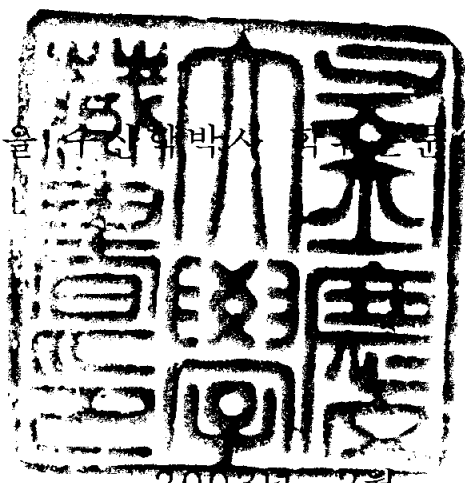


수산학박사 학위논문

HDL-CHO을 대량생산 하는 Apolipoprotein A I
유전자가 이식된 형질전환 미꾸라지,
Misgurnus mizolepis 개발

지도교수 김 동 수

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함.



2003년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

이 윤 호

이윤희의 수산학박사 학위논문을 인준함

2002년 12월 26일

주 심 농 학 박 사 장 영 진



부 심 이 학 박 사 전 임 기



위 원 이 학 박 사 손 철 현



위 원 이 학 박 사 김 윤



위 원 이 학 박 사 김 동 수



목 차

영문요약 (Abstract)	iv
표 목 차 (List of Tables)	vi
그림목차 (List of Figures)	vii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 어류 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝	6
1-1. cDNA library 제작 및 Express Sequence Tag	6
1-2. Library Screening을 통한 apolipoprotein 유전자 탐색	10
1-3. Apolipoprotein 유전자	11
1-4. Apolipoprotein 유전자의 구조적 특성 분석 선발 및 염기서열 결정	11
2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터 개발	12
2-1. 어류 프로모터 확보 및 기능성 평가	12
2-2. Apolipoprotein 유전자 발현용 벡터 개발	13
3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환어류 생산	14
3-1. Microinjection을 통한 유전자 이식	14
3-2. Southern blot에 의한 유전자 삽입구도 분석	14
3-3. 유전자 발현 유무 분석	15
3-4. Stable line 확보를 위한 F ₁ 생산	15

4. 비계, cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환 어류의 cholesterol 농도 변화	15
4-1. 비계 첨가사료 공급에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화	15
4-2. Cholesterol 농도 및 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL- CHO의 농도 변화	16
4-3. Fenofibrate 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화	16
4-4. T-CHO 및 HDL-CHO의 측정	17
III. 결 과	19
1. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝	19
1-1. cDNA library 제작	19
1-2. EST와 Library Screening을 통한 apolipoprotein 유전자 탐색	19
1-3. Apolipoprotein 유전자 선발 및 염기서열 결정	24
1-4. Apolipoprotein 유전자의 구조적 특성분석	24
2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터개발	30
2-1. 어류 프로모터 확보 및 기능성 평가	30
2-2. Apolipoprotein 유전자 발현용 벡터 개발	30
3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환어류 생산	41
3-1. Microinjection을 통한 유전자 이식	41
3-2. Southern blot에 의한 유전자 삽입구도 분석	41

3-3. 유전자 발현 유무 분석	42
3-4. Stable line 확보를 위한 F ₁ 생산	49
4. 비계, cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환 어류의 cholesterol 농도 변화	52
4-1. 비계 첨가사료 공급에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화	52
4-2. Cholesterol 농도 및 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL- CHO의 농도 변화	52
4-3. Fenofibrate 처리 기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화	64
IV. 고찰	67
국문요약	73
감사의 글	74
참고문헌	75

Production of Transgenic Mud Loach with Apolipoprotein AI Gene

Youn-Ho Lee

*Department of Fisheries Biology, Graduate School
Pukyong National University*

Abstract

Apolipoprotein AI (Apo AI), the major protein component of high density lipoproteins is linked to numerous metabolic pathways of animals especially with respect to lipid metabolism involved in a development of coronary artery diseases in mammals. Fish species, which have higher concentration of high density lipoprotein (HDL) in their serum than mammalian species have, are believed to represent relatively strong activity of the apolipoproteins. To initiate the engineering project of fish lipid metabolism, we discovered various types of apolipoprotein genes from several fish species including our experimental model organism, mud loach (*Misgurnus mizolepis*) based on high density screening and Express Sequence Tag (EST) profiling of

cDNA libraries: 14 different transcripts encoding fish apolipoproteins were obtained with 4 kinds of cDNA libraries from 3 species (loach, shark and hagfish). The selected mud loach Apo AI were fused to carp beta-actin promoter to develop a mud loach Apo AI-expression vector. Transgenic mud loaches were generated by microinjecting the vector into one-celled embryos. Various genotypes of transgene were detected in transformants with 1 or 2 copy numbers of transgene(s) per cell. Founder transgenics exhibited the remarkable increase in serum levels of total cholesterol (T-CHO) and HDL-CHO up to more than 200%. F₁ fish propagated from the selected transgenic lines showed more increased level of expression up to 3-fold when compared to control normal levels. Various feeding experiments with the feeds supplemented by high fat and/or chemical inducers, many transgenic fish accumulated the preferentially the HDL-CHO (up to 4-fold of control value) rather than low density lipoprotein (LDL-CHO), indicating that the fish would acquire novel function to change the composition of CHO in a desirable manner.

표 목 차 (List of Tables)

Table 1. Summary of cDNA library construction	21
Table 2. Summary of EST profiles	22
Table 3. Putatively identified cDNA clones as apolipoprotein	23
Table 4. Sequence homology of the mud loach apolipoprotein at the amino acid levels	36
Table 5. Comparison of plasmid form on gene expression following in mud loach	39
Table 6. Factors affecting the viability of mud loach embryos subjected to various conditions of microinjection	43
Table 7. Incidence of transgene in the hatched larvae developed from the eggs microinjected either with pmlectGH (for mud loach), pca β -actfGH (for flounder), pca β -actGH (for carp) or pHx β -actGH (for greenling)	44
Table 8. Serum level of total CHO in transgenic and in transgenic and non-transgenic mud loach	46
Table 9. Serum level of HDL-CHO in transgenic and non-transgenic mud loach	47
Table 10. Brief summary of transgenic lines containing pFV4mAPO cDNA	48
Table 11. Hatching rate and early survival of two different F ₁ transgenic lines	50
Table 12. Germ line transmission and expression of apolipoprotein activity determined by blood concentration of T-CHO and HDL-CHO	51

그림 목 차 (List of Figures)

Fig. 1. Blast search results of putatively identified clone.	28
Fig. 2. Complete nucleotide sequence of the mud loach apolipoprotein cDNA.	29
Fig. 3. Hydropathicity profile of apolipoprotein genes.	32
Fig. 4. Prediction of signal peptide cleavage sites in apolipoprotein amino acid sequences.	33
Fig. 5. Alignment of amino acid sequences of the apolipoproteins. ...	35
Fig. 6. Phylogenetic tree of apolipoprotein based on amino acid sequences.	37
Fig. 7. Tertiary structure of apolipoprotein reconstructed by automated protein structure homology-modeling server, SWISS-MODEL.	38
Fig. 8. The pFV4m Apo construct used for microinjection.	40
Fig. 9. Representative Southern blot of transgenic Fo fish developed from the embryos injected with pFV4m Apo cDNA.	45
Fig. 10. Plasma T-CHO level of control mud loach fed with the diet contained hog fat for 4 days.	54

Fig. 11. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of control mud loach fed the control diet for 6 days.	55
Fig. 12. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach fed 1% cholesterol diet for 6 days.	56
Fig. 13. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach fed 2% cholesterol diet for 6 days.	57
Fig. 14. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach fed 4% cholesterol diet for 6 days.	58
Fig. 15. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of non-transgenic mud loach fed the 0% cholesterol diet for 6 days.	60
Fig. 16. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of non-transgenic mud loach fed the 4% cholesterol diet for 6 days.	61
Fig. 17. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach transgenic lines (TG6) fed the 4% cholesterol diet for 6 days.	62
Fig. 18. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach transgenic lines (TG9) fed the 4% cholesterol diet for 6 days.	63
Fig. 19. Plasma T-CHO levels in transgenic line (TG 9) and non-transgenic mud loach fed the 1% fenofibrate diet for 10 days.	65
Fig. 20. Plasma HDL-CHO levels in transgenic line (TG 9) and non-transgenic mud loach fed the 1% fenofibrate diet for 10 days.	66

I. 서 론

유전자 이식을 통한 형질전환 기술은 세포내로 새로운 유전물질을 주입, 숙주의 염색체상에 이식함으로써 개체로 하여금 요구되는 새로운 유전형과 표현형을 갖도록 하는 기술이다. 특히 어류는 척추동물군 중 가장 광범위한 유전적 다양성을 보유한 분류군으로서 형질전환 유전자 소재의 보고이며 더욱이 최근 인간을 위시한 고등 척추동물에서는 그 기능이 진화적으로 소실된 유전자들이 어류에서는 높은 활성을 유지한 채 보존되어 있는 예들이 밝혀지고 있어 큰 관심을 받고 있다 (Hew and Fletcher, 2001). 이에 어류를 대상으로 한 형질전환은 척추동물의 유전자 조절과 유전학을 위한 유용 모델의 개발이라는 측면에서 크게 각광받고 있으며 (Powers, 1989; Iyengar et al., 1996) 포유류와 비교시 모델 시스템으로서 다음의 장점들을 갖는다. 첫째, 체외수정을 하므로 배우자 조작이 용이하고 또한 수정 후 착상 등의 작업이 필요 없으며, 둘째, 수정란 및 발생하는 배가 투명한 어종들일 경우 발생관련 유전자 발현 분석이 용이하고, 셋째, 배 발생 속도가 빠를 뿐만 아니라 외부 온도 조절에 따라 발생 속도의 조절이 가능하며, 넷째, 1세대의 길이가 비교적 짧아 생식세포 형성과정을 연구하기에 용이하고, 다섯째, 포유류에 비해 높은 산란력을 가지므로 동시에 다량의 생물학적 재료를 확보할 수 있다. 또한 여섯째, 어류의 배우자, 접합자 및 배를 대상으로 포유류에서는 극히 어려운 염색체 조 조작 또는 성 조작이 가능하므로 형질전환 계통 확립에 유리한 장점이 있다. 이러한 장점들을 바탕으로 일부 어종들에서 척추동물의 형질전환 모델 시스템 개발이 시도되고 있으며 이들을 이용한 기능 유전체학

분야의 시대가 급속히 도래하고 있다 (Nam and Kim, 2001). 형질 전환 기술을 이용하여 신규 유전자의 대량 발현 또는 발현 억제 등을 통해 표현형으로 나타나는 현상을 추적, 유전자의 기능을 구명하기 위한 연구들이 이루어지고 있으며 아울러 척추동물군 중 가장 하등한 어류로부터 가장 고등한 포유류까지 유전자 조절 방식의 진화를 추적하기 위한 진화 유전체학의 소재로서도 그 유용성을 인정받고 있다 (Nam et al., 2002).

현재 다음과 같이 대별되는 두 가지 큰 목적을 달성하기 위해 어류 유전자 이식이 수행되고 있다. 첫째, 어류 시스템을 이용하여 목적 유전자 또는 유전자 조절 부위의 기능을 추적 및 구명하고자 하는 것이며 둘째, 유용 어류로 하여금 경제적으로 중요한 기능을 획득시킴으로써 양식 형질을 대폭 개선하고 이를 통한 고생산성을 창출하고자 하는 것이다 (Iyengar et al., 1996). 이들 두 연구 분야를 독립적으로 나누어 평가하는 것은 매우 어려운 일이나 상기 첫 번째 분야의 경우, 리포터 유전자와 융합된 어류 프로모터 및 발현 조절 부위들을 이식하여 발현조절 방식 (즉 발현 강도, 발현 시점, 발현 부위 등)에 관한 정보를 추적하거나 또는 특정 유전자의 발현을 증폭시키거나 억제한 후 관찰되는 표현형을 관찰함으로써 해당 유전자의 기능을 구명하는 연구이다 (Hackett and Alvarez, 2000; Hew and Fletcher, 2001). 두 번째 생산성 개선을 목적으로 한 형질전환 어류의 개발은 양식 생산에 있어 경제적으로 중요한 양적 형질 (quantitative trait)을 획기적으로 개선하고자 하는 연구로서, 현재까지는 성장 호르몬 유전자 이식을 통해 성장률을 개선하고자 하는 노력이 주를 이루어왔으며, 최근 들어 성장 형질 이외에 여타 다른 양식 형질을 개선시키기 위한 유전자 이식, 예컨대 질병저항성 획득, 성 성숙 제어, 소화대사의 조절 등이 진행되

고 있다 (Devlin et al., 1995; Dunham and Devlin, 1999; Nam et al., 2001).

최근 들어 어류로부터 여타 양적 형질 또는 새로운 기능획득과 관련한 형질전환 유전자 소재들의 탐색 역시 활발히 연구되고 있으며 이는 expressed sequence tags (EST) 기술을 중심으로 발전하고 있다 (Douglas et al., 1999). EST는 제작된 cDNA library로부터 무작위로 선발된 클론들을 자동화된 장비를 이용하여 염기서열 정보를 대량 확보하는 기술로서 EST 정보는 어류의 신규 유전자를 발굴하는데 가장 강력한 기술로 인정받고 있을 뿐만 아니라 특정 조직 또는 특정 시점에서 어류가 발현하는 유전 정보의 청사진을 제시할 수 있다 (Nam and Kim, 2001). 본 기술은 1990년대 중반부터 활발히 소개되어 이미 GenBank의 EST 데이터 베이스인 dbEST는 현존하는 생물학관련 데이터베이스 중 가장 급속도로 성장하고 있다. 어류 dbEST의 경우 아직 포유동물 및 미생물에 비해 일천한 역사를 갖고 있어 현재 전체 GenBank dbEST의 점유도 5% 이하에 그치고 있는 실정이나 최근 들어 일부 모델 어종과 주요 양식어종을 중심으로 local 데이터베이스들의 규모가 급속도로 확대되고 있다 (Gong et al., 1997; Kono et al., 2000). 어류에서 조직별로 얻어지는 유용 유전자 및 신규 유전자들을 형질전환 소재로 활용함으로써 소재 활용 폭의 제한을 정면으로 극복할 수 있으며 종래의 성장형질 외에도 생식 및 성 성숙, 질병저항성, 면역증강, 특정 물질 대사의 개선(metabolic engineering) 등을 대상으로 한 새로운 형질전환 연구개발 계획 및 결과들이 창출되리라 예상된다 (McLean and Devlin, 2000; Nam and Kim, 2001).

인간의 유전체 지도 초안이 작성됨에 따라 분자 치료 기법을 이용한 인간 주요 질병의 치료와 극복이 생명공학의 핵심분야가 되

고 있으며 때문에 유용 형질전환 동물 모델 개발은 질병의 분자치료를 위한 핵심 기술과 함께 고부가가치를 창출할 수 있다는 점에서 전세계적으로 첨예한 경쟁 분야로 떠오르고 있다. 이에 신기능성 형질전환 어류 시스템을 이용한 동물 모델 개발은 앞서 언급한 바와 같이 포유류 모델에서 얻을 수 없는 어류만이 갖는 많은 장점에 힘입어 인간의 분자치료 연구를 위한 새로운 연구 모델 시스템으로서 각광받기 시작하고 있다 (Setlow and Woodhead, 2001; Walter, 2001). 이러한 형질전환 신기능성 동물 시스템 개발 중 특히 지질대사와 관련한 형질들은 심장, 신경 및 혈관 순환계 등에 직접적이고 밀접한 관계를 갖고 있기 때문에 전세계적으로 가장 중요한 분자치료 대상 형질 중 하나로 여겨지고 있고, 특히 콜레스테롤 대사와 관련한 유전자 발굴, 유전자 발현 정보 수집, 생물학적 기능 및 작용 정보 해석에 많은 연구들이 이루어짐과 동시에 이들 연구를 수행하기 위한 새로운 모델 시스템 개발 역시 활발히 이루어지고 있다 (Ruben et al., 1991; Jiang et al., 1996; Cohen et al., 1997).

이중 Apolipoprotein들은 lipoprotein들의 주요 성분으로서 모든 척추동물의 생체내 지방 전달 및 대사에 중요한 역할을 담당하고 있으며 (Gotto et al., 1986) 많은 Apo 단백질들은 양극성의 나선구조를 갖고 있어 친수성 세포성분은 물론 소수성의 지질 성분과 반응 및 작용할 수 있고 이를 통해 지질의 생체내 이동과 대사 기능을 수행한다 (Segrest et al., 1992). 이 중 apolipoprotein AI (Apo AI)은 high density lipoprotein (HDL)의 주요 단백질 성분으로서 동맥을 위시한 생체 조직 및 기관의 콜레스테롤 대사에 밀접하게 관여한다. HDL은 조직 및 기관으로부터 분비되는 콜레스테롤과 결합하여 조직에 과도한 콜레스테롤 축적을 방지하는 세포외 수용

체 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으며 과다 콜레스테롤에 저항하는 생체 반응인 reverse cholesterol transport (RCT)의 핵심 역할을 담당한다 (Plump et al., 1996). HDL의 주요 구성 단백질 성분인 Apo AI은 생체 방어 경로의 활성을 결정짓는 단백질로서 혈청내 Apo AI-HDL 농도의 감소는 바로 동맥경화 유발 및 많은 심장계 질환에 직접적인 원인을 제공하며, 때문에 순환계 질병 위험을 예측하는 biomarker로서 매우 중요시되고 있다 (Francis and Frohlich, 2001). 뿐만아니라 Apo AI은 세포외 RCT 반응 외에도 세포내 형성된 콜레스테롤의 세포외 배출 반응에도 관여하며 또한 항산화 및 항염증 작용에도 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 밝혀지고 있다 (Wang et al., 1998; Sviridov et al., 2001).

이에 본 연구에서는 기능성 어류 유전자 자원의 생명공학적 활용 기술 개발을 위한 일환으로 어류 Apo AI 유전자를 목적 유전자로 설정하여 EST 기법을 이용, 우리나라 주요 양식대상 어종으로부터 apolipoprotein 유전자들을 탐색 발굴하고자 하였으며, 특히 본 실험에 사용한 미꾸라지는 여타 어류와는 달리 양식산일 경우에도 체내 복강지방이 전혀 발견되지 않으며 그 외 간도 다른 어류와는 달리 지방을 거의 함유하지 않아 체내 apolipoprotein의 활성이 매우 높을 것으로 추측되고 있다. 또한, 발굴된 유전자들의 DNA 및 아미노산 염기서열 구조를 해석하고, 재조합 DNA 기술을 이용하여 어류 Apo AI 발현벡터를 제작하고, 유전자 이식을 통해 Apo AI을 과발현하는 새로운 형질전환 어류를 개발하고 신 기능성 유용 형질전환 어류 시스템을 이용한 고부가가치 창출 방안을 도출하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 어류 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝

1-1. cDNA library 제작 및 EST

1-1-1. 조직 선발 및 RNA 분리

Library를 제작하기 위해 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis*, 상어 *Scyliorhinus torazame*, 먹장어 *Eptatretus burgeri* 등 3종의 어종들에 대해 장 (intestine)과 간 (liver) 조직을 대상으로 각 조직 100 mg 당 1 ml TriPure™ Isolation Reagent (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 이용하여 조직을 완전히 분쇄한 후, 실온에서 10분간 방치하고 chloroform extraction과 원심분리 (12,500 rpm, 15분)를 수행하였다. 원심분리를 실시하여 RNA를 포함하는 상층액을 취한 후, 동일량의 isopropanol을 첨가하여 total RNA의 침전을 유도하였다. 250 μ g의 total RNA로부터 mRNA Isolation Kit (Roche, Germany)를 이용하여 mRNA만을 순수 분리하였다. RNA 시료에 lysis buffer (0.1 M Tris, 0.3 M LiCl, 10 mM EDTA, 1% lithium dodecylsulfate, 5 mM dithiothreitol, pH 7.5)를 첨가하여 65°C에서 2분간 방치한 후 100 pmol/ μ l, biotin-labeled oligo d(T)₂₀ 2 μ l를 넣어 완전히 섞어주고, poly (A)와 oligo d(T)간의 hybrid 반응을 유도하였다. 이후 streptavidin magnetic particles 1.5 mg을 첨가하여 37°C에 5분간 방치하여 biotin과 streptanidin과의 결합반응을 유도하였다. 반응이 완료되면 magnetic particle separator (BM Co., Germany)를 이용하여 washing buffer (10

mM Tris, 0.2 M LiCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 250 μ l로 3회 씻어 준 후, DEPC 처리된 멸균수로 65°C에서 2분간 가온하여 magnetic particle로부터 poly (A) mRNA를 분리 하였다.

1-1-2. cDNA 합성 및 library 제작

분리된 poly (A) tail의 mRNA를 이용, cDNA library를 제작하였으며 cDNA library 제작을 위한 실험과정은 Stratagene사의 ZAP-cDNA Synthesis Kit와 ZAP-cDNA GigapackIII Gold Cloning Kit를 이용하여 수행하였다. 제조사의 protocol을 바탕으로 mRNA로부터 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였으며 클로닝을 용이하게 하기 위해 합성된 cDNA의 말단을 조작함으로써 XhoI과 EcoRI의 양쪽 끝 말단을 갖도록 하였다. 합성된 cDNA 단편들 중 0.6 Kb 이상되는 cDNA strand들만을 선택하기 위해 sepharose column을 이용하여 size fraction을 수행하였다. Column 제작은 Stratagene사의 cDNA Synthesis Kit manual에 따라 Falcon 1 ml pipette과 10 ml sterile syringe를 이용하여 제작하고 이때 column의 매질은 sepharose CL2를 이용하였다. 제작된 drip column에 cDNA를 loading한 후 각 100 μ l씩 12 분획을 얻었으며 전기영동으로 각 분획에 있는 cDNA의 길이를 확인한 후 0.6 Kb 이상되는 cDNA를 선택하여 벡터와 ligation을 수행하였다

Ligation된 cDNA/벡터를 bacteriophage에 packaging하기 위해 1.0 μ g ligated DNA 4 μ l를 준비된 packaging extract (Stratagene

Co., USA)와 즉시 섞어준 후 실온 (23℃)에서 2시간 동안 반응을 유도하였다. 반응이 완료되면 SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 0.01% gelatin) 500 μ l와 chloroform 20 μ l를 첨가하여 천천히 섞어서 4℃에 보관하며 실험에 사용하였다. Packaging의 효율을 분석하기 위해 titer를 조사하였다. 숙주세포를 준비하기 위해 agar plate에 bacterial glycerol stock (XL1-Blue MRF'와 SOLR cell)을 도말하여 37℃에서 16시간 배양한 후 single colony를 취하여 액체배지 (10 mM MgSO₄, 0.2% maltose in 1X LB)에 접종하여 37℃에서 OD₆₀₀ = 1.0이 넘지 않을 때까지 배양한 후 10 mM MgSO₄로 OD₆₀₀ = 0.5가 되게 조정하여 실험에 사용하였다. Primary library titring을 위해 10 mM MgSO₄에 OD₆₀₀ = 0.5로 희석된 host cell 200 μ l와 packaging된 lambda phage 1 μ l를 첨가 후, 37℃에서 15분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 NZY top agar (melted and cooled to ~48℃) 3 ml, 0.5 M Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) 15 μ l와 250 mg/ml X-gal (in N,N- Dimethylformamide) 50 μ l를 첨가한 즉시 NZY agar plate에 붓고 10분간 실온에 방치한 후 37℃에서 16시간 동안 배양하였다.

1-1-3. Plasmid 벡터로의 sub-cloning

Lambda phage에 포함되어 있는 cDNA clone들을 plasmid 벡터로 sub-cloning 하기 위해 mass in vivo excision을 수행하였다. Excision반응을 위해 phage들의 숙주 세포들인 XL1-Blue MRF'와

SOLR cell strain을 10 mM MgSO_4 와 0.2% maltose가 첨가된 LB 배지에서 $\text{OD}_{600} = 1.0$ (8×10^8 cells) 까지 성장시킨 후 10 mM MgSO_4 에 $\text{OD}_{600} = 1.0$ 의 농도로 조정하여 실험에 사용하였다. 먼저 phage stock : XL1-Blue MRF' cell : ExAssist helper phage를 1 : 10 : 100으로 혼합하여 37°C 15분간 반응시킴으로써 phage들이 모든 숙주 세포들에 부착되도록 하였다. 반응이 완료되면 20 ml의 LB 배지를 넣고 3시간 동안 37°C에서 shaking culture를 수행하였고 배양 후 67°C에서 세포들을 불활성화 시키고 cell debris들을 원심분리 (1,000×g, 10분)를 통해 제거하였다. Excision이 효과적으로 이루어졌는지 확인하기 위해 상기 excised phage 1 μl 를 준비된 SOLR cell 200 μl 에 37°C 15분간 감염시켰다. Excised된 phagemid는 ampicillin 내성 유전자를 포함하도록 조작되었으므로 감염된 SOLR cells (phagemid를 포함하는 세포)만을 선택적으로 얻기 위해 LB-ampicillin agar 배지 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 도말하였다.

1-1-4. EST clone 준비

Sequencing을 위한 PCR용 template를 준비하기 위하여 cDNA를 포함하는 bacteria colony들을 LB-ampicillin 액체 배지에 접종하고 16시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 원심분리를 통해 세포들을 회수하고 proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in DW) 용액으로 resuspend한 후 실온에서 2시간 동안 방치하였으며 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 94°C에서 15분간 proteinase K를 불활성화 시키고 다시 원심분리 (12,000 rpm, 5분)

를 통해 cell debris를 제거하고 plasmid를 포함하는 상등액을 취하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

1-2. Library Screening을 통한 apolipoprotein 유전자 탐색

제작된 library의 1차 profile 조사 후 여타 housekeeping gene들을 포함한 중복성 클론들의 간섭효과를 제거함으로써 무작위 염기서열 분석시 얻어질 수 있는 유전정보의 다양성을 극대화하였다. Normalization을 수행하기 위해 1차 BLAST profile에서 library내 20% 이상의 중복성을 보이는 EST clone들을 대상으로 PCR을 통해 DIG-labeling을 수행하여 probe를 제조하였으며, 또한 1차 EST를 통해 확보된 클론 중 apolipoprotein과 유사성을 나타내는 클론을 대상으로 PCR을 통해 DIG-labeling을 수행하여 filter screening용 probe를 제조하였다. 96 well format 또는 원형 replica에 등간격으로 정렬되어 있는 500개 bacteria colony set들을 대상으로 nylon membrane을 배양 접시 위에 올려놓고 1분 뒤 떼어 내어 순차적으로 변성화 용액 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 2분, 중성화 용액 (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl)에 5분, 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate)에 1분간 담근 후 membrane에 DNA가 견고하게 부착되도록 UV crossing chamber (Bio-Rad, USA)에서 150 mJ을 조사하여 UV cross linking시켜 앞서 제조된 probe와 multi-hybridization을 수행함으로써 중복성 클론의 제거 및 positive clone들을 확보하였다.

1-3 Apolipoprotein 유전자 선발 및 염기서열 결정

확보된 각 bacteria colony들은 2 ml LB-ampicillin 액체 배지에서 밤새 배양하였다. 원심분리를 통해 세포들을 회수하고 proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in DW) 용액에 현탁하여 실온에서 2시간, 50°C에서 30분간 반응시킨 후, 94°C에서 15분간 proteinase K를 불활성화시키고 다시 원심분리 (12,000 rpm, 5분)를 통해 plasmid를 포함하는 상등액을 얻었다.

Primer extension을 위해 lysate 11 μl 와 SK primer (5' CGCTCTAGA ACTAGTGGATC 3') 3.2 pmole, 형광 표지된 ddNTP를 포함하는 BigDye terminator (Perkin Elmer Co., USA) 2 μl , 및 2.5 $\times$ dilution buffer 6 μl 를 넣어 reaction mixture를 만들고 PCR cycling을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 3분간 initial denaturation 단계를 거친 후 96°C에서 10초, 50°C에서 5초 및 60°C에서 4분을 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후 PCR 산물을 ethanol 침전반응 시키고 70% ethanol wash를 수행하였다. 최종적으로 3.5 μl 의 loading buffer (5:1 deionized formamide to 25 mM EDTA, 50 mg/ml blue dextran)에 resuspend하여 분석에 이용하였다. Sequencing gel은 제작사의 protocol (PE Co., USA)에 따라 만든 후 ABI 377 sequencer (PE Co., USA)를 이용하여 염기서열 data들을 확보하였다.

1-4. Apolipoprotein 유전자의 구조적 특성분석

Sequence gel에서 얻어진 data를 염기서열 분석 software인

Sequencher 3.1.1 (Gene Codes Co., USA)를 이용하여 data를 분석 후 벡터 부분의 sequence를 포함한 불필요한 염기서열 data를 제거하고 Genbank 탐색을 수행하였다. 다른 어종들과의 염기 서열 및 아미노산 서열 수준에서의 유사성 비교는 NIH BLAST 프로그램 blastx와 blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov)을 동시에 수행하였다. 또한 유전자의 구조 및 특징 분석은 CGG 염기 서열 분석 프로그램 (genomic.sanger.ac.uk)과 BCM Search Launcher: Gene Feature Searches (dot.imgen.bcm.tmc.edu) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 또한 얻어진 염기 서열 및 이로부터 유추된 아미노산 서열은 MultAlin (www.toulouse.inra.fr), Clustal W (www.clustalw.genome.ad.jp) 등의 multiple sequence alignment 프로그램을 이용하여 다중 배열함으로써 상동성을 비교 분석하였다.

Apolipoprotein 아미노산 서열의 hydropathicity plot은 ProtScale (expasy.hcuge.ch)을 이용하여 그리고 서열 내 signal peptide의 유무 및 cleavage sites의 예측은 SignalP (www.cbs.dtu.dk)를 이용하여 분석하였으며, PSORT (psort.ims.u-tokyo.ac.jp)와 TargetP (www.cbs.dtu.dk) 등의 프로그램을 이용하여 발현된 apolipoprotein 단백질의 sorting signal과 세포내 위치 등을 예측하였다. 또한 SWISS-MODEL (www.expasy.org)을 이용하여 종간의 단백질의 3차 구조를 재구성하여 비교하였다.

2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터 개발

2-1. 어류 프로모터 확보 및 기능성 평가

Apolipoprotein 유전자의 효율적 발현을 유도하기 위해 RSV/LTR promoter와 잉어 β -actin의 두가지 promoter에 reporter 유전자인 CAT을 구조 유전자로 하는 발현벡터를 제조하였다. 이들 재조합 발현벡터들의 발현 조절 능력 평가를 위해 미꾸라지 근육에 direct injection한 후 두 promoter간 미꾸라지 근육 세포에서의 발현율을 조사하였으며, 아울러 plasmid form에 따른 발현율의 차이도 검증하였다. 즉 두 종류 유전자의 plasmid form에 따른 발현 양상을 조사하기 위하여 miniprep에 의해 얻어진 각각 100 μ g의 plasmid DNA를 circular form과 EcoRI으로 digestion 한 linear form과 circular form 그대로 미꾸라지 근육에 주사하고 48 시간 후 CAT assay를 통해 이들 promoter의 발현 유도 정도를 비교하였다.

2-2. Apolipoprotein 유전자 발현용 벡터 개발

Apolipoprotein 유전자 발현 벡터의 제조를 위해 pBluscript II KS(-) (pBS; Stratagene, USA) 벡터내에 cloning되어있는 ML003 plasmid와 pFV4a plasmid 2 μ g을 제한효소 NotI과 XhoI 10 U으로 2시간 동안 반응시켜 절단한 후, 이를 전기영동하여 크기별로 분리하였다. 해당 band를 포함하는 gel 조각으로부터 GeneClean kit (Bio 101, USA)를 이용하여 회수하고 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. 이어 50 mM CaCl_2 를 처리한 대장균 숙주 세포 XL-1 blue MRF' 균주에 형질전환시키고, 배양한 후 나타난 흰색 콜로니를 무작위로 선택하여 37°C에서 2 ml LB 배양액에 밤새 배

양하였다. 배양액 중 1.5 ml을 알칼리 용해 방법에 따라 플라스미드 DNA를 추출하여 일부를 제한 효소로 절단, 정확한 insert가 들어 있는지 여부를 확인하였다.

3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환

어류생산

3-1. Microinjection을 통한 유전자 이식

3-1-1. Microinjection의 최적 조건 조사

성숙된 암컷과 수컷 미꾸라지(4~5년생)에 HCG를 어체중 g당 10 IU의 농도로 복강주사한 후 난과 정자를 얻어 수정시켰다. 수정된 알을 15℃에 보관하면서 1세포기에 도달한 수정난의 할구세포 중앙에 다양한 조건으로 microinjection을 실시하였다. 이후 microinjection이 끝난 알을 25℃의 부화기로 옮겨 부화율과 초기 생존율을 구하여 가장 효율적인 microinjection 조건을 구하였다.

3-1-2. 최적 microinjection 조건에 의한 유전자 이식

상기 3-1-1의 방법에 의해 얻어진 최적조건의 microinjection 방법을 이용 3쌍의 미꾸라지를 대상으로 3회에 걸쳐 수정난을 대량 처리한 후 이들을 부화시켜 실험에 사용하였다.

3-2. Southern blot에 의한 유전자 삽입구도 분석

부화 3개월 후 꼬리지느러미를 절취한 후 SDS/proteinase K 방법에 의거 DNA를 추출하였다. Southern blot을 위하여 10 µg의 DNA를 제한효소 DraII로 잘라 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 옮겨 non-isotopic labeling and detection

kit (Boehringer-Mannheim, Germany)를 이용 Southern blot 하였다.

3-3. 유전자 발현 유무 분석

상기 3-2의 southern blot에서 positive signal과 high molecule weight DNA band가 보여 integration이 확인된 개체를 선정 그의 피를 뽑아 T-CHO와 HDL-CHO를 측정 Apo AI 유전자의 형질전환 어체내 발현 유무를 직접 조사하였다.

3-4. Stable line 확보를 위한 F₁ 생산

3-4-1. 대조군과 교배 F₁ 생산

상기 3-3의 실험에서 발현율이 높은 두개의 line (TG 6 및 TG 9)을 선정하여 산란용의 실험사료를 공급한 후 대조군의 암컷(4~5년생)으로부터 산란을 유도하고 TG 6 및 TG 9로부터 정액을 채취한 후 수정시켜 F₁ TG 어류를 생산하였다.

3-4-2. F₁의 발현 양상

각 line에서 20마리씩을 채취한 후 상기 3-3에 기술한 방법으로 T-CHO 및 HDL-CHO를 측정함으로써 F₁ 어류들의 발현율과 그 양상을 조사하였다.

4. Cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환 어류의 cholesterol 농도 변화

4-1. 비계 첨가사료 공급에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

LDL-CHO가 높은 것으로 이미 잘 알려진 돼지의 비계부분을 사료분쇄기로 분쇄한 후 미꾸라지 사료에 0, 5 및 10%의 농도로 대조군 미꾸라지에 4일간 먹인 후 T-CHO 및 HDL-CHO의 농도 변화를 측정하여 대조군 미꾸라지에 있어서 고농도 cholesterol 사료 공급시 그의 혈중농도의 변화 여부를 조사하였다.

4-2. Cholesterol 농도 및 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

4-2-1. 대조군 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 나타나는 농도 및 처리시간에 따른 변화

Cholesterol (Sigma, USA)을 미꾸라지 사료에 0, 1, 2 및 4%의 농도로 섞어 미꾸라지에 6일간 공급한 후 2일 간격으로 T-CHO의 농도 및 HDL-CHO의 농도를 조사하여 농도 및 처리 시간에 따른 대조군 미꾸라지의 혈액내 cholesterol 변화 양상을 측정하였다.

4-2-2. 형질전환 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 T-CHO와 HDL-CHO의 농도변화

상기 두 F₁ 계통 (TG 6 및 TG 9)의 stable TG line에 4%의 cholesterol이 함유된 사료를 6일간 공급한 후 2일 간격으로 혈중 T-CHO와 HDL-CHO의 농도를 조사하였다. 이때 대조군으로는 cholesterol 무첨가 사료를 공급한 군 (control 1)과 4%의 cholesterol 첨가 사료를 공급한 군 (control 2)로 나누어 대조군과 형질전환 미꾸라지의 cholesterol 축적량과 HDL-CHO의 전환효율을 분석하였다.

4-3. Fenofibrate 처리기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의

농도 변화

Fenofibrate를 사료에 섞어 공급함으로써 미꾸라지 Apo AI 유전자의 기능이 fenofibrate에 의해 어떠한 영향을 받으며, 본 종의 Apo AI 유전자는 어떠한 type에 속하는가를 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다. 본 실험을 위하여 1% 농도의 fenofibrate가 함유된 사료를 대조군과 TG 13 군의 미꾸라지에 공급, 6일과 10일 후 이들의 혈액을 채취 T-CHO 및 HDL-CHO의 농도 변화를 관찰하였다.

4-4. T-CHO 및 HDL-CHO의 측정

4-4-1. T-CHO 측정

혈액 채혈은 1.0 ml/cc (26G $\frac{1}{2}$ ") syringe를 사용하여 200~300 μ l 채집 하였으며, 채집된 혈액을 7000 rpm에서 5분간 원심분리 후 serum만 새로운 tube에 보관 하였다. 보관된 각 개체의 serum을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) plate reader (Bio-Rad, USA)를 사용하여 분석하였다. 분석 시약으로는 총 cholesterol 측정용 시약(아산테크, 한국)을 사용하였으며, 분석 방법은 fish serum 2 μ l에 300 μ l 효소액(cholesterol esterase + cholesterol oxidase; 아산테크 T-CHO 측정용 시액, 한국)을 섞어 준 후 serum과 효소액이 섞인 microwell plate를 상온에서 10분간 반응시켰다. 이때 공시험에는 PBS와 표준시험에는 표준액(cholesterol 300 mg/dl)을 사용 하였으며, 490 nm (500 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

4-4-2. HDL-CHO 측정

혈액 채혈 및 serum의 채집은 상기의 T-CHO 측정법에서와 같

은 방법으로 하였다. 분석 시약으로는 HDL-CHO 측정용 시약 (아산테크, 한국)으로 시약 A (계면활성제 + ASOD: HDL과 친화성이 큰 계면 활성제를 이용하여 HDL-CHO만 선택적 용해하기 위한 시약)와 시약 B (cholesterol esterase + cholesterol oxidase: 효소반응에 의해 용해된 HDL-CHO를 정량화하기 위한 시약)로 구성되어 있으며, 분석 방법으로는 fish serum 3 μl 에 300 μl 시약 A와 100 μl 시약 B를 섞어준 후 serum과 측정 시약이 섞인 microwell plate를 상온에서 5~10분간 반응시켰다. 이때 공시험에는 PBS와 표준시험에는 표준액(HDL-CHO 50 mg/dl)을 사용 하였으며, ELISA plate reader를 사용하여 655 nm (주파장: 600 nm; 부파장: 700 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결 과

1. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자의 탐색 및 클로닝

1-1. cDNA library 제작

1-1-1. 제작된 cDNA library 평가

선발된 모델 어류들과 원시 어류 총 8종으로부터 19개의 library (8 종류 조직)가 구축되었다. 구축된 library들의 기본적인 평가를 위해 각 cDNA library들이 충분한 유전자들을 포함하고 있는지를 1차로 확인하고 이들 각 library들로부터 무작위 48개의 클론들을 선발하여 재조합 클론들이 포함하고 있는 cDNA insert들의 평균 길이를 확인하였다. 그 결과 제조된 primary library들의 크기는 1.2×10^6 pfu/ml에서 2.8×10^6 pfu/ml 사이였으며 증폭된 library 및 excised 된 library 역시 각각 최대 2.5×10^{11} pfu/ml 및 1.5×10^8 cfu/ml로 나타냄으로써 다양한 유전정보를 포함하고 있는 cDNA library가 합성되었음을 알 수 있었다. 제작된 이들 library 중 apolipoprotein과 유사성을 갖는 clone을 포함하는 library를 Table 1에 나타내었다.

1-2. Express Sequence Tag (EST)와 Library Screening을 통한 apolipoprotein 유전자 탐색

1-2-1. EST 데이터 베이스 구축

염기서열의 구조 및 유사성에 관해 (a) 5' upstream 쪽 또는 poly (A) signal이 보존되어 있는지 여부, (b) Start codon이 잘 보

존되어 있는 ORF 인지 여부, (c) 조직내 반복되는 공통 염기서열의 contig 작성 및 그 빈도, (d) 조직간 반복되는 공통 염기서열의 contig 작성 및 그 빈도, (e) GenBank의 데이터베이스내 염기서열과 match되는지 여부, (f) match되었다면 그 유사성 (%) 정도 (50% 이상, 30~50%, 30% 미만), (g) query-Subject간 alignment가 염기서열의 전반에 걸쳐서 있는지 또는 국한된 염기서열 영역에서만 존재하는지 여부, (h) unmatched 염기서열간 상동성이 있는지 또 이들 염기서열이 정확한 ORF인지 여부 등을 분석하였다. 구축된 cDNA library들 및 EST의 기본적인 특성을 Table 2에 나타내었다.

1-2-2. Apolipoprotein의 탐색

Library 검색을 통해 확인된 apolipoprotein 유전자 clone들은 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis* 간 cDNA library에서 10개, 두툽상어, *Scyliorhinus torazame* 간 cDNA library에서 2개와 뇌 cDNA library에서 1개, 및 먹장어, *Eptatretus burgeri* 간 cDNA library에서 1개 등 총 14개의 positive clone이 확인되었다. Table 3은 본 연구결과 미꾸라지, 상어 및 먹장어로부터 확인된 apolipoprotein 연관 유전자 정보이다.

Table 1. Summary of cDNA library construction

Fish species	Tissue	Primary size (<i>pfu</i> /mℓ)	Amplified size (<i>pfu</i> /mℓ)	Excised size (<i>cfu</i> /mℓ)	Average length of insert (kb)
Mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i>	Liver	1.2×10^6	1.0×10^{11}	7.5×10^7	1.6
Tiger shark <i>Scyliorhinus torazame</i>	Liver	2.1×10^6	2.5×10^{11}	5.0×10^7	1.7
	Brain	1.5×10^6	6.5×10^{10}	2.8×10^7	2.0
Hagfish <i>Eptatretus burgeri</i>	Liver	2.8×10^6	2.0×10^{11}	1.5×10^8	2.5

Table 2. Summary of EST profiles

Fish species	Tissue	No. of EST	% of novel gene	% unique seq.	% full length clone
Mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i>	Liver	320	11	76	75
Tiger shark <i>Scyliorhinus torazame</i>	Brain	365	21	85	46
	Liver	288	17	88	55
Hagfish <i>Eptatretus burgeri</i>	Brain	192	35	84	51

Table 3. Putatively identified cDNA clones as apolipoprotein

EST source	Clone No.	Putative Identification	Accession No.	Species	Length (aa)	% ID	Score (bits)
Mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i> Liver	ML003	apolipoprotein AI	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	171	61	221
	ML007	28KDa apolipoprotein	BAB40960	Eel <i>Anguilla japonica</i>	222	50	227
	ML035	28KDa apolipoprotein	BAB40960	Eel <i>Anguilla japonica</i>	222	50	227
	ML036	28KDa apolipoprotein	BAB40960	Eel <i>Anguilla japonica</i>	222	50	227
	ML037	apolipoprotein AI	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	161	59	202
	ML038	apolipoprotein AI	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	155	60	196
	ML045	apolipoprotein AI-2	AAB96973	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	249	40	194
	ML049	apolipoprotein AI-2	AAB96973	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	257	41	196
	ML061	apolipoprotein AI	CAC34942	Carp <i>Cyprinus carpio</i>	149	59	187
	ML092	apolipoprotein AIV	P06727	Human <i>Homo sapiens</i>	245	26	118
Tiger shark <i>Scyliorhinus torazame</i> Liver	SL0139	apolipoprotein B	J10382	Pig <i>Sus scrofa</i>	161	26	66
	SL0231	apolipoprotein E	NP_571173	Zebra fish <i>Danio rerio</i>	90	31	60
Brain	SB188	apolipoprotein E	NP_571173	Zebra fish <i>Danio rerio</i>	194	25	76
Hag fish <i>Eptatretus burgeri</i> Liver	HL116	apolipoprotein AI precursor	A26602	Sea lamprey <i>Petromyzon marinus</i>	55	25	32

1-3. Apolipoprotein 유전자 선발 및 염기서열 결정

EST 염기서열 분석과 library 검색을 통해 apolipoprotein 유전자와 유사성을 갖는 총 14개의 clone을 확보하였다 (Table 3). 이들 clone들의 염기서열 분석 및 유사성 확인 결과 미꾸라지 간 cDNA library에서 확보한 10개의 clone들 중 ML092를 제외한 나머지 9개의 clone들은 각각 염기서열에서 97~100%의 상동성을 보이면서 뱀장어, *Anguilla japonica*의 28kDa-2 apolipoprotein과 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*의 apolipoprotein AI-1 및 apolipoprotein AI-2, 그리고 잉어, *Cyprinus carpio*와 대서양 연어, *Salmo salar* 등의 apolipoprotein AI과 약 40~60%의 유사성을 나타내었다. 반면 이들과 다른 ML092 clone은 사람, *Homo sapiens*의 apolipoprotein A IV와 상동성을 나타내었다. 또한 두툽상어의 간 cDNA library에서 확보된 1개의 clone은 돼지, *Sus scrofa*의 apolipoprotein B와 유사성을, 그리고 나머지 1개와 뇌 DNA library에서의 1개의 clone은 Zebrafish, *Danio rerio*의 apolipoprotein E와 상동성을 나타내었다. 그 밖에 먹장어에서 확인된 1개의 clone은 Sea lamprey, *Petromyzon marinus*의 apolipoprotein AI과 낮은 수준에서 상동성을 나타내었다 (Fig. 1).

1-4. Apolipoprotein 유전자의 구조적 특성분석

Apolipoprotein 유전자 full clone의 확보를 위해 유연 관계가 가까운 잉어와 비교적 높은 상동성을 보이는 ML003 clone에 대해 forward와 reverse primer를 이용하여 cloning된 insert의 전체 염

기서열을 결정하였다. 확인된 미꾸라지 apolipoprotein 유전자는 1090 bp의 길이 중 762 bp가 254개의 amino acid를 coding하고 있었으며, 32 bp의 5' UTR 영역과 TAA stop codon으로부터 274 bp 뒤에 poly (A) signal sequence가 연이어 2개가 나타났으며 이로부터 8 bp 지나 poly (A) 서열이 확인되는 등 전사 종결점까지 293 bp의 3' UTR 영역이 확인되었다 (Fig. 2).

이들 염기서열로부터 유추된 254개의 아미노산 서열로 이루어진 apolipoprotein은 분자량이 약 29.3 KDa, pH 6.12 이었으며, 평균 hydrophobicity는 -0.500787로 특히 N-terminal 부위에서 높은 소수성 특성을 보였으며 (Fig. 3), SignalP를 이용한 서열 내 signal peptide의 유무 및 cleavage sites의 예측에서 N-MRFIALAVTVLLAGCQA의 17개 아미노산의 signal peptide와 17~18번째 아미노산 사이의 절단 부위 등이 확인되었다 (Fig. 4). 또한 PSORT와 TargetP 등의 프로그램을 이용한 apolipoprotein 단백질의 세포내 위치의 예측은 sorting signal에 의해 secretion되는 extracellular의 형태로 나타났다.

A.

ML003 225 LGQSVNDNLHGYFQHAFQGIAPFAGQFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQLEPKREELRAVIE 404
 Carp ApoA1 1 LGQSVNDNLHGYFQNGFOAITPIGDOVLEATKDTREKLVKDVEELRKKIEPMRAELRQVLE 60
 LGQSVNDNLHGYFQ+ FQ I P Q E E+ KD+E++RK++EP R ELR V+E

ML003 405 KHFEYSTELKPIVDEYLAKHDKEMAELKVKLEPVVESLKQKIPVNWEETKSKLLPILEI 584
 Carp ApoA1 61 KHLQEYRDELKPFVEEYLTQHOKFLEEMRIKLEPVVKSLEKFGPNWEETKSKLLPILEA 120
 KH QEY ELKP V+EYL KH K + E+++KLEPVV+SL++K NWEETKSKL+PILE

ML003 585 VRNKITAQVQDLKAQLEPYIQDYKDSVEKGALEFREKVRSGELRKKMDELG 737
 Carp ApoA1 121 VREKVAEHLQDLKKLLEPYMODYREQMEKGAQEFRRQSVKSGELRKKMDELG 171
 VR K+ +QDLK LEPY+QDY++ +EKA EFR+ V+SGELRKKM+ELG

B.

ML007 31 MRFIALAVTVLL-AGCQARFMQ---DAPPSQLEHVKSVLQVYADQLKQSAHKALNHLDDT 198
 Eel Apo 1 MKFVALALTVLLVAGSQARFLQADAPAPPSQLEHVRAAVGMYLQQVKETAQKALEHLLDDT 60
 M+F+ALA+TVLL AG QARF+Q APPSQLEHV++ + +Y Q+K++A KAL HLDDT

ML007 199 EFKDYKGLGQSVNDNLHGYFQHAFQGIAPF----AGQFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQLE 366
 Eel Apo 61 EYKDYKLRLSQSLDNIQGYIQSASAALSPYTDVSSQFMELTKDMRDKIQADVQDLKKDL 120
 E+KDYK L QS+DN+ GY Q A ++P+ + QF E+ ++ + D++ ++K L

ML007 367 EPKREELRAVIEKHFEYSTELKPIVDEYLAKHDKEMAELKVKLEPVVESLKQKIPVNWE 546
 Eel Apo 121 QPKRDELKEVQKHLEDEYRAKLEPLVKEYTEKHQEMEELKTKLQPVVEDLRARIQVNVE 180
 +PKR+EL+ V++KH EY +L+P+V EY KH +EM ELK KL+PVVE L+ +I VN E

ML007 547 ETKSKLLPILEIVRNKITAQVQDLKAQLEPYIQDYKDSVEKA 672
 Eel Apo 181 ETKSKLVPIVEAIRAKLTERLEELRTLAEPYVQYKDHLSA 222
 ETKSKL+PI+E +R K+T ++++L+ EPY+Q+YKD + +A

C.

ML049 33 MRFIALAVTVLLAGC-QARFMQDAPPSQLEHVKSVLQVYADQLKQSAHKALNHLDDTEFK 209
 RT ApoA1 1 MQFLALALTI LLAAATQAVPMQADAPSQLEHVKVAMMEYMAQVKETAQRSIDHLDDTEYK 60
 M+F+ALA+T+LLA QA MQ PSQLEHVK + Y Q+K++A ++++HLDDTE+K

ML049 210 DYKGLGQSVNDNLHGYFQHAFQGIAPFAG----QFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQLEPK 377
 RT ApoA1 61 EYKVQLSQSLDNLQQAQTASESLAPYSEAIGVQLTEATAAVRAEVMKDVEELRSQLEPK 120
 +YK L QS+DNL Y Q A + +AP++ Q E A + KD+E++R QLEPK

ML049 378 REELRAVIEKHFOEYSELKPIVDEYLAKHDKEMAELKVKLEPVVESLKQKIPVNWEETK 557
 RT ApoAI 121 RAELKEVLDKHIDEYRKRLLEPLIKDIVEQRRTELEAFRVKIEPVVEEMRAKVSANVEETK 180
 R EL+ V++KH EY L+P++ + + + E+ +VK+EPVVE ++ K+ N EETK

ML049 558 SKLLP ILEIVRNKITAQVQDLKAQLEPYIQDYKDSVEKAPWNSVRSPIRRTEEDGRTGS 737
 RT ApoAI 181 AKLMPIVETVRAKLTERLEELRTLASPYAEEYKEQMVKAVGEVREKVVPLTTDFKQQLGP 240
 +KL+PI+E VR K+T ++++L+ PY ++YK+ + KA + T + G+ G

ML049 738 GGQAHFELL*ALKVLIS 788
 RT ApoAI 241 AAEQAKEKLMALYETIS 257
 + E L AL IS

D.

ML092 31 VLVVLALAVFTGCQANLFYADEPKPQLEQLTDAFWSYVAKATHTAEETVQMIRNSQLGQD 210
 HuApoI-IV 6 VVLTLALVAVAGARA EV-----SADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLOKSEL TQO 57
 V++ LAL G +A + +Q+ W Y ++ ++ A+E V+ ++ S+L Q

ML092 211 VNARLTQSADMASEYAVTLKKHVDPLTEELMTKIKTKEAEVLRERLGQDLLSVR----- 369
 HuApoI-IV 58 LNALFQDKLGEVNTYAGDLQKKLVFPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHA 117
 +NA + YA L+K + P EL ++ K++E L+E +G++L +R

ML092 370 -----DKLEPYADNIKSQIQQRVEDLRTAMAPFADSLD-----SETLKA 486
 HuApoI-IV 118 NEVSQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQA 177
 +LEPYAD +++Q+ + E LR + P+A ++ +++L+A

ML092 487 TLLQKSEELRGSVESVKELKAQLEPYTADIKEKVDQHLQEFQKTVNPMAEELQPRC*ES 666
 HuApoI-IV 178 SLRPHADELKAKIDQNV EELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQ 237
 +L ++EL+ ++++V+ELK +L PY + K K+DQ ++E +++ P A++ Q +

ML092 667 KDGST 681
 HuApoI-IV 238 LEGLT 242
 +G T

E.

SB188 6 LGTQLGPYS D----RFNSDLEEASERLKH DHTAMRSMVMYTHDELNLMVNQNVDDVHRTL 173
 ZebraApoE 83 LQTQMTPTYASDAAGQLSKDLQLLAGKLQTDMDAKERSTQYLQELKTMMEQNADDVKNRV 142
 L TQ+ PY+ + + DL+ + +L+ D T + Y EL M+ QN DDV +

SB188 174 AXXXXXXXXXNRDQATIRNKFOEYSELLRSKKERTLSDFQAMVAPYTSSVSDKVQHSQ 353
 ZebraApoE 143 GTYTRKLLKRLNKDTEEIRNTVATYMSEMQSRASONADAVKDRFQPYMSQAQDGATQKLG 202
 N+D IRN Y ++S+ + + PY S D Q

SB188 354 NIQQSLAQQAEEVKS---KAAALQGHISENADDLRHSLRQKMEEISAWFESEAQQISER 521
 ZebraApoE 203 AISELMKAQAQEVSEQLVQAGALKEKLEETAENLRTSLEGRVDELTSLLAPYSQKIREQ 262
 I + + QA+EV +A AL+ + E A++LR SL +++E+++ +Q+I E+

SB188 522 FTGLLNLYSDSAHA 563
 ZebraApoE 263 LQEVMDKIKEATAA 276
 +++ + ++ A

F.

SL139 20 TASQYQKVKEATNKLKFKRAADKVANVDFEQKVTTLLDAISNLTQEYQSKLKDLEAAIKF 199
 ZebraApoB 2191 TTKSYQQWKDRAQSLYQKLLAQEDQGDFQGLRNKVFDSVIGVTQEYNNVTVKRAVDSLIKS 2250
 T YQ+ K+ L+++ + DF+ + D++ +TQEY +K +++ IK

SL139 200 LKYTKFQLPGLADQYTGOELYTMSINHGTQLFVKFDNIVKDHLENAVEYIRELEFNMMVPG 379
 ZebraApoB 2251 LKFTRFQLPGRARNYTGDELGNMVMTEVGEVLSQIYSKIHSGLEILLSYFQDLMEKSKLN 2310
 LK+T+FQLPG A YTG EL M + ++ + + + LE + Y ++L

SL139 380 NNSTIK-----ASEILSQLGGSLKQVLTQVLDVLTQM 475
 ZebraApoB 2311 KARKIKFTFDSVKYQLTDVVSEYGEQLKSLSQDVQKALS DL 2351
 IK ++++S+ G LK + V L+ +

G.

HL116 559 NAVTRIEMLIGEIRSSRMGELTKELAGETMKVMKPHLAALREHISQGIQEYTATE 395
 Lamprey 49 NVSMFEKKMVHGLQTSNIGHAKSLYTDTVAVLTPYLQKIRENVTKMYQVYVESK 103
 ApoI N + ++ +++S +GE K L +T+ V+ P+L +RE++++ Q Y ++

Figure 1. Blast search results of putatively identified clone.

```

1  GGCACGAGACCAGCTACATCAACAGATCCAGGATGAGGTTTATAGCTCTTGCAGTCACAG
      M R F I A L A V T V 10
61  TTCTGCTGGCAGGTTGCCAGGCACGTTTCATGCAGGATGCACCTCCATCGCAGCTGGAAC
      L L A G C Q A R F M Q D A P P S Q L E H 30
121 ATGTGAAGTCTGTTCTGCAGGTGTATGCAGATCAACTGAAACAATCTGCACACAAGGCC
      V K S V L Q V Y A D Q L K Q S A H K A L 50
181 TCAATCACCTCGATGACACAGAGTTCAAAGACTACAAAGGTTCTGGGCCAGTCCGTGG
      N H L D D T E F K D Y K G F L G Q S V D 70
241 ACAACCTCCATGGCTACTTTCAGCATGCCCTTCCAAGGCATTGCCCATTTGCCGGCCAGT
      N L H G Y F Q H A F Q G I A P F A G Q F 90
301 TCGCTGAAGTCTTGGCTCCAAAGATCGAGCAGTTCAAGAAGGATATGGAGGACATGCGCA
      A E V L A P K I E Q F K K D M E D M R K 110
361 AGCAGCTCGAAGCCCAAGCGAGAGGAGCTGAGGGCTGTATAGAGAAGCACTTTCAGGAGT
      Q L E P K R E E L R A V I E K H F Q E Y 130
421 ACAGCACTGAGCTCAAGCCCATCGTCGATGAGTACTTGGCCAAACACGACAAGGAAATGG
      S T E L K P I V D E Y L A K H D K E M A 150
481 CGGAGCTGAAGTCAAGCTGGAGCCTGTGGTAGAGAGCTTGAAGCAGAAAATTCCTGTTA
      E L K V K L E P V V E S L K Q K I P V N 170
541 ACTGGGAGGAGACCAAGTCCAAGCTGCTGCCATCTTGGAGATTGTGCGTAACAAGATTA
      W E E T K S K L L P I L E I V R N K I T 190
601 CTGCTCAGGTCAGGATCTGAAGGCCAGCTAGAGCCCTACATCCAGGACTATAAAGATT
      A Q V Q D L K A Q L E P Y I Q D Y K D S 210
661 AGTGGAGAAAGGCCCTCGAATTCCGTGAGAAAGTCCGATCCGAGAAAGGAGAAAA
      V E K G A L E F R E K V R S G E L R K K 230
721 AGATGGACGAAGTGGAGCGGAGGTCAAGCCCCACTTTGAGGCTATTTTGCAGCTCTCC
      M D E L G A E V K P H F E A I F A A L Q 250
781 AAAAGTCCTTTGAGTAAAGCAATCGCTTTTAAACATTCCCCTCTTTCTCTCTCCAC
      K S F E * 254
841 TTATACCCAATACGAAAACCTCAGCCTTTCTCAGAGAATACACCAGTCTGTCTTTCTTCT
901 AGAGTACACTTCATATGCACTTTTACCAAACCACTAACTTATGGACTTTAATCTTATG
961 ATCAACAGAGATATAAATGAGAACACAATTCGGTTTAAAGTTTACAGAAATTTCTTAG
1021 CAAAATCCTTTGTTAAATGCTTTTTTTGGTAAAAATTGATTGCAATGTTAAATAAAATA
1081 AAAACTGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figure 2. Complete nucleotide sequence of the mud loach apolipoprotein cDNA. The deduced amino acid sequences are shown with a single letter code below the corresponding codons. Numbering of the nucleotide and amino acid sequences are given at the left and right. The translational start codon (ATG), termination codon (TAA), and polyadenylational signal sequence are shown in boldface letters.

미꾸라지의 apolipoprotein 아미노산 서열을 현재 알려진 어류들과 포유류의 생쥐와 사람의 것과 서열 다중 배열 분석 결과, 유연 관계가 가까운 잉어와 60%를 비롯하여 다른 어류들과는 34~43%의 상동성을 그리고 사람과는 불과 16%의 낮은 서열 상동성을 나타내었으며 (Fig. 5, Table 4), 이들 서열 상동성에 기초한 계통도에서는 종간의 유연 관계가 잘 나타났다 (Fig. 6). 그러나 이들 단백질의 3차 구조의 예측에서는 서로 낮은 상동성에도 불구하고 구조가 매우 유사한 것으로 나타났다 (Fig. 7).

2. 미꾸라지 apolipoprotein 유전자 이식용 벡터개발

2-1. 어류 프로모터 확보 및 기능성 평가

Table 5에서 보듯이 plasmid 형태에 따른 유전자의 발현율은 동일한 유전자간에는 circular form의 경우 18.25 pg/mg 단백질 그리고 linear form의 경우 18.39 pg/mg 단백질로 차이를 보이지 않았다. 또한 RSVCAT의 경우에는 circular form은 13.14 pg/mg 단백질 그리고 linear form의 경우 13.84 pg/mg 단백질로 역시 차이를 보이지 않았다. 그러나 promoter의 종류에 따라 발현율의 차이를 보여 FV4 promoter가 RSV보다는 약 25% 정도 더 발현율이 높은 것으로 나타났다.

2-2. Apolipoprotein 유전자 발현용 벡터 개발

발현 벡터의 제조를 위한 apolipoprotein 유전자는 EST 결과 전

체 염기서열을 포함하는 ML003 clone으로부터 확보하였으며, 발현 벡터의 promoter 영역으로는 잉어 β -actin 유전자의 조절부위를 포함하는 pFV4a 벡터를 이용하였다. ML003 plasmid와 pFV4a plasmid의 제한효소 NotI과 XhoI 절단으로 1.2 Kb의 apolipo-protein 유전자 단편과 pFV4a 벡터를 회수하여 ligation시킴으로 재조합 발현벡터를 제조하였다 (Fig. 8).

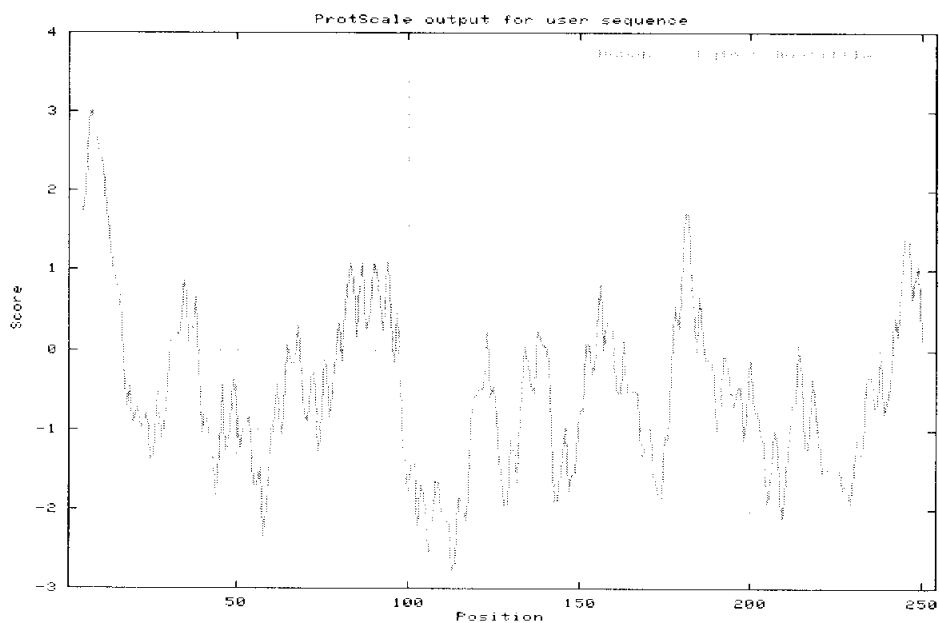
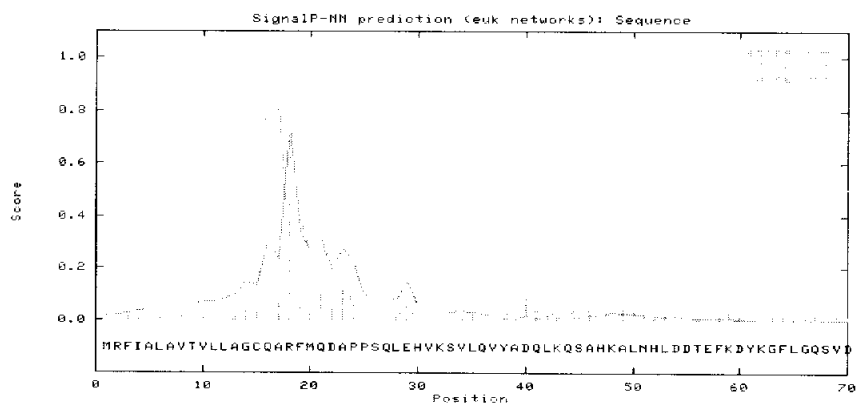


Figure 3. Hydropathicity profile of apolipoprotein genes. Hydropathy scores were calculated by amino acid scale value of Kyte and Doolittle (1984) using a setting 9 residues.

a



b

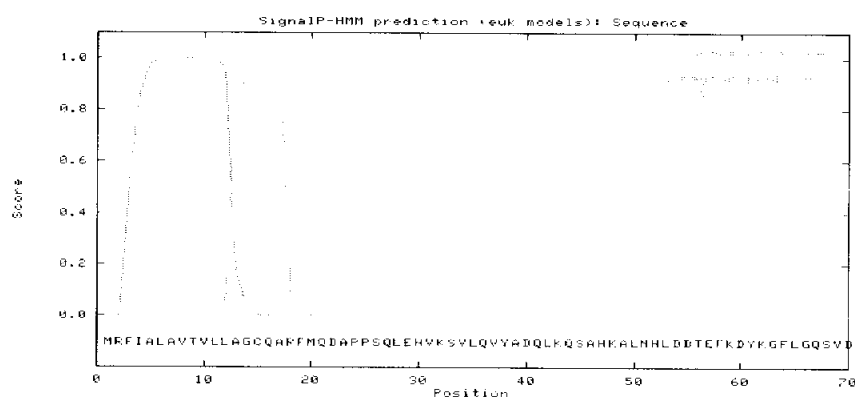


Figure 4. Prediction of signal peptide cleavage sites in apolipoprotein amino acid sequences. Both of Signal-NN prediction (A) and Signal-HMM (B) are predicts the presence and location of signal peptide cleavage sites. C-score, raw cleavage site score; S-score, signal peptide score; Y-score, combined cleavage site score.

Mud loach	MRFIALAVTVLLAG-CQARFMDADAPS---QLEHVKSVLQVYADQLKQSAHKALNHLDDT
Carp	-----
Rainbow trout	MKFLALALTILLAAGTQAFPMQADAPS---QLEHVKAALSMYIAQVKLTAQRSIDLDDT
Atlantic Salmon	MKFLVLALTILLAAGTQAFPMQADAPS---QLEHVKAALNMYIAQVKLTAQRSIDLDDT
Zebra fish	MKFVALALTLLLALGSQANLFQADAPT---QLEHYKAAALVYLNQVKDQAEKALDNLGT
Eel	MKFVALALTVLLVAGSQARFLQADAPAPPSQLEHVRAAVGMYLQQVKETAQKALEHLDDT
Sea bream	MKFAALALALLAVGSHAASMQADAPS---QLDHARAVLDVYLTQVKDMSLRVNLDDP
Human	MKA AVLTLAVLFLTGSQARHFQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGS
Mouse	MKAVVLAVALVFLTGSQAWHVWQQDEP-QSQWDKVKDFANVYDAVKDSGRDYVSQFESS

Mud loach	EF-KDYKGLGQSDNLHGYPQHAFOGAP----FAGQFAEVLAPKIEQFKKDMEDMRKQ
Carp	-----LGQSDNLHGYPONGFOAITP----IGDQVLEATKDTREKLVKDVEELRKK
Rainbow trout	EY-KEYKMQLTQSLDNLQQYADATSQSLAPYSEAFGTQLTDATAAVRAEVMKDVEELRSQ
Atlantic Salmon	EY-KEYKMQLSQSLDNLQQFADSTSKSWPPTPRSS-APSCDATATVRAEVMKDVEDVRTQ
Zebra fish	DY-EQYKLQSLSESLTKLOEYAQTTSQALTPYAEITSTQLMENTKQLRERVMTDVEDLRSK
Eel	EY-KDYKLRLSQSLDNLQGYIQSASAALSPYTDVSSQFMELTKDMRDKIQADVQLKKD
Sea bream	QY-AEFKTNLAQRIEEMYTIKTLQGSVSPMTDSFYNTVMEVTKDTRESLNVDLKALSS
Human	ALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAK
Mouse	SLGQQLNLNLLDNWDTLGSTVSQQLERLGPLTRDFWDNLEKETDWRQEMNKDLEEVKQK

Mud loach	LEPKREELRAVIEKHFQEYSTEKPIVDEYLAKHDKEMAELVKLEPVVESLKQKIPVNW
Carp	IEPMRAELRQVLEKHLQEYRDELKPFVEEYLTKHQKFL EEMRIKLEPVVKSLEKFGPNW
Rainbow trout	LEPKRAELKEVLDKHIDEYRKKLEPLIKEHIELRRTEMAFRAKMEPIVEELRAKVAINV
Atlantic Salmon	LEPKRAELTEVLNKHIDEYRKKLEPLIKQHIELRRTEMDAFRAKIDPVVEEMRAKVAVNV
Zebra fish	LEPHRAELYTALQKHIDEYREKLEPVFQEYSALNRQNAEQLRAKLEPLMDDIRKAFESNI
Eel	LQPKRDELKEVVQKHLDEYRAKLEPLVKEYTEKHQKQEMEELKTKLQPVVEDLRARIQVNV
Sea bream	LAPQNEQLKQVIEKHLNDYRTLLTPIYNDYKTKHDEEMAALKTRLEPVMEELRTKIQANV
Human	VQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELOEGARQKLHELGEKLSPLGEEMRDRARAHV
Mouse	VQPYLDEFQKKWKEDVELYRQKVGPL-AELQESARQKLQELQGLSPVAEEFRDRMRTHV

Mud loach	EETKSKLLP ILE I VRNK I TAQVODLKAQLEPY I QDYKDSVEKGALEFREKVR--SGELRK
Carp	EETKSKLMP ILEAVREKVAEHLQDLKKLLEPYMODYREQMEKGAQEFROSVK--SGELRK
Rainbow trout	EETKTKLMP IVE I VRAKLTERLEELRTLAAPYAEEYKEQM I KAVGEVREKVSPLSEDFKG
Atlantic Salmon	EETKTKLMP IVE I VRAKLTERLEELRTLAAPYAEEYKEQMFKAVGEVREKVAPLSEDFKA
Zebra fish	EETKSKVPMVEAVRTKLTTERLEDLRTMAAPYAEEYKEQLVKAVEEAREK I APHTODLOT
Eel	EETKSKLVP IVE I RAKLTERLEELRTLAEPPVQEQYKDHLSEALTDVKDKVQ--GEDLQS
Sea bream	EETKAVLMPMVETVRTKVTERLESREVVPYVQEQYKEQMKQMYDQAQTVD---DALRT
Human	DALRTHLAPYSDELRLQRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQ
Mouse	DSLRTQLAPHSEQMRESLAQRLAELKSN--PTLNEYHTRAKTHLKTGKARPALEDLRH
Mud loach	KMDELGAEVKPHFEA I FAALQKSFE--
Carp	KMNELGRRR-----
Rainbow trout	QVGPAAEQAKQKLLAFYET I SOAMKA-
Atlantic Salmon	RWAPPPRRPSKSSWLSTRPSARP----
Zebra fish	RMEPYMENVRTTFAQMYET I AKA I QA-
Eel	KLKPYAEELKTKLVALWESLSQPKAS-
Sea bream	KITPLVEE I KVKMNA I FE I I AASVTKS
Human	GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ
Mouse	SLMPMLETLKTKAQSV I DKASETLTAQ

Figure 5. Alignment of amino acid sequences of the apolipoproteins.

Table 4. Sequence homology of the mud loach apolipoprotein at the amino acid levels

Species	Mud loach 254 aa	Common carp 174 aa	Zebra fish 262 aa	Eel 263 aa	Rainbow trout 262 aa	Atlantic salmon 258 aa	Sea bream 260 aa	Human 267 aa	Mouse 263 aa
Mud loach	100	60	34	43	39	37	35	16	17
Common carp		-	39	41	41	37	37	23	20
Zebra fish			-	47	55	49	37	23	20
Eel				-	53	47	42	25	22
Rainbow trout					-	78	39	23	23
Atlantic salmon						-	35	22	21
Sea bream							-	19	20
Human								-	62
Mouse									-

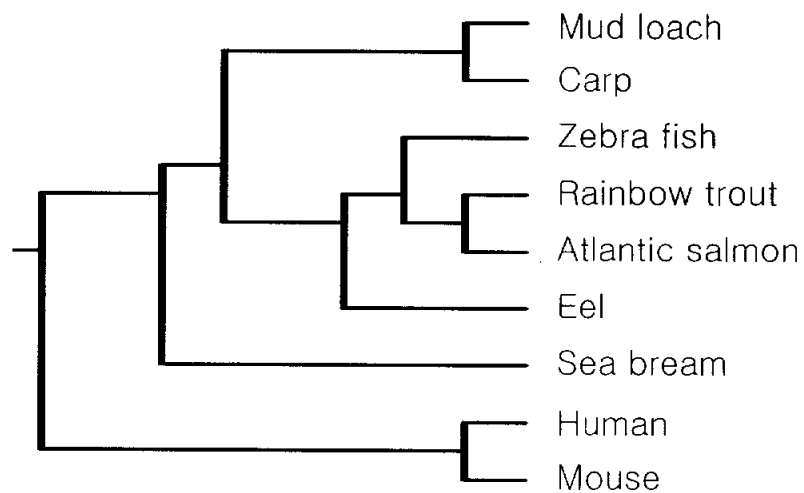


Figure 6. Phylogenetic tree of apolipoprotein based on amino acid sequences. Distances between amino acid sequences were estimated using PRODIST. The distance matrix was analyzed using the Neighbor-Joining method of NEIGHBOR. Lines are proportional to the estimated branch lengths.

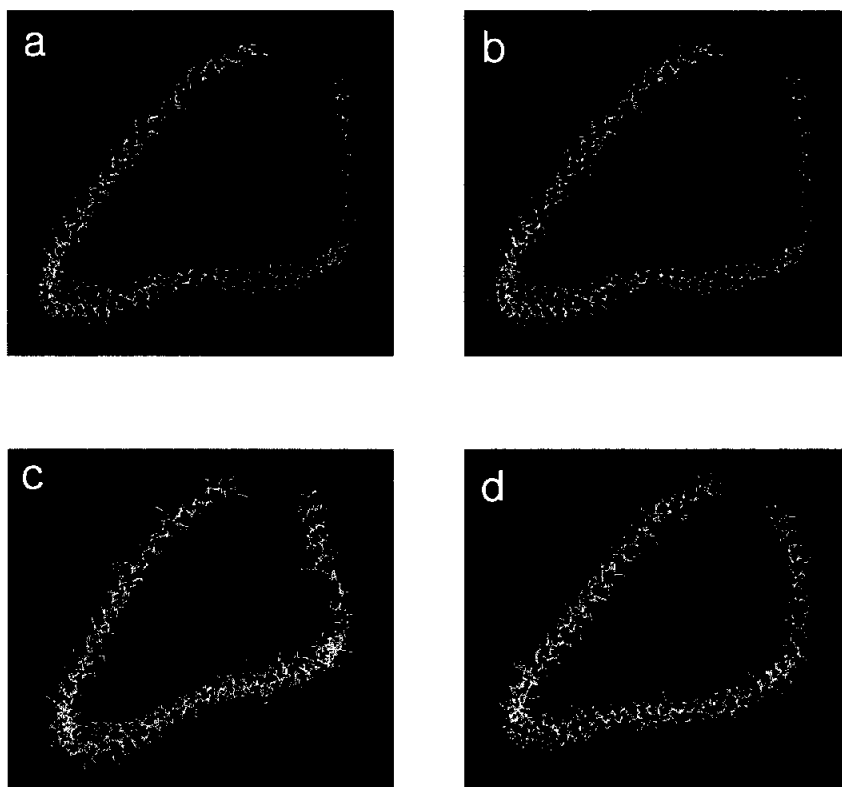


Figure 7. Tertiary structure of apolipoprotein reconstructed by automated protein structure homology-modeling server, SWISS-MODEL. a. mud loach; b. zebra fish; c. rainbow trout; d. mouse

Table 5. Comparison of plasmid form on gene expression following intramuscular injection in mud loach

Plasmid form	Gene	No. of fish examined	CAT expression (pg/mg protein)
Circular	FV4CAT	5	18.25±1.48 ^a
	RSVCAT	5	13.14±1.26 ^b
Linear	FV4CAT	5	18.39±1.54 ^a
	RSVCAT	5	13.84±1.39 ^b

The expression was assayed by ELISA.

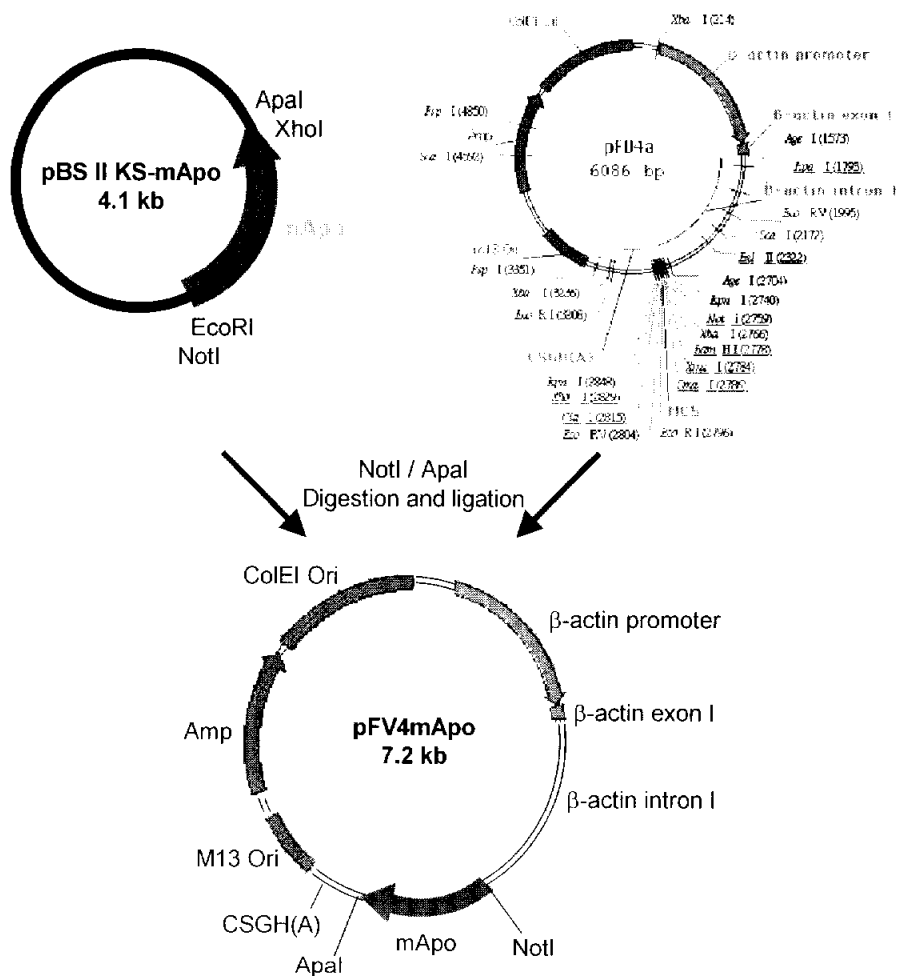


Figure 8. The pFV4mApo construct used for microinjection.

3. Apolipoprotein 유전자 발현 유무 확인을 위한 형질전환 어류 생산

3-1. Microinjection을 통한 유전자 이식

3-1-1. Microinjection의 최적 조건 조사

다양한 microinjection 방법에 따른 생존율과 부화율을 Table 6에 나타내었다. Table 6에서 보듯이 유전자를 microinjection하지 않은 군의 초기 상실배와 생존율은 98%이었고 부화율은 86% 그리고 초기생존율은 76%로 나타났다. 그러나 주입하는 DNA 농도를 $10\sim40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 주사했을 때, 그의 상실배의 생존율과 부화율이 농도의 증가에 따라 크게 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 부화된 자어의 난황 흡수시까지 생존율은 각 실험군간 큰 차이가 없었다.

Microinjection에 사용된 needle은 직경을 5 및 $10\ \mu\text{m}$ 로 하여 미꾸라지 난에 주사한 결과 역시 구경의 크기가 커지면 생존율이 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 DNA의 형태에 따른 미꾸라지 수정난의 생존율은 두 형간 큰 차이가 없었다.

3-1-2. 최적 microinjection 조건에 의한 유전자 이식

상기 연구에서 나타난 가장 효율적 microinjection 조건인 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DNA 농도로 $5\ \mu\text{m}$ 구경의 capillary를 사용 circular 와 linear DNA를 섞어 3쌍의 각각 암수로부터 수정된 미꾸라지 수정난에 microinjection 한 결과 유전자 이식율은 Table 7에서 보는 바와 같이 22~41%로 나타났고 평균 33.3%로 나타났다.

3-2. Southern blot에 의한 유전자 삽입구도 분석

Southern blot에 의해 이식된 유전자의 삽입 형태를 조사한 결과는 Fig. 9와 같이 나타났다. Southern blot에 의해 분석된 81마리 중 27마리가 southern positive pattern으로 나타났고 그들의 삽입 형태를 분류한 결과 Fig. 9.에서 보듯이 11 type의 Southern pattern을 나타내었다. 이들 11 type의 어류들은 모두 high molecular weight 부위에 band를 가지고 있었고, 대체로 1~2 copy가 핵내 DNA에 삽입된 형태였다.

3-3. 유전자 발현 유무 분석

60마리의 대조군 어류와 형질전환어류 (TG) 중 분석시 까지 살아남은 13마리의 Fo 어류를 대상으로 T-CHO를 분석한 결과 control group의 T-CHO reading value는 190 정도 나타났다. 그러나 TG Fo군에 있어서는 128~445로 나타나 개체에 따라 다양성을 보여주었다. 가장 많은 T-CHO 치를 보인 개체는 대조군 어류에 비해 약 2.3배의 발현율을 나타내었다 (Table 8).

HDL-CHO의 분석결과에 있어서도 대조군은 10분간 incubation 시 120 정도의 수치를 나타내었으나 TG group의 경우 94~261로 나타나 HDL 농도도 개체에 따라 최대 2.2배까지 증가되는 경향을 보였다(Table 9).

Table 10은 TG Fo 어류의 개체간 T-CHO와 HDL-CHO 양의 분석에 따른 각 개체간 Apo AI 유전자의 발현정도를 보여주고 있다. Table 10에서 보듯이 대조군보다 두 수치가 모두 낮은 개체 (TG 1), 대조군보다 두 수치가 모두 약간 높은 개체 (TG 2, 3, 5 & 7) 그리고 둘 중 한 개의 수치만 높은 개체 (TG 4, 6, 8, 9, 10 & 12) 그리고 두 개의 수치가 모두 높은 개체 (TG 11, 13)으로 나눌 수 있었다.

Table 6. Factors affecting the viability of mud loach embryos subjected to various conditions of microinjection

Factors	% viable embryo at morula stage	Hatching success (%)	Early survival up to yolk sac absorption (%)
Non-injected control	78	86	76
<i>DNA concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)</i>			
10	62	42	84
20	57	26	86
40	42	20	80
<i>Diameter of capillary (μm)</i>			
5	65	45	79
10	51	39	81
<i>DNA form</i>			
linear	64	45	88
circular	67	39	89

Average value of at least 3 observations.

Table 7. Incidence of transgene in the hatched larvae developed from the eggs microinjected either with pmlectGH (for mud loach), pca β -actfGH (for flounder), pca β -actGH (for carp) or pHx β -actGH (for greenling)

Species	Incidence of transgene (%)			Average (%)
	Trial I	Trial II	Trial III	
Mud loach	22	41	37	33.3±10.01

Each transgene was detected with Southern blot analysis using randomly chosen 27 fish. Data indicate the presence of transgene in the fish as both integrated and extrachromosomal forms.

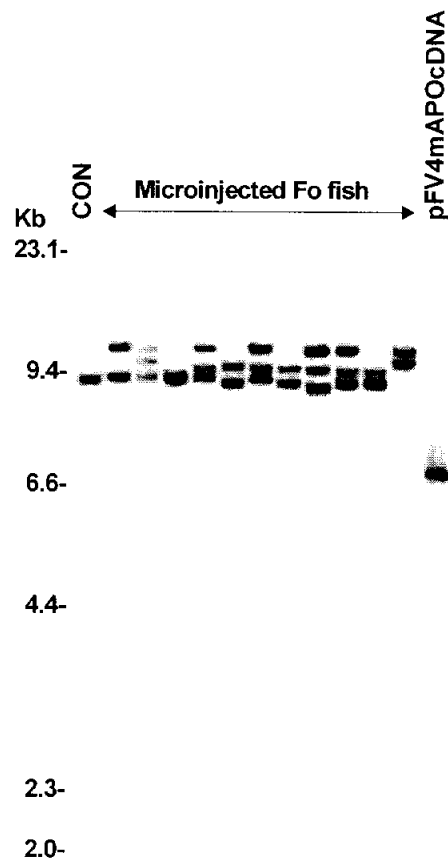


Figure 9. Representative Southern blot of transgenic Fo fish developed from the embryos injected with pFV4mApocDNA. DNA was digested with *DraII*, separated onto 0.8% agarose gel, and probed with DIG-labeled mud loach apolipoprotein cDNA. CON, non-injected control fish. Figures in left panel are molecular weight sizes determined by λ /HindIII DNA marker.

Table 8. Serum level of total CHO (arbitrary reading value at 490 nm) in transgenic and non-transgenic mud loach. Each reading value is average of triplicate examinations

Exp. group	Incubation time	
	5 min	10 min
Control-1	234	221
Control-2	233	218
Control-3	197	210
Control-4	195	197
Control-5	175	182
Control-6	120	138
Mean±SD	192±43	194±31
Transgenic-1	120	128
Transgenic-2*	262	277
Transgenic-3*	268	271
Transgenic-4	224	230
Transgenic-5*	272	296
Transgenic-6	199	208
Transgenic-7*	259	266
Transgenic-8	183	174
Transgenic-9	223	221
Transgenic-10*	345	368
Transgenic-11*	349	370
Transgenic-12*	299	326
Transgenic-13*	392	445

* Labels might be individuals showing significantly higher level of total CHO by over-expression of transgene.

Table 9. Serum level of HDL-CHO (arbitrary reading value at 655 nm) in transgenic and non-transgenic mud loach. Each reading value is average of triplicate examinations

Exp. group	Incubation time	
	5 min	10 min
Control-1	108	119
Control-2	102	124
Control-3	121	137
Control-4	115	125
Control-5	93	98
Control-6	118	126
Mean±SD	110±11	121±13
Transgenic-1	97	94
Transgenic-2*	209	213
Transgenic-3*	141	166
Transgenic-4*	174	180
Transgenic-5*	131	175
Transgenic-6*	184	195
Transgenic-7*	191	188
Transgenic-8*	174	181
Transgenic-9*	209	234
Transgenic-10*	162	189
Transgenic-11*	210	239
Transgenic-12*	207	240
Transgenic-13*	218	261

* Labels might be individuals showing significantly higher level of HDL-CHO by over-expression of transgene.

Table 10. Brief summary of transgenic lines containing pFV4m APOcDNA

Line	Relative fold (%) to control at 10 min incubation		Summary
	T-CHO	HDL-CHO	
Transgenic-1	66	77	· Contain the transgene, but not express the transgenic mAPOI cDNA
Transgenic-2	143	176	· Moderate increases in both · total CHO ↑ < HDL-CHO ↑
Transgenic-3	140	137	· Moderate increases in both · total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-4	118	148	· Moderate increase only in HDL-CHO
Transgenic-5	153	144	· Moderate increases in both · total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-6	107	161	· Moderate increase only in HDL-CHO
Transgenic-7	137	155	· Moderate increases in both · total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-8	90	149	· Moderate increase only in HDL-CHO
Transgenic-9	114	193	· Significant increase in only HDL-CHO
Transgenic-10	190	156	· Significant increase in total CHO · Moderate increase in HDL-CHO · total CHO ↑ > HDL-CHO ↑
Transgenic-11	191	197	· Significant increases in both · total CHO ↑ = HDL-CHO ↑
Transgenic-12	168	198	· Moderate increase in total CHO · Significant increase in HDL-CHO · total CHO ↑ < HDL-CHO ↑
Transgenic-13	229	215	· Significant increases in both · total CHO ↑ = HDL-CHO ↑

3-4. Stable line 확보를 위한 F₁ 생산

3-4-1. 대조군과 교배 F₁ 생산

형질전환 Fo 어류 중 T-CHO와 HDL-CHO 중 특히 HDL-CHO의 발현농도가 모두 높았던 TG 6과 TG 9의 정자를 대조군 암컷과 수정시킨 후 그의 부화율과 초기 생존율은 Table 11과 같이 나타났다. Table 11에서 보듯이 암컷의 난질에 따른 부화율의 차이는 관찰되었으나 부화된 개체의 초기 생존율이나 TG Fo 어류에 따른 부화율, 초기 생존율의 차이는 나타나지 않았다.

3-4-2. F₁의 발현 양상

TG 6 및 TG 9로부터 얻어진 20마리의 물고기의 혈중 T-CHO 및 HDL-CHO 농도로 그들의 발현 양상을 분석한 결과는 Table 12와 같다.

TG 6 F₁ 어류의 경우 분석된 20마리 중 14마리에서 T-CHO와 HDL-CHO의 농도가 유의하게 증가함이 관찰되었고 그 범위는 T-CHO의 경우 354~532 mg/dl 혈청이었다. HDL-CHO의 경우 arbitrary value가 279~508로 나타나 대조군에 비해 1.4~2.2배 증가되는 것으로 나타났다.

TG 13 F₁ 어류의 경우에는 17마리에서 모든 분석치의 증가를 보여 85%의 빈도로 TG 어류가 존재하는 것으로 나타났으며 T-CHO의 증가치와 HDL-CHO의 증가치 모두에서 TG 6 F₁ 어류 수치보다 약간 높은 경향을 보여 TG 9의 F₁ fish의 Apo-AI 유전자 발현율이 TG 6보다 약간 높은 것으로 나타났다.

Table 11. Hatching rate and early survival of two different F₁ transgenic lines

Female No.	Male No. (TG)	Hatching rate (%)	Early survival (%)
1	TG 6	83.5	85.9
	TG 9	81.4	88.8
2	TG 6	75.6	87.5
	TG 9	77.4	86.4

Table 12. Germ line transmission and expression of apolipoprotein activity determined by blood concentration of T-CHO and HDL-CHO

TG fish number	Incidence of TG fish (%)	Range of T-CHO (mg/dl)	Range of HDL-CHO (arbitrary unit)
6	TG 14/20 (70)	354 ~ 532	279 ~ 508
	NTG 6/20 (30)	292 ~ 324	203 ~ 246
9	TG 17/20 (85)	407 ~ 518	340 ~ 682
	NTG 3/20 (15)	240 ~ 361	195 ~ 279

4. Cholesterol 및 fenofibrate 첨가사료 공급에 의한 형질전환 어류의 cholesterol 농도 변화

4-1. 비계첨가 사료 공급에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

4일간 대조군 사료를 먹인 개체들의 T-CHO의 혈중 농도는 236.5이었다. 그러나 5% 돼지비계를 4일간 공급한 실험군의 혈중 T-CHO의 농도는 78%가 증가된 301.0으로 나타나 유의한 증가를 보였다. 이는 미꾸라지의 경우에 있어서도 cholesterol의 농도가 증가된 사료를 공급하면 혈중 CHO가 증가된다는 결과를 말해준다. 그러나 10%의 돼지비계를 공급한 군의 경우 사육시 관찰 결과 먹이 섭취가 지극히 저조하였고, 혈중 T-CHO 농도를 측정된 결과 대조군과 별 차이가 없이 나타났다 (Fig. 10).

4-2. Cholesterol 농도 및 처리 기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

4-2-1. 대조군 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 나타나는 농도 및 처리 시간에 따른 변화

상기의 예비 실험 결과를 바탕으로 cholesterol을 사료에 다양한 농도로 섞어 6일간 대조군에 공급한 결과 처리 기간에 따라 T-CHO와 HDL-CHO에서 모두 유의한 증가를 보였다. T-CHO 분석결과 대조군의 경우 처리기간이 증가함에 따라 유의한 증가가 관찰되지 않았으나 1~4% CHO 공급군은 모두 처리기간에 따라 유의한 증가를 보였고 특히 4% 처리군의 경우에는 공급 2일째부터 유의한 차이를 보여 공급 6일째에는 대조군에 비해 거의 1.6배인 433 mg/dl의 T-CHO 농도를 보였다 (Fig. 11~14). 혈중

HDL-CHO의 경우에 있어서도 T-CHO와 유사한 경향을 보였다. 즉 대조군은 실험 기간동안 동일한 HDL-CHO의 혈중 농도 값을 보여 주었으나 여타 처리군에 있어서는 농도에 따라 뚜렷한 HDL-CHO 양의 증가를 보여 주었다. 특히 T-CHO의 경우와 마찬가지로 4%, 6일 처리군은 대조군에 비해 2.39배인 251 mg/dl의 혈중농도를 보여 미꾸라지에 있어 cholesterol 양이 높은 사료를 공급할 때 혈중 T-CHO 및 HDL-CHO의 양이 모두 증가된다는 것을 알 수 있었다.

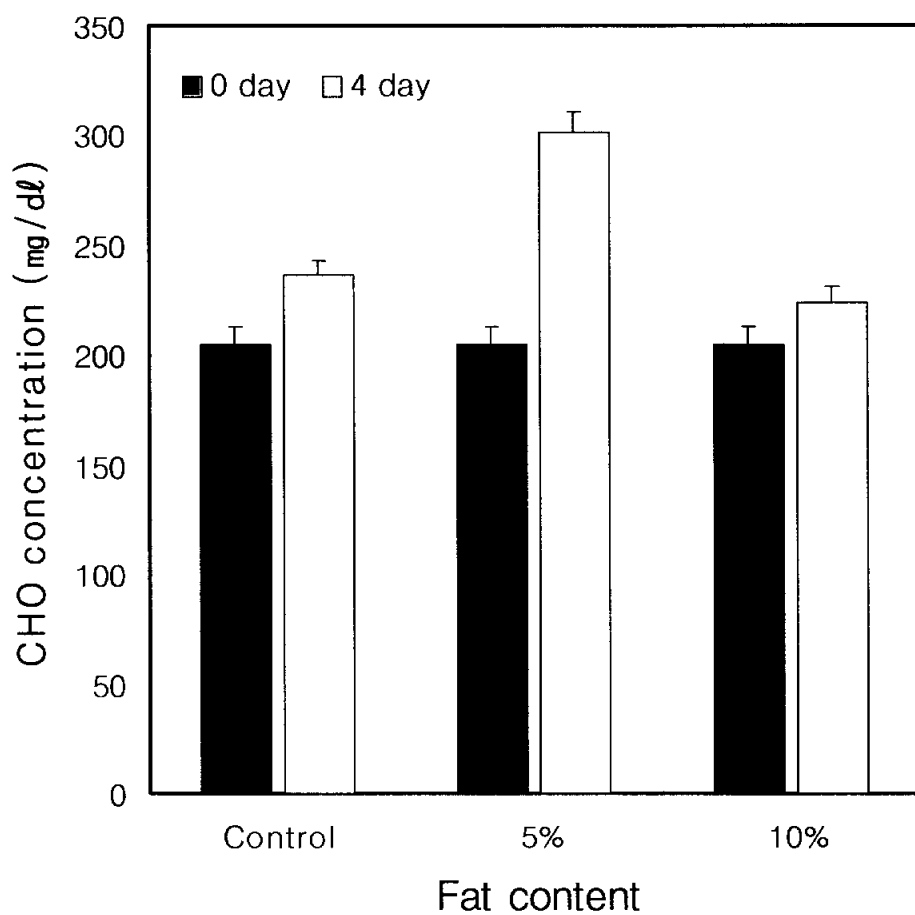


Figure 10. Plasma T-CHO level of control mud loach fed with the diet contained hog fat for 4 days.

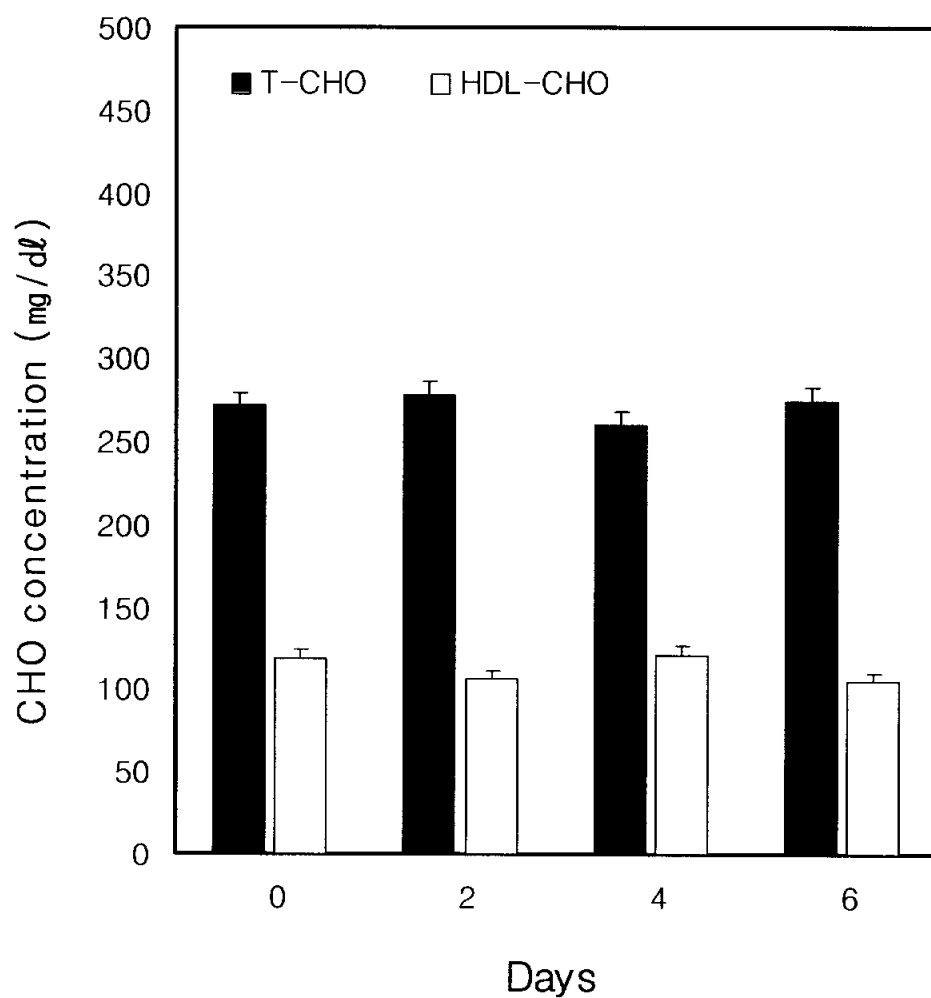


Figure 11. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of control mud loach fed the control diet for 6 days.

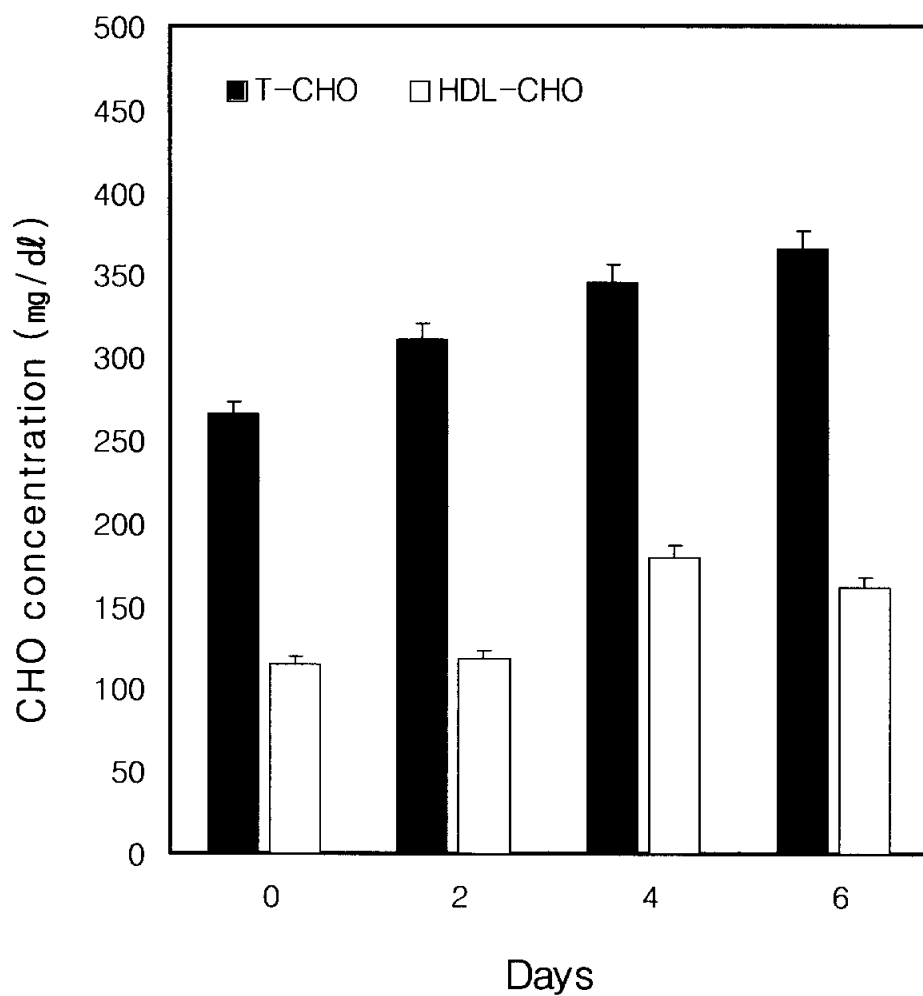


Figure 12. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach fed 1% cholesterol diet for 6 days.

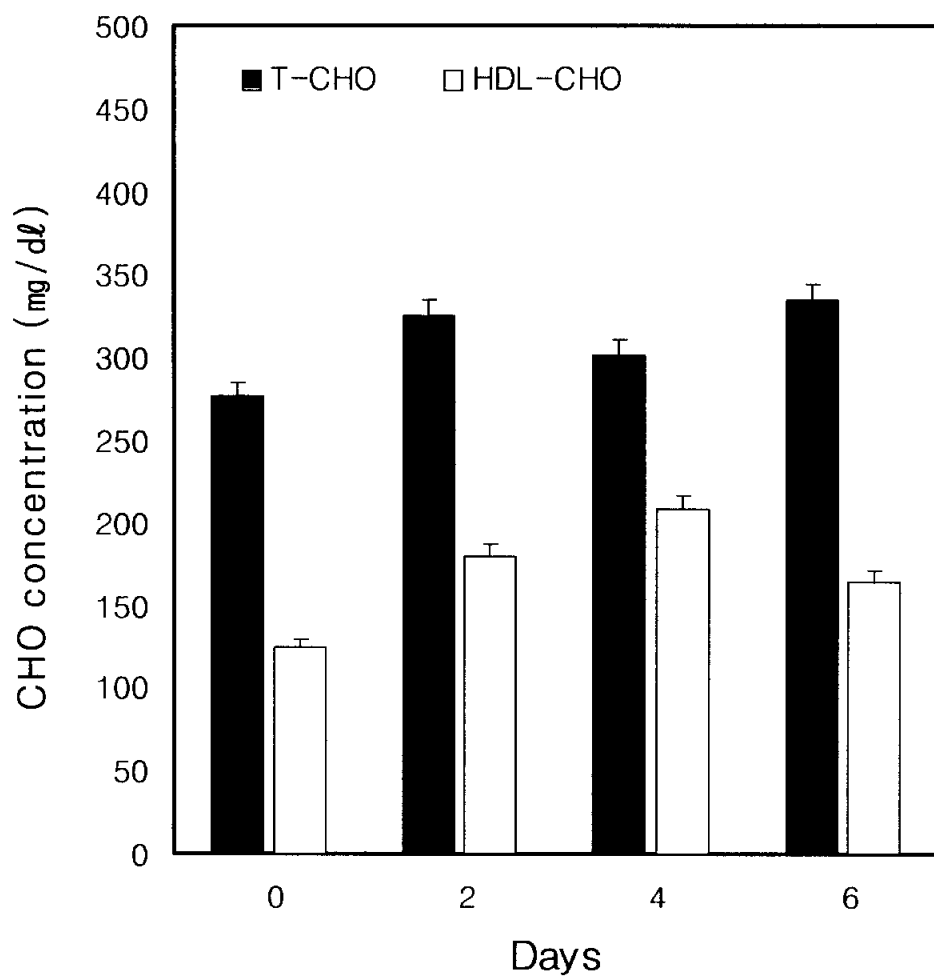


Figure 13. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach fed 2% cholesterol diet for 6 days.

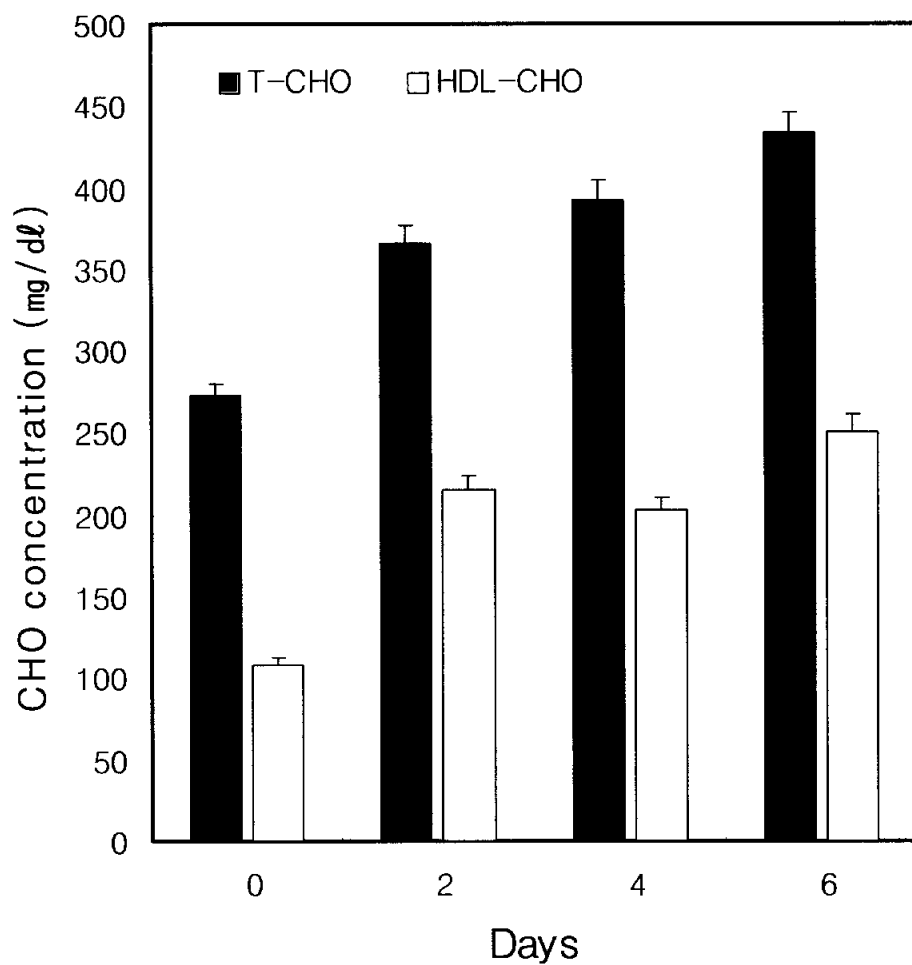


Figure 14. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach fed 4% cholesterol diet for 6 days.

4-2-2. 형질전환 미꾸라지에서 cholesterol 사료 공급시 T-CHO와 HDL-CHO의 농도 변화

상기 실험에서 4%의 CHO 처리가 대조군 미꾸라지의 T-CHO 및 HDL-CHO가 증가된다는 것이 밝혀졌으므로 이 실험에서는 trans- genic (TG) fish의 혈중내 T-CHO와 HDL-CHO의 농도를 분석하였다. 그결과 CHO 무첨가 사료 공급군 (control 1)은 실험 4-1의 결과와 마찬가지로 실험기간 중 전혀 변화가 없었다. 또한 4% 공급 대조군의 결과도 상기실험 4-1의 경과와 마찬가지로 T-CHO 및 HDL-CHO의 농도가 모두 처리기간에 따라 증가되는 향상을 보였다. 그러나 TG 6 및 TG 9의 형질전환 어류군은 T-CHO의 경우 약간 증가하는 경향을 보였으나 control 2에 비해 그리 큰 증가는 아니었다. 그러나 HDL-CHO의 경우 처리 4일자에는 TG 6 군은 1.3배 및 TG 9군은 1.7배가 대조군에 비해 증가되는 경향을 보였고 처리 6일 후에 TG 6군은 무려 1.8배, TG 9군은 2.3배가 증가되는 경향을 보여 주었다 (Fig. 15~18).

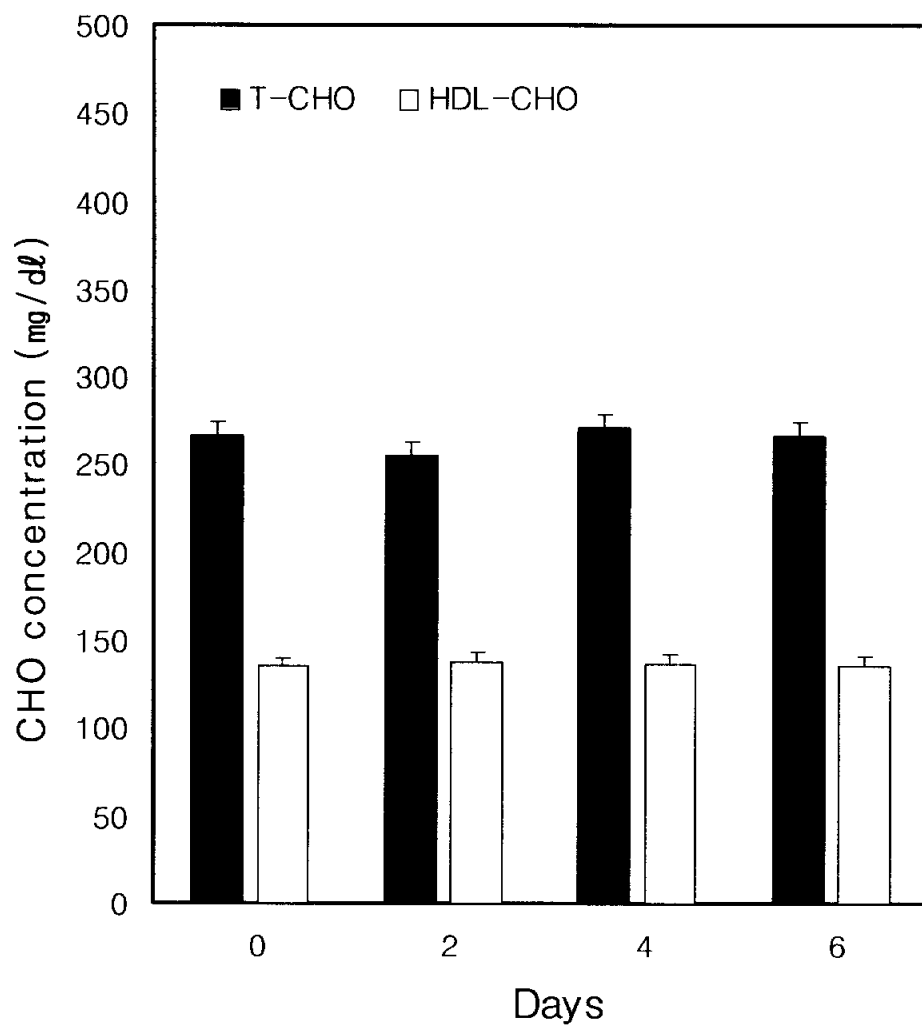


Figure 15. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of non-transgenic mud loach fed the 0% cholesterol diet for 6 days.

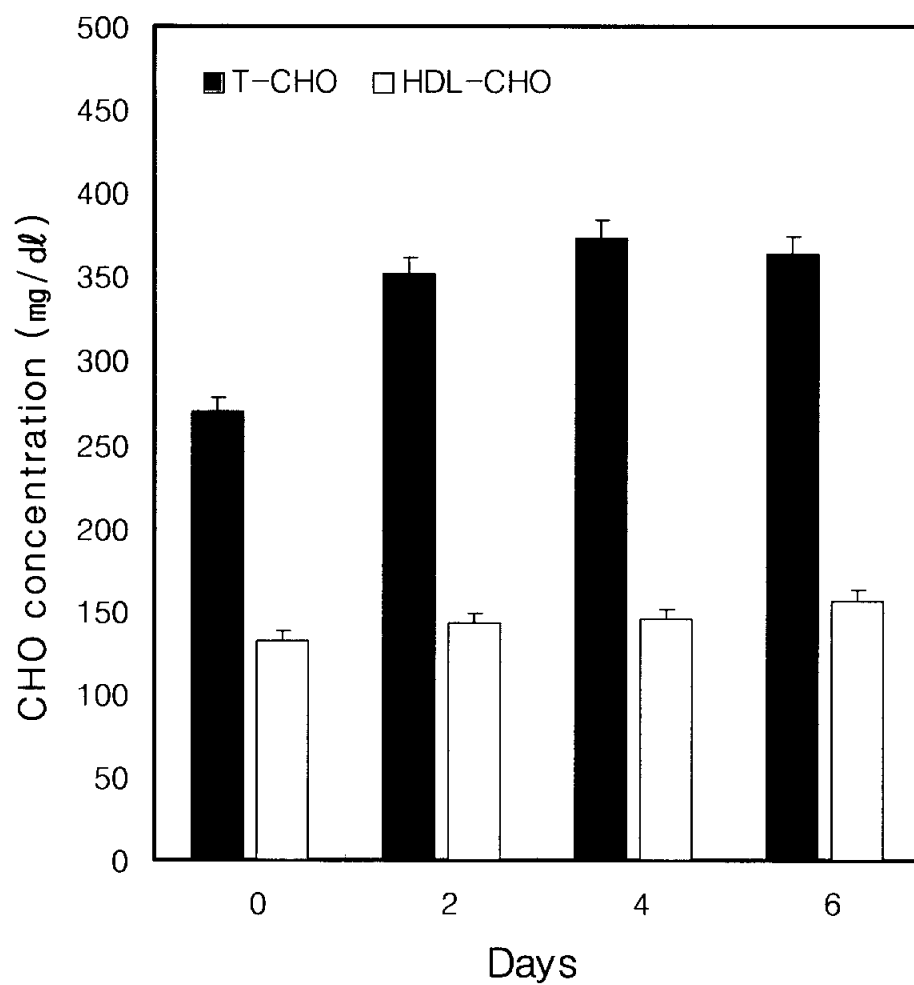


Figure 16. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of non-transgenic mud loach fed the 4% cholesterol diet for 6 days.

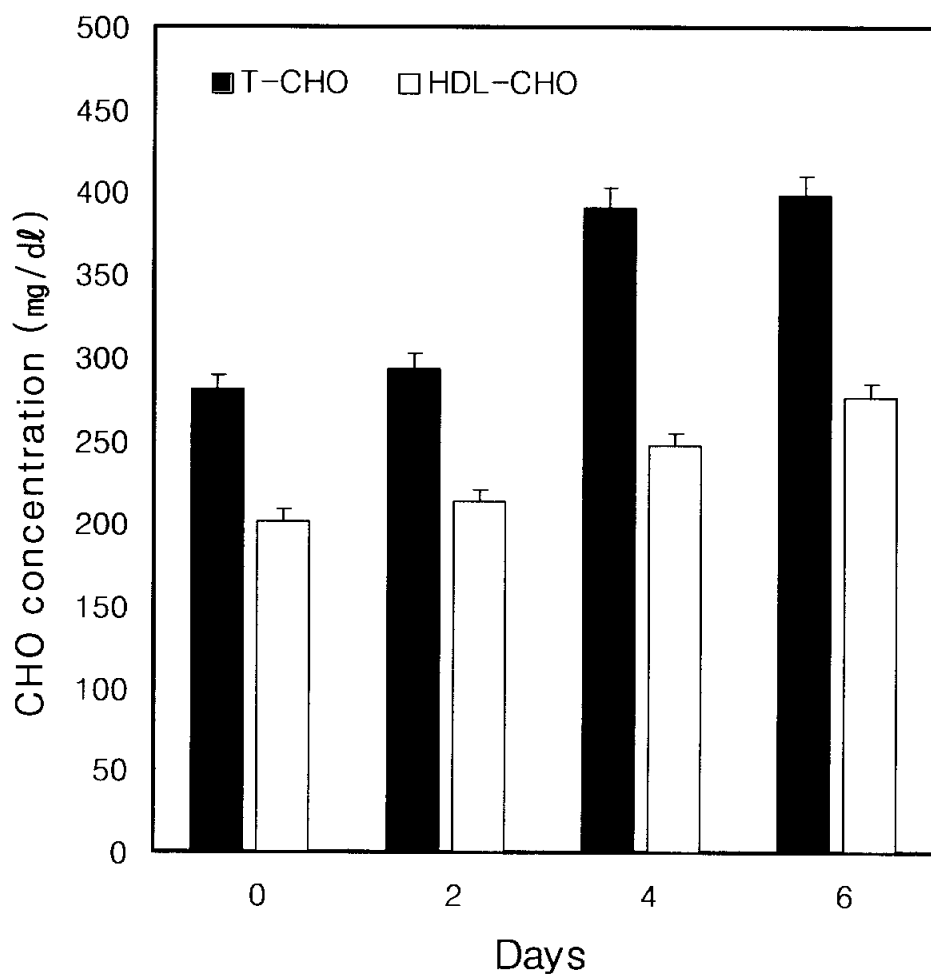


Figure 17. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach transgenic lines (TG6) fed the 4% cholesterol diet for 6 days.

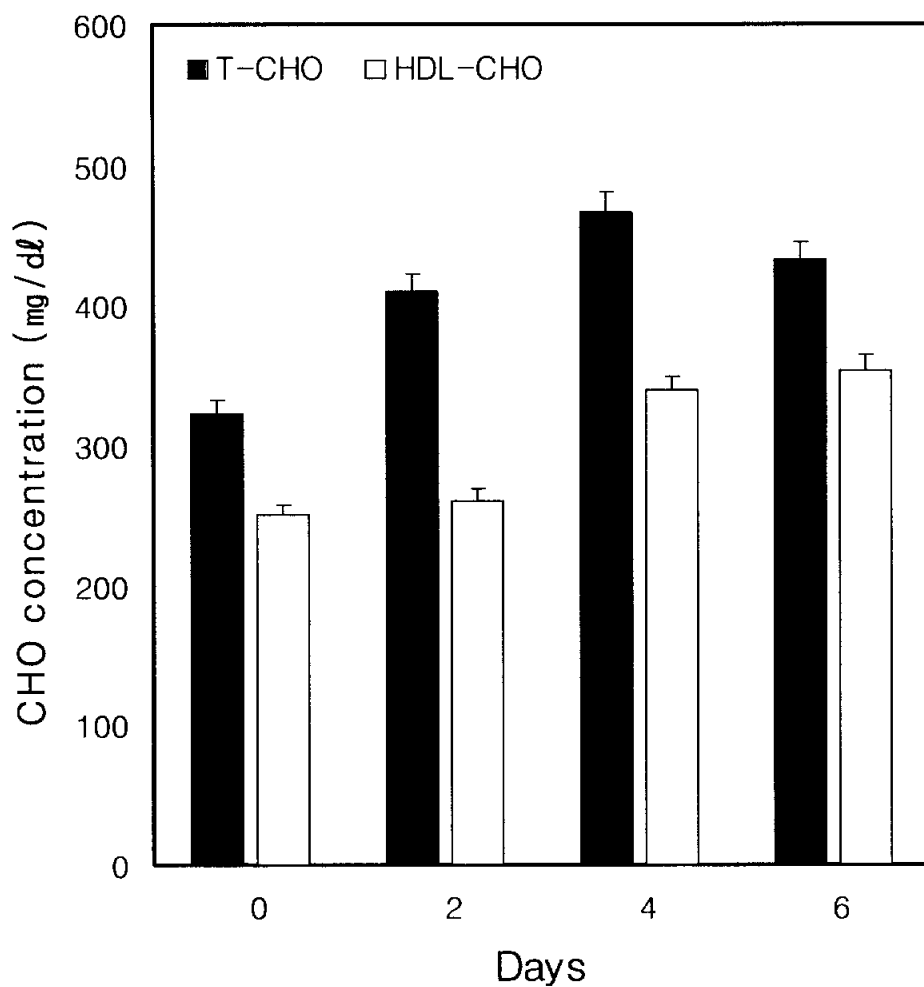


Figure 18. Plasma T-CHO and HDL-CHO levels of mud loach transgenic lines (TG9) fed the 4% cholesterol diet for 6 days.

4-3. Fenofibrate 처리 기간에 따른 어체내 T-CHO와 HDL-CHO 의 농도 변화

1%의 fenofibrate를 공급한 후 대조군에 있어서는 T-CHO 및 HDL-CHO 모두에서 처리 기간에 따라 약간의 증가는 관찰되었으나 처리 시간에 따른 유의한 차이는 없었다. 그러나 TG 9 F₁ 어류에 fenofibrate를 공급한 경우에는 처리 6일 후 T-CHO는 1.1 배, 그리고 HDL-CHO의 경우 1.8배의 증가를 보였다. 처리 10일 후에도 이들보다 약간 더 큰 증가를 보여 T-CHO는 1.3배, HDL-CHO는 1.8배의 증가를 보여 시간 의존적인 양상을 보여주었다 (Fig. 19~20).

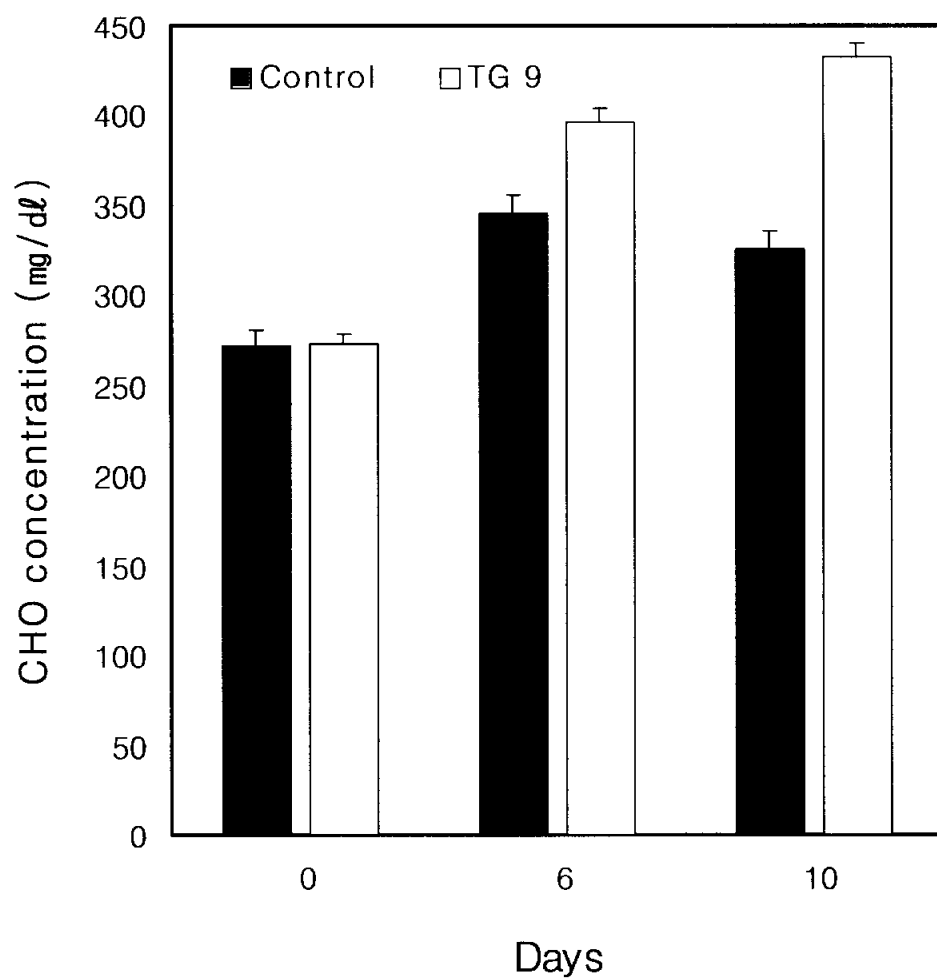


Figure 19. Plasma T-CHO levels in transgenic line (TG 9) and non-transgenic mud loach fed the 1% fenofibrate diet for 10 days.

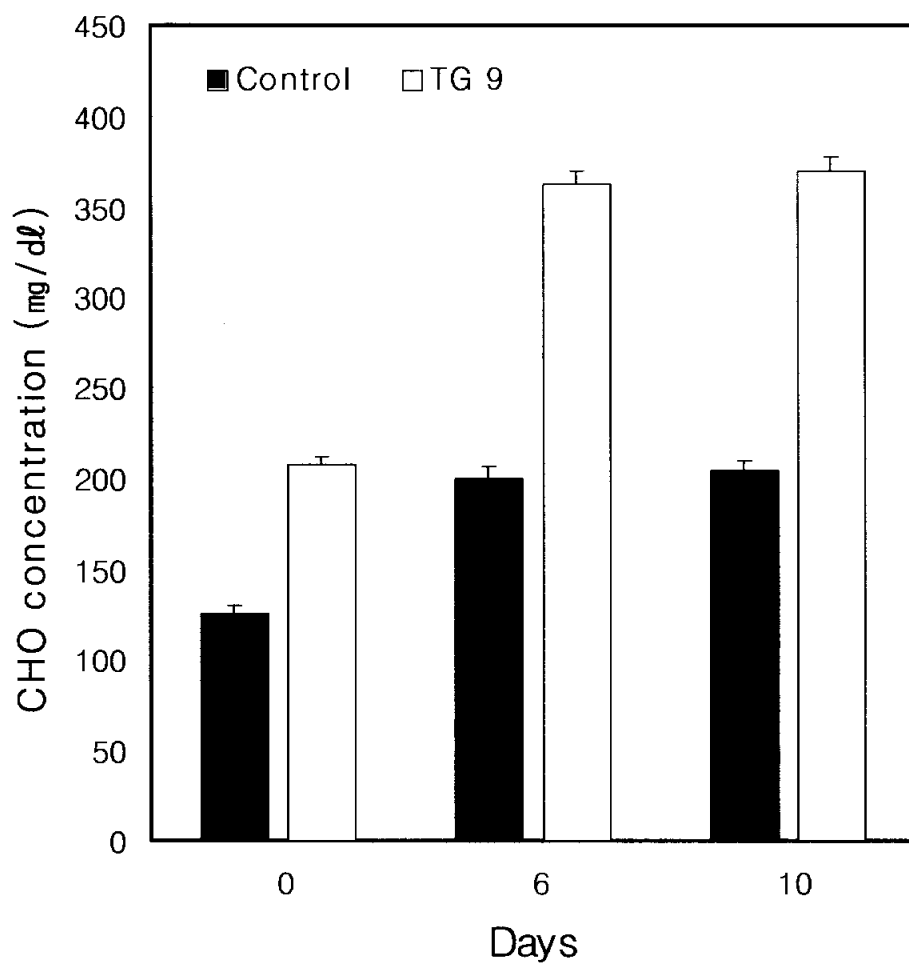


Figure 20. Plasma HDL-CHO levels in transgenic line (TG 9) and non-transgenic mud loach fed the 1% fenofibrate diet for 10 days.

IV. 고 찰

본 연구는 어류로부터 유용 유전자 자원을 탐색하고 발굴된 유전자의 형질전환적 활용을 통해 신기능성을 획득한 새로운 어류 유전계통을 개발함으로써 수·해양 생물산업의 새로운 고부가가치 창출 모델을 정립하고자 하였다. 이를 위해 다양한 어류 유전자 library들을 구축하고, EST 기법을 통해 발현하는 유전자 정보를 수집하였으며, 본 연구의 목적 유전자인 apolipoprotein AI 유전자를 선발, 유전자 재조합 기술과 유전자 이식기술을 통해 HDL을 대량 발현하는 기능성 형질전환 어류 시스템을 구축하였다.

본 연구에서 유전자 탐색 및 발굴을 위해 제작된 cDNA library들은 모두 1×10^6 pfu/ml의 primary size를 갖는 고용량 library들로서 다양한 유전자 소재를 포함하고 있음이 EST 정보 수집을 통해 잘 입증되었다. 또한 EST 기술을 통해 다양한 신규 유전자 발굴과 Apo AI 탐색 역시 매우 효과적으로 이루어졌음을 알 수 있었다 (see Nam and Kim, 2001). Apolipoprotein 유전자들이 발현하리라 예상되는 4 종류의 cDNA library들로부터 수집된 총 1,100여개 이상의 EST들 중 14종의 다양한 apolipoprotein 유전자들이 발굴되었고 이들 apolipoprotein 유전자들은 인간, 포유류 및 어류의 Apo AI, AIV, B, E등과 다양한 상동성을 나타내고 있었다. 발굴된 Apo 단백질 중 형질전환을 위해 선발한 미꾸라지 Apo AI 유전자를 대상으로 전체 염기서열을 분석한 결과 인간과는 단지 16%의 낮은 서열 상동성을 보였음에도 불구하고 이들의 단백질 3차 구조 분석에서 매우 유사한 구조를 보였으며 아미노산 수 역시 인간 (243개) 및 미꾸라지 (245개)로 매우 유사하였다. 특히 본

연구에서 발굴된 미꾸라지 Apo AI 유전자 역시 여타 다른 Apo AI 유전자와 마찬가지로 아미노산 염기서열상에서 17개로 구성된 signal peptide를 포함하고 있었으며 지질 성분과 작용할 수 있는 높은 소수성 부위가 N-terminal 부위에서 확인되었다 (Birchbauer et al., 1993). 본 연구결과는 어류와 인간이 서로 상이한 Apo AI 유전자 염기서열에도 불구하고 그 단백질 기능이 잘 보존되어 있을 수 있는 가능성을 시사하는 결과로서 서로 다른 염기서열이 어떻게 유사한 단백질 구조와 기능으로 프로그램되는지에 대한 매우 흥미로운 연구 방향을 제시할 수 있으리라 판단된다. 또한 인간 Apo AI의 경우 20 Kb 이상의 거대 유전자 family 상태로 11번 염색체상에 다른 Apo 유전자들과 밀집해 존재하면서 서로의 유전자 발현에 많은 영향을 끼치는 것으로 알려져 있어 향후 어류 Apo AI 유전자의 genomic 유전자 존재 양상분석이 매우 중요할 것으로 판단된다 (Birchbauer et al., 1993; Wang et al., 1998).

본 연구에서 발굴된 미꾸라지 Apo AI 유전자의 기능을 *in vivo* 상태에서 구명하기 위해 형질전환 기술을 이용하였다. 미꾸라지 Apo AI 발현 벡터를 제작하기 위해 미꾸라지에서 이미 다양한 단백질의 발현 유도 능력이 검증된 FV4 벡터와의 융합 구조를 개발하였으며 본 발현 벡터를 이용하여 미꾸라지 수정란내 미세현미주입 (microinjection) 조건을 최적화하고 유전자 이식을 수행하였다. 유전자 이식 효율은 평균 33%로서 기존의 형질전환 실험과 비교 시 높은 효율을 보임으로써 미꾸라지 수정란에 효과적인 유전자 이식 조건이 정립되었음을 알 수 있었다 (Nam et al., 1999; see also Hackett and Alvarez, 2000). 유전자 이식된 Fo 개체들을 대상으로 형질전환 유전자의 염색체 삽입 구도를 분석하기 위해 Southern blot을 수행한 결과 다양한 염색체 상의 삽입 위치를 나

타냄으로써 전형적인 미세현미주입의 특징 관찰되었으며 high molecular weight DNA band가 많은 개체에서 검색됨으로써 이식한 유전자가 미꾸라지의 염색체상에 안정적으로 삽입되었음을 알 수 있었다 (Nam et al., 1999).

pFV4m Apo AI 벡터의 이식을 통해 개발된 새로운 형질전환 미꾸라지들은 Apo AI 유전자의 발현을 통해 새로운 생물학적 기능을 획득할 수 있는 것으로 나타났다. 형질전환 미꾸라지들은 (Fo) HDL의 주요 단백질 성분인 Apo AI을 과발현함으로써 대조군에 비해 혈청내 T-CHO 및 HDL-CHO의 유의적인 증가를 나타내어 대조군 대비 최대 각 220% (T-CHO) 및 230% (HDL-CHO)의 증가율을 보임으로써 인체 질환 모델로 개발된 바있는 형질전환 생쥐에서와 유사한 결과를 나타내었다 (Ruben et al., 1991). 그러나 그 증가 양상은 계통별로 매우 다양하게 나타남으로써, T-CHO 및 HDL-CHO 모두 약간 증가하는 계통에서부터 T-CHO 또는 HDL-CHO 한쪽만 증가하는 계통, 그리고 두가지 CHO 모두 유의적으로 증가하는 계통들이 관찰되었다. 이와 같이 형질전환 어류 제 1세대에서 관찰되는 발현율의 차이는 각 개체별로 서로 다른 형질전환 유전자형을 갖기 때문으로 여겨지며 이때 형질전환 유전자형은 유전자 삽입 위치, concatemer 형성 유무, 삽입된 유전자의 copy수 모두에서 영향을 받을 수 있음이 많은 형질전환 실험에서 보고된 바있다 (Iyengar et al., 1996). 개발된 신기능성 형질전환 미꾸라지 제1세대 개체들 중 유전자형과 발현 양상 정보를 바탕으로 선발한 두 계통을 대상으로 F₁ 생산을 수행하였다. F₁으로의 유전자 전달 양상 역시 이전의 형질전환 미꾸라지에서와 유사한 결과를 보였으며 hemizygous 형태로 확립된 두 계통의 형질전환 미꾸라지 F₁들 Fo에서 관찰되었던 발현특성을 잘 보존하는 것으로

나타났다. F1 Apo-형질전환 미꾸라지들은 대조군에 비해 T-CHO 및 HDL-CHO에서 최대 220%의 증가율을 나타내었다.

본 연구를 통해 지질대사가 조작된 형질전환 미꾸라지들을 지질 대사 조작 및 분자치료 연구모델로 개발 및 인체 유용 성분을 대량함유하고 있는 새로운 부가가치 창출 모델로 개발 가능성을 평가하였다. 콜레스테롤을 포함한 다양한 실험 사료를 이용하여 인위적으로 유도된 과다 콜레스테롤 스트레스에 본 형질전환체들이 생체 방어 능력을 평가하기 위해 첫째, 비계 첨가사료를 이용한 기초 실험을 통해 사료내 5% 농도로 4일 이상 공급할 경우 T-CHO가 78% 증가함이 관찰됨으로써 포유류 뿐만 아니라 어류에서도 콜레스테롤 투여를 통해 혈중 T-CHO의 농도 증가를 인위적으로 유도시킬 수 있음이 입증되었고 둘째, 정제된 콜레스테롤을 이용하여 T-CHO 및 HDL-CHO 증가 유도 실험을 통해 상기 조건을 재확인하였다. 셋째, 일반 미꾸라지를 이용한 T-CHO 및 HDL-CHO 유도 실험 결과를 바탕으로 본 연구에서 개발된 Apo AI을 대량 발현하는 기능성 형질전환 미꾸라지들이 체내 증가된 콜레스테롤 수치에 신속하고 민감하게 반응할 수 있는지를 평가하였다. 일반 미꾸라지에서 최대 2배 이상의 HDL-CHO 변화를 야기할 수 있는 4% 콜레스테롤 함유 사료를 형질전환 미꾸라지에 일반미꾸라지와 함께 동일 기간동안 동일 환경에서 투여한 결과 T-CHO의 증가 폭은 큰 유의차가 없었으나 HDL-CHO의 경우 처리 6일째에 대조군 증가치의 180~230%에 달하는 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 형질전환체들이 체내 조직 및 혈관 등에 과도하게 축적될 수 있는 잉여 콜레스테롤들을 RCT (reverse cholesterol transport) 반응을 통해 신속하게 조절하기 위한 것으로 RCT 능력이 일반 미꾸라지에 비해 월등하게 우수하기 때문인

것으로 판단된다 (Ruben et al., 1991; Plump et al., 1996). 따라서 본 연구결과는 Apo AI 유전자의 발현 조절을 통해서 어류 콜레스테롤 대사가 조작될 수 있으며 아울러 콜레스테롤 과다 축적으로 인해 야기되는 질환 모델은 물론 RCT 능력 개선을 통해 hypercholesteramia 및 atherogenesis에 저항하는 분자치료 모델 역시 개발 가능성을 강력히 시사하고 있다. 또한 본 연구에서 fenofibrate 투여 실험을 통해 미꾸라지 Apo AI은 인간의 Apo AI 과 유전자 발현 조절 기작이 유사할 가능성을 나타내었다. Fenofibrate는 서로 다른 종의 Apo AI 유전자의 발현율에 다른 영향을 끼치는 화합물로서 시궁쥐에 투여할 경우 Apo AI mRNA의 발현을 감소시키나 인간에게는 Apo AI의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 사료내 1%의 농도로 대조군 및 형질전환 미꾸라지에 투여한 결과 대조군에서는 비교적 적은 양의 T-CHO/HDL-CHO 증가가 관찰되었으나 형질전환군에서는 최대 180%의 증가를 나타냄으로써 미꾸라지 Apo AI 유전자가 인간 유형의 Apo AI 유전자 조절 기작을 받는 것으로 판단되었다 (Berthou et al., 1996).

본 연구를 통해 개발된 어류 Apo AI 유전자와 이를 대량 발현하는 기능성 형질전환 미꾸라지들은 다음의 특징을 갖는다. 첫째, 미꾸라지 Apo AI 유전자는 인간 Apo AI 유전자와 낮은 DNA 염기서열의 상동성에도 불구하고 매우 유사한 단백질 구조와 기능을 갖고며, 둘째, 그 유전자를 발현하는 형질전환 미꾸라지는 콜레스테롤 대사에 핵심적인 조절 기능을 담당하는 HDL을 대량 발현할 수 있고, 셋째, 과잉의 콜레스테롤의 체내 축적에 강력하게 대처할 수 있는 새로운 능력을 획득함으로써 동맥경화 등 콜레스테롤 과다로 인해 유발되는 질병에 저항할 수 있다. 따라서 본 연구결과에

서 개발된 신기능성 형질전환 계통의 분자유전육종을 통해 다음의 활용 가능성 및 연구 방향을 제시할 수 있다. 첫째, 어류로부터 유용 유전자 자원을 발굴하고 이들의 기능을 어류 모델에서 발현시킴으로써 신기능성 동물 연구 모델 및 기능 유전체학 개발을 가속화시킬 수 있으며 둘째, 이러한 신기능성 어류에게 인체 질환 및 분자 치료 모델 연구를 위한 핵심 정보를 포함시킴으로써 획기적인 부가가치 창출을 실현시킬 수 있으며, 셋째, 양식 생물산업 소재로 개발할 경우 인체 유용 물질을 대량 함유하고 있는 기능성 식품소재로 개발 가능할 것이다. 앞으로 현재 개발된 기능성 형질전환체들의 기능성 극대화과 안전성 확보를 위한 분자유전육종 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

국문요약

어류는 인간과 유사한 apolipoprotein 유전자 염기서열을 가지며 그 유전자 활성도 매우 높아 인간에서 다발하는 동맥경화, 고혈압 및 치매 증상이 전혀 보고된 바 없고 인간에 이로운 혈중 high density lipoprotein (HDL) 농도가 여타 척추동물에 비해 매우 높다. 따라서 어류는 apolipoprotein 활성이 매우 높을 것으로 추측되고 있다. 본 연구는 효율적인 apolipoprotein 유전자의 탐색을 위해 3종의 어류로부터 4종류의 cDNA library를 제작하여 그들에서 14종의 apolipoprotein 유전자를 확인한 후, 미꾸라지 간에서 얻어진 apolipoprotein 유전자를 가지고 그의 구조적 특징을 분석하여 그 유전자가 apolipoprotein AI임을 확인하였다. 이후 FV4a promoter와 얻어진 apolipoprotein AI 유전자가 융합된 벡터를 제작하였고 제작된 벡터를 미꾸라지 수정란에 미세현미주입하여 형질전환 어류를 생산한 후 이들의 유전자 삽입 양상과 발현 양상을 조사하였다. 그결과 형질전환 어류는 1~2 copy의 외래유전자가 삽입되어 있음이 확인되었고, 대조군에 비해 T-CHO와 HDL-CHO의 혈중 농도가 최대 2배 증가되는 경향을 보였다. 이후 안정적인 line 확보를 위한 두 개의 서로 다른 TG Fo 어류로부터 F₁ 형질전환 어류를 생산한 후 다양한 먹이를 공급하며 신기능성 형질전환 어류의 T-CHO 및 HDL-CHO 축적량을 조사한 결과 혈중 T-CHO는 그다지 증가되지 않으나 HDL-CHO는 최대 4배까지 증가하였다.

감사의 글

제게 학문의 길을 인도하여 주시고, 또 본 논문이 완성되기까지 정성껏 손질하여 틀을 잡아주시고 자상하게 이끌어 주시어 결실을 맺게 해주신 김동수 교수님께 진심으로 깊이 감사드립니다.

논문이 완성되기까지 심사를 맡아 세심한 충고와 함께 격려를 하여주신 부경대학교 양식학과 손철현 교수님, 장영진 교수님, 국립수산과학원 전임기 소장님, 김운 부장님께 감사의 말씀을 드립니다.

학위과정과 실험의 모든 과정을 배려하여 주시고 뜨거운 충고로써 지도하여 주신 부경대학교 허성범 교수님, 조재운 교수님, 김창훈 교수님, 배승철 교수님, 박수일 교수님께 깊은 감사의 뜻을 전합니다.

그리고, 실험의 전 과정에 있어서 좋은 결과가 나오도록 전력을 다하여 도와주시고, 논문을 손질해 주신 남윤권 교수께 진심으로 감사의 뜻을 전하며, 본 논문을 위해 열과 정성을 다해 도와주신 어류유전공학 실험실의 이상윤 박사, 노재구 박사, 임재현님, 우선량님, 이수진님께 진심으로 감사를 보냅니다.

학문의 길을 갈 수 있게 힘이 되어주신 동해수산연구소의 박차수 소장님, 문영봉 과장님께 감사드리며, 옆에서 격려와 많은 도움을 준 동해수산연구소의 박상언님, 권문경님께 진심으로 고마움을 드립니다. 학위 과정중 따뜻한 성원과 여러 가지 도움을 주신 국립수산과학원의 김종연 박사님, 윤호동 연구관님, 김경길 박사님, 김봉석 박사님, 그리고 어류유전공학 실험실에 몸담았던 정창화 박사님께 고마운 마음을 드립니다. 또 알게 모르게 이 논문이 있기까지 보이지 않은 곳에서 저를 도와주신 모든 분들께 진심으로 감사드립니다.

어려움 속에서도 뒷바라지에 정성을 다해주신 부모님께 깊은 감사를 드리며, 또한 오늘이 있기까지 사랑과 인내로 묵묵히 뒷바라지 해준 아내 제숙혜님과 사랑스런 아들 해정, 해영, 딸 선이에게 이 논문을 바칩니다.

References

- Berthou, L., N. Duverger, F. Emmanuel, S. Langouët, J. Auwerx, A. Guillouzo, J. -C. Fruchart, E. Rubin, P. Denèfle, B. Staels and D. Branellec, 1996. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein AI by fibrates in human apolipoprotein AI transgenic mice. *J. Clin. Invest.*, 97: 2408-2416.
- Birchbauer, A., G. Knipping, B. Juritsch, H. Aschauer and R. Zechner, 1993. Characterization of the apolipoprotein AI and CIII genes in the domestic pig. *Genomics*, 15: 643-652.
- Cohen, R. D., L. W. Castellani, J. -H. Qiao, B. J. V. Lenten, A. J. Lusis and K. Reue, 1997. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J. Clin. Invest.*, 99: 1906-1916.
- Devlin, R. H., T. Y. Yesaki, E. M. Donaldson, S. J. Du and C. L. Hew, 1995. Production of germ line transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 1376-1384.
- Douglas, S. E., J. W. Gallant, C. E. Bullerwell, C. Wolff, J. Munholland and M. E. Reith, 1999. Winter flounder expressed sequence tags: establishment of an EST database and identification of novel fish genes. *Mar.*

Biotechnol., 1: 458-464.

- Dunham, R. A. and R. H. Devlin, 1999. Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness. In: Transgenic Animals in Agriculture: Murray J. D., G. B. Anderson, A. M. Oberbauer and M. N. McGloughlin (eds). pp. 209-229. CAB International, Wallingford, UK.
- Francis, M. C. and J. J. Frohlich, 2001. Coronary artery disease in patients at low risk - apolipoprotein AI as an independent risk factor. *Atherosclerosis*, 155: 165-170.
- Gong, Z., T. Yan, S. E. Lee, J. He and C. L. Hew, 1997. Rapid identification and isolation of zebrafish cDNA clones. *Gene*, 201: 87-98.
- Gotto, A. M. Jr., H. J. Pownall and R. J. Havel, 1986. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.*, 128A: 3-41.
- Hackett, P. B. and M. C. Alvarez, 2000. The molecular genetics of transgenic fish. In: Recent Advance in Marine Biotechnology, Vol 4 (Part B), Fingerman, M. and R. Nagabhushanam (eds). page 77-145. Science Publishers Inc., NH, USA.
- Hew, C. L. and G. L. Fletcher, 2001. The role of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture*, 197: 191-204.

- Iyengar, A., F. Muller and N. Maclean, 1996. Regulation and expression of transgenes in fish - a review. *Transgenic Res.*, 5: 147-166.
- Jiang, X. C., O. L. Francone, C. Bruce, R. Milne, J. Mar, A. Walsh, J. L. Breslow and A. R. Tall, 1996. Increased preß-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J. Clin. Invest.*, 98: 2373-2380.
- Kono, T., M. Sakai and S.E. LaPatra, 2000. Expressed sequence tag analysis of kidney and gill tissues from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Mar. Biotechnol.*, 2: 493-498.
- McLean, E. and R. H. Devlin, 2000. Application of biotechnology to enhance growth of salmonids and other fish. In: *Recent Advance in Marine Biotechnology*, Vol 4 (Part B), Fingerman, M. and R. Nagabhushanam (eds). page 17-55. Science Publishers Inc., NH, USA.
- Nam, Y. K. and D. S. Kim, 2001. Bioinformatics in fish: its present status and perspectives with particular emphasis on expressed sequence tags - brief review. *J. Aquacult.*, 14: 9-16.
- Nam, Y. K., J. K. Noh, Y. S. Cho, H. J. Cho, K. N. Cho, C. G. Kim and D. S. Kim, 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud

- loach (*Misgurnus mizolepis*). Transgenic Res., 10: 353-362.
- Nam, Y. K., Y. S. Cho, S. E. Douglas, J. W. Gallant, M. E. Reith and D. S. Kim, 2002. Isolation and transient expression of a cDNA encoding L-gulonono-g-lactone oxidase, a key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis, from the tiger shark *Scyliorhinus torazame*. Aquaculture, 209: 271-284.
- Plump, A. S., S. K. Erickson, W. Weng, J. S. Partin, J. L. Breslow and D. L. Williams, 1996. Apolipoprotein A-I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production. J. Clin. Invest., 97: 2660-2671.
- Powers, D. A., 1989. Fish as model systems. Science, 246: 352-358.
- Ruben, E. M., R. M. Krauss, E. A. spangler, J. G. Verstuyft and S. M. Clift, 1991. Infibition of early atherosclerosis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. Nature (Lond.) 353: 265-267.
- Segrest, J. P., M. J. Jones, H. De Loof, C. G. Brouillette, Y. V. Venkatachalapathi and G. M. Anantharamaiah, 1992. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: A review of secondary structure and function. J. Lipid Res., 33: 141-166.
- Setlow, R. B. and A. D. Woodhead, 2001. Three unique

experimental fish stories: *Poecilia* (the Past), *Xiphophorus* (the Present), and Medaka (the Future). Mar. Biotechnol., 3: S17-S23.

Sviridov, D., N. Fidge, G. Beaumier-Gallon and C. Fielding, 2001. Apolipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae). Biochem. J., 358: 79-86.

Walter, R. B., 2001. Introduction: Aquaria fish models of human disease. Mar. Biotechnol., 3: S1-S2.

Wang, X. L., R. B. Badenhop, A. S. Sim, D. E. L. Wilcken, 1998. The effect on transcription efficiency of the apolipoprotein AI gene of DNA variants at the 5' untranslated region. Int. J. Clin. Lab. Res., 28: 235-241.