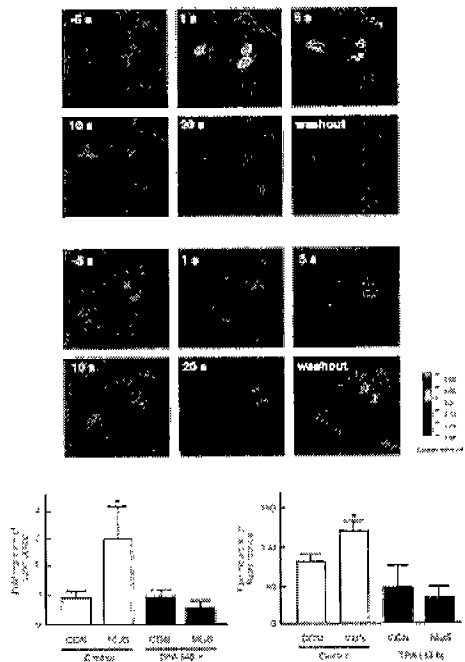


그림 2. SEAP 리포터를 이용한 GnRH 프로모터 활성과 호르몬 분비의 동시측정
 A. SEAP 리포터를 이용한 GnRH 프로모터 활성과 호르몬 분비의 동시측정 모식도.
 B. 호르몬 분비와 프로모터 활성 동시측정용 Sykes-Moore chamber에 입력된 호르몬과 SEAP의 양이 같은 농도로 출력되도록 시스템을 최적화하여 (왼쪽), GnRH 프로모터를 stable transfection한 GT1세포에서 GnRH 프로모터의 활성과 GnRH 신경호르몬의 분비를 동시에 측정하였다 (오른쪽).

A.



B.



C.

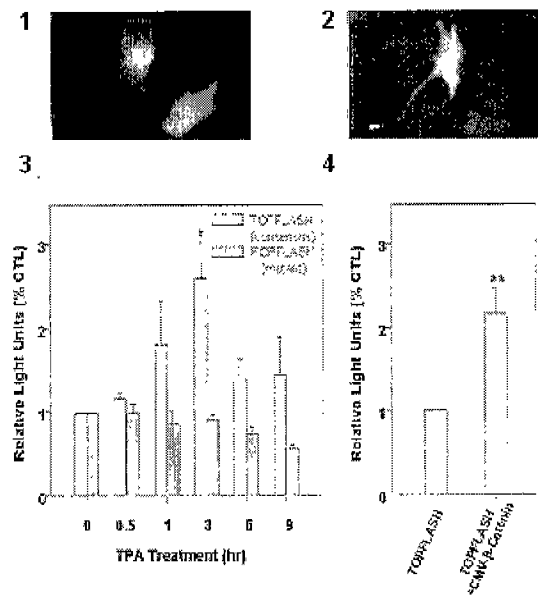


그림 3. PKC 활성화와 β -catenin에 의한 GT1 신경세포의 분화

- A. PKC 활성화에 의한 GT1 신경세포 분화의 모식도.
- B. PKC 활성을 전후로 한 GT1 신경세포의 기능적 분화. GABA-A 수용체의 agonist인 muscimol의 처리에 의해 세포내 칼슘의 변화를 분화 전후의 GT1 세포에서 측정하였다.
- C. GT1 세포에 GFP를 발현하였을 때는 세포의 형태적 변화가 없었으나 (1) GFP-tagging된 세포접착인자 β -catenin을 과발현하면 GT1 세포의 분화가 유도된다 (2). PKC 활성화는 β -catenin의 전사활성을 증가시켰다 (3, 4).

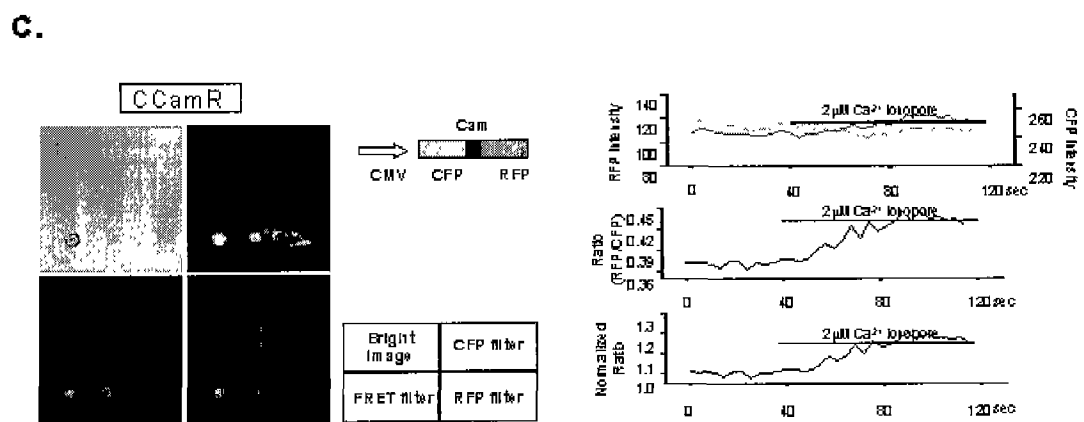
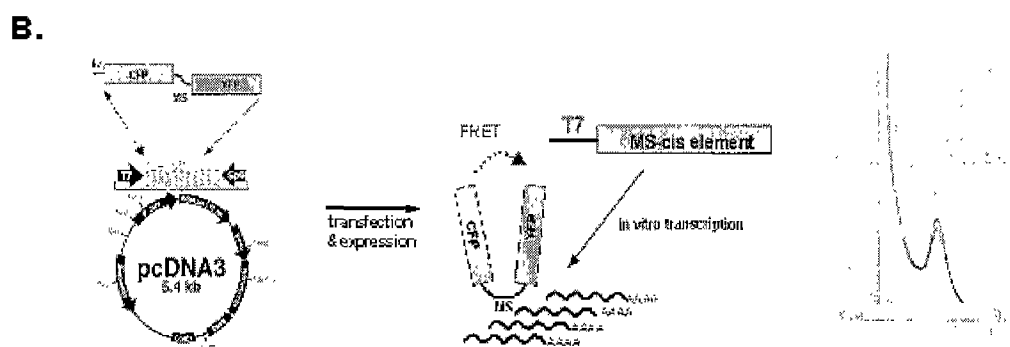
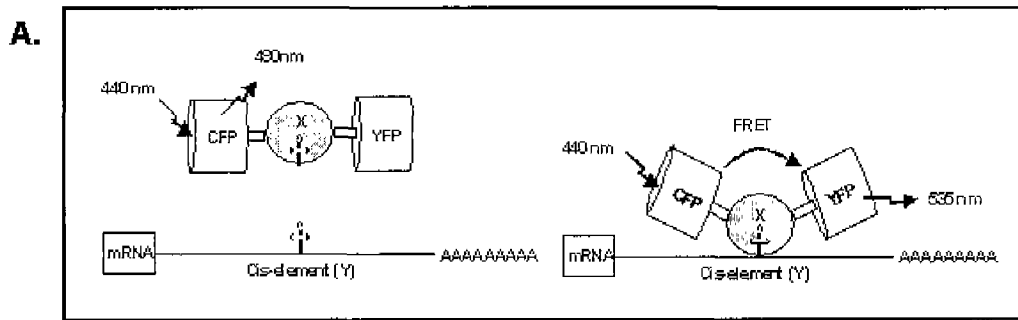


그림 4. FRET 기술을 이용한 유전자 발현 측정과 공초점 현미경에서 생리활성물질 칼슘의 측정

- A. FRET을 이용한 표적 유전자의 발현 측정의 원리.
- B. 유전자 발현 측정용 FRET 센서인 CMY MS-coat 단백질과 MS-sis mRNA를 이용한 *in vitro* 조건에서 유전자의 발현 측정.
- C. RFP와 CFP를 이용한 공초점 현미경에서 칼슘을 측정할 수 있는 FRET 센서와 칼슘 ionophore로 증가된 세포내 칼슘을 FRET 효율로 측정.

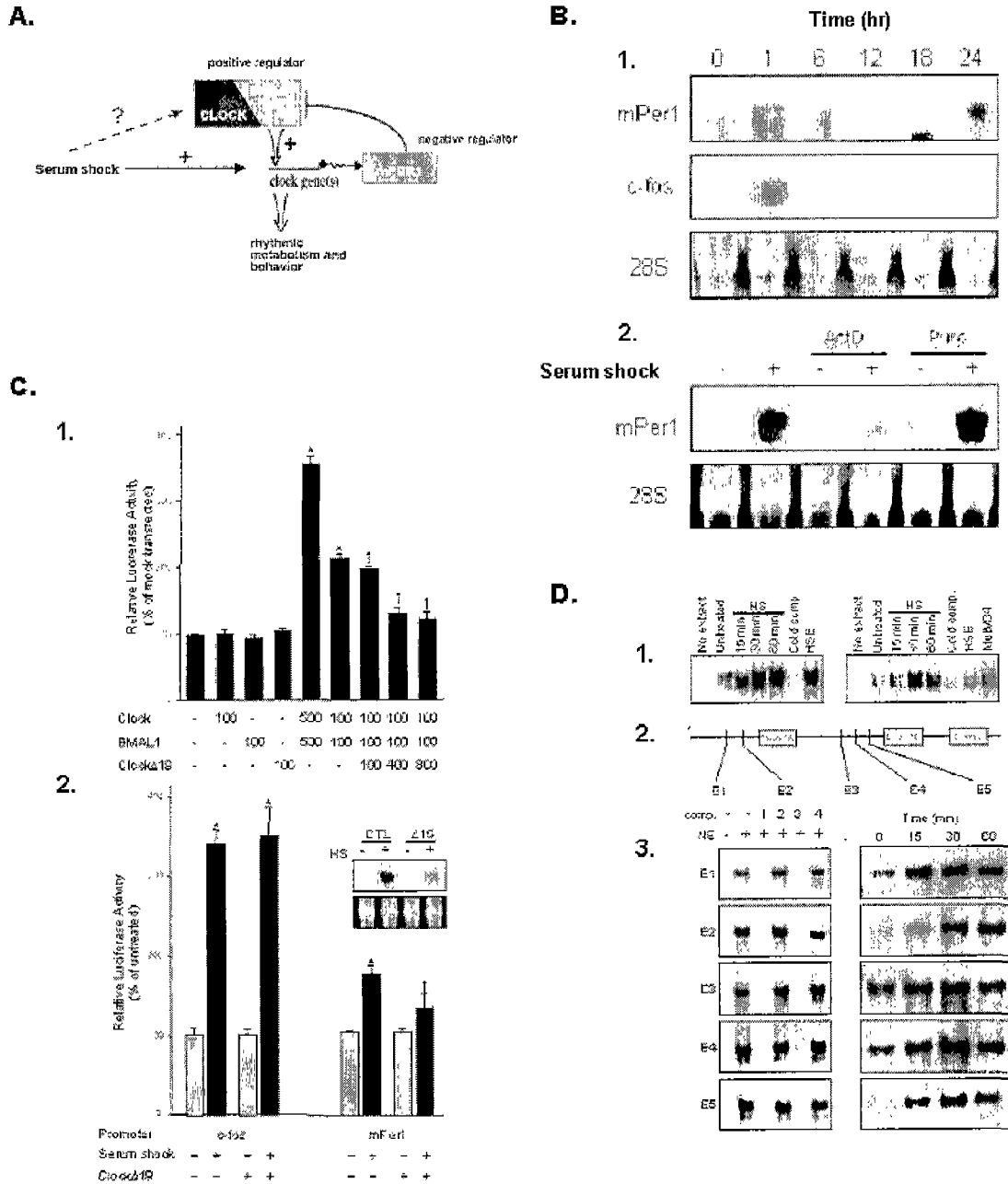


그림 5. 생체시계 재설정에 관련된 mPer1 유전자의 전사 증가 시 CLOCK:BMAL1 생체시계 조절인자의 기능 분석

- A. 생체시계 유전자 조절 네트워크의 모식도.
- B. Serum shock에 의해 mPer1 유전자는 24 시간 후 다시 증가된 반면 c-fos는 증가하지 않았으며 (1) 이는 단백질 합성 억제제인 Puromycin 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (2).
- C. 생체시계 활성 측정용 리포터 M34-Luc의 활성에 CLOCK의 dominant-negative 조절자인 ClockΔ19가 농도 의존적으로 억제적 기능을 하며 (1) 또한, mPer1 프로모터의 활성도 ClockΔ19의 발현으로 저해되었다 (2).
- D. Serum shock에 의해서 mPer1 프로모터에 binding하는 핵단백질이 30분내 증가하였으며 (1), 이는 mPer1 프로모터에 존재하는 각 E-box (2)에 조절인자가 binding함을 확인하였다 (3).

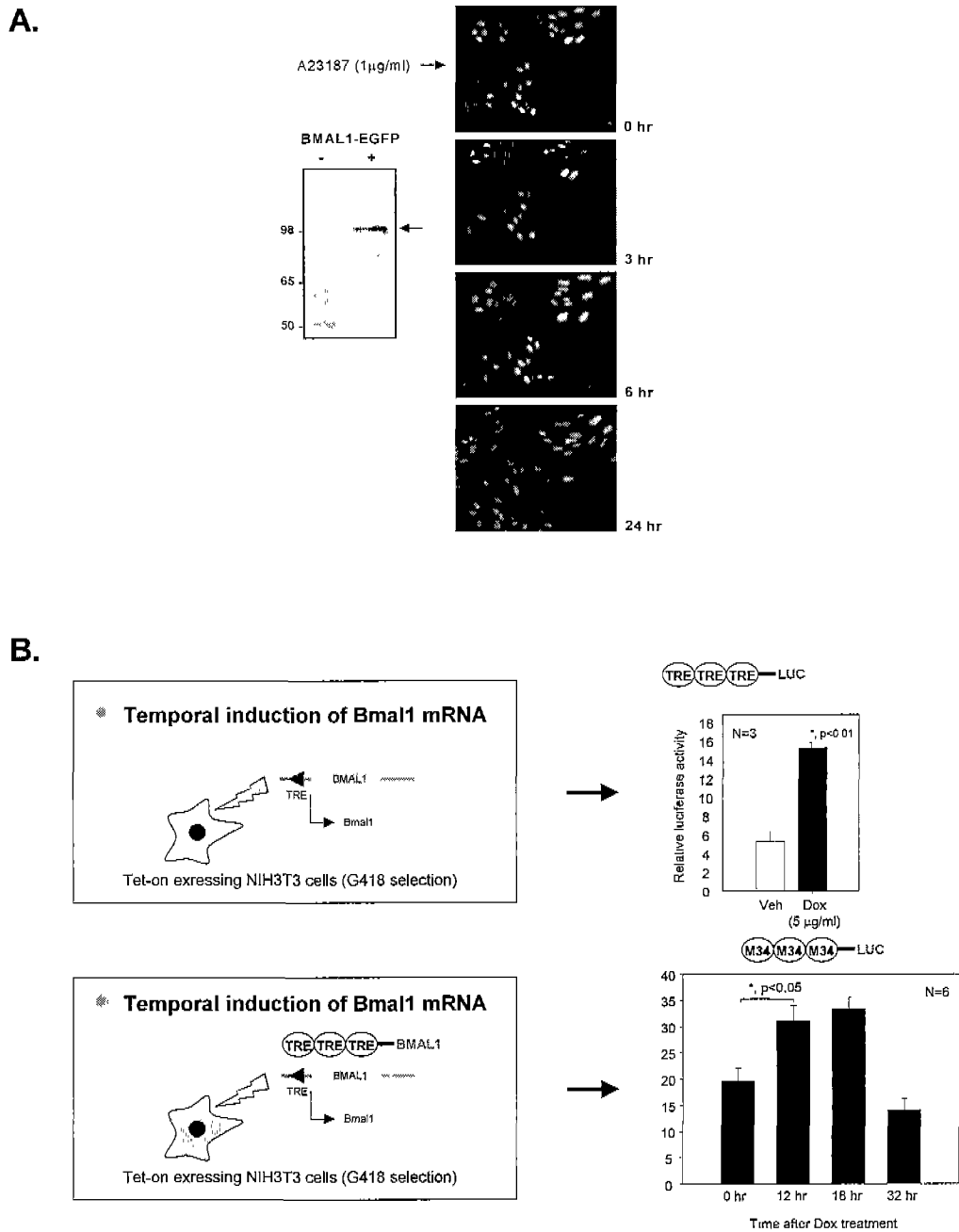


그림 6. 생체시계 조절인자 활성의 cell-based assay 시스템과 생체시계 조절인자 BMAL1의 on/off 시스템

- 생체시계 조절인자 BMAL1의 GFP 형광체를 stable expression 세포주에서 칼슘 ionophore A23187 처리에 따른 하루 주기의 활성 측정.
- 생체시계 조절인자 BMAL1의 발현을 tetracycline으로 on/off 할 수 있는 in vitro 모델과 tetracycline의 유사체인 doxycycline 처리에 따른 리포터 유전자의 활성 측정.

Accession No.	유전자	기능
AF361435	Mus musculus neuronal development-associated protein 7 (Ndap7) mRNA,	GABAergic neurons에서 발현되며 기능은 밝혀지지 않았음
NM014939	Homo sapiens KIAA1012 protein	세포신호전달, 정보, 구조 및 핵산 유지의 역할을 수행할것으로 예상되는 mRNA
Y13832	GT12 protein	발생 분비기관의 포피낭과 중추 신경계의 부분에서 근분화에 역할
AB066557	kinensin	근육섬유를 구성하는 미오신의 성분
BC019443	MGC:30540 IMAGE:5041121	밝혀진 기능이 없음
NM013580	lactate dehydrogenase 3, C chain, sperm specific	대사작용
BC007152	eukaryotic translation elongation factor 2	번역에서의 기능수행
NM033561	Williams-Beuren syndrome chromosome region 1	미세결핍으로 생기는 복합성 신경발생 질환
NM010438	hexokinase 1	당대사에 관여하는 인산화효소
NM019875	ATP-binding cassette, sub-family B	식세포나 분비가 일어나는 조직 존재
XM086996	GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE	대사작용
NM009093	ribosomal protein S29	KREV1의 tumor suppressor activity를 강화
BC018321	ribosomal protein L12	nuclear import pathway
U95498	AF1q mRNA	밝혀지지않음
AK016011	adult male testis cDNA, RIKEN full-length	밝혀지지않음
NM019930	RAN binding protein 9	밝혀지지않음
AF006465	B cell antigen receptor Ig beta associated protein 1	밝혀지지않음

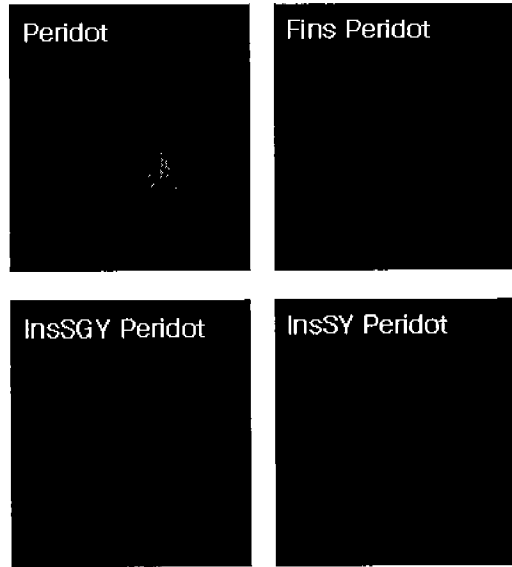
표 1. 일차 Yeast two hybrid 스크리닝에서의 positive clones

A.

```

                                145
Peridot      KLEYN YGGSGAS  NSHNVYIMA
             : : : : : : : : : : : : : : :
Fins         KLEYN FGGSGAS  NSHNVYIMA
             : : : : : : : : : : : : : : :
InsSY        KLEYN  GSGASY  NSHNVYIMA
             : : : : : : : : : : : : : : :
InsSGY       KLEYN  GSGASGYNSHNVYIMA

                                192
YCitriIns    YQQNTPIGDGPVLLLPDNHYLSYQ
             : : : : : : : : : : : : : : :
Peridot      YQQNTPIGDGLVLLLPDNHYLSYQ
  
```



B.

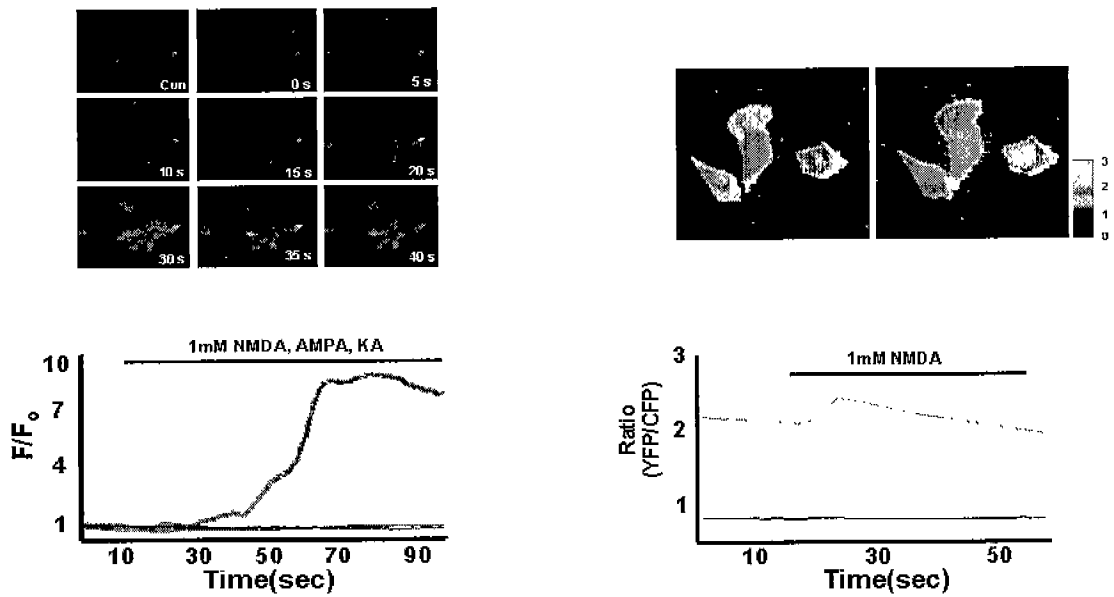


그림 7. 생리 조건에서 형광을 보이는 Peridot과 그 유사체 및 생체시계 세포주에서 생리활성물질 칼슘의 측정

- A. 삼입형 형광체 Peridot과 그 유사체 염기서열의 mutagenesis 부위 및 세포내 발현 후 green fluorescence를 공초점 현미경에서 이미징하여 측정.
- B. 생체시계 세포주인 SCN2.2 세포에서 fluo-3 칼슘 형광체와 FRET 센서를 이용한 NMDA 수용체 경유 칼슘의 측정.

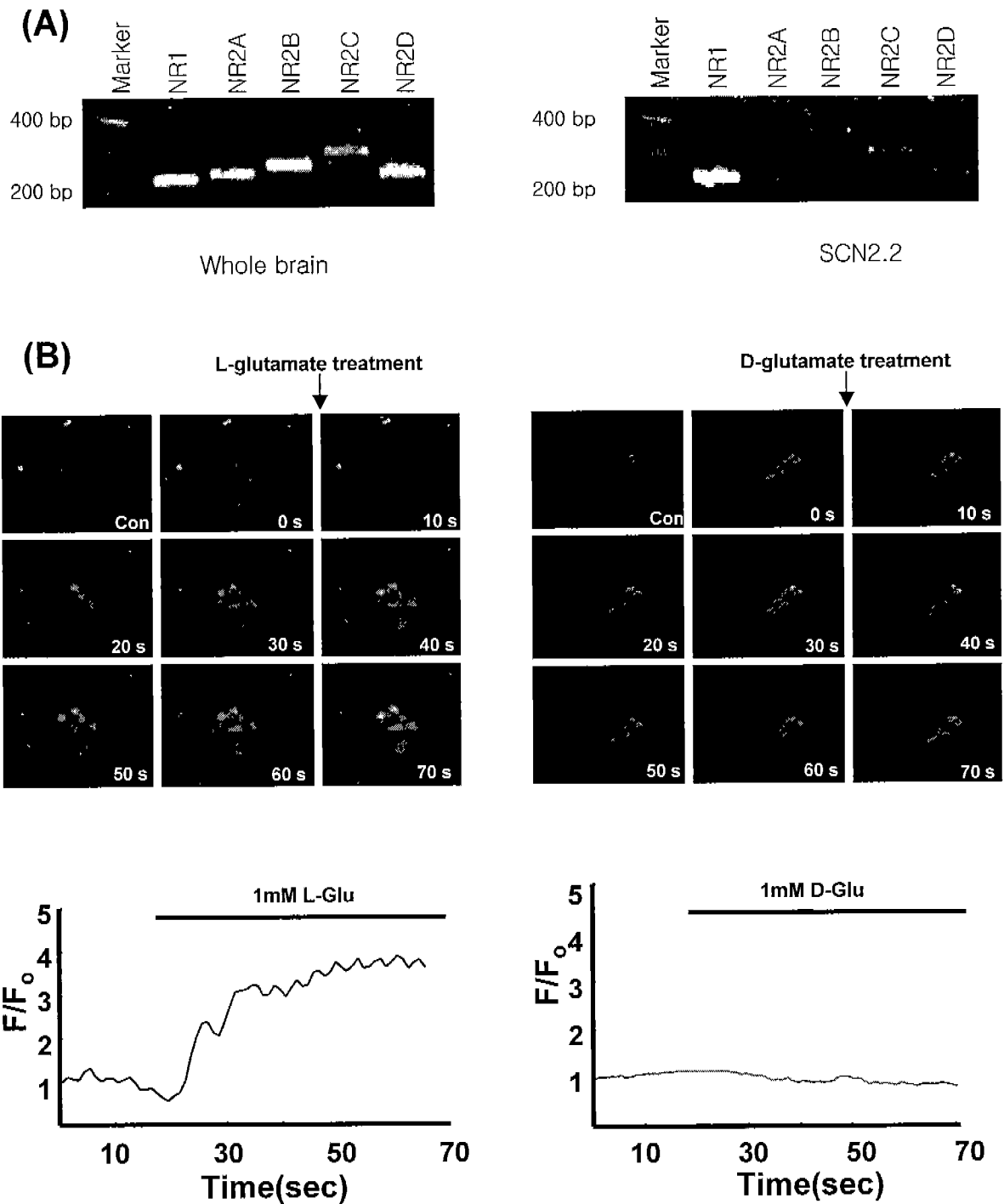


그림 8. SCN2.2 세포주에서의 NMDA 수용체 발현과 glutamate에 의한 세포내 칼슘농도 변화

- A. RT-PCR을 통한 흰쥐 뇌 전체와 SCN2.2 세포주에서의 NMDA 수용체 아형태 유전자 발현 확인
- B. Fluo3-AM 형광 물질을 이용한 glutamate 처리에 의한 시간에 따른 세포내 칼슘농도의 변화 관찰

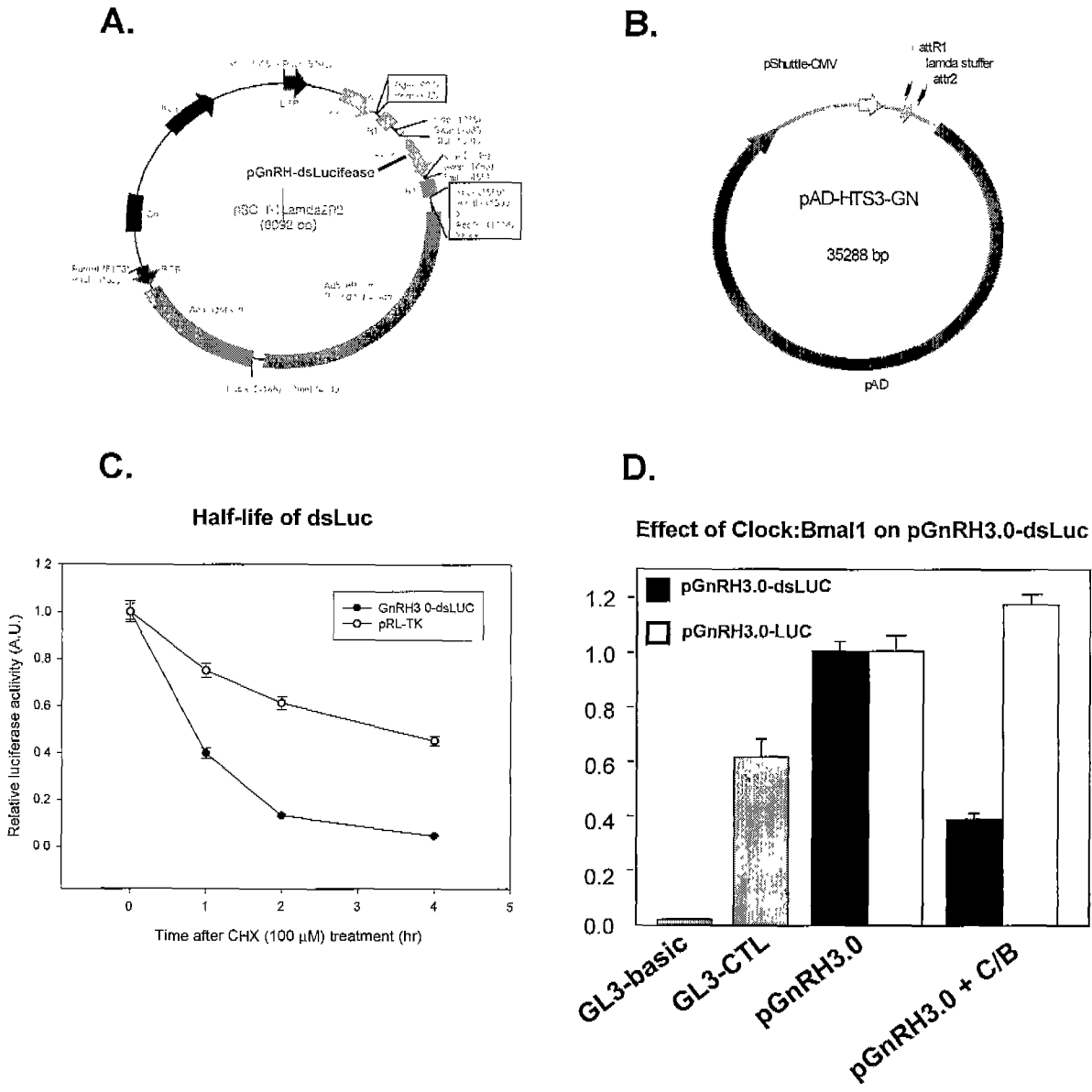
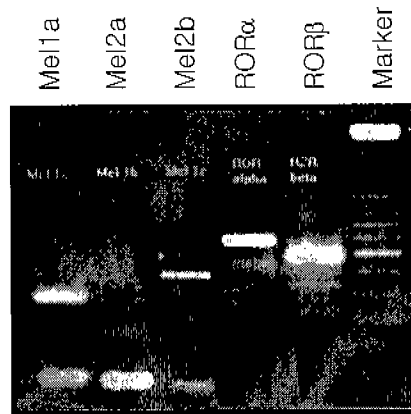


그림 9. 불안정화시킨 luciferase (ds-luciferase)를 이용한 adenovirus 제작

- A. GnRH 프로모터(pGnRH)와 ds-luciferase 가 연결된 벡터, pSC-R1Lamda2R2
- B. Adenovirus backbone 벡터인 pAD-HTS3-GN
- C. Cyclohexamide 처리 후 ds-luciferase의 반감기 확인
- D. pGnRH3.0-dsLuc의 CLOCK:BMAL1 이합체에 의한 영향 측정

(A)



(B)

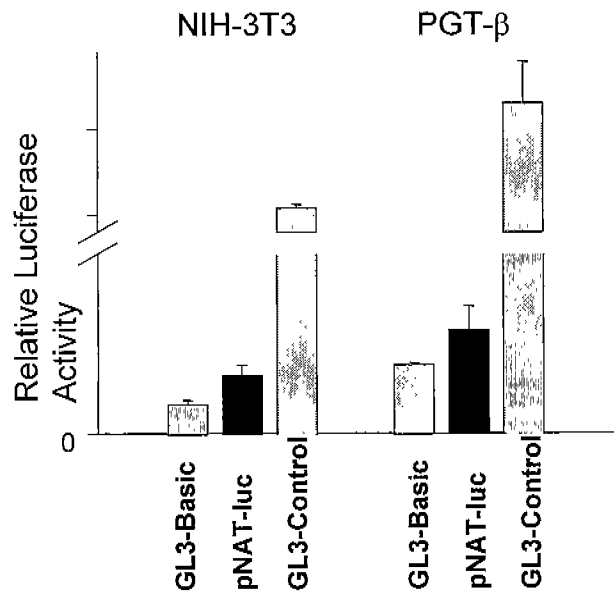


그림 10. PGTβ 세포주에서의 멜라토닌 수용체의 발현과 NAT 프로모터의 활성 측정

A. PGTβ 세포주에서 추출한 mRNA를 이용한 RT-PCR을 통해 멜라토닌 수용체 아형태의 유전자 발현 확인

B. Luciferase assay를 이용하여 NIH3T3 세포주와 PGTβ 세포주에서 NAT 프로모터의 활성 확인

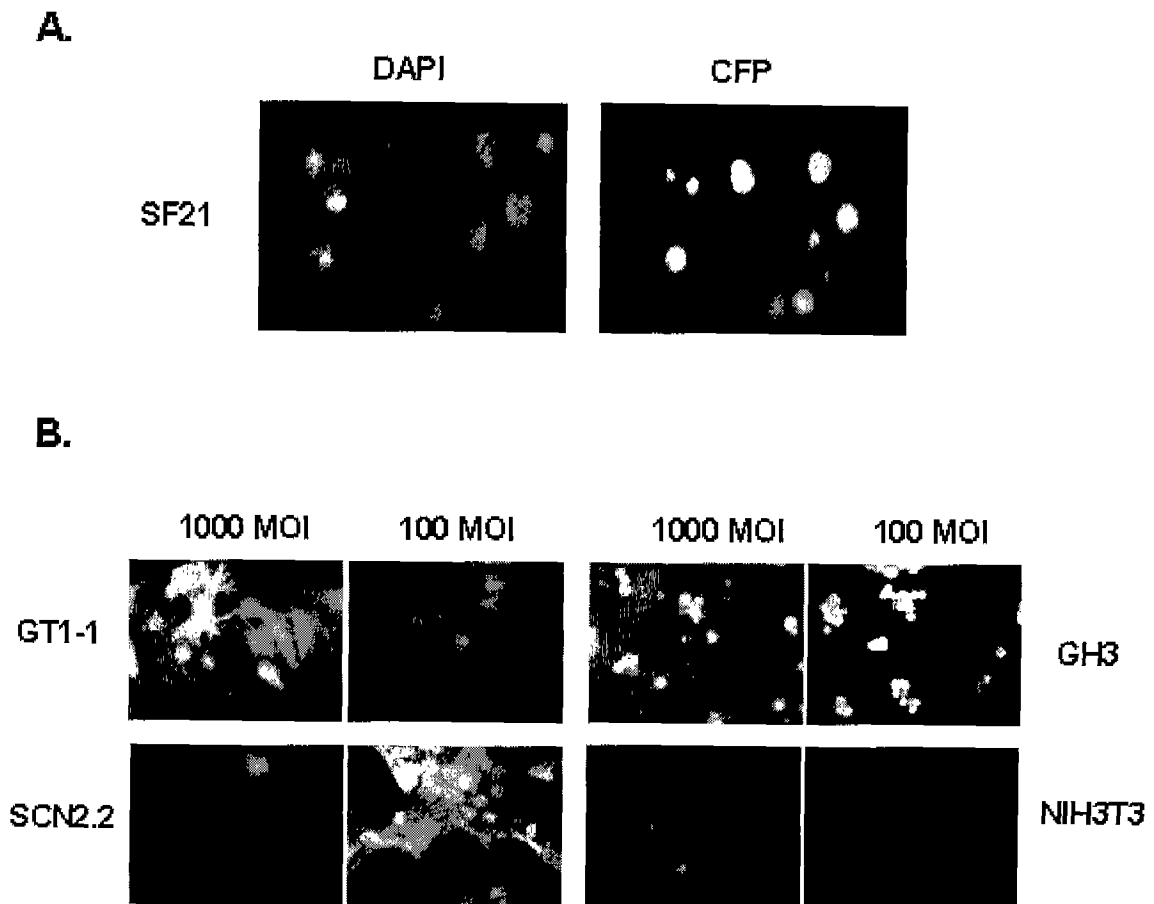
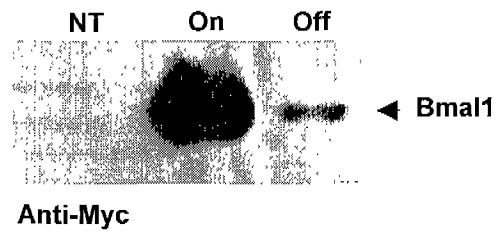
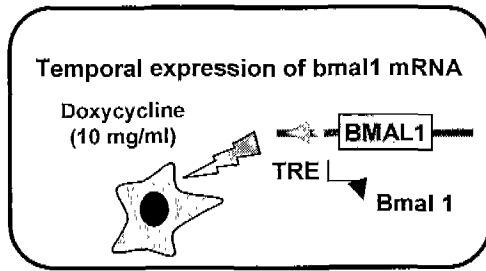


그림 11. 체외배양중인 세포주에 Baculovirus와 adenovirus를 이용한 유전자 발현

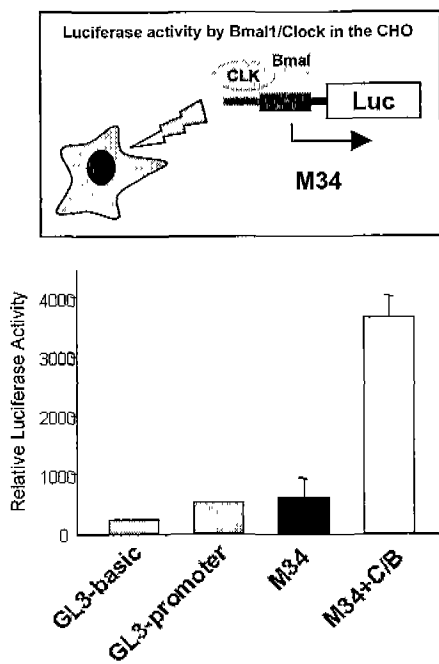
A. Baculovirus를 이용한 SF21에서의 CFP 형광단백질 발현

B. Adenovirus를 이용한 여러 세포주에서의 GFP 형광단백질 발현

A.



B.



C.

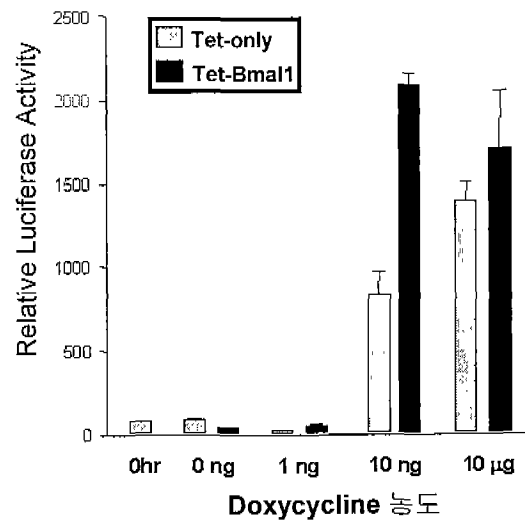


그림 12. CLOCK/BMAL1에 의한 Luciferase 활성도 및 TRE-Bmal1 발현 및 활성도

- TRE-Bmal1 벡터 제작 및 실험모델, Vector를 transfection 하지 않은 대조군 (NT)과 TRE-Bmal1 을 transfection을 Doxycycline 10µg/ml을 처리한 것 (On)과 안한 것(Off)에 따른 Bmal1의 발현 측정
- Clock/Bmal1에 의한 M34에 대한 luciferase reporter assay. M34와 Luciferase 대조군 벡터를 Clock, Bmal1와 함께 transfection 하여 CHO 세포에서의 Luciferase 활성 측정
- TRE-Bmal1을 안정적으로 발현하는 세포에서 Doxycycline 농도별 luciferase 활성도 측정.

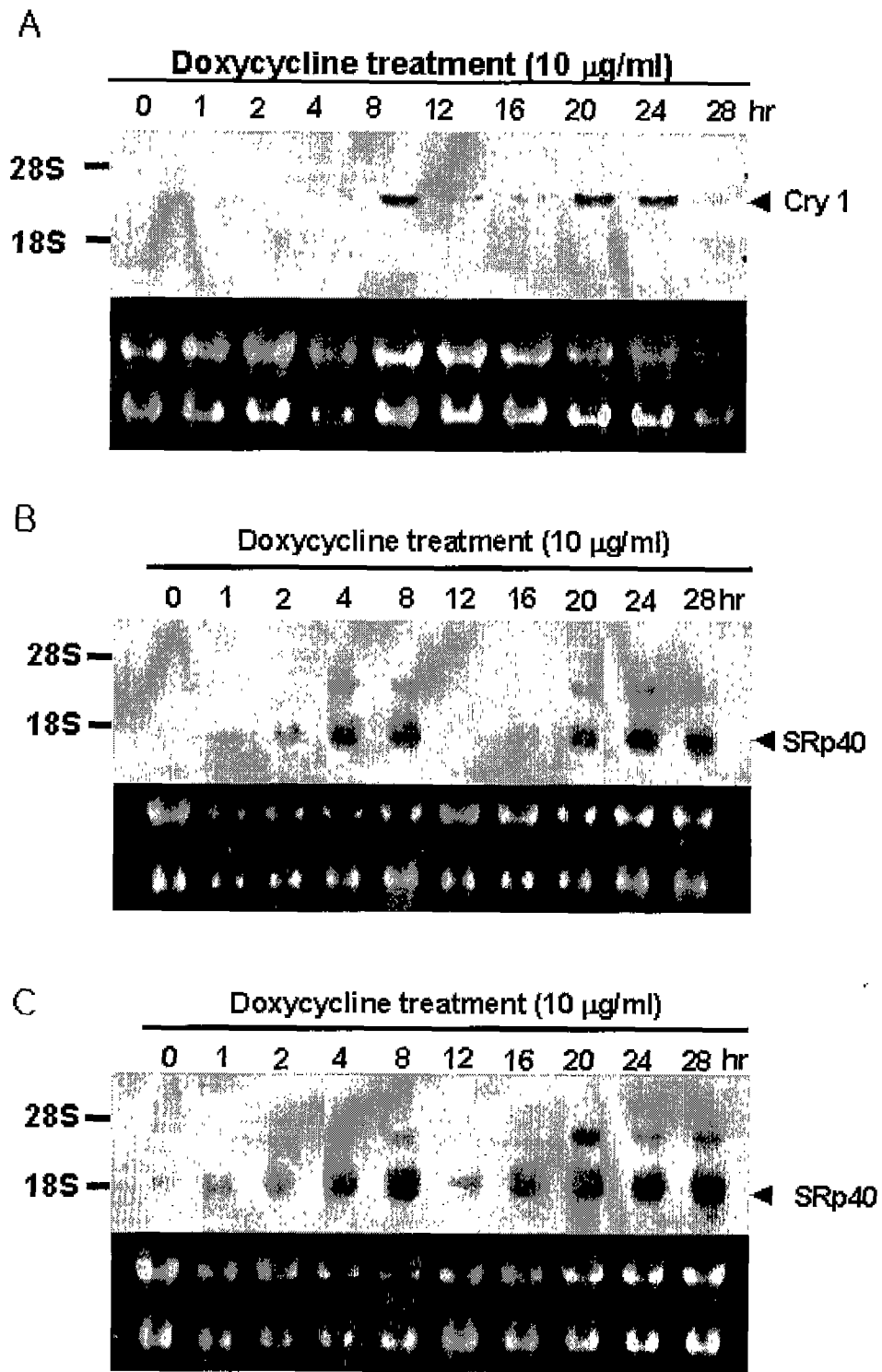
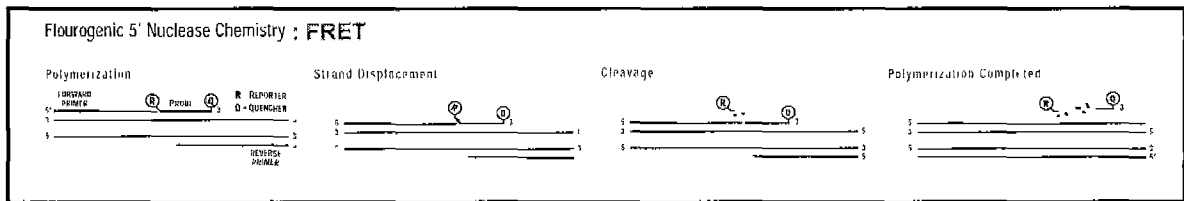


그림 13. TRE-Bmal1 세포에서 mCry1와 하부 유전자 SRp40의 일주기성 분석

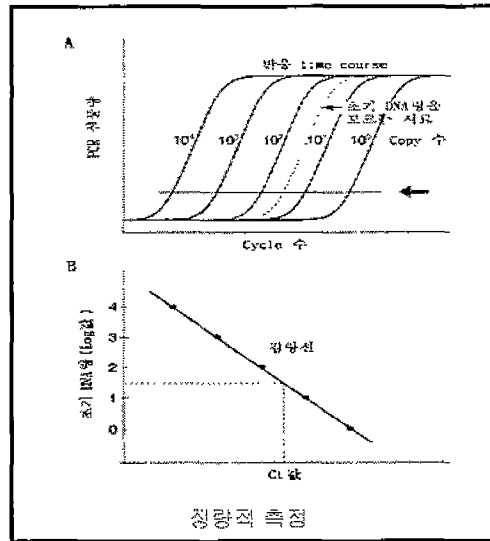
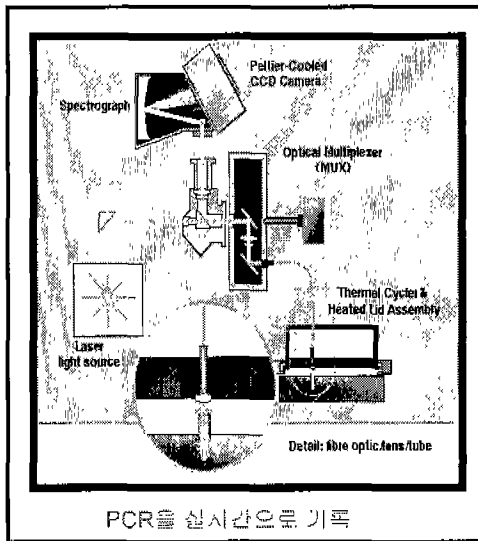
A. TRE-Bmal1 세포주에서 일주기 유전자인 mCry1의 24시간 일주기성 확인

B. TRE만 갖는 대조군에서 일주기 유전자의 조절을 받는 SRp40의 발현양상을 28시간 동안 측정

C. TRE-Bmal1 세포주에서 SRp40의 일주기적 발현 측정



FRET과 probe hybridization을 이용한 PCR의 실시간 측정



[Real-time PCR을 이용한 mRNA 정량의 사례]

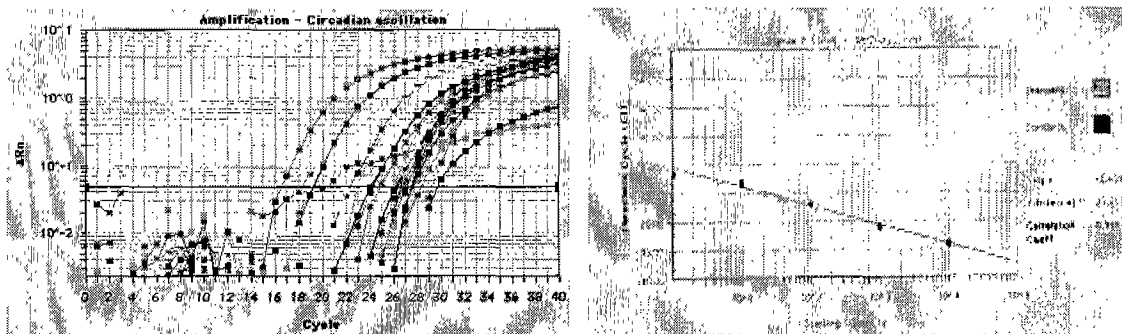


그림 14. Quantitative Real-time RT-PCR 원리 모식도

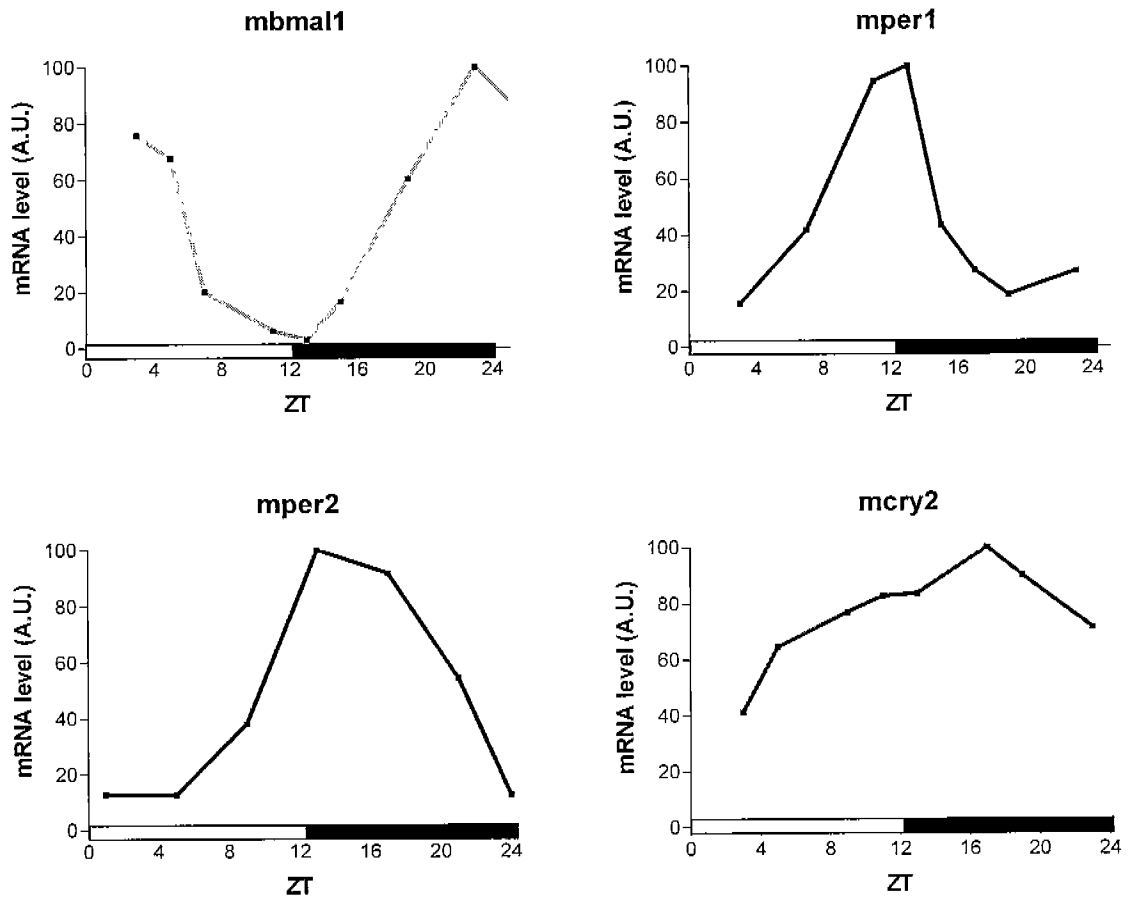
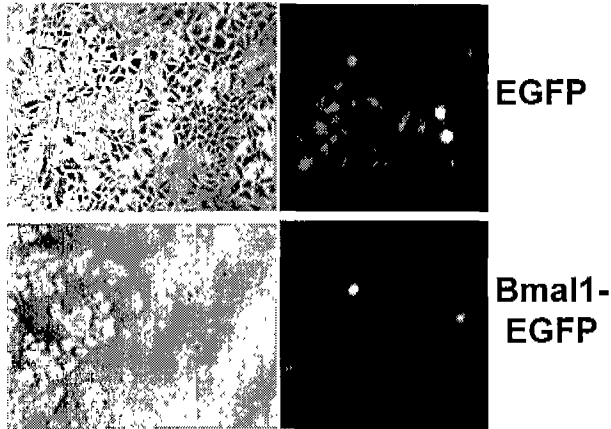
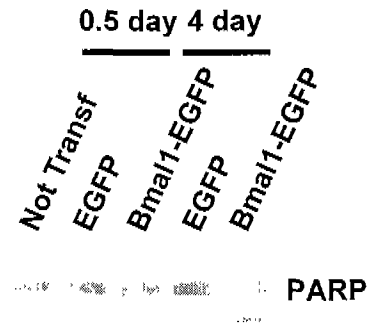


그림 15. Real-time RT-PCR을 이용한 생쥐의 생체시계 유전자의 일주기 리듬
mbmal1, mper1, mper2, 그리고 mcry2의 24시간 일주기에 따른 전사 측정

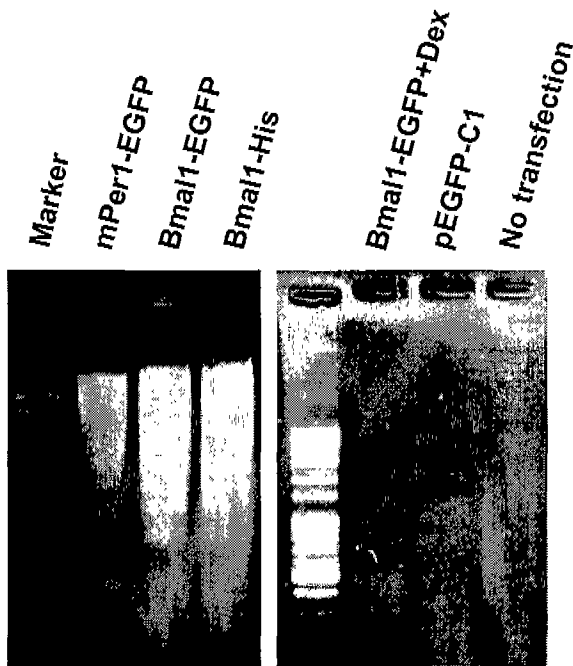
A. HeLa cells transfected with EGFP or Bmal1-EGFP



B. Activation of caspase



C. DNA fragmentation



D. TUNEL

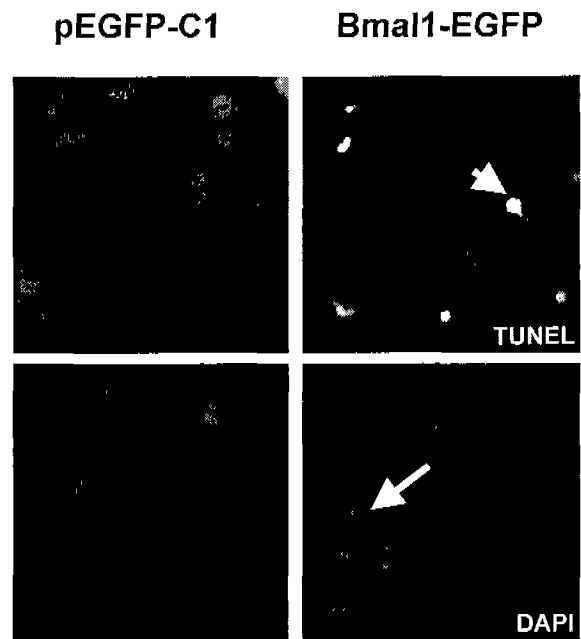
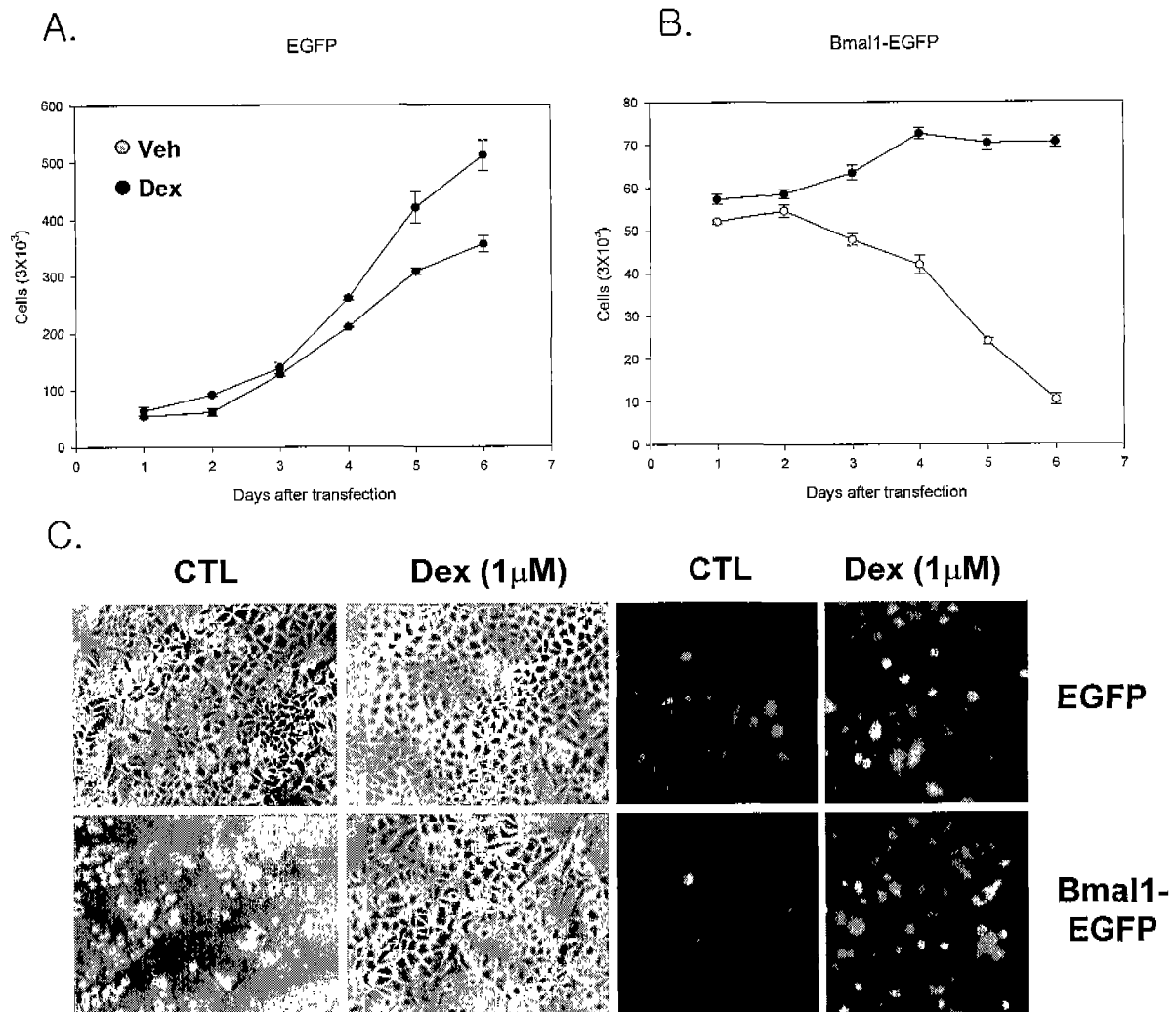


그림 16. HeLa 세포에서 Bmal1-EGFP에 의한 세포 사멸(Apoptosis)

- A. Bmal1-EGFP transfection 후 4일 후 세포 관찰
- B. Bmal1-EGFP transfection 후 12시간, 4일이 지난 다음 세포 추출물로 부터 PARP의 분해량을 Western blot을 확인
- C. HeLa 세포에 mPer1-EGFP, Bmal1-EGFP, Bmal1-His, EGFP를 각각 transfection 후에 1% agarose 겔 전기영동 수행
- D. EGFP, Bmal1-EGFP transfection한 세포를 4% paraformaldehyde로 고정후 TUNEL 분석



Representative images of HeLa cells transfected with EGFP or Bmal1-EGFP (4-day after transfection)

그림 17. Bmal1-EGFP에 의한 세포사멸에서 Dexametasone의 저해 효과

- A, B. EGFP와 Bmal1-EGFP가 transfection된 HeLa 세포에 dexamethasone (1 μ M) 처리 후 trypan blue 염색으로 살아있는 세포수를 측정
- C. Transfection 4일 후에 형광현미경으로 세포사멸 확인

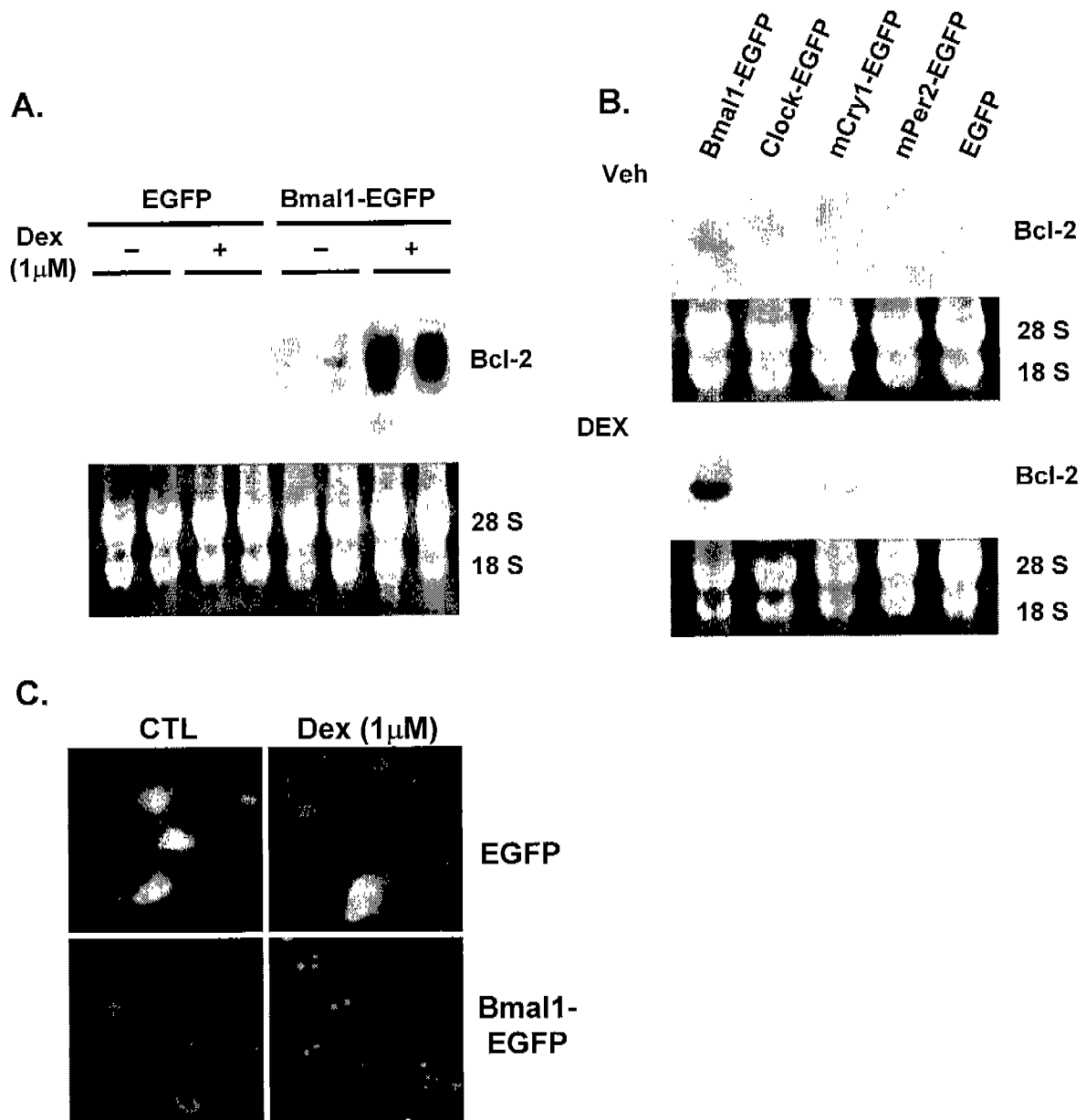
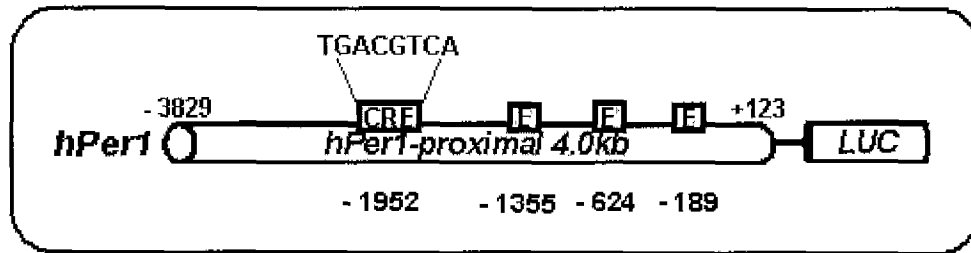


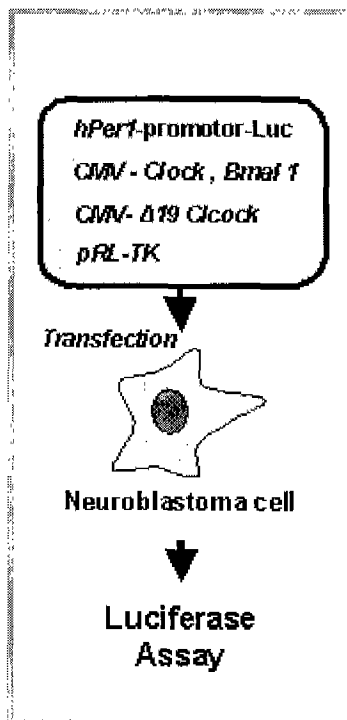
그림 18. Bmal1과 GR의 동시 활성화에 의한 세포사멸 저해 유전자인 Bcl-2의 발현

- A. EGFP와 Bmal1-EGFP를 transfection 한 후 Bcl-2의 전사수준에서의 발현을 Northern blot 분석
 B. Dexamethasone 처리에 의한 Bmal1-, Clock-EGFP, mCry1-EGFP, 그리고 mPer1-EGFP를 각각 transfection 한 후 Bcl-2의 발현 확인
 C. Bmal1-EGFP가 발현된 HeLa 세포에 dexamethasone 처리에 의한 nuclear body 형성

A.



B.



C.

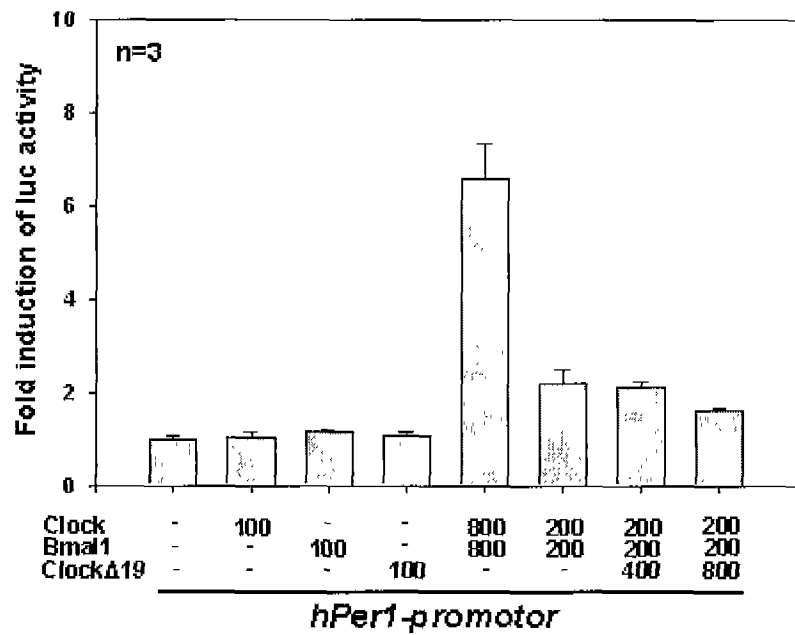
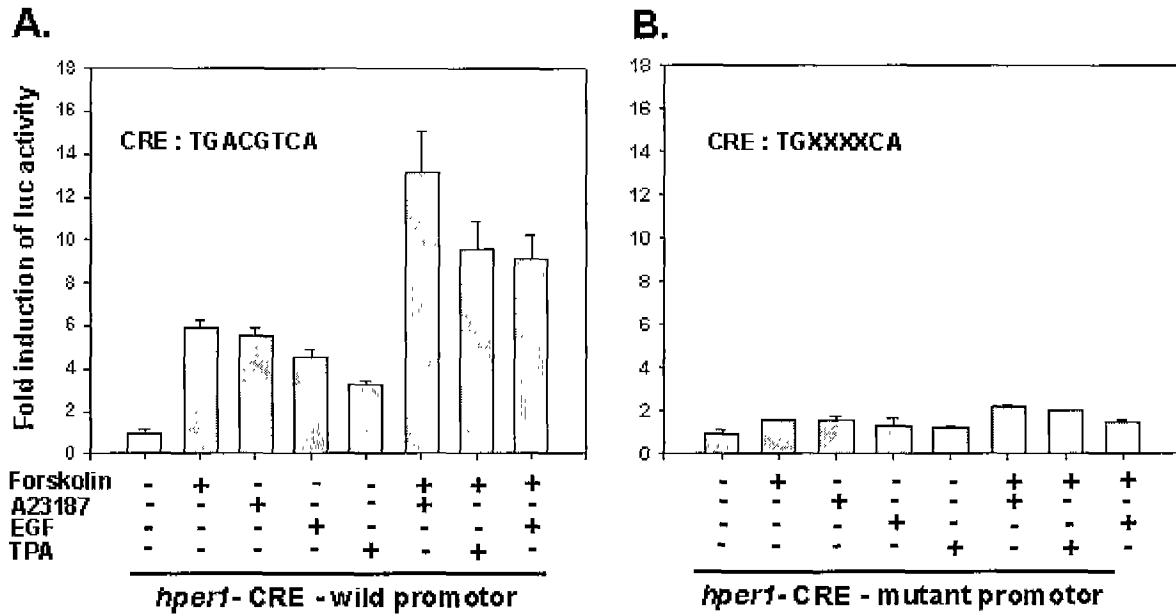


그림 19. Human Per1 promoter의 Luciferase 리포터 벡터 제작과 CLOCK/BMAL1에 의한 활성화 측정 및 CLOCKΔ19 돌연변이에 의한 경쟁적 저해

- A. hPer1-Luc reporter 벡터를 제작 구조
- B. 실험 모식도
- C. CLOCK (또는 CLOCKΔ19)/BMAL1에 의한 luciferase 활성측정



C.

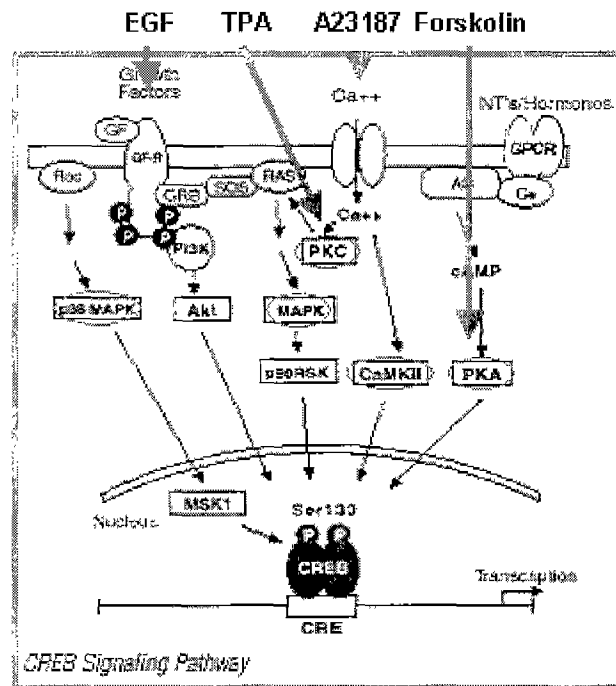


그림 20. CRE 신호경로 활성화제에 의한 *Per1* 프로모터의 활성 측정

- A. CRE 활성화제 처리 후 정상적인 *hPer1* 프로모터의 luciferase 활성도
- B. *hPerΔCRE* 프로모터의 CRE 활성화제에 의한 활성도 측정
- C. 신호전달 기작의 모식도

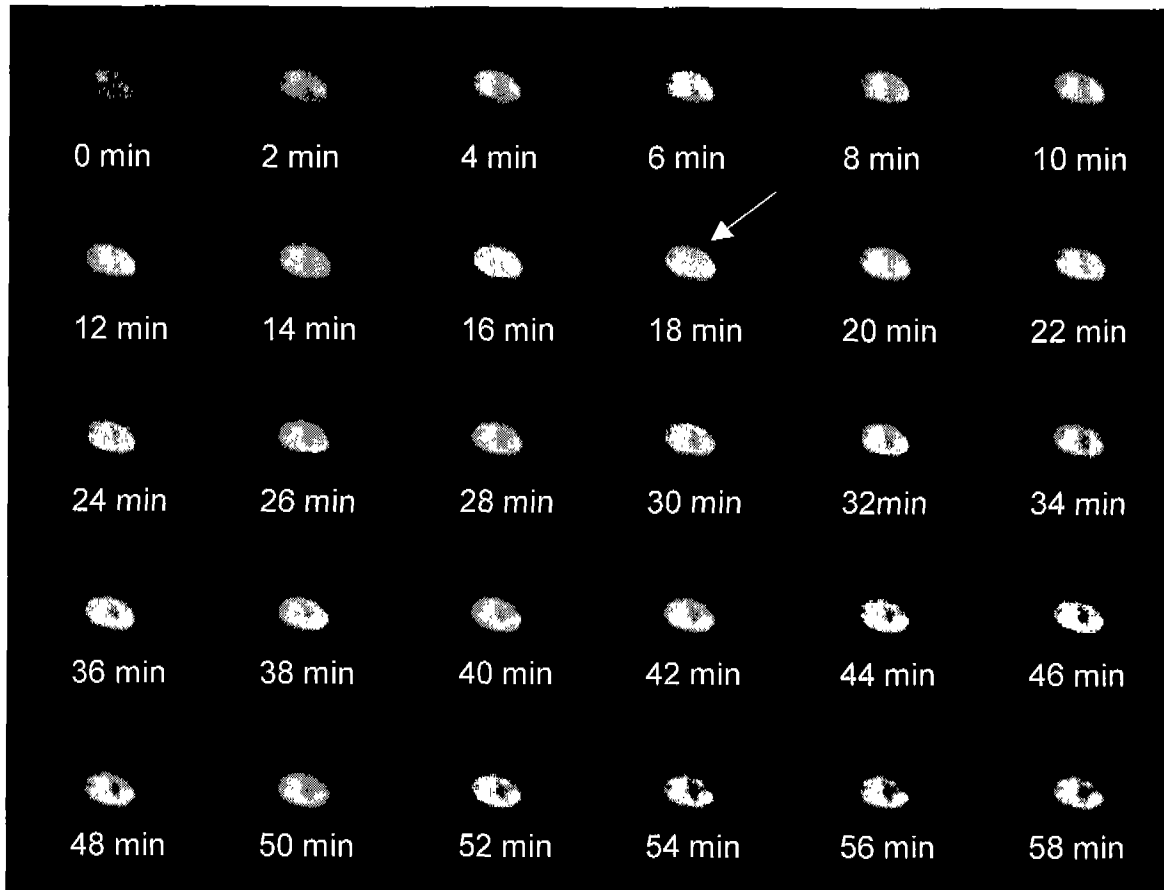
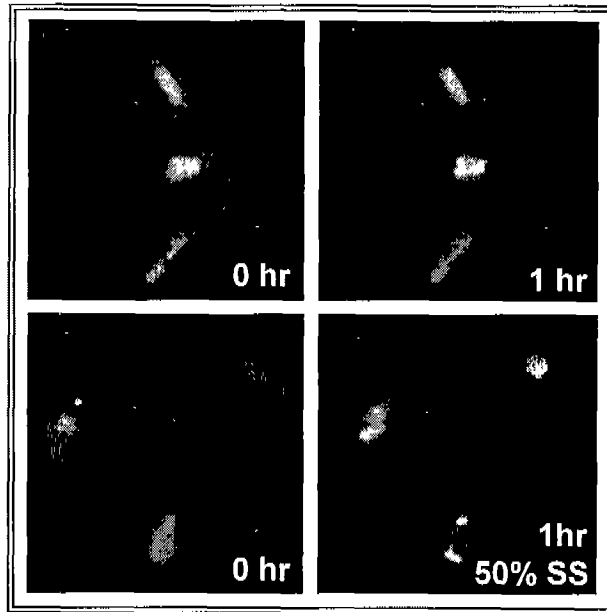


그림 21. Adenovirus 시스템을 사용하여 발현된 mPer2-EGFP 단백질의 HeLa 세포 핵내 발현변화 측정

HeLa 세포에 mPer2-EGFP adenovirus를 감염시킨 다음 24시간 후에 50% serum 처리를 한 후 세포 내에서의 발현변화를 1시간 동안 형광 현미경으로 관찰하였다. 화살표로 표시된 처리 후 18 분부터 핵 내의 단백질 양이 감소하는 것을 보인다.

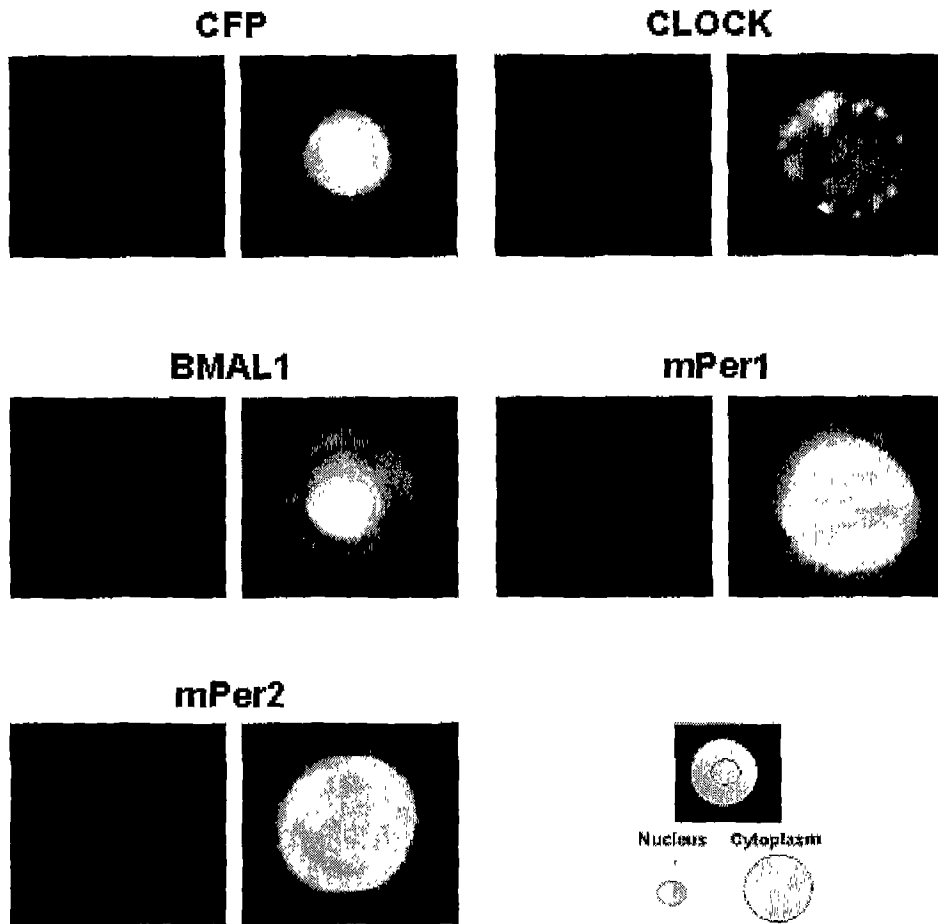


그림 22. CFP 형광 단백질을 표지한 Clock, Bmal1, mPer1, 그리고 mPer2의 세포 내 발현 위치

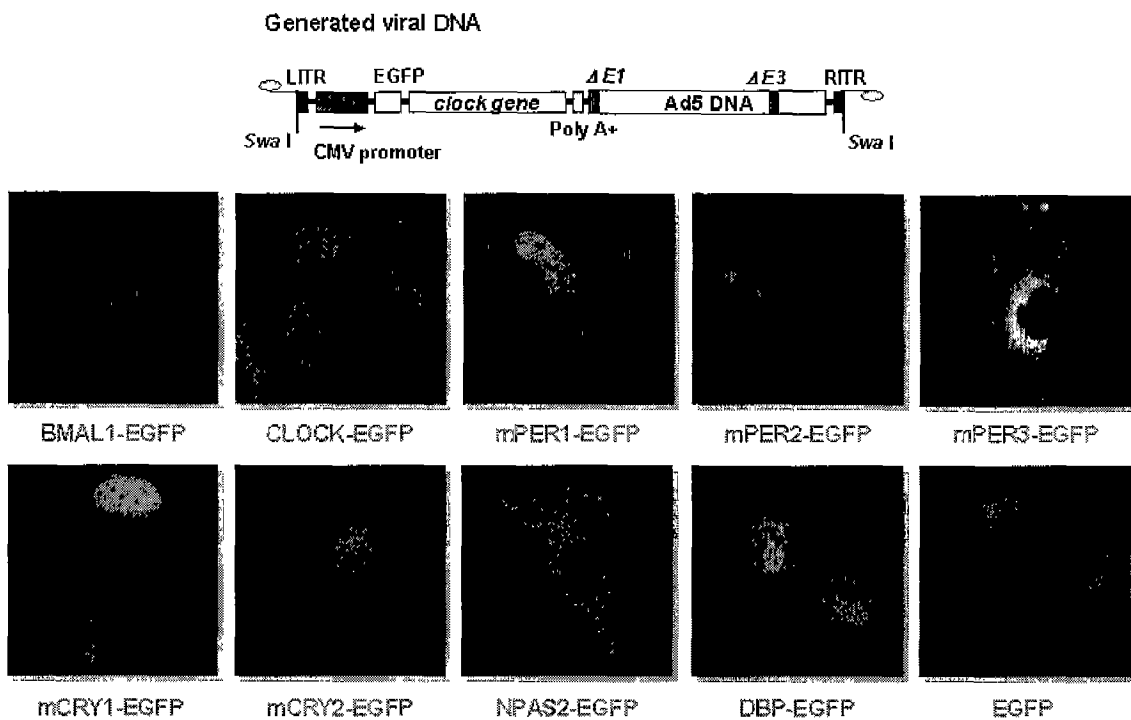


그림 23. 아데노 바이러스로 제조된 일주기 유전자의 발현 및 세포내 분포 확인.

아데노 바이러스로 제조된 EGFP, mPer1-EGFP, mPer2 -EGFP, mPer3 -EGFP, Bmal1 -EGFP, Clock -EGFP, mCry1-EGFP, mCry2 -EGFP, NPAS2 -EGFP, DBP-EGFP를 SCN2.2 세포중에 감염시킨 후 slide에 고정 한 후에 GFP형광이미지를 통해 세포내의 분포를 확인하였다.

4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 1단계 목표 달성도

단계	세부연구개발 목표	달성내용	달성도 (%)
1 단 계 1 년 차	○실시간 유전자 발현 측정을 위한 새로운 기반 기술 구축	(1) RNase protection assay 방법을 이용하여 생체시계 유전자 Period1의 발현을 NIH3T3 섬유아세포, SK-N-SH 신경아세포에서 측정 - 세포내 칼슘 증가에 의해서 mPer1 유전자 발현이 촉진 규명 - 인산화 효소 PKA, PKC의 활성화 및 탈인산화 효소의 억제에 의해서 mPer1 유전자의 발현이 촉진 규명. (2) 세포내 칼슘, 인산화효소의 활성화 및 세포성장인자에 의한 일주기 유전자의 발현 양상 측정 - mPer1은 세포내 칼슘의 증가에 의해 24 시간 주기로 발현이 조절 받으며 c-fos의 경우는 1시간 후 짧은 시간 증가함을 확인. (3) 생체시계 유전자 mPer1의 프로모터 활성인자 및 프로모터 조절 부위 탐색 - mPer1 프로모터의 다양한 변이체를 이용하여 세포내 칼슘이 미치는 프로모터 부위 측정.	100%
	○SEAP reporter를 이용한 유전자 발현과 신경호르몬 분비의 동시 측정 기술	(1) SEAP 리포터를 이용한 GnRH 신경호르몬의 분비와 유전자 발현 동시 측정 - SEAP 리포터로 표지된 GnRH 프로모터를 GT1 신경세포에 transfection 시킨 후 세포주를 확립. - Serum shock으로 GT1 세포주를 동기화 시킨 상태에서 호르몬 분비를 radioimmuno assay (RIA)로 측정하고 GnRH 프로모터의 활성을 SEAP 활성으로 측정. (2) 생리활성물질 측정을 위한 GnRH pulse generator의 맥동성과 신경세포의 분화 및 발생 모델 구축 - GT1 GnRH 신경세포주에 PKC 활성화제 (TPA)의 처리에 의한 기능적 신경분화를 유도한다는 사실을 밝혔으며 세포접착인자인 N-cadherin과 β -catenin에 의한 transactivation 기능을 규명. - 또한, GABA-A agonist인 muscimol에 의한 세포내 칼슘변화와 GnRH 신경호르몬 분비의 상관관계 규명. - PKC alpha 아형에 의한 GABA-A 수용체의 인산화가 GT1 신경세포의 pulse generator를 변조한다는 사실을 규명.	110%
	○FRET을 이용한 단일 세포에서 생리활성물질 혹은 유전자 발현의 실시간 측정 기술 개발	(1) 실시간으로 세포 내 생리활성물질을 측정하기 위해서 FRET 기술 응용 - 칼슘 형광체인 Cameleon을 C2C12 세포주에 발현시킨 후 CFP와 YFP 형광 단백질간의 FRET 효율을 이용하여 세포 내 칼슘을 측정. - 신경전달물질인 glutamate를 C2C12에 처리하여 세포내 칼슘의 증가를 확인함으로써 근육세포에서 glutamate 수용체가 기능적임을 밝힘. (2) 공초점 현미경에서 FRET 기술을 이용할 수 있는 칼슘 형광체 개발 - 공초점 현미경에 FRET 기술을 적용하기 위해서 RFP와 GFP 형광 단백질의 현광 전이현상을 성공적으로 적용.	

		<p>(3) FRET 기술을 이용한 표적 mRNA 측정법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - MS-coat 단백질 양쪽에 CFP와 YFP를 발현하는 FRET 벡터(CMY 벡터)를 제작하고, MS-coat의 인지 RNA를 발현하는 MS-sis를 이용하여 표적 mRNA를 합성한 후 CMY 벡터를 세포내에 발현하여 CMY 단백질을 합성하여 MS-sis mRNA를 각각 반응시켜 in vitro에서 mRNA의 양을 FRET 효율로 측정. 	110%
<p>1 단계 2 년 차</p>	<p>○ 실시간 유전자 발현 측정 기술의 확립 (3종의 리포터 시스템 구축)</p>	<p>(1) 생체시계 재설정에 관련된 mPer1 유전자의 전사 증가 시 CLOCK:BMAL1 생체시계 조절인자의 기능 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - Serum shock에 의해서 mPer1의 mRNA는 대조군으로 사용된 c-fos의 경우와는 달리 증가된 후 24시간 후에 다시 증가함을 확인 (그림 5B1). - 전사와 번역 억제제인 actinomycin D와 puromycin을 각각 처리한 후 serum shock에 의해 mPer1 mRNA가 증가하는 것으로 보아 mPer1의 증가는 이미 존재하는 단백질을 사용하여 전사가 촉진된 결과라는 사실을 확인. - 생체시계 조절인자 활성 측정용 리포터 M34-Luc를 제작하고 ClockΔ19가 CLOCK:BMAL1의 활성화에 음성적 작용을 한다는 사실을 확인. - Clock 생체시계 조절인자의 돌연변이인 ClockΔ19를 과발현하는 NIH-3T3 세포주를 확립하고, ClockΔ19 발현 유전자와 mPer1 프로모터 Luc 리포터를 동시에 형질도입 시킨 후 serum shock을 준 결과 대조군에 비해 Luc 활성의 증가폭이 현저히 감소함을 확인. - Serum shock 후 짧은 시간대에 각각 세포에서 핵을 추출하여 electromobility shift assay (EMSA) 실험을 수행한 결과, serum shock 후 30분 이내에 CLOCK:BMAL1 이합체의 E-box에 대한 결합력이 증가함을 다양한 E-box 절편을 사용하여 확인. <p>(2) 생체시계 유전자에 의한 유전자 발현 제어 기술</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tetracycline에 의해 전사활성이 증가하는 전사조절인자와 생체시계 조절인자 중 최상위 수준에서 전사 조절을 담당하는 BMAL1 유전자들 tetracycline 조절 유전자(TRE)와 재조합하여 NIH-3T3 세포주에 stable transfection 시킴. - Tetracycline에 의해서 유전자의 발현을 on/off시킬 수 있는가 조사하기 위하여 TRE-Luc를 세포내 주입하고 tetracycline의 유사체인 doxycycline을 처리하였을 경우 TRE-Luc의 활성을 증가시키는 특정 유전자의 발현을 on/off시킬 수 있는 세포주를 확립. - 생체시계 조절인자 활성 측정용 리포터 벡터인 M34-Luc를 세포내 transfection 하고 doxycycline을 처리하였을 경우 M34-Luc의 활성이 시간에 의존적으로 증가하였다가 감소하는 것으로 보아 생체시계 조절인자인 BMAL1의 활성을 외부적으로 조절할 수 있다는 사실을 입증하였으며, 생체시계 유전자에 의한 in vitro 유전자 발현 제어 시스템을 구축. <p>(3) 생체시계 조절인자의 실시간 발현 측정 기술</p> <ul style="list-style-type: none"> - Luciferase와 GFP, SEAP 리포터를 이용하여 c-fos, mPer1, hPer1, DBP 등과 같은 일주기 유전자와 멜라토닌 생성 효소인 α-NAT 유전자와 같은 다양한 유전자의 발현을 시간대 별로 측정하는 기술을 확립. - mPer1-Luc, hPer1-Luc, pDBP-GFP, α-NAP-Luc, α-NAT-SEAP, pGnRH-Luc, pGnRH-SEAP 등의 7종의 프로모터 분석용 리포터와, mPer1-GFP, DBP-GFP, BMAL1-GFP, CLOCK-GFP, 	200% 이상

		<p>Cryptochrome2-GFP 등 5종의 생체시계 조절인자의 주기성을 조사할 수 있는 바이오센서를 개발하고 DBP-GFP 및 BMAL1-GFP 발현 세포주를 구축하여 실시간대 조절인자의 활성을 측정.</p> <p>3 종의 리포터 시스템 구축이 목표였으며, 7종의 실시간 유전자 발현 측정용 리포터를 개발하였으며 생체시계 유전자 발현 제어시스템을 구축 (초과달성)</p>	
<p>○ 시신경 교차상핵에서 일주기 유전자 발현을 조절하는 조절인자 탐색 및 동정 (2종의 library 구축)</p>		<p>(1) 교차상핵, retina, GT1에서 3 종의 cDNA expression library 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - GT1 신경세포와 50 여 마리의 생쥐로부터 SCN과 retina의 total RNA를 추출하고, oligo-dT 컬럼을 사용하여 mRNA를 분리한 후 이를 cDNA로 변환하고 HybriZap 벡터를 이용하여 HybriZap mouse SCN, retina, GT1 cDNA phage library를 구축. <p>(2) 생체시계 조절인자 관련 유전자 탐색 및 동정</p> <ul style="list-style-type: none"> - pBD GAL4 Cam에 NPAS2, BMAL1, Cryptochrome 등의 생체시계 유전자를 클로닝하여 조절인자 탐색용 Bait로 사용하여 SCN, retina, GT1 그리고 mouse testis cDNA library를 포함 4개 library에서 yeast two hybrid screening을 수행하여 positive clone들을 확보하고, 플라스미드의 염기서열을 분석. - 생체시계 조절인자 관련 유전자로서 testis library에서 NDAP7, Hexokinase 등 17개와 SCN library에서 TOLLIP, TRIM32 등의 13개의 clone을 확보. <p>2종의 library 구축이 목표였으며, yeast two hybrid screening 용 expression library 3종을 구축</p>	<p>150%</p>
<p>○ FRET 벡터의 기능 향상 및 범용성 확보 (2종의 바이오센서 개발)</p>		<p>(1) 형광 바이오센서의 기능 향상 및 범용성 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - YFP의 145번째 Tyr 자리에 YGGSGAS 아미노산 서열을 삽입하고 PCR-based mutagenesis를 이용하여, 192번째 Proline을 Leucine으로 바꾼 YFP 변종(Peridot)을 생산. 이 Peridot은 세포내 소기관 targeting이 가능하고 현재까지 가장 기능이 향상된 YFP인 Citrin보다 10배 더 형광이 강하다는 사실을 밝힘. - 또한, 145 Tyr 자리에 GGTGEL 아미노산 서열을 삽입한 다른 YFP 유사체를 구축 (YFPins). - 삽입형 칼슘 형광체인 Bio-Cart for Calcium (BCC)를 개발하였으며, BCC는 증가된 형광의 밝기가 장기간 유지되는 성질을 가지는 것으로 조사. - 세포사 측정용 형광제 DEVDins를 개발하여 세포사 과정에서 Caspase-3의 활성을 세포수준에서 실시간 측정할 수 있는 바이오센서를 구축. - Peridot의 기능을 향상시키기 위해 site-directed mutagenesis를 수행하여 3 종의 유사체를 개발. <p>(2) 실시간 유전자 측정용 CMY FRET 벡터의 기능 향상</p> <ul style="list-style-type: none"> - CMY FRET 벡터의 기능을 향상시키기 위해서 MS-sis 시퀀스의 mutagenesis를 수행하였으며, IRE 시퀀스를 CMY에 도입하여 FRET 효율을 향상시킴. - CMY 발현 세포주를 구축하고 MS-coat 인지 MS-sis luciferase 벡터를 이용하여 유전자 발현을 측정. <p>(3) SCN 유래 세포주에서 FRET 기술의 응용</p> <ul style="list-style-type: none"> - SCN2.2 생체시계 세포주에 glutamate 신경전달물질이 NMDA 수용체를 통해서 세포내 칼슘을 증가시킨다는 사실을 밝힘. <p>4종 이상의 바이오센서와 그 유사체를 개발하여 특허 출원 (3건)</p>	<p>200%</p>

2. 2단계 목표 달성도

<p style="text-align: center;">2 단 계 1 년 차</p>	<p style="text-align: center;">○ in vitro 모델 구축</p>	<p>(1) 시신경교차상핵(SCN) 기원 세포주, SCN2.2 배양 - SCN 2.2 세포주에서 NMDA 수용체 아형체인 NR1, 2A, 2B, 2C, 그리고 2D 중 NR1, 2C, 그리고 2D만이 발현하는 것을 확인.</p> <p>(2) GT1 배양 및 adenovirus를 infection한 새로운 모델 구축 - GT1 세포주에서 주기가 짧은 맥동성의 전사적 조절과 transfection 의문제점을 극복하기 위하여 ds-luciferase를 이용한 adenovirus를 만들기 위한 벡터를 제작.</p> <p>(3) 송과선 기원 세포주, PGTβ 배양 - 흰쥐 송과체에서 기원한 PGTβ세포주에서 멜라토닌 수용체 중 아형태 1a와 1c 그리고 RORα와 β 유전자 발현하나 멜라토닌 합성에 필수적인 NAT-Luc 프로모토의 불활성화로 세포주활용의 제한.</p> <p>(4) Baculovirus와 adenovirus에 이용한 다양한 세포에 유전자 도입 - 형광리포터 유전자인 CFP를 발현하는 baculovirus(CFP-Bac)를 제작 및 CFP 발현 확인. - 형광리포터 유전자인 GFP를 발현하는 adenovirus(GFP-Adv)를 제작 다양한 세포주에 감염됨을 확인함으로써 신경세포로의 유전자 도입법 향상.</p> <p>일주기 리듬유전자에 대한 Adenovirus를 통해서 신경세포 및 in vivo 동물모델로의 유전자 도입법을 구축 확립함</p>	<p style="text-align: center;">110%</p>
	<p style="text-align: center;">○ 생체시계 조절 유전자 발현의 on/off 시스템 구축</p>	<p>(1) 생체시계 조절 유전자 Bmal1 발현의 Tet-On/Off 시스템 구축 - TRE (tetracycline response element)에 일주기 유전자인 Bmal1을 결합하여 Tet-on Bmal1 벡터의 제작 및 Tet-on/off 시스템 구축.</p> <p>(2) 생쥐의 착상전 배아에서 일주기성 유전자 발현 양상 - 일주기성 유전자들은 생쥐의 착상 전 배아 발달과정에서 각각 다르게 발현하며 발생 초기 배아 분화과정에 관련성을 시사.</p> <p>(3) Real-time RT-PCR을 이용한 일주기 유전자의 24시간 발현 측정 - Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET)와 probe hybridization을 응용하여 PCR을 실시간으로 측정할 수 있는 정량적 Real-time PCR 방법을 이용하여 빠르고 정량적인 생체시계 유전자 24시간 발현측정기술 구축.</p> <p>(4) 일주기 유전자 Bmal1의 발현에 의한 세포사 - HcLa 암세포주에서 Bmal-EGFP가 발현에 의한 세포사 유도가 Stress 호르몬으로 알려진 Glucocorticoid(GC)의 유도체인 Dexamethasone에 의해 급격히 감소함을 확인.</p> <p>일주기 유전자의 초기배아발생과정의 관련성 시사와 실시간 발현측정기술인 Real-time RT-PCR 구축</p>	<p style="text-align: center;">150%</p>

	<p>○ 조절인자에 의한 일주기 활성 변조기술 확립</p>	<p>(1) 전사조절인자인 CRE에 의한 일주기 유전자인 hPer1의 발현 활성화도 변조 - 일주기 유전자의 발현이 다양한 세포외적인 요인에 의해서 활성화 될 수 있고 조절 반응을 보임으로써 일주기성 변조에 다양성 및 잠재적 응용성을 제시</p> <p>(2) mPer2의 세포핵에서의 번역수준의 변화 분석 - mPER2의 핵에서의 변화는 일주기 리듬의 하부단위 유전자의 발현 및 일주기 유전자 상호간에 단백질의 생성 및 분해와 같은 양적 변화에 의해서 조절되고 변화됨을 시사.</p> <p>(3) 곤충세포에서 일주기 유전자의 세포 내의 발현 및 위치 변화 측정 - Clock, Bmal1, Per1, 그리고 Per2 유전자를 CFP형광단백질 결합형태의Baculovirus 제작.</p> <p>생체시계 유전자의 세포내 분포에 영향을 주는 새로운 신물질을 스크리닝할 수 있는 가능성 시사.</p>	<p>120%</p>
<p>2 단계 2 년차</p>	<p>○ In vitro 모델 확립 및 분석</p>	<p>(1) Adenovirus를 infection한 세포주에서 일주기 유전자 및 Reporter 유전자 발현 분석 - 생쥐의 Bmal1, Clock, Npas2, Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, DBP에 형광단백질인 GFP를 결합된 일주기 유전자 Adenovirus 제작 - SCN2.2세포에서 각 일주기 단백질들의 분포 확인</p> <p>(2) GnRH의 맥동성 연구모델 확립 및 분석 - GnRH의 짧은 맥동성과 24시간의 일주기리듬의 관계성 분석할 수 있는 prGnRH3.0-dsLuc 벡터제작으로 맥동성연구를 위한 분석기술 확립</p>	<p>100%</p>
	<p>○ 효과적인 유전자 도입 기술 확립</p>	<p>(1) Adenovirus에 의한 유전자 도입의 효율성 분석 - SCN2.2 , GH3, GT1-1, NIH3T3와 같은 다양한 세포주에 높은 효율로 감염되며 유전지도입법 확립 및 신경세포주의 유전자 도입법 효율의 극대화</p>	<p>100 %</p>

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 형광단백질을 이용한 GFP 바이오센서 개발

- 본 연구실에서 유전자 발현을 조절하거나 측정하고자 만들어진 GFP 바이오센서들이 다양한 과학자들의 요구에 맞게 변형되어 널리 사용될 것으로 기대되며, 특히 여러 연구자들이 지속적으로 기능을 향상함으로써 더 진보된 센서를 개발하는데 일조 할 것으로 기대된다.
- 생리 조건인 37℃에서 형광을 내는 삽입형 형광체(YFP mutant)는 본 연구실에서 개발한 Peridot이 유일하다. 따라서, 생리조건에서 cell-based assay를 하기 위한 바이오센서를 개발하는데 Peridot을 사용하는 것은 필수적이라 할 수 있다. 또한, 본 연구실은 Peridot에 기반한 다양한 기능의 바이오센서를 개발 중에 있다.
- Bio-Cart for Calcium (BCC) 형광체는 세포내 칼슘의 변화치를 장기간 보고하는 성질을 가지기 때문에 대량 약물 검색에 용이한 장점을 갖고 있어, 세포내 칼슘 대사에 관련된 약물 검색에 사용될 것으로 사료된다. 또한, 세포사에 중요한 caspase-3 단백질 분해효소의 활성을 측정할 수 있는 DEVDins라는 삽입형 형광단백질을 개발하였다. 이는, 본 연구계획서 3단계에서 이뤄질 내용이 앞당겨져 이루어진 성과로서 현재까지 개발된 caspase-3 활성 측정용 센서에 비해 그 사용이 용이하고 측정에 비용이 절감되는 효과를 거둬 고속 약물스크린과 유전자 검색에 사용될 것으로 보인다.

2. FRET에 기반한 생리활성물질 및 유전자 발현 측정 기술

- 시험관 내에서 유전자 발현을 측정할 수 있는 유전자 기반 형광 센서로는 현재 본 연구실에서 개발한 CMY가 유일하다. 본 연구실은 CMY의 기능을 더욱 향상시켜서 세포 및 실험동물에 유전자를 도입함으로써 생체 내에서 유전자 발현을 측정하고자 한다. 더 나아가, 단일 유전자의 발현을 보는 것에 그치지 않고, 여러 유전자를 각기 다른 센서를 통해서 측정함으로써 관련 유전자의 상호 발현을 비교할 수 있는 센서를 만들고 있다.
- 현재 in vitro 조건에서 단백질과 단백질의 상호작용을 측정하는 방법의 한계를 극복하고 세포 수준에서 단백질과 단백질의 상호작용을 정량화하기 위해 FRET 기반 다양한 형광체를 이용하는 방법을 개발하고 있다. FRET을 이용한 유전자 발현 측정기술을 cell-based assay 기술과 접목할 경우 특정 유전자의 발현과 관련된 고속 약물 스크린을 가능하게 하는 고부가가치 기술이므로, 본 기술의 범용성을 확보하기 위한 노력과 함께 이미 개발이 완료된 바이오센서의 기능을 접목하는 시도가 활발할 것으로 기대된다.
- 앞서 연구된 세포의 분화 및 분열 모델을 이용하여 세포의 분화 및 분열에 관련된 유전자를 스크린하고 그 발현을 세포의 형태적 변화와 관련하여 조사하고 있다. 이를 위해서 Differential display-PCR 방법과 DNA microarray 등을 이용하였다. 세포의 형태적 분화와 이 때 관련된 유전자를 실시간 보여줌으로써 본 유전자 발

현 측정술의 독창성과 효율성을 입증할 것으로 사료된다.

3) Yeast 스크린 용 cDNA expression library 구축

- 생체시계와 관련된 조직에서 제작된 cDNA expression library는 현재 인터넷을 통해서 공개되어 있고, 또한 여러 과학자들에 의해서 사용되고 있다. 이를 통해서 밝혀지게 될 생체시계 조절인자들은 생체시계 유전자 네트워크를 작성하는 중요한 데이터가 될 것으로 기대된다.
- 현재 본 NRL 실험실 벤처 (주)뉴로제넥스에서 생체시계 조절인자의 인산화에 영향을 주는 인산화 효소를 게놈 수준에서 스크린하고 있으며, 생체시계 유전자를 Adenovirus 형태로 세포나 실험 동물에 유전자 도입할 수 있는 벡터 시스템을 구축하고 있다. 또한, Baculovirus를 이용하여 생체시계 조절인자의 단백질을 고순도로 정제하고 있다. 이러한 새로운 도구는 이 분야에서 유일한 것으로서 앞으로 큰 주목을 받을 것으로 기대된다.

4. Real-time RT-PCR에 의한 유전자의 정량적 측정법 확립

- FRET과 probe hybridization을 응용한 Real-time RT-PCR 방법은 일주기 유전자 외에 현재 연구결과들에 의하면 세포사, 세포분열, 전사/번역에 작용하고 있는 많은 유전자들이 24시간을 주기로 발현됨이 보고됨에 따라서 앞으로 다양한 생물학 분야에서 일시적인 유전자의 기능연구에서 실시간적인 기능연구가 대두될 것이며, 본 연구에서 일주기 유전자의 24시간 발현의 정량적 측정 및 이를 이용한 스트레스 모델에서 유전자의 실시간 발현을 확인함으로써 보다 빠르고 정확하게 특정 유전자의 발현양상을 통해 기능연구에 초석이 될 것으로 사료된다.

5. Baculovirus/Adenovirus를 이용한 효율적 유전자 발현 및 도입기술 확립

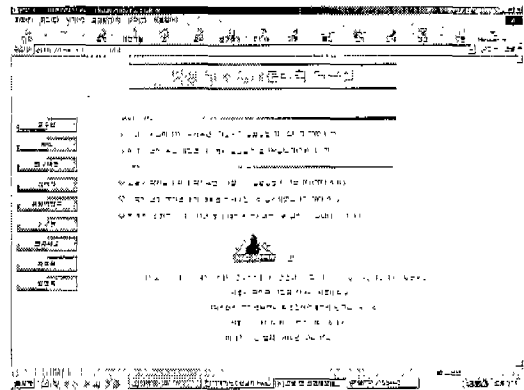
- 일반적인 단백질 과잉발현 시스템은 대장균에서 발현되어지고 있다. 하지만 대장균에서 발현/정제된 단백질은 post-translation과정이 없어 그 단백질의 기능을 연구하기에는 다소의 장벽을 갖고 있다. 따라서 앞으로는 포유류에 근접한 곤충세포에서의 단백질 발현 시스템을 사용하여 기능적인 단백질을 발현시켜 얻을 수 있어서 단백질의 기능 연구 및 항체 생산에 중요한 항원을 만드는데 사용하고 있는 경향이 짙어지고 있다. 본 연구에서 제작된 Baculovirus시스템과 곤충세포에서의 발현양상을 형광 이미지로 관찰하는 연구는 새로운 생리활성물질의 대량 스크리닝에 응용할 수 있다.
- 또한 Adenovirus는 현재 유전자 치료법 연구에 이용하고 있을 뿐만 아니라, 특정 유전자에 대한 형질전환/knock-out 동물 모델에서 그 유전자의 기능 회복 및 저해에 응용하여 기능을 보다 명확히 할 수 있는 in vivo에 적용 가능한 기술이다. Adenovirus로 제작된 일주기 유전자들은 향후 기능연구에 있어서 보다 효율적인 것으로 사료되며, 특히 뇌에 직접적인 유전자의 삽입 및 유전자 도입 효율이 낮은 신경세포에서 일주기성 연구에 중요한 기반이다.

6. 홈페이지 운영 및 활용 현황

본 발생 및 신경내분비학 연구실에서는 생체시계 유전자 연구자들을 위해 생체시계관련 유전자 은행, 생체시계 유전자 데이터 베이스, 일반인을 대상으로 운영중인 생체시계연구 관련 정보제공 사이트 및 서울대 실험실 벤처 (주)뉴로제넥스 사이트를 각각 운영하고 있다.

○ 서울대학교 발생 및 신경내분비학 연구실 (<http://neuroendo.snu.ac.kr>)

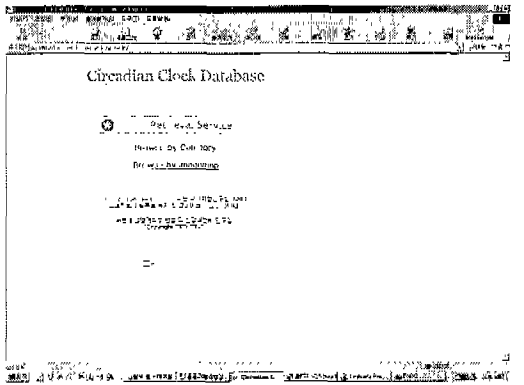
연구 내용, 실험실 구성원 안내, 실험 기자제 목록 및 교수님 소개, 논문 목록 등 실험실 전반에 관한 소개를 하고 있으며, 특히 국가지정연구실 연구 과제인 실시간 유전자 발현 및 조절인자 탐색, 생체시계 유전자 발현 제어 시스템 확립에 대한 내용을 자세히 다루고 있다. 또한, 연구실의 실험기자제는 모든 연구자에게 개방되어 있어, 신청이 있을 경우 이용을 허가해 주고 있다. 본 실험실에서 매주 열리고 있는 세미나 내용, 실험 방법, 기타 생물학 관련 자료들을 자료실을 통해 제공하고 있어 국내외 모든 연구자들이 다운로드 받아 이용할 수 있게 되어 있다.



○ 생체시계관련 유전자 은행 (<http://neuroendo.snu.ac.kr/genebank>)

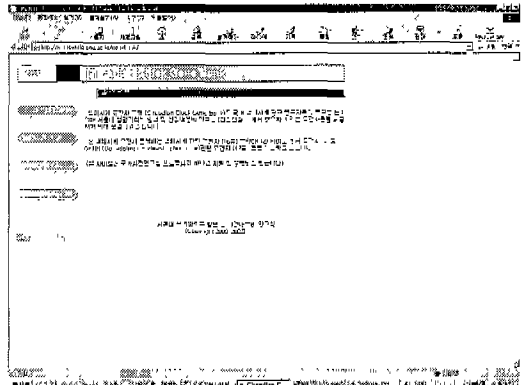
생체시계관련 유전자 은행은 국내 생체시계 유전자 연구자들을 위해 본 연구실에서 보유하고 있는 생체시계관련 유전자와 바이오센서 유전자, GnRH 등과 같은 시상하부 신경호르몬 유전자를 포함한 신경과학 관련 유전자 등을 무상으로 공급하기 위해 설치 운영되고 있다.

본 유전자 은행에서는 2002년 3월 현재 생체시계관련 유전자 16종, GnRH 관련 유전자 17종, 바이오 센서 유전자 29 종, 기타 유전자 20 종 등 총 82종의 유전자를 공급하고 있다.



○ 생체시계관련 유전자 데이터 베이스 (<http://neuroendo.snu.ac.kr/genedb>)

생체시계관련 유전자 데이터 베이스는 현재 까지 *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Neurospora crassa*, *Synechococcus elongatus* 등에서 알려진 생체시계 유전자 조절기작을 데



이더 베이스로 제공하고 이들 유전자의 DNA 정보와 단백질 정보를 링크함으로써 관련 연구자들이 최신의 정보를 손쉽게 찾을 수 있도록 했다.

- 생체시계연구 관련 정보제공
(<http://neuroendo.snu.ac.kr/news>)

본 사이트는 일반인을 대상으로 일간지 및 학술지에 발표된 생체시계연구 관련 내용과 연구실에서 직접 작성한 글들을 알기 쉽게 전달함으로써 일반인들에게 생체시계연구의 중요성 및 활용성을 홍보하고자 운영되고 있다. 생체시계 및 관련 연구분야에 대한 깊이 있으면서 쉬운 해설로 일반인들의 많은 호응을 얻고 있다.

7. 첨단기술정보의 제공, 연구기기 공동활용

본 연구실에서 운영중인 연구실 홈페이지를 통해 생체시계 연구를 위한 실험 방법을 제공하고 있으며, 형광 공명 에너지 전이현상(FRET) 측정장치 및 여러 가지 연구에 필요한 기기를 국내 연구자들이 이용할 수 있도록 개방하여 운영하고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. AAMCC (The American Association of Medical Chronobiology and Chronotherapeutics)

치료시간: 몸의 리듬에 의한 생체리듬치료(Chronotherapy)

일반적으로 성공적인 질병치료를 위하여 수술과 약물투여시간을 한달 또는 하루의 적절한 시간대에 의해서 치료가 이루어지고 있으며, 특히 천식(asthma), 관절염 통증은 일주기성치료의 예라 할 수 있다. 질병이 치료시간은 연령, 성별, 유전적인 많은 요소에 의해서 이루어지고 있으며 약물의 효능과 부작용을 최소화하기 위해서 투여량과 시간이 중요하게 고려되어지고 있는 실정이다.

하나의 예로서 천식의 치료재인 theophyline (Purdue Frederic Co., 1989년 FDA 승인)은 아침에 복용하도록 되어있다.

또한 관절염 통증 완화제인 Ibuprofen 골다공성 관절염 (osteroarthritis)는 점심에 복용하며, 같은 약을 류마티스 관절염환자는 저녁식사 후에 복용하는 것이 효과적인 것으로 확인되었다.

AAMCC는 수면관련 질병의 생체리듬치료를 연구뿐만 아니라 임상에 적용하고 있다.

2. **Chronotherapy at Block Center** for Integrative Cancer Care

미국의 Block Center for Integrative Cancer Care는 현재 암치료를 위해서 생체리듬치료를 응용하고 있으며 특정 French infusion pump (그림1B)를 사용하여 하루의 생리적인 리듬 (그림 1A)에 맞추어서 암을 치료하고 있다.

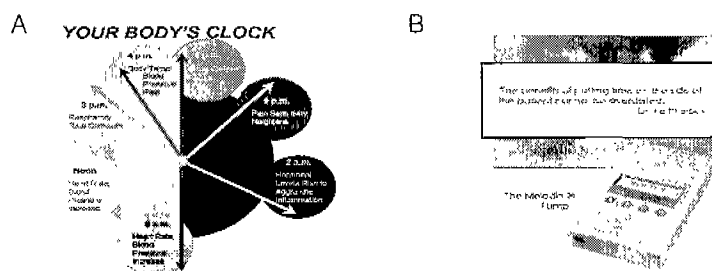


그림 1.

3. Delayed Sleep Phase Syndrome (DSPS)

Per2의 돌연변이에 의해서 Familial advanced sleep disorder (FASP)이 유발됨이 사람에게서 밝혀졌으며, 또한 새벽 4시쯤 수면장애를 겪는 질병인 Delayed sleep phase syndrome의 가계도와 환자의 혈액샘플검사를 통해서 일주기 유전자인 Per3의 이상으로 생긴다는 것을 최근 발표하면서 일주기 유전자에 관련되는 유전자 치료법이 부각되고

있다.

4.  Empirical Technologies Corporation

Empirical's Photonic Eye Delivery System (US Pat 6,235,046) fiber optics를 사용해서 특정한 빛의 파장과 강도를 망막에 조사함으로써 적용되고 있다 (그림2). 인간의 생체시계를 동조화할 수 없는 빛을 사용하여 중추시각에 장애를 주지 않는 범위에서 이용되고 있다. 현재 알츠하이머병, 우울증, 시차의 치료에 적용되어지고 있다.

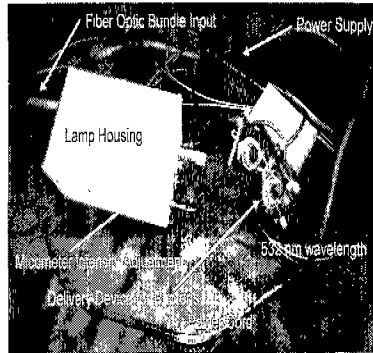


그림 2.

▶ 현재까지 생체시계를 이용한 약물치료와 광선치료법에 제한되어 있으며 아직까지 일주기 유전자의 기능을 조절할 수 있는 치료적 접근은 미진하다. 그러므로 향후 생체시계 유전자의 기능적인 연구 및 유전자 치료와 같은 임상 응용적인 분야의 투자와 개발이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

- Borjigin J, Deng J, Wang MM, Li X, Blackshaw S and Snyder SH (1999) Circadian rhythm of patched 1 transcription in the pineal regulated by adrenergic stimulation and cAMP. *J Biol Chem* 274:35012-3515.
- Borjigin J, Deng J, Wang MM, Li X, Blackshaw S and Snyder SH (1999) Circadian rhythm of patched 1 transcription in the pineal regulated by adrenergic stimulation and cAMP. *J Biol Chem* 274:35012-3515.
- Burke E, Wells T, Carter D, Klein D and Baler R (1999) Genetic Targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectivity in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J Neurochem* 73:1343-1349.
- Burke E, Wells T, Carter D, Klein D and Baler R (1999) Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectivity in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J Neurochem* 73:1343-1349.
- Clayton JD, Kyriacou CP, Reppert SM (2001) Keeping time with the human genome. *Nature* 409:829-831.
- Cullen BR and Malim MH (1992) Secreted alkaline phosphatase as a eukaryotic receptor gene. *Meth Enzymol* 216:362-368.
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clock. *Cell* 96:271-290.
- Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS and Greenberg ME (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 268:238-241.
- Gonzalez JE and Tsien RY (1997) Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer. *Chem Biol* 4:269-272.
- Gotter AL, Reppert SM (2001) Analysis of human Per4. *Brain Res Mol Brain Res* 92:19-26.
- Grundschober C, Delaunay F, Puhhofer A, Triqueneaux G, Laudet V, Bartfai T, Nef P (2001) Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J Biol Chem*. 276:46751-46758.
- Hao H, Allen DL, Hardin PE (1997) A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 17:3687-3693.

- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6:269-278.
- Hastings M and Maywood ES (2000) Circadian clocks in the mammalian brain. *BioEssays* 22:23-31.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065-1070.
- Heim R. and Tsien R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence energy transfer. *Curr Biol* 6:178-182.
- Kippert F and Hunt P (2000) Ultradian clocks in eukaryotic microbes: from behavioral observation to functional genomics. *BioEssays* 22:16-22.
- Kippert F and Hunt P (2000) Ultradian clocks in eukaryotic microbes: from behavioral observation to functional genomics. *BioEssays* 22:16-22.
- Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U (2001) Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 20:7128-7136.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855-867.
- Lee DK, Sun W, Lim C, Rhee K, Thompson EA, Lee CC, Cho WK and Kim K (1994) Murine thymidine kinase in transgenic mice. *Transgenics* 1:337-347.
- Lemmer B (1996) The Clinical relevance of chronopharmacology in therapeutics. *Pharmacol Res* 33:107-115.
- Lemmer B (1996) The Clinical relevance of chronopharmacology in therapeutics. *Pharmacol Res* 33:107-115.
- Li X, Chen S, Wang Q, Zack DJ and Snyder SH (1998) A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1876-1881.
- Li X, Chen S, Wang Q, Zack DJ and Snyder SH (1998) A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1876-1881.
- McNamara P, Seo SP, Rudic RD, Sehgal A, Chakravarti D, FitzGerald GA (2001)

- Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* 105:877-889.
- Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R., and Tsien R.Y. (1999) Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2135-2140.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature* 415:493.
- Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, Lewy AJ. (2000) Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med.* 343:1070-1077.
- Scully AL and Kay SA (2000) Time flies for Drosophila. *Cell* 100:297-300.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291:490-493.
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, Virshup DM, Ptacek LJ, Fu YH (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291:1040-1043.
- Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (2000) Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404:87-91.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국가지정연구실사업			
	세부사업명	국가지정연구실사업			
과제명		생체시계 유전자를 이용한 유전자 발현 제어 기술			
연구기관		서울대학교	연구책임자	김 경 진	
총연구기간		2000년. 06월. 14일. ~2003년. 09월. 30일. (40개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		862,422	0	862,422	
기술분야		생명과학분야 → 생명공학기술 → 분자 세포공학 기술			
참여기업					
공동연구기관					
위탁연구기관					
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진()	4.타사업에 활용()
		5. 선행 및 기초연구(○)	6. 기타목적활용(교육연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

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

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2003년 11 월 28 일

연구책임자 : 김 경 진 (인)
연구기관장 : 서울대학교총장 (인)

과학기술부장관 귀하



[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

- ▶ 뇌 시상하부를 주 모델 시스템으로 [생체시계의 조절 메카니즘]을 규명하고 신경호르몬의 맥동적 합성, 분비 기작의 연결고리를 규명하여 생체시계의 핵심조절 인자를 탐색, 개발한다.
- ▶ 생체시계를 이용한 새로운 유전자 발현 제어기술을 개발하고, 타 기술에 응용할 수 있는 기반을 확립한다.

2. 연구수행결과 현황

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
세포내 칼슘 변화의 측정을 위한 칼슘 바이오 센서	대한민국특허 출원 제10-2002-0015219	2002년 3월	김경진	대한민국	
변종삼입형광단백질	대한민국특허 출원 제10-2002-0015218	2002년 3월	김경진	대한민국	
캐스페이즈 활성 평가 방법	대한민국특허 출원 제10-2002-0015217	2002년 3월	김경진	대한민국	
펜틸렌테트라졸 장기처리 에 의한 도파민 신경세포 사멸 유도 방법	대한민국특허 출원 제10-2002-0015220	2002년 3월	김경진	대한민국	
유전자 클로닝 과정을 실시실험과정과 동일하게 시뮬레이션하고 그 결과물을 데이터베이스형태로 저장할 수 있도록 하는 컴퓨터 프로그램 및 그 구현방법	대한민국특허 출원 제10-2001-0071566	2001년 11월	(주)뉴로제넥스	대한민국	
형광강도가 증강된 삼입형 녹색 형광 단백질 및 그 유전자	대한민국특허 출원 제10-2002-0012409	2002년 3월	(주)뉴로제넥스	대한민국	
에이치닥과 같은 전사조절 인자를 이용한 세포 수준의 양성 활성 분석	대한민국특허 출원 제10-2002-0012476	2002년 3월	(주)뉴로제넥스	대한민국	
웰 또는 핀타입의 체외 대량, 고속의 단백질 상호작용 검색 시스템	대한민국특허 출원 제10-2002-0012564	2002년 3월	(주)뉴로제넥스	대한민국	
재조합 바이러스의 제조방법	대한민국특허 출원 제10-2002-0012633	2002년 3월	(주)뉴로제넥스	대한민국	
시험관 내에서 재조합 반응을 이용한 초고속 재조합 바이러스의 제조	대한민국특허 출원 제10-2002-0012634	2002년 3월	(주)뉴로제넥스	대한민국	

나. 프로그램 등록목록 (없음)

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
J. Kor. Soc. Endocr.	Interaction of neuro-endocrine-immune systems.	2000. 6.	15	대한 내분비학회	(한국)	X
Mol. Cell. Endocrinol.	Analysis of exonic splicing enhancers in the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene.	2001. 2.	173	Elsevier Science	(아일랜드)	O
Korean J. Brain. Sci. & Tech.	The role of pre-mRNA splicing in neuroendocrine gene regulation: Special reference to GnRH neurohormone.	2001. 6.	1	한국 뇌학회	(한국)	X
Korean J. Biol. Sci.	Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor mRNA transcripts during the mouse ovarian development.	2001. 8.	5	한국 동물학회	(한국)	X
Mol. Brain Res.	9-cis-Retinoic acid represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcription via proximal promoter elements that are distinct from all-trans-retinoic acid response element.	2001. 3.	87	Elsevier Science	(네덜란드)	O
Mol. Brain Res.	A functional retinoic acid response element (RARE) is present within the distal promoter sequence of the rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene.	2001. 3.	87	Elsevier Science	(네덜란드)	O
J. Neuroendo.	Evidence for direct involvement of beta-catenin in phorbol ester-induced neurite outgrowth in GT1-1 hypothalamic neurons.	2001. 3.	13	Blackwell Science	(영국)	O
J. Neuroendo.	Analysis of steroid-induced gene in the rat preoptic area-anterior hypothalamus using a differential-display reverse transcriptase-polymerase chain reaction.	2001. 6.	13	Blackwell Science	(영국)	O
Endocrinol.	First intron excision of GnRH pre-mRNA during postnatal development of normal mice and adult hypogonadal mice.	2001. 10.	142	Endocrine Society	(미국)	O
J. Biol. Chem.	Phosphorylation-dependent cellular localization and thermoprotective role of hsp25 in hippocampal HiB5 cells.	2002. 3.	277	American Society for Biochemistry and Molecular Biology	(미국)	O

J. Neurochem.	Participation of protein kinase C alpha isoform and extracellular signal-regulated kinase in neurite outgrowth of GT1 hypothalamic neurons	2002	83	Blackwell Science	영국	○
J. Biol. Chem.	Regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene transcription by TTF-1, a homeodomain-containing transcription factor	2002	277	미국 생화학 분자생물학회	미국	○
Mol. Endocrinol.	Ala/Thr201 in extracellular loop 2 and Leu/Phe290 in transmembrane domain 6 of type-1 frog gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor confer differential ligand sensitivity and signal transduction	2003	144	미국 내분비학회	미국	○
J. Neurochem.	Ontogeny and the possible function of a novel epidermal growth factor-like repeat domain-containing protein, NELL2, in the rat brain	2002	83	Blackwell Science	영국	○
Mol. Brain Res.	Modulation of olfactory bulb tyrosine hydroxylase and catecholamine transporter mRNA by estrogen	2002	108	Elsevier Science	영국	○
Mol. Brain Res.	Activation of protein kinase A pathway induces neuronal differentiation of HiB5 hippocampal progenitor cells	2002	109	Elsevier Science	영국	○
NeuroReport	Involvement of Clock:Bmal1 heterodimer in serum responsive mPer1 induction	2003	14	Lippincott Williams & Wilkins	미국	○
J. Neuroendo.	Selective roles of protein kinase C isoforms on cell migration of immortalized hypothalamic neurons	2003	15	Blackwell Science	영국	○
Mol. Reprod. Dev.	Identification of estrogen-regulated genes in the mouse uterus using a delayed implantation model	2003	64	John Wiley & Sons, Inc	영국	○
계: 19 건수						

※ 국가지정연구실 사업외 연구실적

논문제목	학술지명	계제연월일	호	발행기관 (국명)	SCI여부 (O,X)
Effects of immobilization on estrogen-induced surges of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized rats.	Endocrine	2000. 6.	12	Humana Press Inc.(미국)	O
Effect of GM-CSF and IL-2 co-expression on the anti-tumor immune response.	Anticancer Res.	2000. 7.	20	International Istitute for Anticancer Research (그리스)	O
Enhancement of adenoviral transduction with polycationic liposomes in vivo.	Cancer Gene Therapy	2000. 10.	7	Nature America Inc. (미국)	O
Regulation of rat heat shock factor 2 expression during the early organogenic phase of embryogenesis.	Bioch. Biophy. Acta	2000. 12.	1494	Elsevier Science (네덜란드)	O
Subcellular localization of presenilins during mouse preimplantation development.	FASEB J	2000. 11.	14	The Federation of American Societies for Experimental Biology (미국)	O
Interferone beta secreted from human hair dermal papillar cells inhibits the growth of outer root sheath cells cultured in vitro.	BBRC	2002. 1.	290	Elsevier Science (미국)	O
Hyperpolarization, but not depolarization increases intracellular Ca ²⁺ levels in cultured chick myoblast.	BBRC	2002. 2.	290	Elsevier Science (미국)	O

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술발표제목	발표자	발표장소 (국명)	일시
Pre-mRNA splicing of GnRH gene.	Kim K, Kim BW, Han J and Seong JY	82nd Annual Meeting of Endocrine Society (캐나다)	2000. 6. 21-24
Maternal stress impairs fetal development and learning and memory in adult offspring mice	Kim K, Geum D, Son GH and Lee CC	30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (미국)	2000. 11. 4-9
TTF-1 a homeodomain-containing transcription factor, regulates circadian rhythm in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression in the retinohypothalamic tract.	Lee BJ, Kim MS, Choi WS, Kim JI, Lee SH, Ojeda SR, Cho S and Kim K.	30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (미국)	2000. 11. 4-9
Tra2a interacts with exonic splicing enhancer in exon 4 in the GnRH primary transcript.	Han J, Seong JY and Kim K	2000년 한국분자생물학회 (한국)	2000. 10. 12-13
Participation of extracellular signal-regulated kinase in protein kinase C alpha induced neurogenesis of GT1-1 hypothalamic neurons.	Choe Y, Park NH and Kim K	2000년 한국분자생물학회 (한국)	2000. 10. 12-13
Glucocorticoid inhibits growth factor-induced differentiation of hippocampal progenitor HiB5 cells.	Son GH, Geum D, Jung H and Kim K	2000년 한국분자생물학회 (한국)	2000. 10. 12-13
Neuronal differentiation of HiB5 hippocampal progenitor cells by activation of cAMP-dependent protein kinase A.	Kim GO, Cho S and Kim K	제55회 생물과학협회 추계학술대회 (한국)	2000. 10. 27-28
Roles of calcium in the entrainment of mammalian circadian clock gene, <i>Per1</i> .	Kim J, Choe Y, Park N and Kim K	제55회 생물과학협회 추계학술대회 (한국)	2000. 10. 27-28
SRp30c interacts with Tra2a in the GnRH RNA splicing.	Park K, Han J and Kim K	제55회 생물과학협회 추계학술대회 (한국)	2000. 10. 27-28
Involvement of ERK in PKC-mediated neurogenesis of GT1-1 hypothalamic neurons.	Choe Y, Park NH and Kim K	제3회 한국뇌신경과학회 (한국)	2000. 12. 3
A noble gene construct for real-time calcium monitoring in a single cell using the confocal microscope.	Park JY, Maeng J and Kim K	2001년 한국 내분비학회 춘계학술대회 (한국)	2001. 5. 2-3
Participation of ERK in protein kinase C alpha induced neurogenesis of GT1 hypothalamic neurons.	Choe Y, Park NH and Kim K	2001년 한국 내분비학회 춘계학술대회 (한국)	2001. 5. 2-3
Excision of the first intron from gonadotropin-releasing hormone pre-mRNA is necessary for the translation initiation.	Son GH, Chung H, Geum D and Kim K	2001년 한국 내분비학회 춘계학술대회 (한국)	2001. 5. 2-3
RNA splicing of GnRH: Role of Exonic splicing enhancer.	Kim K, Seong JY, Kim BW and Han J	2nd Int'l Symposium on Comparative Biology of GnRH: Molecular Forms & Receptors (말레이시아)	2001. 6. 2-4
Neurobiology of Maternal Stress	Kim K	한독 분자생물학 (뇌기능 연구) 공동 심포지움 (독일)	2001. 7. 28-29
Glucocorticoid inhibits growth factor-induced differentiation of hippocampal progenitor HiB5 cells.	Son GH, Geum D and Kim K	31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (미국)	2001. 11. 11-15
Interaction of tra2alpha with exonic splicing enhancer is important in the splicing activity of mouse gonadotropin-releasing hormone pre-mRNA.	Han J, Park K, Park J-H and Kim K	31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (미국)	2001. 11. 11-15
Participation of extracellular signal-regulated kinase in protein kinase C alpha induced neurogenesis of GT1 hypothalamic neurons.	Choe Y, Son GH, Park N and Kim K	31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (미국)	2001. 11. 11-15

A noble gene construct for real-time calcium monitoring in a single cell using the confocal microscope.	Park JY, Maeng J and Kim K	2001년 한국뇌학회 춘계학술대회 (한국)	2001. 6. 29-30
Selective role of protein kinase C alpha in extracellular signal-regulated kinase mediated neurite-outgrowth of GT1 hypothalamic neurons.	Choe Y and Kim K	2001년 한국뇌학회 춘계학술대회 (한국)	2001. 6. 29-30
Effects of calcium ion on human per 1 gene expression in SK-N-SH human neuroblastoma cells.	Kim J, Choe Y, Park N and Kim K	2001년 한국 분자-세포 생물학회 추계학술대회 (한국)	2001. 10. 11-12
Induction of cellular death by over-expression of mammalian PERIOD 1.	Choe Y and Kim K	2001년 한국 분자-세포 생물학회 추계학술대회 (한국)	2001. 10. 11-12
Effect of calcium ion on mammalian period 1(mPer1) mRNA expression in NIH-3T3 Cell Line.	Park N, Kim J, Choe Y and Kim K	제56회 한국생물과학협회 학술발표대회 (한국)	2001. 10. 26-27
Expression of epithin in mouse preimplantation development: functional role in compaction.	Kang I, Sonn S, Rhee K, Park D and Kim K	제56회 한국생물과학협회 학술발표대회 (한국)	2001. 10. 26-27
Studies on the calcium influx mediated by glutamate receptor in neuronal cells.	Maeng J, Park JY and Kim K	제56회 한국생물과학협회 학술발표대회 (한국)	2001. 10. 26-27
The involvement of clock-bmal1 heterodimers in serum-responsive induction of mper1 expression.	Jung II, Park N, Choe Y and Kim K	제56회 한국생물과학협회 학술발표대회 (한국)	2001. 10. 26-27
Apoptotic cell death by over-expression of mammalian period 1.	Choe Y and Kim K	제4회 뇌신경과학회 추계학술대회 (한국)	2001. 11. 30-12. 1
Multiple interactions between SR proteins and exonic splicing enhancer (ESE) regulates splicing activity of mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pre-mRNA	Park Y and Kim K	BK21 연례 학술대회 (서울대)	2002.7.9
Cell death induced by over-expression of mammalian period 1	Choe and Kim K	국제 내분비 학회 (영국)	2002. 8.31-9.4
Participation of extracellular signal-regulated kinase in protein kinase C alpha induced neuritogenesis of GT1 hypothalamic neurons	Seo J, Cho Y and Kim K	국제 내분비 학회 (영국)	2002. 8.31-9.4
Excision of the first intron serves as a key regulatory step for the synthesis of gonadotropin-releasing hormone	Son GH and Kim K	국제 내분비 학회 (영국)	2002. 8.31-9.4
Hypothalamic GnRH RNA splicing: role of exonic splicing enhancer	Han J, Park E, and Kim K	아시아-오세아니아 신경과학회 (초정세미나)	2002. 9.28-10.1
Over-expression of mammalian period 1 induced apoptotic death of chinese hamster ovarian cells	Choe Y and Kim K	아시아-오세아니아 신경과학회 (서울)	2002. 9.28-10.1
Induction of serum-responsive mper1 by heterodimerization of CLOCK and BMAL1	Eum B, Jung H, Choe Y and Kim k	아시아-오세아니아 신경과학회 (서울)	2002. 9.28-10.1
Regulation of splicing activity of mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pre-mRNA by multiple interactions between several SR proteins and exonic splicing enhancers (ESEs)	Park E and Kim K	아시아-오세아니아 신경과학회 (서울)	2002. 9.28-10.1
Expression of epithin in mouse preimplantation development: functional role in compaction	Khang I, Son S, Park D and Kim K	아시아-오세아니아 비교내분비학회 (중국)	2002. 10.8-10.11
Differential action of raloxifene on the expression of estrogen receptor a, b and the truncated estrogen receptor product-1 (TERP-1) in the hypothalamus and pituitary of rat	Lee S, and Kim K	아시아-오세아니아 비교내분비학회 (중국)	2002. 10.8-10.11

Interaction between several SR proteins including TRA2a and exonic splicing enhancer (ESE) regulates the splicing activity of mouse gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Pre-mRNA	Park E, Han Jin, Park K and Kim K	아시아-오세아니아 비교내분비학회 (중국)	2002. 10.8-10.11
Participation of protein kinase C A Isoform and extracellular signal-regulated kinase in neurite outgrowth of GT1 hypothalamic neurons	Kim II, Choe Y and Kim K	아시아-오세아니아 비교내분비학회 (중국)	2002. 10.8-10.11
Selective inhibition of epithin expression by RNA interference in the mouse preimplantation development: functional role of epithin in compaction	Khang I, Son S, Park D and Kim K	한국분자세포생물학회	2002. 10.17-10.18
Identification of exonic splicing enhancers and involvement of SR proteins as trans-acting factors for mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pre-mRNA splicing	Park E, Han J and Kim K	한국분자세포생물학회	2002. 10.17-10.18
Participation of extracellular signal-regulated kinase in protein kinase C alpha induced neurogenesis of GT1 hypothalamic neurons	Choe Y and Kim K	생물과학협회	200.11
Involvement of CLOCK:BMAL1 heterodimer in serum-responsive mPer1 Induction	Eun B, Jung H, Choe Y and Kim K	미국신경과학회	2002. 11.1-11.8
Excision of the first intron serves as a key regulatory step for the synthesis of gonadotropin-releasing hormone	Son G, Geum D and Kim K	미국신경과학회	2002. 11.1-11.8
GnRH pre-mRNA splicing: role of exonic splicing enhancer	Kim K	분자신호전달 및 내분비학 국제 심포지움 (조청세미나)	2002.11
Differential action of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on the expression of estrogen receptors α , β and the truncated estrogen receptor product-1 (TERP-1) in the hypothalamus and pituitary of ovariectomized rats	Lee S, Hubertus J and Kim K	BK21 연례 학술대회 (서울대)	2003. 7.4
Bmal1-induced apoptotic cell death was rescued by dexamethasone, a potent analog of glucocorticoid	Chang S, Choe Y, S대 J and Kim K	BK21 연례 학술대회 (서울대)	2003. 7.4
Regulation of Human <i>Period 1</i> Promoter Is Involved with CREB Activation by MAP Kinase Pathway in Human Neuroblastoma Cell Li	Park S and Kim K	58th 생물과학회	2003. 8.19-8.21
Subcellular localization of circadian clock gene produced by recombinant adenoviral expression system	Kim H, Jung N, Son H and Kim K	58th 생물과학회	2003. 8.19-8.21
Modeling of Ultradian Rhythmicity of Hypothalamic GnRH Neuron	Han K, Lee S and Kim K	58th 생물과학회	2003. 8.19-8.21
계: 50건수			

3. 연구성과

연월	업체명	기술명	주요내용
2000. 10	(주) KDR	신경과학 관련 기술자문	(1) 뇌 특이조직 미세천공 및 미세주입 기술 (2) 신경세포 배양 기술
2001. 3	한국광학, 택산상역 (Olympus)	FRET 및 형광이미징 기술	FRET 측정 기술이전 및 컨설팅 계약 체결

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

1) Real-time RT-PCR에 의한 유전자의 정량적 측정법 확립

○ FRET과 probe hybridization을 응용한 Real-time RT-PCR 방법은 일주기 유전자 외에 현재 연구결과들에 의하면 세포사, 세포분열, 전사/번역에 작용하고 있는 많은 유전자들이 24시간을 주기로 발현됨이 보고됨에 따라서 앞으로 다양한 생물학 분야에서 일시적인 유전자의 기능연구에서 실시간적인 기능연구가 대두될 것이며, 본 연구에서 일주기 유전자의 24시간 발현의 정량적 측정 및 이를 이용한 스트레스 모델에서 유전자의 실시간 발현을 확인함으로써 보다 빠르고 정확하게 특정 유전자의 발현양상을 통해 기능연구에 초석이 될 것으로 사료된다.

2) Baculovirus/Adenovirus를 이용한 효율적 유전자 발현 및 도입기술 확립

○ 일반적인 단백질 과잉발현 시스템은 대장균에서 발현되어지고 있다. 하지만 대장균에서 발현/정제된 단백질은 post-translation과정이 없어 그 단백질의 기능을 연구하기에는 다소의 장벽을 갖고 있다. 따라서 앞으로는 포유류에 근접한 곤충세포에서의 단백질 발현 시스템을 사용하여 기능적인 단백질을 발현시켜 얻을 수 있어서 단백질의 기능 연구 및 항체 생산에 중요한 항원을 만드는데 사용하고 있는 경향이 짙어지고 있다. 본 연구에서 제작된 Baculovirus시스템과 곤충세포에서의 발현양상을 형광 이미지로 관찰하는 연구는 새로운 생리활성물질의 대량 스크리닝에 응용할 수 있다.

○ 또한 Adenovirus는 현재 유전자 치료법 연구에 이용하고 있을 뿐만 아니라 특정 유전자에 대한 형질전환/knock-out 동물 모델에서 그 유전자의 기능 회복 및 저해에 응용하여 기능을 보다 명확히 할 수 있는 in vivo에 적용 가능한 기술이다. Adenovirus로 제작된 일주기 유전자들은 향후 일주기 유전자의 기능연구에 있어서 보다 효율적인 것으로 사료되며 특히 뇌에 직접적인 유전자의 삽입 및 유전자 도입 효율이 낮은 신경세포에서 일주기성 연구에 중요한 기반이다.

나. 활용방법

- Real-time RT-PCR 방법의 확립은 다양한 생물/의학 분야에서 특정 유전자의 24 시간 주기 발현양상을 정량적 측정을 통한 전반적인 기능연구의 확대
- Baculovirus를 이용한 생리활성물질의 대량 스크리닝의 모델로서의 활용
- Adenovirus를 이용한 유전자 도입법은 형질전환/knock-out 모델에서 유전자의 기능 회복 및 저해 연구자들에게 연구의 다양성을 제공.

5. 기대효과

최근의 연구결과에 의하면 하루 중의 어느 시기에 약물을 투여하는가에 따라 그 효과도 크게 달라지고 약물의 작용 메커니즘도 역시 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. 질병의 일주기 리듬에 맞추어 약물을 투여하는 생체리듬 치료요법의 필요성이 제기되고 있다. 예를 들면, 천식은 주로 밤에 그 증상이 심해지므로 천식을 막기 위한 약물은 밤에 고농도로 투여하고 낮 동안에는 적은 양만을 투여하는 것이 훨씬 효과적이다. 천식과 같이 시간에 따른 약물 처방이 필요한 질병으로는 소화액성 궤양, 고혈압, 암 등으로 그 범위가 점차 확대되고 있다. 21세기에는 유전자 수준에서 질병을 치료하는 이른바 유전자 치료 기술이 개발될 것이며, 유전자 치료법의 핵심기술은 조직 특이적으로 공간적인 유전자 발현을 유도하는 것이다. 예를 들어, 전립선암 치료를 위해서는 PSA (prostate specific antigen)의 프로모터, 유방암 치료에는 락토알부민의 프로모터와 같이 조직 특이적으로 발현하는 유전자의 프로모터를 이용한다. 시간적인 발현을 조절하기 위해서는 유전자 치료 벡터의 promoter에 특정한 외부 신호에 반응할 수 있는 cis-element 서열을 넣는 것이 일반적인 접근 방법이다. 그러나, 이러한 기존의 접근법은 환자의 내인성 요인에 의해서 영향을 받게되고 또한 외부로부터 끊임없이 특정 유도물질을 주기적으로 주입해야 한다는 문제점을 안고 있다. 따라서, 치료 목적의 단백질을 표적 조직에서만 특이적으로 발현하게 하는 한편, 이 단백질이 가장 적절한 시기에 발현이 유도될 수 있도록 만듦으로써 유전자 치료의 부작용을 최소화하고 치료 효과를 극대화하는 것이 현재 유전자 치료기술의 핵심과제라 할 수 있다.

본 연구는 기존의 유전자 치료요법의 한계를 극복하는 초석이 될 것이며, 생체리듬 치료요법을 한 차원 높이게 될 것이다. 생체리듬 유전자를 이용한 유전자 발현제어기술의 개발을 통해 한국의 국제 경쟁력을 높이는데 크게 기여할 것이다.

6. 문제점 및 건의사항

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

생체시계를 이용한 유전자 발현 제어 기술

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	200-N-NL-01-C-1			
과제명	생체시계 유전자와 조절인자를 이용한 유전자 발현 제어 기술 개발			
사업명	국가지정연구실사업			
세부사업명				
연구기관	서울대학교	기관유형	대학	
참여기관(기업)				
총연구기간				
총연구비	정부(862,422)천원	민간(0)천원	합계(862,422)천원	
연구책임자 1	성명	김경진	주민번호	
	근무기관 부서	서울대학교 생명과학부	E-mail	kyungjin@snu.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	02)880-6694
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	김경진	소속/부서	서울대학교 생명과학부
	직위/직급	교수	E-mail	kyungjin@snu.ac.kr
	전화번호	02)880-6694	FAX	02)884-6560
	주소	(151-742)서울 관악 신림동 산 56-1 서울대 생명과학부		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

현재 개발 중인 유전자 치료기술들이 효과가 오래 지속되지 않을 뿐 아니라, 단백질이 하루 중 치료에 적절한 시기에 맞추어 분비될 수 없다는 한계점을 갖고 있다. 또한 기존의 접근법은 환자의 내인성 요인에 의해서 영향을 받게되고 또한 외부로부터 끊임없이 특정 유도물질을 주기적으로 주입해야 한다는 문제점을 안고 있으며, 치료 목적의 단백질을 표적 조직에서만 특이적으로 발현하게 하는 한편, 이 단백질이 가장 적절한 시기에 발현이 유도될 수 있도록 만듦으로써 유전자 치료의 부작용을 최소화하고 치료 효과를 극대화하는 것이 현재 유전자 치료 기술의 핵심과제라 할 수 있다.

본 연구팀이 제안하는 생체시계를 이용한 유전자 발현 제어 기술은 기존 유전자 치료 기술이 가지고 있는 이러한 근본적인 문제점을 원천적으로 해결하고자 하는 적절한 대안으로서 생체시계 관련 유전자 변조 기술 및 생체리듬 pacemaker에 대한 기초연구를 기반으로 유전자 치료 기술의 문제점을 극복하고 나아가 질환모델을 대상으로 치료요법에 활용하고자 한다.

<기술적 특징>

- (1) 내인성 일주기 생체리듬을 이용한 특정 시간대 유전자 작동 및 유도하여 생리적인 적절한 치료를 위한 단백질양을 조절하고,
- (2) 유전자 치료 효과 지속성 향상하기 위해 환자의 내인성 요인에 의한 유전자 치료 극복을 의해서 특정 조직에서 특이적 발현을 유도하며,
- (3) 치료 표적 유전자 또는 단백질 발현을 위한 주기적인 유도물질 주입해야 하는 현 유전자 치료법의 문제점 해결을 위해 생체시계 관련 유전자 변조 및 생체리듬 pacemaker를 기반으로 하는 유전자 치료 기반 기술이다.

[용도 · 이용분야]

- (1) 유전자 치료법에 있어 유전자의 작동시간과 지속성 및 과잉발현의 부작용을 대체함으로써 현 유전자치료법의 효율의 극대화에 응용될 수 있다.
- (2) Shift-worker 및 시차 등의 내재적인 생체시계의 환경변화에서 발생하는 사회·경제적인 안정성 확보 및 전반적인 지식기반 및 환경개선에 효과를 가져다 줄 것이다.
- (3) 신경내분비 유전병 (Kallmann syndrome, precocious puberty (조숙), delayed puberty) 신경 행동학적 질환치료에 응용 및 실질적 연구에 상당한 효과를 갖는다.
- (4) 장기적인 약물 치료, 화장품 및 발모제 등의 신경호르몬 관련 상품 개발에 응용할 수 있다.
- (5) 생체리듬의 이상에서 발병하는 자궁암, 유방암 등을 비롯한 난치병의 생체리듬요법에 보다 효율적으로 적용될 것이다.

■ 기술의 분류

[기술코드] D22

[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
 기 타 (지식 및 기술향상)

[기술의 용도] (복수 선택(√로 표시)가능합니다)

- 기계설비 부품소자 원료재료 소프트웨어
 가공처리기술 자동화기술 불량률 감소 등 현장애로기술
 제품설계기술 공정설계기술 기 타 (기초과학 응용)

■ 산업재산권 보유현황

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
세포내 칼슘 변화의 측정을 위한 칼슘 바이오 센서	대한민국특허 출원 제10-2002-0015219	2002년 3월	김경진	대한민국	
변종삼입형광단백질	대한민국특허 출원 제10-2002-0015218	2002년 3월	김경진	대한민국	
캐스페이즈 활성 평가 방법	대한민국특허 출원 제10-2002-0015217	2002년 3월	김경진	대한민국	
펜틸렌테트라졸 장기처리에 의한 도파민 신경세포 사멸 유도 방법	대한민국특허 출원 제10-2002-0015220	2002년 3월	김경진	대한민국	
유전자 클로닝 과정을 실시실험과정과 동일하게 시뮬레이션하고 그 결과물을 데이터베이스형태로 저장할 수 있도록 하는 컴퓨터 프로그램 및 그 구현방법	대한민국특허 출원 제10-2001-0071566	2001년 11월	(주)뉴로제넥스	대한민국	
형광강도가 증강된 삼입형 녹색 형광 단백질 및 그 유전자	대한민국특허 출원 제10-2002-0012409	2002년 3월	(주)뉴로제넥스	대한민국	
에이치닥과 같은 전사조절 인자를 이용한 세포 수준의 양성 활성 분석	대한민국특허 출원 제10-2002-0012476	2002년 3월	(주)뉴로제넥스	대한민국	

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

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