

98-J04-02-01-A-07

Peripheral nervous system의 손상에 의해
유도되는 신경세포 재생 관련유전자의 기능분석

Functional studies on the noble gene
induced by injury on peripheral nervous system

생명공학연구소

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “Peripheral nervous system의 손상에 의해 유도되는 신경 세포 재생 관련유전자의 기능분석”과제의 보고서로 제출합니다.

2000. . . .

주관연구기관명 : 생명공학연구소

주관연구책임자 : 최 인 성
연 구 원 : 김 재 화
“ : 이 영 희
“ : 문 애 란
“ : 윤 선 영
“ : 주 종 혁

요 약 문

I. 제 목

Peripheral nervous system의 손상에 의해 유도되는 신경세포 재생 관련 유전자의 기능분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 Peripheral nervous system (PNS)이 central nervous system (CNS)과 비교해 다른 점은 PNS의 경우 신경계에 손상을 입었을 경우 축삭이 재생 (axonal regeneration)을 할 수 있는 능력을 지니고 있다는 점과 이때 발현이 증가되는 유전자 가운데 *nerve injury induced protein*이라고 명명된 유전자의 기능분석을 위하여 단백질의 기능연구, 형질전환 동물과 Knock-out mouse제작 등을 통한 기능을 정립하고자한다. *nerve injury induced protein* 연구의 중요성은 신경세포의 재생기작에 대한 이해와 질병 또는 물리적 손상을 입은 뇌를 다시 복구하는데 필요한 치료방법을 개발하는데 필요한 연구방향을 제시하는 기반이 된다. 손상된 뇌를 치료하기 위해서는 CNS의 간세포 (stem cell)에 대한 연구와 이해를 필요로 하지만 PNS의 재생과정에 대한 이해도 매우 중요하다. 신경세포의 재생기작을 연구하기 위해 이 유전자의 기능을 연구하기 위해서는 동물모델이 필요함을 인식하고 transgenic 또는 knock-out mouse를 만들기 위해 백서 (mouse)에서 쥐 (rat)의 *nerve injury induced protein* 유전자의 homologue를 클로닝하는 작업을 진행하였으며 *nerve injury induced protein*의 생리적인 기능을 밝혀 PNS의 재생에 관한 이해를 높일 수 있고 또 이 유전자의 기능을 연구할 수 있는 동물모델을 확보해 앞으로의 실험에 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

Ⅲ-1. 세포 주를 이용한 *nerve injury induced protein*의 생리적 기능연구

*Nerve injury induced protein*의 세포 내 기능을 검증하기 위하여 단일 클론항체의 생산과 이 항체를 이용한 세포내의 분포를 확인하고, 합성된 재조합 단백질을 분석하여 단백질의 세포 내에서의 기능을 분석하고 세포의 형태학적 변화를 분석하였다.

Ⅲ-2. Mouse의 full ORF를 포함한 cDNA 클로닝

*Nerve injury induced protein*의 발현이 장기에 따른 발현의 특이성을 나타내는 지를 확인하기 위하여 RT-PCR 방법 및 multi-blot membrane을 통하여 Northern hybridization 방법으로 확인하였다. 이때 사용된 probe를 제작하기 위하여 mouse의 full ORF를 포함하는 cDNA를 제작하였고 이를 이용하여 재조합 단백질과 단일 클론항체를 생산하였다.

Ⅲ-3, Genomic DNA 클로닝

Nerve injury induced protein 발현의 증가현상에 영향을 미치는 전사조절 기능을 확인하기 위하여 genomic DNA를 cloning하고 전체염기서열을 분석하여 신경조직재생과 관련된 전사조절인자의 역할을 규명하고자하였다. 이를 위하여 promoter analysis를 통하여 각종 신경세포 주에서 전사조절activity를 측정하여 *nerve injury induced protein*의 전사활동을 분석하였다.*nerve injury induced protein* 유전자의 upstream sequence에 결합 가능한 transcription factor의 종류와 결합위치를 분석하고, 확보된 6.8kb upstream sequence의 전부 혹은 일부를 포함한 염기서열을 reporter인 *CAT* (*chloramphenicol acetyltransferase*) 유전자가 포함된 vector에 cloning하였다. neuroblastoma에서 유래한 세포 주에 plasmid를 transfection하여 발현 조절 영역을 확인하였으며 생체 내 각 조직에서의 발현 조절 기작을 밝히기 위해 동일한 plasmid를 사용하여 transgenic mouse를 제작하였다.

Ⅲ-4, 유전자 적중동물의 제작

Nerve injury induced protein 유전자의 기능이 상실된 knock-out mouse로부터 *nerve injury induced protein*의 기능을 분석하고자 knock-out mouse를 제작하였다. *nerve injury induced protein* 단백질의 기능을 상실한 knock-out mouse를 제작하기 위하여, 확보된 *nerve injury induced protein* genomic DNA의 6.8kb upstream sequence와 exon 2 부분을 포함한 염기서열을 Osdupdel vector에 cloning하여 targeting vector를 제작하였으며, targeted 유전자를 확인할 수 있는 검정체계를 수립했다.

IV. 연구개발결과

IV-1. 세포 주를 이용한 *nerve injury induced protein*의 생리적 기능연구

다양한 세포 주에서 *nerve injury induced protein* 단백질의 발현을 조사한 결과 조직 특이적인 발현현상을 확인할 수 있었으며, 이것은 *nerve injury induced protein* mRNA의 발현 양상을 분석한 Northern hybridization의 결과와 일치하였다. 또한 다양한 자극에 의한 *nerve injury induced protein*의 발현과 세포의 형태학적 변화, 항체를 이용한 상호작용을 가지는 단백질의 상관관계를 분석함으로써 이 단백질의 세포 내에서의 기능을 분석하였다.

IV-2. Mouse의 full ORF를 포함한 cDNA 클로닝

Nerve injury induced protein 유전자의 염기서열을 분석하고 ORF 영역 중 extracellular domain으로 여겨지는 N-말단의 50개 아미노산을 coding하는 150 bp의 DNA 절편을 재조합 단백질 발현 vector에 cloning한 후 생산된 재조합 단백질을 분리 정제하였고, 이를 전기영동과 Western blot 방법으로 확인하였다. 생산된 재조합 단백질을 백서에 면역 주사하여 단일클론항체를 얻었으며, 세포막에서 *nerve injury induced protein* 단백질이 검출됨을 확인하였다.

III-3, Genomic DNA 클로닝

백서의 genomic DNA library로부터 *nerve injury induced protein*의 전체

유전자 및 upstream sequence를 포함하는 염기서열을 cloning하여 *nerve injury induced protein* 유전자의 구조를 밝혔다. 백서의 *nerve injury induced protein* 유전자는 4 개의 exon으로 구성되어있으며, intron을 포함하여 약 8kb에 달하는 것으로 여겨진다.

III-4, 유전자 적중동물의 제작

*Nerve injury induced protein*의 생체 내 기능분석을 위하여, 확보한 백서의 *nerve injury induced protein* genomic DNA의 전체 염기서열을 이용하여 *nerve injury induced protein* 유전자의 exon 1 부분이 제거될 수 있는 targeting vector를 제작하였고 homologous recombination에 의해 생산될 수 있는 예상 targeted 유전자의 지도를 작성하고 이에 따른 검정체계를 확립과 knock-out mouse를 생산하였다.

S U M M A R Y

The nucleotide sequence of the cDNA clone was identical to that of human *nerve injury induced protein* gene isolated from a keratinocyte stem cell cDNA library. The comparison of nucleotide and amino acid sequences among human, rat and mouse *nerve injury induced protein* genes showed 87% and 90% identity, respectively. To provide a basis for further studies about the transcriptional regulation and the function of *nerve injury induced protein in vivo*, the tissue-differential expression of mouse *nerve injury induced protein* was investigated and the mouse *nerve injury induced protein* genomic DNA was analyzed.

The mouse *nerve injury induced protein* mRNA was expressed predominantly in liver, but hardly detectable in brain. A genomic clone containing the complete sequence of mouse *nerve injury induced protein* gene was isolated from mouse bacterial artificial chromosome (BAC) library. Two sub-clones constructed from pUC118 and pBlueScript, were named pMNH1 and pMNH2; both clones contained upstream sequence of 6.8 kb and the entire mouse *nerve injury induced protein* gene. The mouse *nerve injury induced protein* gene was composed of four exons and the complete coded sequences were included within the first three exons.

The putative promoter region of mouse *nerve injury induced protein* gene was G-C rich and did not contain "TATA" or "CAAT" consensus sequences. The upstream sequence of exon 1 consisted of a number of putative *cis*-elements including NRSE (neural-restrictive silencer element), the binding sites for nerve growth factor induced-protein A and C (NGFI-A and NGFI-C). To identify the transcriptional regulation of mouse *nerve injury induced protein*, three kinds of plasmid constructs containing the bacterial *chloramphenicol acetyltransferase* (*CAT*) gene and the truncated upstream sequence of mouse *nerve injury*

induced protein gene were generated and named as pCAT-300, pCAT-2000, and pCAT-6800. These constructs were transfected in BNL SV A.8, N Mu 2Li, and NIH 3T3 cells and the CAT activity was measured. The CAT activity showed cell-type dependent manner transfected with pCAT-300 or pCAT-2000. In addition, the CAT activity was significantly decreased in BNL SV A.8 and N Mu 2Li cells transfected with pCAT-6800. From these results, the transcription of mouse *nerve injury induced protein* could be regulated in cell-type dependent manner by some transcriptional factors, like as neural-restrictive silencer factor (NRSF), bound the upstream sequence within 2042 to 6850.

To identify the upstream region involved in tissue-differential expression and/or induction by nerve-injury of mouse *nerve injury induced protein*, the transgenic mice has being constructed. The construction of transgenic mice has being carried out using the plasmids, pCAT-300, pCAT-2000 and pCAT-6800 and three transgenic pups derived from pCAT-2000 have been isolated. In addition, knock-out mice containing the defective *nerve injury induced protein* gene has being constructed to investigate the function of *nerve injury induced protein*. The targeting vector for the construction of knock-out mice was generated using the upstream 6.8 kb sequence and the 1 kb sequence included the exon 2 of mouse *nerve injury induced protein* gene.

Therefore, the mice deleted the exon 1 of mouse *nerve injury induced protein* gene will be produced by homologous recombination between the wild type genomic DNA and targeting vector.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	10
Chapter 2. Current status of the art	15
Chapter 3. Contents and results of the project	18
3-1. Contents of the project	18
3-2. Results of the project	26
Chapter 4. Project achievements and external contributions	43
Chapter 5. Further applications	48
Chapter 6. Reference	49

목 차

제 1장 서론	10
제 2장 국내외 기술개발 현황	15
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	18
3-1 연구개발수행 내용	18
3-2 연구수행 결과	26
4장 연구개발목표 달성도 및 기여도	43
제 5장 연구개발결과의 활용계획	48
제 6장 참고문헌	49

제 1 장 서론

제1절 연구 목적

본 연구는 뇌 조직의 재생 시 관여하는 유전자인 *nerve injury induced protein* 유전자 의 발현 분석과 더불어 단백질의 발현 형태를 분석하기 위하여 재조합 단백질의 생산 및 이에 대한 단일클론 항체를 생산한다. 신경 세포 주를 비롯한 각종 세포 주를 대상으로 *nerve injury induced protein*의 발현 분석을 통하여 유전자와 단백질의 기능을 예측하여 활용 가능성이 있는 기능성 유전자를 발굴하고 질병과 관련된 기능을 예측함으로써 질병의 예방과 치료에 응용하고자 한다. 이를 위하여 *nerve injury induced protein*의 발현 조절 기작 규명 및 단백질의 기능 분석을 위한 model 동물을 제작하기 위한 기초 단계로, 백서에서 *nerve injury induced protein*의 전체 유전자를 포함하는 genomic DNA를 확보하고 upstream sequence를 분석하고 조직 특이적 발현을 보이는 *nerve injury induced protein*의 발현 조절 기작을 밝히기 위하여 *nerve injury induced protein*의 발현에 영향을 줄 수 있는 upstream 영역을 *in vitro*에서 분석한다. 생체 내에서 *nerve injury induced protein*의 발현 기작을 분석하기 위한 transgenic mice를 제작, 확인하고 단백질의 기능을 분석하기 위한 knock-out mice 제작을 위한 targeting vector를 제작하였고 검정체계를 수립한다.

제 2절 연구의 필요성

Peripheral nervous system (PNS)이 central nervous system (CNS)과 비교해 다른 점은 PNS의 경우 신경계에 손상을 입었을 경우 축삭이 재생(axonal regeneration)을 할 수 있는 능력을 지니고 있다는 점이다. PNS 신경세포가 재생능력을 나타내기 위해서는 주위에 Schwann 세포와 basal laminae, fibroblast, collagen, degenerating myelin과 대식세포들이 존재해야 한다고 알려져 있다(1). 신경조직에 손상이 가해지면 여러 가지 변화가 일어나는 것이 알려져 있는데 myelin lipid의 생합성과 주요한 myelin 단

백질들의 발현은 억제되는 반면 neurotrophic factor들, p75 NGF 수용체와 유사한 세포의 surface molecules 그리고 cell adhesion molecule: L,N-cadherin, N-CAM 등의 발현은 Schwann 세포 내에서 증가한다(2-3). 1996년, Araki 등은 쥐 (rat)의 좌골신경을 절단하거나 압쇄(crush)함으로써 손상을 가한 후 좌골신경의 말단부위에서 급격히 증가하는 유전자를 differential hybridization 기법으로 클로닝하고 이를 *nerve injury induced protein*이라고 명명하였다(4).

이 유전자가 코딩하는 단백질은 정상 상태의 좌골신경에서는 발현 정도가 매우 낮으나 신경이 손상을 입을 경우 7-14일 후에 Schwann 세포 내에서 발현이 증가하며 그 특성을 연구한 결과 세포표면에 존재하는 새로운 adhesion molecule로 밝혀졌다. 이 단백질은 좌골신경이 절단 등의 방법으로 손상을 입으면 dorsal root ganglion (DRG) 신경세포에서 발현이 증가하며 축삭(axon)을 통해 손상부위로 이동하여 축삭의 재생에 중요한 cellular adhesive interaction에 관여하는 것으로 추정되고 있다. 이 단백질의 기능을 유추할 수 있는 또 다른 증거로는 DRG 신경세포를 *nerve injury induced protein*을 많이 생산하는 것으로 알려진 CHO 세포 위에서 배양할 경우 DRG 신경세포로부터 신경세포 돌기(neurite)가 자라 나오는 것이 관찰되었다.

Nerve injury induced protein 연구의 기술적 측면에서의 중요성은 다음과 같다. 신경세포의 재생기작에 대한 이해는 질병 또는 물리적 손상을 입은 뇌를 다시 복구하는데 필요한 치료방법을 개발하는데 필요한 연구방향을 제시하는 기반이 된다. 손상된 뇌를 치료하기 위해서는 CNS의 간세포(stem cell)에 대한 연구와 이해를 필요로 하지만 PNS의 재생과정에 대한 이해도 매우 중요하다. 신경세포의 재생기작을 연구하기 위해 본 연구자들은 1995년도에 독자적으로 쥐의 *nerve injury induced protein*에 해당하는 인간 homologue 유전자의 full ORF (open reading frame)를 포함하고 있는 cDNA 클론을 확보하고 발현벡터를 제작하여 대장균체 내에서 이 인간 유래의 단백질에 해당하는 재조합 단백질을 생산하였으며 이 재조합 단백질에 대한 단일 클론 항체를 생산하는 hybridoma 세포 주를 클로닝하고 있다. 또 이 유전자의 기능을 연구하기 위해서는 동물모델이 필요함을 인식하고 transgenic 또는 knock-out mouse를 만들기 위해 백서(mouse)에서 쥐(rat)의 *nerve*

injury induced protein 유전자의 homologue를 클로닝하는 작업을 진행 중으로 백서 유전자의 full ORF를 포함하는 cDNA 염기서열을 이미 확보하였고 현재는 이 full ORF 염기서열을 탐색자 (probe)로 하여 genomic DNA를 클로닝하는 연구를 수행하고 있다. 본 연구과제가 성공적으로 수행되면 *nerve injury induced protein*의 생리적인 기능을 밝혀 PNS의 재생에 관한 이해를 높일 수 있고 또 이 유전자의 기능을 연구할 수 있는 동물모델을 확보해 앞으로의 실험에 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

*Nerve injury induced protein*의 인간 homologue 유전자는 인간 염색체의 9q22 부근에 위치하며 염색체의 이 부위는 감각신경세포의 퇴행으로 고통과 온도에 대한 감각을 상실하고 피부에 만성적인 궤양을 일으키는 hereditary sensory neuropathy type I (HSNI)이라는 질병과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(6). 따라서 본 연구에서 제작하는 동물모델은 인간에서 발견되는 HSNI 또는 유사한 질병에 대한 질환 모델동물이 될 수 있을 것이다. 동물모델은 *nerve injury induced protein*이 과 발현되거나 혹은 발현이 억제되는 transgenic mouse와 *nerve injury induced protein*의 백서 유전자 homologue가 존재하는 부위를 knock-out시킨 mouse를 제작하고자 한다.

Transgenic mouse는 *nerve injury induced protein*의 생체 내에서의 기능을 밝혀주는 좋은 모델동물이 될 수 있을 것으로 여겨지며, knock-out mouse로부터는 *nerve injury induced protein*의 유전자가 완전히 존재하지 않을 때 발생하는 현상 혹은 질병에 대해 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 모델동물은 통상적으로 제작자들의 연구가 거의 완결된 후에 분양을 해주며, 분양을 받더라도 치료제의 개발 등의 실용적인 연구에는 이용하지 못 하는 제한이 있다. 따라서 신경세포의 재생과 퇴행성 뇌질환에 대한 관련 가능성이 매우 높은 *nerve injury induced protein* 유전자를 knock-out시킨 백서를 제작하여 뇌질환의 병인을 밝히고, 이의 치료제를 찾는 과제는 국제적인 경쟁력이 매우 높은 과제로서 시급히 연구가 실시되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구과제에서는 대상 유전자를 결핍시킨 (0 copies) 백서와 유전자의 수를 2배로 증가시킨 (4 copies) 시킨 백서를 제작한 후 이들을 교배시켜 각각 0, 1, 2, 3, 및 4 copies의 유전자를 지닌 백서를 제작하고자 한다. 또한 knock-out 마우스를 이용하여 유전자의 copy수에 따른 유전자의

발현 양상을 조사하고, 특히 뇌 조직에서의 발현 정도와 퇴행성 뇌 질환의 발병에 대한 상관관계를 규명함으로써 이 유전자가 퇴행성 뇌 질환에 미치는 영향을 밝히고 퇴행성 뇌 질환의 병인론을 보다 명확하게 연구하여 치료법을 찾아내고자 한다. 뿐만 아니라 본 연구에서 개발된 유전자적중 동물은 새로운 치료제를 개발하기 위한 동물모델로도 사용할 수 있다. 본 연구에 필요한 대부분의 기술들, 즉 유전자 클로닝기술, Northern blot analysis 기술 및 염기서열 결정 기술 등의 분자생물학 관련기술들과 재조합 단백질 생산, 단일클론항체 생산 및 정제기술, 실험동물 사육 및 동물실험기술 등의 면역학 관련기술들은 면역조절 연구실에서 일상적으로 사용하는 기술들이며 knock-out 또는 transgenic mouse를 제조하기 위해서는 생명공학 연구소의 유용생물자원 연구실 소속의 오 구택 박사팀이 연구에 직접 참여하여 연구를 진행할 것이다.

인간을 포함하는 고등동물이 손상된 조직을 재생하는 능력은 하등동물에 비해 현저히 낮은 것으로 알려져 있고 특히 뇌 조직의 재생능력은 같은 인체 내에서도 간과 같이 재생능력이 뛰어난 조직에 비해 매우 낮다. 질병에 의한 손상 또는 사고 등으로 인한 물리적인 뇌 조직의 손상을 치료 또는 복구시킬 수 있는 기술이 개발된다면 그 효과는 엄청난 것으로 추정되며 이러한 치료법은 뇌 조직 또는 신경세포의 재생에 대한 이해를 기초로 해야만 한다. 국내의 생명공학 관련산업은 제약산업을 중심으로 외형적으로는 활발히 발전, 성장하고 있으나 그 기반이 되는 소재들은 외국 기업들에 대부분 의존하고 있으며, 생물의약품의 기본 소재는 거의 전적으로 외국에서 개발된 것을 빌어다 쓰는 형편이다. 이에 따라 국내 관련산업은 외국 기업에 대한 의존도가 매우 높으며, 물질특허 제도가 도입된 후 그 의존도는 더욱 심화되어 국내 산업이 외국 기업에 대해 기술면에서 종속적인 위치를 차지하게 되어 경제적으로도 더욱 많은 특허료를 지불하는 등 국제경쟁력 확보에 지장이 되고 있다. 이와 같은 이유로 국내에서 수행되는 활용 가능성이 있는 새로운 유전자에 대한 연구는 학문적인 면과 의학, 약학, 생물학 및 생명공학 분야에서 실용적 가치도 매우 높을 것으로 판단된다.

본 연구개발의 결과, 얻어질 것으로 예상되는 새로운 유전자에 관한 정보는 국내에서 개발된 독자적이고 새로운 유전자원으로 활용될 수 있으며 새로

운 유전자원의 확보는 국내 연구수준의 향상과 특허 등 지적 소유권 확보를 용이하게 하여 선진국들을 상대로 한 국내 기업들의 기술적 국제경쟁력 향상에 큰 도움이 될 것이며 대상 유전자의 발현을 촉진 또는 저해시키는 동물모델의 제작은 신경의 재생과 관련된 새로운 질환 동물모델로 활용할 수 있어 경제적인 가치 면에서도 소중한 자원이 될 것이다.

신경조직 또는 신경세포의 재생에 대한 이해를 높이는 연구는 뇌의 손상에 의해 영향을 받는 환자와 가족들의 고통을 덜어 주는데 도움이 될 수 있으며 노화와 관련된 뇌 세포의 퇴화를 지연시키는 데도 활용할 수 있는 가능성이 있다. 뇌의 재생과 관련된 유전자 또는 단백질의 기능에 대한 연구는 뇌 손상의 치료 가능성을 제고시켜 보건의료 환경 개선과 국민의 삶의 질을 향상시키는데 기여할 수 있다. 또 연관되는 연구결과 및 기술의 축적은 궁극적으로 국내 생명공학의 발전에 도움이 되며 선진국들이 시도하는 유용 유전자의 특허 화와 생물자원의 무기화로 특징 지워지는 과학기술의 국제적인 무한경쟁 시대에 대처하는 방안으로 국내 고유의 유전자원을 개발하는 독자적이고 기본적인 기술개발 전략이 될 수 있다. 연구추진 과정에서 얻어지는 각종 연구개발 기술은 기술집약형, 에너지절약형 및 탈공해형의 미래 산업의 개발을 촉진할 것이고 연구결과로서 신규 유전자의 유용성이 밝혀진다면 그로 인해 개발되는 의약품은 보건의료 분야의 발전에 직접적인 기여를 할 것으로 기대된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내 기술개발 현황

본 연구자들은 인체 조직의 재생에 관여하는 유전자를 탐색하는 과정에서 1995년 암 조직에서 발현이 특이적으로 억제되는 미지의 인간 유전자의 부분 염기서열을 발견하였으며 1996년 초부터 이 유전자에 대한 연구에 착수하고 그 특성을 연구하기 위해 인체 조직에서 만들어진 cDNA library에서 이 새로운 유전자의 full ORF를 포함하는 cDNA 염기서열을 클로닝하고 발현벡터를 만든 후 대장균 체를 이용해 재조합 단백질을 생산하였으며 현재 이 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포 주를 클로닝하고 있다. 본 연구자들이 인간의 cDNA library에서 독립적으로 클로닝한 유전자는 1996년 Milbrandt 그룹이 rat에서 발견한 유전자의 인체 homologue임이 Milbrandt의 발표로 밝혀졌다.

*Nerve injury induced protein*이 신경세포의 재생에 어떻게 관련되어 있는가를 연구하기 위해서는 두 가지 접근 방법이 있다고 사료된다. 첫째는 인간 또는 동물에서 유래한 세포 주를 사용한 세포 수준에서의 연구이며 둘째는 동물모델을 개발하여 모델동물을 대상으로 연구를 수행하는 방법이다. 본 연구자들은 이 새로운 단백질의 세포수준에서의 생리적인 기능을 밝히기 위해 본 연구자들이 확보한 *nerve injury induced protein* 유전자의 인간 homologue 유전자의 cDNA 염기서열, 재조합 단백질 그리고 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체 이외에 생체 수준에서의 생리적인 기능을 밝히기 위해서 모델동물이 반드시 필요할 것으로 판단하여 현재 transgenic mouse와 knock-out mouse를 제작하기 위해 백서의 cDNA library로부터 이 유전자의 full ORF를 포함하는 cDNA 염기서열을 클로닝 하였으며 이 클로닝된 백서의 full ORF 염기서열을 탐색자로 사용하여 백서의 genomic DNA를 클로닝하는 작업을 수행하였다.

제 2절 국외 기술개발 현황

*Nerve injury induced protein*에 관해서는 1996년 Milbrandt 그룹이 쥐의 좌골신경을 절단하거나 압제하는 손상을 가한 후 좌골신경의 말단부위에서 급격히 증가하는 유전자를 differential hybridization 기법으로 클로닝하고 이를 *nerve injury induced protein*이라고 명명한 다음 학계에 보고한 것이 최초이다(4). 이 유전자가 코딩하는 단백질은 정상 상태의 좌골신경에서는 발현 정도가 매우 낮으나 신경이 손상을 입을 경우에는 손상 후 7-14일이 지난 다음 Schwann 세포 내에서 발현이 증가하며 그 성질을 연구한 결과 세포 표면에 존재하는 새로운 homophilic adhesion molecule로서의 특성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이 단백질은 좌골신경이 손상을 입으면 Schwann 세포와 dorsal root ganglion (DRG) 신경세포에서 발현이 증가하며 축색을 통해 손상부위로 이동하여 축색의 재생에 중요한 역할을 하는 세포간의 유착반응 (cellular adhesive interaction)에 관여하는 것으로 추정되고 있다. 저자들은 이 단백질의 기능을 유추할 수 있는 또 다른 증거로 DRG 신경세포를 *nerve injury induced protein*을 많이 생산하는 것으로 알려진 CHO 세포 위에서 배양할 경우 DRG 신경세포로부터 신경세포 돌기 (neurite)가 자라나오는 현상을 제시하였다(4).

쥐의 *nerve injury induced protein*을 대상으로 aggregation assay를 수행한 결과에 의하면 이 단백질에 의한 유착반응은 2가 양이온을 필요로 하며 energy-dependent process라는 것이 알려졌다 있고 homophilic adhesion에 필수적인 부위는 이 단백질의 Pro²⁶과 Asn³⁷ 사이임이 밝혀져 있다(5). 인간 유래의 *nerve injury induced protein*의 homologue에 대한 cDNA도 이미 클로닝이 되어 있으며 이 유전자의 위치는 인간 chromosome 9q22로 알려져 있다 (5). 이 단백질에 대한 인간의 homologue는 152개의 아미노산으로 구성되어 있으며 쥐의 단백질과 아미노산 서열의 동질성을 비교하면 89%의 아미노산 서열이 완전히 일치함을 알 수 있고 백서의 단백질과 쥐의 단백질은 아미노산 서열에서 98%가 동일한 것으로 밝혀졌다(6). 이 *nerve injury induced protein*의 인간 homologue 유전자가 위치한 인간의 염색체 9q22 부위는 degenerative neurological disorder인 hereditary sensory neuropathy type I과 cancer predisposition syndrome인 multiple self-healing squamous epitheliomata의 원인이 되는 유전자가 존재할 가능성이 높은 부위로 알려져

있다(7).

본 연구에서 기능분석에 초점을 맞춘 *nerve injury induced protein* 유전자의 경우, 국외의 연구개발 실적은 1996년 8월, 미국의 Washington University, School of Medicine의 J. Milbrandt 박사팀이 쥐의 신경세포에서 *nerve injury induced protein* 유전자를 발견하고 그 유전자가 쥐의 신경세포의 재생에 관여한다는 연구결과를 Neuron지에 투고한 것을 포함하여 현재까지 5편의 논문이 발표되었을 뿐이다. 이들의 연구보고는 모두 *nerve injury induced protein*의 신경세포재생에 관련된 기능에 관한 것이며, 현재까지 *nerve injury induced protein* 유전자의 cDNA 염기서열은 집쥐, 백서, 인체에서 밝혀진 바 있지만 전체 genomic DNA 염기서열은 밝혀진 바가 없었으며, 본 연구에서 최초로 백서 *nerve injury induced protein*의 전체 genomic DNA를 cloning 하여 전체 염기서열을 분석하였으며 이를 GenBank에 등록하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 방법 및 내용

1. 세포 주를 이용한 *nerve injury induced protein*의 생리적 기능연구

*Nerve injury induced protein*의 세포 내 기능을 검증하기 위하여 단일 클론항체의 생산과 이 항체를 이용한 세포내의 분포를 확인하고, 합성된 재조합 단백질을 분석하여 단백질의 세포 내에서의 기능을 분석하고 세포의 형태학적 변화를 분석하였다.

1) Northern hybridization

태아 뇌 조직에서 total RNA를 AGPC (acid guanidine phenol chloroform)를 이용한 추출 법으로 분리 정제한 후, Feinberg and Vogelstein의 방법 (1983)으로 Northern hybridization을 실시하였다. RNA는 capillary transfer method를 사용해 Hybond (+) nylon membrane (Boehringer Mannheim)에 옮겼으며 labelling에 사용한 동위원소는 ^{32}P 였고 염기서열을 표식 하는 방법은 random priming method를 사용하였다. 이 방법으로 수행한 실험의 종류는 첫째 인체의 여러 장기의 종류에 따른 *nerve injury induced protein* 유전자의 발현정도 확인, 둘째 백서와 집쥐 그리고 인간 유래의 *nerve injury induced protein* 유전자들 상호간의 차이점 비교, 셋째 다양한 세포 주에서의 *nerve injury induced protein* 유전자의 발현 확인 등을 조사하였다.

2) *Nerve injury induced protein* 유전자의 PCR 방법을 이용한 증폭

Nerve injury induced protein 단백질을 크게 2개의 domain으로 나누고 (extracellular domain, transmembrane domain) 이들 peptide를 포함한 재조합 단백질을 cloning하기 위하여 본 연구자들이 고안하여 제조한 primer를 사용하여 각각의 domain에 해당하는 peptide를 증폭하였다. 클로닝된 *nerve injury induced protein*의 full length cDNA를 template로 이용하고 그림 1.에서 보는 바와 같이 computer program을 활용하여 유전자의 특성을 분석하고 재조합 단백질의 생산을 위한 절편을 N-말단의 50개 amino acids로 결정하였

다.

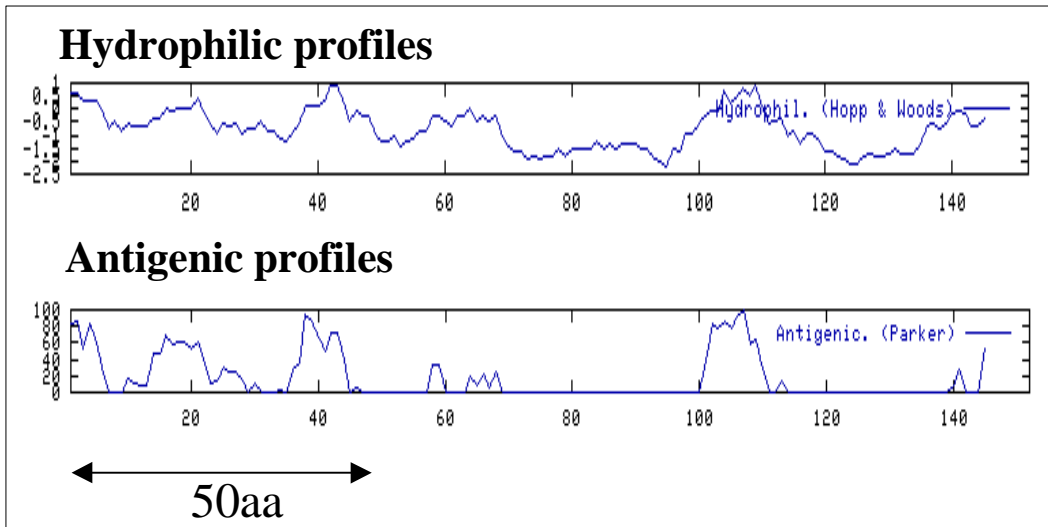


그림 1. *nerve injury induced protein* 유전자의 특정 domain을 증폭하기 위한 염기서열 분석. *nerve injury induced protein*의 유전자의 분석을 hydrophilic profiles과 antigenic profiles 을 computer program (EXPACY)를 통하여 분석하였다

3) *Nerve injury induced protein* 유전자의 재조합 단백질 발현을 위한 벡터의 제조

Extracellular 부위의 증폭된 150여 nucleotides의 DNA 절편을 *XhoI*과 *BamHI* 제한효소로 처리한 다음 Geneclean II kit (BIO 101)으로 정제하고 재조합 단백질의 발현을 위한 벡터인 pGET28a 역시 *EcoRI*과 *BamHI* 제한효소로 처리하고 Geneclean II kit으로 정제한 다음 이들을 T_4 ligase로 결합시켜 재조합 단백질 발현벡터를 제작하였다. 재조합 단백질의 방향성을 고려하여 5' 말단과 3' 말단의 제한효소를 달리 사용하여 원하는 단백질을 생산하고자 하였으며 형질전환 대장균 체를 확인하기 위하여 selection marker로는 kanamycin을 coding하는 vector를 사용하였다. 또한 codon의 정확한 frame을 위하여 pET28a vector를 선정하여 실험을 실시하였다. (그림 2. 참조)

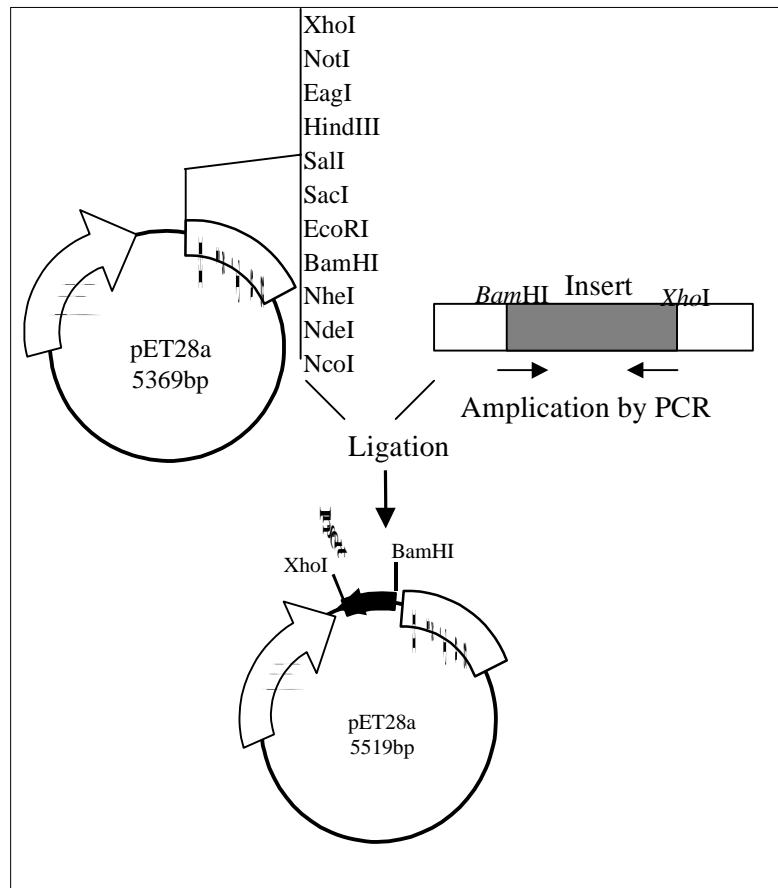


그림 2. *nerve injury induced protein* 유전자의 재조합 단백질 생산을 위한 vector construction의 모식도. *nerve injury induced protein*의 유전자의 재조합 단백질은 pET28a plasmid vector를 사용하여 N-말단부위의 50개의 amino acids를 포함하는 절편 단백질을 생산하였다.

2. Mouse의 full ORF를 포함한 cDNA 클로닝

*Nerve injury induced protein*의 발현이 장기에 따른 발현의 특이성을 나타내는 지를 확인하기 위하여 RT-PCR 방법 및 multi-blot membrane을 통하여 Northern hybridization 방법으로 확인하였다. 이때 사용된 probe를 제작하기 위하여 mouse의 full ORF를 포함하는 cDNA를 제작하였다.

1) 재조합 단백질의 생산 및 발현 확인

제작된 재조합 발현용 벡터를 발현용 균주인 *Escherichia coli* DH5a에 도입하고 이 대장균체 내에서 재조합 단백질의 생산을 유도하였다. 구체적으로

설명하면, 재조합 단백질 생산용 벡터를 가지고 있는 대장균 균주를 ampicillin이 들어 있는 LB 배지에서 배양하며 1mM IPTG를 첨가하여 재조합 단백질의 생산을 유도한 후 균체를 회수하고 초음파로 처리하여 균체를 파쇄하였다. 파쇄된 균체 용액은 원심 분리하여 침전물과 상등액으로 분리하고 상등액에 존재하는 재조합 단백질을 전기영동법과 Western hybridization으로 확인하였다. Western hybridization 분석법으로 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위하여 1차 항체로는 anti-GST/*nerve injury induced protein*을 사용하였으며 2차 항체로는 horseradish peroxidase가 결합된 anti-rabbit IgG를 사용하여 4°C에서 반응시켰다.

2) 재조합 단백질에 대한 단일클론항체 생산

재조합 단백질에 대한 단일클론 항체를 얻기 위해 백서를 이용해 hybridoma 세포주를 제작하였다. 세포융합을 실시하기 위하여 항원을 주사한 생쥐로부터 적취한 spleen 세포와 SP2/0 myeloma 세포를 융합시켰으며 선별용 배지로는 HAT 배지를 사용하였다. 항원에만 특이적으로 반응하는 hybridoma 세포군은 간접 효소결합 면역흡착검사 (indirect ELISA) 분석방법을 사용해 선별하였다. 선별된 세포가 단일클론이 되도록 제한 희석법 (limiting dilution)을 사용해 hybridoma 세포를 희석한 후 하나의 세포로부터 자라 나온 세포들로 이루어진 세포주를 확립하고 이들 중 활성도가 가장 높은 세포를 cloning하였다.

3) 단일클론 항체의 특이성 검증

선별된 hybridoma 세포주가 생산하는 단일 클론 항체가 재조합 단백질이 아닌 세포 내에 존재하는 *nerve injury induced protein* 단백질에 대하여 특이적으로 반응하는지를 ELISA 방법으로 확인하였고 형질전환 동물에서 발현의 pattern과 기능분석을 위하여 사용하기 위하여 항체를 분리 정제하였다.

3. Genomic DNA 클로닝

Nerve injury induced protein 발현의 증가현상에 영향을 미치는 전사조절 기능을 확인하기 위하여 genomic DNA를 cloning하고 전체염기서열을 분석

하여 신경조직재생과 관련된 전사조절인자의 역할을 규명하고자하였다. 이를 위하여 promoter analysis를 통하여 각종 신경세포 주에서 전사조절activity를 측정하여 nerve injury induced protein의 전사활동을 분석하였다. *nerve injury induced protein* 유전자의 upstream sequence에 결합 가능한 transcription factor의 종류와 결합위치를 분석하고, 확보된 6.8kb upstream sequence의 전부 혹은 일부를 포함한 염기서열을 reporter인 *CAT* (*chloramphenicol acetyltransferase*) 유전자가 포함된 vector에 cloning하였다. neuroblastoma에서 유래한 세포 주에 plasmid를 transfection하여 발현 조절 영역을 확인하였으며 생체 내 각 조직에서의 발현 조절 기작을 밝히기 위해 동일한 plasmid를 사용하여 transgenic mouse를 제작하였다.

생체 내 *nerve injury induced protein*의 기능 분석을 위한 transgenic mouse와 knock-out mouse 제작을 위하여 백서의 genomic DNA library로부터 *nerve injury induced protein*의 전체 유전자 및 upstream sequence를 포함하는 염기서열을 cloning하였다. 백서의 *nerve injury induced protein* cDNA 염기서열 중 ORF (open reading frame) 영역만을 포함하는 염기서열을 probe로 하여 129/SvJ 백서의 genomic DNA로부터 제작된 BAC (bacterial artificial chromosome) library를 screening하였다. 확보된 clone은 Southern hybridization으로 확인한 후 subcloning하였으며, Southern hybridization에 사용된 probe는 *nerve injury induced protein* 유전자의 translational start site 혹은 translational stop site를 포함하는 20개의 염기로 구성된 두 종류의 oligomer이다. Southern hybridization에 의해 *nerve injury induced protein* 유전자의 전체 염기서열이 포함된 것으로 확인된 DNA 절편을 각각 subcloning한 후 염기서열을 분석하였다. 분석이 완료된 전체 염기서열은 *nerve injury induced protein* cDNA의 염기서열 및 splicing junction에 존재하는 consensus sequence와 비교하여 exon과 intron을 구분하였다. *nerve injury induced protein* 유전자의 upstream에 해당하는 6,850 bp의 염기서열과 이미 밝혀진 243 bp의 인체 *nerve injury induced protein* 유전자의 upstream sequence에 결합할 것으로 예상되는 transcription factor와 그 결합 부위를 MatInspector program (Genomatix) (core similarity 1.0)을 이용하여 확인하고 비교하였다. *nerve injury*

induced protein 유전자의 발현을 조절하는 영역을 밝히기 위하여, 확보된 upstream sequence의 일부 혹은 전부를 포함하는 plasmid (pCAT-300, pCAT-2000, pCAT-6800)를 제작하고 이를 이용하여 transient transfection assay를 실시하였다. plasmid 제작 방법은 그림 2.에 도식도로 나타냈으며, 간단히 설명하면 아래와 같다. 먼저 vector는, reporter로 bacterial CAT (*chloramphenicol acetyltransferase*) 유전자를 포함하는 pCAT-basic vector (Promega)를 *Xba*I로 처리하고 다시 Klenow fragment를 이용하여 blunt end로 만든 후 *Hind*III를 처리하여 준비해 두었다. 백서의 6.8 kb upstream sequence를 포함하는 pMNH1 subclone에서 upstream sequence 6.8 kb를 분리하기 위하여, pMNH1을 제한효소 *Sfi*I로 처리한 후 Klenow fragment를 처리하여 blunt end로 만들었다. 다시 제한효소 *Hind*III를 처리하고 agarose gel에서 전기영동하여 6.8 kb에 해당하는 DNA 절편을 회수하였다. 이 DNA 절편은 미리 준비하여 둔 pCAT-basic vector에 cloning 하고 pCAT-6800이라 명명하였다. pCAT-6800 DNA를 *Xba*I과 *Hind*III로 처리하여 upstream sequence 중 -2,042 부터 -6,850 염기에 해당하는 염기서열을 제거하고 ligation하여 -14 부터 -2,041 염기를 포함하는 pCAT-2000을 제작하였다. 다시 pCAT-6800 DNA를 *Nru*I과 *Hind*III로 처리하여 -285부터 -6,850 염기에 해당하는 염기서열을 제거하고 ligation하여 -14 부터 -284 염기를 포함하는 pCAT-300을 제작하였다. pCAT-basic, pCAT-300, pCAT-2000, pCAT-6800 plasmid를 각각 백서의 neuroblastoma에서 유래한 N18-RE-105 세포주, rat의 pheochromocytoma에서 유래한 PC12 세포주에 Fugene6 (Roche)를 이용하여 transfection한 후 48 시간 후에 CAT activity를 측정하여 reporter 유전자인 CAT 유전자의 발현 정도를 확인하였다. *nerve injury induced protein*의 upstream sequence에 결합 가능한 transcription factor의 종류와 결합위치를 분석한 결과, *nerve injury induced protein*의 upstream sequence에는 신경세포에서 발현되는 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려진 NGFI-A (nerve growth factor induced protein-A), NGFI-C (nerve growth factor induced protein-C), NRSE (neural-restrictive silencer element)의 결합 부위가 다수 존재하였다. *in vitro*에서 *nerve injury induced protein* 유전자의 발현조절에 관여하는 upstream 영역을 분석하기 위하여, 확보된 *nerve injury induced*

*protein*의 6.8kb upstream sequence 중 일부 혹은 전부를 포함하는 3종류의 plasmid (pCAT-300, pCAT-2000, pCAT-6800)를 제작하고 neuroblastoma에서 유래한 세포주에 transfection하였다. *in vitro*, transient transfection assay에 의하면 실험에 사용되었던 모든 세포주에서, -2,042부터 -6,850 염기에 해당하는 upstream sequence에 의해 *nerve injury induced protein*의 발현이 감소되는 것으로 확인되었으며, 특히 PC12 세포 주에서 그 발현의 감소가 가장 큰 것으로 나타났다. 동일한 plasmid를 사용하여 transgenic mouse를 만들어 생체 내 각 조직에서 *nerve injury induced protein*의 발현이 조절되는 양상을 알아보려고 하였으며, 현재 pCAT-2000, 6000, 300 에서 생산된 수십 마리의 transgenic mouse 에서 발현의 정도를 분석하고 있다.

4, 유전자 적중동물의 제작

*Nerve injury induced protein*의 기능이 상실된 knock-out mouse로부터 *nerve injury induced protein*의 기능을 분석하고자 knock-out mouse를 제작하였다. *nerve injury induced protein* 단백질의 기능을 상실한 knock-out mouse를 제작하기 위하여, 확보된 *nerve injury induced protein* genomic DNA의 6.8kb upstream sequence와 exon 2 부분을 포함한 염기서열을 Osdupdel vector에 cloning하여 targeting vector를 제작하였으며, targeted 유전자를 확인할 수 있는 검정체계를 수립했다. *in vitro*, transient transfection assay로부터 얻은 결과를 토대로 생체 내에서 *nerve injury induced protein*의 발현에 대한 결과를 예측하고, transient transfection assay에 사용된 동일한 plasmid를 사용하여 transgenic mouse를 제작, 확인 중이다. transgenic mouse를 제작하기 위한 plasmid 준비과정은 다음과 같다. 각각의 plasmid는 *HindIII*로 잘라서 linear DNA로 만들고 agarose gel에서 linearized DNA 만을 회수한 후, Elutip-D를 사용하여 정제하고 dialysis bag에 넣어 TE buffer에서 48 시간 동안 투석하였다. 회수한 DNA는 2ng/ul의 농도로 25ul씩 분획하여 냉동 보관하고 백서에서 회수해 두었던 oocyte에 microinjection하였다.

Transgenic mouse의 확인을 위하여 mouse의 꼬리를 약 1cm 정도 절단하여

genomic DNA를 추출하였다. microinjection에 사용되었던 plasmid에 존재하는 bacterial CAT 유전자 부분에 대한 PCR을 실시하여 해당되는 PCR 산물을 확인하고 이 PCR 산물을 다시 Southern hybridization으로 확인하였다. 이때 probe는 bacterial CAT 유전자 염기서열의 내부에 존재하는 20개의 염기로 구성된 oligomer를 제작하여 사용하였다. *nerve injury induced protein* 유전자의 일부가 소실되어 단백질의 합성 또는 기능이 저해된 knock-out mouse 제작을 위한 targeting vector를 제작하였고 targeted 유전자를 포함한 ES (embryonic stem) cell을 확인하기 위한 검증 방법을 확립했다. targeting vector의 제작 방법은 다음과 같다. 백서의 *nerve injury induced protein* 유전자의 upstream sequence와 exon 1을 포함하는 subclone인 pMNH1으로부터 upstream sequence에 해당하는 6.8 kb DNA fragment를 분리하고, 이를 Osdupdel vector에 존재하는 neomycin 내성 유전자의 3' 말단에 cloning 하였다. 또한 백서의 *nerve injury induced protein* 유전자의 exon 2, 3, 4를 포함하는 subclone pMNH2로부터 exon 2를 포함하는 약 1 kb에 해당하는 DNA fragment를 PCR을 이용하여 증폭한 후 앞서 cloning한 vector에 존재하는 neomycin 내성 유전자의 5' 말단에 cloning하였다. 이렇게 제작된 targeting vector는 *nerve injury induced protein* 유전자의 exon 1 대신 neomycin 내성 유전자를 포함하게 된다. 제작된 targeting vector는 *NotI*로 처리하여 linear DNA로 만들고 100% 에탄올에서 침전시킨 후 다시 70% 에탄올로 세척하고 260nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정하였다. 이렇게 준비된 targeting DNA는 1x10⁶ ES cell 당 10ug을 사용하여 electroporation하였다. 이후 targeting된 ES cell을 선별하기 위하여, neomycin이 포함된 배양액에서 2일에 한번씩 배양액을 교환하면서 일주일 정도 배양하고 남아있는 ES cell을 dilution method로 1차 cloning하여 48 well-plate에 옮긴다. 충분히 자란 ES cell은 회수하여 일부는 냉동보관하고 일부는 genomic DNA를 추출하는데 사용하였다. 선별된 ES cell에서 추출된 genomic DNA를 이용하여 *nerve injury induced protein* 유전자와 neomycin 내성 유전자의 일부를 증폭할 수 있는 primer를 사용하여 PCR을 실시하였다.

제 2 절 연구수행 결과

1. *Nerve injury induced protein*의 발현 연구

다양한 세포 주에서 *nerve injury induced protein* 단백질의 발현을 조사한 결과 조직 특이적인 발현현상을 확인할 수 있었으며, 이것은 *nerve injury induced protein* mRNA의 발현 양상을 분석한 Northern hybridization의 결과와 일치하였다. 또한 다양한 자극에 의한 *nerve injury induced protein*의 발현과 세포의 형태학적 변화, 항체를 이용한 상호작용을 가지는 단백질의 상관관계를 분석함으로써 이 단백질의 세포 내에서의 기능을 분석하였다. 그림 3에서 보는 결과는 mouse의 각 장기에서 *nerve injury induced protein*의 발현을 northern blot으로 분석해본 결과로서 특이한 것은 정상적인 상태에서는 brain에서의 발현을 볼 수가 없었다.

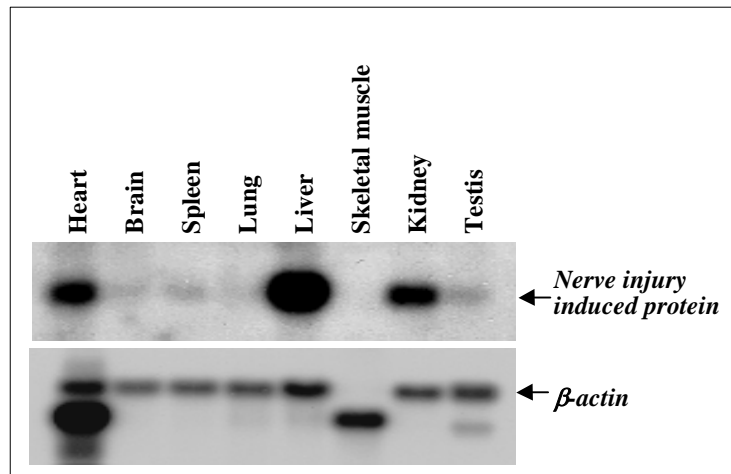


그림 3. *Nerve injury induced protein*의 각 조직에서의 발현 pattern을 northern blot으로 분석한 결과. *nerve injury induced protein*은 신경세포의 재생에 관련된다고 알려진 gene으로서 mouse의 각 장기에서 발현 pattern을 분석하여본 결과 heart와 liver, kidney에서 상당량이 발현되고있고 이러한 결과는 nerve regeneration 이외에 heart, liver, kidney에서 biological function을 가지고 있을 것으로 사료된다.

Nerve injury induced protein 단백질의 발현을 조사를 위하여 다양한 세포 주 liver, never related, cervical cancer 관련 세포 주에서 단백질을 분리 정제하여 확인한 결과를 그림 4에서 보여 주고있다.

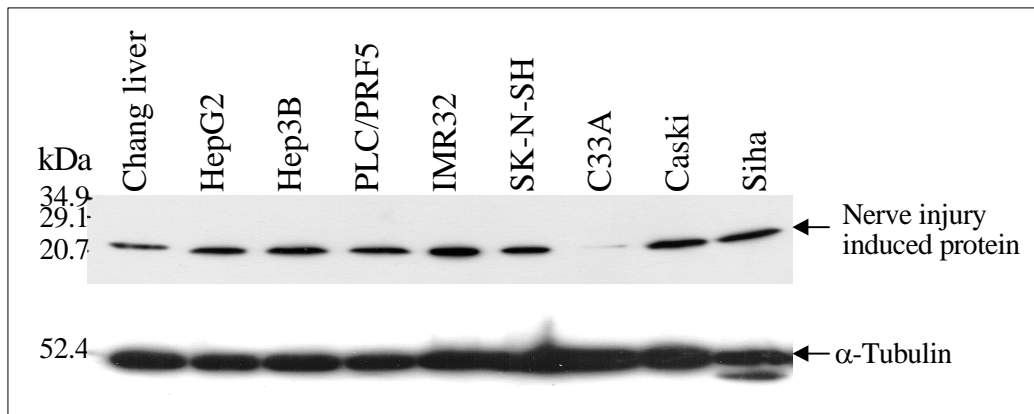


그림 4. *Nerve injury induced protein* 의 다양한 세포주 에서의 발현 pattern을 western blot으로 분석한 결과. *nerve injury induced protein* 단백질의 발현을 다양한 세포 주에서 단백질을 분리한 후 western blot을 실시한 결과에서는 이 protein은 다양한 세포에서 발현되고 있는 유전자임을 확인 할 수있다.

2. Mouse의 *nerve injury induced protein*의 ORF를 포함한 cDNA 클로닝

Nerve injury induced protein 유전자의 염기서열을 분석하고 ORF 영역 중 extracellular domain으로 여겨지는 N-말단의 50개 아미노산을 coding하는 150bp의 DNA 절편을 재조합 단백질 발현 vector에 cloning한 후 생산된 재조합 단백질을 분리 정제하였고, 이를 전기영동과 Western blot 방법으로 확인하였다. 생산된 재조합 단백질을 백서에 면역 주사하여 단일클론항체를 얻었다. Cloning된 *nerve injury induced protein* 유전자의 ORF를 포함하고 있는 cDNA 절편의 크기는 1,221 bp로 구성되어 있었으며 이 중 실제로 단백질을 coding하는 부위인 ORF의 크기는 459 bp 이다. 이 ORF에 의하여 coding되는 단백질은 152개의 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노산의 hydrophobicity에 의한 단백질의 특성을 분석한 결과 N-말단 50개의 아미노산은 extracellular domain에 해당하며 중간 부분에 29개의 아미노산과 21개의 아미노산으로 이루어진 1개의 transmembrane domain이 존재하는 것으로 예측된다 (그림 5).

Nerve injury induced protein 유전자의 N 말단 부위를 포함하는 재조합 단백질을 생산하기 위해서 *nerve injury induced protein* 절편을 포함하고

있는 발현 vector를 제작하였으며 이들을 이용해 형질전환 시킨 대장균 균주 DH5α를 배양하여 재조합 단백질을 생산하였다. 이 때 재조합 단백질의 발현은 1mM IPTG를 첨가하여 유도하였다. *nerve injury induced protein*의 ORF 전체에 해당하는 염기서열을 가지고 있는 *nerve injury induced protein F* 유전자를 포함하고 있는 발현 vector로 형질전환 시킨 대장균체에서 *nerve injury induced protein* 재조합 단백질을 생산하였다. 재조합 단백질의 생산을 유도시킨 균체를 원심 분리하여 회수한 후 12% SDS-PAGE에서 새로운 단백질의 발현을 조사한 결과 재조합 단백질의 발현을 유도하지 않은 균체에서는 발현되지 않던 단백질이 IPTG를 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도한 대장균체에서는 발현되며 이 단백질의 분자량을 PAGE gel상에서의 이동거리에 의해 측정했을 때 *nerve injury induced protein* 재조합 단백질의 예상 분자량과 일치함을 확인할 수 있었다 (그림 6).

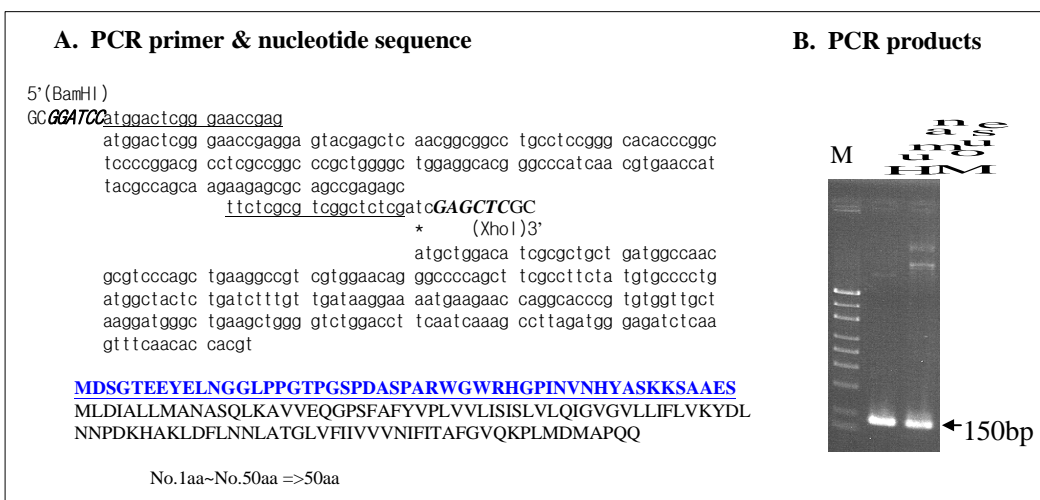


그림 5. *Nerve injury induced protein* 의 재조합 단백질 생산을 위한 N' 말단 부위 150 bp의 cloning을 위한 primer design과 PCR product 분석. *Nerve injury induced protein* 단백질의 기능분석과 항체 생산을 위한 재조합 단백질을 생산하기 위하여 제작된 primers의 위치와 PCR product로서 연구 방법에서 언급된 pET vector와 ligation하여 형질 전환 균체를 만들었다.

형질전환 균체의 배양에서 얻어진 재조합 단백질을 immunogen으로 이용하여 생쥐의 복강에 주사하였다. 항체의 형성이 확인된 mouse의 비장세포와 parent cell line의 세포를 융합하여 단일클론항체를 생산하는 hybridoma를

생산하였다.

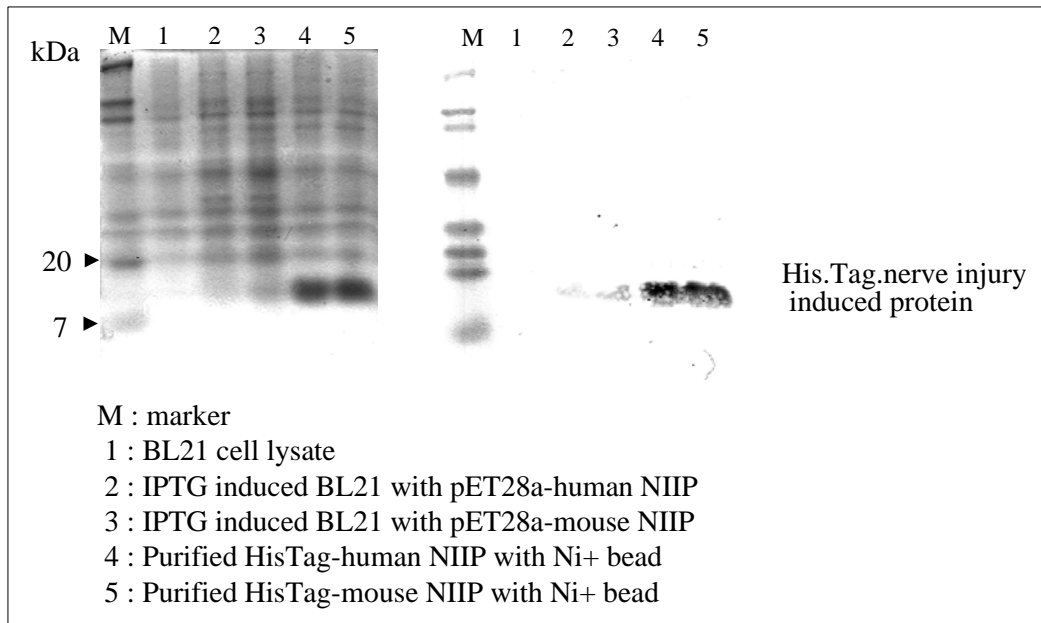


그림 6. 재조합 단백질 생산을 위한 N'말단 부위 150 bp의 cloning을 위한 primer design과 PCR product 분석. *Nerve injury induced protein* 단백질의 기능분석과 항체 생산을 위한 재조합 단백질을 생산하기 위하여 제작된 primers의 위치와 PCR product로서 연구 방법에서 언급된 pET vector와 ligation하여 형질 전환 균체를 만들었다.

3. *Nerve injury induced protien*의 genomic DNA 클로닝

백서의 genomic DNA library로부터 *nerve injury induced protein*의 전체 유전자 및 upstream sequence를 포함하는 염기서열을 cloning하여 *nerve injury induced protein* 유전자의 구조를 밝혔다. 백서의 *nerve injury induced protein* 유전자는 4 개의 exon으로 구성되어있으며, intron을 포함하여 약 8kb에 달하는 것으로 여겨진다 (그림 7).

```

1 AAGCTTTATGICTAGATTGGGACAGCTATCACTATATTAATCAATTCOCCAGCTATGAGACCCCTTGCTACTTGIGGCTTCTCCAGGCCATGIGGTTCTGCTCCATCTTCTCTCCACAT
121 CCTCTTCCTCCCTCTCTTCTTCCGACCTCTTATCTTATCTCCAGCCOCCACCTCTCCCTTCCACTGCCCCAACACAGGCTCCAGCCTTTATTTGACCAGTTAAATGGGGAGAAGGTT
241 CACATGAAATCACCACCTCTTGTGGGACAGCCCTCTTGGAGGAAAGAAATTAACATCAGAATGCAAAACAGCATCAGGGCCACCCCTTCAITCTCCTGCATCATGGGTGGAAGGGCCCTCA
361 GTGATATAGGGTTGAGAGGAAGATGGGTACATTGAGTCTTGAAGAGCTGGGTTTGGGGGAGTACAGTATGCGAGAGGCCAAGGCCAGATAGCCCTAGGCTTCTCTGGGAATTTTGGGG
481 GGAATAGCTAGCTAAGAGTCCAGTGTCTTTAGGGATCAGTGTCTGGCACAGTTTCTGTGGTCCCAATGATTTGGGTTAGCCTTAGCCTTAAGTAAGTAGACCCCAITTTACTAAGGAA
601 ATACGGCTTCTTAAGCGTTTCCAGCACCCAGACAGGCAGAGCCAGTAGCTAAAGTCCAGTTCACCTGCACCATCAGAAGAAAACAGGAGGTGTAAGGAGAGATGACCTGTCTGCAG
721 ATGTTTCTTTGCOCAAGCCACAGGCCAOCCTACCCCTCTCCCTGCTCCOCCOCCAAOCTCCOCCOCCAGCCTGCTGCCCTCACTOCCACACTCTCTGACCAGTGGCTTGGGGGACCTCAGTGG
841 GTCCATGTGGGGACCAAGATAAGGAGTCCAGGCAGCCTCTGTCTATAGTGGTTTGTCTGATCACAGCCTGGGCCAAGGGACACCTGGCATCATGCCATAGGGGATGCATAGAGGATGTAGC
961 CAGGCCATGCCOCCAGGCAGACACAGATGGTGGCTAGCACCTGAGCTCTAAGGTGACCTTCCCTTCCAGGCTGACTGTGGTCCAGACACTGGTCCAGGATGGGGCACAAATACAGTGT
  
```

1	0	8	1
TTCAGGCCATACCCAGGTGCAGGGAGGTCCCAGGGAACAGGTGCATGGCCATCAGGTGACAGCCAGCTATCAGGTGACAGCCAGCTATTGGAGACTGGGCAGGA			
GCACAAATGGCCCTC			
1	2	0	1
AGGTTGAAAGGTCTCAAAGGGACAAAAGGAAGAGCAGAGCAGAGGATGGTGCATTCAGAGGCCCTGGGAGGGCTTCCCAGCGAGCCTCAGAGGGTTTGACTGTC			
CTTTGTCTGT			
1	3	2	1
TGTCTTGTTTTGTTTTGTCTTAAGGCCTGTACAATCCTCCTGTCTGTACCTTCTGGTCTGGGATGCGAGGCATATACCAGTGTCTGGTTTCCATGAC			
GCTAGGATCGAACC			
1	4	4	1
TAGGGCCTCATGCATGCTAAGCAAGTCTATCATCCCCAGCCAGTGTAGGACTTTAAAACCAGAGCCAAGTTCAGCTGATGAGTGTCAAGAAGACGACTAAATTAC			
AGCAGTTTCAAAAC			
1	5	6	1
AAGATAATTTTTCTGACAGTAAGAAGTTGGCAGATGGAAGCCGGGAGCCCGGGAGCCCGGGCAGAGCCTGTGCTCCAGTTGTAGGAACACAGGCTGCTTCTGT			
CTTTGGCTCTGCTG			
1	6	8	1
TTCAAGGCTCCCTGCTCAGGATCCCTAAGTCTAATATGACCATCTTTACATTTCCACATTCAGTTCAGTTGGCAGAAAAGGAAGAATTAATGAATGAAGCTAG			
ACTCAGGAGTGTGG			
1	8	0	1
GACTGAGGCCAGGCATGACTCCCTCCCTGCCTCTGCTCTTGGACCATGGGTAGGGACAGTGTCAAGGGCATGTCATGATCATGCTTGACCTCATTCTCTCTCTC			
TCTCTCTCTCTCT			
1	9	2	1
CTCTCTCTGAGATGGAATGGCACTCTCTGCTTCTAAGACATGGTCTGTCTACAGGTGTCTAACCAGTGTGCCCTCATTAGTAAAGCCACAACCTCTGCGCTG			
TATGGGACTCAGA			
2	0	4	1
TCCCAGTATTTCAACCAGGTTCCTGGGGCACATGGAGAAGGCCTCAACTTCCCTGCAAAAGACCCAGGTGGTGCATAGTACAGGGACATGTGAGGATACCCATCTCC			
TCCAAAGCTAACA			
2	1	6	1
TGGTTGGATCCCAGCCTCGGGGCCACCAAGGATAACTGGCACCTACTTCTATATGAAGCAGCACCTGTGGCTTGTTTGCTGTGCCTGTGCCTATCCTCTGTCC			
TGCTCAGGCCACAG			
2	2	8	1
GTGCTAGCCACCTTTGTTCTGAGACAGGATTCTTACTGGCCTAAAGCTCATGGAGTAGGCTAGGCTAGTGGGCTACTCAGGGAATCCAGGATTCTGCTTGTCTC			
TGTAGCTCCATTGT			
2	4	0	1
TGGGATTACAAGTGCACACCGCTGCACCCAGCTTTTAAAAAGAGGGATCGTGGGACTGAAGTCAAGTACTCATGTTGTCAAGGAGAACAATTTACTGACTGAATC			
ATCAGATTCAGCCC			
2	5	2	1
AGAGGCCCTTTTATCAGCTAAGACGGCAGAGCTGCTGTGGAAGTAAAGTACCATTGGGAGAGGCTGGAAAATAAAGCCGTCAGGGCCACACACACCCTCTTCAGA			
GCATTCCTGCTTCA			
2	6	4	1
CAGACTAGGATACAACCCAGAGCCACAGTTCAGAGTGGGGAGGGTGTGAGAAGTGTATGCAGCACAGATCATCCTGTTTCTATCAGCAGTGAAGCCACACAAGA			
GAGTCTCCAGTGC			
2	7	6	1
TAGGGAGATAGCCGAGATACTGGCCTTGAGCTAAGTGGCAGACTCAGAGCCCTCATGCAAAACAGATGCAGAAATGTTTGTGTGAGCCTTGCAATTATACACAGG			
GATCAGCCGCACTT			
2	8	8	1
CTCTGGGCCCTCCCGTTCTAATCTCTCTGAGGACACATCCCTGTGGACCATCAGCTCAGAGCCAGTGTCTAGGGGAAGGCTGGGATGTCTTACCTTCTCAGC			
ATTACCAGCAGGC			
3	0	0	1
CTTGAAACCAGATGGGAAGCAGGGATACAGAGGATGCTGTCCCTTTAAAACCTGACCTGGGTGGATCCAGCAGAGAAAAGTCTGGTAAACATTCCTGAGCCAGA			
GGGAAGAGGGGGCA			
3	1	2	1
AGAAAGGATGACACAGCAGACTGGAACCCCTTGCAGTTTCACTTAGAAGGGCAGCCAGCCAGGGAAGCTTACATGCCTCGGCCTTCTCTCTCCCGCTGACAG			
ATGAGGAAACTAA			
3	2	4	1
GACTAGAGGAGAAGAAGCAGTGCACAAGCCAGGGGTGGAACACTGAGTAATGCAGCAACACAGTGTGACAGCTCAATTGCTCCATCAAAGTCCCTCGTGTCCCTC			
TGAAACAGCACTAA			
3	3	6	1
GGACCTCAGCGGAGTTGCCAGGGCTTAAGGACAGGACAGGTTCCACTGATGTCTCAGAAGCCTGCCAGAACACACGCCACCCACGCAGGCAGGCATGAACAAA			
CACACACACCCTG			
3	4	8	1
CACACTACTGCTTCAGTAGACCTTCCCTGGACCTTCATTTCTGTGTTTGTCTGCTTCTGGCTACTCCGAGGTGAGCAGCTTCCCTCTGCAATGGCCTTCTGTG			
ATGCTGTCTTAGCC			
3	6	0	1
TCATCTCAGGCTCCTATAATAGAACCAGTGGGCCATCTGGCCACGGACTCAAACCTTCTAAAAAACTGAGCTGAAATAATCTGTCTGTAAGTTGCTTTGCTCA			
GTTACTCATCATGG			
3	7	2	1
AAGCATCCTGCTGTAACCCAGTGGGCGAGTTAGCCTCCATTGTTTACTCCATGAGACACACCAAGCCCAGGCTGAGGTATCATAGGCAAGCACTGTCATGTCT			
GCCCTCGAATGCC			
3	8	4	1
TGGTGTTCCTCAACTCCTGCTCCAGTGTGGGGTCCAGCCCAATAGGGACTTGGTAGGCTGACCTGTGGCTGTGGAATATTTATACACTCTGCCTAGTGAAGA			
TTCCCTGTGTGCC			
3	9	6	1

AGGGTAGGCACTTGCACCCTAATCCCAGGACTCCCAAATGGGCAAAGTACTGAAGAGTGAACAGCAAGCCAGGAGCTAAGCAATCAGTCTCAGTCATGGAAAGG
 GTC AAGTTGGAATC

4 0 8 1
 TAGCCCTTTGCTGTCTCAGTCTGTCCATAGCCTCCTGTCACTCAGGTGACACAGAGTTATGGAGCATCAGGCCCTGAAGCTGGGTAAGTGGAAAAATCCCA
 TTTTCTCACAACA

4 2 0 1
 CCTTTGACTGGCTGGCACTTTCTGTGCCATCTGTTTACGCTCTGAAAACAACCTGAAGAGTTGGGTACCCCATGCACGCGTGTGGAGCAAGTACTGGTCTCCAGGG
 CCTTTGTAAAGAT

4 3 2 1
 CACCTGTTCAACTTGGAAATATTACTGTGACTGGGGACAGCAAACAGGCAATGAGTCCAGGGATCCACCCATGTCTCTCTGTCTCTATTTGCTATTCTCTAGA
 ATTATAAATCTGCA

4 4 4 1
 CACCCAGTACCAGGCACTTAGTGGATTCTGGAGACAAAATCAGGCCCTCACACTGAAGCAATCACTCTACCAACTGTGTGCTCTGCAGTCTTTTTTTCT
 TTTTTTTCCAAGA

4 5 6 1
 CAGGGTCTTTCTGGTCTCTGTGTAGTTCTGTGCTGGAATGGGCTCTGTAGACCAGACTGCCAGCCTCTGCTCCCAAGTGTGGGATTAAAGAT
 GTGTGTGTGTGT

4 6 8 1
 GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATCTGAAGTGTGTGAGGCAGGACAGTGGCTCATGCCTTTAATGCCAGCACTCAGGAGGCAGAGTCAGATAGTTCTC
 TGTGACTTTGAGGG

4 8 0 1
 GAGCCTAATCTAGATAGTGAAGTTCCAGGTCTGACAGTGTACATAGTGAAGTGTGTTCCAAAAAACATCAACAAACAACAAAAAACCCTAAAAACAATG
 TTAATAAATGCTA

4 9 2 1
 TTTATTAATAAATAAAAAATTTACACCAATGCATGCGTAAAAGAAGTGTGAGTCCCTTGGAGCTGGAGTGTCTATGACCCCTCCAATGTGGTGTGGAATC
 AAGTTCGGGACCTC

5 0 4 1
 TGCAAGAGCAACAAGGGTTAATAACTGCTGAGCCGTCTCTCCAGCCCTCTCACCCCTAGCCCTGTCTTAAGAAGTATGGCACCAGGCTTCACAAAGTGTGGCC
 TCTTATTTGTGTC

5 1 6 1
 TGACTGTCCATCTGCTCCACAGGACAGATTTCTACTGTCTAGCTCCAGCCTGTAATGCCTGCAACAGGACCTGGCATAACAGACAGCCTTGGGTACCATTTCTTCT
 TCTTTTTAAATAAT

5 2 8 1
 TTTCTTTGTCAATTTATTTTATGTAGATGGGTGTTTGCTGCATGTATGTCTGGTACCCACAGAAGCCAGAAGAGGATGTAAGACGCTTGAAGAGGAGTGA
 AGAGGTC AAGAGCT

5 4 0 1
 GCAAGCAGCCGCTACTCTTAACACTAAGCCATCTTCTGCCCAGGTATCTTTTTGTTTTTGGGACAGCGTTTCTCTATGTAGTCTGGCTGTCTGGAAGTGT
 CTCTGTAGACCAGG

5 5 2 1
 CTGGCCTCGAACTCAGACATACACCTGTCTCTGCTCCAAAGTGTGGGATTAAGGCTGTGCCCACCACTCTACCAACAGGCTGGCTCCATTTCTTATTTCTAATC
 CTCTCTCTCTGG

5 6 4 1
 ATGTGAGACAGGGACAGAGGGTCCGACAGTTCACTTGGCCTTTAGCAAATCCAGCCTTATGCTAAGACACAAGCTGGCAAGAAGGGTCATAAAGAGAAGGTGAA
 CCACTCCATCAAGG

5 7 6 1
 AACGGTAGTTCTGAGCCCCAGCTTGTAACTCCCTAAGAGTCTCATGTCTTATTCCTTCTGAGACTCAGGAGATACCAGGAGAGGAGTGTGCCACCCTGAGGC
 CAGCAAAGCATGG

5 8 8 1
 GGCTGAGAGTGAAGCCAGGGTGGGAAGGAAGAAGGCACAGCAACTGGCTTTTACTCTGCATCTAGTGTGTCTCTCGGACGACAGCACCCTCACACTCCATCT
 AGCTTCTTAGGCC

6 0 0 1
 AGGAAAAGACATGGTACTGGGGCACAAAGGTCCATTGGGCCACGAACTGCAGTAGCCAACCAACACGTCATACCCCTGGAGTATAGATGTCAGGGCTATGATGTCA
 GCTTCTCTGGACA

6 1 2 1
 CTAAGCTGTGTGCTTCCCTCTGGTCCCTGGTCTCTTGGAGGGTGGTGGGAGGCAGGAGAGTCCCGGAGAGCGGAATGCCAGCCTTCTCCACCAGTGGCAG
 CCACACGACGGCTC

6 2 4 1
 TGCACAGTGGGGTGTGGCTGCAAGCTAGACCAGAGCAAGAGGCTCTCCCTCATATGTTCTATTCTCCAGGCAGAACAGCTGAGGGCTCTAAAGTGGAAACTGG
 AGTAACCGTTGACA

6 3 6 1
 CCTTTTCTGTGTTGAGTTACCTGAAGGGACTTACAGCCTCAGGGCGTGTCTCCCAAGGAAAAACCTCAGCACGGGCAGCATGTGCTCGCCCTTGGCCTC
 ACTTTTAAACAGA

6 4 8 1
 TCAAGTCTTATGTTCAAAGTTCAGAGGGGGCCCGTTTGATCAACAACCTTGAGACAGGGTCCCTGGGGACCCCGATGTCATCGGAGGACAGGCGTGGGCTG
 CTTGCCCTAGCCAT

6 6 0 1
 CGTGAAGGACCTGAGAAATGGGGACATCAAGCCGCTGGAGAAGTCTATCTGCTCAGGCGGATCCAGCAGCTGGCGTCTAGGCCCGGGCCCGCCGGGTGG
 AGGCGGAGTCCGG

6 7 2 1
 GGGCGCCGCGCGGGGGCGGTGTGCGGGCGGGCCGGGGCGGGGGCGGGCGCACAGCCGTAGCCCGTGGCGGAGGCGGGGTGCGCTCAGGCCGTGTGC
 TGGGCGCCCGGG

(1)

6 8 4 1
 OGGCCGACCAATGGAGTCGGGCACCTGAGGAGTATGAGCTCAACGGCGACCTGCGCCCGGGCTCCCCCGTTCCCCCGAAGCCTTGGTAAGCTCTCAGCACTCTCGC
 CCGGCTGCTGTG
 M E S G T E E Y E L N G D L R P G S P G S P D A L
 6 9 6 1
 TGACCTTGGCCGGCGCCGCTCTCTGCGCCGGCAGCTCAGCGGGCACCTGTGGGCGTCTGGCCCGGTTTCGCGCGCGCTCCGCACTGCGGGGGTGGTGGTGGCC
 GCTGCTTCCGGC
 7 0 8 1
 AAAGTCGTGCTTACCTGTCTCTAGCGCAAGTGGTGGCCACGGTCTGGGGCCAGCAGCAGGTAGCCAGAGGGCCCGGGCGGTCTAGCTTGTGCGCTCGCCCG
 GCTGTGCAGAGC
 7 2 0 1
 CGGCTCTGGTGGCACCACTCTCGGGTGGAGAAGGCTGGCATTCCGCTCTCCGGACTCTCTGCCTCCACACCATCTCCAACCTCCAACGCCCTCCGGGTGTG
 TCCTGGCTGCCTT
 7 3 2 1
 GGGGTGGGGGGGAGAAGATCACCCCTCTGGTTGGAAGCTAGCATCAGGCAGACAGCTACGTACCACACGGTGACCACAGGTCGTCTGCAGCAGTGATAAGG
 GGAACCCGTGGC
 7 4 4 1
 TGTGTCTCTGCTGTGCACTGCCTATGAAAAACAGAACGCCACCTCTCGATCGTCAGGGTGTAGTTCTAGGACTGTAAGGACTGCCTCGAGTTTGTCTGTG
 CTAGCTGCTAAGG
 7 5 6 1
 CCACAGCGATGGTCGGATGCCTGTGTGAGGGACCATCTTCTGACCCCTCACCTCATAGTCTACCTCCGGGGCAGGGCTGAGCATGCCAGGGCCGAGCCTTCC
 TTGTACCACCCG
 7 6 8 1
 CATGGCCCTCTGCTCCGCTGACATGTTGACTTTGGACATTCCTTCTATTTCCGACCCCCCCCCAGGGATGGGGTGGAGTGGGGTGGGAATTGCACCAGGCT
 GGGATTTCCACAA
 7 8 0 1
 GTCTTTGCGGTGCAAAATAAACAGAACAGAGACTTCTGCCAGGTCCATATAGTGAACAGGGAACACCAACGCTCTCTGGACTACTTCAGGTGTGCCAGCT
 GAGACTTGGGCTCT
 7 9 2 1
 GCCAAAATGTGTGAACACTCCGGAAAGCAGTGGGGCAGGGACACCCCGGGCTGAGTTCCCTTAGGGAGCCCATCAACTGTCTGGGCTTTTGTATGTGGGTCTACAA
 TAAAGAACCAGTGA
 8 0 4 1
 TCTTAGCCCTTAAAGGACAAGGGATGCAAAATCAGGAACAGGTGGGCCGTGGTTACGCTGCGGATTTGAAGGGAAACTGGCTGTCTCTGAGCAGCAGCCTCCCC
 TTCAGCTCTGCAGA
 8 1 6 1
 CAGCTGGATCAGCTGTGCTCCCAAGAGAAATCTGAGCACAGACAGGAGAGATTTGGTTGGATTGCTCAGGGGTACGTCTTGGCTCTGGGAACAAGGAGAGA
 GATATCCACCCCG
 8 2 8 1
 TCCCGGCCATTCTTTGAAGACCAACTAGGAGAATGAAATCAACTAAATTAGGTTCTCAAGGGTATGCAGGGTTCCTGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCC
 TGCTGCCATAGTG
 8 4 0 1
 GTTAGTAGGGAGCAAAGAGGTGAGAGAGGCTCCCTGTGTGGTGGAGGTGTTTGCAGTGGCTTAGGGGAGGGACAGATCTGGCCCTTTGGTGTGAGTGAAGAGGT
 CAGGGGAACAGTAC
 8 5 2 1
 AAGTGGAGACAGAGGCTCGTTACTGAGACTGTACAGGGTGGGTGGGAGGGAGATTTTGTCTAGAGTCTCTGGGCACACAGGATGCTTCTCTGAGGTGTGGCTA
 ACTTTGAAGGCTGC
 8 6 4 1
 CCTGCTCAAATGCTGGTCCCGCTCCCAACCTCAGGCTCCTACCTCCCAACTTTCTAAGGTGTGTGCTGTCAGCATTTCTGTGCTCAGTTTATCATCTACGAAGTGG
 CATCATAGTAAGT
 8 7 6 1
 GCCTCTGCTAAGTGAACACTATATGGCTGACATAAAGGAAATGCTTGGCGCAGAGCGCAGTACGTGGCGGGTGTAGCTATGGAGACACTCTCCATGGTCTCATGGT
 GGCATCCATAGAAG
 8 8 8 1
 TTTGGGAAGGACAACACTGTCCCAGGATGAGAAOCCAAGGGAGCCTCGGTTTCCCCCTGGAAGGGGTGCCACTACCTCCAGGTAGTTGAGGCCCGCAGAG
 CCACCTGGTTGG
 9001 TTCTGTCAAGTGAACACTGGGAAGCTCTGCCACACCCCTCCAGATGCTAGGTTCCOCAGAGCGGTTAGCTAAAGGCCCTGTAGTGTTCACAGCCTGATCCAGTTTGGTGA
 9121 AGCTCACTGTCACTTGGCCCTGAGAAACAGTAAACACCAGTTAAACGTGGAATGOCATCTCTACACAGCCTGGGGCAGCCTTCATGTTAGACACAGCCAGGGAGGTGGCTGG
 9241 GATGCAACTGGACATAAOCCTGTGGCACTGCCCTGCTTTCTTGTCTCTCAGGAAAGCAGGCTGAGGGAGCTAAGGCCATATCTCAGGTTCTTAGGTCATGCCACGTCCTGCACTGG
 9361 GCCTCTTCAAGCTTCCAGAGGGCAAGCCOCAGATACAAAGGAGGGGACAGGCAGCAAGCATGTGGGACACAGACCCAGGCTGTGGAGAGGTAGAGTTTAAACACATTTAATAGCCA
 9481 GCCTGCTTTGCCCTTGGGCTGTCCCTCAGCCTGAGGOCATATCACATCTTTACAGCTAAAGGTAAGCAGGTGGCTGATGAGTTGTAGCCCTGTGGTCCAAAGGCTCTGAGTAC
 9601 CTCAGGGTATTAATTCACAAGCTCTGTGACTTATCGAGACACTGAGGCTAAGACTAGCTGTCTGAACCTAAGACAGATAGCCCTCAGATCTCAGTCCCTCAGAGTCTCCGCTACCG
 9721 GGGCTGTGACCCAAAGTGTAAATTCACATTGCAGCTGGCCCTGCTTGTGTATGGCTTTGGGAGGACTTATGGAGAGATTTCAGTTTGTCTCCCTGAGTGGCCAGCAGGGGCACA
 9841 GGGGTGTGTGACTAAGAGTCTGAGAGCAGGGGGTGGGGATGGGTAGATCATTCATGTTGCTGTCTTGTGACCCCTGTGGTCCAGGAGCCCTTAAAGTGGTTCAAGACAA
 9961 AAGAACTCTTCTGCTGCCAGGGCCAGCAAGCTCAGCCTGTGGTCTCATTTTCAOCCATTCGACACCTCTGCTCCAGCAACTGAGCTAACAAAAGTTCCACTTTTGTGTTGTGTTG
 1 0 0 8 1
 TGCAATGCATGCATGTGTAGGCTGTTTATCTGTCTGTGCTTATGTGTTATAACGATATGTGTTGTGTGACACATGGGCATGCATACACACACAGTACTCATGTGCAT
 CCATGGCGGTGTA
 1 0 2 0 1
 ACTTCTGCAACACATACAACACTACATATACAGTGAATTTATATACAAATGCCATACCCATACACACACACACACACACACACACACACACACCGGAATGTGCTCC
 TGAGTAAGAATTT
 1 0 3 2 1
 TGACCCAGTGTGTTGCTATTCAAAGGGCAGGCTTATTGAAAGCTGGTATTGTCTGTCTAACTCAGGCTCGGGTAGCAGAGCCCGCTGTGCTGCCTTCT
 TGAACACATGACTT

1 0 4 4 1
 CAGAAGCAGTTTCATGTTAGCGATACACTGTTCAGTTCAGTGGCACCTGCTTTAGGCTTTTCGGCTGCAGAAAATATTCATGTGAGTTAGGTGGACGCCTTCCCA
 CAGCCCTACAGCAC
 1 0 5 6 1
 TACATCCATTCCCTGCATCTTTCATGAGTCTAGAAACAGGATCTTTCAGGGTGGCCAGGTGGCTGGCCACACAGCAGGCCCTTTCAGCTCCGT
 GCCCTCCCTGG
 1 0 6 8 1
 AGGCTACGGTGCAGGGCTCGATGGCTCAGGGCAGCAGTGGACAATGGGCTAAGCCTAGGTTCCGTGAGATTTCTTAGGTAGTGAGAAGGGGCCAGCCAGGCA
 TCTTGAGAGAGCCG
 1 0 8 0 1
 ACTGTCTCGGTGGGAAGAGAAACCAGCCATTTAAAGTACCTTAGAAGGAAGCAGCCAGCAGAGAAGTGACCTCTCATGACAGAAGAGGGCCAGGTCCAACCA
 GGGGAATCAAGGAC
 1 0 9 2 1
 AGTAGCCTGGAAGCAGGGCCCTCAAGGAGAACCTCGGAGCATGGGGTATCTGGAAGGGGAAACCCCTTTGGGTAGAGAAATATATATATATATAGCCATGTAAGAG
 AGGTGGGAAATGAG
 1 1 0 4 1
 GAGGGGACGAGCTGAAGGGTGCCTACGCTTAAAGAAGCCAGAAGTATCTCATTACTGTGAGAAACCAGGAGATACACATCCTGTCTACTGCATGCAGGTT
 GGTGGTACATCTAT
 1 1 1 6 1
 TGAGCACCTGCTGTGTCTCTTGGTACCACATAATCATGAGTAGTGTAGCTAAACAAGGTGACCAACGCTTGTATGGTGTGATGCTTGAAGCTGAGGTGTGT
 CTGTGTGGGTGTT
 1 1 2 8 1
 GCACTGAGCGGGTAAGGCTGAGGCTGGGAGGTGAACCAAGCAGGATTGACCAGACCTTTGGGCTCAGCCAGGAAGGGTTAGTTAGTTCAAGCCAGAGCCAGTA
 TGCAGAGGCCTGTC
 1 1 4 0 1
 TATTCACCTCATTGTCTTCTTGGTACCTTCAGGAACCTAGACCTGGGGAGGGGAAGCCAAGGGTTCATAGGCAAGGAGAAGTACCTGCTGCATGGGATAAT
 GAGAGATGGGCTTT
 1 1 5 2 1
 CCCCCTAGAGACCAGTGTGTGTCAGAGGTGGTGTCTGTCTCTACAGAACTTTATTCCAGGACATTCCTTGGAGTAATGATCACTTGCAGGGT
 TGGGCAACAGAAG
 1 1 6 4 1
 CCCTACCTACAGGGCCCTTGGCAACTCCCTGCAGCCCAAGGGAGGTGGAACCCCTGCTGACCTCTTCTGTAGCTCACCCAGAACCCAAATGTCCCTATT
 CTGCTGACCGCT
 (2)
 1 1 7 6 1
 TGCTCCACAGCCACCCCGCTGGGGTTTGGGAAACCGCCATCAATGTAACCATTTATGCCAACAAGAAGCGCTGGGAGAGCATGCTGGACATCGCGCTGCTC
 ATGCCAACGCGT
 P P R W G L R N R P I N V N H Y A N K K S A A E S M L D I A L L M A N A
 1 1 8 8 1
 CGCAGCTGAAGGCCGTGGTGGAGCAGGGCAATGATTTCCGCTTCTTCGTGCCCTTGTGGTCTCATCTCTATCTCCCTCGTGCAGATAGGAGTGGGGTGTG
 CTCACTTCTGG
 S Q L K A V V E Q G N D F A F F V P L V V L I S I S L V L Q I G V G V L L I F L
 1 2 0 1
 GTAGGACCCATGGCTGCTGCACAGCCAGGGATGGGGAGGAGATGTGTGGGGTGGTGGAGCAGTGGTTTACCTCAGACTCTTGGCCCTCAGGGAGTAAGGC
 GTATGGCCAAAGT
 1 2 1 2 1
 GTGACTCCACACTGACCTGCTCTCGAAAGCAGAGTGTGGTTAGGGTCTCAGGGTCTGGAAGTGGGGTGGTGCAGGGGAAGGGAAATGGGTACCTGCT
 TCCTTGGGTCCCTG
 1 2 2 4 1
 TGGCTCCTGCCACAAGATAGCTACTGCAGCCAGTCCCTCCCTGCTAGACTAGCTCAGGCCTATGTCCAGTAACATAGAGCAGCCAGAACTAACTTCTTTCTGG
 TTCTGAGTGAAAA
 1 2 3 6 1
 TCCAAAATGCAGAGTATAAATCTAAATCCAACTTAATCACTGTGCTCCCTTGCAGATGACCCAGGTGACCGTAGGCATGGATGGATAGCTGATAG
 GAAAGTGGGCTGGG
 1 2 4 8 1
 TTGCCAGGGCAACTTTGGTGCCTGTCCAGAGCAGAAGATGTCATCAGGAATGGCAAGGGCCACATTGACTTCTGACCTCAGATTAATGAGGGGTGTCTGGGA
 TCTCACGGTCTGTA
 1 2 6 0 1
 CCTGCGCAATGGTTGTAGTAGCAGAGCCTAAGGTAGACTGGAGGGTCTGTGAACTAGGCCTCAGAAGGAATTCAGTCTTCTGCCTTAGAAAATGAAACCTGGCCTG
 GCTTGGCATCCAGA
 1 2 7 2 1
 AGTGACATGTGACACTTAACCTGCTGGGCTCTTCTCCTGTGGAGAAAGTGGCAGTTATAAAAAAGGAGGGACAACCATGCCTGACTTTAGCATTTTTTCAAT
 GGGGAACAAAACCC
 (3)
 1 2 8 4 1
 TAACTATGGCCAGAGCTCTGTCTTCCCTAGCCACTCCACCCAGGCCAGGCTCCCTGAGCAGCATCTACCCATCTCACCCAGTCAAGTATGACCTCAACA
 ACCCGCCAAGCA
 V K Y D L N N P A K H
 1 2 9 6 1
 CGCCAAGCTGGACTTTCTTAAACAACCTGGCCAGGGACTGGTTTTCATCATCTGCTGGTCAACATCTTATTACGGCCTTCGGGGTCCAGAAGCCTGTAATGGAC
 GTGGCAGCCCGGCA
 A K L D F L N N L A T G L V F I I V V N I F I T A F G V Q K P V M D V A P R Q
 1 3 0 8 1
 GTAGAAGCCCAAGGTGAGTAGGCAGGGAGCCGAGACCAAGGTGTGGTGGTCTTGGACTGGCTGCTCCCTCACATATGGCATGACCAGGCCACTTACTAATC
 ACTGTCTTGATG

```

1           3           2           0           1
CTCCCTGAGGATGTAGGTTCATCTGGCCAGGACCAGGGTACTAGGGCCTGTGGGAAAGTGTAGTCCCTGTCCCCCTGGCCTGTCTTCTTTATGGTGTCTCCAGAGCTCT
TTCCAGAGGCTTCA
1           3           3           2           1
AGTTCTTGCTGACTGCATGGTCAGCTGCTGTCGACAGCTGGAGTAATAGGGTTTGTAGGCAAGTGGCCATGGTCACTTGTGGTTCTTGTCACTATTATGAGCATG
TCTTTTAAGTCCCTG
1           3           4           4           1
ACAGACACCCAGGAGAACTGTATTTCAGCGTGGAAAGGGACACGGCATCTCGTCCATGGTGGACAGATCCTTACACCCAAGACTGAGTAGCCCTGATGCCACAACCT
GGTCACAACATG
(4)
1           3           5           6           1
AACTTAGCACCCCTTCCAGCCTGGGGCACTGCTAGCTGCCCCAGCAGCACTAATGCCTGCCTCTCTTTTCATCCTTTCAGAGACTTTAAGGGTACCGGACCTGCAGCC
CAGCTGACCAGAC
1           3           6           8           1
CCCTGCAACTGCTGTACCCCCAAGGTATCCCTCTCCTGTGTGCAGAGCCCAAGGTGGCCACCCCTGGACCATGGTCAGGGACGGACTTCCGTCCAACCTGTGACCCGT
GTGTGGGGCCCA
1           3           8           0           1
CCTGAGACATGTGGGAACCGGATGCAGGGCCATGAAGATCAGAACTGGACAGCTCCATAGAAACCCAAGTCCAGAGAATGGTCACTGCCACCCAAGGACATGCAGC
AAATCCATGATTG
1           3           9           2           1
GACTTGACGAGGGGCCAGCACTGGCTTCTGTCTCAGGACATTCAGAAGGACCAGGATATGCCCTCCCTTTGCTGATACACCAGTGACCCATTTTCTCATGGAGCC
TGCCAGGTCACC
1           4           0           4           1
CTGGAGACTGCTGCCTTTTGTGTTTCTTGACCCAGGGACCTTGGACAGCCATCAGTATCTGTGGTCCAGCCTCAGTGCCTGGGCTTGGCAGCCATCAAGAGGCA
GCCATGCCCGTGGG
1           4           1           6           1
GGCTGCAGGTCATGGTGGTACTTCCTGCCAGTGGTGACCTGGGTAGAGCCCCAGCCCTCAACTCAGGGGTCAGGCCCCACTTTTCTAATCAGGAACGACAATAAA
GCTT

```

그림 7. *nerve injury induced protein*의 genomic clone과 sequence. *nerve injury induced protein*의 4개의 exon은 underline으로 표시하였고 intron을 포함하는 약 14kb에 해당하는 전체염기서열을 분석하고 transgenic mouse와 knock out mice 생산을 위한 clone을 확보하였다.

Nerve injury induced protein 유전자를 포함하는 genomic DNA clone을 확보하기 위하여 백서의 genomic DNA library를 screening하였고 2개의 clone을 확보하였다. 이들 clone에 대하여 *nerve injury induced protein* cDNA의 ORF 영역 중 translational start site를 포함하는 oligomer와 translational stop site를 포함하는 oligomer를 각각 이용하여 Southern hybridization을 실시한 결과 그 중 하나의 clone이 *nerve injury induced protein*의 전체 유전자를 포함하는 것으로 확인되었으며, 이 clone을 Southern hybridization 결과에 따라 subcloning하였다 (그림 8). translational start site를 분석하기 위하여 primer extension 실험을 실시하여 mouse *nerve injury induced protein*의 5' UTR region을 분석하고 예상되는 start site를 분석하였다(그림 9).

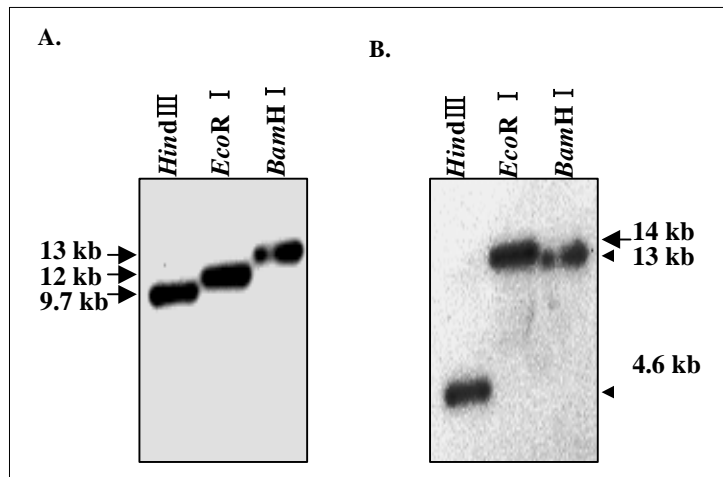


그림 8. *nerve injury induced protein*의 genomic clone을 확인하기 위한 southern blot 결과. a. 약 9.7kb 에 해당하는 DNA 절편의 subclone과 b. 4.6kb 에 해당하는 DNA 절편을 얻어 전체 약 14 kb에 해당하는 염기서열을 얻을 수 있었다.

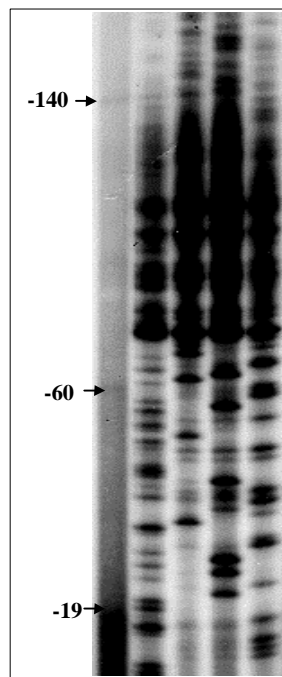


그림 9. *nerve injury induced protein*의 genomic clone을 대상으로 발현유전자의 5'UTR을 확인하기 위한 primer extension 실험 transcription start는 ATG 개시 codon -19bp, -60, -140에서 initiation의 band를 확인하였다.

Translational start site를 포함하며 약 9.7kb의 DNA 절편을 포함하는

subclone을 pMNH1이라 명명하였고, translational stop site를 포함하며 약 4.6kb의 DNA 절편을 포함하는 subclone을 pMNH2라 명명하였다.

두 subclone의 전체 염기서열을 분석하고 이를 GenBank에 등록하였으며 (AF219626) (그림 7), *nerve injury induced protein*의 cDNA 염기서열과 비교한 결과 *nerve injury induced protein* 유전자는 4개의 exon으로 구성되어 있으며, promoter 영역에는 consensus sequence인 “CAAT”나 “TATA” sequence가 존재하지 않는 것으로 밝혀졌다. 두 subclone 중 pMNH1 clone은 promoter 영역을 포함하여 6.8 kb에 달하는 upstream sequence도 포함하고 있었다. *nerve injury induced protein*의 전체 genome의 구성도를 분석하여보면 그림 10. 에서 보여주는 바와 같다.

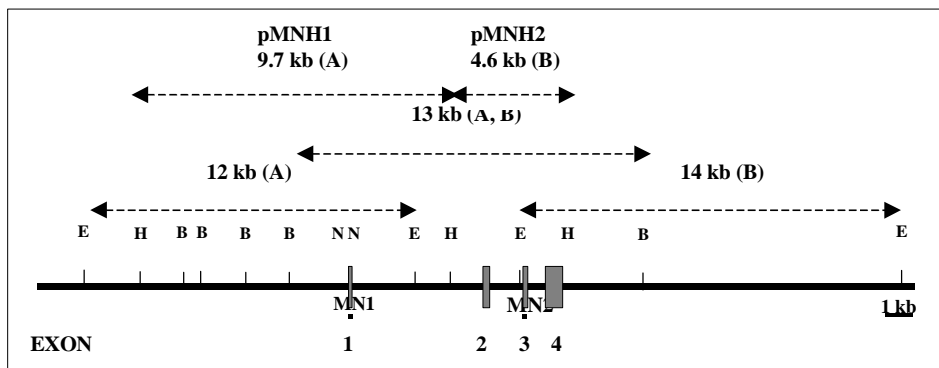


그림 10. *nerve injury induced protein*의 genome을 contig map을 통해 나타낸 전체 유전자의 모식도. *nerve injury induced protein* 유전자는 4개의 exon(dark box)과 exon을 포함하는 약 14kb의 유전자를 확보하였다.

4. *Nerve injury induced protien*의 형질전환 동물제작

Nerve injury induced protein 유전자의 6.8 kb upstream sequence에 결합할 것으로 예상되는 transcription factor를 MatInspector program을 이용하여 분석한 후, 1998년에 보고된 인체 *nerve injury induced protein* 유전자의 243 bp upstream sequence (GenBank: AF029051)에 대한 sequence homology 및 결합 가능한 transcription factor와 그 결합 부위에 대한 비교 분석을 실시하였다. 그림 11 에서 보이는 것처럼 -100에서 -200부분의 염기서열 부분에 백서와 인체에서 공통적으로 결합할 것으로 예상되는

transcription factor들이 가장 많이 존재하였으며, 이 부분에서 염기서열의 상동성도 가장 높았다.

백서 *nerve injury induced protein*의 6.8 kb upstream sequence에 결합할 것으로 예상되는 transcription factor 중에는 간 조직에서 특이적으로 발현하는 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려진 HNFs와 신경세포의 발달과 재생에 관련된 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려진 NGFI-A, NGFI-C, NRSE 등의 transcription factor의 결합부위가 다수 존재하고 있었다. *nerve injury induced protein* 유전자의 발현 조절에 관여하는 upstream region에 대한 분석을 위하여 제작된 13가지 plasmid (pCAT-300, pCAT-2000, pCAT-6800)를 이용하여 transient transfection assay를 실시하였다. transfection을 실시하고 48 시간 경과한 후 세포들을 모두 회수하여 CAT activity를 측정된 결과를 그림 13.에 나타내었다. 그림에서 보이는 것처럼 모든 세포 주에서 나타나는 결과는 pCAT-6800을 transfection했을 경우에 CAT activity가 감소한다는 것이다. 이런 결과는 neuroblastoma 혹은 pheochromocytoma에서 유래한 세포주인 N18-RE-105 세포주와 PC12 세포주에서 pCAT-6800을 transfection하였을 때 CAT activity가 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 특히 PC12 세포주의 경우 감소효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

-2000 gactgtgtcc aaaaaaacat caacaacaa caacaaaaaa accccaaaaa

HNF1 HNF1 HNF3

-1950 caattggttaa ataattgcta tttattaaat aaataaaaaa atttcadacc

NGFI-A E2F

-1900 aatgcatgcg taaaagaagc tgtcagatcc cttggagctg gagtgcttat

-1850 gaccctcca atgtggtgct ggaatcaagt tcgggacctc tgcaagagca

HNF1

-1800 acaagggtta ataactgctg agccgtctct ccagccctcc tcaccctta

-1750 gccctgttct taagaagtat ggcaccaggc ttcacaaagt gctggcctct

-1700 tatttgtgtc tgactgtcca tctgctccac aggacagatt tctactgtct

-1650 agctccagcc tgtaatgcct gcaacaggac ctggcataca gacagccttg

-1600 ggtaccattt ctttcttctt tttaaataat tttctttgtc attttatatt

▶ Kpn I

-1550 atgtagatgg gtgttttgcc tgcattgatg tctggtagcc acagaagcca

-1500 gaagaggatg taagacgctt tggaagagga gtgagagacg gtcaagagct

Y1

-1450 gcaagcagcc ggtactctta actactaagc catctcttct gccaggtat

-1400 cttttttgtt tttgggacag cgtttcteta tntagctctg gctgttctgg

-1350 aacttgctct gtagaccagg ctggcctcga actcagacat acacctgtct

-1300 ctgctccaa gtgctgggat taaaggcttg tgccaccacc tctaccacca

▶ Bst X I

-1250 ggctggctcc atttcttatt tctaactctc ttccttctgg atgtgagaca

C/EBP

-1200 gggacagag ggtccgcagg ttcacttggc ctttagcaaa ctccagcctt

OCT1

-1150 atgctaagac acaagctggc aagaagggtc ataaagagaa ggtgaaccac

GATA3

-1100 tccatcaagg aacggtagtt ctgagcccca gcttgtaatc tccttaagag

GATA2

-1050 tctcatcgtc cttattcctt ctgagactca ggagatacca ggagaggagt

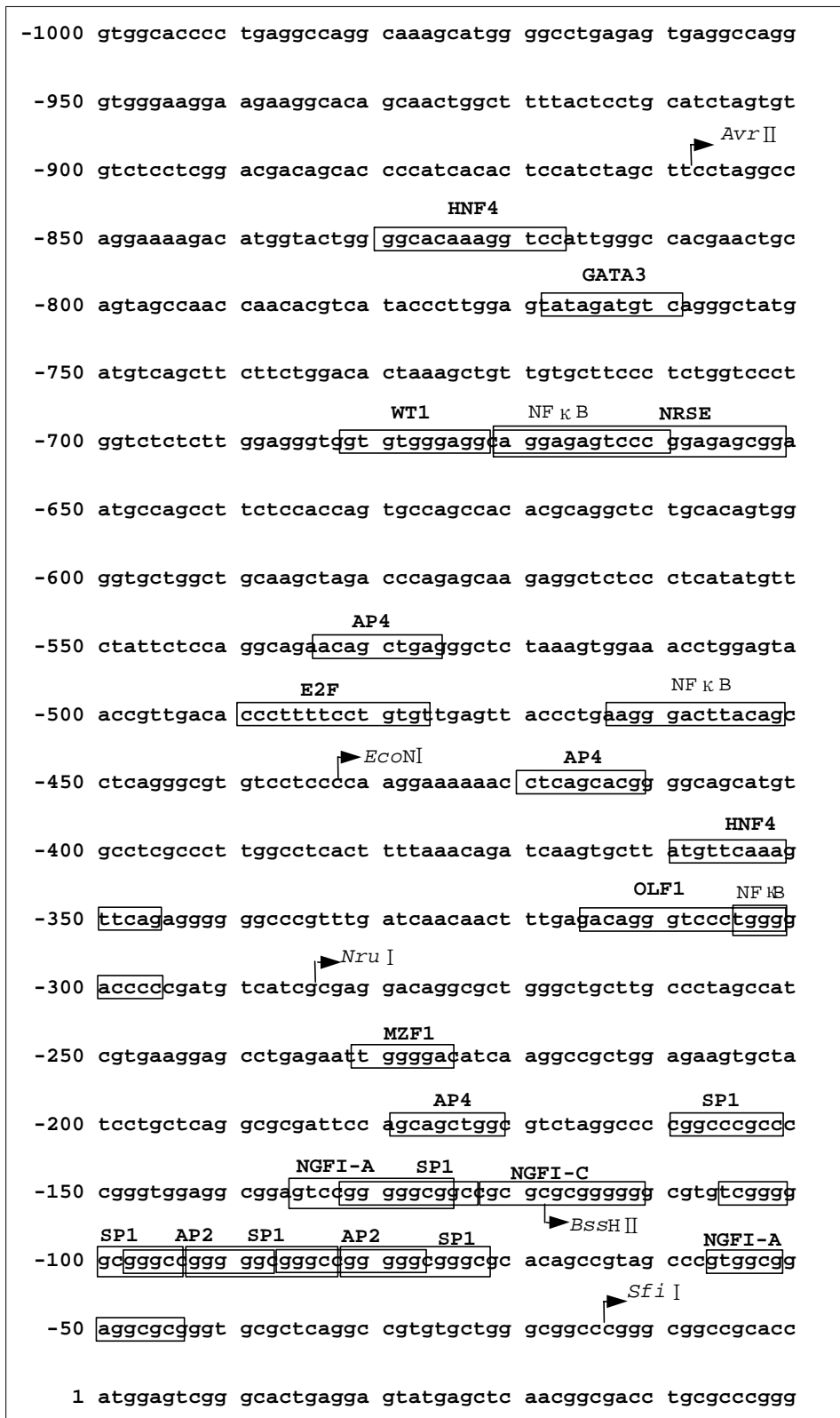


그림 11. *nerve injury induced protein*의 genome의 transcriptional region 분. *nerve injury induced protein* 유전자의 ATG site upstream

-2000bp에 존재할 가능성이 높은 transcription factor와 그 결합 부위를 MatInspector professional program (core similarity value of 1.0)을 사용하여 분석한 결과이다. 위 표에서 사용된 약자는 activator protein 4; AP2, activator protein 2; Sp1, stimulating protein 1; NGFI-A, nerve growth factor induced-protein A; RREBP1, ras-responsive element binding protein 1 이다.

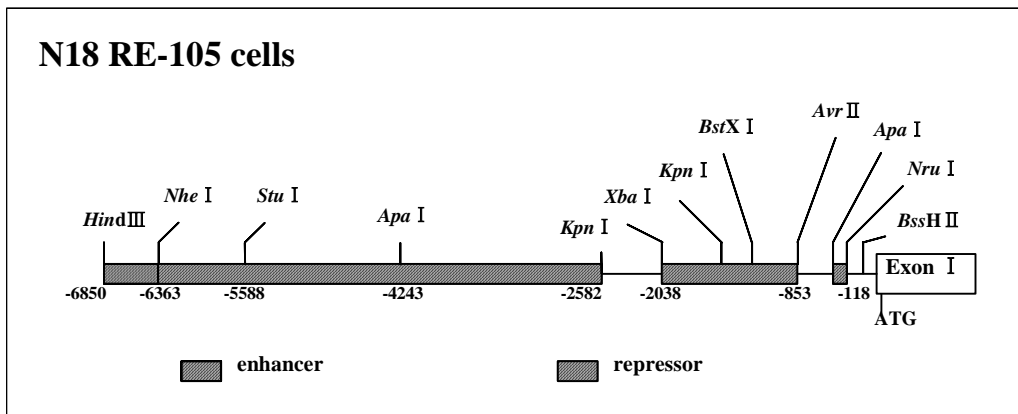


그림 12. 신경 세포 주에서 *nerve injury induced protein*의 발현조절과 관련된 upstream의 전체 지역 분석. *nerve injury induced protein* 유전자는 upstream -118bp부터 -6363bp에 해당하는 지역에서 repressor들이 존재하고 있음을 알 수 있었고 enhancer에 해당되는 2개 지역(dark box)은 exon 1의 바로 위에 site와 -6850 region에 존재하고 있다.

이 결과로 -2,042부터 -6,850의 염기서열에 *nerve injury induced protein* 유전자의 발현을 억제하는 cis-element가 존재할 것이라고 유추할 수 있으며 이러한 조절 기작이 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 발생하는 지를 알아보기 위하여 *in vitro*, transient transfection assay에 사용되었던 plasmid와 동일한 plasmid를 사용하여 transgenic mouse를 제작 중에 있으며, 현재까지 pCAT-2000, pCAT-6800, pCAT-300 plasmid에 의하여 형질 전환된 백서를 생산하고 생체 내에서의 발현 pattern을 분석하고있는 상태이다.

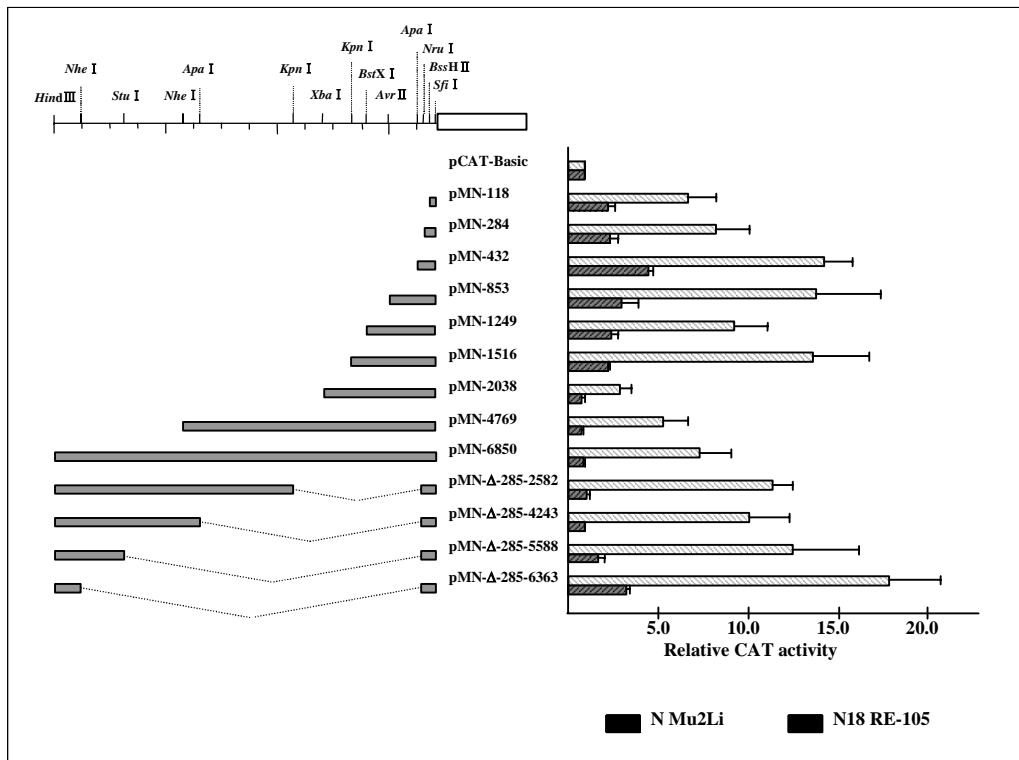


그림 13. *Nerve injury induced protein*의 발현 분석을 위한 promoter 유전자의 vector 제작과 발현 분석을 실시한 결과. *nerve injury induced protein* 유전자의 발현을 분석하기 위하여 제작된 13종류의 vector와 세포 주에서 나타난 CAT activity를 분석하여 enhancer region과 repressor지역을 분석하였다.

5. 유전자 적중동물의 제작

*Nerve injury induced protein*의 생체 내 기능분석을 위하여, 확보한 백서의 *nerve injury induced protein* genomic DNA의 전체 염기서열을 이용하여 *nerve injury induced protein* 유전자의 exon 1 부분이 제거될 수 있는 targeting vector를 제작하였고 homologous recombination에 의해 생산될 수 있는 예상 targeted 유전자의 지도를 작성하고 이에 따른 검정체계를 확립과 knock-out mouse를 생산하였다 (그림 14).

Knock-out mouse 생산을 위하여 targeting vector를 제작하였으며, 제작된 targeting vector의 염기서열을 확인하였다. targeting vector는 제한효소 *NotI*으로 절단한 후 ES cell에 electroporation하였으며, neomycin이 포함된 선택배지에서 일주일정도 배양하고 targeting 여부를 확인하였다. Targeting

여부의 확인은 3가지 primer를 동시에 넣어 실시하는 multiplex-PCR 방법을 사용하였다. 본 연구에서 제작된 targeting vector에 의해 ES cell 내에서 homologous recombination이 일어나면 *nerve injury induced protein* 유전자의 exon 1 부분이 제거될 것이며, 이로 인해 *nerve injury induced protein* 단백질의 발현이 저해되거나 그 기능을 상실한 백서가 생산될 수 있을 것이다. 현재 수종의 knock-out mouse가 생산되어 *nerve injury induced protein* 유전자의 기능을 분석하기 위하여 homozygote의 생산을 시도하였다.

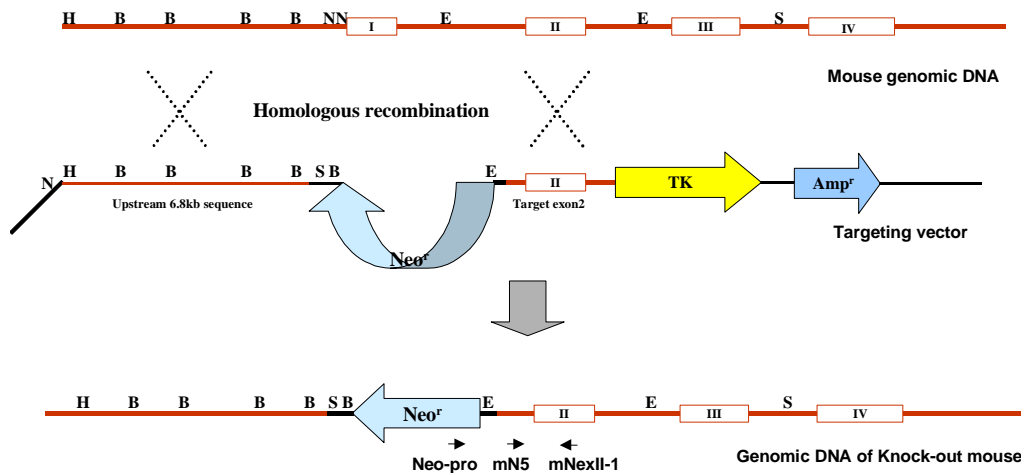


그림 14. *Nerve injury induced protein* 유전자의 knock-out mouse 생산을 위한 vector construction의 모식도. *nerve injury induced protein* 유전자는 4개의 exon(dark box)중 exon 1의 유전자를 homologous recombination에 의하여 Neo gen으로 substitution하는 system의 요약이다.

Nerve injury induced protein 유전자의 knock out mice 생산을 위하여 ES (embryonic stem) cells에 유전자를 incorporation 시킨 후 insert 유전자를 PCR 방법으로 확인하였다(그림.15)

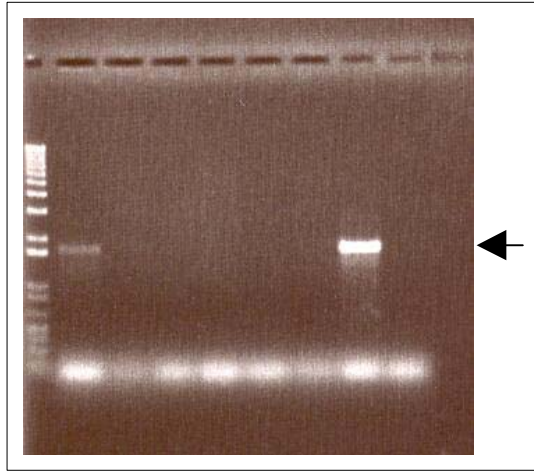


그림 15. Screening of the targeted ES cells. *nerve injury induced protein* 유전자는 electroporation 방법으로 insertion 시킨 후 Neomycin에 저항성을 가진 ES cell의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 실시하고 유전자의 incorporation을 확인하였다.

ES (embryonic stem) cells에 *nerve injury induced* 유전자의 incorporation이 확인한 후 embryo에 주입하고 knock-out mice를 생산한 후 산자를 대상으로 genomic DNA에 insertion이 일어난 개체를 southern blot으로 확인하였다(그림 16). 지금까지 연구결과를 요약하여 표 1에서 정리하였다.

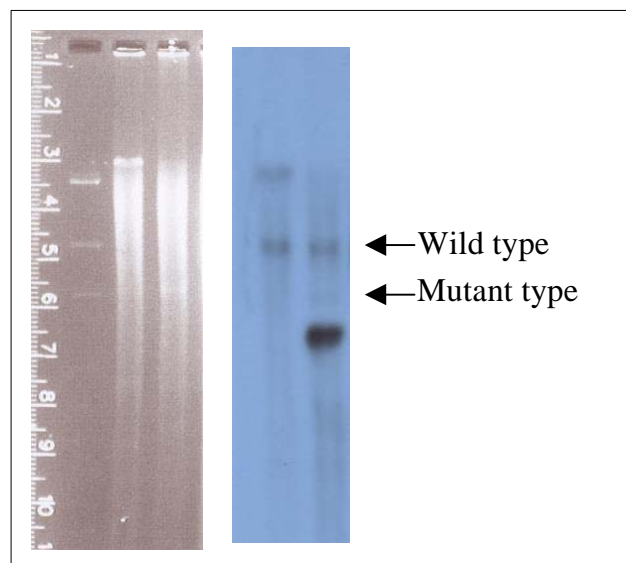


그림 16. *nerve injury induced protein-1* exon IV를 probe로 사용한 Southern hybridization. wild type Genomic DNA는 BamH1 fragment에서 14kb의 위치에서 *nerve injury induced protein* 유전자를 확인할 수 있는 반면, neomycine resistant를 갖은, 즉 exon-1 이 deletion 된 mutant 형태로 대치된 genome에서는 의 *nerve injury induced protein* 유전자를 8kb에서 그 fragment를 확인할 수있다.

표1. Never injury induced protein의 형질전환 동물과 Knock-out mice 생산(2000.현)

Transgenic mice		Knock-out mice
pCAT-300	founder: 5 F1: 8	Chimera; 10 Agouti: 5
pCAT-2000	founder: 3 F1: 21 F2: 28 F3: 15	
pCAT-6800	founder: 2 F1: 13 F2: 45	

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1절 연구개발 목표의 달성도

Nerve injury induced protein 유전자의 발현과 그 특성의 분석은 첫째, *nerve injury induced protein* 유전자의 cloning, 재조합 단백질의 생산, 그리고 재조합된 단백질을 이용한 단일클론항체의 생산을 통한 *nerve injury induced protein* 유전자와 *nerve injury induced protein* 단백질의 확보와 발현에 대한 체계적인 연구를 수행하였다. 둘째, *nerve injury induced protein* 유전자의 발현 기작을 밝히기 위하여 유전자의 upstream regulation 기작을 포함하는 promoter analysis와 이를 위한 유전자의 cloning 체계를 확립하고 생체 내에서 발현의 특이성을 분석하기 위한 transgenic mouse를 생산하였다. 셋째, *nerve injury induced protein* 단백질의 생체 내 기능을 분석하기 위한 knock-out mouse의 생산 system과 *nerve injury induced protein* 유전자의 발현 결함에 의한 유전자의 기능을 분석하기 위한 모든 체계를 확립하였다. 지금까지 진행된 *nerve injury induced protein* 유전자와 *nerve injury induced protein* 단백질의 기능과 특성 분석은 계획대로 진행되었다. 본 연구의 연구내용과 연구결과 그리고 연구업적을 정리하면 다음과 같다

<연구내용에 따른 연구결과 및 목표달성도>

연구 내용	연구 결과	목표 달성도(%)
<i>nerve injury induced protein</i> 유전자의 cloning 및 특성분석		
<i>nerve injury induced protein</i> cDNA의 cloning 및 발현양상 분석	<ul style="list-style-type: none"> - <i>nerve injury induced protein</i> cDNA의 전체염기서열을 포함하는 유전자를 PCR 방법에 의하여 확보하고 cloning하여 염기서열을 결정 - 조직에 대한 Northern hybridization 과 RT-PCR의 결과에서 <i>nerve injury induced protein</i> 유전자가 차등 발현됨을 확인 	100%
<i>nerve injury induced protein</i> 유전자의 기능 연구		
<p>인간 <i>nerve injury induced protein</i> 유전자의 각 조직별 발현 형태분석</p> <p><i>nerve injury induced protein</i> 유전자의 염기서열 분석 및 재조합 단백질 생산</p> <p><i>nerve injury induced protein</i> 재조합 단백질에 대한 단일 클론 항체 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>nerve injury induced protein</i>의 mRNA는 인체 조직 중 kidney에서 가장 높게 발현되고 heart, placenta, lung, skeletal muscle에서 중간 정도로 발현되며 liver와 pancreas에서는 발현되는 정도가 매우 낮음 - cloning된 <i>nerve injury induced protein</i> cDNA의 ORF를 확인 (459bp) - 이 ORF에 의하여 coding되는 단백질은 152개의 아미노산으로 구성되어 있으며 이 단백질의 특성을 분석한 결과 N-말단 50개의 아미노산이 extracellular domain에 해당함을 밝힘 - 이 부분에 대한 재조합 단백질을 생산하여 분리 정제 - <i>nerve injury induced protein</i> 재조합 단백질에 대한 단일 클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포 주를 확보하였다 - 생산된 항체를 사용하여 Western blotting 방법으로 항체의 특이성 확인 	100%

<i>nerve injury induced protein</i> 의 기능 분석을 위한 transgenic 및 knock-out mouse 제작		
백서의 <i>nerve injury induced protein</i> genomic DNA의 분리 및 염기서열 결정	<ul style="list-style-type: none"> - <i>nerve injury induced protein</i>의 ORF영역을 probe로 하여 백서의 genomic DNA library에서 <i>nerve injury induced protein</i> 유전자를 포함하는 DNA fragments를 확보 - 전체 염기서열 분석 (Genbank: AF219626)을 통한 백서 <i>nerve injury induced protein</i> genomic DNA의 구조 확인 - 백서에서 <i>nerve injury induced protein</i>의 발현을 조절하는 기작을 밝히기 위하여 <i>nerve injury induced protein</i> 유전자의 upstream 부위에 속하는 6,850개의 염기서열을 분석 	100%
<i>nerve injury induced protein</i> 의 발현 조절 기작을 밝히기 위한 <i>in vitro</i> assay	<ul style="list-style-type: none"> - <i>nerve injury induced protein</i>의 발현 조절 기작을 분석하기 위하여 발현에 영향을 미칠 것으로 예상되는 유전자의 promoter 부위를 선정하고 - 확보된 upstream sequence의 일부 혹은 전부를 포함하며 reporter 유전자를 포함하는 plasmid 제작 - 각각의 plasmid를 간 조직에서 유래한 세포주와 neuroblastoma에서 유래한 세포주에 transfection하여 reporter의 활성 측정 - <i>nerve injury induced protein</i> 유전자의 -2042부터 -6850 염기 사이에 발현 억제에 관여하는 cis-element가 존재할 가능성 확인 	100%
knock-out mouse 제작을 위한 targeting vector 제작 및 electroporation	<ul style="list-style-type: none"> - 백서의 <i>nerve injury induced protein</i> genomic DNA의 전체 염기서열과 exon 및 intron의 염기서열을 분석하여 제거하고자 하는 exon 1 유전자의 targeting을 위한 vector를 제작. - homologous recombination에 의한 예상 targeted 유전자 지도를 작성하고 검정체계를 확립 	100%

<연구성과>

연성구과	내 용			
특허	명 칭	국 명	출원번호	비 고
	1) Monoclonal antibody specific for human nerve injury induced protein and fusion cell strain producing same	한국	10-2000-0038131	
학회발표	명 칭	학회명	발표일	
	1) Structural characterization of the genomic DNA of mouse <i>nerve injury induced protein</i> and its expression	Kor. Biochem. Soc.	2000	
	2) Isolation and characterization of a novel ubiquitin-protein ligase, UREB1, in the tumor tissues"	Kor. Biochem. Soc.	2000	
논문	명 칭	저널명	발표일	
	1) Increment of Efficiency in the Identification on Noble Genes by Colony Hybridization Assay.	BMBI 44(2);225-233	1998	
	6) Differential Expression of Human <i>nerve injury induced protein</i> mRNA in Hepatocellular Carcinoma Tissues and Cirrhotic Liver Tissues	Mol Cells, 11(2):151-7	2001	
	7) Genomic DNA sequence and transcription factor binding sites of mouse <i>nerve injury induced protein</i>	Mamalian Genome revised	2001	

제 2절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

특정한 조직 또는 세포에서 발현이 조절되는 대부분의 유전자는 세포 내의 특정기능과 관련되어 있으므로, never regeneration에 관한 연구에서 기능분석을 위한 기초자료로 활용되어질 것이다. 특정한 조직 또는 세포에서 발현되며 새로운 기능을 가진 유전자를 탐색하는 방법으로 얻어진 *nerve injury induced protein* 유전자에 관한 본 연구는 인체기능연구가 앞으로 진행되어 나갈 내용 중의 하나인 유전자의 기능연구 및 실용화 연구에 중점을 둔다는 점에서 중요한 의미를 지니고 있다.

본 연구에서는 새로운 유전자군의 특정한 생리활성을 가지고 있는 단백질을 정제한 후 그 유전자를 cloning 하고 이용하는 효과적인 연구방법을 제시하고 있으며, 이러한 연구방법은 생명공학기술의 발전에 힘입어 산업계를 중심으로 생명공학 연구분야 전반에 걸쳐 급속히 보급될 것이며 앞으로 새로운 유전자의 기능연구의 한 방법론으로 정착될 것으로 전망된다. 본 과제의 연구결과로서 활용 가능한 유전자원을 확보하였으며 선정된 유전자들의 기능검정을 통하여 국내 산업계에서 실용화 할 수 있는 실질적인 자료를 제공하였고, 재조합 단백질을 이용한 세포생물학적 기능분석 방법은 국내 제약산업계에서 조기 진단기술, 또는 치료기술의 개발 등에 활용될 것으로 예측된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 동물 model system 제공

Nerve regeneration 진행 과정에 관여할 것으로 여겨지는 *nerve injury induced protein* 단백질의 생리적 기능을 이용한 특이 신경조직 재생에 관한 연구의 필요성이 요구되는 연구과제로서 형질전환 세포 주 및 실험동물의 개발을 통하여 가능하리라고 생각한다. 본 연구의 산물로 얻어진 형질전환동물은 *nerve injury induced protein*의 생리적 기능 분석 뿐 아니라 뇌 질환의 병인과 진행과정에서 *nerve injury induced protein*과 관련된 물질을 탐색하는 동물 model system을 제공해 줄 수 있을 것으로 보인다. *nerve injury induced protein* 단백질이 관여하는 세포 내 관련물질 탐색 및 분석을 통하여 질환 진단 및 치료에 대한 활용가능성을 검토할 수 있을 것이다.

제 6 장 참고문헌

- (1) "Increment of Efficiency in the Identification on Noble Genes by Colony Hybridization Assay." J.W. Kim, I.A. Lee, Y. Lee, J.C. Song, Y.K. Choe, Y.S. Hahn, J.H. Chung, T.W. Chung, and I.S. Choe. *Biochemistry and Molecular Biology International*, Volume 44(2) ; 225-233, 1998.
- (2) "Isolation of cDNA Clones Encoding Human Histone MacroH2A1 Subtypes." Y. Lee, M. Hong, J.W. Kim, Y.M. Hong, Y.K. Choe, S.Y. Chang, K.S. Lee, and I.S. Choe. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1399 ; 73-77, 1998.
- (3) "Cloning of the Genomic Sequence Encoding a Processed Adenylate Kinase 2 Pseudogene." Y. Lee, M. Hong, Y.J. Kim, J.W. Kim, C.H. Kim, K.S. Lee, S.Y. Chang, J.S. Lim, and I.S. Choe. *Biochemistry and Molecular Biology International*, Volume 47(1) ; 37-46, 1999.
- (4) "Isolation and characterization of cDNA clone for human liver 10-formyltetrahydro folate dehydrogenase." M. Hong, Y. Lee, J.W. Kim, and I.S. Choe. *Biochemistry and Molecular Biology International*, Volume 47(3) ; 407-415, 1999.
- (5) "Cloning and Expression of Human cDNA Encoding Human Homologue of Pituitary Tumor transforming Gene." In Ae Lee, C.K. Seong, and I.S. Choe. *Biochemistry and Molecular Biology international*, Volume 47(5) : 891-897.1999
- (6) cDNA 분석에 의한 면역조절 유전자의 탐색 및 개발, 선도기술개발사업 보고서, BSHS2070-98040-5, 과학기술부, 1998.
- (7) Chen, P.J., and D.S. Chen, Hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: molecular genetics and clinical perspectives, *Semin. Liver Dis.*, 19, 253 (1999).
- (8) Ozturk, M. Genetic aspects of hepatocellular carcinoma, *Semin. Liver Dis.*, 19, 235 (1999). Johnson, P.J., Role of alpha-fetoprotein in the

- diagnosis and management of hepatocellular carcinoma, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, *14 Suppl*, S32 (1999).
- (9) Suarez, Y., M. Sala, J.M. Llovet, and J. Bruix, Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma, *Acta Gastroenterol. Belg.*, *62*, 410 (1999).
- (10) Chomczynski, P., and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, *162*, 156 (1987).
- (11) Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, *215*, 403 (1990).
- (12) Araki, T., and J. Milbrandt, *nerve injury induced protein*, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth, *Neuron*, *17*, 353 (1996).
- (13) Chadwick, B.P., S.K. Heath, J. Williamson, F. Obermayr, L. Patel, D. Sheer, and A.M. Frischauf, The human homologue of the *nerve injury induced protein* gene maps to the candidate region of hereditary sensory neuropathy type I (HSNI), *Genomics*, *47*, 58 (1998).
- (14) Araki, T., D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, and J. Milbrandt, Mechanism of homophilic binding mediated by *nerve injury induced protein*, a novel widely expressed adhesion molecule, *J. Biol. Chem.*, *272*, 21373 (1997).

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.