

# 2003년 TKB 연구과제

다카라코리아바이오테크놀로지(주) 연구개발센터 / 배 상우

당사에서는 생명공학 분야에 축적된 기술력을 바탕으로 핵심 원천기술 개발 및 제품화 사업에 주력하고 있으며, 독창성 있는 아이디어 또는 실용성 있는 기술을 발굴하여 공동연구를 통한 제품화 사업을 다방면으로 전개하고 있다.

이와 같이 생명공학 분야의 연구자들과 핵심 원천기술 개발 및 제품화 사업을 적극적으로 전개하기 위하여, 2002년부터 'TKB (Takara Korea Biomedical Inc.) 연구과제' 라는 명칭으로 연구과제를 공모하여 연구비 지원 및 공동연구를 진행하고 있다.

제 1회 2002년 TKB 연구과제는 DNA chip을 주제로 과제를 공모하였으며, 총 7개 과제를 선정하여 전체 2억 1천만원의 연구비를 지급하였다.

## <2002년 TKB 연구과제>

소 속	연구책임자	연구과제명
세종대 생명공학과	권호정	Human cancer 및 Angiogenesis 관련 DNA Chip의 개발
고려대 의과대학	원남희	신장암 진단 DNA chip개발에 관한 연구
경상대 응용생명과학부	임채오	식물 스트레스 관련 유전자 및 개화 관련 DNA Chip의 개발 및 응용
서울대 의과대학	전범석	철대사 관련 유전자를 중심으로 한 파킨슨병 진단용 DNA Chip의 개발
삼성서울병원	진동규	삼핵산 반복서열의 증가에 초래되는 유전 질환 진단용 DNA chip개발
전남대 의과대학	최 찬	암전이 관련 유전자 cDNA microarray chip의 개발
명지대 생명과학과	홍순광	방선균 유래 신규 생리활성 물질 발굴용 DNA chip 개발과 응용

2002년 TKB 연구과제를 통하여 현재 다양한 기능성 DNA chip이 개발되고 있으며, 일부 과제는 중소기업청 등에서 지원하는 국책과제로 전환되어 다카라코리아 연구개발센터와 공동연구를 진행 중에 있다. 또한, TKB 연구과제의 연구비 지원을 통하여 얻어진 연구결과는 특허출원, 논문투고 및 제품화 개발로 이어지고 있으며, 일례로 경상대 임채오 교수님의 결과는 2003년에 PNAS에 등재되었다 (NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003 Jan 7;100(1):358-63).

제 2회를 맞는 2003년 TKB 연구과제는 지난해와는 달리 DNA chip에 한정하지 않고 생명공학 전 분야에 걸쳐 연구과제를 공모하였으며, 많은 연구자 분들의 관심 속에 총 29과제가 접수되었다. 각 과제는 분야별 외부 전문심사위원에 의한 전문성 심사와 당사와의 사업협력 가능성을 포함한 사업성 관련 심사로 공정하게 실시되었으며, 최종 5과제가 선정되어 전체 2억 여원의 연구비가 지급되었다.

2003년 TKB 연구과제에 선정된 연구과제는 다음과 같다.

### 1. Development of the efficient and rapid genomic tool for the construction of custom-designed microorganisms (한국과학기술원 김선창 교수)

현재 산업적으로 널리 이용되는 대장균의 유전체를 선택적으로 조절하여 생산성이 증가되고 새로운 기능을 갖는 생물산업용 새로운 균주 개발이 필요하다. 이를 위하여 유용물질 생산을 저해하거나, 생산 대사 경로 상에서 경쟁관계에 있는 유전자군을 손쉽게 빠르게 제거하고 유용 목표물질의 생산에 적합한 유전자군을 삽입시킴으로써 유용물질의 생산에 최적화된 인공대장균 개발 기술을 확립하고, 이를 생물산업체의 맞춤형균주 개발에 이용하고자 한다.

이에 본 연구에서는 Transposon과 cre/loxP excision system을 이용한 빠르고 효과적인 유전자 제거기술을 확립하여 loxP site를 가진 Transposon을 이용 유전자 제거용 대장균 genome library를 확충하고자 한다. 또한, Genome library를 이용하여 combinatorial deletion과 cumulative deletion을 통한 경쟁 혹은 저해 유전자군들의 제거기술, 유용물질의 고효율 생산을 위한 외부 유전자군들의 삽입기술 및 거대 유전체 구간의 반전을 통한 균주 개량 기술을 확립하고자 한다.

### 2. Discovery of useful genes from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 (충북대학교 김영창 교수)

*Sphingomonas chungbukensis* DJ77 균주의 유용 유전자를 발굴하기 위하여 현재 약 3Mb 정도의 유전체 서열을 밝혀냈으며, 이 서열로부터 전체 유전자의 약 38% 수준인 약 1,500개의 유전자를 찾아냈다. 본 연구에서는 약 6 Mb 정도의 유전체 서열을 추가적으로 밝혀냄으로써, DJ77의 완전한 유전자 목록을 작성하고, 이를 분석하여 속 특이적, 종 특이적 유전자들과 산업적으로 유용한 유전자들을 찾아내고자 한다.

특히, 피부질환이나 항암 작용에 관여하는 스펅고지질의 생합성, 식품 첨가물로 많이 사용되고 있는 exopolysaccharide의 생합성, 난분해성 방향족 오염물질의 생분해 등에 관여하는 유전자들을 찾아내고자 한다. 이와 같은 산업적으로 이용 가치가 매우 높은 기능들은 매우 많은 유전자가 복잡하게 관여하고 있기 때문에 일반적인 클로닝 방법으로 분석하는 데는 많은 어려움이 따른다. 따라서 전 유전체에 걸쳐 목표 유전자를 탐색하는 것이 필요하고, 본 연구에서는 생명정보학적 분석 도구를 개발하여 대사 경로를 재구성해봄으로써 발견한 유전자 목록의 질을 평가하고 산업화에 대한 아이디어를 얻는 논리적 근거를 마련하고자 한다.

3. Development of inducible siRNA expression and delivery system (서울시립대학교 조익훈 교수)

최근에 다양한 mammalian cell과 embryo에서 target gene의 발현을 specific하게 억제할 수 있는 siRNA의 방법이 개발되어 특정 유전자의 기능을 연구하는 연구자들이 사용하고 있거나 사용을 계획 중에 있으며, siRNA의 제작과 관련된 다양한 방법들이 개발되어 왔지만 siRNA의 발현을 inducible하게 조절하는 방법은 아직 시도 단계이다. siRNA를 사용하는 많은 연구자들이 직면한 또 다른 문제점은 neuronal cell과 같은 분화된 세포는 일반적인 cell line 보다 transfection efficiency가 훨씬 낮아서 siRNA의 효율을 검증하는데 어려움이 있다.

이에 본 연구에서는 유전자의 발현을 조절할 수 있는 siRNA의 inducible expression을 위한 vector system 및 lentiviral vector를 이용한 siRNA를 발현하는 유전자의 도입 방법을 개발하고자 한다. siRNA vector system에서 사용된 U6, H1 promoter의 구조적 특성과 rtTA2S-M2를 이용한 Tet-on system을 이용하여, 원하는 시간과 특정 조직에서 target gene에 대한 siRNA의 발현을 조절할 수 있는 inducible siRNA vector를 제작하고, Target 유전자에 대한 inducible siRNA vector의 작동성 여부 및 lentiviral vector를 이용하여 siRNA의 발현을 inducible 하게 조절하는 기능을 가진 vector를 효율적으로 세포 내로 도입하는 방법의 개발 및 작동성 여부를 확인하고자 한다.

4. Identification of a HRF secretion pathway and development of the HRF secretion blockers (이화여자대학교 이경림 교수)

IgE 의존성 histamine releasing factor(HRF)는 만성 알러지 반응(late phase allergic response)에 관여하는 인자로 IgE 의존적으로 basophils로부터 히스타민의 방출을 유도하는 것으로 알려져 있다. HRF는 house-keeping gene product로 세포 내에서 작용하는 단백질이지만 알러지 환자에서는 세포 밖으로 분비되고 있다. 이렇듯 알러지 환자에서는 HRF가 세포의 외부에서 작용하는 단백질임에도 불구하고, 세포 밖으로 분비되는 단백질의 특징인 signal peptide를 가지고 있지 않다. 현재까지 HRF와 같이 signal sequence를 가지지 않고 세포 외부로 분비되는 것으로 알려진 여러 단백질에 대한 연구가 계속되어 왔으나 아직 정확한 분비 경로는 규명되지 않았다. 본 연구는 ER-Golgi independent pathway를 통하여 분비되는 단백질에 대한 연구 방법을 HRF에 적용하여, HRF의 분비에 관여하는 인자를 찾고 이를 조절할 수

있는 물질을 탐색하여 새로운 기전을 가진 알러지 치료제에 대한 접근을 시도하고자 한다.

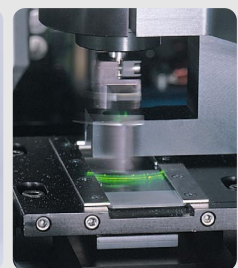
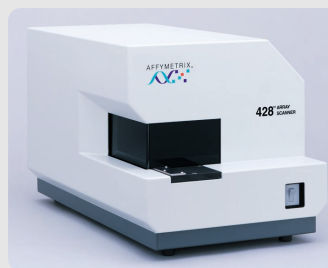
5. Development of PCR genomic fingerprinting Kit for Bacterial strains (한경대학교 강희완 교수)

반복배열 DNA 염기서열의 특이 영역으로부터 다수의 primer를 고안, 변형 제작하여 농업, 산업 및 인체에 연관된 다양한 세균에 모두 적용할 수 있는 PCR 핵산지문 분석 kit를 개발하고자 한다. Primer를 구성하는 염기구성을 20mer 이상으로 고안, 제작하여 세균 genome DNA와 접촉온도가 55°C 이상에서 high stringent PCR 반응을 실시할 수 있게 하여 높은 재현성으로 안정하게 세균 종 또는 계통간의 특이적으로 DNA polymorphism을 검출해낼 수 있게 함으로서 기존의 RAPD와 AP-PCR 방법에서 문제점으로 지적되어온 재현성을 획기적으로 개선한다. 특히, 세균 종, 계통특이 균주의 DNA 다형성 밴드의 특이성을 규명하고 세균 종 또는 계통특이 검출을 위한 특이밴드의 이용성을 조사한다. 본 연구에서는 개발된 primer를 이용한 PCR 핵산지문법을 환경, 농업, 의학, 산업에 연관된 다양한 세균 균주에 적용하여 세균 종간, 종내 계통간 유전적 식별을 위한 genome typing의 유용성을 증명하며, PCR-DNA profile의 database 구축과 computer-assisted PCR genomic fingerprint 분석에 의한 종, 계통의 신속 동정시스템의 적용성을 검토하고자 한다.

# DNA chip 해석장치

## Affymetrix® 428™ Array Scanner

- Flying Objective™ Microscope 방식
- Automatic Scanning
- 다양한 Slide glass 가능
- Icon 이용한 간편조작
- 9종의 형광 색소 사용가능



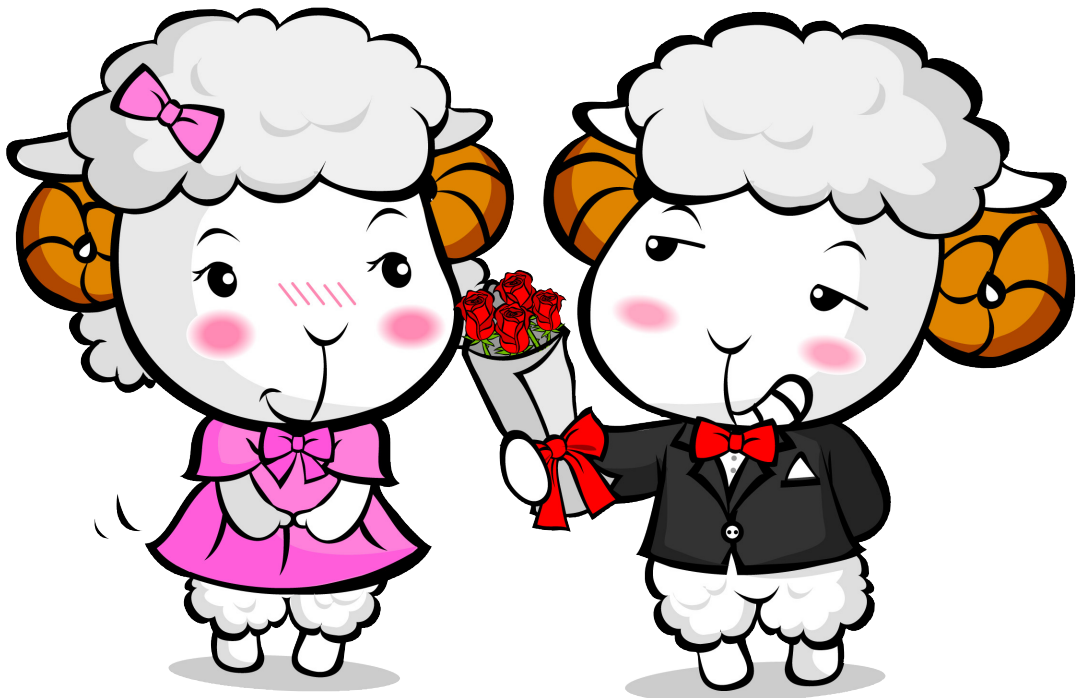
# 찰떡궁합

TaKaRa Taq을 쓰고 계시다면

Primer는 당연히 TaKaRa~

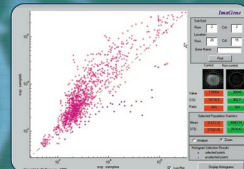
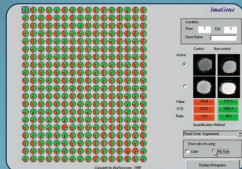
자기~  
TaKaRa Taq  
쓰고 있지?

당연하지만  
Primer도  
같이 쓰는걸~



# MTP 과정

(Microarray Training Program)



다카라코리아 연구개발센터에서 Post genome 시대에 발맞춰 유용하게 사용되는 DNA chip에 대한 Takara 본사의 DNA chip 제작 및 해석에 관한 축적된 기술 및 노하우를 연구자 여러분께 전수해드리고자 합니다. 본 과정은 실습 과정으로서 DNA chip 실험을 연구원님들이 실험실에서 직접 하실 수 있도록 준비해 놓았습니다. 또한 DNA chip 제작과정과 DNA chip center의 견학과정을 통해 microarray system에 대한 전반적인 이해를 돕도록 했습니다. DNA chip 연구를 준비하시는 연구원님들께 큰 보탬이 될 것을 확신합니다.

## < 강좌 MTP >

- » 일 시: 6월20일 (금)~ 6월21일 (토)
- » 인 원: 16명 (선착순)
- » 연수비: TaKaRa Intelligene<sup>®</sup> Chip 이용 - 38만원 (VAT별도)  
연수자 요정에 따라 Duplicate Chip을 이용한 연수가능.
- » 당사 홈페이지([www.takara.co.kr](http://www.takara.co.kr))에서 프로그램 등을 확인할 수 있습니다.  
(Tel: 031-456-6969 , Fax: 031-456-6963, E-mail: [r&d@takara.co.kr](mailto:r&d@takara.co.kr))

보다 자세한 사항은 당사 연구개발센터로 문의하시기 바랍니다.

## < MTP 과정 >

### » MTP 과정의 특징

1. TaKaRa Intelligene<sup>™</sup> CHIP 제공 (30만원 상당)
2. RNA sample 및 chip 관련 모든 시약 제공
3. Takara만의 Technical Tip
4. 연수자가 준비한 RNA sample로 실험 가능 (RNA 준비란 참조)
5. Microarray system 견학

### » RNA 준비

- 연수자가 직접 준비한 sample로도 연수가 가능합니다.
- 연수사정상 별도의 RNA QC는 없으므로 RNA QC에 신경을 써주시기 바랍니다.
- Gel 사진과 OD 측정 자료를 지참해 오시기 바랍니다 (실험 가능 여부 판단).
- RNA sample은 total RNA일 경우 30-50  $\mu$ g (3-5  $\mu$ g/ $\mu$ l)가 필요하며,  
mRNA일 경우 2  $\mu$ g이상 OD순도 1.80이상이 필요합니다.