

KAERI/RR-3087/2009

방사선 유도 신규 전사체(*uscA*) 규명 및
발현조절 메커니즘 연구

Characterization of a novel radiation-inducible transcript,
uscA, and analysis of its transcriptional regulation

KAERI

한국원자력연구원

제 출 문

한국원자력연구원장 귀하

본 보고서를 2009 연도 “방사선 유도 신규 전사체(uscA) 규명 및 발현 조절 메커니즘 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 03.

과 제 명 : 방사선유도 신규
전사체 규명
및 발현 조절
메커니즘 연구

과제책임자 : 임 상 용

참 여 자 : 조 민 호
김 동 호

KAERI

요 약 문

I. 제 목

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*) 규명 및 발현조절 메커니즘 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 1990년도 초에 전리방사선(ionizing radiation)이 동물세포 유전자의 발현에 미치는 영향이 보고 된 이후 다양한 유전자들의 방사선 반응연구가 시작되었으나 진핵생물의 복잡성으로 인하여 방사선 반응 관련 조절 메커니즘은 아직 정확하게 밝혀지지 않았음.
- 그간 방사선 살균의 대상으로만 연구되어져 온 세균은 진핵생물보다 간단한 구조를 가졌으므로 세균에서 방사선 반응 유전자 규명 및 발현 연구는 생물의 방사선 반응 관련 조절 메커니즘의 연구에 있어 중요한 단서를 제공할 수 있을 것임.
- 세균에서 방사선에 의하여 발현이 유도되는 전사체의 특성을 규명하고 발현관련 조절인자를 탐색함으로써 **생물체의 방사선 반응 메커니즘을 체계적으로 이해할 수 있는 기초기반 자료를 확보하고자 함.**

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 반응 연구
 - 미생물을 여러 조건에서 배양한 후 다양한 선원의 방사선을 조사하여 *uscA*의 방사선 반응 최적 조건 규명
 - 다른 oxidative stress 환경에서 *uscA*의 발현 변화를 방사선 조사에 의한 발현 변화와 비교하여 방사선 특이 반응성 분석

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 발현 특성 규명
 - Promoter deletion 등을 통하여 방사선 특이 반응에 필요한 *uscA*의 핵심 promoter 부위 규명
 - Primer extension assay를 통하여 *uscA*의 전사 개시 부위 탐색

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 small RNA 규명
 - Reverse transcription을 통하여 *uscA*의 전사체 크기 규명
 - Real-time PCR을 통하여 chromosome에서 *uscA*의 길이별 발현 정도 분석

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 유도 메커니즘 규명
 - *uscA*의 발현 조절 부위를 증폭하여 단백질이 붙을 수 있는 DNA-affinity column 제작
 - LC-MS/MS를 이용하여 *uscA* 방사선 조절 부위에 특이적으로 결합된 단백질 규명

IV. 연구개발결과

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 반응 연구
 - *uscA*는 2 Gy의 방사선 조사에 의해 발현이 약 100배 증가하였으나 혐기적 조건에서는 방사선 반응성이 관찰되지 않았으며 OH radical에 의해서는 발현이 변하지 않았으나 superoxide에 의해서는 약간 발현이 증가하였음. 그러나 방사선 조사에 비하여 그 발현정도가 매우 미약하므로 *uscA*는 방사선에 의하여 발현이 특이적으로 유도되는 것으로 판단됨.

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 발현 특성 규명
 - Primer extension assay를 통해서 *uscA*의 발현시작점(transcriptional start site)을 결정하였으며 *uscA*의 염기서열의 순차 제거를 통하여

*uscA*의 방사선 반응 관련 핵심 부위를 규명하였음.

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 small RNA 규명
 - *uscA* 전사체의 역전사실험을 (reverse transcription assay)한 결과 *uscA* 전사체의 크기는 약 250 bp로 추정됨.

- 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 유도 메커니즘 규명
 - *uscA* promoter 지역을 이용한 DNA affinity assay 결과 Tryptophanase, ribosomal 단백질, Ef-Tu 등이 검출되었으며 이들 단백질은 *uscA*의 mRNA와 결합하는 것으로 추정됨. 156개의 아미노산으로 이루어진 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 단백질이 *uscA*에 결합되는 것을 확인함.

V. 연구개발결과의 활용계획 및 건의사항

- 본 연구를 통하여 *uscA*는 약 250 bp 정도의 크기를 가진 small RNA로 밝혀졌음. 향후 연구를 통하여 *uscA*의 방사선 반응성 관련 기능을 규명하고 생물체 내 고유의 방사선 반응 메커니즘을 밝혀 방사선 유전체학(radiogenomics)의 이론적 배경을 확립함

- 방사선 반응성이 우수한 *uscA*의 프로모터를 방사선 항암 유전자치료 (radiogenic therapy)에 적용하여 기존의 단점을 극복한 새로운 방사선 항암 유전자 치료 기술 개발

- 본 연구의 결과는 2010년도에 시작되는 원자력연구원 신규 정부출연금 사업 연구과제인 “방사선 유도 유전자 연구 (연구비 8억/년)”과제 수주에 활용되었음.

SUMMARY

I. Project Title

- Characterization of a novel radiation-inducible transcript, *uscA*, and analysis of its transcriptional regulation

II. Objective and Importance of the Project

- A study of ionizing radiation (IR)-induced alterations in the transcriptional expression of animal cells were really started in the early 1990s, but the regulation mechanism of radiation inducible genes is still poorly understood.
- Characterization of radiation inducible genes and study of its transcription in bacteria can give us important clues to the radiation response mechanism of living bodies, because bacteria has more simple structure than eucaryotic cells, which has been considered as a target of radiation sterilization.
- The objective of this project is to collect the fundamental data that can be used for understanding of radiation response mechanism of living bodies through the characterization of a novel radiation inducible transcript and screening of its transcriptional regulators.

III. Scope and Contents of Project

- Characterization of radiation response of *uscA*
 - Characterization of an optimal-expression condition of *uscA* related to the growth phase of *Salmonella* and the kinds of radiation source
 - Comparing the expressionern of *uscA* between ionizing radiation and other agents that cause oxidative stress

- Characterization of transcriptional pattern of *uscA*
 - Identification of a core radiation-response element within the *uscA* promoter region using promoter deletion assay
 - Determination of transcriptional start site of *uscA* using primer extension assay

- Study for the possibility that *uscA* is small RNA
 - Identification of a size of *uscA* transcript using reverse transcription PCR
 - Real-time PCR analysis of the level of *uscA* expression on chromosome depending on the length of *uscA*

- Investigation of radiation induction mechanism of *uscA*
 - Construction of a DNA-affinity column by amplification of the core radiation-response element of *uscA*
 - Characterization of transcriptional regulators of *uscA* using LC-MS/MS

IV. Result of Project

- Characterization of radiation response of *uscA*
 - The transcriptional expression of the *uscA* promoter (P_{uscA}) only occurred under aerobic conditions and a dose of 2Gy maximally activated transcription of P_{uscA} . Interestingly, P_{uscA} activity was not significantly induced by other radicals such as H_2O_2 , OH radicals, and superoxide radicals, suggesting the specific induction of *uscA* by gamma irradiation.

- Characterization of transcriptional pattern of *uscA*
 - Primer extension assay showed the transcription of *uscA* was initiated at 170 bp upstream of the *cyoA* start codon. The deletion analysis of *uscA* promoter defined a region from a position -20 to position +111 relative to the start of transcription as necessary in order to observe the radiation inducibility of *uscA* that is repressed under non-irradiated conditions.

- Study for the possibility that *uscA* is small RNA
 - The size of *uscA* was determined through reverse transcription assay, approximately 250 bp. Considering the usual size of small RNA that has regulatory function is 30 to 300 bp, the possibility that *uscA* is small RNA is very high.

- Investigation of radiation induction mechanism of *uscA*
 - We found that tryptophanase, ribosomal proteins, and elongation factor (Ef-Tu) could bind to the *uscA* promoter region through DNA affinity assay. Because these proteins are involved in the translation step of proteins, it is likely that *uscA* is a component of translation machinery. In addition, an unnamed protein whose function is not revealed was also detected. This protein is a good material of next research.

V. Proposal for Applications

- The result of this project shows the possibility that *uscA* is small RNA. If we succeed in proving that the function of *uscA* is involved in radiation response of living bodies, *uscA* can be used in demonstrating the unique radiation response pathway and in establishing "Radiogenomics".

- The radiation induction of *uscA* originates from its promoter. This radiation inducible promoter can be used in radiogenic therapy in which the radiation-inducible promoter activates a transgene encoding a cytotoxic protein in tumor cells.

- A new project, "Research for radiation inducible gene" was launched this year (2010) based on the results of this project.

CONTENTS

I. Introduction	1
1. Objective of project	1
2. Importance of project	1
3. Scope of project	3
II. Present status of technical development	5
1. Present status of foreign technical development	5
2. Present status of domestic technical development	8
3. Preliminary study of the novel radio-inducible transcript	8
4. The vulnerability of current techniques	10
III. Contents and results of project	11
1. Characterization of radiation response of <i>uscA</i>	11
2. Characterization of transcriptional pattern of <i>uscA</i>	17
3. Study for the possibility that <i>uscA</i> is small RNA	21
4. Investigation of radiation induction mechanism of <i>uscA</i>	23
IV. Attainments and contribution of project	33
1. Attainments of project	33
2. Contribution to relevant fields	34
V. Proposal for applications	35
VI. References	37

목 차

제 1 장 서론	1
1. 연구개발의 목적	1
2. 연구개발의 필요성	1
3. 연구개발의 범위	3
제 2 장 국내외 기술개발 현황	5
1. 국외 기술개발 현황	5
2. 국내 기술개발 현황	8
3. 방사선 유도 신규 전사체 선행연구	8
4. 현 기술상태의 취약성	10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	11
1. 방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 방사선 반응 규명	11
2. 방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 발현 특성 규명	17
3. 방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 small RNA 규명	21
4. 방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 방사선 유도 메커니즘 규명	23
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	33
1. 연구개발 목표 달성도	33
2. 관련 분야 기술발전예의 기여도	34
제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획	35
제 6 장 참고문헌	37

제 1 장 서론

1. 연구개발의 목적

방사선에 의하여 생성이 증가되는 미생물 유래 신규 방사선 유도 전사체 (*uscA*)의 특성 및 발현조절 인자를 규명하여 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의한 반응과 구별되는 방사선 특이반응 메커니즘을 체계화할 수 있는 기초기반 자료를 확보한다.

2. 연구개발의 필요성

(1) 기술적 측면

- 현재 수행되고 있는 식품생명, 농학, 의학 분야의 방사선 이용연구는 산업기술 및 macro 수준의 개량기술개발이 주를 이루고 있으며, 특히 생명공학 분야의 접근방법은 아직 기초적인 수준에 머무르고 있는 실정임.
- 현재 방사선 및 동위원소(RI)이용 연구 분야에서는 새로운 RT/BT 융합기술 개발이 강조되고 있으나 아직까지 방사선생명공학 분야에서 괄목할 만한 연구는 이루어지지 않고 있음. 이 분야의 발전을 위해서는 생물체의 방사선 반응과 관련된 기초 메커니즘의 체계화가 시급함.
- 최근 유전체학(genomics)/단백질체학(proteomics) 등의 첨단 생명과학 기술을 이용하여 방사선에 의한 생체내의 유전자 발현변화를 연구하는 방사선 유전체학 (radiogenomics)의 개념이 정립되고 있으나 아직 개별 유전자의 발현을 연구하는 수준에 머물러 있음.
- 그간 동물 및 식물세포 등의 진핵생물에서 방사선에 의하여 반응이 유도되는 유전자들은 밝혀져 왔으나 진핵생물의 복잡성으로 인하여 방사선 반응 관련 조절 메커니즘은 상대적으로 연구가 미진하였음.

- 세균과 같은 원핵생물은 진핵생물보다 간단한 구조를 가졌으므로 세균의 방사선 반응 시스템 연구는 향후 진핵생물의 방사선 반응 관련 조절 메커니즘의 연구에 있어 중요한 단서를 제공할 수 있음.
- 감마선과 같은 전리방사선은 hydroxyl radical등을 생성하므로 일반적으로 방사선에 반응하는 유전자들은 hydrogen peroxide (H₂O₂)와 같은 oxidative stress 조건에서도 발현이 유도되는 특징을 가짐. 그러므로 방사선에 반응하는 유전자의 방사선 특이성 여부 및 방사선 특이 반응 관련 조절 인자의 규명은 방사선 반응 시스템의 중요한 기초기반 이론을 제시할 수 있음.

(2) 경제·산업적 측면

- 지금까지의 대부분의 방사선 반응 유전자 연구는 인체에 미치는 방사선의 영향과 방사선 암치료의 효과증진을 위한 암세포 사멸 및 성장억제 관련 유전자에 대한 발현 연구가 대부분이며, 이 연구결과는 방사선 민감제 또는 방사선 방호제 등을 개발하는 데에 국한하여 활용되고 있음.
- 생물체의 방사선 반응계 및 방사선에 특이적으로 발현 혹은 억제되는 유전자나 프로모터를 활용하여 유전자 기능연구나 유용물질 생산 등의 생물공학에 활용하기 위한 연구는 거의 없는 실정임.
- 미생물은 대사산물 발효 및 유용산물 등의 생산에 수십 년간 사용되어왔으므로 미생물의 방사선 특이반응 연구를 통한 방사선 반응계 분석은 방사선을 기반으로 하는 미생물 생물공학기술의 핵심기술 확보를 가능하게 할 것임.
- 이러한 방사선 반응계 활용 신규 생물 공정의 개발은 유용산물의 효율적 생산에 활용되어 기초의약학, 식품생명공학, 생물공학분야의 산업에 큰 파급효과를 나타낼 것으로 예상됨.
- 본 과제에의 결과는 방사선융합기술 개발 뿐 아니라 생물공학 연구사업 전체에 새로운 패러다임을 제공하여 국가 산업발전의 원동력이 될 수 있는 첨단산업 및 고부가가치 기술 창출의 기반 구축에 활용 가능.

(3) 사회·문화적 측면

- 생명공학 관련 연구의 경우 장기간의 연구기간이 소요되고 학술적인 연구 성과물의 생산이 응용연구에 비하여 상대적으로 낮으나 본 연구는 RT/BT 융합 기술이라는 독창성과 창의성이 확보되어 있으므로 방사선과 생명공학 융합기술 기반기술 연구개발은 국가 방사선 기술 고도화 및 기술 선점의 효과가 있을 것으로 판단 됨.
- 본 과제 의 연구 결과는 방사선 기술의 생명공학적 이용 활성화 및 다양화를 위한 기초기반 확보로 방사선 융합 생명공학 기술 개발의 토대를 마련하여 국민 삶의 질 향상이라는 비전과 원자력 기술의 평화적 이용에 기여할 수 있음.



KAERI

3. 연구개발의 범위

(1) 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 반응 연구

- 미생물을 여러 조건에서 배양한 후 다양한 선원의 방사선을 조사하여 *uscA*의 방사선 반응 최적 조건 규명
- 다른 oxidative stress 환경에서 *uscA*의 발현 변화를 방사선 조사에 의한 발현 변화와 비교하여 방사선 특이 반응성 분석

(2) 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 발현 특성 규명

- Promoter deletion 등을 통하여 방사선 특이 반응에 필요한 *uscA*의 핵심 promoter 부위 규명
- Primer extension assay를 통하여 *uscA*의 전사 개시 부위 탐색

(3) 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 small RNA 규명

- Reverse transcription을 통하여 *uscA*의 전사체 크기 규명
- Real-time PCR을 통하여 chromosome에서 *uscA*의 길이별 발현 정도 분석

(4) 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 유도 메커니즘 규명

- *uscA*의 발현 조절 부위를 증폭하여 단백질이 붙을 수 있는 DNA-affinity column 제작
- LC-MS/MS를 이용하여 *uscA* 방사선 조절 부위에 특이적으로 결합된 단백질 규명

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외 기술 개발 현황

(1) 방사선 유도 유전자(radio-inducible gene) 연구

- 1990년도 초에 전리방사선(ionizing radiation)이 동물세포 유전자의 발현에 미치는 영향이 보고 된 이후 많은 연구자들이 방사선에 의하여 발현이 증가하는 유전자들에 대한 연구를 시작하였고 이후 2000년도에 들어오면서 세포방호, DNA 손상회복, 세포주기조절, 세포성장/사멸조절 유전자의 방사선에 대한 반응연구가 활발히 이루어지고 있음.
- 동물 세포의 EGR1(early growth response), c-JUN, β -actin, interleukin 1, protein kinase C, bFGF, tissue plasminogen activator(tPA), GADD45 등을 만들어내는 유전자들이 방사선에 의하여 발현이 유도되는 것으로 밝혀짐^[1].
- 특히 EGR1 유전자의 경우 방사선 반응과 관련된 염기서열(CArG element)이 분석 되었으며 이 유전자의 promoter를 이용하여 방사선 암치료의 효과를 증진하기 위한 연구 (radiogenic therapy)가 지속되고 있음 (그림 1)^[2].

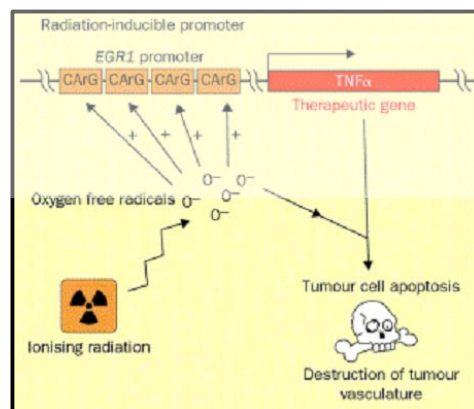


그림 1. Radiogenic therapy 개념도

- 동물세포의 유전자가 아닌 bacteria의 유전자를 이용한 radiation- induction system은 *Clostridium*을 대상으로 한 것이 유일한 경우로 DNA repair system에 관여하는 *recA* promoter의 개량을 통하여 radio-responsive promoter를 개발하기 위한 연구를 진행 중^[3].

(2) 방사선 저항성 미생물 *Deinococcus*의 방사선 유도성 유전자 연구

- 1956년 방사선으로 살균된 고기 통조림에서 대장균보다 약 200배 정도 방사선 저항성이 강한 방사선 저항성 미생물인 *Deinococcus radiodurans*가 발견된 이후 11종의 *Deinococcus* sp.가 분리되었으며 그 중 7 균주에서 방사선 저항성이 관찰 됨^[4].
- 1999년 미국 에너지부의 지원으로 *D. radiodurans*의 genome DNA 염기서열이 밝혀지면서 활발한 연구가 진행되고 있으며 밝혀진 3,187개의 ORF 중 약 반 정도의 유전자는 기능이 알려져 있지 않으며 그 중 약 1,000개의 유전자는 *D. radiodurans*에만 특이적으로 존재하는 유전자로 밝혀짐^[5].
- 2000년 초반부터 최신 omic 분석기술을 이용한 *D. radiodurans*의 transcriptomic, proteomic 분석이 수행되었으며 이를 바탕으로 방사선에 의하여 발현이 유도되는 유전자/단백질 들을 탐색하여 기능을 규명하는 연구가 진행되고 있음.
- 지금까지 *D. radiodurans*의 방사선 유도 유전자의 연구는 이 미생물의 특이적인 방사선 저항성 메커니즘을 규명하는데 초점이 맞추어져서 진행되고 있음. *D. radiodurans*의 대표적인 방사선 유도성 유전자인 *recA*는 *D. radiodurans*의 DNA repair 시스템에서 중요한 역할을 담당하고 있으며 대장균의 RecA 단백질의 기능과는 다르다는 것이 밝혀짐^[6].
- 이후 *recA*의 발현을 조절하는 발현조절인자 (PprI)가 규명되었으나 PprI 조절인자는 *Deinococcus*에서만 특이적으로 존재하여 일반 미생물의 방사선 조절 메커니즘 연구로 확대하여 활용하기에는 무리가 있음^[7].

(3) 미세 리보핵산 (small RNA) 연구

- 2000년 이후에 약 50~300nt 길이의 단백질을 만들지 않는 미세 리보핵산 (small non-coding RNAs)이 진핵생물(eucaryotic cells)에서 세포사멸 및 chromosome silencing 등에 관여하는 새로운 조절 인자로 알려져 다양한 연구가 진행되어져 왔음.
- 세균의 small RNA는 1970년 초반에 밝혀졌으나 2002년 이후 “Cell”지 등에 세균의 small RNA들이 단백질을 만들어 내는 mRNA들의 안정성과 번역 (translation)에 매우 핵심적인 역할을 하는 것으로 밝혀짐^[8].
- 세균의 small RNA는 세균이 생육 최적조건이 아니거나 스트레스가 많은 환경에서 외부환경 변화를 세균으로 전달해 주는 조절인자의 역할을 하는 것으로 알려짐. 이러한 small RNA들은 대사과정 및 영양소 이용 정도를 조절하여 세균의 생존도를 높임^[9].
- 지금까지 대장균에서 약 60여개의 small RNA가 밝혀졌으며 아래의 그림에서와 같이 철의 고갈, 산화적 스트레스와 같은 중요한 외부 stress 반응에는 최소한 하나 이상의 small RNA가 조절인자의 기능을 수행할 것이라고 추정되고 있음^[10].

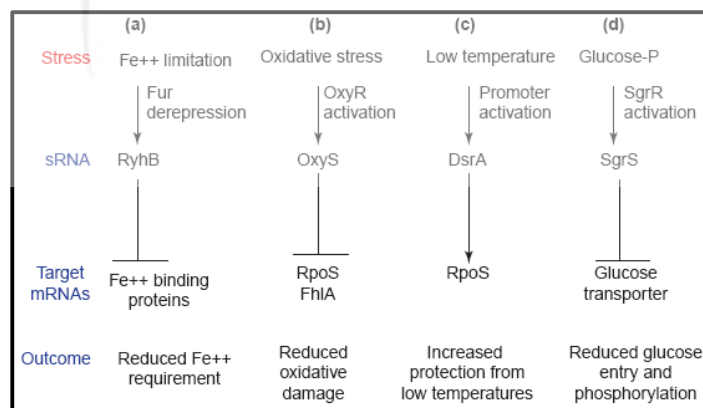


그림 2. Small RNA regulators

2. 국내 기술 개발 현황

- 원자력의학원 및 여러 의과대학 등에서 동물세포를 대상으로 방사선 효과, 방사선에 의한 DNA 손상 인지 및 관련 신호 전달단백질을 밝히고자 하는 연구가 진행되고 있음.
- 식물체 및 미생물에서 방사선 유도 유전자를 규명하여 활용하고자 하는 연구가 원자력연구원 방사선연구소에서 2003년부터 진행되어져 오고 있음.
- *Deinococcus* sp.의 superoxide dismutase 등에 관한 연구를 충북대학교 생명과학부 이영남 교수팀이 일부 진행하였고 서울여자대학교 김종일 교수가 *Deinococcus* DNA repair system의 핵심 인자 중에 하나인 RecA 단백질의 기능을 밝히는 연구를 진행하고 있음^[11,12].
- 서울대학교 생명과학부 김빛내리 교수는 진핵생물에서 small RNA의 조절기능과 관련된 기초 이론을 발견한 학자로서 human cell에서 small RNA의 기능과 생성과정에 대하여 다양한 연구를 수행하고 있음.

3. 방사선 유도 신규 전사체 선행연구

- *cyo* operon의 방사선에 의한 발현 변화를 연구하던 도중 아래의 그림과 같이 *cyoA* promoter의 역방향으로 전사가 되는 transcript(*uscA*)를 발견함.
- *cyoA* 유전자의 상위에 존재하는 *ampG*도 *cyo* operon과 같은 방향으로 전사되기 때문에 이 transcript (*uscA*)는 *cyoA*와 *ampG* 사이의 intergenic region에 존재하는 small RNA로 추정됨 (그림 3).
- *uscA*의 방사선 반응 정도를 microarray 실험에서 선발된 다른 방사선 유도성 유전자들의 발현과 비교한 결과 2 Gy의 방사선 조사에 의해 발현이 비약적으로 (약 100배) 증가 (그림 4).

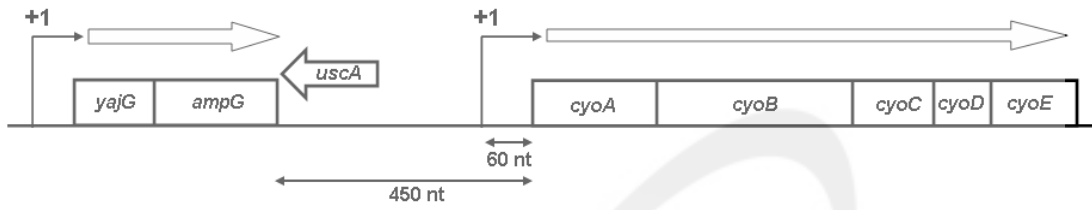


그림 3. 방사선 유도성 신규 전사체(*uscA*)의 위치

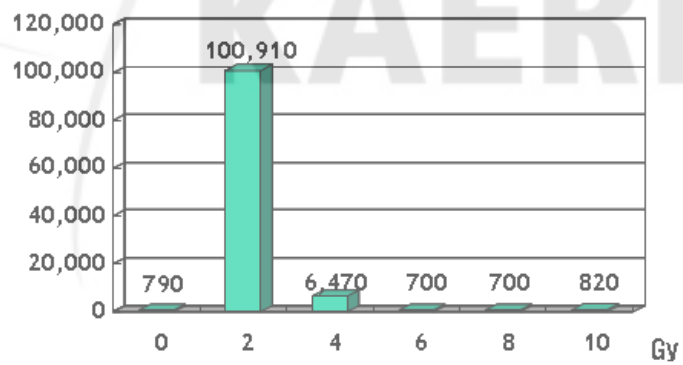


그림 4. *uscA*의 방사선 발현 유도성

4. 현기술상태의 취약성

- 방사선 유도성 유전자와 관련하여 과학자들이 주된 관심을 보이는 분야는 방사선에 의한 생물체의 DNA 손상과 이를 복구하는 메커니즘에 관련되어 있는 방사선 유도성 유전자의 기능을 파악하는 것으로 주로 방사선 암치료 등 의학적인 연구에 초점이 맞추어져 있음.
- 미생물과 관련되어서는 식품 및 공중보건제품에서 인체 위해 미생물을 제거하는 방사선 살균 (radiation sterilization)에 초점이 맞추어져 있었기 때문에 일반 미생물을 대상으로 수행된 분자생물학적인 연구는 거의 전무하며 방사선 저항성 미생물인 *Deinococcus*와 같은 특수한 경우에 한정되어 있음.
- 그러므로, 분자유전학적 접근이 쉬운 미생물에서 방사선에 의하여 특이적으로 발현이 유도되는 유전자를 규명하고 이의 발현 조절인자를 찾는 것은 지금까지 밝혀지지 않은 새로운 방사선 생명공학 연구분야이며 진핵생물의 방사선 반응 시스템을 밝히는 기초기반 연구결과를 제공할 수 있음.
- 국내 small RNA연구는 진핵생물, 특히 동물세포에서 암발생과 관련된 기능을 규명하는데 초점이 맞추어져 있으며 미생물의 외부환경자극 (environmental stress)과 관련하여 small RNA를 연구하는 그룹은 없는 것으로 파악 됨.
- 지금까지 밝혀진 small RNA의 조절 기전과 관련된 중요한 특징은 특정 stress에 의해서만 생성이 유도된 후 해당 target 유전자와 특이적으로 결합하여 small RNA 생성을 유도하는 특정 환경에서만 활성이 유지되는 특징을 가지고 있음.
- 그러므로, 방사선 반응 및 방사선 관련 조절 메커니즘과 관련된 small RNA 규명은 다른 스트레스 특히, 산화적 스트레스 (oxidative stress)와는 구별되는 방사선 특이반응 체계의 존재 유무를 밝히는 데 있어서 매우 중요한 근거가 될 수 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 반응 연구

(1) 방사선 반응 최적 조건 규명

○ *ampG*와 *cyoA* 사이의 염기서열 중 (아래의 염기서열 및 그림 1 참조) 약 510 bp 정도 되는 DNA 단편을 *XhoI*과 *HindIII* site를 가지고 있는 PCR primer로 (*uscA3*과 *uscA4*) 증폭한 후 이 단편을 pGL3 vector에 cloning하였다. 이 plasmid를 사용하여 방사선 조사 전후의 luciferase activity를 측정함으로써 *uscA*의 방사선 반응을 측정하였다 (그림 5).

```
1 atcaacatcaggccaaatgccgctcagatcagcgaacgcttgctccagtcgaatctgtcct
                               XhoI
61 ttgggatccagcagcgcagaattacagccactgagtaatgcagtgctgcaattaatgac
121 aaccatcccaaacttttattgtatttctgagtcctCATttaacgacctcaattccacggg
                               start codon of CyoA
181 acctggcggcgtttaaagtgtagggcattttacggtaagggtacattactgtaaacatg
241 attggttctgtgttaccagttctgcccgcgatgtcacatatgttgccaagtatgtcgaa
301 ataactttaagacactgttgaaactttgcgttataacggatgaggtctgtaagtgggatg
361 ttgagggataattggtataaccaatgtaaaaaataaacaattacttaacaatttattatc
421 aataaaaggacaatcaacggcagaaatttaaattaatcggctgaatcgtgtaagaaaa
481 taggtagcgtagaaattaccaataatttccaaaattctgttgcgcacaaaaagacaaata
541 tattttttatcaattgatggttatttagccgttataattccgggctggtattacaacggc
                               HindIII
601 aaataatggtTTAcagcaggcgtgttttctgtagcgcaggtagtcagcaaccgcca
                               stop codon of AmpG
```

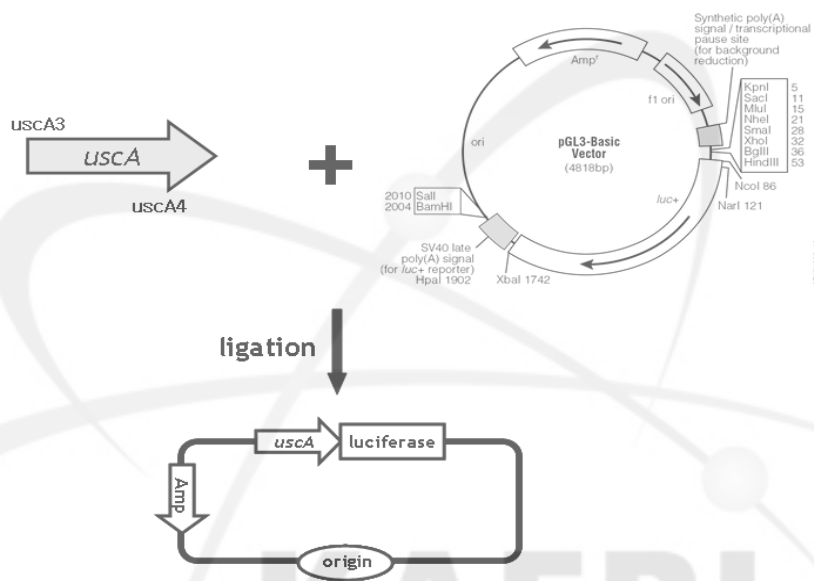


그림 5. *uscA*의 방사선 반응 측정용 reporter plasmid 제작

- *uscA*의 방사선 반응을 더욱 자세하게 살펴보기 위하여 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6 Gy의 방사선을 대장균의 생육 초기(exponential phase)와 후기(stationary phase)에 각각 조사한 후 시간대 별로 방사선 반응을 살펴보았다. 그 결과 2 Gy의 방사선이 *uscA*의 발현을 증가시키는 최적의 선량이었으며 6 Gy에서는 방사선에 의하여 발현이 전혀 증가되지 않았고 미생물의 생육정도는 *uscA*의 방사선 반응에 영향을 미치지 않았고 조사 직후에 *uscA*의 발현이 증가되고 이후 점차 감소하는 경향을 보였다 (그림 6).
- 방사선 연구소의 Co⁶⁰ source와 Cs¹³⁷ source 및 전남대 병원에 있는 치료용 방사선 발생장치를 이용하여 2 Gy의 방사선을 조사한 경우 *uscA*의 발현이 증가되는 것을 확인하였으나 전자선은 저선량 조사가 불가능하여 실험을 수행하지 못하였으며 이온빔은 아직 설치가 완료되지 않았다.

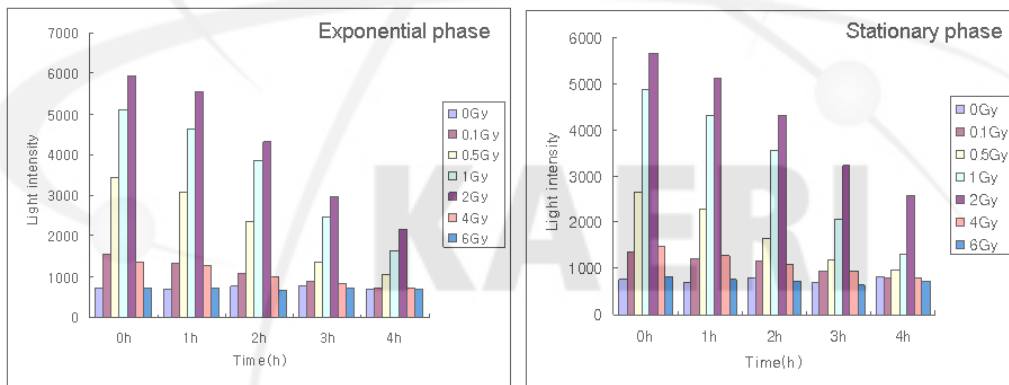


그림 6. *uscA*의 최적 방사선 반응 조건

(2) *uscA*의 방사선 특이 반응성 분석

- 최근에 방사선이 조사된 미생물에서 방사선 조사로 인한 단백질 손상을 복구하기 위하여 변이된 단백질의 제거 및 정상 단백질의 형태를 유지시켜주는 GroEL, DnaK와 같은 chaperon 단백질 생성이 유도되었다는 보고가 있다^[13]. 이것은 방사선이 미생물의 stress 반응을 유발한다는 증거이므로 *uscA*가 다른 stress 유발 조건에서도 발현이 증가되는지 살펴보기 위하여 산도(pH), 온도, 삼투압과 같은 물리적 조건을 변화시켜 미생물에 stress를 가한 후 luciferase의 activity를 분석하였다. pH stress를 주기 위하여 pH 7 조건에서 대수기(exponential phase)까지 성장한 대장균을 회수한 후 pH가 1, 3, 5로 맞추어진 배지로 옮겨 30분 동안 배양하였고, 온도 stress를 주기 위해서는 30℃에서 성장한 균을 42℃로 옮겨 10분 동안 배양하였으며, 마지막으로 삼투압 stress를 주기 위해서 NaCl이 첨가되지 않은 배지에서 자란 대장균을 0.3, 0.5 M NaCl이 존재하는 배지로 옮겨 30분 동안 배양하였다. 실험 결과 어떤 물리적 stress 조건에서도 *uscA*의 발현은 증가되지 않았다 (표 1).

표 1. 물리적 stress에 대한 *uscA*의 반응성

pH	pH 7	pH 1	pH 3	pH 5
luciferase activity	810	790	760	690
온도	30℃	42℃		
luciferase activity	760	770		
NaCl 농도	0 M	0.3 M	0.5 M	
luciferase activity	780	730	730	

○ 일반적으로 방사선은 생물체 내에서 $\cdot\text{OH}$ 또는 $\cdot\text{O}_2$ 와 같은 radical을 발생시켜 DNA 손상을 유발한다고 알려져 있다. 그러므로 방사선 조사는 활성 산소종 생성에 의해서 필연적으로 생물체에 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 되고 동시에 이들로 인한 DNA 손상을 복구하는 SOS response를 유도하게 된다. 방사선이 아닌 다른 물질로 oxidative stress 및 SOS response를 유발한 후 *uscA*의 발현이 증가되는지를 관찰하였다. 산화 스트레스는 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)을 만들어 내는 H_2O_2 , Iron sulfate(FeSO_4)와 superoxide radical($\cdot\text{O}_2$)을 만들어 내는 Pyrogallol, Menadione(MD), Paraquat(PQ)을 배지에 첨가하여 유발하였고 SOS response는 UV 조사와 DNA 손상 물질인 Mitomycin C(MMC)를 이용하여 유발하였다. 실험 결과 SOS response를 유발하는 (UV 조사 및 MMC 첨가) 조건에서는 *uscA*의 발현이 전혀 증가되지 않았고 oxidative stress를 유발하는 조건인 Pyrogallol과 FeSO_4 첨가에 의하여 발현이 약간 증가하는 것을 볼 수 있었다 (표 2). 이는 방사선 조사에 의해 *uscA*의 발현이 증가되는 이유는 산화적 스트레스 때문이라는 추정을 가능하게 한다. 그러나 같은 superoxide radical($\cdot\text{O}_2$)을 만들어 내는 MD나 PQ의 첨가는 *uscA*의 발현을 전혀 유도하지 못하였다 (표 2). 또한 방사선 조사에 비하여 활성의 증가가 그렇게 높지 않았다. 이것은 아마도 생성되는 superoxide radical($\cdot\text{O}_2$)의 양이 서로 다르기 때문에 생기는 현상으로 판단되므로 2차년도에 추가 실험을 통하여 방사선 조사 및 다양한 chemical agent 첨가 시에 생기는 radical 양을 측정하여 *uscA*의 발현에 미치는 radical의 영향을 더욱 자세히 연구하고자 한다.

표 2. SOS response 및 oxidative stress 유발 물질에 대한 *uscA* 반응성 분석

SOS response	UV (J/Cm ²)		0	1	2	5	10
	luciferase activity		750	740	810	770	780
	Mitomycin C		0 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
	luciferase activity		660	680	730	780	710
oxidative stress	· OH	H ₂ O ₂	0 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
		luciferase activity	730	780	710	790	770
		Iron sulfate	0 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
		luciferase activity	780	790	1880	1560	760
	· O ₂	Pyrogallol	0 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
		luciferase activity	760	830	2320	1320	820
		Menadione	0 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
		luciferase activity	740	740	710	780	750
		Paraquat	0 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
		luciferase activity	710	830	840	760	770

2. 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 발현 특성 규명

(1) *uscA* promoter의 방사선 반응성 관련 부위 규명

○ *uscA*의 방사선 반응성을 보다 체계적으로 분석하기 위하여 pGL3 vector에 cloning 된 *uscA* promoter 부위를 EcoRI과 BamHI 제한효소 인식부위를 가지고 있는 프라이머를 사용해서 다양한 길이를 가지고 있는 *uscA* promoter DNA 단편을 생산하였다. 이 후 증폭된 다양한 길이의 DNA 단편의 양쪽 말단을 EcoRI과 BamHI 제한효소로 처리하여 pRS415 벡터 (그림 7)에 클로닝(cloning)하였다. 총 7 종류의 재조합 벡터를 가진 대장균 형질전환체를 제작하고 각각 LB 배지에 3시간 동안 배양하고(37°C) *uscA* 발현 최적 선량인 2 Gy의 방사선을 조사한 후 방사선 조사 전후의 *uscA*의 발현 변화를 살펴보았다. pRS415 벡터는 *lacZ* 리포터 벡터로 β -galactosidase 생산 유전자를 가지고 있으므로 방사선 조사에 의하여 증가된 *uscA*의 발현량을 β -galactosidase assay를 통하여 분석하였다.

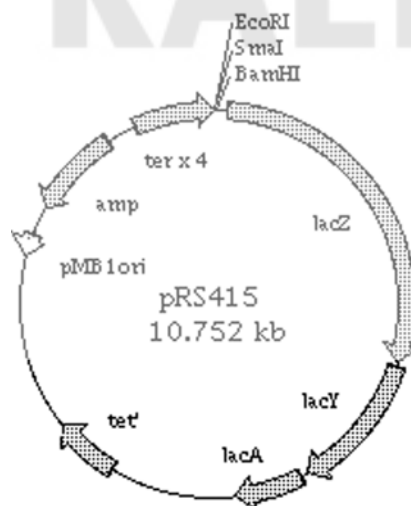


그림 7. pRS415 vector 지도

- 실험 결과, pUscA-5 벡터는 방사선 조사와 상관없이 β -galactosidase를 전혀 생산하지 못한 반면, pUscA-3, pUscA-4, pUscA-6 벡터는 방사선을 조사하지 않은 경우에도 β -galactosidase를 생산하였고, 방사선에 의하여 그 생산량이 증가하지도 않았다. 그러나, pUscA-1, pUscA-2, pUscA-7 벡터는 방사선 조사 전에는 낮은 수준의 β -galactosidase를 생산하다가 방사선 조사 후에 방사선 조사 전과 비교하여 약 10~20배 이상의 β -galactosidase를 생산하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 8).
- 이 결과를 토대로 *uscA* 프로모터의 -35와 -10 지역과 같은 프로모터 인자 (RNA polymerase의 결합 부위)는 *uscA* promoter 부위 중 203 ~ 318번째 뉴클레오티드 사이에 존재한다는 것과 *uscA* 프로모터의 방사선 유도성을 조절하는 부위(radiation response element)는 318 ~ 461번째 뉴클레오티드 사이에 존재한다는 것을 알 수 있었다.

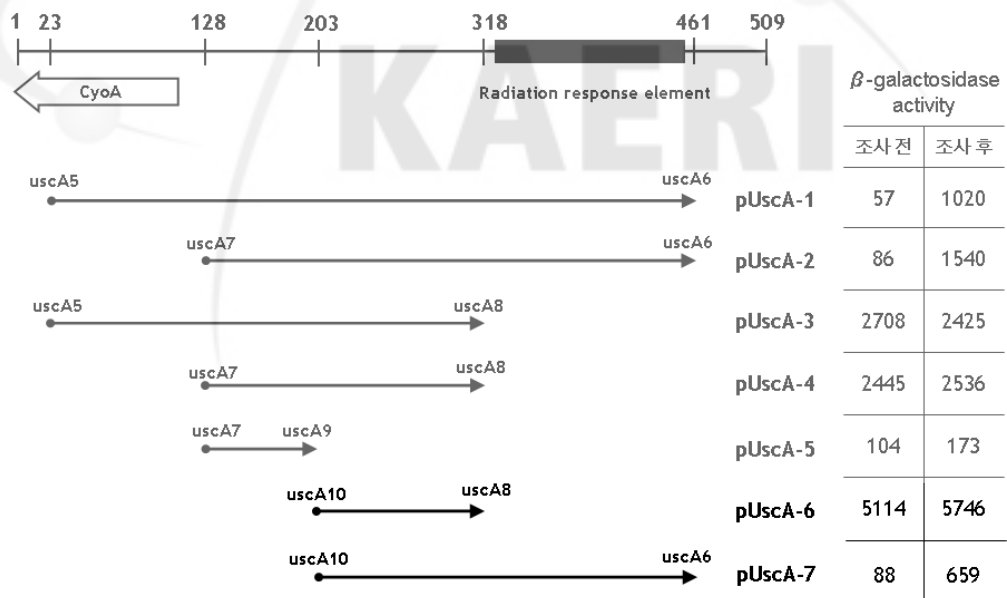


그림 8. *uscA* promoter 길이 별 방사선 반응성 분석

(2) *uscA* promoter의 전사개시부위 (transcriptional start site) 규명

- *uscA* promoter, 즉 *uscA* 전사체의 시작부위를 규명하기 위하여 위의 실험에서 사용된 pUscA-3 벡터의 형질전환체를 이용하여 전사개시 부위를 탐색하였다. pUscA-3 형질 전환체를 배지에 3시간 동안 배양한 후 total RNA를 회수하였다. pRS415 벡터의 BamHI 하류지역의 염기서열과 상보적인 서열을 갖고 있는 프라이머를 polynucleotide kinase(PNK)를 사용하여 방사성 동위원소로 표식한 후 회수된 total RNA 30 μ g과 혼합하였다. 이 후 역전사효소를 사용하여 total RNA로부터 cDNA를 합성한 후 합성된 cDNA를 전기영동하여 전사체를 확인하였다. 실험 결과, 그림 4의 282 뉴클레오티드에서 *uscA*의 전사가 시작됨을 알 수 있었고 *uscA* 프로모터의 -35와 -10 지역(RNA polymerase의 결합 부위)을 추정할 수 있었다 (그림 9).

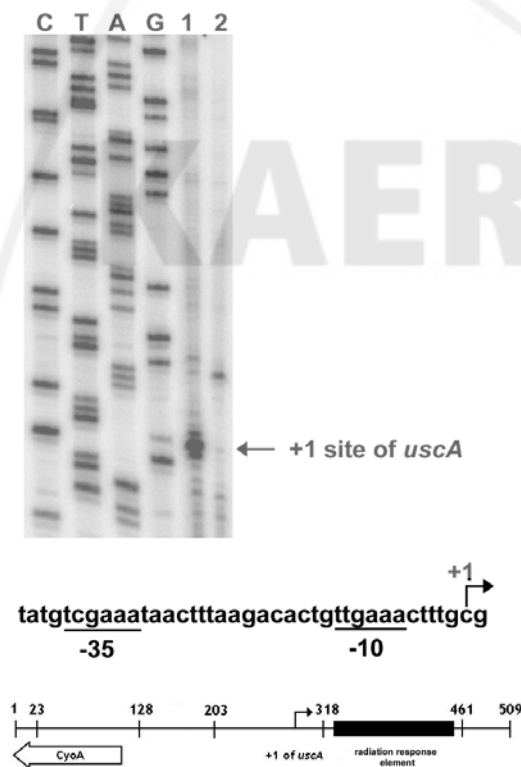


그림 9. *uscA* promoter의 전사개시부위 탐색

(3) *uscA* 최소 promoter 규명

- *uscA*의 방사선 반응에 필요한 최소 부위를 규명하기 위하여 그림 8의 실험과 유사한 실험을 다시 반복하였다. 이전 실험에서 규명된 *uscA* 최소 지역은 203 ~ 461 bp 까지였으나 primer extension 결과 *uscA*의 +1이 318 위치에 가깝게 있었으므로 203 ~ 261 bp 지역을 제거한 pUscA8을 제작하여 방사선 반응성을 분석한 결과 가장 긴 pUscA1에 비하여 방사선 증가도는 감소하였으나 여전히 방사선 반응성은 유지하고 있었다. 다음으로는 pUscA8에서 391 ~ 461 bp 지역을 제거한 pUscA10 플라스미드를 제작하고 방사선 반응성을 분석한 결과 pUscA8과 똑같은 방사선 반응성을 보였다. 이로써 방사선 반응성을 유지하고 있는 130 bp로 이루어진 가장 짧은 *uscA* promoter를 규명할 수 있었다 (그림 10).

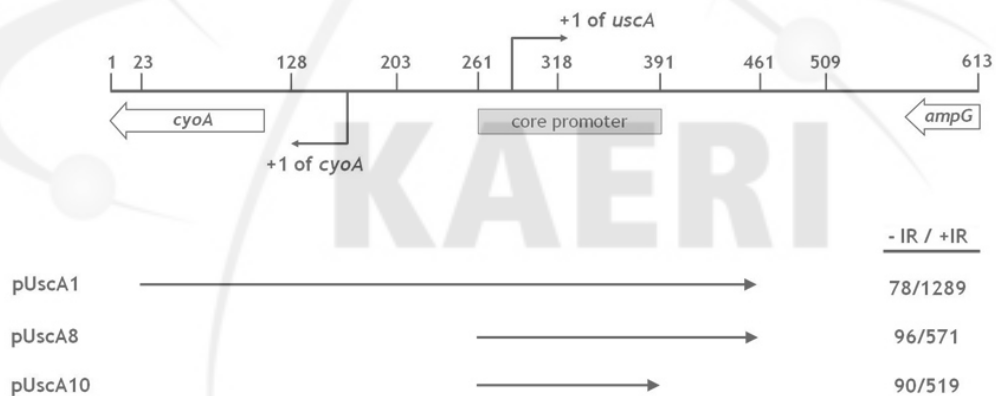


그림 10. *uscA* 최소 promoter

3. 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 small RNA 규명

(1) *uscA* 전사체 크기 규명

- 일반적으로 small non-coding RNA의 크기는 30 ~ 300 nt 정도로 알려져 있다. *uscA*의 전사체 크기를 규명하기 위하여 RNA로부터 DNA를 합성하는 역전사(reverse transcription) 실험을 수행하였다. 먼저 대수기까지 자란 균체에 방사선을 조사한 후 RNA를 분리하였다. 혼입된 DNA를 제거하기 위하여 DNase를 처리하고 역전사 효소를 사용하여 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 이후 합성된 cDNA를 template로 하여 서로 다른 지역에 결합하는 다양한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다 (그림 11). 그 결과 1번부터 4번 primer를 사용하였을 경우에는 PCR product가 생성 되었으나 5번 primer를 사용한 경우에는 PCR product가 생성되지 않았다. RNA에 혼합되어 있는 DNA를 template로 하여 PCR product가 생성될 수 있으므로 역전사효소를 첨가하지 않은 대조구를 동시에 PCR하였으나 아무런 PCR 산물도 관찰할 수 없었다. 그러므로, *uscA*는 약 250 bp 정도의 크기를 가지는 non-coding RNA로 추정된다.

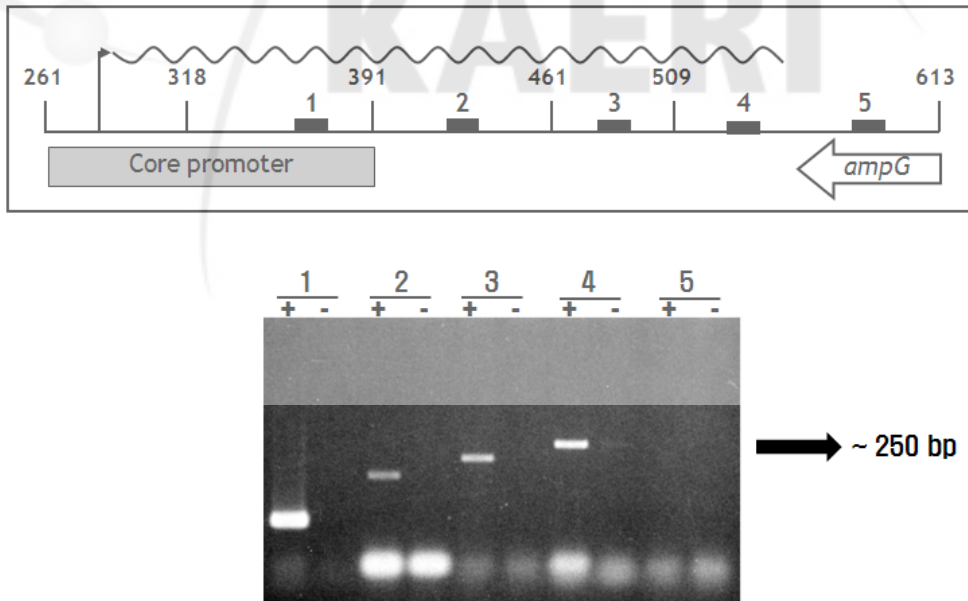


그림 11. *uscA*의 역전사 실험 결과

(2) small RNA *uscA*의 지역별 발현 분석

○ 지금까지 수행한 *uscA*의 발현 분석 실험은 *uscA* promoter를 β -galactosidase를 생산할 수 있는 pRS415 vector에 cloning한 후 생성된 β -galactosidase의 양을 측정하여 *uscA* promoter의 활성을 측정하는 것이다. 염색체 상에 존재하는 promoter와 플라스미드로 cloning된 promoter의 조절 체계가 가끔 서로 맞지 않는 경우도 있으며 또한 *uscA*의 mRNA양을 직접 측정하는 것이 아니라 리포터 단백질의 양을 측정하는 것이므로 보다 직접적으로 *uscA*의 방사선 반응성을 분석하기 위하여 방사선 조사 전후의 균체에서 RNA를 회수한 후 real time PCR을 통하여 방사선 반응 정도를 분석하였다 (그림 12). 역전사 실험에 사용한 동일한 primer를 real time PCR에 사용하였다. 1번부터 4번까지 primer를 사용하였을 경우 방사선 유도성이 관찰되었고 예상대로 5번 primer를 사용하였을 시에는 방사선 유도성이 보이지 않았다. 흥미롭게도 1번과 2번 primer를 사용하였을 경우에는 약 10배 정도로 *uscA*의 mRNA 생산이 증가하였으나 3번 primer의 경우에는 방사선 반응성이 약 40배 정도로 증가하였고 4번 primer는 다시 약 10 배 정도의 방사선 유도성을 보였다. 이는 461 ~ 509 사이에서 방사선 유도성과 관련된 또다른 조절메커니즘이 있을 수도 있다는 것을 의미한다.

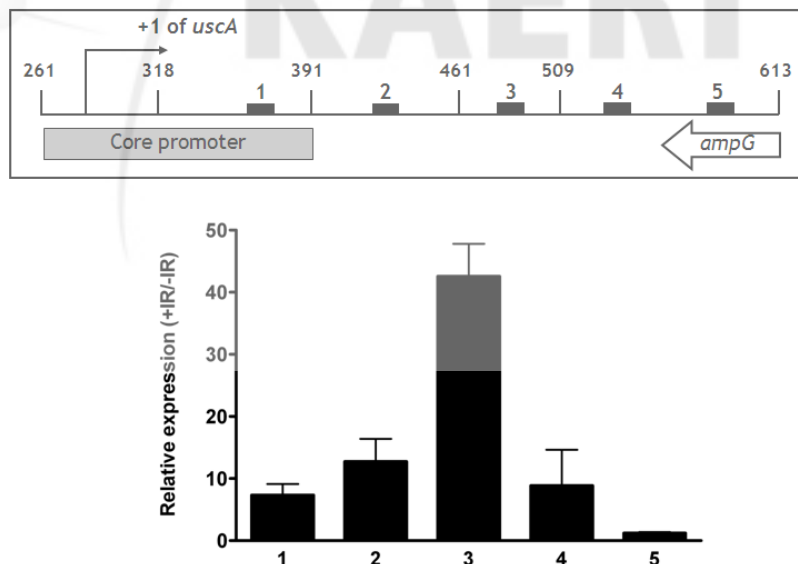


그림 12. 방사선 조사 전후의 *uscA* mRNA의 증가정도 측정

4. 방사선 유도 신규 전사체(*uscA*)의 방사선 유도 메커니즘 규명

(1) *uscA* 방사선 유도성 관련 추정 메커니즘

○ *uscA*의 방사선 유도성 메커니즘을 규명하기 위하여 핵심 최소 프로모터 보다 더 작은 promoter를 제작하여 그림 8와 같은 실험을 수행하였다. 318 ~ 391 bp 지역을 제거한 pUscA13 플라스미드는 높은 발현을 보이는 대신 방사선 반응성을 보이지 않았다. 318 bp 하위 지역의 염기서열을 추가한 pUscA14의 경우도 발현 정도는 높았으나 방사선 반응성이 보이지 않는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 13). 이 결과는 318 ~ 391 bp에 해당하는 방사선 반응 조절 부위에 발현을 억제하는 조절 단백질(terminator)이 결합되어 있다가 방사선이 조사되면 이 억제 단백질이 떨어져 나옴으로써 *uscA* 프로모터의 발현이 유도된다는 것을 의미한다 (그림 14).

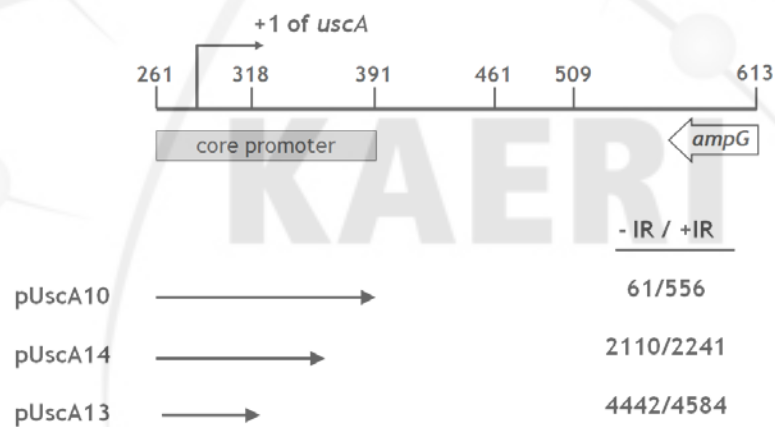


그림 13. *uscA* promoter 길이 별 방사선 반응성 분석

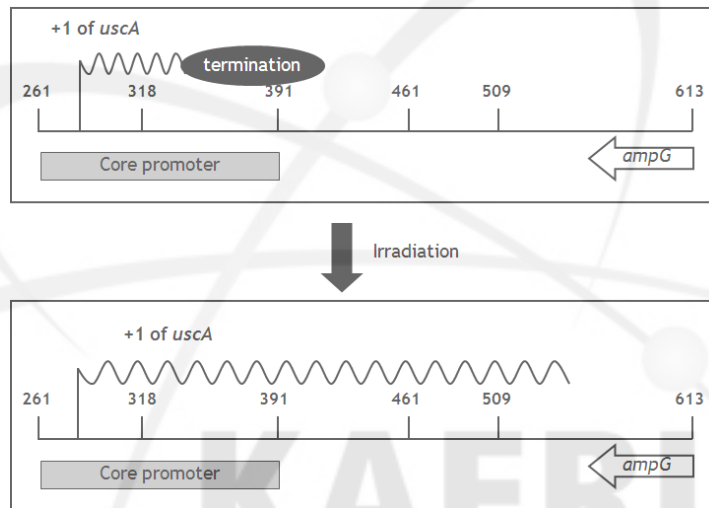


그림 14. *uscA*의 방사선 유도성 관련 추정 메커니즘

(2) *uscA* 발현조절인자 규명을 위한 DNA affinity capture 분석

- *uscA*의 transcriptional start site의 하위 지역에 결합하여 발현을 억제하는 단백질을 규명하기 위하여 DNA affinity capture assay를 수행하였다. 이 실험 방법의 개요는 다음과 같다. 먼저, 발현조절 단백질이 붙는 promoter 지역을 biotin으로 표지된 primer를 이용하여 증폭한다. 증폭된 프로모터 DNA 단편을 avidin으로 충전된 column에 흘려보내면 streptavidin-biotin 결합이 일어나게 되어 그림 15와 같은 DNA affinity column이 만들어진다. 이후 이 column에 단백질 mixture를 넣어주면 해당 DNA와 결합이 되는 단백질은 column에 남아 있게 되지만 다른 단백질은 흘러 나가게 된다. 이 후 DNA에 결합되어 있는 단백질을 회수하여 LC-MS/MS를 이용하여 규명한다.

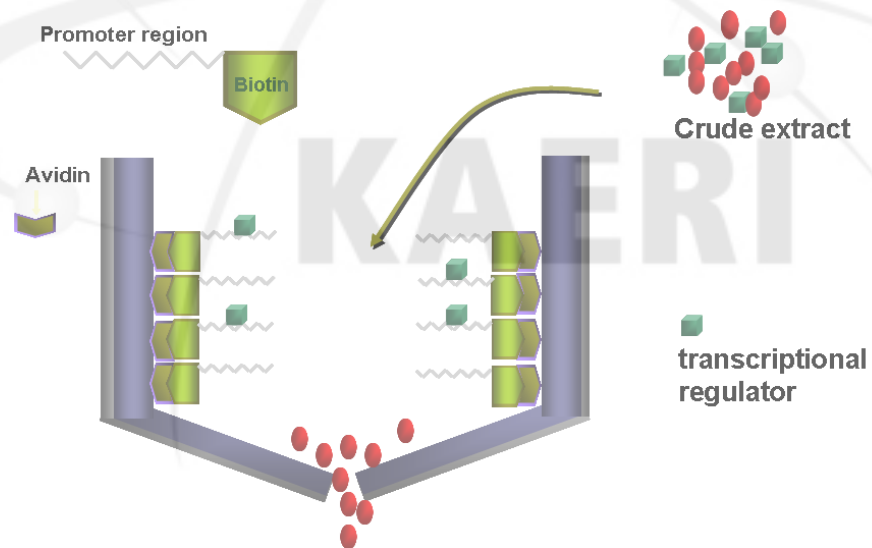


그림 15. DNA affinity capture assay 방법 모식도

- DNA affinity capture assay를 수행하기 위하여 *uscA* +1 하위 지역(+1 ~ +179)을 PCR로 증폭하였다. 하지만, 이 지역에는 *cyoA* 유전자 발현조절 단백질인 ArcA가 결합하는 지역을 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다 (그림 16).

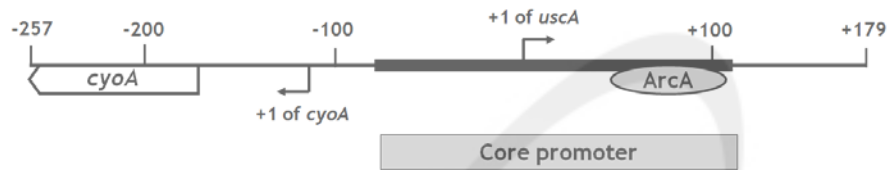


그림 16. *uscA* 프로모터에 존재하는 ArcA 결합 부위

KAERI

- DNA affinity assay 수행 시 ArcA의 간섭을 피하기 위하여 ArcA 변이균체를 준비하였다. 대장균 wild type인 CH1018 균주와 CH1018의 *arcA* 변이체에서 단백질을 회수한 후 이를 *uscA* promoter로 충전된 column에 흘려 보내 *uscA* promoter에 특이적으로 결합하는 단백질을 분석하였다. 또한, *uscA* promoter가 아닌 일반적으로 DNA에 결합하는 비특이적 단백질을 미리 제거하기 위하여 DNA competitor를 제작하여 첨가하였다 (표 3). DNA affinity column에서 회수된 *uscA* promoter 결합 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 확인한 후 (그림 17) SDS-PAGE gel에서 단백질을 재회수하여 LC-MS/MS 분석을 수행하였다.

표 3. DNA affinity capture assay의 실험 방법 요약

	사용 균주	DNA competitor
시료 1	CH1018 (wild type)	X
시료 2	CH1018 (wild type)	첨가
시료 3	CH1018 (<i>arcA</i> 변이균주)	X
시료 4	CH1018 (<i>arcA</i> 변이균주)	첨가

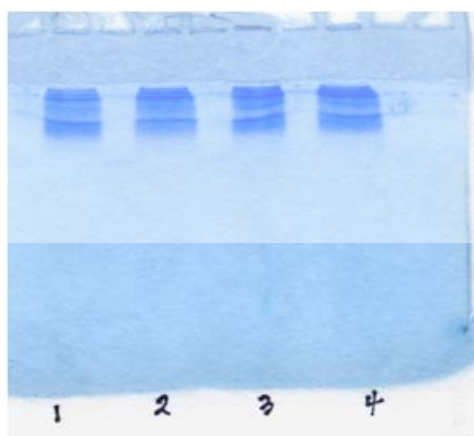


그림 17. SDS-PAGE 분석

- LC-MS/MS로 분석된 단백질 중 검출된 양이 많은 (score가 높은) 단백질 30 종류만을 표로 작성하였다 (표 4부터 7). Score가 가장 높은 단백질 3 종은 tryptophan 생성에 관여하는 Tryptophanase, ribosomal 단백질 RpsD, translation elongation factor Ef-Tu 였다. 이들 단백질은 일반적인 전사조절 단백질이 아니므로 이들 단백질은 *uscA*의 방사선 반응성과 관련이 없을 것으로 판단된다.
- *uscA*는 단백질을 생성하지 않는 non-coding RNA이므로 RNA에 결합하여 단백질의 생성을 담당하는 ribosome 구성 단백질인 RpsD가 *uscA*에 결합하는 것은 다소 의외의 결과이다. 만약 *uscA*가 ribosome과 결합하는 RNA라면 방사선에 의해 생성된 *uscA*가 생체의 단백질 생성에 영향을 준다는 것을 의미하므로 추후 *uscA*-ribosome 연구는 가치 있는 연구가 될 것으로 생각된다.
- Tryptophanase와 Ef-Tu는 *uscA* RNA가 아닌 ribosome에 결합된 단백질이 검출된 것으로 추정된다.
- 회수된 단백질 중 모든 실험 샘플에서 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 unnamed protein이 검출되었다. 대다수의 다른 단백질들이 대사에 관여하는 효소인 반면 이 단백질만은 아직 그 기능이 밝혀져 있지 않으므로 이 단백질을 대상으로 *uscA*의 조절 기능이 있는지 추후 연구를 통하여 규명하고자 한다.

표 4. LC-MS/MS로 분석된 시료 1의 단백질

	Protein	Score
#1	A Chain A, Crystal Structure Of The Apo Form Of Y74f	140.5
#2	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	100.3
#3	G Chain G, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	70.3
#4	C Chain C, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	60.4
#5	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	50.2
#6	A Chain A, Structure Of The Gdp Domain Of Ef-Tu And	40.2
#7	A Chain A, Solution Structure Of Holo-Biotinyl Domai	40.1
#8	unnamed protein product [Escherichia coli]	30.3
#9	rpoC [Escherichia coli]	30.2
#10	E Chain E, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	30.2
#11	gatY [Escherichia coli]	30.2
#12	G64976 tagatose-bisphosphate aldolase gaty (EC 4.1.2.-) -	30.2
#13	A Chain A, Crystal Structure Of S-Adenosylmethionine	20.4
#14	D Chain D, Crystal Structure Of Putative Tagatose 6-P	20.4
#15	rpoB [Escherichia coli]	20.3
#16	oligopeptide transporter ATP-binding componen	20.2
#17	AE005435_11 tagatose-bisphosphate aldolase 1 [Es	20.2
#18	tryptophanyl-tRNA synthetase [Escherichia coli]	20.2
#19	PutA	20.2
#20	D-amino acid dehydrogenase	20.2
#21	H ⁺ ATPase F1 beta subunit [Escherichia coli]	20.1
#22	L Chain L, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.1
#23	S1 ribosomal protein [Escherichia coli]	20.1
#24	K Chain K, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	10.6
#25	frameshifts changes start relative to ECOMREB [Es	10.6
#26	yefF [Escherichia coli]	10.4
#27	B Chain B, Correction Of X-Ray Intensities From An Hs	10.3
#28	phosphatidylserine synthase	10.3
#29	ATP-dependent helicase HepA [Escherichia coli]	10.2
#30	A Chain A, Solution Structure Of The Seca-Signal Pep	10.2

표 5. LC-MS/MS로 분석된 시료 2의 단백질

	Protein	Score
#1	A Chain A, Crystal Structure Of The Apo Form Of Y74f	188.3
#2	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	120.2
#3	C Chain C, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	90.4
#4	A Chain A, Structure Of The Gdp Domain Of Ef-Tu And	90.3
#5	G Chain G, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	90.3
#6	E Chain E, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	90.2
#7	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	90.2
#8	gatY [Escherichia coli]	60.2
#9	rpoB [Escherichia coli]	50.5
#10	glycine-tRNA synthetase, beta subunit [Escherichi	40.5
#11	rpoC [Escherichia coli]	40.4
#12	phosphatidylserine synthase [Escherichia coli]	30.2
#13	D Chain D, Crystal Structure Of Putative Tagatose 6-P	30.2
#14	A Chain A, Solution Structure Of Holo-Biotinyl Domai	30.1
#15	E Chain E, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.4
#16	G64976 tagatose-bisphosphate aldolase gaty (EC 4.1.2.-) -	20.2
#17	C Chain C, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#18	AE005435_11 tagatose-bisphosphate aldolase 1 [Es	20.2
#19	2 Chain 2, Structure Of The 50s Subunit Of A Secm-St	20.2
#20	galactose binding protein	20.2
#21	ORF_f183 [Escherichia coli]	20.1
#22	A Chain A, Crystal Structure Of Apo C298s Tryptophan	20.1
#23	D Chain D, Mechanism Of Homologous Recombination Fro	10.6
#24	PutA	10.4
#25	B Chain B, Crystal Structure Of Escherichia Coli Sem	10.4
#26	LngD [Escherichia coli]	10.4
#27	analogue of ATP-dependent protease regulatory sub	10.4
#28	G Chain G, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	10.3
#29	A Chain A, The Nmr Structure Of The Rna Binding Doma	10.3
#30	unnamed protein product [Escherichia coli]	10.3

표 6. LC-MS/MS로 분석된 시료 3의 단백질

	Protein	Score
#1	A Chain A, Crystal Structure Of The Apo Form Of Y74f	206.3
#2	C Chain C, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	130.3
#3	A Chain A, Structure Of The Gdp Domain Of Ef-Tu And	128.2
#4	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	120.2
#5	G Chain G, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	110.3
#6	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	100.3
#7	B Chain B, Crystal Structure Of E. Coli Aconitase B.	50.3
#8	D-amino acid dehydrogenase	50.3
#9	unnamed protein product [Escherichia coli]	40.3
#10	gatY [Escherichia coli]	40.3
#11	S1 ribosomal protein [Escherichia coli]	38.2
#12	E Chain E, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	30.4
#13	D Chain D, Crystal Structure Of Putative Tagatose 6-P	30.3
#14	B Chain B, Correction Of X-Ray Intensities From An Hs	30.2
#15	D Chain D, Structure Of Escherichia Coli Rna Polymeras	20.6
#16	AE005435_11 tagatose-bisphosphate aldolase 1 [Es	20.3
#17	B Chain B, E. Coli Pyruvate Dehydrogenase E1 Compone	20.2
#18	E Chain E, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#19	H ⁺ ATPase F1 beta subunit [Escherichia coli]	20.2
#20	L Chain L, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#21	F Chain F, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#22	B Chain B, The Closed Ring Structure Of The Rho Tran	20.2
#23	tryptophanase [Escherichia coli 53638]	20.2
#24	B Chain B, Strcuture Of Udp-Galactopyranose Mutase Fr	20.2
#25	B Chain B, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#26	lipoic acid synthetase [Escherichia coli]	20.2
#27	oligopeptide transport ATP-binding protein op	20.2
#28	D Chain D, Mechanism Of Homologous Recombination Fro	20.2
#29	FtsZ protein [Escherichia coli]	20.1
#30	clp protease ATP-binding subunit [Escherichia	20.1

표 7. LC-MS/MS로 분석된 시료 4의 단백질

	Reference	Score
#1	A Chain A, Crystal Structure Of The Apo Form Of Y74f	268.3
#2	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	180.2
#3	C Chain C, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	120.6
#4	G Chain G, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	120.3
#5	A Chain A, Structure Of The Gdp Domain Of Ef-Tu And	110.4
#6	D Chain D, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	90.2
#7	S1 ribosomal protein [Escherichia coli]	70.3
#8	E Chain E, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	60.4
#9	E Chain E, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	40.2
#10	I Chain I, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	30.3
#11	D-amino acid dehydrogenase	30.2
#12	D Chain D, Crystal Structure Of Putative Tagatose 6-P	30.2
#13	glycine-tRNA synthetase, alpha subunit [Escherich	30.2
#14	A Chain A, Solution Structure Of Holo-Biotinyl Domai	30.1
#15	ORF_f579 [Escherichia coli]	20.4
#16	H+ ATPase F1 beta subunit [Escherichia coli]	20.3
#17	gatY [Escherichia coli]	20.2
#18	L Chain L, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#19	unnamed protein product [Escherichia coli]	20.2
#20	B Chain B, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#21	B Chain B, Complex Ii (Succinate Dehydrogenase) From	20.2
#22	F Chain F, Structure Of Pdf Binding Helix In Complex	20.2
#23	D Chain D, Mechanism Of Homologous Recombination Fro	20.2
#24	frameshifts changes start relative to ECOMREB [Es	20.1
#25	tryptophanase [Escherichia coli 53638]	18.2
#26	E Chain E, C123av Mutant Of E. Coli Succinyl-Coa Syn	10.4
#27	B Chain B, Correction Of X-Ray Intensities From An Hs	10.4
#28	B Chain B, Crystal Structure Of The Apo Form Glyoxala	10.4
#29	phosphatidylserine synthase	10.4
#30	Aminoacyl-histidine dipeptidase (peptidase D)	10.4

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

1. 연구개발 목표 달성도

연구개발 목표	연구개발 결과	달성도
방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 방사선 반응 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 oxidative stress 환경에서 <i>uscA</i>의 발현 변화를 방사선 조사에 의한 발현 변화와 비교 - <i>uscA</i>는 방사선에 의하여 발현이 특이적으로 유도되는 사실을 확인 	100
방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 발현특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - Primer extension assay를 통해서 <i>uscA</i>의 발현시작점(transcriptional start site)을 결정 - Promoter deletion 등을 통하여 방사선 반응과 관련된 약 130 bp 길이의 핵심염기서열 규명 	100
방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 small RNA 규명	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse transcription 등을 통하여 <i>uscA</i>의 전사체 크기 규명 - <i>uscA</i>가 약 250 bp의 길이를 가지는 small RNA라는 것을 규명 	100
방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 방사선 유도 메커니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> - <i>uscA</i> promoter 부위를 증폭하여 발현 조절 관련 단백질이 붙을 수 있는 DNA affinity column 제작 - LC-Mass를 이용하여 <i>uscA</i> 결합 단백질 복합체의 구성 단백질 규명 	100

2. 관련 분야 기술발전예의 기여도

- 방사선에 의하여 발현이 유도되는 *uscA*는 약 250 bp 정도의 크기를 가진 non-coding RNA로 밝혀졌음. 유전자 조절 기능을 수행하는 small RNA의 경우 30 ~ 300 bp 정도의 크기를 가지고 있으므로 *uscA*가 방사선 관련 발현 발현조절인자의 기능을 수행할 가능성이 있음.
- 향후 연구를 통하여 *uscA*가 방사선 반응 조절 관련 기능을 수행하는 small RNA로 규명이 된다면 이는 생물체가 고유의 방사선 반응 메커니즘을 가지고 있다는 것을 의미하므로 방사선생물학 분야의 발전에 매우 중요한 발견이 될 것이라고 판단됨.
- 방사선에만 특이적으로 높은 발현 유도성을 보이는 *uscA* 프로모터는 방사선을 신호로 작동이 되는 방사선 유도 프로모터로 개발될 수 있음. 이러한 프로모터는 기존의 방사선 암치료의 효과를 높이고 부작용을 줄일 수 있는 “radiogenic therapy” 기술 개발에 활용되어 관련 분야의 발전에 기여할 수 있음.
- 또한, *uscA*의 방사선 유도성 promoter를 활용한 미생물 재조합 유전자 발현 시스템은 기존의 고비용 단백질 발현 시스템을 대체하는 저비용의 새로운 단백질 발현시스템을 구축하는데 활용될 수 있음. 이는 방사선을 기반으로 하는 새로운 생물산업분야 창출에 기여할 수 있을 것으로 판단됨.
- RT/BT 융합기술의 개발을 목표로 하는 본 연구과제는 원자력의 평화적 이용에 관한 대국민적 합의를 이끌어 낼 수 있어 원자력 분야 전체에 큰 파급효과를 보일 것임.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 과제를 통하여 방사선 특이 반응과 관련이 있는 small RNA (*uscA*)의 존재가 밝혀진다면 향후 이를 기반으로 방사선 유전체학 (Radiogenomics) 분야의 경쟁력 있는 연구가 가능하여 방사선 생명공학 융합기술개발 분야의 국제적 우위를 선점할 수 있음.
- 생명과학 분야의 경향인 유전체, 생물정보학 기술을 본 연구 성과에 적용하여 새로운 방사선 반응 메커니즘을 밝혀내면 인간, 동물, 식물 등의 고등 생물 연구에도 빠르게 적용 가능
- 본 연구의 성과는 RT/BT 융합기술의 새로운 모델을 제시하여 관련 유전학, 생화학 분야 등의 기초 연구 분야에 활용될 수 있으며 동시에 방사선을 이용한 방사선의학기술, 식품생명공학기술, 방사선육종기술, 저 선량 방사선의 생리활성연구, 방사선의 환경영향평가 등의 분야에서 기초 및 응용기술로서 활용이 가능 함.
- 본 연구 결과는 RT/BT 융합기술(Fusion Technology)의 기초기반을 제공하여 향후 타 기술 분야와의 융합기술 개발에 성공적인 모델을 제시할 수 있음.
- 본 연구과제는 BT 및 NT분야에 적용할 수 있는 방사선 반응 메커니즘 규명 관련 원천기술의 확보를 목표로 하고 있으며 이와 같은 원천기술의 확보는 생명공학 분야뿐만 아니라 다양한 산업 분야에 활용될 수 있는 핵심요소 기술로 산업화 가치가 크다고 할 수 있음.
- 유전자 특허는 어떤 유전자이든 그 기능을 먼저 밝힌 사람이 그 유전자의 사용에 대한 권리를 전유할 수 있도록 제도적으로 보호해주는 장치로서 유전자 특허를 지니지 못한 기업과 국가는 해당 유전자의 사용을 위해 로열티를 지불해야 함. 본 연구 과제의 결과물인 방사선 특이반응 유도성 유전자는 향후 생물 산업 경쟁력을 강화할 수 있는 특허로 활용이 가능함.

- 2010년 생명공학산업의 세계시장 규모는 약 2,000억불로 추정되며 그 중 상당 부분이 미생물 관련 제품임. 그러므로, 미생물의 방사선 반응 메커니즘 규명을 기반으로 하는 생물체의 방사선 반응계 활용기술 연구는 현재 시장에 존재하지 않는 고부가 고기능 유용산물 생산 균주 및 공정을 가능하게 하여 미생물 산업 분야의 전반적인 발전과 동시에 세계시장을 선점할 수 있는 새로운 생명공학산업 시장의 창출이 가능할 것임.
- 본 과제의 연구 결과를 바탕으로 원자력 연구원 신규 정부 출연금 사업을 수주하였음.



제 6 장 참고문헌

- [1]. C. Chastel, J. Jiricny and R. Jaussi, Activation of stress-responsive promoters by ionizing radiation for deployment in targeted gene therapy. *DNA Repair* 3, 201–215 (2004).
- [2]. R. R. Weichselbaum, D. W. Kufe, S. Hellman, H. S. Rasmussen, C. R. King, P. H. Fischer and H. J. Mauceri, Radiation-induced tumour necrosis factor- α expression: clinical application of transcriptional and physical targeting of gene therapy. *Lancet Oncol* 3, 665–671(2002).
- [3]. S. Nuyts, L. Van Mellaert, J. Theys, W. Landuyt, E. Bosmans, J. Anné and P. Lambin, Radio-responsive *recA* promoter significantly increases TNF α production in recombinant clostridia after 2 Gy irradiation. *Gene Ther* 8, 1197–1201 (2001).
- [4] M. M. Cox and J. R. Battista, *Deinococcus radiodurans*—the consummate survivor. *Nature Rev Microbiol* 3, 882–892 (2005).
- [5] O. White et al., Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 268, 1571–1577 (1999).
- [6] J.-I Kim and M. M. Cox, The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 7919–7921 (2002).
- [7] Y. Hua, I. Narumu, G. Gao, B. Tian, K. Satoh, S. Kitayama and B. Shen, PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochim Biophys Res Commun* 306, 354–360 (2003).
- [8] K. M. Wassarman, Small RNAs in bacteria: Diverse regulators of gene

expression in response to environmental changes. *Cell* 109, 141-144 (2002).

- [9] N. Majdalani, C. K. Vanderpool and S. Gottesman, Bacterial small RNA regulators. *Critic Rev Biochem Mol Biol* 40, 93-113 (2005).
- [10] S. Gottesman, Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* 21, 399 - 404 (2005)
- [11] N. R. Yun and Y. N. Lee, Iso-superoxide dismutase in *Deinococcus grandis*, a UV resistant bacterium. *J Microbiol* 47, 172-177 (2009).
- [12] J.-I. Kim, Analysis of double stranded DNA-dependent activities of *Deinococcus radiodurans* RecA protein. *J Microbiol* 44, 508-514 (2006).
- [13] S. Caillet, M. Millette, D. Dussault, F. Shareck and M. Lacroix, Effect of gamma irradiation on heat shock protein expression of four foodborne pathogens. *J Appl Microbiol* 105, 1384-1391 (2008).

The logo for KAERI (Korea Atomic Energy Research Institute) is centered on the page. It features the word "KAERI" in a bold, sans-serif font. Above the text is a stylized graphic consisting of several curved lines and circular nodes, resembling a molecular structure or a network diagram.

KAERI

서 지 정 보 양 식					
수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제코드		
KAERI/RR-3087/2009					
제목 / 부제	방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>) 규명 및 발현조절 메커니즘 연구				
연구책임자 및 부서명	임 상 용 (방사선 생명공학연구부)				
연구자 및 부서명	김 동 호 (방사선 생명공학연구부) 조 민 호 (방사선 생명공학연구부)				
출판지	대전	발행기관	한국원자력연구원	발행년	2010
페이지	48 p.	도표	있음(○), 없음()	크기	27 Cm.
참고사항	없음				
공개여부	공개(○), 비공개()		보고서종류	연구 보고서	
비밀여부	대외비(), ___ 급비밀				
연구위탁기관			계약번호		
초록 (15-20줄내외)	<p>선행 연구를 통하여 밝혀진 방사선 유도 신규 전사체(<i>uscA</i>)의 방사선 반응 특성을 살펴본 결과 pH, 온도, 삼투압과 같은 물리적 스트레스 및 산화스트레스를 발생시키는 radical들도 <i>uscA</i>의 발현을 유도하지 못하는 것으로 밝혀졌다. <i>uscA</i>의 발현은 <i>cyoA</i> start codon의 약 170 bp 위쪽에서 <i>ampG</i> 유전자 방향으로 진행되었으며 역전사 PCR 수행결과 약 250 bp 정도의 길이를 가지는 small RNA로 판명되었다. <i>uscA</i>의 방사선 반응에는 전사 시작점을 중심으로 해서 약 130 bp 정도의 promoter region이 필요하였다. <i>uscA</i>의 방사선 유도성에 관여하는 전사 조절인자를 찾기 위하여 DNA affinity assay를 수행한 결과 156 aa 크기의 기능이 밝혀지지 않은 단백질이 <i>uscA</i> promoter 지역에 결합하는 것으로 밝혀졌다.</p>				
주제명키워드 (10단어내외)	전리 방사선, 방사선 유도 유전자, <i>uscA</i> , 미세리보핵산, 핵산 친화 분석				

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET							
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.		INIS Subject Code	
KAERI/RR-3087/2009							
Title / Subtitle		Characterization of a novel radiation-inducible transcript, <i>uscA</i> , and analysis of its transcriptional regulation					
Project Manager and Department		Sangyong Lim (Radiation research division for biotechnology)					
Researcher and Department		Dongho Kim (Radiation research division for biotechnology)					
		Minho Joe (Radiation research division for biotechnology)					
Publication Place	Daejeon	Publisher	Korea Atomic Energy Research Institute		Publication Date	2010	
Page	48 p.	Ill. & Tab.	Yes(○), No ()		Size	27 Cm.	
Note							
Open	Open(○), Closed()						
Classified	Restricted(), ___Class Document		Report Type		Research report		
Sponsoring Org.				Contract No.			
Abstract (15-20 Lines)		<p>The transcriptional expression of the <i>uscA</i> promoter (P_{uscA}) only occurred under aerobic conditions and a dose of 2Gy maximally activated transcription of P_{uscA}. However, various environmental stress including physical shocks (pH, temperature, osmotic shock), DNA damaging agents (UV and MMC) or oxidative stressagents (paraquat, menadione, and H_2O_2) didn't cause the transcriptional activation of P_{uscA}. The transcription of <i>uscA</i> was initiated at 170 bp upstream of the <i>cyoA</i> start codon . and ended around the <i>ampG</i> stop codon. The size of <i>uscA</i> was determined through reverse transcription assay, approximately 250 bp. The deletion analysis of <i>uscA</i> promoter demonstrates that radiation inducibility of P_{uscA} is mediated by sequences present between -20 and +111 relative to +1 of P_{uscA} and radiation causes P_{uscA} activation through permitting the expression that is repressed under non-irradiated conditions.</p>					
Subject Keywords (About 10 words)		ionizing radiation, radiation inducible gene, <i>uscA</i> , small RNA, DNA affinity assay					