

누에 特異 遺傳子의 探索 및 發現

金 尚 賢

農村振興廳 蠶絲昆蟲研究所緒論

緒 論

昆蟲類는 전체 動物種數의 반이상을 차지하는 거대한 生物群이다. 지금까지 世界에 알려져 있는 昆蟲의 種類는 약 180만이 되는데, 해마다 수천種의 昆蟲이 발견되고 있어 실제로는 1,000만種을 넘으리라고 생각하는 學者도 적지 않다. 이제까지 발견된 昆蟲의 化石 중에서 가장 오래된 시대의 것은, 영국 스코틀랜드 地方에서 찾아낸 날벌레의 化石인데, 이는 지금으로부터 약 4억년전인 고생대 대본기라 불리는 時代의 것이라 한다. 4억년이나 되는 進化의 歷史속에서 昆蟲類는 뛰어난 適應力에 의하여 增殖을 계속하며, 스스로 다양한 機能을 개발하여온 셈이다. 이렇듯 오랜 進化의 과정을 거치면서 얻은 昆蟲의 機能은 대부분 아직도 비밀상자 속에 깊이 감추어져 있으나 최근의 생명공학과 과학기재의 급속한 發展으로 우리는 그 비밀의 배일속으로 접근하고 있다.

昆蟲의 機能에 대한 解明은 生物學 특히 생명 현상 연구에 확실한 進展을 가져올 것이며, 그 應用은 農學이나 醫學分野는 물론이고, 環境科學이나 生命科學의 分野에 이르기까지 무한한 應用가능성을 內包하고 있다. 21세기를 향해 가장 발전성이 기대되는 生物學의 “主役” 자리는 틀림없이 昆蟲들이 차지하게 될 것이며 이들 昆蟲 중에도 누에는 實驗動物의 자격요건인 세대반복의 빠르기와 사육원가의 節減, 增殖 및 取扱의 용이성 등을 고려할 때 단연 優位를 차지하여 이제 누에는 “명주실을 만드는 벌레”에서 “명주실도 만드는 벌레”로 탈바꿈이 可能하리라 생각한다.

명주실도 만드는 벌레인 누에는 哺乳類 특히 사람에게서는 발견할 수 없는 變異種이 많이 있고, 또 人爲的으로 變異種을 만들수도 있어 그 遺傳子 해석으로 遺傳子의 확정과 機能解明을 통하여 21세기 人類에 지대한 유용성을 제공할 것으로 의심치 않는다.

이에 본 論題에서는 누에를 포함한 昆蟲에서 발견되는 다양한 遺傳子들의 분리, 동정을 통한 人類에 유용한 물질생산에 관하여 紹介하고자 한다.

本 論

生物은 DNA라는 생명현상에 관련된 화학물질을 가지고 있고, 이 물질은 유전정보를 擔當하여 生存을 유지한다. DNA는 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C), 티민(T)이라는 4種類의 염기와 디옥시리보오스라는 당, 인산으로 이루어져 있다. 염기와 당, 인산이 모여 뉴클레오티드(nucleotide)라는 遺傳의 기본 단위를 구성한다. 이들의 결합은 긴 사슬 모양을 이루고 있으며 이 사슬은 2가닥으로서 2중나선 構造를 하고 있다(Watson *et al.*, 1953).

유전정보는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민이라는 4가지 염기의 배열순서에 의해 DNA분자 속에 存在한다. 다시 말하면 유전정보란 DNA분자속에서 A, G, C, T 4문자로 쓰인 生命의 문장이다. 昆蟲의 유전정보는 수억~수십억쌍의 염기배열로 구성되어 있다 (Table 1). 이들로로부터 이루어지는 昆蟲의 모든 유전

Table 1. Sizes of various DNA molecules

Organism or paticle	Molecular weight, M
15 plasmid	1.4×10^6
Polyoma virus	3.2×10^6
Phage 186	18×10^6
Phage T7	25×10^6
Phage λ	32×10^6
F plasmid	62×10^6
F'lac plasmid	95×10^6
Phage T4	106×10^6
Vaccinia virus	121×10^6
Fowlpox virus	178×10^6
F'450 dimer plasmid	210×10^6
Mycoplasma homina	5.3×10^8
Most bacteria	$2.0-2.6 \times 10^9$
Yeast	6×10^9
Drosophila(fruit fly)	7.9×10^{10}
Human	8×10^{11}

정보를 가진 유전물질을 “昆蟲의 게놈(genome)”이라고 한다.

게놈 DNA에는 生命에 필요한 유전정보가 “遺傳子”라는 단위로 存在하고 있다. 사람의 경우 전체 遺傳子수는 5~10만으로 알려져 있다. 昆蟲 특히 초파리의 경우는 사람의 1/5에 해당하는 遺傳子를 가지고 있으며 이들 遺傳子는 서로 간격을 두고 게놈에 분산되어 存在하고 있다. 소수의 機能 RNA를 만드는 遺傳子를 제외하고, 모든 遺傳子는 단백질을 만들기 위한 정보의 단위이다. 그 내부를 보면 遺傳子의 발현을 제어하는 領域(promoter), 遺傳子의 발현으로 이어지는 단백질의 아미노산 배열을 유전암호에 따라 규정하는 領域(open reading frame), 마지막으로 전사(transcription)의 종결신호로 形成되어 있다. 단백질을 규정하는 領域 즉 open reading frame은 단백질을 규정하지 않은 領域 즉, 인트론(intron)에 의하여 몇으로 나누어져 있다. 이 “인트론”에 대하여, 단백질을 규정하고 있는 領域을 “엑손”이라 한다.

20세기 후반 DNA 재조합 기술 및 DNA의 염기배열 결정법으로 유전정보에 대한 지식의 급진전을 초래했다(Maxam *et al.*, 1977). 그러나 지금까지 構造가 해명된 遺傳子 수는 극소수에 불과하고, 대충 그 位置만이 推定되고 있는 遺傳子를 포함시킨다 해도 전체 遺傳子의 몇 %에 불과하다(GenBank, Release). 이들 미지의 遺傳子를 解明하기 위해서는 앞으로 어떻게 하면 될까? 이 큰 목표를 달성하는데에는 지금까지의 연구방법만 가지고는 빠른 시일안에 도달하기 힘들다. 이에 전세계적으로 사람을 비롯한 動物·植物·昆蟲에 이르는 광범위한 生命現象 해명 전략을 간단히 소개하므로써 人類에 유용한 昆蟲의 특이 遺傳子 探索의 방향을 제시하고자 한다.

1. 게놈 (Genome Project) 해석에 의한 遺傳子 探索

앞에서 언급했듯이 5~10만개로 알려진 사람의 遺傳子 중에서 지금까지 그 構造가 解明된 것은 600~700개에 불과하며, 대충 그 위치만이 推定되고 있는 遺傳子를 포함시킨다 해도 2,000개 정도 밖에 되지 않는다(Bishop *et al.*, 1974). 현재 95% 이상은 아무것도 모르는 상태이다. 사람의 植物, 昆蟲의 遺傳子도 대부분 미지의 숲에 놓여져 있는 상태다. 수십억의 염기쌍이 있는 高等生物의 DNA 염기배열 중 遺傳子 부분은 겨우 5%에 불과하고, 이들을 계획없이 무작위로 分析한 다른것은 무의미할 뿐 아니라 불가능하다. 따라서 미국을 중심으로한 국제적인 연구협력은 이들 미지의 遺傳子의 構造를 알기 위해 구체

적인 計劃을 세워 조금씩 進展하고 있어 이를 紹介하고자 한다.

현재 研究되고 있는 方法은, 우선 게놈 DNA 위에 分析의 거점이 되는 장소를 확보하고 그것을 출발점으로 하여 더욱 세밀한 分析을 추진하는 방식이 採擇되고 있다(Stephens *et al.*, 1990). 따라서 최초의 목표는 分析의 거점이 되는 장소를 게놈상에서 자리잡는(mapping) 즉 게놈지도 만들기이다. 사람의 경우 DNA 염기수는 30억개이며, 평균 100만 염기쌍씩 약 3,000의 領域으로 區分하여 遺傳子 지도를 작성하는 작업이 활발하게 進行되고 있다. 게놈 지도에는 유전적 지도와 물리적 지도가 있으며 유전적 지도는 감수분열시 상동염색체 사이에서 일어나는 交叉 빈도를 바탕으로 하여 만들어지는 지도로서 2세대, 3세대 가계에서 2가지의 形質이 동시에 子孫에게 전달되는 頻度を 測定하므로써 연쇄의 강도를 推定할 수 있고 이것을 “연쇄해석법”이라 한다. 이 방법으로 조사한 遺傳子사이의 交叉 頻度を “유전적 거리”라 하며 100회의 감수분열당 1회의 交叉를 일으키는 거리를 1cM이라 한다. 현재 DNA 개체의 차를 제한단편 장다형(RFLP)라 하며 이를 marker로 하여 이미 平均 5cM 단위의 연쇄지도가 만들어져 있고 現在 1~2cM 단위의 사람 게놈 遺傳子 지도를 만드는 일을 수행하고 있다(Roberts, 1990). 또한 물리적 지도는 제한 효소절단 부위의 지도로서 사람의 경우 약 3,000개의 단편으로 잘 나누는 “Not I”이라는 제한 효소가 있고 이를 이용하여 3,000개의 Not I 절단 단편의 게놈상에서의 순서를 나타내는 지도를 完成시키고자 하고 있다(Stephens *et al.*, 1992).

위 두가지 방법은 지도상에 經도와 緯도를 표시하여 지역을 區分하듯이 염색체를 구획정리한 후 자리가 결정된 遺傳子를 꺼내어 그 配列을 알아내고 궁극적으로는 수십억 쌍의 염기배열을 모두 밝히려는 計劃의 첫걸음인 것이다. HUGO(Human Genome Organization)는 美國, 英國, 蘇聯, 이태리, 日本, 프랑스, EC 공동체, 호주 등이 가입하여 각각 24개의 染色體를 나누어 염기서열을 分析중에 있으며 염기 1쌍의 분석에 \$3~\$5 정도의 경비가 소요됨을 勘案할 때 30억쌍의 인간 게놈 파악을 위해서는 엄청난 豫算과 15년이라는 기간을 소요될 것으로 발표하고 있다(美 에너지성).

HUGO '94 대회에서 美國 國立衛生研究所(NIH)의 인간 게놈 과제책임자인 Collins 博士는 現在의 進行狀況을 說明하였는데 인간의 DNA를 1년에 5천만개씩 糾明하여 1998년까지 5,000개의 遺傳子 marker를 확립한다는 야심찬 계획을 발표하였으며 향후 급속한

속도로 遺傳子의 糾明이 이루어질 것이고 遺傳子의 糾明이 질병의 診斷과 治療方法의 수립에 기본적인 단계임을 역설하였다.

한편 사람은 실험물이 아니므로 植物, 昆蟲, 선충 등 사람과 함께 몇몇의 모델 生物의 게놈 해석을 병행 수행하고 있는 실정이다. 선충의 경우 *C. elegans*(100 Mb) 게놈연구 進行狀況은 DNA 자동판독기 10대로 1년에 850만개의 染色體를 糾明하는 중이며, 6개의 染色體중 3번 染色體의 90% 이상을 糾明한 것으로 알려져 있다(Coulson *et al.*, 1988). 植物 分子生物學의 모델인 *Arabidopsis thaliana* (100Mb)는 美國과 유럽의 공동연구로 遺傳子 機能이 급속히 밝혀지고 있다(Stephens *et al.*, 1992). 昆蟲의 경우 *D. melanogaster* (150 Mb)는 사람의 1/5에 해당하는 遺傳子를 가지고 있지만 사람에서는 isoform으로 중복되는 遺傳子들이 많이 있기 때문에 機能的으로는 사람과 초파리의 遺傳子 숫자가 큰 차이가 없으며 초파리의 遺傳子는 機能을 알아내기 쉽기 때문에 게놈 과제와의 병행수행이 이루어지고 있다(Watson, 1990). 益蟲인 누에의 경우도 genome의 分析이 요구되고 있다.

위와같이 구체적인 計劃과 實行은 DNA 그 자체의 순서를 分析하는 方法이므로 앞으로 언급할 cDNA와 mRNA를 이용한 遺傳子 探索法의 母體가 될 것이다. 이 방대한 作業은 전세계적으로 힘을 모으고 정보를 交換해 가면서 進行되고 있는 실정이다.

2. cDNA 解析에 의한 遺傳子 探索

高等生物의 遺傳子는 發生, 生育단계에 따라 수만 여종 이상의 遺傳子에 의해서 정교하게 조절된다. 특히 昆蟲과 植物의 경우 여러 환경요인에 의해서 많은 影響을 받으며 또한 高等生物의 경우 게놈안에 존재하는 반복 염기서열은 構造遺傳子로 작동하지 않으므로 반복 염기서열이 배제된 cDNA를 분석하는 것이 遺傳子 構造연구에 效率적이다. 效率적인 cDNA 분석을 위해서는 무작위 염기서열 분석에 의한 발현 유전자 꼬리표 (Expressed Sequence tags) 作成法(Adams *et al.*, 1991), 특히 RNA를 이용한 차별화 선별 (Differential screening)法(Hoog, 1991), cDNA 遺傳子 은행 성숙화 (preprocessing) 方法(Fargnoli, 1990) 등이 있다.

1) 發現 遺傳子 꼬리표 작성법(ESTs)에 의한 遺傳子 探索

cDNA 염기분석을 이용한 cDNA 카탈로그 作成은 유전자원의 대량확보와 더불어 새로운 遺傳子의 동정, 染色體 지도작성, 게놈 遺傳子 分析에 유용하게 이용된다. cDNA 카탈로그는 發現遺傳子 꼬리표(Expre-

ssed Sequence Tags)를 이용하며, 이 ESTs는 mRNA로 부터 얻어진 150bp 이상의 DNA 염기서열 단편을 의미한다. 이러한 ESTs는 發現된 遺傳子의 exon 부위만을 포함하기 때문에 발생단계별 혹은 組織 특이적인 遺傳子의 선별에 효과적으로 이용된다. ESTs를 이용하여 표지된 게놈 遺傳子 부위를 Sequence tagged sites (STSs)라 한다. 이는 게놈 遺傳子 作成을 效果的이고 經濟的으로 수행하는 것을 가능하게 하여 현재 進行되고 있는 ESTs를 이용한 cDNA 카탈로그 작성은 사람, 쥐, 초파리, 선충 등에서 행하여지고 있다(Olson, 1989). 사람의 경우 Adams 등(1991)은 사람의 뇌 cDNA 遺傳子 은행으로부터 任意로 선정한 cDNA 부분 염기서열을 가지고 데이터 分析을 수행한 결과 32%에 해당하는 197개의 ESTs가 이미 알려진 사람의 遺傳子와 높은 相同性을 나타내었고, 48개의 ESTs는 사람이외 다른 種의 遺傳子들과 相同性을 보였다. 한편 230여개의 ESTs는 데이터베이스에 등록된 遺傳子들과 유의할만한 相同性을 나타내지 않았으며 생산된 ESTs 중 46개를 효소중합반응(polymerase chain reaction)을 이용하여 染色體 상의 지도를 作成하였다. 이 研究結果는 ESTs를 染色體 지도 작성에 직접적으로 응용한 예로 蠶絲昆蟲 研究所 昆蟲微生物研究室 金權榮 博士팀에서는 누에의 cDNA 遺傳子 은행으로부터 200여개의 遺傳子를 임의로 選定하여 부분염기서열을 決定하고 데이터 분석을 수행한 결과 분석이 이루어진 40개 클론중 4개 遺傳子는 누에에서 밝혀진 遺傳子이고, 15개 遺傳子는 다른 昆蟲의 遺傳子와 相同性을 나타내었으며, 21개 遺傳子는 糾明되지 않은 새로운 遺傳子로 밝혀졌다. 이후로 부분염기서열을 決定하였으나 데이터 分析을 수행하지 못한 160개의 cDNA 遺傳子를 分析하여 유전자원을 확보하고, 이 遺傳子들을 효소중합반응에 의한 염색체상의 位置 把握에 應用하면 染色體 지도 작성에 應用할 수 있을 것으로 豫想된다.

2) 差別化 選別法(Differential screening)에 의한 特異 遺傳子 探索

差別化 選別法(differential screening)은 서로 다른 組織, 環境, 分化 단계별로 발현되는 서로 다른 mRNA를 탐침(probe)으로 하여 다량의 새로운 特異 遺傳子를 選別하는 방법이다. Differential screening 전략을 이용하면 遺傳子들을 abundance(multi copy 遺傳子)와 rare sequence(low copy 遺傳子) 그룹으로 나눌 수 있으며 이들 그룹의 遺傳子 염기서열 分析을 수행하면 重複을 피하면서 기존의 밝혀져 있지 않는 새로운 遺傳子들을 探索할 수 있다. 스웨덴의 스톡홀름대의 Christer Hoog(1991)는 mouse를 利用하여

Table 2. A comparison of random and differential cDNA clone isolation strategies

	Random Adams <i>et al.</i>	Random (rare + abundant)	Differential (rare)
No database match	38%(49%)	56%	75%
Database match humans	33%(41%)	—	—
Database match-mouse	—	37%	16%
Database match-other species	8%(10%)	7%	9%

cDNA 遺傳子 은행에서 무작위 염기서열 方法과 differential screening 方法의 효율성을 제고해서 발정전 蠶丸의 특이 遺傳子를 選擇하기 위한 전략을 발표하여 이를 紹介하고자 한다.

우선 발정전 蠶丸으로부터 200여개의 cDNA 클론을 무작위 염기서열 분석한 결과 63%가 새로운 遺傳子였고 differential screening법에 의해서는 84%가 새로운 遺傳子으로 밝혀져 위 두가지 方法 중 differential screening법이 효율성이 높은 것으로 推定하였다 (Table 2). 발정전 蠶丸 特異 遺傳子를 선별하기 위해서 간, 콩팥, 심장의 mRNA를 混合하여 cDNA를 제작하고, 蠶丸의 mRNA를 抽出하여 cDNA를 제작하여 이들 각각을 특이 遺傳子 선발을 위한 탐침 (probe)으로 사용하였다. 발정전 蠶丸 cDNA 遺傳子 은행으로 부터 filter 당 200개 plaque를 고정하고, 상기 2種의 탐침을 이용하여 hybridization한 결과 약 30%는 混合 mRNA를 탐침으로한 membrane에서 모두 반응이 이루어진 반면, 70%는 蠶丸 mRNA를 탐침으로한 membrane에서 반응이 이루어졌다. 30%의 plaque은 abundance mRNA 그룹으로 구분하였고 70%의 plaque은 rare mRNA 遺傳子 그룹으로 구분하였다. abundance 遺傳子 그룹에서 61개 clone을 rare 遺傳子 그룹에서 140개 클론을 選擇하여 다음과 같은 結果를 얻었다. Table 3에서 보면 200개 클론 중 171개가 insert가 있었으며 rare 遺傳子 그룹에서는 84%가 新規 遺傳子이고 abundance 遺傳子 그룹에서는 12%가 新規 遺傳子로 發見되었다.

한편 蠶絲昆蟲研究所 昆蟲微生物研究室 金權榮 博士팀에서는 누에에서 抗菌 誘導후 예상되는 누에생체 방어 메카니즘을 遺傳子 수준에서 檢索하기 위하여 아래와 같은 사업을 수행하였다. 누에생체에 *E. coli* K12를 주사하여 8시간 경과후, 抗菌 유도 누에로부터 cDNA 遺傳子 은행을 만들었다. 이로부터 plasmid DNA를 分離하여 건강한 누에와 항균 유도 누에로부터 分離한 mRNA를 이용하여 differential screening한 결과 생체방어 특이 발현 遺傳子 32개를 選擇하여 遺傳子의 insert 크기를 推定하고, 부분 또는

Table 3. Comparison of sequence data to the EMBL nucleic acid database

Rare group	no.	%
No database match	90/120	75
Database match-mouse	19/120	16
Nuclear genes	9	
Mitochondrial genes	—	
Ribosomal genes	1	
Repeated sequences	9	
Database match 0 other species	11/120	9
Rat	5	
Human	6	
Abundant group	no.	%
No database match	5/51	10
Database match-mouse	45/51	88
Nuclear genes	11	
Mitochondrial genes	34	
Ribosomal genes	—	
repeated sequences	—	
Database match-other species	1/51	2
Human	1	

전체 염기서열 분석을 수행한 결과 29개의 新規 遺傳子를 얻을 수 있었으며 이들 중 2種은 新規 抗菌 蛋白質 遺傳子임을 밝혀내었다.

上記 結果를 고려할 때 누에 계승 연구과제와 병행수행을 한다면 생체방어에 의해 誘導되는 遺傳子들의 위치와 그 機能을 밝힐 수 있을 것으로 推定된다. 또한 differential screening을 이용하면 다양한 자극에 대응하는 유도 遺傳子 탐색에 적절할 것으로 생각된다.

3) cDNA 遺傳子 은행 성숙화(cDNA library preprocessing)에 의한 遺傳子 探索

cDNA 遺傳子 探索시 기존의 밝혀져 있지 않은 새로운 遺傳子를 발견할 확률을 높이기 위해서는 무작위 염기서열 분석법보다 차별화 선별법이 勸獎된다 (Maniatis *et al.*, 1982). 그러나 組織 特異 遺傳子,

Table 4. DNA-Inducible cDNA Clones Isolated Hybridization Subtraction

cDNA clones	Number of isolates	RNA (kb)	Induction	cDNA clones
CHO cell library(library A)				CHO cell library (librar)
A29	2	4.8	3	(continued)
A141	1	4.3	3.1	A33
A31	2	3.9	2.1	A7
A995	1	3.9	2	A50
A143	1	3.7	4	A87
A88	1	3.7	1.6	A162
A8	1	3.1	3.5	A115
A112	1	2.7	1.8	A72
A170e	1	2.7	1.9	A83
A78	1	2.4	1.6	A180
A15	1	2.4	1.6	A94
A34	1	2.2	2.3	A70
A84	1	2.1	2.9	V79 cell library(library U)
A20	2	2.0	4.9	U1(metallothionein γ)
A9	8	1.9	5.3	U2(metallothionein t)
A13e	1	1.9	3.4	U4
A148	1	1.9	4.1	U49
A71	1	1.75	1.6	U56
A109	1	1.4	3.9	U52
A18	4	1.4	3.1	U53
A45	1	1.4	4.2	U5
A77	2	1.37	2.5	U64
A26	2	1.3	2.5	U30
A153	5	1.0	3.1	U44
A90	1	1.0	1.7	U45
A185	1	1, 0.77	1.6	Actin

發生分化 特異 遺傳子 등 copy수가 낮은 미량의 遺傳子를 확보하기 위해서는 cDNA 遺傳子 은행의 성숙화(preprocessing) 技術을 이용하여야 하고, 성숙화 技術을 대표하는 subtraction 遺傳子 은행 제작법을 紹介하고자 한다(Fargnoli, 1990).

動物細胞의 경우 기존의 differential screening 方法은 세포당 100 copy 이상 存在하는 遺傳子를 효율적으로 選別할 수 있는 方法이다. 즉 세포당 총 $2 \sim 5 \times 10^5$ 개의 mRNA가 存在하며 또한 $1 \sim 2 \times 10^4$ 개의 서로 다른 mRNA가 存在하는 상황에서 abundance level이 0.1% 이상의 특정 염기 構造가 많이 選別된다(Lewin, 1985). 그러나 세포당 $1 \sim 2 \times 10^4$ 개의 서로 다른 mRNA들중 거의 대부분의 abundance level은 0.1% 이하이며 이들을 效果的으로 選別하기에는 어려움이 따른다(Sargent *et al.*, 1983; Hedrick *et al.*, 1953; Timberlake, 1980). 이집에 착안하여 미국 국립보건원(NIH) Fargnoli 등(1990)은 아래와 같은 方法으로 mRNA의 abundance level이 0.05% 이하의

자외선에 의해 誘導되는 遺傳子들을 풍부(enrichment)하게 하여 발현률이 낮은 遺傳子를 效率적으로 分離하였다.

우선 chinese hamster ovary 細胞에 자외선을 조사한 후 이들로 부터 cDNA를 作成하고 대조구로 정상세포의 RNA를 分離하였다. 고농도의 자외선 조사 cDNA와 대조 RNA를 반응시켜 異種결합체(heteroduplex cDNA: RNA)는 제외하고, 결합하지 않은 자외선 조사 single strand cDNA만을 풍부화(enrichment) 한다. 이렇게 함으로서 대조에서 발현되는 遺傳子를 제거한 후 풍부화된 자외선 조사 single strand cDNA를 자외선 조사한 세포에서 抽出한 RNA와 結合시켜 同種결합체(duplex cDNA: RNA)를 作成하고 RNA를 제거하여 풍부화된 cDNA를 얻었다. 上記方法으로 얻은 수십종의 자외선 조사 誘導遺傳子(UV-irradiated inducible gene)는 결국 DNA 손상시 誘導되는 遺傳子(DNA-damage-inducible cDNA clone)로 이것의 構造와 機能을 밝히면 DNA 손상에 의한 돌

Table 5. Comparison of cDNA Synthesized with AMV or MMLV Reverse Transcriptase

Enzyme	Yield (%)	Duplex cDNA (%)	
		C _{ot} <10 ⁻¹	C _{ot} >10 ²
AMV	40-70	<10	31± 22
MMLV	40-70	<5	6.6± 3.2

연변이의 진단 및 치료에 決定的 役割을 할 것이다. Table 4은 上記方法으로 얻은 誘導遺傳子이고, Table 5는 본 實驗을 하는데 있어 중요한 役割을 담당하는 역전사 효소의 種類에 따른 效率性을 제고한 표이다. MMLV 역전사 효소는 적어도 5 Kb 정도를 반응시키며, AMV 역전사 효소는 1Kb 미만의 비교적 짧은 RNA에 效率的인 것으로 나타났다.

이와같이 上記言及한 方法은 세포내 공통분모를 형성하는 遺傳子들은 초기에 제거함으로써 特異遺傳子 探索에 적절함으로 누에세포에서 發現되어지는 low copy의 遺傳子 특히 single copy의 遺傳子도 탐색될 수 있을 것으로 생각되며 계통분류를 위한 제한단편장다형(RFLP)의 탐침 선발에 效率的인 것으로 생각된다.

3. 差別化 表現(differential display)에 의한 特異 遺傳子 探索

高等生物의 경우 10만개의 遺傳子가 있고 이중 약 15%만이 세포개체들에서 共通的으로 發現된다(Peng Liang, 1992). 그러나 우리는 발달분화, 항상성 유지, 자극에 의한 反應, 세포 계대조절, 노화 심지어는 programmed cell death 현상 등 모든 生의 過程 속에서 決定되는 遺傳子 및 病理學的 변이에 따른 遺傳子 발현조절 기구변이와 같은 生物學的 進과정(biological process)의 程度 등을 分析하고자 한다(Maniatis et al., 1987; Pardee, 1989; Lewin, 1990). 이와 같은 비밀의 숲에서 發現되는 mRNA를 동정하기 위하여 Harvard大의 Peng Liang 등은 mRNA 差別化 表現(mRNA differential display)法을 提案하였다(Peng Liang, 1993).

이 方法을 이용하면 最近까지 주로 이용되어 왔던 差別化 選別(differential screening)法과 subtraction library 方法의 재현성 불가 및 많은 양의 RNA를 要求하는 단점을 극복할 수 있다. 이 方法에서 核心은 固定된 oligo-dT primer(anchored oligo-dT primer)를 이용한 역전사 遺傳子 增幅이다. 이때 사용되는 anti-sense primer는 11~12개의 티민 oligomer에 2개의

3' 염기를 附加하여 特異的 反應을 增加시켰으며, 다양한 任意의 sense primer를 조합하여 약 15,000여 種의 서로다른 mRNA들을 동시에 發現시켰다. 또한 이들 發現된 遺傳子를 이용한 full length cDNA와 이들의 genomic clone을 얻는데 成功하였다.

이 方法은 RNA 수준에서 表現되는 여러가지 遺傳子를 직접 選抜함으로써 實驗過程 중 놓칠 수 있는 copy수가 낮은 遺傳子 探索에 適合하며 특히 昆蟲과 바이러스와의 分子 生物學的 關係 즉 감염시간에 따른 宿主내 바이러스 遺傳子의 合成 및 이로부터 誘導되는 昆蟲체내 변화 관련 遺傳子 등과 같은 宿主내 變化過程에서의 特異 遺傳子(process specific gene)들을 분리동정하는데 有用하게 적용되리라 생각된다.

結 論

上記 言及한 다양한 遺傳子 동정법은 進化的 歷史속에서 다양한 機能을 발달시킨 生物의 遺傳子 관련 研究의 실질적인 수행방법이다. 昆蟲 중에서도 특히 누에는 科學과 산업을 위한 좋은 實驗動物이고 應用的 측면에 있어 무한한 가능성을 내포하고 있어 上記方法들을 이용할 경우 人類에 有用한 물질생산을 담당하는 特異 遺傳子를 누에 등 昆蟲으로부터 效果的으로 探索할 수 있다.

실제로 누에를 포함한 昆蟲의 抗菌, 抗바이러스 蛋白質 생산 遺傳子 또는 유용 호르몬 관련 遺傳子의 탐색과 전편에서 논한 baculovirus를 이용한 高等生物 발현계를 접목 활용하였을 때 이들은 人類에 有用한 物質生産을 통한 21세기의 “꿈”을 現實化시키는 قدم들이 될 것이다.

引 用 文 獻

Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merrill, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., Kerlavage, A. R., McCombie, W. R. and Venter, J. C. (1991) Science 252: 1651-1656
 Adams, M. D. et al. (1991) Science 252: 1651-1656
 Adams, M. D. (1992) Nature 355: 632-634
 Bishop, J. O., Morton, J. G., Rosebach, M. and Richardson, M. (1974) Nature 250: 199-204
 Coulson, A., Waterson, R., Kiff, J., Sulton, J. and Kohara, Y. (1988) Nature 335: 184
 Department of Health and Human Services, Department of Energy, A Five-Year Plan for the Human Genome Project(DOE, Washington, DC, in press)
 Fargnoli, J. (1990) Anal. Biochem. 187: 364-373

GenBank, Release 62(15 December 1989)

- Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A. and Davis, M. M.** (1984) *Nature(London)* **308**: 149-153
- Hoog, C.** (1991) *Nucleic acid Reserch* **19(22)**, 6123-6127
- Lewin, B.** (1985) *Genes II*, p. 307, Wiley, New York.
- Lewin, B.** (1990) *Cell* **61**: 743
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harber Laboratory, Cold Spring Harber, NY.
- Maniatis, T., Goodbourn, S. and Fisher, J. A.** (1987) *Science* **236**: 1237
- Maxam, A. M. and Gilbert, W.** (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 560
- Olson, M.** (1989) *Science* **245**: 1434
- Pardee, A. B.** (1989) **246**: 603
- Peng Liang et al** (1992) *Science* **257**: 967-971
- Peng Liang et al** (1993) *Nucleic Acid Reserch* **21(14)**, 3269-3275
- Roberts, L.** (1990) *ibid* **247**: 281
- Sargent, T. D. and Dawid, I. B.** (1983) *Science* **222**: 135-139
- Stephens, J. C. et al.** (1990) *Science* **250**: 237
- Stephens, J. C. et al.** (1992) *Science* **258**: 1580
- Timberlake, W. E.** (1980) *Dev. Biol.* **78**: 497-510
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C.** (1953) *Nature* **171**: 737
- Watson, J. D.** (1990) *Science* **248**, 44