Collection @ chosun

creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000238423

Collection @ chosun

2009년 8월
교육학석사(생물교육)학위논문

예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용한 망간항상성이 병원균 감염에 미치는 영향에 대한 연구

조선대학교 교육대학원

생물교육전공

선 주 리

Collection @ chosun

예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용한 망간항상성이 병원균 감염에 미치는 영향에 대한 연구

Studies on the Effects of Manganese Homeostasis on Pathogen Infection in *Caenorhabditis elegans.*

2009년 8월

조선대학교 교육대학원

생물교육전공

선 주 리

Collection @ chosun

예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용한 망간항상성이 병원균 감염에 미치는 영향에 대한 연구

지도교수 조 정 훈

이 논문을 교육학석사(생물교육)학위 청구논문으로 제출함.

2009년 4월

조선대학교 교육대학원

생물교육전공

선 주 리

Collection @ chosun

선주리의 교육학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 조선대학교 교수 이용보 인

심사위원 조선대학교 교수 조은희 인

심사위원 조선대학교 교수 조정훈 인

2009년 6월

조선대학교 교육대학원

Collection @ chosun

목 차

목차 i

그림 목차 ii

ABSTRACT iii

Ⅰ.서론(INTRODUTION) 1

Ⅱ. 재료 및 방법(MATERIALS AND METHODS) 4

A. 예쁜꼬마선충 스트레인(*C. elegans* strain)과 배양조건 4

B. 병원균주(pathogen strain)와 배양조건 5

C. *smf* 유전자가족 프로모터 결합 녹색형광단백질(GFP) 플라스미드 제작 5

D. DNA 형질 전환체 제작 및 녹색형광단백질(GFP) 발현 6

E. 교차 교배(out-cross)와 이중돌연변이(double mutant) 제작 6

교차 교배(out-cross) 8

이중돌연변이(double mutant) 제작 8

F. 고농도의 EDTA와 망간(Mn^{2+}) 실험 9

G. 병원균 실험(pathogen test) 9

Ⅲ. 결과(RESULT) 10

A. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)과 인간의 자연-저항 대식세포 연관 단백질 유전자(Nramp) 유사체, *smf* 유전자가족(*smf* gene family) 10

B. *smf* 프로모터(promoter)에 조절되는 녹색형광 단백질(GFP) 발현양상 10

C. *smf* 유전자가족 돌연변이 교차교배 및 이중돌연변이 제작 11

D. *smf* 유전자가족 돌연변이들의 높은 농도 EDTA, 망간(Mn^{2+})에서의 생존율 12

E. *smf* 유전자가족 돌연변이들의 병원균 민감성 테스트 13

F. 망간(Mn^{2+})과 *smf* 돌연변이들의 병원균 민감성과의 상관관계 13

Ⅳ. 토론(DISCUSSION) 15

참고문헌 42

Collection @ chosun

그림 목차

<그림 1> 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 소개 18

<그림 2a> 예쁜꼬마선충(*C. elegans*) *smf* 유전자가족 사이의 유사도 20

<그림 2b> 예쁜꼬마선충(*C. elegans*) *smf* 유전자가족과 다른 종의 유사체간의 일치도 및 유사도 22

<그림 3> *smf* 유전자가족의 물리적지도(physical map)와 유전적지도 (genetic map) 24

<그림 4> *smf* 프로모터 결합 녹색 형광 단백질(GFP) 플라스미드 제작 26

<그림 5> *smf* 프로모터(promoter)에 의해 발현되는 녹색형광단백질(GFP) 28

<그림 6> *smf* 결실 돌연변이의 교차 교배 30

<그림 7> *smf* 이중돌연변이 제작 32

<그림 8> *smf* 유전자가족 돌연변이들의 높은 농도 EDTA, 망간(Mn^{2+})에서의 생존율 34

<그림 9> *smf* 유전자가족 돌연변이들의 병원균 민감성 테스트 36

<그림 10> 망간(Mn^{2+})과 *smf* 유전자가족 돌연변이들의 병원균 민감성과의 상관관계 38

<그림 11> 대식세포(macrophage)와 선충 내장의 선천면역 모델 40

Collection @ chosun

ABSTRACT

예쁜꼬마선충(*Caenohabditis elegans*)을 이용한 망간항상성이 병원균 감염에 미치는 영향에 대한 연구

Ju Lee Sun

Advisor : Prof. Hoon Jeong Cho

Major in Biology Education

Nramp(Natural resistance-associated macrophage protein) is a manganese transporter in macrophage functionally conserved in bacteria and eukaryotes. Manganese(Mn), which is required in small amounts functions as a cofactor for most antioxidants, and also known as a superoxide scavenger. It is also known that mouse defective in Nramp is susceptible to pathogen. Three Nramp homologues, *smf-1*, *smf-2*, and *smf-3*, have so far been identified in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. GFP promoter assay revealed intestinal expressions of *smf* genes from early embryonic stages and these expressions were maintained through the adult stages. *smf* deletion mutants have sensitivity to excess manganese. Interestingly, defective *smfs* cause hypersensitivity to the pathogen, *Staphylococcus aureus* but not to the non-pathogenic *Bacillus subtilis*, and their sensitivity were recovered by manganese feeding or knock down of a Mn homeostasis related gene, the Golgi calcium/manganese ATPase, *pmr-1*, indicating that manganese uptake is essential for the innate immune system. We propose that *C. elegans* intestinal lumen provide a good and a simple model for macrophage phagosome especially in Mn-mediated innate immune systems.

Collection @ chosun

Ⅰ. 서론(INTRODUCTION)

활성산소(reactive oxygen species; ROS)는 유산소 세포에서 에너지가 생산되는 과정 중에 발생된 산소분자와 그 화학적 파생 생성물의 분자 집단이다.[1] 정상적으로는 활성산소(ROS)와 이를 제거하는 항산화 물질이 평형을 이루지만 활성산소(ROS)등의 산화물질이 과다 생성되거나 항산화 물질이 부족해지면 산화 스트레스(oxidative stress)가 유발된다. 활성산소는 반응성이 크기 때문에 지질, DNA, 단백질에 손상을 주고 노화, 자가 면역질환, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 암 등의 주요 발병원인이 된다.[2][3] 반면, 대식세포(macrophage)나 호중구(neutrophil)와 같은 면역계 세포들이 활성산소(ROS)의 강력한 산화반응을 이용하여 몸 안으로 침입한 미생물이나 바이러스를 공격하는 방어용 무기로 사용되며, 세포내 신호전달에 있어서 중요한 역할을 수행한다.[4] 이는 불필요한 유해물질로 인식되던 활성산소의 유익한 역할 중 하나이다. 이와 같이 활성산소(ROS)는 양날의 칼처럼 잘 쓰면 유용하고 잘못 쓰면 자신을 해하게 된다.

일반 세포는 대사과정 중 발생한 활성산소에 대한 방어기작을 가지고 있다. 세포내에 생성되는 활성산소를 제거하는 체계로 과산화 이온(superoxide anion)을 처리하는 망간-항산화효소(Mn^{2+}-SOD; Mn^{2+}-superoxide dismutase)와 과산화수소수를 제거하는 카탈라아제(catalase), 그리고 항산화 비타민(vitamin C, E) 및 유비퀴논(ubiquinone)등이 있다.[5] 그 중 망간-항산화효소(Mn^{2+}-SOD)는 미토콘드리아 내에 존재하며, 산화적 인산화 과정에서 생성되는 슈퍼옥사이드라디칼(O_2^-) 또는 수산화라디칼(OH^-)과 같은 산소 유리기(free radical)를 제거하여 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 항산화 역할을 한다.[6] 일반적으로 망간(Mn^{2+})은 생체 필수 금속으로 과당의 합성, 골형성, 카테콜아민 대사와 멜라닌 세포의 정상적인 기능에 관여하고, 생체효소반응 중 피루브산 키나아제(pyruvate kinase), 글리코실 전이효소(glycosyl transferase) 및 지방산 합성에 관련된 효소반응의 보조인자로서 작용한다.[7] 또한 망간(Mn^{2+})은 망간-항산화효소(Mn^{2+}-SOD)의 보조인자로써 그리고 그 자체로 항산화 기능을 갖는다.[8][9]

Collection @ chosun

망간(Mn^{2+})은 자연에 존재하는 생체필수금속으로 미량원소 중 하나지만 과량의 망간은 세포에서 자유 라디칼 농도를 증가시켜 세포막 등의 불포화지방산에서 과다한 지질과산화반응을 초래하여 세포의 구조적 손상, 기능장애 및 괴사를 유발한다.[(10)(11)] 즉, 망간(Mn^{2+})은 적정농도에서는 항산화제로 작용하지만, 고농도에서는 산소 유리기를 생성함으로써 독성을 유발한다.[(12)]

이 연구에서는 망간(Mn^{2+})의 항산화 능력과 선천면역의 관계를 밝히고자 한다.

이 실험에 사용한 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*; *C. elegans*)은 토양세균을 먹고사는 토양 선충의 일종으로 성체의 크기가 1mm정도이고 몸통이 투명하여 관찰이 용이하다. 한 마리당 평균 300개 자손을 낳으며, 알에서부터 성체가 되기까지 걸리는 시간이 약 3일로 짧은 생활사를 갖는다(그림 1a, b)[(13)(21)]. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)은 L1, L2, L3, L4의 4단계 유충시기를 거쳐 성체가 된다(그림 1c)[(21)].

예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 성은 자웅동체(hermaphrodite,⚥)와 수컷(male,♂)의 두 가지로 구성되며, 이러한 특성은 돌연변이의 유지 및 다중 돌연변이 제조를 용이하게 한다. 또한 게놈 연구 등으로부터 얻은 방대한 정보를 쉽게 이용할 수 있다. DNA 미세주입(microinjection) 등을 통해 형질전환(transgenic animal)을 만들 수 있고 RNA 간섭실험(RNA interference; RNAi)을 이용하여 쉽게 특정 유전자의 기능을 억제할 수 있어 유전자의 기능연구에 적합하다. 또한 녹색형광단백질(green fluorescent protein; GFP)을 이용하여 생체 내(*in vivo*)에서 유전자 발현 양상 등의 연구가 가능하다.[(13)]

이와 같은 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 장점을 이용하여 연구자는 숙주-병원균 관계에서의 망간(Mn^{2+})의 역할에 대한 연구를 수행하였다. 자연-저항 대식세포 연관 단백질(Nramp; Natural resistance-associated macrophage protein)은 망간수송체로 알려져 있으며 이 유전자의 결함은 대식세포(macrophage)의 면역기능을 약화시킨다.[(14)(15)(16)] 이러한 사실로부터 망간(Mn^{2+})이 선천면역에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.[(17)]

면역계에서 철(Fe^{2+})에 관한 연구는 많이 진행되고 있으나 망간(Mn^{2+})에 관한 연구는 그렇지 못하다. 이 연구에서는 망간(Mn^{2+})과 선천면역과의 관련성을 단순모델

Collection @ chosun

시스템인 선충을 이용하여 연구하고자 한다. 실험에 사용된 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 *smf* 유전자가족(*smf* gene family)은 사람의 자연-저항 대식세포 연관 단백질(Nramp)과 높은 유사도[70%의 유사도(identity)/55%의 일치도(homology)]를 갖는다. 병원균은 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection; KACC)로부터 선충에 대한 치사율이 높은 병원균(pathogen)인 황색포도상구균(*Staphylococcu saureus;* KACC.11596)과 비병원균(non-pathogen)인 고초균(*Bacillus subtilis;* KACC.10854)을 분양받아 사용하였다. 그리고 병원균감염을 비롯한 여러 가지 스트레스로부터 저항성과 민감성을 갖는다고 알려진 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 돌연변이 *daf-2*와 *daf-16*을 대조군으로 사용하였다. 이들은 인슐린 유사 기작에 관련되어 있다고 알려져 있으며, *daf-2* 돌연변이는 정상 선충보다 2배의 수명을 보이고 반대로 *daf-16*은 짧은 수명을 갖는다. *daf-2*는 *daf-16*의 상위조절자이며 *daf-16*의 발현을 저해한다고 알려져 있다.[18] *daf-16*은 전사조절자로 각종 항산화효소 및 항산화 관련 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다.[19]

최근 항생제 오남용으로 인한 내성 박테리아의 등장으로 인류의 건강이 위협받고 있다. 이는 더 강력한 항생제의 개발을 요구한다. 하지만 현재로서 항생제의 개발속도가 병원균의 내성능력 획득 속도를 따라가지 못하고 있다. 무엇보다 항생제 치료가 아닌 새로운 치료방법 개발이 필요한 실정이다. 그러므로 이 연구는 선천면역계를 보다 잘 이해하고 연구에 적합한 모델동물시스템을 확립하여 병원균에 대항하는 새로운 치료법의 개발에 필요한 정보를 제공하고자 수행되었다.[20]

Collection @ chosun

Ⅱ. 재료 및 방법(materials and methods)

A. 예쁜꼬마선충 스트레인(*C. elegans* strain)과 배양조건

정상형 및 돌연변이 선충 스트레인(strain)[N2(wild type), *smf-1*(ok1748)X, *smf-2*(gk133)X, *smf-3*(ok1035)IV, *daf-16*(m26)I과 *daf-2*(e1370)III]은 미국의 미네소타대학에 위치한 예쁜꼬마선충 유전학 센터(*C. elegans* Genetics Center; CGC)로부터 얻었다. 배양에 이용된 선충배지(Nematode Growth Media; NGM)는 1리터(L)기준으로 Tris-Hcl 0.55㎎, Tris base 0.24㎎, Tryptone 3.1㎎, NaCl 2.0㎎, Bacto-agar 17㎎, Cholesterol 1ml(5mg/ml in 95% ethanol)를 넣고 멸균시킨 후 6cm 플라스틱 플레이트(#10060, SPL, Korea)에 10ml씩 부어 굳힌 다음, LB액체배지에 12시간 배양한 선충의 먹이인 대장균 *E. coli*(OP50)를 약 100㎕씩 도말하여 상온에서 2일정도 키운 후 실험에 사용하였다.[13]

교배(mating)배지는 LB액체배지에서 12시간 배양한 대장균(OP50)을 선충 배지(NGM)에 약 10㎕정도 떨어뜨려 도말한 후 상온에서 2일정도 키워 사용하였다. 이는 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)이 좁은 공간에 서식하게 함으로써 교배가 잘 이루어지게 함이다.

B. 병원균주(pathogen strain)와 배양조건

한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection; KACC)로부터 병원성인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus* ; KACC.11596)과 비병원성인 고초균(*Bacillus subtilis;* KACC.10854)을 확보하였다. 이들을 뇌심장조직배지(Brain-Heart Infusion; BHI)에서 배양하였다. 병원균 배양에 이용된 BHI액체배지는 뇌심장조직배지분말(Bacto™ Brain heart infusion; Becton, Dickinson and company, USA)을 1L당 37g 넣었으며, BHI고체배지는 추가로 한천(Bacto™agar; Becton, Dickinson and company, USA) 15g을 넣어 멸균한 뒤 6cm 플라스틱 플레이트(#10060, SPL, Korea)에 10ml씩 넣고 굳힌 후 박테리아를 도말하여 사용하였다. 황색포도상구균과 고초균은 37℃에서 6시간동안 BHI액체배지에 배양하고 BHI

Collection @ chosun

고체배지에 10㎕씩 떨어뜨려 도말한 후 37℃에서 6시간, 25℃에서 6시간동안 다시 배양시켜 실험에 사용하였다.[13]

C. *smf* 유전자가족 프로모터 결합 녹색형광단백질(GFP) 플라스미드 제작

smf-1, *smf-2*, *smf-3*의 5′상위영역의 약 1.5~2kb DNA 조각을 연쇄중합효소반응(PCR, Biometa; personal cycler 사용)을 이용하여 획득하고, 제한효소를 이용하여 클로닝(cloning) 하였다. 연쇄중합효소반응(PCR)의 주형 DNA(template DNA)로 *smf-1*과 *smf-2*는 코스미드 KllG12.4, *smf-3*는 Y69A2AR.4를 사용하였고, 파이어 벡터(fire vector) pPD95.77에 이들 연쇄중합효소반응(PCR) 결과물들을 제한효소[Sph I과 Xba I(New England Biolabs, Inc, USA)]를 이용하여 삽입하였다.

다음은 실험에 사용한 시발체(primer)의 서열이다.

smf-1 프로모터 왼편 프라이머(*smf-1* promoter left primer):
5′-GTGT GCATGC CCAACATCAGTACCAC-3′;
smf-1 프로모터 오른편 프라이머(*smf-1* promoter right primer):
5′-TGCCAT TCTAGA GCCAAGAAACTTG-3′
[연쇄중합효소반응(PCR) 결과물 크기: 1.3kb],

smf-2 프로모터 왼편 프라이머(*smf-2* promoter left primer):
5′-GAAA GCATGC CAGACACCGTTTCC-3′;
smf-2 프로모터 오른편 프라이머(*smf-2* promoter right primer):
5′-ACGCAATGCTC TCTAGA AATCCAG-3′
[연쇄중합효소반응(PCR) 결과물 크기:1.4kb],

smf-3 프로모터 왼편 프라이머(*smf-3* promoter left primer):
5′-CATTGGGGGCATGCTTTGTGGA-3′;

Collection @ chosun

smf-3 프로모터 오른편 프라이머(*smf-3* promoter right primer):
5′-ACTCTAGGTCTAGATTTCCTGACG-3′
[연쇄중합효소반응(PCR) 결과물 크기:1.45kb].

D. DNA 형질 전환체 제작 및 녹색형광단백질(GFP) 발현

자웅동체의 자궁에 플라스미드(plasmid) DNA를 주입하여 형질전환체를 만들었다. 젊은 성체(young adults)의 자궁에 *smf* 프로모터 결합 녹색형광단백질 플라스미드(*smf* promoter::gfp plasmid)와 pRF4를 각각 30ng/㎕와 70ng/㎕ 농도로 섞어 주입하였다. 형질전환의 표지자인 플라스미드(plasmid) pRF4는 돌연변이형 콜라겐을 암호화하는 대립유전자 *rol-6*(su1006)를 내포하여 형질전환체를 반시계 방향으로 회전하도록 한다. 미세주입으로 얻어진 형질전환체를 분리하였고 3세대 이후 형광현미경하에서 형광의 발현을 관찰하였다.

E. 교차 교배(out-cross)와 이중돌연변이(double mutant) 제작

결실 돌연변이 확인을 위해 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)방법을 이용하였다. 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)은 두 번에 걸쳐 중합효소반응을 수행하는 방법으로 단일 연쇄중합효소반응(PCR)보다 민감하여 주형의 순도가 낮은 경우에 주로 사용된다. 주형 DNA는 선충을 단백질 분해효소 K(proteinase K)가 들어있는 용해액(lysis buffer)에 넣고 -80℃에서 15분 얼린 뒤, 65℃에서 1시간 용해반응을 시켜 얻었다. 용해액(lysis buffer)의 조성은 다음과 같다. 용해액(lysis buffer): 10mM Tris pH 8.2, 50mM KCl, 2.5mM $MgCl_2$, 0.45% Tween 20, 0.05% gelatin.

네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR, Biometa; personal cycle) 조건은 1단계로 94℃에서 3분 동안 DNA를 변성시키고, 2단계로 55℃에서 30초, 3단계로 72℃에서 2분, 4단계로 95℃에서 30초 동안 반응시켰다. 2단계부터 4단계 과정을 33회 반

Collection @ chosun

복한 후 마지막 5단계로 72℃에서 5분간 신전(extension)하였다. 1차 연쇄중합효소반응의 결과물 50㎕중 1㎕를 2차 연쇄중합효소반응의 주형으로 이용하였다. 연쇄중합효소반응의 최종산물의 양은 50㎕이고 반응물의 조성은 다음과 같다. 10X buffer 5㎕, dNTP 3㎕ 100pmol, primer 각각 0.5㎕, 주형 1㎕, Klen taq polymerase (Any Gen Co-Ctd, Korea) 1㎕, 증류수 39㎕.

다음은 실험에 사용한 시발체(primer)의 서열이다.

smf-1 바깥의 왼편 시발체(*smf-1* outer left primer):
5′-TCGTGGTGTCAAAATAGCCA-3′
smf-1 바깥의 오른편 시발체(*smf-1* outer right primer):
5′-GTGAAGATTGCCGGAAGAAC-3′
smf-1 안쪽의 왼편 시발체(*smf-1* inner left primer):
5′-TCAGTTTGGCACCACGTTAG-3′
smf-1 안쪽의 오른편 시발체(*smf-1* inner right primer):
5′-CGACAATCACCCACTGTTTG-3′

smf-2 바깥의 왼편 시발체(*smf-2* outer left primer):
5′-GTCAACACTCGCTTCATCAC-3′
smf-2 바깥의 오른편 시발체(*smf-2* outer right primer):
5′-GACTTCCAAAAATGTGGTAG-3′
smf-2 안쪽의 왼편 시발체(*smf-2* inner left primer):
5′-CAGTTTTCGGATGCCATA-3′
smf-2 안쪽의 오른편 시발체(*smf-2* inner right primer):
5′-ACTAAGCATGTTTCTGCACA-3′

smf-3 바깥의 왼쪽 시발체(*smf-3* outer left primer):
5′-ATTAGGGAAAAGCCTGAGATGC-3′

Collection @ chosun

smf-3 바깥의 오른쪽 시발체(*smf-3* outer right primer);
5′-ACAGCAAGAGTTGGAAGGATTG-3′
smf-3 바깥의 왼쪽 시발체 (*smf-3* outer left primer):
5′-ATTAGGGAAAAGCCTGAGATGC-3′
smf-3 바깥의 오른쪽 시발체(*smf-3* outer right primer):
5′-ACAGCAAGAGTTGGAAGGATTG-3′

교차 교배 (out-cross)

교배 배지에 10마리의 정상형 N2(wild type) 수컷(♂)과 3마리의 동형접합자 돌연변이(hermaphrodite;⚥)를 올려놓고 교배가 충분히 이루어진 24시간 후 무작위로 다음세대(L1～L2 시기 유충)를 한 마리씩 새로운 선충배지(NGM)에 놓는다. 3일 후 이들 유충은 성체가 되어 알을 낳게 되는데, 이형접합자의 자웅동체가 자손을 낳으면 그중에서 25%의 동형 접합자(homozygote) 돌연변이가 나오게 된다. 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)을 이용하여 이들 중 동형접합자 돌연변이를 선별한다. 이러한 교차 교배는 *smf-1*, *smf-2*, *smf-3* 돌연변이 각각에 대해 모두 3번에 걸쳐 수행되었다.

이중돌연변이(double mutant) 제작

이중돌연변이를 만드는 과정도 교차 교배와 유사하다. 교차 교배로 얻은 *smf* 순수 돌연변이들 간에 교배를 시키고, 3일 후에 교배된 1세대(F1)에서 무작위로 골라 한 개의 배지 당 한 마리씩 키운다. 이중돌연변이가 나올 확률은 1/16이고 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)을 통해서 이중돌연변이(double mutant)를 찾는다. 이러한 방법으로 *smf* 유전자가족들(*smf* gene family) 중 *smf-1*과 *smf-3, smf-2*와 *smf-3*의 교배를 통하여 이중 돌연변이 *smf-1;smf-3*와 *smf-2;smf-3*를 만들었다. *smf-1*과 *smf-2*는 이웃유전자로 두 유전자간의 유전적 거리는 0.02CM으로 매우 가까워 이중돌연변이(double mutant)제작이 사실상 불가능하다. 교배를 통해 나타난 자손들의 유전형 확인을 위해 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)을 사용하였

Collection @ chosun

다.

F. 고농도의 EDTA와 망간(Mn^{2+})실험

20mM EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)배지와 20mM $MnCl_2$배지는 대장균(*E. coli*; OP50)이 깔린 선충배지에 각각 0.5M EDTA를 400㎕, 1M $MnCl_2$를 200㎕ 도말하여 준비하였다. 이 실험에는 젊은 성체(young adults)를 40마리씩 옮겨 20℃ 배양기에서 키웠으며 2일 후에 생존율을 측정하였다. 실험은 총 6번에 걸쳐 수행되었다.

G. 병원균 실험(pathogen test)

한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection; KACC)로부터 얻은 병원균(pathogen) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; KACC.11596)과 비병원균(non-pathogen) 고초균(*Bacillus subtilis*; KACC.10854)은 37℃에서 뇌심장조직(BHI) 액체배지에서 12시간 배양하고, 뇌심장조직 고체배지에 도말하였다. 도말한 뇌심장(BHI) 고체배지에 37℃에서 약 6시간, 20℃에서 약 6시간을 배양한 후 선충을 40마리씩 올려놓았다. 실험은 총 6번에 걸쳐 실시하였다.

망간(Mn^{2+}) 섭취 병원균 감염 실험에서는 L2 단계의 유충을 1mM의 망간(Mn^{2+})이 함유된 선충배지(NGM)에 24시간 배양한 후, 일반 선충배지(NGM)에 옮겨 12시간 배양된 선충을 실험에 사용하였다.

예쁜꼬마선충(*C. elegans*)이 배지를 가볍게 두드리는 작업(tapping) 후에도 반응이 없거나 인두(pharynx)에서 저작 작용인 펌핑(pumping)을 하지 않는 경우를 죽은 것으로 판단하고 기록하였다.

Collection @ chosun

Ⅲ. 결과(Result)

A. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)과 인간의 자연-저항 대식세포 연관 단백질(Nramp) 유전자 유사체, *smf*유전자 가족(*smf* gene family)

예쁜꼬마선충(*C. elegans*) *smf-1*, *smf-2*, *smf-3*간의 유사도는 *smf-1*과 *smf-2*간에 80%의 유사도와 67%의 일치도를 보이고, *smf-1*과 *smf-3*은 54%의 유사도, 70%의 일치도를 보인다. *smf-2*와 *smf-3*간의 유사도와 일치도는 각각 70%와 54%이다. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*) *smf-1*의 아미노산 개수는 562개이고 *smf-2*와 *smf-3*는 각각 465개와 666개이다(그림 2a).

예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 *smf* 유전자가족 돌연변이들은 자연-저항 대식세포 연관 단백질(Nramp) 유전자와는 70%정도의 유사도와 55%정도의 일치도를 보였고, 효모(yeast)의 *smf* 가족과는 50%의 유사도와 30%의 일치도를 보였다(그림 2b).

*smf-1*과 *smf-2*는 성염색체 X상에 존재하고 *smf-3* 상염색체 Ⅳ에 존재한다. X염색체상에서 *smf-1*과 *smf-2* 유전자는 *mdl-1*과 *acr-3*사이에 존재하며 두 유전자간의 유전적 거리와 물리적 거리는 각각 0.02CM과 약 1kb로 매우 가깝다(그림 3a). *smf-3*는 상염색체 Ⅳ에서 *ngn-1*과 *nhr-242*사이에 존재한다(그림 3b).

B. *smf*프로모터(promoter)에 의해 조절되는 녹색형광단백질(GFP)의 발현양상

코스미드(cosmid) KllG12.4와 Y69A2AR.4를 각각 *smf-1, smf-2*와 *smf-3*의 주형으로 연쇄중합효소반응(PCR)을 이용하여 프로모터로 예상되는 5'상위부분 약 1.5~2kb를 확보하였고, 이들을 스탠포드 대학의 앤드류 파이어 박사 실험실에서 제작된 선충유전자 발현 벡터인 파이어벡터 pPD95.77에 제한효소 Sph I과 Xba I을 이용하여 녹색형광단백질(Green Fluorescent Protein; GFP)유전자 앞에 삽입시켰다(그림 4). 이 플라스미드들을 정상형 선충의 자궁에 미세 주입시켜 형질전환체를 확보하

Collection @ chosun

였고 이를 초기 배 발생단계에서부터 성체에 이르기까지 형광현미경에서 관찰한 결과 *smf-1*과 *smf-3* 프로모터의 조절을 받는 녹색형광단백질 유전자는 내장세포에서 강하게 발현되었다. *smf-2*의 경우 녹색형광단백질의 발현이 관찰되지 않았다. 이는 전사에 필요한 요소가 결핍되었음을 의미한다.

smf-1 프로모터 결합 녹색형광단백질 플라스미드(*smf-1* promoter::gfp plasmid)로 형질 전환된 선충은 초기 배 발생 단계에서부터 성체에 이르기까지 내장세포에서 강한 발현을 보였다. 또한 배설세포, 상피세포, 머리 쪽 신경세포, 음문세포 등에서 형광이 관찰되었다(그림 5A-E).

smf-3 프로모터 결합 녹색형광단백질 플라스미드(*smf-3* promoter::gfp plasmid)를 획득한 형질 전환체 역시 내장세포에 강한 형광을 보였으며 다른 조직에서는 형광이 관찰되지 않았다(그림 5F).

C. *smf* 유전자가족 돌연변이 교차 교배 및 이중돌연변이 제작

이 실험에 이용된 *smfs* 돌연변이는 역유전학적 방법(reverse mutagenesis)으로 얻어진 결실 돌연변이(deletion mutant)로 예쁜꼬마선충 유전학 센터(*C. elegans* Genetics Center; CGC, 미국의 미네소타 대학에 위치)로부터 받았다. 이들 돌연변이체들(*smf-1, smf-2, smf-3*)은 교차 교배(out-cross)가 되지 않은 것으로 정상형 N2와 3번에 걸친 교차 교배를 통해 순수 돌연변이를 확보하였다. 자웅동체 *smfs* 돌연변이와 정상 돌연변이 수컷을 교배하여 이형 접합자를 얻었고, 이들 중 자웅동체를 각각 한 마리씩 한 배지에 옮겼다. 2일 후에 각각의 배지로부터 일부 선충을 포획하고 단백질 분해효소 K(proteinase K)를 처리한 후, 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)의 주형으로 사용하여 *smf* 동형접합자 돌연변이를 만들었다(그림 6).

이중돌연변이(double mutant)를 만드는 과정도 교차 교배(out-cross)와 유사하다. 세 차례의 교차 교배를 통해 얻어진 순수 *smfs* 돌연변이 간에 교배를 통해 이중 돌연변이 이형접합자 자웅동체를 확보하였다. 이들을 자가 수정을 시키면 자손들 중 16분의 1의 확률로 이중돌연변이 동형접합자를 얻을 수 있었다. 이들의 유전형을

Collection @ chosun

확인하기 위해 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)을 이용하였다(그림 7).

*smf-1*의 경우 1차 연쇄중합효소반응에는 시발체로 *smf-1* 바깥의 왼편 시발체(*smf-1* outer left primer)와 *smf-1* 바깥의 오른편 시발체(*smf-1* outer right primer)를 사용하였고, 2차 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)에서는 *smf-1* 안쪽의 왼편 시발체(*smf-1* inner left primer)와 *smf-1* 안쪽의 오른편 시발체(*smf-1* inner right primer)를 시발체로 사용하였다. 정상형의 경우 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)의 예상크기는 3158bp이고 *smf-1* 돌연변이(ok1748)는 959bp 결실되었으므로 돌연변이 동형접합자의 경우 2199bp의 결과물이 나온다. *smf-2(*gk133)와 *smf-3*(ok1035) 돌연변이의 경우 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR) 결과물의 크기는 정상형과 결실 돌연변이에 대해 각각 1248bp와 800bp, 그리고 약 3500bp와 1700bp이다.

D. *smf* 유전자 가족 돌연변이들의 높은 농도 EDTA, 망간 (Mn^{2+})에서의 생존율

선충의 *smf* 유전자가족 돌연변이들이 망간(Mn^{2+})의 항상성에 관련되어 있는지 확인하기 위해 2가 이온 킬레이트인 EDTA를 처리한 환경과 고농도의 망간을 처리한 환경에서의 생존율을 측정하였다. 실험에는 일반 선충배지(NGM), 20mM EDTA가 포함된 선충배지(NGM+20mM EDTA), 20mM의 망간(Mn^{2+})이 포함된 선충배지(NGM+20mM $MnCl_2$)에 각각 40마리의 선충들을 올려놓은 후 20℃에서 배양하였고, 3일 후의 생존율을 조사하였다. 그래프는 이 실험을 6번 반복하여 평균값으로 나타낸 것이다. *smf* 유전자가족 돌연변이들의 대조군으로 인슐린 관련 돌연변이인 *daf-2*와 *daf-16*이 사용되었다. 아무것도 처리하지 않은 일반 선충 배지(NGM)에서 자라는 생존율을 살펴보면 모두 약 98%의 높은 생존율을 나타내었으나 20mM EDTA환경에서는 정상형 생존율(약 80%)에 비해 *smf* 유전자가족 돌연변이는 약간 낮은 생존율(60~70%)을 보였다. 20mM $MnCl_2$을 함유한 고농도망간 환경에서는 *smf* 가족 돌연변이의 생존율이 정상형에 비해 급감하였다. 특히 이중돌연변이들

Collection @ chosun

(double mutant)은 단일 *smf* 유전자가족 돌연변이 보다 더 큰 민감성을 보였다(그림 8).

E. *smf* 유전자가족 돌연변이들의 병원균 민감성 테스트

smf 유전자가족 돌연변이들의 선천면역 관련성을 조사하기 위해 민감성 테스트를 실시하였다. 병원균(pathogen)으로는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; KACC.11596)을 사용하였고 대조군으로 비병원성인 고초균(*Bacillus subtilis*; KACC.10854)과 열처리로 죽인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; KACC. 11596)을 이용하였다. 40마리의 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)을 배지로 옮겼고 3일 후의 생존율을 측정하였다. 비병원성균인 고초균(*Bacillus subtilis*)에 대해서는 선충 대부분이 90% 이상의 생존율을 보였다. 반면 선충에 대해 병원성을 나타낸다고 알려진 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에서 정상형 N2는 약 75%의 생존율을 보였고, *smf* 유전자가족 돌연변이는 약 50%의 생존율을 보였다. 여러 가지 스트레스로부터 저항성을 갖는다고 알려진 *daf-2* 돌연변이체는 상대적으로 90%의 생존율로 높은 저항성을 보였고, 스트레스에 민감하다고 알려진 *daf-16*은 약 70%의 생존율을 보였다. 이러한 병원균의 병원성은 열처리 후 사라졌다. 그래프에서 보듯이 죽은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 처리한 경우 비병원성 고초균(*Bacillus subtilis*)을 처리했을 때와 마찬가지로 정상형과 모든 돌연변이체에서 90% 이상의 높은 생존율이 나타남을 확인할 수 있다(그림 9).

F. 망간(Mn^{2+})과 *smf* 유전자가족 돌연변이들의 병원균 민감성과의 상관관계

앞의 병원균 실험에서 살아있는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 *smf* 유전자가족 돌연변이들이 큰 민감성을 보였다. 망간(Mn^{2+})결핍에 의해 병원균에 대한 민감성이 증가한 것으로 예상되며 망간(Mn^{2+})과 선천면역의 관계를 확인하기 위해 선충의 성장 과정 중 망간(Mn^{2+})을 투여하였다. *smf* 유전자가족 돌연변

Collection @ chosun

이들과 대조군의 L2 단계 유충을 1mM $MnCl_2$가 함유된 선충배지(NGM)에 하루정도 배양하고, 다시 하루정도 일반 선충배지(NGM)에서 배양하여 외부 표피나 장내에 남아있을지 모를 망간(Mn^{2+})을 씻어 주었다. 그런 다음 병원균 배지에 올려놓고 3일 후의 생존율을 확인한 결과 모든 종류의 선충들의 생존율이 증가하였다. 특히 평균 50% 정도였던 *smf* 유전자가족 돌연변이들의 생존율이 약 80%정도로 회복되었다. 또한 세포질 내에 존재하는 망간(Mn^{2+})을 세포 밖으로 분비한다고 알려진 골지-망간 수송체인 *pmr-1*을 RNA간섭방법(RNAi)으로 저해한 결과, 1mM 망간(Mn^{2+})을 투여한 실험과 유사하게 병원균에 대한 저항성을 보였다(그림 10).[20]

Collection @ chosun

Ⅳ. 토론(Discussion)

이 연구에서는 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)을 모델동물로 이용하여 선천면역기작에 망간(Mn^{2+})이 관련되어 있는지를 밝히고자 하였다. 망간(Mn^{2+}) 흡수에 관련된 망간 수송체인 대식세포의 자연-저항 대식세포 연관 단백질(Nramp)의 유사체가 선충에 약 75%의 높은 유사도로 보존되어 있다. 선충은 *smf-1*과 *smf-2* 그리고 *smf-3* 세 종류의 Nramp 유사체를 갖고 있으며, *smf-1*과 *smf-2*는 같은 성염색체 X상에 약 1.5kb 거리로 이웃해 있으며 *smf-3*은 상동염색체 IV상에 존재한다. 이들 선충 Nramp 유사 유전자의 프로모터 부위를 녹색형광단백질(GFP)에 붙인 실험 결과, 내장세포에서 강하게 발현되었다. *smf-1*의 프로모터를 녹색형광단백질에 연결시킨 경우 장에서 강하게 발현되었으며 그 밖에도 신경세포, 음문세포, 표피세포 등에서도 약하게 발현되었다. *smf-3*의 프로모터도 장에서 강한 발현을 보였으나 그 외의 부위에서는 발현이 관찰되지 않았으며, *smf-2*의 경우 발현이 아무 곳에서도 관찰되지 않았다. *smf-2* 유전자는 *smf-1*과의 거리가 약 1kb로 매우 가까이 위치해 있어 선충에서 흔히 발견되는 오페론(operon)관계일 것으로 추정된다. 즉, *smf-2* 유전자는 *smf-1* 유전자 뒤에 존재하는 오페론(operon) 유전자로 *smf-1* 유전자에 의해 발현이 조절될 것으로 예상된다. 진핵동물에서 오페론관계는 매우 드문 일이나 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 경우에서는 일반적인 전사 조절 기작이다.

예쁜꼬마선충 유전학 센터(CGC)로부터 확보한 *smf-1, smf-2, smf-3* 돌연변이들은 순수한 돌연변이를 얻는 과정인 교차 교배(out-cross)를 3번 실시한 후 실험에 사용하였다. *smf* 돌연변이들은 2가 이온의 킬레이트인 EDTA처리 실험과 고농도 망간(Mn^{2+})처리 실험에 대해 정상형에 비해 민감성을 보였다. 특히 고농도의 망간에 대해서는 큰 민감성을 보였다. 이는 *smf* 유전자가족돌연변이들이 망간(Mn^{2+})의 항상성에 관련되어 있음을 간접적으로 보여준다. 망간(Mn^{2+})은 항산화 기작에 중요한 금속으로 알려져 있다. 숙주-병원균(host-pathogen)관계에서 숙주는 병원균을 죽이기 위해 활성산소를 이용한다. 하지만 활성산소는 양날의 칼처럼 잘 쓰면 유용하지만 자칫 잘못하면 자신을 해하게 된다. 자신의 칼날에 다치지 않기 위해서는 활성산소를 효과적으로 제어할 수 있어야 할 것이다. 즉 항산화 기작이 필요하다.

dCollection @ chosun

항산화에 주요한 (Mn^{2+})을 흡수하는 자연-저항 대식세포 연관단백질 수송체(Nramp)의 선충 유사체들인 *smf* 유전자가족 돌연변이들에 병원균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 처리한 결과, 정상형에 비해 생존율이 급감하였고 이들 병원균 감염 민감성 돌연변이의 성장과정 중 적정 농도의 망간(Mn^{2+})을 투여하였더니 병원균 민감성 표현형이 대부분 회복되었다. 또한 세포질 내에 존재하는 망간(Mn^{2+})을 세포 밖으로 분비한다고 알려진 *pmr-1*의 발현을 RNA 간섭(RNAi)방법을 이용하여 억제시켰을 때 병원균에 대한 민감성이 어느 정도 회복됨을 확인하였다. 이러한 결과로부터 숙주-병원균 관계에서 망간(Mn^{2+})이 중요한 역할을 담당하며, 이들의 항상성에 관여하는 수송체인 *smf* 유전자가족 돌연변이들이 기능을 상실하면 병원균 감염에 민감하다는 사실을 알 수 있었다.

망간(Mn^{2+}) 수송체는 두 가지 이유로 숙주-병원체 관계에서 중요할 것으로 예상된다. 첫째, 숙주는 병원균의 감염에 대항하여 듀옥스(NADPH oxidase; DUOX)효소를 이용하여 반응성 산소종을 만들고 이들 반응성 산소종로부터 자신을 보호하기 위해 항산화효소의 보조인자로 혹은 그 자체의 항산화 능력 때문에 망간(Mn^{2+})을 필요로 한다. 둘째, 식포(phagosome)라고 하는 갇힌 공간 내의 병원균을 효과적으로 죽이기 위해 망간(Mn^{2+}) 농도를 떨어뜨린다. 세균도 활성산소로부터 자신을 보호하기 위해 망간(Mn^{2+})을 확보하려 하기 때문에 대식세포(macrophage)와 세균 간에 망간(Mn^{2+})에 대한 경쟁이 일어난다(그림 11).

이와 유사한 기전이 선충의 장내에 존재함을 이 연구에서는 보여주고자 한다. 즉, 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)은 박테리아를 주식으로 하기 때문에 쉽게 병원균에 노출될 수 있다. 선충은 병원균에 감염되지 않기 위해 방어 기전을 가지고 있을 것이다. 선충의 장내부는 마치 병원균을 삼켜 가둔 대식세포(macrophage)의 식포(phagosome)와 유사하며 식포막에 존재하고 식포 내 망간(Mn^{2+})을 대식세포질로 수송하는 인간의 자연-저항 대식세포 연관 단백질 유전자(Nramp)의 선충 유사체인 *smf*의 발현을 조사한 결과 장에서 강하게 발현됨을 보여주었다. 또한 인간의 자연-저항 대식세포 연관 단백질 유전자(Nramp) 돌연변이가 척추동물에서 병원균 민감성 표현형을 보였듯, 선충의 *smf* 유전자가족 돌연변이 역시 병원균의 공격에 취약

Collection @ chosun

하였다. 이 연구를 통해 숙주-병원균 관계의 연구를 위한 단순 동물 모델 시스템을 확립하였고 망간(Mn^{2+}) 투여 실험에서 보여준 망간섭취에 의한 면역력 향상은 새로운 병원균 대항 치료법개발에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Collection @ chosun

그림 1. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 소개

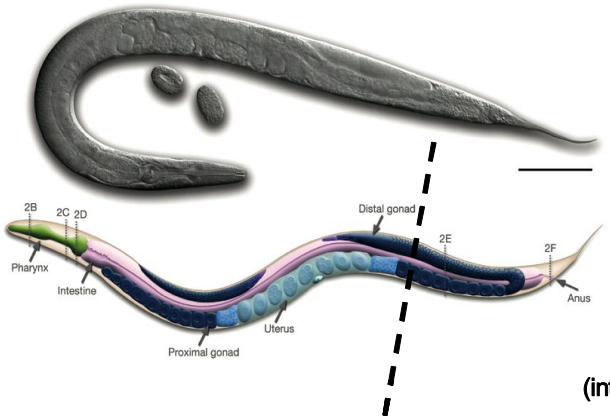
a) 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)는 토양에 서식하는 선충의 일종으로, 자웅동체와 수컷의 두 가지 성을 가지며, 실험실에서 쉽게 배양이 가능한 대장균을 먹는다. 성체의 크기는 약 1mm이며 몸통이 투명하여 관찰이 용이하다. 녹색은 인두, 남색은 생식선, 자궁은 파란색이고 내장은 보라색으로 표시하였다. 크기 막대는 0.1mm이다.

b) 선충의 절단면을 보여주는 그림으로 내장세포들을 보라색으로 표시하였다. 내장 세포내에 속이 비어있는 내강(lumen)이 보인다.

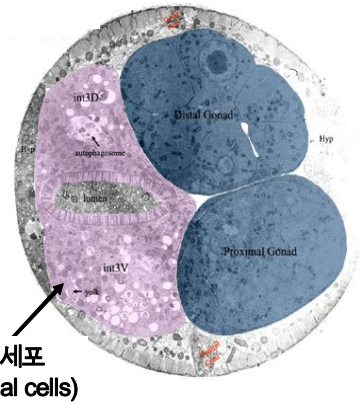
c) 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 자라는 단계는 크게 4단계로 나뉘고 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 생활사는 20℃의 환경에서 약 3일의 생활사를 갖는다. 파란색 숫자는 단계별 소요 시간을 나타낸다. 알을 낳고 난할 과정이 9시간 정도로 진행되고 부화한다. 이후 L1단계를 거쳐 L2단계의 유충이 되고 8시간 후에 L3, 다음 8시간 뒤엔 L4가 되며 L4로부터 10시간 뒤에 완전한 성체가 된다. 만약 먹이가 떨어지게 되면 L1단계에서 L2와 L3단계로 가지 않고 다우어(dauer) 단계로 가게 된다. 이 단계에서 약 몇 달 정도 먹이를 먹지 않고도 생존할 수 있다. 이들은 먹이가 공급되면 다시 L4단계로 편입된다.[21]

Collection @ chosun

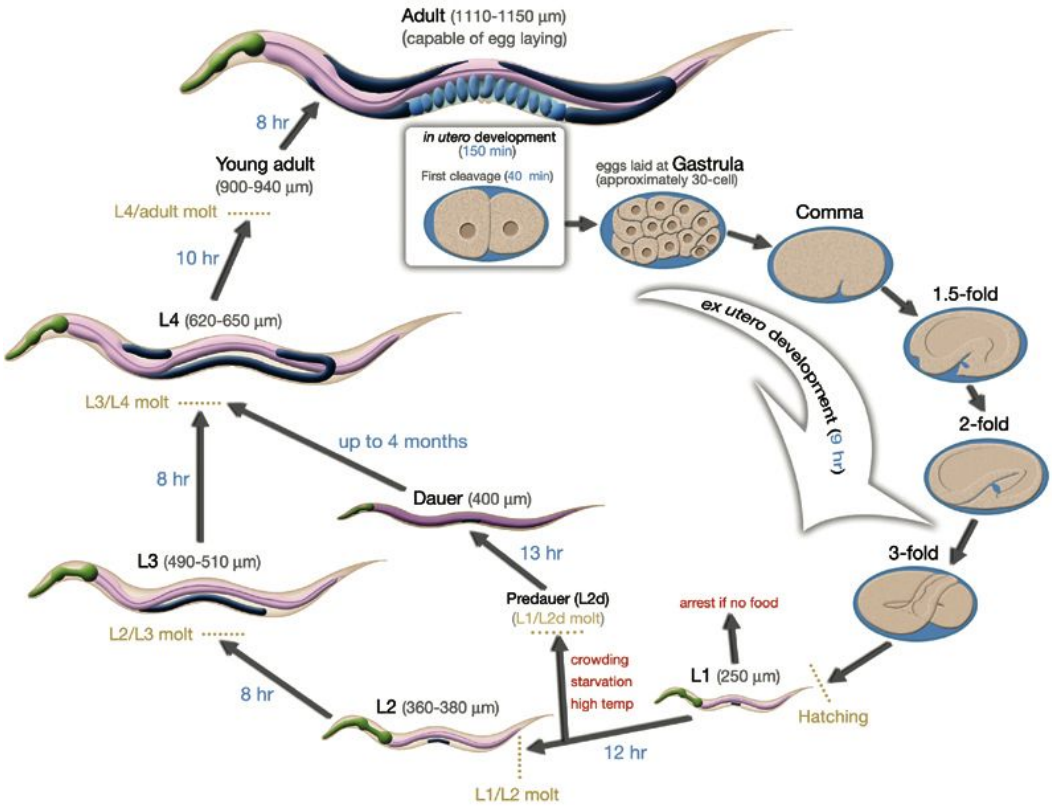
a)



b)



C)



Collection @ chosun

그림 2a. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*) *smf* 유전자가족 사이의 유사도

예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 *smf-1*과 *smf-2*는 80%정도의 유사도와 67%의 일치도를 보이고, *smf-1*과 *smf-3*은 54%의 유사도와 70%의 일치도를 보인다. *smf-2*와 *smf-3*간의 유사도는 70%, 일치도는 54%이다. 선충과 인간의 자연-저항 대식세포 연관 단백질 유전자(Nramp) 유사체인 *smf* 가족간에는 약 70%의 유사도와 50%이상의 일치도를 보인다.

dCollection @ chosun

```
smf-1          ------------------------------------------------------------
smf-2          ------------------------------------------------------------
smf-3          MPRVHRQSRWNSVSFSGFFLQISGIKPRFTSEKGSFLKKKLILKIRFFFKIFFADKTMNF 60

smf-1          ---------------MASSNNDGPIEPEAEPWRITQNDHLEQDLLEED------------ 33
smf-2          ------------------------------------------------------------
smf-3          LIFIFDALTFFISKNTVDTVNFAIFVPNFLIVFFSKFKNFSDNILTMEGEMKCPIEEIRE 120

smf-1          ------AESQERVDIPVDDV-EKAFSFKKLWAFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLQSGAQA 86
smf-2          ---------------------------------------MSIAYLDPGNIESDLQAGAQA 21
smf-3          KPEMRKAQQTYEVQVEVEDTPDTTFSWRKLWAFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLQAGAIS 180
                                                    ****************:** :

smf-1          AYKLLWVLLSAHIIGMLLQRMSARLGVVSGKHMAEVAYQFYPRLPRIILWLMIEIAIVCS 146
smf-2          EYKLLWVLLVSHIVGMLLQRMSARLGVVSGKHMAEIAYDYYPLVPRIILWLMIEIAIVCS 81
smf-3          YFKLIWVLLVAHIMGLLLQRLAARLGVVSGKHMAEIAFSYYPKIPRLVLWMLVESAIVGS 240
                :**:**** :**:*:****::**************:*:.:** :**::**:::* *** *

smf-1          DMQEVIGTAIAIFLLSKGFVPLYVGVFITILDTFTFLLIDRYGIRKLELIFGFLILTMTV 206
smf-2          DMQEVIGTAIAIYLLSSGKIPLLVGVLITILDTFTFLFIDRYGIRKLEFIFVALISTMAI 141
smf-3          DMQEVIGTAISFYLLSNGVIPLWAGVLITICDTFTFLFLEKYGVRKFEAFFCFLITCMAI 300
               **********:::***.* :** .**:*** ******::::**:**:* :*  **  *::

smf-1          SFGYEFVVVKPPIGEVISGMVVPWCAGCGKGEFMQAISVVGAVIMPHNLYLHSALVKSRR 266
smf-2          SFGYEFVVMKPVLTKVLTGTVVPWCSGCGKEEIITAISIFGAVIMPHNFYLHSALVKSRK 201
smf-3          TFGYEFGVSAPDAGKMFSGMFVPWCNGCDNNMVMQGVAIIGAVIMPHNFYLHSALVKSRR 360
               :***** *  *   ::::* .**** **.:  .: .::::.********:**********:

smf-1          VDRKDRRRVAEANKYFTLESAIALFLSFFINLFVVAVFAHGLYQKTNADVREMCIARHDI 326
smf-2          VDRSSKTRIAEANKYFSIESAFALSVSFFINLFVLSVFARGLYQKTNGDV---------- 251
smf-3          VDRRRAEKVTEANKYFFIESAFALFVSFIINTLVISVFAQGMYGKTNQDIRDTCYNNTHN 420
               ***    :::****** :***:** :**:** :*::***:*:* *** *:

smf-1          PDADI----FPNNTEPVEVDIYKGGIYLGCQFGAIAMFIWGIGIFAAGQSSTMTGTYTGQ 382
smf-2          -----------------------GGIYLGCQFGLFAMIIWAIGIFAAGQSSTMTGTYTGQ 288
smf-3          GMPDFYKVEFPANNDAAQSDIYHAGIFLGCTFGIFALYVWAVGILAAGQSSTMTGTYAGQ 480
                                     .**:*** ** :*: :*.:**:************:**

smf-1          FVMEGFVKIEWPKWKRVLITRAIAITPTLVLTFYSQGVQNLTGMNDFLNCVQMIQLPFAL 442
smf-2          FVMEGFVRISWPKWKRVLITRAVAITPTLILCIKAHGIKNLTGMNDFLNCVQMVQLPFAL 348
smf-3          FAMEGFIQIKLPQWKRILITRSLAILPTLAVVIFSGGIDNISSLNDFLNCLQLIQLPFAL 540
               *.****::*. *:***:****::** *** : : : *:.*::.:******:*::******

smf-1          IPIITFTSSRKIMHDFRSSKVFQIFALITSALILSINVYFISDYVFSRLGSEWYIIMVLA 502
smf-2          IPMITFTSSKRIMHNFRTSKPLQYFSIICGIITIGINVYFIFQYVTENFGTGWLIFVIIG 408
smf-3          IPVLTFVSDRNIMHEYKLASVSKVVSIVISLIILFINFYFLYSWIGSTFGYNAVSIPITI 600
               **::**.*.:.***::: :.  : .::: . : : **.**: .:: . :*     : :

smf-1          PITFAYVLFVLYLALYCLVSCEIIPDTVSIRGFSFNKSYENDAPWLAVDSSAVHDNAGYQ 562
smf-2          PFTLLYIAFILYLAIYCLVACELMNDTVNLPGFDFHRTLELDAPWITET--FVVNDVYF- 465
smf-3          FCAIFYIIFIAYLTYYCLVAMEFIS-PIQTKWLAEPIYHDFDAPWLEDSENPSTKNTISD 659
                 :: *: *: **: ****: *::  .:.   :      : ****:        .:.

smf-1          -------
smf-2          -------
smf-3          DELSMRY 666
```

Collection @ chosun

그림 2b. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*) *smf* 유전자가족과 다른 종의 유사체간의 일치도 및 유사도

예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 돌연변이 *smf-1*, *smf-2*, *smf-3*과 인간의 자연-저항 대식세포 연관 단백질 유전자(Nramp)의 유사도는 70%정도이고, 일치도는 55%이다. 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 *smf* 유전자가족과 효모(yeast)의 *smf* 가족 간에는 50%정도 유사도와 30%정도의 일치도를 보였다. (Id/Ho)앞에 위치한 숫자는 일치도 (Id; identity)이고, 뒤에 위치한 숫자는 유사도 (Ho; homology)이다.

Collection @ chosun

	Human		Yeast		
	Nramp1	Nramp2	*smf1*(yeast)	*smf2*(yeast)	*smf3*(yeast)
smf-1(worm)	55/73 (Id/Ho)	58/76	29/47	28/49	30/50
smf-2(worm)	53/69	56/72	30/47	30/49	30/50
smf-3(worm)	57/73	55/74	28/47	30/49	30/48

Id: Identity

Ho: Homology

Collection @ chosun

그림 3. *smf* 유전자가족의 물리적지도(physical map)와 유전적지도(genetic map)

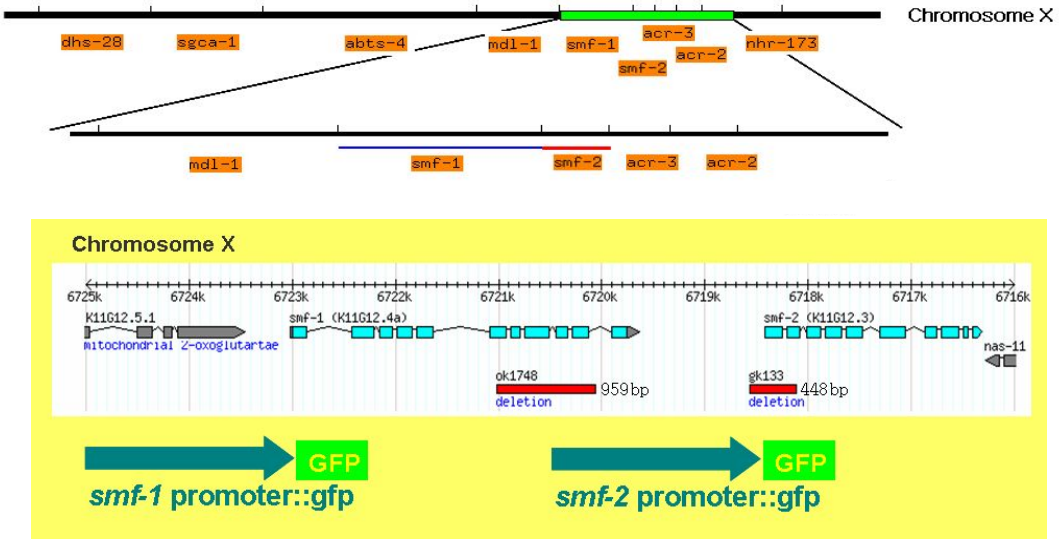
*smf-1*과 *smf-2*는 성 염색체 상에 존재하며 유전적 지도상에는 *mdl-1*과 *acr-3* 유전자 사이인 -2. 52 CM과 -2. 54 CM에 위치한다. 물리적지도(physical map)상 위치는 *smf-1*은 성염색체 X의 6723021~6719625bp에, *smf-2*는 6718419~6716313bp에 존재한다. 이 연구에 사용된 결실 돌연변이 *smf-1*(ok1748)과 결실 돌연변이 *smf-2*(gk133)의 결실부위 각각 959bp와 448bp 위치를 빨간색 선으로 표시하였고 발현연구에 이용된 프로모터 예상부위는 진한 녹색 화살표로 표시하였다(a).

*smf-3*은 상염색체 IV의 유전적 지도상 -6. 98 CM에 위치하며 물리적 지도상에는 2618930~2625435bp에 위치한다. *smf-3*(ok1035) 결실돌연변이는 엑손 4번부터 8번까지 약 1800bp가 결실되었다. 발현연구를 위해서는 약 2kb의 5'상위부위가 이용되었다(진한녹색 화살표)(b).

Collection @ chosun

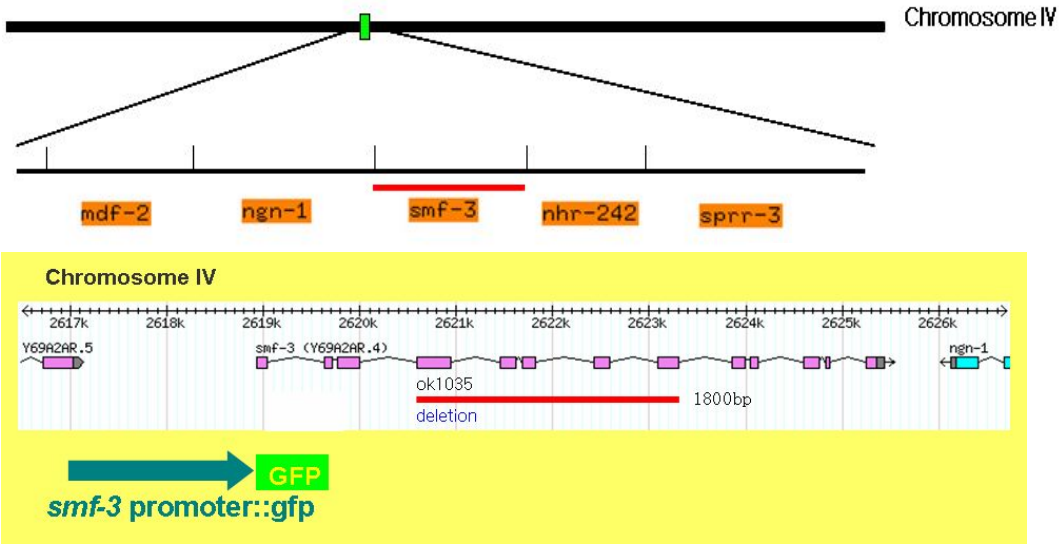
smf-1(X)의 유전적 좌위: -2.52 CM
물리적 위치: 6723021~6719625bp
smf-2(X)의 유전적 좌위: -2.54 CM
물리적 위치: 6718419~6716313bp

(a)



(b)

smf-3(IV)의 유전적 좌위: -6.98 CM
물리적 위치: 2618930~2625435bp

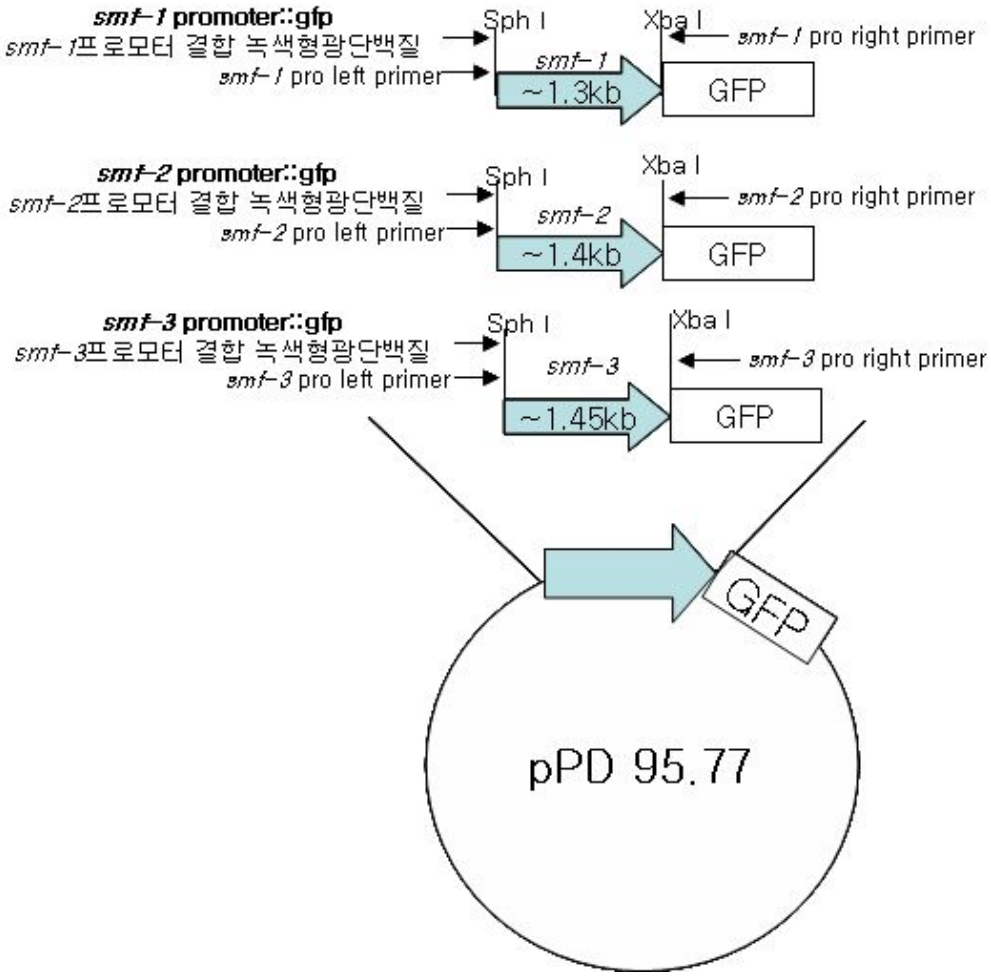


Collection @ chosun

그림 4. *smf* 프로모터 결합 녹색 형광 단백질(GFP) 플라스미드 제작

smf-1, *smf-2*, *smf-3*의 5′상위영역을 연쇄중합효소반응(nested PCR)을 이용해 확장하였다. 연쇄중합효소반응의 주형으로(template) 코스미드(cosmid) KllG12.4와 Y69A2AR.4가 각각 이용되었고, 이들은 제한효소 Sph I과 Xba I을 이용하여 파이어 벡터(fire vector) pPD95.77에 삽입되었다. 파란색 화살표는 주형을 나타낸다. 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)으로 증폭되어 클로닝된 각각의 크기는 *smf-1*은 1.3kb, *smf-2*는 1.4kb, *smf-3*은 1.45kb이다.

Collection @ chosun



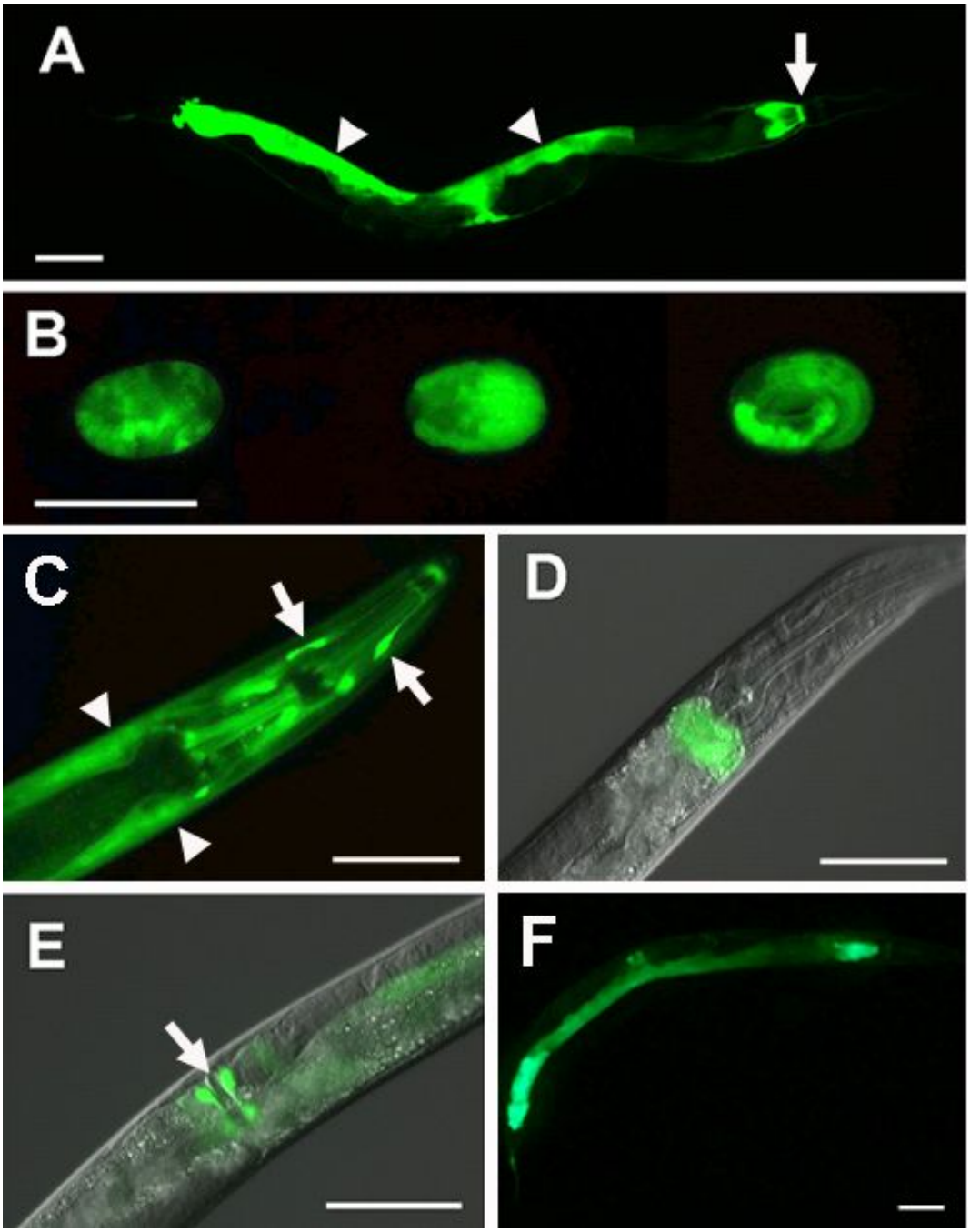
Collection @ chosun

그림 5. *smf* 프로모터(promoter)에 의해 발현되는 녹색형광단백질(GFP)

smf-1 promoter::gfp(A-E)와 *smf-3* promoter::gfp(F)의 형광 발현이 형광현미경 하에서 관찰되었다. *smf-1* promoter::gfp는 배 발생단계(B)부터 성체(A)에 이르기까지 장에서 강하게 발현되었다(A의 화살표 머리와 D). 또한 배설세포(A의 화살표), 상피세포(C의 화살표 머리), 신경세포(C의 화살표), 음문세포(E의 화살표)등에서 발현되었다. *smf-3* promoter::gfp 역시 장에서 강하게 발현되었다.

사이즈 바의 크기는 50㎛이다.

Collection @ chosun

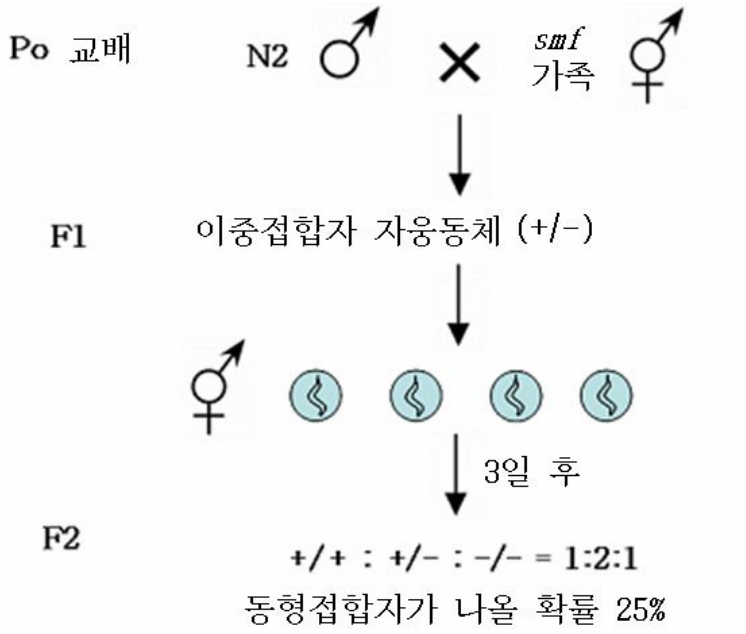


Collection @ chosun

그림 6. *smf* 결실 돌연변이의 교차 교배

교배 배지에 정상형 N2(wild-type) 수컷 10마리와 2마리의 자웅동체들을 올려놓고 24시간 후 다음세대의 L1～L2 시기(stage) 자손들을 한 마리씩 선충배지(NGM)로 옮긴다. 3일후면 L1～L2 시기(stage)의 선충들은 성체(adult)가 되어 알을 낳게 된다. 이형접합자 자웅동체의 자손 중에서 25%는 동형접합자 돌연변이다. 이를 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)방법을 이용하여 이들 중 동형접합자 돌연변이를 선별한다. 이 작업을 3번 반복한다. 정상형 N2(wild-type)의 크기 *smf-1*은 3158bp, *smf-2*는 1248bp 그리고 *smf-3*은 약 3500bp이다. 결실 돌연변이형의 크기 *smf-1*은 2199bp, *smf-2*는 698bp 그리고 *smf-3*은 약 1700bp이다.

Collection @ chosun

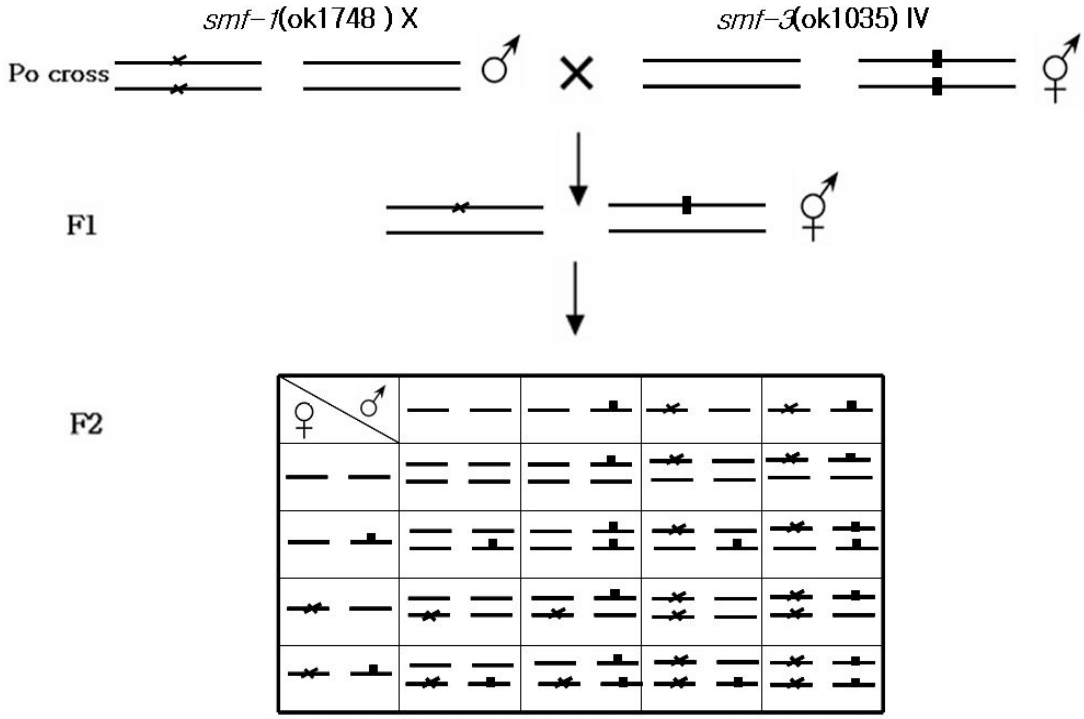


Collection @ chosun

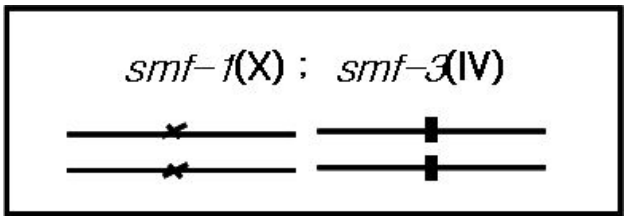
그림 7. *smf* 이중돌연변이 제작

교차 교배를 통해 얻어진 *smf* 유전자가족 돌연변이 순종으로부터 자웅동체와 수컷을 분리하고 *smf* 유전자가족 돌연변이 간에 교배하였다. 3일 후에 교배되어 나온 다음 세대인 F1에서 무작위로 찾아 한 배지 당 한 마리씩 키운다. 여기서 이중돌연변이가 나올 확률은 1/16이다. 이중돌연변이는 네스티드 연쇄중합효소반응(nested PCR)을 통해서 찾았다. 이중돌연변이는 *smf-1*과 *smf-3* 그리고 *smf-2*와 *smf-3* 간에 이루어졌다.

Collection @ chosun



동형접합 이중돌연변이는 1/16확률로 나타나게 된다.

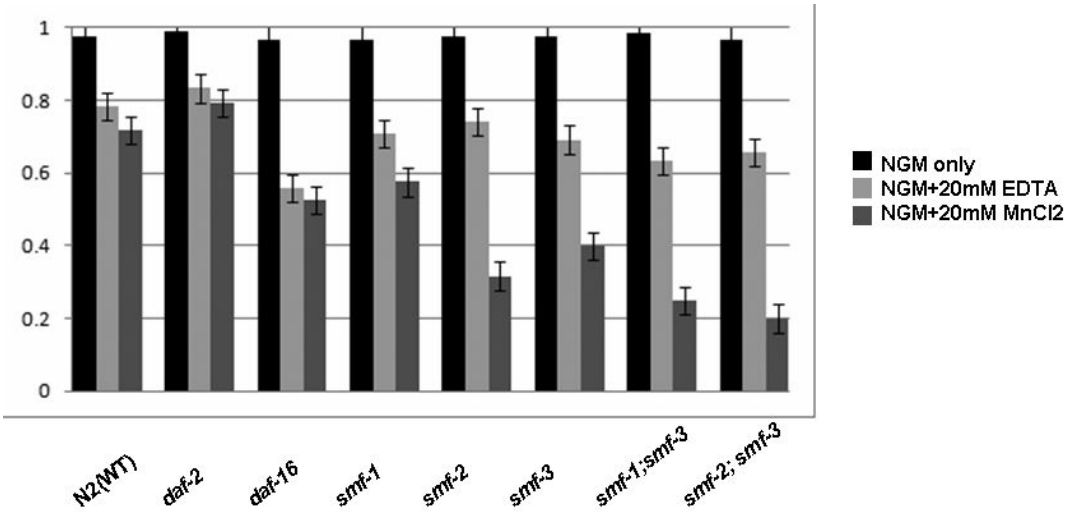


Collection @ chosun

그림 8. 정상형 N2, 인슐린유사기작 돌연변이 *daf-2*, *daf-16* 그리고 *smf* 유전자 가족 돌연변이들의 높은 농도의 EDTA, 망간(Mn^{2+})에서의 생존율

정상형 N2, 단일 *smf* 유전자가족 돌연변이, *smf* 유전자가족 이중돌연변이, 각종 스트레스에 저항성을 갖는 *daf-2* 돌연변이와 민감성을 보이는 *daf-16* 돌연변이가 실험에 이용되었다. 유충 L4 단계를 갓 지난 성체(adult stage)를 20mM EDTA, 20mM $MnCl_2$를 함유한 선충배지에 40마리씩 올려놓고 20℃에서 배양하였다. 2일 후 각각의 생존율을 조사하였고 이와 같은 실험을 총 6회 실험하여 평균값을 그래프로 나타내었다. 검정막대는 아무것도 처리하지 않은 일반 선충 배지에서의 생존율을 나타내며 고농도 EDTA와 고농도 망간 환경에서의 생존율은 각각 어두운 회색막대와 밝은 회색막대로 나타내었다.

Collection @ chosun

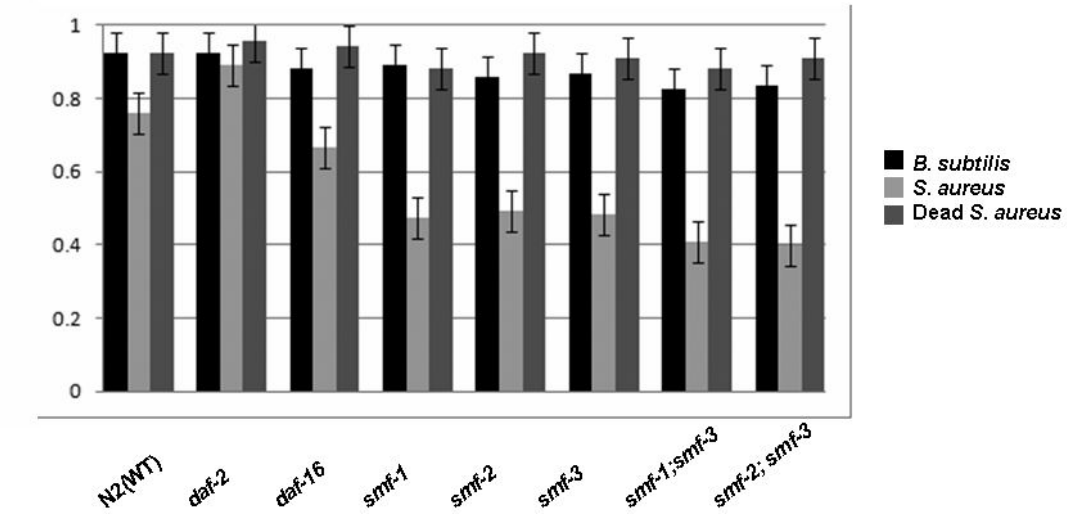


Collection @ chosun

그림 9. 정상형 N2, 인슐린 유사기작 돌연변이 *daf-2*, *daf-16* 그리고 *smf* 유전자가족 돌연변이들의 비병원균 고초균(*Bacillus subtilis*), 병원균 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 죽은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 상태에서의 생존율

정상형 N2(wild type), 단일 *smf* 유전자가족 돌연변이, *smf* 유전자가족 이중돌연변이, 각종 스트레스에 저항성을 갖는 *daf-2* 돌연변이와 민감성을 보이는 *daf-16* 돌연변이가 실험에 이용되었다. 유충 L4 단계를 갓 지난 젊은 성체들을 병원균(pathogen) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus;* KACC.11596), 비병원성인 고초균(*Bacillus subtilis;* KACC.10854)과 열처리로 죽인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 배양한 뇌심장조직배지(BHI)에 40마리씩 올려놓고 20℃에서 배양하였다. 2일 후 각각의 생존율을 조사하였고 이와 같은 실험을 총 6회 실험하여 평균값을 그래프로 나타내었다. 검정막대는 비병원균 고초균(*Bacillus subtilis*)이 처리된 배지를 나타내며 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 열처리로 죽인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 환경에서의 생존율은 각각 밝은 회색막대와 어두운 회색막대로 나타내었다.

Collection @ chosun

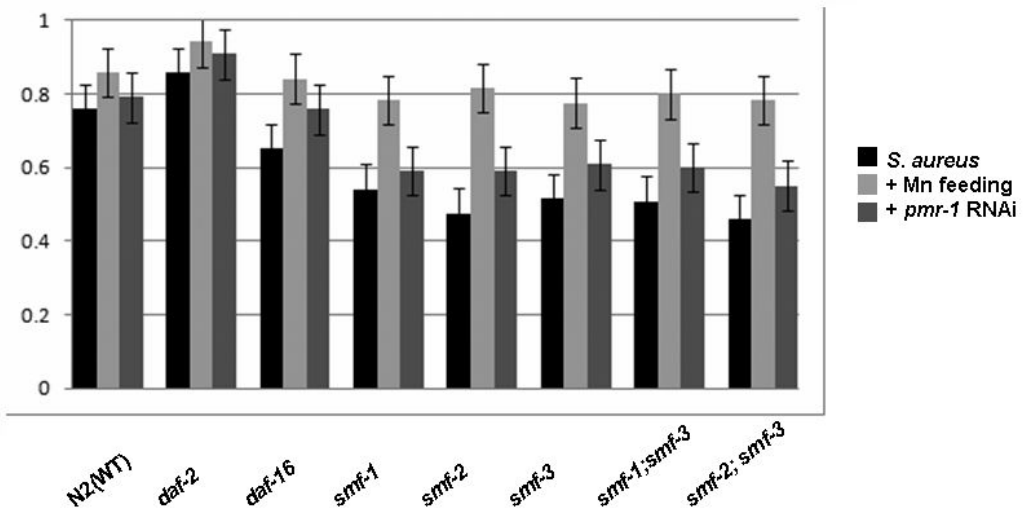


Collection @ chosun

그림 10. 망간(Mn^{2+})을 보충하거나 *pmr-1* RNA간섭방법(RNAi) 처리한 정상형 N2, *daf-2*, *daf-16* 그리고 *smf* 유전자가족 돌연변이들의 병원균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에서의 생존율

정상형 N2(wild type), 단일 *smf* 유전자가족 돌연변이, *smf* 유전자가족 이중돌연변이, 각종 스트레스에 저항성을 갖는 *daf-2* 돌연변이와 민감성을 보이는 *daf-16* 돌연변이가 실험에 이용되었다. 유충 L4단계를 갓 지난 젊은 성체들을 1mM $MnCl_2$ 선충배지(NGM)에 약 24시간 정도 키운 뒤 다시 일반 선충배지(NGM)에서 약 24시간동안 배양하였다. 그 후에 선충을 병원균(pathogen) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 40마리씩 올려놓고 20℃에서 배양하였다. 2일 후 각각의 생존율을 조사하였고 이와 같은 실험을 총 6회 실시하여 평균값을 그래프로 나타내었다. 검정막대는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 처리한 배지의 생존율을 나타낸 것이고 망간을 처리한 배지와 골지-망간(Golgi-Mn) 펌프로 알려진 *pmr-1*을 RNA 간섭(RNAi)방법으로 처리한 배지는 각각 밝은 회색막대와 어두운 회색막대로 나타내었다.

Collection @ chosun

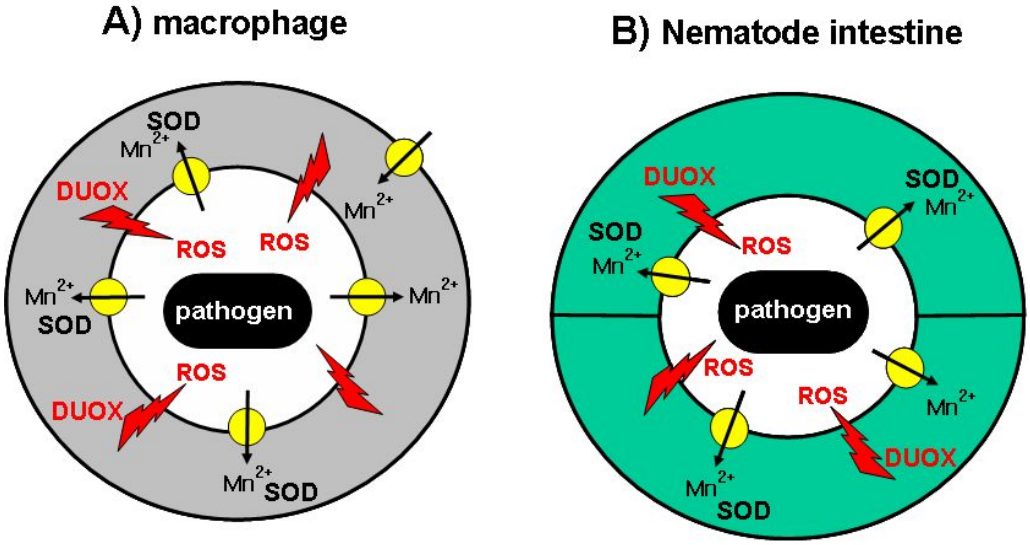


Collection @ chosun

그림 11. 대식세포(macrophage)와 선충 내장의 선천면역 모델

대식세포(macrophage)는 병원균이 숙주내로 들어오면 식포(phagosome)를 형성하고 식포 내부로 듀옥스(NADPH oxidase; DUOX)에 의해 만들어진 활성산소(ROS)를 주입하여 병원균을 죽이는 식균기작을 한다. 이 과정에서 무기인 활성산소(ROS, 붉은 번개모양)로부터 숙주 자신은 해를 입지 않기 위해 항산화기작을 필요로 한다. 망간 수송체인 자연-저항 대식세포 연관 단백질(Nramp, 노란 원)은 식포내의 망간을 세포질 쪽으로 이동시킨다(A). 이와 유사한 기작이 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 내장에 존재할 것으로 예상된다(B). 자연-저항 대식세포 연관 단백질(Nramp)의 유사체인 *smf* 가족은 붉은색 원으로 표시하였고, 장세포에서 강하게 발현되었다. *smf* 가족 돌연변이들은 자연-저항대식세포 연관 단백질(Nramp) 돌연변이가 저하된 면역기능을 앞선 실험에서 보여 주듯이 병원균의 감염에 매우 민감하였다. 수송된 망간은 대식세포(macrophage)의 망간-항산화효소(Mn-superoxide dismutase; Mn-SOD)작용에 보조인자로 이용된다. 망간 수송으로 인해 낮아진 식포내의 망간농도는 병원균을 더욱 효과적으로 산화시키도록 한다(A).

Collection @ chosun



Collection @ chosun

참고문헌

1. Halliwell, B. and Cross, C. E. "Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress." Environ Health Perspect, *102*:5 - 12, 1994.
2. Malin, H., Lina M. O., Kyra, A. G. and Rikard, H. "The protective role of ROS in autoimmune disease." Trends in Immunology, *30:*201-208, 2009.
3. Wang, D., Kreutzer, D. A. and Essigmann, J. M. "Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions." Mutat Res, *400*:99-115, 1998.
4. Baran, C. P., Zeigler, M. M., Tridandapani, S. and Marsh, C. B. "The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes." Curr Pharm Des, *10*:855-66, 2004.
5. Ozawa, T. "Genetics and functional changes in mitochondria associated aging." Physiol Rev, *77*:425-464, 1997.
6. Cheton, P. L. and Archibald, F. S. "Manganese complex and the generation and scavenging of hydroxyl radicals." Free Radic Biol Med, *5*:325-333, 1988.
7. Klaassen, C. D. Amdur, M. O., Doull, J. and Casaren. "The basic science of poisons." Macmillan Publishing Company, New York(NY), 717-18, 1996.
8. Hussain, A. and Ali, S. F. "Manganese scavenges superoxide and hydroxyl radicals: an in vitro study in rats." Neurosci Lett, *261*:21-24. 1999.
9. Wendel, A., Feurstein, S. and Konz, K. H. "Acute paraceramol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo." Biochem Pharmacol, *28*:2051-5, 1979.
10. Baran, C. P., Zeigler, M. M., Tridandapani, S. and Marsh, C. B. "The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes." Curr. Pharm, *10*:855 - 66, 2004.

Collection @ chosun

11. Harper, M. E., Bevilacqua, L., Hagopian, K., Weindruch, R. and Ramsey, J. J. "Aging, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling." Acta Physilo Scand, *182*:321-331, 2004.

12. Knight, J. A. and Voorhees, R. P. "Peroxidation of linolenic acid catalysis by transition metal ions." Anal Clin Lab Sci, *20*:347-52, 1990.

13. Brenner, S. "The genetics of *Caenorhabditis elegans.Genetics*." Genetics, *77*:71 - 94, 1974.

14. Blackwell, J. M., Searle, S., Goswami, T. and Miller, E. N. "Understanding the multiple functions of Nramp1." Microbes Infect, *2*:317-321, 2000.

15. Jenefer, M. C., Howard, B., Jacqueline, K., Susan, S., Anne-Marie, B., Hazel W. and Marie-Anne, S. "Genomic organization and quence of the human NRAMP gene: identification and mappying of a promoter region polymorphism." Mol Med, *1*:194-205, 1995.

16. Daniel, A., Irene, M. M., Joseph, A. M., Philip, D. B. and Sanjeev, K. "Mycobacterium tuberculosis Expresses a Novel pH-dependent Divalent Cation Transporter Belonging to the Nramp Family." The Journal of Experimental Medicine, 717-724, 1999.

17. Larsen, P. L., Albert, P. S. and Riddle, D. L. "Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans.*" Genetics, *139*:1567-83, 1995.

18. Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C. and Ruvkun, G. "*DAF-16* target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism." Science, *300* :644-7, 2003.

19. Coleen, T., Murphy, Steven, A., McCarroll, Cornelia, I. B., Andrew, F., Ravi S. K., Julie, A., Hao, L. and Cynthia, K. "Genes that act downstream of *DAF-16* to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans.*" Nature, *424*:277-83, 2003.

Collection @ chosun

20. Cho, J. H., Ko, K. M., Gunasekaran, S., Ahnn, J. "*Caenorhabditis elegans* PMR1, a P-type calcium ATPase, is important for calcium/manganese homeostasis and oxidative stress response." FEBS Letters, *579*:778-782, 2005.

21. Artwork by Altun and Hall, http://www.wormatlas.org.

dCollection @ chosun

감사의 글

어느 덧 짧지 않은 대학원 생활을 마치고 '감사의 글'을 접하려니 많은 아쉬움과 후회가 듭니다. 그동안 많은 도움을 주신 분들에게 감사인사를 전하지 못하여 그 마음이 더 그러한 것 같습니다. 그 분들에게 늦었지만 이글을 통해서 짧은 감사 인사를 드리고 싶습니다.

먼저 여기까지 오는데 세심한 지도와 많은 격려를 해주시고 소중한 경험을 해주시게 한 저의 조정훈 지도교수님, 교수님이 계시지 않았다면 저는 이 자리에 올 수 없었을 것입니다. 그리고 오랜 시간 동안 아낌없는 지도를 해주신 심사위원장 이용보 교수님, 좋은 말씀으로 힘이 되어주시는 이규배 교수님, 저를 당신 실험원처럼 아껴주시고 항상 밝게 웃어주시던 조은희 교수님, 그리고 마지막까지 아낌없는 지도를 해주신 신동훈 교수님께 머리 숙여 감사 인사를 드립니다.

대학 생활에 없어서는 안 될 식구 임용운 선생님, 학부시절부터 함께해온 멋진 동기 정지이 선생님, 항상 신세만 지는데 웃어주며 도와주는 임가영 선생님, 물심양면으로 도와주시고 조언과 격려를 아끼시지 않는 선배님들 이미경 선생님, 김송희 선생님, 우리 뷰티 클럽을 결성하여 삭막한 대학원에 활기를 불어넣게 해주신 신주란 선생님, 귀엽고 최강 깜찍 황아영 선생님, 이름처럼 아름다운 미스코리아 장미선생님까지 너무나 감사드립니다. 당신들이 없었다면 대학원을 즐겁게 지낼 수 없었을 것입니다.

나의 둥이 선영이, 상큼쟁이 경신이, 대략태희 서영이, 최강단아 명화, 오랜친구 지향이와 솔, 평생 인연 희현언니 곁에 있어줘서 너무 고마워. 너무나 값진 내 친구들이 있어서 난 너무 행복해요. 평생토록 지금처럼 함께해요.

이제껏 너무나 큰 사랑을 베풀어주신 너무나 사랑하는 저희 가족들 할아버지, 할머니, 아빠(선종삼님), 엄마(김영희님), 언니(선미라님), 형부(최현철님), 동생들(정아, 원찬) 예쁜 딸로, 형제로써 살면서 뿌듯해 하실 수 있도록 그 은혜에 보답하겠습니다. 그리고 또 하나의 소중한 가족 아버님(김문식님), 어머님(안광덕님), 아주버님(김지윤님), 많이 부족한 저를 너그러이 이해해주시고 딸처럼 예뻐해 주셔서 전 너무 행복합니다. 또 하나의 가족이라는 존재가 얼마나 큰 힘이 되는지 몰라요. 너무 감사드립니다.

마지막으로 삶의 이유이자 평생의 동반자 남편(김치윤님)! 여기까지 같이 와준 거 너무 고맙구 당신 덕에 해낼 수 있었어요. 지금까지 살아온 세월보다 같이 지낼 시간이 더 많이 남은 우리들, 지금처럼 노력하며 행복하게 살아요. 당신을 너무 사랑합니다.

이 모든 행복을 주신 나의 소중한 주님께 감사드립니다. 2009년 6월 선주리

Collection @ chosun

저작물 이용 허락서

학 과	생물교육	학 번	20068233	과 정	석사
성 명	한글: 선주리 한문 : 宣周理 영문 : Ju Lee Sun				
주 소					
연락처	E-MAIL : darlinglover@naver.com				
논문제목	한글 : 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용한 망간항성성이 병원균 감염에 미치는 영향에 대한 연구 영어 : Studies on the Effects of Manganese Homeostasis on Pathogen Infection in *C. elegans*				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집・형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2009년 6월 24 일

저작자: 선 주 리 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하